

DOI: 10.13376/j.cblls/2016047

文章编号: 1004-0374(2016)03-0384-07

植物天冬氨酸蛋白酶的功能研究进展

王亚锐, 吴 燕*

(武汉大学生命科学学院, 杂交水稻国家重点实验室, 武汉 430072)

摘 要: 天冬氨酸蛋白酶 (aspartic proteases, APs) 是一类重要的蛋白水解酶, 广泛分布于哺乳动物、植物、细菌和病毒中。近年来, 越来越多的植物天冬氨酸蛋白酶相继被发现, 有关天冬氨酸蛋白酶在植物生长发育中的作用的研究获得了新进展。现就植物天冬氨酸蛋白酶的结构和功能的研究进行总结, 并对相关领域今后的研究方向提出展望。

关键词: 天冬氨酸蛋白酶; 信号转导; 细胞程序性死亡; 胁迫

中图分类号: Q946.5 **文献标志码:** A

The research progress on the functions of plant aspartic proteases

WANG Ya-Rui, WU Yan*

(State Key Laboratory of Hybrid Rice, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Aspartic proteases are important proteolytic enzymes which are widely distributed in mammals, plants, bacteria and viruses. Recently, more and more family members of aspartic proteases have been identified in plants. The roles of aspartic proteases in plant development have been reported in numerous studies. In this brief review, we highlight the structures and functions of plant aspartic proteases, and also discuss the prospect in underlying the molecular mechanisms involving in aspartic proteases of plants.

Key words: aspartic protease; signaling; programmed cell death; stress

天冬氨酸蛋白酶 (aspartic proteases, APs) 是蛋白水解酶家族非常重要的亚家族成员^[1], 普遍存在于动物和植物细胞中^[2]。例如, 哺乳动物的胃蛋白酶 (Pepsin)、凝乳酶 (Chymosin)^[3]、肾素 (Rennin)^[4] 及溶酶体中的组织蛋白酶 (Cathepsin) D 和 E 等, 均属于天冬氨酸蛋白酶。天冬氨酸蛋白酶广泛分布于植物的种子、茎、叶片、花器官等组织中。20 世纪 90 年代, 植物天冬氨酸蛋白酶在单子叶植物, 如玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* Linn.); 双子叶植物, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、油菜 (*Brassica campestris* L.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 等相继得到分离^[5]。这些水解酶最初主要是在休眠的种子中检测到的^[2], 后来在蓟 (*Cirsium japonicum*) 的花、烟草和马铃薯的叶片、猪笼草 (*Nepenthes distillatoria*) 的捕虫囊消化液 (pitcher fluid)^[6], 以及水稻的胚囊

中均发现有天冬氨酸蛋白酶的存在^[7]。此外, 天冬氨酸蛋白酶也在细菌和病毒中被发现^[8]。

人们对于植物天冬氨酸蛋白酶的理解建立在动物和微生物相关研究之上。植物中的 APs 主要参与前体蛋白的加工、蛋白质的降解、细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 等过程, 同时也参与植物抗病、抗逆、叶片衰老^[9] 等过程。近年来, 越来越多的植物天冬氨酸蛋白酶得到了分离, 并通过体内实验对其功能进行了探究。在拟南芥和水稻中的研究尤为突出。通过筛选拟南芥抗病突变体库, Xia 等^[10] 分离获得 AP 基因 *CDR1* (constitutive disease resistance 1), 该基因可能是抗病相关基因, *CDR1*

收稿日期: 2015-06-30; 修回日期: 2015-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270333)

