



# 拟南芥乙酰羟酸合成酶(AHAS)点突变原核表达与活性测定

赵菲佚,焦成瑾,田春芳,王太术,谢尚强,何丽娟

(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(AHAS)参与支链氨基酸合成。为考察 AHAS 不同结构域对支链氨基酸合成的影响,分别对其大小亚基上特定位点进行点突变后进行原核表达,体外重组后对其全酶活性进行测定,并对其终端产物之一——缬氨酸对 AHAS 全酶活性的影响进行探讨。结果显示:AHAS 小亚基 G88D 突变将解除其终端产物的反馈抑制作用,而大亚基 E305D 与 E482D 的突变降低 AHAS 全酶活性,且 2 种不同突变大亚基对 AHAS 全酶活性影响存在差异。AHAS 大亚基 E482D 突变较 E305D 突变影响更大。研究结果表明:AHAS 大小亚基间存在着相互作用,且大小亚基不同结构域突变对 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;原核表达;全酶活性

**中图分类号:**Q786;Q789      **文献标志码:**A

## Expression and Determination of Activity of the Point Mutated *Arabidopsis* Acetohydroxyacid Synthase

ZHAO Feiyi, JIAO Chengjin, TIAN Chunfang, WANG Taishu, XIE Shangqiang, HE Lijuan

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

**Abstract:** Acetohydroxyacid synthase (AHAS) is involved in the synthesis of branched-chain amino acids (BCAAs) in *Arabidopsis*. To investigate the effects of various domains of AHAS on the BCAAs synthesis, the point mutations harboring in the specific sites of the large and small units of AHAS were introduced by site-directed mutagenesis. The mutagenized histidine-tagged units of AHAS were expressed individually in the bacterial hosts and the recombinant proteins were purified using Ni beads. The point mutated large and small units were reconstituted *in vitro* and the activities of holoenzymes were determined. Moreover, the effects of valine, which is one of the final end products of AHAS, on the activities of the mutated holoenzymes were also examined. The results showed that the G88D mutation in the small unit of AHAS abolished the final end product inhibition and the E305D or E482D mutation in the large unit decreased the activity of AHAS holoenzyme. The two mutations in the large unit displayed difference in the activity of AHAS and the E482D mutation presents the more effects than the E305D on the activity of AHAS. The results in this study suggest that the large unit interacts with the small unit in the AHAS and the various domains in the units of AHAS exhibit distinct functions.

**Key words:** AHAS; point mutation; bacterial expression; holoenzyme activity

收稿日期:2014-12-17;修改稿收到日期:2015-02-03

基金项目:国家自然科学基金(31160060,31260568)

作者简介:赵菲佚(1972—),男,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:tspaulzhao@163.com

缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸由于具有支链碳骨架而被称为支链氨基酸。支链氨基酸参与动物生长与发育诸多代谢过程<sup>[1-3]</sup>。在动物细胞中,支链氨基酸通过信号蛋白 mTOR(mammalian target of rapamycin)进行信号传递,通过促进胞内蛋白合成及降解过程在蛋白质合成中起着重要的作用。此外,支链氨基酸也直接或间接影响兴奋性神经递质谷氨酸的合成与区室化过程<sup>[4]</sup>,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<sup>[2,5]</sup>。由于动物不能从头合成支链氨基酸,只能通过饮食获取,使植物成为支链氨基酸的重要来源。

在植物、细菌及真菌中,支链氨基酸通过非常保守的代谢途径进行合成,合成过程受合成酶底物及合成途径终产物的严格调控<sup>[6]</sup>。乙酰羟酸合成酶(acetohydroxyacid synthase, AHAS)也称乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase),是该代谢途径第一个酶,催化两分子丙酮酸盐生成缬氨酸和亮氨酸的前体物质乙酰乳酸;也能催化丙酮酸盐与  $\alpha$ -酮丁酸生成异亮氨酸前体乙酰羟基丁酸盐<sup>[7]</sup>。由于 AHAS 可作为一些化学除草剂的靶点,其结构与功能在不同生物中已有较好研究。细菌 AHAS 全酶为四聚体,由 2 个较大的催化亚基和 2 个较小的调节亚基组成,小亚基可稳定并增强催化亚基的活性<sup>[8]</sup>,包含 1 个保守的 ACT 结构域,大亚基则介导终产物的反馈抑制作用。对植物 AHAS 研究表明:植物 AHAS 大小是细菌的 2 倍,催化亚基含有 2 个 ACT 结构域,推测植物 AHAS 的构象可能与细菌不同<sup>[9]</sup>。

