

植物己糖激酶的信号转导作用

程建徽^{1,2} 谢鸣^{1*} 蒋桂华 徐凯²⁽¹浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021; ²安徽农业大学园艺系, 合肥 230036)

摘要 己糖激酶在植物细胞的信号转导中起着重要的作用。近年来, 有关植物己糖激酶的研究工作已经较多, 受到足够的重视。现对植物己糖激酶的特性、亚细胞定位、编码基因分子特征、感受己糖与信号转导功能、依赖己糖激酶的糖信号转导途径及其调控作用进行介绍。

关键词 己糖激酶; 糖信号转导; 调控

糖不仅作为植物生长发育的基础物质, 而且在细胞信号转导中起着信号分子的作用。近年来对植物糖信号转导的分子机制研究表明, 己糖激酶(hexokinase, HXK)作为细胞内糖传感蛋白(sugar sensor), 在葡萄糖的信号转导中起着重要的功能, 其信号转导途径调节着植物的生长发育与基因表达^[1,2]。

1 植物己糖激酶概述

1.1 特性

己糖激酶是糖代谢中催化己糖磷酸化的酶, 它既能催化葡萄糖的磷酸化, 又能催化果糖的磷酸化。广义的己糖激酶则还包括葡萄糖激酶和果糖激酶, 分别对葡萄糖和果糖具有高度的专一性和高亲和力。在植物组织中己糖激酶大多以二聚体形式存在, 不同植物中其分子量变化幅度相当大, 如油料种子中有 38 kDa, 马铃薯块茎中却高达 118 kDa; 同一种植物中存在多种己糖激酶, 它们的分子量也有变化, 如在小麦胚芽中有 50 kDa 和 100 kDa^[3], 玉米仁中有 39 kDa 和 59 kDa^[4], 马铃薯块茎中有 66 kDa、102 kDa、105 kDa 和 118 kDa^[5]。

近年来运用离子交换和柱层析等生化技术从植物中分离纯化出了多个己糖激酶, 发现其活性受细胞内己糖及磷酸己糖浓度、pH 值、能量形式 NTPs 与 Mg²⁺ 等因子的共同调节, 且因其定位不同有所差异。如: Galina 等^[6]发现玉米胚根中的各己糖激酶同工酶结合 ATP 的 K_m 值在 0.15~0.37 mmol/L 间, 结合葡萄糖的 K_m 值在 0.05~0.13 mmol/L 间, 线粒体中的己糖激酶受 ADP 的强抑制($K_i=0.04$ mmol/L), 而细胞质中的则不受 ADP 抑制。玉米幼苗根细胞胞

胞器中的一种己糖激酶活性受 ADP($K_i=30$ μ mol/L)和甘露庚酮糖($K_i=300$ μ mol/L)的抑制, 而细胞质中的则无此抑制现象, 并且其催化 ATP 和葡萄糖的效率(V_{max}/K_m)是细胞质中己糖激酶的一倍多^[7]; 番茄幼果中的一种葡萄糖激酶, 其分子量 74 kDa, 最适 pH 7.5~8.5, 活性也受 ADP 的抑制, 不受 6-磷酸葡萄糖的抑制。番茄未成熟果实和成熟果实果皮中存在的 3 种果糖激酶(FKI、FKII、FKIII), 除受 ADP 的抑制外, FKI 活性受果糖、Mg²⁺ 以及 1 mmol/L 以上 CTP 和 GTP 的抑制, FKII 活性不受果糖、Mg²⁺ 抑制, FKIII 受果糖但不受 Mg²⁺ 抑制^[8]; 甜菜块茎中的果糖激酶为二聚体, 分子量为 38 kDa, 最适 pH 8.5, 对果糖具有高度专一性($K_m=0.068$ mmol/L), 当果糖浓度超过 0.6 mmol/L 时该酶活性受到抑制, 高浓度的 6-磷酸果糖和 Mg²⁺、ADP 也会对其产生抑制效应, 而 10 mmol/L 的 K⁺ 则能使该酶的活性提高 30%^[9]。

1.2 亚细胞定位

现有研究大多表明: 在植物细胞中, 己糖激酶位于细胞质中和高尔基体、线粒体与叶绿体等细胞器膜上。如玉米根里的己糖激酶位于细胞质中和线粒体膜上, 并且线粒体膜上的己糖激酶活性比细胞质中的高^[6]; Wiese 等^[10]通过细胞分离和活性测定法研究发现菠菜叶片中的 HXKI 位于叶绿体外膜上, 并且通过其“N-末端锚(membrane anchor)”嵌入膜中。