*通信作者: E-mail: wuy@whu.edu.cn; Tel: 027-68753805

蛋白在细胞间质中的大量积累,可能是一种对病原的防御反应。水稻 *O_sCDR1* 是拟南芥 *CDR1* 的同源基因,其表达受到植物抗病诱导剂的诱导^[11]。在拟南芥或水稻中,*CDR1* 基因参与了植株抵御细菌和真菌的感染^[12-13]。预测在拟南芥基因组中可能存在 60 多个编码天冬氨酸蛋白酶的基因。Takahashi 等^[14]通过分析 AP 基因的组织表达模式,发现一些 AP 基因在拟南芥的组织中广泛表达,暗示了天冬氨酸蛋白酶功能的多样性。本实验室进行相关研究发现,拟南芥天冬氨酸蛋白酶基因 *ASPG1* (aspartic protease in guard cell 1) 参与了 ABA (abscisic acid) 信号介导的避旱过程。*ASPG1* 基因的表达主要分布在保卫细胞中,这与它参与气孔关闭,益于植株避旱的功能特征吻合^[15]。目前人们已确定在水稻基因组中存在 96 个 AP 基因^[16]。通过对一个控制籼稻和粳稻亚种间杂种不育的主效基因 S5 位点的研究,发现此位点处的 ORF5 基因编码一种天冬氨酸蛋白酶。S5 位点由 3 个基因 ORF3、ORF4、ORF5 构成,这 3 个基因组成“杀手—保护系统”(killer-protector system)以调控籼粳杂种不育^[17]。

天冬氨酸蛋白酶的作用在植物生长发育中不容忽视。本文就近期对植物天冬氨酸蛋白酶的功能研究进行综述,旨在为今后相关领域的研究提供理论依据。

1 植物天冬氨酸蛋白酶类型

植物天冬氨酸蛋白酶 (APs) 在 MEROPS 数据库 (<http://merops.sanger.ac.uk/>) 中,根据氨基酸序列同源性,被划分为 14 个家族。依据各家族成员间的进化关系和三级结构,植物 APs 又进一步地被归为 5 类,分别为 Clan AA、AB、AC、AD 和 AF^[18]。Clan AA 亚家族包含了大部分重要的 APs 成员,其中包括 A1 和 A2 两组成员。A1 组包含胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶 D 和 E、肾素、Plasmepepsins (PMs) 及 Histo-aspartic peptidase (HAP); A2 组包含 HIV retropepsin。其他 4 种类型的 APs 只包含较少的家族成员。大多数植物天冬氨酸蛋白酶属于 Clan AA 亚家族的 A1 类型,如拟南芥 *CDR1*^[10] 和 *PCS1*

(promotion of cell survival 1)^[19] 蛋白,水稻 S5 位点的 ORF5^[17],均为 A1 类 pepsin 家族成员。

2 植物天冬氨酸蛋白酶的结构

不同物种中天冬氨酸蛋白酶 (APs) 具有相似的蛋白酶特性。在酸性 pH 条件下 APs 具有水解酶的活性,然而,其活性能够被 Pepstatin A 抑制。大部分植物 APs 的氨基酸序列包含 3 个部分: N 端 (amino-terminal)、植物特有插入系列 (plant-specific insert, PSI) 和 C 端 (carboxy-terminal)^[20]。植物 APs 的 N 端和 C 端与哺乳动物及微生物中 APs 的序列具有高度同源性。如图 1 所示,植物 APs 的 N 端通常包括信号肽 (signal peptide)、前肽 (propeptide) 及活性位点结构域 (Asp domain)。N 端信号肽序列与 APs 前体向内质网的转运相关,前肽区由 40 个左右氨基酸构成,活性位点区主要包含两个保守的植物 APs 催化位点,它们分别为 Asp-Thr-Gly 和 Asp-Ser-Gly。然而,在动物和微生物中,相当一部分 APs 却只具有一个含 Asp-Thr-Gly 的保守区域。典型的天冬氨酸蛋白酶 (APs) 在酸性条件下活性最高,这是因为酸性条件会中和酶表面过多的负电荷,使其更加的稳定,并且前肽区段的去除需在酸性的条件下完成。在中性条件下,APs 会发生不可逆变性,但并不是所有的天冬氨酸蛋白酶都遵循此规律。有些特殊的植物 APs 在接近中性环境中酶活性反而增强,如拟南芥的 *CDR1* 蛋白在较高的 pH 值 (pH6.0~6.5) 时活性最高^[21]。

APs 的最终形式是由一条或两条肽链拼接折叠而成^[22],其加工成熟过程相当复杂。当植物 APs 处于蛋白质加工阶段时,信号肽会在内质网处被剪切掉,接着前肽和 PSI 序列也会在蛋白成熟过程中被去除。植物 APs 的最终形式由剩余的活性位点结构域及 C 端构成。但是,有些特殊的植物 APs 的蛋白加工过程不尽相同。如 Lufrano 等^[23]在翼蓟 (*Cirsium vulgare*) 中成功克隆并分离出了一种植物 APs,将其命名为 *cirsin*。通常大部分的 APs 需要通过酸的刺激或蛋白水解才能催化成活性形式。但 *cirsin* 则不同,无需切去信号肽和前肽区段它便具

