

## 植物半胱氨酸合成及调控研究进展

王小芳<sup>1</sup>, 杨玲娟<sup>1</sup>, 董晓宁<sup>1</sup>, 李志孝<sup>2</sup>, 焦成瑾<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃天水 741001; <sup>2</sup>兰州大学化学化工学院功能有机分子化学国家重点实验室, 甘肃兰州 730000

**摘要:** 硫是植物重要的营养元素。植物将氧化态硫吸收并还原后, 首先合成半胱氨酸使其进入各种代谢途径。合成半胱氨酸的两种酶——丝氨酸乙酰转移酶和O-乙酰丝氨酸硫醇裂合酶均由多基因家族编码, 并能可逆的结合形成二酶复合物进行有效的合成调节。本文对近年来半胱氨酸合成相关酶表达、定位、活性调控及转基因效果研究进展作了简要介绍, 并对将来需要重点研究的方面作了展望。

**关键词:** 半胱氨酸合成; 丝氨酸乙酰转移酶; O-乙酰丝氨酸硫醇裂合酶; 半胱氨酸合成酶复合物

## Advancement in Research on Synthesis and Regulation of Cysteine in Plants

WANG Xiao-Fang<sup>1</sup>, YANG Ling-Juan<sup>1</sup>, DONG Xiao-Ning<sup>1</sup>, LI Zhi-Xiao<sup>2</sup>, JIAO Cheng-Jin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** Sulfur is an essential element that is taken up by plants in the oxidation state form, reduced to H<sub>2</sub>S, and first incorporated into cysteine before involving metabolic processes. Cysteine synthesis occurs through two sequential reactions catalyzed by serine acetyltransferase (SAT) and O-acetylserine(thiol)lyase (OAS-TL), both of which are encoded by multigene families, and reversibly form a dienzyme complex to play a regulatory role. In this review, we summarize the recent progress made in the understanding of Cys synthesis, including the isoform expression, localization, activity regulation as well as efficiency of genetic transformation. Finally, aspects of the particularly important research in the future are suggested.

**Key words:** Cys synthesis; SAT; OAS-TL; CSC

硫是植物生长发育的大量营养元素之一, 参与合成许多在新陈代谢上重要的有机化合物, 如半胱氨酸(cysteine, Cys)和甲硫氨酸(methionine, Met)是构成蛋白质的重要氨基酸; 参与合成含硫维生素(如维生素 B<sub>1</sub>、生物素和硫辛酸等)、含硫辅酶(如辅酶A); 形成谷胱甘肽以及许多含硫防御性有机物(如金属硫蛋白、植物螯合肽、蒜素和芥子油苷等)和含硫信号分子(如结瘤因子和膨胀素)等(Droux 2004; Wirtz 和 Droux 2005; Kopriva 等 2009)。其中半胱氨酸是植物将无机硫转变为有机硫的第一个含硫有机物, 其他绝大多数含硫代谢物都直接或间接来源于半胱氨酸。因此它的合成在植物硫代谢中处于中心位置(Kopriva 2006; Kopriva等2009)(图 1)。

植物通常将环境中的无机硫(主要以 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 形式, 硫处于氧化态)通过根细胞膜上的专一转运蛋白吸收进入细胞, 在根细胞质体或叶肉细胞叶绿体中经过一系列酶促还原后成为硫化物(主要以 H<sub>2</sub>S 形

式, 硫成为还原态)(Hawkesford 和 Wray 2000; Leustek 等 2000)。在半胱氨酸合成酶[cys synthase, CSase; 常称 O-乙酰丝氨酸硫醇裂合酶, O-acetylserine(thiol)lyase, OAS-TL]的催化下, H<sub>2</sub>S 与 O-乙酰丝氨酸(O-acetylserine, OAS)反应形成 Cys (Bick和Leustek 1998; Ravina等2002; Kopriva 2006), 并产生乙酸。OAS 事先由丝氨酸(serine, Ser)和乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)在丝氨酸乙酰转移酶(serine acetyltransferase, SAT)催化下形成(图 1)。尽管 SAT 和 OAS-TL 依次催化这两步不同的反应, 但它们常常形成多亚基酶复合物, 即半胱氨酸合成酶复合物(cysteine synthase complex, CSC), 从而更有效地调节 Cys 合成(Droux 等 1998; Wirtz 和 Hell 2006)。

收稿 2010-10-21 修定 2010-12-01

资助 甘肃省教育厅科研项目(1008B-07)。

\* 通讯作者(E-mail: jiaochj2009@163.com; Tel: 0938-8367717)。

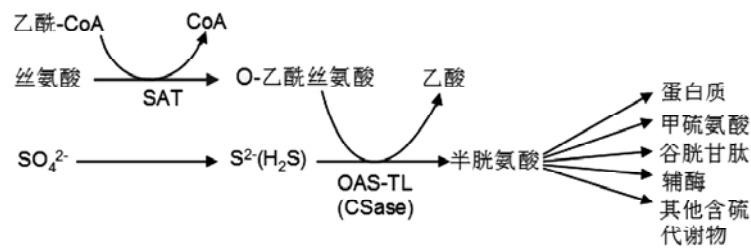


图1 植物中硫元素的同化

Fig.1 The sulfur assimilation in plants

Kredich 等早在上世纪 60 年代首先对鼠伤寒沙门氏菌的 OAS-TL 和 CSC 进行了比较详尽的研究, 随后人们从菠菜、菜豆、小麦、大麦以及甘蓝等植物中相继纯化到了 2~3 种 OAS-TL 同工酶(Ngo 和 Shargool 1974)。Nakamura 和 Tamura (1989)从葡萄叶子中纯化得到 5 个 OAS-TL 同工酶。进入上世纪 90 年代后人们开始陆续克隆

OAS-TL 主要同工酶 cDNA (Hell 等 2002), 与此同时也开始了基因转化方面的研究(Saito 等 1992, 1994)。

1994 年 Hell 等从模式植物拟南芥中克隆出胞质和质体 OAS-TL 同工酶 cDNA。至 2000 年, 拟南芥基因组中 OAS-TL 家族 9 个成员基因序列全部得以鉴定(表 1) (Watanabe 等 2008a)。

表 1 拟南芥 OAS-TL 同工酶及其基因家族成员

Table 1 OAS-TL isoforms and its gene family in *Arabidopsis*

基因	基因编号	同工酶别称	定位	主要活性	文献
<i>Bsas1;1</i>	At4g14880	OAS-TL A1	胞质	合成 Cys	Hell 等(1994)
<i>Bsas1;2*</i>	At3g22460	OAS-TL A2	胞质	无活性	Jost 等(2000)
<i>Bsas2;1</i>	At2g43750	OAS-TL B	质体	合成 Cys	Barroso 等(1995)
<i>Bsas2;2</i>	At3g59760	OAS-TL C	线粒体	合成 Cys	Hesse 等(1999)
<i>Bsas3;1</i>	At3g61440	AtcysC1	线粒体	CASase (氰解毒酶)	Hatzfeld 等(2000)
<i>Bsas4;1</i>	At5g28020	AtcysD2	胞质	CSase (弱活性)	Yamaguchi 等(2000)
<i>Bsas4;2</i>	At3g04940	AtcysD1	胞质	CSase (弱活性)	Yamaguchi 等(2000)
<i>Bsas4;3</i>	At5g28030	CS-like protein <sup>a</sup>	胞质	半胱氨酸脱硫酶	Álvarez 等(2010)
<i>Bsas5;1</i>	At3g03630	CS26 <sup>b</sup>	质体	磺酸半胱氨酸合成酶	Bermúdez 等(2010)

