

高等植物中蔗糖降解酶及其基因表达与调控^{*}

谢 虹, 梁建生, 陈 云, 高红明

(扬州大学 生物科学与技术学院, 中国江苏 扬州 225009)

摘 要: 大多数植物的库器官都是以蔗糖的形式接受碳源和能源, 蔗糖进入库代谢需要转化酶和蔗糖合成酶降解成为葡萄糖和果糖, 而糖又调节植物代谢过程中许多酶的基因表达, 因此蔗糖降解酶是植物生长发育中起关键作用的酶. 综述了近年来蔗糖合成酶和转化酶的作用及它们基因表达和调节的研究进展.

关键词: 蔗糖; 蔗糖合成酶; 转化酶; 基因表达

中图分类号: Q945; Q946

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2003)02-0123-05

Expression and Regulation of Sucrose Cleaving Enzymes and Genes in Higher Plants

XIE Hong, LIANG Jian-sheng, CHEN Yun, GAO Hong-ming

(College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

Abstract: Sink organs of most plant species are supplied with carbon and energy in the form of sucrose, the channeling of sucrose into sink metabolism requires its cleavage into glucose and fructose by several isoforms of invertase and sucrose synthase, but sugars regulate gene expression of many enzymes during metabolism, sucrose cleaving enzymes play a vital role in plant growth and development. The functions of sucrose cleaving enzymes are discussed, the current advances in gene expression and regulation of sucrose synthase and invertase are reviewed.

Key words: sucrose; sucrose synthase; invertase; gene expression

(Life Science Research, 2003, 7(2): 123~ 127)

大多数植物的库器官都是以蔗糖的形式接受碳源和能源. 蔗糖是光合作用的主要终产物, 也是韧皮部同化物长距离运输至库器官的最主要的形式, 它不仅为库器官中进行的各种生理生化过程提供碳源和能量, 也控制着库器官的生长. 在库器官中蔗糖只有在转化为己糖或磷酸己糖后才能进入细胞的代谢过程. 可以推测催化蔗糖降解的酶在库器官内的定位和活性表达对同化物进入库细

胞代谢过程具有重要的作用. 催化蔗糖降解的途径有二: 一是蔗糖合成酶 (Sucrose Synthase, SS) (UDPG: D-果糖 2- α -葡萄糖基转移酶, EC2. 4. 1. 13), 可逆性催化蔗糖与 UDP 形成 UDPG 和果糖; 二是转化酶 (Invertase) (β -D-呋喃果糖苷酶, EC3. 2. 1. 26), 不可逆水解蔗糖为果糖和葡萄糖. 因此, 蔗糖降解酶主要由蔗糖合成酶和转化酶组成.

* 收稿日期: 2002-09-25; 修回日期: 2003-04-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1998010100)

作者简介: 谢虹 (1968), 女, 福建永安县人, 工程师, 扬州大学在读硕士研究生, 从事植物生理生化研究, Tel: + 86-0514-7991559-8513, E-mail: xiehongwjn@yahoo.com.cn; 梁建生 (1964), 男, 江苏海门人, 扬州大学生物科学与技术学院教授, 博士生导师, 通讯作者, 从事植物生理生化研究, Tel: + 86-0514-7979202 Fax: + 86-514-7991747, E-mail: jsliang@yzu.edu.cn.

1 蔗糖合成酶

1.1 定位

近年来研究表明 SS 可定位在多个细胞区室:

1) 作为可溶性酶定位在胞液; 2) 结合在质膜上; 3) 与肌动蛋白细胞骨架相联系^[1].

1.2 功能

豌豆、绿豆籽粒的发育阶段和拟南芥 (*Arabidopsis*) SS 基因表达实验表明, SS 是库器官中蔗糖向淀粉转化的关键性酶, 并且 SS 活性与库强密切相关^[2-4]. 用转基因马铃薯、番茄和胡萝卜等植物通过反义 RNA 途径, 显示 SS 决定碳的分配和库强^[5-7]. 在发育的玉米胚乳中, SS 与细胞壁合成有关^[8,9]. 玉米根尖的缺氧耐受试验证明, 蔗糖是缺氧条件下玉米秧苗根的主要碳源, SS 在蔗糖降解中起主要作用^[10]. 该酶在豆科植物中对氮的固定是必需的. 因为相比于野生型, 突变体豌豆属的低 SS 活性(只有野生型酶活性的 10%) 导致较低含量的可溶性蛋白和豆血红蛋白, SS 为氮的固定提供碳源^[11].