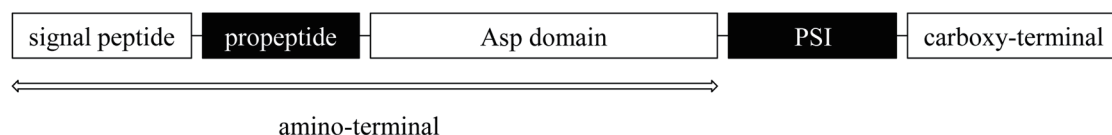


图1 植物APs蛋白结构域示意图

有蛋白酶的活性^[23]。目前发现的很多植物天冬氨酸蛋白酶均含有 PSI 序列, 该序列由 50~100 个氨基酸残基构成。尽管该序列含有 6 个保守的半胱氨酸残基、几个疏水残基和 1 个糖基化位点, 但不同植物物种的 PSI 序列差异很大, 体现出天冬氨酸蛋白酶在进化过程中的多样性。

3 植物天冬氨酸蛋白酶的组织分布和亚细胞定位

植物 APs 最初是在种子中分离获得的。植物 APs 作为一种蛋白水解酶, 能够将大分子的蛋白质水解为氨基酸小分子。在大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 种子萌发起始阶段, AP 主要在胚和盾片中表达; 待种子萌发形成根之后, 在根和糊粉层中表达量较高。在发育时期的大麦种子的胚、糊粉层和种皮等结构中, 均有 AP 的表达。植物 APs 在种子中的广泛分布, 为种子的正常萌发提供了充足的营养。此外, AP 也存在于拟南芥、油菜、蓖麻等植物的种子中^[5]。随着研究的发展和深入, 人们观察到, 在植物的其他部位, 其实也能够检测到 AP 的积累。如在水稻中克隆出的第一个天冬氨酸蛋白酶基因 *Oryzasin1*。它在萌发的种子、幼嫩的根和叶中表达量较高, Asakura 等^[24]推测 *Oryzasin1* 可能参与贮藏蛋白的加工与降解。水稻开花后 2~4 周, *Oryzasin1* 的表达呈上升趋势; 种子形成之后, 其表达量下降, 说明 *Oryzasin1* 在种子形成的过程中发挥了重要的作用。在大麦的根中, 有人发现一种植物天冬氨酸蛋白酶 *Phytopsin*, 其在导管和筛管中大量积累^[25]。本实验室的研究结果显示, 拟南芥天冬氨酸蛋白酶基因 *ASPG1* 主要存在于幼苗、成熟叶、茎、花和角果的保卫细胞中。这一现象与它所具有的参与 ABA 信号介导的避旱过程相一致^[15]。

典型的植物 APs 定位在液泡中。随着研究的深入, 人们发现 APs 在细胞中的定位其实是多样化的。例如, 有些 APs 能够定位在细胞壁或内质网处。研究表明, 天冬氨酸蛋白酶在植物细胞中的定位可能与它们所特有的 PSI 序列有关。PSI 序列与动物和微生物中的 APs 没有序列同源性, 但却与哺乳动物的 *soposin C* 高度同源, 该蛋白能够激活溶酶体中的 β -半乳糖神经酰胺酶 (β -galactosylceramidase) 和 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)。加工成熟的植物 APs 与动物的组织蛋白酶 D (*cathepsin D*) 的序列及 3D 结构十分相似。在动物细胞中, *cathepsin D* 的加工成熟必须通过 *soposin C* 的协助才能实现其

在溶酶体中的定位^[5]。植物 APs 的 PSI 序列被认为可能与酶在细胞内或向胞外转运有关。近期解析的马铃薯 PSI 晶体结构显示, 其 N 端在酸性 pH 下形成 *helix-kink-helix* 的结构, 具有介导双层膜融合的能力, 从而实现了天冬氨酸蛋白酶到液泡的转移^[26]。研究表明, 有些植物中的 APs 不含 PSI 序列, 其亚细胞定位也多种多样, 如拟南芥抗病相关的 *CDR1* 定位于细胞壁^[10], 干旱胁迫相关的 *ASPG1* 定位于内质网^[15]。水稻在雌蕊特异表达的 S5 位点的 *ORF5*, 其编码的 AP 也不含 PSI 序列, 暗示其亚细胞定位可能不在液泡, 免疫电镜 (*immuno-electron microscopy*) 结果显示, *ORF5* 定位于细胞壁处^[16]。

