

产胶植物橡胶转移酶的研究进展

代龙军, 曾日中*

中国热带农业科学院橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 海南儋州571737

摘要: 天然橡胶合成中, 橡胶转移酶催化异戊二烯焦磷酸的多聚化过程, 这一过程对天然橡胶的品质及产量至关重要。橡胶转移酶及其性质、橡胶生物合成分子机理及橡胶的分子量大小决定机制是亟待解决的重要科学问题。本文介绍了以巴西橡胶树为主的产胶植物橡胶转移酶的性质和生物学功能, 对橡胶转移酶的分离与鉴定及其活性调节等研究进展进行了综述。

关键词: 天然橡胶; 橡胶转移酶; 产胶植物; 巴西橡胶树

Research Advances in Rubber Transferases of the Rubber-Producing Plants

DAI Long-Jun, ZENG Ri-Zhong*

Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory Incubation Base, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Rubber transferase, a *cis*-prenyltransferase catalyzing the incorporation of isopentenyl pyrophosphate into rubber molecules, is critical to the quality and the yield of natural rubber. However, the identity of the rubber transferase, and the mechanisms related to polymerization and the determination of the molecular mass of natural rubber remain equivocal. This article provides an overview of the rubber transferases of *Hevea brasiliensis* and other rubber-producing plants from aspects of the biological function, the purification, the characterization, and the regulation of the catalytic activity.

Key words: natural rubber; rubber transferase; rubber-producing plants; *Hevea brasiliensis*

世界上存在约2 500种产胶植物, 只有少数物种产生的天然橡胶(顺式-1,4-聚异戊二烯, *cis*-1,4-polyisoprene)的物理性能符合工业生产需要(Moobroek和Cornish 2000), 如: 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*, 以下简称橡胶树)、银胶菊(*Parthenium argentatum*)和橡胶草(*Taraxacum kok-saghyz*和*T. brevicorniculatum*)。天然橡胶品质取决于分子量, 分子量越高, 品质越好, 上述3种植物所产天然橡胶平均分子量超过 1×10^6 Da, 即聚合度大于14 700个异戊二烯单体(Schmidt等2010a; Swanson等1979)。生长于热带的橡胶树因其天然橡胶物理性能好、胶乳产量高、胶乳收获便捷, 已成为商业用途天然橡胶的唯一来源(Cornish 2001a; Gronover等2011)。银胶菊、橡胶草等二战期间开始利用的温带替代产胶植物也受到研究者的重视。而印度榕(*Ficus elastica*)所产天然橡胶分子量小于 1×10^5 Da (Cornish等2000), 品质不高, 因此被当作对照研究物种。产胶植物无花果(*Ficus carica*)、孟加拉榕树(*Ficus benghalensis*)及莴苣(*Lactuca*

*serriola*和*L. sativa*), 产天然橡胶的分子量分别约为 1.19×10^5 、 1.5×10^6 和平均大于 1×10^6 Da, 也有少量报道(Kang等2000a, b; Bushman等2006)。另外, 杜仲(*Eucommia ulmoides*)所产杜仲胶(反式-1,4-聚异戊二烯)的反式长链是有序的, 易于有序聚集而结晶, 不像顺式-1,4-聚异戊二烯的长链分子可形成无规线团结构, 形成高次结构时能形成无定形弹性胶团, 因此需要使杜仲胶硫化或异构化, 将其变为弹性体以提高工业应用价值(严瑞芳1995)。

天然橡胶是一种重要的工业原料和战略物资, 虽然对以巴西橡胶树为主的产胶植物做了大量研究, 但橡胶生物合成的分子机理、橡胶转移酶的鉴定与特征、橡胶分子量大小的决定机制仍是亟待解决的重要科学问题(van Beilen和Poirier 2007)。

收稿 2013-05-17 修定 2013-07-30

资助 国家自然科学基金(31270713)和海南省自然科学基金(312028)。

* 通讯作者(E-mail: hnzrz@aliyun.com; Tel: 0898-23300776)。

橡胶转移酶是天然橡胶合成的重要参与者, 它催化异戊二烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)的多聚化过程, 因此, 探明橡胶转移酶的性质及其生物学功能对揭示橡胶生物合成的分子机理及橡胶分子量大小的决定机制具有重要意义。然而, 目前关于橡胶转移酶的研究还存在争议, 橡胶转移酶的本质及其亚细胞定位仍不清楚。分离和鉴定不同产胶植物的橡胶转移酶及其基因, 确定橡胶转移酶的亚细胞定位及其功能, 将有助于橡胶树和其他产胶植物的优质新品种的选育和改良。

本文从橡胶转移酶的生物学功能及其分离鉴定和活性调节等方面对以巴西橡胶树为主的产胶植物橡胶转移酶的研究历史及最新进展进行了综述。

1 橡胶转移酶的生物学功能及性质

1.1 橡胶转移酶的作用

天然橡胶合成发生于产胶植物的乳管细胞(如橡胶树、印度榕和橡胶草)或皮层薄壁细胞(如银胶菊)。天然橡胶合成过程主要是: 光合作用产生的蔗糖被运送到乳管细胞或薄壁细胞, 并在其中被转化酶(亦称 β -呋喃果糖苷酶)水解为葡萄糖和果糖两种单糖; 葡萄糖和果糖进入糖酵解途径, 被转化为乙酰辅酶A; 乙酰辅酶A经甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径转化为IPP; IPP经过IPP异构酶作用转化为二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP); 反式-异戊烯转移酶(*trans*-prenyltransferase, TPT)催化数量不等的IPP单体以反

