

植物细胞色素 P450

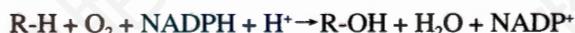
余小林 曹家树* 崔辉梅 叶纨芝

(浙江大学农业与生物技术学院园艺系; 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘要 对植物细胞色素 P450(CYP450)基因的分离, 植物 CYP450 在苯丙烷类物质、芥子油苷及 IAA 和萜类等物质的生物合成中的功能, 以及对天然生物合成与人工合成物质的解毒功能等研究进展作了简要的综述。指出分离植物细胞色素 P450 基因, 并对其生物学功能进行分析以及植物细胞色素 P450 降解除草剂的机制及其在环境生物修复等方面的应用是今后一段时间内植物 CYP450 领域的研究热点。

关键词 植物细胞色素 P450; 基因分离; 生物合成; 解毒

细胞色素 P450(以下简称 CYP450)是广泛存在于动植物及细菌、真菌等细胞内的, 与内质网、线粒体、质体、高尔基体等细胞器膜结合的一类具有混合功能的血红素氧化酶系, 是一个古老的基因超家族, 也是近年来国际学术界的研究焦点之一^[1,2]。近年的基因组测序结果揭示, CYP450 是高等植物中最大的酶蛋白家族^[3]。研究表明, 其三维结构非常保守, 经典的 CYP450 在催化中心有高度保守的 FxxGxRxRxGxC 的结构域^[4]。CYP450 最早是以 CO 结合蛋白质而被发现的, 因其还原型与 CO 结合后在波长 450 nm 有最大吸收峰而得名。CYP450 催化的反应过程包括两步: 电子由 NADPH / NADH 传至黄素蛋白及铁硫蛋白(或 NADPH-CytP450 还原酶), 然后再传递至 CYP450 氧化酶。CYP450 催化氧化反应可以用如下方程式表示:



研究结果显示, 各种 CYP450 酶催化的反应广泛而复杂, 主要有烷基的羟化, 烯基的环氧化, 烃基的氧化, 氮、硫、氧位的脱烷基化, 氮位的羟化和氧化, 硫位的氧化, 氧化性脱氨、脱卤和脱氢, 氧化性的碳碳键断裂及一些还原反应等。正因为 CYP450 的多种功能而被人们称为万能的生物催化剂。已有作者对 P450 与植物次生代谢以及植物 P450 基因的表达和调控等内容做过详尽的综述^[5,6], 本文主要对植物 CYP450 基因的分离、植物 CYP450 的生物合成功能及其解毒功能等作简要的综述。

1 植物细胞色素 P450 基因的分离

在自然界中, CYP450 酶系无处不在。据统计, 人们已经从不同的生物中分离出 268 个家族的 CYP450, 其中细菌 75 个家族, 低等原核生物 72 个家族, 植物 52 个家族, 动物 69 个家族(<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>)。随着植物基因组计划的顺利进行, 从植物中分离获得 CYP450 基因数量也日益增多。当前, 研究者主要从拟南芥、番茄、水稻、玉米、大豆等农作物中分离获得 CYP450 基因全长或片段。根据研究的不同深度和广度, 其分离的数量也有很大的差异, 其中拟南芥以 1249 条 CYP450 ESTs, 分属 39 个基因家族和 67 基因亚家族而位居首位。目前, 已经对 1059 条植物 CYP450 的基因序列进行了命名, 占有生物 2377 条已命名的 CYP450 的基因序列的 45%。综合 <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html> 等网站上所发表的数据, 就从植物中分离获得的 CYP450 基因全长或片段简要见表 1。

2 植物 CYP450 的生物学功能

从功能意义上植物 CYP450 可以分为两大类型^[7], 一种是具有生物合成功能的 CYP450, 此类 P450 在木质素中间物、植物激素、甾醇、萜类、黄酮类、异黄酮和呋喃香豆素等生物物质的合成中起重要作用; 另一类为代谢解毒的 CYP450, 可以催化外源化合物如除草剂、农药等变成非毒性产物。还有一

