

综 述

红景天甙生物合成途径：酪醇合成的起始反应及其糖基化

马兰青¹, 柳春梅¹, 于寒松², 张继星³, 高东尧⁴, 李彦舫⁴, 王有年¹

1 北京农学院 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 102206

2 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118

3 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古 通辽 028043

4 吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062

马兰青, 柳春梅, 于寒松, 等. 红景天甙生物合成途径：酪醇合成的起始反应及其糖基化. 生物工程学报, 2012, 28(3): 282-294.

Ma LQ, Liu CM, Yu HS, et al. Salidroside biosynthesis pathway: the initial reaction and glycosylation of tyrosol. Chin J Biotech, 2012, 28(3): 282-294.

摘 要: 红景天甙 (Salidroside) 生源途径分子机制的解析是利用基因工程、代谢工程技术合成目标化合物的基础。糖基化是红景天甙生物合成的最后一步反应。在前期工作中, 本课题组率先报道了与红景天甙生物合成相关的 3 个尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 (UGTs) 基因, 在体外酶学性质研究的基础上, 利用根癌农杆菌和发根农杆菌介导分别建立了相关转基因体系, 鉴别了红景天甙生物合成最适 UGT 及植物和毛状根生物反应器系统合成红景天甙的效率差异; 酪醇 (Tyrosol) 是红景天甙糖基化反应的甙元底物分子, 其具体的代谢通路及其调控机制仍不明确。针对酪醇生物合成来源主要存在两种观点: 一是酪醇可能来自于苯丙烷代谢途径产生的 4-香豆酸, 该途径起源于苯丙氨酸; 二是生物碱代谢途径的中间产物酪胺可能是酪醇生物合成的前体, 该途径则起源于酪氨酸。在后续工作中, 否定了酪醇来源于苯丙烷代谢途径的可能性, 进一步的工作证实酪氨酸脱羧酶 (TyrDC) 在酪醇生物合成的起始反应中担负着重要功能, 酪醇作为一种苯乙烷类化合物衍生物, 其生物合成来源于生物碱代谢途径。

关键词: 红景天甙, 酪醇, 分子调控, 红景天

Received: July 18, 2011; **Accepted:** October 20, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31140068, 30900112), Key Natural Science Foundation of Beijing Municipality (No. 5111001), Foundation of Beijing Municipal Education Committee (No. KM201110020001), Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning Under the Jurisdiction of Beijing Municipality (Nos. PHR20090516, PHR201108279).

Corresponding author: Yanfang Li. Tel/Fax: +86-431-87961591; E-mail: lqma@jlu.edu.cn

Younian Wang. Tel/Fax: +86-10-80797305; E-mail: lqma@bac.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31140068, 30900112), 北京市自然科学基金重点项目 (No. 5111001), 北京市教委面上项目 (No. KM201110020001), 北京市属高校人才强教深化计划项目 (Nos. PHR20090516, PHR201108279) 资助。

Salidroside biosynthesis pathway: the initial reaction and glycosylation of tyrosol

Lanqing Ma¹, Chunmei Liu¹, Hansong Yu², Jixing Zhang³, Dongyao Gao⁴, Yanfang Li⁴, and Younian Wang¹

¹ Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture China, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

² Food Science and Engineering College, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

³ College of Life Science, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, Inner Mongolia, China

⁴ College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: Salidroside, the 8-O- β -D-glucoside of tyrosol, is a novel adaptogenic drug extracted from the medicinal plant *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Due to the scarcity of *R. sachalinensis* and its low yield of salidroside, there is great interest in enhancing the production of salidroside by biotechnological process. Glucosylation of tyrosol is thought to be the final step in salidroside biosynthesis. In our related works, three *UGT* clones were isolated from the roots and the cultured cells. Our intention was to combine the catalytic specificity of these *UGTs* *in vitro* in order to change the level of salidroside *in vivo* by over-expression of the above *UGTs*. However, as the aglycone substrate of salidroside, the biosynthetic pathway of tyrosol and its regulation are less well understood. The results of related studies revealed that there are two different possibilities for the tyrosol biosynthetic pathway. One possibility is that tyrosol is produced from a *p*-coumaric acid precursor, which is derived mainly from phenylalanine. The second possibility is that the precursor of tyrosol might be tyramine, which is synthesized from tyrosine. Our previous work demonstrated that over-expression of the endogenous phenylalanine ammonia-lyase gene (*PALrs1*) and accumulation of *p*-coumaric acid did not facilitate tyrosol biosynthesis. In contrast, the data presented in our recent work provide *in vitro* and *in vivo* evidence that the tyrosine decarboxylase (*RsTyrDC*) is most likely to have an important function in the initial reaction of the salidroside biosynthesis pathway in *R. Sachalinensis*.

