

植物乙酰辅酶A羧化酶亚基 accD 在因研究进展

崔燕 祝建波 张煜星* (石河子大学生命科学学院农业生物技术实验室, 新疆石河子 832003)

摘要 综述了乙酰辅酶A羧化酶及其催化域羧基转移酶(Carboxyltransferase, CT)的亚基(-CT)的分布和生理功能、-CT编码基因 accD 的分子生物学特征及乙酰辅酶A羧化酶在脂肪酸代谢工程中的应用研究进展。

关键词 乙酰辅酶A羧化酶; 羧基转移酶 亚基; accD 基因; 脂肪酸代谢工程

中图分类号 Q552 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05255-02

Research Progress on Plant Acetyl-CoA Carboxylase

CUI Yan et al (Laboratory of Agricultural Biotechnology, College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract The research progress on the distribution and biological functions of acetyl-CoA carboxylase and its catalytic domain carboxyltransferase (CT) subunit, the molecular biological characteristics of the coding gene accD of -CT and the application of acetyl-CoA carboxylase in fatty acid metabolism engineering were summarized.

Key words Acetyl-CoA carboxylase; Carboxyltransferase subunit (-CT); accD gene; Fatty acid metabolism engineering

乙酰辅酶A羧化酶(Acetyl-CoA Carboxylase, ACCase)属于生物素包含酶,它在生物体内催化乙酰辅酶A羧化形成丙二酰辅酶A,为脂肪酸和许多次生代谢产物的合成提供底物^[1]。ACCase是脂肪酸生物合成的关键酶或限速酶,是碳流进入脂肪酸生物合成的重要调控位点^[2]。此外,ACCase也是几类化学除草剂作用于植物的靶。迄今为止,关于动物、植物和微生物中ACCase的相关分子生物学研究屡见报道。

1 乙酰辅酶A羧化酶的类型和分布

生物体中ACCase有2种类型。一种是异质型(Heteromeric),也称多亚基或原核型ACCase,存在于细菌及双子叶植物和非禾本科单子叶植物的细胞质中。异质型ACCase包含4个亚基,即生物素羧化酶(Biotin carboxylase, BC)、生物素羧基载体蛋白(Biotin carboxyl Carrier Protein, BCCP)以及羧基转移酶的2个亚基-CT和-CT,其中前2个亚基组成BC和BCCP域,后2个亚基构成CT催化域。在有活性的状态下异质型ACCase的BC和BCCP亚基呈现同型二聚体,而-CT和-CT亚基呈现异型二聚体。异质型ACCase不稳定,容易解离^[2]。另一种ACCase称为同质型(Homomeric),亦称多功能或真核型,存在于动物、酵母、藻类及植物的胞质溶胶中,具有一个相对分子量为220~260的生物素包含亚基。这类单亚基ACCase含有3个功能域,在序列上对应于异质型ACCase的BC、BCCP、-CT和-CT组分,但与异质型ACCase不同,同质型ACCase的3个功能域融合成多肽链,并以同型二聚体的形式出现,结构上更为稳定而难以解离。不同生物来源的同质型ACCase具有相同的组织结构形式:NH₂-BC-BCCP-CT-COOH^[2]。这两种同工型ACCase在植物中的定位有2个例外。一个是油菜的叶绿体中可能同时包含两种同工型ACCase。另一个例外是禾本科植物,它们的质体和胞质溶胶中的ACCase都属于真核类型^[3]。

目前已从多种植物中克隆到了ACCase基因的全长序列,如苜蓿(GenBank L25042)、拟南芥(GenBank L27074 D34630)、大豆(GenBank L42814)、油菜(GenBank X77576)、小麦(GenBank AF029895 U10187)、玉米(GenBank U19183)。同质型

ACCase的一条多肽链上包含有BC、BCCP和-CT 3个功能域,并都是由单一核基因编码。异质型ACCase的3个可分离的亚基BC(accC编码)、BCCP(accB编码)和-CT(accA编码)是由核基因组编码的,第4个亚基-CT(accD编码)由叶绿体基因组编码^[4]。目前对同质型ACCase的3个功能域了解较少,对异质型ACCase的4个亚基在多种植物中都有所研究。这4个亚基中由叶绿体基因组中的accD基因编码的-CT较为特殊。而在禾本科植物中,accD基因编码的-CT或者已被短截,仅残存一个短的C端区域,如水稻;或者完全缺失,如小麦^[3]。

