

植物类黄酮生物合成的分子调控

郭欣慰^{1,2}, 黄丛林², 吴忠义², 张秀海², 罗 昌², 程 曦²

(1. 首都师范大学 生命科学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘 要:类黄酮是一类重要的多酚类次生代谢物,在植物中分布广泛,具有抗菌、抗氧化等重要功能。围绕类黄酮生物合成,概述了类黄酮合成途径中的重要基因以及生物合成调控的分子机制等方面的研究进展,以期从分子角度为提高类黄酮合成提供一定的理论基础。

关键词:类黄酮;生物合成;分子调控

中图分类号:Q 946-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0204-04

类黄酮是一大类重要的次生代谢产物,在生物体内发挥着重要功能。在植物中,豌豆素、菜豆素、大豆素等异黄酮类是三大植保素(Phytoalexin)之一;在人体和动物中,黄酮类化合物能增强机体的非特异性免疫和体液免疫。菊花黄酮、大豆黄酮(Daidzein)、山楂叶黄酮等还具有降低血脂、胆固醇和保护动脉完整的作用,可用于预防和治疗动脉粥样硬化、冠心病和心肌梗塞等疾病。并且类黄酮还因其强抗氧化作用而被称为“自由基清道夫”,具有抗癌、抗肿瘤和延缓细胞衰老等功能。例如白杨素(Chrysin)、橙皮素(Hesperetin)、柑橘黄酮(Tangeritin)等。

类黄酮主要存在于维管植物和部分苔藓植物中。类黄酮的生物合成即通过对类黄酮途径的调控来提高植物体内类黄酮的合成。目前在类黄酮工业合成中,主要以对天然类黄酮的化学修饰等化学合成为主,生物合成较少。因此如何提高类黄酮的生物合成是类黄酮合成的创新点和热点之一。类黄酮途径是目前研究得最为清晰的次生代谢途径,这为从分子角度研究类黄酮生物合成提供了良好的基础。调控类黄酮合成的策略目前主要是从非生物因素、自身途径的相关基因和其它途径的间接作用等方面入手。现对类黄酮的种类、功能、相关重要基因及合成途径调控等方面的研究进行简要综述。

1 类黄酮的种类与分布

类黄酮是一大类具有“黄烷核”基本骨架(C6-C3-

C6)的低分子量多酚类物质的总称。目前已知的种类已超过 9 000 种^[1]。黄烷核由 2 个芳香环(A 环和 B 环)通过 1 个中央三碳桥连接而成,中央三碳桥往往形成杂环(C 环)。根据 B 环的连接位置(2-或 3-位)、中央三碳链的氧化程度以及中央三碳链是否构成环状等特点,一般可将类黄酮分为 6 类^[2]:黄酮(Flavones)、黄酮醇(Flavonols)、黄烷酮(Flavanones)、异黄酮(Isoflavones)、黄烷醇(Flavanols)及花色素(Anthocyanidins)。

类黄酮化合物的存在形式既有游离体的,也有与糖结合成苷的,如花色苷、柚皮素(Naringenin)等。对于不同构象的类黄酮,拟南芥中存在有选择的吸收系统。类黄酮的糖苷基不带负电荷,具有亲脂性,这一特性有利于类黄酮在生物膜系统上进行各类反应。

类黄酮在苔藓植物、蕨类植物等裸子植物中分布不多,其成分最集中的是被子植物。目前开发相对较多的有 大豆、柑橘等,另外很多药用植物也富含类黄酮,如菊花、野菊花、银杏叶、山楂、黄芪、葛根、陈皮、枳实等。在成熟植物中,类黄酮在茎部、叶片、花序、花粉、柱头、花原基细胞以及感受重力的柱细胞、表皮细胞和皮层细胞等都有积累。不同种类类黄酮的含量随植物生长而变化。例如在拟南芥种子中,85% 的黄酮醇都来自槲皮素 Q,而在拟南芥叶片、茎、花、幼苗中最主要的黄酮醇是山奈酚 K^[3]。不同种类类黄酮的积累部位也存在明显差异。在幼嫩的 *Landsberg erecta* 种子的胚轴根尖过渡区,K 积累在表皮,Q 积累在皮层^[4-5]。这些积累方式与类黄酮通过复杂的膜系统调控植物生长、形态、花粉育性等都密不可分。

