

• 综 述 •

酪氨酸酶的研究进展

陈清西, 宋康康

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 酪氨酸酶(EC 1. 14. 18. 1) 是一种含铜的氧化还原酶, 它广泛存在于动植物和微生物中, 与生物体合成色素直接相关. 在人体中, 它与色素障碍性疾病及恶性黑色素肿瘤的发生与治疗有关. 因此对编码酪氨酸酶基因的结构、表达及其调控, 以及酪氨酸酶的抑制剂和激活剂的研究, 引起国内外的广泛重视. 目前, 对酪氨酸酶活性中心及其催化功能的研究比较透彻, 但对酪氨酸酶蛋白的立体结构尚不清楚.

关键词: 酪氨酸酶; 黑色素; 色素障碍性疾病; 基因; 活性中心

中图分类号: Q 356. 1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006) 05-0731-07

酪氨酸酶(EC 1. 14. 18. 1, Tyrosinase) 是一种含铜的金属酶, 广泛分布于微生物、动植物及人体中^[1]. 在植物中, 酪氨酸酶一般称为多酚氧化酶; 在昆虫中, 则称为酚氧化酶; 在微生物和人体中, 才称为酪氨酸酶. 酪氨酸酶主要参与两个反应过程: 催化 *L*-酪氨酸羟基化转变为 *L*-多巴和氧化 *L*-多巴形成多巴醌, 多巴醌经一系列反应后, 形成黑色素. 酪氨酸酶在生物体中具有重要的生理功能. 同时, 它也与人体雀斑、褐斑等黑色素过度沉积等疾病的发生有关, 并与昆虫的蜕皮和果蔬的褐化有很大关系^[2].

自从发现了人黑色素细胞可以以 *L*-3, 4-二羟基丙氨酸(*L*-多巴) 为底物合成黑色素, 这个反应成为酪氨酸酶活性和定位检测的基础. 在之后的研究中, 酪氨酸酶成为第一个用亲和色谱纯化的酶, 酪氨酸酶也是最早发现能将酶分子内部氧原子参入到有机物中的酶; 并为酶自杀性失活提供了早期实例. 现今, 人们已经从微生物、植物及多种动物中提取并纯化了酪氨酸酶.

目前, 对酪氨酸酶的研究主要集中在酶的分离纯化、催化机制、活性调控以及酪氨酸酶基因及其在生物体内的生理作用等方面, 在结构方面, 其三维结构仍未得到. 鉴于此, 对编码酪氨酸酶基因的结构、表达及其调控, 酪氨酸酶的合成和运输的研究也在不断发展.

1 酪氨酸酶的种类及分布

酪氨酸酶的分布与动物的生理功能息息相关, 不同动物的酪氨酸酶在体内分布的部位不同. 多数昆虫在正常生理状态下, 酪氨酸酶以酶原的形式存在, 不同类型的酪氨酸酶存在于昆虫的特定部位, 以完成特定的生理功能^[3]. 美洲蜚蠊存在于血红细胞内, 而麻蝇则仅存在于血浆中, 并且在表皮中主要以活化形式的酪氨酸酶存在. 昆虫酪氨酸酶除参与黑色素的形成外还是唯一参与角质硬化的酶. 昆虫高度硬化的角质能阻断微生物和异物的入侵, 并为柔软的无脊椎动物身体提供了保护. 在节肢动物中, 酪氨酸酶还参与其他两种重要的生理过程——防御反应和伤口愈合.

哺乳动物酪氨酸酶催化产生的黑色素被分泌进入到表皮和毛发的角质细胞中, 使体表着色, 从而起保护皮肤和眼睛、抵御紫外线的辐射和防止内部组织过热等作用. 哺乳动物酪氨酸酶常见于黑素细胞中, 黑素细胞是存在于皮肤、发囊和眼睛中并产生色素的高度特异性的细胞^[1, 4]. 酪氨酸酶功能减退或缺失时, 即会影响黑色素代谢, 从而发生疾病如白癫疯和白化病. 动物与人的常染色体隐性疾病也与酪氨酸酶的缺失或活性下降有关^[5].

2 酪氨酸酶的理化性质

高等脊椎动物、低等脊椎动物和原核生物的酪氨酸酶的理化性质不同. 由表 1 可以看到, 从 *Streptomyces antibioticus* 的 272 个氨基酸到 *Homo sapiens* 的 529 个氨基酸, 不同生物中的酪氨酸酶氨基酸数目差异很大. 虽然它们在生物体内具有相似的生理功能,

收稿日期: 2006-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(30570408)和福建省重点科技项目(2004N002)资助

作者简介: 陈清西(1959-), 男, 教授, 博导.

