

查尔酮合成酶基因

蒋明 曹家树*

(浙江大学蔬菜研究所细胞与分子生物学实验室, 杭州 310029)

摘要 查尔酮合成酶基因是苯丙氨酸代谢途径中的关键基因, 在类黄酮类物质合成中扮演着重要的角色, 调控着色素合成、防御反应、植物育性等生理生化过程, 对植物的生长发育起着至关重要的作用。现对查尔酮合成酶在苯丙氨酸代谢途径中的地位、基因表达特性、基因功能以及基因进化等方面的进展做一介绍。

关键词 查尔酮合成酶基因; 植物育性; 植物花色; 表达特性; 基因进化

查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是类黄酮类物质合成的关键酶, 在苯丙氨酸合成途径中, 香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 在查尔酮合成酶催化下产生苯基苯乙烯酮^[1,2]。在这一过程中, 查尔酮为类黄酮类物质提供了基本的碳架结构, 为类黄酮、黄酮醇、黄烷酮、花青素糖苷及其他物质的合成提供了保障。查尔酮合成酶在植物中广泛存在, 在很多生理生化活动中起着重要作用, 是近年来植物生理生化和分子生物学研究的热点之一。CHS 的功能主要表现在色素合成、防 UV 照射、抵御病原真菌感染、根瘤形成、植物育性、调节生长素运输、抗虫等方面^[3-9], 近年来均有大量的相关报道。

查尔酮合成酶基因广泛存在于高等植物中, 已从裸子植物、被子植物中克隆到了大量的 CHS 基因, 并对它们的功能进行了研究和分类。近年来, 研究人员还从蕨类植物松叶蕨(*Psilotum nudum*)^[10]甚至苔藓植物 *Marchantia paleacea* var. *diptera*^[11]中克隆到了 CHS 基因或类似 CHS 基因, 为研究 CHS 进化提供了重要依据。本文就 CHS 在苯丙氨酸代谢途径中的功能、其基因表达特性、基因功能及基因进化等方面的进展进行论述。

1 CHS 基因及 CHS 在苯丙氨酸合成途径中的作用

CHS 基因的编码区十分保守, 不同科之间的氨基酸同源性在 80% 以上^[12], cDNA 全长约 1.2 kb, 编码近 400 个氨基酸。CHS 基因的结构也十分保守, 除金鱼草的 *AmCHS* 基因有 2 个内含子外, 其他 CHS 基因均只有一个内含子^[13]。Ferrer 等^[14]对苜蓿 (*Medicago sativa*)CHS 2 的三维晶体结构研究表明,

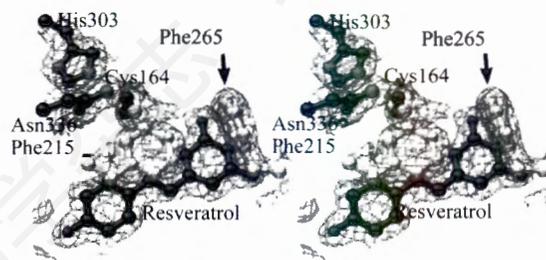


图 1 CHS-白藜芦醇复合体的电子密度图^[14]

Cys164、His303 和 Asn336 分别为 CHS 基因的 3 个活性位点, Phe215 和 Phe265 为苯丙氨酸残基。

CHS 具有 Cys164、His303 和 Asn336 三个活性位点(图 1)及两个决定底物特异性的苯丙氨酸残基 Phe215 和 Phe265^[15], 此外, 还有特别保守的信号序列 G378FGPG^[16]。

在苯丙氨酸代谢途径中(图 2)^[17], 苯丙氨酸在苯丙氨酸脱氨酶的作用下生成肉桂酸, 肉桂酸经肉桂酸羧化酶、4-香豆酰辅酶 A 连接酶的催化生成香豆酰辅酶 A, 然后在 CHS 的作用下, 与丙二酰辅酶 A 结合生成苯基苯乙烯酮即查尔酮, 查尔酮则在苯基苯乙烯酮黄烷酮异构酶的作用下生成具有诸多生理活性的黄烷酮物质。再由黄烷酮衍生出黄酮、异类黄酮、黄酮醇、黄烷醇、翠雀素糖苷和花青素糖苷等次生代谢物质。因此, CHS 在苯丙氨酸代谢途径中扮演着极其重要的角色, CHS 基因的沉默、超表达或者基因突变都将直接或间接影响到该过程, 从而对色素合成、抗病性、抗 UV 等方面产生一定影响。

