

植物甾醇与三萜类皂苷生物合成基因调控的研究进展

刘强 丛丽娜*, 张宗申 (大连轻工业学院生物与食品工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要 植物甾醇和三萜类皂苷是2种具有调节生物体系免疫力, 抗血糖过多, 抗癌等生理功能的植物次生代谢产物。它们在生物合成过程中有许多关键酶, 如鲨烯合成酶(SS)、鲨烯氧化酶(SE)、氧化鲨烯环化酶(OSCs)和糖基转移酶(GT)等。综述了这些关键酶在催化机理、基因克隆与表达调控方面的研究进展, 并简要探讨了通过这些关键酶的代谢工程研究来增产植物甾醇和三萜类皂苷的广阔前景。

关键词 植物甾醇; 三萜类皂苷; 鲨烯合成酶; 鲨烯氧化酶; 氧化鲨烯环化酶; 糖基转移酶

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)19-4844-03

Research Progress in Genetic Analysis of the Biosynthesis of Phytosterols and Triterpene Saponins

LIU Qiang et al (College of Bio & Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian, Liaoning 116034)

Abstract The phytosterols and triterpene saponins are two kinds of plant secondary metabolites, which have the immune system modulation functions, anti-hyperglycemic activities and anti-cancer effects in the organism. There are several pivotal enzymes in the biosynthesis, such as squalene synthase (SS), squalene epoxidase (SE), oxidosqualene cyclases (OSCs), glucosyltransferase (GT) and so on. Here, we summarized the research progress in the catalysis mechanism, gene cloning, expression and regulation of those enzymes. In addition, in this paper also the extensive background of increasing production of the phytosterols and triterpene saponins through the engineering metabolites of the important enzymes were briefly discussed.

Key words Phytosterols; Triterpene saponins; Squalene synthase; Squalene epoxidase; Oxidosqualene cyclase; Glucosyltransferase

目前, 研究药用植物次生代谢产物生物合成的基因调控已成为分子生物学十分活跃的前沿研究领域, 其中植物甾醇和三萜类皂苷是植物次生代谢产物的重要组成部分, 其含量和组分又主要取决于生物合成关键酶以及在细胞中的表达水平^[1]。由于这类化合物具有很好的社会和经济效益吸引了众多学者的广泛研究兴趣, 因此, 探讨植物甾醇与三萜类皂苷生物合成途径及基因调控的影响具有重要的现实意义。笔者综述了这方面的最新研究进展。

1 植物甾醇与三萜类皂苷的生物合成

植物新陈代谢分为初生代谢(plant primary metabolism)与次生代谢(plant secondary metabolism)。植物次生代谢产物是指植物体中一大类并非植物生长发育所必需的小分子的有机化合物, 如甾醇、生物碱、萜类、黄酮类和酚类等化合物。研究表明, 利用植物新陈代谢促使植物甾醇和三萜类皂苷增产, 最行之有效的办法便是改良植物中甾醇与三萜类的生物合成途径。

目前, 对植物甾醇和三萜类皂苷的生物合成途径已有初步认识。异戊二烯途径是获得这些代谢产物的必由途径^[2], 其生物合成路线为甲羟戊酸(Mevalonic acid)生成的异戊二烯二磷酸(IPP)在香草二磷酸合成酶(GPS)作用下首先形成香叶二磷酸(GPP), 接着利用法呢二磷酸合成酶(FPS)转化成法呢二磷酸(FPP), 又在鲨烯合成酶(Squalene synthase, SS)的作用下合成鲨烯, 然后经鲨烯环氧酶(Squalene epoxidase, SE)催化转变为2,3-氧化鲨烯(2,3-oxidosqualene)^[3]。此SS和SE酶催化反应是异戊二烯途径的限速步骤, 也是甾醇和三萜类等代谢产物的前期共同代谢途径。最后, 2,3-氧化鲨烯经过2,3-氧化鲨烯环化酶(OSCs)的环化作用得到植物甾醇和三萜类骨架。三萜类骨架依赖细胞色素P450单加氧酶、糖基转移酶和糖苷酶进行氧化、置换及糖基化等化学修饰, 最终获得不同种类的三萜类皂苷产物(图1)。由于目前对植物甾