Keywords: salidroside, tyrosol, molecular regulation, *Rhodiola* L.

红景天是蔷薇目景天科 (Crassulaceae) 红景天属 (*Rhodiola* L.) 多年生草本或亚灌木, 具有肉质匍匐根状茎, 为珍稀药用植物^[1-2]。全世界约有红景天属植物 90 余种, 分布于我国 71 种, 约占世界红景天种质资源的 80%^[1]。最近几年, 由于红景天根茎提取物具有众多生物学活性, 如抗过敏、消炎及提高精神敏锐性等, 其作为一种商业制剂被美国、欧洲以及亚洲消费者普遍接受^[2-3]。红景天甙 (Salidroside) 和甙元酪醇 (Tyrosol) 是红景天属植物主要活性化合物 (图 1)^[4]。药理学研究表明, 红景天甙具有重要的适

应原样作用, 对于缺氧、辐射、疲劳及衰老具有显著的拮抗和调节作用^[5-6]。

红景天生存环境条件恶劣, 同时由于花粉传粉障碍等自身生殖生理特性, 加之近年来过度放牧以及开发力度不断加大, 导致红景天属植物生存的原生生态系统遭到破坏^[7]; 另一方面, 人工栽培红景天功效成分含量低且病害严重^[8], 致使红景天原药资源日趋匮乏。运用现代生物技术解析红景天甙生物合成途径的分子机制, 为利用基因工程、代谢工程技术合成红景天甙提供基础, 成为该领域研究热点。近 10 年来, 我们主要围

绕红景天甙生物合成途径关键基因分离和功能鉴定开展工作,取得重要进展。本文主要对红景天甙生物合成分子机制——酪醇合成的起始反应及其糖基化机理进行综述。

1 酪醇生物合成的起始反应

红景天甙为酪醇-8-*O*- β -D-葡萄糖甙(图1)。作为酪醇分子在植物体内的一种贮运分子形式,红景天甙生物合成最后一步反应机制已经明确,植物体内的尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(UDP-glucosyltransferase, UDPGT, UGTs)以尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和酪醇为底物催化合成红景天甙(图1)^[4,9]。然而,酪醇作为红景天甙生物合成的甙元分子,其具体的代谢通路及其调控方式仍不明确。酪醇是芳香族氨基酸衍生物,属于典型的简单酚类化合物,根据植物次生代谢途径的共同规律,可明确其前体化合物来源于莽草酸途径(Shikimate pathway)(图1)。总结以往的文献报道,针对酪醇生物合成来源主要存在两种观点:一是酪醇可能来自于苯丙烷代谢途径产生的4-香豆酸(*p*-Coumaric acid),该途径起源于苯丙氨酸(Phenylalanine)(图1A)^[10-11];二是生物碱代谢途径的中间产物酪胺(Tyramine)可能是酪醇生物合成的前体,该途径则起源于酪氨酸(Tyrosine)(图1B)^[12-13]。

莽草酸途径起始于磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate)和赤藓糖-4-磷酸(Erythrose 4-phosphate)间的缩合,之后经过若干步反应生成阿罗酸(Arogenate);之后代谢途径形成两个支路,阿罗酸在阿罗酸脱水酶和阿罗酸脱氢酶的催化下分别生成苯丙氨酸和酪氨酸(图1)^[14]。苯丙氨酸和酪氨酸是高等植物芳香族

次生代谢产物重要的前体化合物。苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)和酪氨酸脱羧酶(Tyrosine decarboxylase, TyrDC)是连接初生代谢和次生代谢途径之间的关键酶类^[15]。来源于苯丙氨酸,植物体形成一系列基于苯丙烷基本骨架的天然产物。苯丙烷类化合物的生物合成起始于苯丙氨酸去氨基后生成肉桂酸,之后肉桂酸羟基化后产生4-香豆酸。苯丙氨酸解氨酶催化了苯丙氨酸的去氨基作用,是苯丙烷代谢途径的第一步反应,同时也是该途径的限速步骤(图1A)^[16]。酪氨酸在酪氨酸脱羧酶等酶的催化作用下转化为多巴胺(Dopamine)和4-羟基-苯乙醛(4-Hydroxyphenylacetaldehyde, 4-HPAA),多巴胺和4-羟基-苯乙醛进一步缩合,生成苯异喹啉生物碱合成的主要前体(s)-Norcoclaurine,再进一步合成各种苯丙异喹啉生物碱^[15]。酪氨酸脱羧酶是生物碱合成途径的关键酶和限速酶,其中,4-羟基-苯乙醛是酪醇(4-羟基-苯乙醇)生物合成的直接前体,其经过一步还原反应可直接生成酪醇。

