

植物 6-磷酸山梨醇脱氢酶

陈冬冬¹, 郭旭辉¹, 刘卫群^{1,2,*}

河南农业大学¹ 国家烟草栽培生理生化重点实验室, ²生命科学学院, 郑州 450002

Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase in Plants

CHEN Dong-Dong¹, GUO Xu-Hui¹, LIU Wei-Qun^{1,2,*}

¹National Key Lab of Tobacco Culture and Physiology and Chemistry, ²College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

摘要: 6-磷酸山梨醇脱氢酶是植物合成山梨醇的关键酶。文章从酶学特性、山梨醇转化、碳水化合物代谢等方面对 6-磷酸山梨醇脱氢酶的研究进展以及此酶的某些应用研究情况作介绍。

关键词: 6-磷酸山梨醇脱氢酶; 酶学特性; 山梨醇转化; 碳水化合物代谢

6-磷酸山梨醇脱氢酶(sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, S6PDH, EC 1.1.1.200)是合成山梨醇的关键酶(Teo 等 2006; Chong 等 2007)。山梨醇是蔷薇科木本植物中主要光合产物和贮运物质,起其他植物中蔗糖的作用,与提高植物抗逆性、改善果实风味等诸多方面有密切关系。近年来,人们用基因工程技术将 *S6PDH* 的 cDNA 分别导入烟草(*Nicotiana tabacum*) (Tao 等 1995; Deguchi 等 2006)、水稻(*Oryza sativa* L.) (王慧中等 2000)后,其转基因植物也可以合成山梨醇,遗传性状也有所改变。这表明 *S6PDH* 不仅对蔷薇科植物,而且对其他植物的生长发育也可能起调控作用。本文就近年来有关 S6PDH 的酶学特性和其在植物体内的功能研究进展作介绍。

1 S6PDH 的酶学特性

S6PDH 又称醛糖 6-磷酸还原酶(aldose 6-phosphate reductase, A6PR, EC 1.1.1.200) (Negmand 和 Loescher 1981), 主要分布于植物叶绿体和胞液中(Kanayama 等 1995)。在果实中此酶一般以同型二聚体形式存在,每条多肽的分子量为 36 kDa (Hirai 1981; Kanayama 和 Yamaki 1993)。此酶催化反应如下:

6-磷酸山梨醇脱氢酶+NADP $\xrightarrow{S6PDH}$ 6-磷酸葡萄糖+NADPH+H⁺

蔷薇科植物叶片中的 S6PDH 在光合组织中催化 6-磷酸葡萄糖(glucose-6-phosphate, G6P)还原生成 6-磷酸山梨醇(sorbitol-6-phosphate, S6P)的反应能力大于催化 6-磷酸山梨醇氧化生成 6-磷酸葡萄糖的能力(李嘉瑞和马锋旺 1991; Yamada 等

2006b)。Hirai (1979, 1981)研究枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)叶中 S6PDH 特性的结果表明: S6PDH 对 S6P 和 G6P 的 K_m 值分别为 2.22 mmol·L⁻¹ 和 11.6 mmol·L⁻¹, 对 NADP⁺ 和 NADPH 的 K_m 值分别为 13.5 μmol·L⁻¹ 和 1.61 μmol·L⁻¹, 说明 S6P 是 S6PDH 的最适底物,但对 NADPH 的亲合力大于 NADP⁺, 因此整体反应倾向于逆反应。此外, S6PDH 催化 S6P 氧化的最适 pH 为 9.8, 平衡常数为 5.12×10⁻¹⁰, 而 G6P 还原在 pH 7~9 的范围都有最大酶活性,这进一步证明在中性 pH 条件下, G6P 还原反应比 S6P 氧化反应更有效率。

