

# 植物花青素生物合成途径相关基因的研究进展

张云洁, 潘怡辰, 王汝茜, 李集临, 张杰\* (哈尔滨师范大学, 黑龙江哈尔滨 150025)

**摘要** 花青素是自然界中存在的天然色素。通过基因工程等技术手段可以生产出绿色、健康的保健品、水果及观赏性花卉植物。目前与花青素生物合成相关的基因已通过 PCR、蛋白质纯化、转座子标签等技术手段从金鱼草、玉米、矮牵牛等植物中分离且克隆。本研究综述了花青素合成途径相关调节基因和结构基因的研究进展。

**关键词** 花青素; 调节基因; 结构基因

**中图分类号** S188+.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12014-03

## Research Progress of Genes which Relate to the Biosynthetic Pathway of Anthocyanins

ZHANG Yun-jie, PAN Yi-chen, WANG Ru-xi, ZHANG Jie\* et al (Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

**Abstract** Anthocyanins are natural pigments, green health care products, fruit and ornamental flowering plants can be produced by such means as genetic engineering technology. Currently, the genes relate to anthocyanins biosynthesis have successfully been isolated and cloned from *Antirrhinum majus*, *Zea mays*, *Petunia hybrida* and other plants through as PCR, protein purification, transposon tagging, etc. Anthocyanin biosynthesis-related adjustment advances in genetic and structural genes were reviewed.

**Key words** Anthocyanins; Regulation gene; Structural gene

花青素是植物类黄酮次生代谢途径的产物, 是一种天然水溶性色素, 以花色苷的形式存在。它使花、果实、种子、根等器官呈红色、蓝色、紫色、蓝紫色等<sup>[1]</sup>。花青素具有广泛的功能, 如吸引昆虫进行花粉传播、防止紫外线损伤、预防病原体攻击、抗寒抗旱等。近期研究表明, 花青素有益于人类健康, 包括防止癌症、炎症、冠状动脉心脏疾病和其他潜在的与年龄有关的疾病<sup>[2]</sup>。因此, 对于花青素的转录合成途径及其代谢调控的研究具有重要的意义。

## 1 植物中花青素的合成途径

花青素是类黄酮途径代谢产物, 在自然条件下通常与一个或多个鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖等通过糖苷键结合, 很少以游离状态存在, 一般不影响花色素的呈色反应。目前, 类黄酮途径在拟南芥、矮牵牛、玉米等植物中已较清楚。合成前体是苯丙氨酸, 可分为 4 个阶段。苯丙烷途径是第一个途径, 是大部分次生代谢产物所共有的途径, 由苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 调控使其脱去氨基, 形成反式肉桂酸<sup>[3]</sup>, 再经肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 的作用形成反式-4-香豆酸。在香豆酸辅酶 A 连接酶催化下形成香豆酸辅酶 A。活化产生的香豆酸可以进一步形成肉桂酸进入木质素途径<sup>[4]</sup>。第 2 个阶段由香豆酸与丙二酰辅酶 A 在查尔酮合酶 (CHS) 的作用下催化合成 4-羟基查尔酮, 再经查尔酮异构酶 (CHI) 的催化下形成柚皮素, 然后在黄酮醇-3-羟化酶 (F3H) 催化下形成二氢黄酮醇。这一阶段出现了如黄酮醇、原花青素苷、异黄酮、鞣红等多个重要的分支途径<sup>[4]</sup>。第 3 个阶段在二氢黄酮醇-4 还原酶 (DFR)、花青素合成酶 (ANS) 和无色花青素双加氧酶 (LDOX) 的催化下形成各种花青素<sup>[5]</sup>。第 4 阶段形成的花青素经过一系列糖基化、酰基化、甲基化的修饰形成稳定的花青素苷, 通过转运蛋白运

输到液泡中富集和储存<sup>[6]</sup> (图 1)。

## 2 花青素合成途径的调控基因

目前研究证实, 影响花青素合成的调节基因有 MYB、MYC (bHLH)、WD40、WRKY、锌指蛋白、同源域蛋白、MADS 蛋白基因家族, 其中与花青素合成有直接关系的转录因子主要有 MYB 蛋白、bHLH 蛋白和 WD40 蛋白 3 种<sup>[7]</sup>。这些转录因子与真核基因的顺式作用元件特异性结合, 激活或抑制花青素合成途径中多个基因的表达, 从而调控花青素的生物合成途径。