4 植物天冬氨酸蛋白酶的功能

4.1 蛋白质的加工与降解

植物 APs 参与植物体内蛋白质的加工与降解过程。种子萌发过程中, 在一些特殊的组织 (胚乳或子叶) 里, 编码贮藏蛋白的基因表达, 经过转录翻译形成蛋白前体, 由 APs 对其进行加工和剪切, 使之成为有功能的蛋白质, 如油菜种子中天冬氨酸蛋白酶参与种子贮藏蛋白清蛋白 (*albumin*) 的 2S 前体的加工。这些贮藏蛋白的多肽前体, 在翻译后修饰过程中 (*post-translational process*) 被 APs 剪切为两条不同的由二硫键联系起来的链, 从而形成成熟的 2S 清蛋白^[27]。而成熟的 2S 清蛋白能够有效抑制细菌和真菌的生长, 抵抗植物病原体的侵染, 在植物体防御系统中起重要的作用^[28]。植物种子的萌发, 需要大量水解酶的参与, 这些酶将种子贮藏蛋白水解为氨基酸小分子, 为植物的生长发育提供氮源, 如食肉植物猪笼草中的天冬氨酸蛋白酶主要分布在捕虫囊中, 可将捕获的昆虫进行消化, 从而提供植物生长所需的营养物质^[29]。小麦的两个天冬氨酸蛋白酶 *WAP1* 和 *WAP2* 在种子萌发和成熟过程中表达。将这两个蛋白从萌发的种子中纯化, 发现其能消化谷蛋白 (*gluten*) 底物, 而谷蛋白正是小麦贮藏蛋白的一种。为了探究这两个 APs 的生理学功能, 以一天吸胀 (*imbibition*) 作用的小麦种子为材料, 通过原位杂交 (*in situ hybridization*) 实验, 发现 *WAP1* 和 *WAP2* 主要在胚根、盾片 (*scutellum*) 和糊粉层 (*aleurone layer*) 中表达。成熟种子中 *WAP1* 在整个胚中均有表达^[30]。这一组织表达特点与其水解贮藏蛋白的功能相一致。

4.2 植物衰老和细胞程序性死亡

当植物迈进了衰老时期, 接踵而来的是一系列

的形态和生理变化。伴随着植物的叶片、茎、种子等器官的衰老, 细胞结构也发生剧烈变化, 如细胞膜坍塌、细胞器解体、DNA 降解等等。此时, 植物的光合速率和呼吸速率均明显降低, 叶绿素含量也随之下降, 自由基水平升高, 激素水平变化等。目前的研究显示, 在植物衰老过程中 APs 主要参与了细胞器的降解、光合作用关键酶 (rubisco) 的降解以及激素调控的衰老机制等过程。在研究欧洲山杨 (*Populus tremula*) 衰老的叶片中的基因时, Bhalerao 等^[31]发现两个天冬氨酸蛋白酶基因在幼嫩叶片中几乎不表达, 但在衰老叶片中表达量明显升高; 在叶片的衰老过程中, 光合作用逐渐减弱, 叶绿体呈现降解; 实验数据表明, 这两个天冬氨酸蛋白酶可能与细胞中叶绿体的降解密切相关。Cruz de Carvalho 等^[32]在豇豆 (*Vigna unguiculata* L. Walp.) 中分离出一个天冬氨酸蛋白酶基因 *VuAPI*, 根据 RNA 印迹 (Northern blot) 结果, 发现该基因在叶片和茎中特异性表达, 且在衰老的叶片中转录水平明显升高。由此, 他们推测该酶可能参与了叶片衰老过程。在烟草中, Kato 等^[33]发现定位于叶绿体的蛋白 CND41 参与了叶片衰老时核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶全蛋白 (rubisco holoprotein) 的降解过程, 且 *CND41* 的水平与烟草细胞叶绿体内的转录水平呈负相关。与烟草 *CND41* 同源的拟南芥基因同样也具有类似的作用^[34-35]。在马铃薯中, SPAP1 蛋白为典型的天冬氨酸蛋白酶, 参与乙烯调控的叶片衰老, 但 SPAP1 促进马铃薯叶片衰老并未直接发挥作用, 它还需要乙烯信号通路中多个成员的共同参与才能实现^[9]。一些 APs 还参与了植物细胞程序性死亡 (PCD) 进程, 如大麦的 *phytepsin* 和 *nucellin* 蛋白均参与了 PCD 过程^[25,36]。其中 *phytepsin* 基因在根的导管和筛管的降解过程中表达量较高, *nucellin* 基因则是在发生双受精 (double fertilization) 后进行表达, 从而降解大麦珠心细胞。在荞麦 (*Fagopyrum esculentum* Moench.) 种子中分离出了天冬氨酸蛋白酶基因 *FeAPI2*, Timotijevic 等^[37]发现该基因在种子发育早期呈特异性表达, 该基因也可能与珠心 (*nucellus*) 的降解有关。拟南芥 *PCSI* 基因与胚胎发育和有性生殖有关。*PCSI* 主要在花和幼嫩的角果中表达, 当该基因异位表达时, 雌配子的育性并未受到影响, 但雄配子败育, 原因是花粉囊不能正常开裂, 而花粉囊的正常开裂与 PCD 有关, 因此, 该基因可能抑制 PCD 过程^[19]。已有证据显示, 水稻天冬氨酸蛋白酶基因 *OsAP25*、*OsAP27*^[38]以及