苹果(*Malus domestica* Borkh. cv. 'Greensleeves')实生苗的研究中也呈现同样的趋势,并且 ATP 强烈抑制 G6P 的还原, ADP 与 NADPH 竞争性抑制 G6P 的还原。当向反应体系加入 3 mmol·L⁻¹ ATP 时,还原的活性受抑制 44%, 加入 3 mmol·L⁻¹ ADP 时,还原的活性受抑制 34%; 二价的金属离子如 Zn²⁺ (0.3 mmol·L⁻¹) 等对 G6P 也有较大的抑制作用(Kanayama 和 Yamaki 1993)。

2 山梨醇的转化及与其相关的酶

山梨醇是一种糖醇,作为一种小分子渗透物质,可以改变细胞渗透势,从而可以提高植物抗寒、抗旱、抗盐和抗硼亏缺的能力(Yamaki 1980; Bellaloui 等 1999; 王慧中等 2000)。从 G6P 到合成山梨醇途径中与山梨醇转化相关的酶有 S6PDH、6-磷酸

收稿 2008-04-17 修定 2008-05-30

资助 河南省自然科学基金(2007210015)。

* 通讯作者(E-mail: liuweiqun2004@126.com; Tel: 0371-63558722)。

山梨醇磷酸酯酶(sorbitol-6-phosphate phosphatase, S6PPP, EC 3.1.3.50)、依赖于NADP的山梨醇脱氢酶(NADP-dependent sorbitol dehydrogenase, NADP-SDH, EC 1.1.1.14)和山梨醇氧化酶(sorbitol oxidase, SOX)以及依赖于NAD的山梨醇脱氢酶(NAD-dependent sorbitol dehydrogenase, NAD-SDH, EC 1.1.1.14) (Grant 和 Rees 1981; 李嘉瑞和马锋旺 1991)。其反应如图1所示。

S6PDH 在光合组织中促使 G6P 生成 S6P

(Yamaki 1980; Kanayama 等 1998), 而 S6P 向山梨醇的转化是由特定的磷酸酯酶即 S6PPP 催化完成的。山梨醇在 SDH 和 SOX 的作用下, 生成葡萄糖、果糖(Yamada 等 2006a, b) (图1)。植物体内 S6PDH 的活性大小或 S6PDH 基因表达的程度直接与植物体内山梨醇、葡萄糖、果糖含量关系密切, 山梨醇的积累可以作为影响植物体内碳水化合物分布和运输的信号(Sheveleva 等 1998)。

此外, 梨树(*Pyrus communis* L. var. *sativa*)和枇

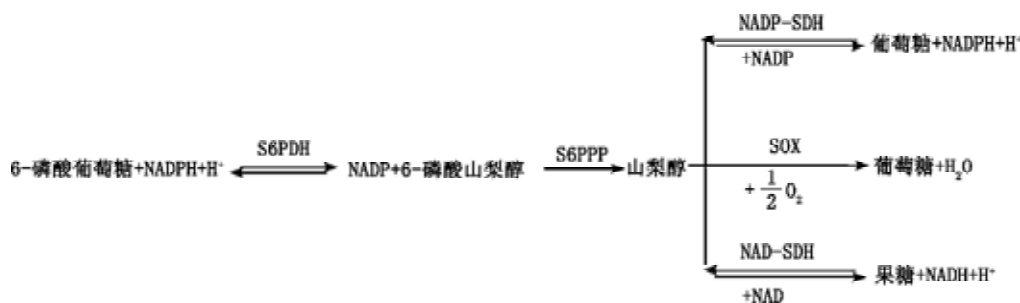


图1 植物山梨醇代谢相关酶示意图(Grant 和 Rees 1981; 李嘉瑞和马锋旺 1991)

杷的果实(Hirai 1979)中也有 S6PDH, S6PDH 活性大于NAD-SDH, 表明果实中S6PDH有助于山梨醇积累, 改变果实中碳水化合物的种类(Hansen 和 Ryugo 1979; Yamada 等 2006a), 但是其具体过程和机制尚不清楚, 有待进一步研究。

