

$\alpha$ -synuclein 蛋白及抑制剂对酪氨酸酶的调控机制

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 21620060153332

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

$\alpha$ -synuclein 蛋白及抑制剂对酪氨酸酶的调控机制

Transcriptional Regulation of Tyrosinase by  $\alpha$ -synuclein and  
Inhibitors

庄江兴

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 8 月

论文答辩时间: 2009 年 9 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: 刘波 \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 9 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（     ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年   月   日解密，解密后适用上述授权。

（     ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年   月   日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
1 前言.....	3
1.1 酪氨酸酶.....	3
1.1.1 概述.....	3
1.1.2 酪氨酸酶的三维结构.....	3
1.1.3 理化性质.....	5
1.1.4 生理功能.....	5
1.1.5 酪氨酸酶催化作用机理.....	6
1.1.6 基因表达与调控.....	8
1.1.7 与酪氨酸酶相关的应用研究概况.....	10
1.2 $\alpha$ -synuclein 蛋白.....	10
1.2.1 概述.....	10
1.2.2 $\alpha$ -synuclein 与帕金森病.....	12
1.3 本论文研究的内容和意义.....	14
2 实验试剂与仪器.....	16
2.1 主要材料和试剂.....	16
2.2 主要实验仪器.....	18
3 实验方法.....	19
3.1 培养基及缓冲液配制.....	19
3.1.1 大肠杆菌培养基.....	19
3.1.2 细胞培养基.....	19
3.1.3 琼脂糖凝胶.....	20
3.1.4 RIPA 裂解液.....	20
3.1.5 胶迁移缓冲液.....	20
3.1.6 免疫印迹(Western blot)相关缓冲液.....	20
3.2 cardols和 cardnals的分离纯化及结构鉴定.....	21

<b>3.3 抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用机理的研究</b> .....	22
3.3.1 抑制剂对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力的影响.....	22
3.3.2 抑制剂对蘑菇酪氨酸酶二酚酶作用作用的研究.....	23
3.3.3 效应物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制类型和抑制常数的测定.....	23
3.3.3 效应物对酶抑制作用动力学常数的测定.....	23
<b>3.4 免疫印迹(Western blot)</b> .....	23
3.4.1 蛋白样品的制备.....	23
3.4.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	24
3.4.3 蛋白质的电转移及膜的封闭.....	24
3.4.4 抗原抗体反应.....	24
3.4.5 ECL 显色.....	25
<b>3.5 瞬时转染</b> .....	25
<b>3.6 ELISA 检测</b> .....	25
<b>3.7 免疫共沉淀</b> .....	25
<b>3.8 实时荧光定量PCR (Real-time PCR)</b> .....	26
3.8.1 总RNA的提取.....	26
3.8.2 cDNA 单链的合成.....	26
3.8.3 Real-time PCR.....	27
<b>3.9 RNAi 干扰实验</b> .....	27
3.9.1 Tyrosinase RNAi 序列.....	27
3.9.2 RNAi 干扰实验操作.....	27
<b>4 实验结果</b> .....	29
<b>4.1 Cardols and cardonals 分离纯化与结构鉴定</b> .....	29
4.1.1 HPLC 分离 Cardols and cardonals.....	29
4.1.2 Cardols and cardonals 的 GC-MS 分析.....	30
4.1.3 Cardols and cardonals 的核磁共振分析.....	32
4.1.3.1 cardol trienes 的核磁共振分析.....	32
4.1.3.2 cardol diene 的核磁共振分析.....	35
4.1.3.3 cardanol trienes 的核磁共振分析.....	38