式构型头尾相接地掺入DMAPP, 生成牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)、法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)及牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)等呈反式构型的烯丙基焦磷酸(allylic pyrophosphate)引发底物; 结合于橡胶粒子上的橡胶转移酶连续地将IPP单体以顺式构型头尾相接地添加到引发底物上, 形成顺式-1,4-聚异戊二烯; 最后, 橡胶聚合反应终止, 末端的磷酸基团被移除(Cornish 2001a, b; Venkatachalam等2013)。GPP、FPP和GGPP等化合物亦可衍生为单萜、甾醇、植保菌素、脱落酸、叶绿素、胡萝卜素和赤霉素等次生代谢产物(Cornish 2001b; Gronover等2011)。天然橡胶合成中IPP的多聚化过程如图1所示。

1.2 橡胶转移酶的性质

两种异戊烯转移酶参与天然橡胶的合成过程: TPT负责引发底物的合成, 所掺入的C5单体呈反式构型; 橡胶转移酶负责催化IPP多聚化, 是一种特定的顺式-异戊烯转移酶(*cis*-prenyltransferase, CPT), 所掺入的C5单体呈顺式构型。

据推测, 天然橡胶合成过程中橡胶转移酶催化IPP多聚化(Archer和Audley 1967; Archer等1963), 但迄今未能对其进行有效分离和鉴定。本质上, 橡胶转移酶是一种CPT, 它可能是CPT家族的一员; 同时, 它能催化合成高分子量天然橡胶, 有别于一般的CPT。橡胶转移酶可能是单一的蛋白质, 也可能是蛋白质复合物(Cornish 2001a)。已

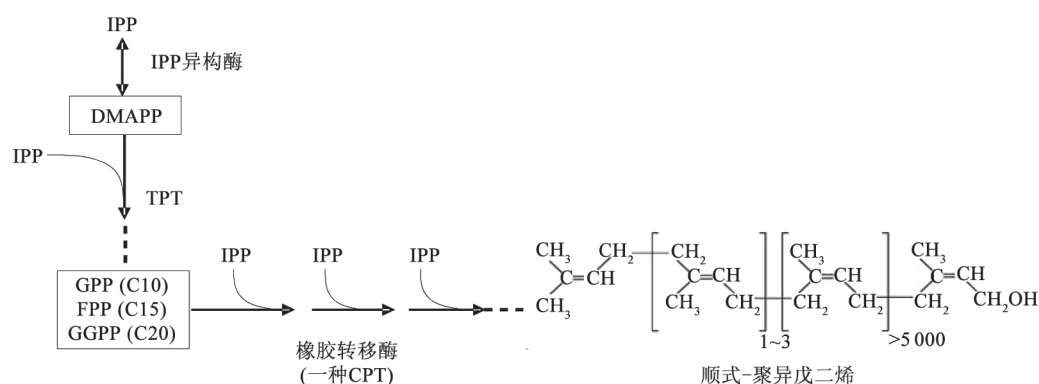


图1 IPP的多聚化过程

Fig.1 Incorporation of IPP to natural rubber

根据文献(Cornish 2001a, b; Mooibroek和Cornish 2000)改画。TPT包括GPP合成酶、FPP合成酶及GGPP合成酶等。分子式中左侧括号内1~3个反式双键来自引发底物, 右侧括号内为多聚化过程中形成的顺式双键, 右侧的羟基表示焦磷酸基已被移除。

有的研究表明, IPP多聚化过程除需要橡胶转移酶外, 还需要其他蛋白质与金属离子等辅助因子及橡胶粒子等细胞器参与。IPP多聚化形成长链橡胶分子的过程相当复杂, 是橡胶转移酶及天然橡胶合成机理之谜至今未能解开的重要原因。

2 橡胶转移酶的分离与鉴定

目前, 已有许多关于产胶植物橡胶转移酶分离纯化及酶活性研究的报道; 然而, 迄今为止对橡胶转移酶的本质及其亚细胞定位仍不十分清楚。

2.1 橡胶转移酶活性测定方法

橡胶转移酶活性测定方法起始于1960年代(Archer等1961, 1963; Archer和Cockbain 1969), 主要由Archer等建立, 并一直为其他研究者沿袭使用。该方法使用放射性标记的 $[^{14}\text{C}]$ -IPP作为单体底物, 有效地监测新掺入的IPP, 反映了橡胶合成速率及橡胶转移酶活性。Archer等(1963)首次将 $[^{14}\text{C}]$ -IPP分别加入橡胶树胶乳高速离心后获得的3个组分——橡胶粒子(上层)、C-乳清(central serum, 中间层)及黄色体(lutoid, 下层)所组成的体外反应体系, 以监测天然橡胶合成, 认为IPP单体在橡胶粒子表面掺入延伸中的含有烯丙基磷酸末端的橡胶分子上; 这一结论成为橡胶转移酶活性测定的基础。橡胶粒子是该体外反应体系的必需组分, 橡胶粒子的半单位膜结构为天然橡胶合成提供水相-有机相分界面: 橡胶粒子的亲水表面为催化聚合反应的酶或酶复合物提供附着点, 酶或酶复合物从水相接受引发底物和IPP; 同时, 不断增长的疏水天然橡胶长链从远端(即长链的起始端)渐渐进入橡胶粒子内部。

橡胶转移酶活性检测过程是: 将洗涤过的橡胶粒子(washed rubber particles, WRP)和 $[^{14}\text{C}]$ -IPP、引发底物、镁离子等组成体系进行橡胶体外合成; 用苯或己烷等溶解已合成的顺式-1,4-聚异戊二烯; 采用液体闪烁计数器检测放射标记的新合成顺式-1,4-聚异戊二烯(Archer等1963; Archer和Cockbain 1969)。Mau等(2000)开发出一种底部带有截留膜的96孔板, 可在橡胶体外合成实验后快速实现顺式-1,4-聚异戊二烯的收集和检测, 实现了检测体系微量化和检测过程快捷化。

