

植物蔗糖代谢参与酶的表达及调控

杨国志, 张明方

(浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 园艺植物遗传资源与功能改良实验室;
园艺植物生长发育与生物技术农业部重点实验室 杭州 310029)

摘要: 在高等植物中, 蔗糖具有至关重要的作用, 蔗糖是光合作用的主要产物, 是糖运输的主要形式, 在植物生长、发育、营养物质的贮存、信号传导以及逆境条件下有重要的作用。植物中的蔗糖代谢受多种酶的调节, 现对蔗糖代谢关键酶的表达及调控进行综述, 并对存在的问题和今后研究的方向进行探讨。

关键词: 转化酶; 蔗糖合成酶; 蔗糖磷酸合成酶

中图分类号: Q946.3; Q533⁺.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)05-0045-03

蔗糖是植物光合作用的主要产物, 蔗糖从叶片通过韧皮部向库器官输送碳源和能量, 供应植物的生长和淀粉、脂肪等贮藏物质的合成。蔗糖参与植物对逆境胁迫的反应, 是细胞代谢的调控因子。蔗糖具有信号功能, 可调节转运蛋白、贮藏蛋白和编码酶的基因的表达^[1,2]。蔗糖也可以影响与细胞分裂和分化相关的基因的表达, 参与调控植物花的诱导、维管组织的分化、种子发育以及贮藏物质的积累等生长发育过程^[3-5]。所以, 蔗糖不仅是植物生长发育的能源, 而且对植物的命运具有决定性作用。在高等植物中, 与蔗糖代谢密切相关的酶主要有转化酶、蔗糖合成酶和蔗糖磷酸合成酶。

1 转化酶

转化酶(invertase; EC 3.2.1.26)催化以下反应: $\text{Sucrose} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glucose} + \text{Fructose}$ 。转化酶的同工酶有不同的生化特性, 依其定位不同可分为: 1、细胞壁转化酶(CWI), 其响应机械损伤, 病菌侵染; 调节蔗糖在源、库间的分配, 控制细胞分化和植物发育。2、液泡转化酶(VI), 其主要响应低温, 可调控贮藏器官中糖的组分, 促进细胞膨大和渗透调节。3、细胞质转化酶(CI), 其功能未知, 可能是蔗糖分解代谢的通道。通常将CWI和VI称为酸性转化酶(AI), 把CI称为中性或碱性转化酶(NI)。

转化酶基因的表达随植物生长发育时期的不同而改变, 存在时间和空间的差异。以拟南芥为例, 其细胞壁和液泡中的转化酶至少由4个基因编码, 分别为At β fruct1、At β fruct2、At β fruct3和At β fruct4。在子叶中没有检测到细胞壁转化酶基因At β fruct1的转录, 而在成熟的叶片中其却高水平表达; 细胞壁转化酶基因At β fruct2在花中特异性表达, 而At β fruct1在花中却不表达。液泡中的转化酶基因At β fruct3在子叶中高效表达, 而在叶、根、花芽中只有低水平的表达; At β

fruct4仅在幼小植物的叶片中表达, 在成熟开花植物的叶片中不表达。在番茄中, 编码液泡转化酶的基因只有TIVI一个TIVI的mRNA在成熟、完熟的果实中高度表达, 然而在其它组织中则很少; 编码细胞壁转化酶的基因有4个分别为Lin5、Lin6、Lin7和Lin8。Lin6在旺盛生长的库组织中特异表达, 如幼根、花芽和块茎, Lin7的mRNA只在大的花芽、花中表达, Lin8在任何组织中均未检测到, 为沉默基因。利用毒麦草(*Lolium temulentum*)中一异源序列, Bosch等^[6]从甘蔗中分离出一编码NI的cDNA, 其含有一个1716bp的开放阅读框, 编码572个氨基酸残基, 该多肽的分子量为64.3 kDa, 等电点为8.57, 其氨基酸序列与*Daucus carota*和*L. temulentum*的NI序列分别有54%和53%的同源性。Southern印迹分析表明甘蔗中NI的基因型比较简单, 在基因水平上, 可能仅有几个甚至只有一个同工酶。在甘蔗的生长发育至成熟过程中, NI转录一直低水平持续表达, 在其叶、茎和根组织中都可以检测到NI转录, 在幼小的生长组织中有较高的转录表达, 而在贮藏器官中NI转录水平则较低。

内源蛋白抑制因子、终产物和底物、激素、逆境、抑制剂等, 各种因素既可在蛋白质水平也可在基因水平通过激活或抑制来调节植物转化酶的表达。Thomas和Steffen^[7]从烟草中克隆出NtCIF和NtVIF(细胞壁/液泡 β -果糖激酶的抑制子)的cDNA, 其中NtCIF蛋白的活性范围较广, 可抑制不同植物中的CWI和VI; 而NtVIF只特异性的抑制VI。CWI的抑制和pH值有关, 在pH4.5附近效果最好。在离体条件下, Mg、Zn、EDTA、Cd等二价离子与NtCIF结合可以促进CWI的抑制。编码VI抑制子的NtVIF cDNA在转基因马铃薯中的表达表明: 在转基因的块茎中, 低温诱导的己糖积累减少75%。Simon等^[8]从Broccoli(*Brassica oleracea* var *italica*)中分离出两个AI cDNA(BoINV1和BoINV2), 它们在核苷酸和氨基酸水平上分别有85%和90%的一致性。它们的cDNA编码73kDa的多肽, 与拟南芥中的可溶性转化酶At β fruct4有高度的同源性(87%)。RNA印迹分析表明: 在Broccoli小花衰老的过程中, BoINV1和BoINV2约有2.3kb的转录积累。与对照相比, 水和蔗糖可以抑制转录的积累, 而低浓度的O₂或高浓度的CO₂则显著地降低了BoINV1和BoINV2的转录积累。在玉米细胞悬浮培养中, INCW1基因编码的一个细胞



第一作者简介: 杨国志, 1979年生, 2003年毕业于河南农业大学林学院园艺系, 同年考入浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 攻读蔬菜学硕士学位, 师从张明方教授, 主要从事西瓜抗冷突变体的选育和甜瓜蔗糖代谢酶表达和调控机理的研究。

收稿日期: 2006-03-16

壁转化酶被糖在转录水平和转录后水平调节。INCW1 基因编码两个转录子: INCW1-S(较小)和 INCW1-L(较大), 其大小差异主要在于 3' 非翻译区长度的不同。惟有代谢性糖(例如: 蔗糖和 D-葡萄糖)与 INCW1-S RNA 增加的稳态丰度有关, 相应地增加 INCW1 蛋白和酶活性以及蔗糖合成酶基因 Sh1 下游代谢阻遏; 非代谢性糖(例如: 两个葡萄糖类似物 3-O-甲基葡萄糖和 2-脱氧葡萄糖)诱导 INCW1-L RNA 有较高的稳态水平, 但没有导致 INCW1 蛋白或酶活性升高和蔗糖合成酶基因 Sh1 阻遏。Luc 等研究发现: 葡萄浆果中的转化酶在浆果开始成熟时迅速增加; 在 GA3 处理的葡萄浆果中转化酶活性比对照约高 2 倍。用 p-CPA 和 CPPU 处理不同生长期的甜瓜, 发现在花后 5 d 和 20 d 中的果皮中, AI 和 NI 活性增强, 而在花后 45 d AI 和 NI 的活性则不受影响^[9]。Liu 等^[10]研究表明: 在干旱胁迫条件下, 大豆叶片中蔗糖含量显著降低, 而花和豆荚中蔗糖浓度则较高, 蔗糖在生殖器官中的积累可能是因为 AI 活性降低——有证据表明干旱可以使生殖器官中的 AI 活性受到抑制——不能将输入的蔗糖分解成己糖。干旱还可以在转录水平上上游调节玉米叶片中的 AI 活性。盐胁迫实验中, 在花后 10~40 d 的对照中(0 mM), AI 是主要的蔗糖分解酶, 其活性和库强度成正比。在中等盐浓度(70 mM)和高等盐浓度(140 mM)下, NI 和 SS 在花后 30~40 d 活性较强, 并伴随很高的淀粉累积和蔗糖含量减少, 其活性的增强和胁迫程度相关。

2 蔗糖合成酶

蔗糖合成酶(SS; EC. 2.4.1.13)催化如下反应: $\text{UDPG} + \text{Fructose} \rightleftharpoons \text{Sucrose} + \text{UDP}$, 虽然该反应可逆, 但通常认为 SS 主要起分解蔗糖的作用。SS 是由分子量约为 83~100 kDa 的亚基构成的四聚体, 多数植物有两种或多种 SS 同工酶, 在同一种植物内, 这些同工酶有不同的表达和调节方式, 行使着不同的代谢功能。SS 同工酶已在黄瓜、日本梨、玉米、豌豆、水稻、甘蔗和小麦中被分离和纯化。SS 在蔗糖输入器官中的活性最高, 如根、块茎、果实、种子和未发育完全的叶片。在大多数植物的库器官中, SS 活性和库强度与蔗糖输入呈正相关, 表明 SS 对源、库器官碳水化合物分配有调控作用。SS 活性在非光合器官中占优势, 在非光合器官中, 蔗糖作为碳源的主要形式, 从韧皮部卸载, 但在叶组织中, 特别是幼叶中也可以检测到。

SS 由多个基因编码, 不同形式的 SS 行使不同的代谢功能。拟南芥中编码 SS 的是一个多基因家族, 分别为 AtSuS1、AtSuS2、AtSuS3、AtSuS4、AtSuS5 和 AtSuS6。这一基因家族中各个基因应对各种反应时的表达不同。在厌氧条件下 AtSuS1 和 AtSuS4 表达增加; AtSuS2 仅在开花后 12 d 特异性的表达; AtSuS3 在叶片失水、渗透胁迫以及后熟的种子等各种脱水条件下各个器官都有表达; 而 AtSuS5 和 AtSuS6 在所有组织中的表达是组成性的, 不受胁迫条件的影响。Fu 和 Mark 在马铃薯中发现了 2 个表达不同的 SS 基因, 一个在根和茎中表达水平很高, 在叶片中正常表达; 另一个在块茎中高度表达。说明前者可能负责糖的装载、运输和卸载, 而后者可能负责在块茎中为淀粉合成提供底物。Klotz 等从甜菜正在发育的根中分离和纯化出 2 个 SS 同工酶, 分别命名为 SuSy1 和 SuSy11, SuSy1 是一个由 2 个 84 kDa 亚基和 2 个 86 kDa 亚

基组成的异型四聚体, SuSy11 是由 86 kDa 亚基组成的同型四聚体。在根生长发育的大部分时间里, SuSy1 都可以检测到, 而 SuSy11 只有在根的成熟期才能检测到。不同的 pH 条件下 SuSy1 和 SuSy11 的活性不同, pH6.0 和 pH6.5 分别是 SuSy1 和 SuSy11 分解蔗糖的最适 pH 值; pH7.5 和 pH7.0 则分别是 SuSy1 和 SuSy11 合成蔗糖的最适 pH 值。SuSy1 和 SuSy11 分解活性的最适温度分别是 50℃ 和 40~45℃, 合成活性的最适温度分别是 45℃ 和 50℃。

逆境条件可以刺激叶片和其他器官中 SuSy 的活性和相应基因的表达。Iwona 等研究表明: 拟南芥(含有 6 个 SuSy 基因)在低温和干旱胁迫下, SuS1 的转录水平增加, 而 SuS2 mRNA 则在缺氧条件下被特异诱导。低温和干旱使叶片中可溶性糖含量增加, 叶的渗透势降低, 改变渗透势是 SuS1 的最重要的调控方式。SuS1 是拟南芥中一个重要的 SuSy 基因, 其被蔗糖、葡萄糖和 D-甘露糖所正调节。用 N-乙酰葡萄糖胺(HXK 酶活性的抑制子)培养拟南芥叶片, 降低了 SuS1 上游调节的蔗糖和葡萄糖依赖途径, 而甘露糖的依赖途径则没有明显变化。HXK1 过量表达的转基因(OE)植株和反义(AS)HXK1 植株, 在蔗糖和葡萄糖溶液中培养后, OE 植株中 SuS1 的上游调节水平最高, 而 SuS1 在 AS 植株中的表达降低。因为拟南芥叶片有很强的分解蔗糖合成葡萄糖和果糖的能力, 所以, 可能是葡萄糖作为信号, 通过 HXK 上游调节 SuS1 的表达, 这说明葡萄糖和甘露糖通过 HXK 依赖途径上游调节 SuS1。Nelson 等用从大豆中获得的一个蔗糖结合蛋白同源染色体(命名为 S-64)来改变转基因烟草细胞系内 SBP(蔗糖结合蛋白)水平, 在烟草感受态细胞系中, 随着 S-64 量的增加, SS 的分解活性增强; 同时, 细胞壁转化酶活性降低, 而在反义细胞中, 细胞壁转化酶活性却显著增强。在低浓度 Pi 培养基上培养 16 d 的菜豆根部, SS 活性增加了两倍多, NI 活性增加了 30% 多。在 Pi 缺乏的情况下, 在菜豆根部的分生组织和伸长区中, SS 对蔗糖的降解具有重要作用。用 p-CPA 和 CPPU 处理不同生长期的甜瓜, p-CPA 对开花后 5 d 中果皮中的 SS 活性无影响, 而在开花后 20 d 和 45 d, SS 活性则显著增强; CPPU 在整个生长期中对 SS 活性无影响^[9]。

3 蔗糖磷酸合成酶

蔗糖磷酸合成酶(SPS; EC. 2.4.1.14)催化以下反应: $\text{UDPG} + \text{fructose-6-phosphate} \rightarrow \text{sucrose-6-phosphate} + \text{UDP}$ 。在不同的组织、细胞和器官中 SPS 蛋白浓度和形式不同。

SPS 基因序列可分为 A、B、C 三个基因家族, 每个基因家族都含有单子叶和双子叶植物。所有高等植物的基因组在每一个 SPS 家族中至少有一个代表性的 SPS 基因, 它们之间的转录差异可能是由于染色体数多倍化造成的。这三个基因家族的表达在时间和空间上也不同。Fung 等研究了编码 SPS 的亚家族基因的表达特性, 他们从二倍体 *A. chinensis* 克隆出 4 个基因的 cDNA 片段, 其中 3 个基因高度相似(在阅读框的重叠区域有 94%~96% 的核苷酸一致性)属于基因家族 A(分别命名为 AcSPS1-3 即 A1, A2, A3)。第 4 个基因(67% 的核苷酸一致性)属于基因家族 B。用 RT-PCR 比较这 4 个基因的转录丰度, 3 个 A 基因在各种组织(小叶、全叶、老

叶、茎、根、根尖、花、花芽、花瓣)均表达,但只有 A1 丰度较高且对发育和环境信号的刺激有反应。用外源乙烯处理或在果实成熟期, A1 转录增加,但 A1 的转录水平不受低温的影响; A1 在衰老的叶、茎和花芽中表达水平也较高。在根中可以检测到 B 基因家族的转录,但转录水平很低,在低温条件下和果实成熟期,它的转录水平增加,但外源乙烯处理对其无影响。用原位 RT-PCR 和启动子分析水稻 SPS 中的 B 基因家族表明:该基因家族在叶片中的叶肉细胞、萌发种子的小盾片和未成熟花序的花粉中特异表达,其在叶片中的表达受光调控,在非光合组织中则不受光调控。Komatsu 等从柑橘中克隆出 3 个 SPS cDNA 同工酶(CitSPP1, CitSPP2 和 CitSPP3),结果表明:在柑橘果实可食组织的成熟期, CitSPP1 和 CitSPP2 转录的积累和 SPS 活性增加相一致,说明这两个基因对柑橘果实蔗糖的成分和累积起决定性作用。在可食组织和果皮组织中,都可以检测到 CitSPP1 和 CitSPP2 的转录,但 CitSPP2 只有在果实成熟期才可以检测到,其可能在成熟期才特异的表达;同样的, CitSPP3 在可食组织中不表达,似乎在果皮组织中才特异表达。所以,柑橘果实中 3 个 SPS 同工酶的表达调控各不相同,取决于不同的发育时期和组织,这说明 SPS 基因的调控是独立的,其表达方式存在明显的时间和空间上的差异。

SPS 的表达被光照、低温、干旱、CO₂ 浓度等环境信号调节, SPS 酶活性还受 Glc-6-P 和 Pi 的变构效应调控,低浓度的 Pi 和高水平的 Glc-6-P 可提高 SPS 活性。许多植物叶片中的 SPS 活性在光照下增强,在黑暗条件下减弱。在菠菜和玉米中,这种光暗调节分别是由可逆蛋白磷酸化位点 Ser-158 和 Ser-162 完成的。在光暗调节下, Ser158 的磷酸化使 SPS 酶失活;菠菜中第二个调节磷酸化位点是 Ser-424,它参与了该酶的渗透胁迫诱导活化。在渗透胁迫下, Ser424 磷酸化激活 SPS 酶的活性。Ser229 磷酸化与 14-3-3S 共同作用使 SPS 酶失活。在高等植物中,通过蛋白磷酸化作用调节 SPS 酶的活性是普遍存在的。在 SPS 磷酸化过程中,至少有两种类型的蛋白激酶参与:一是与 SNF1 相关的蛋白激酶(SnRK1),其与酵母中蔗糖的非酵解(SNF1)蛋白激酶相关;二是钙依赖性的蛋白激酶(CDPK)。Huber 认为 SnRK1 主要作用于双子叶植物中的 SPS, SnRK1 和 CDPK 可以磷酸化单子叶植物中的 SPS,即 SnRK1 可以磷酸化单子叶、双子叶植物 SPSs 中的 A 基因家族, SnRK1 和 CDPK 可以磷酸化单子叶、双子叶植物 SPSs 中的 B 基因家族。所以,通过环境条件决定的不同丝氨酸残基的磷酸化, SPS 酶活性受多个水平的调节,在这些调节活动中,至少有一个水平的调节与 14-3-3S 的互作。Zuk 等从马铃薯中克隆和筛选出 6 个具有高度序列同源性的 14-3-3 cDNAs,在抑制 29 G 或 20 R 同工酶的转基因植株中,伴随相应的蔗糖水平的变化, SPS 活性显著增加(SPS V_{max} 活性增加 1.3~1.8 倍, SPS V_{sel} 活性增加 3~5 倍)。当 G3 转基因植株中 6 个已知的同工酶都被抑制时, SPS V_{max} 活性增至 2~3 倍, SPS V_{sel} 活性增至 5~9 倍。在 14-3-3 蛋白被抑制的 3 种转基因马铃薯中:当 2 个不同的同工酶 29 G(J5 系)和 20 R(J4 系)其一被抑制或同时被抑制时(G1 系), SPS 活性在所有的转基因植株中都显著增强。SPS

活性在 J4 系中最高,并增强了 SS 活性。在活体培养中, 14-3-3 蛋白可结合 SPS 调节糖代谢, 14-3-3 是 SPS 活性的主要调节因子,其调节没有同工酶特异性。

4 小结

植物蔗糖参与酶的表达和调控是一个十分复杂的过程。不同的酶单独或与激素和外界刺激相结合,调控从基因表达到营养物质的长距离运输和分配等诸多方面。不同的酶对植物的重要性可能因植物而异,并随植物的生长发育而改变。即使同一种酶,也可能有不同的基因,在不同的时期、不同的组织中差异的表达。目前,植物蔗糖参与酶在酶的转录调节、翻译控制、蛋白质转换的调控等方面的研究还不尽如人意,许多研究得出的结论都是在各种酶适宜的条件下且酶的激活和基因表达一致性假设的前提下获得的,但基因组的复杂性、多重基因的存在使酶的研究复杂化,使单个酶基因的表达研究十分困难。

在外部和内部因子的共同作用下,研究酶的活性对理解蔗糖代谢调节的途径十分重要。利用分子生物学手段从正向和反向表达酶的基因,以及利用特异性启动子表达基因来研究作物的不同组织和不同发育时期各种酶对蔗糖积累的作用。研究绿藻和原始植物,追溯蔗糖酶基因的进化起源,会帮助我们揭开高等植物蔗糖代谢的神秘面纱。

参考文献:

- [1] Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 10876-10880.
- [2] Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C et al. Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression[J]. Plant J, 2002, 30: 489-497.
- [3] Ohto M, Onai K, Furukawa Y et al. Effects of sugar on vegetative development and floral transition in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2001, 127: 252-261.
- [4] Uggle C, Magel E, Montiz T et al. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine[J]. Plant Physiol, 2001, 125: 2029-2039.
- [5] Iraqi D, Tremblay FM. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development[J]. J Exp Bot, 2001, 52: 2301-2311.
- [6] Bosch S., Grof C.P. L., Botha F. C. Expression of neutral invertase in sugarcane[J]. Plant Science, 2004, 166: 1125-1133.
- [7] Thomas R., Steffen G. Plant protein inhibitors of invertases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1696: 253-261.
- [8] Simon A, Coupe Ben K, Sinclair, Lindsay A, Greer et al. Analysis of acid invertase gene expression during the senescence of broccoli florets[J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 28: 27-37.
- [9] Li X. X, Hayata, Yasuyoshi, Yasukawa, Junichi, et al. Response of sucrose metabolizing enzyme activity to CPPU and p-CPA treatments in excised discs of muskmelon[J]. Plant Growth Regulation, 2002, 36: 237.
- [10] Liu F. L., Christian R. Jensen, Mathias N. Andersen., Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set[J]. Field Crops Research, 2004, 86: 1-13.