植物中的 MYB 蛋白属于 DNA 结合蛋白, 含有一段保守的结合区域, 即 MYB 结构域。目前, 已从玉米、金鱼草、水稻、矮牵牛、葡萄、拟南芥、非洲菊、苹果、番薯、石竹目、草莓、小麦等中克隆鉴定出<sup>[8]</sup>。一般每个 MYB 区域含有 51 ~ 53 个氨基酸, 每个 MYB 区折叠成螺旋-转角-螺旋的形式与 DNA 的大沟结合。植物中的 MYB 转录因子可根据所含有的 MYB 结构域数目分为 3 种。一类是只含有一个 MYB 结构的 MYB 蛋白。研究表明, 它是一类重要的端粒结合蛋白, 对于维持染色体结构稳定、完整及转录调节有重要作用。第 2 类是含有 2 个 MYB 结构域的 R2R3MYB 转录因子。它们参与植物次生代谢、细胞分化、抗逆胁迫、激素应答等多方面的调控。第 3 类是含有 3 个结构域的 R1R2R3MYB, 与真菌和动物中的 MYB 蛋白高度同源, 参与细胞分化和细胞周期的调控<sup>[9]</sup>。

另一类转录因子是 bHLH 蛋白, 广泛地存在于各种生物中, 从简单的酵母菌到复杂的多细胞生物, 如人类。研究表明, bHLH 蛋白参与调控多数物种的细胞增殖作用及多个分化途径。在植物中 bHLH 蛋白具有广泛的功能, 如参与调控表皮细胞的分化、花器官的发育调节、激素应答、类黄酮生物合成等<sup>[10]</sup>。在拟南芥中已分离、鉴定出 133 个 bHLH 基因, 最初被划分为 12 个亚类<sup>[11]</sup>。进一步研究从拟南芥、杨树、苔藓及藻类中分离了 638 个 bHLH 基因家族, 使原来的系统进化树延伸为 32 个亚类<sup>[12]</sup>。

**基金项目** 哈师大博士科研启动基金项目 (08XBSK87)。

**作者简介** 张云洁 (1988 -), 女, 黑龙江虎林人, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事活性蛋白多肽组学研究及分子遗传学方面的研究。

**收稿日期** 2014-10-27

目前 WD40 蛋白在许多真核细胞生命进程中被看作为重要的调节因子,包括细胞分裂、囊泡的形成和转运、信号传导、RNA 加工修饰。这些蛋白质通常由 44 ~ 60 个氨基酸组成的肽基序,通常由 GH 二肽(甘氨酸 - 色氨酸)在 N-末端和 WD 二肽(色氨酸 - 天冬氨酸)在 C-末端<sup>[13]</sup>。值得注意的是,WD40 通过参与组蛋白修饰的染色质构型重塑,影响转录

过程<sup>[14]</sup>。MYB 和 bHLH 结构蛋白之间的相互作用已被广泛研究,一直是最近 10 年研究的焦点,特别是类黄酮生物合成途径<sup>[15]</sup>。WD40 蛋白被认为不具有任何催化活性,而似乎是一个对接平台在调节花青素和 PA 的生物合成途径。例如,在拟南芥中,TTG1 主要通过 bHLH 合作调控 TT2-TT8-TTG1 的表达<sup>[16]</sup>。

