

植物 ACC 合成酶的分子生物学

万小荣^{1,2}, 李玲¹ (1. 仲恺农业技术学院生命科学学院, 广东广州 510225; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要 论述了 ACC 合成酶的分子生物学研究进展, 阐述了系统1 乙烯和系统2 乙烯形成过程中 ACC 合成酶基因的表达特点。

关键词 ACC 合成酶; 系统1 乙烯; 系统2 乙烯

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00654-02

Research Advance in the Molecular Biology of ACC Synthase of Plant

WAN Xiao-Rong et al (College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou, Guangdong 510225)

Abstract The research progress in the molecular biology of ACC synthase of plant, a key enzyme involved in ethylene biosynthetic pathway, was reviewed in this paper. Particularly, the expression pattern of the gene encoding ACC synthase was overviewed during the system1 and system2 of ethylene formation in plant.

Key words ACC synthase; System1 ethylene; System2 of ethylene

1-氨基环丙烷羧酸合成酶(ACC synthase, ACS)是植物体内乙烯生物合成途径中的限速酶,在调节乙烯形成中起关键作用。ACS在植物组织中很不稳定、丰度低,难于分离纯化。但ACS基因的分子克隆及其在大肠杆菌和酵母中的功能表达大大推动了该酶的生物化学和分子生物学研究。

1 ACC 合成酶多基因家族及其差异表达

1989年,Sato和Theologis首先在夏南瓜(*Zucchini*)中分离到编码ACS的基因,他们通过获取夏南瓜果实ACC合成酶抗血清(其中包含有ACC抗体),得到了高纯度的ACC合成酶蛋白,进而利用纯化的ACC合成酶抗体去分离ACS基因。现通过低严紧型杂交和简并PCR(degenerate PCR)方法已在许多植物中克隆到ACS同系物。ACC合成酶是由多基因家族编码的,经研究的所有植物都存在一个以上的ACS基因。番茄有9个,分别响应番茄植株在对应诸如生长素、淹水、创伤反应、果实成熟等过程中所需要的乙烯生物合成反应,其中6个为生长素诱导;绿豆下胚轴中至少有6个;拟南芥基因组中有12个。不同的发育、环境、激素刺激等信号诱导不同组的ACC合成酶基因表达。表1阐述了一些植物中ACS基因在响应发育、激素和环境刺激时的差异表达情况。

表1 ACC合成酶基因的差异表达

	ACS 基因	表达调控
拟南芥 ACSs	AACS4	生长素快速诱导
	AACS5	响应低水平细胞分裂素诱导
	AACS6	臭氧胁迫下高表达
番茄 ACSs	RIN, LeACS2 和 LeACS4	响应果实成熟;形成第二系统乙烯
	LeACS3 和 LeACS9	淹水胁迫诱导
	LeACS6	成熟绿果中表达;参与第一系统乙烯形成
蝴蝶兰 ACSs	ACS1	乙烯和生长素诱导
	ACS2	柱头中表达;生长素诱导
	ACS3	子房中表达;生长素诱导
马铃薯 ACSs	ACS4	臭氧缓慢诱导
	ACS5	臭氧快速诱导
夏南瓜 ACS	ACC1 A	果实中表达;受伤害和生长素诱导

根据果实成熟过程中乙烯生成量的变化,McMurtrie等首次提出第1系统乙烯和第2系统乙烯的观念^[1]。第1系统乙烯指具有呼吸跃变的果实在呼吸跃变前所产生的基础水平的少量乙烯;随着果实成熟,伴随呼吸跃变产生的大量乙烯称为第2系统乙烯。随着这方面研究的进展,近年来杨祥发研究小组在此基础上提出了第1系统乙烯和第2系统乙烯在果实成熟过程中的作用模型^[2]。在番茄果实成熟过程中,ACC合成酶LeACS2和LeACS4基因的表达导致第2系统乙烯的显著增加,这2个基因的转录本分别在呼吸跃变前和呼吸跃变过程中迅速累积,而且可以在成熟绿果中被低量乙烯诱导表达,其中,LeACS2基因转录本在呼吸跃变过程中的累积量是LeACS4的10倍之多。目前,人们普遍认为LeACS2和LeACS4基因的表达是导致番茄果实呼吸跃变和果实成熟过程中产生大量乙烯(第2系统乙烯)的主要原因。这一论点已被反义RNA技术所证实:反义LeACS2转基因的番茄果实如不经外源乙烯处理则无法成熟。