收稿日期: 2003-12-31 接受日期: 2004-07-08

浙江省重大科技项目资助(No. 021102536)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

表1 主要植物中分离获得的 CYP450 基因和 ESTs

植物种类	已分离的基因和 ESTs 数目	基因家族和亚家族数目	统计截止时间
拟南芥	1249 条 ESTs(其中 249 条全长)	39 个基因家族, 67 个基因亚家族	2003.11
番茄	235 条 ESTs(其中 5 条全长)	15 个基因家族	1999.9
水稻	957 条 ESTs(其中 323 条全长)	38 个基因家族	2002.9
玉米	39 条 ESTs	12 个基因家族	1999.10
松树	122 条 ESTs(其中 9 条全长)	14 个基因家族	2004.1
大豆	86 条 ESTs(其中 22 条全长)	15 个基因家族	1999.9
黑麦草	14 条全长, 2 条片段	5 个基因家族	2001.10
红藻	5 条全长	2 个家基因族	2004.7
衣藻	33~34 条全长, 6~7 条片段	9 个家基因族	2003.9

些 CYP450 可能活化某些无毒性的物质如前除草剂 (proherbicide) 成为具有毒性的除草剂^[8]。

2.1 CYP450 在生物物质合成中的作用

2.1.1 苯丙烷类的生物合成

在苯丙烷的生物合成中, 已报道的 CYP450 催化反应超过 16 个^[7]。近年来, 随着突变体库的快速构建以及基因剔除等实验方法的建立, 越来越多催化植物次生代谢物质合成相关酶的基因功能被阐明。研究结果显示, CYP450 在植物黄酮类物质的合成反应中起着至关重要的作用, 其催化的生物合成途径如图 1 所示^[2]。

从苯丙氨酸 4- 香豆辅酶 A 开始, 经 PAL 催化生成反-肉桂酸, 随后由肉桂酸-4- 羟化酶(CHC)催

化生成对-香豆素, 而 CHC 就是一种 CYP450。由于 CHC 催化反应的中心地位, 其活性几乎存在于所有植物中, 且与其他 CYP450 的活性相比具有相对较高的活性。因此, CHC 成为第一个被鉴定的 CYP450^[9]。CHC 自发现以来, 得到了广泛的研究, 因为它参与的苯丙烷代谢途径产生大量的重要代谢物质, 如木质素、黄酮类、羟基肉桂酸酯、木脂体(lignans)、二苯乙烯(stilbenes)等, 以及一些其他次生性代谢物质, 如植物防御化合物(异类黄酮、香豆素、呋喃香豆素)。进一步研究表明, CHC 活性及其基因的表达受创伤、金属离子、病原侵染等因素的调控, 并可能在转录水平上进行调控^[10-13]。