醇与三萜类皂苷生物合成酶及其生化途径的认知较少, 所以只有详尽阐明其生物合成途径的分子基础, 才有可能通过改良单个或多个酶促步骤, 实现人工调控植物甾醇与三萜类皂苷在植物细胞中的产量。

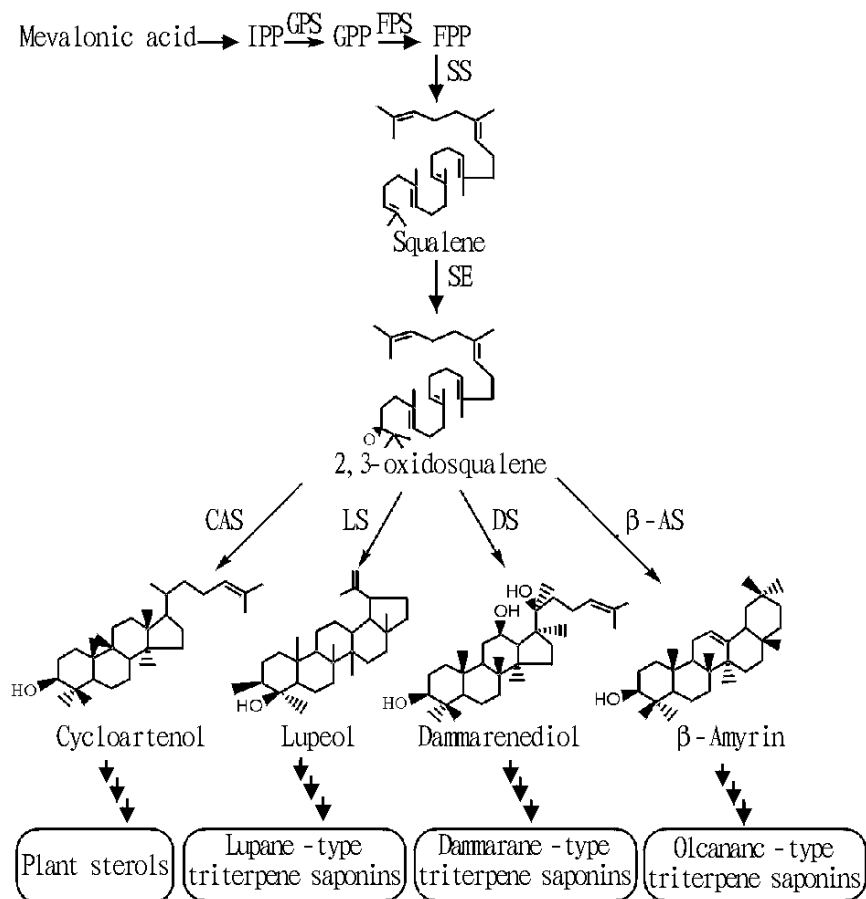


图1 植物甾醇和三萜类皂苷的生物合成途径

2 植物甾醇与三萜类皂苷共同代谢途径的基因调控

如前所述, 在植物甾醇和三萜类生物合成过程中, 鲨烯合成酶(SS)和鲨烯环氧酶(SE)在其前期的共同代谢途径中起到关键性作用, 其中SS酶催化是起始步骤。在中间体环丙甲醇二磷酸介导下, SS酶催化2个法呢二磷酸(FPP)分子, 使它们以头对头形成具有还原性的二聚体。Karst等^[4]通过动物和酵母的SS酶突变型实验, 已充分了解该酶在甾醇生物合成中的控制作用。Choi等^[2]经实验证明植物人参的SS酶在植物甾醇和三萜类皂苷的生物合成中具有很强的调控功能, 它的转录物存在于各种组织中, 并且在枝叶尖和根部中含量最高。植物人参SS酶的转录物经过甲基茉莉酸酯(Methyl jasmonate, MeJA)处理12~96h, 其含量明显上升, 原因

作者简介 刘强(1979-), 男, 辽宁抚顺人, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物次生代谢产物基因调控。* 通讯作者, 博士, 教授, Email: congln@dili.edu.cn.

