



多酚氧化酶导论

胡婉峰 编著



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社



国家自然科学基金项目资助出版

多酚氧化酶导论

胡婉峰 编著



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

多酚氧化酶导论/胡婉峰编著. —武汉: 武汉大学出版社, 2016. 7
ISBN 978-7-307-18481-7

I. 多… II. 胡… III. 氧化酶 IV. Q554

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 177085 号

封面图片为上海富昱特授权使用(© IMAGE MORE Co., Ltd.)

责任编辑: 陈帆 李汉保 责任校对: 汪欣怡 版式设计: 韩闻锦

出版发行: 武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件: cbs22@whu.edu.cn 网址: www.wdp.com.cn)

印刷: 虎彩印艺股份有限公司

开本: 720 × 1000 1/16 印张: 13 字数: 188 千字 插页: 1

版次: 2016 年 7 月第 1 版 2016 年 7 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-18481-7 定价: 39.00 元

版权所有, 不得翻印; 凡购我社的图书, 如有质量问题, 请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

近四十年来,有关多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)的研究十分活跃,这些研究被扩展到生物化学、酶学、微生物学、植物生理学等诸多学科。随着生化技术的不断进步,有关多酚氧化酶的理论研究也不断深入。酶的晶体结构、酶反应动力学、酶催化机制、酶结构和功能的关系等相继被提出或证实。

多酚氧化酶在自然界中广泛存在。在动物、植物、真菌和细菌中,多酚氧化酶都发挥着重要的作用,如氧化色素、硬化作用、初次免疫应答反应、防御反应等。多酚氧化酶的分布、细胞定位、氨基酸序列、分子大小、糖基化和激活反应等因物种的不同而不同。因此对于其具体的生理功能,大部分仍是未知的。具体来讲,在氧气的参与下,PPO催化两类反应:一类是单酚类发生羟基化反应生成苯二酚(甲酚酶,酪氨酸酶或单酚的氧化酶活性[EC 1.10.3.1]);另一类是二羟基酚类发生脱氢作用生成二醌类(儿茶酚酶,二元酚氧化还原酶活性[EC 1.10.3.2])。醌类是高活性的亲电体,可以参与两种非酶催化反应:*o*-醌类通过加成反应生成细胞亲核物质;醌类还可以通过歧化作用转变成半醌基团。随后,半醌基团既可以与其他分子共价结合,又可以争夺氧分子的一个电子,使氧分子变成超氧阴离子基团($O_2^{\cdot -}$)。醌类物质发生这一系列的反应后,最终形成黑褐色物质。这两类反应过程中所产生的中间体和终产物非常复杂。这些化合物在什么情况下通过多酚氧化酶的催化作用而被合成,最终又进入哪些体内代谢支路,以及其在生物体中发挥怎样的作用,人们怎么利用和控制这些反应,等等,这些问题激发了研究者强烈的兴趣。研究者对这些理论问题的深入探讨,极大地丰富了多酚氧化酶的理论体系,使关于这一具有多种可

能性的酶的研究逐渐成熟起来。

虽然国内外有关多酚氧化酶的学术论文很多,但至今还没有一本专门的学术著作。为了较全面地介绍多酚氧化酶的理论基础和实际应用的知识和成果,着力于阐述对多酚氧化酶研究过程中取得的进展、尚未解决的问题以及应用于该酶的新兴方法和技术,笔者编著了《多酚氧化酶导论》这本专著。全书共分为5章,第1章主要讲述了多酚氧化酶的分类及结构特点,包括多酚氧化酶的命名、3型铜蛋白的特点以及多酚氧化酶的活性中心结构特征。第2章主要讲述了多酚氧化酶在生物界的生理功能,包括多酚氧化酶在体内的定位,其在抗逆生理、发育控制、光合作用等过程中发挥的作用等。第3章主要讲述了多酚氧化酶的理化特点,包括多酚氧化酶的最佳催化反应条件、激活剂、多酚氧化酶的生物多样性等。第4章主要介绍了多酚氧化酶活性的抑制方法,包括物理方法、化学方法和生物方法等。第5章主要介绍了多酚氧化酶在诸多领域的应用,比如医学领域、化工领域等。