2 -CT编码基因 accD 的研究进展和分子生物学特征

近几年对叶绿体基因组编码的-CT的研究不断深入,对-CT编码基因accD的分子生物学特征也有了进一步认识。Jinshan等^[5]用烟草的含accD的DNA片段与拟南芥文库杂交,分离到编码拟南芥异质型ACCase-CT亚基的accD基因。分离到的单杂交克隆为一个2.95 kb具有Hind III-Kpn I酶切位点的accD杂交片段并测序。这个片段在它的Hind III末端包含一个不完整的98 kb ORF,与C端rbcL的32残基具同源性。98 kb ORF之后是1 464 bp ORF,这个1 464 bp ORF的氨基酸序列与E. coli的accD多肽具有37%的同源性,分别与豌豆、烟草和油菜的accD多肽具有48%、67%、91%的同源性。

Sang等^[6]从马铃薯叶片叶绿体DNA中克隆到了accD并与GenBank进行比对(Genbank AF069288)。马铃薯accD(saccD)全长2 487 bp,5'端上游启动子区614bp,ORF 1 524 bp。其N端缺乏能够识别的基序,而在C端含有5个基序,在这些基序中,基序II PLIIVCASGGARMOE存在于所有得到accD序列的植物、动物和E. coli中。saccD具有典型的原核启动子标志TTGACA和TAICAA,分别在saccD的-184区和-160区,与PEP(质体编码rRNA聚合酶)序列相似,推断为PEP启动子识别位点。其他accD中,如gaccD(Soybean)、ptaccD(Pinus thunbergii)和e-vaccD(Epifagus virginiana)中并没有相一致的推断出的PEP启动子位点。saccD的第301个氨基酸和C端之间是高度保守区,在这段区域内已明确了5个氨基酸序列,GSMGCVVG和PLIIVCASGGARMOE基序存在于所有植物accD和E. coli accD中,而其他保守基序QMAKISSAL、DTTGGVTASFGMLGDILAEP和

作者简介 崔燕(1982-),女,山西介休人,硕士研究生,研究方向:植物基因工程。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-03

FAGKRMIEQTL 在水稻 *accD* 中不存在。在质体和胞液 *accD* 中共有的序列为基序 II PLIIVCASGGARMQE 和它的变形基序。Jirshan 等^[5] 在 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* mRNA 的协调和积累研究中,发现了 *accD A*(2.3 kb) 和 *accD B*(1.5 kb)。 *accD A* 和 *accD B* 编码 -CT 亚基,在 ACCase 表达的调控过程中由多个部分组成的 *accD* 转录的重要性还不明确,但 *accD A* 和 *accD B* mRNAs 的积累具有相似的方面。ACCase 亚基 mRNAs 的积累具有恒定的摩尔比率,这些 mRNA 的摩尔比率为 *accB accC accA accD- A accD- B*=0.14 1.0 0.17 0.04 0.02,这个比率不仅存在于拟南芥发育的长角果中,也存在于其他器官中即叶片、花芽和花。并对拟南芥长角果发育过程中,*accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* mRNA 积累的空间和时间协调变化进行了研究。在长角果非胚胎细胞的 ACCase mRNAs 的最大积累发生在 1 DAF(开花天数),与这些细胞用于膜脂合成的丙二酰 CoA 的预期需求量相协调。

转录后 -CT 亚基的 RNA 编辑对 ACCase 功能的影响是目前研究的一个焦点。在叶绿体中, RNA 编辑是一个普遍的创造起始和终止密码并且通常是改变编码序列的加工过程。叶绿体中的 RNA 编辑通常是一个在三联体的第 2 个核苷酸位置上胞 转变为尿 的变化。烟草质体基因组的转录中,有 0.13% 胞 转变成了尿 。比较豌豆的 *accD* 基因序列与其 cDNA 序列,发现了胞 到尿 的转变: UCG(丝氨酸) 的第 2 个核苷酸转变成了尿 ,结果成了编码亮氨酸的 UUG。15 种陆生植物的 *accD* 基因推定的氨基酸序列比对的结果中,6 种植物产生了相似的变化。这些植物本来在相应的地点没有亮氨酸密码子,编辑的结果出现了亮氨酸密码子。研究验明,在特定位置上需要一个亮氨酸密码子, *accD* 编辑对有些植物是必需的。通过比较编辑和未编辑的重组酶 CT 的活力发现,编辑后的酶是有活力的,未编辑的酶没有活力。以酵母 CT 的晶体结构为基础,预测豌豆 CT 的结构,编辑后的残基出现在单体的中心区域。ACCase 是一种必不可少的酶,在编辑中是必要的。胞 到尿 的转变是由酶催化的脱氨作用,但尚不知道为什么只对一个特定的胞 脱氨基^[4]。