2 类黄酮合成的相关基因

类黄酮的合成途径是目前研究最为清晰的次生代谢途径^[6]。类黄酮途径的相关基因主要分为两大类:结构基因和调节基因,还有少部分其它基因如: *tt9*, *tt13*, *tt17*, *tds1*, *3,5,6,tds2*^[7](表 1)。

拟南芥中类黄酮途径的突变体根据外种皮颜色主要分为两大类:透明种皮基因(*transparent testa genes*,

第一作者简介:郭欣慰(1987-),在读硕士,研究方向为花卉分子生物学。

通讯作者:黄丛林(1969-),研究员,现主要从事植物逆境调控和菊花生物技术育种工作。E-mail:conglinh@126.com。

基金项目:北京市科委资助项目(Z09050600630906);科技部科技支撑计划资助项目(2009BADB8B04);北京市园林绿化局资助项目(YLHH201000104)。

收稿日期:2010-12-07

TTgene)和非透明种皮基因。目前在拟南芥中已经鉴定出 21 个透明种皮基因(*tt1-19*, *ttg1*, *ttg2*)^[8], 这些基因的突变导致外种皮颜色不同程度地变浅或透明, 进而反映出内部子叶的颜色, 显示为黄褐色至浅黄色^[9]。非透明种皮基因如 BAN 的突变则使种子在萌发早期显紫色。

表 1 类黄酮途径的部分相关基因

结构基因	
<i>tt3</i>	黄烷醇还原酶(Dihydroflavonol reductase, DFR)
<i>tt4</i>	查耳酮合酶(Chalcone synthase, CHS)
<i>tt5</i>	查耳酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)
<i>tt6</i>	3-二氢黄酮羟化酶(Flavanone 3-hydroxylase, F3H)
<i>tt7</i>	黄酮醇 3'-羟化酶(Flavanone 3'-hydroxylase, F3'H)
<i>tt10</i>	多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)
<i>tt15</i>	糖基转移酶(Glycosyltransferase, GT)
<i>tt18/tds4/tt11</i>	无色花色素双加氧酶(Leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX)
<i>fls1</i>	黄酮合成酶(Flavanone synthase, FLS)
<i>ban</i>	花色素还原酶(Anthocyanidin reductase, ANR)
<i>tt12</i>	MATE 家族二级转运因子
<i>tt19/tt14</i>	谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase, GST)
调节基因	
<i>tt1</i>	WIP 型锌指转录因子
<i>tt2</i>	MYB 型转录因子
<i>tt8</i>	bHLH 型转录因子
<i>tt16</i>	MADS 转录因子
<i>ttg1</i>	WD40 调节蛋白
<i>ttg2</i>	WRKY 型转录因子

2.1 类黄酮合成的结构基因

在类黄酮合成的结构基因中, 相关重要基因主要集中在从查耳酮到形成花青素的过程。在拟南芥中涉及的突变体包括 *tt5*, *tt6*, *fls1*, *tt3*, *tt7*, *tt10* 等。

tt5 为 CHI 基因突变, CHI 催化查耳酮到异黄酮的可逆反应。该植株由于角质层蜡质的改变而呈浅绿色。至今只有一个 *tt5* 株系被分离出来, 并且添加 CHI 不能补偿突变表型, 因此推测可能有一个与 *tt5* 紧密连锁的突变实际也产生 *tt5* 的表型^[10]。

3-二氢黄酮羟化酶 F3H 属催化柚皮素转化为二氢山奈酚 DHK。该突变理论上应导致柚皮素的大量积累, 并且添加 DHK 后突变表型能恢复。但实际在 *tt6* 中根本检测不到柚皮素, 这可能是由于柚皮素并不稳定或者很快就转化为其它化合物^[4]。并且添加 DHK 后, 下胚轴延长的突变表型更加明显。因而推测这个突变的基因可能是渗漏的^[11], 或者 DHK 到 K 的反应可能依赖于 F3H 的调控。