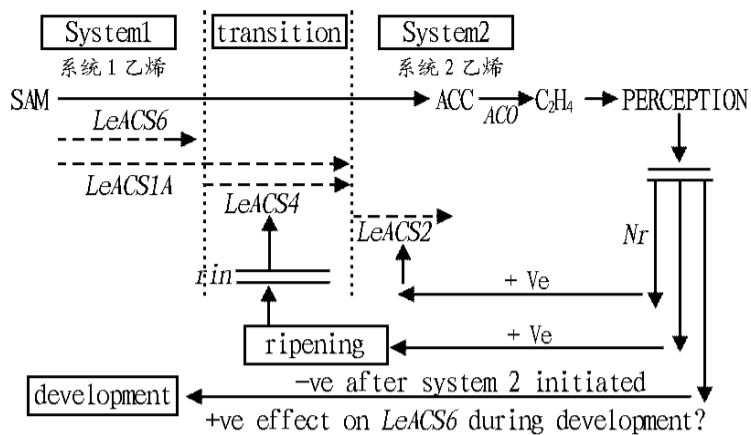
与此相反,目前对于第1系统乙烯生成的调节及其在果实成熟过程中的作用都了解甚少。1997年杨祥发实验室从番茄中克隆到一个新的ACC合成酶LeACS6的cDNA^[3],最近,Nakatsuka等发现这一ACC合成酶可能参与第1系统乙烯的合成:LeACS6 mRNA在番茄绿果中累积但在果实成熟过程中消失,以乙烯结构类似物处理可以抑制LeACS6基因在绿果中表达,而乙烯作用抑制剂则可诱导该基因在成熟番茄果实中表达^[4]。这说明在番茄果实中第1系统乙烯和第2系统乙烯的合成是分别通过对特定的ACC合成酶基因的负向和正向反馈控制来调节的。在系统1和系统2乙烯形成过程中,ACS基因存在着差异表达。在番茄绿果和营养组织中LeACS6和低水平LeACS1A基因表达很可能调控着系统1乙烯的形成。有人提出乙烯对系统1乙烯合成起负调控作用,证明乙烯对营养器官中ACS酶活性和基因表达起负调控作用。此外,在幼苗中也检测到了低水平的LeACS1B转录本,但其丰度不受乙烯影响。在番茄果实成熟过程中,ACC合成酶基因LeACS2的表达控制第2系统乙烯的合成。总之,在番茄果实发育过程中乙烯生物合成受ACS基因家族中不同成员的调控:LeACS6和低水平LeACS1A基因负责系统1乙烯的低速率合成,在呼吸跃变前果实中受乙烯负调控;在成熟果实中,LeACS2是系统2乙烯形成的主要基因,受乙烯正调

基金项目 仲恺农业技术学院博士科研启动基金(G2360225)。

作者简介 万小荣(1977-),男,江西南昌人,博士,讲师,从事植物分子生物学及植物基因工程研究。

收稿日期 2006-10-10

控; *LeACS4* 基因可能负责由系统1 向系统2 乙烯过渡期的乙烯形成(图1)^[5]。



注: +ve 和 -ve 分别表示在乙烯信号转导途径中乙烯对 ACS 基因表达的正向或负向调控作用。

图1 系统1 向系统2 乙烯合成过渡过程中 ACS 基因表达的调控模型

2 ACS 的酶学性质和多态性

从生长素处理的绿豆下胚轴、番茄、笋瓜和苹果等的果实中分离到 ACS, 证明该酶存在于组织的胞质中, 专一地以 S-腺苷蛋氨酸(AdoMet) 为底物, 磷酸吡哆醛(PLP) 作为辅基, 氨基乙氧基乙烯基甘氨酸(AVG) 和氨基氧乙酸(AOA) 是 ACS 的竞争性抑制剂。对 AVG 的 K_i 为 $0.12 \sim 10 \mu\text{mol/L}$, 从不同组织提取的酶的 $K_m(\text{AdoMet})$ 为 $12.1 \sim 60 \mu\text{mol/L}$, 反应的最适 pH 值 $8.5 \sim 9.5$ 。细胞内 ACS 很易失活, 半衰期短, 如番茄果实的 ACS 的半衰期只有 25 min ^[6]。ACS 对 AdoMet 有严格的立体化学专一性。天然存在的 AdoMet 是 (-)-L-AdoMet, 用非天然的 (+)-L-AdoMet 作为基质是无活性的, (+)-D-AdoMet 作基质也完全无活性。不同植物品种或同一品种在不同外界条件刺激下新合成的 ACS 性质各异, 说明植物体中具有多种 ACS 同工酶, 不论是品种还是组织, 成熟型(R 型) 酶、伤害型(W 型) 酶和生长素型(A 型) 酶是由特定刺激所表达的 3 种不同的基因产物。植物组织中 ACS 的存在形式也不同, 有单体和二聚体之分。所有 ACS 的编码区都有一定的同源性, 氨基酸序列一致性变幅为 $50\% \sim 90\%$, 不同植物的 ACS 的 M_r 颇为相似, 如番茄的为 55 kD , 康乃馨的为 58 kD 。RNA 印迹表明, 不同的 ACS mRNA 大小为 $1.8 \sim 2.1 \text{ kb}$, 各种 ACS 的最大同源性部分是在多肽的内部, 酶的活性中心位于保守区域, 该中心含有一个赖氨酸残基, 这个残基和结合辅酶 PLP、催化该酶反应并和参与依赖基质的酶钝化有关, 而差异最大的是在 C 端^[6]。

