

综 述 Reviews

高等植物中赖氨酸代谢调控及其关联效应研究进展

杨晴晴, 吴宏玉, 陈思予, 张韬, 刘巧泉*

扬州大学农学院, 江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室, 植物功能基因组学教育部重点实验室, 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏扬州225009

摘要: 赖氨酸是禾谷类作物中第一限制性必需氨基酸, 缺乏赖氨酸严重影响人类和动物的营养和健康水平。因此, 提高植物中赖氨酸含量一直是科学家的目标。虽然对植物中赖氨酸的代谢调控通路的解析目前已十分清晰, 但对天冬氨酸途径衍生的赖氨酸代谢所关联的其他代谢通路的认识却非常有限。本文在介绍植物中赖氨酸代谢途径及提高赖氨酸含量策略的基础上, 分析了赖氨酸调控对其他氨基酸、淀粉合成、产量、籽粒外观、种子萌发和胁迫响应等的影响, 并归纳阐述了与赖氨酸调控相关的代谢关联, 以便为今后赖氨酸的代谢调控研究理清思路, 并为利用相关知识避免不良效应的同时改良植物的营养品质提供参考。

关键词: 赖氨酸; 营养品质; 代谢调控; 代谢关联

植物能够产生超过20万种结构与功能各异的代谢产物(Goodacre等2004)。这些代谢产物是细胞进程的最终产物, 其水平的变化可被视为生物系统对遗传或环境变化的最终反应(高慧兵等2019)。它们不仅与作物产量和品质性状密切相关, 在人类营养和医疗保健等方面也发挥着重要作用(Saito和Matsuda 2010)。植物中氨基酸代谢调控具有特殊意义: 一方面, 人类和动物自身不能合成的必需氨基酸需要从食物中获取, 而植物是人类和动物膳食的主要来源, 往往因食物中缺乏一些必需氨基酸而造成营养不均衡(Yang等2016); 另一方面, 氨基酸作为某些代谢通路的中间或者最终代谢物, 还参与多条代谢通路的调控, 与植物其他的生理生化途径相关联, 影响植物的许多生理过程(Galili和Amir 2013; Yang等2018)。

植物中尤其是禾谷类作物中含有的赖氨酸水平较低, 远远不能满足人类和动物的需求, 从而影响其营养和健康水平, 且易造成营养缺乏代谢疾病。因此, 赖氨酸被称为水稻(*Oryza sativa*)等禾谷类作物中的第一限制性必需氨基酸(Galili和Amir 2013)。近年来, 研究者一直致力于与植物中赖氨酸含量提高的研究, 以期提高禾谷类作物中赖氨酸的水平。研究表明, 天冬氨酸代谢途径是赖氨酸生物合成的主要途径, 并参与多条代谢通路, 与其他的代谢通路相关联, 从而影响植物体内其他代谢物质的水平(Wang等2018; Yang等2018)。

1 植物中赖氨酸的代谢与调控

1.1 赖氨酸的合成代谢

植物中, 赖氨酸的合成来自于天冬氨酸复杂的代谢途径, 在此途径中还生成苏氨酸、甲硫氨酸和异亮氨酸三种必需氨基酸(Wang等2018)。赖氨酸和苏氨酸的含量在禾谷类作物中尤其低, 因此天冬氨酸代谢途径在禾谷类作物中显得尤为重要(Galili等2016)。大量的研究表明, 在依赖于天冬氨酸途径的赖氨酸合成通路中, 赖氨酸的生物合成受天冬氨酸激酶(aspartate kinase, AK)和二氢二吡啶酸合酶(dihydrodipicolinate synthase, DHPS)两种关键酶的影响最大(Galili和Amir 2013)。

基因表达水平的研究表明, AK和DHPS基因的表达都受光调节, AK的表达还额外受光合作用相关代谢物、蔗糖和无机磷酸盐的调节; 通路水平分析显示, 赖氨酸合成相关基因的表达在非生物胁迫下一般呈下调趋势(Galili等2016)。Vauterin等(1998)研究表明, AK和DHPS基因在不同组织和发育时期的表达模式非常相似, 即在萌发的种苗中高度表达, 在幼芽和根组织、发育的花器官以及胚中活跃存在。

收稿 2019-06-05 修定 2019-09-24

资助 国家自然科学基金(31801322和31471459)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08001006)和江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2018357)。

* 通讯作者(qqliu@yzu.edu.cn)。

生物化学、分子生物学和遗传学的发展大大加强了我们对天冬氨酸代谢途径调控的认识,即发现许多分支点酶受合成产物正向或者负向的反馈调控(Galili 2002)。AK和DHPS是赖氨酸合成途径中两种重要的限速酶,协同控制植物中游离赖氨酸的合成速率(Galili和Amir 2013)。AK作为天冬氨酸代谢的第一个限速酶,将天冬氨酸转化为 α -天冬氨酸磷酸盐,其分子特征和理化性质在微生物和许多植物中已经被很好地表征(Galili 2002);AK至少含有两种不同形式的同工酶,其活性被赖氨酸和/或苏氨酸反馈抑制,从而限制组织或器官中赖氨酸和苏氨酸的水平(Galili和Amir 2013)。DHPS作为赖氨酸合成途径中的第一个限速酶,催化丙酮酸和天冬氨酸半醛缩合形成二氢二吡啶酸,其活性特异性地受赖氨酸水平的反馈抑制,从而影响赖氨酸的合成和累积(Galili和Amir 2013)。