E-mail: chenqx@jxjxian.xmu.edu.cn

©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 不同来源酪氨酸酶的分子量、长度、等电点

Tab. 1 The molecular weight, length and isoelectric point of tyrosinase from different sources

来 源		分子量/ ku	肽链长度	等电点	参考文献
人	<i>Homo sapiens</i>	60. 393	529 A A	5. 71	[6]
鸡	<i>Gallus gallus</i>	60. 357	529 A A	6. 03	[7]
鼠	<i>Mus musculus</i>	60. 648	533 A A	5. 67	[8]
牛	<i>Bos taurus</i>	60. 304	530 A A	5. 54	[9]
青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	61. 253	540 A A	5. 99	[10]
中国软壳海龟	<i>Trionyx sinensis</i>	31. 136	273 A A	5. 53	[11]
蘑菇	<i>Agaricus bisporus</i>	63. 927	556 A A	5. 92	[12]
链霉菌	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	30. 723	272 A A	7. 71	[13]
根瘤菌	<i>Rhizobium meliloti</i>	54. 109	494 A A	4. 65	[14]
曲霉菌	<i>Aspergillus fumigatus</i>	73. 032	630 A A	5. 89	[15]

但它们的理化性质却有不同程度的差异性. 酪氨酸酶在同工酶的研究也占有非常重要的地位, 是生物体内具有同工酶的一大类酶. 据研究, 哺乳动物、原核动物、真菌的酪氨酸酶一般为单聚体或二聚体; 而昆虫、两栖类的酪氨酸酶一般为二聚体、四聚体或五聚体等多聚体.

3 酪氨酸酶的活性中心结构

酪氨酸酶的活性中心是由两个含铜离子位点构成. 在催化过程中, 双核铜离子位点以 3 种形态存在, 分别是氧化态(E_{oxy})、还原态(E_{met})和脱氧态(E_{deoxy}). 研究表明与酪氨酸酶结合的双核铜离子活性中心与在血蓝蛋白中发现的活性中心非常相似^[16, 17]. 由 X 射线吸收光谱 (XANES, X-Ray Absorption Near Edge Structure) 分析, 酪氨酸酶和血蓝蛋白含铜活性中心主要的构象变化基本相同, 铜离子位点的几何构型是可变的. 血蓝蛋白氧化态结晶学和延伸 X 射线吸收结构光谱 (EXAFS, Edge X-ray Absorption Fine Structure) 的研究结果表明^[18], Cu—Cu 键长约为 0. 35 nm, 每个二价铜离子构型为正四棱锥状, 受到两个强的赤道面配位原子的调控和一个相对较弱的轴向 N_{His} 配基的调控, 形成 5 个配位键(结构可见图 1). 其电子构象为 $3d^9$. 即与蛋白上的组氨酸残基上的氮原子形成 3 个配位键, 外源氧分子作为过氧化物与铜离子形成两个配位键占据了铜离子的两个赤道面位置, 并可作为两个铜离子之间的桥联配体. 所以 E_{oxy} 活性中心可以写成 $Cu(I) - O_2 - Cu(I)$, 但通常更适合用过氧化态 $Cu(II) - O_2 - Cu(II)$ 表示^[16]. 过氧化物的电子结构对于 E_{oxy} 的生物功能很重要. 由于受强的 σ^* 受体作用, 过氧化物带有较少的负电荷, 而 π 电子受体与过氧化物的 σ^* 轨道上的电子作用, 大大的削弱了氧氧键, 使

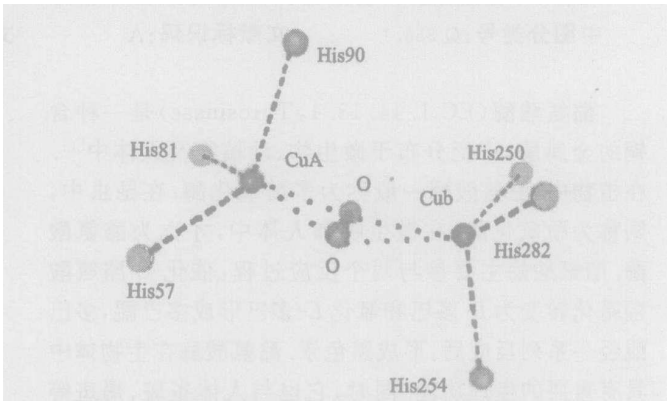


图 1 酪氨酸酶活性中心的双核铜中心结构

Fig. 1 The structure of the active center containing Cu of tyrosinase

之容易断裂. 酪氨酸酶被认为是血蓝蛋白的祖先蛋白, 因为酪氨酸酶在非常原始的生物体中也有发现. E_{oxy} 的结构比血蓝蛋白的结构更紊乱, 因此酪氨酸酶相对于血蓝蛋白存在更多构象不同的底物与其活性中心结合.

