

# 硫代葡萄糖苷合成核心途径与植物生长素微调

阮颖<sup>1</sup>, 周朴华<sup>1</sup>, 刘春林<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学 生物科学与技术学院, 中国湖南 长沙 410128 ;  
2. 湖南农业大学 作物基因工程湖南省重点实验室, 中国湖南 长沙 410128)

**摘要:** 硫代葡萄糖苷是刺山柑 *Capparis spinosa*(Capers)和十字花科 (*Brassicaceae*)植物中一类特有和重要的次生代谢产物。在植物体内, 硫代葡萄糖苷的合成包括前体氨基酸侧链延伸, 核心结构的形成和次级侧链修饰 3 个步骤。利用核心结构合成途径上有关催化酶的基因突变体证明, 后醛肟反应途径上任何催化酶基因的突变, 都将导致吲哚乙酰胺结构相似的吲哚乙酸 (IAA) 含量变化, 硫苷核心途径对生长素的动态平衡起着微调 (fine-tune)作用。

**关键词:** 硫代葡萄糖苷; 核心途径; 生长素; 动态平衡

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S2-0025-05

## Review on the Relationship Between Core Pathway of Glucosinolate Synthesis and Fine-tune of Auxin

RUAN Ying<sup>1</sup>, ZHOU Pu-hua<sup>1</sup>, LIU Chun-lin<sup>2</sup>

(1. *Biology Science & Technology College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China ;*

2. *Crop Gene Engineering Key Lab of Hunan Province, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China*)

**Abstract:** Glucosinolate is a set of specific and vital secondary metabolite in *Capparis spinosa*(Capers) and *Brassicaceae* family. In plant, glucosinolate synthesis includes three steps: side-chain elongation of amino acids, formation of the core structure and secondary side-chain modifications. By use of gene mutants corresponding to post-aldoxime enzymes on the core pathway of glucosinolate synthesis, it is clear that core pathway of glucosinolate synthesis finely tunes the homeostasis of plant auxin IAA.

**Key words:** glucosinolate; core pathway; auxin; homeostasis

(*Life Science Research*, 2006, 10(4)S2: 025 ~ 029)

硫代葡萄糖苷 (glucosinolate, 简称硫苷, 又名芥子油苷) 及它们的衍生产物在植物防御、人类的营养和抗癌方面具有特殊的作用。所以长期以来, 它们的代谢受到人们的极大关注。到目前为止, 对硫苷代谢的生化过程已经有了比较清楚的认识。特别是在拟南芥中, 硫苷新陈代谢的大部

份结构基因都已经被鉴定, 而且这些基因的功能也得到了确定。目前有关硫苷的研究, 其重心已逐渐转移到硫苷合成的调控、分布和降解, 以及工程改良硫苷谱的可行性, 硫苷代谢与其他代谢途径的关系等问题上来了。本文重点讨论了拟南芥中硫苷合成的核心途径 (core pathway) 与生长素

收稿日期: 2006-07-29; 修回日期: 2006-11-29

基金项目: 湖南农业大学回国留学人员启动基金(20050375)

作者简介: 阮颖 (1963-), 女, 湖南长沙人, 博士, 湖南农业大学副教授, 主要从事分子细胞生物学方面的研究, Tel: 0731-4617019, E-mail: yingruang@hotmail.com.

动态平衡(homeostasis)关系的最新进展情况。

## 1 硫苷合成的核心途径

硫苷作为十字花科 (*Brassicaceae* family) 和刺山柑 (*Capparis spinosa*, *Capers*) 等植物中的一类重要的次生代谢产物<sup>[1, 2]</sup>, 是由三部分构成 (图 1): 磺胺基部分 (sulfonated oxime)、 $\beta$ - 硫代葡萄糖部分 ( $\beta$ -thio-glucose) 和一个可变的 R 侧链 (side-chains)。磺胺基和  $\beta$ - 硫代葡萄糖构成硫苷的主体, 又称为硫苷的核心部分; 而不同类型的硫苷则带有不同的 R 侧链。目前已经有一百多种结构不同的硫苷被鉴定出来, 这种结构差异主要是

