

次生萜类生物合成的调控

许燕华 骆萍 卢山 贾军伟 蔡煜

周向军 林芝萍 陈晓亚

(中国科学院植物生理研究所, 上海 200032)

[摘要] 克隆了青蒿单萜合成酶(芳樟醇合成酶)cDNA,发现该酶基因的转录可被伤诱导。在棉花悬浮细胞中,真菌激发子诱导这两个基因的转录表达。在棉籽发育种子中,FPS基因和杜松烯合成酶基因(CAD1)随腺体的出现而大量表达,导致棉酚等倍半萜醛类的积累。在棉花幼苗和植株中,CAD1-A和CAD1-C具有不同的表达特征。

[关键词] 次生代谢,倍半萜合成酶,棉酚,棉花,青蒿

植物次生产物可以分为酚类(黄酮类化合物、香豆素、木质素等)、生物碱、萜类化合物、有机酸等几个主要类群。1891年Kossel把植物次生产物定义为一类对植物细胞正常生理功能并非必要的小分子化合物^[1]。这些有机成分通常在形成和分布上具有种属、组织、或者发育阶段的特异性。在特定的器官或者特定的发育阶段,次生产物有可能成为代谢库中的主要成分,例如橡胶。在甜叶菊的叶中,二萜类物质stevioside可以占到干重的10%。植物在受到病原菌侵染、生物激发子以及非生物激发因子处理后,在细胞中产生一系列生理、生化和代谢变化,包括合成小分子的次生产物,以拮抗病原菌的侵害。这些小分子的次生产物被称为植保素。

萜类物质具有异戊二烯(C5)单元组成的基本骨架。到1998年,大约有22000种萜和萜类衍生物的结构已被鉴定,包括分别由2、3和4个异戊二烯单位组成的单萜、倍半萜和二萜,以及三萜(如植物甾醇和皂甙)和多萜(如橡胶)。单萜、倍半萜和二萜分别来自于牻牛儿基焦磷酸(C10)、法呢基焦磷酸(C15)和牻牛儿基焦磷酸(C20),由萜类环化酶催化其反应。近期的研究表明,单萜和二萜是在质体中合成的,而倍半萜在细胞质中合成,它们分别来自不同的生物合成途径^[2]。单萜和少数倍半萜构成了植物主要的挥发成分,而许多倍半萜和二萜是植保素。许多萜类具有重要的药用价值,如青蒿中的

倍半萜内酯青蒿素被用于治疗疟疾。

1 倍半萜合成酶

倍半萜是萜类中最大的类群,在高等植物、苔藓、地衣、真菌和藻类中均有分布。在已发现的数千种倍半萜成分中,基本骨架有上百种。

倍半萜合成酶催化由15碳的法呢基焦磷酸形成环式的中间代谢物,进而产生复杂的倍半萜类。由于大多数倍半萜化合物是环状的,所以倍半萜合成酶又称为倍半萜环化酶。近年来对植物萜类合成酶的研究受到重视,一些不同植物的倍半萜合成酶的cDNA克隆已经被陆续分离。首先是克隆了烟草中的表-马兜铃烯合成酶(EAS)^[3],并解析了其蛋白晶体结构^[4]。该酶含有由 α -螺旋(环-转角-环)构成的双层 α -桶状激活位点,此活性位点的结构与微生物相应的合成酶相似。亚洲棉(*Gossypium arboreum*)编码(+)- δ -杜松烯合成酶(CAD)的cDNA也已分离^[5,6],该酶是棉花的倍半萜环化酶,催化法呢基二磷酸的分子内环化形成 δ -杜松烯,后者是所有棉酚类似物生物合成的前体。以棉酚为代表的酚性倍半萜衍生物是棉花防御机制的重要组成部分。

在烟草的基因组中发现有12—15个EAS基因的拷贝,其中只有EAS3和EAS4已经分离^[3]。EAS4的启动子在诱导后才有活性,其中的一个顺

式元件—TAC-box (ACTCTACAGTACTC),起到了沉默或者抑制的作用。棉花的倍半萜合成酶同样是由一个基因家族编码的。在用激发子处理的亚洲棉(*G. arboreum*)细胞构建的cDNA文库中,已经得到了4个不同的克隆。3个CAD1-C成员的氨基酸序列一致性超过了95%,另一个(CAD1-A)则区别较大,相似性仅为80%。最近从陆地棉(*G. hirsutum*)克隆得到另一个CAD1-C的成员。已从亚洲棉中分离了3个(+)- δ -杜松烯合成酶基因,CAD1-C3^[7],CAD1-A^[8]和CAD1-B(GenBank Accession No. X95323),它们推测的氨基酸序列一致性超过了73%。CAD1-A的启动子和内含子序列与其他两个基因的相似性很小。所有已报道的植物萜类环化酶基因(包括棉花CAD1基因)都具有6个内含子且位置保守。另外,在CAD1-A转录起始点上游-358bp处有一个W-box(TTGACC),W-box是WRKY蛋白的结合位点,与植物基因的诱导表达有关。