基于植物 AHAS 在支链氨基酸代谢中的关键作用,研究者试图过表达该基因各自的亚基来提高植物体内的支链氨基酸含量,但实验结果均未达到预期目标<sup>[10-11]</sup>。对细菌 AHAS 大亚基的研究确定了 H132、K155、E213、D217、E221、E389、E393 和 S414 为其关键位点,除 E213D 外,其余位点的突变使细菌 AHAS 酶活性完全丧失,E213D 的突变使细菌 AHAS 的酶活性只有野生型酶蛋白的 25%<sup>[12]</sup>。波菜 AHAS 大亚基体外突变分析结果与细菌相似,大亚基 R2598、E311、D315、E319、E488、E492、S518 和 T520 组成 AHAS 的活性中心,除 E488D 突变外,其它突变均消除了该酶活性,E488D 突变使其酶活性为野生型的 48%<sup>[13]</sup>。对 AHAS 氨基酸序列在不同物种间的比对分析发现,细菌 E213 与拟南芥 E305 对应,而波菜 E488 与拟南芥 E482 相对应。细菌 AHAS 小亚基 ilvH 中,N11A、G14D、N29H、

T34L、A36V 及 Q59L 突变对细菌 AHAS 全酶活性与对缬氨酸的敏感性有影响,其中 G14D 突变具有野生型 AHAS 酶活性的 92%,并使细菌具有对缬氨酸最强烈的抗性,比对发现此突变与拟南芥小亚基 G88D 突变相对应<sup>[14]</sup>。

近期 Chen 等<sup>[15]</sup>通过正向遗传学筛选到拟南芥突变体 *vat1*(valine-tolerant 1),并发现催化亚基的 T119L 突变可解除终产物抑制,使支链氨基酸含量增加。植物 AHAS 全酶催化亚基与调节亚基间存在着相互作用,进而影响 AHAS 催化活性。已有研究多集中于对 AHAS 各自亚基功能的探讨,对大小亚基上关键结构域同时突变,并从全酶水平进行活性研究未见报道。本研究对拟南芥 AHAS 两亚基不同位置进行体外突变,然后在原核细胞中分别表达,不同突变亚基蛋白经体外重组后测定 AHAS 全酶活性变化。研究结果在理论上将为了解 AHAS 亚基间相互作用提供信息,实践上将为提高支链氨基酸含量的基因操作提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

拟南芥野生型(Columbia-0)订购自 SALK(<http://signal.salk.edu/>)。种子用含 0.1% TritonX-100 的 20% 次氯酸钠消毒液在 EP 管中消毒 12 min,灭菌 ddH<sub>2</sub>O 漂洗 5 次后,点种于 MS 固体培养基平板上。置于 4 ℃下春化 2~3 后移至 22 ℃连续光照条件下竖直培养。

### 1.2 AHAS 点突变原核表达载体构建

平板上生长 7 d 的拟南芥整株幼苗,提取其总 RNA,采用上海生物工程公司总 RNA 提取试剂盒进行(Sangon, SK1312),提取的总 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,使用高保真酶进行 AHAS 大小亚基 CDS 全长 PCR 扩增(Trans, AP221-01)。野生型 AHAS 大亚基使用引物 ALUF(5'-CCGGAATT~~C~~ATGGCGGCGGCTA-CTTCATCCATC-3') 和 ALUR(5'-CCCAAGCTT-TCAGTTGCTAGATTGACGCAAC-3');野生型 AHAS 小亚基使用 ASUF(5'-CGCGGAT~~C~~CATG-GCGGCGACGACTGCTAC-3') 和 ASUR(5'-CCCAAGCTTCTACAAAGGAAGAGAGTATCC-ACG-3');AHAS 大亚基在第 305 位 E305D 的正向突变引物为 ALU305F(5'-ACTCTTGAACAGGA-TTACAGGAGTGAC-3'),反向突变引物 ALU305R

