

植物螯合肽合成酶的研究进展

李安明*, 李德华, 邓青云, 汪宜宇

孝感学院生命科学技术学院, 湖北孝感 432000

摘要: 植物螯合肽(phytochelatins, PCs)在植物解除重金属的毒性方面具有重要作用, 其结构为 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2\sim 11$), 它不是基因的编码产物, 而是在植物螯合肽合成酶(phytochelatase, PCS)的催化下以谷胱甘肽(glutathione, GSH)为底物合成的。PCS能够被金属离子激活, 高度保守的N-端是催化结构域, 而其C-端则是多变的。本文就PCS的结构, 功能与催化机制以及PCS的最新研究进行了介绍。

关键词: 植物螯合肽; 植物螯合肽合成酶; 植物螯合肽合成酶基因

Research Progress on Phytochelatase Synthase

LI An-Ming*, LI De-Hua, DENG Qing-Yun, WANG Yi-Yu

School of Life Sciences and Biotechnology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432000, China

Abstract: Phytochelatins (PCs), with a general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2\sim 11$), play an important role in heavy metal detoxification in plants. PCs are post-translationally synthesized directly from glutathione (GSH) by the enzyme phytochelatase synthase (PCS), of which the activity is dependent on the presence of heavy metals. The conserved N-terminal core domain of PCS functions as the catalytic domain, whereas the C-terminal region is highly variable. The review focused on the structure, functions and catalytic mechanisms of PCS, prospects were also included.

Key words: phytochelatase (PC); phytochelatase synthase (PCS); phytochelatase synthase gene

重金属污染是全球性环境问题, 植物修复技术因其廉价、安全与环境友好的特点, 给重金属污染环境的修复带来了新的希望(Salt等1998)。植物修复就是利用植物去除环境中的污染物或者将其转变成无毒及毒性较低的物质过程(Pilon-Smits 2005)。超富集植物是指那些能够抗重金属且地上部分累积较多重金属的植物(Cunningham等1995; Salt等1998), 在植物修复中具有重要作用。超富集植物对重金属的抗性主要是通过两个方面实现的: (1)阻止金属通过细胞膜的运输将细胞质中有毒金属离子的浓度维持在较低水平, 主要是通过三条途径来完成的: 提高细胞壁的结合能力、改变离子通道的通透性, 减少金属的吸收以及提高主动将金属运出细胞的能力(Silver和Misra 1988); (2)解除进入细胞中金属的毒性, 主要是通过螯合作用使金属失活, 降低金属毒性或者通过区室化作用来实现的(Tong等2004)。

Salt等(1998)将植物对金属的抗性机制分为螯合作用、区室化作用、生物转化与细胞修复四个方面。其中螯合作用是指植物中的重金属通过与

高亲和力的物质结合形成螯合物而被吸收, 从而降低重金属离子的浓度, 减少其毒性。金属硫蛋白(metallothionein, MT)和植物螯合肽(phytochelation, PC)被认为是其中两种起主要作用的金属结合蛋白。MT是基因编码的一类低分子量的富含半胱氨酸的多肽(Robinson等1993)。但在高等植物中分离最多的重金属结合肽, 不是MT而是PC。

自Grill等(1985)从Cd处理过的印度萝芙木(*Rauvolfia serpentina*)悬浮培养细胞中分离纯化到一类新的能够结合重金属的蛋白即PC, 又陆续在真核生物包括高等植物(Grill等1988; Gekeler等1989)、真菌(Grill等1986)与藻类(Gekeler等1988)中发现了PCs。PC是一类含有 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 二肽重复单位而在其C-末端以Gly结尾的多肽, 其基本特征是: Glu位于其N-端, 下一个残基是通过 $\gamma\text{-羧基}$

收稿 2010-10-08 修定 2010-11-08

资助 湖北省重点(培育)学科农业资源利用(0903)和湖北省自然科学基金项目(2005ABA083)。

* 通讯作者(E-mail: Lsahmp68@yahoo.com.cn; Tel: 0712-2345490)。

与Glu相连的Cys, γ -Glu-Cys可以重复2到多次(Rausser 1995)。通过化学与物理方法证明PC的基本结构是 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, 通常n在2到5之间变化, 最高可以达到11(Zenk 1996; Cobbett 2000a, b; Cobbett和Goldsbrough 2002)。在高等植物中发现除了以Gly为C-末端氨基酸的PCs分子之外, 还存在以其他氨基酸为C-末端氨基酸残基的PCs分子, 根据其羧基末端氨基酸的不同将PCs分为五种类型(Rausser 1995; Zenk 1996)。PCs不仅能够被Cd, 而且还可以被其他有毒重金属和一些必需重金属, 如Hg、Zn、Cu和Ni诱导合成。Grill等(1987)最早在悬浮培养的植物细胞中发现植物螯合肽合成酶(phytochelatin synthase, PCS)活性, 他们的研究表明PCS可以被重金属激活, 以谷胱甘肽(glutathione, GSH)为底物催化PC的合成。

1 PC的作用

PC富含Cys可以通过其巯基与金属结合而形成硫醇盐, 它们的作用主要表现在两个方面: 提高植物对重金属的抗性与解除重金属对植物的毒害作用; 维持细胞内环境中金属离子浓度的相对稳定(Rausser 1990, 1995; Zenk 1996; Cobbett 2000a, b; Cobbett和Goldsbrough 2002)。

