

淀粉去分支酶研究进展

周 会^{1,2}, 张军杰^{2,3}, 黄玉碧^{1,2*}

(1. 四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014; 2. 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 四川 雅安 625014;

3. 四川农业大学生命理学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 淀粉去分支酶(Starch debranching enzyme, DBE)对淀粉最终结构的形成起着非常重要的作用, 因此, 对DBE的深入研究有助于解释淀粉生物合成机理。对近年来DBE在遗传和生物化学及分子生物学上的研究进展做了简要综述, 并在此基础上提出了一个新的观点: DBE在支链淀粉合成中作用机理的2种假设, 其本质是一致的。

关键词: 淀粉去分支酶(DBE); 极限糊精酶(ZPU); 异淀粉酶(ISA); 支链淀粉; 直链淀粉

中图分类号: Q556.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)09-0005-04

淀粉分直链淀粉和支链淀粉, 2类淀粉所占比例及支链淀粉的结构共同决定淀粉结构^[1]。不同作物中, 这2类淀粉的比例和所含支链淀粉的结构存在很大差异。现已明确, 直链淀粉是在颗粒结合型淀粉合成酶(Granule-bound starch synthase, GB-SS)催化下合成的, 而支链淀粉的合成非常复杂, 它首先在腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGP)的作用下, 葡萄糖-1-磷酸(Glu-1-P)与ATP作用生成ADP-葡萄糖(ADP-Glu), 随后ADP-Glu在可溶性淀粉合成酶(Soluble starch synthase, SSS)的作用下通过 α -1, 4-糖苷键进行葡聚糖链的延伸, 当链达到一定长度后, 在淀粉分支酶(Starch branching enzyme, SBE)作用下, 在线性糖链内部引入 α -1, 6-糖苷键形成分支, 并进一步在SSS催化下延长分支, 最后淀粉去分支酶(DBE)对分支进行修饰, 最终合成具有一定结构特性的淀粉晶体^[2]。迄今, 国内外已获得多种马铃薯和水稻等作物的转基因材料, 对淀粉合成进行修饰, 试图培育优质品种, 产生多样化的淀粉。为此, 笔者对近几年来DBE研究的最新进展作了较全面综述和深入探讨。

1 DBE的种类

DBE的主要作用是水解 α -1, 6-糖苷键, 根据其作用底物不同分为2类: 间接去分支酶和直接去

分支酶。间接去分支酶存在于动物、酵母中, 需4- α -葡萄糖苷转移酶及淀粉-1, 6-葡萄糖转移酶等的共同参与才能完成脱分支过程, 这里不作介绍。直接去分支酶存在于植物和细菌中, 水解作用不需要其他酶的参与。直接去分支酶能特异性地水解淀粉中的 α -1, 6-糖苷键, 在氨基酸序列上它与 α -淀粉酶相似, 属于淀粉水解酶家族。依据作用的底物不同, 直接去分支酶有两大类: 一类是普鲁蓝酶或称极限糊精酶(Pullulanase; Limit dextrinase; ZPU), 是与普鲁蓝酶同工的DBE(普鲁蓝是麦芽糖单元以 α -1, 6-糖苷键连接而形成的多糖); 另一类是异淀粉酶(Isoamylase, ISA), 是与淀粉酶同工的DBE。ZPU以极限糊精和普鲁蓝等为底物, 特异去除其 α -1, 6-糖苷键; 而ISA则以变性支链淀粉、糖原和支链淀粉类似物为底物, 去除其 α -1, 6-糖苷键, 但不能作用于极限糊精和普鲁蓝。由于编码ZPU和ISA的基因既不是源于同源位点的等位基因, 也不是同工酶编码基因, 它们的功能是否相同仍然未知, 所以, 国际上的通用名称是同种型(Isoform)。

2 DBE的作用机理

目前, 有关DBE在支链淀粉合成中的作用机理主要有2种假说^[3], 一种是以Erlander^[4]为代表, 认为植物糖原(Phytoglycogen, PG)是支链淀粉合成的中间产物, 经过DBE的作用形成支链淀粉。另一

