

甘油-3磷酸转酰酶氨基酸与植物抗冷性关系初探*

杨明挚¹, 陈善娜^{**1}, 鄢波², 黄兴奇², 刘继梅¹

(¹ 云南大学生物系, 云南 昆明 650091)

(² 云南省农科院生物技术所, 云南 昆明 650223)

摘要: 甘油-3磷酸转酰酶(GPAT)与植物抗冷性密切相关。南瓜(*Cucurbita moschata*)与黑子南瓜(*Cucurbita ficifolia*)同属不同种,亲缘关系较近,但却存在显著的抗冷性差异。南瓜及黑子南瓜GPAT基因的克隆,可以使我们从二者推导的有限氨基酸的差异中对GPAT氨基酸组成及其与植物抗冷性作一定的探讨。发现在南瓜与黑子南瓜13个不同的氨基酸残基中有3个与抗冷性植物拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)、豌豆(*Pisum sativum*)、红花(*Carthamus tinctorius*)和菠菜(*Spinacia oleracea*)等相同,可能与黑子南瓜比南瓜更具抗冷性的原因有关。比较南瓜、黑子南瓜、豌豆、红花、拟南芥菜和菠菜等植物中GPAT基因推导的氨基酸序列发现,在比较抗冷的拟南芥菜、红花、豌豆和菠菜等植物中,虽然它们之间的亲缘关系都比较远,但某些位点上的氨基酸残基却完全相同,而与南瓜等抗冷性较差的植物不同,这些位点的氨基酸残基可能也与GPAT对底物酰基的选择性有关。

关键词: 甘油-3磷酸转酰酶(GPAT); 抗冷性; 氨基酸

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2000)02-0169-06

A Research on the Relationship between GPAT and Plant Chill - Resistance

YANG Ming - Zhi¹, CHEN Shan - Na¹, YAN Bo², HUANG Xin - Qi², LIU Ji - Mei¹

(¹ Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

(² Institute of Biotechnology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223)

Abstract: Glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT) is closely related to the plant chill-resistance. Squash(*Cucurbita moschata*) and figleaf gourd(*Cucurbita ficifolia*) are close in taxonomy but very different in chill-resistance. The cloning and sequence of figleaf gourd and squash give us a chance to study the relationship between GPAT and plant chill-resistance in molecular level, from a few different amino-acid residues compared with the two GPAT amino-acid sequences. Among thirteen different amino acid residues between squash and figleaf gourd, three of them are the same as those of chill-resistant plants, *Arabidopsis thaliana*, redflow(*Carthamus tinctorius*), pea(*Pisum sativum*) and spinach(*Spinacia oleracea*), which may related to the chill-resistant difference of squash and figleaf gourd. Compared with the GPAT amino acid among squash, figleaf gourd, *Arabidopsis thaliana*, spinach, pea, redflow, etc., some sites of

* 基金项目: 国家自然科学基金、云南省自然科学基金和云南省教委基金资助项目

** 通讯作者

收稿日期: 1999-04-22, 1999-10-29 接受发表

amino acid are the same in chill - resistant plants but different from squash, figleaf gourd and cucumber.

These amino acids may also related to the selectivity of GPAT to different fatty acids in different plants.

Key words : GPAT ; Chill - resistance ; Amino - acid

低温是导致作物减产及植物死亡的重要原因之一。至今,低温对植物的伤害尚未找到根本的解决途径。因此,探索植物抗冷性的生理机制及其遗传因素不仅具有理论意义,在解决生产实际问题中也有广泛的应用价值。大量的研究表明植物生物膜中磷脂酰甘油(PG)分子种的饱和程度与植物抗冷性密切相关,甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)是PG生物合成过程中的第一个酰基酯化酶,其对底物的选择性对决定PG分子种的不饱和程度起着关键性作用(Murata等,1992;Frentzin等,1983)。

国外已先后从冷敏植物南瓜(*Cucurbita moschata*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)以及抗冷性植物拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)、红花(*Carthamus tinctorius*)、豌豆(*Pisum sativum*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)等少数植物中获得了GPAT基因的cDNA或DNA片段,由于它们之间的亲缘关系较远(几乎分属于不同的目),基因推导的氨基酸序列间差异较大,难于从氨基酸组成等方面作出有用的推测。笔者等通过RT-PCR方法分离克隆了云南高原作物黑子南瓜(*Cucurbita ficifolia*)的该基因的cDNA并进行了序列分析。由于南瓜和黑子南瓜亲缘关系较近,其GPAT基因推导的氨基酸序列间差异不大,但却有显著的抗冷性差异,因此可以此为突破口从分子水平上对GPAT与植物抗冷性关系作一些探讨。

