

# 木质素生物合成途径中关键酶基因的分子特征

石海燕, 张玉星

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

**摘要:** 主要对苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)基因、4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate-CoA ligase, 4CL)基因、肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)基因、过氧化物酶(oxidase, POX)基因、漆酶(laccase, LAC)基因、dirigent(DIR)蛋白基因等木质素生物合成途径中关键酶基因的克隆、表达、调控等研究进展进行综述,旨在揭示上述木质素生物合成途径中关键酶基因的分子特征,为通过转基因技术来调控植物体中木质素的含量及其化学组成从而得到改良的新植物资源提供思路。

**关键词:** 木质素;生物合成;基因调控

中图分类号:S184

文献标志码:A

论文编号:2010-2808

## Molecular Characterization of Key Enzyme Genes Related to the Pathway of Lignin Biosynthesis

Shi Haiyan, Zhang Yuxing

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001)

**Abstract:** This review focused on the cloning, expression and regulation of key enzyme genes, such as phenylalanine ammonia-lyase genes (PALs), 4-coumarate-CoA ligase genes (4CLs), cinnamyl alcohol dehydrogenase genes (CADs), peroxidase genes (POXs), laccase genes (LACs), and dirigent genes (DIRs), which were related to the pathway of lignin biosynthesis. It would provide some ideas for regulating content and chemical composition of plant lignin and obtaining improved new plant resource by genetic manipulation at the key metabolic steps through disclosing the molecular characterization of the above key enzyme genes related to the pathway of lignin biosynthesis.

**Key words:** lignin; biosynthesis; genetic regulation

## 0 引言

在植物体中,木质素含量在15%~36%之间,是地球上仅次于纤维素的大分子有机物<sup>[1]</sup>。木质素是一种酚类多聚体,是维管植物细胞壁的重要组成成分,具有机械支持、水分运输和抵抗病菌侵袭等重要生物学功能<sup>[2-4]</sup>。然而,在制浆造纸过程中,将原料木材里的木质素与纤维素分离,不仅耗费能源,而且成本高,废弃物还污染环境;饲草中的木质素还影响牲畜的进食消化;而沙梨等果实中的木质素含量过高则影响品质。因此通过基因工程等技术适当地降低木质素含量或改变木质素的组成成分,将有利于更好地利用资源植物。此文综述了木质素生物合成途径中关键酶基因的分子特

征,为利用转基因技术来调控植物体中木质素的含量及其化学组成提供思路。

木质素的生物合成途径大致分为两步:先是木质素单体的合成,而后是木质素单体聚合成具有生物活性的木质素。在整个木质素生物合成过程中存在众多酶基因的参与,它们共同调控维管植物中木质素的含量及其组成成分。

## 1 木质素单体合成中的酶基因

有十几种酶基因参与了木质素单体合成的调控,这些酶基因主要有:苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)基因、肉桂酸-4-羟基化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)基因、香豆酸-3-羟化

基金项目:河北省教育厅青年基金项目(2010138)。

第一作者简介:石海燕,女,1980年出生,助理研究员,博士,研究方向:植物分子生物学。通信地址:071001 河北省保定市河北农业大学园艺学院, Tel:0312-7528320, E-mail:shyrainbow1980@yahoo.com.cn。

收稿日期:2010-09-27,修回日期:2010-11-16。

酶(coumarate-3-hydroxylase, C3H)基因、香豆醇辅酶A-3-羟化酶(coumaroyl-coenzyme A 3-hydroxylase, CCoA3H)基因、咖啡酸5-羟化基阿魏酸-*O*-甲基转移酶(cinnamate-*O*-methyltransferase, COMT)基因、咖啡酰辅酶A-*O*-甲基转移酶(caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase, CCoAOMT)基因、阿魏酸5-羟化酶(Ferulate 5-hydroxylase, F5H)基因、4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate-CoA ligase, 4CL)基因、肉桂酰CoA还原酶(cinnamyl-CoA reductase, CCR)基因和肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)基因等,但在多途径中还发现了松柏醛5-羟基降解酶(coniferaldehyde 5-hydroxylase, CAld5H)基因和松柏醛甲基转移酶(5-hydroxyconiferaldehyde *O*-methyltransferase, AldOMT)基因等。下文将重点介绍木质素单体合成途径中的PAL、4CL和CAD这三类具有标志性的关键酶基因