收稿日期: 2004-02-06 接受日期: 2004-04-25

国家自然科学基金(No.30370998)、浙江省自然科学基金(No.302391, No.302389)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-86401007, Fax: 0571-86404018, E-mail: mxie@mail.hz.zj.cn; yyssz@zaas.org

1.3 基因的分子特征

目前, 已经克隆分离了拟南芥、玉米、马铃薯、番茄、菠菜、水稻、甜橙、柑橘、桃等多种植物的己糖激酶基因。己糖激酶的糖信号转导途径调控基因的表达在酵母和动植物体上都存在, 且相类似。Jang 等^[11]认为其糖信号转导作用与信号识别结构可能在所有的真核生物中都存在, 且是在进化过程中被保留了下来。

通常己糖激酶基因都含有结合 ATP 位点、腺苷反应区以及保守的糖结合域, 不同植物及同种植物的不同组织己糖激酶同工酶之间其核酸序列有一定的同源性, 氨基酸序列有很高的一致性。如从拟南芥中克隆到的己糖激酶基因序列分析表明: *AtHXK1* 和 *AtHXK2* 的开放可读框分别编码 496、502 个氨基酸组成的蛋白质, 两者核酸序列具有 82% 的同源性, 编码 85% 的相同氨基酸, 而且 *AtHXK* 与哺乳动物 *GLK*(葡萄糖激酶)、酵母 *HXK* 的氨基酸序列相似, 一致性分别是 34%~35% 和 36%~38%。通过 RFLP 分子标记技术确定了 *AtHXK1* 在第 4 条染色体上的 *mi232* 和 *g8300* 之间, *AtHXK2* 在第 2 条染色体上的 *mi148* 和 *mi238* 之间^[11]; 番茄中的 *LeHXK1* 和 *LeHXK2* 分别第 3、6 条染色体上, *LeHXK2* 的 cDNA (AF208543) 全长 1770 bp, 开放可读框编码 496 个氨基酸组成的蛋白质, 与拟南芥的两种 *HXKs* 的氨基酸一致性为 69%, 与马铃薯的 *StHXK1*、烟草 *NtHXK* 的一致性分别是 83% 和 85%, 与马铃薯 *StHXK2* 的一致性则高达 97%^[12]; 马铃薯中的果糖激酶基因编码 323 个氨基酸残基, 开放可读框 957 bp, ATG 启动子在核酸的第 11 号位置, TAG 终止子在第 1119 号位置, 低拷贝, G+C 占 50.4%^[13]; Jiang 等^[14]通过 PCR 技术从玉米未成熟种子中克隆到的果糖激酶基因 *OsFKI* 和 *OsFKII*, 分别编码由 323、336 个氨基酸组成的蛋白质。

2 信号转导功能

植物己糖激酶在新陈代谢中催化己糖的磷酸化——糖酵解的第一步不可逆反应。但除此之外, 己糖激酶在葡萄糖的感受和信号转导中还起着重要作用。

糖作为一种信号分子, 调节植物基因的转录表达, 那么细胞是通过什么来感受糖浓度进行信号转导的呢? Graham 等^[15]通过研究黄瓜细胞和 Jang 等^[16]研究玉米原生质对糖的感受和反应, 提出了己糖信

号由己糖激酶感受的假设。进而大量的运用各种糖、葡萄糖类似物(6-脱氧葡萄糖、3-氧甲基葡萄糖)、磷酸化糖来研究糖调节光合作用和乙醛酸循环中编码酶的基因表达, 发现相对低浓度的葡萄糖(如对玉米叶肉原生质体而言 1~10 mmol/L)导致酶基因表达量的减少, 加入甘露庚酮糖(己糖激酶的竞争性抑制剂), 则己糖激酶活性受到抑制, 这些酶基因表达正常, 而其他形式的糖均不改变酶基因的表达, 表明在新陈代谢中他们并不是基因表达下降的信号^[17]。通过构建带有花菜病毒 35S 启动子的有义、反义 *HXK1* 与 *HXK2*(编码不同的构象)的拟南芥转基因植株, 发现过量表达己糖激酶的转基因植株对糖敏感, 加入 6% 葡萄糖培养, 则根、茎发育受阻; 反义抑制己糖激酶的转基因植株对糖不敏感, 茎、叶仍能正常转绿、伸长延展; 过量表达酵母 *YHXK2* 的植株己糖激酶的催化活性虽然提高了, 但对糖的敏感性确下降了。这与加入 0.8 mmol/L 2-脱氧葡萄糖培养得到的结果相似, 而加入 6% 甘露醇或 6% 3-脱氧葡萄糖(不能被己糖激酶磷酸化的葡萄糖类似物)培养, 未转化对照植株与各转基因植株间无明显差异^[12,18]。因此, 上述研究结果证明: 己糖信号分子调节基因的表达与幼苗早期发育是由己糖激酶感受而进行信号转导的。