\* 表示为假基因, 翻译的蛋白没有酶活性; a 表示最近发现其主要功能为分解半胱氨酸产生  $\text{NH}_3$ 、 $\text{H}_2\text{S}$  和丙酮酸, 因而被命名为 L-半胱氨酸脱硫酶(L-Cys desulfhydrase, DES1); b 表示最近发现其主要功能以硫代硫酸盐(thiosulfate)和乙酰丝氨酸(OAS)为底物形成 S-磺酸半胱氨酸(S-sulfocysteine), 故被命名为 S-sulfocysteine synthase (SSCS)。

另外, 人们在细菌、植物以及昆虫中很早就发现一种解脲(HCN)毒的酶—— $\beta$ -腈基-丙氨酸合成酶( $\beta$ -cyanoalanine synthase, CAS), 其蛋白序列及功能与 OAS-TL 家族酶非常相似, 也就是说这两类酶都具有不同程度合成  $\beta$ -Cyanoalanine 和 Cys 的功能, 而且都需要磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)作为辅基。因而将两类酶合并为一个家族—— $\beta$ 位取代的丙氨酸合成酶( $\beta$ -substituted alanine synthase, Bsas)家族(Ikegami 和 Murakoshi 1994), 该家族因而属于磷酸吡哆醛依赖性酶超家族(Watanabe 等 2008a)。

由于CAS合成Cys的活性也比较高(Hatzfeld等2000), 实际上已将CAS看作是OAS-TL家族成员(Watanabe等2008a)。

SAT 酶也是先在大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌(Kredich 和 Tomkins 1966)中被研究的, 后来在菠菜(Giovanelli 和 Mudd 1968)、菜豆(Smith 和 Thompson 1971)等植物中相继被发现。2000 年, 人们从拟南芥基因组中鉴定出 5 个 SAT 同工酶基因(Hell 等 2002)。早期研究表明, 不同的 SAT 对 Cys 的反馈抑制敏感性不同(Kawashima 等 2005)。

## 1 植物 OAS-TL 家族成员、亚细胞定位、功能及表达

植物 OAS-TL 有多种同工酶, 其基因家族成员数量在不同植物中也不一样, 如拟南芥中有 9 个, 水稻中有 9 个, 甜高粱和大豆中各有 6 个, 而毛果杨中有 10 个(Kopriva 等 2009; Zhang 等 2010)。细胞的三个主要区室细胞质、叶绿体和线粒体均存在各自不同的同工酶形式, 它们的催化活性和表达在不同植物中差别显著。

在拟南芥中, 人们已经对这些同工酶及编码基因进行了比较详细地研究(Jost 等 2000; Wirtz 等 2004; Heeg 等 2008; Watanabe 等 2008a; Álvarez 等 2010; Bermúdez 等 2010)。在文献中, 这些同工酶基因一般以 *Bsas1;2*... 或 *BSAS1;2*... 表示。除了 *Bsas1;2* 是假基因外, 其他 8 个基因分别是 *Bsas1;1*、*Bsas2;1*、*Bsas2;2*、*Bsas3;1*、*Bsas4;1*、*Bsas4;2*、*Bsas4;3* 和 *Bsas5;1* (Watanabe 等 2008a) (表 1)。

通过基因表达分析及 T-DNA 插入突变体生化分析已经确认, 细胞质 OAS-TL A1 (目前称 OAS-TL A)、叶绿体 OAS-TL B 和线粒体 OAS-TL C 是拟南芥 Cys 合成的主要同工酶。它们的酶活性占细胞总 OAS-TL 活力的 95% 以上, 其中叶肉细胞胞质是 Cys 合成的主要场所(Heeg 等 2008; Watanabe 等 2008a, b; Shirzadian-Khorramabad 等 2010), 因而

OAS-TL A 在 Cys 合成中尤其重要(Lopez-Martin 等 2008), 其基因突变株尤其表现出严重的 CSase 活性丧失以及细胞中硫醇化合物如 Cys, GSH 含量的减少。在根细胞中, OAS-TL C 活性明显高于叶子的, 说明根和叶细胞线粒体对 Cys 合成需求是不同的。AtcysC1 虽然也能合成 Cys, 但事实上是真正的 CASase (Hatzfeld 等 2000), 它定位于线粒体, 对于解氰毒而保护呼吸链意义重大。最近西班牙 Gotor 的实验室连续发现了 CS-like protein 和 CS26 的新功能。前者作为 L-半胱氨酸脱硫酶通过分解半胱氨酸有助于细胞中半胱氨酸维持正常的低水平(Álvarez 等 2010), 后者作为 S-磺酸半胱氨酸合成酶第一次发现存在于植物中(Bermúdez 等 2010)。两者的功能都与叶片活性氧(reactive oxygen species, ROS) 稳态维持有关。另外, 定位于细胞质中的 AtcysD1 和 AtcysD2 除了表现出弱的 CSase 活性外, 人们对它们的真实功能一无所知(图 2)。

有些植物的 Cys 合成研究虽然早于拟南芥, 但目前人们对它们的了解远不如拟南芥的清楚。马铃薯和菠菜的线粒体中没有发现 OAS-TL, 而只检测到 CASase 的存在, 但后者也具有合成 Cys 的酶活性(Hatzfeld 等 2000)。

在早期研究中, 人们发现了植物 OAS-TL 家族成员还有其他方面的功能, 如以日本学者 Ikegami

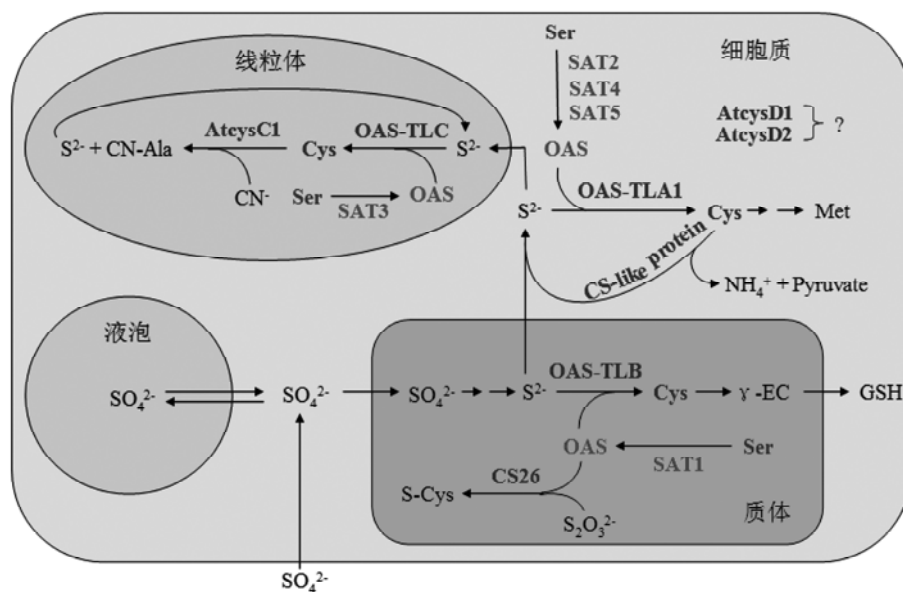


图 2 拟南芥 OAS-TL 和 SAT 亚细胞定位及 Cys 合成

Fig. 2 Cys synthesis, subcellular localization of OAS-TL and SAT in *Arabidopsis*

为主的研究者通过对山豆、豌豆、香葱、含羞草、使君子及西瓜等植物的研究,发现 OAS-TL 同工酶还具有合成一系列  $\beta$  位杂环取代丙氨酸的功能(表 2)。后来日本学者又在大肠杆菌中异源表达了其中的一些 OAS-TL 同工酶,菌粗酶液和纯化

酶均表现出合成相应产物的活性。这一系列  $\beta$  位杂环取代丙氨酸大多数有毒或对其他生物有生长抑制作用(Saito 等 1997; Mino 等 2001)。由此也可以看出植物 OAS-TL 家族成员在进化中共同保存下来的生物学意义。