收稿日期: 2006-12-26 接受日期: 2007-04-10

浙江省重大科技项目(No.2005C12019-02)和国家自然科学基金(No.30370975)资助

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

(*Chrysanthemum morifolium*)的一个 *CHS* 基因导入开粉红色花的菊花中, 结果分别获得了开浅红色和白色花的转基因植株。以矮牵牛“Red Star”为材料, Koseki 等^[27]在 mRNA 水平上分析了 6 个花青素生物合成过程中的重要基因, 发现只有 *CHS* 基因的表达受到抑制而使花冠形成红白相间的现象。Wang 等^[28]利用农杆菌介导法, 将正义 *CHSA* 基因片断导入烟草, 使其超表达, 结果转基因烟草的花色由粉红变为白色。此外, Deroles 等^[29]以洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)为材料, 利用农杆菌介导法转入反义 *CHS* 基因, 发现转基因植株的花色变浅, 甚至产生开白花的植株。Fukusaki 等^[30]利用 RNAi 技术将 *CHS* mRNA 导入夏堇(*Torenia hybrida*), 发现花色由蓝变白。

Hemleben 等^[31]对紫罗兰(*Matthiola incana*)白花突变体的研究表明, 发现该突变是由单核苷酸替代造成的, 其中一个编码精氨酸的 AGG 变成了编码丝氨酸的 AGT, 而且突变后的 *CHS* 没有生理活性, 从而影响花色素的形成。

3.2 *CHS* 基因与逆境

植物具有对不良环境的适应和忍耐能力, 在各种胁迫下作出积极应答, 激发相关基因的表达, 从而在生理生化上表现出对逆境的抵御反应。一些次生代谢物质如木质素、胍胍质、富含羟脯氨酸糖蛋白、富含甘氨酸糖蛋白、植物抗毒素、几丁质酶、葡聚糖酶及一些蛋白酶抑制剂在逆境反应中起着十分重要的作用^[32], 这些代谢物质均通过苯丙氨酸代谢途径调节合成, 而 *CHS* 基因在此过程中起着关键作用。

Cui 等^[33]用玉米小斑病(*Bipolaris maydis*)病菌感染高粱幼苗, 发现 *CHS* 的表达量明显增加, 并且抗性高的品种比抗性低的品种在表达量更大, 表达持续的时间更长。Ryan 等^[34]利用拟南芥的突变体为材料, 发现 *CHS* 及其同工酶基因的突变会导致对 UV 敏感, 其中的 *CHI* 突变型为特别敏感类型。Michael 等^[35]用菜豆炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianum*)提取物处理菜豆(*Phaseolus vulgaris*)发现, 处理 20 min 后, *CHS* 的表达量明显提高, 并在处理后 2.5 h 时达到最大值, 说明该 *CHS* 基因受提取物中的激发因子诱导。

3.3 *CHS* 基因与雄性不育

类黄酮类物质在植物花粉发育中有着重要的作用, 近年来的研究表明, *CHS* 基因与雄性不育相关, 相关研究主要在矮牵牛、玉米、水稻等植物上进行。Pollak 等^[36]研究矮牵牛后认为, 类黄酮物质对花粉萌发十分重要, 缺乏 *CHS* 的突变体不产生类黄酮并且是

雄性不育的, 通过添加类黄酮类物质, 花粉管生长恢复正常。Ylstra 等^[37]通过离体培养烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉证实培养基中加入类黄酮物质能使花粉恢复正常功能。van der Meer 等^[8]把花椰菜花叶病毒 35S 启动子和反义 *CHS* 基因导入矮牵牛, 发现花药中的色素合成受到抑制, 花药变为白色, 而且花粉不能正常萌发而导致雄性不育。Napoli 等^[5]在矮牵牛自交系中发现一花色突变体 *wha*, 该突变体花冠颜色较野生型浅, 花药由黄色变为白色, 而且雄性不育, 转基因互补实验证明该现象是由 *CHSA* 基因发生变异所引起的。

Mo 等^[6]认为 *CHS* 基因突变体在花粉管生长过程中缺少某些重要物质, 在对玉米(*Zea mays*)和矮牵牛白色花粉 *CHS* 突变体的研究发现, 授粉过程中若加入类黄酮可使花粉管生长恢复正常, 从而恢复它们的育性。郑宏红等^[38]采用 RNA 原位杂交技术对水稻类 *CHS D5* 基因进行细胞学定位, 表明 *D5* 基因特异地在水稻花药绒毡层及维管束周围细胞中大量表达。为了进一步研究其功能, 将水稻肌动蛋白基因启动子驱动的 *D5* 正义及反义基因分别转入水稻中, 对转基因水稻花粉不同发育时期进行观察, 发现表达了反义 *D5* 基因的花粉形态表现明显不正常, 推测 *D5* 基因对花粉的发育起着重要作用。