(5'-GTCACTCCTGTAATCCTGTTCAAGAGT-3'); AHAS 大亚基第 482 位 E482D 正向突变引物为 ALU482F(5'-CACTCTTACTCAGATATCATC-AACGAG-3'), 反向引物为 ALU482R(5'-CTCGTTGATGATATCTGAGTAAGAGTG-3')。AHAS 小亚基第 88 位 G88D 正向突变引物 ASU88F(5'-GGCGATGAGAGCGATATAATAATAGA-3'), 反向突变引物为 ASU88R(5'-TCTATTAT-TATATCGCTCTCATCGCC-3')。引物中下划线标记各酶切位点。PCR 扩增产物经胶回收柱 (Sangon, SK8132) 纯化后双酶切, 再次纯化后连接到 pET28a 表达载体上, 所有克隆序列送上海生物工程公司进行测序, 确认克隆正确后分别进行 AHAS 大小亚基蛋白原核表达。

### 1.3 AHAS 突变大小亚基蛋白原核表达

将测序正确的原核表达载体转入 BL21(DE3) 菌株, 按 1:1 000 的比例接种至 60 mL 含 50  $\mu$ g/L 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 °C 过夜小量培养。次日将 10 mL 过夜培养物转入 1 L 含 50  $\mu$ g/mL Kan 的 LB 培养基中继续培养, 当菌液 OD<sub>600</sub> 达 0.6 时收菌, 4 000 r/min 离心, 沉淀加入 30 mL 裂解液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, pH 8.0) 重悬, 在超声破碎仪上破碎后 12 000 r/min 离心, 上清液中加入 Qiagen 公司 Ni-NTA 树脂, 重组蛋白提取按 Qiagen 公司树脂使用方法进行。纯化蛋白保存于 4 °C 冰箱备用。

### 1.4 AHAS 突变大小亚基蛋白体外重组与全酶活性测定

AHAS 蛋白酶大小亚基体外重组与全酶活性测定按照 Maria Vyazmensky 的方法进行<sup>[8]</sup>, 并依据发表文献进行部分修改<sup>[16-17]</sup>。野生型及各突变等量 AHAS 大小亚基蛋白 (500  $\mu$ g) 加入 500  $\mu$ L 重组缓冲液 A (0.1 mmol/L FAD, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.6) 中。37 °C 保温 15 min 使 AHAS 大小亚基进行重组, 后加入 500  $\mu$ L 缓冲液 B (80 mmol/L 丙酮酸钠, 0.2 mmol/L TPP, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mmol/L FAD, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L EDTA 溶解于 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液中, pH 7.6), 至已保温完全的缓冲液 A 中开始反应。此反应混合液在 37 °C 保温 30 min 后加入 1/10 总反应体积的 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 以终止反应, 在 60 °C 下加热 15 min 使乙酰乳酸转变为 3-羟基-2-丁酮, 再加入 120  $\mu$ L 1.7% 肌酸, 使用 2.5 mol/L NaOH 调节反应液至碱性, 后

加入 140  $\mu$ L  $\alpha$ -奈酚, 60 °C 保温 15 min 使其显色。反应生成的 3-羟基-2-丁酮使用 CARY 50 Bio 分光光度计在 525 nm 下进行比色测定。在此反应条件下, 一个酶活力单位定义为 1  $\mu$ mol 乙酰乳酸在 1 min 内生成的产物。测定重复 3 次, 计算均值与标准差。外源加入缬氨酸对 AHAS 酶活性影响测定方法除在缓冲液 B 中加入所需浓度的缬氨酸外, 其余步骤与上述标准测定方法相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 AHAS 蛋白结构及其突变位置

拟南芥 AHAS 全酶由 2 个相同的大亚基和 2 个相同的小亚基构成, 大亚基为催化亚基, 小亚基为调节亚基。AHAS 大亚基 (ALU) 定位于拟南芥第 5 条染色体上 (At5g58610), 其 CDS 共有 1 773 bp, 编码蛋白含 591 个氨基酸。蛋白第 305 位氨基酸由 E 转变为 D, 导致第一个大亚基突变蛋白为 ALU<sup>E305D</sup>, 第 482 位氨基酸由 E 转变为 D 形成该大亚基第二个突变蛋白 ALU<sup>E482D</sup> (图 1, A)。AHAS 小亚基 (ASU) 定位于拟南芥第 3 条染色体上 (At3g16290), 其 CDS 共有 1 441 bp, 共编码 477 个氨基酸, 属于 ACT 超家族。小亚基蛋白包含 2 个 ACT 结构域, 分别位于 78~150 和 309~383 氨基酸区域。蛋白第 88 位氨基酸由 G 转变为 D 形成小亚基突变蛋白 ASU<sup>G88D</sup> (图 1, B)。