收稿日期: 2006-04-03

基金项目: 教育部长江学者与创新团队资助计划项目(IRT0453)

作者简介: 周 会(1979-), 女, 安徽合肥人, 在读硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: zhoushui1234486@163.com

通讯作者: 黄玉碧(1963-), 男, 四川南充人, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。

种以 Nakamura 和 Yuki^[3] 等为代表, 认为 SBE 和 DBE 这 2 种酶的酶活性平衡对 $\alpha-1, 6$ -分支酶的频率或支链淀粉的 $\alpha-1, 4$ -侧链的链长的分配有着重要的决定作用。

我们认为, 上面 2 种假说其本质是一致的, 只是着眼点不同。前一假设是以 DBE 的底物为着眼点, 而后一假设则是以 SSS、SBE、DBE 3 种酶的协同作用为着眼点, 并且这 2 种假说彼此是相互补充的。Erlander 等认为, 在 SSS 和 SBE 2 种酶的作用下形成 PG, 随后产生的这些 PG 由 DBE 作进一步修饰形成支链淀粉, 即 SSS 在颗粒表面使短链延伸, 最初这些链太短, 不能被 SBE 作为底物(一般 SBE 与具有双螺旋结构的葡聚糖链作用), 所以是未分支的。当它们达到一定长度时, 在 SBE 和 SSS 的共同作用下形成分支。DBE 可去除这些未组装起来的暴露在葡聚糖以外的分支, 但却不能打断那些紧密结合形成双螺旋区的分支。所以 DBE 的作用使在双螺旋区的上部形成短链区, 这些短链又可被 SSS 在下一轮中重新延伸。Nakamura 和 Yuki 等强调的是 SSS、SBE、DBE 3 种酶的协同作用, SBE 和 DBE 这 2 种酶的酶活性平衡在支链淀粉与 PG 之间产生了一个动态平衡, 即当 SBE 活性增强时, 该平衡向 PG 方向移动, 也就是支链淀粉向 PG 转化; 同样, 当 DBE 活性增强时, 该平衡向支链淀粉方向移动, 也就是 PG 向支链淀粉转化。Shannon 等^[4] 用 ^{14}C 处理受粉后 18 d 的玉米, 发现支链淀粉和直链淀粉是同时合成的, 这一结果也支持以上观点。

DBE 的活性降低时多糖结构便趋向于形成多分支的小分子多糖和 PG, 这是因为: DBE 对淀粉最终结构的形成起到重要作用。淀粉合成是一个从可溶性多聚糖到具有胶体性质的淀粉分子形成过程, 期间需要多聚糖中单个葡萄糖分子的一 OH 基团与其他相邻的一 OH 基团结合才能使它们之间形成更为稳定、紧凑的结构, 其结果是相对减少活性基团一 OH 而使多聚糖可溶性下降。在玉米、水稻和拟南芥种子中观察到的支链淀粉和淀粉粒间有一个过渡区域, 这一区域内交替发生的代谢是 DBE 切断短分支和 SBE 将其重新链接的过程, 即在具备支链淀粉分子的前提下, DBE 则趋向于切断有碍于合成稳定紧凑结构的短分支, 由 SBE 将切下的这些短分支重新连接到其活性基团一 OH 的位置, 否则在淀粉体内合成的将是 PG 而不是淀粉。

Tom 等^[6] 利用 ^{14}C 脉冲标记技术研究了在淀粉粒生物合成过程中中间态葡聚糖结构的形成, 认

为 6 个葡萄糖残基的侧链是所能大量合成的最短链, 这种侧链是从有 12 个葡萄糖残基或更长的供体链转移形成的。具有短侧链的中间态结构不同于 PG, 它是一种几乎没有长链而有更多分支的分子。脉冲和示踪标记图谱显示 dbe 突变体的淀粉粒最终结构比中间态有更多的分支, 以及在缺失 ISA 活性的玉米、水稻、衣藻和拟南芥的突变体中发现有大量的没有形成淀粉粒的高度分支的多糖和 PG 的积累, 暗示支链淀粉分子的包装与分支及链长的分布存在密切的关系。这说明形成的可溶性的支链淀粉前体或 PG 作为淀粉生物合成的中间产物。