4 *CHS* 基因的进化

CHS 基因广泛存在于苔藓类植物、蕨类植物、裸子植物和被子植物中, 而且基因序列相对比较保守, 用于进化分析具有十分重要的意义。Ursula 等^[39]利用 *CHS* 基因的编码区分析了 7 个种的 8 个基因序列, 这 7 个物种分别为大麦(*Hordeum vulgare*)、辛夷(*Magnolia liliiflora*)、矮牵牛(*P. hybrida*)、五裂毛茛(*Ranunculus acer*)、玉米(*Z. mays*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)、欧芹(*Petroselinum hortense*)等, 发现在核苷酸和氨基酸水平上分别有 66% 和 80% 的相似性, 而且单子叶植物对碱基 G 和 C 有偏好性。

黄金霞等^[40]用 TAIL-PCR 方法从苔类植物半月苔(*Lunularia cruciata*)中克隆到了一段长约 1 000 bp 的基因片段, 推断的酶反应 4 个催化位点与已知晶体结构的紫花苜蓿 *MCHS2A* 基因相同, 证明了苔藓类植物中可能存在类 *CHS* 基因, 将 *CHS* 基因的起源时间推到苔藓类植物出现之前。以该序列和两种蕨类植物松叶蕨(*P. nudum*)和问荆(*Equisetum arvense*)的 *CHS* 基因序列构建进化树, 发现除十字花科、豆科和禾

本科外,大部分科的 *CHS* 基因分布在不同分支上,认为差异形成与被子植物的生活史、生活环境、花的特性等的多样性有关。

苔藓类植物大约在 4.5 亿年前跟古维管束植物分离,是研究陆生植物生物合成途径进化的理想材料。最近, Jiang 等^[41]从模式植物葫芦藓科小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 中克隆到了一个 *CHS* 基因 *PpCHS*, 小立碗藓又名球蒴藓, 分布于欧洲及东北亚, 是一种土生藓类, 进化分析表明, 该基因处于进化树的底部, *PpCHS* 基因是目前为止 *CHS* 家族的最原始基因, 在研究植物进化过程中有着重要的地位。王金玲等^[42]认为 *CHS* 基因的外显子 2 基因比较保守, 利用最简约法进行分析, 发现除少数科分散在不同分支外, 大部分科的同科序列可各自聚为一组, 认为 *CHS* 基因家族的成员在不同科中的重复和丢失事件式样不同, 很难用来解决不同科中直系同源成员的系统发育问题, 但可用来进行科以下分类等级的研究。杨继等^[42]认为 *CHS* 基因在不同植物谱系中发生了不同程度的重复和分化, 导致在多数植物基因组中存在具不同表达特性的 *CHS* 基因和类 *CHS* 基因。*CHS* 家族表达模式的分化在很大程度上受启动子和顺式调节元件的影响, 最终导致重复基因的亚功能化^[43,44], 而发生在 *CHS* 活性位点附近的碱基替换则导致形成不同的类 *CHS* 基因^[45,46]。

5 小结

由于 *CHS* 在苯丙氨酸代谢途径及植物生长发育中的重要作用, 对它的研究有着很大的理论意义和实践价值。*CHS* 基因的功能多种多样, 涉及植物生长的诸多过程, 如逆境反应、植物育性、植物花色等, 表达部位和时期也不尽相同, 有的在营养器官中出现, 有的在生殖器官中表达, 还有一些在外界环境诱导下表达, 搞清基因家族各成员的作用及相互关系, 对系统研究 *CHS* 基因有着重要的意义。另外, *CHS* 基因的起源较早, 不论在低等植物还是高等植物, 都存在 *CHS* 基因或类 *CHS* 基因, 对 *CHS* 基因展开进化研究可为植物进化提供一些分子依据。

我们实验室前不久从白菜花蕾 cDNA 中克隆到了一个 *CHS* 基因 *BcCHS* (NCBI 登录号: EF101136), 该基因全长 1 188 bp, 编码 395 个氨基酸。在获得 *BcCHS* 的基础上, 还从 13 种十字花科作物中克隆到

了它的同源基因, 为研究十字花科 *CHS* 基因的进化提供了依据。目前, 实验室正在利用转基因技术开展 *BcCHS* 基因的功能研究。

参考文献(References)