是 MJA 能够诱导鲨烯环氧酶(SE) 和 - 香树精合成酶(- Anyrin synthase, - AS) 的活性。Seo 等^[5] 将植物人参根中 SS 酶克隆到植物高效表达载体 pCAMB A1302, 再通过根癌农杆菌介导转化刺五加(*Eleutherococcus senticosus*) 合子胚愈伤组织, 使其表达代谢终产物。结果表明, 转基因植物的 SS 酶活性是野生型的 3 倍。由此可见, 增强植物人参 SS 酶的活性会使植物甾醇即人参皂苷的含量显著增加, 同时也能提高植物人参三萜类皂苷的产量, 所以 SS 酶是植物甾醇和三萜类产物共同生物合成途径的第 1 个关键酶。

第 2 个关键酶是鲨烯环氧酶(SE), 它催化鲨烯是在 C=C 之间插入 1 个氧原子形成环氧化物, 即 2,3-氧化鲨烯^[6]。Choi 等^[2] 在研究人参皂苷合成时, 已识别 3 个编码 SE 酶的转录物, 这表明在人参基因组中 SE 酶形成了一个小的多基因家族。Suzuki 等^[6] 通过 DNA 琼脂印迹分析, 在苜蓿基因组中发现了 2 个 SE 基因(SE1 和 SE2)。SE1 和 SE2 编码的蛋白与人参中公认的 SE 编码蛋白高度相似, 分别有 77.1% 和 74.4% 的序列完全相同。用 MJA 处理苜蓿后 SE1 转录物并没有被诱导, 相反, SE2 转录物的诱导率却很高。这表明 SE2 并不是 SE1, 它们在植物甾醇和三萜类皂苷合成过程中都起到重要的作用。

3 植物甾醇与三萜类皂苷分别代谢途径的基因调控

合成植物甾醇和三萜类皂苷的第 1 个关键步骤是氧化鲨烯环化酶(OSCs) 作用于 2,3-氧化鲨烯环化形成甾醇和三萜类产物各自的前体物质, 如环阿齐醇(Cydoartend)、原人参萜二醇(Protopanaxadiol) 等。到目前已经从不同植物中分离得到了 4 个编码 OSCs 酶的基因, 即羽扇醇合成酶(Lupeol synthase, LS)、- 香树脂合成酶(- Anyrin synthase, - AS)、达玛烯二醇合成酶(Damarenediol synthase, DS) 和环阿齐醇合成酶(Cydoartend synthase, CAS)^[2,6,7], 其中前 3 个酶是合成各类三萜类产物的前体, 第 4 个酶是甾醇的前体(图 1)。由于大多数三萜类皂苷是从齐墩果烷(Qeane) 和达玛烯(Dammarane) 衍化而来的, 因此 - AS 和 DS 酶对三萜类皂苷合成有至关重要的作用。Choi 等^[2] 已经从 MJA 处理的人参发根表达序列标签(EST) 中识别了编码 OSCs 酶的 3 个转录调节子, 并且证实其中一种 OSC 酶与齐墩果烷的 - AS 十分相似, 其他 2 种与人参和豌豆中的 - AS 十分相似, 并具有催化氧化鲨烯产生单个环化产物的功能。但迄今还没有实例可以证明 OSCs 中的 DS 酶能够产生原人参萜二醇(Protopanaxadiol)。Böhmann 等^[8] 分析发现这些 OSCs 酶的氨基酸序列同源性显著, 但又能产生不同类型的三萜类化合物。由此推测通过序列同源性比较, 有可能分离出参与不同三萜类生物合成的 DS 酶候选物。对 OSCs 酶进行不可逆抑制和变异分析, 结果显示它在与底物结合时需要高保守的氨基酸模体 DCTAE。

4 植物甾醇后期生物合成的基因调控

植物甾醇生物合成的第 1 个特定反应是 2,3-氧化鲨烯环化形成 4,4-二甲基 9,19-环丙烷环的环阿屯醇(Cydoartend) 中间产物。植物体中从环阿屯醇转化成植物甾醇的过程需要在各种酶复合体催化下在 C-4 位置上去除 2 个甲基。实验证明, 甾醇分子只有在 C-4 上除去 2 个甲基才具有细胞膜结构成分等功能^[9]。