### 2.2 AHAS 原核表达载体构建

ALU 野生型与 ALU 第 305 位 E 突变为 D 的 ALU<sup>E305D</sup>、第 482 位 E 突变为 D 的 ALU<sup>E482D</sup> 突变蛋白和 ASU 野生型及 ASU 第 88 位 G 突变为 D 的

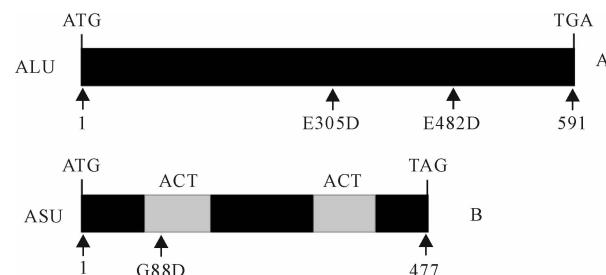


图 1 AHAS 蛋白大小亚基结构与突变位置示意

A. ALU 结构与突变位置; B. ASU 结构与突变位置;

图中数字表示从翻译起点处氨基酸位置; ACT. ACT 结构域

Fig. 1 Schematic diagrams of the large and small units

and the mutant positions of the AHAS protein

A. Structure of ALU and the mutant positions in the mutant ALU version; B. Structure of ASU and the mutant position in the mutant ASU version; Numbers indicate the mutant positions relative to the translation start site; ACT. ACT domain

ASU<sup>G88D</sup>突变蛋白CDS以PCR方式进行扩增,并被克隆到原核表达载体pET28a中(图2)。从图2可看出,PCR扩增产物与AHAS大小亚基片段大小相符合,大亚基片段大小为1.7 kb,小亚基大小约1.4 kb。扩增片段连接到pET28a后经酶切验证克隆正确,用于后续表达试验。

### 2.3 AHAS突变蛋白原核表达

将构建并测序验证的AHAS大小亚基及其突

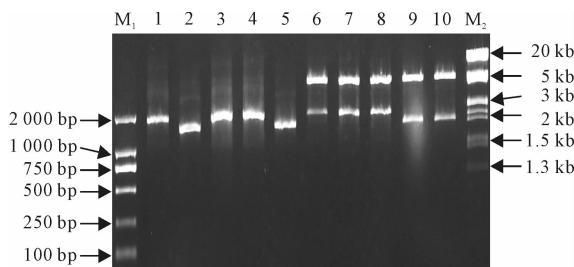


图2 AHAS大小亚基及其突变形式原核表达载体构建  
M<sub>1</sub>, DL2000; M<sub>2</sub>, λDNA/EcoR I + Hind III; 1~5 分别为 ALU、  
ASU、ALUE<sup>E305D</sup>、ALUE<sup>E482D</sup> 及 ASU<sup>G88D</sup>; 6~10  
分别为 1~5 PCR 产物克隆至原核表达载体 pET28a 后  
经 BamH I 与 Sal I 双酶切鉴定

Fig. 2 Construction of the bacterial expression vectors of the AHAS large and small units and mutant versions of AHAS M<sub>1</sub>, DL2000; M<sub>2</sub>, λDNA/EcoR I + Hind III; 1~5 indicate the PCR products of ALU, ASU, ALUE<sup>E305D</sup>, ALUE<sup>E482D</sup> and ASU<sup>G88D</sup>, respectively; 6~10 indicate the BamH I / Sal I double digestion verification of constructs in which the PCR products of lanes 1~5 were cloned into the pET28a bacterial expression vectors