OsAP37^[39]均参与植物发育过程中 PCD。*OsAP25*、*OsAP27* 参与了花药绒毡层的降解, *OsAP37* 与 PCD 过程中 caspase-like protease(s) 的激活相关。*Os1295* 基因与 *Oryzasin1* 具有很高的同源性, 但前者是在水稻衰老相关 cDNA 文库中被发现的, 且该基因在黑暗处理时在衰老叶片中表达量明显上升^[40]。综上所述, 近年来发现很多植物 APs 直接或间接地参与到了叶片衰老及 PCD 进程, 但并没有实际的证据, 且具体机制尚不明确。

4.3 逆境胁迫反应

已有大量证据证实植物 APs 参与非生物和生物胁迫过程。Cruz de Carvalho 等^[41]在菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 和豇豆的叶片中分离出天冬氨酸蛋白酶基因, 发现它们的转录水平和酶活性受到干旱胁迫的诱导。当荞麦处于不同胁迫环境中, 如黑暗、干旱、紫外、创伤以及水杨酸 (salicylic acid, SA) 处理时, 叶片中的天冬氨酸蛋白酶基因 *FeAP9* 的表达水平上调^[42]。对两种不同品种的菠萝 (*Ananas comosus*) 进行收获后冷处理, 发现耐冷品种中 AP 基因 *AcAPI* 表达量升高, 而另一非抗寒品种中, *AcAPI* 表达量下调, 由此说明 *AcAPI* 可能参与到了菠萝收获后耐冷胁迫通路中^[43]。研究发现拟南芥 *ASPG1* 基因参与了 ABA 信号通路, 通过调节细胞中 ROS (reactive oxygen species) 水平的平衡, 介导植物干旱胁迫应答^[44]。本实验室的研究结果显示, ABA 和干旱胁迫均能够提升 *ASPG1* 的表达水平, 过量表达 *ASPG1* 能够促进保卫细胞中 ROS 的产生, 影响 *ABI2* (ABA-insensitive 2) 基因的转录水平^[15]。有报道指出, *ABI2* 能够抑制 H₂O₂ 和钙离子诱导的气孔关闭^[45]。因此, *ASPG1* 可能通过调节 *ABI2* 的表达水平实现其帮助植物避旱的功能。

除了参与各种非生物胁迫过程, 植物 APs 也参与植物对生物胁迫的应答。早在 20 世纪 90 年代, Rodrigo 等^[46-47]在烟草和番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 叶片中分离出了定位于胞外的 APs, 它们与病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins) 的降解有关。Guevara 等^[48]在马铃薯的块茎中分离出 *StAP* 基因, 对块茎进行真菌感染和创伤两种处理, 发现被致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 感染的组织中 *StAP* 表达水平明显升高, 且发现该酶能够直接抑制真菌孢囊 (cyst) 的萌发。拟南芥 *CDRI* 基因编码一个分泌到胞外的天冬氨酸蛋白酶。如果超表达 *CDRI* 基因, 植株具有矮化、抗病的表型。相反地, 如果抑制该基因的表达, 植株呈现感病敏感表型, 由此

