

啤酒酵母中海藻糖合成酶和海藻糖-6-磷酸合成酶的功能及结构分析

郭永豪¹,孙连海¹,余华顺²,马向东¹

(1.河南农业大学生物技术与食品科学学院,河南 郑州 450002 2.安琪酵母股份有限公司,湖北 宜昌 443003)

摘要: 啤酒酵母的海藻糖合成酶复合物由4个亚基(TPS1,TPS2,TPS3和TSL1)组成,这4个亚基具有协同作用。其中海藻糖-6-磷酸合成酶是海藻糖合成酶的功能中心,TPS1除了具有合成海藻糖的功能之外,还具有调节糖代谢和促进酵母孢子形成的功能。*tps1*大量表达时,有助于细胞增加对高温、高渗和酒精等的耐受性。

关键词: 啤酒酵母;海藻糖合成酶;海藻糖-6-磷酸合成酶;结构;功能

中图分类号:TS261.1;Q55;TS262.5 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)06-0040-04

Analysis of Structure & Functions of Trehalose Synthetase & Trehalose-6-phosphosynthetase in Beer Yeast

GUO Yong-hao¹, SUN Lian-hai¹, YU Hua-shun² and MA Xiang-dong¹

(1.Biotechs & Food Science College of He'nan Agriculture University, Zhengzhou, He'nan 450002; 2.Angel Yeast Co. Ltd., Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: Trehalose synthetase in beer yeast was composed of four subunits including TPS1, TPS2, TPS3 and TSL4 with synergetic effects. Trehalose-6-phosphosynthetase was the function center of trehalose synthetase. Except the function of trehalose synthesis, TPS1 also had the functions of adjusting sugar metabolism and advancing the formation of yeast spore. The overexpression of *tps1* was helpful for improving heat-resistance, alcohol-resistance and permeation-resistance of cells. (Tran. by YUE Yang)

Key words: beer yeast; trehalose synthetase; trehalose-6-phosphosynthetase; structure; function

海藻糖是啤酒酵母的一种重要抗逆因子,目前国内许多研究机构都在研究啤酒酵母中编码海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)的*tps1*基因,并利用这个基因来构建不同的转基因植物。目前,国内对TPS1在酵母体内的功能及作用机理研究很少,国外不少的文献对此做出了许多解释,现将其研究进展报告如下。

1 TPS1与海藻糖合成酶的其他亚基

1.1 海藻糖合成酶

在啤酒酵母*S.cerevisiae*中,海藻糖是由海藻糖合成酶复合物合成的,这个酶包含4个亚基,分别为TPS1,TPS2,TPS3和TSL1,它们分别由不同的基因编码。其中*tps1*编码分子量为56KD的蛋白亚基,具有海藻糖-6-磷酸合成酶的活性,*tps2*基因编码分子量为100Kd的蛋

白亚基,具有海藻糖-6-磷酸磷酸酶(TPP)的活性,*tsl1*基因编码是最大的调节亚基(123KD),*tps3*和*tsl1*是同源基因^[1,2]。

啤酒酵母*S.cerevisiae*中的海藻糖合成酶和大肠杆菌的海藻糖合成酶是不一样的,大肠杆菌的这两个酶分别存在于由*otsA*(承担TPS1的活性)和*otsB*(承担TPP的活性)编码的酶中。其中TPS1与OTSA有54%的相关性,并有34%的氨基酸完全相同^[3]。*tps1*是大肠杆菌*otsA*的同源基因,TPS2只和*otsB*产物的羧基端具有同源性,TPS2的羧基端负责TPS2的TPP活性。

若以TPS1的全部495个氨基酸为基础,那么4个亚基的同源性超过了35%,可是却只有TPS1具有海藻糖-6-磷酸酶的活性。4个亚基的保守序列在它们形成

收稿日期:2004-12-23

作者简介:郭永豪(1974-),男,硕士研究生,研究方向:分子生物学。

复合物时具有一定的相互作用, TPS3 和 TSL1 具有稳定海藻糖合成酶复合物结构的功能, 并且可能还有调控合成酶活性的功能^[4]。海藻糖合成酶复合物的实际结构还不太清楚, 因为它的估计分子量(600~800 KD)超过了所有已知亚基的分子量总和, 可以推测在海藻糖合成酶中有的亚基可能是以两个或两个以上拷贝出现的^[1]。

1.2 TPS1 的二级结构

TPS1 共有 495 个氨基酸, 通过 Predictprotein 分析表明, 其二级结构中没有 β 转角, 只有 α 螺旋和 β 折叠, 从其 330 位开始的 SRGD 4 个氨基酸序列为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; 从 331 位开始的 RGDVEEYQY 序列为酪氨酸激酶磷酸化位点^[5]。这些很可能是调节酶活性的重要位点。与大肠杆菌(*E. coli*)的 OTSA 相比, 二者具有 34% 的同源性。4 个完全相同的 OTSA 链构成了大肠杆菌的海藻糖-6-磷酸合成酶, 对 OTSA 的三维结构分析表明 4 条 OTSA 链在酶复合物的中心构成了一个表面开口的中空结构^[6]; 而这也正是一般酶的活性中心的空间构象。进一步分析表明 4 条 OTSA 链的 299-311 位的氨基酸都参与了这一构象的形成。用 Vector NTI 进行蛋白序列比对分析, 啤酒酵母的 TPS1 与大肠杆菌的 OTSA 在这一位点具有很高的同源性, TPS1 的 330-341 位的氨基酸与 OTSA 的 299-311 位氨基酸相比, 有 9 个是完全相同的, 这提示我们, 啤酒酵母 TPS1 的这一位点可能是其活性中心。

1.3 TPS1 与其他亚基的关系

在海藻糖合成酶复合物的 4 个亚基中, TPS1 具有其他亚基不可替代的作用。TPS2 和 TPS1 共同催化合成海藻糖, TSL1 和 TPS3 调控海藻糖合成酶的活性。

当 TPS1 缺失时, 细胞内检测不到海藻糖; 在 TPS1 存在, TPS2, TPS3 和 TSL1 3 个亚基都缺失的菌株中, 依然可以检测到海藻糖合成酶的活性, 但是, 其合成海藻糖的能力会大大下降, 说明单独的 TPS1 具有较低的合成海藻糖的能力。研究表明, 单独敲除 *tps3* 或者是 *tsl1* 对 TPS2 和 TPS1 的活性影响很小, 但是同时敲除二者则会大大降低 TPS2 和 TPS1 的活性; 如果 *tps1* 不存在, 无论 *tsl1* 和 *tps3* 是否存在, 都会大大削弱 TPS2 的活性; 若敲除 *tps2*, 则酵母细胞内会积累高含量的海藻糖-6-磷酸。在啤酒酵母中, 存在非 *tps2* 编码的磷酸酶的活性, 同样可以催化海藻糖-6-磷酸转变为海藻糖, 因为当只有 *tps1* 存在时, 细胞内依然可以积累一定量的海藻糖。当敲除 *tsl1* 和 *tps3* 以后, 在胞内会检测到比野生型含量更高的游离 *tps1*, 再一次说明了 *tsl1* 和 *tps3* 具有稳定海藻糖合成酶复合物结构的功能^[1]。

2 海藻糖及海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS1)在细胞内的

功能

2.1 TPS1 对于糖代谢的影响

TPS1 除了以结合的方式存在以外, 酵母细胞内还有游离的 TPS1。TPS1 的双重定位会带来双重的功能, 海藻糖合成酶中的 TPS1 与海藻糖合成有关, 而游离的 TPS1 具有控制葡萄糖流向糖酵解的功能, 即通过与己糖激酶相互作用来控制^[1]。葡萄糖进入细胞以后, 首先经己糖激酶催化, 生成 6-磷酸葡萄糖。这一步既是合成肝糖和海藻糖的必经途径, 也是己糖进入糖酵解的必经途径(图 1)。当细胞缺少 TPS1 时, 己糖激酶的活性会过量表达, 磷酸化的己糖将大量积累, 这将会导致细胞的最终死亡。*tps1* 的催化产物海藻糖-6-磷酸是己糖激酶的抑制子, 当 TPS1 存在时, 会合成海藻糖-6-磷酸, 从而抑制己糖激酶的活性, 阻止葡萄糖过量流向糖酵解, 最终恢复酵母细胞的活性^[7]。

除了对糖酵解的影响以外, TPS1 还对肝糖的代谢具有重要的影响。其机制如下: 磷酸化的肝糖合成酶需要 6-磷酸葡萄糖(G6P)来充分表达其活性, G6P 的合成需要己糖激酶, 而海藻糖-6-P 则抑制己糖激酶的活性, 海藻糖-6-磷酸又是 TPS 反应活动的产物, 并且 G6P 还是合成海藻糖的底物; 此外, TPS 和肝糖合成酶还共同竞争一个底物: UDPG^[7](图 1)。所以大量表达 TPS1 就会减少细胞内肝糖的合成和积累。

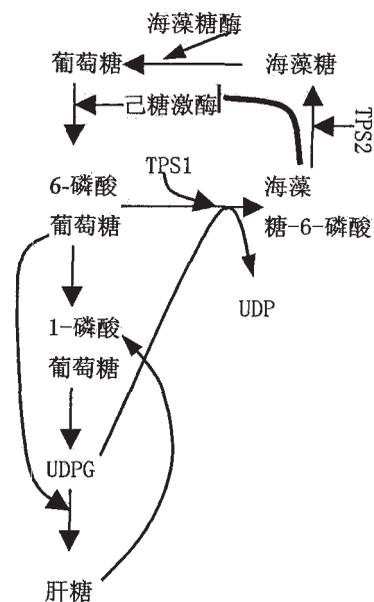


图 1 海藻糖和肝糖的代谢途径

2.2 TPS1 与酵母形成孢子的关系

TPS1 与啤酒酵母细胞孢子产生之间具有紧密的关系, 大量表达 *tps1* 可以提高酵母细胞孢子形成的频率。

IME1 是一个很重要的减数分裂的诱导物, *ime1* 基因诱导表达的 IME2 和其他的一些基因产物都是野生

型菌株高频率形成孢子所必需的。*tps1* 基因的缺失, 可以导致 *ime1* 表达量的减少, 同时也相应减少了由 IME1 诱导的其他基因产物。Mihiri N. De Silva Udawatta 和 John F. Cannon 曾利用构建的隐性 *tps1* 二倍体和 IME2-Lac 融合蛋白 (IME1 可以诱导 *ime2* 的表达) 来研究 *ime1* 与 *tps1* 在酵母产生孢子方面的相互影响^[7]。结果表明, 当将携带 *ime2-lac* 基因的质粒转化进隐性 *tps1* 二倍体中后, IME2 的出现时间与野生型相比大大延迟, 而且表达量也低了 3 倍。通过 Northern 杂交分析表明, 隐性 *tps1* 二倍体中的 *ime1* mRNA 水平非常低, 而 *ime2* mRNA 则根本检测不到; 那么可以推定 *ime2* 的表达需要一定起始浓度的 IME1 来诱导, 在隐性 *tps1* 二倍体中根本未达到 *ime2* 表达要求的 IME1 起始浓度。同样他们还发现, 高拷贝的 *ime1* 可以加倍的增加酵母细胞的孢子形成量, 也就是说, 由于 TPS1 活性降低会导致孢子量下降, 增加 *ime1* 的拷贝数可以弥补这一下降。

2.3 海藻糖与酵母的抗逆性

由于 *tps1* 编码海藻糖-6-磷酸合成酶, 所以 *tps1* 的敲除, 将会直接导致细胞体内海藻糖含量的下降。海藻糖是酵母体内一个重要的抗逆因子, 它对细胞抵抗高渗、高温、酒精等产生的胁迫压力至关重要。

研究表明, 在极度压力的条件下, 处于稳定期的啤酒酵母细胞比处于对数生长期的细胞存活率要高得多, 而海藻糖恰是在稳定期内开始积累的, 在高渗和高温条件下, 敲除 *tps1* 的菌株比野生型的菌株更敏感, 死亡率更高^[8,9]。乙醇是酵母发酵的重要产物, 当乙醇在培养基中积累到一定程度时, 会对细胞膜产生伤害, 从而导致细胞死亡。当用乙醇冲击酵母时, Mansure JJ 等发现细胞内的高含量海藻糖可以抑制由乙醇引起的内含物泄漏, 并提高酵母细胞在 10% (v/v) 乙醇培养基上的存活率^[10]。