在对马铃薯 *accD* 基因的表达研究中 Sang 等^[6] 发现其表达在叶片、块茎和根中转录水平相似,而在茎中较低。 *accD* 的表达在组织类型、发育阶段、光照或黑暗中是基本的、独立的。并认为 NEP 可能是主要负责 *saccD* 转录的 RNA 聚合酶。

Nrihiro 等^[7] 利用双元虫荧光素酶为报告基因,改进 Bi-distics 瞬时表达系统,对 *accD* 5'-Flanking 和 5'-Untranslated 区域(5'UTR) 进行了仔细检测,发现 2 个 AT 富集序列,其中之一包含 2 个重叠基序(YRTA),对 *accD* 表达是必需的。5'UTR 的长度而非特殊序列决定了 *accD* 表达的水平。

Position Element 定位于 -72 和 -62 之间、-62 和 -15 之间。-15 和 -3 之间的序列可能含有小的核心序列,直接影响 *accD* 的表达。在序列 -63 和 -4 之间存在 2 个 AT 富集基序,是 *accD* 表达的必需序列。转录起始位点的 YRTA 基序上游对转录是重要的。位于 -9 和 -4 之间的 2 个重叠基序(YRTA) 对 *accD* 启动子的活性是重要的。Negative Element 存在于 +23 和 +129 之间,序列 +10/ +23 似乎含有 Positive Ele-

ment。在 5'UTR 的突变试验中发现没有一个突变明显影响 LUC(虫荧光素) 活性,5'UTR 的长度而非序列元件决定表达水平。5'UTR 在植物转录调空中的作用仅在一些核编码基因中得到证实。

3 ACCase 在植物脂肪酸代谢工程中的应用

植物油含有丰富的还原态碳链,是同体积淀粉所含能量的 8 倍多,是一种密集的可更新能源。植物油不仅可作为食品,而且可作为低成本汽油生产的化学原料。植物油是含有 3 条脂肪酸碳链的甘油酯,主要成分是包含有近 50 个还原态碳的脂肪酸。还原态碳链的大规模生产是植物必需的,这一过程主要受质体 ACCase 的控制。通过用农杆菌转化系统过量表达同质型 ACCase 和用叶绿体转化系统过量表达异质型 ACCase 的方法,实现了脂肪酸合成的数量调控^[4]。提高植物体和种子含油量的基因工程可广泛应用于单子叶植物和双子叶植物,尤其适用于种子含油量较多的植物如油茶、黄豆、油菜、棉花和向日葵。同样,若通过反义抑制 ACCase 的表达,可降低种子的脂肪酸含量。质体转化技术的发展为研究提供了有效方法,笔者在植物育种中试图构建 *accD* 超量表达载体,以提高其表达量、提高 ACCase 水平,最终提高植物油脂含量。

目前,植物脂类代谢工程的主要目标是通过增加新酶、促使已存酶的超量表达以及采用反义 RNA 减少内源酶表达水平途径来控制脂肪酸的合成过程,利用植物这一天然工厂定向生产和加工出更多、更好的为人类所需的物质。相应的一些工作已取得较大进展。Davi 等将噬菌体 T、强启动子与大肠杆菌 ACCase 酶 4 个亚基编码基因连接(*accB*、*accC*、*accD* 和 *accA* 依次排列),构建成一个细菌多顺反子,用其转化大肠杆菌后,脂肪酸含量增长 6 倍。

王伏林提出正向调控 ACCase 的超量表达,其克隆大肠杆菌的 ACCase 4 个亚基基因,再将油菜种子贮藏蛋白 Napin 特异表达启动子与大肠杆菌 ACCase 4 个亚基基因正向连接,在油菜转移肽 *accB*(GenBank X90731) 的转运下,定向地将大肠杆菌 ACCase 基因转入到油菜质体中;并曾尝试将大肠杆菌 ACCase 4 个亚基基因分别或共同转入到油菜质体中,分析 ACCase 基因表达对油菜含油量提高的正向调控作用^[2]。