3 S6PDH与碳水化合物代谢

Yamada等(2006b)的研究表明在梨树的功能叶片中, S6PDH的表达量及其酶活性高于蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SPS, EC 2.4.1.14) 10倍, SPS活性受S6P抑制(Zhou 等 2002), 而S6P正是S6PDH的催化产物。在植物体中, SPS是以UDPG为供体, 以6-磷酸果糖为受体催化6-磷酸蔗糖合成的糖基转移酶。而SPS的活力大小直接影响光合产物的分配, 其活力大小与淀粉积累呈负相关, 与蔗糖形成呈正相关(刘凌霄等 2005)。植物生长发育进程受糖的调控, 蔗糖及其衍生物能被植物细胞感知进而调控基因表达和影响生理生化进程, 其作为强有力的信号分子的见解现已经为人们所接受(陈俊伟等 2002, 2005), S6PDH通过对SPS的抑制, 减少蔗糖浓度, 从而调节植物的生长发育。

近年来, S6PDH 基因转入烟草、日本柿

(*Diospyros kaki* Thunb.)中的工作表明, S6PDH 过量表达, 积累过多的山梨醇, 会导致转基因植物光合能力下降, 抑制其生长发育, 甚至死亡, 且转基因植物中 S6PDH 过量表达还会导致叶中淀粉含量的明显增高(Sheveleva 等 1998; Gao 等 2001)。这进一步说明S6PDH活性增强可以改变植物光合产物的正常代谢途径, 有人把非蔷薇科植物中过量积累的山梨醇称为终极产物(dead-end product)。为了缓解S6PDH过量表达对植物生长发育造成的影响, Deguchi 等(2006)将苹果中编码 S6PDH 和 NAD-SDH 的cDNA同时转化烟草后, 发现山梨醇也有一定的积累, 但山梨醇可在SDH的作用下, 转化为果糖, 这样烟草植株可以正常生长。这说明如果导入NAD-SDH基因, 则可以促使山梨醇转化为果糖, 植物即能正常生长。图2显示的是苹果体内山梨醇与其他碳水化合物代谢的关系, 山梨醇和蔗糖在源(功能叶片)中是由6-磷酸葡萄糖生成的, S6PDH和SDH是山梨醇代谢过程中的关键酶, 蔗糖和山梨醇运输到库(果实、种子、根、老叶)后, 山梨醇在SDH作用下转化为果糖, 蔗糖则在转化酶(NIN、VIN)催化下生成果糖和葡萄糖, 淀粉的合成与分解也可以在库(果实)中进行(王玉华等 2004; Teo 等