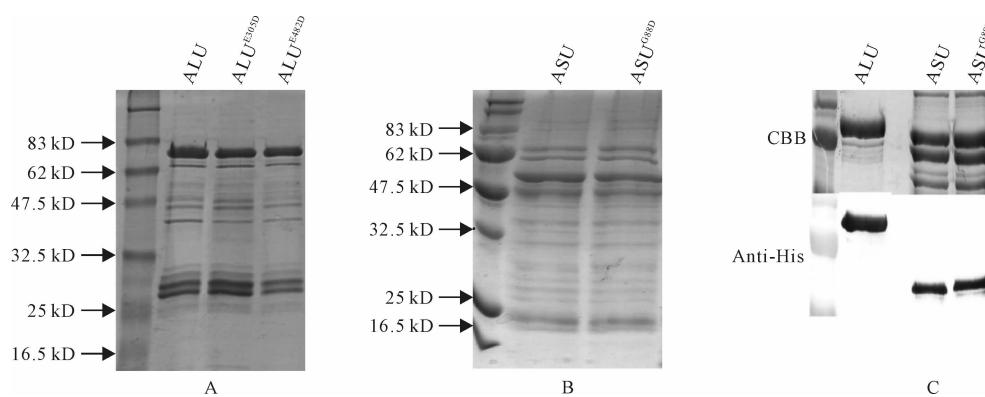


图3 AHAS大小亚基及其突变蛋白表达与纯化

A. ALU、ALUE<sup>E305D</sup>和ALUE<sup>E482D</sup>His标签融合蛋白表达与纯化; B. ASU及ASU<sup>G88D</sup>His标签融合蛋白表达与纯化;  
C. ASU与ASU<sup>G88D</sup>His标签融合蛋白Western检测,图中上部为纯化蛋白考马斯亮蓝染色(CBB),下部为His标签抗体杂交结果

Fig. 3 Expression and purification of the hexahistidine-tagged proteins of the

AHAS large or small unit and the related mutated versions

A. Expression and purification of the 6x-His-tagged proteins of ALU, ALUE<sup>E305D</sup> and ALUE<sup>E482D</sup>;

B. Expression and purification of the 6x-His-tagged proteins of ASU and ASU<sup>G88D</sup>; C. Western blotting of the hexahistidine-tagged proteins of ASU and ASU<sup>G88D</sup> using the antibodies against His tag. The upper panel indicates Coomassie brilliant blue(CBB) stain and the low panel signifies the Western blotting detection

变形式原核表达载体转入原核表达菌株BL21(DE3)进行大小亚基蛋白分别表达,表达的不同形式蛋白经His标签纯化,经12%SDS-PAGE蛋白胶检测结果见图3。

图3,A显示,ALU及其2种突变形式ALUE<sup>E305D</sup>、ALUE<sup>E482D</sup>均得到正确表达,其大小都在其预测的65 kD。从图3,B可看出,ASU及ASU<sup>G88D</sup>也得到了表达,预测大小为53 kD,然而小亚基的表达除有一条表达主带外,还有其它非特异性条带存在。为进一步确认AHAS大小亚基表达的正确性及小亚基的正确位置,对所纯化的蛋白使用抗His标签抗体进行Western检测(图3,C)。结果表明,AHAS大小亚基均为His融合蛋白,其与预测大小符合,且AHAS小亚基位于非特异性条带下方。

### 2.4 AHAS突变蛋白体外重组与全酶活性测定

为考察AHAS各亚基不同点突变形式对其全酶活性的影响,对已在原核中表达的AHAS亚基的不同突变形式在体外进行重组,并对重组的全酶活性及不同缬氨酸浓度对全酶活性影响进行了测定结果见图4。

图4表明,当AHAS大亚基第305位或其第482位由谷氨酸变为天冬氨酸(E突变为D),而小亚基第88位由甘氨酸变为天冬氨酸时(G突变为D),不同的大亚基突变形式与突变的小亚基重组后依然表现出酶活性,但不同的突变大亚基形式与突变小亚基组合对其全酶活性的影响不同。与未突变