- [1] Heller W *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1980, **200**: 617
- [2] Holton TA *et al.* *Plant Cell*, 1995, **7**: 1071
- [3] Koes RE *et al.* *Bioessays*, 1993, **16**: 123
- [4] Martin CR *et al.* *Int Rev Cytol*, 1993, **147**: 233
- [5] Napoli CA *et al.* *Plant Physiol*, 1999, **120**: 615
- [6] Mo Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 7213
- [7] Chen JZ *et al.* *Plant Mol Biol*, 2004, **55**: 521
- [8] van der Meer IM *et al.* *Plant Cell*, 1992, **4**: 253
- [9] Jacobs M *et al.* *Science*, 1988, **241**: 346
- [10] Yamazaki Y *et al.* *Planta*, 2001, **214**: 75
- [11] Harashima S *et al.* *Plant Cell Rep*, 2004, **23**: 167
- [12] 王金玲等. *科学通报*, 2000, **45**: 942
- [13] Sommer H *et al.* *Mol Gen Genet*, 1986, **202**: 429
- [14] Ferrer JL *et al.* *Nat Struct Biol*, 1999, **6**: 775
- [15] Jez JM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 5319
- [16] Kim SH *et al.* *Plant Growth Regul*, 2002, **38**: 173
- [17] 刘忠松等. *植物雄性不育机理的研究及应用*, 北京: 中国农业出版社, 2001, 60
- [18] Samappito S *et al.* *Planta*, 2002, **216**: 54
- [19] Qu LJ *et al.* *Sex Plant Reprod*, 1997, **10**: 181
- [20] Ito M *et al.* *Mol Gen Genet*, 1997, **255**: 28
- [21] Ryder TB *et al.* *Mol Gen Genet*, 1987, **210**: 219
- [22] Koes RE *et al.* *Plant Mol Biol*, 1989, **12**: 213
- [23] Coen ES *et al.* *Cell*, 1986, **47**: 285
- [24] Van der Krol AR *et al.* *Mol Gen Genet*, 1990, **220**: 204
- [25] Elomaa P *et al.* *Biotechnology*, 1993, **11**: 508
- [26] Courtney-Gutterson N *et al.* *Biotechnology*, 1994, **12**: 268
- [27] Koseki M *et al.* *Plant Cell Physiol*, 2005, **46**: 1879
- [28] Wang CK *et al.* *Bot Stud* 2006, **47**: 71
- [29] Deroles SC *et al.* *Mol Breed*, 1998, **4**: 59
- [30] Fukusaki E *et al.* *J Biotechnol*, 2004, **111**: 229
- [31] Hemleben V *et al.* *Plant Mol Biol*, 2004, **55**: 455
- [32] 廖靖军等. *北京大学学报(自然科学版)*, 2000, **36**: 566
- [33] Cui Y *et al.* *Physiol Mol Plant Pathol*, 1996, **49**: 187
- [34] Ryan KG *et al.* *Z Naturforsch*, 2001, **56c**: 745
- [35] Michael A *et al.* *Eur J Biochem*, 1983, **129**: 593
- [36] Pollak PE *et al.* *Plant Physiol*, 1993, **102**: 925
- [37] Ylstra B *et al.* *Plant Physiol*, 1995, **107**: 639
- [38] 郑宏红等. *科学通报*, 2000, **45**: 1132
- [39] Niesbach-klosgen U *et al.* *J Mol Evol*, 1987, **26**: 213
- [40] 黄金霞等. *植物学报*, 2004, **46**: 10
- [41] Jiang C *et al.* *Phytochemistry*, 2006, **67**: 2531
- [42] 杨继等. *科学通报*, 2006, **51**: 745
- [43] Clegg MT *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 7016
- [44] Yang J *et al.* *J Mol Evol*, 2004, **58**: 54
- [45] Yang J *et al.* *Mol Biol Evol*, 2002, **19**: 1752
- [46] Austin MB *et al.* *Chem Biol*, 2004, **11**: 1179

Chalcone Synthase Gene

Ming Jiang, Jia-Shu Cao*

(Lab of Cell & Molecular Biology, Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Chalcone synthase gene is one of the key genes in phenylpropanoids pathway for producing flavonoids, isoflavonoids, anthocyanin and other secondary metabolism products in plants. It plays important roles in the physiological and biochemic progress of pigment synthesis, defense response and plant fertility. In this article, we reviewed the role of chalcone synthase in phenylpropanoids pathway and its progress in expression pattern, function characters and evolution of chalcone synthase genes.

Key words chalcone synthase gene; plant fertility; flower color; expression pattern; gene evolution

Received: December 26, 2006 Accepted: April 10, 2007

This work was supported by the Key Sci-technology Project of Zhejiang Province (No.2005C12019-02) and the National Natural Science Foundation of China (No.30370975).

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