而且, 植物己糖激酶的信号转导功能和催化功能是不偶联的, 应用现代生物工程技术, 可以将依赖于己糖激酶的葡萄糖代谢从依赖于己糖激酶的葡萄糖信号转导中区分出来。Moore 等^[19]研究拟南芥 *HXK1* 的两种突变体 *gin2-1* 和 *gin2-2*(对葡萄糖弱敏感性)发现: *gin2-1* 在繁殖和营养生长方面表现出很大的缺陷, 己糖激酶磷酸葡萄糖能力下降了 50%, 但 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的量并没有减少。而且在基因表达、细胞增殖、根叶生长、开花、衰老等方面, 转化失去磷酸化催化活力 *HXK1*(点突变: Gly¹⁰⁴ - Asp¹⁰⁴、Ser¹⁷⁷ - Ala¹⁷⁷)的转基因植株仍表现出正常的糖信号转导功能。目前, 植物学家已经分离利用突变体来研究 *HXK* 的信号转导功能, 使得我们对它有了更全面的了解, 如 Halford 等^[20]发现己糖的信号转导需 *HXK* 的参与而不依赖于下游代谢产物的消耗和 ATP/ADP 的变化。

3 信号转导途径

3.1 途径

在植物体中, 糖是重要的呼吸底物和调节碳代

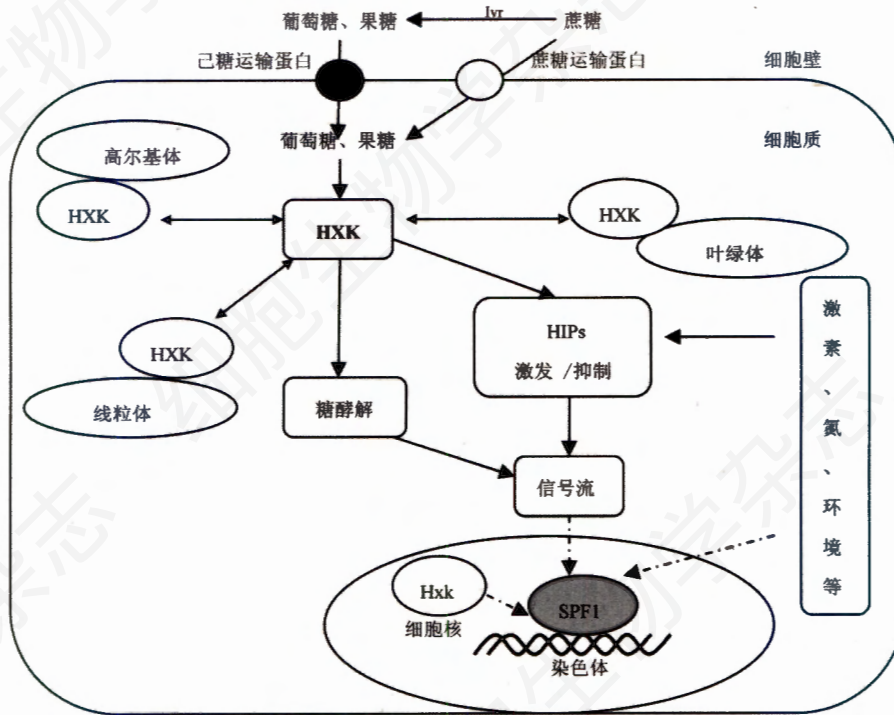


图1 己糖激酶参与的糖信号转导途径^[23]

Ivr: 转化酶(invertase); HIPs: 蛋白质复合体(HXK-interacting proteins); SPF1: DNA上的一种蛋白质, 结合在糖调节基因启动子的 cis 元件部位。