2.4 酵母海藻糖作为抗逆因子的作用原理

人们提出了几种假说来解释海藻糖的抗逆机理: 包括可以解释抗高渗机理的“水代替学说”和“玻璃态学说”, 以及解释抗冷冻干燥胁迫压力的“优先排阻学说”等^[11]。在这几种假说的基础之上, 许多人又在分子水平上研究了啤酒酵母抗高温的作用机理。有人提出海藻糖可能会具有分子伴侣的功能, 或者是协助分子伴侣折叠蛋白; 但是没有直接的证据来证明这一观点。2000 年, Mari Simola, Anna-Liisa Hanninen 等明确提出并证明了海藻糖的抗高温功能在于其协助分子伴侣 Hsp104 重新折叠由于热激而导致的变性蛋白。它具有维持蛋白现状的功能, 可以阻止蛋白继续降解, 从而等待分子伴侣的结合, 重新折叠蛋白^[12]。

2.5 有关嗜高温酵母中 TPS1 的表达与细胞抗逆性的关系

国内有人研究了能够高水平表达海藻糖且同时耐高温的啤酒酵母, 并可克隆出其 *tps1* 基因, 与国外报道的序列相比, 具有 99.6% 的同源性^[13]。Anke Reindersdeng 等曾经研究过嗜热多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 在高温情况下的适应情况^[14]。发现在 40℃ 培养多形汉逊酵母时, 体内的海藻糖并没有明显升高, 说明此时细胞对高温的耐受性与海藻糖无关。当培养温度从 27℃ 升至 47℃ 时, 多形汉逊酵母 *tps1* 的 mRNA 的表达量, TPS1 蛋白表达量, 海藻糖的合成量均达到了最高水平 (一般酵母的这几个高峰值在热激温度为 40℃ 时出现)。并且它们的研究也表明, 在 56.5℃ 热激 1 h 的情况下, $\Delta tps1$ 菌株比野生型菌株的死亡率高出了 1000 倍。我们现在也在研究一株耐高温的啤酒酵母, 其致死温度为 68℃。根据我们已经做的不同热激温度 (35~45℃) 的蛋白 SDS-PAGE 图谱来看, 与对照组相比, 实验组没有明显的变化。这可能是因为高温菌株在相对较低的热激温度处理下 *tps1* 并没有显著增加表达量, 也间接说明了 TPS1 具有较强的抗热激活能力。我们已经克隆出这个菌株的 *tps1* 基因, 经测序分析以后, 发现与 Genbank 报告的 *tps1* 基因序列共有 13 处不同, 蛋白序列分析表明, 有 3 个位置的氨基酸发生了改变。

3 研究展望

海藻糖在酵母中作为抗逆因子的角色一度曾受到怀疑^[15], 但现在正被越来越多的人所接受。研究海藻糖功能的方法主要集中于构建海藻糖合成酶复合物各个亚基的各种缺陷型组合, 虽然这种方法具有直观快捷的优点, 但是由于不能很好地去除其他抗逆因子的影响, 所以得到的结果总是带有某种缺陷。也有人构建重组体, 或者在各种缺陷型菌株中引入携带目的基因的表达质粒, 并将其置于某种可诱导的启动子之下, 来研究其表达和相关的功能。作为一个抗逆基因 *tps1* 正在被国内许多的实验室从啤酒酵母中克隆出来, 然后构建各种携带 *tps1* 的转基因植物; 在国外, 对海藻糖抗逆机理的研究也正方兴未艾。相信随着酵母蛋白质组学的发展, TPS1 的作用机理一定会清晰地展现在人们面前, 我们也希望这篇文章能给从事海藻糖研究的人员以帮助。

参考文献:

- [1] Bell W, Sun W, Hohmann S, et al. Composition and Functional Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Trehalose Synthase Complex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 33311-33319.
- [2] 戴秀玉, 程苹, 周坚, 等. 海藻糖的生理功能分子生物学研究