1.1 提高植物对重金属的抗性与解除重金属的毒害作用

为了获得抗 Cd^{2+} 的细胞, Steffen等(1986)将番茄(*Lycopersicon esculentum* cv. Heinz)细胞置于正常情况下足以致死的浓度下筛选, 获得的 Cd^{2+} 抗性细胞中, PC的累积量大大高于正常细胞, 但当用谷胺酰半胱氨酸合成酶抑制剂丁胱亚磺酰亚胺(buthionine sulfoximine, BSO)处理上述抗 Cd^{2+} 的细胞后, 其对 Cd^{2+} 的敏感性恢复, 认为PC介导了细胞对 Cd^{2+} 的抗性, PC的水平与对 Cd^{2+} 的抗性是相关的。用不同植物重复该实验得到了相同的结果(Gupta和Goldsbrough 1991)。PC抗 Cd^{2+} 最令人信服的结果是由Howeden等(1995a; b)发表的, 他们成功的分离到一个对 Cd^{2+} 敏感的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体, 这个突变体对 Cd^{2+} 是高度敏感的, 且不能形成Cd-PC复合物, 尽管其合成GSH的速度没有变化。PC合成酶活性实验表明, 与野生型植物相比, 这个突变体是PCS缺陷型。在 Cd^{2+} 的胁迫下该突变体不能富集PCs, 同时突变体对 Cd^{2+} 所

表现出来的敏感性与PC的含量降低是一致的。食用蘑菇美味牛肝菌(*Boletus edulis*)能够通过PCs螯合Cd(Collin-Hansen等2007)。而表达线虫*CePCS3*的烟草提高了对Cd的抗性, 同时细胞质与液泡中累积PC/Cd的比例也有所增加, 表明PCs对Cd的解毒作用是通过在细胞质中PCs暂时螯合Cd的结果(Wojas等2010)。这些研究说明PCs能够解除Cd对植物的毒害作用, 提高植物对Cd的抗性。

越来越多的研究表明PCs不仅能够解除Cd对植物的毒害作用与提高植物对Cd的抗性, 还能够抗Cd以外的许多金属和非金属。利用拟南芥与酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) PCS缺陷型突变体研究表明PCs在解除Cd和As的毒害作用中具有重要作用, 但在解除Zn、Ni和Se的毒害作用中却没有明显的作用。拟南芥PCS缺陷型突变体*cad1-3*与*cad1-6*即使在 Zn^{2+} 浓度较低的培养基上生长对Zn也是高度敏感的, 而且其根富集Zn的能力也大大降低, 表明PCs在植物对Zn的抗性与累积方面具有重要功能(Tennstedt等2009)。大豆(*Pisum sativum*)富集Cd与As的量与(h)PC(homo-phytochelatin)是一致的, (h)PC能够解除Cd和As的毒性(Vázquez等2009; Kim等2009)。PCs也能够提高植物对Pb的抗性(Andra等2009; Estrella-Gómez等2009)。

然而超富集植物体内合成的PC与其对重金属的耐性和超富集性无关。与非超富集植物相同, 超富集植物体内的PCs主要在根中由Cd诱导合成, Cd诱导PCs的快速累积只在Cd敏感的超富集植物天蓝遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*)(Schat等2002)与非超富集植物东南景天(*Sedum alfredii*)(Sun等2007)观察到。As能够有效诱导非超富集植物PCs的合成, 然而, 在As的诱导下, As超富集植物蜈蚣草(*Pteris vittata*)却只能合成极少量的PCs(Zhao等2003)。

1.2 维持细胞内环境中金属离子浓度的相对稳定

仅用微量金属元素处理过的植物组织与体外培养的细胞中就能够检测到PCs的存在, 同时体外培养细胞中产生PCs的水平与培养基中金属离子减少的水平是一致的。表明PCs在维持新陈代谢过程中金属离子的相对稳定方面有一定的作用(Rausser 1995, 1999; Zenk 1996)。另外, 体外实验表明PC-Cu和PC-Zn复合物可以分别激活依赖于Cu

的二胺氧化酶和依赖于Zn的碳酸酐酶(Thumann等1991),表明PCs金属复合物能够给需要金属离子的酶提供金属离子;此外,还有人提出PCs也可以参与Fe和S的新陈代谢(Zenk 1996; di Toppi和Gabbrielli 1999)。

1.3 参与植物体内金属离子尤其是Cd的运输

根特异性表达小麦(*Triticum aestivum*) *TaPCS1*的拟南芥突变体*cad1-3*抑制了突变体对Cd、Hg及As的敏感性,同时在根、叶及茎都可以检测到PCs,且根中Cd²⁺的浓度比突变体低,表明PCs不仅可以提高植物对这些重金属的抗性,而且可以从根向地上部分运输PCs与Cd²⁺(Gong等2003),转基因植物主要以Cd-PC₂的形式螯合Cd,且地上部分Cd的浓度是根的2倍,是野生型植物的1.6倍(Sadi等2008)。地上部分特异性表达小麦*TaPCS1*的拟南芥突变体*cad1-3*恢复了对Cd及As的抗性,并且根中累积的Cd比地上部分高,同时检测到PC₂的存在,但在突变体中没有检测到,表明PCs也可以从植物地上部分向根运输(Chen等2006)。另外通过质谱与荧光HPLC分析发现印度芥子菜(*Brassica juncea*)在Cd处理24小时之后,韧皮部含有高浓度的PCs,木质部中只检测到极其微量的PCs,并且韧皮部Cd浓度是木质部的4倍,表明PC-Cd的运输是通过韧皮部而不是木质部实现的(Mendoza-Cózatl等2008)。香根草(*Vetiveria zizanioides*)能够通过合成PCs提高对Pb的抗性,并且能够螯合与转运Pb,将其储藏在根与地上部分微管组织的液泡中(Andra等2009)。由于PCs是在Cd的诱导下合成的,因此可以相信PCs可参与Cd在植物体内的长距离转运过程。