1.2 赖氨酸的分解代谢

酵母氨酸途径通常被认为是赖氨酸在植物体内降解的主要代谢途径。 ^{14}C -赖氨酸标记实验表明,谷氨酸和 α -氨基己二酸被同位素 ^{14}C 所标记,赖氨酸酮戊二酸还原酶(lysine-ketoglutarate reductase, LKR)在未成熟玉米(*Zea mays*)胚乳中的活性也证实了这一途径(Galili等2016)。酵母氨酸途径的前两个步骤是由LKR和酵母氨酸脱氢酶(saccharopine dehydrogenase, SDH)催化反应完成的,它们是一个双功能多肽的独立结构域(LKR/SDH)。

在植物中表达对赖氨酸反馈抑制不敏感的大肠杆菌(*Escherichia coli*) AK和DHPS基因,发现赖氨酸并未在成熟种子中积累,而酵母氨酸和 α -氨基己二酸显著增加,同时,催化赖氨酸分解代谢的LKR/SDH也明显增多,说明在转基因植物中赖氨酸积累诱导了LKR/SDH基因的表达,并通过酵母氨酸途径加快了赖氨酸降解的速率,在此过程中,双功能酶LKR/SDH作为关键酶参与赖氨酸的分解代谢,并在赖氨酸的积累中发挥至关重要的作用(Wang等2018)。

植物中LKR/SDH基因的表达受复杂的转录调控和翻译调控。正常生长条件下, LKR/SDH基因在植物花器官和发育种子中表达最高;但在种子发育过程中, LKR/SDH基因在双子叶植物和单子

叶植物中的表达模式有所不同(Tang等1997)。LKR/SDH基因的表达不仅受发育调控的影响, 酪蛋白激酶II、脱落酸(abscisic acid, ABA)、茉莉酸、糖分和胁迫响应等也调控LKR/SDH基因的转录和翻译活性(Galili 2002)。在高赖氨酸植物中, LKR活性的诱导需要 Ca^{2+} 和蛋白磷酸化/去磷酸化的级联信号反应(Galili 2002)。

2 代谢调控提高植物中赖氨酸含量

基于赖氨酸在人类及动物体内重要的生理功能及在禾谷类作物中作为第一限制性氨基酸的重要性, 提高植物中赖氨酸含量也一直是科学家研究的主要目标之一。目前, 已有多种策略用于尝试提高植物中赖氨酸水平, 主要包括传统育种技术和现代生物技术。

2.1 传统育种技术选育高赖氨酸种质

育种家在利用传统育种技术选育高赖氨酸品种时, 其首要的任务是筛选赖氨酸含量较高的基础材料, 进而对这些资源进行遗传改良, 使其不仅在营养品质性状上有所改良, 在农艺性状及产量上也要保持优良的特性或者有较大突破。早期的传统育种中, 主要使用回交兼轮回选择法用于高赖氨酸材料的选育, 使优良基因得以纯合, 综合性状增强(杨晴晴2016)。但早期氨基酸性状检测的困难和传统育种的局限, 使得这一方法在提高植物赖氨酸含量方面显得尤为艰难。

2.2 高赖氨酸植物突变体的选育

Mertz等(1964)首次报道的玉米隐性突变基因 *opaque-2* (*o2*)为提高植物中赖氨酸含量开辟了一条新的途径, 研究表明 *o2o2* 纯合基因型的玉米突变体胚乳中赖氨酸含量提高了70%, 赖氨酸含量和色氨酸含量与普通玉米亲本相比均增加一倍左右。随后, 自然突变和物理生化突变方法被用于高赖氨酸植物的选育。类似的胚乳突变体 *opaque-6*、*opaque-7*、*opaque-15*、*floury-2* 等相继被发现和研究, 这些突变体玉米胚乳中醇溶蛋白减少, 总赖氨酸含量提高, 但成熟籽粒由于醇溶蛋白的减少而出现或多或少的胚乳缺陷, 使得这些高赖氨酸突变体难以用于生产实际(Sarika等2017)。类似的高赖氨酸突变基因在小麦(*Triticum aestivum*)、高粱

(*Sorghum bicolor*)、水稻、大麦(*Hordeum vulgare*)等作物中被相继发现(Wenefrida等2013; Mofokeng等2017; Yu和Tian 2018)

近年来, 随着科学家对微生物及植物中赖氨酸代谢调控的详细解析, 一些代谢调控关键酶基因的突变体也被相应挖掘, 以提高体内游离赖氨酸含量。细菌中首次发现对赖氨酸反馈抑制不敏感的AK突变基因*lysC*, 同样的DHPS突变基因*dapA*对赖氨酸的敏感浓度为 $1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 是植物中DHPS赖氨酸敏感浓度($10\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的20~100倍(Galili 1995)。玉米、大麦中AK突变体的发现, 使得赖氨酸的反馈抑制浓度显著升高, 并提高了赖氨酸和/或苏氨酸的含量(Muehlbauer等1994; Bright等1982)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) LKR/SDH的T-DNA插入突变体中, 叶片中赖氨酸水平无明显变化, 但成熟种子中赖氨酸含量显著高于野生型亲本对照(Zhu和Galili 2003)

综上, 富含高赖氨酸的优质蛋白玉米(quality protein maize, QPM)的育成和高赖氨酸拟南芥的发现, 使提高植物中赖氨酸含量的研究获得一些进展(Galili和Amir 2013)。但由于大多数植物中缺乏高赖氨酸含量的种质资源以及突变体选育的困难, 还难以在其他植物中开展。

