

马铃薯腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶研究进展

成善汉¹, 柳俊², 谢从华¹

(1. 华中农业大学园艺系, 武汉 430070; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase) 是马铃薯淀粉合成的限速酶, 有关该酶的酶学特性、表达规律及分子生物学已进行了较为深入和系统的研究。异源表达和突变研究表明, 该酶的小亚基具催化活性, 大亚基具变构调节作用。化学修饰和位点定向突变方法分析已发现了 AGPase 的底物、激活因子和抑制因子结合位点。此外, 通量控制系数、反义抑制和反向遗传学等多种方法已阐述了该酶是淀粉合成关键酶的原因。

关键词: 马铃薯; 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; 亚基; 结合位点; 淀粉合成

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2001) 05-0349-06

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是总产和栽培面积仅次于小麦、水稻和玉米之后的第四大粮食作物^[1], 其块茎的贮藏物质主要是淀粉, 约占块茎干物重的 70%~80%, 块茎淀粉不仅用于医药、食品和饮料生产, 还可以用作造纸、包装、纺织和化工原料等。因而获得高含量、多用途、不同结构的淀粉已经成为育种工作者的技术攻关课题之一。

腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPP 或者 AGPase) 是植物淀粉生物合成过程中的一个起关键性调节作用的酶。研究表明, AGPase 对淀粉合成的一般控制系数在 0.3~0.6^[2], 且植物组织中淀粉合成的曲线与

AGPase 积累曲线基本一致, 抑制 AGPase 的活性将导致淀粉合成的部分或全部终止^[3,4]。因而, 全面了解 AGPase 的研究进展, 对我们采用不同的方法来提高淀粉含量和改良马铃薯品质具有重要意义。

1 AGPase 的酶学特性

1.1 催化和调节性质

已经纯化出来的马铃薯 AGPase 分子量约为 206 KD, 是由 51 KD 大亚基和 50 KD 的小亚基组成的异源四聚体^[5], 定位于块茎、匍匐茎、根、叶和茎中, 块茎和叶中含量较多^[6]。AGPase 催化淀粉合成前体物质 ADPG 的形成 ($G-1-P + ATP \leftrightarrow ADPG + PPi$)^[7]。作为淀粉合成第一步, AGPase 存在两种方式的调节作用, 一是变构调节, 通过激活因子 3-PGA 与抑制因子 Pi 的比率来控制酶的活

收稿日期: 2001-06-15

作者简介: 成善汉 (1975-), 男, 华中农业大学园艺系 99 硕士生。

[58] Austin S. and M. A. Baer, Interspecific fusion in *S. Tuberosum*. *Theor. Appl.* 1985, 71: 172-175.

[59] Mattheij W. M. and R. Eijlander et al, Interspecific hybridization between the cultivated potato *S. Tuberosum* subspecies *S. Tuberosum* L. and the wild species *S. Circaeifolium* subsp. *Circaeifolium* Bitter Exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. *Theor. Appl. Genet.* 1992, 83: 459-466.

[60] 陈文品等, 小麦与多年生黑麦草原生质体的电融合及杂种愈伤组织的形成 [J]. *植物学报*, 1992, 34 (4) 284-290.

[61] 刘宝, 刘大钧. 通过“供体-受体”原生质体融合将裸燕麦部分基因组转移给普通小麦 [J]. *实验生物学报*, 1995, VOL. 23, NO. 1, 95-102.

[62] Chaput M. H and D. Sihachakr et al, Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes: BF15 (H2), Aminca (H6) and Cardinal (H3). *Plant Cell Rep.* 1990, 9: 411-414.

[63] Waara S. and L. Pijnacker et al, A cytogenetic and phenotypic characterization of somatic hybrid plants obtained after fusion of two different dihaploid clones of potato (*S. Tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1992, 85: 470-479.

[64] Austin S. and M. K. Ehlenfeldt et al, Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *S. Tuberosum* AND *S. Brevidence*: phenotypic variation under field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 1986, 71: 682-690.