1 材料和方法

1.1 各种植物中GPAT氨基酸序列的来源:1)南瓜(Ishzaki等,1988);2)黄瓜(Thomas等,1992);3)拟南芥菜(Hishida等,1993);4)菠菜(Nishizawa等,1994);5)红花(Bhilla等,1994);6)豌豆(Webe等,1991);7)黑子南瓜(杨明攀等,1999)。

1.2 方法:依据几种植物的不同抗冷性,从剪切位点开始,对应排列出不同植物GPAT基因推导的氨基酸序列。由于导肽部分的同源性较低,长度差异大,与酶活性功能无关,因此都从剪切位点开始排列。从12个南瓜与黑子南瓜不同的氨基酸残基入手,并从不同抗冷性植物中GPAT氨基酸序列间的差异来探讨GPAT氨基酸与植物抗冷性关系。

2 结果与讨论

2.1 不同植物中GPAT氨基酸序列比较(图1)

2.2 讨论

在所涉及的7种植物GPAT基因cDNA序列推导的这段约367个氨基酸的序列中,完全相同的氨基酸残基有163个(图中用“*”标出),约占44.4%,比较保守的氨基酸残基(5种以上的植物在相应位点上都为同一种氨基酸残基)有289个,占81.2%。这些比较保守的氨基酸残基与GPAT酶的总体功能及特性有关而与植物种类和不同抗冷性(或对底物的不同选择性)应无太大关系。那些约占19%变化较大的氨基酸残基或区段才可能与植物种属特性及不同抗冷性有关。

南瓜与黑子南瓜在这一段序列中有12个氨基酸残基(图中用黑体标出)的差异,这

F: EPAHSRKFLDVRSEEEELLSICKKETEAGKLPNVAAAGMEE
 S: EPAHSRKFLDVRSEEEELLSICKKETEAGKLPNVAAAGMEE
 G: DPPHSRAFLDIRSEEEELLSICKKETEAGRLPSNVAAGMEE
 A: ELNHSRTFLDARSEQDLLSGIKKEAEAGRLPANVAAGMEE
 T: DHGHSRTFI DARSEQDLLSGIQRELEAGTLPKHIAQAMEE
 P: SSVSSRTFLNAQNEQDVLSGIKKEVEAGTLPASIAAGMEE
 S: QL LRS RTYRN VRSAEELLSEIKRESE I GRLPKSVAYAMEG

* * * * . . * * . * * * . . * . . * * .

F: LYQNYRNAVIESGNPKADEIVLSNMTVALDRILLDVEDPF
 S: LYQNYRNAVIESGNPKADEIVLSNMTVALDRILLDVEDPF
 G: LYQNYKNAVFEESGNPKADEIVLSNMTVALDRILLDVEDPF
 A: LYWNYKNAVLSGASRADETVVSNMSVAFDRMLLGVEDPY
 T: LYQNYRNAVLSQAAPHAEDIVLSNMRVAFDRMFLDVKEPF
 P: VYLYNYKSAVAKSGDPKAN EIVLSNMTALLDRIFLDVKEPF
 S: LFHYRYRNAVLSGISHADEIVLSNMSVMLDFVLLDIEDPF

. *

F: VFS P HHKAI REPF DYYM FGQKYI RPLIDFGNSFVGNLYLF
 S: VFS SHHKAIREPF DYYI FGQNYI RPLIDFGNSFVGNLSLF
 G: MFS P HHKAI REPF DYYT FGQNYVRPLIDFENSFVGNLLLF
 A: TFN P YHKAVREPF DYYM FVHTYIRPLIDFNSFVGNASIF
 T: EFS P YHEAILEPFNYM FGQNYI RPLLVNFRS YVGNVSVF
 P: VFE A HHKAKREPF DYYM FGQNYI RPLVDFETS YVGNMPLF
 S: VFP P FHKAI REPAD YYS FGQDYI RPLVDFGNSYVGNIAIF

