

马铃薯腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶的调控^{*}

马彦军, 王 蒂

(甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

摘 要: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶是淀粉合成过程中一个限速酶, 其表达受到转录、温度、底物等多种因素调控。在 25 ℃ 其活性最强。3-磷酸甘油和焦磷酸分别是其最有效的激活剂和抑制剂, 其它物质如 BSA、半胱氨酸、2-巯基乙醇和谷胱甘肽都能使腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶的活性有所提高; NADP⁺、ADP、AMP 等轻微地抑制腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶活性。

关键词: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶、转录、温度、3-磷酸甘油、焦磷酸、基因工程、调控

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2002) 06-353-03

腺苷二磷酸葡萄糖 (ADPG) 焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase) (EC2.7.7.27) 是植物合成淀粉和细菌合成糖原的一个限速酶^[1~5], 催化: $ATP + \text{glucose} - 1-P \rightleftharpoons ADP\text{-glucose} + PPi$ 这个可逆反应, 为淀粉合成提供所需要的葡萄糖活化供体。在高等植物的叶片^[6,7]、绿藻^[8]、兰绿细菌^[9] 和植物非光合作用器官^[10] 等中都已发现了这个酶的存在。这个酶被^[11~13] 3-磷酸甘油 (3-PGA) 激活, 而焦磷酸 (PPi) 对其有抑制作用, 在 25 ℃ 其活性最强^[14]。

1 AGPase 的结构

高等植物与细菌的天然 AGPase 大小相似, 都在 200~240KD 范围内。在植物中该酶是由二大 (lAGPase) 和二小 (sAGPase) 亚基组装成的异型四聚体。马铃薯块茎 AGPase 由分子量为 51 KD 和 50 KD 的大小亚基组成^[15], 其它物种如拟南芥菜、衣藻、小麦、水稻、玉米均包含相似大小的肽链。高等植物的小亚基高度保守, 氨基酸序列同源性大于 85%, 而大亚基间相似性相对低, 但高于物种

自身大小亚基间的相似性。马铃薯大小亚基 cDNA 克隆分别或一起在 E. coli 中表达, 可确定每个亚基是否具有特异性功能。马铃薯小亚基单独表达, 3-AGP 浓度升高到 20 mM, 有高催化活性, 而大亚基单独表达活性可忽略, 因而推测小亚基的主要功能是催化作用, 对淀粉合成起主要作用; 而大亚基主要功能是增加小亚基对激活剂的亲和性, 降低小亚基对抑制因子的亲和性^[16]。

2 AGPase 的调控

2.1 转录水平的调控

高等植物中 AGPase 是由二大 (l AGPase) 和二小 (sAGPase) 亚基组装成的异型四聚体, 每个亚基是由不同基因编码^[17]。研究表明^[18] 马铃薯块茎形成时 AGPase 的调控主要是在转录水平上, 而在叶片中 AGPase 调控主要在转录后的加工。当块茎形成时, l AGPase 和 sAGPase 的 mRNA 和 AGPase 的多肽链同时稳定升高, 高水平的 mRNAs、高水平的 AGPase 的多肽链和高水平的酶活性, 都表明在块茎形成时转录是调控 AGPase 表达的主要机制。在其它作物中也得到了相同的结果。在水稻中, sAGPase 转录水平^[19] 与淀粉积累速率一致。在小麦种子中, AGPase 的含量^[20] 和淀粉合成速率^[21] 与 AGPase 的 mRNA 含量成正相关。因而在非光合贮藏器官中, AGPase 在淀粉合成中作用主要是通过转录来调控的。相反, 叶片中大小亚基

收稿日期: 2002-05-10

^{*} 本课题得到国家高技术研究发展计划 (863) 项目资助, 子课题编号: 2001AA241132 及甘肃省自然科学基金暨中青年科技基金项目资助, 项目编号: ZS011-A25-026-N

作者简介: 马彦军 (1975-), 男, 硕士, 主要从事基因工程在马铃薯遗传育种中的应用研究

mRAN 水平显著差异与多肽水平的接近则说明了在叶片中转录后的调控起主要作用。

2.2 温度对 AGPase 的调控

在马铃薯块茎形成时将马铃薯放在不同的温度下, 测定块茎淀粉含量、ADPG 含量和 AGPase 活性。温度从 21.5 °C 升高到 30 °C 时, 淀粉合成降低了 50%^[22], 在 32 °C 和 37 °C 时, 淀粉合成分别降低了 61% 和 65%^[11]; ADPG 的含量在 30 °C 和 37 °C 分别比在 25 °C 时减少了 23% 和 45%, 同样的实验结果也证明了, ADPG 含量在高温有所下减少^[14]; 在 37 °C 时, AGPase 活性下降了 27%, 温度由 32 °C 升高到 37 °C 时 AGPase 活性下降了 32% 到 50%^[14]。由此说明温度对 AGPase 活性有调节作用。