2.3 基因工程提高植物赖氨酸水平

现代生物技术的发展为改良植物营养品质提供了一条有效的途径, 并已取得了许多富有成效的研究成果(Galili等2016)。目前有两种较为有效的基因工程技术策略被用于研究提高植物中赖氨酸水平。

一种策略是将人工合成或者不同物种间的富含赖氨酸的优良蛋白基因在植物中过量表达来提高植物的氨基酸和/或蛋白质含量, 从而改良植物的营养品质。Keeler等(1997)将新合成的富含赖氨酸与甲硫氨酸的蛋白基因成功导入烟草(*Nicotiana tabacum*)中, 转基因烟草种子中的总赖氨酸含量显著提高。通过在水稻植株中过表达富含赖氨酸和苏氨酸的人工合成融合蛋白, 也成功提高了赖氨酸和苏氨酸含量(Jiang等2016)。四棱豆(*Psophocarpus tetragonolobus*) WBLRP蛋白是一种富含赖氨酸的优质蛋白, 在小麦和水稻中表达WBLRP能够显著提高赖氨酸的水平(Meng等2004; Liu等

2016)。类似的策略如马铃薯(*Solanum tuberosum*) sb401、SBgLR, 棉花(*Gossypium* spp.) GhLRP, 水稻组蛋白RLRH1和RLRH2等富含赖氨酸蛋白的表达也能提高水稻和玉米赖氨酸的含量(Yu等2005; Yue等2014; Wong等2015; Liu等2016)。

随着对高等植物中天冬氨酸代谢通路的详细解析, 另一种利用基因工程技术调控赖氨酸的代谢通路, 特异性积累植物中游离赖氨酸含量的策略应运而生。AK和DHPS作为赖氨酸合成途径中最重要的两个限速酶, 因其活性受赖氨酸的反馈抑制, 导致赖氨酸的合成累积受阻, 造成在植物中赖氨酸含量较低。细菌中对赖氨酸反馈抑制不敏感或者低敏感的AK和DHPS突变体的发现, 结合基因工程手段, 在植物中组成型或者特异性表达细菌赖氨酸反馈抑制不敏感或者低敏感的AK和/或DHPS, 使得烟草和马铃薯中游离苏氨酸和游离赖氨酸含量显著增加(Galili和Amir 2013)。但同样的方法并不适用于水稻(Long等2013)。赖氨酸分解代谢关键酶LKR/SDH的分子表征, 突破了水稻、玉米等禾本科作物中游离赖氨酸累积的瓶颈。通过过表达赖氨酸反馈抑制不敏感的赖氨酸合成途径关键基因AK和DHPS, 同时降低或者抑制其分解代谢途径关键酶基因LKR/SDH的表达, 大幅度提高了拟南芥、烟草、玉米、水稻、油菜(*Brassica napus*)、大豆(*Glycine max*)等作物中游离赖氨酸含量(Galili和Amir 2013; Yang等2016)。

3 植物中赖氨酸代谢调控的关联效应

研究认为代谢在生物系统中是规律且复杂的网络, 但往往因为对整个代谢网络调控的忽略, 限制了对代谢调节的理解。现代分子生物学技术虽然在一定程度上提高了植物中赖氨酸含量, 但与其并存的连带效应出现的机制还不是很清楚, 一些与之相应的代谢关联也被报道。在过去的几十年中, 对于作物品质复杂性状的网络一直知之甚少, 改良作物品质性状的推进工作较为缓慢。因此, 作物中代谢网络的深入解析是培育高产优质作物的基础, 将有助于深化人们对作物基因组和代谢组遗传基础的理解, 同时可为利用基因工程进行作物品质改良提供新的信息和方向。

3.1 赖氨酸与其他氨基酸代谢的关联

最早对玉米o2突变体中其他氨基酸的分析结果显示,在突变体成熟种子中,除了赖氨酸含量提高,色氨酸含量也相应提高,但具体的关联机制未涉及(Mertz等1964)。在高等植物中,赖氨酸的生物合成来自于天冬氨酸途径的一个分支,此途径还涉及甲硫氨酸、苏氨酸和异亮氨酸的合成,因此为了维持体内游离氨基酸的稳态,在基因工程调控赖氨酸代谢的同时,也影响了这三种氨基酸的水平(Long等2013; Yang等2016)。调控植物中赖氨酸代谢途径,游离赖氨酸含量增加的同时,其他大部分的游离氨基酸含量也相应增加(Yang等2016)。相应地,甲硫氨酸提高的工程拟南芥中,包括赖氨酸在内的其他氨基酸也有所增加(Galili等2016),说明游离赖氨酸和其他氨基酸的生物合成途径之间存在着很强的正相关关系,即当种子中某种氨基酸水平发生变化时,其他游离氨基酸的含量也会随之升高。这些观察结果表明,游离氨基酸的生物合成过程中存在一个紧密的调控网络(Amir等2018)。

