

## 过表达拟南芥点突变乙酰羟酸合成酶基因改变植物对缬氨酸的抗性并增强缬氨酸合成

赵菲佚\*, 焦成瑾, 王太术, 田春芳, 谢尚强, 刘亚萍

天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃天水741001

**摘要:** 拟南芥乙酰羟酸合成酶(acetohydroxyacid synthase, AHAS)在支链氨基酸合成中具有重要的作用。为考察AHAS不同亚基关键位点突变对植物缬氨酸抗性与缬氨酸合成的影响,对AHAS大小亚基上特定位点进行体外突变,构建AHAS点突变过表达转基因植物,研究AHAS不同亚基点突变转基因植物对缬氨酸抗性及其合成的影响。研究表明:AHAS小亚基G88D突变解除了终端产物对该酶的反馈抑制作用,使转基因植物缬氨酸含量提高。大亚基E305D突变增强小亚基G88D突变效应,而大亚基E482D突变对G88D突变具有相反的作用。AHAS全酶E305DG88D双突变转基因植物较E482DG88D具有更强的缬氨酸抗性表型和更高的缬氨酸含量。这些结果提示AHAS大小亚基间存在着相互作用,大小亚基不同位点突变对AHAS全酶活性具有不同的影响。

**关键词:** 乙酰羟酸合成酶; 点突变; 转基因植物; 缬氨酸抗性表型; 缬氨酸含量

## Overexpression of the Point Mutated Acetohydroxyacid Synthase Alters Resistance to Valine and Enhances Production of Valine in *Arabidopsis*

ZHAO Fei-Yi\*, JIAO Cheng-Jin, WANG Tai-Shu, TIAN Chun-Fang, XIE Shang-Qiang, LIU Ya-Ping

School of Bioengineering & Biotechnology, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001, China

**Abstract:** Acetohydroxyacid synthase (AHAS) plays a pivotal role in the synthesis of branched-chain amino acids (BCAAs) in *Arabidopsis*. To investigate effects of various specific mutated sites harboring in the large and small subunits of AHAS on resistance to valine and production of valine in *Arabidopsis*, transgenic plants overexpressing the point mutated AHAS were generated by site-directed mutagenesis, and the phenotype of resistance to valine and production of valine of the transgenic plants were evaluated *in planta*. The results showed that the G88D mutation in the small unit of AHAS abolished the feedback-resistance of valine to AHAS and this mutation resulted in increase of valine in the transgenic plants. The E305D mutation in the large unit of AHAS strengthens the effect of the G88D mutation. Interestingly, the E482D mutation in the large unit of AHAS acts antagonistically on the G88D mutation in resistance to valine and production of valine in transgenic plants. Compared with the combined double E482DG88D AHAS mutant transgenic plants, the E305DG88D AHAS transgenic plants exhibited the increased valine resistance and accumulated the more content of valine *in planta*. The results in this study suggested that the large unit interacts with the small unit of AHAS and different mutations in various sites of AHAS displayed distinct effects on the holoenzyme activity of AHAS.

**Key words:** acetohydroxyacid synthase; point mutation; transgenic plants; valine-resistance phenotype; valine content

缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸由于具有支链碳骨架被称为支链氨基酸,在动物生长与发育过程中有着不可或缺的作用(Harris等2005; Nair和Short 2005; Brosnan和Brosnan 2006)。已有研究表明:在动物体内,支链氨基酸可被如mTOR (mammalian target of rapamycin)信号蛋白感应,在促进蛋白合成与抑制蛋白降解中起着重要的作用。此外,支链氨基酸也直接或间接参与神经递质谷氨酸的合

成与区室化;对胺类神经递质5-羟色胺、儿茶酚胺类多巴胺和去甲肾上腺素的合成也有影响(Hutson等2001; Fernstrom 2005; Nair和Short 2005)。然而,动物体内不能进行支链氨基酸的从头合成,只能

收稿 2015-02-05 修定 2015-06-10

资助 国家自然科学基金(31160060和31260568)。

\* 通讯作者(E-mail: tspaulzhao@163.com; Tel: 0938-8362830)。

从饮食中获取,植物是动物获取支链氨基酸的重要来源。因而,植物支链氨基酸的合成与调控研究具有重要的理论与实际意义。

植物、细菌与真菌通过一个保守的代谢途径进行支链氨基酸的合成,该合成途径中的合成酶活性不仅受到底物的严格调控,而且受终端产物的反馈抑制(Singh和Shaner 1995; Duggleby和Pang 2000; Chipman等2005)。乙酰羟酸合成酶(AHAS,也称为乙酰乳酸合成酶)为支链氨基酸合成途径的第1个合成酶。在植物中,3种支链氨基酸对AHAS的活性均有抑制作用,但缬氨酸显示出较亮氨酸与异亮氨酸更为明显的抑制效应(Miflin和Cave 1972)。