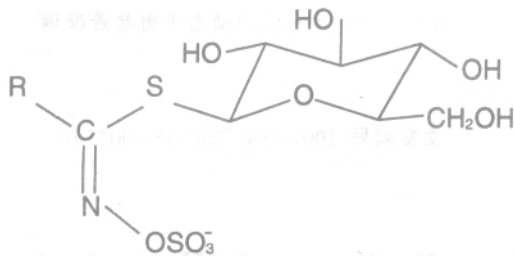


图 1 芥子油苷的基本结构

Fig. 1 The structure of glucosinolate

由 R 基团替换造成的<sup>[3]</sup>。

硫苷的生物合成是一个非常复杂的生理生化反应体系, 涉及到的酶类 (蛋白质) 就有 20 多种, 通过对模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、油料作物油菜 (*Brassica napus*) 等的研究发现, 硫苷的生物合成也分为三部分: 前体氨基酸侧链延伸 (side-chain elongation of amino acids) 核心结构的形成 (development of the core structure) 和次级侧链的修饰 (secondary side-chain modifications)<sup>[4-7]</sup>。硫苷核心结构的合成过程, 也叫核心途径 (core pathway) 是所有硫代葡萄糖苷合成的共同部分。在拟南芥中, 这条途径分为 5 个步骤 (图 2): 第 1 步, 前体氨基酸通过 CYP79 家族中的侧链专一性的细胞色素 P450 单加氧酶催化 (氧化) 产生醛肟<sup>[4, 7]</sup>。一般将醛肟形成之后的所有反应统称为后醛肟反应 (post-aldoxime reaction), 参与反应的酶统称为后醛肟酶 (post-aldoxime enzymes) 第 2 步, 在 CYP83 家族的细胞色素 P450 催化下, 醛肟进一步被氧化成硝基化合物 (硝基-2-吲哚-乙烷, nitro-2-indolyl ethane) 或者腈氧化物 (nitrile oxides)。这些强亲电子产物立刻与硫醇 (thiols) 化合物反应形成 S-烷基硫羟肟酸共轭物 (S-alkylthiohydroximate conjugates)<sup>[8-10]</sup>。在植物体内, 半胱氨酸有可能是硫醇的供体, 但是这个共

轭的产生一般认为是自动反应过程, 是否为酶促反应至今尚不十分清楚<sup>[4, 11]</sup>; 第 3 步, S-烷基硫羟肟酸共轭物进一步被 C-S 裂解酶 (C-S lyase) 裂解, 转化为硫羟肟酸 (thiohydroximates)、丙酮酸 (pyruvate) 和氨 (ammonia)。在拟南芥中的 C-S 裂解酶为 SUR1<sup>[11]</sup>; 第 4 步, 硫羟肟酸在葡萄糖转移酶 (glucosyltransferase) UGT74B1, 或者 S-GT (芸苔属) 的催化作用下, 将尿苷二磷酸葡萄糖苷 (UDP-Glc) 上的葡萄糖基转到硫羟肟酸上形成脱硫硫苷 (Desulfoglucosinolate)<sup>[12-14]</sup>; 第 5 步, 糖基 (Glucone) 化的硫苷形成的最后一步是在 3'-氧-磷酸腺苷-5'-磷酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) 参与下, 脱硫硫苷硫酸化酶 (sulfurylase), 即 AtST5a, AtST5b 或 AtST5c 催化脱硫硫苷硫酸化而形成硫苷<sup>[14, 15]</sup>。