同时,在植物种子中,天冬氨酸可以由谷氨酸或谷氨酰胺通过天冬氨酸氨基转移酶或由天冬酰胺通过天冬酰胺酶产生,且赖氨酸在分解代谢过程中也产生两分子的谷氨酸,因此,在拟南芥*LKR*敲除突变体中表达细菌*DHPS*,其转基因种子中游离赖氨酸含量提高的同时,谷氨酸和天冬氨酸含量显著降低,谷氨酰胺和天冬酰胺水平则意外增加(Zhu和Galili 2003)。同样的调控策略在转基因水稻成熟籽粒中,谷氨酸水平没有变化,天冬氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺水平显著高于野生型亲本对照,再次说明赖氨酸的代谢调控在不同物种中可能有所不同(Long等2013)。此外,研究发现在高赖氨酸水稻成熟种子中,谷氨酸的含量虽然没有显著变化,但与谷氨酸代谢相关的精氨酸、脯氨酸、组氨酸和 γ -氨基丁酸等这些与植物胁迫响应和氮平衡相关的氨基酸均有所提高(杨晴晴2016)。有趣的是,近来我们发现赖氨酸代谢与色氨酸代谢之间存在相应的关联,而色氨酸属于芳香族氨基酸,与赖氨酸代谢途径分别位于代谢主干的两侧。通过进一步的分析显示,高赖氨酸水

稻中赖氨酸代谢与色氨酸代谢通过茉莉酸信号途径等相关的植物胁迫响应介导存在代谢关联(Yang等2018)。以上研究结果均为深入了解植物氨基酸代谢及其相互关联提供了新的认识。

3.2 胚乳赖氨酸累积对淀粉代谢的影响

虽然基因工程技术成功提高了一些植物中赖氨酸含量,但是近来越来越多的研究表明,提高植物中赖氨酸水平会对植物的生长发育或者生理生化特性产生影响。

淀粉作为碳水化合物的重要来源,为人类和动物提供日常所需的能量。但有研究表明,*opaque-2*突变体玉米与野生型亲本相比,虽然赖氨酸含量提高了1.7倍,但成熟种子表现非正常的柔软的粉质胚乳表型(Zhang等2016)。育成的其他优质蛋白玉米(other quality protein maize, OPM) Tx802玉米籽粒中赖氨酸含量提高了约1.5倍,但胚乳牢固而又坚硬,严重影响了其理化品质特性(Betrán等2003)。水稻中过表达*Bip*提高赖氨酸水平的同时,粒重下降,籽粒总淀粉含量减少(Kawakatsu等2010)。这些不良效应的产生无不说明提高植物中赖氨酸含量对其籽粒的品质性状产生了一定的影响。

*Opaque-2*玉米突变体的转录组和蛋白组数据分析显示,*opaque-2*基因的突变在提高赖氨酸含量的同时,更改了大量的淀粉合成基因的表达,产生了较多的水晶状淀粉,进而导致了柔软的淀粉胚乳(Jia等2013)。也有研究表明,种子的硬度与醇溶蛋白的水平有关(Zhang等2016)。另外,Zhang等(2016)发现玉米胚乳特异性转录因子*opaque-2*和PBF(prolamine-box binding factor)网络调控蛋白质和淀粉的合成。Peng等(2014)发现转基因植物种子中蛋白质的积累能够导致淀粉含量显著下降。遗憾的是,高赖氨酸和淀粉特性之间的具体机制和代谢网络尚不清楚。

3.3 赖氨酸累积对产量和种子外观的影响

品质的改良大多数时候也会影响作物的产量(Zeng等2017)。来源于四棱豆的赖氨酸丰富的*LRP*(lysine-rich protein)基因在水稻胚乳中特异性表达,成熟籽粒的千粒重显著降低至15.7 g,野生型亲本对照则为18.6 g(Liu等2016)。类似的产量减少效应也出现在*Bip*过表达水稻中(Kawakatsu等2010)。

油菜中表达棒状杆菌(*Corynebacterium*)对赖氨酸反馈抑制不敏感的*DHPS*, 转基因油菜种子中游离赖氨酸含量提高了100倍以上, 但产油量降低(Falco等1995)。类似的报道还有很多, 但是却鲜有对其产生机制和代谢关联进行研究解析。仅有的相关解释为大豆、油菜等油料作物中的油和蛋白质往往是负相关的, 在蛋白含量增加的同时, 其含油量则下降(Wang等2007)。种子蛋白质、淀粉和油含量等种子性状, 通常与母本植株发育过程中碳-氮平衡、代谢主干和源-库相互作用等功能相关(Shi等2013)。

另一方面, 水稻中过表达细菌*DHPS*导致种子出现形态学差异(Galili和Amir 2013)。皱缩的种子表型也被发现于高游离赖氨酸的转基因大豆中(Falco等1995)。玉米*floury-2*突变体中, 赖氨酸含量与种子粉质胚乳和垩白表型紧密相关(Jia等2013)。类似的成熟种子透明度降低、垩白增加这一连带效应也经常出现在高赖氨酸转基因水稻中(Wong等2015)。研究表明, 这些籽粒垩白表型明显增加的发育胚乳中*Bip* (binding protein)和*PDI* (protein disulfide isomerase)基因均被诱导上调, 说明胚乳中UPR (unfolded protein responses)被诱导(Wong等2015); 超微结构分析表明, 这些转基因水稻中UPR导致了新的或异常蛋白体的形成, 从而产生垩白表型(Wong等2015)。

近来, 我们利用基因工程的手段在水稻中表达细菌*AK*和*DHPS*, 同时降低*LKR/SDH*的表达, 获得高游离赖氨酸转基因水稻(high-free-lysine rice, HFL), 并发现棕褐色的籽粒外观表型(Yang等2016)。但这一表型并未在其他高赖氨酸植物中发现。利用代谢组学和转录组学相结合, 研究深褐色物质的主要成分, 并分析与赖氨酸代谢相关的代谢通路, 结果表明, 赖氨酸及相关代谢物质的积累, 诱导了茉莉酸等相关的植物胁迫响应, 进而诱导了色氨酸脱羧酶基因的高表达, 使得色氨酸代谢物5-羟色胺在种子中大量富集, 从而产生棕褐色的籽粒表型, 说明水稻中赖氨酸的代谢调控与色氨酸的代谢存在相互关联(图1) (Yang等2018)。因此, 天冬氨酸代谢途径衍生的赖氨酸代谢是一个复杂的代谢网络, 在植物中具有多种生理作用。

