

文章编号: 1000-5692(2004)03-0344-05

高等植物赤霉素生物合成及其关键酶的研究进展

周明兵, 汤定钦

(浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 近年来, 随着研究手段和技术的进步, 赤霉素 (GA) 生物合成及其调控研究取得了较大的进展。对高等植物赤霉素的生物合成前体的形成及各种赤霉素的衍变途径进行了归纳和总结, 并对 GA 生物合成过程中古巴焦磷酸合酶、内根-贝壳杉合成酶、内根-贝壳杉烯氧化酶、GA20-氧化酶、GA 3 β -羟化酶等关键酶的研究进展进行了综述, 特别对目前 GA20-氧化酶、GA 3 β -羟化酶在赤霉素生物合成中调控机理的研究进展进行了总结。图 1 参 29

关键词: 植物生理; 高等植物; 赤霉素; 生物合成; 关键酶

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A

赤霉素 (GA) 广泛存在于植物界, 在被子植物、裸子植物、蕨类植物、褐藻和绿藻中都发现有 GA 的存在。到 1998 年为止, 已发现 127 种 GA^[1]。根据 GA 分子中碳原子数的不同可分为 20-C 赤霉素和 19-C 赤霉素 2 种类型。赤霉素影响着高等植物生活史的各个阶段, 如种子萌发, 茎的伸长, 花器官的诱导和发育以及种子和果实的形成。近年来, 随着研究手段和技术的进步, 各种突变体材料的获得和利用, 模式植物基因组的解明, GA 生物合成及其调控方面的研究取得了较大的进展。本文对此作一总结和展望。

1 GA 生物合成途径

1.1 GA 生物合成前体的形成

GA 生物合成的前体是二萜牛儿萜基焦磷酸 (GGPP)。植物细胞内的 GGPP 形成途径有 2 条: 一条为甲羟戊酸途径, 另一条为非甲羟戊酸途径 (图 1)^[2~5]。

在线粒体、细胞质和内质网, GGPP 是通过甲羟戊酸途径形成的。乙酰 CoA 和乙酰乙酰 CoA 经过 2 步反应形成甲羟戊酸 (MVA), MVA 经过加磷酸基团反应和脱羧反应形成异戊烯基焦磷酸 (IPP); IPP 在 IPP 异构酶的作用下可逆异构化形成二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP), 它与一个 IPP 分子在二萜牛儿萜基焦磷酸合酶催化下, 头尾相连形成 C₁₀-中间产物二萜牛儿基焦磷酸 (GPP), 后者与另一个 IPP 分子缩合为法呢基焦磷酸 (FPP), 并进一步与第 3 个 IPP 分子在二萜牛儿萜基焦磷酸合酶的作用下缩合为 C₂₀-中间产物 GGPP。GGPP 形成的另一条途径是通过非甲羟戊酸途径而形成。该途径主要存在于质体中, 它与甲羟戊酸途径的不同点在于 IPP 的形成方式不同。在叶绿体, IPP 是由丙酮酸在转酮酶

收稿日期: 2004-03-11; 修回日期: 2004-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371181); 浙江省自然科学基金青年人才培养项目(R303420); 浙江林学院科学研究发展基金项目

作者简介: 周明兵(1975-), 男, 河南信阳人, 硕士, 从事竹子生物学的研究。E-mail: zmbin@163.com

的作用下, 提供二碳单位给甘油醛-3 磷酸而形成 1-脱氧-D-木酮糖-5 磷酸, 再经分子重排形成 IPP 或 DMAPP。因此该途径也称为甘油醛-3 磷酸/丙酮酸途径^[6-8], 但目前还没有直接证据证实合成赤霉素的 IPP 来源于非甲羟戊酸途径^{9, 10]}。

1.2 GGPP 至 GA₁₂-醛途径

GGPP 在古巴焦磷酸合成酶 (CPS) 和内根-贝壳杉烯合成酶 (KS) 催化下环化为赤霉素的前身内根-贝壳杉烯。内根-贝壳杉烯的 C-19 的甲基在内根-贝壳杉烯氧化酶催化下不断被氧化, 分别形成内根-贝壳杉烯醇、内根-贝壳杉烯醛和内根-贝壳杉烯酸。内根-贝壳杉烯酸再次分支, 形成 2 种产物, 一种是 GA₁₂-醛, 它是 GA 的最初产物 (图 1)。