表 2 在 OAS 和适宜底物存在下,部分植物 OAS-TL 同工酶所合成的游离  $\beta$  位杂环取代丙氨酸

Table 2 The synthesis  $\beta$ -substituted alanine derivatives by OAS-TL isoforms in presence of OAS and suitable substrates

底物	合成的游离氨基酸	功能	植物	文献
Isoxazolin-5-one	BIA	抗真菌	山豆等	Ikegami 等(1993)
Pyrazole	$\beta$ -(Pyrazol-1-yl)-L-alanine	神经毒	西瓜等	Brown 等(1982)
3,4-dihydropyridine	含羞草氨酸	蛋白毒	含羞草等	Murakoshi 等(1984)
3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidine	使君子氨酸	神经毒、驱虫	使君子等	Murakoshi 等(1986)
1,2,4-triazole*	$\beta$ -(1,2,4-triazol-1-yl)-L-alanine	真菌剂解毒	许多植物	Ikegami 等(1990)

\* 表示为三唑类真菌抑制剂在土壤中的降解产物,大多数植物吸收后可通过 OAS-TL 同工酶而解毒。

由于 OAS-TL 家族成员都以催化功能多样的 PLP 为辅基,这样成员之间底物结合位点的变异很可能导致它们催化反应类型上的分化。序列对比发现,大肠杆菌以及拟南芥主要 OAS-TL 同工酶(OAS-TL A、OAS-TL B 和 OAS-TL C)和底物结合序列很保守(Heeg 等 2008),均为“TSGNT”。而拟南芥中功能发生明显变化的 AtcysC1、CS-like protein 和 CS26,底物结合序列已分别变为“TSGNM”、“TGGNT”和“TTGNT”,功能未知的 AtcysD2,结合位点也已变为“TAGNT”。通过对 CS-like protein 新功能的研究,Alvarez 等(2010)认为,正是底物结合位点中“S”(丝氨酸)被替换为“G”(甘氨酸),才使其催化功能发生了显著的变化。由此可见,OAS-TL 家族成员功能多样是有结构基础的。

## 2 植物 SAT 家族成员、亚细胞定位及表达

和 OAS-TL 相似,植物 SAT 同工酶也是由多基因编码的一个小家族,在拟南芥中由 5 个基因分别编码 5 个不同的 SAT 同工酶,并分别定位于 5 条染色体上(Hell 等 2002; Kawashima 等 2005)(表 3,图 2)。

早期研究中,SAT 分别只在菜豆的线粒体、菠菜的叶绿体和西瓜的胞质中被检测到(Kopriva 等 2009)。通过对拟南芥的详细研究,人们发现细胞的三个主要区室均有 SAT 同工酶分布,其中丰度较高的 SAT1、SAT3 和 SAT5 是合成 OAS 的主要酶(Noji 等 1998),而后来分离到的低丰度 SAT2 和 SAT4 由于合成 OAS 的活性很低,以至于人们推测它们可能有其他方面的功能(Kawashima 等 2005;

表 3 拟南芥 SAT 同工酶及其基因家族成员

Table 3 SAT isoforms and its gene family in *Arabidopsis*

基因	基因编号	同工酶	定位	对 Cys 反馈抑制	主要功能	文献
<i>Serat2;1</i>	At1g55920	SAT1*	质体	不敏感	合成 OAS	Noji 等 1998
<i>Serat3;1</i>	At2g17640	SAT2	胞质	不敏感	合成 OAS	Noji 等 1998
<i>Serat2;2</i>	At3g13110	SAT3	线粒体	不敏感	合成 OAS	Noji 等 1998
<i>Serat3;2</i>	At4g35640	SAT4	胞质	敏感	未知	Kawashima 等 2005
<i>Serat1;1</i>	At5g56760	SAT5	胞质	敏感	未知	Kawashima 等 2005

\* 表示其定位与植株叶片的发育状态有关,4 周龄拟南芥叶中定位于叶绿体,而 6 周龄叶子中只有 10% 定位于叶绿体,其余 90% 定位于胞质中。

Watanabe 等 2008b)。SAT 同工酶的定位也不是绝对的, 比如 SAT1 的定位与叶龄有关(表 3), 冷胁迫下, 甚至在细胞核也发现它的存在(Bae 等 2003)。序列对比发现, SAT1 和 SAT3 以及 SAT2 和 SAT4 相似性很高, 说明它们起源于基因片段的相互复制(Watanabe 等 2008b)。

SAT 家族成员的表达虽然几乎都是组成型的, 而且都倾向于在维管束的韧皮部表达, 但表达强度存在明显差异。SAT1、SAT3 和 SAT5 三个同工酶主要在拟南芥发育的早期表达, 而 SAT2 和 SAT4 主要在植株繁殖时期、缺硫或镉胁迫情况下表达(Kawashima 等 2005)。通过实时定量 PCR 分析发现, SAT1 是表达量最高的同工酶, SAT5 和 SAT3 的表达量大概是它的 1/10 左右, 而 SAT2 和 SAT4 的表达量比它小至少 2 个数量级(Kawashima 等 2005)。

拟南芥除了所有 SAT 基因突变(五重突变)为胚胎致死外, SAT 家族单基因突变个体表型与野生型并没有明显差别, 说明 SAT 基因家族成员在功能上是冗余的(Watanabe 等 2008b)。然而四重突变(敲除 5 个 SAT 中的 4 个基因, 只保留一个发挥功能的突变体)研究表明, 5 个 SAT 同工酶对植株生长的重要性是不一样的。SAT1、SAT2 或 SAT4 基因正常的四重突变体在苗期均出现生长抑制, 外观与缺硫时的表现相似, 衰老症状明显(Watanabe 等 2010); 而 SAT3 或 SAT5 基因正常的四重突变体生长正常, 并进一步证实线粒体 SAT3 对细胞 OAS 的合成起主要作用(Watanabe 等 2008b)。

### 3 Cys 合成调控

植物硫代谢调控与氮代谢调控完全不同, 氮缺乏时, 一系列  $\text{NO}_3^-$  同化酶表达下调, 硫缺乏时, 一系列  $\text{SO}_4^{2-}$  同化酶, 尤其硫转运体和还原酶表达上调。因而, 从总体来看, 硫代谢调节与细菌的相似, 即主要由需求驱使(Lappartient 和 Touraine 1996; Davidian 和 Kopriva 2010)。另外, 虽然植物中 Cys 的合成涉及由 SAT 和 OAS-TL 催化的两步反应, 但 SAT 的底物之一——Ser 与氮代谢的状况密切相关, 而 OAS-TL 的底物之一—— $\text{H}_2\text{S}$  涉及  $\text{SO}_4^{2-}$  的吸收和还原等硫代谢的上游途径, 加之硫转运体、SAT 及 OAS-TL 家族成员众多, 活性和分布各异, 因而不难推测 Cys 合成调控是极其复杂的。根据它的

调控特点及目前人们了解的程度, Cys 合成调控可粗略的分为上游和下游调控: 上游调控主要涉及  $\text{SO}_4^{2-}$  的吸收与还原, 这方面转录等分子水平的研究比较多(Davidian 和 Kopriva 2010); 而下游调控主要涉及 OAS、Cys 及 GSH 等相关酶活性的影响, 这方面生化水平如酶学性质的研究相对多(Sirko 等 2004; Wirtz 和 Hell 2006; Lewandowska 和 Sirko 2008; Yi 等 2010)。

