

高等植物体内 γ -氨基丁酸代谢的酶学研究进展(综述)

穆小民 沈黎明 吴显荣

(北京农业大学生物学院,北京 100094)

摘要: 本文对高等植物体内 γ -氨基丁酸代谢的酶学研究进展,特别是参与酶谷氨酸脱羧酶、 γ -氨基丁酸转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶的分布、分离提纯和酶的性质进行了较为全面的综述。

关键词: γ -氨基丁酸; 谷氨酸脱羧酶; γ -氨基丁酸转氨酶; 琥珀酸半醛脱氢酶

中图分类号: Q946.5

γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric Acid,简称GABA或4-AB)是一种独特的非蛋白质氨基酸,它除了在脊椎动物中枢神经系统作为抑制性神经递质而起重要作用外,在高等植物中也广泛分布,在许多植物组织中,GABA以高浓度($0.03\sim 32.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 鲜重)存在,常超过许多蛋白质氨基酸^[1,2]。人们对于GABA的研究,过去主要集中在脊椎动物。近几年发现GABA与植物在逆境条件下的应激反应有关^[2~5]。对高等植物GABA代谢的酶学进行的大量研究,期揭示了GABA在高等植物体内的代谢过程、调控机制及其在高等植物体内的生理作用。

1 生物合成

在高等植物体内,GABA合成的主要途径是L-谷氨酸的脱羧反应,该反应由L-谷氨酸脱羧酶(L-Glutamate Decarboxylase,EC 4.1.1.15,简称GDC或GAD)催化,已证明在发芽种子中L[U-¹⁴C]谷氨酸转变成[U-¹⁴C]GABA,以及大多数植物中存在谷氨酸脱羧酶^[6,7]。

在一些情况下,GABA可由鸟氨酸和丁二氨转化而来,但这些物质都是由谷氨酸生成的,所以说谷氨酸是GABA的唯一来源^[8]。

2 谷氨酸脱羧酶

1937年,Okunuki从多种植物的干粉中发现了这种使谷氨酸脱羧的酶,但他未能用甘油(60%)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0和8.0)和氯化钠溶液提取出这种酶,他认为该酶结合在细胞结构上^[9]。1946年,Schales等证明用水溶液可容易地从30多种植物组织中抽提到GDC,用透析的方法证明该酶是磷酸吡哆醛和蛋白质的复合物。接着,他们用从胡萝卜中提取的GDC粗酶液进行了一些性质和动力学特性的初步研究,表明胡萝卜的GDC的最适pH值为5.0~5.9,氰化物对该酶有抑制作用^[9]。1951年,Beevers提取了大麦的谷氨酸脱羧酶,测定了 K_m 值为 $9.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,酶的最适pH值与胡萝卜的类似。该作者还用丙酮和硫酸铵对粗酶进行了沉淀,丙酮可使该酶沉淀,但干燥并溶于缓冲液后,酶活力大为弱化。硫酸铵是最为有效的沉淀剂,而硫酸铵沉淀不影响酶的活性。羟胺、氨基脲和氰化物为该酶的抑制剂^[11]。

收稿日期: 1995-03-06

1971年,Smith等用硫酸铵重复处理的方法将向日葵子叶谷氨酸脱羧酶蛋白和辅基分开,使酶活力弱化40%~50%^[12]。

1975年,Inatomi等研究了大麦胚和根的谷氨酸脱羧酶,胚的酶对谷氨酸的 K_m 值为22 mmol·L⁻¹,加入磷酸吡哆可增强酶活性3.5倍。蔗糖密度梯度表明,存在两种形式的酶,分子量分别为256 000和120 000,低分子量的酶活性较弱,在贮存期间,低分子量的酶不断接合到高分子量的酶上,根的谷氨酸脱羧酶分子量为310 000,对谷氨酸的 K_m 值为3.1 mmol·L⁻¹^[13]。

1989年,Satya Narayan等用亲和层析的方法纯化了马铃薯的谷氨酸脱羧酶,该酶为两个相同的亚基组成的二聚体,亚基分子量43 000,天然酶分子量91 000。每摩尔酶蛋白合有两摩尔的磷酸吡哆醛,磷酸吡哆醛可通过长时间的透析或凝胶过滤除去。该酶在370 nm处有最大吸光度,在磷酸盐液中的最适pH值为5.8,反应的最适温度为37℃,等电聚焦测定其等电点为4.7,对谷氨酸的 K_m 值为5.6 mmol·L⁻¹,对磷酸吡哆醛的 K_m 值为2 μmol·L⁻¹^[14](附表)。