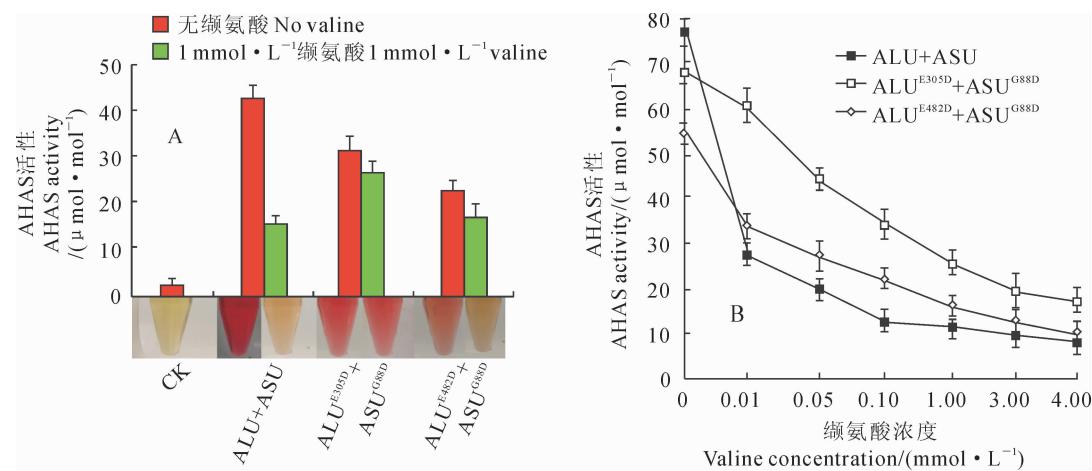


图4 突变ALU与ASU重组酶不同缬氨酸浓度下活性

A. 突变ALU与ASU重组全酶活性; B. 不同浓度缬氨酸处理下突变ALU与ASU重组全酶活性

Fig. 4 Activities of the reconstructed holoenzymes of the mutated ALU and ASU under various concentrations of valine

A. Activities of the reconstructed holoenzymes of the mutated ALU and ASU; B. Activities of the reconstructed holoenzymes of the mutated ALU and ASU under various concentrations of valine

的野生型全酶相比较,发生点突变后的全酶活性均降低,下降最快的为大亚基发生E482D的突变形式(图4,A,红色柱),说明当AHAS的大小亚基不同结构域突变会对其全酶活性产生影响。为考察缬氨酸对不同突变形式AHAS酶活性的影响,在不同突变形式的重组体系中加入终浓度为1 mmol/L缬氨酸,并对此条件下AHAS酶活性进行了测定(图4,A,绿色柱)。与无缬氨酸加入时不同,测试体系中存在缬氨酸时,AHAS野生型蛋白酶活性受到抑制,而突变形式AHAS酶活性被抑制的程度小于其未突变的酶形式。在大亚基2种不同突变形式中,大亚基E305D突变形式酶活性被抑制的程度最小。此结果一方面说明,当AHAS小亚基发生G88D突变时的确部分解除了其终端产物对全酶的抑制作用,另一方面说明在小亚基与大亚基同时存在突变时,大亚基上的突变又可部分减弱由于小亚基突变导致的其终端产物对酶活性的影响,且在大亚基不同位置的点突变对此减弱的程度存在差异。

此外,对不同AHAS突变形式在不同浓度缬氨酸存在时对其活性影响也进行了测定(图4,B),结果表明,在不同缬氨酸浓度下,野生型及突变形式AHAS活性均随着缬氨酸浓度的升高而降低,野生型AHAS的活性降幅最大,在缬氨酸0~0.01 mmol/L区间内,降幅达65%,而突变形式的AHAS在此区间内的降幅与野生型相比则较小,大亚基E482D突变的降幅为38.1%,而E305D的突变降幅仅为11.7%。在缬氨酸从0~4 mmol/L区间内,野生型AHAS活性的降幅平均为87.1%,

E305D的平均为70.5%,E482D为80.8%。此结果说明,当存在不同浓度缬氨酸终产物时,其对AHAS活性的抑制由于AHAS在大亚基上不同位置的突变而有差异,与其在1 mmol/L浓度下的测定结果相似,在不同浓度缬氨酸影响下,呈现出突变形式AHAS活性下降较野生型小,而在2种突变形式AHAS中,E305D对终产物的反馈抑制影响又较E482D小,且缬氨酸对AHAS活性的抑制浓度集中于0~0.01 mmol/L的狭窄区间内。

### 3 讨 论

支链氨基酸是动物的必需氨基酸,植物是这些氨基酸的主要来源。植物AHAS作为支链氨基酸合成途径中的第一个酶,其活性变化与调节在支链氨基酸合成中起着关键性的作用。植物中提高此类氨基酸含量无法以过表达该基因的方式实现<sup>[7,11]</sup>,对AHAS酶蛋白精细结构及活性调控研究成为实现此目标的重要途径。