#### 3.1 $\text{SO}_4^{2-}$ 吸收和还原的正调控和负调控

与  $\text{SO}_4^{2-}$  还原相比, 其吸收显得更为复杂。拟南芥中 14 个定位于根细胞膜上的成员构成  $\text{SO}_4^{2-}$  转运体家族(Hawkesford 2003), 它们以及  $\text{SO}_4^{2-}$  和  $\text{SO}_3^{2-}$  还原酶转录水平均不同程度的受细胞中 OAS 的正调控, 而受 Cys 和 GSH 的负调控(Davidian 和 Kopriva 2010)(图 3)。当硫缺乏时, 转运体表达上调(Takahashi 等 1997), 而当重新供应硫时它们的表达又被抑制(Lappartient 等 1999)。由于硫缺乏时, OAS 积累, 所以可用 OAS 来模拟硫缺乏时的反应, 即 OAS 处理可使转运体 mRNA 水平升高, 硫的吸收增强(Smith 等 1997)。相反, 给植株根部供应 Cys 或 GSH (Vauclare 等 2002), 或用  $\text{H}_2\text{S}$  或  $\text{SO}_2$  来熏植株(Herschbach 等 1995), 则硫转运体的转录被抑制。

#### 3.2 SAT 和 OAS-TL 的活性调节

转录水平的研究表明, 除个别例外情况, SAT 和 OAS-TL 的 mRNA 水平在硫缺乏和逆境胁迫(Cys 需求量增大)条件下变化不大(Dominguez-Solis 等 2001; Kawashima 等 2005), 由此许多学者认为翻译后水平的调节如酶变构抑制等活性调节可能对 Cys 合成起重要调控作用(Wirtz 和 Hell 2006; Lewandowska 和 Sirko 2008; Yi 等 2010)。

**3.2.1 反馈抑制对 SAT 活性调节** 和细菌的 SAT 相似, 许多植物胞质 SAT 同工酶活性受 Cys 反馈抑制调节(Saito 2000)(图 3)。这种调节的意义可能在于: 一方面当 Cys 超过需求量而过剩时, 可防止 SAT 产生 OAS 而浪费 Ser 和 Acetyl-CoA; 另一方面在硫供应充足, Cys 需求量大的情况下, 防止 OAS 合成速度失控而导致 OAS 的浓度达到或超过解离 CSC(参照下文)的临界值, 从而使 CSC 解离, SAT 失活, OAS 供应中断影响 Cys 的进一步合成(Hawkesford 和 De Kok 2006)。显然这种反馈抑制可能对于保持适宜的 OAS 和 Cys 合成速率起到微调的作用。

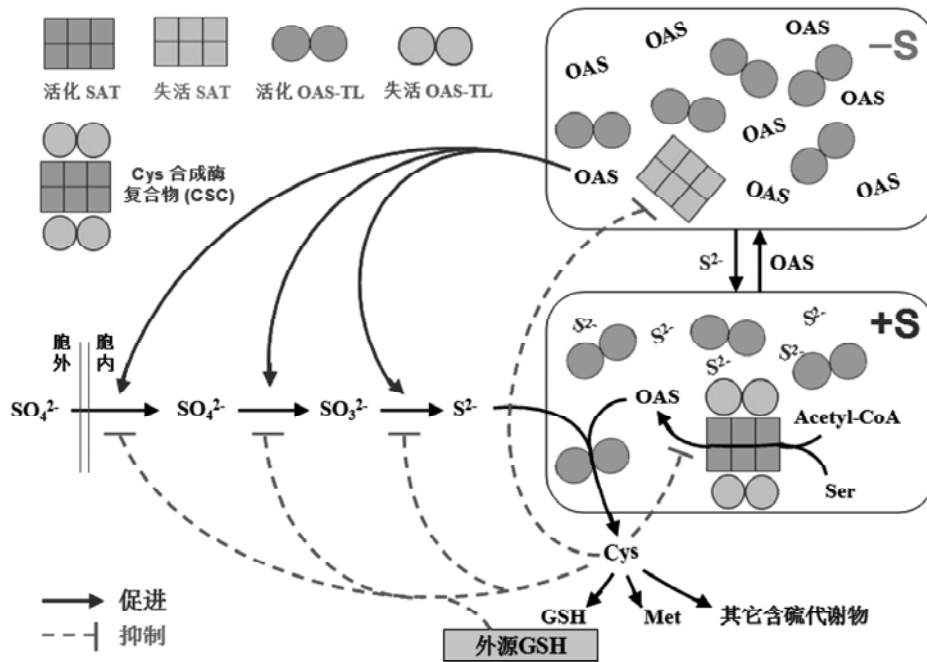


图3 植物硫吸收、还原和Cys合成调控

Fig.3 The general regulation of sulfate uptake, reduction and Cys synthesis in plants

不过在大豆中,当植株遭遇胁迫而需要大量Cys来合成GSH等抗氧化物时,Cys对SAT的抑制作用由于SAT本身被钙依赖性的蛋白激酶磷酸化而变得对Cys不敏感,从而使SAT合成更多的OAS用于Cys合成以增强植物的抗氧化胁迫(Liu等2006)。

但是,定位于叶绿体和线粒体中的SAT同工酶不受Cys反馈抑制或对Cys不敏感(Saito 2000),其原因尚不清楚。然而这些细胞器中的SAT与胞质中的SAT一样可与OAS-TL形成酶复合物从而更有效的进行Cys合成调控。

**3.2.2 SAT和OAS-TL复合物中酶活性调节** 如果说Cys对SAT的反馈抑制体现的是一种酶活性调控普遍形式的话,则SAT和OAS-TL相互作用形成酶复合物(CSC)来影响双方酶活性的模式是硫代谢中Cys合成调控的一个显著特点(图3)。目前CSC被多数学者认为既是植物中硫营养状况的感受器,又是通过蛋白质相互作用影响酶活性更细腻、更巧妙的形式(Wirtz和Hell2006; Lewandowska和Sirko 2008; Yi等2010)。

CSC是由2个SAT同源三聚体和2个OAS-TL同源二聚体组成的十聚体,CSC中的SAT具有催化

活性,而游离存在时没有酶活性;相反,CSC中的OAS-TL是没有活性的,自由存在时才表现出酶活性(Droux等1998; Hindson和Shaw2003)。早期认为CSC形成可能为从Ser到Cys的中间产物OAS提供了一个通道(channel)使SAT的产物OAS不用释放直接传递给OAS-TL而提高Cys合成效率,后来发现不是这样(Droux等1998; Wirtz和Hell2006),因为在CSC中,OAS-TL与SAT互相作用阻止了它与底物OAS的结合。实际情况是: SAT将产物——OAS首先释放到复合物周围,由自由存在的OAS-TL再结合而合成Cys。这种机制可以解释为什么植物中OAS-TL总是过量存在时,Cys的合成才能有效进行。比如豌豆中,OAS-TL和SAT的酶活比在胞质中是200:1,质体中是300:1,但是线粒体中却只有4:1,然而线粒体被证明并不是合成Cys的主要场所(Watanabe等2008a; Krueger 2009)。

由于SAT只有与OAS-TL结合形成CSC后才能催化产生OAS,因此,合成Cys的限制因素是SAT,而不是OAS-TL(Wirtz和Droux 2005)。在无OAS-TL存在的情况下,不管是细菌还是植物粗酶液均检测不到SAT酶活性,尽管重组表达的SAT单独表现出一定的酶活性(Droux等1998; Berkowitz

等 2002; Kawashima 等 2005)。

CSC 的形成和解聚是可逆的。高浓度的  $S^{2-}$  可以稳定并促进 CSC 的形成, 而高浓度的 OAS 则促使 CSC 解聚(Hell 和 Hillebrand 2001; Hell 2003) (图 3)。