谢的信号分子。引发糖的信号转导, 首先糖必须被载体蛋白感受, HXK 参与了这个过程, 它是糖信号转导元件之一, 细胞内的糖传感蛋白, 用于感受细胞内糖浓度的变化。尽管目前 HXK 的糖感受机制尚未阐明, 但 Cortès 等^[17]研究表明己糖激酶磷酸化己糖起着决定性的作用, 但也有研究表明己糖激酶并不参与植物体所有的糖反应途径, 一些受蔗糖调节的基因表达不受葡萄糖的调节^[21,22]。现有研究表明: 在植物体中存在多个糖信号转导途径^[1,2,20]。Xiao 等^[23]研究发现己糖的信号转导存在 3 种途径: 第一, 依赖己糖激酶的转导途径; 第二, 受己糖激酶催化活性影响的依赖糖酵解的转导途径; 第三, 不依赖己糖激酶的转导途径。多种途径的存在表明植物体中糖和信号转导过程相对复杂。这里重点阐述己糖激酶参与的糖信号转导途径(图 1)。

在植物体中, 己糖激酶通常能磷酸化的底物有葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖等。首先经载体运输, 这些糖进入细胞, 己糖激酶感受糖后, 通过与其它蛋白作用形成复合体(HIPs)或者通过糖酵解途径引发信号流, 通过级联放大, 最终调节基因的转录表达, 另外 HXK 也可能迁移入核内直接影响转

录, 但如何进行有待进一步研究^[24,25]。如 YHKK2 与蛋白质磷酸酶 PP 作用形成复合体, 激发葡萄糖的抑制作用^[26]。

3.2 与其他信号转导途径关系

己糖激酶的糖信号转导途径与其他信号转导途径是相互作用的(crosstalk, 对话), 在植物体中形成一个相互作用的网络, 一个影响该网一部分的信号也会或多或少影响到其他部分。如在拟南芥中, *ERA1* 和 *PLD* 的转录表达既有 ABA 衰老信号转导途径的参与, 也有依赖己糖激酶的信号转导途径调控, 经葡萄糖诱导的 *ERA1* 表达表明: 己糖激酶调节的糖信号转导与 ABA 的信号转导相互作用共同调节着分生组织的细胞分化^[23]。

目前, 对模式植物拟南芥研究较为深入, 植物学家们已经分离得到多个突变体来研究己糖激酶参与的糖信号转导途径及与其他信号转导途径的关系(表 1)。Zhou 等^[27]和 Moore 等^[19]分别分离了拟南芥的葡萄糖不敏感突变体 *gin1*、*gin2*, 发现该途径与激素的信号转导途径偶联, 并且将糖信号转导与乙烯的信号转导拆分开。而且, 对拟南芥 *pr11* 突变体的分析表明糖和植物的内源激素间存在着复杂的

表1 己糖激酶参与的糖信号转导突变体

突变体	敏感性	筛选/显型	参考文献
<i>gin1</i>	葡萄糖不敏感	330 mmol/L 葡萄糖下生长	[27]
<i>pr11</i>	糖敏感(多调节位点)	175 mmol/L 蔗糖下生长 受限	[28]
<i>gin2</i>	葡萄糖不敏感	6% 葡萄糖下发育	[18,19]
<i>glo</i>	葡萄糖过敏感	4% 葡萄糖下生长受限	[1]
<i>mig</i>	甘露糖不敏感	7.5 mmol/L 甘露糖下萌芽	[30]
<i>sun</i>	糖不敏感(蔗糖分解)	88 mmol/L 蔗糖下质体蓝素-荧光素酶表达	[31,32]
<i>gss</i>	葡萄糖超敏感	56 mmol/L 葡萄糖下生长 受限	[33]
<i>sis</i>	糖不敏感	300 mmol/L 蔗糖或葡萄糖 下生长	[34]

联系^[28], 并且在幼苗发育期间 Arenas-Huerta 等^[29]发现了糖信号和 ABA 信号的共享元件 ABI4 (ABA-INSENSITIVE4)。