3 DBE 同种型及其编码基因

3.1 ISA 及其编码基因

sul 是 ISA 的编码基因^[7,8]。Rahman 等研究表明, 在玉米中, *sul* 基因位于 4S 染色体上, 其产物 Su1(79kD) 参与胚乳淀粉的生物合成, 并证明 *sul* 就是 ISA, 其最适 pH 为 6.0~7.0, 最适温度为 25~37 °C, 50 °C 完全失活。Zeeman 等^[9] 报道, 拟南芥中, *dbel* 基因编码 ISA, 该基因的突变限制了叶内淀粉的正常积累。Ishizaki 等^[10] 分离并纯化了马铃薯块茎中的 DBE 多肽, 其分子量为 83~95kD, 但它们的性质及区别尚未知。Rahman 等^[8] 在大肠杆菌中表达水稻 *sul* 基因, 克隆产生的多肽在体外条件下仍有活性。

3.2 ZPU 及其编码基因

最近, 对 ZPU 的生化特性进行鉴定, 发现 ZPU 是一种内切酶, 只粘附在较短的支链。改变氧化还原作用的方向可激活 ZPU, 高糖浓度则抑制 ZPU 的活性^[11]。Rachel 等^[12] 研究表明, 大麦编码 ZPU 的单拷贝基因有 26 个内含子, 大小在 93~822 个碱基对不等, 27 个外显子, 阅读框在 8~2 893bp, 其 cDNA 全长为 3 429bp。Mary 等^[13] 发现, 玉米单拷贝 *zpu* 基因位于第 2 号染色体上, *zpu* 基因的 mRNA 只在胚乳中检测到, 而根和叶中没有发现, Mary 还证实, 胚乳中纯化的 ZPU 分子量约为 100kD。Rahman 等^[8] 和 Zhu 等^[14] 深入研究玉米胚乳和豌豆胚内淀粉合成过程中 DBE 的细胞定位, 还比较了 DBE 编码基因的碱基序列, 并推测 ISA 和 ZPU 在植物进化过程中同时形成, 两者具有高度的保守性。

4 DBE 的同种型表达

4.1 ISA 的表达

为了研究 ISA 在支链淀粉合成中的作用,

Genschel 等^[15] 在小麦的叶片和发育种子中都检测到 ISA, 主要以可溶性形式存在于发育的胚乳中, 很少一部分与淀粉粒结合, 这表明, ISA 可能参与叶片和籽粒中淀粉合成。ISA 编码基因突变后, 支链淀粉的积累则达不到正常水平, 因此认为, 此酶参与淀粉的生物合成。Kubo 等^[16] 报道, 玉米突变体 *Su1* (*Sugary1*) 胚乳中淀粉生物合成量显著减少, 支持这一观点。在水稻、玉米 *Su1* 突变体胚乳中 DBE 的缺失, 会造成 ZPU 或 ISA 水平严重下降或丧失, 产生较支链淀粉高度分支化的 PG, 高大山羊草的异淀粉酶基因转到水稻 *Sugary* 突变体中后, 直链淀粉的合成与野生型无明显差异^[17], 这些都说明 ISA 直接参与了支链淀粉的合成。另外, Nakamura 等^[18-19] 发现, 水稻中有 *sul* 基因编码突变的 ISA, 此突变的 ISA 产生畸形淀粉粒。Kubo 等^[1] 的工作不但支持了 Nakamura 的报道, 而且发现水稻 *sul* 突变影响 ISA 的同时, 也影响 ZPU。由此说明 *dbe* 基因对淀粉的生物合成存在多重效应。