对玉蜀黍(*Zea mays*) 植物的生化研究表明^[10], 如果阻断 4-甲基氧化酶(Sterol 4-methyl oxidase, SMO) 活性, 植物代谢能力因 C-4 甲基甾醇的积累受到严重影响。也就是说, SMO 负责植物甾醇 C-4 脱甲基过程的起始氧化步骤, 即产生 4-羧基甾醇衍生物。最近, Darnet 等^[9] 在拟南芥中克隆了 2 类 SMD 基因, 即 SMD1 和 SMD2。为了鉴定这些基因的功能, 他们利用病毒诱导基因沉默法诱导其目的基因表达。即将 SMD1 和 SMD2 的 cDNA 片段插入到病毒载体, 其重组病毒转录子在烟草属(*Nicotiana benthamiana*) 植物转化。经检测, 若 SMD1 基因在该转录子中沉默, 就积累大量中间体 4,4-二甲基 9,19-环丙烷环甾醇, 而 4-甲基甾醇的表达水平不受影响。相反, 当 SMD2 基因沉默时, 4-甲基甾醇大量积累, 而 4,4-二甲基 9,19-环丙烷环甾醇表达正常。这些实验表明, 这 2 个不同的 cDNA 基因在高等植物中编码了不同类型的 C-4 甲基甾醇氧化酶, 它们分别调控 4,4-二甲基甾醇和 C-4 甲基甾醇前体的表达水平。

5 三萜类皂苷后期修饰的基因调控

三萜类皂苷产物是在 2,3-氧化鲨烯环化作用下形成不同的三萜类产物前体物, 如 - 香树精(- Anyrin)、原人参萜二醇(Protopanaxadiol) 等作为底物, 在一系列酶的催化下, 包括细胞色素 P450、酰基转移酶以及糖苷转移酶, 生物转化形成如燕麦镰孢菌素(Avenacin)、人参皂苷(Ginsenoside) 等极具药用价值的产物。目前关于从 - 香树精至燕麦镰孢菌素的生物合成途径还不完全清楚, 但 Osbourn 等在燕麦中已制备了 7 个皂苷缺陷型突变体(即 sad 突变体)。实验表明, sad1 突变体具有 - 香树精合成酶的基因缺陷型, 即导致 2,3-氧化鲨烯环化步骤发生障碍。sad2 能积累 - 香树精, 这说明该突变体可能阻断了细胞色素 P450 介导的早期合成途径, 而 sad3 和 sad4 属于皂苷糖基化缺陷型。sad7 突变体积累一个产物, 它具有与燕麦镰孢菌素 A1 相同的糖基, 但 N-甲基氨基苯甲酸酯基团消失, 这说明 sad7 与酰基化有关(图 2)。其余突变体(sad5、sad6 和 sad8) 目前还没有被鉴定出其生化缺陷位点。但迄今为止, 有关燕麦镰孢菌素生物合成的基因克隆和表达仍未见报道。

近年来, 人参皂苷生物合成的基因调控已成为该领域研究的热点。图 2 展示了目前被认同的人参皂苷生物合成途径及可能编码的酶^[11]。其中人参皂苷的三萜类苷元——原人参萜二醇是由 2,3-氧化鲨烯生物合成的, 接着原人参萜二醇在植物细胞色素 P450 的作用下转化成原人参萜三醇, 最后在糖基转移酶催化下使这些三萜类苷元添加 1 个或多个单糖得到不同的人参皂苷。在三萜类苷元生物合成皂苷时, 原人参萜二醇型骨架 C-3 和 C-20 的羟基进行了糖基化, 形成了原人参萜二醇型人参皂苷; 而原人参萜三醇则是 C-6 和 C-20 进行了糖基化, 形成了原人参萜三醇型人参皂苷^[3]。因此, 皂苷糖基转移酶(Glucosyltransferase, GT) 是人参皂苷代谢途径上的一个关键酶。

Vogt 等^[12] 从表达序列标签(EST) 数据库中鉴定了 9 种人参糖基转移酶基因, 其中 5 种具有一个相同的 PSPG 序列保守域, 而 PSPG 是参与植物次生代谢合成的葡萄糖基转移酶。通过对编码和结构域的研究, Choi 等^[2] 也从 EST 数据库中识