至今,人们对不同物种的AHAS已进行了比较详细的研究。细菌AHAS为四聚体,由2个催化亚基(CSUs)和2个调节亚基(RSUs)组成。调节亚基上包含1个高度保守的ACT功能结构域,该结构域使调节亚基有稳定和增强催化亚基活性的功能(Vyazmensky等1996)。另外,调节亚基与催化亚基相互作用介导终端支链氨基酸对AHAS活性的反馈抑制作用(Lee和Duggleby 2001, 2002; Mendel等2001, 2003; Kaplun等2006)。与细菌AHAS不同,植物AHAS催化亚基含有2个ACT功能结构域,使植物AHAS可能有与细菌AHAS不同的拓扑属性,导致与细菌AHAS功能的差异(Hershey等1999)。

过表达植物AHAS催化亚基不能提高支链氨基酸含量(Tourneur等1993),表明植物AHAS的调控方式可能更复杂。最近发现拟南芥RSU的T119L显性突变可解除缬氨酸对AHAS的反馈抑制,使*vat1*突变体有较高的缬氨酸含量(Chen等2010)。但该研究仅对AHAS调节亚基上点突变对植物支链氨基酸的合成影响进行了探讨。对原核AHAS研究表明: AHAS大小亚基同时突变导致酶蛋白产生变构效应,进而影响酶活性。细菌AHAS大亚基H132、K155、E213、D217、E221、E389、E393和S414为关键性活性位点,除E213D外,其余位点突变使细菌AHAS活性完全丧失。E213D突变使细菌AHAS的酶活性只有野生酶蛋白的25% (Tyagi等2005)。菠菜AHAS大亚基体外突变分析结果与细菌的相似,大亚基R258、E311、D315、E319、E488、E492、S518和T520

组成了AHAS的活性中心,除E488D突变外,其他突变导致酶活性丧失, E488D突变的酶活性为野生型的48% (Dumas等1995)。蛋白序列比对发现,细菌AHAS大亚基E213对应拟南芥E305,菠菜E488对应拟南芥E482。细菌AHAS小亚基ilvH上N11A、G14D、N29H、T34L、A36V及Q59L突变对细菌AHAS的缬氨酸抗性效应与酶活性均有影响, G14D突变酶活性为野生型的92%,并表现出最强的缬氨酸抗性。细菌G14D突变对应拟南芥小亚基G88D突变(Mendel等2001)。

本研究对拟南芥AHAS大小亚基上相应于细菌与菠菜的关键位点进行体外突变,构建AHAS点突变转基因植物,观察其缬氨酸抗性表型并对转基因植物缬氨酸含量进行测定,考察AHAS大小亚基关键位点突变对植物支链氨基酸合成的影响。研究结果对揭示AHAS大小亚基相互作用方式及提高支链氨基酸含量方法具有指导意义。

## 材料与方法

### 1 引物设计

使用Primer Premier 5.0软件进行引物设计,研究用所有引物由上海生物工程公司进行合成。引物序列见表1。

### 2 AHAS点突变植物表达载体构建

拟南芥总RNA提取选用MS平板上生长7 d的整株幼苗(Col-0),使用上海生物工程公司总RNA提取试剂盒进行(Sangon, SK1312)。提取总RNA使用Invitrogen公司反转录酶进行cDNA第一链反转录(Invitrogen, 18080-093),以cDNA为模板,PCR高保真酶扩增AHAS大小亚基CDS (*Trans*, AP221-01)。野生型AHAS大亚基使用ALU-F和ALU-R引物对进行扩增。AHAS小亚基扩增正向引物为ASU-F,反向引物为ASU-R。AHAS大亚基第305位E305D的正向突变引物为ALUE305D-F,反向突变引物为ALUE305D-R。大亚基第482位E482D正向突变引物为ALUE482D-F,反向引物为ALUE482D-R。AHAS小亚基第88位G88D正向突变引物为ASUG-88D-F,反向突变引物为ASUG88D-R。突变引物中下划线指示各突变碱基(表1)。PCR方式引入目标突变,以AHAS大小亚基基因全长正向引物与目标突变位点反向突变引物或全长反向引物与目标

表1 本研究中使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	限制性酶
ALU-F	CTAGTCTAG <u>A</u> ATGGCGGCGGCTACTTCATCCATC	<i>Xba</i> I
ALU-R	ACGCGTCGACTCAGTTGCTAGATTGACGCAAC	<i>Sal</i> I
ASU-F	CGCGGATCCATGGCGGCGACGACGACTGCTAC	<i>Bam</i> HI
ASU-R	CCC <u>AAGCTT</u> CTACAAAGGAAGAGAGTATCCACG	<i>Hind</i> III
ALUE305D-F	ACTCTTGAACAGGA <u>T</u> TACAGGAGTGAC	
ALUE305D-R	GTCACCTCTGTA <u>T</u> CTCTGTTC AAGAGT	
ALUE482D-F	CACTCTTACTCAG <u>A</u> TATCATCAACGAG	
ALUE482D-R	CTCGTTGATGAT <u>A</u> CTGAGTAAGAGTG	
ASUG88D-F	GGCGATGAGAGCG <u>A</u> TATAATAAATAGA	
ASUG88D-R	TCTATTTATAT <u>A</u> TCTGCTCTCATCGCC	
E305D-F	GCCGCCGATGTTGCATTGGGATG	
E305D-R	AAAGATGTCACCTCC <u>A</u> GTA	
E482D-F	CGCGTCAGGAAGTCCAGACCTG	
E482D-R	CACGGATTCAATCACACTCTCGTTGATG <u>A</u>	
G88D-F	GACGGGAGGAAGATGAGGAATGC	
G88D-R	TACTCCAGCAATCTATTTATTA <u>G</u> A	
35S-F	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC	
ASUN-F	GTCTAGCTGTTGGTCTCTGCTG	
ASUN-R	GATGCTGAAACAACGTGCA	
ALUN-F	GTCCAGACCTGCTGGTGACT	
ALUN-R	ACTCTCGACTTAATACTCCG	