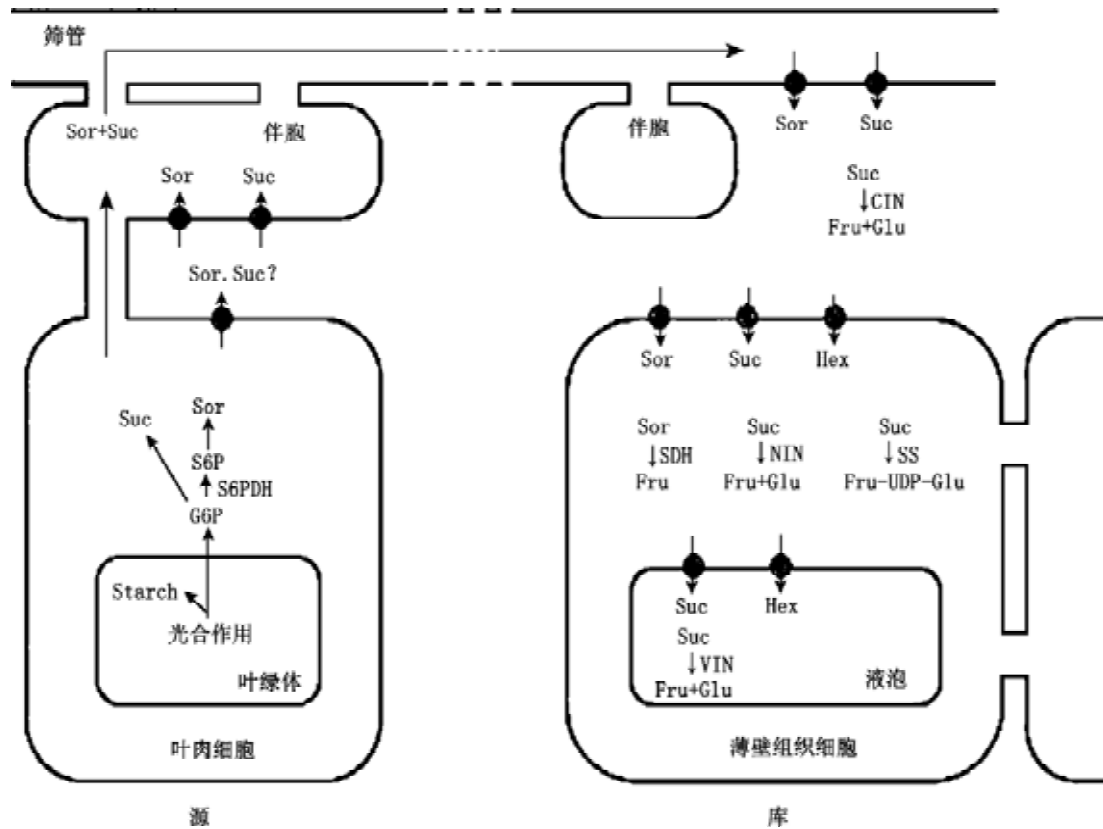


图2 苹果体内碳水化合物的代谢途径(Teo等2006)

2006; Zhou等2006)。

4 S6PDH的应用

自1992年在苹果叶片中克隆到*S6PDH*基因后(Kanayama等1992), *S6PDH*基因的研究不断深入。*S6PDH*与改善果实风味和提高植物抗逆性有密切关系。归纳起来有以下3个方面。

4.1 改善果实风味 在蔷薇科植物中,山梨醇起与蔗糖相同的作用,果实的味道在很大程度上决定于山梨醇转变成糖的类型(李嘉瑞和马锋旺1991)。目前, *S6PDH*已成为果树生理研究中的热点。

Teo等(2006)采用基因沉默技术抑制*S6PDH*后,苹果的碳代谢过程中的山梨醇却会影响淀粉积累、糖和酸性物质之间的平衡等与品质相关的物质。此外, Yamada等(2006b)在研究不同发育期梨树叶中*S6PDH*酶活性过程中,发现成熟叶中的*S6PDH*活性高于幼嫩叶片,随着叶片的发育成熟, *S6PDH*活性也增强,且*S6PDH*活性与 CO_2 的同化吸收、碳水化合物的输出明显相关。

4.2 提高植物逆境适应的能力 山梨醇有清除自由基的能力,它可以保护细胞免受羟自由基的损害。

此外,山梨醇是糖醇类物质,而糖醇是相容性溶质,所以其在渗透调节和渗透保护中起作用(Sheveleva等1998)。植物中导入*S6PDH*基因可以提高其适应逆境的能力(Deguchi等2004)。

Gao等(2001)用农杆菌介导方法将*S6PDH*基因导入柿中后,气相色谱检测到的山梨醇含量在14.5~61.5 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)之间。从中分别挑选高、中含量山梨醇和不含山梨醇的植株进行耐盐性试验,可以检测到叶绿素荧光参数,山梨醇含量高的植株其 F_v/F_m 下降幅度较少,这也说明山梨醇积累可以提高植物的耐盐性。此外,王慧中等(2002)以水稻幼胚为外植体,在建立的高效分化体系的基础上,用基因枪转化技术将外源*S6PDH*基因导入水稻后置于0.5%氯化钠盐池中进行耐盐试验的结果表明,转基因植株对氯化钠表现出较强的耐性,约半数可正常结实。在其他植物中的实验也有类似结果,如在烟草、柿子和苹果中导入*S6PDH*基因后,这些植物对硼亏缺、盐和旱的抗性均可提高(Tao等1995; Sheveleva等1998; Teo等2006)。