---

4.1.3.4 cardanol diene的核磁共振分析.....	42
4.1.3.5 cardanol monone的核磁共振分析.....	44
<b>4.2 抑制剂的酶学效应.....</b>	<b>48</b>
4.2.1 cardol trienes的酶学效应.....	48
4.2.1.1 cardol trienes的对蘑菇酪氨酸酶失活的影响.....	48
4.2.1.2 cardol trienes对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理.....	48
4.2.1.3 cardol trienes 对蘑菇酪氨酸酶催化L-DOPA氧化动力学.....	49
4.2.1.4 cardol trienes 对蘑菇酪氨酸酶失活动力学研究.....	49
4.2.1.5 cardol trienes反应速率常数测定.....	52
4.2.2 cardol diene的酶学效应.....	55
4.2.2.1 cardol diene对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定.....	55
4.2.2.2 cardol diene对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理.....	56
4.2.2.3 cardol diene对二酚酶的抑制作用类型的判断.....	56
4.2.3 cardanol trienes的酶学效应.....	57
4.2.3.1 cardanol trienes对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定.....	57
4.2.3.2 cardanol trienes对二酚酶的抑制作用机理的判断.....	57
4.2.4 cardanol diene的酶学效应.....	59
4.2.4.1 cardanol diene对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定.....	59
4.2.4.2 cardanol diene对二酚酶的抑制作用机理的判断.....	59
4.2.5 cardanol monone的酶学效应.....	59
4.2.5.1 cardanol monone对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制作用的测定.....	59
4.2.5.2 cardanol monone对二酚酶的抑制作用机理的判断.....	61
4.2.6 头孢唑啉和头孢地嗪的的酶学效应.....	62
4.2.6.1 头孢唑啉和头孢地嗪对蘑菇酪氨酸酶单酚酶活力影响的浓度效应....	62
4.2.6.2 头孢唑啉和头孢地嗪对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响.....	64
4.2.6.3 头孢唑啉和头孢地嗪对蘑菇酪氨酸酶的二酚酶抑制机制研究.....	64
4.2.6.4 头孢唑啉蘑菇酪氨酸酶的二酚酶竞争性抑制机制研究.....	65
4.2.6.5 头孢地嗪蘑菇酪氨酸酶的二酚酶混合型抑制机制研究.....	65
<b>4.3 cardols and cardanols的细胞学效应.....</b>	<b>67</b>

4.3.1 cardols and cardanols对小鼠B16F10细胞增殖率的影响.....	67
4.3.2 cardols and cardanols对小鼠B16F10细胞黑色素生成的影响.....	67
<b>4.4 cardols and cardanols对果蝇多巴胺含量的影响.....</b>	<b>68</b>
<b>4.5 <math>\alpha</math>-synuclein对酪氨酸酶的调控机制研究.....</b>	<b>69</b>
4.5.1 $\alpha$ -synuclein对黑色素生成的影响.....	69
4.5.2 免疫共沉淀.....	69
4.5.3 $\alpha$ -synuclein对酪氨酸酶转录调控途径.....	69
4.5.4 $\alpha$ -synuclein对酪氨酸酶表达水平的影响.....	70
4.5.5 $\alpha$ -synuclein对cAMP含量的影响.....	71
4.5.6 RNAi对黑色素生成的影响.....	71
4.5.7 RNAi对酪氨酸酶及P-CREB表达水平的影响.....	72
4.5.8 RNAi对酪氨酸酶转录调控途径影响.....	73
4.5.8.1 Forskolin对黑色素生成的影响.....	73
4.5.8.2 Forskolin对酪氨酸酶转录表达的影响.....	73
4.5.9 酪氨酸酶表达水平对多巴胺产生的细胞毒性的影响.....	75
<b>5 讨论.....</b>	<b>76</b>
5.1 cardols 和 cardanols 对蘑菇酪氨酸酶的酶学效应.....	76
5.2 头孢唑啉和头孢地嗪对蘑菇酪氨酸酶的酶学效应.....	76
5.3 cardols 和 cardanols 对小鼠 B16F10 细胞学效应.....	78
5.4 cardols 和 cardanols 对小鼠多巴胺含量的影响.....	78
5.4 $\alpha$ -synuclein 蛋白对酪氨酸酶的调控机制研究.....	78
<b>6 结论.....</b>	<b>80</b>
<b>7 参考文献.....</b>	<b>81</b>
在学期间发表论文.....	92
致谢.....	93