序列中下划线为酶作用位点或突变碱基。

突变正向突变引物为引物对,以cDNA为模板进行PCR扩增,分别扩增的PCR产物经胶回收柱(Sangon, SK8132)回收后等量混合作为突变全长PCR模板,再次以基因全长两端引物进行扩增,扩增产物回收后进行双酶切,再次纯化后连接到pCAMBIA1307植物表达载体上。转化DH5 $\alpha$ 宿主菌,每个突变载体挑选2个不同克隆送上海生物工程公司测序验证,每个克隆重复测2次,以2个不同克隆4次测序结果与基因标准参考序列进行比对,如与参考序列相同并在目标突变位点引入正确突变,则突变载体构建成功,否则,重新构建突变载体,直至正确为止。

### 3 植物材料、生长条件、植物转化与鉴定

植物材料使用拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(Col-0),营养钵中AHAS点突变转基因植物生长表型观察使用22℃下长日照(16 h光/8 h暗)条件培养。含不同缬氨酸浓度MS竖直平板上转基因植物初生根长表型分析使用22℃下连续光照培养。

植物转化方法采用农杆菌浸蘸法,拟转化农

杆菌GV3101在含50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的利复平和50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的LB培养基中小量过夜培养,次日接种至250 mL与小量培养液相同的LB培养液中,当菌液OD<sub>600</sub>至2左右时,4 000 r·min<sup>-1</sup>常温离心10 min收集菌体,菌体沉淀重悬浮于150 mL转化液(每升含MS盐2.22 g、蔗糖50 g、SilwetL-77 200  $\mu\text{L}$ 、6-BA 200  $\mu\text{L}$ )中,拟被转化植物倒置浸入转化液中20~30 s后用保鲜膜包裹,水平放置于培养盘中24 h后转入正常培养。转基因植物T<sub>0</sub>代种子在MS固体平板(含40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素和50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的头孢氨苄)上进行筛选。

用衍生型酶切扩增多态性序列(derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS)分子标记技术鉴定转基因阳性候选植株。AHAS大亚基E305D及E482D,小亚基G88D的dCAPS鉴定引物由dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)设计如下: AHAS大亚基E305D突变鉴定引物为E305D-F和E305D-R (*Sca*I切野生型)。AHAS大亚基E482D突变鉴定引物为E482D-F和E482D-R (*Eco*RI切野生型)。小亚基G88D突变鉴



定引物使用G88D-F和G88D-R (*DpnI*切突变体)。引物中下划线为dCAPS Finder 2.0引入的突变碱基。dCAPS鉴定过程为: 提取转化植株或野生型基因组DNA作为模板, 对AHAS点突变转基因植物使用CaMV35S正向引物35S-F与突变基因全长反向引物进行PCR扩增, 扩增产物作为模板, 以设计的上述AHAS大小亚基上点突变位点dCAPS鉴定特异引物进行PCR扩增; 野生型对照则以提取的基因组DNA为模板, 直接以dCAPS突变鉴定引物进行扩增, 扩增产物回收后以设计的内切酶进行酶切, 酶切产物经5%琼脂糖凝胶电泳分离。

#### 4 RNA提取、分离及Northern blot分析

以拟南芥野生型(Col-0)及AHAS各转基因植株叶片为材料, 总RNA提取采用上海生物工程公司试剂盒(SK8661), 并按照推荐提取方法进行。所提取总RNA定量后, 取30  $\mu\text{g}$ 总RNA在含甲醛的1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳, 后转到Hybond N<sup>+</sup>尼龙膜上进行杂交, 杂交过程参考Liu等(2000)方法。探针使用TaKaRa公司试剂盒(D6045), 以 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP为底物, 植物表达载体为模板进行标记, 对AHAS小亚基使用引物对ASUN-F和ASUN-R; 大亚基使用引物ALUN-F和ALUN-R。杂交在42  $^{\circ}\text{C}$ 下进行, rRNA的EB染色作为上样对照, 杂交信号用Phosphoimager扫描。