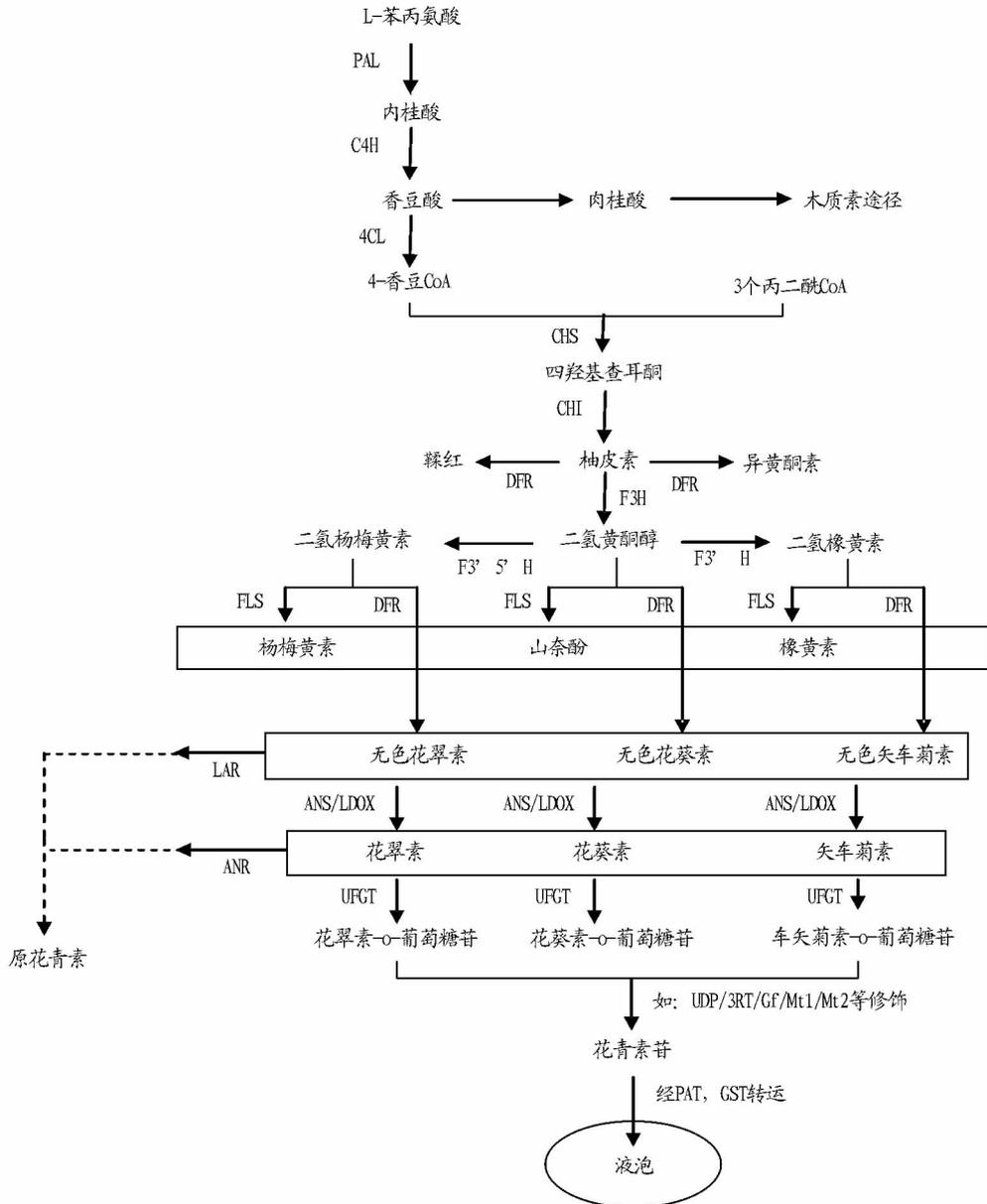


图 1 花青素、黄酮醇和原花青素等类黄酮物质生物合成途径<sup>[4]</sup>

### 3 花青素合成途径的结构基因

在花青素生物合成中主要的酶基因有苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、查尔酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)、二羟基黄酮醇还原酶(Dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、黄烷酮 3-羟化酶(Flavanone 3-hydroxylase, F3H)、花色素苷合成酶(Anthocyanin synthase, ANS) 以及类黄酮 3-O-糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT)。目前,通过 PCR、转

座子标签法及蛋白质纯化等方法已从玉米、矮牵牛、苹果、金鱼草、草莓等植物中分离、克隆出花青素合成相关酶基因。

苯丙氨酸解氨酶催化 L-苯丙氨酸解氨生成反式肉桂酸,是植物花青素类黄酮合成途径中的第一个酶。它存在于所有绿色植物中,在藻类、真菌、细菌中也有发现。研究表明,不同植物中 PAL 活性不同。在一株植物中,不同的组织部位活性也不同,一般越嫩的部位 PAL 活性越高。PAL 基因由 4 个亚基组成,有多个基因家族编码,在这个家族中不同成员