2 棉花中倍半萜生物合成的调节

棉属植物通常具有色素腺体。腺体中积累丰富的棉酚等倍半萜醛类。这些化合物对细菌、真菌、昆虫和哺乳动物(单胃)具有毒性。棉花倍半萜醛类的合成还受到外界环境因子的诱导,因而属于植保素类^[9]。对有腺体棉的研究表明,子叶在形成早期就有倍半萜的合成与积累^[6,10]。RT-PCR分析表明,CAD1-C和CAD1-A基因在种子萌发第2天的根部即开始表达,棉花幼苗原位杂交及转烟草分析也显示CAD1-A基因在根部活跃表达^[8]。在成熟的棉花植株中CAD1-C在茎、叶和果皮(棉铃)中表达,在开花前3d的花瓣和花萼中也有转录,而在开花当天及以后不表达;但在上述器官部分都没有发现CAD1-A的转录产物^[7]。用黄萎病菌激发子处理*G. arboreum*悬浮细胞,CAD1-C和CAD1-A的mRNA水平以及倍半萜化合物含量均有明显提高^[5,11]。该激发子还可诱导*G. arboreum*茎中CAD1-A的转录,而CAD1-C在诱导前后均有表达。在陆地棉无腺体品种GL-5中,CAD1-C基因受到真菌激发子的激活,随后产生棉酚等倍半萜醛类^[7]。这些结果说明CAD1-C和CAD1-A具有一些不同的表达和诱导表达特征。

倍半萜代谢中被激发的基因并不仅仅局限于环化酶。*G. arboreum*悬浮细胞受到黄萎病菌激发子处理后FPS和倍半萜环化酶CAD1转录明显增强,倍半萜随之大量积累。同亚洲棉细胞相比,在野生

澳洲棉(*G. australe*)细胞中,FPS和CAD1基因以及倍半萜植保素的积累却表现出不同的特性。激发子也能够诱导FPS,但是其对CAD1的诱导非常有限,可能是由于在澳洲棉悬浮培养细胞中对于倍半萜类物质的合成,FPP的环化并非是个限速步骤,而FPP的合成可能起更重要的调节作用^[11]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMGR)在植物细胞质中催化代谢中心途径中的第一步不可逆反应,在陆地棉和海岛棉中HMGR基因的表达也同样受到黄萎病菌的诱导。

在防御反应中除了利用协同诱导机制调节萜类物质代谢流向外,植物细胞还存在另外的负调节方式。烟草细胞诱导合成倍半萜类植保素时,倍半萜环化酶转录水平增加而鲨烯合成酶活性降低。真菌激发子处理的烟草细胞中鲨烯合成酶的mRNA仍维持稳定水平,其酶活性的抑制来源于转录后调控^[12]。相似的调节机制也存在于有萜类结构单元参加的其他类型的植保素的合成调节中。用疫霉菌(*Phytophthora cinnamomi*)处理茜草科植物金鸡纳树(*Cinchona robusta*)的悬浮培养的细胞,萜类C5单元-DMAPP掺入蒽醌结构母环(C-环),从而导致蒽醌类植保素大量合成,同时伴随着FPS酶活性的降低,催化IPP与DMAPP之间可逆反应的IPP异构酶活性增加,使C5前体能有效进入蒽醌合成途径^[13]。综上可推测,在不同的植物长期进化过程中,萜类代谢途径形成了一系列特殊的上调或下调机制,从而使植株在防御反应中合成有效的特异的次生代谢终产物,参与植物的抗病防御反应。

