

## 植物的磷酸乙醇胺甲基转移酶

李丹, 尹辉, 张毅, 李秋莉\*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029

## Plant Phosphoethanolamine *N*-methyltransferase

LI Dan, YIN Hui, ZHANG Yi, LI Qiu-Li\*

College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

摘要: 磷酸乙醇胺甲基转移酶(PEAMT)是催化磷酸乙醇胺(P-EA)甲基化, 最终合成磷酸胆碱(P-Cho)的关键酶。文章就近年来植物中PEAMT的结构、性质、功能、表达特性、分子生物学和基因工程的研究进展作了概述。

关键词: 磷酸乙醇胺甲基转移酶; 磷酸乙醇胺; 磷酸胆碱

磷酸乙醇胺甲基转移酶(phosphoethanolamine *N*-methyltransferase, phosphoethanolamine methyltransferase, PEAMT, EC 2.1.1.103)系统名为 *S*-腺苷甲硫氨酸: 磷酸乙醇胺甲基转移酶 (*S*-adenosyl-*L*-methionine: ethanolamine-phosphate *N*-methyltransferase), 是一种甲基转移酶, 其主要功能是催化磷酸乙醇胺(P-EA)甲基化, 最终合成磷酸胆碱(P-Cho), 是合成磷酸胆碱的关键酶 (Datko 和 Mudd 1988a, b; Nuccio 等 2000; Smith 等 2000; Summers 和 Weretilnyk 1993)。磷酸胆碱是合成磷脂酰胆碱(Ptd-Cho)和甜菜碱(GlyBet)的前体, 磷脂酰胆碱和甜菜碱合成途径如图 1 所示。磷脂酰胆碱是植物细胞膜上含量最丰富的磷脂, 约占总膜脂的 60% (Datko 和 Mudd 1988b; Prud'homme 和 Moore 1992b; Moreau 等 1998),

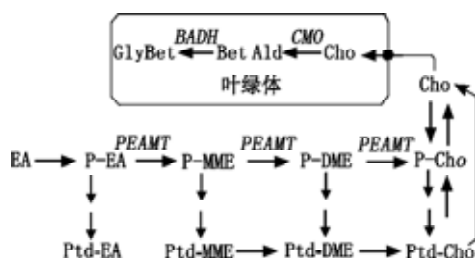


图1 磷脂酰胆碱和甜菜碱的合成途径(McNeil 等 2001)

PEAMT 是合成磷酸胆碱(P-Cho)的关键酶, 催化磷酸乙醇胺(P-EA)连续 3 步的甲基化反应。方框内叶绿体中甜菜碱(GlyBet)的合成只在某些植物中发生。P-: 磷酸基; Ptd-: 磷脂酰基; EA: 乙醇胺; MME: 单甲基乙醇胺; DME: 二甲基乙醇胺; Cho: 胆碱; Bet Ald: 甜菜碱醛; GlyBet: 甜菜碱; CMO (choline monooxygenase): 胆碱单加氧酶; BADH (betaine aldehyde dehydrogenase): 甜菜碱醛脱氢酶。

其含量和多聚不饱和度与植物的抗寒性相关 (Kinney 等 1987), 对植物的结构和生化功能有作用。甜菜碱是一类小分子渗透调节剂, 对细胞的渗透调节、生物大分子结构和功能的稳定有一定的作用, 也能影响细胞内离子的分布。由于 PEAMT 在磷酸胆碱合成中的主要调控作用以及磷脂酰胆碱和甜菜碱在植物体内的作用, 近年来此酶的研究越来越多。

### 1 PEAMT的结构

植物的 PEAMT 普遍含有 2 个不同的 *S*-腺苷甲硫氨酸依赖催化活性结构域(domain), 分别称为第 1 结构域(或 N 端结构域)和第 2 结构域(或 C 端结构域)。每个结构域里含有 4 个基序(motif), 分别为基序 I、基序 p-、基序 II、基序 III (图 2) (Kagan 和 Clarke 1994; Gary 等 1996; Pessi 等 2004)。分析已分离的 PEAMT 基因结构表明, 植物 PEAMT 中普遍存在两结构域和四基序的特征 (Nuccio 等 2000; Bolognese 和 McGraw 2000; Charron 等 2002; Ye 等 2005)。



图2 植物 PEAMT 的结构(Pessi 等 2004)