2 PC的合成

2.1 PC是以GSH为底物,由PCS催化合成的

以大量植物为研究对象,利用体外培养细胞的生理学、化学与遗传学研究证明GSH(或GSH类似物)是PCs合成的底物(Rausser 1995; 1999)。早期的研究发现,在体外培养的细胞中PCs是在Cd的诱导下合成的,同时伴随着GSH含量的降低。进一步的研究发现当向细胞或者植物培养液中加入GSH合成抑制剂BSO,导致它们对Cd的敏感性,也使PCs的合成受到抑制,向培养液中加入GSH可以使这些现象消失(Cobbett 2000a; b)。PCs合成途径

的详细特征是通过研究酵母与拟南芥突变体而得到的。遗传学的研究证明酵母与拟南芥GSH缺陷型突变体中PCs的含量很低,同时对Cd高度敏感(Howden等1995a, b; Wang和Oliver 1996),尤其是拟南芥GSH突变体*cad2-1*不仅是GSH缺陷型,而且GSH合成的前两个酶之一谷氨酰半胱氨酸合成酶(glutamylcysteine synthase, GCS)也是没有活性的。突变体*cad2-1*的GCS基因的一个外显子缺失了6个碱基,从而影响与预测的酶活性位点相邻的结构域(Cobbett等1998),使GSH的合成不能进行。拟南芥GSH也可参与类PCs的合成,而且在Cd存在时,甘氨酸是合成PCs及其相关蛋白质的关键因素之一(Ducruix等2006)。

2.2 PC的合成与金属离子的诱导有关

研究表明在酵母与植物及体外培养的植物细胞中PCs的合成可以被很多金属所诱导(Rausser 1995)。超富集植物东南景天(*Sedum alfredii* H.)在Cd的诱导下,根茎叶中都可以检测到PC,而在Pb诱导下只在茎与根检测到PC的存在(Zhang等2008)。体外反应表明,PCs合成反应能够进行到激活它们合成的金属离子被反应所合成的PCs或加入的金属螯合剂如EDTA等螯合完后才终止(Loeffler等1989)。多种金属如Ni、Cu、Zn、Ag、Sn、Te、V、Au、Hg、Pb、Bi的硝酸盐或硫酸盐以及As、Se的阴离子均可诱导PCs产生,体外实验表明,Cd²⁺是最强的诱导剂(Zenk 1996),其诱导的效率是Cd²⁺>Ag⁺>Bi³⁺>Pb²⁺>Zn²⁺>Cu²⁺>Hg²⁺>Au³⁺>As⁵⁺>In³⁺>Tl³⁺>Ge⁴⁺>Bi³⁺>Ga³⁺;而其他一些离子,如Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Al³⁺就没有激活作用;Cd²⁺诱导速度最快,数量最多,是其他金属离子的几倍或几十倍(Reddy和Prasad 1990)。不同的金属在不同的浓度下对PCS活性的影响是不同的。对Cd而言,10~100 μmol·L⁻¹为PCS的最适活化浓度;而在10 μmol·L⁻¹时,Ni、Cu、Pb、Co对PCS的催化能力影响最大;Zn、Ag在50 μmol·L⁻¹时最大;Hg和Mg在100 μmol·L⁻¹时最大。并且PCS的活性与重金属元素的相互作用有关,Cu-Cd、Hg-Cd为拮抗作用,而Pb-Cd、Mn-Cd为协同作用(Nakazawa和Takenaga 1998)。对海生矽藻(*Thalassiosira pseudonana*)类进行研究,发现(γ-Glu-Cys)_{3,4}-Gly的产生主要决定于Cd²⁺、

Pb²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺ 的自由离子的浓度,而不是金属的总浓度(Gupta 和 Coldsbrough 1991)。PCs 的金属复合物,如 Cd²⁺、Ag⁺、Hg²⁺、Pb²⁺ 与 PCs 形成的复合物,引起了研究者的关注。采用 EXAFS 及可见光谱等手段对这些复合物进行的结构分析阐明了这些金属离子与 PCs 巯基之间的配位结合形式。

2.3 PC 合成的调节

PC 的生物合成途径可以被多种机制所调节。第一个可能的调节机制是通过调节 GSH 的生物合成。通过转基因研究发现,在印度芥子菜中表达 GSH 合成酶基因不仅增加了 PCs 的合成,而且提高了它对 Cd 的抗性(Zhu 等 1999a; b),这表明 GSH 生物合成的调节可能是 PC 合成调控的一种内在机制。Cd 胁迫可以提高野生型印度芥子菜 GCS 基因的转录(Schafer 等 1998); 同样, Cd 与 Cu 胁迫下的拟南芥中与 GSH 生物合成相关的 2 个基因 (GCS 和 GC) 以及 GSH 还原酶基因的转录水平也会提高(Xiang 和 Oliver 1998)。除了研究很清楚的 GSH 的生物合成受 GSH 的反馈抑制外,也有证据证明 GCS 的表达与转录后调控有关(May 等 1998; Noctor 和 Foyer 1998)。

当然,PCS 的调节是 PCs 合成调节的最主要方式。利用植物细胞的动力学研究表明,在 Cd 胁迫下 PCs 的合成很快会发生,与酶被激活的体外观察是一致的,酶的表达似乎与金属胁迫无关。在液体或固体培养基中培养的膀胱麦瓶草 (*Silene cucubalis*) (Grill 等 1989)、拟南芥(Howden 等 1995a; b) 和番茄(Chen 等 1997)的细胞中发现培养基中只含有微量的重金属时 PCs 也能够合成,表明增加了 PCS 活性。而且,PCS 活性的增加不仅可以通过转录调节 PCS 的量实现,也可以通过转录后激活该酶的活性而实现(Estrella-Gómez 等 2009)。总之,这些研究表明通过金属激活 PCS 调控 PCs 的合成是最基本的调节途径。