当环境中  $SO_4^{2-}$  供应充足, 根细胞膜组成型  $SO_4^{2-}$  低亲和转运体蛋白将其转运进入细胞并最终于质体或叶绿体中还原为  $H_2S$ , 后者与 OAS 一起合成半胱氨酸。此时由于  $H_2S$  浓度高, CSC 复合体结合稳定, SAT 酶呈现活性状态, 不断合成 OAS 用于自由状态的 OAS-TL 来合成 Cys, 从而使 OAS 处于低水平, 低水平 OAS 会部分抑制  $SO_4^{2-}$  转运体和还原酶基因的表达, 不至于使  $H_2S$  的浓度过高, 因为高浓度的  $H_2S$  对细胞是有毒的; 当硫供应不足或吸收受限制时, 细胞中  $H_2S$  浓度下降, 这时 OAS 开始积累, 致使 CSC 复合酶解离, SAT 酶失活, 这样不会进一步浪费 Ser 和 Acetyl-CoA。但高浓度的 OAS 和低浓度的  $H_2S$  共同解除对  $SO_4^{2-}$  转运体和还原酶基因的表达抑制, 使  $SO_4^{2-}$  吸收和还原开始加强,  $H_2S$  浓度又开始上升, 此时 OAS 由于 Cys 合成增加而消耗, 浓度开始下降, CSC 复合酶又开始形成, SAT 酶活性恢复(Wirtz 和 Hell 2006) (图 3)。可见, CSC 能感受细胞中  $H_2S$  和 OAS 的代谢状况, 通过自身的形成或解聚来直接影响两酶的活性, 使细胞在特定环境下 Cys 的合成调控更为有效。

**3.2.3 OAS-TL 对  $SO_4^{2-}$  转运的调节** 除了 OAS-TL 能与 SAT 形成酶复合物外, 最近发现定位在拟南芥根皮层细胞质中的 OAS-TL 还可以与其质膜上的  $SO_4^{2-}$  高亲和转运体之一 SULTR1;2 结合而抑制后者的活性使  $SO_4^{2-}$  的吸收减弱(Shibagaki 和 Grossman 2010)。这种抑制硫吸收的机制主要在高  $SO_4^{2-}$  环境而胞内还原力和能量比较低的情况下起调节作用, 对于协调硫的吸收与低水平的细胞代谢同步进行具有重要意义。

#### 4 SAT 和 OAS-TL 的转基因研究

Cys 及其产物在植物正常代谢和抗逆方面具有非常重要的作用。大量研究表明, Cys 及其衍生物如谷胱甘肽等的合成与植物生长发育及胁迫反应尤其维持胞内 ROS 水平平衡密切相关(Mittler 2002; Dominguez-Solis 等 2004; Buchanan 和 Balmer 2005; Meyer 和 Hell 2005; Vieira 和 Rey 2006)。通过转基因提高 Cys 及其衍生物的合成明显增加了烟草对重

金属及氧化胁迫的抗性(Harada 等 2001; Youssefian 等 2001; Sirko 等 2004; Kawashima 等 2004; Matityahu 等 2006); 相反, ROS 水平的升高则上调 OAS-TL 表达(Queval 等 2009)。而 OAS-TL 同工酶突变或敲除则导致拟南芥 ROS 代谢平衡出现紊乱(López-Martón 等 2008; Alvarez 等 2010; Bermúdez 2010)。OAS-TL 尤其 SAT 在维管束韧皮部中的优势表达也说明 Cys 合成对提高植株抗氧化和镉胁迫的重要性(Kawashima 等 2005)。另外, SAT 和 OAS-TL 同工酶蛋白序列从细菌到植物在进化中很保守。因而, 不同来源 SAT 和 OAS-TL 转基因研究不但可以进一步阐明和揭示它们各自的表达调控机制, 而且能够评估过表达对 Cys 及相关产物含量以及植物抗逆性等方面的影响, 从而对提高作物硫营养和增强抗逆性的育种工作具有重要意义。然而目前已经得到的相关结果表明, 情况远比人们想象的要复杂(Sirko 2004; Riemenschneider 2005; Tabe 等 2010)。

#### 4.1 SAT 基因转化

Inoue 等人(1999)较早进行了用西瓜胞质 SAT 的 cDNA 转化拟南芥植株的研究。他们所用的 cDNA 既有野生型的, 也有通过点突变对 Cys 反馈抑制不敏感的, 其中有些 cDNA 还与豌豆 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, rubisco)小亚基导肽序列基因融合。这样得到的拟南芥植株一部分过表达定位于胞质的 SAT, 一部分过表达定位于叶绿体的 SAT。通过检测发现这些由组成型表达启动子控制的 SAT 基因在所有转化的拟南芥植株中均过量表达, SAT 活性显著增强。但是只有转 SAT 点突变基因的植株积累了大量的 OAS 和 Cys, 而野生型基因转化植株这些化合物的含量没有多大的变化。但令人不解的是所有转化植株 GSH 含量均升高了, 在两类转化植株间没有显示出差别(Noji 和 Saito 2002)。

由于拟南芥线粒体 SAT 同工酶对 Cys 不敏感, 用它的 cDNA 不带或携带 Rubisco 导肽序列转化烟草植株, 第一代转基因烟草细胞质和叶绿体 SAT 活性显著升高, Cys 含量分别增加了 3 倍和 6 倍, 但 GSH 含量在所有转基因植株中均增加了 3 倍, 即所有转化植株间也没有显示出差别(Wirtz 和 Hell 2003)。

如果用烟草 Cys 不敏感的 SAT cDNA 来转化大肠杆菌, 与用敏感的 cDNA 转化相比, 培养基中积累了更多的 Cys (Wirtz 和 Hell 2003); 反过来, 用大肠杆菌编码 SAT 的野生型 *CysE* 或突变型 *CysE* (点突变后对 Cys 的抑制敏感性下降) 来转化烟草, 依据表达酶的定位不同得到 4 类转化植株: 第 1 类在叶绿体中表达突变型 SAT; 第 2 类在叶绿体中表达野生型 SAT; 第 3 类在胞质中表达突变型 SAT; 第 4 类在胞质中表达野生型 SAT。检测表明, 4 类转化植株 Cys 和 GSH 含量比对照植株均升高 2~3 倍, 而且它们对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的氧化胁迫抗性显著增强, 并与叶片中的 GSH 含量呈正相关。进一步研究发现 Cys 和 GSH 含量与 SAT 活性呈正相关, 而与其定位无关, 但 Cys 和 GSH 含量在这些转化植株的后代中有下降趋势 (Sirko 等 2004)。

用大肠杆菌野生型 *CysE* 来转化马铃薯发现, SAT 活性在叶子和块茎中都显著增强了, 叶子中的活性甚至增加了 20 倍, 但其 Cys 和 GSH 含量只增加了 2 倍, 而块茎中的 Cys 和 GSH 含量并没有明显的变化, 同时两种组织中的 OAS-TL 活性和表达模式均没有变化 (Harms 等 2000)。

#### 4.2 OAS-TL 基因转化

不同课题组用不同来源的 OAS-TL cDNA 转化烟草, 在正常生长条件下转基因植株与对照相比并无多大差别, 但在氧化胁迫或重金属镉胁迫时, 植株硫醇化合物含量不但升高, 对这些胁迫的抗性也明显增强。

用小麦胞质 OAS-TL 的 cDNA 来转化烟草, 正义转化植株 OAS-TL 活性增强, 反义转化植株的与对照相当。然而, 当用 SO<sub>2</sub> 熏蒸时, 植株中 Cys 和 GSH 含量升高, 对 SO<sub>2</sub> 的抗性增强 (Youssefian 等 1993); 给转基因植株供应 Cys 合成底物 OAS 或 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cu/Zn 型 SOD 酶的转录和活性均大增, 植株也能更加抵抗活性氧释放剂甲基紫精的处理 (Youssefian 等 2001)。Ning 等 (2010) 将大豆胞质 OAS-TL 的 cDNA 转入烟草, 发现 Cys 也显著升高, 但 Met 的含量并没有变化, 不过转化植株对镉的抗性则明显增强。

用菠菜胞质 OAS-TL 的 cDNA (Saito 等 1992) 或该克隆与豌豆 Rubisco 小亚基导肽序列融合后的序列转化烟草 (Saito 等 1994)。两类转基因植株过