#### 5 AHAS点突变转基因植物表型分析

AHAS点突变转基因植物种子4  $^{\circ}\text{C}$ 春化3 d后, 用20%次氯酸钠消毒液(含0.1% TritonX-100)在EP管中消毒10 min, 灭菌ddH<sub>2</sub>O洗5次后点种于MS固体培养基平板上, 置于22  $^{\circ}\text{C}$ 连续光照下竖直培养。当幼苗根长至1.5~2.0 cm时将相同大小幼苗移入含“品氏育苗”基质(Pindstrup, 丹麦品氏托普公司)营养钵中, 置于22  $^{\circ}\text{C}$ 长日照(16 h光/8 h暗)条件下生长, 2周后进行生长表型观察。同时将相同大小幼苗转移至不同浓度缬氨酸的MS处理平板上, 22  $^{\circ}\text{C}$ 连续光照培养条件竖直培养, 转板后6 d对转基因植物拍照, 使用ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>)软件对初生根长度进行测量。

#### 6 自由缬氨酸含量测定

自由氨基酸含量测定使用营养钵中生长4周的野生型(Col-0)与转基因拟南芥幼苗为材料, 测定方法参考Hacham等(2002)的方法进行。约200 mg

幼苗在液氮中研磨至粉末状, 加入600  $\mu\text{L}$ 提取液(水:氯仿:甲醇=3:5:12, *V/V*), 再次充分研磨至匀浆样转入离心管中, 600  $\mu\text{L}$ 提取液漂洗研钵合并至离心管中, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 将上清转入另一离心管中, 加入300  $\mu\text{L}$ 氯仿和450  $\mu\text{L}$ 水, 再次12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集上部水与甲醇相冷冻干燥, 产物重新溶于100  $\mu\text{L}$ 的20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl中, 取出10  $\mu\text{L}$ 使用AccQ衍生试剂盒进行衍生化(Waters, <http://www.waters.com/>)。衍生化后的氨基酸使用ACQUITY UPLC系统进行自由氨基酸分析(Waters), 用缬氨酸标准品定量。

## 实验结果

### 1 拟南芥AHAS大小亚基基因与蛋白结构及其突变位置

拟南芥AHAS由2个大亚基和2个小亚基构成, 大亚基为催化亚基, 小亚基为调节亚基。AHAS大亚基(ALU)基因定位于第3条染色体上(At3g58610), 基因全长3 658 bp, 包含11个外显子和10个内含子(图1-A), CDS共有1 776 bp, 编码蛋白含591个氨基酸(图1-B)。突变第6个外显子上第1 611位(以其转译起点计)G为T, 蛋白第305位氨基酸由E转变为D, 突变第10个外显子第2 749位(转译起点计)A为T, 使蛋白第482位由E变为D。AHAS小亚基(ASU)基因定位于第5条染色体上(At5g16290), 基因全长3 981 bp, 包含13个外显子和12个内含子(图1-C), CDS共有1 441 bp, 编码477个氨基酸(图1-D), 属于ACT超家族。该蛋白包含2个ACT结构域, 分别位于78~150和309~383氨基酸区域。突变第2个外显子上第733位(以转译起点计)的G为A, 蛋白第88位由G变为D。

### 2 AHAS植物转化、筛选、突变鉴定与过表达分析

将AHAS小亚基及大小亚基点突变植物过表达载体转化拟南芥野生型(Col-0), 转基因植物筛选、突变体鉴定及AHAS点突变基因过表达分析如图2所示。

使用含AHAS小亚基和大小亚基点突变植物转化载体的农杆菌对目标植物(第一次为拟南芥野生型, 第二次为已转入第一种突变载体的转基因植物)分别进行两次基因转化操作, 每次转化后使用卡那霉素抗性对转基因植株进行筛选, 筛选过

程示例如图2-A~D。从图中可看出, 构建的植物过表达转化载体已将目标突变基因转入受体植物中, 转化植物在抗性筛选平板上表现出对卡那霉素的抗性, 说明植物至少受到一种植物转化载体的转化。从转化后代中, 使用dCAPS鉴定AHAS小亚基

单突变体和大小亚基双突变体, 图2-E~G表明转基因后代群体中可筛选到AHAS大小亚基均发生目标点突变的双突变体单株。获得AHAS小亚基G88D突变35S:G88D3#和35S:G88D20#两个单突变体植株、大亚基E305D与小亚基G88D双突变