3 PCS 与 PCS 基因

3.1 PCS 的结构、特点与作用

Grill 等(1989)从膀胱麦瓶草的悬浮培养细胞中分离纯化了一种具有活性的酶,它可以通过将供体 GSH 的 γ -Glu-Cys 转移到受体分子而催化 PCs 的合成。研究发现这种转肽反应开始的时候是将 GSH 的 γ -Glu-Cys 转移到另一个 GSH 而形成 PC₂, 随后

的反应中,可以将 γ -Glu-Cys 转移到 PC 分子上从而形成一个 PC_{n+1} 的寡聚体。这种(γ -Glu-Cys)二肽转移酶被称为 PCS。它是一个分子量为 95 000 的三聚体,对 GSH 的 K_m 是 6.7 mmol·L⁻¹, 体外活性实验发现该酶只有在存在金属离子时才有活性。在所测试的金属中 Cd 激活效果最好,依次是 Ag、Bi、Pb、Zn、Cu、Hg 和 Au。随后在大豆(Klapheck 等 1995)、番茄(Chen 等 1997)与拟南芥(Howden 1995a; b)中也发现了类似的酶活性。大豆中同时含有 GSH 与同源的 hGSH, 用其根的粗提酶研究发现,PCS 不仅可以用 GSH 作为底物,也可以用同源 hGSH 为底物进行催化反应,但其催化效率要低于前者。在同时存在这两种底物时,合成 (h)PCs 的能力可以提高(Klapheck 等 1995)。拟南芥 AtPCS1 在 γ -GS 向 γ -EC 的转变中起主要作用,研究发现转染 AtPCS1 的突变细胞,在 Cd²⁺ 存在时 γ -EC 的浓度增加了好几倍,而在 AtPCS1 与 AtPCS2 双突变体中却没有改变,表明 AtPCS1 可以催化 GS 的降解(Blum 等 2010)。

自 1999 年克隆到 PCS 以来,已经克隆到很多 PCS。通过 DNA 序列预测 PCS 的分子量在 42~70 kDa。氨基酸序列比较发现植物、酵母及动物 PCS 的 N-末端序列的同源性高达 40%~50%, 然而其 C-末端却是多变的。C-末端的显著特征是含有许多 Cys 残基,它们常常是以成对或接近于成对的形式存在的,这种 Cys 的排列类似于 MT 中 Cys 的排列方式。例如,拟南芥与酵母的 PCS,其 C-末端分别含有 10 个和 7 个 Cys 残基,其中的 4 个与 6 个分别是成对存在的。然而,这些 Cys 的位置却没有明显的保守性。相反,通过全序列比较却发现单子叶植物小麦的 TaPCS1 与双子叶植物拟南芥的 AtPCS1 的同源性高达 55% (Clemens 等 1999)。前者含有 14 个 Cys 残基,其中包括 C-末端的 2 对,但原核生物的 PCS 却只含有相当于真核生物 N-末端的序列,其中也含有成簇的 Cys 残基(Tsuji 等 2004)。

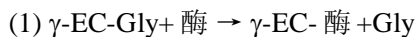
研究表明酵母与植物细胞中 PCS 的合成可以被许多金属所诱导(Rausser 1995)。用培养的植物细胞进行的酶动力学研究发现在 Cd 诱导几分钟后 PCs 的合成就开始。PCS 的表达似乎不需要金属诱导。在微量重金属处理过的植物细胞与组织的

粗提物中就发现含有PCS, 表明PCS主要是被金属激活, 而不依赖于金属调节其表达。这些结论也被在大肠杆菌与酵母中表达PCS的实验所证实, 这些被表达的酶可以被Cd、Ag、Pb、Zn、Cu和Hg激活(Clemens 1999; Ha等1999; Vatamaniuk等1999)。

3.2 PCS的催化机制

自Grill等(1989)最先从膀胱麦瓶草的悬浮培养细胞中分离纯化到PCS以来, 对PCS的催化机制, 包括其被金属离子的激活过程就开始研究, 但得到的研究结果不尽相同, 到目前出现了5种解释PCS催化机制的模型。

Grill等(1989)的研究发现PCS可以被很多金属离子激活, 其中Cd是最强的激活剂(Zenk 1996)。酶催反应动力学分析表明其催化反应可以分成两步:



第一步GSH中Gly的切割与酶中间体的形成; 第二步将 $\gamma\text{-EC}$ 从酶中间体转移到受体GSH或PC寡聚体, 是通过转肽反应完成的。最近的研究发现如果受体是水, PCS可以催化谷胺酰半胱氨酸巯基偶联物的形成(Beck等2003)。Vatamaniuk等(2004)通过体外表达AtPCS1-FLAG, 直接证明PCS是一个二肽转移酶, 能够催化 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 从一个含巯基多肽转移到另一个多肽或者已经合成的PC, 从而介导多肽从N端向C端的方向延伸, 同时, 证明PCS有2个PCs合成所需的乙酰化位点。这是PCS催化机制的第一种模型。

Ha等(1999)报导尽管合成的量只有野生型的33%, 缺失了C端的AtPCS1仍然能够催化PC的合成。这表明, PCS的N-末端结构域是催化结构域, 对于其催化作用来说其C-末端并不是绝对必要的。于是Cobbett(1999)提出保守的N-末端具有催化活性, 酶的激活来自于金属离子与该结构域中可能是半胱氨酸的相互作用。C-末端结构域是PCS的重金属传感器, 由于该结构域也有很多半胱氨酸, 它们首先结合 Cd^{2+} , 然后去激活N-末端结构域。这是PCS催化机制的第二种模型, 正被越来越多的研究所证实。Ruotolo等(2004)发现截短的AtPCS1₁₋₃₇₂催化合成的PC与AtPCS1₁₋₄₈₅的量一样

多, 而AtPCS1₁₋₂₈₃的催化活性比AtPCS1₁₋₄₈₅低很多, 其C-末端373-485可能决定重金属的范围。同样, Tsuji等(2005)也证明AtPCS1₁₋₂₂₁在体外与体内都能够催化PC的合成, 表明PCS的N-末端具有催化活性, 对PCS的催化作用是必不可少的。定点突变PCS的C-末端富含Cys的区域 $\text{C}^{358}\text{C}^{359}\text{XXXXC}^{363}\text{XXC}^{366}$, 减少Cys的含量, 降低SH的含量, 减少了其结合Cd及其他重金属的量, 也影响了酶的活性, 表明C-末端尽管对PCS的活性不是绝对必需的, 但它可以影响金属离子的作用范围(Ramos等2008), 通过结合金属离子, 并且将它们传递到催化结构域, 而提高酶活性(Vestergaard等2008)。用Ala取代Cys³⁵⁸、Cys³⁵⁹、Cys³⁶³与Cys³⁶⁶残基的研究也证明, 突变体PCS活性显著低于野生型, 而且很容易受到氧化破坏, 表明PCS的C-末端在抗氧化方面具有重要作用, 尽管PCS的C-末端不是保守的, 但可能具有其他方面的功能(Matsumoto等2009)

第三种模型是Vatamaniuk等(2000)提出来的。AtPCS1-FLAG催化动力学分析表明酶的激活不需要 Cd^{2+} 与酶结合, 而是通过Cd-GS2复合物来激活AtPCS1。这些复合物被用作PC合成的底物。用硫甲基谷胱甘肽作为底物的研究发现被阻塞的巯基即使在没有重金属的情况下也足够激活PCS。于是, 他们认为在PC合成的过程中伴随着从Cd-GS2切除Gly而形成 $\gamma\text{-EC}$ 乙酰化酶中间体, 接着将 $\gamma\text{-EC}$ 从乙酰化酶中间体转移到受体分子而产生包含增加了一个 $\gamma\text{-EC}$ 重复单元的产物。体内PCS的生理学研究同样表明对于PCs的合成来说重金属是不可缺少的(Zenk 1996)。

第四种模型是Tsuji等(2005)提出来的。他们通过比较分析原核生物与真核生物PCS的两步催化时发现, 在第一步反应中自由的GSH与PCs可以作为供体给正在延长的PCs提供 $\gamma\text{-EC}$ 单元, 将 $\gamma\text{-EC}$ 从GSH或PCs上切下来的过程中需要重金属离子, 更进一步通过比较根据NsPCS与AtPCS1序列得到的突变体时发现AtPCS1₁₋₂₂₁是该酶的催化活性区域, Cys⁵⁶残基对酶的催化活性是必需的。因此他们认为PCS在真核生物中是组成型表达的, 在没有重金属存在时它们以无活性的形式存在, 当生物受到重金属胁迫时, 进入细胞的金属离子大多数与GSH形成如Cd-GS2的复合物, Cd-GS2与PCS的亲

和力高于自由的 Cd (Vatamaniuk 等 2000), 能够作为 PCS 的激活剂, 引起酶的折叠。从 Cd-GS2 释放的 Cd 使酶的构型发生改变并且激活酶。在酶折叠与激活的过程中, 巯基还原物有助于含有大量半胱氨酸的 PCS 分子间二硫键的还原。像 GSH 或者 PCs 供体分子在折叠的有活性的酶的 Cys⁵⁶ 的帮助下可以与酶接合, 一个 γ -EC 就从这些分子中释放出来, 释放的 γ -EC 可以立即转移到受体分子。Maier 等 (2003) 用根据 PCS 的活性位点建立的多肽库进行的 Cd 结合实验与 Cys 残基功能研究表明 AtPCS1 中 Cys⁵⁶、Cys⁹⁰、Cys¹⁰⁹ 与 Cys¹¹³ 对酵母突变体 *S. pombe* Δpcs 在含有 Cd 的培养基中生长是最基本的。相反, Vatamaniuk 等 (2004) 的研究表明 Cys⁵⁶ 在第一步与随后的 PC 合成反应中是必不可少的, 而其他的半胱氨酸残基 (Cys⁹⁰、Cys⁹¹、Cys¹⁰⁹ 与 Cys¹¹³) 却没有什么影响。Romanyuk 等 (2006) 通过突变体的研究也得到相同的结果。

第五种模型是 Vivares 等 (2005) 提出来的, 他们用原核生物一种蓝细菌 *Nostoc* 的 PCS (NsPCS) 建立了在活性与乙酰化条件下的 NsPCS 立体模型, 这不仅是 PCS 立体结构的最早报导, 而且建立了 PCS 属于木瓜蛋白酶超家族及其催化机制与半胱氨酸蛋白酶相似的模型, NsPCS 的 Cys⁷⁰、His¹⁸⁰ 与 Asp²⁰¹ 分别对应于 AtPCS1 的 Cys⁵⁶、His¹⁶² 与 Asp¹⁸⁰ 组成一个类似与木瓜蛋白酶的三联体的催化结构域, 突变体的研究表明其中的任何一个对其催化活性都是必不可少的 (Romanyuk 等 2006)。长喙田青 (*Sesbania rostrata*) SrPCS 通过选择性剪接产生 4 个成熟的 mRNA, 编码 4 种不同的 PCS, 其中 SrPCS1 与 SrPCS3 具有 Cys⁵⁶、His¹⁶² 与 Asp¹⁸⁰ 三个氨基酸, 预测立体结构与 NsPCS 立体模型相似, SrPCS2 与 SrPCS4 只有相当于 SrPCS3 的 N-末端部分, 并且缺少 His¹⁶² 与 Asp¹⁸⁰ 立体结构与 NsPCS 也不相似, 表达这 4 个 PCS 的酵母, 只有 SrPCS1 与 SrPCS3 提高了对 Cd 的抗性, 也证明了上述的模型 (Li 等 2009)。

尽管有这么多种解释 PCS 催化机制的模型, 但还没有一个被大家都普遍接受的模型。PCS 立体结构的建立为理解其催化机制提供了新的途径, 同时, 这些模型对 N-末端是 PCS 的催化结构域都是肯定的, 而 C-末端对酶的催化活性没有太大的影响, 但可以影响金属离子的作用范围。

3.3 PCS 的克隆与表达研究

尽管 20 多年前就发现与纯化到 PCS, 但直到 1999 年三个小组才同时用不同的方法分别克隆到 PCS。其中两个小组通过在酵母中表达拟南芥与小麦的 cDNA 文库, 分别发现表达 AtPCS1 (Vatamaniuk 等 1999) 与 TaPCS1 (Clemens 等 1999) 的酵母提高了对 Cd 的抗性。第三个小组通过图位克隆的方法克隆得到拟南芥的 AtPCS1 (Ha 等 1999)。此后, 又陆续从其他高等植物 (Cazalé 和 Clemens 2001; Oven 等 2002; Loscos 等 2006)、动物 (Clemens 等 2001; Vatamaniuk 2001; Brulle 等 2008)、藻类 (Osaki 等 2008)、原核生物 (Harada 等 2004; Tsuji 等 2004; Chaurasia 等 2008) 克隆到该基因, 表明 PCS 可能广泛存在于生物界, 不仅如此, 研究还发现在植物中存在 PCS 家族, 并且可以通过选择性剪接产生具有不同功能的 PCS (Ramos 等 2007; Li 等 2009)。

早期的研究推定 PCS 是一个组成型表达的酶, 其基因的表达不受重金属的诱导 (Grill 等 1987)。这个推论通过用 Northern 与 RT-PCR 分析 AtPCS1 的表达得到证实, AtPCS1 mRNA 的含量在用重金属如 Cd、Zn、Cu、氧压力、高盐、茉莉酸和水杨酸处理后并没有发生改变 (Ha 等 1999; Vatamaniuk 等 2000; Cazale 和 Clemens 2001)。但在拟南芥发育的早期用 Cd 处理过的生长 5 d 的幼苗 AtPCS1 的 mRNA 比未处理的幼苗增加了 2 倍 (Lee 和 Korban 2002)。最近的研究证明在整株拟南芥都可以检测到 AtPCS1, 但 AtPCS2 只在其根尖表达, 它们在细胞质中催化 GSH 的循环, 而 AtPCS1 起主要作用 (Blum 等 2007)。用竞争性 PCR 分析小麦根中 TaPCS1 的表达发现用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd²⁺ 处理过的根中 mRNA 的水平比没有处理的提高了 5~10 倍 (Clemens 等 1999)。而超富集植物水生蕨类 *Salvinia minima* 受 Pb²⁺ 诱导的叶中 SmPCS 表达量显著提高, 表明 Pb²⁺ 可以在转录水平调控该基因在叶中的表达, 以增加 PCs 的含量, 但在根中 SmPCS 表达是下调的 (Estrella-Gómez 等 2009)。表明在植物的不同器官与植物发育的不同时期, 对重金属胁迫防御反应的要求是不同的, PCS 的表达是可以调节的, 其机制也是不同的。

3.4 转 PCS 植物的研究

自从克隆 PCS 以后, 通过原核生物以及酵母

中表达该基因与通过转基因植物研究其功能就开始了。在细菌和酵母中表达 *PCS* 提高了它们对重金属的抗性(Clemans 等 1999; Osaki 等 2008; Singh 等 2008)。并且表达鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC 7120) *PCS* 的细菌还提高了对多种非生物胁迫的抗性(Chaurasia 等 2008)。但是目前通过转基因植物研究 *PCS* 的功能得到的结论却不一致。超量表达拟南芥 *AtPCS1* 的烟草增强了对 Cd 的耐受能力和积累却不能把它运输到芽(Pomponi 等 2006)。而超量表达小麦的 *TaPCS1* 可以显著提高烟草对重金属如 Pb 和 Cd 的抗性, 同时转基因植物的地上部分累积的 Pb 是野生型的 2 倍(Gisbert 等 2003)。在拟南芥 *cad1-3* 突变体中表达 *TaPCS1* 可以抑制其对重金属的敏感性, 且提高了 Cd 从根到芽的运输, 减少了 Cd 在根中的累积(Gong 等 2003), 但在叶中特异性表达 *AtPCS1* 虽然提高了植物对 Cd 的抗性, 却不能改变其含量(Peterson 和 Oliver 2006)。在印度芥子菜中超量表达 *AtPCS1* 能够增加转基因植物对 Cd、Zn 与 As 的抗性, 但不能增强其累积能力(Gasic 和 Korban 2007a; b)。相反, 在拟南芥中超量表达 *AtPCS1* 反而导致转基因植物对 Cd 的敏感性(Lee 等 2003a), 也不能提高 Cd 的累积量(Lee 等 2003b), 但提高了对 As 的抗性(Li 等 2004)。表达小麦 *TaPCS1* 的烟草在含有多种重金属的矿区生长良好, 而且富集 Cd、Pb、Cu、Zn、Ni 及 B 的能力比野生型提高了很多倍(Martínez 2006)。这些研究表明不同来源的 *PCS* 在不同的转基因植物中对提高植物在重金属抗性方面的作用及机理可能不同。

4 结语

自 20 世纪 80 年代发现 PC 以来, 对 PC 的结构、PCs 对重金属的解毒作用与植物对重金属抗性机制的研究越来越深入, 随后对 *PCS* 的结构及其催化机制以及 *PCS* 的克隆与表达及转基因植物的研究也取得了不少进展, 但这些研究的结论并不是一致的, 今后应加强以下几个方面研究。

(1) 继续加强对 PC 的生物合成和功能的研究。利用突变体以及功能获得的方法获得超量表达 *PCS* 的转基因植物, 从分子生物学角度揭示其生化合成途径与调控的机制, 为 PC 的生化、分子和生理研究提供基础材料, 以通过调控 PC 增加植物对金属的抗性。

(2) 继续加强对 *PCS* 的结构及其催化机制的研究。通过克隆与表达 *PCS*, 分离纯化 *PCS* 建立其立体结构模型, 比较不同模型之间的异同, 以及通过突变体的研究发现与该酶的催化活性相关的氨基酸。一方面可以进一步了其解催化机制, 另一方面, 可以有目的的改造它们, 通过提高其活性以增加 PC 的量, 提高植物对重金属的抗性。

(3) *PCS* 普遍存在于生物界, 继续分离克隆这些基因, 加强其表达与重金属诱导关系的研究, 增加对 PC 与植物重金属抗性之间关系的理解, 同时, 加强转基因植物的研究, 了解不同的转基因植物对不同重金属反应不同的机理, 寻找能够稳定表达该基因并提高对重金属的抗性与富集能力的植物物种, 为将该基因应用于重金属污染土壤的植物修复奠定基础。

参考文献

- Andra SS, Datta R, Sarkar D, Makris KC, Mullens CP, Sahi SV, Bach SB (2009). Induction of lead-binding phytochelatins in vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)]. *J Environ Qual*, 38 (3): 868~677
- Beck A, Lenzian K, Oven M, Christmann A, Grill E (2003). Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry*, 62: 423~431
- Blum R, Beck A, Korte A, Stengel A, Letzel T, Lenzian K, Grill E (2007). Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J*, 49 (4): 740~749
- Blum R, Meyer KC, Wünschmann J, Lenzian KJ, Grill E (2010). Cytosolic action of phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, 153 (1): 159~169
- Brulle F, Cocquerelle C, Wamalah AN, Morgan AJ, Kille P, Leprêtre A, Vandenbulcke F (2008). cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotox Environ Safe*, 71 (1): 47~55
- Cazale AC, Clemens S (2001). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett*, 507: 215~219
- Chaurasia N, Mishra Y, Rai LC (2008). Cloning expression and analysis of phytochelatin synthase (*pcs*) gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 offering multiple stress tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 376 (1): 225~230
- Chen A, Komives EA, Schroeder JI (2006). An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 141 (1): 108~120
- Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plant*, 101:

- 165~172
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J*, 18: 3325~3333
- Cobbett CS (1999). A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci*, 4 (9): 335~337
- Cobbett CS (2000a). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*, 123: 825~832
- Cobbett CS (2000b). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 211~216
- Cobbett CS, Goldsbrough P (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 159~182
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B (1998). The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J*, 16: 73~78
- Collin-Hansen C, Pedersen SA, Andersen RA, Steinnes E (2007). First report of phytochelatins in a mushroom: induction of phytochelatins by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia*, 99: 161~174
- Cunningham SC, Berti WR, Huang JWW (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol*, 13: 393~397
- di Toppi LS, Gabbriellini R (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 41: 105~130
- Ducruix C, Junot C, Fiévet JB, Villiers F, Ezan E, Bourguignon J (2006). New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A.thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie*, 88 (11): 1733~1742
- Estrella-Gómez N, Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R, González-Mendoza D, Zapata-Pérez O, Martínez-Hernández A, Santamaría JM (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatins via changes in *SmpPCS* expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquat Toxicol*, 91 (4): 320~328
- Gasic K, Korban SS (2007a). Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an *Arabidopsis* phytochelatin synthase (AtPCS1) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol Biol*, 64 (4): 361~369
- Gasic K, Korban SS (2007b). Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta*, 225: 1277~1285
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch Microbiol*, 150: 197~202
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989). Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Z Naturforsch*, 44c: 361~369
- Gisbert C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Pilar Bernal M, Serrano R, Navarro-Avino J (2003). A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem Biophys Res Commun*, 303: 440~445
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI (2003). Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10118~10123
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6838~6842
- Grill E, Thumann J, Winnacker EL, Zenk MH (1988). Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep*, 7: 375~378
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230: 674~676
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1986). Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett*, 197: 115~120
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 439~443
- Gupta SC, Goldsbrough PB (1991). Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. *Plant Physiol*, 97: 306~312
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, 11: 1153~1164
- Harada E, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S (2004). A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry*, 65: 3179~3185
- Howden R, Andersen CR, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1995a). A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 107: 1067~1073
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995b). Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol*, 107: 1059~1066
- Kim DY, Park H, Lee SH, Koo N, Kim JG (2009). Arsenate tolerance mechanism of *Oenothera odorata* from a mine population involves the induction of phytochelatins in roots. *Chemosphere*, 75 (4): 505~512
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L (1995). Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol*, 107: 515~521
- Lee J, Bae H, Jeong J, Lee JY, Yang YY, Hwang I, Martinoia E, Lee Y (2003b). Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. *Plant Physiol*, 133: 589~596
- Lee S, Korban SS (2002). Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by