推测该基因可能与植物抵御病原体侵害相关^[10]。水稻的一些 AP 基因也参与了生物胁迫应答。水稻经植物抗病诱导剂 SA 和苯并噻二唑 (benzothiadiazole, BTH) 处理后 *OsCDR1* 的表达量显著上调, 说明 *OsCDR1* 可能与水稻抗病有关^[11]。Alam 等^[49] 为研究 *OsAP77* 基因的功能, 对水稻植株进行了多种处理。发现经细菌、真菌、病毒等感染后, 水稻维管组织中的 *OsAP77* 表达明显增强; 经水杨酸、异烟酸 (isonicotinic acid, INA)、过氧化氢和脱落酸等处理之后, 在维管组织中 *OsAP77* 的表达量也呈上调趋势。由此推测水稻 *OsAP77* 基因同时参与了生物和非生物胁迫机制。当葡萄 (*Vitis vinifera*) 受到白粉菌 (*Uncinula necator*) 感染时, 其质量和产量均会受到影响。葡萄的 4 个 *VvAP* 基因的表达水平在被白粉菌感染后均显示上调, 这也暗示这些基因可能参与了真菌感染的胁迫应答^[50]。

5 总结与展望

APs 是生物体内一类重要的酸性水解酶, 参与生物体的多种生理和病理过程, 包括促进其他酶的活化、降解抗原、特异性水解逆转录病毒蛋白前体、调整血压、消化食物等, 如肾素在控制血压和止血方面具有重要作用^[51]。属于 ClanAD 家族的早老素 (presenilins) 发生突变, 会导致哺乳动物患阿尔茨海默性痴呆 (dementia in Alzheimer's disease)^[52] 等。了解 APs 在不同生理病理条件下的作用机理, 将为人们对艾滋病、肿瘤、肝炎等疾病的攻克提供重要的理论依据。近期, 对白色念珠菌分泌的 APs 结构和功能的研究尤为突出^[53-56], 因该真菌存在于正常人体内, 一般维持较低水平, 当机体免疫功能下降时, 菌株大量滋生, 引发疾病。而 APs 是真菌繁殖必需的水解酶, 因此, 寻找生物活性较强的小分子非肽类抑制剂, 将是下一步研究真菌感染等疾病的重点。由此可见, APs 的研究对人类的健康具有重大意义。基于植物 APs 与哺乳动物及微生物中 APs 的 C 端和 N 端序列的高度同源性, 人们在对动物及微生物 APs 研究的基础上, 对植物 APs 的了解日益增加, 取得了一系列的研究进展。近年来, 研究者们发现植物 APs 参与了蛋白质的加工和降解、组织的衰老和细胞程序性死亡、抗病、抗逆等过程。植物 APs 参与了非生物和生物胁迫过程, 因此, 了解其中的作用机制有助于人们对植物抗逆境胁迫进行深入研究。由于 APs 在酸性环境下具有较高的活性和稳定性, 近几年在食品加工行业得到广泛的应用^[57], 如

生产奶酪时, APs 被用作牛奶凝固剂^[58-60]; 为提升食物的口感, APs 可作为食品添加剂^[61] 等。植物 APs 在生物体内是一个较大的酶家族, 更多的基因功能有待发掘。随着分子克隆技术和生物信息学的发展, 越来越多的植物 APs 被克隆分离, 这些同一物种或不同物种中 APs 在基因水平上存在的分子多态性, 可能会对蛋白质的功能有一定影响。虽然已研究了一些 APs 基因, 并揭示了它们在植物体内行使的多种功能, 且研究了水解酶活性, 但是对 APs 的作用机理的了解依然很少。未来的挑战可能是研究植物 APs 在各种信号通路网络中扮演的角色及其天然底物的确定^[62]。

[参 考 文 献]