### 1.1 苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)基因

苯丙氨酸裂解酶基因(PALs)位于木质素生物合成途径的起步位置,在木质素生物合成途径中起着关键的调控作用。已从多种植物中分离出PAL基因,例如从林木中克隆了杨树、火炬松的PAL基因,模式植物拟南芥中的PAL基因共有4个成员:PAL1 - PAL4<sup>[5-6]</sup>。近几年又从番茄(*Solanum lycopersicum*)<sup>[7]</sup>、烟草(*Nicotiana tabacum*)<sup>[8]</sup>、绿竹(*Bambusa oldhamii*)<sup>[9]</sup>、红参(*Salvia miltiorrhiza*)<sup>[10]</sup>、朝鲜当归(*Angelica gigas*)<sup>[11]</sup>等植物中鉴定出新的PAL基因。

番茄中已经分离出5个PAL基因,对第5个PAL基因-SIPAL5的编码产物序列进行进化分析,结果表明该基因与其它植物PAL基因具有高的同源性,SIPAL5基因序列与烟草中PAL基因序列相似性达到92%,与牵牛(*Ipomoea ni*)中的有87%的相似性,与木薯(*Manihot esculenta*)和长春花(*Catharanthus roseus*)中的也都有84%的相似性。在番茄植物中SIPAL5基因是以多拷贝而存在,在老的叶片和花中优势表达,尽管表达量一直维持相对高,但是从花后5天一直到果实成熟的开始该基因的转录水平逐渐下降,在果实转红期SIPAL5基因的表达水平最低。SIPAL5基因的表达还受到NaCl、甘露醇和冷的诱导,而在脱落酸和双氧水的处理下该基因的表达量逐渐下降。当将番茄暴露在联二-*n*-甲基吡啶环境中3 h, SIPAL5基因的转录量降低,在6 h后其表达开始增强,一直到24 h其表达水平保持稳定,这些研究结果显示SIPAL5基因可能在非生物胁迫应答中发挥作用<sup>[7]</sup>。

### 1.2 4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate-CoA ligase, 4CL)基因

4CL是苯丙烷类代谢途径的最后一个酶,在木质素单体合成过程中发挥重要的调控作用,在4CL基因表达受到抑制的转基因植物中,木质素单体在植物中的组成比例一般发生较大的变化,而且木质素含量均明显下降<sup>[12-14]</sup>;同时在植物体不同的组织中以及木材的不同发育时期,4CL基因的表达特征也呈现出多样性。在被子植物中发现了多个4CL基因,例如已分离克隆了拟南芥、大豆、烟草等多种被子植物的4CL基因;从众多裸子植物中也克隆了4CL基因,例如Voo等<sup>[15]</sup>克隆出了火炬松(*Pinus taeda*)4CL cDNA, Hu等<sup>[16]</sup>分离鉴定了2个美洲山杨(*Populus tremuloides*)4CL基因,4CL1基因在木质茎中正在发育的木质部里表达,表明该基因可能与木质素的合成相关;在苔藓(*Physcomitrella patens*)中也鉴定了1个4CL基因<sup>[17]</sup>。

### 1.3 肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)基因

肉桂醇脱氢酶在木质素单体生物合成的最后阶段起催化作用,在维管植物中抑制CAD的活性则木质素的含量将发生变化,例如在高粱中降低CAD活性则使木质素的总量减少<sup>[18]</sup>。Li等<sup>[19]</sup>从美洲山杨中分离出CAD(PtCAD)的一个同工酶SAD(PtSAD)。PtSAD具有芥子醛的底物特异性,而PtCAD具有阿魏醛的底物特异性。CAD基因已从很多被子植物中被克隆,例如从拟南芥基因组中分离了9个CAD基因,但其中只有3个CAD基因(*AtCAD1*, *AtCAD4*和*AtCAD5*)的编码产物被证明是木质素生物合成途径中的主要酶<sup>[20]</sup>;作为木质素生物合成途径中的关键酶基因,CAD-C和CAD-D在拟南芥抗病过程中发挥重要作用<sup>[21]</sup>。小麦中的一个CAD基因,即TaCAD1,已被分离鉴定,TaCAD1基因在茎中优势表达,在叶片中稍有表达,而在根中没有检测到表达信号。通过功能分析该基因参与木质素的生物合成<sup>[22]</sup>。在裸子植物中也分离鉴定了许多CAD基因,杨树中的各个CAD基因具有不同的表达特性,而且只有2个CAD基因在木质素生物合成过程中在木质部中优势表达<sup>[23]</sup>。

## 2 木质素单体聚合过程中的酶基因

### 2.1 过氧化物酶(peroxidase, POX)基因和漆酶(laccase, LAC)基因

木质素单体在细胞质中合成后,在过氧化物酶(peroxidase, POX)和漆酶(laccase, LAC)等的催化下,通过一系列化学反应聚合成具有生物活性的木质素<sup>[24,25]</sup>。

木质聚合化是一个复杂的生理过程,涉及自由基

聚合的氧化还原反应。Ipelcl等<sup>[26]</sup>将豆科植物的过氧化物酶基因 *Shpx6a* 反向转入杨树,使木质素含量降低约20%。Hans等发现过氧化物酶与锰离子能够在离体条件下合成与天然很相似的木质素。在这一过程中, $Mn^{3+}$ - $Mn^{2+}$ 的氧化还原穿梭在木质素合成中起关键作用,过氧化物酶虽然没有直接与木质素单体接触,但是它的确参与到木质素的聚合中,因为是过氧化物酶将 $Mn^{2+}$ 氧化为 $Mn^{3+}$ , $Mn^{3+}$ 通过扩散作用与木质素单体接触,催化单体末端基团形成自由基,这些自由基在一定的作用下成为木质素分子中的各种共价键<sup>[27]</sup>。以上研究表明过氧化物酶基因与木质素单体聚合有关。已有 *laccase* 基因从植物中分离,其在木质素生物合成方面的作用已有报道:将棉花 *laccase* 基因 (*GaLAC1*) 转化到新疆杨后,与对照相比,转基因植株中的木质素含量增加,这表明该基因可能参与木质素生物合成<sup>[28]</sup>,这是首次报道关于漆酶直接参与木质素生物合成。

## 2.2 dirigent(DIR)蛋白基因

木质素聚合体的形成是随机聚合还是受严格调控,仍在争论当中。争论的焦点主要有三种假说,操纵蛋白模型 (dirigent protein model) 假说是其中之一<sup>[29]</sup>:木质化过程是在 dirigent 蛋白的严格调控下进行,该蛋白控制着木质素分子中特定化学键的形成。随着研究的不断发展,随机假说被质疑,木质素聚合体的形成是受严格调控被越来越多的研究者所接受。Davin等<sup>[30]</sup>首次发现了美国金钟连翘 (*Forsythia intermedia*) dirigent(DIR)蛋白的功能是连接两个松柏醇的苯氧基根,使该木质素单体偶连,形成聚合体木质素。随后又发现美国侧柏里存在9个 *DIR* 基因,它们的编码产物也被证明直接使松柏醇偶联形成(+)-松脂醇<sup>[31]</sup>。Burlat等<sup>[32]</sup>研究表明 *DIR* 蛋白免疫定位于形成层区和细胞壁;白杨 *DIR* 基因在木质化的区域高度表达<sup>[33]</sup>,这些研究表明 *DIR* 基因可能在这些木质化的组织中发挥功能。将欧洲云杉树皮和形成层与带有真菌病原体 (*Ceratocystis polonica*) 的树皮甲虫接种几周后,接种周围的区域都变得木质化,这些木质化有利于加强细胞壁的坚固度,从而阻止真菌的扩散,上述现象可能介导 *DIR* 基因的诱导表达或 *DIR* 蛋白的活性<sup>[34]</sup>。*DIR* 和 *DIR*-类似超大基因家族在整个植物里非常丰富,已从拟南芥、水稻、美国金钟连翘、赤松、松树、柏树、柳树、芝麻、亚麻和烟草等多种植物中鉴定分离出 *DIR* 基因。到目前为止,在拟南芥中发现了25个 *DIR* 基因,水稻里有30个 *DIR* 基因,赤松里有19个 *DIR* 基因,在美国金钟连翘里有3个 *DIR* 基因<sup>[34]</sup>。*DIR* 超大基因家族成员的表达模式多样。*psd-Fil* 是一个美国金钟连

翘 *DIR* 基因,通过组织印记 mRNA 杂交<sup>[35]</sup>和原位杂交<sup>[36]</sup>研究表明该基因在根、茎和叶柄组织中表达,而且 *DIR* mRNA 总的定位主要在形成层区域。

## 3 结语与展望

虽然木质素生物合成途径中相关酶基因基本上都被分离克隆,有的已经通过转基因技术对其进行表达调控,利用转基因植株已分析其对木质素含量、组成及主要结构的影响,但是关于调控木质素生物合成途径中酶基因表达的基因知之甚少,而这些未知的基因可以为调节木质素生物合成提供其它新的思路和方法,目前主要停留在 MYB 等转录因子的研究层面上<sup>[37]</sup>,可见弄清楚所有与木质素生物合成途径相关的关键基因,及其如何调控木质素生物合成,直到获得木质素含量或组成被改良的新植物资源,还任重道远。

## 参考文献

- [1] Zhong R Q, Morrison W H, Himmelsbach D S, et al. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants[J]. *Plant Physiol*,2000,124:563-577.
- [2] Guo D J, Chen F, Kentaro I. Downregulation of caffeic acid 3-O-Methyltransferase and caffeoyl coA3-O-Methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin[J]. *Plant Cell*,2001,13:73-88.
- [3] Raes J, Rohde A, Christensen J H. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis[J]. *Plant Physiology*, 2005,133:1051-1071.
- [4] Rogers L A, Dubos C, Cullis I F, et al. Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis[J]. *J Exp Bot*, 2005,56:1651-1663.
- [5] Raes J, Rohde A, Christensen J H, et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2003,133:1051-1071.
- [6] Huang J L, Gu M, Lai Z B, et al. Functional analysis of the Arabidopsis *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress[J]. *Plant Physiol*,2010,153:1526-1538.
- [7] Guo J, Wang M H. Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (*SIPAL5*) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Mol Biol Rep*,2009,36(6):1579-1585.
- [8] Reichert A I, He X Z, Dixon R A. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco *PAL* genes and active heterotetrameric enzymes[J]. *Biochem J*,2009,424:233-242.
- [9] Hsieh L S, Hsieh Y L, Yeh C S, et al. Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL1*) from *Bambusa oldhamii*[J]. *Mol Biol Rep*,2010,in press.
- [10] Song J, Wang Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SmpPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Mol Biol Rep*,2009,36:939-952.

- [11] Park J H, Park N I, Xu H, et al. Cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase and pyranocoumarin biosynthesis in *Angelica gigas*[J]. *J Nat Prod*,2010, 73(8):1394-1397.
- [12] Lee D, Meyer K, Chapple C, et al. Antisense suppression of 4-coumarate: coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition[J]. *Plant Cell*,1997,9:1985-1998.
- [13] Hu W J, Harding S A, Lung J. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees[J]. *Nat Biotechnol*,1999,17:808-812.
- [14] Voelker S L, Lachenbruch B, Meinzer F C, et al. Antisense down-regulation of *4CL* expression alters lignification, tree growth and saccharification potential of field-grown poplar[J]. *Plant Physiol*,2010,in press.
- [15] Voo K S, Whetten R W, O' Malley D M, et al. 4- Coumarate: coenzyme A ligase from loblolly pine xylem (isolation, characterization, and complementary DNA cloning) [J]. *Plant Physiol*,1995,108:85-97.
- [16] Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,95:5407-5412.
- [17] Silber M V, Meimberg H, Ebel J. Identification of a 4-coumarate: CoA ligase gene family in the moss, *Physcomitrella patens* [J]. *Phytochemistry*,2008,69:2449-2456.
- [18] Palmer N A, Sattler S E, Saathoff A J, et al. Genetic background impacts soluble and cell wall-bound aromatics in brown midrib mutants of sorghum[J]. *Planta*,2008,229:115-127.
- [19] Li L G, Cheng X F, Leshkevich J, et al. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase[J]. *Plant Cell*,2001, 13:1567-1586.
- [20] Eudes A, Pollet B, Sibout R, et al. Evidence for a role of *AtCAD1* in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*,2006,225:23-39.
- [21] Tronchet M, Balague C, Kroj T, et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*[J]. *Mol Plant Pathol*,2010,11(1):83-92.
- [22] Ma Q H. Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat[J]. *J Exp Bot*,2010, in press.
- [23] Barakat A, Bagniewska-Zadworna A, Choi A, et al. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: phylogeny, organization, and expression[J]. *BMC Plant Biol*,2009,9:26.
- [24] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. *Ann Rev Plant Biol*,2003,54:519-546.
- [25] Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M. Lignin: genetic engineering and impact on pulping[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*,2003,38: 305-350.
- [26] Ipelci Z, Ogras T, Altinkut A. Reduced leaf peroxidase activity is associated with reduced lignin content in transgenic poplar[J]. *Plant Biotech*,1999,16:381-387.
- [27] Nnerud H, Zhang L M, Gellerstedt G, et al. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis[J]. *Plant cell*, 2002,14:1953-1962.
- [28] Wang J, Zhu M L, Wei Z M. Cotton laccase gene overexpression in transgenic *Populus alba* *pyramidalis* and its effects on the lignin biosynthesis in transgenic plants[J]. *J Mol Cell Biol*,2008,41:11-18.
- [29] 蔺占兵,马庆虎,徐洋.木质素的生物合成及其分子调控[J].*自然科学进展*,2003,13:455-461.
- [30] Davin L B, Wang H B, Crowell A L, et al. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center[J]. *Science*,1997,275:362-366.
- [31] Kim M K, Jeon J H, Fujita M, et al. The western red cedar (*Thuja plicata*) 8 - 8' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity[J]. *Plant Mol Biol*,2002,49:199-214.
- [32] Burlat V, Kwon M, Davin L B, et al. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues[J]. *Phytochemistry*,2001,57:883-897.
- [33] Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, et al. A transcriptional roadmap to wood formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98: 14732-14737.
- [34] Ralph J, Akiyama T, Kim H. Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure[J]. *J Biol Chem*,2006,281: 8843-8853.
- [35] Ye Z H, Varner J E. Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues[J]. *Plant Cell*,1991,3:23-37.
- [36] Bochenek B, Hirsch A M. In situ hybridization of nodulin mRNAs in root nodules using non-radioactive probes[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*,1990,8:237-248.
- [37] Zhou J L, Lee C H, Zhong R Q, et al. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*,2009,21: 248-266.