* # * . * . * * . . * * # * . . * . * * * . . * . . * * * * *

F: KDI EEK LQQGHNVVLSNHQTEADPA I ISLLEKTNPYIA
 S: KDI EEK LQQGHNVVLSNHQTEADPA I ISLLEKTNPYIA
 G: KDI EEK LHQGHNVVLSNHQTEADPA I ISLLEKTNPYIA
 A: SELEDKIRQGHNIVLSNHQSEADPAV ISLLEAQS PFIG
 T: GVMEEQLKQGDVVLISNHQTEADPAV IALMLET TNPHIS
 P: IQMEEQLKQGHN I I LMSNHQSEADPA I IALLLEMRLPHIA
 S: QEMEEKLKQGDN I I LMSNHQSEADPAV IALLLEKTN S LIA

* * * * * . . * . * * * * * * * * * * * * * * * *

F: ENTI FVAGDRV I DPLCKPFS IGRNLCVYSK KHM LDI PE
 S: ENTI FVAGDRV I DPLCKPFS IGRNLCVYSK KHM FDI PE
 G: ENMI FVAGDRV IADPLCKPFS IGRNLCVYSK KHM LDI PE
 A: ENIKCVAGDRVITDPLCKPFS MGRNLCVYSK KHMNDVPE
 T: ENIIYVAGDRVITDPLCKPFS MGRNLCVYSK KHMNDVPE
 P: ENLIYVAGDRVITVPLCKPFS MGRNLCVYSK KHM LNDNPE
 S: ENLIYIAGDRVITDPLCKPFS MGRNLCVYSK KHM LMYDPE

* * . . . * * * * * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * *

F: LAETKR NANTRS LKE MALLRGGSQLI W IAPSGGRDRPDP
 S: L TETKRKA NTRSLKE MALLRGGSQLI W IAPSGGRDRPDP
 G: LAETKRKA NTRSLKE MALLRGGSQLI W IAPSGGRDRPDP
 A: LVDMKRKA NTRSLKE MATMLRSGGQLI W IAPSGGRDRPNP
 T: LAEMKRS NTRSLKGRMALLRGGSQLI W IAPSGGRDRPDP
 P: LVDMKRKA NTRSRKE MALLRSGSK I I W IAPSGGRDRPVA
 S: LVDVKKRANTRSLDE LVLLRGGSK I I W IAPSGGRDRPDA

* . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

F: LTGEWYPAPFDASSVDNMRRLVQHS DVPGLHFLPLALLCHD
S: STGEWYPAPFDASSVDNMRRLIQHSDVPGHLFPLALLCHD
C: STGEWYPAPFDASSVDNMRRL LQHSGAPGHLYPLA LLCYD
A: STGEWFAPFDASSVDNMRRLVEHSGAPGHIYPMSLLCYD
T: ITNQWFAPFDATS LDNMRRLVDHAGLVGHIYPLA ILLCHD
P: NSGEWAPAPFDSSVDNMRRLVDHSGP P GHIYPLA ILLCHD
SP: VTGEWYPGTF DFAALDNMRRLVEHAGR P GHIYPLA LLCYD
      . . . * * . . * * . . . . * * * * * # * . . . * * . . * * . . * * . . *

```

```

F: IMPPPSQVEVEIGEKRVIAFNGAGLSVAPEISFNEIAATH
S: IMPPPSQVE EIGEKRVIAFNGAGLSVAPEISFEEIAATH
C: IMPPPSQVEIEIGEKRVISFNGAGLSVGPESISFDEIAATH
A: IMPPPPQVEKEIGEKRLVGFHGTGLSIAPEINFS DVTALC
T: IMPPP LQVEKEIGEKSWISFHGTGISVAPEIN FQEVTA SC
P: IMPPP LKV EKEIGEKRIISYHGTGISVAPEISFSNTTAA C
SP: IMPPPA QVEKEIGEKRVMSFHGVGV SVEPEINYN DNSLCC
      * * * * * . * * * * * * * . . . . * * * * * * * . . .

```

```

F: KNPEEVREAYS KALFDSVAMQYTVLKT AISGKQGLGASTA
S: KNPEEVREAYS KALFDSVAMQYNVLKTAISGKQGLGASTA
C: DNPDEVREAYS KALFDSVAQYMLVKA AIPGKQGLEASVA
A: ESPNEAKEAYSQA IYKSVNEQYEILNSAIK HRRGVEASTS
T: GSP EAKAAYSQALYDSVS EQYMLVLSAVHGGKGLEASTP
P: ENPEKAKDAYTKALYDSVT EQYDVLKSAIHGKKG LQA STP
SP: KND EEA KSVYGQALYNSVN EQYNVLKAAIHGKQGS GA STP
      . . . . . . . . . * * . . * * * * . * . * . . . * * . .

```