4 信号转导途径的调控作用

4.1 调控植物的生长发育

己糖激酶的糖信号转导途径调控着植物的生长过程, 表现为糖抑制子叶的扩展和转绿、胚轴的伸长。在植物发育过程中, 葡萄糖起着重要作用: 代谢底物、能量供给和信号调节分子。在拟南芥中, 依赖 HXK1 的信号转导机制控制着葡萄糖对苗期生长发育抑制, 此种机制与糖的代谢是分开的。不加葡萄糖进行水培, 拟南芥转化 *HXK* 植株和未转化对照植株的生长发育受阻, 真叶形态小而卷曲, 但叶绿素、干重无明显变化; 加入 3% 葡萄糖培养, 过量表达 *AtHXK1* 的转基因植株的茎、根生长没有增加, 叶片变小、黄化, 根系变棕色, 第一、二真叶叶柄显著变短, 干重减轻; 反义抑制 *AtHXK1* 的转基因植株叶片颜色深绿, 第一、二真叶叶柄显著变长, 干重增加; 过量表达 *YHXK2* 的转基因植株生长发育受阻^[23]。高表达 *AtHXK1* 的转基因番茄植株, 生长同样受到限制, 其程度与 *AtHXK1* 的活性和表达有关。 *AtHXK1* 活性增强的植株叶片中的叶绿素含量降低, 光合速率降低, 光化学量子效率降低, 而且幼果中淀粉和成熟果实中可溶性固形物含量减少了^[35]。

己糖激酶的糖信号转导途径调控着植物的开花过程, 表现为高糖延迟开花^[27], 通过正向和反向调节开花基因的表达, 但其过程复杂^[36]。

己糖激酶的糖信号转导途径调控着叶片的衰

老, 表现为叶绿素含量下降、光合作用降低。在正常的生长条件下, 过量表达 *AtHXK* 的转基因番茄衰老加速^[35]; 高表达 *AtHXK1* 的转基因拟南芥, 衰老标记基因 *SAG21*^[37] 高表达; 反义抑制 *AtHXK1* 的转基因植株, 未表现出衰老现象; 过量表达 *YHXK2* 的转基因植株生长受到限制, 加速衰老, *SAG21* 高表达, 但程度比过量表达 *AtHXK1* 的症状轻^[23]。另外, Von 等^[38]和 Tang 等^[39]分别在转基因烟草、萝卜中, 也发现了该途径参与调控植物的生长、衰老现象。Fan 等^[40]认为己糖激酶的信号转导途径调控衰老的可能分子机制是该途径模仿 ABA 和乙烯的方式, 转导糖信号活化 *PLD* 和 *ERA1* 的表达从而促进衰老。

4.2 调控不同基因的表达

运用基因工程技术, 我们发现植物己糖激酶的糖信号转导途径调控着诸如控制光合、参与乙醛酸循环等许多基因的表达。在 3%~6% 葡萄糖培养下, 过量表达 *AtHXK1* 和 *AtHXK2* 的转基因植株表现出很高的敏感性, 叶绿素 a/b 结合蛋白(*CAB1*)、核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶(*rbcS*)和质体蓝素(*PC*)等光合基因的转录水平大大降低, 硝酸还原酶(*NRI*)表达大大加强, 转入反义 *AtHXK1* 和 *AtHXK2* 的植株不受葡萄糖的抑制, 光合基因高水平转录, 而 *NRI* 转录水平下降^[12]; 参与叶片衰老的磷脂酶 *PLD*、参与 ABA 信号转导和控制分裂组织细胞周期的 *ERA* 的诱导, 也依赖于 *HXK* 的信号转导功能及其途径, 葡萄糖促进了 *PLD*、*ERA* 的表达, 但 *PLD* 在 *AtHXK1* 的转基因植株中表达高, 而在反义 *AtHXK1*、*YHXK2* 的转基因植株中表达下降, *ERA* 的表达没有明显变化^[23]; Ho 等^[24]研究发现, 玉米中己糖激酶的信号转导途径传递信号激发 *ADH2*、*G3PD* 和 *HSP86* 基因的表达, 抑制 *aAmy3*、*aAmy8* 和 *A3* 基因的表达, 受己糖激酶催化活性影响的依赖糖酵解的转导途径则抑制 *aAmy8*、*A2*、*B1*、*D1*、*E1* 和 *F1* 的表达。此外, 该途径还调节着葡萄糖对玉米胚中 α -淀粉酶、芹菜甘露醇脱氢酶和拟南芥 *DIN* 的表达。

5 小结

己糖激酶在植物的信号转导中起着重要的功能, 但其机制复杂, 未能被完全阐明。随着现代分子生物学技术和先进的生理生化分析手段的发展和应用, 对植物己糖激酶的信号转导研究必将会有更深的了解, 今后应重点着手的方面有: (1) 研究

己糖激酶的信号识别结构及其与功能的关系,以明确己糖激酶在糖感受和信号转导中的调节机制;(2)更多地筛选分离突变体以及鉴定其基因的分子特征,这将有助于了解因子间的直接感应及相互调控作用;(3)阐明己糖激酶的糖感受和信号转导途径、组分、链接以及与激素、氮、环境等其他信号转导途径的联系机制;(4)分离纯化、克隆不同的己糖激酶基因,进行转基因植株研究,探明其在糖信号转导中的调控作用,为用人工手段调节植物生长发育提供生理学依据。

参考文献 (References)

- [1] Sheen J *et al.* *Curr Opin Plant Biol*, 1999, **2**: 410
- [2] Smeekens S. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, **51**: 49
- [3] Higgins TJ *et al.* *Eur J Biochem*, 1974, **45**: 147
- [4] Doehlert DC. *Plant Physiol*, 1989, **89**: 1042
- [5] Renz A *et al.* *Planta*, 1993, **190**: 166
- [6] Galina A *et al.* *Biochem J*, 1995, **309**: 105
- [7] da-Silva WS *et al.* *J Exp Bot*, 2001, **52**: 1191
- [8] Petreikov M *et al.* *Phytochemistry*, 2001, **58**: 841
- [9] Chaubron F *et al.* *Plant Sci*, 1995, **110**: 181
- [10] Wiese A *et al.* *FEBS Lett*, 1999, **461**: 13
- [11] Jang JC *et al.* *Plant Cell*, 1997, **9**: 5
- [12] Menu T *et al.* *Plant Sci*, 2001, **160**: 209
- [13] Smith SB *et al.* *Plant Physiol*, 1993, **102**: 1043
- [14] Jiang H *et al.* *Phytochemistry*, 2003, **62**: 47
- [15] Graham IA *et al.* *Plant Cell*, 1994, **6**: 761
- [16] Jang JC *et al.* *Plant Cell*, 1994, **6**: 1665
- [17] Cortès S *et al.* *Plant Physiol*, 2003, **131**: 824
- [18] Jang JC *et al.* *Trends Plant Sci*, 1997, **2**: 208
- [19] Moore B *et al.* *Science*, 2003, **300**: 332
- [20] Halford NG *et al.* *Trends Plant Sci*, 1999, **4**: 117
- [21] Rook F *et al.* *Plant J*, 1998, **15**: 253
- [22] Muller J *et al.* *Plant Physiol*, 2000, **123**: 265
- [23] Xiao W *et al.* *Plant Mol Biol*, 2000, **44**(4): 451
- [24] Ho S *et al.* *Plant Physiol*, 2001, **125**: 877
- [25] Rolland F *et al.* *Plant Cell*, 2002, **14**: S185
- [26] Sanz P *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 1321
- [27] Zhou L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 10294
- [28] Nemeth K *et al.* *Genes Dev*, 1998, **12**: 3059
- [29] Arenas-huertero F *et al.* *Genes Dev*, 2000, **14**: 2085
- [30] Pego JV *et al.* *Plant Physiol*, 1999, **119**: 1017
- [31] Smeekens S *et al.* *Plant Physiol*, 1997, **115**: 7
- [32] Dijkwel PP *et al.* *Plant Cell*, 1997, **9**: 583
- [33] Pego JV *et al.* *Trends Plant Sci*, 2000, **5**: 531
- [34] Laby RJ *et al.* *Plant J*, 2000, **23**: 587
- [35] Dai N *et al.* *Plant Cell*, 1999, **11**: 1253
- [36] Ohto M *et al.* *Plant Physiol*, 2001, **127**: 252
- [37] Weaver LM *et al.* *Plant Mol Biol*, 1998, **37**: 455
- [38] Von SA *et al.* *EMBO J*, 1990, **9**: 3033
- [39] Tang GQ *et al.* *Plant Cell*, 1999, **11**: 177
- [40] Fan L *et al.* *Plant Cell*, 1997, **9**: 2183

The Signaling Role of Hexokinase in Plants

Jian-Hui Cheng^{1,2}, Ming Xie^{1*}, Gui-Hua Jiang, Kai Xu²

¹Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, China;

²Department of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Hexokinase (HXK) plays a important role in sugar signaling of plant cell. In recent years, there has been already more research work about the hexokinase of plants and got enough attention. Carry on the introduction to the characteristics, subcellular distribution, gene molecular characterization, hexose sensing and signaling function, HXK-department signaling pathway and regulating roles of plant hexokinase now.

Key words hexokinase; sugar signaling; regulating

Received: February 6, 2004 Accepted: April 25, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370998) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.302391, No.302389)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86401007, Fax: 86-571-86404018, E-mail: mxie@mail.hz.zj.cn; yyssz@zaas.org