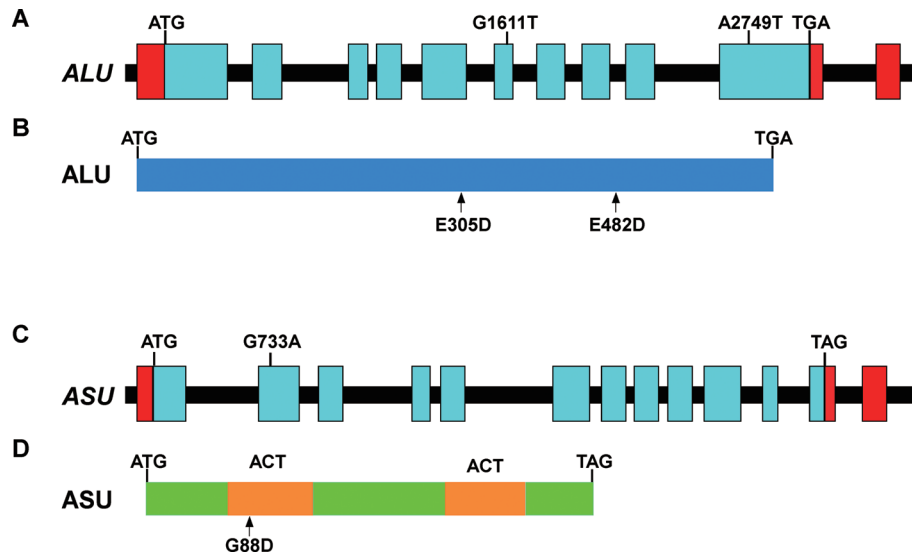


图1 拟南芥乙酰羟酸合成酶(AHAS)基因与蛋白结构及其突变位置

Fig.1 Schematic diagram of the *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase (AHAS) genes, proteins and positions of mutations

A与C分别示例AHAS大亚基(ALU)与小亚基(ASU)基因结构。图中黑色棒表示内含子, 蓝色方框表示外显子, 红色方框表示非编码区(UTRs), 数字表示基因从翻译起始点的核苷酸突变位置。B与D分别示例AHAS大亚基(ALU)与小亚基(ASU)蛋白结构, 突变位点箭头表示相应于翻译起始点第一个氨基酸突变位置。

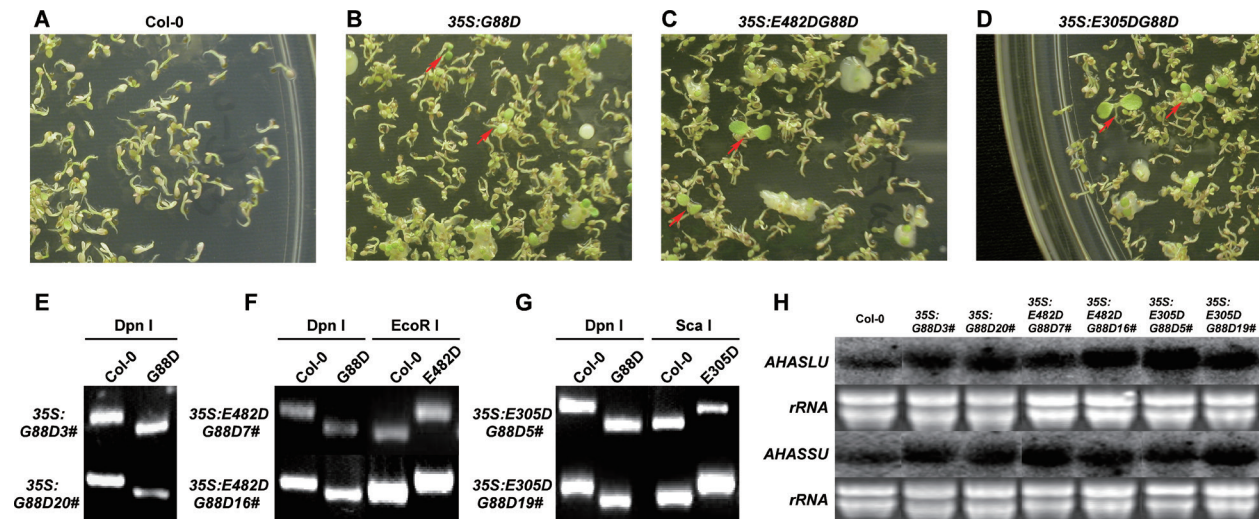


图2 AHAS点突变转基因植物筛选、突变鉴定与过表达分析

Fig.2 Screening, identification of mutations and Northern analysis of transgenic plants expressing the point mutated AHAS versions

A~D: AHAS点突变转基因植物抗性筛选, 红色箭头示阳性转基因候选植株, 筛选培养基为MS+50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素; E~G: AHAS点突变阳性转基因植株dCAPS鉴定, DpnI切G88D突变体, ScaI与EcoRI分别切E305D和E482D野生型; H: AHAS点突变转基因植株过表达分析。



体2个单株35S:E305DG88D5#与35S: E305DG-88D19#、大亚基E482D与小亚基G88D双突变体2个单株35S:E482DG88D7#与35S: E482DG88D16#用于后续表型分析。为检测AHAS大小亚基突变基因是否得到了过表达,使用Northern方法对转入的基因进行过表达分析。图2-H表明:在不同的双突变单株中,对照野生型, AHAS小亚基G88D单突变、大亚基E305D与E482D及小亚基G88D双突变转基因均得到了过表达。