3.4 赖氨酸代谢与种子萌发的关联

研究发现在拟南芥*lkr*突变体的种子中过表达大肠杆菌*DHPS*基因, 转基因拟南芥种子中游离赖氨酸含量显著提高, 但是种子的萌发减缓, 萌发率降低(Zhu和Galili 2003)。类似的赖氨酸积累对萌发率的影响也出现在高游离赖氨酸大豆和高总赖氨酸水稻中(Falco等1995; Liu等2016)。但在过表达细菌*AK*和*DHPS*基因和减少*LKR/SDH*基因表达所产生的高赖氨酸水稻中并未发现种子萌发的变化, 可能赖氨酸代谢对种子萌发的调控在物种间有所差异(Long等2013; Yang等2016)。

研究者对上述高赖氨酸拟南芥进行代谢物质和转录水平的进一步分析, 发现调控赖氨酸的合成代谢影响了体内三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环相关代谢物质的变化, 进而影响了萌发种子的能量代谢, 这些改变的基因和代谢物是种苗形态建立所必须的, 最终导致了种子萌发减缓, 种子萌发率受影响(图1) (Wang等2018)。此外, 植物的天冬氨酸代谢途径通过多个支路分别合成4种必需氨基酸和甘氨酸, 其中甘氨酸是参与光呼吸的关键中间底物(图1) (Galili等2016)。且已证实天冬氨酸分解代谢途径中的氨基酸在微生物中可参与TCA循环(Kirma等2012)。TCA循环是植物体内重要的能量代谢途径, 作为主要的中间代谢参与多种代谢途径, 是糖类、脂类、氨基酸代谢联系的枢纽, 与赖氨酸调控的其他代谢关联还需进一步挖掘。

3.5 赖氨酸代谢与胁迫响应间的关联

在植物中, 赖氨酸是通过酵母氨酸途径分解代谢的, 其中*LKR/SDH*作为关键酶经过几步酶反应将赖氨酸分解代谢为谷氨酸和乙酰辅酶A (Galili等2016)。在表达细菌对赖氨酸反馈抑制不敏感的*DHPS*转基因烟草中, 赖氨酸含量的过量产生导致了*LKR*酶活性的显著提高, 以此说明赖氨酸分解代谢途径是平衡赖氨酸水平的重要途径, 主要是因为高赖氨酸对植物有一定的毒害性(Falco等1995), 至此, 赖氨酸分解代谢途径和*LKR/SDH*作为与植物胁迫响应相关的研究进入研究者的视线。随后有研究表明, 赖氨酸诱导的*LKR*活性受钙以及酪蛋白激酶2介导的*LKR/SDH*多肽磷酸化