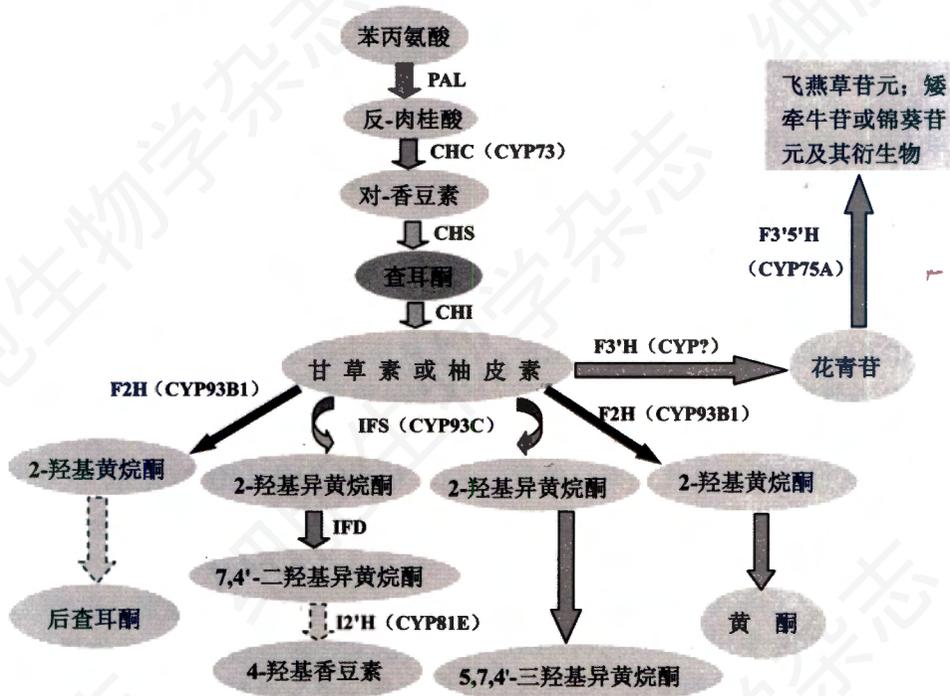


图1 细胞色素 P450 在苯丙烷类生物合成中的催化作用^[2]

F3'H: 一种家族还没有被鉴定的细胞色素 P450, 其生物功能为类黄酮-3'-羟化酶; CHC: 肉桂酸-4-羟化酶; F2H: 黄酮-2-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮-3', 5'-羟化酶; IFD: 2-羟基异黄酮脱水酶; I2'H: 异黄酮-2-羟化酶; PAL: 苯丙氨酸脱氨酶; CHS: 查耳酮合成酶; CHI: 查耳酮异构酶。

目前已从绿豆^[13]、菊芋^[14]和苜蓿^[15]中分离得到 CHC 的编码全长 cDNA, 从向日葵属植物中分离的 CHC 基因被定名为 *CYP73A1*。此外, 在通过苯丙烷类途径花色素苷的合成支路中, 催化 4- 香豆酰基辅酶 A 生成四羟基查耳酮的查耳酮合酶(CHS), 催化底物羟基化的类黄酮 3'- 羟化酶(F3'H)和类黄酮 3', 5' 羟化酶(F3', 5'H)与异黄酮 2'- 羟化酶(I2'H)和异黄酮 3'- 羟化酶(I3'H)均有研究报道^[16]。Martens 等^[17]从大丁草(*Gerbera hybrids*)中获得了一全长 cDNA *CYP93B2*, 由酵母表达的 *CYP93B2* 可以催化黄烷酮产生黄酮的反应, 序列比较显示, 该基因与黄酮合酶 II 的序列同源性为 54%。

2.1.2 芥子油苷和 IAA 的生物合成 近几年来, 从色氨酸到芥子油苷和生长素的生物合成途径的发现是植物 CYP450 研究取得的显著进展之一。研究显示, 芥子油苷及其衍生物来源于自然的氨基酸, 具有一个硫酸盐和半个葡糖硫苷, 主要存贮于十字花科植物细胞的液泡内, 既可用于人类的抗癌药物, 又可作为农业生产中作物的保护剂。因此对芥子油苷生物合成途径的研究是植物化学研究领域中的热点之一。此外, 生长素作为植物生长的促进剂, 在顶端生长优势、根的发生、维管的分化以及植物的热激行为等均具有重要的作用。研究表明, 植物可以通过色氨酸依赖途径和非色氨酸依赖途径等两种方式进行吲哚-3-乙酸(IAA)的生物合成。进一步的研究发现, 在色氨酸依赖途径中, IAA 的生物合成与芥子油苷的生物合成具有相同的初始反应, 而且吲哚-芥子油苷还是 IAA 的中间代谢产物, 其催化的生物合成途径如图 2 所示^[2,18]。Bak^[18]等研究发现, 在生长素生物合成途径中, 吲哚-3-乙醛脒(IAOx)的下游没有直接检测到吲哚-3-乙腈(IAN), 他们利用含 *CYP83B1* 并具有生长素积累形态特征的突变体 *runt1* 为材料, 对幼苗在添加 *CYP83B1* 抑制剂色胺(β -吲哚基乙胺)的培养基上进行生长, 结果表明, 顶端生长优势减弱。进而采用 IAN 处理的研究结果显示, *runt1* 突变体没有在脲水解酶突变体 1(*nit1*)背景下被抑制。上述结果表明, 虽然 IAOx 是 IAA 和芥子油苷生物合成的共同初始底物, 但在 IAA 的生物合成途径中 IAN 不是 IAOx 的直接产物。