- [1] Davies DR. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1990, 19: 189-15
- [2] Mutlu A, Pfeil JE, Gal S. A probarley lectin processing enzyme purified from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Phytochemistry*, 1998, 47: 1453-9
- [3] Fruton JS. A history of pepsin and related enzymes. *Q Rev Biol*, 2002, 77: 127-47
- [4] Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2005, 6: 163-5
- [5] Mutlu A, Gal S. Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol Plantarum*, 1999, 105: 569-76
- [6] Takahashi K, Athauda SB, Matsumoto K, et al. Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: enzymatic and structural characteristics. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, 6: 513-25
- [7] Chen JJ, Ding JH, Ouyang YD, et al. A triallelic system of *S5* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of indica-japonica hybrids in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 11436-41
- [8] Brik A, Wong CH. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem*, 2003, 1: 5-14
- [9] Chen HJ, Huang YH, Huang GJ, et al. Sweet potato *SPAP1* is a typical aspartic protease and participates in ethephon-mediated leaf senescence. *J Plant Physiol*, 2015, 180: 1-17
- [10] Xia YJ, Suzuki H, Borevitz J, et al. An extracellular aspartic protease function in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO J*, 2004, 23: 980-8
- [11] Yu GY, Muehlbauer GJ. Benzothiadiazole-induced gene expression in wheat spikes does not provide resistance to *Fusarium* head blight. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 59: 129-36
- [12] Prasad BD, Creissen G, Lamb C, et al. Overexpression of rice (*Oryza sativa* L.) *OsCDR1* leads to constitutive activation of defense responses in rice and *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009, 22: 1635-44
- [13] Prasad BD, Creissen G, Lamb C, et al. Heterologous

- expression and characterization of recombinant OsCDR1, a rice aspartic proteinase involved in disease resistance. *Protein Expr Purif*, 2010, 72: 169-74
- [14] Takahashi K, Niwa H, Yokota N, et al. Widespread tissue expression of nepenthesin-like aspartic protease genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 724-9
- [15] Yao X, Xiong W, Ye TT, et al. Overexpression of the aspartic protease *ASPG1* gene confers drought avoidance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 2579-93
- [16] Chen JJ, Ouyang YD, Wang L, et al. Aspartic protease gene family in rice: gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene*, 2009, 442: 108-18
- [17] Yang JY, Zhao XB, Cheng K, et al. A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice. *Science*, 2012, 337: 1336-40
- [18] Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: D270-2
- [19] Ge XC, Dietrich C, Matsuno M, et al. An *Arabidopsis* aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO Rep*, 2005, 6: 282-8
- [20] Simões I, Faro C. Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem*, 2004, 271: 2067-75
- [21] Simões I, Faro R, Bur D, et al. Characterization of recombinant CDR1, an *Arabidopsis* aspartic proteinase involved in disease resistance. *J Biol Chem*, 2007, 282: 31358-65
- [22] Duarte P, Pissarra J, Moore I. Processing and trafficking of a single isoform of the aspartic proteinase cardosin A on the vacuolar pathway. *Planta*, 2008, 227: 1255-68
- [23] Lufano D, Faro R, Castanheira P, et al. Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 2012, 81: 7-18
- [24] Asakura T, Watanabe H, Abe K, et al. Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *Eur J Biochem*, 1995, 232: 77-83
- [25] Runeberg-Roos P, Saarma M. Phytapsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *Plant J*, 1998, 15: 139-45
- [26] Bryksa BC, Bhaumik P, Magracheva E, et al. Structure and mechanism of the saposin-like domain of a plant aspartic protease. *J Biol Chem*, 2011, 286: 28265-75
- [27] Krebbers E, Herdies L, De Clercq A, et al. Determination of the processing sites of an *Arabidopsis* 2S albumin and characterization of the complete gene family. *Plant Physiol*, 1988, 87(4): 859-66
- [28] Moreno FJ, Clemente A. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *Open Biochem J*, 2008, 2: 16-28
- [29] Kadek A, Tretyachenko V, Mrazek H, et al. Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expr Purif*, 2014, 95: 121-8
- [30] Tamura T, Terauchi K, Kiyosaki T, et al. Differential expression of wheat aspartic proteinases, WAP1 and WAP2, in germinating and maturing seeds. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 470-7
- [31] Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, et al. Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol*, 2003, 131: 430-42
- [32] Cruz de Carvalho MH, Pham-Thi AT, Gareil M, et al. Isolation and characterization of an aspartic proteinase gene from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J Plant Physiol*, 2004, 161: 971-6
- [33] Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, et al. The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, 2004, 220: 97-104
- [34] Diaz C, Lemaitre T, Christ A, et al. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1437-49
- [35] Kato Y, Yamamoto Y, Murakami S, et al. Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta*, 2005, 222: 643-51
- [36] Chen FQ, Foolad MR. Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 821-31
- [37] Timotijević GS, Milisavljević MD, Radović SR, et al. Seed-specific aspartic proteinase FeAP12 from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Arch Biol Sci*, 2010, 62: 143-51
- [38] Van Hautegeem T, Waters AJ, Goodrich J, et al. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 102-13
- [39] Niu NN, Liang WQ, Yang XJ, et al. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nat Commun*, 2013, 4: 1445
- [40] Lee RH, Wang CH, Huang LT, et al. Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *J Exp Bot*, 2001, 52: 1117-21
- [41] Cruz de Carvalho MH, d'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, et al. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Lett*, 2001, 492: 242-6
- [42] Timotijević GS, Milisavljević MD, Radović SR, et al. Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. *J Plant Physiol*, 2010, 167: 61-8
- [43] Raimbault AK, Zuily-Fodil Y, Soler A, et al. A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus*): cloning, characterization and relation to postharvest chilling stress resistance. *J Plant Physiol*, 2013, 170: 1536-40
- [44] Bright J, Desikan R, Hancock JT, et al. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J*, 2006, 45: 113-22