本研究中,对拟南芥AHAS点突变大小亚基体外表达与活性测定表明:AHAS野生型及不同位置发生突变的大小亚基以融合蛋白方式在原核中均可进行表达,纯化的原核表达大小亚基蛋白在体外可进行重组,且全酶均表现出酶活性,然而在不同的突变方式下其全酶活性存在差异。在无缬氨酸存在时,AHAS大亚基E305D或E482D与小亚基G88D突变组成的全酶与野生型相比其活性均降低,其中E305D活性为野生型的74.4%,E482D为58.1%。当AHAS大亚基不同结构域特定位置发生点突变

时,其活性会降低,此结果与在细菌及波菜中的研究结果一致。然而,在拟南芥中,与细菌或波菜的对应位点突变后,其活性降低程度与细菌与波菜中不同。比对不同物种 AHAS 蛋白编码序列发现,其序列含有 5 个保守结构域,E305 与 E482 处于第 3 与第 4 个结构域中,在拟南芥中,两个结构域上位点突变均导致酶活性的下降,但下降幅度与其它物种不同,此可能是由于拟南芥 AHAS 序列及其空间结构上的不同所致。在细菌与波菜中,第 3 与第 4 结构域在反应中可结合镁离子,第 3 结构域介导后续还原反应,而第 4 结构域介导后续异构化反应过程<sup>[12-13]</sup>。当在此两个结构域上特定位点发生突变后,对 AHAS 活性在总趋势为下降的同时,也存在物种特异性。

AHAS 小亚具有稳定并调节大亚基活性的作用,也介导了支链氨基酸终端产物对全酶的活性调节,尽管目前未发现小亚基结合支链氨基酸的直接证据,但对酵母 AHAS 活性体外测定发现,当存在支链氨基酸时,其大亚基活性的确会发生变化<sup>[18]</sup>。已有研究发现,在支链氨基酸作为终端产物时,在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸中,对其活性起主要影响的为缬氨酸,而其它两种的影响较小<sup>[19]</sup>。本研究中,当缬氨酸在体外活性测定体系中达 1 mmol/L 时,对 AHAS 全酶活性影响与无缬氨酸时显示出不同的效果,其对大亚基 E305D 突变酶活性影响较小,而对 E482D 的影响较大。不同缬氨酸浓度对 AHAS 野生型及突变形式全酶活性的影响测定中也发现,其活性变化与在 1 mmol/L 浓度下的趋势相同,在不同缬氨酸浓度下,野生型与突变形式 AHAS 全酶活性均受到终端缬氨酸的抑制,对突变形式的影响较野生型小,在 2 种大亚基突变形式中,E305D 突变较 E482D 表现出对终端抑制更具有抗性,且此抑制效应存在于 0~0.01 mmol/L 狹窄的浓度范围内。此抑制抗性效果显然来源于 AHAS 小亚基 G88D 突变。已有研究显示:当此位点突变

后可解除终端支链氨酸对 AHAS 的活性抑制作用,拟南芥 AHAS 小亚基与细菌不同,含有 2 个 ACT 结构域(细菌中仅含有一个),在细菌体内,AHAS 更倾向于形成 2 个大亚基与 2 个小亚基的四聚体,而介导终端产物抑制位置存在于 2 个小亚基组成的二聚体界面上<sup>[20-22]</sup>。拟南芥中,由于小亚基含有两个 ACT 结构域,其在调节大亚基活性的过程中与其它物种的不同,已有对小亚基不同 ACT 结构域突变分析表明,其作用方式为在小亚基上的两个 ACT 结构域存在着分子内的相互作用,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<sup>[15]</sup>。本研究结果表明,一方面当小亚基特定位点(G88D)发生突变后消除了其对大亚基活性的反馈抑制作用,另一方面,由于大亚基上同时存在的突变使得其对大亚基活性的抑制影响又存在差异。