附表 不同来源的谷氨酸脱羧酶性质比较^[14,15]

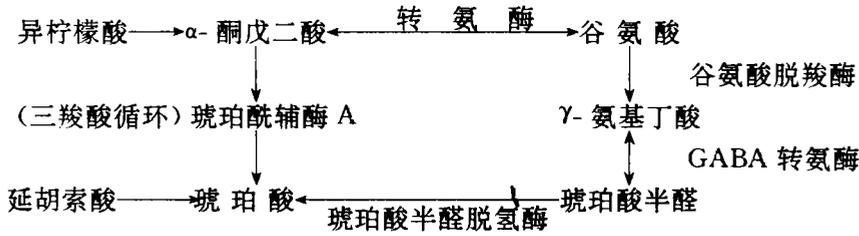
Table Comparison of Glutamate decarboxylase from various sources

来源 Source	分子量 Molecular weight		辅基数 Residues of cofactor	最适pH值 pH optimum	对L-谷氨酸 的 K_m 值 (mmol·L ⁻¹) K_m L-glutamate	对磷酸吡哆醛 的 K_m 值 (μmol·L ⁻¹) Apparent K_{pxyp}	pI
	天然 Native	亚基 Subunit					
	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	300 000					
产气荚膜芽孢菌 <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	290 000		2	4.5		4.5	
人 Human	140 000	67 000		6.8	1.28	0.13	
麦角菌 <i>Claviceps purpurea</i>				5.3	17.4		
鼠脑 Mouse brain	85 000	44 000	2	7.0	0.7	0.05	
大麦胚(酶1) Barley embryo	260 000			6.2	22.0		
大麦根 Barley roots	310 000			6.2	3.1		
向日葵子叶 Sunflower cotyledons				5.7	9.1		
马铃薯块茎 Potato tuber	91 000	43 000	2	5.8	5.6	2.0	4.7

谷氨酸脱羧酶在种子发芽中有重要作用,干燥小麦籽粒在加水后,谷氨酸脱羧酶是最先活化的酶之一^[16]。Lamkin等的研究表明,谷氨酸脱羧酶活力和种子发芽率高度相关($r=0.916$),其活力可作为预测种子发芽率的重要指标^[17],Steiner等比较了40~50种种子活力检验方法,结果表明谷氨酸脱羧酶活力是预测出苗率的三个最有效的指标之一^[17]。Ram的研究表明,谷氨酸脱羧酶的活力可作为小麦田间长势的指标^[18]。

3 分解代谢

在细菌和哺乳动物大脑中,GABA首先在GABA转氨酶(γ -Aminobutyrate transaminase)的催化下,和 α -酮戊二酸发生转氨作用,形成琥珀酸半醛(SSA)和谷氨酸,然后SSA在琥珀酸半醛脱氢酶(succinate semialdehyde dehydrogenase,简称SSADH)氧化形成琥珀酸进入三羧酸循环,这些反应和GDC催化的谷氨酸脱羧反应一起,构成了 α -酮戊二酸氧化成琥珀酸的另一条支路,称之为GABA支路^[8]。



一些动物和昆虫的 GABA 转氨酶已经纯化,对其特性已进行了研究,SSADH 在大脑中的存在也已证明^[15,19]。Naylor 和 Tolbert 在理论上首先推测高等植物中存在 GABA 支路。1961 年,由 Dixon 和 Fowdan 发现豌豆和花生叶片线粒体引入[U-¹⁴C]GABA 温育后,标记物很快进入三羧酸循环的中间体和有关的氨基酸,引入的¹⁴C 半数在 10 h 后以呼吸产物 CO₂ 的形式释放出来。此后陆续报道 GABA 支路存在于烟草培养细胞,马铃薯块茎,西红柿和西葫芦幼苗等许多植物,但 GABA 支路中三种酶的存在仅在萝卜叶、小麦胚芽和马铃薯块茎中得到证实^[8,20]。