性^[8], 减少小亚基 Cys 12 中二硫键^[9]。变构调节作用酶的最大活性出现在 5~8 mM Mg²⁺、ADPG/PPi 为 1.3、pH 为 7.5 的条件下。此外, 果糖-1,6-二磷酸、RuBP、DTT 等对 AGPase 的活性具有轻微激活影响; ADP、NADP、AMP 等对 AGPase 具轻微抑制作用^[10]。另一种是共价调节, 即铁氧还蛋白-硫氧还蛋白系统介导调节 AGPase 活性^[11]。

1.2 配体结合位点

AGPase 除含底物 ATP 和 G-1-P 催化位点外, 还存在激活剂 3PGA 和抑制剂 Pi 配体结合位点, 很可能这些位点定位于不同亚基或同一亚基的不同位置。弄清这些具体位置, 不仅可使我们了解两亚基对 AGPase 发挥最佳活性作用原因, 而且我们还可以在这些位置上做文章, 达到研究酶的性质和调节淀粉合成的目的。

底物结合位点 化学修饰和位点定向突变方法研究 *E. coli* AGPase 证实, Lys¹⁹⁵ 是底物 G-1-P 磷酸部分结合位点^[12,13], Try¹¹⁴ 是底物 ATP/ADPG 腺苷部分结合位点^[14]。整个 AGPase 氨基酸序列与植物、藻菌 AGPase 具 30%~40% 同源性, 然而 *E. coli* AGPase 结合位点附近序列与植物 AGPase 相应位点序列基本相同^[15], 表明这些序列很可能具相同功能。最近, 在 *E. coli* 中表达的马铃薯块茎 AGPase 位点定向诱变实验中, 50KD Lys¹⁹⁸ (相当于 *E. coli* AGPase Lys¹⁹⁵) 变为谷氨酸, 底物 G-1-P S_{0.5} 值 (50% 最大活性需要浓度) 从 57 μM 上升到约 31 μM, AGPase 对 G-1-P 的表现亲和力下降 500 倍以上, 而对其它底物 Mg²⁺、ATP 及激活因子 3-PGA、抑制因子 Pi 的 K_m 值无明显变化。Lys¹⁹⁸ 被 Arg 取代的保守突变造成 AGPase 对 G-1-P 表现亲和性降低 135 倍^[8]。同样, 使马铃薯 AGPase 小亚基 Lys¹⁹⁸ 突变成 Arg、Ala、Glu, AGPase 对 G-1-P 的亲和力下降 135~500 倍, 而大亚基 Lys²¹³ 突变, AGPase 对 G-1-P 的亲和力无影响; 若 Lys¹⁹⁸、Lys²¹³ 双突变, AGPase 对 G-1-P 的亲和力下降 100 倍^[16]。这些结果很明显表明, 马铃薯块茎 AGPase 小亚基 Lys¹⁹⁸ 在 G-1-P 结合位点中, 对 G-1-P 结合起重要作用, 而大亚基 Lys²¹³ 与底物 G-1-P 的作用可忽略。