别出 25 种细胞色素 P450 和 5 种 - 糖苷酶候选基因序列。研究表明, 将原人参萜二醇转化成人参皂苷的另一种主要苷元——原人参萜三醇是由细胞色素 P450 家族的一员完成的。关于原人参萜三醇的糖基化, 在已识别的 5 种 - 糖苷酶中^[13], 实验发现有些人参皂苷可能会因葡萄糖裂解而转化

成其他形式, 这个转化可能是由 - 糖苷酶等酶的调解。另一个发现是其中有 3 种 - 糖苷酶所编码的蛋白质序列与以前分离的 2 种酶相似性高, 后者分别修饰呋甾醇糖基化和燕麦皂苷^[14]。

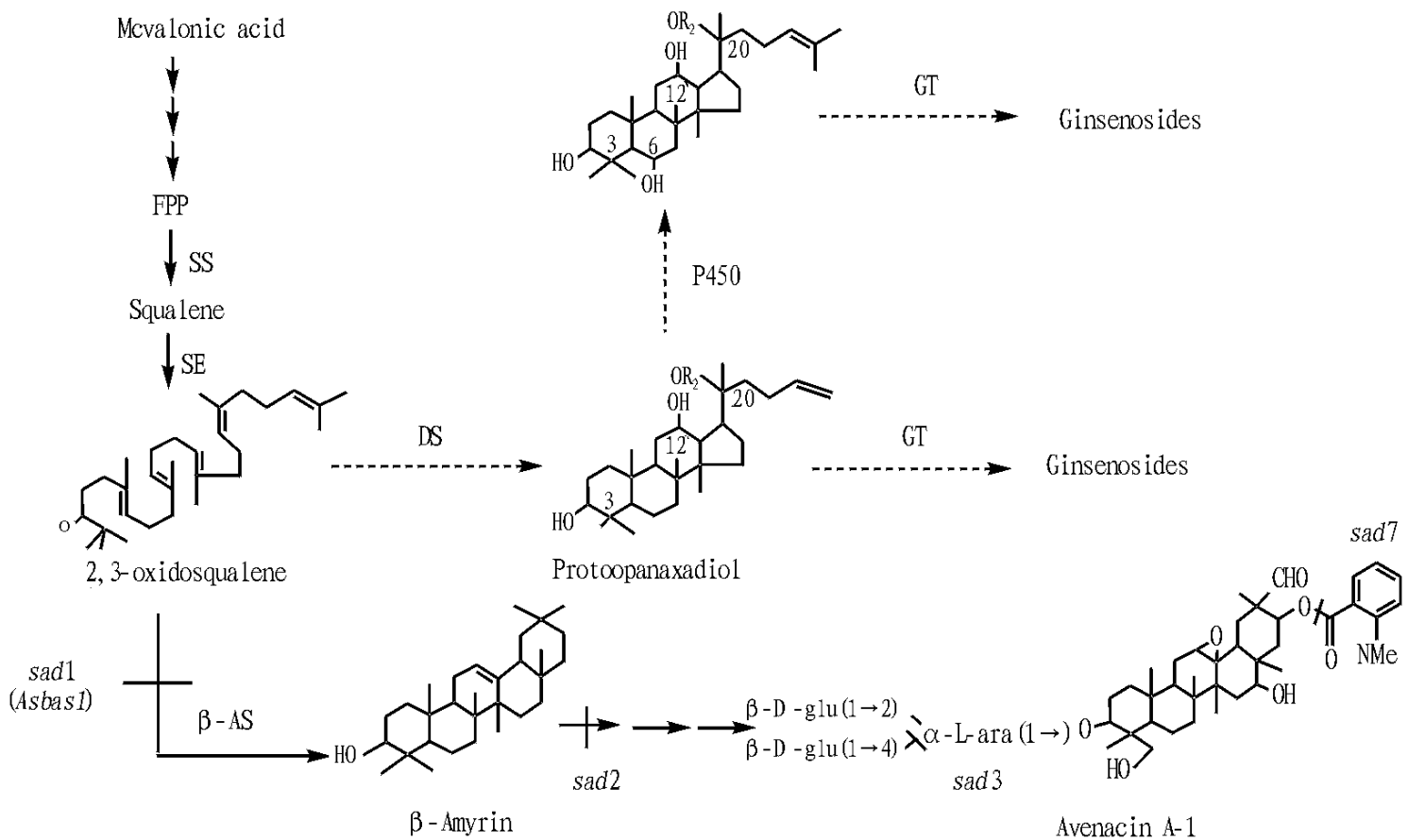


图2 在燕麦和人参皂苷中植物甾醇和三萜类皂苷的生物合成

6 展望

综上所述, 尽管对植物甾醇与三萜类生物合成代谢途径的研究取得了一定的进展, 但由于植物甾醇与三萜类物质的代谢是一个受多因素调节、非常复杂的动态变化过程, 距离完全破解该类物质的代谢途径尚有很多疑问急待解决。通过对次生代谢相关合成酶性质以及相关基因异源表达酶活性和反应动力学的分析, 可以筛选和确定植物甾醇和三萜类次生物质代谢的关键酶基因, 然后通过人工改造关键酶基因并使之高效表达, 达到逐步确定代谢途径的关键调节位点。目前对植物甾醇和三萜类皂苷生物合成途径中各种关键酶的协同性了解尚浅, 仅仅通过调控某一种关键酶基因不能足以提高其代谢终产物产量, 主要原因就是对代谢途径中间体的复杂性缺乏基础性理论。

另外, 也可以利用遗传学技术和原理诱导和筛选敏感株突变体, 研究相关酶在整个代谢途径中的作用。由于植物甾醇、皂苷、油菜素内酯类激素等都来自于相同的前体物质, 只是在共同中间代谢物位点处开始分叉, 然后在各种调控因子作用下, 沿着各自的代谢方向进行生物合成。目前关于从合成前体物质向几种代谢终产物的分配比例、分配机制了解的还不多, 但该问题对最终人工调节植物次生代谢、生产需要目的物非常关键, 这是一个需要长期研究的基础或应用基础性问题, 需要生物学、药学、工程学等多学科的科研工作者共同努力。

参考文献

[1] HARALAMIDIS K, TROJANOVSKA M, OSBOURN A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.

[2] CHI D W, JUNG J, HA Y, et al. Analysis of transcripts in methyl jas-

monate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.

- [3] JUNG J D, PARK H W, HAHN Y, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags[J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.
- [4] KARST F, LACROUX F. Triterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mutants deficient in the early steps of the pathway[J]. *Mol Gen Genet*, 1977, 154(3): 269-277.