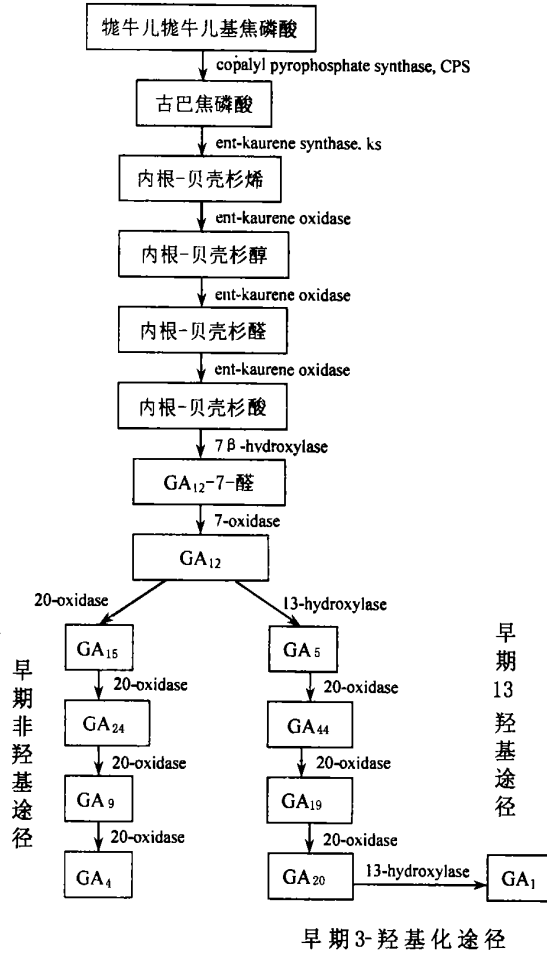


图 1 高等植物 GA 常见的生物合成途径

Figure 1 General biosynthesis pathway of GAs in higher plants

1.3 GA₁₂-醛途径

从甲羟戊酸转变为 GA₁₂-醛的途径在所有植物中都是一样的。从 GA₁₂-醛转变为其他种类 GA 途径则因植物种类而异。一般来说, 从 GA₁₂-醛开始的反应有一个共同的顺序, 就是 C-20 逐渐氧化, 以丧失 CO₂ 的方式转变成 C₁₉-CA, 然后在 3-β 位引入羟基, 这样形成具有生物活性 C₁₉-GA; 若在 2-β 位引入羟基则形成无生物活性的 GA。在高等植物中 GA 氧化常有 3 条途径: 早期 3-羟基化途径, 早期 13-羟基化途径和早期非 3, 13 羟基化途径 (图 1)。

2 赤霉素生物合成中的关键酶

2.1 古巴焦磷酸合成酶 (CPS)

该酶过去称为内根-贝壳杉烯合成酶 A, 催化环化双萜形成的第一步, 也是调节 GA 生物合成途径一

个重要的酶, 决定了 GGPP 向 GA 方向合成。由于它不稳定且对天然的或人工合成的抑制剂很敏感, 因此许多分离内根-贝壳杉烯合酶 A 的实验难获成功。

利用基因扣除技术, 从缺乏 GA 应答反应的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 畸矮突变体 (*gal*) 中克隆到了编码 CPS 基因的 cDNA, 并在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中对其进行了表达和功能鉴定。该基因编码一个约 82 kD 的蛋白, 含有一个富含丝氨酸和苏氨酸的碱性 N 末端序列, 与跨膜有关, 属于引导序列^[11, 12]。该基因在拟南芥的快速生长组织和叶的微管中表达较强。由此可见, CPS 基因被严格地调控。拟南芥 CPS 的氨基酸序列与豌豆 *Pisum sativum*, 玉米 *Zea mays*, 水稻 *Oryza sativa* 和曙南芥 *Stevia rebaudiana* 的 CPS 基因分别有 52%, 47%, 41% 和 51% 的同源性^[12, 13]。

2.2 内根-贝壳杉合成酶 (KS)

该酶过去一直称为内根-贝壳杉烯合酶 B, 它和 CPS 一样, 位于前质体, 也具有引导序列。拟南芥和笋瓜 *Cucurbita maxima* 等植物编码该酶的基因已相继被克隆^[14, 15]。