表达 OAS-TL, 胞质和叶绿体部分的 OAS-TL 活性均显著升高, 但 Cys 和 GSH 含量变化不大。然而叶子小圆片浸入 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 处理时, 其中 Cys 合成增强, 对 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 处理抗性增强。两类转化植株杂交产生 OAS-TL 定位不同 (胞质和叶绿体) 的双转化植株, 这类新植株虽然在合成 Cys 和 GSH 方面与单转化植株差不多, 但更抗 SO<sub>2</sub> 和甲基紫精的处理 (Noji 等 2001)。

当通过转化使拟南芥过量表达 (是原来的 9 倍) 自身胞质 OAS-TL A 的 cDNA 克隆时, 植株正常条件下无明显变化, 但更能抗重金属镉处理, 当镉浓度达 250 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 对照的还原型 GSH 下降 30%, 而转基因植株的却增加了 54% (Dominguez-Solis 等 2001)。在烟草中过表达水稻胞质 OAS-TL 的 cDNA, 转化植株也显示出较强的抗镉特性 (Harada 等 2001)。

烟草的胞质或叶绿体中过表达大肠杆菌 *cysK* (编码 OAS-TL A) 时, 两类植株的 OAS-TL 活性和硫醇含量均升高, 前者还表现得耐镉处理, 甚至在 300 μmol·L<sup>-1</sup> 的 CdCl<sub>2</sub> 中也能正常萌发生长, 但后者即使在无任何处理的情况下, 植株下层叶片也出现黄化表型, 有些植株在整个发育期内有此现象, 个别的发育途中甚至枯死 (Sirko 等 2004)。

#### 4.3 SAT 和 OAS-TL 基因共转化

Sirko 等人 (Liszewska 等 2001; Liszewska 和 Sirko 2003) 用大肠杆菌 *cysE* (编码 SAT) 野生型和点突变型 (酶蛋白第 256 位的甲硫氨酸突变为异亮氨酸, 活性不变但对 Cys 反馈抑制敏感性下降) 以及 *cysK* (编码 OAS-TL) 基因 (包括事先融合叶绿体导肽序列基因) 共转化烟草植株, 得到 4 类共表达的转基因植株, 其转化效果如下: 第 1 类含野生型 SAT 和 OAS-TL, 并均定位于叶绿体中, 这类植株据报导是无效的, 作者推测可能与叶绿体低浓度的 acetyl-CoA 有关; 第 2 类含突变型 SAT 和 OAS-TL, 并均定位于胞质中, 第 3 类含野生型 SAT 和 OAS-TL, 但前者定位于胞质, 而后者定位于叶绿体。第 2 和第 3 类植株中 GSH 含量比两基因单独转化植株的平均高 15%~20%; 第 4 类含野生型 SAT 和 OAS-TL, 并均定位于胞质中, 检测发现 SAT 的活性比较低, 而且与单基因转化植株相比, 这类共转化植株的 GSH 含量无差别, 作者对这类共转化中 *cysE* 的沉默现象解释为使用的启动子不稳定以及胞质中高含量



的OAS或硫醇类可能对细胞的代谢产生了不利的影响而导致 *cysE* 基因表达抑制(Sirko等2004)。

#### 4.4 作物硫营养的转基因改良研究

众所周知,豆类植物虽然富含蛋白质,但含硫氨基酸,即半胱氨酸和甲硫氨酸在种子中的含量很低(Tabe和Higgins1998;Shewry2007)。因此豆类作物育种的一个主要方面是提高种子中含硫氨基酸含量(Krishnan等2005)。通过遗传工程加强半胱氨酸的合成和提高种子中富含半胱氨酸和甲硫氨酸的储存蛋白质含量是目前所采用的两种主要手段(Amir和Taber2006;Shewry2007)。但这方面的研究开展的还不多。Taber等(2010)最近将上述两种手段结合起来考察了转基因羽扇豆种子成熟过程中有机硫的积累情况。过表达拟南芥叶绿体SAT(对Cys不敏感)的植株发育胚的OAS和Cys含量分别高出对照达5倍和26倍,但Met的含量没有变化,而且种子成熟后总Cys和Met含量也没有变化。将转基因植株进一步与过表达向日葵种子球蛋白(sunflower seed albumin, SSA, 富含Cys和Met)的转化植株杂交,子代发育中的种子OAS和Cys含量也发生了显著升高,但Met以及成熟种子总含硫氨基酸含量还是没有变化,只有GSH浓度在发育的种子中有小幅的升高。他们由此认为SAT是合成Cys的限制因子,但Cys则不是限制Met合成的制约因素,也不是合成富含半胱氨酸储藏蛋白的限制因素。

#### 5 展望

尽管有Kredich等人(1969)的开拓性工作,但植物硫代谢,尤其是Cys合成研究上世纪90年代前后才全面展开。SAT受Cys的反馈抑制以及与OAS-TL形成酶复合物调节模式的发现为以后Cys合成的深入研究奠定了坚实基础,但两种合成酶、 $\text{SO}_4^{2-}$ 的转运体蛋白和还原酶类在转录水平的调控了解得还相当不充分。对于许多作物,尤其是大宗作物如水稻、小麦、玉米及大豆等的硫代谢研究则更欠缺(Yi等2010)。然而,Cys及下游产物如Met、GSH等在细胞功能活动中所起的重要作用使其代谢状况不但对植物的生存和抗逆性至关重要,而且是决定作物营养品质和提高抗逆性的重要方面,因此硫代谢研究近年来进展很快。但是SAT和OAS-TL及硫代谢的其他许多组分为小家族蛋白,功能多样,其

表达与氮等其他大量营养元素代谢之间关系密切。因此与硫代谢有关的Cys合成研究任重道远,下面几个研究方面想必尤其需要重视。

(1)不像氮代谢,植物之间硫代谢差别较大。不同形式同工酶在其他代谢方面的催化功能特征有待进一步研究,尤其是低丰度或表达弱的同工酶形式,如拟南芥中的AtcysD2和AtcysD1等,人们对它们的真正功能还一无所知。

(2)在细胞中,与SAT相比,OAS-TL远远过量,约5%与SAT结合为酶复合物,其余95%游离存在(Haas等2008),但转基因植株过表达OAS-TL时,如上所述,仍会使Cys等含量有所增加,抗逆性增强。这一现象表明,OAS-TL合成Cys的调控机制比目前人们了解到的要复杂,显然存在更精细的调控模式有待进一步阐明。只有彻底弄清Cys的合成调控模式,提高含硫氨基酸和增加抗性的作物改良才会有成效。

(3)分布在细胞不同区室的SAT和OAS-TL同工酶差异表达和活性强弱与细胞正常代谢及胁迫反应之间的关系以及各成员在进化过程中的关系也是将来需要加强的研究领域。

(4)Cys的合成与植物其他营养代谢尤其与氮、磷等营养元素代谢之间的协调关系目前的研究还很少。改良作物提高含硫氨基酸含量不能以降低氮磷钾等主要营养为代价,因此重视包括Cys合成在内的大量营养元素代谢整合研究具有重要的现实意义。

#### 参考文献

- Álvarez C, Calo L, Romero LC, García I, Gotor C (2010). An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 152: 656~669
- Barroso C, Vega JM, Gotor C (1995). A new member of the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 363: 1~5
- Berkowitz O, Wirtz M, Wolf A, Kuhlmann J, Hell R (2002). Use of biomolecular interaction analysis to elucidate the regulatory mechanism of the cysteine synthase complex from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 277: 30629~30634
- Bermúdez MA, Páez-Ochoa MA, Gotor C, Romero LC (2010). *Arabidopsis* S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control. *Plant Cell*, 22: 403~416
- Bick JA, Leustek T (1998). Plant sulfur metabolism—the reduction of sulfate to sulfite. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 240~244