```

F: DVSLSQPW
S: DVSLSQPW
C: DVSLSQPW
A: RVSLSQPWN
T: S V S L S Q P L Q F L D
P: V V S L S Q P W K
SP: T T S L S Q P W
      . * * * * * .

```

图1 黑子南瓜 (*Cucurbita ficifolia*) 与南瓜 (*Cucurbita moschata*) 黄瓜 (*Cucumis sativus*) 拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) 红花 (*Carthamus tinctorius*) 菠菜 (*Spinacia oleracea*) GPAT 基因 cDNA 序列递推的氨基酸顺序比较 (从剪切位点开始)。几种植物中完全相同的氨基酸残基用星号“*”标出。相对保守的氨基酸残基用点“.”标出 (在相应位点上有五个以上植物相同的氨基酸残基或只有两种氨基酸残基); 与南瓜不同的黑子南瓜氨基酸残基及其相应位置上其他植物的氨基酸残基用黑体字表示, 其中黑子南瓜与抗冷性植物相同的氨基酸残基用“#”标出; 字母分别表示不同植物, 其中: S: 南瓜; F: 黑子南瓜; C: 黄瓜; A: 拟南芥菜; T: 红花; P: 豌豆; SP: 菠菜。

Fig 1 Alignment of amino acid sequences deduced from the GPAT gene cDNAs between figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) and arabisidopsis (*Arabidopsis thaliana*), redflow (*Carthamus tinctorius*), spinach (*Spinacia oleracea*) (start from processing sites). Identical residues are marked by an asterisk and most homologous ones by a point. The amino acid residues of figleaf gourd, which are different from those of squash, and the corresponding amino acid residues in other plants are marked by dark letters.

些不同的氨基酸残基将在一定程度上导致南瓜与黑子南瓜 GPAT 酶空间构象的不同。例如: 从剪切位点起第 84 个氨基酸, 南瓜为丝氨酸而黑子南瓜为脯氨酸。脯氨酸是一种最具立体

化学效应的氨基酸，它的环形侧链包含了主链的一部分，封闭的环使角固定为 -60 度左右，常形成一个转角，改变主链的方向。而且它仅有一个可变的主链构象角，并缺少形成氢键所需的 $-NH-$ ，以及它具有空间障碍等，对规则的二级结构都具破坏性（卢光莹等，1997）。南瓜第 101 个氨基酸为中性的天冬氨酸而黑子南瓜为碱性带电荷的赖氨酸，而第 207 个氨基酸又恰好相反；第 117 个氨基酸南瓜为丝氨酸，黑子南瓜为酪氨酸，丝氨酸有羟基而酪氨酸有苯环；南瓜第 202 个氨基酸为苏氨酸而黑子南瓜相应位点上为小分子的丙氨酸；此外，疏水性氨基酸苯丙氨酸与亮氨酸，缬氨酸与异亮氨酸，蛋氨酸与异亮氨酸，亮氨酸与苯丙氨酸等差异也将一定程度上导致 GPAT 疏水核心空间构象的不同。这些氨基酸差异可能与南瓜与黑子南瓜间的抗冷性差异有关。比较黄瓜、豌豆、红花、菠菜和拟南芥菜 GPAT 氨基酸序列中上述南瓜与黑子南瓜 12 个不同的氨基酸残基相应位点上的氨基酸残基发现：从剪切位点起第 84 个氨基酸南瓜为丝氨酸，而黑子南瓜、黄瓜、拟南芥菜、豌豆、菠菜和红花中均为脯氨酸；南瓜第 97 个氨基酸为异亮氨酸而黑子南瓜、豌豆、拟南芥菜和红花中均为蛋氨酸；此外，第 262 个氨基酸，南瓜与黄瓜分别为亮氨酸和异亮氨酸，而其他 5 种植物在此位点上均为缬氨酸。其他的氨基酸残基在不同植物的相应位上都变化较大。南瓜属冷敏植物，黄瓜的抗冷性稍强，拟南芥菜是公认的强抗冷性植物，此外，红花、豌豆和菠菜由于其生长季节也具有较弱的抗冷性。黑子南瓜 GPAT 上述 3 个位点上的氨基酸残基（用“#”标出）与拟南芥菜等具有较强抗冷性的植物相同，可能与黑子南瓜比南瓜更具抗冷性的有关。