本研究中,对 AHAS 大小亚基同时进行突变,在小亚基上突变可解除终端产物抑制的前提下考察大亚基不同位点对全酶活性的影响。已有研究中,AHAS 小亚基可通过与大亚基解离与结合达到调节全酶活性目的。基于本研究结果,可推测 AHAS 终端支链氨基酸对其活性影响来源于其全酶空间结构变化,一方面,终端产物的结合可使 AHAS 小亚基空间结构发生变化,且不同浓度终产物对其结构变化影响不同,另一方面结构变化后的小亚基与大亚基的相互作用也将会对大亚基的空间结构产生影响,而 AHAS 大亚基不同活性位点突变所产生的结构变化也会反映于全酶最终活性上。对 AHAS 而言,可能存在不同位点突变产生的连续结构变化和阈值效应,当在一定空间变化范围内,该结构变化仅不同程度地影响全酶活性,而超过阈值后将完全消除其酶活性。不能排除在其大小亚基上是否存在已研究位点之外对 AHAS 活性可产生影响的其它位点,对此推测的验证及 AHAS 突变后体内功能评估是本研究的下一步工作。

## 参考文献:

- [1] HARRIS R A, JOSHI M, JEOUNG N H, et al. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism [J]. *J. Nutr.*, 2005, **135**(6): 1 527~1 530.
- [2] NAIR K S, SHORT K R. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids [J]. *J. Nutr.*, 2005, **135**(6): 1 547S~1 552S.
- [3] BROSNAN J T, BROSNAN M E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation [J]. *J. Nutr.*, 2006, **136**(1): 207S~211S.

- [4] HUTSON S M, LIETH E, LANOUE K F. Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system [J]. *J. Nutr.*, 2001, **131**(3): 846S-850S.
- [5] FERNSTROM J D. Branched-chain amino acids and brain function [J]. *J. Nutr.*, 2005, **135**(6): 1 539-1 546.
- [6] DUGGLEBY R G, PANG S S. Acetohydroxyacid synthase [J]. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **33**(1): 1-36.
- [7] SINGH B K, SHANER D L. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**(7): 935-944.
- [8] VYAZMENSY M, SELLA C, BARAK Z, *et al*. Isolation and characterization of subunits of acetohydroxy acid synthase isozyme III and re-constitution of the holoenzyme [J]. *Biochemistry*, 1996, **35**(32): 10 339-10 346.
- [9] CHIPMAN D M, DUGGLEBY R G, TITTMANN K. Mechanisms of acetohydroxyacid synthases [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**(5): 475-481.
- [10] SCHUSTER J, BINDER S. The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2005, **57**(2): 241-254.
- [11] LEE Y H, FOSTER J, CHEN J, *et al*. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis* [J]. *Plant J.*, 2007, **50**(2): 305-319.
- [12] RAJIV T, LEE Y T, LUKE W, *et al*. Probing the mechanism of the bifunctional enzyme ketol-acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis of the active site [J]. *FEBS J.*, 2005, **272**(2): 593-602.
- [13] RENAUD D, MARIE C B, DOMINIQUE J, *et al*. Evidence for two catalytically different magnesium-binding sites in acetohydroxy acid isomero-reductase by site-directed mutagenesis [J]. *Biochem.*, 1995, **34**(18): 6 026-6 036.
- [14] MENDEL S, ELKAYAM T, SELLA C, *et al*. Acetohydroxyacid synthase: a proposed structure for regulatory subunits supported by evidence from mutagenesis [J]. *J. Mol. Biol.*, 2001, **307**(1): 465-477.
- [15] CHEN H, SAKSA K, ZHAO F Y, *et al*. Genetic analysis of pathway regulation for enhancing branched-chain amino acid biosynthesis in plants [J]. *The Plant Journal*, 2010, **63**(4): 573-583.
- [16] CHANG A K, DUGGLEBY R G. Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase [J]. *Biochem. J.*, 1997, **327**(1): 161-169.
- [17] LEE Y T, DUGGLEBY R G. Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(23): 6 836-6 844.
- [18] SIEW S P, RONALD G D. Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP [J]. *Biochem. J.*, 2001, **357**(3): 749-757.
- [19] MIFLIN B J, CAVE P R. The control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants [J]. *J. Exp. Bot.*, 1972, **23**(2): 511-516.
- [20] PANG S S, DUGGLEBY R G, GUDDAT L W. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors [J]. *J. Mol. Biol.*, 2002, **317**(2): 249-262.
- [21] PANG S S, GUDDAT L W, DUGGLEBY R G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase [J]. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**(9): 7 639-7 644.
- [22] DUGGLEBY R G, MCCOURT J A, GUDDAT L W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2008, **46**(3): 309-324.

(编辑:宋亚珍)