Yuki ko 等^[8] 认为质体中 *accD* 的表达可能制约质体 ACCase 总体水平, *accD* 的超量表达可能会提高 ACCase 水平。在质体中有两种 RNA 聚合酶进行转录:细胞核编码的 RNA 聚合酶(NEP) 和质体编码的 RNA 聚合酶(PEP)。 *accD* 具有 NEP 启动子,而光合基因具有 PEP 启动子。在所有组织中大量表达的 rRNA 操纵子具有 NEP 和 PEP 启动子。为了实现所有组织中 *accD* 的超量表达,用烟草基因组中 rRNA 操纵子的 NEP 和 PEP 启动子替代 *accD* 启动子,并观察对 ACCase 水平的影响。在转化的烟草叶片中,质体 ACCase 水平提高了,成功地通过 *accD* 超量表达提高了质体 ACCase 水平。在转化的烟草中,叶片的脂肪酸含量提高了,而每粒种子的脂肪酸含量并没有发生变化。同时发现转化个体的叶片寿命明显延长,结籽量提高 2 倍,因此提高了每个植株的种子脂肪酸含量。

氨酸和辅酶的必需矿物质,硫不但影响真菌的数量,也影响真菌降解纤维素的能力。Akin 等^[6]报道,饲喂含硫丰富的牧草的绵羊瘤胃中真菌数量较高,而饲喂缺硫牧草的绵羊瘤胃中真菌数量较少,甚至缺失,动物采食含硫丰富的牧草可刺激瘤胃中真菌的生长。于长青等^[2]认为,真菌生长需硫化化合物作为硫的营养成分来源,当供给硫酸盐时,真菌生长被抑制,所以硫酸盐不能作为真菌硫的营养源。

4.3 氮源 目前,有关于氮源对瘤胃真菌种群影响的资料很少。研究 *Neocallimastix* 的学者发现,真菌生长所需氮源为 NH_4^+ 和氨基酸形式的氮,但是混合氨基酸比 NH_4^+ 支持的生长更快,并能直接合成蛋白质^[7]。Atasoglu 等^[12]研究认为,真菌是重要的降解纤维素的微生物,以氨作为氮源可以促进瘤胃真菌的生长,而氨基酸促进瘤胃真菌生长的效果优于氨。

4.4 pH 值 据 Grenet 等^[13]、毛胜勇等^[14]报道,当瘤胃内 pH 值降至 5.5 以下,瘤胃中产生的游动孢子数量减少,从而降低了真菌数量。

4.5 其他因素 McIntosh 的研究表明^[9],奶牛饲料中添加油脂,可以降低瘤胃真菌对蛋白质的降解。Ha JK 等^[15]研究了吐温 80 对瘤胃液中酶的活性和瘤胃细菌和真菌生长的影响,结果表明添加吐温 80 后可以提升瘤胃液中游离酶的活性,增加瘤胃真菌的数量。Obispo 等^[16]研究认为饲喂频率对瘤胃真菌的数量也有影响。

5 瘤胃真菌研究前景展望

由于瘤胃真菌具有很强的降解粗纤维的能力,选育具高效降解能力的菌株有望应用于动物饲料生产、开发和利用。

从营养角度上考虑,瘤胃真菌蛋白除含有较高含量的谷氨酸、天冬氨酸及丙氨酸外,其所含的缬氨酸、异亮氨酸、精氨酸及组氨酸等必需氨基酸营养价值远高于自然界中其他类型的真菌。如果采用大规模的厌氧发酵制成瘤胃真菌发酵液的浓缩产品,可能成为一种良好的饲料蛋白资源。