有关多酚氧化酶的研究持续近80年,该酶负责催化高等动物、植物、真菌和细菌的色素形成。本书将集中于已知信息的收集和分类。本书通过突出多酚氧化酶特性描述时出现的问题、解决问题时所取得的进展、尚未解决的问题以及应用于阐述酶系统的新兴方法论,展现多酚氧化酶家族的复杂性,由此对该领域的进一步研究提供一定的参考。

本书可以作为高等院校生物类、食品科学类专业本科生、研究生的参考书,亦可以供食品、轻工行业的科研人员和企业技术人员查阅参考。

由于时间仓促,书中尚有不足之处,希望各位专家、读者多提宝贵意见,给予批评、指正。

胡婉峰

2016年5月

目 录

1 多酚氧化酶的分类和结构特征	1
1.1 多酚氧化酶的种类与命名	1
1.2 具有催化功能的 3 型铜蛋白	4
1.3 CO 的结构	13
1.4 TYR 的分子结构	20
1.5 漆酶的分布和结构	25
1.6 结构与功能的关系	38
参考文献	40
2 多酚氧化酶的酶学特性	53
2.1 多酚氧化酶的分子量	53
2.2 多酚氧化酶的反应特点	54
2.3 多酚氧化酶的酶学性质	66
2.4 多酚氧化酶的多样性	71
2.5 活化剂的潜伏期和影响	82
2.6 新学科和技术在酶学性质研究方面的应用	88
参考文献	90
3 多酚氧化酶的生理功能	107
3.1 多酚氧化酶在植物中的定位及分区化	107
3.2 多酚氧化酶反应产物的作用	110
3.3 多酚氧化酶的生理功能	111
3.4 真菌 TYR 的生理功能	122
3.5 漆酶的生理功能	123

3.6 未来的挑战	128
参考文献.....	130
4 多酚氧化酶的抑制	140
4.1 多酚氧化酶在食品工业中的重要性	140
4.2 问题的生化基础	141
4.3 多酚类化合物	143
4.4 酶促褐变的控制	146
4.5 化学抑制	148
4.6 物理抑制	176
参考文献.....	180
5 多酚氧化酶的应用	189
5.1 酪氨酸酶	189
5.2 漆酶	195
参考文献.....	200

1 多酚氧化酶的分类和结构特征

1.1 多酚氧化酶的种类与命名

多酚氧化酶(PPO), 亦称多酚酶或酚酶, 是存在于高等动物、植物、真菌和细菌内的大型酶家族, 其主要特点是酶活性位点有双铜原子。当存在分子氧时, PPO 能够催化氧化单酚类和多酚类物质, 生成有色邻苯醌化合物, 随后邻苯醌非酶促进聚合形成黑色素 (Weemaes and Ludikhuyze et al., 1998)。

根据国际生化联合会 (International Union of Biochemistry) 命名委员会统计, 多酚氧化酶的名称在动物、植物、细菌和真菌中有所不同, 其催化功能也有所不同。它们属于同一组酶, 根据其底物可以分成若干种酶, 称为儿茶素氧化酶、酚酶、多酚氧化酶、酪氨酸酶、儿茶素酶或甲(苯)酚酶, 但与漆酶有着明显的不同。由于其催化功能上有较大的相似, 因而研究中对其名称的使用似乎并不特别严格。目前相关文献中使用较多的名称是多酚氧化酶和酪氨酸酶。建议在动物中使用酪氨酸酶, 而在植物中应使用多酚氧化酶为宜。国际生物化学和分子生物学联盟的命名委员会对单酚酶活性 (EC 1. 14. 18. 1) 和儿茶酚酶活性 (EC 1. 10. 3. 1) 进行了区分, 但对酪氨酸酶和儿茶酚氧化酶不作区分。

按照催化底物的不同, 多酚氧化酶可以被分为单酚氧化酶 (tyrosinase, EC1. 14. 18. 1) 和二酚氧化酶 (EC 1. 10. 3. 2) 等。