- [5] SEO J W, JEONG J H, SHIN C G, et al. Overexpression of squalene synthase in *Heterospora seriococcus* increases phytosterol and triterpene accumulation[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(8): 869-877.
- [6] SUZUKI H, ACHINNE L, XU R, et al. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*[J]. *Plant J*, 2002, 32(6): 1033-1048.
- [7] HAYASHI H, HUANG P, INOUE K. Up-regulation of soyasapogenin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycine max*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(4): 404-411.
- [8] BOHLMANN J, MEYER GAUEN G, CROTEAU R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4126-4133.
- [9] DARNET S, RAHER A. Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4alpha-methyl oxidases[J]. *Biochem J*, 2004, 378(3): 889-898.
- [10] RONDET S, TATON M, RAHER A. Identification, characterization, and partial purification of 4alpha-carboxysterol-C3-dehydrogenase/C4-decarboxylase from *Zea mays*[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 366(2): 249-260.
- [11] QI X, BAKHIT S, LEGGETT M, et al. A gene cluster for secondary metabolite biosynthesis: implications for the evolution of metabolic diversity in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 8233-8238.
- [12] VOGT T, JONES P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(9): 380-386.
- [13] KIM Y W, KANG K S, KIMS Y, et al. Formation of fibillar multimers of oat beta-glucosidase isoenzymes is mediated by the As-Gul monomer[J]. *J Mol Biol*, 2000, 303(5): 831-842.
- [14] WARD T J, HELAVSKI J P, KISILER H C, et al. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9278-9283.