- Bonner ER, Cahoon RE, Knapke SM, Jez JM (2005). Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 280: 38803~38813
- Brown EG, Flayeh KAM, Gallon JR (1982). The biosynthetic origin of the pyrazole moiety of  $\beta$ -pyrazole-1-yl-L-alanine. *Phytochemistry*, 21: 863~867
- Buchanan BB, Balmer Y (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 187~220
- Davidiana J-C, Kopriva S (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation—the same or not the same. *Mol Plant*, 3 (2): 314~325
- Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Romero LC, Gotor C (2001). The cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem*, 276: 9297~9302
- Dominguez-Solis JR, Lopez-Martin MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol*, 2: 469~476
- Droux M (2004). Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth Res*, 79: 331~348
- Droux M, Ruffet ML, Douce R, Job D (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine(thiol)lyase in high plants: structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur J Biochem*, 255: 235~245
- Feldman-Salit A, Wirtz M, Hell R, Wade RC (2009). A mechanistic model of the cysteine synthase complex. *J Mol Biol*, 386: 37~59
- Francois JA, Kumaran S, Jez JM (2006). Structural basis for interaction of O-acetylserine sulfhydrylase and serine acetyltransferase in the *Arabidopsis* cysteine synthase complex. *Plant Cell*, 18: 3647~3655
- Giovanelli J, Mudd SH (1968). Sulfuration of O-acetylhomoserine and O-acetylserine by two enzyme fractions from spinach. *Biochem Biophys Res Commun*, 31: 275~280
- Gojon A, Nacry P, Davidian JC (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 328~338
- Haas FH, Heeg C, Queiroz R, Bauer A, Wirtz M, Hell R (2008). Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pace-maker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant Physiol*, 148: 1055~1067
- Harada E, Choi YE, Tsuchisaka A, Obata H, Sano H (2001). Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J Plant Physiol*, 158: 655~661
- Harms K, von Ballmoos P, Brunold C, Höfgen R, Hesse H (2000). Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J*, 22 (4): 335~343
- Hatzfeld Y, Maruyama A, Schmidt A, Noji M, Ishizawa K, Saito K (2000).  $\beta$ -Cyanoalanine synthase is a mitochondrial Cys synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 123: 1163~1172
- Hawkesford MJ, De Kok LJ (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ*, 29: 382~395
- Hawkesford MJ, Wray JL (2000). Molecular genetics of sulfate assimilation. *Adv Bot Res*, 33: 159~223
- Heeg C, Kruse C, Jost R, Gutensohn M, Ruppert T, Wirtz M, Hell R (2008). Analysis of the *Arabidopsis* O-acetylserine(thiol) lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell*, 20: 168~185
- Hell R, Bork C, Bogdanova N, Frolov I, Hauschild R (1994). Isolation and characterization of two cDNAs encoding for compartment specific isoforms of O-acetylserine (thiol) lyase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 351: 257~262
- Hell R, Hillebrand H (2001). Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Curr Opin Biotechnol*, 12: 161~168
- Hell R, Jost R, Berkowitz O, Wirtz M (2002). Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 22: 245~257
- Herschbach C, De Kok LJ, Rennenberg H (1995). Net uptake of sulfate and its transport to the shoot in spinach plants fumigated with H<sub>2</sub>S or SO<sub>2</sub>: does atmospheric sulfur affect the 'interorgan' regulation of sulfur nutrition. *Bot Acta*, 108: 41~46
- Hesse H, Lipke J, Altmann T, Höfgen R (1999). Molecular cloning and expression analysis of mitochondrial and plastidic isoforms of Cys synthase (O-acetylserine(thiol)lyase) from *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 16: 113~131
- Hindson VJ, Shaw WV (2003). Random-order ternary complex reaction mechanism of serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 42: 3113~3119
- Ikegami F, Komada Y, Kobori M, Hawkins DR, Murakoshi I (1990). Biosynthesis of  $\beta$ -(1,2,4-triazol-1-yl)alanine in higher plants. *Phytochemistry*, 29: 2507~2508
- Ikegami F, Murakoshi I (1994). Enzymic synthesis of nonprotein  $\beta$ -substituted alanines and some higher homologues in plants. *Phytochemistry*, 35: 1089~1104
- Ikegami F, Ongena G, Sakai R, Itagaki S, Kobori M, Ishikawa T, Kuo Y-H, Lambein F, Murakoshi I (1993). Biosynthesis of beta-(isoxazolin-5-on-2-yl)-L-alanine by cysteine synthase in *Lathyrus sativus*. *Phytochemistry*, 33 (1): 93~98
- Inoue K, Noji M, Saito K (1999). Determination of the sites required for the allosteric inhibition of serine acetyltransferase by L-cysteine on plants. *Eur J Biochem*, 266: 220~227
- Jost R, Berkowitz O, Wirtz M, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hell R (2000). Genomic and functional characterization of the oas gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 253: 237~247
- Kawashima CG, Berkowitz O, Hell R, Noji M, Saito K (2005). Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 137: 220~230
- Kawashima CG, Noji M, Nakamura M, Ogra Y, Suzuki KT, Saito K (2004). Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. *Biotechnol Lett*, 26: 153~157
- Kopriva S (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Ann Bot*, 97: 479~495
- Kopriva S, Mugford SG, Matthewman C, Koprivova A (2009). Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Rep*, 28: 1769~1780