陈守才等试图把这一技术用于生产实践, 他们研究了橡胶转移酶活性与橡胶树产胶能力之间

的关系(陈守才等1994), 认为可以利用橡胶转移酶活性对橡胶树产胶能力进行早期预测(陈守才等1996)。

然而, 这一检测体系也存在不足, 因为使用WRP导致不同实验结果之间没有可比性。一方面, 制备WRP没有统一的标准, 各研究者所使用的缓冲液、离心力、稀释比等参数各不相同; 另一方面, 通过离心, 难以将橡胶粒子与C-乳清、黄色体及Frey-Wyssling粒子等彻底分离。McMullen和McSweeney (1966)的研究表明, 洗涤过程的稀释倍数不同, 所获得橡胶粒子的蛋白质组成也不同。

2.2 各种产胶植物中的橡胶转移酶

2.2.1 橡胶树橡胶转移酶

2.2.1.1 可溶性的橡胶转移酶 McMullen和McSweeney (1966)在Archer等(1963)的研究基础上, 采用更精细的方法制备WRP: 最高离心力达到 $170\,000\times g$, 洗涤的总稀释倍数(橡胶粒子离心后形成的乳酪状橡胶粒子层含C-乳清水相成分, 需要反复洗涤进行稀释)最高达到 10^{14} 。电镜观察发现分离到的WRP有大(组分II)、中(组分III)、小(组分IV)三种直径。稀释倍数为 10^3 时获得的WRP组分II或组分III, 加入橡胶体外合成体系后不表现橡胶合成活性, 但补充C-乳清后天然橡胶合成活性可以恢复; 随着稀释倍数增加, 所获得的WRP组分中同样加入C-乳清, 橡胶合成活性逐渐降低; 直到稀释倍数达到 10^{14} , 所获得的WRP组分中同样加入C-乳清, 橡胶合成速度为0。因此, 他们认为负责IPP多聚化反应的酶存在于未洗涤的橡胶粒子表面和C-乳清中, 负责IPP多聚化反应的酶是可溶的。他们的研究结果还表明, 橡胶粒子体积越小, 单位面积的橡胶合成活性越高。

Archer和Audley (1967)及Archer和Cockbain (1969)采用硫酸铵沉淀、凝胶过滤和离子交换层析等方法, 从胶乳的C-乳清中分离了一个分子量约为60 kDa的水溶性蛋白质, 并将该蛋白质命名为橡胶转移酶(依照国际生物化学联合会酶学委员会系统命名规则命名为*cis*-1,4-polyisoprene pyrophosphate:*cis*-1,4-isoprenyltransferase, 系统命名编号为EC 2.5.1.20)。

Light和Dennis (1989)重复了Archer等分离纯化橡胶转移酶的步骤, 从橡胶树胶乳C-乳清中纯

化了一个分子量约为38 kDa的可溶蛋白质(不同于Archer等分离的60 kDa蛋白质),亦将该蛋白质称为橡胶转移酶,该酶生理状态下以二聚体形式存在。他们采用凝胶过滤层析对胶乳进行分离,以获取具有较低内生橡胶转移酶活性的脱蛋白橡胶粒子。在由纯化的橡胶转移酶、脱蛋白的橡胶粒子、底物及辅助因子等组成的体外橡胶转移酶活性测定体系中,所纯化的蛋白质表现橡胶转移酶活性;而当体外合成体系中无橡胶粒子存在,但有DMAPP存在时,该蛋白质可催化合成GPP和全反式FPP,表现为TPT活性。为了说明所纯化的“橡胶转移酶”同时具有CPT及TPT活性,Light等(1989)设计合成了手性、氘标记的单体底物($[^{14}\text{C}, 2\text{S-}^3\text{H}]\text{-IPP}$)进行橡胶体外合成实验,以验证该酶的双重立体选择性。Dennis和Light(1989)进一步指出,存在于橡胶粒子上的橡胶延伸因子(rubber elongation factor, REF)是负责橡胶转移酶立体选择性转换的蛋白质:REF存在时该酶表现CPT活性;而无REF结合到橡胶粒子时该酶呈现TPT活性。

2.2.1.2 橡胶粒子结合的橡胶转移酶 Cornish(1993)否定了橡胶转移酶兼具CPT和TPT两种功能的观点,并提出了新的解释:TPT是水溶性酶,催化合成GPP、FPP和GGPP等反式烯丙基焦磷酸引发底物;橡胶转移酶(一种CPT)则结合于橡胶粒子膜上,在橡胶粒子表面催化IPP多聚化反应以形成橡胶分子的顺式长链。因而,Archer等(1963)、McMullen和McSweeney(1966)及Light等(1989)所分离的可溶性“橡胶转移酶”可能是TPT。

2.2.1.3 黄色体膜结合的橡胶转移酶 尽管已有研究表明天然橡胶多聚化过程发生于橡胶粒子表面(Archer等1963; McMullen和McSweeney 1966; Cornish 1993, 2001a; Light和Dennis 1989),但Tangpakdee(1997a, b)、Wititsuwanakul等(2003, 2004)的研究却表明BF组分[bottom fraction, 胶乳经高速离心后沉淀于管底的细胞器组分,主要含黄色体和少量Frey-Wyssling粒子与核糖体]中也存在橡胶转移酶活性。Wititsuwanakul等(2003)认为不能排除橡胶粒子之外存在天然橡胶生物合成的可能性。

Tangpakdee等(1997a, b)使用BF成分和C-乳清分别进行了体外合成实验,发现橡胶树胶乳的BF

组分存在橡胶转移酶活性。这一结果与Archer等(1963)的结果完全相反。

Wititsuwanakul等(2003)比较了洗涤过的BF粒子及WBM(BF粒子经冻融破碎处理及洗涤后获得BF膜成分)的橡胶合成活性,认为BF粒子的橡胶合成催化活性在WBM上。他们用WBM替代WRP进行橡胶体外合成活性测试,发现当WBM在70℃下孵育30 min后加入体外合成体系,橡胶合成活性会突然增加;向上述体系添加阴离子去垢剂SDS,使SDS达到临界胶束浓度,可显著增强橡胶合成,而添加非离子去垢剂Triton X-100或Tween-20则不能增强橡胶合成活性。