的表达具有特异性<sup>[17]</sup>。目前,已从多数植物组织中分离、纯化出 *PAL*, 不同来源的 *PAL* 结构、分子量等均不相同,但总体来说分子量为 240 ~ 330 kD, 一般可解离成 55 ~ 85 kD 的亚基。苯丙氨酸解氨酶是由 4 个相同亚基构成的四聚体。*PAL* 没有固定的 *K<sub>m</sub>* 值,一般在  $10^{-2}$  ~  $10^{-4}$  之间,其活性中心部位含有脱氢丙氨酸基的亲电中心<sup>[18]</sup>。

查尔酮合酶基因目前已从多数植物中克隆得到,如拟南芥、苜蓿、水稻、小麦、玉米等<sup>[19]</sup>。研究表明,*CHS* 在多数植物中存在多个拷贝,尤其是在双子叶植物中,如大豆、矮牵牛等;但是在小麦、玉米、大麦等单子叶植物中一般只含有 2 个 *CHS* 基因。除金鱼草外,*CHS* 在不同植物中的保守性较高,一般含有 2 个外显子和 1 个内含子,其中外显子 1 编码约 60 个左右的氨基酸残基,而外显子 2 编码约 340 个左右氨基酸残基,内含子的差异相对较大<sup>[20]</sup>。

查尔酮异构酶基因最早是通过抗体技术从法国豌豆中分离出来的<sup>[21]</sup>,之后陆续从矮牵牛、玉米、豌豆、苜蓿、翠菊和水莲等植物中分离克隆出。*CHI* 按作用底物不同可以分为两类,一类存在于豆科植物中,另一类存在于非豆科植物中。还有研究表明,*CHI* 除在植物中普遍存在外,在真菌、黏土霉菌中都存在植物 *CHI* 直系同源类的蛋白,但是缺乏上游的查尔酮合酶(*CHS*)。研究表明,*CHI* 基因结构上变化很大,不同类型的 *CHI* 基因即使在同一物种中差异也比较大,同源性一般为 42% ~ 65%<sup>[22]</sup>。

二羟基黄酮醇-4 还原酶(*DFR*)是催化二氢柞皮黄酮(*DHQ*)生成无色花青素、二氢杨梅黄酮(*DHM*)生成无色花翠素、二氢槲皮醇(*DHK*)生成无色花葵素的关键酶<sup>[5]</sup>。*DFR* 基因最早从玉米、矮牵牛和金鱼草中分离出来,后续从拟南芥、水稻、马铃薯、苹果、小麦等中克隆出来<sup>[23]</sup>。在不同的物种中,*DFR* 氨基酸序列有较高的同源性,与 *NADPH* 的结合位点也是保守的。不同物种的 *DFR* 基因在不同的部位和不同的发育期的表达特性也存在差异<sup>[5]</sup>。

黄烷酮 3-羟化酶是植物类黄酮类化合物代谢途径的关键酶,是依赖型 2-酮戊二酸的双加氧酶(2-*ODD*)的家族成员,需要抗坏血酸、分子氧、2-酮戊二酸和铁参与代谢反应,催化柚皮素 C3 位羟基化,生成二氢山奈素(*DHK*)<sup>[5]</sup>。*DHK* 则是异黄酮、黄酮合成的重要代谢中间产物。*F3H* 基因最早从金鱼草中被克隆分离出,已在许多植物中被分离克隆到,如银杏、苹果、小麦、紫花苜蓿和玉米等。鉴于柚皮素作为 *F3H* 的作用底物,*F3H* 参与黄酮和花青素苷产物合成的调控,是整个黄酮类化合物代谢途径的关键位点<sup>[24]</sup>。

花青素合成酶基因最早是从玉米突变体中利用转座子标签法分离得到的。研究表明,*ANS* 蛋白属于 2-酮戊二酸双加氧酶家族,与类黄酮合成途径中其他同属此家族的黄酮醇合成酶具有保守的同源关系<sup>[25]</sup>。

类黄酮 3-O-糖基转移酶和花青素合成酶都是花青素苷生物合成途径后期起关键作用的酶,通过与液泡、细胞质的共同作用使花青素转变为稳定状态的花色苷。*UFGT* 基因目前在紫苏、花生、马鞭草等植物中已有所报道。研究表明,在