- [45] Murata Y, Pei ZM, Mori IC, et al. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, 2001, 13: 2513-23
- [46] Rodrigo I, Vera P, Conejero V. Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl proteinase. *Eur J Biochem*, 1989, 184: 663-9
- [47] Rodrigo I, Vera P, Van Loon LC, et al. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins: evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Physiol*, 1991, 95: 616-22
- [48] Guevara MG, Oliva CR, Huarte M, et al. An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers. *Eur J Plant Pathol*, 2002, 108: 131-7
- [49] Alam MM, Nakamura H, Ichikawa H, et al. Response of an aspartic protease gene *OsAP77* to fungal, bacterial and viral infections in rice. *Rice*, 2014, 7: 9
- [50] Guo RR, Xu XZ, Carole B, et al. Genome-wide identification, evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape. *BMC Genomics*, 2013, 14: 554
- [51] Usacheva MA, Nasedkina TV, Ikonnikova AY, et al. Association study of renin-angiotensin system genes and hemostasis system genes with ischemic stroke among Russians of Central Russia. *Mol Biol: Mosk*, 2012, 46: 214-23
- [52] Grimm MO, Hundsdörfer B, Grösgen S, et al. PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34: 92-110
- [53] Cadicamo CD, Mortier J, Wolber G, et al. Design, synthesis, inhibition studies, and molecular modeling of pepstatin analogues addressing different secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85: 881-7
- [54] Ran Y, Iwabuchi K, Yamazaki M, et al. Secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* acts as a chemoattractant for peripheral neutrophils. *J Dermatol Sci*, 2013, 72: 191-3
- [55] Bocheńska O, Rapała-Kozik M, Wolak N, et al. Secreted aspartic peptidases of *Candida albicans* liberate bactericidal hemocidins from human hemoglobin. *Peptides*, 2013, 48: 49-58
- [56] Jebali A, Hajjar FH, Hekmatimoghaddam S, et al. Triangular gold nanoparticles conjugated with peptide ligands: a new class of inhibitor for *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90: 349-55
- [57] Hsiao NW, Chen Y, Kuan YC, et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electron J Biotechnol*, 2014, 17: 89-94
- [58] Yegin S, Fernandez-Lahore M, Jose Gama Salgado A, et al. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89: 949-60
- [59] Yegin S, Dekker P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci Technol*, 2013, 93: 565-94
- [60] Llorente BE, Obregón WD, Avilés FX, et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. *Food Chem*, 2014, 159: 55-63
- [61] Yin LJ, Hsu TH, Jiang ST. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 662-6
- [62] Tsiatsiani L, Gevaert K, Van Breusegem F. Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? *Physiol Plant*, 2012, 145: 28-40