### 3 AHAS点突变转基因植物生长及缬氨酸处理下初生根长度表型分析

AHAS小亚基突变及大小亚基双突变转基因植株生长表型分析如图3-A。小亚基单突变体及大小亚基双突变体转基因植株生长表型与野生型相同,未观察到任何异常生长表型。表明当AHAS小亚基发生单突变或大小亚基发生双突变后,在无外源胁迫条件时,AHAS突变不影响植物的生长表型。

AHAS合成的3种支链氨基酸中,缬氨酸的反馈抑制作用最为强烈(Porat等2004)。为测试当AHAS小亚基单突变及大小亚基发生双突变后,缬氨酸对AHAS点突变转基因植物表型的影响,分别

使用0、250、500和1 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源缬氨酸对转基因植株进行处理,观察其表型变化,结果如图3-B~E。

测试结果表明,在同一缬氨酸浓度处理下,小亚基G88D突变的转基因植物初生根长度均大于野生型。说明AHAS小亚基发生G88D突变解除了缬氨酸对AHAS的反馈抑制作用(图3-C~E),使AHAS小亚基单突变体或大小亚基双突变体产生对缬氨酸的抗性,在初生根长度上均表现出大于野生型,此与Chen等(2010)的结果相同。在不同外源缬氨酸浓度处理下,与MS平板上各对照相比较,处理板上野生型及AHAS点突变转基因植物初生根生长均受到抑制,随缬氨酸处理浓度升高,抑制程度增加。不同缬氨酸处理浓度间初生根长度差异明显( $P<0.05$ ) (图3-F)。此外,在相同浓度缬氨酸处理下,AHAS大亚基不同位置双突变体与小亚基单突变体在初生根长度上又存在差异, E482DG88D转基因植物相对初生根长度小于G88D转基因植物,而E305DG88D转基因植物相对初生根长度大于G88D转基因植物,3种转基因植物相对初生根长度差异显著( $P<0.05$ ) (图3-F)。说明AHAS大小亚基

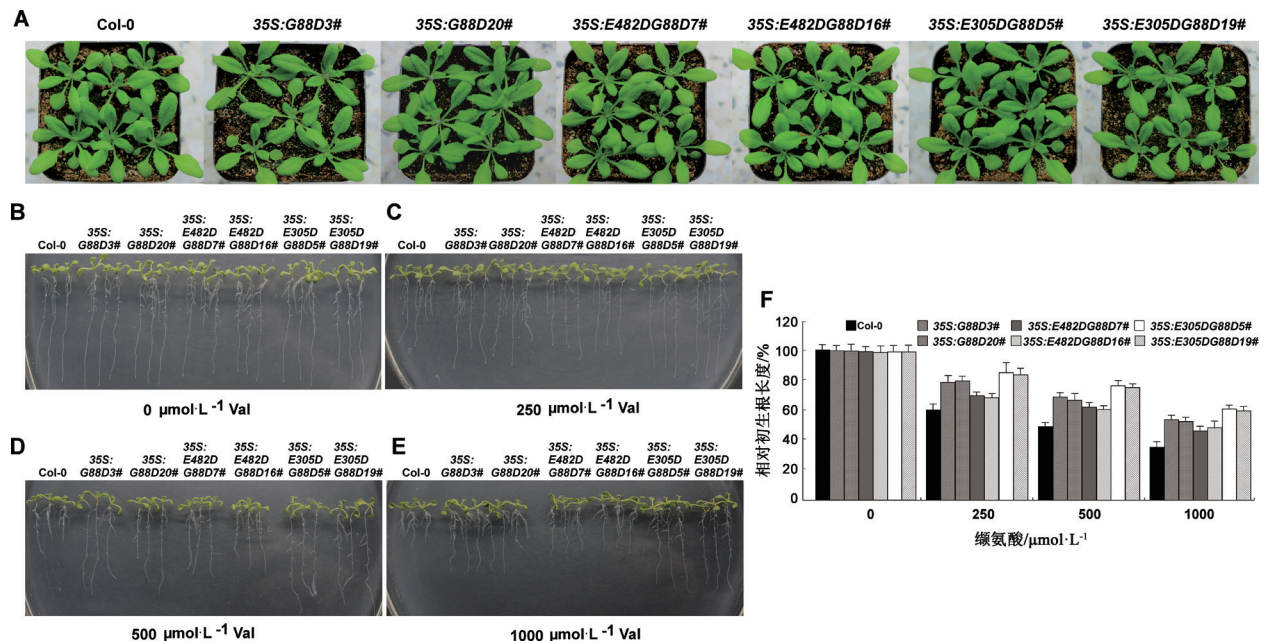


图3 AHAS点突变转基因植物表型分析

Fig.3 Phenotypic analyses of transgenic plants expressing the point mutated AHAS versions

A: AHAS点突变转基因植株生长2周后生长表型; B~E: AHAS点突变转基因植株在不同浓度缬氨酸处理下初生根长度表型; F: 图B~E中AHAS点突变转基因植株转板后6 d相对初生根长度。

同时发生突变后, 由于AHAS大亚基上的不同突变位点对小亚基突变的影响作用存在差异, 可能对AHAS活性产生不同影响, 使E305DG88D转基因植物较E482DG88D转基因植物对缬氨酸处理更具有抗性。