2.1.3 萜类的生物合成 萜类是一大类天然化合物, 包括激素如赤霉素、脱落酸, 光合色素如类胡萝卜素、植物防御物质、电子载体以及结构膜成

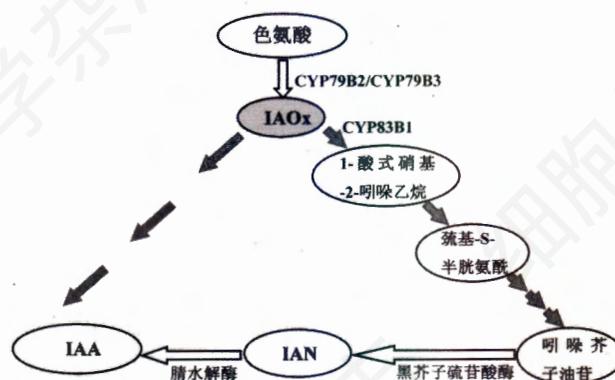


图 2 色氨酸途径 IAA 和芥子油苷的生物合成^[2]

IAOx: 吲哚-3-乙醛脒; IAN: 吲哚-3-乙腈; IAA: 吲哚-3-乙酸。

分等。研究表明, *CYP450* 参与了许多萜类物质的合成^[19]。在植物双萜类衍生物的合成中, 以赤霉素(GA)的生物合成途径最为典型。其生物合成过程中, 由 ent-贝壳杉烯 \rightarrow ent-贝壳杉醇 \rightarrow ent-贝壳杉醛 \rightarrow ent-贝壳杉酸 \rightarrow ent-7 α -羟基贝壳杉烯酸等 4 个连续步骤都是由 *CYP450* 催化的^[19,20]。如图 3 所示, 前 3 个步骤都由贝壳杉烯氧化酶催化, 后一步由贝壳杉烯羧化酶催化, 以上 4 个步骤在植物中都是相同的。利用遗传学方法, 将表型矮小的 GA 缺失植物用于分离“非-*CYP450*”GA 生物合成基因座, 由此已成功地分离了一个 *CYP450* 编码基因。在无外源 GA 存在下不发芽的拟南芥突变体中, 鉴定了 5 个影响 GA 生物合成的基因座(*gal~ga5*)^[21,22]。

甾醇是三萜的重要衍生物, 膜内甾醇无 14 α -甲基, 甾醇前体如动物和真菌的羊毛脂甾醇和植物的钝叶鼠曲草醇的脱甲基反应是由 *CYP51* 家族的 *CYP450* 催化的。采用 *CYP81* 作为探针, 低严格(*low-stringency*)杂交从小麦中分离出了 *CYP51*。随后, 大肠杆菌表达 *CYP51* 与钝叶鼠曲草醇显示出类型 I 结合光谱特征, 而与羊毛脂甾醇结合却无此特征, 实验结果从分子水平上进一步验证了该酶具有较高的底物特异性^[23]。

除此之外, *CYP450* 还在脂肪酸生物合成和代谢, 生物碱、生氰糖苷和植物防御次生性物质的生物合成过程中起催化作用。如在脂肪酸代谢中, 月桂酰羟化酶(LAH)是催化短链(C10)和中链(C12-C14)脂肪酸重要的羟化酶^[24]。催化两个分子 N-甲基鸟药碱氧化形成小檗宁的小檗宁合酶(BS)是一种 *CYP450*。在植物病原菌和昆虫抗性中起重要作用的 2,4-二羟基-7-甲氧基-1,4-苯并噁嗪-3-酮(DIMBOA)