在南瓜与黑子南瓜 12 个不同的氨基酸残基中，有两个氨基酸残基（第 261 号和第 290 号）在南瓜中为异亮氨酸而在黑子南瓜相应位点上为缬氨酸，缬氨酸比异亮氨酸少 1 个“ $-CH_2-$ ”基团。缬氨酸和异亮氨酸都为疏水性氨基酸，一般位于酶的内部。从序列中看，这两个氨基酸很可能处于酶的活性中心位置，因为：1）两个氨基酸残基的附近均含有较多的带电氨基酸如：精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸；2）含有较多的疏水性或位于内外均可的一些氨基酸残基；3）含有长位于酶活性中心带有“ $-OH$ ”基团的丝氨酸、苏氨酸等；4）两个氨基酸残基之前均有两个或多个相连的，具有很强立体化学效应的脯氨酸。GPAT 与植物抗冷性有关主要是居于其对 $C_{18:1}$ 和 $C_{16:1}$ 两种脂肪酰基选择性的差异，抗冷性植物主要选择 $C_{18:1}$ 而冷敏植物主要选择 $C_{16:1}$ ， $C_{18:1}$ 比 $C_{16:1}$ 多两个“ $-CH_2-$ ”基团，分子稍大一些。GPAT 酶的识别中心在总体构象不变的情况下少两个“ $-CH_2-$ ”基团可能使 GPAT 酶更容易包容分子较大的 $C_{18:1}$ ，从而增加对 $C_{18:1}$ 的选择机会，增加膜脂中的不饱和脂肪酸含量，进而提高植物的抗冷性。

南瓜与拟南芥菜、红花、菠菜和豌豆分属于不同的目，亲缘关系都比较远，GPAT 基因 cDNA 推导的氨基酸序列的同源性都小于 70%。但在很多位点上，抗冷性较强的拟南芥菜、豌豆、菠菜和红花中都为相同的氨基酸残基而抗冷性较弱的其它 3 种葫芦科植物中为其它的氨基酸残基，这样的位点有第 7 号、181 号、290 号、301 号、320 号、326 号、335 号和 340 号氨基酸（这些氨基酸在图中被涂黑），这些氨基酸多为疏水性、带电荷或有活性基团等的氨基酸，大多位置比较集中。这些氨基酸也极可能与抗冷性植物中 GPAT 对 $C_{18:1}$ 的优先选择性有关，同时也可能是黑子南瓜虽然比南瓜黄瓜等抗冷性强，但抗冷性却不及拟南芥菜等植物的因素之一。

参 考 文 献

- 卢光莹, 华子干, 1995, 生物大分子晶体学基础 [M]. 北京: 北京大学出版社, 86~93
- 杨明攀, 陈善娜, 鄢波等, 1999. 黑子南瓜 GPAT 基因的克隆及序列分析 [J]. 云南植物研究, **21** (2): 139~144
- Murata N, Takihashi N, 1992. Compositions and positional distributions of fatty acid in phospho-lipids from leaves of chilling-resistant plants [J]. *Plant Cell Physiol*, **23** (6): 1071
- Murata N, 1983. Molecular species composition of phosphatidyl glycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants [J]. *Plant Cell Physiol*, **24**: 81
- Frentzin M, Heins E, Mekeon A *et al*, 1983. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts [J]. *FEBS*, 129~625
- Ishizak O, Nishide I, Agata K *et al*, 1988. Cloning and nucleotide glycerol-3-phosphate acyltransferase from squash [J]. *FEBS*, **238** (2): 424~430
- Hishida I, Tasaka Y, shiraishi H *et al*, 1993. The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, **21**: 267~277
- Thomas C Johnson, Jane C *et al*, 1992. Nucleotide sequence of Acyl Carrier Protein: glycerol-3-phosphate Acyltransferase from Cucumber [J]. *Plant Physiol*, **99**: 771~772
- Webe S, Wolter FP, Buck F *et al*, 1991. Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl-Acp: sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea [J]. *Plant Molecular Biology*, **17**: 1067~1076
- Bhilla R S, Mackenzie S L, 1994. Nucleotide sequence of a cDNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycer-3-phosphate acyltransferase [J]. *Plant Physiol*, **106** (4): 1713~1714