Wititsuwanakul等(2004)发现WBM比WRP橡胶合成活性更高;SDS能促进WBM参与的橡胶体外合成,但抑制WRP参与的橡胶体外合成;含55个碳原子的烯丙基焦磷酸(C55-PP)是WBM参与的体外橡胶合成的有效引发底物,却不是WRP参与的体外橡胶合成的有效引发底物;从WBM提取的蛋白质与2% SDS组成的小囊具有橡胶生物合成活性。

关于橡胶转移酶的定位存在上述3种截然不同甚至相互矛盾的观点,可能是因为体外合成体系过于复杂,不易精确控制。橡胶粒子、C-乳清、黄色体及Frey-Wyssling粒子等组分难以通过离心、洗涤彻底分离,从而影响到这些组分参与的体外橡胶生物合成活性的测定。橡胶粒子易于在剪切力作用下破裂而发生凝聚,因此不能耐受高强度的反复洗涤;胶乳中另外一类细胞器黄色体则对渗透压的变化敏感,离心及重悬操作易导致黄色体破裂并释放内容物,其中的黄色体蛋白质对橡胶粒子有很强的结合力(代龙军等2012)。无论是橡胶粒子或黄色体的洗涤,都必须在洗涤程度与得率之间有所取舍,因此研究者通常以有限次数及有限体积的缓冲液进行洗涤。McMullen和McSweeney(1966)制备橡胶粒子时所采用的严格的洗涤方式几乎没有被其他研究者采用。

2.2.1.4 候选的橡胶转移酶CPT Asawatreratanakul等(2003)对所克隆的2个橡胶树CPT基因HRT1和HRT2进行了Northern blot与RT-PCR分析,发现HRT1和HRT2主要在胶乳表达,其他组织表达较少。橡胶粒子参与的体外橡胶转移酶活性分析表

明,原核表达的重组CPT可催化合成的顺式-1,4-聚异戊二烯分子量为 $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ Da;而在BF成分存在的情况下,所合成顺式-1,4-聚异戊二烯的分子量增加到 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ Da。他们还主张HRT2可能在BF膜成分的某些因子作用下催化顺式-1,4-聚异戊二烯从头合成。原核表达的HRT1和HRT2主要以不溶状态存在,疏水性分析表明HRT1和HRT2可能存在跨膜区,因此推测HRT1和HRT2是膜结合的CPT。

Takahashi等(2012)将HRT1和HRT2基因在酿酒酵母和拟南芥(*Arabidopsis* T87)中进行了表达,发现重组的HRT1和HRT2具有CPT活性,首次发现重组表达的CPT在不添加橡胶树胶乳组分的体外合成体系中可催化合成长度为C80~C100(折合 $5.4 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^3$ Da)的顺式-1,4-聚异戊二烯;而向体外合成体系添加胶乳组分如WRP、WBM或C-乳清均不能增强其聚合活性。他们认为Asawatreratanakul等(2003)经原核表达的CPT在未添加胶乳组分时不具备活性的原因可能是原核表达的蛋白质未经过翻译后修饰,或缺少存在于真核生物中的辅助因子。

Asawatreratanakul等(2003)的研究表明,原核表达的HRT2在体外能够催化合成的天然橡胶分子

量为 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ Da,已经接近植物体内合成的天然橡胶分子量大小,暗示HRT2可能是橡胶转移酶;但是,Takahashi等(2012)真核表达的HRT1、HRT2重组蛋白质在添加胶乳组分即WRP、C-乳清、BF的情况下均不能增强其聚合活性。

Ko等(2003)进行了胶乳转录组分析,所获得的胶乳EST库却未包含他们先前鉴定的4个CPT核酸序列,推测是因为这些CPT基因在胶乳中表达水平过低。Rahman等(2013)发表了橡胶树基因组测序结果,从基因组中鉴定了8个CPT基因。此前已有一些橡胶树CPT基因序列向NCBI提交,而进行过功能研究的仅有HRT1和HRT2(Asawatreratanakul等2003;Takahashi等2012)。Dai等(2013)提取了洗涤过的橡胶粒子蛋白质并进行了蛋白质组学分析,鉴定了6个CPT蛋白,为寻找橡胶转移酶提供了线索。

我们从NCBI蛋白质库中检索并获得橡胶树HRT1及HRT2的非冗余同源蛋白质序列及*T. brevicorniculatum*的3个CPT蛋白质序列,进行序列比对并构建系统发生树(图2)。