研究还发现, AGPase ATP/ADPG 结合位点 Try¹¹⁴ 对应于高等植物、藻菌 AGPase 的 Phe¹¹⁴。未来的研究包括定点诱变和化学修饰,

需确信高等植物 AGPase 含有 Phe¹¹⁴ 的相同序列 WFQGTADAV 保守区是否真的是 ATP 的结合区。

激活因子位点 分离菠菜叶 AGPase 小亚基的吡哆醛磷酸 (PLP) 结合位点发现, 靠近 C-末端的 Lys 对 3-PGA 激活很重要。若该位置被 PLP 共价束缚, AGPase 对 3-PGA 激活缺乏敏感, 酶活性具有未被共价修饰、但被 3-PGA 激活的最大活性的 50%~60%。此外, 还原 PLP 作用也被别构因子 3-PGA 和 Pi 抑制, 修饰酶不再需激活就可以达最大活性, 共价修饰因变构因子出现被抑制, 这些结果表明 PLP (激活因子 3-PGA 类似物) 在激活因子结合位点与酶结合, 该结合位点氨基酸序列分别位于小亚基的 SGIVTVIK (位置 419) DALIPSGTIV (位点 1) 和大亚基的 IKDAIHDK (位置 382) NAR (位点 2)^[17]。鱼腥藻属 AGPase 还原 PLP 作用产生相似的效果^[18]。比较 *E. coli*、鱼腥藻、拟南芥、大麦胚乳、玉米胚乳、马铃薯块茎、水稻种子、菠菜叶、小麦种子位点 1 和位点 2 的氨基酸序列, 结果这些序列 Lys 相当保守^[19], 说明高等植物 AGPase C 末端 Lys 在变构激活因子激活中具有重要意义。

编码马铃薯成熟型块茎 AGPase 大小亚基基因全序列 cDNA 克隆, 连接两个不同载体, 在缺乏 AGPase 活性的 *E. coli* 突变株中表达, 其酶活性高而且其催化、变构动力学特性与纯化马铃薯块茎 AGPase 相似^[8,19]。酶活性亦被马铃薯块茎 AGPase 抗体而不是 *E. coli* AGPase 抗体中性化。位点定向突变实验表明, 马铃薯 AGPase 两亚基的激活域分别为 SGIVTVIKDALIPSGIII (小亚基位点 1)、IRKCHIDKNAR (大亚基位点 2)^[8]。与大亚基同源序列比较, 小亚基推定的激活因子结合位点在调节酶活性作用中更为重要^[20]。

马铃薯块茎 AGPase Lys⁴⁴¹ (相当于鱼腥藻属 Lys⁴¹⁹) 位点定向突变成 Glu、Ala, 结果导致突变株 AGPase 对 3-PGA 亲和性分别下降 32 和 83 倍^[21,22]。Arg 保守突变导致 A_{0.5} 增加两倍, 表明 AGPase 阳性氨基酸正电荷对激活剂结合很重要。与鱼腥藻属 AGPase Lys³⁸² 和菠菜叶 AGPase 大亚基位点 2 的 Lys 残基 (该残基被 PLP 修饰) 同源的马铃薯块茎 AGPase 大亚基 Lys⁴¹⁷ 突变成 Ala 或 Glu, 该酶对 3-PGA 的亲和力下降。然而 A_{0.5} 增加仅 3~13 倍, 没有小亚基 50KDLys⁴⁴¹ 残基突变

高。若大亚基 Lys⁴¹⁷ 和小亚基 Lys⁴⁴¹ 同时突变, 该酶对 3-PGA 的亲性和 A_{0.5} 增加值可累加。因此, 两亚基 Lys 残基有助于激活因子结合。

抑制因子结合位点 高等植物、鱼腥藻属 AG-Pase 有 5 个高度保守的 Arg 残基, 鱼腥藻属 5 个保守 Arg 分别为 Arg⁶⁶、Arg¹⁰⁵、Arg¹⁷¹、Arg²⁹⁴ 和 Arg³⁸⁵, 突变成 Ala 发现, Arg²⁹⁴ 的 Ala 突变株 AGPase 对抑制因子 Pi 亲和性, 3PGA 存在或缺乏时分别下降 40 和 100 倍^[23]。此突变对酶与底物、激活因子 3-PGA 动力学常数几乎没有影响。因此, Arg²⁹⁴ 参与 Pi 结合, 激活因子 3-PGA 与抑制因子 Pi 很明显具不同结合位点。纯化 Arg²⁹⁴ Ala 突变株酶与野生型酶相比, 前者特异性活性提高了 3 倍, 表明随着抑制因子结合位点的消失, 该酶发生构象变化, 从而具更高催化效率。关于马铃薯抑制因子结合位点是否位于相似的 5 个高度保守的 Arg 残基, 可用位点定向突变方法进一步研究。