还原态酪氨酸酶与氧-铜离子态的酶相似, 都含有两个四角形的反磁铜离子, 不同的是, 桥联配体是氢氧化物而不是过氧化物. 每个亚铜离子电子构象为 $3d^{10}$, 分别与两个吡啶上的氮原子形成两个键长为 0. 19 nm 的配位键, 与第三个吡啶上的氮原子形成键长为 0. 27 nm 的配位键, 环绕 Cu—Cu 轴形成近似 C_{3v} 的对称结构. 当加入过氧化物, 酶从 E_{met} 变为 E_{oxy} ; 当缺少过氧化物时, 酶由 E_{oxy} 变为 E_{met} . 纯化后得到的酶是由 $\geq 85\%$ 的 E_{met} 和 $\leq 15\%$ 的 E_{oxy} 组成的混合物.

半亚铜离子态酪氨酸酶含有一个 2 价铜离子和一个 1 价铜离子. 2 价铜离子含有未配对的电子, 由电子顺磁共振分析, 未配对的电子占据一个 $d_{x^2-y^2}$ 轨道. 根

据两个铜离子之间电子离域的电子顺磁共振和可见光谱特征, 证明在两个铜离子之间同样有桥连配体的存在. 通过对铜离子态血蓝蛋白的研究表明: E_{deoxy} 的活性中心由两个一价铜离子组成. 1938 年 Kubowitz 证明了这种酶形态的存在.

4 酪氨酸酶在生物色素形成中的作用

酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶, 而黑色素异常生成造成的色素沉着是动物衰老及果蔬腐败的重要表象. 哺乳动物体内黑色素分优黑素(Eumelanins)和褐黑素(Phaeomelanins)两种, 前一种为棕黑色, 后一种为红棕色, 两种色素的比例不同造成毛发皮肤颜色的不同. 黑素的生物合成是一个由酪氨酸酶(Tyrosinase)催化体内酪氨酸(Tyr)羟化而启动一系列生化反

应生成两种黑色素的过程^[1]. 这一过程最早为 Raper 所描述, 并由 Mason 验证并补充, Seo S Y 等^[19]曾总结酪氨酸酶在催化黑色素形成的作用(图 2).

黑色素生物合成过程可大体分为两个阶段(图 2), 第一阶段是由酪氨酸酶催化酪氨酸被羟化反应形成 *L*-3, 4-二羟基丙氨酸(*L*-多巴)(单酚酶活性), 并进一步将 *L*-多巴氧化生成多巴醌(二酚酶活性). 这两步反应都是由酪氨酸酶催化的, 酪氨酸酶在这里显示了独特的双重催化功能. 第二阶段从多巴醌(DOPAquinone)为原料从两个不同途径分别生成真黑素和褪黑素的过程. 真黑素生成, 多巴醌经多聚化反应等一系列反应生成无色多巴色素, 极不稳定的无色多巴色素被另一分子多巴醌氧化为多巴色素, 多巴色素经异构、脱羧生成 5, 6-二羟基吲哚(DHI), 5, 6-二羟基吲哚