在巨冷杉中,有两类倍半萜环化酶得到了鉴定。其一以 δ -芹子烯合成酶和 γ -蛇马烯合成酶为代表,是组成型的,并具有多种催化产物。另一类是以 δ -杜松烯合成酶和 α -防风根烯合成酶为代表,具有单一的催化产物且可以受到伤诱导^[14,15]。在*G. arboreum*中,也同样存在组成型的和可诱导的倍半萜环化酶。Southern杂交显示在其基因组中约有8个拷贝的CAD1-C基因,而CAD1-A基因是单拷贝的^[7]。在发育的棉花种子和未受环境信号刺激的幼苗的根部检测到了CAD1-A的转录产物,但在茎中只有经激发子处理后CAD1-A基因才表达。显然,同一个基因受到了发育和胁迫信号的共同调节。CAD1基因受发育调控及其在病原菌诱导下的表达,加上倍半萜生物合成在时间和空间上的特征,构成了棉属植物的化学防御机制。

3 青蒿中的单萜和倍半萜的生物合成

一年生草本植物青蒿是传统的药用植物。根据被子植物萜类合成酶的保守序列设计简并引物,我们通过PCR获得了一些萜类合成酶基因片段,进而从cDNA文库中筛选到两个克隆,QH1和QH5。在*E. coli*细胞中表达的QH1和QH5融合蛋白在2价金属阳离子存在时催化 牛儿基焦磷酸合成单一产物,(3R)-芳樟醇^[16]。在青蒿茎表皮、叶和花序中可检测到QH1和QH5的mRNA,但在茎中柱和根部没有检测到。RT-PCR显示QH1和QH5在转录水平上可被伤诱导,在损伤处理3d的叶和茎中都检测到大量的转录本。GC-MS分析结果表明青蒿不含(3R)-芳樟醇,因此QH1和QH5在体内的活性有待进一步研究。

青蒿素是一种倍半萜四环内酯是抗疟疾的有效成分。克隆青蒿中的倍半萜环化酶基因,将是一项很有意义的工作。

4 萜类合成的修饰酶

发生环化后的萜类中间体经过一系列的修饰、加工最终形成各种次生代谢产物(包括羟基化、甲基和去甲基化、异构、还原等),P450单加氧酶是催化许多修饰反应的一类重要的酶。苯丙烷类代谢途径的许多P450单加氧酶在分子水平已有较为深入的研究,但在萜类代谢中有关该酶的报道不多。Lupien等人1999年报道了薄荷的两个参与单萜化合物合成的P450单加氧酶cDNA:(-)-4S-3-柠檬烯羟化酶和(-)-4S-6-柠檬烯羟化酶^[17]。P450单加氧酶也参与棉酚的生物合成,本实验室正从事这方面的研究。

5 展望

植物是一种自养生物,次生代谢是其防御机制

之一。次生代谢的调控不仅具有组织和器官特异性,而且在特定外界环境激发下被诱导。研究次生代谢途径中的关键酶及调控对全面认识植物生物学以及植物与环境的关系有重要意义。为了使植物天然产物的品质、构成和产量更加符合人类的使用要求,可以利用转基因技术修饰次生代谢途径。

参 考 文 献

- [1] Rhodes M J C. *Plant Mol Biol*, 1994, **24**:1—20.
- [2] Lange B M, Wildung M R, McCaskill D et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**:2 100—2 104.
- [3] Facchini P J, Chappell J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**: 11 088—11 092.
- [4] Starks C M, Back K, Chappell J et al. *Science*, 1997, **277**:1 815—1 820.
- [5] Chen X Y, Chen Y, Heinstejn P et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **324**:255—266.
- [6] Meng Y L, Jia J W, Liu C J et al. *J. Nat. Prod*, 1999, **62**:248—252.
- [7] Tan X P, Liang W Q, Liu C J et al. *Planta*, 2000, in press.
- [8] Liang W Q, Tan X P, Chen X Y et al. *Science in China(C)*, 2000, in press.
- [9] Essenberg M, Grover Jr P B, Cover E C. *Phytochemistry*, 1990, **29**: 3 107—3 113.
- [10] 刘长军, 孟玉玲, 侯嵩生等. *植物学报*, 1998, **40**:703—710.
- [11] Liu C J, Heinstejn P, Chen X Y. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, **12**:1 095—1 104.
- [12] Devarenne T P, Shin D H, Back K et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **349**:205—215.
- [13] Ramos-Valdivia A C, Heijden R, Verpoorte R. *Planta*, 1997, **203**: 155—161.
- [14] Bohlmann J, Crock J, Reinhard J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998a, **95**:6 756—6 761.
- [15] Steele C L, Katoh S, Bohlmann J et al. *Plant Physiol.*, 1998, **116**: 1 497—1 504.
- [16] Jia J W, Crock J, Lu S et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **372**: 143—149.
- [17] Lupien S, Karp F, Wildung M et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **368**:181—192.