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	2
<b>1 Introduction</b> .....	3
<b>1.1 Tyrosinase</b> .....	3
1.1.1 Overview.....	3
1.1.2 Structure of tyrosinase.....	3
1.1.3 Physical and Chemical Properties.....	5
1.1.4 Physiological function.....	5
1.1.5 Catalytic mechanism.....	6
1.1.6 Gene expression and regulation.....	8
1.1.7 Research overview about application of tyrosinase.....	10
<b>1.2 <math>\alpha</math>-synuclein</b> .....	10
1.2.1 Overview.....	10
1.2.2 $\alpha$ -synuclein and Parkinson's disease.....	12
<b>1.3 content and significance of the study</b> .....	14
<b>2 Reagents and instruments</b> .....	16
<b>2.1 Reagents and materials</b> .....	16
<b>2.2 Instruments</b> .....	18
<b>3 Methods</b> .....	19
<b>3.1 Media and buffer preparation</b> .....	19
3.1.1 <i>E. coli</i> medium.....	19
3.1.2 Cell culture medium.....	19
3.1.3 Agarose gel preparation.....	20
3.1.4 RIPA lysis buffer.....	20
3.1.5 Gel migration buffer.....	20
3.1.6 Western blot buffer.....	20
<b>3.2 Purification and structural identification of cardols and cardnals</b> .....	21
<b>3.3 Inhibition mechanism of inhibitor for tyrosinase</b> .....	22



---

3.3.1 Inhibitory effects on the monophenolase activity of mushroom tyrosinase. . . .	22
3.3.2 Inhibitory effects on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. . . . .	23
3.3.3 Inhibitory type on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. . . . .	23
3.3.3 Inhibitory kinetics constants. . . . .	23
<b>3.4 Western blot. . . . .</b>	<b>23</b>
3.4.1 Preparation of protein samples. . . . .	23
3.4.2 SDS-Page. . . . .	24
3.4.3 Protein transfer and membrane block. . . . .	24
3.4.4 Antigen-antibody reaction. . . . .	24
3.4.5 ECL detection. . . . .	25
<b>3.5 Transient transfection. . . . .</b>	<b>25</b>
<b>3.6 ELISA dection. . . . .</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Immunoprecipitation. . . . .</b>	<b>25</b>
<b>3.8 Real-time PCR. . . . .</b>	<b>26</b>
3.8.1 RNA extraction. . . . .	26
3.8.2 cDNA synthesis. . . . .	26
3.8.3 Real-time PCR. . . . .	27
<b>3.9 RNAi . . . . .</b>	<b>27</b>
3.9.1 Tyrosinase RNAi sequence. . . . .	27
3.9.2 RNAi process. . . . .	27
<b>4 Results. . . . .</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Purification and structural identification of cardols and cardnals. . . . .</b>	<b>29</b>
4.1.1 HPLC seperation. . . . .	29
4.1.2 GC-MS analysis of Cardols and cardonal. . . . .	30
4.1.3 HNMR analysis of Cardols and cardonals. . . . .	32
4.1.3.1 HNMR analysis of cardol trienes. . . . .	32
4.1.3.2 HNMR analysis of cardol diene. . . . .	35
4.1.3.3 HNMR analysis of cardanol trienes. . . . .	38
4.1.3.4 HNMR analysis of cardanol diene. . . . .	42

---

4.1.3.5 HNMR analysis of cardanol monone. ....	44
<b>4.2 Inhibitory effects of cardol trienes. ....</b>	<b>48</b>
4.2.1 Inhibitory effects of cardol trienes. ....	48
4.2.1.1 Inhibitory effects of cardol trienes. ....	48
4.2.1.2 Inhibitory mechanism of cardol trienes. ....	48
4.2.1.3 Inhibition of cardol trienes for the catalysis of L-DOPA. ....	49
4.2.1.4 Inactivation kinetics of cardol trienes. ....	49
4.2.1.5 Reaction rate constant of cardol trienes. ....	52
4.2.2 Inhibitory effects of cardol diene. ....	55
4.2.2.1 Effect of cardol diene on the diphenolase activity ....	55
4.2.2.2 Inhibitory mechanism of cardol diene on mushroom tyrosinase. ....	56
4.2.2.3 Inhibitory type of cardol diene on mushroom tyrosinase. ....	56
4.2.3 Inhibitory effects of cardanol trienes. ....	57
4.2.3.1 Effect of cardanol trienes on the diphenolase activity. ....	57
4.2.3.2 Inhibitory mechanism of cardanol trienes on on the diphenolase activity. .	57
4.2.4 Inhibitory effects of cardanol diene. ....	59
4.2.4.1 Inhibitory effects of cardanol diene on on the diphenolase activity. ....	59
4.2.4.2 Inhibitory mechanism of cardanol diene on the diphenolase activity. ....	59
4.2.5 Inhibitory effects of cardanol monone. ....	59
4.2.5.1 Inhibitory effects of cardanol monone on the diphenolase activity ....	59
4.2.5.2 Inhibitory mechanism of cardanol monone on the diphenolase activity. .	61
4.2.6 Inhibitory effects of Cefazolin and Cefodizime. ....	62
4.2.6.1 Effects of Cefazolin and Cefodiime on monophenolase. ....	62
4.2.6.2 Effects of Cefazolin and Codiime on diphenolase. ....	64
4.2.6.3 Inhibitory mechanism of Cefazolin and Codiime on diphenolase. ....	64
4.2.6.4 Competitive inhibitory mechanism of Cefazolin and Codiime. ....	65
4.2.6.5 Mixed-type inhibitory mechanism of Cefazolin and Codiime. ....	65
<b>4.3 Effects of cardols and cardanols on cells. ....</b>	<b>67</b>
4.3.1 The effects of cardols and cardanols on the B16F10 cell vability. ....	67