收稿 2007-05-21 修定 2007-08-18

资助 辽宁省科技基金(20031060)。

\* 通讯作者(E-mail: liqiuli@dl.cn; Tel: 0411-84258681)。

Palavalli 等(2006)用软件比对线虫(*Caenorhabditis elegans*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、小麦(*Triticum aestivum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的PEAMT氨基酸序列证实,此酶存在2个结构域和4个保守基序。Cheng 等(1993)认为基序I在结合 Ado-Met (*S*-腺苷甲硫氨酸)的结构域中最重要。Charron 等(2002)定点突变小麦2个结构域中的基序I(将第5位的甘氨酸变成谷氨酸),结果表明:N端结构域的基序I定点突变后其PEAMT活性丧失,C端结构域中基序I突变对PEAMT活性没有影响,进一步证明基序I是重要的。他们认为第2结构域在植物体内可以促进PEAMT对甲基的结合,从而可提高酶的催化效率。在逆境胁迫下,植物中C端结构域的活性就会增强,可以生成更多的P-Cho合成胆碱和甜菜碱。

菠菜PEAMT可催化连续的3步反应(Weretilnyk 等1995;Nuccio 等2000;Smith 等2000),Nuccio 等(2000)进一步用基因工程方法缺失C端结构域后,N端结构域仅能催化第1步反应,而C端则可催化后2步反应。菠菜PEAMT酶活性受磷酸胆碱的强烈抑制,但C端结构域缺失的酶对反馈抑制并不敏感。在小麦中,若缺失第1结构域,其PEAMT即完全失去甲基化磷酸乙醇胺的活性,而缺失第2结构域对酶的活性没有什么影响(Charron 等2002)。

## 2 PEAMT的性质

Summers 和 Weretilnyk (1993)在菠菜中观察到PEAMT的酶促反应在水溶液中进行,用薄层层析法可以从水溶提取物中检测到所有酶促反应的产物,说明此酶是亲水的;Bolognese 和 McGraw (2000)根据软件分析拟南芥 AtNmt1p (即PEAMT)的结果,认为PEAMT有亲水基团,是亲水的。Nuccio 等(2000)用分子排阻色谱法研究菠菜PEAMT时,证明PEAMT是单体酶。

Weretilnyk等(1995)在菠菜叶的胞质中检测到催化P-EA合成P-Cho 3步反应(P-EA → P-MME → P-DME → P-Cho)的酶的大部分活性,分别为整个PEAMT活性的91.2%、90.4%、89.3%(叶绿体和线粒体中也有1%~2%活性),显示此酶为胞质

酶。Bolognese 和 McGraw (2000)用软件分析拟南芥 AtNmt1p (即PEAMT)基因序列,发现该序列中不存在N端叶绿体引导信号,认为PEAMT有65%的可能性为胞质蛋白。Charron 等(2002)用亚细胞定位分析技术观察到,此酶只存在于胞质中,且不与膜结合。Ye 等(2005)用SMART和iPSORT程序分析油菜(*Brassica napus*)的PEAMT基因序列时,也未发现PEAMT中存在负责亚细胞定位的N端肽信号,这些都表明PEAMT是一种胞质酶。

Hanson 和 Rhodes (1983)用<sup>14</sup>C同位素示踪法观察甜菜(*Beta vulgaris*)的磷酸胆碱合成过程,发现磷酸胆碱的合成受其自身的反馈抑制。Mudd 和 Datko (1989a)观察到浮萍(*Lemna paucicostata*)粗提物中的PEAMT活性可为磷酸胆碱抑制。Mudd 和 Datko (1989b)报道,在大豆(*Glycine max*)和胡萝卜(*Daucus carota*)培养基中添加胆碱会抑制其PEAMT活性。Smith 等(2000)进一步研究发现,此酶的活性可以为*S*-腺苷高半胱氨酸、磷酸胆碱、磷酸根、Mn<sup>2+</sup>和Co<sup>2+</sup>抑制,但不为乙醇胺、甲基化乙醇胺、二甲基乙醇胺、胆碱、甜菜碱或Mg<sup>2+</sup>抑制,这些都表明此酶的活性受产物反馈抑制。

## 3 PEAMT的功能

一般认为,植物中的PEAMT可催化P-EA的甲基化,在有些物种中此酶还可以催化后2步的甲基化反应(图3)。

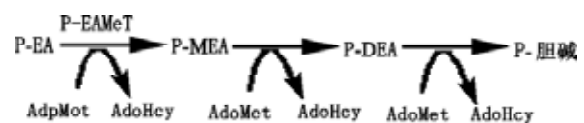


图3 菠菜叶片中磷酸胆碱合成途径(Smith 等2000)