根据甲酚酶或者单酚酶活性的有无, 多酚氧化酶的亚类可以分为酪氨酸酶或儿茶酚酶, 酪氨酸酶首先催化氧化单酚成邻苯二酚 (单酚酶活性; EC 1. 14. 18. 1), 随后催化邻苯二酚氧化成邻醌的

反应(儿茶酚酶活性; EC 1.10.3.1)。儿茶酚酶对邻苯二酚的氧化是特异性的,只能催化氧化邻苯二酚成邻醌。这两个亚类通常都被称为多酚氧化酶,这种简易表征方法,是因为有一些儿茶酚酶实际上是酪氨酸酶,只是它的单酚酶活性没有被发现,与酪氨酸酶活性相比较,要观察到单酚酶活性需要更特殊的条件(Yoruk and Marshall, 2003),如图 1-1 所示。

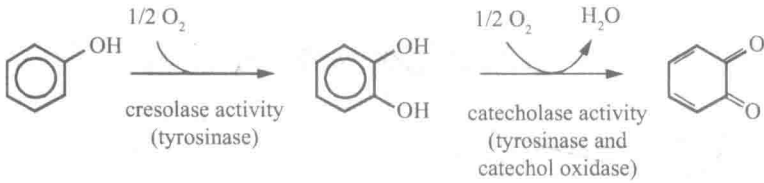


图 1-1 酪氨酸酶和儿茶酚氧化酶催化氧化的反应途径

1.1.1 单酚单氧化酶 (Monophenol monooxygenase) (EC 1.14.18.1)

单酚单氧化酶也被称为酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR)、酚酶 (Phenolase)、单酚氧化酶 (Monophenol oxidase)、甲 (苯) 酚酶 (Cresolase)。这个甲酚酶活性使酶接受一元酚 (如酪氨酸或甲酚) 作为底物。该活性负责单酚羟基化, 形成邻苯二酚, 但生成的邻苯二酚并不从活性中心释放, 并紧接着氧化形成邻苯醌。在只有 1, 2-苯二酚做底物时, 也能发生 EC 1.10.3.1 的催化反应。

1.1.2 儿茶酚氧化酶 (Catechol oxidase, CO) (EC 1.10.3.1)

CO 也被称为双酚氧化酶 (Diphenol oxidase)、*o*-双酚酶 (*o*-Diphenolase)、酚酶 (Phenolase)、多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase)。

同时, CO 也被称为邻二酚氧化酶, 是一个 3 型铜蛋白。根据官方命名法, CO 被称为 1,2-苯二酚: 氧 氧化还原酶, 表明氧是第二底物。CO 仅仅催化儿茶酚的氧化 (即邻-二酚), 生成相应的醌

(称为儿茶酚氧化酶活性)，如图 1-1 所示。

与 CO 不同，作为上述 3 型铜蛋白的另一成员酪氨酸酶，除了二酚酶活性，也显示出额外的单加氧酶的活性(如图 1-1)。CO 被发现于植物组织、一些昆虫和甲壳类动物中，而 TYR 的分布更为广泛，在植物、真菌、细菌、哺乳动物、甲壳类和昆虫中都能分离出 TYR。CO 和 TYR 的区分并不严格，一些植物 CO 也呈现弱的单加氧酶的活性。然而，这些 CO 经常不以酪氨酸作为底物。尽管如此，CO 有时也被描述为 TYR，此外，多酚氧化酶、二酚氧化酶、酚氧化酶也常常被用于这两种酶，但是这些名称缺乏对 TYR/CO 和漆酶进行功能区分的必要精度。

1.1.3 漆酶(Laccase)(EC 1.10.3.2)

漆酶(EC1.10.3.2，对苯二酚：氧氧化还原酶或者对二酚氧化酶)催化对苯二酚，对 *o*-和 *p*-醌有较低的特异性，可以广泛地氧化邻、间和对二酚。经常与氨基酚和邻苯二氨反应，半醌可能进一步发生酶促或非酶促反应。漆酶还可催化邻苯二酚、氨基酚、多胺类、芳基二元胺以及某些无机离子的直接氧化。

与其他 PPO 不同的是，漆酶可以催化对苯二酚类底物，这一特异的催化氧化能力使其区别于其他 PPO，如图 1-2 所示。在蘑菇中，可通过使用选择性抑制剂观察漆酶和 PPO 对选择性底物的结合差异，从而对它们进行区别(Flurkey and Ratcliff et al., 1995)。

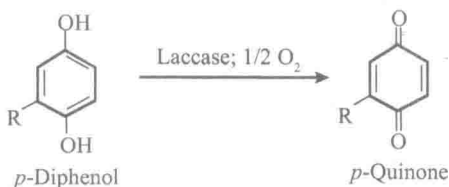


图 1-2 漆酶催化反应

漆酶是使用分子氧通过自由基催化的反应机制，以氧化各种芳香族和非芳香族化合物的多铜蛋白。这一类酶参与生物体的致病

性、免疫和形态发生等方面,在复杂的有机物质如木质素或腐殖物质中参与代谢更新。由于具备高度的非特异性氧化能力,漆酶可以作为有用的生物催化剂。在系统发育上,漆酶是多铜蛋白家族的成员,多铜蛋白家族还包括抗坏血酸氧化酶、血浆铜蓝蛋白和胆红素氧化酶。

1.2 具有催化功能的 3 型铜蛋白

1.2.1 氧和金属蛋白

在大多数活有机体中,氧分子的运输、激活和代谢都是非常重要的过程。这些功能通常是由含有铁或铜的金属蛋白来实现的。含铁血红素蛋白,例如,血红蛋白和肌红蛋白(氧分子运输)、细胞色素 C 氧化酶(活化和还原氧分子)以及过氧化物酶(消除自由基中间体的)都是这一类型的典型蛋白。含铁或含铜的金属双核中心的其他金属蛋白则作为实现生物功能的替代蛋白。这一类型的蛋白是氧分子转运蛋白,如蚯蚓血红蛋白(铁)和血蓝蛋白(铜)。有一类蛋白的双核金属中心与氧分子转运蛋白的很相似,其功能不是氧分子运输而是酶的催化(Gerdemann and Eicken et al., 2002)。自 1949 年以来,已明确植物 PPO 是一种金属蛋白,该酶活性中心含有铜原子,这些铜原子能够运输氧分子或参与氧分子的新陈代谢(Arnon, 1949)。

1.2.2 蛋白质中铜中心的三大经典类型

光谱学的发展将铜蛋白归类为三大家族。根据这些蛋白的光谱特性,三种类型蛋白的活性位点的主要区别在于铜蛋白的不同(Malmstrom, 1982)。第一类是 1 型家族,或称为蓝铜中心,这类蛋白的活性中心包含铜原子并且负责电子传递。第二类是 2 型家族,包括尤指多巴胺- β -单氧酶在内的多种酶,无蓝铜中心,表现出氧化酶及半乳糖氧化酶活性。第三类是 3 型家族。3 型家族活性位点包含两个铜原子,功能在于结合并传递分子氧。PPO 家族归

属 3 型, 由血蓝蛋白和具有儿茶酚酶活性和酪氨酸酶活性的酶组成 (Solomon and Sundaram et al., 1996; Gerdemann and Eicken et al., 2002)。最近, 在链霉菌属 (*Streptomyces murayamaensis*) 中发现第四类铜蛋白, 它能够羟基化邻氨基酚, 形成邻亚氨基酚, 但不同于酪氨酸酶, 它不能羟基化单酚 (Noguchi and Kitamura et al., 2010)。