## 2 硫苷核心合成途径与生长素微调

在拟南芥中, 通过对发育异常个体进行遗传学筛选, 鉴定了几个在硫苷核心合成途径相关催化酶上发生突变的基因, 这些基因通过相互作用的代谢网影响吲哚硫苷和生长素吲哚乙酸 (IAA) 的积累。第一组鉴定出的等位基因突变体 *cyp83a1* (*sur1/rty/alf1/hls3*), 其体内过量积累 (over-accumulation) 游离型和结合型的 IAA, 并出现典型的高植物生长素含量 (high-auxin) 幼苗的表现型, 例如形成丰富的侧根和不定根, 偏上性的子叶 (epinastic cotyledons), 或延长的下胚轴 (hypocotyls) 和叶柄 (petioles)<sup>[16-19]</sup> 等。遗传水平上的破坏, 使催化由 S-烷基硫羟肟酸 (S-Alkyl thiohydroximate) 转化为硫羟肟酸 (thiohydroximate) 反应的 C-S 裂解酶失活<sup>[11]</sup>, 即阻断醛肟 (postaldoxime) 形成后的第 2 个反应步骤, 结果导致与吲哚乙醛肟结构相似的吲哚乙酸 (IAA) 增加, 并且表现出与 *cyp83b1* 等位基因 (*sur2/rnt1/atr4/red1*) 功能缺失的表型类似<sup>[10, 20-23]</sup>。醛肟形成后的第 3 个反应步骤是由葡 (萄) 糖基转移酶 (glucosyl-transferase) UGT74B1 催化完成, 相应基因的突变导致葡 (萄) 糖基转移过程被抑制, 结果也会诱导游离型和结合型 IAA 水平的升高, 其表现出的表型与植物生长素过量产生 (overproduction) 植株的表型一致<sup>[24]</sup>。因此, 抑制醛肟形成后的 3 个连续反应中的任何一个步骤, 都会伴随着吲哚硫苷产量的下降和总的 IAA 水平的增加。醛肟形成后的第 4 个连续反应是硫酸化, ST5a 是一个编码偏好芳香

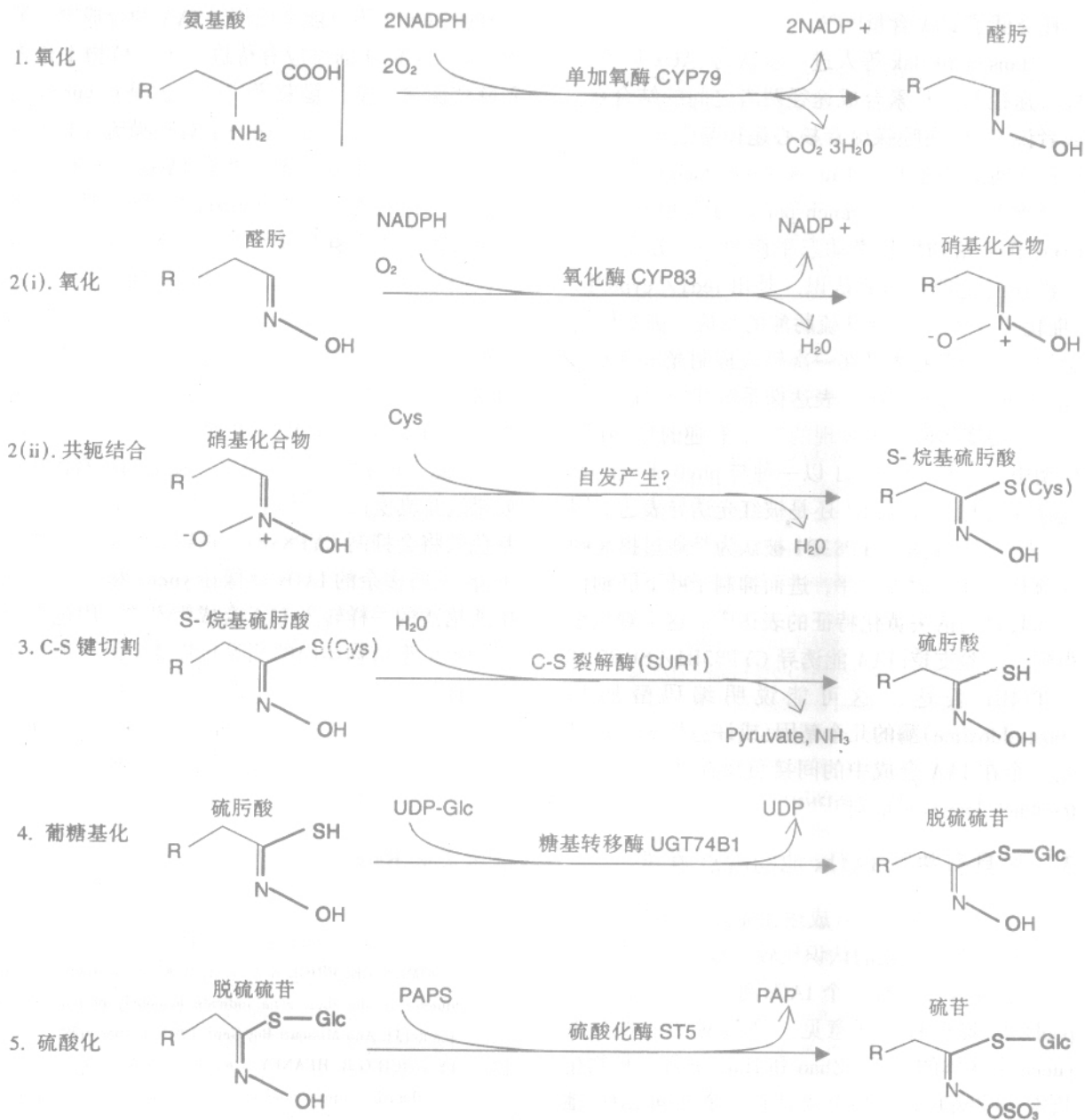


图2 硫苷合成的核心途径(加粗部分表示新形成的键)

Fig. 2 The core pathway of glucosinolates (Bold parts represent new formed bonds)

族的脱硫硫苷底物的磺基转移酶(sulfotransferase)<sup>[15]</sup>, 突变此酶是否也会诱导相似的 IAA 积累, 目前尚没有这方面的报道, 有待进一步研究。

综合上述突变体表现出来的表型及生理特征, Woodward 和 Cohen 等人提出了这样一个假说: 抑制醛肟形成后的 3 个连续反应而导致植株出现高生长素植物表现型 (high-auxin phenotypes of plants), 是因为过量的吲哚-3-乙醛肟(indole-3-acetaldoxime, IAOx) 转移到了 IAA 的合成途径中, 即硫苷核心合成途径对生长素途径起

着微调 (fine-tune) 作用<sup>[25, 26]</sup>. 这个假说得到了一些转基因实验的支持: 过表达 (over expression) IAOx 形成的同工酶 CYP79B2, 可同时增加吲哚硫苷和 IAA 水平, 并且表现型几乎与 sur2 (催化从醛肟到 S-烷基硫脲酸的反应) 突变体相同<sup>[27, 28]</sup>. 相反, cyp79b2、cyp79b3 双重突变体却出现了在根中缺乏吲哚硫苷和 IAA 合成速率下降的现象, 而且其表型与部份 IAA 缺乏的植株的表型一致<sup>[28, 29]</sup>. 同样, 过度表达 IAOx 消耗酶 (IAOx-consuming enzyme) 基因 CYP83B1 诱导子叶下胚轴 (hypocotyls) 变短, 顶端优势消失和吲哚硫苷增加, 说明 IAOx

消耗降低了 IAA 含量<sup>[9, 10]</sup>。

Hansen 和 Bak 等人进一步认为 IAOx 是硫苷核心途径与生长素合成途径两者之间的结合点, 或者说 IAOx 在吲哚硫苷核心途径与生长素合成途径之间的动态平衡 (auxin homeostasis) 起着调节分支点 (regulatory branch point) 的作用<sup>[10, 30]</sup>。对 IAOx 作为植物生长素动态平衡的一个分支点这一潜在的生理作用的认识, 是由 red1 / cyp83b1 (催化从醛肟到 S-烷基硫脲酸的反应) 突变体揭示的。这个突变体是在一次筛选抑制光敏色素 B (phytochrome, phyB) 过表达株系对红光促进去黄化反应突变体时分离发现的<sup>[23]</sup>。有趣的是, 在野生型中, 虽然 CYP83B1 以一种与 phyB 无关的方式存在, 但是 CYP83B1 还是被红光诱导表达。因此, 光诱导表达的 CYP83B1 被认为是通过提高吲哚硫苷来降低 IAA 水平, 进而抑制子叶下胚轴伸长和其它幼苗去黄化特征的表达<sup>[23]</sup>。这个观点也得到了实验支持: IAA 能诱导 CYP83B1 / SUR2 和 UGT74B1 表达, 这可能说明编码醛肟后 (post-aldoxime) 酶的几个基因 (或许包括 SUR1) 是受一个在 IAA 合成中的间接负反馈环 (negative feedback loop) 协同调控<sup>[21, 24]</sup>。