---

4.3.2	The effects of cardols and cardanols on the content of melanin in B16F10. . . . .	67
<b>4.4</b>	<b>The effects of cardols and cardanols on the content of melanin in B16F10. . . . .</b>	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b>Mechanism of <math>\alpha</math>-synuclein's regulation on tyrosinase. . . . .</b>	<b>69</b>
4.5.1	The effects of $\alpha$ -synuclein on the content of melanin in B16F10 melanoma . . . . .	69
4.5.2	Immunoprecipitation. . . . .	69
4.5.3	The effects of $\alpha$ -synuclein on transcription of tyrosinase. . . . .	69
4.5.4	The effects of $\alpha$ -synuclein on expression of tyrosinase. . . . .	70
4.5.5	The effects of $\alpha$ -synuclein on the cAMP in B16F10 melanoma. . . . .	71
4.5.6	The effects of RNAi on the content of melanin in B16F10 melanoma. . . . .	71
4.5.7	The effects of RNAi on the tyrosinase and P-CREB in B16F10 melanoma. . . . .	72
4.5.8	The effects of RNAi on tyrosinase transcription. . . . .	73
4.5.8.1	The effects of Forskolin on melanin production. . . . .	73
4.5.8.2	The effects of Forskolin on tyrosinase transcription. . . . .	73
4.5.9	The effects of tyrosinase express on cell viability by dopamine. . . . .	75
<b>5</b>	<b>Discussion. . . . .</b>	<b>75</b>
5.1	Inhibitory effects of cardols and cardanols for mushroom tyrosinase. . . . .	76
5.2	Inhibitory effects of Cefazolin and Cefodizime for mushroom tyrosinase. . . . .	76
5.3	The effects of cardols and cardanolson on B16 cell. . . . .	78
5.4	The effects of cardols and cardanols on the content of dopamine in fly. . . . .	78
5.4	Mechanism of $\alpha$ -synuclein's regulation on tyrosinase. . . . .	78
<b>6</b>	<b>Conclusions. . . . .</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>References. . . . .</b>	<b>81</b>
<b>Papers.</b>	<b>. . . . .</b>	<b>92</b>
<b>Acknowledgements.</b>	<b>. . . . .</b>	<b>93</b>

## 摘 要

酪氨酸酶 (EC.1.14.18.1) 是一种广泛存在于自然界中含铜的金属氧化酶, 它具有单酚酶活性, 可以将酪氨酸羟化形成 L-多巴 (L-DOPA), 也具有二酚酶活力, 将 L-多巴氧化成多巴醌。它是生物形成黑色素合成的关键酶, 决定了皮肤和头发色素的颜色。酪氨酸酶的异常表达引起了各种各样的皮肤病, 如老年斑及光照损伤等。它还与人脑中的神经黑色素形成及神经退行性病变相关的帕金森病有关, 因此酪氨酸酶抑制剂临床应用于与黑色素失调相关疾病的治疗。其在美白化妆品及日晒变黑应用方面具有重要作用。

本论文从天然植物中分离纯化出对酪氨酸酶具有很强抑制作用的抑制剂并探讨其对单酚酶和二酚酶活性的抑制作用机理。再以小鼠 B16F10 细胞的酪氨酸酶为研究对象, 研究其对黑色素生成量的影响及其相关基因的转录调控机制。最后, 以果蝇为动物模型研究酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶代谢途径中相关产物多巴胺生成量的影响。在筛选酪氨酸酶抑制剂过程中, 发现了与帕金森病相关的  $\alpha$ -synuclein 蛋白的过表达能显著抑制黑色素的生成量, 这预示着酪氨酸酶与帕金森病可能有着某种相关性, 因此研究了  $\alpha$ -synuclein 蛋白对小鼠 B16F10 细胞酪氨酸酶转录调控的机制。相关研究内容和结果如下:

- (1) 对酪氨酸酶有抑制作用的化合物: Cardol trienes, Cardol diene, Cardanol trienes, Cardanol diene, Cardanol monone, 研究了它们对酪氨酸酶的抑制机理及对小鼠 B16F10 细胞的黑色素生成量的影响及其相关基因的转录调控机制。
- (2) 从抗生素药品中筛选了对酪氨酸酶有抑制作用的药物, 研究其对酪氨酸酶的抑制机理。
- (3) 以果蝇为动物模型研究酪氨酸酶抑制剂对酪氨酸酶代谢途径中相关物质含量的影响。
- (4) 研究了  $\alpha$ -synuclein 蛋白过表达对小鼠 B16F10 细胞的酪氨酸酶转录调控的机制。

**关键词:** 酪氨酸酶; 抑制剂; 作用机理;  $\alpha$ -synuclein 蛋白; 黑色素形成调控

## Abstract

Tyrosinase (1.14.18.1), widely distributed in nature, is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis---the hydroxylation of monophenol and the oxidation of *o*-diphenol to the corresponding *o*-quinone. It is a key enzyme in melanin biosynthesis, involved in determining the color of mammalian skin and hair. Its abnormal expression is responsible for the various dermatological disorders, such as melasma age spots, actinic damages. It also contributes to neuromelanin formation in the human brain and the neurodegeneration associated with Parkinson's disease. Tyrosinase inhibitors, therefore, should be clinically useful for the treatments of some dermatological disorders associated with melanin hyperpigmentation and also important in cosmetics for whitening and depigmentation after sunburn. The inhibition of tyrosinase has been the subject of many studies.

In the present paper, we Separate inhibitors from natural plants and effects of them on the activity of mushroom tyrosinase have been studied. Then effects of them on the melanin content and regulation of melanogenesis have been studied. In the end, effects of inhibitors on dopamine content in fly were assay. In the process of our screening the tyrosinase inhibitors, we found that melanin content could be depression by overexpressing  $\alpha$ -synuclein in the cell. The result indicates that tyrosinase and Parkinson's disease have correlation to some extent, so the regulation of tyrosinase in the B16F10 has been studied. The contents and results were as follows:

Five compounds were separated that can inhibit tyrosinase from CNSL: Cardol trienes, Cardol diene, Cardanol trienes, Cardanol diene, Cardanol monone. The inhibition mechanism of them against the activity of mushroom tyrosinase was studied. Effects of them on the melanin content and regulation of melanogenesis in the B16F10 cell were also studied.

Screening the tyrosinase inhibitors from drugs and studying their inhibitory mechanism have been conducted.

Effects of inhibitors on dopamine content in fly were assay. Regulation of melanogenesis by overexpressing  $\alpha$ -synuclein in the B16F10 was also studied.

Key Words: Tyrosinase; Inhibitors; Mechanism;  $\alpha$ -synuclein; Regulation of melanogenesis.

## 1 前言

### 1.1 酪氨酸酶

#### 1.1.1 概述

酪氨酸酶 (EC.1.14.18.1) 是一种广泛存在于自然界中含铜的金属氧化酶, 它具有单酚酶活性, 可以将酪氨酸羟化形成 L-多巴 (L-DOPA), 也具有二酚酶活力, 将 L-多巴氧化成多巴醌<sup>[1]</sup>. 是生物形成黑色素合成的关键酶, 它决定了皮肤和头发色素的颜色. 酪氨酸酶的异常表达引起了各种各样的皮肤病, 如老年斑及光照损伤等, 它还与人脑中的神经黑色素形成及神经退行性病变相关的帕金森病有关<sup>[2]</sup>, 因此酪氨酸酶抑制剂临床应用于与黑色素失调相关疾病的治疗<sup>[3]</sup>且在美白化妆品及日晒变黑应用方面具有重要作用<sup>[4,5]</sup>. 酪氨酸酶抑制剂成了被广泛研究的课题<sup>[6-10]</sup>. 一些药物对酪氨酸酶的作用已有文献报导, 如治疗高血压和心衰药物卡托普利和抗甲状腺药物甲巯基咪唑都是酪氨酸酶抑制剂<sup>[11,12]</sup>.

#### 1.1.2 酪氨酸酶的三维结构

酪氨酸酶是一种疏水性的膜结合蛋白. 酪氨酸酶属于III型铜蛋白家族, 在催化反应过程中, 其铜离子中心存在三种不状态<sup>[13]</sup>, 它的活性中心含有双铜离子, 可以可逆的与氧结合<sup>[14,15]</sup>. 虽然III型铜蛋白家族结构有很多文献报导<sup>[16-22]</sup>, 但直到 2006 年, Matoba 等<sup>[23]</sup>在大肠杆菌表达酪氨酸酶和 ORF378 蛋白, 得到了酪氨酸酶与 ORF378 蛋白共结晶及结构模型 (见图 I).

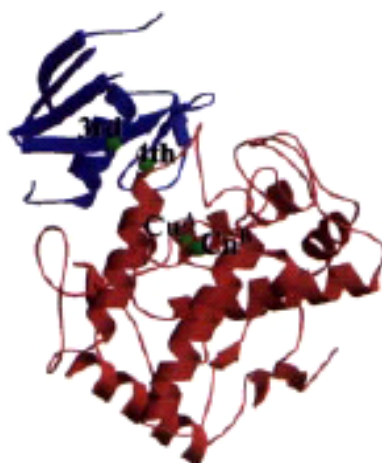


图 I 酪氨酸酶的晶体结构. 红色代表酪氨酸酶, 蓝色代表 ORF378.  
Fig.I Overall structure of tyrosinase complexed with ORF378

酪氨酸酶是由 7 个  $\alpha$ -螺旋和一些  $\beta$ -折叠组成，4 个  $\alpha$ -螺旋位于蛋白的核心 ( $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ )，酶活性中心则位于  $\alpha$ -螺旋中。活性中心 CuA 分别与 His<sub>38</sub>、His<sub>54</sub> 和 His<sub>63</sub> 形成配位键，CuB 分别与 His<sub>190</sub>、His<sub>194</sub> 和 His<sub>216</sub> 形成配位键。除了 His<sub>54</sub>，铜离子的 His 配体均来自于螺旋  $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$  和  $\alpha 7$ ，并且 His<sub>54</sub> 没有与硫原子形成类似于儿茶酚氧化酶活性中心的硫醚键，所以 His<sub>54</sub> 易变动，而导致 CuA 比 CuB 易于变动。酶双铜活性中心位于由疏水氨基酸残基组成的口袋的底部。ORF378 蛋白是位于酪氨酸酶表面的载体蛋白，可以协助铜离子插入酪氨酸酶的活性中心，从而使酪氨酸酶具有活性。研究表明，酪氨酸酶与 ORF378 的结合态是酪氨酸酶在活化前的中间态。酪氨酸酶的活性中心接近酶蛋白分子表面(见图 II)<sup>[23]</sup>，有利于底物与酶活性中心结合。