1.3 马铃薯 AGPase 小亚基是催化亚基, 大亚基是调节亚基

马铃薯块茎 AGPase 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^[8,9]。马铃薯 AGPase 小亚基单独表达, 因 3-PGA 浓度升高到 20 mM, 有高催化活性, 而转基因或正常马铃薯块茎异源四聚体 AGPase 对 3-PGA 的饱和浓度为 3 mM; 小亚基单独表达 A_{0.5} 是 2.4 mM, 说明小亚基对激活因子具低表观亲和性, 单独表达对 Pi 抑制更加敏感, 与转基因异源四聚体酶相比, K_i 值降低 8 倍。3-PGA 激活和 Pi 抑制动力学是转化同源四聚体小亚基和异源四聚体 AG-Pase 产生不同结果的主要差别所在。这些结果与拟南芥缺乏大亚基突变株获得的结果一致^[24]。与异源叶绿体相比, 拟南芥突变株同源四聚体酶对激活因子具更低亲和性, 而对抑制因子有更高的敏感性^[25]。马铃薯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, 对淀粉合成起关键影响; 而大亚基主要功能是增加小亚基对激活因子的亲和性, 降低小亚基对抑制因子的亲和性^[8]。

1.4 植物 AGPase 序列的同源性 (相同或相似)

马铃薯大小亚基氨基酸序列具 52% 的同源性, 比菠菜叶 35% 的同源性高^[26]。马铃薯 AGPase 小亚基与水稻胚乳 AGPase 小亚基表现 84% 同源性,

与菠菜叶小亚基同源性高达 93%^[26,27]。马铃薯大亚基与小麦胚乳 AGA·7、玉米胚乳 Shrunken-2 仅有 58% 和 61% 的同源序列^[28,29]。上述数据说明, 同一物种大小亚基的同源性低于不同物种同一亚基之间的同源性; 不同物种同一亚基之间小亚基更加保守, 大亚基趋向分离。因此推测, 高等植物两亚基来源于同一基因, 只是该基因在进行复制过程中, 受选择压力或最适活性需求而出现分离, 产生两种不同的多肽 (两亚基)^[26]。

2 马铃薯 AGPase 活性变化和表达规律

在马铃薯块茎形成、成熟和贮藏期间 AGPase 与淀粉合成均密切相关。实验发现, 随着块茎膨大 (直径 0.5~1 cm), AGPase 活性增加 24 倍, 淀粉含量占干物重的 60%; 当块茎重达到 1.8g (直径 1.7 cm), AGPase 活性达到最大值。此后, 随着块茎进一步膨大, AGPase 活性逐渐下降, 但比块茎开始形成时的酶活性高, 因而在块茎发育过程中, 淀粉含量始终增加, 直达最大值 65%~70%。贮藏期间, AGPase 因贮藏温度不同活性变化较大, 4℃ 下成熟块茎酶活性基本无变化, 而在 11℃ 下酶活性逐渐下降, 且下降幅度较大^[30]。

许多植物包含小的编码各亚基的多基因家族, 这些多基因家族成员表达模式各不相同。编码亚基的基因, 在表达数目和模式方面不同物种间存在相当大的差异, 即使同一物种, 不同器官组织大小亚基表达具特异性。用时空表达分析方法结合分子杂交研究马铃薯 AGPase 大小亚基的表达模式及其对淀粉生物合成的影响时发现, 马铃薯 AGPase 大小亚基在整个发育期间都协调表达 (转录和翻译), 转录物随着块茎膨大而增加, 主要受转录水平调控^[6]。四个转录物有三个编码大亚基, 一个编码小亚基, 在块茎中所有三个大亚基都协调表达, 而在叶中仅有两个表达; 小亚基在所有组织中均可检测到, 最高水平的表达出现在块茎, 其次是叶、匍匐茎、茎, 最少出现在根, 叶中 sAGP 表达主要受转录后调节^[6,31]。