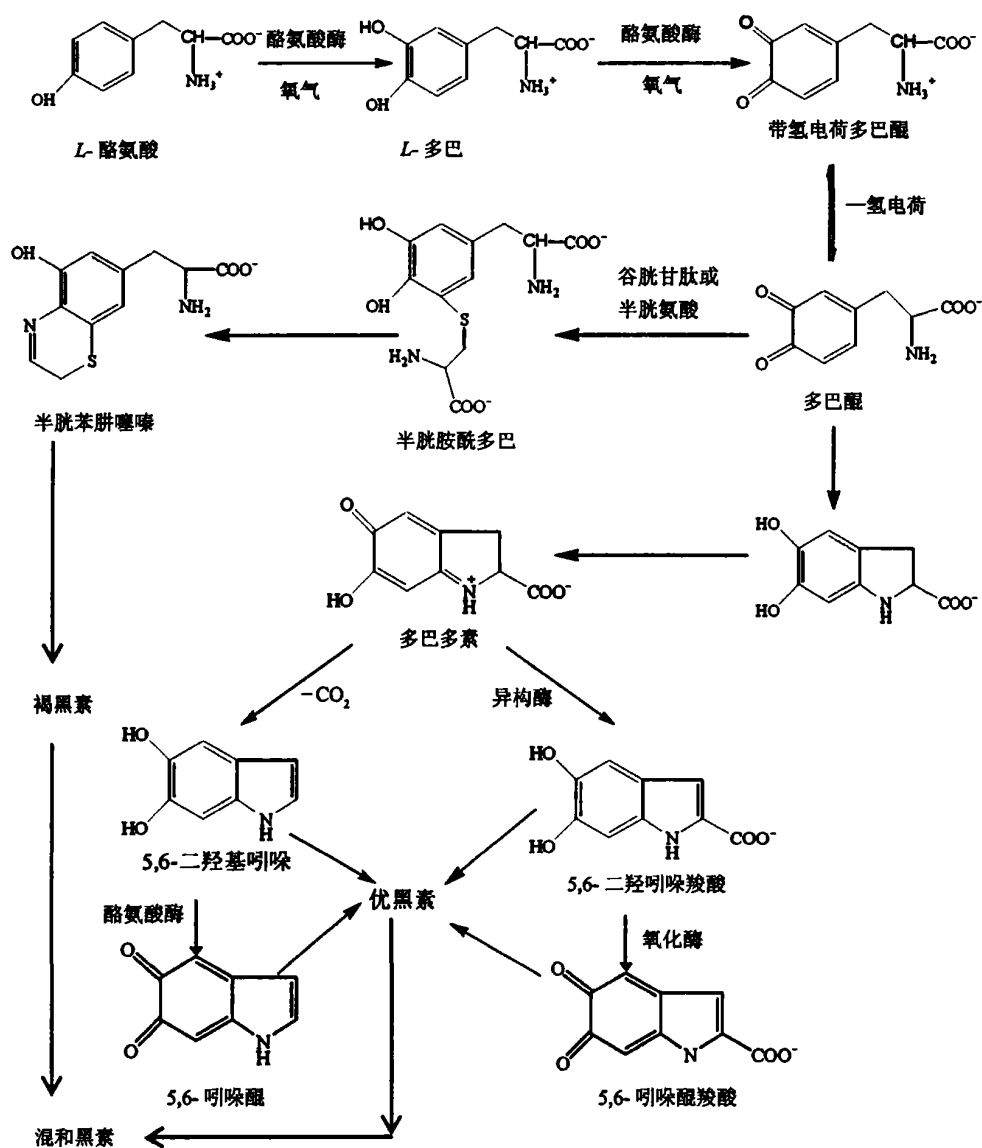


图 2 酪氨酸酶催化生成黑色素过程

Fig. 2 The process of the melanin biosynthesis catalyzed by tyrosinase

(DHI) 由酪氨酸酶催化氧化为真黑色素的前体吲哚 5, 6-醌(IndQu); 褪黑素生成, 多巴醌(DOPAquinon) 与半胱氨酸(Cys) 反应生成产生 5-Cys-多巴及 5-Cys-多巴醌, 然后成环, 脱羧变成苯并噻嗪的衍生物, 最后形成褪黑素. 在第二阶段, 只有少数几步反应由酪氨酸酶、异构酶或金属离子催化, 大部分反应都是自发的, 因此酪氨酸酶是整个黑色素生成反应的限速酶, 第一阶段的两步反应是限速步骤.

酪氨酸酶在催化反应中具有单酚酶活力和二酚酶活力, 它的催化反应可以总结如图 3. 通常人们认为酪氨酸酶在黑色素生成的第一步表现的活力, 即氧化单酚(M) 成为双酚(D) 的活力. 但实际上, 这一活力都是与双酚(D) 被氧化为醌(Q) 的活力同时表现的. 因此将酪氨酸酶催化单酚至醌全过程的活力称为单酚酶活力, 即氧化态酶(E_{oxy}) 与单酚(M) 非共价结合, 单酚(M) 上的羟基被亲核进攻释放出 H^+ , 生成 $E_{oxy}M$ 复合物. 作为底物的酚或酚盐进攻酶复合物, 使 $E_{oxy}M$ 进行羟基化, 生成 $E_{met}D$ 复合物, 并进一步分解成醌(Q)、 H_2O 和脱氧态酶(E_{deoxy}), 脱氧态酶(E_{deoxy}) 与氧结合生成氧化态酶(E_{oxy}), 完成单酚循环. 还原态酶(E_{met}) 不具有单酚酶活力, 当它与单酚(M) 结合成 $E_{met}M$ 后, 进入死胡同, 不能分解出产物. 必需靠反应体系中二酚的形成使之进入二酚酶的循环.

氧化态酶(E_{oxy}) 和还原态酶(E_{met}) 均具有二酚酶的活性, 当氧化态酶(E_{oxy}) 和二酚(D) 结合, 双酚上的羟基亲核被进攻释放出 $2H^+$, 而生成的复合物 $E_{oxy}D$, 分解释放出醌(Q), 酶转变为还原态酶(E_{met}), 后者继

续结合另一分子的二酚(D) 形成 $E_{met}D$ 复合物, 并进一步分解成醌(Q)、 H_2O 和脱氧态酶(E_{deoxy}) 完成循环, 双酚(D) 就在此循环中被不断的氧化为醌(Q).

5 原核生物酪氨酸酶的基因结构及其表达与调控

基因克隆、序列测定以及基因表达分析等分子生物学技术是 20 世纪 80 年代才开始广泛应用的分析手段. 近年来, 有关酪氨酸酶的分子生物学研究也取得了很大进展.