1.2.2.1 1 型铜蛋白

1 型铜中心, 即所谓的“蓝铜中心”在电子转移蛋白, 如质体蓝素 (plastocyanin) 和阿苏林 (azurin) 中发现。其深蓝色的颜色是由 Cys S-Cu(II) 的一种强烈的电荷转移过渡引起的 ($\epsilon > 2000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)。在 EPR 光谱中, 平行 $^{63}\text{Cu}^{65}\text{Cu}$ 超精细分裂比六水合 Cu(II) 配合物的值小很多。蓝铜蛋白的晶体结构表明, 该金属中心有一个强烈扭曲的四面体配位层, 与理想四面体角有 22° 的差异 (Shepard and Anderson et al., 1990)。这一扭曲的四面体配位层结构可能是对应于 Cu(II) (正方形平面) 和 Cu(I) (四面体) 配位几何之间的“过渡状态”。

1 型铜的这一个四面体配位层, 有两个组氨酸和半胱氨酸作为保守赤道线配体和一个作为变量的轴向配体。在细菌 (CotA) 中, 这一轴向的配体是细菌蛋氨酸, 在真菌漆酶中, 是亮氨酸或苯丙氨酸。目前学者广泛认为, 这种轴向位置的配体强烈地影响酶的氧化电势, 可能提供用于调节其活性的机制。从苯丙氨酸到蛋氨酸的突变会显著降低 *Trametes villosa* 真菌漆酶的氧化电势 (Kumar and Phale et al., 2003)。1 型铜赋予多铜蛋白典型的蓝色, 这主要是由于铜-半胱氨酸共价键的强烈电子吸收造成的。由于其较高的氧化还原电位 (ca. +790 mV), 底物氧化发生于 1 型铜位点。

1.2.2.2 2 型铜蛋白

“非蓝-铜中心”, 形成 2 型中心。它们在氧化酶中被发现, 如半乳糖氧化酶、氧合酶和多巴胺- β -单加氧酶。此外, 2 型铜中心出现在铜、锌-超氧化物歧化酶的双核金属部位。2 型铜中心有一个特征正方形平面的配位层结构。从六水合 Cu(II) 复合物可知 Cu(II) 的光谱行为 (UV/VIS, EPR)。2 型铜在可见光谱中没有被吸收, 在 EPR 研究中显示出顺磁特性。

1.2.2.3 3型铜蛋白

相对于单核铜位点, 3型铜中心包含两个铜原子。3型铜蛋白双核中心的光谱特征在于 330 nm(氧化态)的电子吸收且同时由于双铜的反铁磁耦合而缺少 EPR 信号。另一种蛋白超家族包括酪氨酸酶和血蓝蛋白(Decker and Terwilliger, 2000)也具备 3型铜中心的共同特征。

2型铜和 3型铜可形成三核集群, 减少分子氧和水的释放发生。2型铜由两个组氨酸配位。3型铜原子由 6个组氨酸配位。3型铜蛋白的两个铜原子之间的强反铁磁耦合, 由羟基桥维持。

3型铜中心蛋白可以作为加氧酶/氧化酶, 或者氧运输蛋白。血蓝蛋白(HC)即是一种氧载体蛋白, 是 3型铜蛋白的一个典型代表。HC 可以根据它们的生物来源分为两类: 节肢动物(例如龙虾和蜘蛛)和软体动物(例如章鱼和蜗牛)的血蓝蛋白。它们有不同的亚单位, 并且只有微弱的进化关系。数年来, 两种节肢动物——龙虾和鲎的 HC 已经有明确的晶体结构。一种软体动物 HC(巨型章鱼)的亚基也被结晶, 其 3D 结构也被鉴定。

多酚氧化酶也是典型的 3型铜蛋白。如上所述, 包括 CO 和 TYR。在生理催化过程中, 含铜的金属蛋白与分子氧的可逆结合能力及蛋白对分子氧的激活能力起着关键作用。双铜蛋白中, 血蓝蛋白、酪氨酸酶和二酚氧化酶都包含一个双核中心。这个 3型铜中心以特殊的侧接桥联形式, 结合分子氧, 从而导致分子氧的激活, 并形成特征氧结合蛋白: (1)铜元素的电子之间有强烈的反铁磁耦合; (2)在 750 cm^{-1} 的共振拉曼光谱中有较低能量的 O-O 拉伸振动; (3)在 $\sim 600\text{ nm}$ ($\epsilon \sim 1\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和 $\sim 350\text{ nm}$ ($\epsilon \sim 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 处有典型的电荷转移带(Solomon and Sundaram et al., 1996)。除了双铜中心相似的几何结构和电子结构之外, 这些蛋白具有不同的生理功能: 血蓝蛋白是节肢动物和软体动物中氧的转运和存储蛋白; 酪氨酸酶催化邻位酚的羟基化, 并进一步氧化儿茶酚为醌类(Lerch, 1983)。

多酚氧化酶缺乏水解酶活性, 但在氧化邻苯二酚的过程中能够催化 2个电子的转移反应, 所得的产物醌具有高反应性, 能够自动

聚合形成棕色多酚类黑色素。这一过程可以保护受损植物免受昆虫或病原体的破坏。

TYR, CO 和 HC 之间的功能和结构上的差异被混淆了很长一段时间, 因为最初只有节肢动物的 HC 有详细的结构信息。TYR 的三维结构尚不清楚, 而软体动物的 HC 和植物的 CO 的结构数据使人们能够更深入地了解 3 型铜蛋白的活性位点。

1.2.2.4 其他铜蛋白

有些铜蛋白, 如漆酶、抗坏血酸氧化酶和血浆铜蓝蛋白不属于这三种经典类型 (Lippard and Berg, 1994)。这些蛋白质的铜位点包括三核簇部分, 经常被描述为一个 2 型和 3 型中心的结合。在抗坏血酸氧化酶中, 一个 1 型铜中心与这样的三核簇单元距离为 13Å (Dawley and Flurkey, 1993)。其他两种铜中心类型——CuA 和 CuB——也能在包含几个非铜金属中心的细胞色素 C 氧化酶中发现 (Lippard and Berg, 1994)。漆酶是一个有 4 个铜离子的三核簇, 如图 1-2 所示。漆酶是蓝色多铜氧化酶 (MCO) 中最大的子群, 利用铜离子特殊的氧化还原能力催化广泛的芳香族底物, 同时将分子氧还原为水。在 200 余种氧化酶和加氧酶中, 仅有 6 类酶 (细胞色素 c 氧化酶、漆酶、L-抗坏血酸氧化酶、铜氧化酶、胆红素氧化酶、吩噻嗪酮合成酶) 可催化这种类型的氧化反应。

1.2.3 DNA 序列与蛋白质一级结构

某研究确定了 47 个物种的 PPO 序列 (来自于动物、植物、真菌和细菌), 结果表明 PPO 序列的巨大差异几乎无法在物种间进行分类 (Malviya and Srivastava et al., 2011)。但值得注意的是, PPO 家族的共性在于所有成员的催化位点有高度序列同源性 (Decker and Schweikardt et al., 2006), 因此暗示这些成员在进化上有共同的祖先。

植物 CO 的 cDNA 由 3 个翻译区域组成, 一个是编码 9 kD 的通向叶绿体的转运肽, 一个成熟蛋白和一个未知功能的附加 C-末端延伸肽。这个约 15 kD 的 C-末端延伸肽在纯化过程中会被裂解

(Mayer and Harel, 1979)。负责裂解该肽的蛋白质目前没有被鉴定出来, 而且其功能和裂解的控制机制仍不清楚。从细菌 TYR 也发现类似的 C-末端延伸肽, 目前认为延伸肽的裂解会激活酶 (Van Gelder and Flurkey et al., 1997)。

PPO 基因在细胞质中合成含有信号肽的前体肽, 大小为 60~75 kD。PPO 包括 3 个结构域: 一个 N 端 8~12 kD 的信号肽, 一个中部高度保守的 Cu 结合区和一个 C 端疏水结构区 (Tran and Taylor et al., 2012)。两个高度保守的铜结合区 CuA 和 CuB 负责铜与氧分子和酚类底物的协调联动。相关研究表明, 大多数 PPO 含有信号肽, 它可将 PPO 蛋白锚定于类囊体腔 (Steffens and Harel et al., 1994)。只有金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的 PPO 前体肽 N 端序列不具信号肽结构, 且 PPO 定位于液泡 (Nakayama and Yonekura-Sakakibara et al., 2000; Ono and Hatayama et al., 2006)。

从蛋白质的生物来源来看, 7 个不同来源的域已被识别, 如图 1-3 所示。高等真核生物和植物的 TYR 和 CO 具有全部的 3 个结构域, 仅在编码 C-末端延伸肽的某些特性区域有所不同。真菌和细菌的 TYR 缺少一个转运肽的编码域 (Van Gelder and Flurkey et al., 1997)。此外, 细菌的 TYR 具有较短序列, 这导致成熟蛋白质的分子量 < 30 kD。昆虫和甲壳动物的 TYR 和 CO 与前面提到的 4 种不同, 但与节肢动物的血蓝蛋白是相关的。它们还存在潜伏形式, 但不同于植物 CO, 它们通过 N-末端区的裂解而被激活。相对于前述的 TYR 和 CO, 这两类 HC 还显示出一些附加区域。

不同植物的 CO 具有 40%~60% 的序列同一性。植物 CO 和软体动物 HC 之间的序列同一性 (约超过几乎整个序列长度的 35%) 也是值得一提的。与此相反, 非植物来源的其他 3 型铜蛋白和植物 CO 之间的序列同一性仅限于两个铜结合的区域。

基于酪氨酸酶蛋白全序列的进化分析显示, 真菌酪氨酸酶成簇地分布于担子菌门、子囊菌门和半知菌门中。这些观察结果基于数量资料的同一性, 例如血红密孔菌与漏斗多孔菌、香菇菌酪氨酸酶表现出极高的同一性 (分别为 67% 和 56%) (Morinaga, 2003) 和相

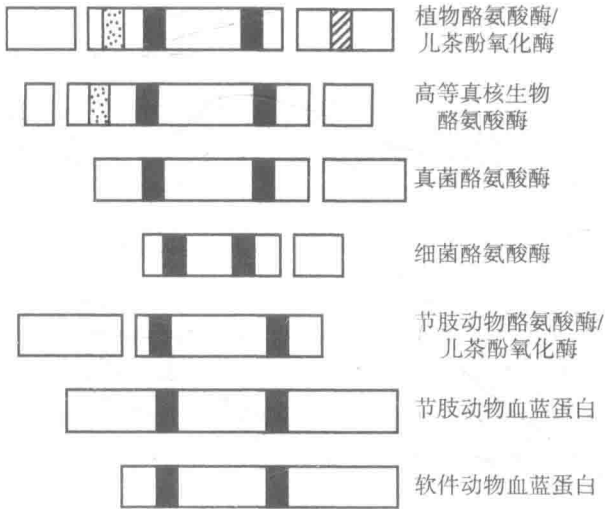


图 1-3 3 型铜蛋白的一级结构。片段的长度与氨基酸残基的数量成正比。铜结合区中高组氨酸区用黑色块标记，高半胱氨酸区用黑点标记，植物儿茶酚氧化酶的 C 端延伸区中额外的高组氨酸区用斜杠标记 (Gerdemann and Eicken et al., 2002)。

似性(分别为 75% 和 67%)(Sato, 2001)。通过比较担子菌门内血红密孔菌、漏斗多孔菌、香菇菌和双孢蘑菇菌、半知菌门内烟曲霉和米曲霉以及子囊菌门内粗糙脉孢菌和柄孢壳菌属的酪氨酸酶全序列，发现它们在最初的 300 个氨基酸残基内具有重要的相似性，这与铜结合区域(含 3 型铜金属蛋白内高度保守的中心区域)相吻合。过去 10 年内，已分离出多个编码真菌酪氨酸酶的基因，它们在基因长度、外显子数量和同源性上存在高度异质性，例如血红密孔菌酪氨酸酶与其他担子菌门真菌的酪氨酸酶核苷酸序列同源性较低，该酶分别与香菇菌 51% 同源，与漏斗多孔菌 17% 同源，与双孢蘑菇菌仅 7% 同源(Halaouli and Asther et al., 2006)。