REGULATION OF PLANT SECONDARY TERPENOID BIOSYNTHESIS

Xu Yanhua Luo Ping Lu Shan Jia Junwei Cai Yu
Zhou Xiangjun Lin Zhiping Chen Xiaoya

(National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology of Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS, Shanghai 200032)

Abstract Terpenoids are products of isoprenoid pathway. The sesquiterpene synthase catalyzes formation of sesquiterpene intermediates from farnesyl diphosphate (FPP). We have cloned cDNAs/genes encoding (+)- δ -cadinene synthase

(CAD) and FPP synthase (FPS) from cotton, and analyzed their expression pattern. Treatment of *Gossypium arboreum* cultured cells with an elicitor of *Verticillium dahliae* dramatically induced transcription of both FPS and CAD1. Investigation of a glanded *G. hisutum* cultivar revealed an active biosynthesis of sesquiterpenoids in developing seeds, starting at an early cotyledon stage. In cotton seedlings and mature plants, the CAD1-A and CAD1-C genes were regulated differentially. We also isolated (3R)-linalool synthase cDNAs (QH1 and QH5) from *Artemisia annua* L. RT-PCR demonstrated a wounding - inducible increase in QH1 and QH5 transcription.

Key words secondary metabolism, sesquiterpene synthase, gossypol, *Gossypium*, *Artemisia annua*

·资料·信息·

莫斯科大学与基础科学

国立罗蒙诺索夫莫斯科大学是俄罗斯最古老的大学。它是由米哈伊尔·瓦西里也维奇·罗蒙诺索夫和伊凡·伊凡诺维奇·舒瓦罗夫倡议,于1755年1月4日通过女皇伊利莎维塔·佩特罗夫娜特别法令批准创建的。

18世纪70年代,莫斯科大学业已成为俄罗斯的科学和思想中心。它的毕业生主持了其所属主要学院、学科系的工作。莫斯科大学一些科学系曾经由诺贝尔奖获得者斯米尔诺夫、塔姆、弗兰克、朗道、普罗科洛夫、卡皮查等主持。这些学院、系和研究所为当今大多数仍处于领先地位的基础科学奠定了基础。

莫斯科大学还是全俄罗斯教育大树之根,它衍生出了约60所俄罗斯的主要大学和学院,如:卡南大学、哈尔科夫大学、莫斯科第一医学院、莫斯科地质勘探学院、莫斯科科技学院、莫斯科国家关系学院、国立厄尔雅诺维奇大学等。

莫斯科大学是培养科学人才的摇篮,240多年来,莫斯科大学曾培养出25万多名科技专家,其中有2000多名中国留学生。

近10年间,莫斯科大学通常被列为全世界最好的大学之一。它的国际声誉表现在有很多杰出的科学家,其中包括19位诺贝尔奖获得者;不少国际界的著名人物、名人曾接受其授予的荣誉学位。他们是歌德、席勒、罗素、洪堡、赫尔姆霍兹、拉马克、帕

斯德、法拉第、瑞利、玻尔、迪拉克、优卡瓦、加尔布雷斯、梅杰、科克南、曼德拉和克林顿等和一批杰出中国校友。

莫斯科大学是俄罗斯规模最大、组织机构完善的大学,它有21个学院、7个研究所、289个系、3所博物馆、3个培训和研究中心及3艘研究用太空船。莫斯科大学图书馆有55个阅览室,藏书约850万册。

莫斯科大学拥有俄罗斯最先进的科学园。约有40家科技企业正在此从事软件、生物医疗技术方面的激光和光导纤维、生物医学研究和生物技术所需的医疗器材、非线性晶体、环保技术及远程通讯技术等方面的开发。

目前,莫斯科大学拥有200多名俄罗斯科学院院士和通讯院士,2000多名具有博士学位的教师,600多位教授;2.6万名本科生、3500名研究生。

在莫斯科,有60多个广场、街道、博物馆和研究所是以莫斯科大学的学者及科学家的名字命名,这是莫斯科人民给予莫斯科大学的特别崇高的荣誉。

莫斯科大学已被俄罗斯政府列为俄罗斯人民最有价值的文化遗产。从历史上看,莫斯科大学不仅作为一个重要的国家教育、科学研究机构,而且作为国家重要文化中心,在不断向前发展。

(国际合作局 吕蓓蕾 供稿)