苹果、草莓和荔枝中花青素苷积累与 *UFGT* 活性呈明显的正相关<sup>[26]</sup>。

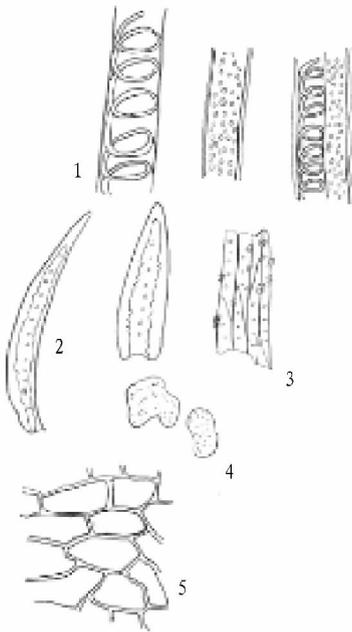
#### 4 展望

近些年对有关花青素生物合成相关的结构基因和调节基因的研究取得很大的进步,如合成后期酶的修饰、运输、沉积等方面的研究都为进一步揭示花青素生物合成途径奠定了基础。分子生物学、酶工程的发展及基因工程的应用可以进一步分离、鉴定出转录因子,有效地调控植物花色素的积累,开发出有益于人类健康的富含花青素的保健品。

#### 参考文献

- [1] 高燕会,黄春红,朱玉球,等. 植物花青素甘生物合成及调控的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(8):94-99.
- [2] WANG K L, BOLITHO K, GRAFTON K, et al. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Rosaceae*[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:50.
- [3] 张宁,胡宗利,陈绪清,等. 植物花青素代谢途径分析及调控模型建立[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(1):97-105.
- [4] 宫焱,薛静,张晓东. 植物花青素合成途径中的调控基因研究进展[J]. 生物技术进展,2011,1(6):381-390.
- [5] 侯夫云,王庆美,李爱贤,等. 植物花青素合成酶的研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(21):188-190.
- [6] HOLTON T A, CORNISH E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin in biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7:1071-1083.
- [7] 房欢,焦滨. 花色苷生物合成及代谢工程研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012,40(7):5-10.
- [8] MA Q H, WANG C, ZHU H H. TaMYB4 cloned from wheat regulates lignin biosynthesis through negatively controlling the transcripts of both cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase genes[J]. *Biochimie*, 2011, 93:1179-1186.
- [9] 陈俊,王宗阳. 植物 MYB 类转录因子研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报,2002,28(2):81-88.
- [10] ZHAO L, GAO L P, WANG H X, et al. The R2R3-MYB, bHLH, WD40, and related transcription factors in flavonoid biosynthesis[J]. *Funct Integr Genomics*, 2013, 13:75-98.
- [11] HEIM M A, JAKOBY M, WERBER M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional Diversity[J]. *Mol Biol Evol* 2003, 20(5):735-747.
- [12] CARRETERO-PAULET L, GALSTYAN A, ROIG-VILLANOVA I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3):1398-1412.
- [13] VaN NOCKER S, LUDWIG P. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function[J]. *BMC Genomics*, 2003, 4(1):50.
- [14] SUGANUMA T, PATTENDEN S G, WORKMAN J L. Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(10):1265-1268.
- [15] FELLER A, MACHEMER K, BRAUN E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. *Plant J*, 2011, 66(1):94-116.
- [16] NESI N, JOND C, DEBEAUJON I, et al. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(9):2099-2114.
- [17] 程水源,陈昆松,刘卫红,等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. 果树学报,2003,20(5):351-357.
- [18] 李莉,赵越,马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶:*PAL*、*C4H*、*4CL* 研究新进展[J]. 生物信息学,2007,4(5):187-189.
- [19] 王坤,潘怡辰,孙慧君,等. 3 种小麦作物查尔酮合酶(*CHS*)及其基因的生物信息学分析[J]. 中国农学通报,2013,29(12):39-43.
- [20] 张党权,谭晓凤,王晓红. 查尔酮合酶与查尔酮异构酶基因特征及转基因应用[J]. 中南林业科技大学学报,2007,27(2):87-91.
- [21] MEHDY M C, LAMB C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor wounding and infection[J]. *EMBO J*, 1987, 6(6):1527-1533.