1.3 酶学

现已对多种植物种属的根、块茎、子叶、叶、果实、种子等的 SS 进行了研究. 酶的天然分子量范围为 280~540 kDa. 米氏常数因不同的植物种属而有差异, 大致范围为 K_m (果糖) 2~8 mmol/L, K_m (蔗糖) 10~290 mmol/L, K_m (UDP) 0.005~6 mmol/L, K_m (UDPG) 0.01~8 mmol/L. SS 一般促进蔗糖降解, 但在李、梨属、黄瓜等植物中该酶主要行使蔗糖合成功能. 该酶由 4 个亚基构成, 有多聚体形式, 主要以四聚体存在. 果糖和 UDPG 抑制酶降解活性, 而 UDP 抑制酶的合成方向活性, 葡萄糖对合成和降解都有抑制作用. SS 发挥活性需二价金属离子, Mg^{2+} 最有效, 而 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 抑制酶活性^[12].

1.4 分子生物学

1.4.1 同工酶

植物中 SS 一般有两个以上的同工酶存在. 玉米中, 共生同源基因 *Sh1* 和 *Sus1* 编码生物化学性质相似的 SS 的两个同工酶 SS1 和 SS2. 同工酶 SS1 在纤维素合成中起作用, 而 SS2 主要是为淀粉合成产生前体. 用单克隆抗体进行 Western 和免疫组织化学方法分析水稻叶组织中 SS, 显示有 3 种同

工酶, 3 种同工酶的基因表达都与籽粒发育密切相关. *RSus1* 主要在发育的籽粒的糊粉层, 把糖送入胚乳; *RSus2* 分布在籽粒中除胚乳以外的其他部位, 扮演持家的角色; *RSus3* 主要定位在胚乳细胞, 催化酶促反应, 为淀粉的合成提供前体^[13].

1.4.2 基因和基因的表达

在单子叶植物中, SS 由两个不等位基因 *Sus1* 和 *Sus2* 编码, 在水稻中, 甚至有第 3 个基因 *Sus3*^[14]. 大多数双子叶植物也有两个非等位基因编码 SS, 它们与单子叶植物的两类基因功能类似, 但豆科根中只发现一种 SS 基因.

玉米 SS 的 *Sus1* 基因的序列测定, *Sus1* 基因与它的同源基因 *Shrunken* (*Sh1*) 基本一致, 只是 *Sh1* 的最后一个内含子在 *Sus1* 基因中缺失^[15]. Wang 等^[16] 用玉米 SS 基因 *Sh1* 作为探针显示水稻基因组至少含有 3 个基因编码 SS. *RSus1* 全部序列与玉米的 *Sh1* 具有高度的同源性(接近 94% 相同的衍生的氨基酸序列), 含有相同的内含子-外显子. *RSus3* 在别的植物中未被发现, 在籽粒中具有高度特异性表达, *RSus2* 是一个家务基因.

马铃薯 SS 的两个基因 *Sus3* 和 *Sus4*, *Sus3* 基因在茎中高水平的表达有利于维管束物质运输, *Sus4* 基因在贮存器官和块茎维管束组织中的表达促进库功能. 在根尖, *Sus3* 基因高水平在细胞分裂区表达, *Sus4* 在分生组织和根冠中表达^[17,18]. 胡萝卜 SS 的两个基因 *Susy* Dc1* 和 *Susy* Dc2* 被分离, 它们衍生的氨基酸序列有 87% 的相同, 但是它们翻译的起始密码子上游序列差异很大. *Susy* Dc2* 只在花中表达, *Susy* Dc1* 主要在茎、不同发育阶段的根、花芽、花和成熟的种子中表达^[19].