为阐明酪醇生物合成起始反应机制,我们从高山红景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor 中分离了苯丙氨酸解氨酶基因,命名为 *PALrs1*, 构建植物表达载体,使其置于双35S启动子(CaMV 35S和TMV 35S)的驱动下通过根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法转化回高山红景天,研究 *PALrs1* 过表达对酪醇和红景天甙生物合成所产生的影响^[17]。如同预先设想,过表达 *PALrs1* 转基因植株中4-香豆酸含量与对照相比提高3.3倍,然而意想不到的是,在转基因植株中酪醇和红景天甙含量与对照相比分别下降4.7和7.7倍,进一步的测定结果表明,处在竞争碳

流支路上的酪氨酸含量却下降了 2.6 倍 (图 1)^[17]。由此我们认识到 *PALrs1* 的过表达和 4-香豆酸的积累并不能够促进酪醇的生物合成; 另一方面, 从 4-香豆酸生成酪醇需要一步脱羧反应, 然而, 4-香豆酸的脱羧反应只存在于微生物

中^[18], 在植物中没有此类反应的任何信息。我们的研究提供了一个体内证据: 酪醇的生物合成并非来源于苯丙氨酸起始的苯丙烷代谢途径, 而酪氨酸水平的下降极有可能是红景天甙积累受阻、含量下降的直接原因^[17]。

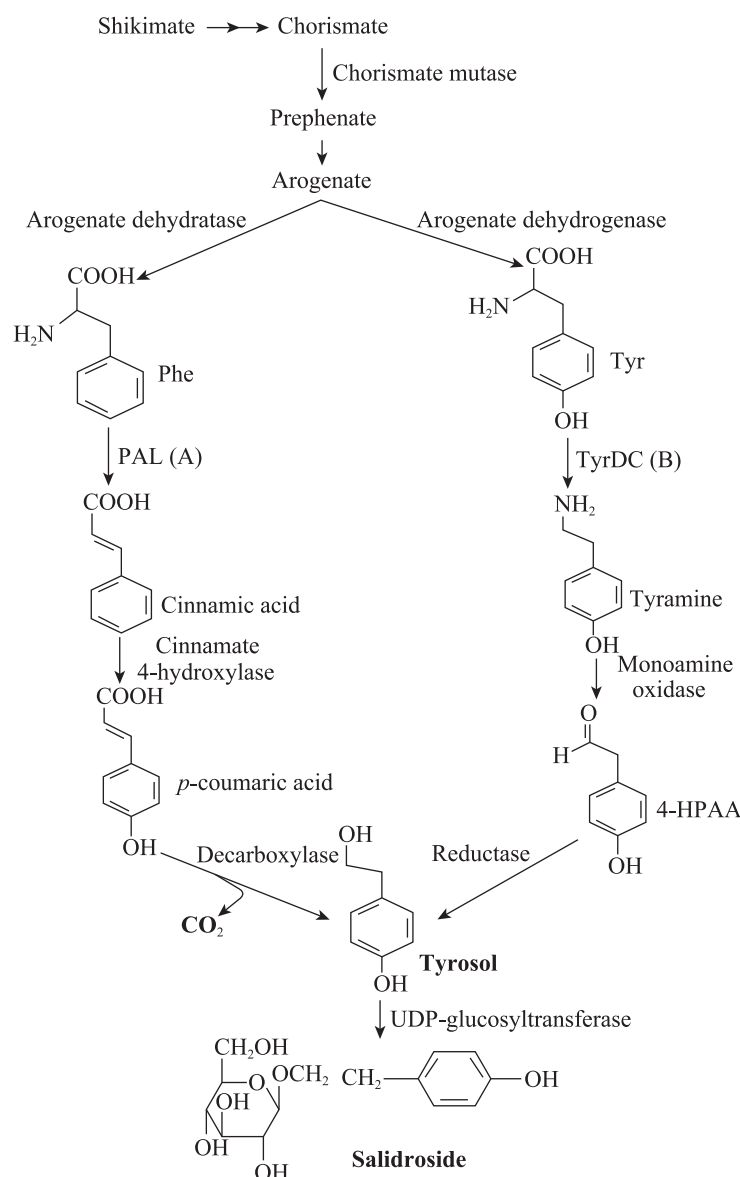


图 1 推测的红景天甙生物合成途径^[17]

Fig. 1 Proposed biosynthetic pathway of salidroside formation^[17]. Phe: phenylalanine; Tyr: tyrosine; PAL: phenylalanine ammonialyase; TyrDC: tyrosine decarboxylase; 4-HPAA: 4-hydroxyphenylacetaldehyde.