总之,橡胶树橡胶转移酶的性质与亚细胞定位尚无定论,其分离与鉴定仍有待深入研究。早

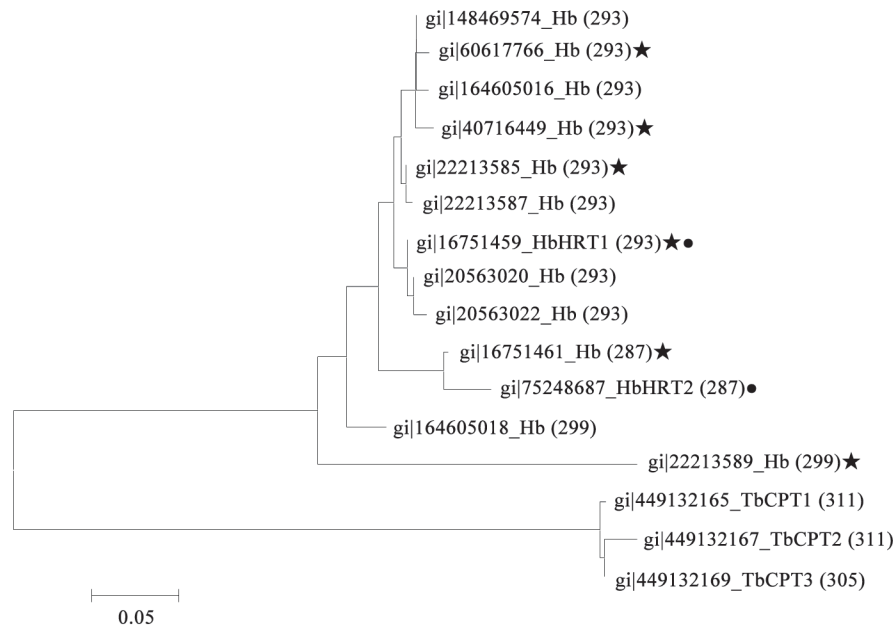


图2 橡胶树及橡胶草的CPT进化分析

Fig.2 Phylogenetic tree for CPTs of *H. brasiliensis* and *T. brevicorniculatum*

括号中的数字表示氨基酸残基数;★表示Dai等(2013)在橡胶粒子蛋白质组学研究中鉴定的蛋白质;●表示HRT1及HRT2。系统树采用MEGA 5软件生成,算法为neighbor-joining method,进化距离计算依据Poisson correction method。

期关于橡胶转移酶的报道均未提供氨基酸序列信息, 然而在当前技术条件下, 分离相关蛋白质, 并获得其氨基酸序列与核酸序列已经比较容易, 因此, 有必要对早期分离鉴定橡胶转移酶的尝试进行重复和验证, 并获得相关蛋白质的氨基酸序列和核酸序列信息, 以便进行转基因研究。

2.2.2 银胶菊橡胶转移酶 Benedict等(1990)及Madhavan和Benedict (1984)测定了银胶菊橡胶粒子中的橡胶转移酶活性。Benedict等(1990)采用含兼性离子去垢剂CHAPS的溶液提取了洗涤过的银胶菊橡胶粒子含量最高的膜结合的52 kDa蛋白质, 称其为橡胶转移酶。Pan等(1995)获得了该蛋白质的部分氨基酸序列及部分cDNA序列信息, 序列分析表明该蛋白质为细胞色素P450 CYP74家族成员, 其氨基酸序列与细胞色素P450家族成员丙二烯氧合酶(allene oxide synthase, AOS)十分相似, 酶活性研究表明该蛋白质具有很强的AOS活性, 从而否定了该蛋白质为膜结合橡胶转移酶的观点。

2.2.3 橡胶草橡胶转移酶 Schmidt等(2010a)从*T. kok-saghyz* (实为*T. brevicorniculatum*) (Hillebrand等2012; Post等2012)克隆了3个CPT基因*TkCPT1~3*, 并在酿酒酵母和烟草中实现了表达, 他们认为*TkCPT1~3*催化*T. kok-saghyz* (实为*T. brevicorniculatum*)橡胶合成中的IPP多聚化过程, 这3个基因的功能可能完全一样(Schmidt等2010b)。

Post等(2012)通过RNAi实验, 抑制*T. brevicorniculatum*植株的*TkCPT1~3*基因表达, 发现转化植株的天然橡胶产量显著下降而三萜及菊糖(inulin, 一种贮藏多糖)合成量却显著增加; 同时, 转化植株的甲羟戊二酸单酰CoA还原酶活性也显著降低, 所含橡胶粒子数量较野生型植物减少。

橡胶草是进行转基因研究的理想产胶植物, 它生命周期较短, 易进行组织培养及转化, 6个月内就可观察植株的表型变化(Mooibroek和Cornish 2000)。因此, 用橡胶草进行转基因研究是验证产胶相关基因功能的有效手段。

3 橡胶转移酶的活性调节

尽管目前对橡胶转移酶活性调节机制还知之甚少, 但借助橡胶体外合成体系及转基因技术, 已获得了有关橡胶树等产胶植物橡胶转移酶活性调节的有意义的结果。

3.1 橡胶树的REF

橡胶树的REF曾被认为是天然橡胶合成的关键蛋白质, 因此被命名为橡胶延伸因子。Dennis和Light (1989)关于REF负责同一个酶在CPT和TPT两种活性间切换的观点已被Cornish (1993)否定。代龙军等(2012)比较了存在于橡胶粒子的REF家族蛋白质和油体(一种具有半单位膜结构的细胞器, 内部储存疏水的甘油三酯)的结构蛋白oleosin, 提出REF家族蛋白质可能是橡胶粒子结构蛋白质的观点。REF的首要功能可能是维持橡胶粒子结构, 尤其是维持半单位膜的水相-有机相分界面, 从而保证天然橡胶生物合成的进行。橡胶粒子为负责天然橡胶多聚化的酶或酶复合体提供亲水的附着表面; 为已合成及正在合成的天然橡胶分子提供储存场所, 使疏水的天然橡胶分子包裹在橡胶粒子内。然而, REF在天然橡胶合成过程中的确切作用仍不清楚。

3.2 橡胶树的SRPP及其他产胶植物的SRPP类似物

小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SRPP)是橡胶树橡胶粒子仅次于REF的高丰度表达蛋白质。Oh等(1999)克隆了其基因并发现, 向体外合成体系加入原核表达的重组SRPP有助于天然橡胶合成; 向体外合成体系加入抗SRPP抗体则抑制天然橡胶合成。Kim等(2004)在银胶菊中发现了SRPP的类似物, 命名为GHS (guayule homologue of SRPP), GHS与SRPP的保守区序列高度同源(序列相似性为50%), 原核表达的重组GHS蛋白对天然橡胶体外合成有促进作用。他们认为, SRPP或类似分子可能是合成高聚合度天然橡胶所必需的蛋白质, 可能与橡胶转移酶组成复合体发挥作用。