栓化,颜色较黄。草酸钙方晶附于纤维存在,木纤维呈多角形或梭形,有的较长,纹孔较小,孔沟明显。可见破碎的油室及淡黄色挥发油(图5)。



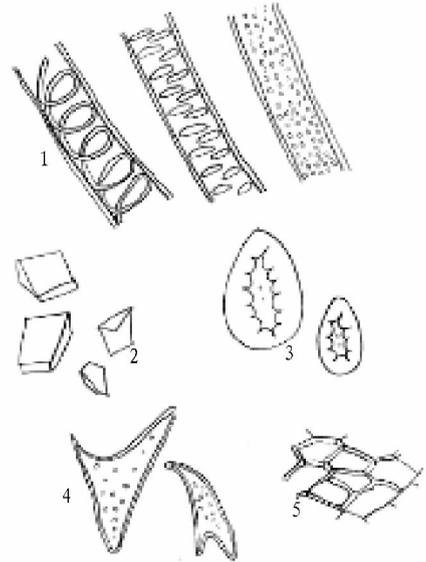
注:1. 导管;2. 木纤维;3. 晶鞘纤维;4. 破碎油室;5. 木栓组织。

图5 狭叶海桐根粉末图

**2.2.2.3 海金子。**淡黄色。导管主为螺纹导管,偶见孔纹或梯纹。木栓组织细胞排列紧密,木栓化严重,较厚,颜色较深。草酸钙方晶可见,呈单个散在。可见少量石细胞存在。木纤维多角形(图6)。可见破碎的油室及黄色挥发油,颜色较深。

### 3 结论与讨论

(1)山柃茶3个种在显微鉴别上存在相同点及明显差别。在组织鉴别上,光叶海桐层纹与孔纹最明显,韧皮薄壁细胞较厚,含草酸钙簇晶,木纤维单个或数个相聚,射线较多;狭叶海桐含皮层石细胞,木栓层与皮层分离不完全,偶见草酸钙方晶,木纤维多角形或梭形;海金子的木栓层与皮层完全分离,草酸钙方晶易见,呈单个散在,木质部与韧皮部相间排列,木纤维多角形,髓部较大。在粉末鉴别上,光叶海桐粉末黄白色,木栓组织细胞较薄,可见少量晶鞘纤维及草酸钙簇晶存在,木纤维呈梭形、较短,可见破碎的油室及黄色挥



注:1. 导管;2. 草酸钙方晶;3. 石细胞;4. 木纤维;5. 木栓组织。

图6 海金子根粉末图

发油;狭叶海桐粉末淡黄色,可见螺纹与少数孔纹导管并列存在,木纤维多角形或梭形、较长,挥发油颜色为淡黄色;海金子粉末颜色为淡黄色,有螺纹或孔纹导管存在,偶见梯纹导管,木栓细胞排列较厚、颜色较深,木纤维多角形,挥发油颜色较深,并可见少量石细胞。

(2)山柃茶为多来源品种,在贵州分布较为广泛,资源丰富,是贵州民族民间常用药,具有镇静、安神、补虚弱、降血压的功效,用于神经衰弱、失眠多梦、体虚遗精、高血压。最新研究表明山柃茶还具有抗抑郁的作用。目前对于山柃茶的研究还较少,对山柃茶进行生药学鉴别研究,为有效控制山柃茶药材质量、充分利用药材资源和开发民族药提供一定的参考。同时有必要对山柃茶药材从药理、化学等方面,采用现代科学手段如高效液相色谱法、指纹图谱等进行深入研究。

### 参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003.
- [2] 何顺志, 徐文芬. 贵州中草药资源研究[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2007.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典, I部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 1977.
- [4] 福建省中医药研究院. 福建药物志[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994.
- [5] 肖炳坤. 山柃茶抗抑郁活性部位及其化学成分研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.

(上接第12016页)

- [22] 李琳玲, 程华, 许锋, 等. 植物查尔酮异构酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(6): 935-937.
- [23] 潘怡辰, 王坤, 王汝茜, 等. 3种小麦作物二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)基因的生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2014, 30(6): 72-76.
- [24] 李鹏, 饶灿, 彭江, 等. 植物黄酮酮3-羟化酶的生物信息学分析[J].

安徽农业科学, 2010, 38(6): 2817-2819.

- [25] ROSATI C, CADIC A, DURON M, et al. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia intermedia* reveals organ-specific expression during flower development[J]. *Plant Sci*, 1999, 149: 73-77.
- [26] 王惠聪, 黄旭明, 胡桂兵, 等. 荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2028-2032.