4.2 ZPU 的表达

Fujita 等^[20] 发现, 含有单个 *sul* 基因的水稻中几乎不能合成支链淀粉。*sul* 突变可引起 ZPU 和 ISA 的缺失, 对突变体 *Su1* 中的 ZPU 活性和电泳特性分析结果表明, ZPU 和 ISA 属转录后调控^[21]。玉米中的 ZPU 参与胚乳淀粉的降解。不同物种之间的同一同种型编码基因序列间表现 60%~80% 的一致性, 同一物种 2 个同种型序列间表现却明显不一致^[22]。因此, ISA 和 ZPU 在多糖链的合成中起不同的作用, 功能并不重叠。*zpu* 基因在 ISA 缺失型中表达, 可产生野生型中未发现的植物糖原, 从而表明 ISA 和 ZPU 之间有部分互补作用。Jason 等^[23] 研究了由于转座子插入突变而无正常功能的玉米 ZPU 的编码基因 *zpu*, 结果表明, 突变纯合体 ZPU 不能转运和贮藏淀粉, 发育中的胚乳积累了不存在于野生型中的 PG。上述不同种类突变体不仅支链淀粉合成减少, 而且 PG 呈明显积累趋势, 这些都说明 ZPU 不但直接参与了支链淀粉的合成, 也说明 ZPU 和 ISA 之间有部分互补作用。

5 DBE 的转基因研究

5.1 基因功能验证

利用突变体和反向遗传技术, 可对调控淀粉合成相关酶基因的功能进行验证。Jason 等用反向遗传技术, 在单拷贝基因 *zpu1* 中插入转座成分产生突变, 对 *zpu1* 基因在淀粉代谢过程中的功能及其

对其他酶的影响的研究发现, ZPU 活性的缺失使得淀粉代谢过程的诸多方面都发生改变。进一步研究表明, ZPU 可部分弥补 ISA 的缺失, 在淀粉的合成代谢中起着必不可少的作用, 同时还参与了淀粉的分解代谢。

5.2 改良淀粉的品质

DBE 酶的活性可改变直、支链淀粉的比例, 而且还可改变支链淀粉的结构, 形成分支程度不一的支链淀粉, 从而赋予淀粉新的理化特性。通过蛋白融合技术、反义基因技术或是通过表达外源酶基因以改变酶水平、活性从而改变淀粉结构, 使淀粉品质发生改变, 从而使作物品质等方面得到提高。

6 展望

近 10 年来, 淀粉合成分子生物学研究取得了长足的进展, 并且随着研究的深入, DBE 在淀粉合成中的作用越来越受到人们的重视。DBE 会影响 BE II a 的活性, 在玉米 DBE 突变体中, 由于 DBE 活性的丧失导致 BE II a 完全没有活性。Regla 等^[24] 证实, 淀粉粒的起始形成受控于 ISA 的异源多聚体。这意味着 DBE 多聚体酶的结构和功能将成为淀粉粒起始形成研究中的起点。近来, 几乎所有重要作物的 *dbe* 基因或基因片段都已被克隆, 对其功能也有了一些了解。但是, 对不同基因及其相应酶的功能, 特别是不同类型酶之间的互作效应的研究还刚刚开始。此外, 淀粉合成的分子生物学研究尚未很好地与作物品质研究和改良结合起来, 对品质育种的指导意义还十分有限。转基因技术的发展, 为深入分析 *dbe* 基因/酶的功能创造了条件, 同时也为改变淀粉特性, 从而改良作物品质, 甚至进行功能创新提供了可能。因此, 必将成为今后一段时期研究的重点和热点。但是对于不同的物种, 其转基因技术发展水平仍有差距, 而且对同一类酶在不同的作物中的功能上是否相类似仍不太清楚。不同酶之间的互作对于淀粉影响的研究仍显不足。Fernle, A. R 等^[25] 利用嵌合基因同时对 2 种甚至多种酶活性进行调控的思路值得借鉴。利用反义 RNA 技术来抑制/提高 DBE 酶的表达, 对于调整淀粉的结构可能是一个较好的手段。除利用转基因进行改良外, 利用淀粉 *dbe* 基因的序列信息, 设计特异性引物, 用于分子标记辅助选择, 甚至进行辅助设计的研究也应受到重视。同样, 利用理化诱变技术对相关基因进行定向改造, 既可为基础研究提供宝贵材料, 也可丰富种质资源, 为选育优良作物新品种创造条件。

参考文献:

- [1] Kubo Akiko, Fujita Naoko, Harada Kyuya, *et al.* The starch-debranching enzymes isoamylase pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm[J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 399—410.
- [2] Ball S, Guan H P, James M, *et al.* From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 349—352.
- [3] 蔡一霞, 徐大勇, 朱庆森. 稻米品质形成的生理基础研究进展[J]. *植物学通讯*, 2004, 21(4): 419—428.
- [4] Shannon J C, Creech R G, Loerch J D. Starch synthesis studies in *Zea mays*[J]. *Plant Physiol* 1970, 45: 163—168.
- [5] Nakamura Y, Yuki K. Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm[J]. *Plant Sci*, 1992, 82 : 15—20.
- [6] Tom H N, Lone Baunsgaard, Andress Blennow. Intermediary glucan structures formed during starch granule biosynthesis are enriched in short side chains, a dynamic pulse labeling approach[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (23): 20249—20255.
- [7] James M G, Robertson D S, Myers A M. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 417—429.
- [8] Rahman A, Wong K S, Jane J L, *et al.* Characterization of Su1 isoamylase, a determinant of storage starch structure ZPU in maize[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 425—435.
- [9] Zeeman S C, Umemoto T, Lue W L, *et al.* A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytylglycogen[J]. *Plant Cell*, 1998, 10 (10): 1699—1712.
- [10] Ishizaki Y, Taniguchi H, Maruyama Y. Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). I. Purification some properties of potato isoamylase[J]. *Agr Biol Chem*, 1993, 47: 771—779.
- [11] Wu C Y, Colleoni G, Myers A M, *et al.* Enzymatic properties and ZPU regulation of ZPU1, the maize pullulanase-type starch debranching enzyme [J]. *Arch Biochem Biophys* 2002, 406: 21—32.
- [12] Rachel A, Burton, Xiao-Qi Zhang, *et al.* A single limit dextrinase gene is expressed both in the developing endosperm and in germinated grains of barley[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 859—872.
- [13] Mary K. Beatty, Afroza Rahman, *et al.* Purification molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase type starch-debranching enzyme from maize[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 255—266.
- [14] Zhu Zhi-Ping, Christopher M. Hylton, *et al.* Characterization of starch-debranching enzymes in pea embryos [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 581—510.
- [15] Genschel U, Abel G, Lorz H, *et al.* The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localization[J]. *Planta*, 2002, 214(5): 813—820.
- [15] Kubo Akiko, Rahman Sadequr Yoshinori Utsumi, *et al.* Complementation of sugary-1 phenotype in rice endosperm with the wheat Isoamylase1 gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137: 43—56.
- [17] Martin G, Smith A M. Starch biosynthesis [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 971—985.
- [18] Nakamura Y, Umemoto T, Ogata N, *et al.* Starch debranching enzyme (R—enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene[J]. *Planta*, 1996, 199: 209—218.
- [19] Nakamura Y, Umemoto T, Takahata Y, *et al.* Changes in structure of starch enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm [J]. *Physiol Plant*, 1996, 97: 491—498.
- [20] Fujita N, Kubo A, Francisco P B Jr, *et al.* Purification, characterization, and cDNA structure ZPU of isoamylase from developing endosperm of rice[J]. *Planta*, 1999, 119: 255—266.
- [21] Mouille G, Maddelein M L, Libessart N, *et al.* Preamylopectin processing: a mandatory step for starch-Biosynthesis in plants[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8: 1353—1366.
- [22] Martha G James, Donald S Robertson, *et al.* Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 417—429.
- [23] Jason R Dings, Christophe Colleoni, Martha G James, *et al.* Mutational analysis of the pullulanase—type debranching enzyme in maize indicates multiple functions in starch metabolism[J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 666—680.
- [24] Regla Bustos, Brendan Fahy, Christopher M Hylton, *et al.* Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers[J]. *Plant Biol*, 2004, 101(7): 2215—2220.
- [25] Fernle A R, Roessner U, Leisse A, *et al.* Simultaneous antagonistic modulation of enzyme activities in transgenic plants through the expression of a chimeric transcript[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2001, 39: 825—830.