研究已证实瘤胃真菌不仅产生多种多样的酶,而且其中许多酶比现有酶制剂的活性更高。如果将这些高活酶通过

生物技术手段,直接转入植物或动物瘤胃中,当这类酶的基因表达成功,这种生物反应器就可产生大量的降解酶,这对于降低饲料成本、提高饲料利润具有重大的意义。

参考文献

- [1] 司振书. 反刍动物对纤维素的消化机制[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(3): 46-48.
- [2] 于长青, 张日俊. 瘤胃真菌的营养特性及应用前景[J]. 饲料工业, 2004, 25(2): 19-21.
- [3] 霍鲜鲜, 侯先志. 瘤胃厌氧真菌生理特性的研究进展[J]. 中国饲料, 2003(17): 8-9.
- [4] SAMANTA C, KIM W. The rumen ecosystem: as a fountain source of noble enzymes[J]. Asian Australian Journal of Animal Science, 1999, 12(6): 988-1001.
- [5] MOUNTFORT D O, ASHER R A. Production of α -amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 54(9): 2293-2299.
- [6] AKIN D E, RIGSBY L L. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen[J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(9): 1987-1995.
- [7] 毛胜勇, 王全军, 姚文, 等. 去除瘤胃厌氧真菌对山羊瘤胃消化代谢的影响[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(1): 61-64.
- [8] JOBIN K N. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 42: 1119-1122.
- [9] WILLIAMS A G, ORPIN C G. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic fungi grown on a range of carbohydrate substrates[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, 33: 418-426.
- [10] DEHORITY B A, TIRABASSO P A. Antagonism between ruminal bacteria and ruminal fungi[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2921-2927.
- [11] JOBIN K N, MAISU H, NAYLOR G E, et al. Degradation of fresh ryegrass by nonpathogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence of absence of *Fibrobacter succinogenes*[J]. Current Microbiology, 2002, 45(1): 46-53.
- [12] ATASOGLU C, WALLACE R J. De novo synthesis of amino acids by the ruminal anaerobic fungus, *Protomyces communis* and *Neocallimastix frontalis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 212(2): 243-247.
- [13] GRENET D E, LYON C E, WINDHAM W R, et al. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi[J]. Applied Environmental Microbiology, 1989, 55(9): 611-616.
- [14] 毛胜勇, 朱伟云. 反刍动物瘤胃真菌的研究进展[J]. 中国奶牛, 2000(5): 26-27.
- [15] HA J K R, BHANING D C P, OPDEN CAMP H J M, et al. Degradation of structural polysaccharides by the plant cell-wall degrading enzyme system from anaerobic fungi: an application study[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21: 130-136.
- [16] OBISPO NE, DEHORITY B A. A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting their concentration in the rumen[J]. Microbiol Methods, 2002, 16: 259-270.

(上接第 5256 页)

4 存在问题与展望

ACCase 作为脂肪酸生物合成限速酶,在用基因工程提高油料作物油脂含量研究中具有重要地位。但迄今为止,这方面的研究进展并不是很大,主要原因是异质型 ACCase 由 4 个亚基组成,这些亚基分别由 3 个核基因和 1 个叶绿体基因编码,采用基因工程使这些基因在目标生物中同时表达、定位于质体并组装成一种有活性的结构有很大的难度。脂肪酸代谢工程研究中,新基因的导入或某一基因的超量表达常会带来一些表型的异常,如发芽率降低、含油量变化,所以要做到最大限度改变植物脂肪酸成分的同时不影响其正常的生理代谢活动还需对植物脂肪酸代谢及转化各参数进行进一步的研究,尤其是对植物生理生化、生长发育等过程和作用机理的了解。选择良好的试验材料及转化体系也是成功的关键。目前的转化研究尚停留在单基因导入方面,关于多基因的导入调控脂肪酸的研究也刚刚起步。优化转化体系并获得良好品质的转基因植物品种也相当复

杂耗时。由于 ACCase 的重要性,人们对其兴趣有增无减,相信随着植物基因工程研究的日益深入和技术的不断发展,上述问题都能逐步得到解决。

参考文献

- [1] KONISHI T, SHINOHARA K, YAMADA K. Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme[J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37(1): 17-22.
- [2] 王伏林. 植物中的乙酰辅酶 A 羧化酶[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 10-14.
- [3] 赵虎基. 植物乙酰辅酶 A 羧化酶的分子生物学与基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 12-16.
- [4] 谢禄山, 谭晓风. 乙酰辅酶 A 羧化酶基因研究综述[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 89-95.
- [5] JINSHAN K, TUAN NAN WEN. Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase[J]. Plant Physiology, 2000, 122: 1057-1071.
- [6] SANG SOOK LEE, WON JOONG JEONG. Characterization of the plastid encoded carboxyltransferase subunit (accD) gene of potato[J]. Cell, 2004, 117: 422-429.
- [7] NORIHIRO HIRATA, DAIZOU YONEKURA. Possible involvement of the 5'-flanking region and the 5' UTR of plastid accD gene in NEP dependent transcription[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(2): 176-186.
- [8] YUKI KOSASAKI, YUKIO NAGANO. Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(6): 1175-1184.