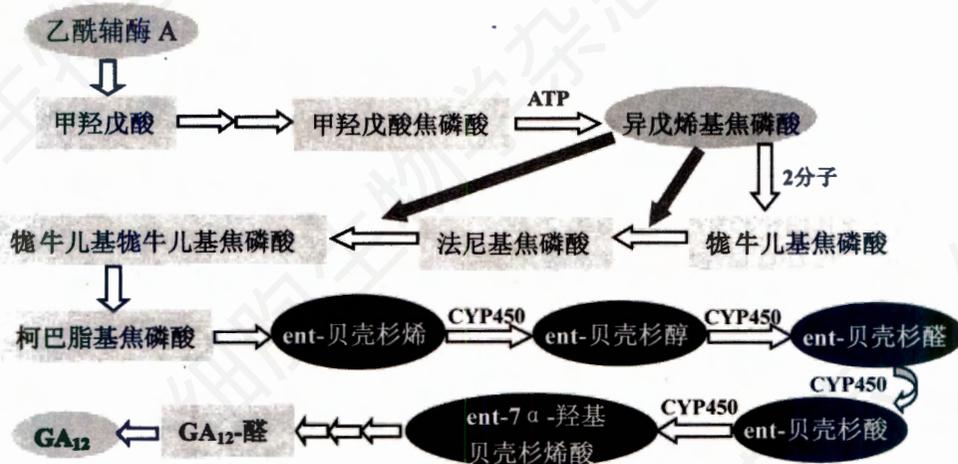


图3 植物体中赤霉素的生物合成(部分参考文献[20])

由 CYP450 催化的前 3 个步骤由贝壳杉烯氧化酶催化,后一步骤由贝壳杉烯羧化酶催化,以上 4 个步骤在植物中都是相同的。

和 2,4-二羟基-1,4-苯并噁嗪-3-酮(DIBOA)类物质的生物合成也包含 CYP450 的催化反应^[25]。

2.2 CYP450 的解毒功能

植物 CYP450 除了具有生物合成的活性外,还具有分解天然产物的功能。在 *Salvia officinalis*, 单萜樟脑被氧化为 6-外-羟基樟脑,这一过程是由微粒体 CYP450(樟脑 6-外-羟化酶)催化完成的^[26]。一些用作模式底物以测定哺乳动物 CYP450 活性的合成的荧光底物(如 7-氧香豆素和 7-氧试卤灵)也可被植物中的某些 CYP450 分解^[10]。

另一类主要的 CYP450 介导的反应是除草剂、农药和外源物质的解毒途径。植物对许多除草剂产生的生物化学抗性是因为除草剂被快速转化为羟基化的失活产物^[27],这些产物随后与植物细胞壁的糖类分子结合。CYP450 对除草剂的代谢作用已知包括小麦和玉米对绿麦隆(chlortoluron)的 N-脱甲基作用和环甲基的羟基化作用^[28,29],小麦对禾草灵(diclofop)的芳基羟基化作用^[30]、小麦对醚苯磺隆(triasulfuron)和绿磺隆(chlorsulfuron)的芳基羟基化^[31]、玉米对氟啶磺隆(primisulfuron)的芳基和嘧啶环羟基化^[29]、玉米对灭草松(bentazon)的芳基羟基化作用等^[30]。

一旦明确 CYP450 与除草剂的降解有关,分离相关基因便成了人们研究的重点。有趣的是,第一个分离出来的除草剂代谢 CYP450 基因不是来自于植物,而是从土壤细菌浅灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*)中分离得到的 *SUI* 和 *SU2* 基因。其中 *SUI* (*CYP105A1*) 基因的靶蛋白是线粒体基质,能活化无毒的磺酰脲类 R7402 成为一种高效的植物毒性除草

剂。O'Keefe 等^[31]将该基因重组在 CaMV35S 和绒毡层特异表达启动子后转化烟草进行表达,结果发现,当基因在全株表达, R7402 处理的植株则死亡,而绒毡层特异表达启动子引起的特异表达,用 R7402 处理未成熟的花会导致雄性不育。所以,目前 *SUI/R7402* 系统作为阴性选择标记被广泛应用。

在哺乳动物中,很少有参与药物和外源生物物质代谢的 CYP450。但从小鼠体内分离得到的 *CYP1A1* 基因进行重组转化植物后,成功地获得了耐除草剂的转基因烟草和马铃薯^[32]。研究表明, *CYP1A1* 的代谢底物较为广泛,如阿特拉津(除草剂)、绿麦隆(除草剂)和 pyriminobac-meth1 等。