克隆的拟南芥 KS 基因编码一个 90 kD 的蛋白质, 基 N-末端有一个引导序列, 还有一个富含天冬氨酸残基的 DDxxD 基元。该基元推测同二价的金属辅基 (如 Mg^{2+} , Mn^{2+}) 与焦磷酸基所形成的复合体相结合, 介导焦磷酸基的解离^[14]。DDxxD 基元也同样在其他的类萜环化酶中存在, 如蓖麻 *Ricinus communis*, 烟草 *Nicotiana sylvestris* 和柠檬 *Mentha spicata* 等类萜环化酶。有意思的是由 GGPP 环化为柯巴基焦磷酸 (*ent-copalyl pyrophosphate*) 的过程没有焦磷酸基的参与, 因此 CPS 没有 DDxxD 基元; 但 CPS 和 KS 都包含一个保守的底物结合位点 YDTAWVAWVP^[16]。赤霉菌 *Gibberella fujikuroi* 的贝壳杉烯合成不是由 CPS 和 KS 2 个酶分步催化的, 而是单一的 CPS/KS 双功能酶将 GGPP 直接催化合成为贝壳杉烯。这种 CPS/KS 双功能酶无论在核酸还是在氨基酸水平与植物的 CPS 和 KS 同源性都较低^[17]。

2.3 GA20-氧化酶

GA20-氧化酶是重要的 GA 生物合成和调控酶, 属于可溶性的双加氧酶, 目前大约有 20~30 种的 GA20-氧化酶基因被克隆。GA20-氧化酶是由小的多基因家族编码, 其氨基酸序列在不相关的物种中同源性较低, 为 50%~60%, 而基因家庭成员间有 65%~85% 的同源性。比较几种植物的 GA20-氧化酶氨基酸序列发现, 它们都有一些共同的保守基元, 如与结合 2-酮戊二酸有关的保守一致序列 NYYPXCQKP, 保守的 H 和 D 残基、LPWKET 基元 (与 GA 底物结合有关)^[18~20]。

GA20-氧化酶底物专一性不强, 形成 GA 代谢的 2 个或多个平行形成途径。GA20-氧化酶对底物的亲和力与 C-13 位的羟基化有关, 这与植物中具有生物活性的 GAs 类型相一致。南瓜 *Cucurbita moschata*, 西方刺瓜 *Marah macrocarpus*, 拟南芥的 GA20-氧化酶对 C-13 位非羟基化的底物的亲和力高于羟基化的底物。因此 C-13 位非羟基化的 GA₅ 是拟南芥茎中赤霉素的主要存在形式^[19]。相反, 从水稻茎中克隆的 GA20-氧化酶对 C-13 位羟基化的 C₂₀-GAs 的亲和力高, 并且催化 C-13 位羟基化 GA₅₃ 的氧化比 GA₁₂ 的氧化效率更高, 因此 GA₁ 是水稻茎中赤霉素的主要存在形式^[21]。

GA20-氧化酶是严格调控的酶, 既受反馈调节, 又受光周期调控。Carrera 等^[22]克隆了马铃薯 *Solanum tuberosum* 3 种 GA20-氧化酶基因, 即 StGA20ox1, StGA20ox2 和 StGA20ox3, 马铃薯的 *gal* 突变体 (13-羟化步骤被阻断) 积累较高 GA20-氧化酶转录本, 外施 GA₃ 后, 3 种酶表达在马铃薯 *gal* 突变体内大幅度减少; GA 合成的抑制剂处理野生型马铃薯, 增加 StGA20ox1 和 StGA20ox3 的转录丰度, 说明负反馈机制调控 GA20-氧化酶基因的表达。GA20-氧化酶也受光周期调控, 如当拟南芥和菠菜 *Spinacia oleracea* 从短日照转到长日照下, 体内 GA20-氧化酶活性增加^[19, 20]。

2.4 GA 3 β -羟化酶

GA 3 β -羟化酶作用位点是 GA₂₀ 至 GA₁ 和 GA₉ 至 GA₄, 很可能是多基因家族编码。拟南芥、烟草、南瓜和豌豆等 GA 3 β -羟化酶基因已经被克隆和鉴定。GA 3 β -羟化酶在不同植物中同源性不是很高, 如南瓜的 GA 3 β -羟化酶的氨基酸残基序列与烟草、豌豆和拟南芥相比分别具有 40%, 39% 和 36% 的同源性^[23~26]。

同 GA 20-氧化酶相类似, GA 3 β -羟化酶对催化底物的偏好性似乎与 C-13 位羟基化有关。如南瓜 GA 3 β -羟化酶能使多种 GAs 的 C-3 位羟基化, 其氧化作用不依赖于 C-7 和 C-20 的氧化状态, 而与 C-13 位的羟基化有一定的关联^[24]; 与拟南芥和豌豆的 3 β -羟化酶相比, 重组的南瓜 3 β -羟化酶催化 C-13 位

非羟基化的 GA₉ 比羟基化的 GA₂₀ 更为有效^[23~25]。

3 β -羟化酶中有多处氨基酸是保守的, 如烟草的 GA 3 β -羟化酶 (Nty) 的 132 ~ 138 位 (Met-Trp-X-Glu-Gly-Phe-Thr) 区保守, 229 位和 286 位的组氨酸残基及 231 位天冬氨酸残基与离子结合有关, 是完全保守的。212 位和 220 位氨基酸区是辅因子 2-酮戊二酸的结合区, 也高度保守; Nty 在烟草的茎尖、花、根和幼嫩的节间高水平表达, 但不在叶子和种子高水平表达。原位杂交和组织化学分析揭示 Nty 的表达局限于各种器官活跃分裂和延长的细胞, 如茎尖分生区、花药的绒毡层和花粉粒及根尖^[29]。

该酶也是严格调控的酶, 受反馈调节和光周期调控, 如 *ga4* 突变体莲座叶 3 β -羟化酶基因的转录远高于野生型, 但用 GA₃ 处理, 能在 8 h 内减少其含量^[23], 表明 3 β -羟化反应受反馈机制的调节。另外, 3 β -羟化酶基因的表达还与红光有一定的相关性, 如在需光萌发的莴苣 *Lactuca sativa* 种子暴露在红光下, 种子内的 GA 3 β -羟化酶基因的 mRNA 丰度增加^[27]。

3 问题与展望

最近, 有关 GA 生物合成过程及其关键酶在草本植物上的研究已取得了很大的进展, 在木本植物上, 关于 GA 对植物生长发育影响机理的研究也已经突破了其作为生长调节剂对植物生长形态调控的研究水平, 进入了 GA 生物合成和调控的分子机理研究层次, 如草莓 *Pseudochromis porphyreus* 和苹果 *Malus pumila* 等 GA 生物合成酶-20 氧化酶基因已相继被克隆, 其表达模式也已经阐明^[18, 28]。

可以预见, GA 合成及其调控的研究将在以下几个方面取得突破: 通过 GA 合成酶的结构和功能研究, 获得各种酶专一的抗体; 利用原位杂交、酶联免疫技术精确确定 GA 合成酶的细胞和亚细胞位置; 利用模式植物从转录和翻译水平深入地研究 GA 合成的调控, 发现更多的酶基因顺式调控元件和反式调控因子, 特别是反式调控因子的研究会有大的突破。许多未知的 GA 单加氧酶基因的克隆鉴定和信号传导的阐明将是最富有挑战性的研究。

在实际应用中, 通过转基因植物改变单一基因的表达来调节 GAs 的合成水平有望成为可能, 这种技术也可以取代原有的化学生长调节剂调控方法。此外, 还可以利用这种技术改变 GA 生物合成途径中酶的丰度, 以确定这种酶在该合成途径中的作用。例如严远鑫等^[29]通过水稻 GA 20-氧化酶基因的正义和反义转化, 导致了转基因水稻的茎秆增高和矮化, 从而证明该酶的活性是此发育过程的限速步骤。但是由于 GA 生物合成调控在分子水平上的研究还不够深入, GA 信号传导机制尚需详细阐明, 因此目前这种技术在农作物改良方面的应用还十分有限。

参考文献:

- [1] Silverstone A L, Sun T P. Gibberellins and green revolution [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 1-2.
- [2] Okada K, Saito T, Nakagawa T, et al. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three sub-cellular compartments in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1 045-1 056.
- [3] Hedden P, William M P. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 365-370.
- [4] 王金祥, 李玲, 潘瑞焱. 高等植物中赤霉素的生物合成及其调控 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38 (1): 1-8.
- [5] 余叔文, 汤章城. 植物生理学及分子生物学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 32-457.
- [6] Mccaskill D, Croteau R. Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose 5-phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants [J]. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40: 653-656.
- [7] Ershow Y, Gantt R R, Cunningham F X, et al. Isopentenyl diphosphate isomerase deficiency in *Synechocystis* strain [J]. *FEBS Letters*, 2000, 473: 337-340.
- [8] Mammel R C, Narciso C, Luisa M L, et al. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Letters*, 2000, 473: 328-332.
- [9] Bouvier F, Harlingue A, Suire C, et al. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1 423-1 431.
- [10] Lichtenhaler H K, Rohmer M, Schwender J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis in higher plants [J]. *Physiol Plant*, 1997, 101: 643-652.
- [11] Sun T P, Goodman H M, Ausubel F M. Cloning the *Arabidopsis* GA1 locus by genomic subtraction [J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 119-128.
- [12] Ait-Ali T, Swain S M, Reid J B, et al. The IS locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme ent-kaurene synthase A [J]. *Plant J*, 1997, 11: 442-454.

- [13] Smith M W, Yamaguchi S, Ait-Ali T, *et al.* The first step of gibberellin biosynthesis in pumpkin is catalyzed by at least two copalyl diphosphate synthases encoded by differentially regulated genes [J]. *Plant Physiol*, 1998, **118**: 1 411—1 419.
- [14] Yamaguchi S, Sun T P, Kawaide H, *et al.* The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes *ent*-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1998, **116**: 1 271—1 278.
- [15] Yamaguchi S, Saito T, Abe H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima*) [J]. *Plant J*, 1996, **10**: 203—213.
- [16] 王伟, 朱平, 程克棣. 植物赤霉素生物合成和信号传导的分子生物学 [J]. 植物学通报, 2002, **19**(2): 137—149.
- [17] Tudzynski B, Holter K. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster [J]. *Fungal Genet Biol*, 1998, **25**: 157—170.
- [18] 石琰景, 果树 GA 生物合成基因-贝壳杉烯氧化酶和 20-氧化酶的克隆及表达模式的初步研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2002.
- [19] Phillips A L, Ward D A, Uknes S, *et al.* Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1995, **108**: 1 049—1 057.
- [20] Wu K, Li L, Gage D A, *et al.* Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach [J]. *Plant Physiol*, 1996, **110**: 547—554.
- [21] Toyomasu T, Kawaide H, Sekimoto H, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings [J]. *Physiol Plant*, 1997, **99**: 111—118.
- [22] Camera E, Jackson S D, Prat S. Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato [J]. *Plant Physiol*, 1999, **119**: 765—773.
- [23] Chiang H H, Wang I, Goodman H M. Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 195—201.
- [24] Lange T, Rohatsek S, Frisse A. Cloning and expression of a gibberellin 2 β -, 3 β -hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm [J]. *Plant Cell*, 1997, **9**: 1 459—1 467.
- [25] Martin D N, William M P, Hedden P. Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997, **94**: 8 907—8 911.
- [26] Itoh H, Tanaka-Ueguchi M T, Kawaide H. The gene encoding tobacco gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development [J]. *Plant J*, 1997, **20**: 15—24.
- [27] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**: 523—530.
- [28] Kusaba S, Honda C, Kano M. Isolation and expression analysis of gibberellin 20-oxidase homologous gene in apple [J]. *Exp Bot*, 2001, **52**: 375—376.
- [29] 严远鑫, 安成才, 栗力, 等. 水稻 20-氧化酶基因 (*rga5*) 正、反义转化对水稻生物学性状的影响 [J]. 科学通报, 2003, **48**(4): 358—363.

Research progress of gibberellin biosynthesis and its key enzymes in higher plants

ZHOU Ming-bing, TANG Ding-qin

(Key Lab for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In recent years, with the development of research methods and technology, great progresses have been made in the study of gibberellins biosynthesis and its mechanism of regulation. The formation of precursor of gibberellin biosynthesis and evolution of various gibberellins were included. The research progress in the key enzymes such as copalyl pyrophosphate synthase, *ent*-kaurene synthase, GA20-oxidase, GA3-hydroxylase were summarized. The research progress in the regulation mechanism of GA 20-oxidase, GA 3-hydroxylase in the process of gibberellins biosynthesis was summarized especially. [Ch, 1 fig. 29 ref.]

Key words: plant physiology; higher plants; gibberellin; biosynthesis; key enzymes