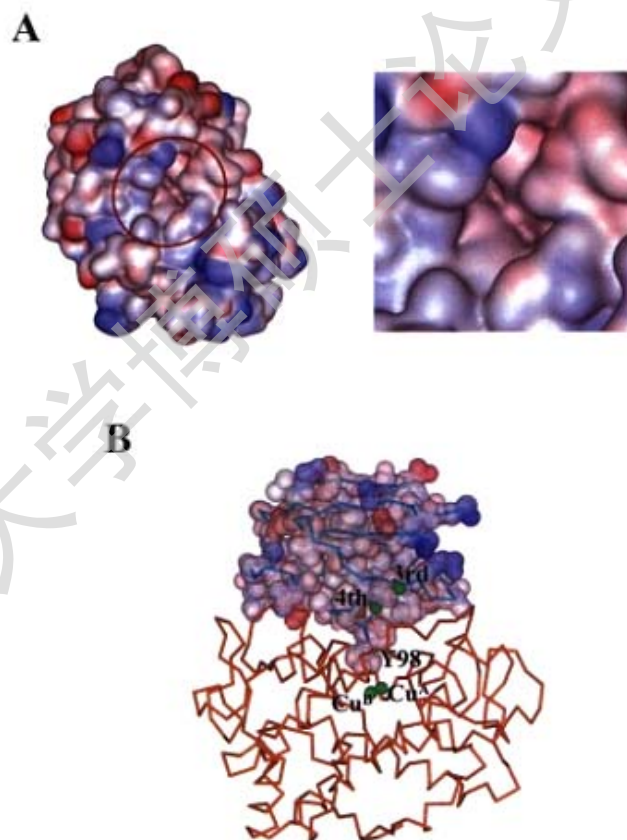
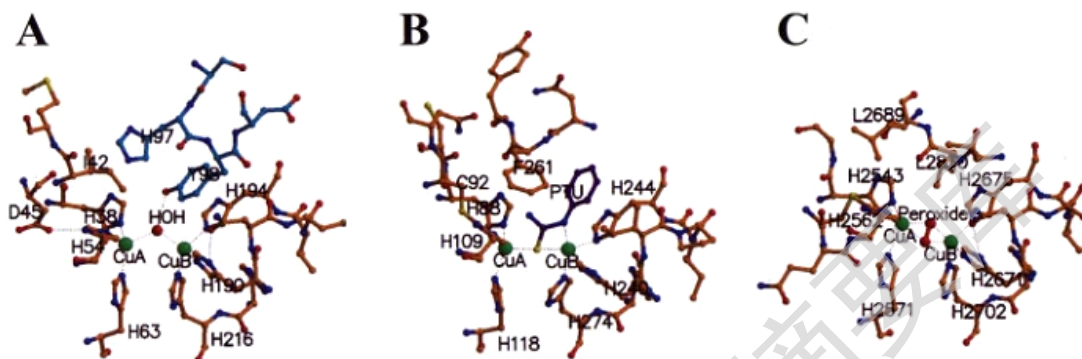


图 II 酪氨酸酶(A)和 ORF378 分子表面结构.

Fig. II Molecular surfaces of tyrosinase (A) and ORF378 (B).

酪氨酸酶的活性中心由两个含铜离子位点构成<sup>[24]</sup>。在催化过程中，双核铜离子位点以三种形态存在，分别是氧-铜离子态( $E_{oxy}$ )、铜离子态 ( $E_{met}$ )、亚铜离

子态 ( $E_{\text{deoxy}}$ ) (见图III) [23]。



图III 酪氨酸酶活性中心的氧-铜离子态(a)、铜离子态(b)、亚铜离子态(c)模型。

Fig.III The mode of  $E_{\text{oxy}}$ ,  $E_{\text{met}}$ ,  $E_{\text{deoxy}}$  of the active site of tyrosinase.

### 1.1.3 理化性质

不同来源的酪氨酸酶有着不同的分子特性、分子量、肽链总长度及等电点 [25-32]。如蘑菇酪氨酸酶反应的最适 pH 为 5.5~7.0, 最适温度为 30~35 °C, 酶液在冰箱 4 °C 条件下, 保存 7 天活力下降 50 %; 室温 30 °C 条件下, 保存 2 天活力即下降 50 %; 酪氨酸酶干粉在 -20 °C 条件下保存 1 年, 活力仅下降 5 %~10 %。人的酪氨酸酶分子量 60 kDa、肽链总长度 529 AA、等电点 6.03; 鸡的酪氨酸酶分子量 60 kDa、肽链总长度 529 AA、等电点 5.71; 鼠的酪氨酸酶分子量 60 kDa、肽链总长度 533 AA、等电点 5.67; 链霉菌 *Streptomyces lincolnensis* 的酪氨酸酶分子量 30 kDa、肽链总长度 272 AA、等电点 7.71; 中国软壳海龟 *Trionyx sinensis* 的酪氨酸酶分子量 31 kDa、肽链总长度 273AA、等电点 5.53。绝大多数酪氨酸酶在 60 °C 时, 其半衰期只有几分钟, 而一种从革兰氏阴性菌 *Thermomicrobium roseum* 分离出的酪氨酸酶, 在 90 °C 时还有很高的活性, pH 范围为 8.5-10。

### 1.1.4 生理功能

酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶, 黑素的生物合成是一个由酪氨酸酶催化体内酪氨酸羟化而启动一系列生化反应生成两种黑色素的过程 [33,34]。哺乳动物体内黑色素分真黑素 (eumelanins) 和褪黑素 (phaeomelanins) 两种 [35], 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。黑色素生



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库