近几年,人们对所有能代谢除草剂的植物源 CYP450 进行比较后发现,从菊芋中分离得到的和从大豆中分离得到的 *CYP71A10* 它们各自表达产物的解毒效率较高,其中 *CYP71A10* 基因具有 CYP450 的基本保守序列^[33]。试验结果表明, *CYP76B1* 对苯脲的催化周期比 *CYP71A10* 的长 10 倍,当上述两种基因超量表达时,对苯脲的耐性则会相应提高。目前还没有有关多代谢 CYP450 的周期速率的研究报道。此外,从植物中还分离和鉴定具有代谢除草剂功能的其他 CYP450,如 *CYP71A11*、*CYP73A1* 和 *CYP76B1* 等^[6]。鉴于除草剂已广泛使用,现已成为生态环境的主要污染源,因此利用 CYP450 对除草剂等人工合成物质的代谢可望开辟新的生物除污途径。

3 展望

随着现代生物学实验方法的日臻完善和技术的

不断提高,越来越多的植物 CYP450 酶被鉴定,部分编码其氨基酸的全长 cDNA 也被成功分离。因此,植物 P450 的研究无论在理论上探索植物的生理代谢、选择进化和与环境的关系上,还是在农业生态、生物防治和作物基因工程上都有重要而广泛的意义。

目前,虽然越来越多的科学家转向植物 CYP450 的研究,但分离和鉴定植物 CYP450 仍然是该领域研究的首要任务。由于有 50 多年动物 CYP450 的研究基础以及近年来对 CYP450 性质有了更多的了解和提纯方法的不断改进,越来越多的植物 CYP450 被分离纯化。在分离纯化过程中,目标蛋白质数量的多少是分离纯化工作成功与否的关键。研究表明,用药物等诱导物质可使 CYP450 的量增多,所以寻找适宜的外源物质,诱导提高目标蛋白质的表达丰度及其适宜的分离技术是今后分离纯化 CYP450 的主要研究内容之一。

其次,分离植物 CYP450 基因和测定它们的生物化学功能是目前植物 P450 研究的核心。迄今为止,利用缺失功能突变体法、差异筛选法和表达序列标签法(EST)已成功分离了 3000 多个植物 CYP450 基因,但仅有极少数的 CYP450 基因的功能被鉴定,因此,验证与测定其生物学功能是整个 CYP450 研究领域的焦点。随着大肠杆菌和酵母体外表达系统的进一步完善,已经把多种动物、微生物和植物的 CYP450 进行了体外表达,并积累了许多成功的经验,为测定未知的 CYP450 基因的生物学功能打下了基础。最近,本实验室利用 mRNA 差异显示技术(DD-PCR)结合 RACE 技术成功分离并克隆到一个与白菜核雄性不育相关的编码细胞色素 CYP450 cDNA 全长 CYP86MF。该 cDNA 具有一个完整的长 1578 bp 的开放阅读框,经 GenBank BLAST 查询表明, CYP86MF 与位于拟南芥第一条染色体上的编码细胞色素 P450 基因 CYP86C4 核苷酸序列有 85.3% 的同源性,氨基酸同源率为 84.9%; Northern 验证表明 CYP86MF 在白菜两用系不育株的表达受到了明显地抑制,并且该基因在花蕾中特异表达,而在叶片和茎中不表达^[34]。当前对该基因可能的生物学功能正在做进一步的研究。

另外,植物 CYP450 基因的表达和调控也是今后一段时间的研究热点。研究表明, CYP450 基因的表达调节主要是转录水平的调节,以 mRNA 的剪切和蛋白质翻译等转录后调节为辅。CYP450 基因

的表达还受许多生物和非生物因子的调节,如微生物侵染、光、化学物质的诱导和组织器官特异性和发育分化等因素的影响。此外,随着植物基因组计划的进一步深入,对调控 CYP450 基因表达的内在因素将有更清楚的认识,如 CYP450 基因的启动子、增强子、衰减子和诱导因素的受体蛋白及其基因序列等作用元件与作用因子的单一及其相互的调节作用都将是今后植物 CYP450 研究的重要内容。随着现代生物技术的发展,人们可以按设计改造 CYP450 基因的结构及操纵其表达过程,由此改变 P450 的活性,甚至构建具有天然 CYP450 不具备的新活性。