酪氨酸酶合成黑色素是 *Streptomyces* 属的典型特点, 已经被作为其分类的依据. 编码酪氨酸酶的基因已经从 *Streptomyces* 中克隆出来并被用于 *Streptomyces* 属质粒载体上的选择性标记. 已经得到 *S. antibioticus* 酪氨酸酶整个基因组的核苷酸序列, 同时得到一个开放阅读框 ORF(438 bp) 即 ORF₄₃₈, 位于酪氨酸酶基因(816 bp) 的上游. 在酪氨酸酶基因表达中, ORF₄₃₈ 基因产物的作用是: (a) 作为酪氨酸酶诱导物的调控蛋白; (b) 是分泌酪氨酸酶所必需的; (c) 铜离子转运蛋白, 有助于激活脱辅基酪氨酸酶.

研究表明, 在 *S. castaneglobisporus mel* 操纵子调控的酪氨酸酶过程表达中起主要作用的不是酪氨酸酶, 而是 ORF₃₇₈ 基因产物^[20]. 链霉菌胞内和胞外两种形式的酪氨酸酶都是由单一多肽组成, 分子量约为 31 ku. 酪氨酸酶基因(*mel*) 由两个开放阅读框(ORF) 组成. 一个是 ORF₃₇₈ 起始于 ATG(A = +1), 终止于

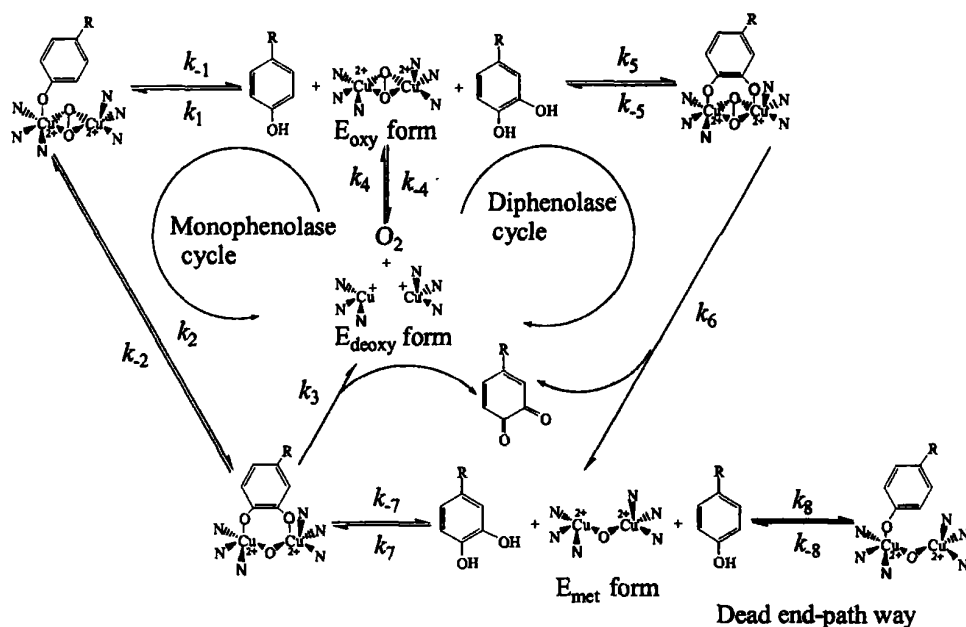


图 3 单酚和双酚底物被酪氨酸酶氧化成醌全过程流程图

Fig. 3 The total process of tyrosinase catalyzing monophenol and diphenol to quinon

TGA(T = 379), 它编码一种分子量为 13. 114 ku 的蛋白(酪氨酸酶的信号肽), 上游有 RBS(GGAGGA, 一个核糖体结合位点); 另一个 819 bp, 为 TYRC, 起始于 ATG(A = 416), 终止于 TGA(T = 1235), 位于 ORF₃₇₈ 下游, 编码分子量为 31. 103 ku 的蛋白^[20]. TYRC 编码的蛋白序列与 TYRA 编码的有 84% 的同源性, TYRA 来自于 *S. antibioticus*. ORF₃₇₈ 与来自于 *S. antibioticus* 的 ORF₄₃₈ 编码的蛋白序列的氨基和羧基端非常相似. *mel* 基因的总 G + C 量为 70%, 其它已测序的链霉菌酪氨酸酶基因的总 G + C 量在 62% ~ 74% 范围内.