为进一步明确酪醇是否来源于酪氨酸脱羧酶起始的生物碱代谢途径,我们从高山红景天中分离了酪氨酸脱羧酶基因,命名为 *RsTyrDC*。首先将 *RsTyrDC* 基因构建原核表达载体,获得 *RsTyrDC* 纯化蛋白,通过体外酶促反应系统确认其具有酪氨酸脱羧酶活性后,将 *RsTyrDC* 基因分别构建正义和反义植物表达载体,通过根瘤农杆菌介导转化回高山红景天,研究 *RsTyrDC* 过表达和 *TyrDCs* 表达受抑制后转基因植株体内酪醇和红景天甙生物合成水平变化^[19]。RNA gel blotting 结果表明,正义-*RsTyrDC* 转基因植株中, *RsTyrDC* 获得转录水平过表达 (图 2A), 转基因植株中酪氨酸脱羧酶相对酶活较对照相应提高 1 倍,酪醇和红景天甙含量与对照相比分别提高 1.6 和 2.7 倍^[19];而反义-*RsTyrDC* 转基因植株中, *TyrDCs* 转录水平表达受到明显抑制 (图 2B), 转

基因植株中酪氨酸脱羧酶相对酶活较对照相应下降 3.2 倍,相应地,酪醇和红景天甙含量较对照分别下降 2.7 和 4.1 倍^[19]。此外, *RsTyrDC* 表达特性分析结果表明,其在高山红景天中的优势表达部位为根茎,与红景天甙积累规律一致;相似的表达规律同样存在于玫瑰红景天 *Rhodiola rosea* L. 的研究中^[20]。以上实验结果提供了重要的研究证据: *RsTyrDC* 能够调控酪醇的生物合成, *RsTyrDC* 在红景天甙生物合成的起始反应中担负着重要功能^[19]。

除了我们的研究结果,一项早期的研究发现,在欧丁香 *Syringa vulgaris* 植物中,酪氨酸脱羧酶活性支持毛蕊花糖甙 (Verbascoside) 生物合成;毛蕊花糖甙的甙元分子结构及其糖基化位点与酪醇极为相似^[13]。有趣的是,在最近的一项研究结果中, Landtag 将欧芹 *Petroselinum sativum*

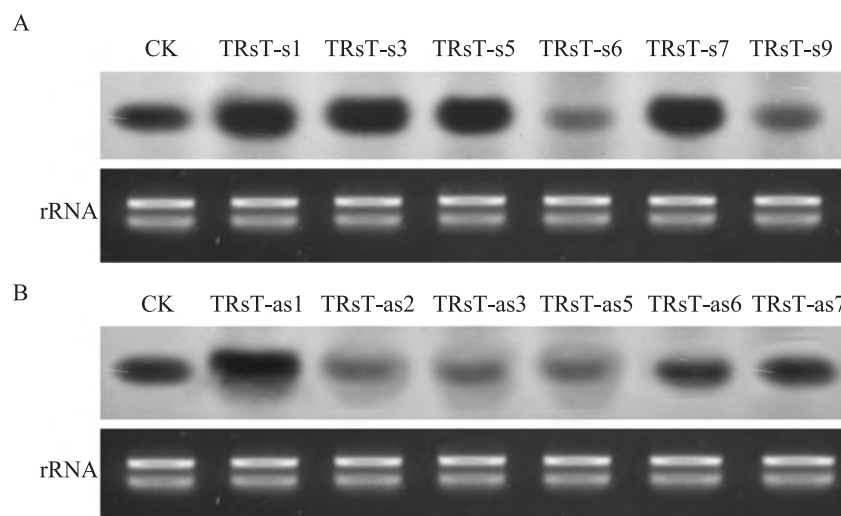


图 2 正义-*RsTyrDC* 转基因株系 (A) 和反义-*RsTyrDC* 转基因株系 (B) RNA gelblotting 分析结果^[19]

Fig. 2 Identification of sense-*RsTyrDC* transformed plant lines (A) and antisense-*RsTyrDC* transformed plant lines (B) by RNA gel-blot analysis^[19]. CK RNA isolated from empty vector transgenic plants was used as the negative control; TRsT-s1 to TRsT-s9 RNA isolated from the sense-*RsTyrDC* transformed plant lines; TRsT-as1 to TRsT-as7 RNA isolated from the antisense-*RsTyrDC* transformed plant lines.