1.4.3 调节

玉米根尖细胞 SS 的基因 *Sh1* 和 *Sus1* 对糖的响应在转录水平上存在显著差异, 低葡萄糖水平促进 *Sh1* 基因的表达, 高糖水平则抑制其表达; 而 *Sus1* 基因表达受高葡萄糖水平促进和低糖水平抑制^[20]. 对于蚕豆 (*Vicia faba* L.) 的 cDNA 编码的 SS 研究, 在体外培养试验过程中, 增加蔗糖浓度导致 SS 的 mRNA 水平的增加^[21]. 离体马铃薯叶培养在蔗糖溶液中, 蔗糖只诱导 *Sus4* 的表达而 *Sus3* 不受影响. Salanoubat 等^[22] 对马铃薯 SS 在植物的不同器官对一定刺激反应的稳态水平的调

查. 在发育的块茎中含高水平蔗糖合成酶的 mRNA, 受伤导致酶的 mRNA 水平降低, 但在厌氧条件下恢复酶的 mRNA 水平, 在叶和叶柄, 蔗糖浓度增加导致 SS 的 mRNA 水平升高. 六倍体小麦 SS 的基因 *Ss1* 和 *Ss2*, *Ss1* mRNA 在缺氧和冷休克 (6 °C) 迅速增加, 而 *Ss2* mRNA 不受影响, 其黄化叶进行光照, *Ss1* mRNA 水平明显降低而 *Ss2* mRNA 水平增加^[23]. 拟南芥两个 SS 编码基因, 在冷处理和干旱条件下, *Sus1* 转录水平增加, *Sus2* mRNA 被缺氧诱导, 主要是因为冷处理和干旱诱导可溶性糖增加和渗透压降低, 缺氧表现糖的消耗. 给离体叶喷脱落酸(ABA) 或把 ABA- 缺失突变体处于冷条件下, 不影响 *Sus1* 或 *Sus2* 的表达. 用代谢糖(葡萄糖、蔗糖) 或非代谢糖(山梨醇、甘露醇) 对离体叶模拟渗透压对 *Sus1* 表达的影响, 结果表明 *Sus1* 表达通过独立于 ABA 的信号传导途径而调节, *Sus2* 不受糖或渗透压的影响^[24].

2 转化酶

2.1 分类

转化酶分为 3 类: 1) 酸性不溶性转化酶, 结合在细胞壁上, 最适 pH 4.5~ 5.0; 2) 酸性可溶性转化酶, 存在于液泡, 最适 pH 4.5~ 5.0; 3) 中性和碱性转化酶, 在细胞质中, 最适 pH 7.0~ 7.8.

2.2 功能

3 种不同形式的转化酶在植物的不同发育阶段和特异性组织区域起着不同的作用. 蔗糖从韧皮部卸出后进入质外体被水解为葡萄糖和果糖, 以维持韧皮部和质外体的蔗糖浓度梯度, 因此细胞壁转化酶被认为是蔗糖从韧皮部卸出的驱动力^[25, 26]. 在番茄的生长区伴随细胞壁和液泡转化酶活性的迅速升高, 表明转化酶促进植物生长. 高等植物真菌和细菌感染的一般特点是转化酶活性增加, 转化酶在感染部位的原因之一是为植物防御反应提供碳源^[27]. 低温条件下, 转化酶的活性与植物的抗低温反应有关. 另外, 转化酶调节源库的转换, 参与蔗糖在库器官的分配.

2.3 分子生物学

2.3.1 同工酶

3 种类型的转化酶都存在不同的同工酶形式, 同工酶具有不同的 K_m 值、抑制反应和生化特性. 在许多植物中, 转化酶至少有两种同工酶共

存. 例如, 玉米胚乳中含可溶性转化酶的同工酶, 大麦发育的节间细胞壁转化酶也存在两种同工酶形式^[28]. 转化酶存在多种同工酶形式, 主要是因为植物在各种内外条件下、不同的发育阶段为了更好地控制蔗糖的代谢、运输和贮存.