黄酮醇合酶 FLS 之前被认为是不可逆的, 只能单向催化 DHK 形成 K 或二氢槲皮素 DHQ 形成 Q。但这样就无法解释添加 K 之后 Q 的积累明显提高的现象^[12]。有报道认为 F3'H 可以催化 K 到 Q 的直接转化, 还有待试验证明^[17]。但目前能明确的是 Q 不能转化为 K。因对 *tt4*(CHS 缺失)添加柚皮素可以恢复该突变体的表型, 而 Q 则不行^[10], 说明 FLS 不能逆向催化形成进一步形成花青素。

tt7 为 F3'H 缺乏, DHK 合成提高, 其外种皮为不完

全的灰棕色。*tt7*, *tt12* 的双突变体缺乏原花色素, 其外种皮完全透明, 完全不同于 2 个单突变的表型^[14]。这 2 个位点的突变几乎完全抑制了原花色素的合成, 其中 *tt7* 阻断了 DHQ 这一通路, 因此推断 *tt12* 可能阻断了 DHK 这一通路。

tt6(F3H 突变)和 *tt10*(PPO 突变)会随着储存时间的延长而变暗, 并且在所有突变体中, 只有这二者在所有组织部位都能检测到花青素, *tt6* 相比野生型稍低, *tt10* 则与野生型相当^[10]。*tt10* 的种子是浅棕色的, 它可能参与将原花青素由无色氧化为棕色的过程, 但 *tt10* 的具体功能现在还不是很清楚^[7]。

2.2 类黄酮合成的转录基因

目前, 已从玉米、拟南芥、矮牵牛、水稻等植物中分离、鉴定了调控黄酮类次生代谢的转录基因, 分别属于编码 MYB、MYC(bHLH)、bZIP 蛋白、WD40 蛋白、锌指蛋白等各类基因家族。

tt1 是 WIP 家族的一个锌指蛋白类转录因子; *tt2* 是一个含有 2 个重复 MYB(R2R3)的转录因子。*tt8* 是 bHLH 类转录因子。*ttg1* 是 WD40 类转录因子, 含有 4 个 WD 重复的蛋白, 该突变体的一个特点是缺乏表皮毛, 种子完全缺少花青素, 进一步发现该突变体类黄酮途径中黄烷醇-4-还原酶催化受阻^[15]。*ttg2* 是在 TTG1 下游作用的一个 WRKY 型转录因子, 包含 2 个 SPF1 锌指结构域, 也调控表皮毛的形成。*tt16* 蛋白含有植物 MADS-box 的典型结构。MADS 被认为参与 DNA 的结合以及蛋白质之间的相互作用^[16]。

这些转录因子可以通过互作共同调控类黄酮途径相关基因的表达, 也可以直接调控。共同调控方式以类黄酮合成途径中后期花色素还原酶 BAN(BANYLUS)基因为例, 首先 *tt2* 与 *tt8* 形成一个复合体, 结合到 BAN 的启动子上, 之后 *ttg1* 和 *tt2* 相互作用形成的复合体, 进一步激活 *tt8* 的表达^[17]。因此推测 *ttg1* 似乎在 *tt8* 的上游行使功能^[18]。而同时 *tt8* 的激活又促进了 *ttg1* 的表达, 最后这三者相互作用形成 MBW(MYB-bHLH-WD40)三连复合物, 共同诱导 BAN 基因的表达。

直接调控以 MYB12 为例。MYB12 转录因子可以特异激活黄酮醇的表达。它的表达水平与幼嫩种子中黄酮醇的含量密切相关。MYB12 与玉米的 P 因子具有高度相似性, 发挥作用时不需要 bHLH 协助。过量表达 MYB12 可使 CHS、FLS、CHI 和 F3H 表达增强, 但 MYB12 缺失对 CHI 和 F3H 影响不大。MYB12 活性的变化不影响 F3'H 和 DFR 基因的表达, 以及花青素的形成^[19]。

3 类黄酮合成的分子机制

3.1 类黄酮的合成途径

类黄酮基本骨架中的 B 环和桥是从莽草酸途径(Shikimic acid pathway)经苯丙氨酸转变来的, 而 A 环则来自丙二酸途径(Malonic acid pathway)。植物类黄酮合

积累^[30]。

除了 PAL 基因,近来对拟南芥中木质素合成基因 HCT 缺失的突变体的研究发现,其植株矮小的原因是由于类黄酮的积累。因木质素合成抑制导致代谢物改变方向进入类黄酮,引起黄酮醇等物质的大量积累^[6]。

