

顶复门原虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶功能及其应用研究进展

廖申权, 戚南山, 吴彩艳, 吕敏娜, 袁建丰, 余劲术, 孙铭飞

(广东省农业科学院兽医研究所 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东广州 510640)

摘要:糖酵解途径广泛存在于各类生物中,是顶复门原虫的主要供能方式。3-磷酸甘油醛脱氢酶是糖酵解途径的重要酶,与顶复门原虫的生存密切相关,可以作为抗寄生虫药物研发的重要靶标。文章主要从顶复门原虫糖酵解途径、3-磷酸甘油醛脱氢酶的基因分析、作用机理及应用等方面进行综述。

关键词:顶复门原虫;3-磷酸甘油醛脱氢酶;药物靶标

中图分类号:Q554

文献标识码:B

文章编号:1671-7236(2012)01-0071-04

顶复门原虫包括多种能引起严重的人和动物疾病的寄生性原虫,其中艾美耳球虫(*Eimeria* spp.)、隐孢子虫(*Cryptosporidium* spp.)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、犬新孢子虫(*Neospora caninum*)、泰勒虫(*Theileria* spp.)及疟原虫(*Plasmodium* spp.)等危害较严重。对于高等生物来说,糖酵解过程被认为是生物最古老、最原始获取能量的一种方式。但现有研究资料证实,这一代谢方式是顶复门原虫获取能量的最主要途径(Denton 等, 1996; Senkovich 等, 2005; Fleige 等, 2007; Polonais 等, 2010)。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)在糖酵解途径中,催化 3-磷酸甘油醛氧化脱氢并磷酸化生成含有 1 个高能磷酸键的 1,3-二磷酸甘油酸,在这一代谢过程中起着极其重要的作用。顶复门原虫 GAPDH 的结构生物学特征与高等生物具有明显差异,提示 GAPDH 可作为研发新型抗顶复门原虫药物的理想靶标(Bakker 等, 2000; Patel 等, 2008; Cáceres 等, 2010)。目前,已经发现一系列以该酶为靶标并具有明显抑制作用的先导化合物,具有开发成为临床应用药物的前景。

1 顶复门原虫糖酵解途径

机体生存所需能量的主要提供方式是 ATP。ATP 主要通过两条途径形成,三羧酸循环与糖酵解途径。随着顶复门原虫(如疟原虫、弓形虫、隐孢子虫等)全基因组测序工作的完成及其生化代谢分析显示,糖酵解途径是顶复门原虫能量代谢的主要方式。三羧酸循环虽然能高效率产生 ATP,但整个代谢过程需要大量氧参与,而顶复门原虫在其发育过程中,大多数内生发育阶段所生存的环境是低氧或无氧,以至于顶复门原虫在有氧条件下仍主要通过糖酵解途径提供能量。

1977 年,Oppendoes 等在布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)中发现了一类特殊的细胞器——糖酵解酶体(glycosome),含糖酵解途径的大多数酶。研究发现,糖酵解途径为疟原虫的红内期提供能量,对疟原虫的体外培养发现 ATP 主要由糖酵解途径产生。Denton 等(1996)研究发现弓形虫缓殖子脱囊会损伤线粒体的功能,揭示这一时期依赖无氧条件的糖酵解提供能量,而速殖子可以通过三羧酸循环(TCA)及糖酵解的途径同时产生 ATP。随着隐孢子虫全基因组测序工作的完成,对其基因组数据和生化分析结果显示,隐孢子虫不存在线粒体基因组,缺乏三羧酸循环途径,不能通过糖的有氧氧化产生 ATP(Rider 等, 2010)。

到目前为止,锥虫的糖酵解途径研究最为深入,对 *T. brucei* 的能量代谢研究结果显示,血液期 *T. brucei* 唯一的供能方式是糖酵解途径,此代谢过程中 GAPDH 催化反应生成的 NADH 的电子转移由线粒体提供氧化酶实现,从糖酵解酶体(glycosome)到线粒体的电子转移通过甘油三磷酸/二氢

收稿日期:2011-05-31

作者简介:廖申权(1981-),女,重庆人,博士,主要从事鸡球虫生化代谢研究。

通信作者:孙铭飞。Tel:020-85291691;E-mail:smfei7810@yahoo.com.cn

基金项目:广东省国际科技合作专项(2008A050200015);广东省自然科学基金项目(1045106001006126);广东省农业科学院院长基金项目(201014, 201115);广东省农业科学院兽医研究所所长基金项目。

丙酮磷酸穿梭进行,当线粒体氧化酶抑制物与 *T. brucei* 同时培养,可以抑制 *T. brucei* 生存(Lambeir 等,1991;Wiemer 等,1995;Aronov 等,1999)。由于锥虫依赖糖酵解途径提供能量,糖酵解途径的重要酶也成为很有前景的药物靶标。同时,顶复门原虫在不同生长阶段供能方式的差异正是对环境有氧或无氧条件的适应。

2 顶复门原虫 GAPDH 研究

2.1 GAPDH 基因分析

GAPDH 被认为是一个看家基因,广泛存在于生物体内,具有高度种属保守序列。研究显示,高等植物、绿藻和红藻核基因组中存在 2 个 GAPDH 基因,一个是依赖 NAD^+ ,真核起源并定位于胞质的 GAPDH 基因,一个是依赖 NAD^+ 或 NADP^+ ,蓝细菌(cyanobacteria)起源并定位于顶质体的 GAPDH 基因。然而,顶复门原虫和甲藻(dinoflagellate)的胞质定位及顶质体定位 GAPDH 基因均为真核起源,来源于基因重复,其中一份拷贝在获得定位序列后靶向顶质体(Fast 等,2001;Sato,2011)。高等动物 GAPDH 的天然分子质量为 140~150 ku,由 4 个 35~37 ku 亚基组成。具有催化活性的墨西哥利什曼原虫(*Leishmania mexicana*)GAPDH 是由 4 个亚单位组成分子质量为 156 ku 的多聚体(Kim 等,1998)。据 NCBI 序列信息显示,恶性疟原虫(*P. falciparum*)、鼠隐孢子虫(*Cryptosporidium muris*)及柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)的 GAPDH 单体分子质量约 36 ku,而 *T. brucei* 的 GAPDH 单体分子质量为 39 ku。

T. gondii 存在 1 条完整的糖酵解途径,具备从磷酸果糖激酶(phosphofructokinase)到丙酮酸激酶(pyruvate kinase)整个代谢途径所需的酶,可以将葡萄糖降解为丙酮酸。Fleige 等(2007)报道了 *T. gondii* 的 GAPDH 亚型(GAPDH I、GAPDH II);GAPDH I 位于胞质中,编码序列全长为 1023 bp;GAPDH II 由核基因组编码,编码序列全长为 2988 bp,靶向到顶质体,顶质体是该类生物所特有的一种亚细胞器(Wiesner 等,2008)。顶质体相关蛋白由核基因组编码,其 N 端存在信号肽和转运肽,在细胞质中合成之后通过某种途径靶向顶质体。此外,*T. gondii* 的磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase II, TPI II)、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase II, PGK II)及丙酮酸激酶(pyruvate kinase II, PK II)经试验证实均靶向顶质体。由于顶质体中缺乏烯醇化酶(enolase, ENO)活性,使得顶质体不能完成糖酵解途径,GAPDH II

的功能仍有待于进一步研究。

2.2 GAPDH 的结构与作用机理

GAPDH 在糖酵解过程中起重要作用,催化 3-磷酸甘油醛的氧化和磷酸化,形成 1,3-二磷酸甘油酸——具有高能磷酸基团转移势能的化合物。GAPDH 具有 2 个重要功能区域: NAD^+ 结合位点和 3-磷酸甘油醛结合位点。活性 GAPDH 分子能结合 4 个 NAD^+ 分子,分别对应着每个亚单位的活性位点。该酶的活性部位含有一个带游离巯基(-SH)的半胱氨酸。巯基是亲核体,它以解离形式向作为底物的醛分子中带正电荷的羰基碳原子进攻,从而形成一个与酶分子结合着的半缩硫醛(hemithioacetal),此时醛分子上与原来羰基相连的氢原子就以氢负离子(H^-)的形式离开羰基碳原子,也就是离开半缩硫醛,于是形成了还原的 NADH 和硫酯,同时释放出一个 H^+ 。NADH 一旦形成就立即从酶分子上解离下来,而氧化型的 NAD^+ 又立即结合到酶分子上。随后磷酸分子又向硫酯进行亲核攻击,形成 1,3-二磷酸甘油酸和游离的酶。研究结果发现,GAPDH 的酶活性需要 NAD^+ 和无机磷酸(Pi)的参加。GAPDH 催化的化学反应见图 1。

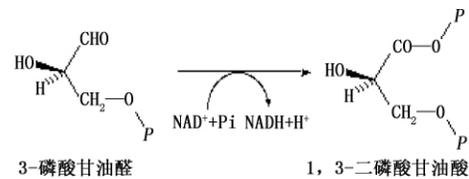


图 1 GAPDH 催化的化学反应

3 GAPDH 作为抗寄生虫药靶的研究

研究结果显示,寄生性原虫参与糖酵解代谢途径酶基因序列与其宿主有明显差异,而与植物等一些低等生物更为接近。对顶复门原虫 GAPDH 及其宿主 GAPDH 高级结构的解析揭示了两者在 NAD^+ 结合位点存在明显差异,为抑制物的合理设计提供了理论依据(Suresh 等,2001),进一步证实该代谢途径的重要酶可以作为开发新型抗寄生虫药物的靶标。

对多种寄生虫 GAPDH 的结构与功能分析显示,GAPDH 是抑制糖酵解过程的潜在靶标,阻断 GAPDH 的功能可以干扰虫体赖以生存的碳水化合物和能量代谢,从而抑制寄生虫的生长,目前已成为研发抗寄生虫药物的重要靶标。疟原虫 GAPDH 的酶活性由硫氧还蛋白系统调控,在 GAPDH 反应体系中加入硫氧还蛋白能显著提高其酶活性(Kawazu 等,2010)。迄今为止,以锥虫 GAPDH 为

潜在抗寄生虫药靶的研究最为深入,应用等温滴定微量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)研究了锥虫 GAPDH 的酶动力学及生物学特性(Wiggersa 等, 2007; Cheleski 等, 2011),同时开展了大量基于 GAPDH 结构的抑制物设计工作,并筛选有效的抑制物。试验证实银锻苷(Tiliroside)、Guajaverin、槲皮素(Quercetin)、芒果苷(Mangiferin)、如酸(8E, 11E, 14E-anacardic acid)等能体外抑制 *T. cruzi* GAPDH 的酶活性,其中经结构修饰的如酸能达到最好的抑制效果,同时还发现了不同抑制剂作用的靶位点(Mamani-Matsuda 等, 2004; Pereira 等, 2008; Freitas 等, 2009)。

1995 年解析了 *T. brucei* 及 *L. mexicana* GAPDH 的晶体结构(Vellieux 等, 1995; Kim 等, 1995),随后,解析了克氏锥虫(*T. cruzi*)GAPDH 的晶体结构(Souza 等, 1998)。Rottenberg 等(2005)基于 *T. brucei* 及 *L. mexicana* 的 GAPDH 晶体结构改造的 N⁶-(1-萘甲)-2'-(3-氯苯甲酰胺基)腺苷不仅能体外抑制 *T. brucei* 的 GAPDH 酶活性,同时还可抑制 *T. brucei* 的生长,该抑制物处理 *T. brucei* 数分钟后,则不能检测到糖酵解代谢产物丙酮的存在,虫体的运动性也消失,同时能观察到变形及溶解的虫体,揭示 GAPDH 是研发抗锥虫药物的重要靶标。Senkovich 等(2005)解析了小球隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)GAPDH 的晶体结构,这些试验结果为其他寄生虫 GAPDH 抑制剂的设计及筛选提供了理论资源,同时也提示 GAPDH 可以作为研制抗寄生虫药物的靶标。

4 小结

目前,由于 GAPDH 在顶复门原虫能量代谢过程中的重要作用,GAPDH 已受到越来越多的关注。有关顶复门原虫 GAPDH 的研究主要集中在对锥虫的研究,而对其他一些严重危害畜禽养殖业发展的顶复门寄生虫(如艾美耳球虫等)的研究仍较少。目前广东省农业科学院兽医研究所广东省兽医公共卫生公共实验室在前期研究中已成功克隆获得 *E. tenella* 的 GAPDH 基因 cDNA 全长序列,正在进行其功能的研究工作。随着抗寄生虫药物的广泛使用,耐药性问题也日益显现,研发新的抗寄生虫药物已成为生产实践的迫切需求。基于 GAPDH 已有的研究基础,以 GAPDH 为靶标为新型抗寄生虫药物的研发提供新的前景。

参 考 文 献

- 1 Aronov A M, Suresh S, Buckner F S, et al. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(8): 4273~4278.
- 2 Bakker B M, Westerhoff H V, Opperdoes F R, et al. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs[J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 106(1): 1~10.
- 3 Cáceres A J, Michels P A, Hannaert V. Genetic validation of aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as drug targets in *Trypanosoma brucei*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2010, 169(1): 50~54.
- 4 Cheleski J, Freitas R F, Wiggers H J, et al. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*[J]. Protein Expr Purif, 2011, 76(2): 190~196.
- 5 Denton H, Roberts C W, Alexander J, et al. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1996, 137(1): 103~108.
- 6 Fast N M, Kissinger J C, Roos D S, et al. Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids[J]. Mol Biol Evol, 2001, 18(3): 418~426.
- 7 Fleige T, Fischer K, Ferguson D J, et al. Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator[J]. Eukaryot Cell, 2007, 6(6): 984~996.
- 8 Freitas R F, Prokopczyk I M, Zottis A, et al. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(6): 2476~2482.
- 9 Kawazu S, Takemae H, Komaki-Yasuda K, et al. Target proteins of the cytosolic thioredoxin in *Plasmodium falciparum*[J]. Parasitol Int, 2010, 59(2): 298~302.
- 10 Kim H, Feil I K, Verlinde C L, et al. Crystal structure of glycosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site[J]. Biochemistry, 1995, 34(46): 14975~14986.
- 11 Kim H, Hol W G. Crystal structure of *Leishmania mexicana* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a new crystal form confirms the putative physiological active site structure[J]. J Mol Biol, 1998, 278(1): 5~11.
- 12 Lambear A M, Loiseau A M, Kuntz D A, et al. The cytosolic and glycosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* kinetic properties and comparison with homologous enzymes[J]. Eur J Biochem, 1991, 198(2): 429~435.
- 13 Mamani-Matsuda M, Rambert J, Malvy D, et al. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei* gambiense and decreases the proinflammatory response of human macrophages[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(3): 924~929.
- 14 Opperdoes F R, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glyco-

1 Aronov A M, Suresh S, Buckner F S, et al. Structure-based design

- some[J]. FEBS Lett, 1977, 80(2): 360~364.
- 15 Patel A P, Staines H M, Krishna S. New antimalarial targets; the example of glucose transport[J]. Travel Med Infect Dis, 2008, 6(1~2): 58~66.
 - 16 Pereira J M, Severino R P, Vieira P C, et al. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16(19): 8889~8895.
 - 17 Polonais V, Soldati-Favre D. Versatility in the acquisition of energy and carbon sources by the Apicomplexa[J]. Biol Cell, 2010, 102(8): 435~445.
 - 18 Rider S D Jr, Zhu G. *Cryptosporidium*: genomic and biochemical features[J]. Exp Parasitol, 2010, 124(1): 2~9.
 - 19 Rottenberg M E, Masocha W, Ferella M, et al. Treatment of African trypanosomiasis with cordycepin and adenosine deaminase inhibitors in a mouse model[J]. J Infect Dis, 2005, 192(9): 1658~1665.
 - 20 Sato S. The apicomplexan plastid and its evolution[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(8): 1285~1296.
 - 21 Senkovich O, Speed H, Grigorian A, et al. Crystallization of three key glycolytic enzymes of the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum* [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1750(2): 166~172.
 - 22 Souza D H, Garratt R C, Araújo A P, et al. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design[J]. FEBS Lett, 1998, 424(3): 131~135.
 - 23 Suresh S, Bressi J C, Kennedy K J, et al. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors[J]. J Mol Biol, 2001, 309(2): 423~435.
 - 24 Vellieux F M, Hajdu J, Hol W G. Refined 3.2 Å structure of glycosomal holo glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995, 51: 575~589.
 - 25 Wiemer E A, Hannaert V, Van den Ijssel P R, et al. Molecular analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanoplasma borelli*: an evolutionary scenario of subcellular compartmentation in kinetoplastida[J]. J Mol Evol, 1995, 40(4): 443~454.
 - 26 Wiesner J, Reichenberg A, Heinrich S, et al. The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(9): 855~871.
 - 27 Wiggersa H J, Chelieskia J, Zottisb A, et al. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays[J]. Anal Biochem, 2007, 370(1): 107~114.

Research Advances on the Function and Application of Glyceraldehydes-3-phosphate Dehydrogenase in Apicomplexa

LIAO Shen-quan, QI Nan-shan, WU Cai-yan, LV Min-na, YUAN Jian-feng, YU Jin-shu, SUN Ming-fei
(Guangdong Common Lab of Veterinary Public Health, Institute of Veterinary Medicine,
Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Glycolysis exists in various organisms. It is the major energetic process in apicomplexan parasites. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) plays an important role in glycolysis, which closely related to the survival of parasites. GAPDH is proposed to be a potential target for antiparasitic drugs. This review will focus on glycolysis and the genetic analysis, mechanism and application of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in Apicomplexa.

Key words: Apicomplexa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); drug target

2 株重组犬冠状病毒株的分离、组织分布与分子特征分析

V. Ntafis 等著 王聪慧摘译 刘丹校

摘要: 犬冠状病毒(CCoV)是一种有包膜的 RNA 病毒,引起犬胃肠道的感染。迄今,CCoV 已鉴定出两种不同的基因型,CCoV I 型和 CCoV II 型。近年来,已检测到与传染性胃肠炎病毒有潜在重组起源的 CCoV II 型毒株(CCoV-II b),并鉴定为新亚型,以区别于“经典”CCoV II 型株(CCoV-II a)。本研究在两只出现胃肠道症状后死亡的幼犬体内检测出两株 CCoV-II b 型病毒。在粪便中检测到两种亚型(CCoV-II a/II b)的混合感染,但在脏器中只检测出了 CCoV-II b。同时,检测到幼犬被犬细小病毒 2 型(CPV2)感

染。两株 CCoV-II b 毒株均在细胞培养物中分离出,并进行了序列分析和系统发育分析,通过 RT-PCR 和实时定量 PCR 的方法,进行了组织分布和病毒载量分析。本研究首次描述了 CCoV-II b 毒株在脏器中的组织分布并进行了定量。CCoV-II a 毒株仅在粪便中检测到,提示了在 CPV2 共感染的犬类动物中,CCoV-II b 毒株与常见的肠道 CCoV-II a 型毒株相比,可能在散播上更具优势。

关键词: CCoV; 重组; TGEV 样; 犬; 分布; 器官

(原载: Veterinary Microbiology, 2011, 151: 238~244)