2.3.2 基因和基因的表达

已从一些高等植物如胡萝卜、绿豆、马铃薯、拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)、番茄、玉米、燕麦属(*Oat*)、烟草、红藜、豌豆、郁金香属中分离得到编码转化酶的基因或 cDNA. 拟南芥菜的基因 *Atβfruct1* 和 *Atβfruct3*、胡萝卜基因 *ImwDC2* 和 *ImwDC3*、玉米 *Ivr1* 基因、番茄 *ImLe* 和 *ImLp* 基因都含有 7 个外显子和 6 个内含子, 而胡萝卜的 *ImwDC1* 基因和拟南芥菜的 *Atβfruct2* 基因含有 5 个外显子和 6 个内含子^[29, 30]. 同种植物的不同转化酶的氨基酸序列差异很大, 而不同植物的同种转化酶的氨基酸序列具有高度的相似性.

拟南芥菜细胞壁和液泡转化酶由至少 4 个基因编码, 为 *Atβfruct1*、*Atβfruct2*、*Atβfruct3* 和 *Atβfruct4*. 在子叶中没有测到细胞壁转化酶基因 *Atβfruct1* 的转录, 在成熟的叶子却高水平表达; 细胞壁转化酶基因 *Atβfruct2* 具有花特异性表达, 相反在花中没有测到基因 *Atβfruct1* 的表达. 液泡基因 *Atβfruct3* 在子叶表达, 而在叶、根、花芽只有低水平的转录. 液泡基因 *Atβfruct4* 在幼小植物叶中表达, 在成熟开花植物叶中未被发现有表达^[31]. 番茄的基因家族 *Lin5*、*Lin6*、*Lin7*、*Lin8*, *Lin5*、*Lin6* 和 *Lin7* 表达说明细胞壁结合的转化酶催化质外体蔗糖降解以建立和维持库代谢. *Lin5*、*Lin7* 在雌蕊群和雄蕊群的表达说明转化酶提供碳水化合物进入花器官, *Lin7* 的 mRNA 只存在于这个特异性的库器官^[32].

2.3.3 调节

终产物和底物、激素、受伤和病原体感染、温度、光、重力、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调节植物转化酶的表达^[33~ 35].

玉米细胞悬浮培养中, *Incw1* 基因编码的一个细胞壁转化酶被糖在转录和转录后水平调节. *Inaw1* 基因编码两个转录子: *INCW1-S* 和 *INCW1-L*. 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* 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. Cheng 等^[36] 指出 *Incw1* 的糖反应和诱导是独立于己糖激酶途径.

3 结语

蔗糖不仅为植物的生长发育提供物质和能量, 也可作为一种信号分子调节源库细胞内许多催化碳水化合物代谢的酶活性和基因的表达进而影响植物的生长和发育. 近年来, 对蔗糖降解酶的研究主要聚焦在编码这些酶的基因克隆和阐明翻译后的调节机制. 蔗糖降解酶的同工酶定位在不同的区室, 行使着不同的功能. 它们的酶活性调节蔗糖进入不同的生化途径 (呼吸、细胞壁多糖类的生物合成和贮藏物积累); 韧皮部同化物卸出位点的转化酶活性; 液泡转化酶和蔗糖合成酶活性在库器官的作用及驱动蔗糖长距离运输; 蔗糖合成酶与植物在低温和厌氧等逆境条件下抗逆反应有关; 转化酶与植物防御反应和驱动细胞的伸长有关. 所以, 蔗糖降解酶在细胞的分化和发育中起着重要的作用.

参考文献 (References):