虽然链霉菌属不同种的酪氨酸酶的一级结构有很大的差异, 但其催化区域都含有一个双核铜离子中心. 这个活性中心含有六个铜离子配基(组氨酸), 在酪氨酸酶前体的激活中起关键作用. *Streptomyces antibioticus* 中的黑色素操纵子(*melC*) 需要蛋白 *MelC1*, *MelC1* 在酪氨酸酶前体(*MelC2*) 的折叠, 装配, 分泌, 热激反应中作为一个分子伴侣, 以助于铜离子的插入和酪氨酸酶的分泌^[21]. 发现酪氨酸酶铜离子 B 位点上的配基区有很高的序列同源性, 铜离子 A 位点上同源性则较弱, 但同样可以激活酪氨酸酶. 目前链霉菌属酪氨酸酶激活的模型为: 在酪氨酸酶前体激活过程中, *MelC1* 与酪氨酸酶前体形成一个瞬间化合物, 当酪氨酸酶前体被激活后, *MelC1* 又从复合物中释放出来. 除了链霉菌属酪氨酸酶, 铜离子插入不同种酪氨酸酶前体的机制还有很多尚未清楚. 在蘑菇中, 已发现一种不同于链霉菌属的酪氨酸酶前体铜离子插入机制. 分子伴侣 *MelC1* 对于链霉菌属酪氨酸酶的激活是必需的, 但在其它不存在 *MelC1* 的酪氨酸酶前体中则可能有一段序列和 *MelC1* 起相同的作用.

6 真核生物中的酪氨酸酶的基因结构及其表达与调控

Neurospora 酪氨酸酶的前体, 其分子量(75 ku) 接近天然酪氨酸酶(46 ku) 的两倍. 通过对两种 *N. crassa* 的研究, TATA 框和 poly(A) 上具有 12 个点突变, 酪氨酸酶具有两个别构构象, 核苷酸序列有 0. 5% 的差异性^[22]. 这些突变点是随机存在的, 在非编码区这些突变不会影响任何调控元件或是保守区, 而在编码区, 核苷酸序列则是完全保守的. 天然酶有 56 个芳香氨基酸(13. 8%), 其中只有 11 个在羧基端. 由推测出的氨基酸序列与已知的酶的一级结构比较得到酪氨酸酶是先以其前体形式合成. 酪氨酸酶前体的 C 端比天然酪氨酸酶的多 213 个氨基酸. 前体经过羧基端加

工后, 才形成天然的酪氨酸酶^[22]. 酪氨酸酶的编码区含有两个内含子, 分别含有 52 和 99 个碱基对. 对不同种的酪氨酸酶和血蓝蛋白的氨基酸序列进行比较, 发现存在两个高度保守的序列与活性中心铜离子的结合有关. *N. crassa* 中的酪氨酸酶 mRNA, 没有典型真核生物所具有 poly(A) 附加信号 AAUAAA. 然而, 酪氨酸酶基因有一段序列, 10 个碱基中有 8 个碱基与真核生物 3' 端序列 UUUU CACU GC 一致, 并富含胸(腺嘧啶脱氧核) 苷^[19]. 在 *S. antibioticus* 中, 信号肽含有一个带正电荷的序列和一个亲水的核心蛋白, 对于酪氨酸酶的分泌有可能是必需的. *S. castaneoglobisporus* 中也存在这样的序列. ORF₃₇₈ 调控的酪氨酸酶比 ORF₄₇₅ 调控的有更高的表达活性, 因为 ORF₃₇₈ 与脱辅基酪氨酸酶(酪氨酸酶前体) 有亲和结合力, 而 ORF₄₃₈ 没有. 可以用 *S. castaneoglobisporus* 中的高表达 *mel* 操纵子作为一种报告基因, 构建一个启动子探针载体, 用于分离一些弱的启动子^[20].

酪氨酸酶是个诱导酶, 它的基因表达受到很强的调控: 61 个密码子中, 有 60 个被用于编码酪氨酸酶. 人酪氨酸酶基因编码一个 58 ku 的糖蛋白, 这个糖蛋白含有 529 个氨基酸. 老鼠和人的酪氨酸酶基因家族中, 内含子和外显子结构不同, 只有一个内含子是保守的. 通过对河豚和石斑鱼酪氨酸酶基因的研究表明, 酪氨酸酶基因在靠近启动子的位置有个高度保守的 11 bp 长度的调控序列 M 框. M 框保守的核心序列, 5'-GT CATGTG-3', 包含一个 E 框(CATGTG), 是小眼转录因子的识别位点(Mitf). 因为 Mitf 与 E 框结合会激活酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白 1 的翻译, 所以这些 M 框元件是色素细胞基因表达关键的调控元件. 老鼠酪氨酸酶基因除了受一个位于 -12 kb 的增强子调控外, 同样受到一个位于 -100 bp 处 M 框的调控. 在大多数脊椎动物中, 基因间序列的长度, 导致很难分析整个基因及其完整的调控序列.

目前得到三个完整的哺乳动物(人、老鼠、兔子)的酪氨酸酶编码基因. 编码兔子酪氨酸酶基因的长度为 1 593 nt(GenBank Accession No. AF210660). 兔子的酪氨酸酶含有 512 个氨基酸, 由含有 18 个氨基酸的信号肽引导^[23], 人的含有 511 个氨基酸(GenBank. Access. No. AH003020), 老鼠的含有 515 个氨基酸(GenBank Access. No. D00440). 老鼠与兔子成熟蛋白的编码核苷酸序列有 82% 的同源性, 和人的有 88% 的同源性. 酪氨酸酶氨基酸序列与老鼠有 85% 的同源性和人的有 90% 的同源性. 不同种生物的非同源性主要是由蛋白的不同长度引起的, 比较兔子、人与老鼠的酪氨酸酶基因, 可以测出与酶功能多态性相关的序列.