2.3 化学物质对 AGPase 的调控

2.3.1 3-AGPase 的激活剂

3-APG 是 AGPase 的最有效的激活物, $A_{0.5} = 4.5 \times 10^{-6}$ molar, 用 0.1 millimolar 的 3-APG^[23,24] $S_{0.5}$ 对 ADP-Glucose 和磷酸化酶分别提高 3.5 倍 (0.83~0.24 millimolar) 和 1.8 倍 (0.18~0.10 millimolar), 而 V_{max} 提高了近 4 倍。3-PGA 对 AGPase 激活取决于 3-PGA 与 AGPase 的巯基结合和环境 pH 值。氧化或除去巯基, AGPase 的活性显著下降; 在只有 3-PGA 作为 AGPase 的激活因子情况下, pH 对 3-PGA 有很大影响, 在 pH 值为 7.5、8.0、8.5 和 9.0 时, AGPase 活性分别提高了 3.1、2.9、4.8 和 9.5 倍, 可以看出, 在 pH 值在 9.5 时, 酶活性相对最高。

除了 3-PGA 对 AGPase 有激活作用外, 其它因子^[9]对 AGPase 也有激活作用。加入高浓度的 BSA (200 μ g) 能够提高 AGPase 活性 14%~19%, 在 DTT 和 3-PGA 同时存在的条件下, AGPase 活性略有提高。半胱氨酸 (Cys) (20mM)、2-巯基乙醇 (10 mM) 和谷胱甘肽 (GSH) (10 mM) 分别使未活化的 AGPase 的活性提高 1.3、3.5 和 2.8 倍。

2.3.2 AGPase 的抑制剂

PPi 是 AGPase 最有效的抑制剂, 在浓度为 2 mM 时, AGPase 活性下降了 92.5%^[9], 其它抑制因子有 NADP⁺ (抑制 AGPase 活性的 74.0%)、ADP (抑制 AGPase 活性的 55.0%)^[9]。

2.3.3 PPi 与 3-PGA 相互作用对 AGPase 活性的影响

当 PPi 的浓度为 0.12 mM、0.18 mM 和 0.33

mM 和对应的 3-PGA 浓度分别为 0.25 mM、0.50 mM 和 3.0 mM 时, AGPase 活性下降了 50%^[25]。

2.4 基因工程调控 AGPase 活性

AGPase 具有表达的特异性, 在不同组织、器官和不同植物中的结构和表达是不同的, 因此, 通过基因将不同组织、器官、植物的 AGPase 基因克隆转化来研究这个 AGPase 的性质。目前, 已克隆出了不同植物、组织、器官中特异表达的 AGPase 基因。目前马铃薯 AGPase 基因的 cDNA (大小亚基)、反义表达、基因组克隆都已成功。

3 展望

随着植物生理学、分子生物学和基因工程的发展, 对淀粉合成代谢途径研究有了很大的突破; 同时各种植物特别是马铃薯的高效遗传转化体系的建立, 使得利用转基因的方法研究马铃薯淀粉合成途径成为可能。利用基因工程调控 AGPase 基因的表达来研究 AGPase 在淀粉合成的作用以及与其它因子的相互关系。但是, 在淀粉合成过程中还有一些步骤没有完全弄清楚, 需要进一步深入研究。结合分子生物学和基因工程技术来研究淀粉合成相关酶的功能、以及相互作用, 将会更进一步地了解 AGPase 在淀粉合成过程中的作用, 为我们改良作物淀粉品质提供强有力的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ghosh H P, and Preiss J. Characterization of glucose pyrophosphorylase; a regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach chloroplasts. *J Biol Chem*, 1966, 241: 4491-4504.
- [2] Preiss J, Ghosh H P, and Wittkop J. Regulation of the biosynthesis of starch in spinach chloroplasts. *Biochemistry of Chloroplasts*, 1966, Vol 2. Academic Press New York, 131-153.
- [3] Preiss J. Regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1978, 46: 317-381.
- [4] Preiss J. Biosynthesis of starch and its regulation. In J Preiss, ed. *The Biochemistry of Plants*. 1988, Vol 14, Academic Press, San Diego 181-254.
- [5] Preiss J. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu Rev Microbiol*, 1984, 38: 419-458.
- [6] Peter Geigenberger, Michael Geiger and Mark Stitt. High-temperature perturbation of starch synthesis is attributable to inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase by decrease leaves of glycerate-3-phosphate in growing potato tubers. *Plant Physiol J*, 1998, 117: 1307-1316.