- WINTER H, HUBER S C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35(4): 253-289.
- MARTIN T, FROMMER W B, SALANOUBAT M, *et al.* Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in etabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs [J]. *Plant J*, 1993, 4(2): 367-377.
- DEJARDIN A, ROCHAT C, MAUGENEST S, *et al.* Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*pisum sativum* L.) [J]. *Planta*, 1997; 201(2): 128-137.
- CHOPRA J, KAUR N, GUPTA A K. Ontogenic changes in enzymes of carbon metabolism in relation to carbohydrate status in developing mungbean reproductive structures [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(5): 539-548.
- ZRENNER R, SALANOUBAT M, WILLMITZER L, *et al.* Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant J*, 1995, 7(1): 97-107.
- TANG G Q, STURM A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(4): 465-479.
- D' Aoust M A, YELLE S, NGUYEN-QUOC B. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(12): 2407-2418.
- CHOUREY P S, TALIERCIO E W, CARLSON S J, *et al.* Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 259(1): 88-96.
- NAKAI T, TONOUCI N, KONISHI T, *et al.* Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(1): 14-18.
- RICARD B, TOAI T V, CHOUREY P, *et al.* Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(4): 1323-1331.
- GORDON A J, MINCHIN F R, JAMES C L, *et al.* Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120(3): 867-878.
- ELLING L. Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains—a study on enzyme inhibition and enzyme topography [J]. *Glycobiology*, 1995, 5(2): 201-206.
- WANG A Y, KAO M H, YANG W H, *et al.* Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40(8): 800-807.
- HUANG J W, CHEN J T, YU W P, *et al.* Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expression [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(2): 233-239.
- SHAW J R, FERL R J, BAIER J, *et al.* Structural features of the maize *sus1* gene and protein [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(4): 1659-1665.
- WANG M B, BOULTER D, GATEHOUSE J A. A complete sequence of the rice sucrose synthase-1 (RSs1) gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 19(5): 881-885.
- FU H, PARK W. Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(9): 1369-1385.
- FU H, KIM S Y, PARK W D. High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene requires 5' and 3' flanking sequences and the leader intron [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(9): 1387-1394.
- STURM A, LIENHARD S, SCHATT S, *et al.* Tissue specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(2): 349-360.
- KOCH K E, NOLTE K D, DUKE E R, *et al.* Sugar levels modulate

- differential expression of maize sucrose synthase genes[J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 59-69.
- [21] HEIM U, WEBER H, BAUMLEIN H, *et al.* A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L. : expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation[J]. *Planta*, 1993, 191(3) : 394-401.
- [22] SALANOUBAT M, BELLARD G. The steady-state level potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration [J]. *Gene*, 1989, 84(1) : 181-185.
- [23] MARANA C, GARCIA-OLMEDO F, CARBONERO P. Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light[J]. *Gene*, 1990, 88(2) : 167-172.
- [24] DEJARDIN A, SOKOLOV L N, KLECZKOWSKI L A. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*[J]. *Biochem J*, 1999, 344 (2) : 503-509.
- [25] ESCHRICH W, ESCHRICH B. Control of phloem unloading by source activities and light [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 25: 625-634.
- [26] WEBER H, HEIM U, BUCHNER P, *et al.* Seed coat-associated invertases of Fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(11) : 1835-1846.
- [27] BENHAMOU N, GRENIER J, CHRISPEELS M J. Accumulation of β -fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen[J]. *Plant Physiol*, 1991, 97: 739-750.
- [28] KARUPPIAH N, VADLAMUDI B, KAUFMAN P B. Purification and characterization of soluble (cytosolic) and bound (cell wall) isoforms of invertases in barley (*Hordeum vulgare*) elongating stem tissue[J]. *Plant Physiol*, 1989, 91: 993-998.
- [29] LORENZ K, LIENHARD S, STURM A. Structural organization and differential expression of carrot β -fructosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 189-194.
- [30] HAOUAZINE-TAKVORIAN N, TYMOWSKA-LALANNE Z, TAKVORIAN A, *et al.* Characterization of two members of the *Arabidopsis thaliana* gene family, *At β fruct3* and *At β fruct4*, coding for vacuolar invertase[J]. *Gene*, 1997, 197: 239-251.
- [31] TYMOWSKA-LALANNE Z, KREIS M. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family[J]. *Planta*, 1998, 207(2) : 259-265.
- [32] GODT D E, ROITSCH T. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(1) : 273-282.
- [33] ROITSCH T, BIYNER M, GODT D E. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 285-294.
- [34] SILVA M P, RICARDO CPP. β -fructosidases and *in vitro* dedifferentiation-redifferentiation of carrot cells[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1507-1511.
- [35] ZHOU D, MATTOO A, LI N, *et al.* Complete nucleotide sequence of potato tuber acid invertase cDNA[J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 397-398.
- [36] CHENG W H, TALIERCIO E W, CHOUREY P S. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*INCW1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18) : 10512-10517.