#### 4 AHAS点突变转基因植物缬氨酸含量测定

为考察AHAS小亚基及大小亚基点突变转基因植物中缬氨酸含量变化, 对AHAS转基因植株幼苗及完全展开叶片中的缬氨酸含量进行了测定, 结果如表2所示。

表2数据表明, AHAS各转基因植株幼苗缬氨酸含量升高, 含量达野生型的6~7倍之多。叶片缬

氨酸含量较幼苗低, 但叶片缬氨酸含量变化趋势与幼苗中相同, 转基因植株叶片缬氨酸含量为野生型对照的3~4倍(表2)。在AHAS大亚基不同位置突变植株幼苗与叶片中, E305DG88D与E482DG88D转基因植株的缬氨酸含量存在差异( $P<0.05$ )。在幼苗中, AHAS大亚基E482D转基因植株中缬氨酸含量为E305D突变的82.5%, 而叶片中只有72.8%。这表明AHAS小亚基G88D突变解除了终端产物对AHAS的反馈抑制作用, 使转基因植株缬氨酸含量相对于野生型提高, 而大亚基E305D与E482D不同位置突变又使转基因植株间在相应组织的缬氨酸含量存在差异。

表2 AHAS点突变转基因植株幼苗及叶片缬氨酸含量

Table 2 Valine content of seedlings and leaves in transgenic lines expressing the point mutated AHAS

突变株类型	缬氨酸含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ (DW)	
	幼苗	叶
Col-0	418.3 $\pm$ 35.4 <sup>d</sup>	330.9 $\pm$ 7.2 <sup>d</sup>
35S:G88D3#	2 867.3 $\pm$ 125.7 <sup>b</sup>	1 102.9 $\pm$ 22.4 <sup>b</sup>
35S:G88D20#	2 903.6 $\pm$ 138.4 <sup>b</sup>	1 137.5 $\pm$ 19.1 <sup>b</sup>
35S:E482DG88D7#	2 544.4 $\pm$ 147.6 <sup>c</sup>	998.7 $\pm$ 18.4 <sup>c</sup>
35S:E482DG88D16#	2 632.3 $\pm$ 152.5 <sup>c</sup>	995.7 $\pm$ 16.3 <sup>c</sup>
35S:E305DG88D5#	3 079.1 $\pm$ 201.5 <sup>a</sup>	1 320.1 $\pm$ 36.5 <sup>a</sup>
35S:E305DG88D19#	3 124.1 $\pm$ 207.6 <sup>a</sup>	1 285.3 $\pm$ 29.4 <sup>a</sup>

表中数值为3次重复的平均值 $\pm$ 标准差; 同列不同小写字母表示差异达到显著水平( $P<0.05$ )。

## 讨 论

本研究发拟南芥AHAS小亚基G88D突变可解除缬氨酸对AHAS的反馈抑制作用, 使AHAS突变体内缬氨酸含量提高(表2), 并在初生根长度上表现出对外源缬氨酸抗性(图3-C~E)。此结果与在细菌及拟南芥中的研究结果一致(Mendel等2001; Chen等2010)。然而, 拟南芥AHAS双突变体E305DG88D较E482DG88D转基因植物有更强的缬氨酸抗性, 体内积累了更多的缬氨酸(图3-C~E, 表2)。说明在AHAS小亚基上发生G88D突变解除终端产物反馈抑制的前提下, 大亚基不同位置的突变对植物缬氨酸合成有不同的影响。对不同物种AHAS大亚基蛋白编码序列比对发现, ALU含有5个保守结构域, E305与E482分别位于第3与第4个结构域中(Tyagi等2005)。拟南芥ALU在2个关键结构域中突变可能造成该酶活性下降, 并且不同

位点突变对酶活性有不同的影响。因而, 在缬氨酸抗性与缬氨酸积累上, AHAS双突变E305DG88D与E482DG88D转基因植物在对外源缬氨酸抗性与体内缬氨酸积累上存在差异是AHAS小亚基与大亚基上两种突变共同作用结果。

细菌AHAS小亚基具有稳定并调节其大亚基活性的作用, 小亚基介导终端产物支链氨基酸对酶活性调节。尽管目前尚未发现小亚基结合支链氨基酸的直接证据, 但在体外测试中, 当存在支链氨基酸时, 大亚基活性的确会发生变化(Pang和Duggleby 2001)。推测AHAS活性变化与其全酶构象相关, 本研究结果支持此推测的合理性。

拟南芥AHAS大亚基点突变中, E305D突变较E482D表现出对缬氨酸抑制更具有抗性(图3-C~E)。拟南芥AHAS小亚基与细菌的不同, 其包含2个ACT结构域(细菌中仅有1个)。细菌AHAS更倾向于形成2个大亚基与2个小亚基的四聚体, 介