在酪氨酸酶两个铜离子结合区之间的中间区域,是编码酪氨酸酶基因导致 Oculocutaneous 白化病错义突变簇.因此,被认为这个域是个功能域.

7 酪氨酸酶的应用与发展方向

酪氨酸酶的作用底物具有一定的广谱性,并且其对底物邻位羟基的催化具有高度的特异性,因而在催化合成有重要价值的化合物上,酪氨酸酶引起很多科学家的关注.酪氨酸酶可以催化单酚和二酚形成的醌类化合物在水溶液中不稳定,经过一系列催化反应,可自身聚合或与其它物质(有机胺类化合物等)聚合反应形成不溶于水的大分子物质而沉淀.因此酪氨酸酶不仅除去酚类物质,还能去除其它多种有机物,如有机胺、有机氯化物等^[24,25].现利用酪氨酸酶处理工业废水的技术已经成熟.可以采用电流法测定酪氨酸酶的活性,因此,可以将酪氨酸酶做成酶电极用于检测水环境中是否含有有毒物质^[26].

酪氨酸酶是黑色素合成的限速酶.近年来的研究表明,黑色素在防紫外线辐射、清除自由基、作为无定形半导体、化妆品、以及生物杀虫剂的光保护剂等方面都具有广阔的应用前景^[27].酪氨酸酶的抑制剂可被作为化妆品中的增白剂如熊果甙和曲酸,因此可以以酪氨酸酶作为研究对象寻找更好的美白剂^[28-32].同时,酪氨酸酶激活剂如一些中药的提取物则被用于治疗白化病和白癫疯等疾病^[33].

编码酪氨酸酶的基因(*melO*)的启动子是个非常强的启动子,可用于对弱启动子的研究.而且通过基因融合技术,可以用 *melO* 调控合成大量高纯度的蛋白,如 Hyper-protein 的生成^[34].酪氨酸酶基因在基因工程中,可以作为一种很好的基因标记.因此,老鼠、兔子都可以作为生物工程中很好的模式生物.酪氨酸酶基因突变会导致形成多种疾病,如白化病,黑色素瘤等.所以近年来,对酪氨酸酶的研究已转向色素障碍性疾病、黑色素瘤、白化病及早发性老年痴呆疾病的应用上.因此,对酪氨酸酶的进一步研究,不仅能为临床治疗上述疾病寻找合适药物奠定理论基础,也为阐明这些疾病的发生机理提供理论依据.

参考文献:

- [1] Sánchez-Ferrer Á, Rodríguez-López J N, Garduño-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1247: 1- 11.
- [2] Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis[J]. Pigm. Cell Res., 2000, 13 (Suppl. 8):

103- 109.

- [3] Funatsu M, Inaba T. Studies on tyrosinase in housefly. Part I: Protyrosinase in the pupae of housefly and its activation[J]. Agric. Bio. Chem., 1962, 26: 535- 540.
- [4] Zimmerman W C, Blanchette R A, Burnes T A, et al. Melanin and perithecial development in *Ophiostoma piliferum* [J]. Mycology, 1995, 87: 857- 863.
- [5] Goto M, Sato M, Matsumura K C, Sawamura D, et al. Tyrosinase gene analysis in Japanese patients with oculocutaneous albinism[J]. J. Dermatol. Sci., 2004, 35: 215- 220.
- [6] Giebel L B, Strunk K M, Spritz R A. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment[J]. Genomics, 1991, 9: 435- 445.
- [7] Mochii M, Iio A, Yamamoto H. Isolation and characterization of a chicken tyrosinase cDNA[J]. Pigm. Cell Res., 1992, 5: 162- 167.
- [8] Kwon B S, Wakulchik M, Haq A K. Sequence analysis of mouse tyrosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 153: 1301- 1309.
- [9] Schmutz S M, Berryere T G, Ciobanu D C, et al. A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation[J]. Mamm. Genome, 2004, 15: 62- 67.
- [10] Inagaki H, Koga A, Bessho Y, et al. The tyrosinase gene from medaka: transgenic expression rescued albino mutation[DB/OL]. Submitted (Jan- 1998) to the EMBL/GenBank/ DDBJ databases. <http://www.ebi.ac.uk/Databases/>
- [11] Yamamoto H, Kudo T, Masuko N. Phylogeny of regulatory regions of vertebrate tyrosinase genes[J]. Pigm. Cell Res., 1992, 5: 284- 294.
- [12] Ebbelaar C E M, Wichers H J, Van D B T. Characterization of fruiting body expressed gene encoding a putative tyrosinase in *Agaricus bisporus* [DB/OL]. Submitted (Jan- 1998) to the EMBL/Gen Bank/ DDBJ databases. <http://www.ebi.ac.uk/Databases/>
- [13] Bernan V, Fipula D, Herber W. The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product[J]. Gene, 1985, 37: 101- 110.
- [14] Mercado-Blanco J, Garcia F, Fernandez-Lopez M, et al. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene mepA[J]. J. Bacteriol., 1993, 175: 5403- 5410.
- [15] Langfelder K, Glaser P, Brakhage A A. Cloning of a tyrosinase gene of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* [DB/OL]. Submitted (Aug- 2000) to the