4 γ -氨基丁酸转氨酶

GABA 分解代谢的第一步是在 γ -氨基丁酸转氨酶的催化下和 α -酮戊二酸转氨形成 SSA。关于植物 GABA 转氨酶分布的研究较少,且相互间有矛盾。Robert 等采用通常测定鼠脑中 GABA 转氨酶的方法,对已知有很高 GDC 活力的鳄梨和辣椒中没有检测到酶活力。Miettinen 等首先证明有良好根瘤的豌豆根具有 GABA 转氨酶的活力,但他们也报道鳄梨和辣椒中缺乏这种酶的活力。Suzuki 等证明用马铃薯块茎制备物由 GABA 和 α -酮戊二酸产生了谷氨酸,但以后的研究工作者根据实验条件(37℃, 24 h),认为肯定发生了微生物污染,而且生成谷氨酸的量仅为 1%。Dixon 等发现,有良好根瘤的豌豆有相当高的 GABA 转氨酶活力,无根瘤的豌豆则没有,表明这种酶的来源与根瘤有关。Streeter 等应用一种较敏感的 GABA 转氨酶放射性检验方法,证明在萝卜中存在这种酶,Wallace 等进一步扩展了这项工作,在大豆、西红柿、苜蓿、豇豆、大麦和金狗尾草叶中显示了良好的转氨酶活力。而 Setya Narayan 等证明在马铃薯块茎中也存在这种酶^[20]。

GABA 转氨酶和 SSADH 在植物体内分布于胞浆和线粒体,在这两个部位含量的比率为 3:1。目前还没有一种高等植物的 GABA 转氨酶被纯化,其最适 pH 值范围为 8.6~9.0,为磷酸吡哆醛依赖型^[20]。

不同来源的 GABA 转氨酶对底物的特异性不同,细菌、酵母和高等植物的 GABA 转氨酶只能以 GABA 为底物, β -丙氨酸不能作为底物。而放线菌、真菌和哺乳动物的 GABA 转氨酶也可以 β -丙氨酸为底物。微生物和哺乳动物的 GABA 转氨酶可转氨基到 δ -氨基戊酸、 β -氨基异丁酸和鸟氨酸,但效率较低。细菌、酵母、真菌和哺乳动物的 GABA 转氨酶,只能以 α -酮戊二酸做为氨基受体,丙酮酸不能替换。植物的 GABA 转氨酶可以以丙酮酸做为氨基受体,而且以丙酮酸为氨基受体时,酶的典型的活力比(丙酮酸/ α -酮戊二酸):豌豆幼苗为 5,萝卜叶为 19,大豆叶为 10,马铃薯块茎为 1.7。但 kretoovich 等报道大豆 GABA 转氨酶对 α -酮戊二酸活力高,对丙酮酸的活力极低^[8,20]。

5 琥珀酸半醛脱氢酶

GABA 支路的最后一步反应,是由琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)催化,以 NAD 为辅酶,

SSA 不可逆地被氧化成琥珀酸,这样把 GABA 支路和三羧酶循环联系起来。SSA 的还原依赖 NAD^+ ,已由萝卜子叶、小麦胚、大麦种子和马铃薯块茎粗提液所证明。最近从大麦种子中获得了 SSADH 的均一制备物,纯化植物 SSADH 的一些特性大致和哺乳动物的相似,分子量为 $140\,000\sim 220\,000$,最适 pH 值为 $9.0\sim 10.0$,保持其最高活性需加入硫醇,它对底物的特异性很高,对 SSA 的 K_m 值为 $5\sim 10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,可被重金属离子抑制,马铃薯块茎的 SSADH 具有一个很高的特异性活力 ($6.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$),其特性已详细研究,该酶在焦磷酸钠缓冲液 (pH 9.0) 中活力最高,对 SSA 的 K_m 值为 $4.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,底物浓度大于 $120\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,酶活性则受到抑制。在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 中酶活性仅为焦磷酸钠缓冲液中的 $1/5$, K_m 值也升高,对 SSA 的 K_m 值为 $130\ \mu\text{mol}$,可被超过 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SSA 所抑制。这个结果同鼠大脑在 Tris 和高浓度的底物抑制该酶活性的研究结果一致。除马铃薯块茎外所有植物的 SSADH 的活性测定是在 Tris-HCl 缓冲液中,以 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SSA 为底物进行的,所以得出的结果低于实际组织中 SSADH 的含量。此外,Tris 的 pK_a 值为 8.1,在 pH 9~10 有很差的缓冲能力,所以在 SSADH 活力测定中不应继续应用^[20,21]