4.3 促进硼素吸收和运输 *S6PDH*对植物的硼吸收

和运输也有影响。硼是植物必需的微量元素, 在植物生长、发育过程中起着其他元素不可替代的作用。植物体内的硼素的移动有助于提高其对土壤中硼素营养缺失的抗性, 富含山梨糖醇的植物体中硼易于移动, 尤其是在低硼胁迫时; 山梨糖醇含量低的植物, 其硼难以移动(Brown 和 Shelp 1997)。Bellaloui (1999)和Brown等(1999)采用转*S6PDH*基因烟草研究山梨醇含量与硼素吸收之间关系的结果显示: 转基因烟草的幼嫩叶片可以重复使用衰老叶片和叶面喷施的硼素, 以满足自身生长的需要; 而非转基因烟株则不能重复使用衰老组织中的硼素以维持幼嫩组织的生长。山梨醇含量与韧皮部中硼的移动强度有关, 可以保证缺硼土壤中生长的烟株产量, 而且转基因烟株还能更好地利用成熟组织中的硼和叶面喷施的硼。

5 结语

植物中糖的合成、运输与分配是一个复杂的过程, 并受植物自身发育和环境信号的调控, 糖本身作为信号分子也可以通过调控相关基因的表达来调节植物自身的生长发育过程(Smeekens 2000; 谢祝捷等 2002; Gibson 2004; Yamada 等 2006a, b; Veyres 等 2008)。在大多数情况下, 蔗糖的这种作用可完全为己糖(例如果糖和葡萄糖)替代(Koch 1996; Jang 等 1997)。S6PDH 作为催化 G6P 和 S6P 相互转变的酶, 其在调节植物生长发育过程中的作用和机制尚不清楚, 尤其在非蔷薇科植物中的研究还鲜见报道。S6PDH 在调节植物碳水化合物代谢中作用也有待深入研究。

参考文献

- 陈俊伟, 谢鸣, 秦巧平(2005). 植物糖信号与激素信号之间的联系. 植物生理学通讯, 41 (3): 279~285
- 陈俊伟, 张上隆, 张良诚(2002). 糖对源库关系的调控与植物糖信号转导途径. 细胞生物学杂志, 24 (5): 266~270
- 李嘉瑞, 马锋旺(1991). 蔷薇科果树山梨醇的研究. 果树科学, 8 (2): 111~115
- 刘凌霄, 沈法富, 卢合全, 韩庆点, 刘国云(2005). 蔗糖代谢中蔗糖磷酸合成酶(SPS)的研究进展. 分子植物育种, 3 (2): 275~281
- 王慧中, 黄大年, 鲁瑞芳, 刘俊君, 钱前, 彭学贤(2000). 转 *mtlD/gaiD* 双价基因水稻的耐盐性. 科学通报, 45 (7): 724~729
- 王慧中, 卢德赵, 颜美仙, 钱前, 黄大年(2002). 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因转化水稻(*Oryza sativa* L.)研究. 科学通报, 18 (6): 441~445
- 王玉华, 杨清, 陈敏(2004). 植物糖感知和糖信号传导. 植物学通报, 21 (3): 273~279
- 谢祝捷, 姜东, 戴廷波, 曹卫星(2002). 植物的糖信号及其对碳氮代谢基因的调控. 植物生理学通讯, 41 (4): 399~405
- Bellaloui N, Brown PH, Dandekar AM (1999). Manipulation of *in vivo* sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiol*, 119: 735~741
- Brown PH, Bellaloui N, Hu H, Dandekar A (1999). Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem boron transport and increases tolerance of tobacco to boron deficiency. *Plant Physiol*, 119: 17~20
- Brown PH, Shelp BJ (1997). Boron mobility in plants. *Plant Soil*, 193: 85~101
- Chong BF, Bonnett GD, Glassop D, O'Shea MG, Brumbley SM (2007). Growth and metabolism in sugarcane are altered by the creation of a new hexose-phosphate sink. *Plant Biotechnol J*, 5 (2): 240~253
- Deguchi M, Bennett AB, Yamaki S, Yamada K, Kanahama K, Kanayama Y (2006). An engineered sorbitol cycle alters sugar composition, not growth, in transformed tobacco. *Plant Cell Environ*, 29: 1980~1988
- Deguchi M, Koshita Y, Gao M, Tao R, Tetsumura T, Yamaki S, Kanayama Y (2004). Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. *Plant Physiol*, 161: 1177~1184
- Gao M, Tao R, Miura K, Dandekar AM, Sugiura A (2001). Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Sci*, 160 (5): 837~845
- Gibson SI (2004). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot*, 55: 253~264
- Grant CR, Rees T (1981). Sorbitol metabolism by apple seedlings. *Phytochemistry*, 20 (7): 1505~1511
- Hansen P, Ryugo K (1979). Translocation and metabolism of carbohydrate fraction of ^{14}C -photosynthates in 'French' prune, *Prunus domestica* L.. *J Am Soc Hort Sci*, 104: 622~625
- Hirai M (1979). Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat fruit. *Plant Physiol*, 63: 715~717
- Hirai M (1981). Purification and characteristics of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from loquat leaves. *Plant Physiol*, 67: 221~224
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9: 5~19
- Kanayama Y, Mori H, Imaseki H, Yamaki S (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding NADP-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple. *Plant Physiol*, 100: 1607~1608
- Kanayama Y, Sakanishi K, Mori H, Yamaki S (1995). Expression of the gene for NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in apple seedlings. *Plant Cell Physiol*, 36:

- 1139~1141
- Kanayama Y, Sakanishi K, Mori H, Yamaki S (1998). Molecular biology of sugar metabolism and its regulation in fruit. *J Jpn Soc Hort Sci*, 67: 1203~1208
- Kanayama Y, Yamaki S (1993). Purification and properties of NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple seedlings. *Plant Cell Physiol*, 34 (6): 819~823
- Koch KE (1996). Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 509~540
- Negmand FB, Loescher WH (1981). Characterization and partial purification of aldose-6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. *Plant Physiol*, 67: 139~142
- Sheveleva EV, Marquez S, Chmara W, Zegeer A, Jensen RG, Bohnert HJ (1998). Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 117: 831~839
- Smeeckens S (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 49~81
- Tao R, Uratsu SL, Dandekar AM (1995). Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, 36: 525~532
- Teo G, Suzuki Y, Sandie L, Lampinen UB, Ormonde N, Hu WK, DeJong TM, Dandekar AM (2006). Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (49): 18842~18847
- Veyres N, Danon A, Aono M, Galliot S, Karibasappa YB, Diet A, Grandmottet F, Tamaoki M, Lesur D, Pilard S et al (2008). The *Arabidopsis* sweetie mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. *Plant J*, 55: 665~686
- Yamada K, Suzue Y, Hatano S, Tsukuda M, Kanayama Y, Shiratake K, Yamaki S (2006a). Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and sucrose-related enzymes associated with development of 'La France' pear fruit. *Jpn Soc Hort Sci*, 75 (1): 38~44
- Yamada K, Suzue Y, Hatano S, Tsukuda M, Kanayama Y, Shiratake K, Yamaki S (2006b). Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and sucrose-related enzymes with leaf development of 'La France' pear. *J Jpn Soc Hort Sci*, 75 (1): 45~50
- Yamaki S (1980). Property of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase and its connection with sorbitol accumulation in apple. *HortScience*, 15: 268~270
- Zhou R, Cheng L, Dandekar AM (2006). Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. *J Exp Bot*, 57 (14): 3647~3657
- Zhou R, Sicher RC, Quebedeaux B (2002). Apple leaf sucrose-phosphate synthase is inhibited by sorbitol-6-phosphate. *Funct Plant Biol*, 29: 569~574