Schmidt等(2010a)在橡胶草*T. kok-saghyz* (实为*T. brevicorniculatum*)中发现了SRPP同源蛋白*TkSRPP1~5* (应为*TbSRPP1~5*)。Hillebrand等(2012)采用免疫胶体金电镜技术证实*TkSRPP1~5*定位于橡胶粒子表面; 针对*TbSRPP1~5*的RNAi试验表明, RNAi植株干胶产量下降40%~50%, 但平均分子量及分子量分布均无变化, RNAi植株的橡胶粒子变得不稳定、容易快速凝集, 因此推测SRPP的作用可能是维持橡胶粒子结构, 从而有利于天然橡胶合成及储存。

*TbSRPP3*是存在于*T. brevicorniculatum*橡胶粒

子的高丰度蛋白质。Collins-Silva等(2012)发现*TbSRPP3*基因过表达植株根部的天然橡胶产量增加,而*TbSRPP3*基因沉默植株根部的橡胶合成产量则显著下降,所产生的橡胶分子量也急剧下降。这表明该基因在植物体内的表达不仅与橡胶的产量相关,也与橡胶的聚合程度相关。

Singh等(2003)的研究表明,抗SRPP抗体与*F. carica*和*F. benghalensis*的橡胶粒子均不存在免疫识别反应,因此认为,这两种植物橡胶粒子的表面可能没有与SRPP同源的蛋白质。

3.3 天然橡胶多聚化的底物

烯丙基焦磷酸引发底物的分子量越大,天然橡胶合成速度越快(DMAPP<GPP<FPP及GGPP)(Cornish和Siler 1995)。植物体内天然橡胶合成的主要引发底物被认为是FPP,因为与其他引发底物相比,FPP具有更低的结合常数(Cornish 2001b)。

体外橡胶合成实验表明,反应体系中引发底物与IPP的浓度比值影响顺式-1,4-聚异戊二烯分子合成的起始与终止(Castillón和Cornish 1999)。例如,当IPP的浓度有限,而FPP浓度较高时,合成短链顺式-1,4-聚异戊二烯;相反,当IPP浓度较高,而FPP浓度较低时,则合成长链顺式-1,4-聚异戊二烯(Castillón和Cornish 1999; da Costa等2005)。

在体内条件下,橡胶树与银胶菊合成的天然橡胶分子量远大于印度榕;但在相同条件(FPP、IPP浓度)的体外橡胶合成体系中,橡胶树与银胶菊橡胶粒子合成的顺式-聚异戊二烯分子量只有印度榕橡胶粒子合成的一半(Cornish等2000)。这一现象说明,尽管橡胶转移酶是天然橡胶多聚化反应的执行者,却不是决定分子量的首要因素;导致这一现象的原因可能是,当FPP存在时印度榕橡胶转移酶对IPP有较高亲和力(Cornish等2000)。

Mau等(2003)发现chaetomelic acid A同系物和 α -hydroxyfarnesylphosphonic acid两类FPP类似物对橡胶树和银胶菊橡胶粒子参与的橡胶体外合成有抑制作用,这表明橡胶转移酶的引发底物结合位点与以FPP为底物的其他酶的底物结合位点结构相似。DeGraw等(2007)使用光激活的FPP类似物标记从橡胶树胶乳获得的蛋白质粗提物,结果表明,在天然橡胶合成过程中,REF直接与FPP作用。

3.4 橡胶生物合成中的蛋白质抑制剂

Archer和Audley (1987)将初步离心后获得的C-乳清用凝胶过滤层析技术分离,得到3个组分(按出峰顺序):组分A(橡胶粒子)、组分B(蛋白质)、组分C(蛋白质及其他成分)。将上述组分重新组合进行体外橡胶合成实验发现,组分C对组分A参与的体外天然橡胶合成有增强作用,组分B对组分A参与的体外天然橡胶合成则有强烈的抑制作用,具体而言,起抑制作用的是一个分子量约为50 kDa的可热变性蛋白质。

3.5 橡胶生物合成中的金属离子

金属离子通过调节产胶植物橡胶转移酶活性影响IPP多聚化反应(Kang等2000a, b; Scott等2003)。橡胶转移酶有多种金属辅助因子,其中 Mg^{2+} 浓度比 Mn^{2+} 高3个数量级,因而 Mg^{2+} 是主要的金属辅助因子(Scott等2003)。 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 浓度影响IPP掺入合成中的天然橡胶分子的速度;在橡胶树、银胶菊和印度榕3种植物中,橡胶转移酶能结合FPP、FPP-金属离子或单独结合金属离子,但不能单独结合IPP分子(Scott等2003)。在体外合成的条件下, Mg^{2+} 浓度可显著影响橡胶树和银胶菊所合成天然橡胶的分子量,但是橡胶树合成天然橡胶的分子量对 Mg^{2+} 浓度更敏感(da Costa等2006)。

3.6 橡胶转移酶活性的低温诱导

在Bonner (1943)发现银胶菊橡胶转移酶活性需要低温诱导的基础上,Benedict等(1983)发现2-(3,4-dichlorophenoxy)-triethylamine可替代低温的作用,诱导银胶菊橡胶转移酶活性。Cornish和Backhaus (2003)发现夜晚约20 °C的低温对成熟银胶菊植株橡胶转移酶活性有诱导作用,但不能诱导小于200天龄幼苗产生橡胶转移酶活性。

4 展望

由于橡胶生物合成机理的复杂性,产胶植物橡胶转移酶迄今未能得到分离和鉴定,关于橡胶转移酶活性的调节也仅有一些间接的实验证据。橡胶生物合成可能存在共同的机制,因此,不同植物橡胶转移酶、橡胶生物合成分子机理及橡胶分子量大小决定机制的研究结果可相互借鉴与印证。

目前,橡胶树基因组数据已经公布,胶乳转录组数据亦趋于完善,这些研究进展使得通过蛋白质组学技术鉴定更多胶乳或橡胶粒子的低丰度蛋

白质成为可能, 从而有助于获得橡胶转移酶及其辅助蛋白因子的序列信息。全面开展橡胶树等产胶植物胶乳中的亚细胞结构及全胶乳蛋白质组学研究, 将为鉴定橡胶转移酶及其辅助因子并最终阐明橡胶生物合成的分子机理奠定基础。