环境信号如光周期^[6,32]、蔗糖浓度^[4,6]、温度^[33]对 AGPase 转录物、翻译物和活性存在影响。昼夜交替过程中, sAGP 在光照的最先 8 小时稳定增加, 光期结束时下降, 整个循环中白天结束时酶活性比暗期结束时高; 而 IAGP 整个光周期循环中

无变化^[6,32]。一般情况下,随着蔗糖浓度增加,sAGP和IAGP转录协调增加,而外源蔗糖供应却没有增加AGPase多肽量和活性的作用^[3,6]。

马铃薯不同组织AGPase大小亚基的时空表达与淀粉合成密切相关。AGPase亚基量与淀粉积累平衡,最高丰度的AGPase多肽和淀粉出现在块茎中,其次为匍匐茎、叶、茎和根^[6]。但有结果显示,在6%蔗糖或持续光照条件下,淀粉积累大量增加。在这里淀粉积累不是因为AGPase基因表达量增加而产生^[3],而是因为(1)酶对底物的利用能力提高,(2)AGPase受到变构激活作用,(3)光周期末端淀粉含量增加^[32]。

3 马铃薯AGPase的分子生物学

3.1 AGPase亚基基因的克隆分析

马铃薯AGPase是由不同基因编码的大小两亚基组成的异源四聚体,科学家们通过对大小亚基全长cDNA克隆和氨基酸序列分析显示^[27,31,34,35],小亚基基因由8个内含子和9个外显子组成,总长超过5.5 kb。外显子大小范围为100~400 bp,平均A+T为56.8%;内含子大小范围为90~900 bp,平均A+T为67.1%,如此高的A+T含量是高等植物特有的,可能在内含子剪接中起关键作用。研究还发现sAGP是一个低拷贝基因,基因组Southern、Northern blot以及引物延伸、转基因等研究表明,相同的sAGP在叶和其它组织均有表达。sAGP启动子含有两个TATA框,分别位于转录起始位点上游26和52碱基;另外,启动子区还包含两个PAT框和两个SPO框,这些框在蔗糖诱导的块茎特异性蛋白—patatin增加、sporamin积累和淀粉贮存中可能起重要作用。

3.2 AGPase的异源表达

在AGPase异源表达研究中,报道存在两种方式的异源表达系统,一是E.coli AGPase基因在马铃薯块茎表达,用于研究AGPase与淀粉合成的关系;另一种是马铃薯AGPase基因在细菌中的表达,用于研究AGPase的性质。

前一系统结果表明,编码E.coli AGPase的glgC基因,嵌合来自于拟南芥核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基基因(rbcS)编码的修饰叶绿体转运肽(modified chloroplast transit peptide, CTP),在CaMV增强的^{35S}(CaMV-^{35S})启动子和多腺苷

作用信号因子NOS(nopaline synthase)控制下转化马铃薯植株,达到了提高AGPase活性和增加淀粉含量的目的^[36]。但马铃薯叶中过量淀粉积累将限制蔗糖的输出利用,减少块茎中蔗糖的进入,从而影响块茎细胞的生长和淀粉的积累。为了克服组成型AGPase活性的影响,Heineke等通过将编码E.coli AGPase glgC的突变体glgC16组成CTP-glgC16,连接在块茎特异性表达的patatin启动子后转化并获得了表现正常的马铃薯植株,其块茎淀粉含量比对照株平均增加35%,有些块茎淀粉含量甚至比对照株高60%^[37]。

编码马铃薯块茎AGPase大小亚基的cDNAs在E.coli中表达,产生重组异源四聚体酶,研究发现与天然纯化酶具相似特性。大亚基的主要功能是调节小亚基对Pi和3-PGA的敏感性,小亚基主要行使催化作用^[8]。此外,用N末端缺失的AGPase不完整小亚基cDNAs在E.coli中表达出现热不稳定性,对3-PGA具明显不同的亲和性,对Pi的抑制不敏感^[19]。这些N末端10个氨基酸缺失被证明与AGPase蛋白稳定性和酶的调节性质密切相关^[8,19]。