参考文献

- [1] Buer C S, Lmin N, Djordjevic M A. Flavonoids: New roles for old molecules[J]. *Journal of integrative plant biology*, 2010, 52(1): 98-111.
- [2] Rice-Evans C A, Miller N J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids[M]. *Flavonoids in Health and Disease*, 1997, 199-219.
- [3] Routaboul J M, Kerhoas L, Debeaujon I, et al. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2006, 224: 96-107.
- [4] Peer W A, Brown D E, Tague B W, et al. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*[J]. *Plant physiology*, 2001, 126: 536-548.
- [5] Tripoli E, Guardia M L, Giammanco S, et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2): 466-479.
- [6] Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, et al. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 148-162.
- [7] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 405-30.
- [8] Shirley B W. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. *Plant physiology*, 2001, 126: 485-493.
- [9] Koornneef M. The complex syndrome of ttg mutants[J]. *Arabidopsis Info. Serv.*, 1981, 18: 45-51.
- [10] Shirley B W, Kubasek W L, Storz G, et al. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 1995(8): 659-671.
- [11] Buer C S, Djordjevic M A. Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(3): 751-763.
- [12] Buer C S, Muday G K, Djordjevic M A. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145: 478-490.
- [13] Graham T L. Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1998, 36(1-2): 135-144.
- [14] Debeaujon I, Peeters A J M, Léon-Kloosterziel K M, et al. The *transparent testa* 12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13: 853-871.
- [15] Grotewold E. *The science of flavonoids*[M]. USA: Springer Press, 2006: 71-90.
- [16] Nathalie N, Isabelle D, Clarisse J, et al. The *transparent testa* 16 locus encodes the *Arabidopsis* bister MAD5 domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 2463-2479.
- [17] Ramsay N A, Walker A R, Mooney M, et al. Two basic-helix-loop-helix genes(MYC-146 and GL3) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(3): 679-688.
- [18] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 63-70.
- [19] Frank M, Harald K, Pawel B, et al. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant physiology*, 2005, 138: 1083-1096.
- [20] Hartmann U, Sagasser M, Mehrrens F, et al. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(2): 155-171.
- [21] 王曼, 王小簪. 蓝光和蔗糖对拟南芥花色苷积累和 CHS 基因表达的影响[J]. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12(3): 252-256.
- [22] Carvalho I S, Cavaco T, Carvalho L M, et al. Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(2): 384-390.
- [23] Jaakola L, Riihinen M K, Karenlampi S, et al. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry(*Vaccinium myrtillus* L.) leaves[J]. *Planta*, 2004, 218: 721-728.
- [24] 张玉进, 孟祥春, 潘瑞炽, 等. 非洲菊苯基苯乙烯酮合成酶 CHS 基因表达模式的初步研究[J]. *华南农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 23(2): 89-90.
- [25] Derolles S C. An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in *lisianthus* (*Eustoma grandiflora*) flowers[J]. *Mol. Breed.*, 1998(4): 59-66.
- [26] 魏开发. AtNCED3 及 AtAAO3 基因启动子功能分析及其驱动 CHS 基因表达[J]. *湖北民族学院学报(自然科学版)*, 2009, 27(2): 121-125.
- [27] 张大勇, 李文滨, 李冬梅, 等. 大豆叶片异黄酮含量与 PAL 基因相对表达量的关系[J]. *大豆科学*, 2009, 28(4): 670-673.
- [28] 赵宗方, 赵勇, 吴桂法. 果实花青素含量与 PAL 活性关系的研究[J]. *园艺学报*, 1994, 21(2): 199-200.
- [29] 郭世乾, 王春枝, 李瑛, 等. 施肥对南果梨花青素含量及苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(2): 313-315.
- [30] Lea U S, Slimestad R, Smedvig P, et al. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway[J]. *Planta*, 2007, 225(5): 1245-1253.

Molecular Regulation of Plant Flavonoid Biosynthesis Pathway

GUO Xin-wei^{1,2}, HUANG Cong-lin², WU Zhong-yi², ZHANG Xiu-hai², LUO Chang², CHENG Xi²

(1. Department of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097)

Abstract: Flavonoids are one kind of polyphenolic secondary metabolites, widely existing in plants, play significant roles on plant protection, such as anti-bacterial and antioxidant. In this paper, the important genes related to flavonoid biosynthesis and its molecular regulation mechanisms were summarized.

Key words: flavonoid; biosynthesis pathway; molecular regulation