转基因和RNAi技术可在植物体内对CPT等基因的生物学功能进行验证, 从而获得产胶相关的重要功能基因, 这些基因功能的信息将有助于橡胶树和其他产胶植物的新品种选育和改良。

参考文献

- 陈守才, 邵寒霜, 胡东琼, 郑学勤(1994). 橡胶转移酶活性与橡胶树产胶能力关系的研究. 热带作物学报, 15 (增刊): 1~6
- 陈守才, 郑学勤, 吴坤鑫, 邵寒霜, 胡东琼(1996). 利用橡胶树橡胶转移酶活性早期预测橡胶树产胶能力的研究. 热带作物学报, 17 (2): 1~4
- 代龙军, 项秋兰, 黎瑜, 聂智毅, 康桂娟, 段翠芳, 曾日中(2012). 巴西橡胶树橡胶粒子蛋白质的16-BAC/SDS-PAGE双向电泳及质谱分析. 中国农业科学, 45 (11): 2328~2338
- 严瑞芳(1995). 杜仲胶研究进展及发展前景. 化学进展, 7 (1): 65~71
- Archer BL, Audley BG (1967). Biosynthesis of rubber. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 29: 221~257
- Archer BL, Audley BG (1987). New aspects of rubber biosynthesis. Bot J Linn Soc, 94 (1~2): 181~196
- Archer BL, Audley BG, Cockbain EG, McSweeney GP (1963). The biosynthesis of rubber. Incorporation of mevalonate and isopentenyl pyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis*-latex fractions. Biochem J, 89 (3): 565~574
- Archer BL, Ayrey G, Cockbain EG, McSweeney GP (1961). Incorporation of [^{14}C]-isopentenyl pyrophosphate into polyisoprene. Nature, 189: 663~664
- Archer BL, Cockbain EG (1969). Rubber transferase from *Hevea brasiliensis* latex. Methods Enzymol, 15: 476~480
- Asawatreratanakul K, Zhang YW, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, Takahashi S, Rattanapittayaporn A, Koyama T (2003). Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding *cis*-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*. A key factor participating in natural rubber biosynthesis. Eur J Biochem, 270 (23): 4671~4680
- Benedict CR, Madhavan S, Greenblatt GA, Venkatachalam KV, Foster MA (1990). The enzymatic synthesis of rubber polymer in *Parthenium argentatum* Gray. Plant Physiol, 92 (3): 816~821
- Benedict CR, Reibach PH, Madhavan S, Stipanovic RV, Keithly JH, Yokoyama H (1983). Effect of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-triethylamine on the synthesis of *cis*-polyisoprene in guayule plants (*Parthenium argentatum* Gray). Plant Physiol, 72 (3): 897~899
- Bonner J (1943). Effects of temperature on rubber accumulation by the guayule plant. Bot Gaz, 105 (2): 233~243
- Bushman BS, Scholte AA, Cornish K, Scott DJ, Brichta JL, Vederas JC, Ochoa O, Michelmore RW, Shintani DK, Knapp SJ (2006). Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. Phytochemistry, 67 (23): 2590~2596
- Castillón J, Cornish K (1999). Regulation of initiation and polymer molecular weight of *cis*-1,4-polyisoprene synthesized *in vitro* by particles isolated from *Parthenium argentatum* (Gray). Phytochemistry, 51 (1): 43~51
- Collins-Silva J, Nural AT, Skaggs A, Scott D, Hathwaik U, Woolsey R, Schegg K, McMahan C, Whalen M, Cornish K et al (2012). Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TksRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism. Phytochemistry, 79: 46~56
- Cornish K (1993). The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferases in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis. Eur J Biochem, 218 (1): 267~271
- Cornish K (2001a). Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species. Nat Prod Rep, 18 (2): 182~189
- Cornish K (2001b). Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. Phytochemistry, 57 (7): 1123~1134
- Cornish K, Backhaus RA (2003). Induction of rubber transferase activity in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) by low temperatures. Ind Crops Prod, 17 (2): 83~92
- Cornish K, Castillon J, Scott DJ (2000). Rubber molecular weight regulation, *in vitro*, in plant species that produce high and low molecular weights *in vivo*. Biomacromolecules, 1 (4): 632~641
- Cornish K, Siler DJ (1995). Effect of different allylic diphosphates on the initiation of new rubber molecules and on *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). J Plant Physiol, 147 (3): 301~305
- da Costa BMT, Keasling JD, Cornish K (2005). Regulation of rubber biosynthetic rate and molecular weight in *Hevea brasiliensis* by metal cofactor. Biomacromolecules, 6 (1): 279~289
- da Costa BMT, Keasling JD, McMahan CM, Cornish K (2006). Magnesium ion regulation of *in vitro* rubber biosynthesis by *Parthenium argentatum* Gray. Phytochemistry, 67 (15): 1621~1628
- Dai LJ, Kang GJ, Li Y, Nie ZY, Duan CF, Zeng RZ (2013). In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). Plant Mol Biol, 82 (1~2): 155~168
- DeGraw AJ, Zhao Z, Strickl CL, Taban AH, Hsieh J, Jefferies M, Xie W, Shintani DK, McMahan CM, Cornish K et al (2007). A photoactive isoprenoid diphosphate analogue containing a stable phosphonate linkage: synthesis and biochemical studies with prenyltransferases. J Org Chem, 72 (13): 4587~4595
- Dennis MS, Light DR (1989). Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. J Biol Chem, 264 (31): 18608~18617
- Gronover CS, Wahler D, Prüfer D (2011). Natural rubber biosynthesis and physico-chemical studies on plant derived latex. In: Elnashar M (ed). Biotechnology of Biopolymers. Croatia: InTech, 75~88
- Hillebrand A, Post JJ, Wurbs D, Wahler D, Lenders M, Krzyzanek V, Prüfer D, Gronover CS (2012). Down-regulation of small rubber