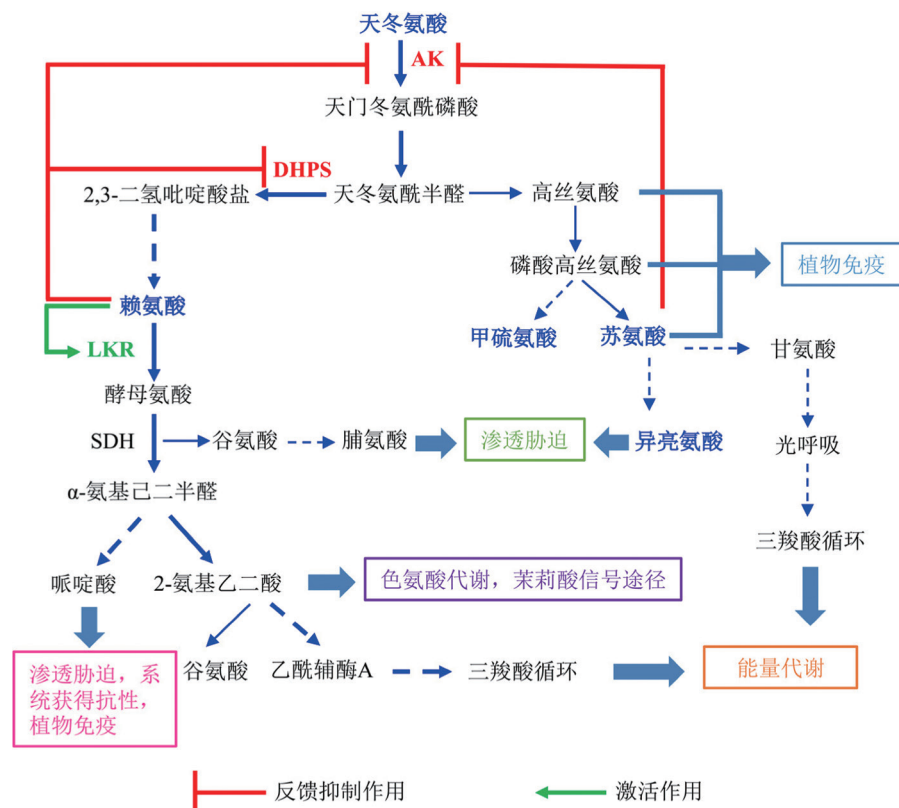


图1 高等植物中赖氨酸调控及相关代谢关联

Fig.1 Lysine metabolism and relative metabolic connections in higher plants

AK: 天冬氨酸激酶; DHPS: 二氢二吡啶酸合酶; LKR: 赖氨酸酮戊二酸还原酶; SDH: 酵母氨酸脱氢酶。

的调控(Galili等2016)。油菜中*LKR/SDH* mRNA水平及其编码的LKR和SDH多肽活性受渗透胁迫的刺激诱导(Moulin等2000)。这些植物胁迫应激表达的原因可能是赖氨酸分解代谢的主要终产物谷氨酸是许多植物应激响应相关代谢物的重要前体(图1)(Moulin等2000)。拟南芥中, ABA、茉莉酸和缺糖处理显著提高了LKR/SDH水平, 而过量糖和缺氮降低了LKR/SDH水平, 因此表明赖氨酸分解代谢途径似乎在胁迫相关和碳-氮代谢中发挥多种功能, 同时也论证了赖氨酸分解代谢与光合相关代谢在调节碳-氮分配方面存在代谢和机制上的联系(Stepansky和Galili 2003)。

另外, 酵母氨酸途径也证明了涉及植物的渗透胁迫响应(Kiyota等2015)。植物在渗透胁迫条件下, *LKR/SDH*表达水平增加, 促进了赖氨酸分解为 α -氨基己二酸, 进而提高了哌啶酸的水平, 哌啶酸

作为一种渗透保护剂参与植物的渗透胁迫响应(图1)(Hartmann和Zeier 2018)。将酵母氨酸途径水解产生的谷氨酸作为底物合成的脯氨酸也是一种渗透保护剂(图1)(Batista-Silva等2019)。事实上在盐胁迫或者渗透处理条件下, 拟南芥幼苗和油菜叶片中哌啶酸和脯氨酸的水平显著增加, 说明酵母氨酸途径参与渗透物质的合成, 从而响应植物的渗透胁迫(Kiyota等2015)。再者, 当组织或细胞承受渗透胁迫时, 酵母氨酸途径中的第三个酶——氨基脂肪半醛脱氢酶(α -amino adipic semialdehyde dehydrogenase, AASADH)显著上调, 表明AASADH也与渗透胁迫响应有关(Brockner等2010)。Kiyota等(2015)研究表明在发育的玉米胚乳中, 酵母氨酸途径能够被添加的外源赖氨酸诱导, 但被盐胁迫抑制, 这与拟南芥及油菜中有所不同。此外, 受盐、渗透和氧化应激胁迫的玉米组织中并未发现

LKR/SDH蛋白的积累, LKR/SDH蛋白仅可在发育中的胚乳中检测到; AASADH蛋白则显著增加, 说明不同于双子叶植物中的哌啶酸, 脯氨酸在发育的玉米种子中对于非生物胁迫的响应起到重要的作用, 进而表明玉米中酵母氨酸途径在种子发育和胁迫响应中的调控与双子叶植物有所不同。Yang等(2018)在高赖氨酸水稻HFL发育及成熟籽粒中发现大量的非生物胁迫相关的代谢物质和基因表达, 同时验证了赖氨酸代谢调控与茉莉酸信号途径、色氨酸代谢相关的代谢关联, 并对低温有所响应。不同于其他植物中的哌啶酸、脯氨酸和AASADH的重要作用, 这三种物质及基因表达在高赖氨酸水稻HFL发育或成熟种子中均未显著变化。

另一方面, 赖氨酸生物合成来源的天冬氨酸途径除生成赖氨酸外, 还有苏氨酸、甲硫氨酸和异亮氨酸的产生, 其中异亮氨酸为支链氨基酸(branched-chain amino acids, BCAAs), 作为渗透调节因子在植物抗逆中起到重要作用, 且与苏氨酸和甲硫氨酸相互依赖(图1) (Batista-Silva等2019)。

此外, 天冬氨酸衍生氨基酸的生物合成途径中涉及的多个氨基酸对植物特定病原菌的抗性有重要影响, 如与同源丝氨酸或苏氨酸积累相关的氨基酸失衡会提高植物对卵菌病原体的免疫力, 对致病真菌或细菌则不会(Zeier 2013)。在拟南芥中, 赖氨酸分解代谢产生一种免疫信号哌啶酸, 这是一种环状的非蛋白氨基酸, 它能增强植物的防御反应, 是植物系统获得性抗性、防御启动和局部抵抗病原菌的关键调控因子(图1) (Hartmann和Zeier 2018)。因此, 天冬氨酸族代谢途径作为生物合成和分解代谢流的结合点, 在调控赖氨酸关键酶的同时影响了其他的代谢通路, 而具体的代谢关联网络还需要科学家们的解密。

4 总结与展望

植物中, 赖氨酸的合成来自于天冬氨酸代谢途径的一个分支, AK和DHPS作为限速酶调控赖氨酸的生物合成, LKR/SDH作为关键酶调控赖氨酸的分解代谢(Galili 2002)。多种遗传学方法已被证明在提高植物赖氨酸含量方面的成效(Wang等2018)。

但在大多数高赖氨酸植物中, 高赖氨酸的性状总是伴随不良的种子特性, 如产量降低、淀粉受影响、种子萌发减缓、籽粒垩白增加及出现棕褐色表型(Wang等2018; Yang等2018)。但某些情况下, 在高赖氨酸植物中只检测到轻微的甚至正常的形态表型(Long等2013; Galili和Amir 2013; Yang等2016)。上述结果表明, 利用代谢工程调控提高植物中游离赖氨酸含量对植株产生的危害, 相对小于其他策略所产生的高赖氨酸植物。因此, 了解赖氨酸代谢及其与其他生物途径的代谢联系尤为重要。

代谢是生物系统中最重要、最复杂的网络之一, 目前对代谢调控的认识中尚缺乏对代谢调控网络模块化运作的研究。因此, 通过植物育种和基因工程生物强化植物营养品质应注意植物代谢网络的潜在干扰(Yu和Tian 2018)。不同的方法可以尝试联合使用, 协同增加赖氨酸的含量。近年来, 转录组学、代谢组学、蛋白组学等的发展, 也为作物代谢网络调控的研究提供了技术支持(阮林伟等2019)。新途径的发现和代谢网络的研究在转基因作物领域显示出巨大的潜力, 有望改善赖氨酸水平和/或营养品质, 而没有非预期或者不良效应的出现。

参考文献(References)

- Amir R, Galili G, Cohen H (2018). The metabolic roles of free amino acids during seed development. *Plant Sci*, 275: 11–18
- Batista-Silva W, Heinemann B, Rugen N, et al (2019). The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. *Plant Cell Environ*, 42: 1630–1644
- Betrán FJ, Bockholt A, Fojt F III, et al (2003). Registration of Tx802. *Crop Sci*, 43: 1891–1892
- Bright SWJ, Mifflin BJ, Rognes SE (1982). Threonine accumulation in the seeds of a barley mutant with an altered aspartate kinase. *Biochem Genet*, 20 (3–4): 229–243
- Brocker C, Lassen N, Estey T, et al (2010). Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 285: 18452–18463
- Falco SC, Guida T, Locke M, et al (1995). Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Nat Biotechnol*, 13: 577–582
- Galili G (1995). Regulation of lysine and threonine synthesis.

- Plant Cell, 7: 899–906
- Galili G (2002). New insights into the regulation and functional significance of lysine metabolism in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 27–43
- Galili G, Amir R (2013). Fortifying plants with the essential amino acids lysine and methionine to improve nutritional quality. *Plant Biotechnol J*, 11: 211–222
- Galili G, Amir R, Fernie AR (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 67: 153–178
- Gao HB, Yu PY, Sun Y, et al (2019). Analysis of carbon metabolism and differential expression of related enzyme genes in castor leaves under Pb and Zn stress. *Plant Physiol J*, 55 (4): 483–492 (in Chinese with English abstract) [高慧兵, 郁培义, 孙宇靖等(2019). 铅胁迫下蓖麻叶糖代谢规律及相关酶基因差异表达分析. *植物生理学报*, 55 (4): 483–492]
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, et al (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, 22: 245–252
- Hartmann M, Zeier J (2018). L-lysine metabolism to *N*-hydroxy-pipecolic acid: an integral immune-activating pathway in plants. *Plant J*, 96: 5–21
- Jia M, Wu H, Clay KL, et al (2013). Identification and characterization of lysine-rich proteins and starch biosynthesis genes in the *opaque2* mutant by transcriptional and proteomic analysis. *BMC Plant Biol*, 13: 60
- Jiang SY, Ma A, Xie L, et al (2016). Improving protein content and quality by over-expressing artificially synthetic fusion proteins with high lysine and threonine constituent in rice plants. *Sci Rep*, 6: 34427
- Kawakatsu T, Wang S, Wakasa Y, et al (2010). Increased lysine content in rice grains by over-accumulation of BiP in the endosperm. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74 (12): 2529–2531
- Keeler SJ, Maloney CL, Webber PY, et al (1997). Expression of *de novo* high-lysine α -helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*, 34: 15–29
- Kirma M, Araújo WL, Fernie AR, et al (2012). The multifaceted role of aspartate-family amino acids in plant metabolism. *J Exp Bot*, 63 (14): 4995–5001
- Kiyota E, Pena IA, Arruda P (2015). The saccharopine pathway in seed development and stress response of maize. *Plant Cell Environ*, 38: 2450–2461
- Liu C, Li S, Yue J, et al (2015). Microtubule-associated protein SBGLR facilitates storage protein deposition and its expression leads to lysine content increase in transgenic maize endosperm. *Int J Mol Sci*, 16 (12): 29772–29786
- Liu X, Zhang C, Wang X, et al (2016). Development of high-lysine rice via endosperm-specific expression of a foreign *LYSINE RICH PROTEIN* gene. *BMC Plant Biol*, 16: 147
- Long XH, Liu QQ, Chan ML, et al (2013). Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine. *Plant Biotechnol J*, 11: 490–501
- Meng CM, Chen XQ, Liang RQ, et al (2004). Expression of lysine-rich protein gene and analysis of lysine content in transgenic wheat. *Chin Sci Bull*, 49 (19): 2053–2057
- Mertz ET, Bates LS, Nelson OE (1964). Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, 3629 (145): 279–280
- Mofokeng AM, Shimelis H, Laing M (2017). Breeding strategies to improve sorghum quality. *Aust J Crop Sci*, 11 (2): 142–148
- Moulin M, Deleu C, Larher F, et al (2006). The lysine-ketoglutarate reductase–saccharopine dehydrogenase is involved in the osmo-induced synthesis of pipecolic acid in rapeseed leaf tissues. *Plant Physiol Bioch*, 44: 474–482
- Muehlbauer GJ, Gengenbach BG, Somers DA, et al (1994). Genetic and amino-acid analysis of two maize threonine-overproducing, lysine-insensitive aspartate kinase mutants. *Theor Appl Genet*, 89 (6): 767–774
- Peng B, Kong HL, Li YB, et al (2014). *OsAAP6* functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice. *Nat Commun*, 5: 4847
- Ruan LW, Fu Y, Wang MH, et al (2019). Investigation on the function and possible mechanism of light signal in anther development based on transcriptome and protein interaction network analyses. *Plant Physiol J*, 55 (2): 159–168 (in Chinese with English abstract) [阮林伟, 付营, 王梦涵等 (2019). 基于转录组和蛋白互作网络分析光信号在花药发育过程中的功能和可能机制. *植物生理学报*, 55 (2): 159–168]
- Saito K, Matsuda F (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 463–489
- Sarika K, Hossain F, Muthusamy V, et al (2017). Exploration of novel *opaque16* mutation as a source for high lysine and tryptophan in maize endosperm. *Ind J Genet*, 77 (1): 59–64
- Shi W, Muthurajan R, Rahman H, et al (2013). Source–sink dynamics and proteomic reprogramming under elevated night temperature and their impact on rice yield and grain quality. *New Phytol*, 197 (3): 825–837
- Stepansky A, Galili G (2003). Synthesis of the *Arabidopsis* bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress-associated signals.

- Plant Physiol, 3 (133): 1407–1415
- Tang G, Miron D, Zhu-Shimoni JX, et al (1997). Regulation of lysine catabolism through lysine–ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase in *Arabidopsis*. Plant Cell, 9: 1305–1316
- Vauterin M, Frankard V, Jacobs M (1998). The *Arabidopsis thaliana dhds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. Plant Mol Biol, 39: 695–708
- Wang HW, Zhang B, Hao YJ, et al (2007). The soybean Dof-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. Plant J, 52 (4): 716–729
- Wang W, Xu M, Wang G, et al (2018). New insights into the metabolism of aspartate-family amino acids in plant seeds. Plant Reprod, 31 (3): 203–211
- Wenefrida I, Utomo HS, Linscombe SD (2013). Mutational breeding and genetic engineering in the development of high grain protein content. J Agric Food Chem, 61 (48): 11702–11710
- Wong HW, Liu Q, Sun SSM (2015). Biofortification of rice with lysine using endogenous histones. Plant Mol Biol, 87 (3): 235–248
- Yang QQ (2016). Nutritional assessment and metabolic connection analysis of transgenic rice with high free lysine (dissertation). Yangzhou: Yangzhou University (in Chinese with English abstract) [杨晴晴(2016). 高赖氨酸转基因水稻的营养评价及代谢关联研究(学位论文). 扬州: 扬州大学]
- Yang QQ, Zhang CQ, Chan ML, et al (2016). Biofortification of rice with the essential amino acid lysine: molecular characterization, nutritional evaluation, and field performance. J Exp Bot, 67 (14): 4285–4296
- Yang QQ, Zhao DS, Zhang CQ, et al (2018). A Connection between lysine and serotonin metabolism in rice endosperm. Plant Physiol, 176: 1965–1980
- Yu J, Peng P, Zhang X, et al (2005). Seed-specific expression of the lysine-rich protein gene *sb401* significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. Food Nutr Bull, 26 (4): 427–431
- Yu S, Tian L (2018). Breeding major cereal grains through the lens of nutrition sensitivity. Mol Plant, 11 (1): 23–30
- Yue J, Li C, Zhao Q, et al (2014). Seed-specific expression of a lysine-rich protein gene, *GhLRP*, from cotton significantly increases the lysine content in maize seeds. Int J Mol Sci, 15 (4): 5350–5365
- Zeier J (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. Plant Cell Environ, 36: 2085–2103
- Zeng D, Tian Z, Rao Y, et al (2017). Rational design of high-yield and superior-quality rice. Nat Plants, 3: 17031
- Zhang Z, Zheng X, Yang J, et al (2016). Maize endosperm-specific transcription factors O2 and PBF network the regulation of protein and starch synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 113 (39): 10842–10847
- Zhu X, Galili G (2003). Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in *Arabidopsis* seeds. Plant Cell, 15 (4): 845–853

Advances in regulation and connection of lysine metabolism in higher plants

YANG Qing-Qing, WU Hong-Yu, CHEN Si-Yu, ZHANG Tao, LIU Qiao-Quan*

Agricultural College of Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding, Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Co-innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: As the first restrictive essential amino acid in cereals, lysine affects the nutritional and health level of human and animals. Therefore, improving the lysine content in plants has always been the aim of scientists. Lysine metabolism pathway has been very clear in higher plants, however, its metabolic connections are poorly understood. In this review, we introduce the progress on regulation of lysine metabolism and strategies for increasing lysine level in higher plants, especial in cereals, and analyze the effects of lysine accumulation on other amino acids, starch quality, yield, grain appearance, seed germination and stress response. In addition, the metabolic correlations related to lysine regulation were comprehensively summarized and elaborated. All these would help clarify ideas for study on lysine metabolism regulation, and provide references for improving nutritional quality without adverse effects in plants.

Key words: lysine; nutritional quality; regulation of metabolism; metabolic connection

Received 2019-06-05 Accepted 2019-09-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31801322 and 31471459), Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2016ZX08001006), and the Government of Jiangsu Province (BE2018357).

*Corresponding author (qqliu@yzu.edu.cn).