3.3 AGPase与块茎的淀粉合成

AGPase是淀粉合成的限速酶主要基于下列证据,一是光合产物的控制分析,结果表明,AGPase对马铃薯植株叶片淀粉合成的通量控制系数(flux control coefficient, FCC)高达0.6^[38],AGPase对块茎淀粉合成的FCC为0.55,对蔗糖合成的控制系数为-0.47^[2]。二是反义抑制分析,编码马铃薯AGPase小亚基cDNA反义表达发现,转基因块茎AGPase活性极大减少,淀粉含量也急剧降低^[4]。但AGPase活性变化出现在多个组织如叶、块茎,很难确定AGPase对块茎淀粉合成的贡献大小。为了克服这一困难,通过块茎特异性patatin启动子控制下的反义AGPase基因获得转化植株,得到相同的结论^[2]。在马铃薯转基因植株中,通过反义抑制减少AGPase数量和活性,减少合成淀粉的前体物质ADPG,发现尽管淀粉晶体形态未变,但直链淀粉含量大大减少,支链淀粉含量大量增加,但组成更短,淀粉粒变小^[39]。三是间接通过反向和正向方法调节质粒ATP/ADP转运蛋白活性,结果显示反义方向上,ATP/ADP转运蛋白活性降低,淀粉合成急剧减少,直链淀粉/支链

淀粉比率下降; 而正义方向上, ATP/ADP 转运蛋白活性上升, 淀粉含量比野生型植株高, 直链淀粉/支链淀粉比率增加。研究还发现, 反义块茎中 ADPG 降低 50%, 正义块茎 ADPG 增加 2 倍^[40]。而 ADPG 是淀粉合成的前体物质, 这表明 AGPase 在植物体内受 ATP 限制, ADPG 浓度变化决定淀粉合成的多少。四是通过反向遗传学方法产生正向调节的马铃薯 AGPase 变种, 结果表明马铃薯 AGPase 大亚基发生突变产生的 P52L 对激活因子 3-PGA 不敏感; 再次突变产生的第二位点回复突变体 AGPase 对 3-PGA 亲和性比 P52L 突变体高出 11~49 倍, 对 Pi 敏感性下降^[41]。这种回复突变体酶的再生提供了高等植物 AGPase 变构调节的额外的结构功能信息, 这些新型酶的产生可用于提高淀粉合成。

此外, 动力学模型^[42]、淀粉亏缺突变^[24]和水分胁迫^[43]也用于研究 AGPase 对淀粉合成的贡献, 得出相同的结论。

4 展望

迄今为止, 马铃薯 AGPase 的酶学特征和表达规律已经较为清楚, 进一步的分子生物学研究也正在深入。我们认为, 由于马铃薯块茎淀粉代谢涉及多种酶的调节如尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶、淀粉磷酸化酶等和多条代谢路径如糖酵解、乙醛酸循环, 是一个精确的、系统的、复杂的过程。而整合基因组、蛋白质组和代谢组学方法研究代谢路径^[44,45], 为我们获得马铃薯块茎淀粉糖代谢的清晰路径和关键调节位点提供了新的途径。

此外, AGPase 在块茎不同贮藏温度条件下, 酶活性变化存在差异^[30]。或许 AGPase 的活性影响着块茎贮藏和“低温糖化”, 建立低温条件下 AGPase 活性与淀粉含量、结构之关系, 对抑制“低温糖化”不无作用。

研究还发现随着 AGPase 活性降低, 块茎主要贮藏蛋白—patatin 含量减少^[4], 而 patatin 是占块茎总蛋白 40% 的糖蛋白, 是否 AGPase 活性、含量、序列与 patatin 存在关系也有待深究。若然这种关系存在, 我们甚至可以认为 AGPase 不仅决定淀粉合成速率, 而且将影响块茎的形成, 即影响库强度的大小。