导终端产物抑制的位置存在于2个小亚基组成的二聚体界面上(Pang等2002, 2003)。拟南芥AHAS小亚基含有2个ACT结构域, 对大亚基活性调节与细菌不同, 对小亚基不同ACT结构域的突变分析表明, 小亚基2个ACT结构域存在分子内相互作用, 2个ACT形成U型结构, 且2个ACT在介导大亚基活性抑制中均起作用(Chen等2010)。本研究中, 相同AHAS小亚基点突变与不同位置大亚基点突变转基因植株在缬氨酸抗性与缬氨酸积累上存在差异, 提示AHAS大小亚基间存在相互作用。AHAS大亚基上的不同位置突变导致不同的全酶构象, 对酶活性产生不同的影响, 最终反映出对外源缬氨酸的抗性与体内缬氨酸积累的不同。

AHAS可能存在由不同位点突变产生的连续构象变化, 也可能存在构象变化的阈值效应, 在一定的空间变化范围内, 突变效应对酶活性产生影响, 超过一定的阈值后将完全消除酶活性。不能排除在AHAS大小亚基上存在对AHAS活性产生影响的其他位点。

### 参考文献

- Brosnan JT, Brosnan ME (2006). Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr*, 136 (1): 207~211
- Chen H, Kristen S, Zhao F, Joyce Q, Xiong L (2010). Genetic analysis of pathway regulation for enhancing branched-chain amino acid biosynthesis in plants. *Plant J*, 63 (4): 573~583
- Chipman DM, Duggleby RG, Tittmann K (2005). Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Curr Opin Chem Biol*, 9 (5): 475~481
- Duggleby RG, Pang SS (2000). Acetohydroxyacid synthase. *J Biochem Mol Biol*, 33 (1): 1~36
- Dumas R, Butikofer MC, Job D, Douce R (1995). Evidence for two catalytically different magnesium-binding sites in acetohydroxy acid isomeroreductase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 34 (18): 6026~6036
- Fernstrom JD (2005). Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr*, 135 (6): 1539~1546
- Hacham Y, Avraham T, Amir R (2002). The N-terminal region of *Arabidopsis* cystathionine  $\gamma$ -synthase plays an important regulatory role in methionine metabolism. *Plant Physiol*, 128 (2): 454~462
- Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M (2005). Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr*, 135 (6 Suppl): 1527~1530
- Hershey HP, Schwartz LJ, Gale JP, Abell LM (1999). Cloning and functional expression of the small subunit of acetolactate synthase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol*, 40 (5): 795~806
- Hutson SM, Lieth E, LaNoue KF (2001). Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system. *J Nutr*, 131 (3): 846~850
- Kaplun A, Vyazmensky M, Zherdev Y, Belenky I, Slutzker A, Mendel S, Barak Z, Chipman DM, Shaanan B (2006). Structure of the regulatory subunit of acetohydroxyacid synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 357 (3): 951~963
- Lee YT, Duggleby RG (2001). Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry*, 40 (23): 6836~6844
- Lee YT, Duggleby RG (2002). Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett*, 512 (1): 180~184
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000). The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (7): 3730~3734
- Mendel S, Elkayam T, Sella C, Vinogradov V, Vyazmensky M, Chipman DM, Barak Z (2001). Acetohydroxyacid synthase: a proposed structure for regulatory subunits supported by evidence from mutagenesis. *J Mol Biol*, 307 (1): 465~477
- Mendel S, Vinogradov M, Vyazmensky M, Chipman DM, Barak Z (2003). The N-terminal domain of the regulatory subunit is sufficient for complete activation of acetohydroxyacid synthase III from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 325 (2): 275~284
- Mifflin BJ, Cave PR (1972). The control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants. *J Exp Bot*, 23 (2): 511~516
- Nair KS, Short KR (2005). Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J Nutr*, 135 (6): 1547~1552
- Pang SS, Duggleby RG (2001). Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochem J*, 357 (3): 749~757
- Pang SS, Duggleby RG, Guddat LW (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J Mol Biol*, 317 (2): 249~262
- Pang SS, Guddat LW, Duggleby RG (2003). Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J Biol Chem*, 278 (9): 7639~7644
- Porat I, Vinogradov M, Vyazmensky M, Lu C-D, Chipman DM, Abdelal AT, Barak Z (2004). Cloning and characterization of acetohydroxyacid synthase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol*, 186 (2): 570~574
- Singh BK, Shaner DL (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *Plant Cell*, 7 (7): 935~944
- Tourneur C, Jouanin L, Vaucheret H (1993). Over-expression of acetolactate synthase confers resistance to valine in transgenic tobacco. *Plant Sci*, 88 (2): 159~168
- Tyagi R, Lee YT, Guddat LW, Duggleby RG (2005). Probing the mechanism of the bifunctional enzyme ketol-acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis of the active site. *FEBS J*, 272 (2): 593~602
- Vyazmensky M, Sella C, Barak Z, Chipman DM (1996). Isolation and characterization of subunits of acetohydroxy acid synthase isozyme III and reconstitution of the holoenzyme. *Biochemistry*, 35 (32): 10339~10346