3 乙烯与其他植物激素相互作用

拟南芥 *ACS5(AtACS5)* 基因的表达调控充分体现了植物激素之间的相互作用。细胞分裂素能以依赖于乙烯的方式诱导植物三重反应。黄化幼苗中乙烯的形成对细胞分裂素的响应呈现双相剂量反应, 这表明存在着 2 条相互独立的途径介导依赖于细胞分裂素的乙烯生物合成^[7]。在低剂量细胞分裂素响应途径中生成的乙烯量足以诱导三重反应, 这使

分离出对低浓度细胞分裂素不敏感的拟南芥突变体得以成功, 然而, 这些细胞分裂素不敏感突变体(*cin*) 在响应高剂量细胞分裂素和乙烯时与野生型植株没什么区别。隐性突变体 *cin5* 是过表达显性突变体 *eto2* 基因的等位基因, *ETO2* 基因编码 ACC 合成酶同系物 ACS5, 已有的证据表明它的表达在转录后水平调控: 首先, 细胞分裂素只能诱导一定量(不到 2 倍) 的 ACS5 mRNA 表达, 但能使乙烯水平增加 8 倍; 对 *eto2* 突变体的序列分析表明其 ACS5 基因发生了移码突变, 导致 ACS5 蛋白 C 端 12 个氨基酸被替换了, 但这种突变并不影响 ACS5 mRNA 水平, 而是这替代的 C 端区域影响了蛋白的积累、定位或是活性^[7]。ACS5 等位基因突变体的表型表明, 细胞分裂素的一些作用是需要乙烯响应途径来介导的, ACS5 等位基因突变体 *eto2* 的鉴定进一步确证 ETO2 基因编码乙烯生物合成调节剂。

4 应用展望

乙烯在果实成熟中起着十分重要的作用, ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因的克隆使科学家能充分利用生物技术来减少果实成熟时乙烯的形成, 以延长果实的贮存期。一是在番茄生产中, 利用 Ti 质粒介导转反义 ACS 或 ACO 基因控制果实成熟。在转基因番茄中, 反义 ACS 转录本会与正义 ACS 转录本配对结合并使正义 ACS 转录本失活, 这样有效地关闭了正义 ACS 基因的表达, 从而减少果实中乙烯的形成; 二是利用 ACC 或 SAM 代谢酶基因降低转基因番茄中乙烯的形成。通过上述方法获得的转基因番茄果实都呈现出明显的成熟延迟, 转反义 ACS 基因番茄果实只有当外施乙烯时才能成熟。现在这些相似的方法正在应用于重要的农作物上, 如各种瓜和香蕉等。另外, 这些方法也用于延缓花卉衰老, 进而减少采后损失。对 ACC 合成酶基因的研究为基础研究能改进农作物和园艺植物的品质提供了一个最好的例子。

参考文献

- [1] MCMURCHE EJ, MCGLASSON WB, EAKSI L. Testnet of fruit with propylene gives information about the biosynthesis of ethylene[J]. *Nature*, 1972, 237: 235-236.
- [2] OELIKER J H, YANG S F. The role of ethylene in fruit ripening[J]. *Acta Hort*, 1995, 398: 167-178.
- [3] OELIKER J H, OLSON D C, SHUO Y, et al. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by diethyl in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *Hort Mol Biol*, 1997, 34: 275-286.
- [4] NAKATSUKA A, MRACH S, OKUNSH H, et al. Differential expression and internal feedback regulation of ACC synthase, ACC oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening[J]. *Hort Physiol*, 1998, 118: 1295-1305.
- [5] BARRY CS, ILOP TOUS MI, GRIERSON D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system1 to system2 ethylene synthesis in tomato[J]. *Hort Physiol*, 2000, 123: 979-986.
- [6] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 493-509.
- [7] JOHNSON P R, ECKER J R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective[J]. *Annu Rev Genet*, 1998, 32: 227-254.