- Kredich NM, Tomkins GM (1966). The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 241: 4955~4965
- Kredich NM, Becker MA, Tomkins GM (1969). Purification and characterization of cysteine synthetase, a bifunctional protein complex, from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 244: 2428~2439
- Krishnan HB (2005). Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Sci*, 45: 454~461
- Krueger S, Niehl A, L6pez-Martín MC, Steinhauser D, Donath A, Hildebrandt T, Romero LC, Höfgen R, Gotor C, Hesse H (2009). Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 32: 349~367
- Lappartient AG, Touraine B (1996). Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and  $SO_4^{2-}$  uptake in intact canola: the role of phloem-translocated glutathione. *Plant Physiol*, 111: 147~157
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass ADM, Touraine B (1999). Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J*, 18: 89~95
- Leustek T, Martin MN, Bick J-A, Davies JP (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 141~165
- Lewandowska M, Sirko A (2008). Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica*, 55 (3): 457~471
- Liszewska F, Blaszczyk A, Sirko A (2001). Modification of non-protein thiols contents in transgenic tobacco plants producing bacterial enzymes of cysteine biosynthesis pathway. *Acta Biochimica Polonica*, 48: 647~656
- Liszewska F, Sirko A (2003). Analysis of transgenic tobacco lines expressing bacterial *cysK* gene encoding O-acetylserine(thiol) lyase A. In: Davidian J-C, Grill D, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennerberg H (eds). *Sulphur Transport and Assimilation in Plants. Regulation, Interaction and Signaling*. Leiden: Backhuys Publishers, 269~271
- Liu F, Yoo BC, Lee JY, Pan W, Harmon AC (2006). Calcium-regulated phosphorylation of soybean serine acetyltransferase in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, 281: 27405~27415
- Lopez-Martin MC, Becana M, Romero LC, Gotor C (2008). Knocking out cytosolic cysteine synthesis compromises the antioxidant capacity of the cytosol to maintain discrete concentrations of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147: 562~572
- Maruyama A, Ishizawa K, Takagi T (2000). Purification and characterization of  $\beta$ -cyanoalanine synthase and Cys synthases from potato tubers: are  $\beta$ -cyanoalanine synthase and mitochondrial Cys synthase same enzyme? *Plant Cell Physiol*, 41: 200~208
- Maruyama A, Ishizawa K, Takagi T, Esashi Y (1998). Cytosolic  $\beta$ -cyanoalanine synthase activity attributed to Cys synthases in cocklebur seeds. *Plant Cell Physiol*, 39: 671~680
- Maruyama A, Saito K, Ishizawa K (2001).  $\beta$ -Cyanoalanine synthase and Cys synthase from potato: molecular cloning, biochemical characterization, and spatial and hormonal regulation. *Plant Mol Biol*, 46: 749~760
- Matityahu I, Kachan L, Ilan I B, Amir R (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing the Met25 gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibit enhanced levels of cysteine and glutathione and increased tolerance to oxidative stress. *Amino Acids*, 30: 185~194
- Meyer AJ, Hell R (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res*, 86: 435~457
- Mino K, Yamanoue T, Ohno K, Sakiyama T, Eisaki N, Matsuyama A, Nakanishi K (2001). Production of  $\beta$ -(pyrazol-1-yl)-l-alanine from L-serine and pyrazol using recombinant *Escherichia coli* cells expressing serine acetyltransferase and O-acetylserine sulfhydrylase-A. *Biotechnol Lett*, 23: 2051~2055
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405~410
- Murakoshi I, Ikegami F, Hinuma Y, Hanma Y (1984). Purification and characterization of L-mimosine synthase from *Leucaena leucocephala*. *Phytochemistry*, 23: 1905~1898
- Murakoshi I, Kaneko M, Koide C, Ikegami F (1986). Enzymatic-synthesis of the neuroexcitatory amino-acid quisqualic by cysteine synthase. *Phytochemistry*, 25: 2759~2763
- Nakamura K, Tamura G (1989). Five isoforms of cysteine synthase in rape leaves. *Agric Biol Chem*, 53 (9): 2537~2538
- Ngo TT, Shargool PD (1974). The enzymatic synthesis of L-cysteine in higher plant tissues. *Can J Biochem*, 52: 435~440
- Ning HX, Zhang CH, Yao Y, Yu DY (2010). Overexpression of a soybean O-acetylserine (thiol) lyase-encoding gene GmOASTL4 in tobacco increases cysteine levels and enhances tolerance to cadmium stress. *Biotechnol Lett*, 32: 557~564
- Noji M, Inoue K, Kimura N, Gouda A, Saito K (1998). Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 273: 32739~32745
- Noji M, Saito K (2002). Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulphur metabolic engineering in plants. *Amino Acids*, 22: 231~243
- Noji M, Saito M, Nakamura M, Aono M, Saji H, Saito K (2001). Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulphur-containing environmental pollutants. *Plant Physiol*, 126: 973~980
- Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakire B, Noctor G (2009).  $H_2O_2$ -activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol Plant*, 2: 344~356
- Ravina CG, Chang C-I, Tsakraklides GP, McDermott JP, Vega JM, Leustek T, Gotor C, Davies JP (2002). The sac mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* reveal transcriptional and posttranscriptional control of cysteine biosynthesis. *Plant Physiol*, 130: 2076~2084
- Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, Antonicelli GE, Rasche N, Luder F, Weckwerth W, Jahn O (2007). Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals

- novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell*, 19: 3170~3193
- Riemenschneider A, Riedel K, Hefgen R, Papenbrock J, Hesse H (2005). Impact of reduced O-acetylserine(thiol)lyase isoform contents on potato plant metabolism. *Plant Physiol*, 137: 892~900
- Saito K (1997). Molecular biology and engineering of biosynthesis of cysteine and biogenetically related non-protein amino acids in plants. In: Ogura K, Sankawa U (eds). *Dynamic aspects of natural products chemistry: molecular biological approaches*. 12-1 Otowa 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan and HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS, The Netherlands, 227~230
- Saito K (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Curr Opin Plant Biol*, 3:188~195
- Saito K, Kimura N, Ikegami F, Noji M (1997). Production of plant non-protein amino acids by recombinant enzymes of sequential biosynthetic reactions in bacteria. *Biol Pharm Bull*, 20: 47~53
- Saito K, Kurosawa M, Tatsuguchi K, Takagi Y, Murakoshi I (1994). modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase [O-acetylserine(thiol)-lyase]. *Plant Physiol*, 106: 887~895
- Saito K, Miura N, Yamazaki M, Hirano H, Murakoshi I (1992). Molecular cloning and bacterial expression of cDNA encoding a plant cysteine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 8078~8082
- Sirko A, Blaszczyk A, Liszewska F (2004). Overproduction of SAT and/or OASTL in transgenic plants: a survey of effects. *J Exp Bot*, 55: 1881~1888
- Shibagaki N, Grossman AR (2010). Binding of cysteine synthase to the STAS domain of sulfate transporter and its regulatory consequences. *J Biol Chem*, 285: 25094~25102
- Shirzadian-Khorramabad R, Jing H-C, Everts G E, Schippers J H M, Hille J, Dijkwel PP (2010). A mutation in the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase induces a genome-dependent early leaf death phenotype in *Arabidopsis* *BMC Plant Biology*. doi: 10.1186/1471-2229-10-80
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, van den Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS (1997). Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J*, 12: 875~884
- Smith IK, Thompson JF (1971). Purification and characterization of L-serine transacetylase and O-acetylserine sulfhydrylase from kidney bean seedlings *Phaseolus vulgaris*. *Biochim Biophys Acta*, 227: 288~295
- Tabe L, Higgins TJV (1998). Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends Plant Sci*, 3: 282~286
- Tabe L, Wirtz M, Molvig L, Droux M, Hell R (2010). Overexpression of serine acetyltransferase produced large increases in O-acetylserine and free cysteine in developing seeds of a grain legume. *J Exp Bot*, 61: 721~733
- Takahashi H, Yamazaki M, Sasakura N, Watanabe A, Leustek T, De Almeida Engler J, Engler G, Van Montagu M, Saito K (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 11102~11107
- Vauclaire P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos O, Krähenbühl U, Op den Camp R, Brunold C (2002). Flux control of sulfate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulfate reductase is more susceptible to negative control by thiols than ATP sulfurylase. *Plant J*, 31: 729~740
- Vieira DSC, Rey P (2006). Plant thioredoxins are key actors in oxidative stress response. *Trends Plant Sci*, 11: 329~334
- Waddell J (1958). Supplementation of plant proteins with amino acids. In: Altschul AM (ed). *Processed Plant Protein Foodstuffs*. Academic Press, New York, 307~351
- Watanabe M, Hubbertenb H-M, Saito K, Hoefgen R (2010). General regulatory patterns of plant mineral nutrient depletion as revealed by serate quadruple mutants disturbed in cysteine synthesis. *Mol Plant*, 3 (2): 438~466
- Watanabe M, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Noji M, Saito K (2008a). Physiological roles of  $\beta$ -substituted alanine synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 146: 310~320
- Watanabe M, Mochida K, Kato T, Tabata S, Yoshimoto N, Noji M, Saito K (2008b). Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 2484~2496
- Wirtz M, Droux M (2005). Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynth Res*, 86: 345~362
- Wirtz M, Droux M, Hell R (2004). O-acetylserine(thiol)lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 55: 1785~1798
- Wirtz M, Hell R (2003). Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: application of cysteine feedback-insensitive isoforms of serine acetyltransferase. *Amino Acids*, 24: 195~203
- Wirtz M, Hell R (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol*, 163: 273~286
- Yi H, Galant A, Ravilious GE, Preuss ML, Jez JM (2010). Sensing sulfur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Mol Plant*, 3 (2): 269~279
- Youssefian S, Nakamura M, Orudjev E, Kondo N (2001). Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-acetylserine(thiol) lyase modifies plant responses to oxidative stress. *Plant Physiol*, 126: 1001~1011
- Youssefian S, Nakamura M, Sano H (1993). Tobacco plants transformed with the O-acetylserine(thiol)lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. *Plant J*, 4: 759~769
- Zhang CH, Meng QC, Zhang M, Huang F, Gai JY, Yu DY (2008). Characterization of O-acetylserine(thiol)lyase encoding genes reveals their distinct but cooperative expression in cysteine synthesis of soybean [*Glycine max* (L) Merr]. *Plant Mol Biol Rep*, 26 (4): 277~291