- EMBL/GenBank/DBJ databases. <http://www.ebi.ac.uk/Databases/>
- [16] Gastel M V, Bubacco L, Groenen E J J, et al. EPR study of the dinuclear active copper site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* [J]. FEBS Lett., 2000, 474: 228–232.
- [17] Himmelwright R S, Eickman N C, Lu Bien C D, et al. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins [J]. J. Am. Chem. Soc., 1980, 102: 7339–7344.
- [18] Longa S D, Ascone I, Biancoconi A, et al. The dinuclear copper site structure of *agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy [J]. J. Biol. Chem., 1996, 271(35): 21025–21030.
- [19] Seo S Y, Sharma V K, Sharma N. Mushroom tyrosinase: recent prospects [J]. J. Agric. Food Chem., 2003, 51: 2837–2853.
- [20] Ikeda K, Masujima T, Suzuki K, et al. Cloning and sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *St. castaneoglobisporus* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996, 45: 80–85.
- [21] Tzung-Yuan T, Yan-Hwa W L. Roles of copper ligands in the activation and secretion of *Streptomyces tyrosinase* [J]. J. Biol. Chem., 1998, 273: 19243–19250.
- [22] Urs K, Denise M N, Grazia T, et al. Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa* [J]. J. Biol. Chem., 1989, 264: 17250–17258.
- [23] Aigner B, Besenfelder U, Müller M, et al. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains [J]. Mamm. Genome., 2000, 11: 700–702.
- [24] 安林坤, 马林, 全军民, 等. 固定化酪氨酸酶去除水中酚及胺类物质的研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(5): 63–67.
- [25] 胡龙兴. 固定化酶催化氧化去除水溶液中酚的研究 [J]. 环境科学, 1996, 17(3): 57–60.
- [26] 胡效亚, 冷宗周. 酪氨酸酶电流传感器测定低浓度氰化物抑制剂的反应 [J]. 高等学校化学学报, 1995, 16: 359–362.
- [27] 段晓红, 毛歆, 彭珍荣. 固定化细胞生产黑色素的研究 [J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1997, 43(2): 249–253.
- [28] Song K K, Huang H, Han P, et al. Inhibitory effects of *cis*- and *trans*- isomers of 3, 5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 342: 1147–1151.
- [29] Qiu L, Chen Q X, Wang Q, et al. Irreversibly inhibitory kinetics of 3, 5-dihydroxyphenyldecanoate on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase [J]. Bioorgan. Med. Chem., 2005, 13: 6206–6211.
- [30] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 2003, 18(6): 491–496.
- [31] Chen Q X, Song K K, Qiu L, et al. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids [J]. Food Chem., 2005, 91: 269–274.
- [32] Song K K, Chen Q X, Wang Q, et al. Inhibitory effects of 4-vinylbenzaldehyde and 4-vinylbenzoic acid on the activity of mushroom tyrosinase [J]. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 2005, 20(3): 239–244.
- [33] 王建华, 雷帆, 胡波, 等. 10 种中药对酪氨酸酶激活作用的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(4): 40.
- [34] Ishida H, Matsumura K, Hata Y, et al. Establishment of a hyper-protein production system in submerged *Aspergillus oryzae* Culture under tyrosinase-encoding gene (*melO*) promoter control [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 57: 131–137.

Tyrosinase: Recent Prospects

CHEN Qing-xi, SONG Kang-kang

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Tyrosinase is a copper-containing enzyme, as known as polyphenol oxidase, which is widely distributed in microorganisms, plants and animals. In human being, tyrosinase is the key enzyme for melanin biosynthesis, and is associated with melanin hyperpigmentation such as melasma, freckles, ephelide, senile lentigines. Furthermore, the studies for tyrosinase including the structure, expression and regulation of coding tyrosinase gene, and the inhibitors and activators of tyrosinase, have been paid attention to in the world. As so far, the active site and catalytic capacity of tyrosinase have been studied intensively, however, the three-dimensional structure of tyrosinase has been unclear.

Key words: tyrosinase; melanin; hyperpigmentation; gene; active site