- particle protein expression affects integrity of rubber particles and rubber content in *Taraxacum brevicorniculatum*. PLoS One, 7: e41874
- Kang H, Kang MY, Han KH (2000a). Identification of natural rubber and characterization of rubber biosynthetic activity in fig tree. Plant Physiol, 123 (3): 1133~1142
- Kang H, Kim YS, Chung GC (2000b). Characterization of natural rubber biosynthesis in *Ficus benghalensis*. Plant Physiol Biochem, 38 (12): 979~987
- Kim IJ, Ryu SB, Kwak YS, Kang H (2004). A novel cDNA from *Parthenium argentatum* Gray enhances the rubber biosynthetic activity *in vitro*. J Exp Bot, 55 (396): 377~385
- Ko JH, Chow KS, Han KH (2003). Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). Plant Mol Biol, 53 (4): 479~492
- Light DR, Dennis MS (1989). Purification of a prenyltransferase that elongates *cis*-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*. J Biol Chem, 264 (31): 18589~18597
- Light DR, Lazarus RA, Dennis MS (1989). Rubber elongation by farnesyl pyrophosphate synthases involves a novel switch in enzyme stereospecificity. J Biol Chem, 264 (31): 18598~18607
- Madhavan S, Benedict CR (1984). Isopentenyl pyrophosphate *cis*-1,4-polyisoprenyl transferase from guayule (*Parthenium argentatum* Gray). Plant Physiol, 75 (4): 908~913
- Mau CJD, Garneau S, Scholte AA, Van Fleet JE, Vederas JC, Cornish K (2003). Protein farnesyltransferase inhibitors interfere with farnesyl diphosphate binding by rubber transferase. Eur J Biochem, 270 (19): 3939~3945
- Mau CJD, Scott DJ, Cornish K (2000). Multiwell filtration system results in rapid, high-throughput rubber transferase microassay. Phytochem Anal, 11 (6): 356~361
- McMullen AI, McSweeney GP (1966). The biosynthesis of rubber: incorporation of isopentenyl pyrophosphate into purified rubber particles by a soluble latex serum enzyme. Biochem J, 101 (1): 42~47
- Mooibroek H, Cornish K (2000). Alternative sources of natural rubber. Appl Microbiol Biotechnol, 53 (4): 355~365
- Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han KH (1999). Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. J Biol Chem, 274 (24): 17132~17138
- Pan Z, Durst F, Werck-Reichhart D, Gardner HW, Camara B, Cornish K, Backhaus RA (1995). The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450. Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. J Biol Chem, 270 (15): 8487~8494
- Post J, van Deenen N, Fricke J, Kowalski N, Wurbs D, Schaller H, Eisenreich W, Huber C, Twyman RM, Prüfer D et al (2012). Laticifer-specific *cis*-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of *Taraxacum brevicorniculatum*. Plant Physiol, 158 (3): 1406~1417
- Rahman AYA, Usharraj AO, Misra BB, Thottathil GP, Jayasekaran K, Feng Y, Hou S, Ong SY, Ng FL, Lee LS et al (2013). Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. BMC Genomics, 14: 75
- Schmidt T, Hillebrand A, Wurbs D, Wahler D, Lenders M, Gronover CS, Prüfer D (2010a). Molecular cloning and characterization of rubber biosynthetic genes from *Taraxacum koksaghyz*. Plant Mol Biol Rep, 28 (2): 277~284
- Schmidt T, Lenders M, Hillebrand A, van Deenen N, Munt O, Reichelt R, Eisenreich W, Fischer R, Prüfer D, Gronover CS (2010b). Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum koksaghyz*. BMC Biochem, 11: 11
- Scott DJ, da Costa BMT, Espy SC, Keasling JD, Cornish K (2003). Activation and inhibition of rubber transferases by metal cofactors and pyrophosphate substrates. Phytochemistry, 64 (1): 123~134
- Singh AP, Wi SG, Chung GC, Kim YS, Kang H (2003). The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*. J Exp Bot, 54 (384): 985~992
- Swanson CL, Buchanan RA, Otey FH (1979). Molecular weights of natural rubbers from selected temperate zone plants. J Appl Polym Sci, 23 (3): 743~748
- Takahashi S, Lee H-J, Yamashita S, Koyama T (2012). Characterization of *cis*-prenyltransferases from the rubber producing plant *Hevea brasiliensis* heterologously expressed in yeast and plant cells. Plant Biotechnol, 29 (4): 411~417
- Tangpakdee J, Tanaka Y, Ogura K, Koyama T, Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D (1997a). Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. Phytochemistry, 45 (2): 269~274
- Tangpakdee J, Tanaka Y, Ogura K, Koyama T, Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Asawatreratanakul K (1997b). Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyl transferase activities in bottom fraction and C-serum from *Hevea* latex. Phytochemistry, 45 (2): 261~267
- van Beilen JB, Poirier Y (2007). Establishment of new crops for the production of natural rubber. Trends Biotechnol, 25 (11): 522~529
- Venkatachalam P, Geetha N, Sangeetha P, Thulaseedharan A (2013). Natural rubber producing plants: an overview. Afr J Biotechnol, 12 (12): 1297~1310
- Wititsuwannakul D, Rattanapittayaporn A, Koyama T, Wititsuwannakul R (2004). Involvement of *Hevea* latex organelle membrane proteins in the rubber biosynthesis activity and regulatory function. Macromol Biosci, 4 (3): 314~323
- Wititsuwannakul D, Rattanapittayaporn A, Wititsuwannakul R (2003). Rubber biosynthesis by a *Hevea* latex bottom-fraction membrane. J Appl Polym Sci, 87 (1): 90~96