- [7] Kraus A, and Marschner H. Growth rate and carbohydrate me-

tabolism of potato tubers exposed to high temperature. *Potato Res.* 1984, 27; 297—303.

[8] Sanwal G G, and J Preiss. Biosynthesis of starch in *Chlorella pyrenoidosa* II. Regulation of ATP: α -glucose 1-phosphate adenytransferase (ADP-Glucosepyrophosphorylase) by inorganic phosphate and 3-phosphoglycerate. *Arch Biochem Biophys.* 1967, 119; 454—469.

[9] Levi C, and J Preiss. Regulation properties of the ADP-Glucose pyrophosphorylase of the blue-green *Synechococcus* 6301. *Plant Physiol.* 1976, 58; 753—756.

[10] Amir J, and J H Cherry. Purification and properties of adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase from sweet corn. *Plant Physiol.* 1972, 49; 893—897.

[11] Copeland L, and Preiss J. Purification of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant physiol.* 1981, 68; 996—1001.

[12] Morell M K, Bloom M, Knowles V, and Preiss J. Subunit structure of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 1987, 85; 182—187.

[13] Plaxton W C, and Preiss J. Purification and properties of non-proteolytic degraded ADP-glucose pyrophosphorylase from maize endosperm. *Plant Physiol.* 1987, 83; 105—112.

[14] Preiss J, H P Ghosh, and J Witrop. Regulation of the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. In T W Goodwin, ED. *Biochemistry of chloroplasts*, Academic Press, New York. 1981, 2; 131—153.

[15] Okita T W, Nakata P A, Anderson J M, and Preiss J. The submit structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 1990 (93); 785—790.

[16] Ballicora M A, Laughlin, and Fu Y B. Adenosine 5'-diphosphate — Glucose pyrophosphorylase from potato tuber. *Plant Physiol.* 1995, 109; 245—251.

[17] Smith-White B J, and Preiss J. Comparison of protein of ADP-glucose pyrophorylase from diverse. *J Mol Evol.* 1992, 34; 449—464.

[18] Paul A Nakata, and Thomas W Okita. Differential regulation of ADP-glucose pyrophosrylase in the sink and source tissue of potato. *Plant Physiol.* 1995, 108; 361—368.

[19] Anderson J M, Larson R, Laudencia D, Kim W T, Morrow D, Okita T W, and Preiss J. Molecular characterization of the gene encoding a rice endosperm-specific ADP-glucose pyrophosphorylase subunit and its developmental patter of transcription. *Gene.* 1991, 97; 199—205.

[20] Reeves C D, Krishan H B, and Okita T W. Gene expression in development wheat endosperm. *Plant Physiol.* 1986, 82; 34—40.

[21] Briarty L G, Hughes C E, and Never A D. The developing endosperm of wheat; stereological analysis. *Ann Bot.* 1979, 44; 641—658.

[22] Sanwal G G, E Greenber, J Hardie, E C Cameron, and J Preiss. Regulation of starch biosynthesis in plant leaves; activation and inhibition of ADP-Glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 1968, 43; 417—427.

[23] Joseph R Sowohinos, and Preiss J. Pyrophosphorylases in *Solaum tuberosum*. III. Purification, physical, and catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplast in barley endosperm. *Plant J.* 1982, 10; 243—250.

[24] Joseph R Sowohinos. Pyrophosphorylases in *Solaum tuberosum*. II Catalytic properties and regulation of ADP-glucose and UDP-glucose pyrophosphorylase activities in potatoes. *Plant Physiol.* 1981, 68; 924—929.

[25] Joseph R Sonwokin, and Jack Preiss. Pyrophosphorylases in *SolaNum tuberosum*. III. Purification, physical, and catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiol.* 1982, 69; 1459—1466.

浙江省台州市路桥锦绣筛网厂

全国马铃薯育种单位防虫网专用生产厂家

经营项目：尼龙筛网、网罩、遮阳网（防虫网）、尼龙种子袋、塑料标签等。

价目：尼龙筛网 40目 1.60元/m 60目 1.90元/m
尼龙种子袋 35×24 cm 0.45元/条 45×30 cm 0.65元/条
塑料遮阳网 遮阳率（70%） 0.85元/m
塑料标签 4.5×3.0 160元/万张 （以上产品量大优惠）

通信地址：浙江省台州市新桥镇凤阳章路9号
汇款户名：浙江省台州市路桥锦绣筛网厂
开户银行：台州市农行路桥区支行新桥分理处
银行帐号：331021089874021848

邮编：318055
厂长：章万富 手机：013701030208（北京网）
业务科手机：013968615918（台州网）
电话/传真：0576—2642298、2615837、2615705