最后, CYP450 的生物解毒功能的开发和利用也是今后一段时间植物 CYP450 的研究重点。由于 CYP450 不但能分解天然的生物物质,还能分解如除草剂、农药和外源物质等人工合成的物质,但目前对其代谢的机制还不是很清楚。相信在不久的将来,在清楚 CYP450 代谢人工合成的物质机制的基础上,通过遗传转化等分子生物学手段改造的植物和微生物将大大提高其对除草剂及农药的耐性,并通过这些超级生物来达到修复环境的目的。此外,在庞大的 CYP450 家族中也有可能寻找到诸如 *bar* 一样的标记基因,并应用于植物表达载体的构建。

参考文献 (References)

- [1] Nelson DR. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **369**: 1
- [2] Feldmann AK. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, **4**: 162
- [3] Werck-Reichhart D et al. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**: 116
- [4] Hasemann CA et al. *J Mol Biol*, 1994, **236**: 1169
- [5] 赵剑等. *生命科学*, 1999, **11**: 127
- [6] Bolwell GP et al. *Phytochemistry*, 1994, **37**: 1491
- [7] 冷欣夫等. *细胞色素 P450 酶系结构、功能与应用前景*, 北京: 科学出版社, 2001
- [8] Schuler MA. *Plant Physiol*, 1996, **112**: 1411
- [9] Russell DW. *J Biol Chem*, 1971, **246**: 3870
- [10] Batard Y et al. *Plant Cell Environ*, 1995, **18**: 523
- [11] Bell-Lelong DA et al. *Plant Physiol*, 1997, **113**: 729
- [12] Frank MR et al. *Plant Physiol*, 1996, **110**: 1035
- [13] Mizutani M et al. *Plant Cell Physiol*, 1993, **34**: 481
- [14] Teutsch GH et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 4102
- [15] Fahrendorf T et al. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **305**: 509
- [16] Shimada Y et al. *FEBS Lett*, 1999, **461**: 241
- [17] Martens S et al. *Plant J*, 1999, **20**: 611
- [18] Bak S et al. *Plant Cell*, 2001, **13**: 101
- [19] Hedden P et al. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, **48**: 431
- [20] 曾广文等. *植物生理学*, 成都: 成都科技大学出版社, 1998
- [21] Chiang HH et al. *Plant Cell*, 1995, **7**: 195

- [22] Sun T *et al. Plant Cell*, 1992, **4**: 119
[23] Bak S *et al. Plant J*, 1997, **11**: 191
[24] Salaun JP *et al. Drug Metabol Drug Interact*, 1995, **12**: 261
[25] Frey M *et al. Science*, 1997, **277**: 696
[26] Funk C *et al. Plant Physiol*, 1993, **101**: 1231
[27] Frear DS *et al. Pesticide Biochem Physiol*, 1991, **41**: 274
[28] Mougín C *et al. Plant Sci*, 1990, **66**: 195
[29] Fonne-Pfister R *et al. Phytochemistry*, 1990, **29**: 2793
[30] McFadden JJ *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **168**: 206
[31] O' Keefe DF *et al. Plant Physiol*, 1994, **105**: 473
[32] Lacour, T *et al. Biochem Biophys Acta*, 1999, **1433**: 87
[33] Siminszky B *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 1750
[34] Ye WZ *et al. J Hort Sci Biotech*, 2003, **78**: 319

Plant Cytochrome P450

Xiao-Lin Yu, Jia-Shu Cao*, Hui-Mei Cui, Wan-Zhi Ye

(*Department of Horticulture, College of Agri-Biotechnology of Zhejiang University; The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Hangzhou 310029, China*)

Abstract The isolation of plant cytochrome P450 genes, and their functions in biosynthesis of metabolites such as phenylpropanoid, glucosinolates, IAA and terpenoid, and detoxification of some natural and synthetical chemicals were briefly reviewed. It was also proposed in our paper that further research of this area will be focused on the identification of more cytochrome P450 genes, analysis of their biological functions, and elucidation of the role of cytochrome P450 on herbicide resistance and their application in environment biological recovery.

Key words plant cytochrome P450; isolation gene; biosynthesis; detoxification

Received: December 31, 2003 Accepted: July 8, 2004

This work was supported by the Key Sci-technology Project of Zhejiang Province (No.021102536)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn