

# 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展

马俊彦<sup>1</sup>, 杨汝德<sup>1</sup>, 敖利刚<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

(2. 江西省南昌市昌北国际机场边防检查站, 江西 南昌 330114)

**摘要:** 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL, E.C.4.3.1.5) 作为植物次生代谢特别是苯丙烷途径的关键酶, 与植物抵抗病原菌入侵有密切关系, 具有重要的植物生理意义。本文综述了植物 PAL 的存在与分布、分子结构、酶学性质和作用机制, 应用酶学和分子生物学知识阐述了其表达调控机理, 并在基因水平上对 PAL 的分子生物学研究进行了展望, 旨在为今后 PAL 在植物抗病应用上提供基础数据。

**关键词:** 苯丙氨酸解氨酶; 作用机制; 表达调控

中图分类号: Q555+.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)07-0071-05

## Progress in Biological Research of Phenylalanine Ammonialyase

### (E.C.4.3.1.5)

MA Jun-yan<sup>1</sup>, YANG Ru-de<sup>1</sup>, AO Li-gang<sup>2</sup>

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Nanchang Changbei International Airport Frontier Inspection Station, Nanchang 330114, China)

**Abstract:** As a critical enzyme in secondary metabolism of plants, especially in the first reaction of the biosynthesis of L-phenylalanine, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL, E.C.4.3.1.5) has significant biological meaning and strong ability against bacteria. The distribution, molecular structure, enzymatic characters and mechanism of PAL in plants were reviewed. Meanwhile, the regulation mechanisms of PAL was introduced using enzymology and molecular biology. The development of the researches on molecular biology of PAL at the gene level was prospected to provide basic data for the application of PAL in fruit tress disease resistant.

**Key words:** phenylalanine ammonia-lyase; function mechanism; expression and regulation

植物代谢分为初、次两级代谢, 苯丙烷类代谢是次级代谢途径中很重要的一条, 在苯丙氨酸解氨酶作用下, 苯丙烷类代谢完成第一步反应, 生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物, 这些化合物进一步转化为香豆素、绿原酸, 也可以形成苯丙烷酸 CoA 酯, 再进一步代谢转化为一类苯丙素类化合物, 如黄酮体、木质素、生物碱<sup>[1]</sup>, 这些次生产物对植物生长发育、抵御病虫害、防紫外线及构成植物支撑系统等方面具有重要意义<sup>[2]</sup>。苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL, E.C.4.3.1.5) 是植物次生代谢, 特别是苯丙烷途径的关键酶和限速酶, 与植物的抗病性直接相关。植物受病菌侵染后, 通常 PAL 酶活性有所提高, 同时随木质素、绿原酸等抗菌物质合成的增加, 在植物抗病过程中起着化学屏障作用<sup>[3]</sup>。近年来, 迫于安全、生态和环境压力, 新化学农药的开发周期逐年延长, 开发成功率日趋下降, 因而利用植物自身

的防御系统, 提高植物抗病性化学物质的产生成为今后植物防病治虫的新发展方向。

## 1 PAL 的存在与分布

PAL 主要存在与高等植物、部分微生物 (丝状真菌, 酵母及链霉菌) 和某些藻类中, 动物体内尚未发现。1961年, Koukol 和 Conn<sup>[4]</sup> 首次从绿色植物中发现它, 并进行了分离纯化, 随着对 PAL 研究的迅速展开, 在真菌、细菌和藻类中也发现该酶的存在。Towers 和 Czich<sup>[5]</sup> 分别在真菌和某些藻类如 *Dunaliella marina* 中提取过 PAL。金庆超等<sup>[6]</sup> 研究了苯丙氨酸解氨酶活性在玉米抗、感品种和不同生育期与叶鞘位之间存在差异。在玉米 (川单10号) 的不同生育期和叶鞘位中, 随生育期的发展和叶鞘位的下降, 苯丙氨酸解氨酶活性降低。在受纹枯病菌侵染后, 抗病品种 (R15) 的苯丙氨酸解氨酶活性增加的速度和程度明显高于感病品种 (K09)。胡美娇等<sup>[7]</sup> 人对热处理后芒果、香蕉果

收稿日期: 2007-04-23

实果皮PAL活性在贮藏期间的变化与炭疽病发生的关系进行了研究,结果表明:果实采后经热处理和接种,炭疽菌可诱导酶活性增强,即调动了寄主组织抗性反应提高,随着热效应减弱,果实的后熟,酶活性逐渐下降,直至果实完熟时达最低值。在果实发病期间,酶活的高低与炭疽病发生速度和严重程度密切相关。江柯等<sup>[8]</sup>采用玻珠破壁、硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤和离子交换等方法,从L-苯丙氨酸工业生产菌株红酵母中分离纯化PAL,并对其进行了部分酶学性质研究。结果表明:该酶分子量约为79.4 kD,最适反应温度为40℃,最适反应pH为8.5,除了Mg<sup>2+</sup>和Na<sup>+</sup>,其它金属离子如Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>等对其都有明显的抑制作用。细胞水平上,植物的PAL主要分布在表皮下的细胞和微管组织细胞中;亚细胞水平上,PAL定位于细胞质和一些膜细胞器如叶绿体、白色体、线粒体、过氧化酶体等。Jin等<sup>[9]</sup>应用电镜技术对PAL亚细胞进行了定位测试,发现PAL分散在细胞基质中,细胞间质部分PAL活性最高。

## 2 PAL 的结构、性质和作用机制

### 2.1 PAL 的分子结构

不同来源的PAL分子量不同,但一般介于220~330 kD的酸性蛋白。PAL是多基因家族,在一组染色体中含有2~3个PAL基因,随植物不同而异,如菜豆有3个基因、欧芹有4个基因、番茄有5个基因、而马铃薯PAL基因估计达到40~50之多。一个酶蛋白由四个亚基组成,多数PAL有均一亚基,分子量为55~88 kD。不同植物中PAL的氨基酸组成不同,水稻中的PAL酸性成分少于小麦、玉米、马铃薯,而中性成分高于以上三种植物<sup>[10]</sup>。

### 2.2 PAL 的诱导性及稳定性

PAL是一种典型的细胞内诱导酶,具有别构酶的特征,在酶促反应体系中加入诱导物后,PAL基因的转录活性增高。不同来源的PAL其诱导因素不同,成水源等<sup>[8]</sup>人用6种生长调节剂诱导离体银杏(*Ginkgo biloba* Linn)叶PAL活性,结果表明诱导效果从高至低依次为:乙烯利(ETP)、2,4-D、矮状素(CCC)、吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)。刘太国等<sup>[12]</sup>人利用诱导药剂水杨酸(SA)对烟草幼苗诱导处理,探讨了诱导前后感染TMV的烟草叶片内PAL活性变化规律。在抗病烟草品种CV85中诱导接种处理8d时产生一个PAL活性高峰,PAL活性比对照增加0.22倍。无论从症状表现还是从实验数据来看,水杨酸的外源应用可以比较有效地诱导烟草抗病品种

产生抗病性,为诱导抗病机制用于病害的防治提供了理论依据。郭红莲等<sup>[13]</sup>人用磷酸氢二钾、灰斑病菌滤液、水杨酸和草酸作诱抗剂,研究玉米对灰斑病的诱导抗病作用,同时测定了挑战接种前后PAL活性的变化。结果表明:上述三种诱抗剂均有不同程度的诱导抗病性,其中水杨酸诱抗效果最好,病菌培养滤液和磷酸氢二钾次之,草酸诱抗效果最差。诱导后挑战接种,PAL活性都有增加,且酶活性曲线波形变化较大。和其它酶类一样,除受诱导剂诱导外,PAL也可经紫外诱导改变其活性,孙旭东<sup>[14]</sup>以番茄为试材,经2.4 kJ/m<sup>2</sup> UV照射,取果皮经冰浴研磨、硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤和离子交换层析,分离纯化出苯丙氨酸解氨酶,经测定,紫外照射组PAL防御酶活性比对照组高出5 U/mL,从而提高了对灰葡萄孢菌的抗病能力。

提高PAL的稳定性可通过添加效应物的方法来实现,张文博等<sup>[15]</sup>人通过单因素实验研究了谷氨酸钠、海藻酸钠、甘油、氮气等对PAL的稳定性影响,通过正交实验和方差分析,确定在转化液中加1.0 g/L锌粉和20 g/L谷氨酸钠作为效应物,L-苯丙氨酸积累浓度提高55%,该两种效应物对PAL的稳定性增加显著。岳海燕等<sup>[16]</sup>人考察了聚乙二醇6000、D-山梨醇、二巯基苏糖醇、戊二醛反应中PAL活力的影响。单因子实验发现,0.5%聚乙二醇6000对PAL酶活的影响最大,可提高活力80.3%。响应面实验发现,海藻糖、聚乙二醇6000、二巯基苏糖醇在实验浓度范围内交互作用很小;0.62%海藻糖、0.54%聚乙二醇6000和0.31%巯基苏糖醇的组合可提高酶活92.9%。

### 2.3 PAL 的催化作用机制

PAL催化作用机制的研究主要经历了三个阶段:1970年,Hason和Havir率先提出米切尔加成反应机理(Michael Addition Reaction):即去氢丙氨酸(DHA)为PAL的活性中心,PAL反应机理方案的关键步骤是L-苯丙氨酸的氨基经由米切尔加成到DHA的β位,这个提法已经由化学和突变研究证据所支持;1994年,Schuster和Retey<sup>[17]</sup>借助在PAL失活条件下,观察转化4-硝基-L-苯丙氨酸提供的实验证据,反驳了前述机理,提出了第二种傅氏反应机理,即辅基DHA以傅氏(Friedel-Crafts)反应方式,攻击L-苯丙氨酸芳环邻位,造成C<sup>+</sup>,使β位质子被酸化,从而有助于由酶催化碱基的去除作用。在氨的前-S-质子消除作用去除后,该环再度芳构化,并重新产生辅基。实际上,无论上述哪种机理,均能解释了L-苯丙氨酸的氨消除模式,PAL中的DHA单位是反应活性的关键;随着化学和分子生物学实验证据的不断出现,主要基于PAL和

HAL(组氨酸解氨酶, E.C.4.3.1.3)的高度同源性(19%~29%序列分析)及其对“姐妹”酶HAL的X-射线结构分析, 2004年杨顺楷等人发现催化性的亲电试剂并非DHA, 而是3,5-二氢-5-次甲基-4H-咪唑-4-酮(MIO), 由此提出一对非芳香L-苯丙氨酸异构体作探针, 以支持这一机理的实验研究。此外, 还列出红酵母PAL逆向催化合成非天然芳族氨基酸的相关实验结果<sup>[18]</sup>。

### 3 PAL 的表达调控

前面叙述过植物 PAL 基因结构的普遍特点是由小的多基因家族组成, 一组染色体中, 一般含有 2~6 个基因, 并且可分为 2~3 个不同的亚族或类群。另外, PAL 基因的编码区长度变化不大, 一般在 2000 bp 左右, 如菜豆 PAL2 编码区长 2136 bp、PAL3 编码区长 2130 bp, 水稻 PAL 编码区长 2103 bp。PAL 基因的表达及 PAL 活性受多种因素影响, 而针对不同的影响应速, PAL 的表达模式不尽相同, 其选择性表达受到复杂的调控。

#### 3.1 表达的组织特异性

PAL 在植物组织中的表达具有组织特异性, 也受发育的调控, 同一 PAL 基因家族中不同 PAL 基因的表达模式不完全相同。在大多数植物的根部和成熟的花中 PAL 表达量最高, 茎中的表达水平中等, 而成熟的叶片中几乎不表达, 菜豆的 3 个基因 PAL1、PAL2 和 PAL3 都能在根部大量表达; 芽中 PAL1 和 PAL2 均有表达; 叶中仅 PAL1 有表达; 花瓣中 PAL2 大量表达, PAL1 表达量很少, PAL3 不表达。草莓、苹果、梨的果实在发育过程中, PAL 活性有两个高峰, 一个为幼果期, 一个为果实成熟期。

#### 3.2 表达调控的方式

首先, 对苯丙烷类代谢途径的调控受酶的内部调节。一方面受到苯丙烷类代谢途径产物的反馈调节。王燕等<sup>[19]</sup>人曾经通过添加前体底物和末端产物的方式, 从酶学角度探讨了这些物质对PAL活性的影响, 分别从促进酶活性和抑制酶活性这两个方向来确定诱导和抑制酶活力的最适宜浓度。研究发现, 4个浓度的反式肉桂酸处理都能抑制酶活性, 100 mmol/L反式肉桂酸抑制酶活性作用最强。3,5-二氢肉桂酸除100 mmol/L微弱地增加酶活性外, 其余都抑制酶活性。4个浓度的4,5,7-三羟黄酮都能抑制酶活性, 其中, 6.25 mmol/L抑制能力最强。阿魏酸除100 mmol/L浓度增加酶活性外, 其它浓度处理都降低酶活性, 50 mmol/L抑制酶活性最强。另一方面, 植物体内的一种

PAL内源性抑制物质(PAL-I)参与了PAL活性调节, 这已在水稻、马铃薯、萝卜、向日葵中得到证实。从去胚乳的水稻黄化苗中提取并部分纯化PAL-I, 它是一种非透析蛋白, 具有热稳定性, 动力学实验表明PAL-I对PAL的抑制是竞争的, 它不仅能抑制水稻PAL, 而且能抑制从玉米、小麦、马铃薯块茎切片中提取的PAL。

其次, 苯丙烷类代谢途径的调控也受到酶的外部因子的调节。各种类型的低温、机械损伤、光、病原菌感染等都可以刺激PAL基因的表达, 在受伤害的菜豆下胚轴组织中出现大量PAL转录产物的积累。使用生长素(IAA)、外源乙烯、激动素(BAP)后, PAL活性增加; 而使用NAA、赤霉素(GA<sub>3</sub>)后, 活性减小。研究表明, 植物在生长发育过程中以及受病原物及其诱导物和伤害等刺激, PAL常伴随植物体内乙烯生物合成的增加而积累。外源乙烯也能引起马铃薯块茎中编码PAL的mRNA水平的提高。用病原菌毒素处理能刺激PAL活性升高, 而且毒素处理的作用强度大于病原菌接种的作用强度。各种因子对PAL的诱导存在互作关系, 王敬文等<sup>[20]</sup>在切伤诱导甘薯块根切片PAL活性增高, IAA、BAP能再使PAL活性增加, 且BAP的效应又可被照射红光而增强。

#### 3.3 表达调控的机制

PAL 基因的表达受到包括生长发育、病菌感染、环境刺激等多种因素的影响, 且不同因素影响下, 其表达模式又各不相同, 说明表达是受到复杂的机制调控的, 研究启动子的结构有助于理解的表达调控机制。菜豆 PAL2 与木质素前体合成有关, 其启动子区域起始密码子上游-289 到-74 的顺式作用元件对木质部的表达是必需的, 但与在叶原基和茎的表达或在花瓣建立组织特异性无关; 在-135 到-119 区域有一个负调控元件, 它能抑制一个位于-480 到-289 区域的与韧皮部表达相关的隐藏的顺式作用元件的活性。欧芹 PAL1 的启动子区域有两个核苷酸序列, 与紫外辐射和诱导反应有关, 这些序列在不同种类的好几个与诱导及光反应有关的基因中位置是保守的。在小麦的 PAL1 启动子区也含有与在其它基因启动子中鉴定的调控元件高度相似的区域, 这些元件包括其它的苯丙烷代谢途径基因的抗紫外线和在真菌诱导中起作用的序列以及在植物的防御基因转录活化中起作用的序列。将菜豆 PAL 基因(PAL1, PAL2)的启动子与 GUS 报告基因融合转移到马铃薯、烟草和拟南芥中, 的研究表明表达受环境刺激因子的诱导调控, 也受转基因植物发育阶段调控而表现出不同的时空表达模式<sup>[21]</sup>。

#### 4 PAL 的分子生物学研究展望

国内外对 PAL 的研究较为深入,但主要集中在它的提取纯化、抗逆境、生理作用等方面,关于它的基因表达和调控方面的研究还不多,需要进一步展开更深入更广泛的研究。随着分子生物学尤其是基因工程技术的不断发展,已有不同来源的 PAL 基因序列被克隆和测序,近年来研究最多也较有成果的还是构建 PAL 基因表达系统,现在已有用大肠杆菌表达系统、乳酸乳球菌表达系统构建的 PAL 基因工程菌的报道,但国内现在对 PAL 基因工程菌的构建工作开展不多,随着更多的表达系统的建立和现有表达系统的优化,会有更多更好的 PAL 基因工程菌构建出来,满足生物化工对高性能工业生物催化菌种的需求。

鉴于此,今后对 PAL 分子生物学研究可以从以下两个方面入手:一是优化现有的 PAL 表达系统,二是开发新的 PAL 表达系统。对现有 PAL 表达系统进行优化是发展高效 PAL 表达系统的重点,尤其是精巧地利用菌株的有效表达元件,是开发好 PAL 基因工程菌的重要途径。对 PAL 基因启动子及相关的转录因子进行分析可以进一步阐明 PAL 基因的表达调控机理,对 PAL 基因启动子进行剖析,寻求一种能高效、可控的启动基因转录的启动子,找出有关的顺式作用元件将是今后的焦点之一。另外,可以克隆相关的转录因子,并研究它们所编码蛋白的功能。PAL 调控过程主要通过转录因子对生物合成基因转录的活化来实现,转录因子充当着“分子开关”的作用,当它们得到特定发育阶段所发出的信号后,将活化苯丙烷代谢途径的特定生物合成途径。开展 PAL 特异性基因的结构特点、克隆、测序、表达部位和时空表达模式的研究,以便有目的地用之于转化植物,使之在转基因植物中大量、持久地表达,提高特定次生代谢物的产量。

现有许多外源基因表达系统已经用于生产外源蛋白,而用于表达 PAL 的似乎还很少,故开发新的 PAL 表达系统具有很大的研究空间。如上文中提到,现在已有用大肠杆菌表达系统、乳酸乳球菌表达系统构建的 PAL 基因工程菌的报道。此外,链霉菌表达系统,芽孢杆菌表达系统,甲醇酵母表达系统等都有自身的特点,有利于 PAL 表达系统的构建。尤其是甲醇酵母,它作为一种新的高效分泌型表达外源基因的宿主,近几年来已成为一个研究热点。甲醇酵母中含有非常强的甲醇氧化酶基因(methanol oxidase, MOX 或 alcohol oxidase, AOX)启动子,具备高密度发酵和分泌表达的能力,比传统的酿酒酵母(*S. cerevisiae*)更具产业

化发展潜力<sup>[22]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 欧阳光察,薛应龙.植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J].植物生理学通讯,1988,24(3):9-16
- [2] 贺立红,张进标,宾金华.苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J].食品科技,2006(7):31-34
- [3] 张淑红,高宝嘉,温秀军.枣疯病过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的研究[J].植物保护,1995,30:59-62
- [4] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants.IV. Purification and properties of the-phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare*[J]. Journal of Biology and Chemistry,1961,236:2692-2698
- [5] Hanson K R, Havir E A. Phenylalanine Ammonia-Lyase[J]. The Biochemistry of Plants,1981,7:578-621
- [6] 金庆超,叶华智,张敏.苯丙氨酸解氨酶活性与玉米对纹枯病抗性的关系[J].四川农业大学学报,2003,21(2):116-118
- [7] 胡美娇,刘秀娟,黄圣明.热处理后芒果、香蕉果皮PAL活性变化与炭疽病发生的关系[J].热带作物学报,2000,21(4):63-68
- [8] 江柯,卢涛,赵德立,等.红酵母苯丙氨酸解氨酶分离纯化及性质研究[J].四川大学学报(自然科学版),2004,41(4):865-868
- [9] Jin Nakashima, et al. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia mesophyll* cells[J]. Plant Cell Physiology,1997, 38(2): 113-123
- [10] 欧阳光察,应初衍,等.植物苯丙氨酸解氨酶的研究.VI.水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性[J].植物生理学报,1985,11(2):204-214.
- [11] 成水源,王燕,刘卫红,等.生长调节剂对离体银杏苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J].植物资源与环境学报,2005,14(1):20-22
- [12] 郭红莲,陈捷,高增贵,等.不同诱抗剂诱导玉米对灰斑病的抗性及其与PAL的关系[J].沈阳农业大学学报,2000,31(5):465-467
- [13] 孙旭东,荣瑞芬.短波紫外线诱导采后番茄苯丙氨酸解氨酶的分离纯化[J].农产品加工,2006(8):67-71
- [14] 张文博,李守平,杜连祥,等.几种效应物对苯丙氨酸解氨酶稳定性的影响[J].生物技术,2002,3(12):14-16
- [15] 岳海燕,袁其朋,刘晓慧.相应面法分析效应物对苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J].食品科技,2006(10):58-62

(下转第 97 页)