尽管应用了敏感的酶学检测方法,研究工作者还没有在植物组织中检测到游离的 SSA,这种半醛不稳定,在细胞中不积累,一旦形成后就被 SSADH 转变成琥珀酸。Roggiant 等报道离体水稻根含 $1.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重的 SSA,在缺氧条件下温育 3 h,SSA 增加约 63%^[21,22]。

参 考 文 献

- 1 Satya Narayan V, Nair P M. The 4-aminobutyrate shunt in *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 1986,25:997~1001
- 2 Koiwai A, Noguchi M, Tamaki E. Change in the amino acid composition of tobacco cells in suspension culture. *Phytochemistry*, 1971,10:561~565
- 3 Naidu B P, Paleg L G, Aspinall D et al. Amino acid and glyline betaine accumulation in cold-stressed wheat seedling. *Phytochemistry*, 1991, 30:407~409
- 4 Reggiani R, Aurisano N, Mattana M et al. ABA induced 4-aminobutyric accumulation in wheat seedlings. *Phytochemistry*, 1993,34:605~609
- 5 Wallace W, Secor J, Dvhtsfrt L E. Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol*, 1984,75:170~175
- 6 Crawford A, Bown A W, Breikreuz K E et al. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatment reducing cytosolic pH. *Plant Physiol.*, 1994, 104:865~871
- 7 Inatomi K, Slaughter J C. The role of glutamate decarboxylase and γ -aminobutyric acid in germinating barley. *Journal of Experimental Botany*, 1971, 22:561~571
- 8 Streeter J G, Thompson J F. *In vivo* and *In vitro* studies on γ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol*,1972, 49:579~584
- 9 Okunuki K. *Bot Mag*, Tokyo,1937 51:270

- 10 Schales O, Schales S S. Glutamic acid decarboxylase of higher plants: I, pH-activity curve, reaction kinetics, inhibition by hydroxylamine. *Arch Biochem*, 1946, 11:115~166
- 11 Beevers H. An L-glutamic acid decarboxylase from barley. *Biochem J*, 1951, 48:132~137
- 12 Smith J E, Waygood E R. Resolution of the apoenzyme and coenzyme of L-glutamic acid decarboxylase from sunflower cotyledons. *Can J Biochem Physiol*, 1961, 39:1055~1059
- 13 Inatomi K, Slaughter J C. Glutamate decarboxylase from barley embryos and roots. *Biochem J*, 1975, 147:479~484
- 14 Satyanarayan V, Nair P M. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum*. *Eur J Biochem*, 1985, 150:53~60
- 15 Maitre M, Blindermann J M, Ossola L et al. Comparison of the structure of L-glutamate decarboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1978, 85:885~890
- 16 Lamkin W M, Nelson S W, Miller B S et al. Glutamic acid decarboxylase activity as a measure of percent germination for barley. *Cereal Chemistry*, 1983, 60(2):166~171
- 17 Sceiner J J, Grabe D F, Tulo M. Seed physiology, production, & technology. *Crop Science*, 1989, 29:782~786
- 18 Ram C, Wiesner L E. Glutamic acid decarboxylase activity (GADA) as an indicator of field performance of wheat. *Seed Sci & Technol*, 1988, 16:11~18
- 19 Stapleton A, Tyrer N M, Goosey M W et al. A rapid purification of L-glutamic acid decarboxylase from the brain of the locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Neurochemistry*, 1989, 53(4):112~113
- 20 Satya Narayan V, Nair P M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry*, 1990, 29:367~375
- 21 Bown A W, Shelp B J. The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid. *Biochemistry*, 1989, 8:21~25
- 22 Collins D M, Wilson A T. Embryo and endosperm metabolism of barley seeds during germination. *Journal of Experimental Botany*, 1975, 26(94):737~740

Enzymological Progress on the Study of γ -Aminobutyrate Metabolism (Review)

Mu Xiaoming Shen Liming Wu Xianrong
(College of Biological Sciences, CAU, Beijing 100094)

Abstract: Enzymological progress on the study of γ -aminobutyrate metabolism, especially the distribution, purification and property of three enzymes involved in the metabolism—L-Glutamate decarboxylase, γ -Aminobutyrate transaminase and succinate semialdehyde dehydrogenase is documented and discussed in this review.

Key words: γ -Aminobutyrate; L-Glutamate decarboxylase; γ -Aminobutyrate transaminase; succinate semialdehyde dehydrogenase