菠菜叶片中P-EA经过连续的3步甲基化反应生成P-Cho; AdoMet: *S*-腺苷甲硫氨酸为甲基供体; AdoHcy: *S*-腺苷高半胱氨酸。

拟南芥(Bolognese 和 McGraw 2000; Mou 等2002)、菠菜(Summers 和 Weretilnyk 1993; Nuccio 等2000; Smith 等2000)、小麦(Charron 等2002)、浮萍(Datko 和 Mudd 1988b)和胡萝卜(Datko 和 Mudd 1988a)的PEAMT可以催化连续的3步甲基化反应,而大豆中的PEAMT只能催化第1步反应(Datko 和 Mudd 1988a)。Lorenzin 等(2001)检测17

个物种的结果表明, PEAMT都具有第1步甲基化的酶活性, 其中能积累甜菜碱的物种, 如棉花(*Gossypium hirsutum*)、甜菜、苋菜(*Amaranthus caudatus*)和向日葵(*Helianthus annuus*)中PEAMT活性更高, 除大豆和豌豆(*Pisum sativum*)外, 其余物种的PEAMT都能催化后2步反应。Prud'homme和Moore (1992a)报道蓖麻(*Ricinus communis*)种胚中的PEAMT没有第1步甲基化酶活性, 而Lorenzin等(2001)在蓖麻叶子中则检测到了前2步酶的活性, 认为可能是由于光照或不同部位PEAMT的合成方式不同造成的。

Datko和Mudd (1988b)针对大多数植物的PEAMT可催化连续3步甲基化反应, 而少数植物的PEAMT仅催化第1步甲基化反应的现象, 提出假设认为, 植物在自然界的演化过程中存在原被子植物(proangiosperm), 这种原被子植物的PEAMT仅具有催化第1步甲基化反应的活性并在进化中得以保留, 而后2步催化甲基化的能力则是一些植物在进化过程中才具有; 或者可以认为, 原被子植物的PEAMT可以催化连续的3步反应, 而在进化过程中某些物种PEAMT失去了后2步催化甲基化反应的活性(或能力)。

#### 4 PEAMT与逆境胁迫的关系

Summers和Weretilnyk (1993)分别用100、200和300 mmol·L<sup>-1</sup>氯化钠处理菠菜叶片后, 其PEAMT酶活性均高于未做氯化钠处理的。Weretilnyk等(1995)也观察到在盐胁迫下, 菠菜中PEAMT酶活性增加。Nuccio等(2000)发现, 盐胁迫下菠菜PEAMT的mRNA水平约增长10倍; Ye等(2005)也检测到油菜叶经盐诱导后, 其PEAMT的mRNA水平上升。此外, 一些实验还相继观察到此酶活性与光照和温度等因素有关。Weretilnyk等(1995)的实验表明, 暗培养时菠菜中催化P-EA甲基化的酶活性降低, 随着暗培养时间的延长酶活性进一步下降, 光照下酶活性升高。Lorenzin等(2001)研究17种植物的结果表明, 在光照强度减小时各种植物中的PEAMT活性有不同程度的减少(30%~90%), 其中能合成甜菜碱的植物PEAMT酶活性下降幅度最大。Horváth和van Hasselt (1985)研究黄瓜(*Cucumis sativus*)冷敏感性的结果表明, 在寒冷胁迫下胆碱及其类似物可以维持植物脂膜的

完整性。Charron等(2002)认为不同品种小麦的耐寒程度和PEAMT的mRNA水平紧密相关。Mou等(2002)报道, 内源PEAMT的表达沉默会导致植株对温度敏感而发生雄性不育, 胆碱含量下降约64%, 且其对盐高度敏感。

#### 5 PEAMT的分子生物学与基因工程

PEAMT的分子生物学研究也有了一定的进展。1999年, Bolognese首先从拟南芥中分离到PEAMT cDNA, 该基因全长1878 bp, 其中5'非编码区域201 bp, 开放阅读框1476 bp, 编码492个氨基酸, 3'非编码区域201 bp (Bolognese和McGraw 2000)。其后, 菠菜和小麦等的PEAMT基因也相继获得。我们用生物分析软件MEGA 3.1对GenBank中收录的10种植物PEAMT的氨基酸序列进行了比对, 该10种植物的PEAMT序列中均包含有结构域1和结构域2的保守序列。以恶性疟原虫的PEAMT为参照构建了植物PEAMT基因分子进化树(图4), 从进化树中可以看出, 亲缘关系近的PEAMT的同源性高, 说明PEAMT的分子进化与物种进化是一致的。