两个铜结合的区域在所有 3 铜类型的蛋白质都表现出最高度的保守。尤其是 CuB 的结合区域是高度保守的，而 CuA 结合区域显示出更多的序列多样性，并因此造成 TYR，CO 和 HC 的不同的功

能表现 (Van Gelder and Flurkey et al., 1997)。两个铜配位区如图 1-4 所示。

	088	092		109		118
ibCO	LVHCAY	CN-----	GGYDQVNF	PDQEIQV	HNSWLFFP	-FHRW
hsTYR	WMHY-YV	SMDALLGG-----	SEI-WR	DID-FA	HEAPAF	LP-WHRL
ncTYR	GIHGMP	FKPWAGVPS	DTDWSQ	PGSSG	FGGYCT	HSSILFIT-WHRP
piHC	IHHVTWH	-MDFPF-----	W---W	EDSYGY	HLDRK	GELFFW-VHHQ
lpHC	AHHWHWH	-LVYPST-----	W---N	PKYFG	KKKDR	KGELFFY-MHQQ
hpHC	SFHGK	PGLCQHE-----	GHK	VACSV	SGMPT	FPS-WHRL
odgHC	SYHGIP	LSCHYE-----	NGTAY	ACQ	HGMVT	FFRNWHRL
(a) CuA-site						
	240	244				274
ibCO	ETSPHI	PIHRWVG	DPRN-----	TNNE	DGMNFYS	SAGRDIAFYCHHSN
hsTYR	QSSMHN	ALHIYM-----	NGTMS	QVQG---	SAN-D	PIFLLHHAF
ncTYR	LEAVNE	IHDRTGG-----	NGHMS	SLEV---	SAF-D	PLFWLHHVN
piHC	YGSLHN	TAHVMLGR	QDPHG	KFNLP	PG-V	MEHFETATRDPSFFRLHKY
lpHC	YGNLHN	WGHVTMARI	HDPDGR	FHEEP	G-V	MSDTSTSLRDPIFYNWHRF
hpHC	FEVLHN	ALHSWLGG	HAKYSF	SSLDY	TAF-----	DPVFFLHHAN
odgHC	FEIGHN	AIHSWVG	SSPYGM	STLHY	TSF-----	DPLFYLHHAN
(b) CuB-site						

图 1-4 甘薯儿茶酚氧化酶 (ibCO), 人类酪氨酸酶 (hsTYR), 粗糙脉孢菌酪氨酸酶 (ncTYR), 断沟龙虾血蓝蛋白 (piHC), 罗马蜗牛血蓝蛋白 (hpHC) 以及北太平洋巨型章鱼 (odgHC) 的序列比对。CuB 区域高度保守, 载氧蛋白、单加氧酶和氧化酶的 CuA 区域则各不相同 (Gerdemann and Eicken et al., 2002)。

3 种类型的 3 型铜酶彼此密切相关。这也由一个事实所证实, 即某些 HC 有弱儿茶酚酶活性或可被蛋白水解活化以诱导这种活性 (Van Holde and Miller, 1995)。弱儿茶酚氧化酶活性经常被发现于软体动物和节肢动物的 HC 中, 例如, 章鱼 (*Octopus vulgaris*) HC 以及被胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶水解部分消化后的狼蛛 HC。在狼蛛 HC 中, Decker 和 Tucek 认为其激活作用是因其 N 端区域的蛋白水解的结果 (Decker and Tucek, 2000)。此外, 如上所述, 一些植物 CO 显示出弱甲酚酶活性, 其底物为特殊的一元酚, 如 4-羟基茴香醚 (4-hydroxyanisole)。此活性常常在纯化过程中损失, 可能是由于在活性位点的结构变化引起。HC, TYR 和 CO 也被检测出弱的过氧化氢酶的活性, 即过氧化氢的歧化反应 (Gerdemann and Eicken et al., 2001)。