参 考 文 献

- [1] Jackson SD. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol* 1999, 119, 1—8.
- [2] Sweetlove LJ, Muller-Rober B, Willmitzer L, et al. The contribution of adenosine 5' - diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta* 1999, 209, 330—337.
- [3] Müller-Röber B, Kossmann J, Hannag LC, et al. One of two different ADP - glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol Gen Genet* 1990, 224, 136—146.
- [4] Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L. Inhibition of AGPase in transgenic potatoes leads to sugar - storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber - storage protein genes. *EMBO J* 1992, 11, 1229—1238.
- [5] Okita TW, Nakata PA, Anderson JM, et al. The subunit structure of potato tuber ADP - glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol* 1990, 93, 785—790.
- [6] Nakata PA, Okita TW. Differential regulation of ADP - glucose pyrophosphorylase in the sink and source tissues of potato. *Plant Physiol* 1995, 108, 361—368.
- [7] Smith AM, Denyer K and Martin C. The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997, 48, 67—87.
- [8] Ballicora MA, Laughlin MJ, Fu YB, et al. Adenosine 5' - diphosphate - glucose pyrophosphorylase from potato tuber. *Plant Physiol* 1995, 109, 245—253.
- [9] Fu Y, Ballicora MA, Leykam JF, Preiss J. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP - glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* 1998, 273, 25045—25052.
- [10] Sowokinos JR. Pyrophosphorylase in *S. tuberosum* L III. *Plant Physiol* 1982, 69, 1459—1466.
- [11] Ballicora MA, Frueauf JB, Fu Y, Schurmann P, Preiss J. Activation of the potato tuber ADP - glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J Biol Chem* 2000, 275, 1315—1320.
- [12] Hill MA, Kaufmann K, Otero J, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen; mutagenesis of a catalytic site residue of ADP - glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1991, 266, 12455—12460.
- [13] Parsons TF, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen; incorporation of pyridoxal phosphate into the allosteric activator site and an ADP - glucose protected pyridoxal phosphate binding site of *Escherichia coli* B ADP - glucose synthase. *J Biochem* 1978, 253, 6197—6202.
- [14] Lee YM and Preiss J. Covalent modification of substrate - binding sites of *E. coli* ADP - glucose synthetase. Isolation and structural characterization of 8 - azido - ADP - glucose - incorporated peptides. *J Biol Chem* 1986, 261, 1058—1064.
- [15] Preiss J and Sivak MN. *Biochemistry, molecular biology and reg-*