- cadmium during early stages of plant development. *Planta*, 215: 689~693
- Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS (2003a). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol*, 131: 656~663
- Li AM, Yu BY, Chen FH, Gan HY, Yuan JG, Qiu R, Huang JC, Yang ZY, Xu ZF (2009). Characterization of the *Sesbania rostrata* phytochelatin synthase gene: alternative splicing and function of four isoforms. *Int J Mol Sci*, 10 (8): 3269~3282
- Li YJ, Dhankher OP, Carreira L, Lee D, Chen A, Schroeder JI, Balish RS, Meagher RB (2004). Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant Cell Physiol*, 45: 1787~1797
- Loeffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989). Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett*, 258: 42~46
- Loscos J, Naya L, Ramos J, Clemente MR, Matamoros MA, Becana M (2006). A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. *Plant Physiol*, 140: 1213~1221
- Maier T, Yu C, Kullertz G, Clemens S (2003). Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta*, 218: 300~308
- Martinez M, Bernal P, Almela C, Velez D, Garcia-Agustin P, Serrano R, Navarro-Avino J (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere*, 64: 478~485
- Matsumoto S, Vestergaard M, Konishi T, Nishikori S, Shiraki K, Tsuji N, Hirata K, Takagi M (2009). Role of C-terminal Cys-rich region of phytochelatin synthase in tolerance to cadmium ion toxicity. *J Plant Biochem Biot*, 18 (2): 175~180
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montague M, Inze D (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot*, 49: 649~667
- Mendoza-Cózatl DG, Butko E, Springer F, Torpey JW, Komives EA, Kehr J, Schroeder JI (2008). Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J*, 54 (2): 249~259
- Nakazawa R, Takenaga H (1998). Interactions between cadmium and several heavy metals in the activation of the catalytic activity of phytochelatin synthase. *Soil Sci Plant Nutr*, 44 (2): 553~575
- Noctor G, Foyer CH (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 249~279
- Osaki Y, Shirabe T, Tamura S, Yoshimura E (2008). A functional putative phytochelatin synthase from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72 (12): 3306~3309
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM (2002). Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase. *J Biol Chem*, 277: 4747~4754
- Peterson AG, Oliver DJ (2006). Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 44: 885~892
- Pilon-Smits E (2005). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 15~39
- Pomponi M, Censi V, Di Girolamo V, De Paolis A, di Toppi LS, Aromolo R, Costantino P, Cardarelli M (2006). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*, 223: 180~190
- Ramos J, Clemente MR, Naya L, Loscos J, Perez-Rontome C, Sato S, Tabata S, Becana M (2007). Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol*, 143: 1110~1118
- Ramos J, Naya L, Gay M, Abián J, Becana M (2008). Functional characterization of an unusual phytochelatin synthase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, 148 (1): 536~545
- Rausser WE (1990). Phytochelatin. *Annu Rev Biochem*, 59: 61~86
- Rausser WE (1995). Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol*, 109: 1141~1149
- Rausser WE (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys*, 31: 19~48
- Reddy CN, Prasad MNV (1990). Heavy metal binding-proteins peptides occurrence: structure, synthesis and function. A review. *Environ Exp Bot*, 30: 252~264
- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ (1993). Plant metallothioneins. *Biochem J*, 295: 1~10
- Romanyuk ND, Rigden DJ, Vatamaniuk OK, Lang A, Cahoon RE, Jez JM, Rea PA (2006). Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, 141: 858~869
- Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S (2004). Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J Biol Chem*, 279: 14686~14693
- Sadi BB, Vonderheide AP, Gong JM, Schroeder JI, Shann JR, Caruso JA (2008). An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatin in genetically modified

- Arabidopsis thaliana*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 861 (1): 123~129
- Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998). Phytoremediation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 49: 643~668
- Schafer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1998). cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform. Plant Mol Biol, 37: 87~97
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM (2002). The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator metallophytes. J Exp Bot, 53: 2381~2392
- Silver S, Misra TK (1988). Plasmid-mediated heavy metal resistances. Annu Rev Microbiol, 42: 717~743
- Singh S, Lee W, Dasilva NA, Mulchandani A, Chen W (2008). Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. Biotechnol Bioeng, 99(2): 333~340
- Steffens JC, Hunt DF, Williams BG (1986). Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl)_n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. J Biol Chem, 261: 13879~13882
- Sun Q, Ye ZH, Wang XR, Wong MH (2007). Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. J Plant Physiol, 164: 1489~1498
- Tennstedt P, Peisker D, Böttcher C, Trampczynska A, Clemens S (2009). Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. Plant Physiol, 149 (2): 938~948
- Thumann J, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1991). Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS Lett, 284: 66~69
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG (2004). Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. Trends Plant Sci, 9: 7~9
- Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Matsumoto S, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Miyamoto K, Hirata K (2005). Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. Planta, 222: 181~191
- Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K (2004). Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. Biochem Biophys Res Commun, 315: 751~755
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA (2004). Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. J Biol Chem, 279: 22449~22460
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 7110~7115
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. J Biol Chem, 275: 31451~31459
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO (2009). Comparative analysis of the contribution of phytochelatin to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin. Plant Physiol Biochem, 47 (1): 63~67
- Vestergaard M, Matsumoto S, Nishikori S, Shiraki K, Hirata K, Takagi M (2008). Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cysteine-rich C-terminal. Anal Sci, 24 (2): 277~281
- Vivares D, Arnoux P, Pignol D (2005). A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 18848~18853
- Wang CL, Oliver DJ (1996). Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana* and complementation of a *gsh2* mutant in fission yeast. Plant Mol Biol, 31: 1093~1104
- Wojas S, Ruszczyńska A, Bulska E, Clemens S, Antosiewicz DM (2010). The role of subcellular distribution of cadmium and phytochelatin in the generation of distinct phenotypes of AtPCS1- and CePCS3-expressing tobacco. J Plant Physiol, 167 (12): 981~988
- Xiang C, Oliver DJ (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10: 1539~1550
- Zenk MH (1996). Heavy metal detoxification in higher plants—a review. Gene, 179: 21~30
- Zhang Z, Gao X, Qiu B (2008). Detection of phytochelatin in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* exposed to cadmium and lead. Phytochemistry, 69 (4): 911~918
- Zhao FJ, Wang JR, Barker JHA, Schat H, Bleeker PM, McGrath SP (2003). The role of phytochelatin in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. New Phytol, 159: 403~410
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999a). Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. Plant Physiol, 121: 1169~1178
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, Terry N (1999b). Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. Plant Physiol, 119: 73~79