关于PEAMT基因工程的研究, 目前报道较少。McNeil等(2001)报道, 在转化了胆碱单加氧酶(CMO)和甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因的烟草(*Nicotiana tabacum*)中转入菠菜PEAMT基因, 获得了转CMO-BADH-PEAMT三价基因烟草(即3个外源基因均转化到烟草中), 转基因的烟草中PEAMT蛋白水平至少增加40倍, 磷酸胆碱含量增加5倍, 胆碱含量增加50倍, 表明PEAMT基因可显著提高转基因植株体内胆碱的含量, 解除内源胆碱含量不足对甜菜碱合成的限制(Nuccio等1998, 2000; Huang等2000; McNeil等2000), 从而进一步提高植物抗性。

#### 6 结束语

近年来关于PEAMT的研究越来越多, 取得了一定的进展, 但如何解除产物的反馈抑制、怎样认识2个结构域的功能及其之间的相互关系, 仍需进一步深入研究; 同时, 开展PEAMT基因工程, 提高转基因植物的磷脂酰胆碱含量, 可能是提高植物抗性的一条途径, 这也有待继续探讨。

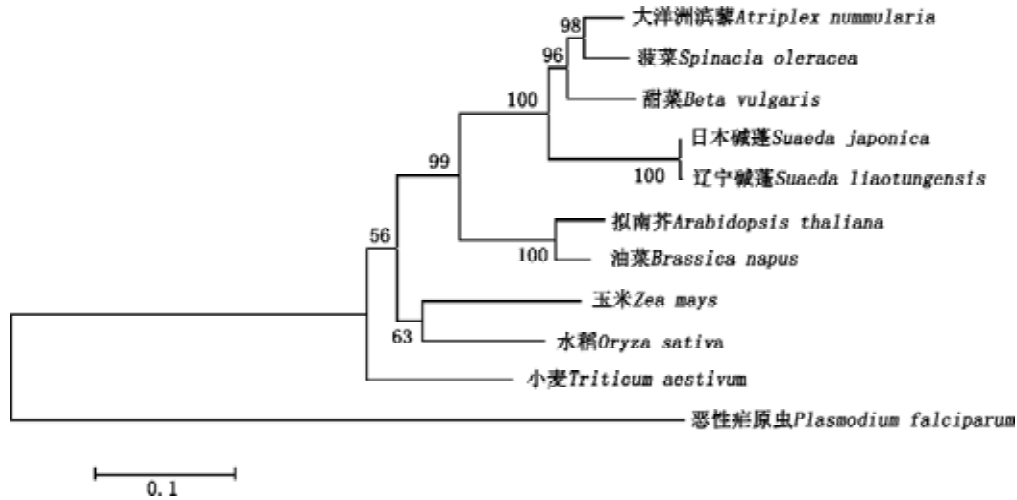


图4 PEAMT系统进化树

基因序列来源于 GenBank。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AF197940); 菠菜(*Spinacia oleracea*, AF237633); 小麦(*Triticum aestivum*, AY065971); 日本碱蓬(*Suaeda japonica*, AB080186); 油菜(*Brassica napus*, AY319479); 大洋洲滨藜(*Atriplex nummularia*, AB196771); 玉米(*Zea mays*, AY626156); 水稻(*Oryza sativa*, AY551100); 甜菜(*Beta vulgaris*, AB221008); 辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis*, EF057749)。