### 3 对具有共同 IAOx 池的观点争议

现在对硫苷核心合成途径能微调植物体内生长素 IAA 含量变化的认识比较一致, 但对这两条途径之间是否共有一个 IAOx 池 (a shared IAOx pool) 的观点有不同意见。通过对功能恢复的 yucca 突变体的分析, Zhao 和 Hansen 等对植物生长素和吲哚硫苷生物合成具有一个共同 IAOx 池的观点又提出了置疑。Yucca 突变体能过量表达黄素单加氧酶 (flavin monooxygenase), 这种酶在体外能将色胺 (tryptamine,  $\beta$ -吲哚基乙胺) 氧化为 N-羟基色胺<sup>[28, 30]</sup>。Yucca 株系有点类似植物生长素生产过剩的突变体 sur1, sur2 和 ugt74b1, 其体内的游离 IAA 比野生型的大约多 50%<sup>[30]</sup>。而有毒性的色氨酸类似物并不能阻止 yucca 植物体内这部分额外 IAA 的产生, 说明额外 IAA 有一个色氨酸依赖型来源。如果假设 yucca 蛋白在 IAOx 合成中起作用, 可是令人惊奇的是与野生型相比, YUCCA-过表达的植物只轻微地减少了吲哚硫苷水平<sup>[28]</sup>。相反, 醛肟前 (pre-aldoxime) 酶 CYP79B2 的过表达显著地提高吲哚硫苷和 IAA 两者的水平<sup>[27, 28]</sup>。因此来自 YUCCA 途径 (一条假定的途

径) 的 IAOx 也不可能专门用于 IAA 的合成<sup>[28]</sup>。虽然 YUCCA 催化的反应有待进一步与植物生长素新陈代谢途径整合起来<sup>[26, 29, 32]</sup>, 但是对 yucca 植株显现的与假说 (即存在一个对吲哚硫苷和 IAA 两条合成途径都有贡献的共有 IAOx 池) 相吻合的表现型这一现象可能有另外的解释。因为据报道色胺能通过将氨基基团的电子孤对就近转位给亚铁而结合到细胞色素 P450 酶 CYP83B1 上, 而紧密地结合到 CYP83B1 的活性位点 ( $K_s$  约为 18  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[9]</sup>, 并能竞争性地抑制 IAOx 氧化作用<sup>[27, 28]</sup>。而通过 YUCCA 催化色胺形成的 N-羟基色胺, 由于羟基化了的氨基基团更加类似 IAOx 的肟基团, 因此, 作为竞争抑制剂比色胺更加具有潜力。如果这是真实的, 在体内由 YUCCA 生产的 N-羟基色胺将会抑制 CYP83B1, 并导致吲哚硫苷含量下降, 同时多余的 IAOx 就像在 yucca 和 sur2 幼苗中所描述的一样转入 IAA 合成<sup>[10, 21, 28]</sup>。用色胺处理的野生型植物体内的吲哚硫苷减少的报道与这上述推导出的情形是一致的<sup>[10]</sup>。然而, 正如在牵牛花 floozy 突变体上所看到的<sup>[32]</sup>, 这些研究并不排除在硫苷核心途径之外存在一个通过 YUCCA 进入 IAA 的途径。

### 参考文献 (References):

- [1] ETTLINGER M G, KJAER A. Sulfur compounds in plants[J]. Rec Adv Phytochem, 1968, 1: 49-144.
- [2] RODMAN J E, PRICE R A, KAROL K, *et al.* Nucleotide sequence of the rbcL gene indicate monopyly of mustard oil plants[J]. Ann Missouri Bot Gard, 1993, 80: 686-699.
- [3] FENWICH G R, HEANEY R K, MULLIN W J. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants[J]. Crit Rev Food Sci Nutri, 1983, 18: 123-201.
- [4] WITTSTOCK U, HALKIER B A. Glucosinolate research in the Arabidopsis era[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7: 263-270.
- [5] MIKKELSEN R. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates[J]. Amino Acids, 2002, 22: 279-295.
- [6] UNDERHILL E W. Glucosinolates[M] // BELL E A, CHARLWOOD B C. Encyclopedia of Plant Physiology (Vol. 8). New York: Springer, 1980. 493-511.
- [7] POULTON J E, MOLLER B L. Glucosinolates[M] // LEA P J. Methods in Plant Biochemistry (Vol. 9). London: Academic Press, 1993. 209-237.
- [8] HANSEN C H, DU Liang-cheng, NAUR P, *et al.* CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in Arabidopsis[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 24790-24796.
- [9] BAK S, FEYEREISEN R. The involvement of two p450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and

- glucosinolate biosynthesis[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 108-118.
- [10] BAK S, FRANS E, KENNETH A, *et al.* CYP83B1, a cytochrome p450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 101-111.
- [11] MIKKELSEN M D, NAUR P, HALKIER B A. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis[J]. *Plant J*, 2004, 37: 770-777.
- [12] MARILLIA E F, MACPHERSON J M, TSAN E W T, *et al.* Molecular cloning of a *Brassica napus* thiohydroximate-glucosyltransferase gene and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Physiol Plant*, 2001, 113: 176-184.
- [13] GRUBB C D, ZIPP B J, LUDWIG-MULLER J, *et al.* *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis[J]. *Plant J*, 2004, 40: 893-908.
- [14] GACHON C M, LANGLOIS-MEUNNE M, HENRY Y, *et al.* Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: functional and evolutionary implications[J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58: 229-245.
- [15] PIOTROWSKI M, SCHEMENEWITZ A, LOPUKHINA A, *et al.* Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 50717-50725.
- [16] BOERJAN W, CERVERA M T, DELARUE M, *et al.* Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1405-1419.
- [17] KING J J, STIMART D P, FISHER R H, *et al.* A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 2023-2037.
- [18] CELENZA J L, GRISAFI P L, FINK G R. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 2131-2142.
- [19] LEHMAN A, BLACK R, ECKER J R, *et al.* HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl[J]. *Cell*, 1996, 85: 183-194.
- [20] DELARUE M, PRINSEN E, ONCKELEN H V, *et al.* Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis[J]. *Plant J*, 1998, 14: 603-611.
- [21] BARLIER I, KOWALCZYK M, MARCHANT A, *et al.* The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14819-14824.
- [22] SMOLEN G, BENDER J. *Arabidopsis* cytochrome p450 cyp83B1 mutations activate the tryptophan biosynthetic pathway[J]. *Genetics*, 2002, 160: 323-332.
- [23] HOECKER U, TOLEDO-ORTIZ G, BENDER J, *et al.* The photomorphogenesis-related mutant red1 is defective in CYP83B1, a red light-induced gene encoding a cytochrome p450 required for normal auxin homeostasis[J]. *Planta*, 2004, 219: 195-200.
- [24] WOODWARD A W, BARTEL B. Auxin: regulation, action, and interaction[J]. *Ann Bot (Lond.)*, 2005, 95: 707-735.
- [25] COHEN J D, SLOVIN J P, HENDRICKSON A M. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis[J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 197-199.
- [26] MIKKELSEN M D, HANSEN C H, WITTSTOCK U, *et al.* Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33712-33717.
- [27] ZHAO Y, HULL A K, GUPTA N R, *et al.* Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome p450s CYP79B2 and CYP79B3[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 3100-3112.
- [28] LJUNG K, HULL A K, CELENZA J, *et al.* Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1090-1104.
- [29] HANSEN B G, HALKIER B A. New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2005, 221: 603-606.
- [30] ZHAO Y, CHRISTENSEN S K, FANKHAUSER C, *et al.* A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis[J]. *Science*, 2001, 291: 306-309.
- [31] TOBENA-SANTAMARIA R, BLIEK M, LJUNG K, *et al.* FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 753-763.