- ulation of starch synthesis. *Genetic Engineering*, Vol. 20, edited by J. K. Setlow. Plenum Press, New York, 1998.
- [16] Fu YB, Ballicora MA, and Preiss J. Mutagenesis of the glucose-1-phosphate-binding site of potato tuber AGPase. *Plant Physiology* 1998, 117, 989-996.
- [17] Ball KL, and Preiss J. Allosteric sites of the large subunit of the Spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Biolchem* 1994, 269, 24706-24711. Charny Y, Iglesias AA, Preiss J. Structure-function relationships of Cyanobacterial AGPase. *J Biolchem* 1994, 269, 24107-24113.
- [19] Iglesias AA, Barry GF, Meyer C, et al. Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *E. coli*. *J Biolchem* 1993, 268, 1081-1086.
- [20] Ballicora MA, Fu Y, Nesbitt NM, et al. ADP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Site-directed mutagenesis studies of the regulatory sites. *Plant Physiol* 1998, 118, 265-274.
- [21] Ballicora MA, Fu Y, et al. 1996, in NIAR/COE International Symp. Proc. Tsukuba Japan, pp. 5-11, November 11-12.
- [22] Preiss J, Sheng J, Fu Y and Ballicora MA. 1996. In Proc. Xth international Photosynth. Congr. Vol. 5 (P. Mathis, ed.) pp. 47-52, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- [23] Sheng J, Preiss J. Arg²⁹⁴ is essential for the inhibition of *Anabaena* PCC 7120 ADP-glucose pyrophosphorylase by phosphate. *Biochem* 1997, 36, 13077-13084.
- [24] Lin TP, Caspar T, Somerville CR, et al. A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADPglucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant physiol* 1988, 88, 1175-1181.
- [25] Li L and Preiss J. Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase from a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Carbohydr. Res* 1992, 227, 227-239.
- [26] Preiss J, Ball K, Hutney J, Smith-White B, Li L, Okita TW. Regulatory mechanisms involved in the biosynthesis of starch. *Pure Appl Chem* 1991, 63, 534-544.
- [27] Anderson JM, Okita TW, Preiss J. Enhancing carbon flow into starch: the role of ADP-glucose pyrophosphorylase. In: Vayda ME, Park WD (eds) *The molecular Biology of the potato* pp. 159-180. C. A. B International. Wallingford (1990).
- [28] Oliver MR, Ellis RT, Schuch WW. Isolation and nucleotide sequence of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf and endosperm. *Plant Mol Biol* 1989, 12, 525-530.
- [29] Bhavre MR, Lawrence S, Barton C, Hannach LC. Identification and molecular characterisation of shrunken-2 cDNA clones of maize. *Plant Cell* 1990, 12, 581-588.
- [30] Sowokinos JR. Pyrophosphorylase in *S. tuberosum* L. *Plant Physiol* 1976, 57, 63-68.
- [31] Nakata PA, Anderson JM, Okita TW. Structure and expression of the potato ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit. *J Biochem* 1994, 269, 30798-30807.
- [32] Geigenberger P and Stitt M. Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant J.* 2000, 23 (6), 795-806.
- [33] Geigenberger P, Geiger M, and Stitt M. High-temperature perturbation of starch synthesis is attributable to inhibition of ADP-Glucose pyrophosphorylase by decreased levels of glycerate-3-phosphate in growing potato tubers. *Plant Physiol* 1998, 117, 1307-1316.
- [34] du Jardin P and Berhin A. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone encoding a subunit of the ADP-glucose pyrophosphorylase of the potato tuber amyloplast. *PMB* 1991, 16, 349-351.
- [35] Nakata PA, Greene TW, Anderson JM, Smith-White BJ, Okita TW and Preiss J. Comparison of the primary sequences of two tuber ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Mol Biol* 1991, 17, 1089-1093.
- [36] Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM. Regulation of the amount of starch in plant tissue by AGPase. *Science* 1992, 258, 287-292.
- [37] Heineke D, Sonnewald U, Büßis D, Günter G, Leidreiter K et al. Apoplast expression of Yeast-derived invertase in potato. *Plant Physiol* 1992, 100, 301-308.
- [38] Neuhaus HE, Stitt M. Control analysis of photosynthate partitioning. Impact of reduced activity of ADP-glucose pyrophosphorylase or plastid pyrophosphorylase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 1990, 182, 445-454.
- [39] Lloyd JR, Franziska S, Buleon A, et al. The influence of alterations in ADP-glucose pyrophosphorylase activities on starch structure and composition in potato tubers. *Planta* 1999, 209, 230-238.
- [40] Geigenberger P, Stamme C, Tjaden J, et al. Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic potato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. *Plant Physiol* 2001, 123, 1667-1678.
- [41] Greene TW, Kavakli IH, Kahn ML, et al. Generation of up-regulated allosteric variants of potato ADP-glucose pyrophosphorylase by reversion genetics. *PNAS* 1998, 95, 10322-10327.
- [42] Pettersson G, Ryde-Pettersson U. Metabolites controlling the rate of starch synthesis in the chloroplast of the C₃ plants. *Eur J Biochem* 1989, 179, 169-172.
- [43] Geigenberger P, Mueller-Roeber B, Stitt M. Contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis is decreased by water stress in growing potato tuber. *Planta* 1999, 209, 338-345.
- [44] Ideker T, Thorsson V, Ranish JA et al. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 2001, 292, 929-934.
- [45] DeRisi J, Lyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997, 278, 680-686.