### 参考文献

- Bolognese CP, McGraw P (2000). The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-Adenosylmethionine: phospho-ethanolamine N-methyltransferase. *Plant Physiol*, 124: 1800~1813
- Charron JBF, Breton G, Danyluk J, Muzac I, Ibrahim RK, Sarhan F (2002). Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat. *Plant Physiol*, 129: 363~373
- Cheng X, Kumar S, Posfai J, Pflugrath JW, Roberts RJ (1993). Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell*, 74: 299~307
- Datko AH, Mudd SH (1988a). Phosphatidylcholine synthesis. Differing patterns in soybean and carrot. *Plant Physiol*, 88: 854~861
- Datko AH, Mudd SH (1988b). Enzymes of phosphatidylcholine synthesis in *Lemna*, soybean and carrot. *Plant Physiol*, 88: 1338~1348
- Gary JD, Lin WJ, Yang MC, Herschman HR, Clarke S (1996). The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271: 12585~12594
- Hanson AD, Rhodes D (1983). <sup>14</sup>C tracer evidence for synthesis of choline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant Physiol*, 71: 692~700
- Horváth I, van Hasselt PR (1985). Inhibition of chilling induced photooxidative damage to leaves of *Cucumis sativus* L. by treatment with amino alcohols. *Planta*, 164: 83~88
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol*, 122: 747~756
- Kagan RM, Clarke S (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys*, 310: 417~427
- Kinney AJ, Clarkson DT, Loughman BC (1987). The regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in rye (*Secale cereale*) roots. Stimulation of the nucleotide pathway by low temperature. *Biochem J*, 242: 755~759
- Lorenzin D, Webb C, Summers PS, Weretilnyk EA (2001). Enzymes of choline synthesis in diverse plants: variation in phosphobase N-methyltransferase activities. *Can J Bot*, 79 (8): 897~904
- McNeil SD, Nuccio ML, Ziemak MJ, Hanson AD (2001). Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (17): 10001~10005
- McNeil SD, Rhodes D, Russell BL, Nuccio ML, Shachar-Hill Y, Hanson AD (2000). Metabolic modeling identifies key constraints on an engineered glycine betaine synthesis pathway in tobacco. *Plant Physiol*, 124: 153~162
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C (1998). Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res*, 37: 371~391
- Mou ZL, Wang XQ, Fu ZM, Dai Y, Han C, Ouyang J, Bao F, Hu YX, Li JY (2002). Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 2031~2043
- Mudd SH, Datko AH (1989a). Synthesis of methylated ethanolamine moieties. Regulation by choline in *Lemna*. *Plant Physiol*, 90: 296~305

- Mudd SH, Datko AH (1989b). Synthesis of methylated ethanolamine moieties. Regulation by choline in soybean and carrot. *Plant Physiol*, 90: 306~310
- Nuccio ML, McNeil SD, Ziemak MJ, Hanson AD (2000a). Choline import into chloroplasts limits glycine betaine synthesis in tobacco: analysis of plants engineered with a chloroplastic or a cytosolic pathway. *Metab Eng*, 2: 300~311
- Nuccio ML, Russel BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J*, 16: 487~496
- Nuccio ML, Ziemak MJ, Henry SA, Weretilnyk EA, Hanson AD (2000b). cDNA cloning of phosphoethanolamine N-Methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem*, 275: 14095~14101
- Palavalli LH, Brendza KM, Haakenson W, Cahoon RE, McLaird M, Hicks LM, McCarter JP, Williams DJ, Hresko MC, Jez JM (2006). Defining the role of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Caenorhabditis elegans* in phosphocholine biosynthesis by biochemical and kinetic analysis. *Biochem*, 45: 6056~6065
- Pessi G, Kociubinski G, Mamoun CB (2004). A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (16): 6206~6211
- Prud'homme MP, Moore TS Jr (1992a). Phosphatidylcholine synthesis in castor bean endosperm. Free bases as intermediates. *Plant Physiol*, 100: 1527~1535
- Prud'homme MP, Moore TS Jr (1992b). Phosphatidylcholine synthesis in castor bean endosperm. The occurrence of an S-adenosyl-L-methionine: ethanolamine N-methyltransferase. *Plant Physiol*, 100: 1536~1540
- Smith DD, Summers PS, Weretilnyk EA (2000). Phosphocholine synthesis in spinach: characterization of phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Physiol Plant*, 108: 286~294
- Summers PS, Weretilnyk EA (1993). Choline synthesis in spinach in relation to salt stress. *Plant Physiol*, 103: 1269~1276
- Weretilnyk EA, Smith DD, Wilch GA, Summers PS (1995). Enzymes of choline synthesis in spinach. Response of phosphobase N-methyltransferase activities to light and salinity. *Plant Physiol*, 109: 1085~1091
- Ye CJ, Wu SW, Yang QK, Ma CZ, Yang GS, Wang B (2005). Cloning, sequencing and salt induced expression of *PEAMT* and *BADH* in oilseed rape (*Brassica napus*). *DNA Seq*, 16 (5): 364~371