TyrDC 置于 35S 启动子的驱动下转入马铃薯, 在过表达 *TyrDC* 转基因马铃薯块茎中, 意外发现了一种新化合物——红景天甙, 并由此推测过表达 *TyrDC* 在转基因马铃薯中启动了一条新的代谢途径^[12]。

鉴于酪醇生物合成的直接前体 4-羟基-苯乙醛是酪氨酸脱羧酶起始生物碱代谢途径的一个中间产物, 结合上述我们的研究结果和相关文献报道, 基本可以确定酪醇分子生物合成来源于酪氨酸脱羧酶起始的生物碱代谢途径, 其具体代谢通路推测如下: 酪氨酸在酪氨酸脱羧酶的催化下生成酪胺, 其在酪胺单氧化酶 (Tyramine oxidase) 的催化下生成 4-羟基-苯乙醛, 之后芳基乙醇脱氢酶 (Aryl-alcohol Dehydrogenase) 将 4-羟基-苯乙醛还原为酪醇, 最终酪醇经糖基化生成红景天甙 (图 1B)^[19]。目前, 已经发现在植物中存在催化酪胺生成 4-羟基-苯乙醛的酪胺单氧化酶^[12]。

基于以上实验证据, 基本可以确定酪醇的生物合成来源于酪氨酸而非苯丙氨酸, 在酪氨酸脱羧酶起始的途径中, 下步的工作重点应该确认红景天植物中酪胺单氧化酶基因的存在以及对于酪醇生物合成的具体调控方式; 另一方面, 来源于酪氨酸的另一条途径也有可能为酪醇的合成提供前体: 酪氨酸在酪氨酸转氨酶 (Tyrosine aminotransferase, TAT) 的催化下生成 4-羟基-苯丙酮酸 (4-Hydroxyphenylpyruvic acid, 4-HPP), 之后 4-羟基-苯丙酮酸经过脱羧反应也可以生成 4-羟基-苯乙醛, 其经过一步还原反应生成酪醇。然而, 截止到目前的研究结果, 没有证据支持酪醇的生物合成来源于该途径, 因此, 后续的工作

需要分析和验证酪氨酸转氨酶是否具有调控酪醇生物合成的相关功能。

2 酪醇的糖基化反应

糖基转移酶 (Glycosyltransferase, GT, EC 2.4.x.y) 是生物体中广泛存在的一大类酶, 负责催化合成自然界中所有的寡糖、多糖、复合糖 (糖脂、糖蛋白) 以及糖甙。糖基转移酶将高能活性供体分子的单糖残基转移至糖、蛋白质、脂类、核酸以及另外一些小分子化合物等受体分子 (甙元) 上, 形成糖苷键, 完成糖基化反应^[21]。糖基高能活性供体分子是核苷二磷酸活化的含糖基化合物, 其中以尿苷二磷酸-葡萄糖 (UDPG) 最为常见, 另外还包括 UDP-半乳糖和 UDP-鼠李糖等, 供体为 UDPG 的糖基转移酶称为 UDP-葡萄糖基转移酶 (UGTs)^[22]。UGTs 是一大类与植物次生代谢产物糖基化相关的蛋白, 植物次生代谢途径产生的绝大部分糖甙类化合物均是由 UGTs 催化合成的^[23]。糖甙的生物合成改变了植物中甙元分子的生物活性、水溶性以及在细胞和生物体内的转运特性^[24]。

基于序列相似性、信号模序、立体化学性质、糖甙连接构建方式以及受体分子特异性等因素, 自然界中的糖基转移酶多基因家族可以划分为 92 个超家族^[25] (<http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>); 其中, GT 超家族-1 包含动物、植物、真菌、细菌以及病毒中所有的 UGTs^[26] (http://www.unisa.edu.au/pharm_medsci/Gluc_trans/table21.htm)。植物中的 GT 超家族-1 由一个庞大的基因家族组成, 如在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和紫花苜蓿 *Medicago*

truncatula 中分别含有 120 和 165 种 UGTs^[27-28]。Ross 等采用邻位相连法 (Neighbor-joining) 和基于最大简约法 (Parsimony-based) 分析了拟南芥 GT 超家族-1 所有 UGTs, 建立了上述基因系统进化树, 其分支为 14 个组, 说明拟南芥 UGTs 有可能从 14 个祖先基因进化而来。该研究为植物 UGTs 功能分析提供了一个参照系, 其他植物新发现 UGTs 与拟南芥系统树整合聚类分析, 有可能初步预测新基因的部分功能信息^[23]。

植物中的 UGTs 含有相似的结构域, 所有的 UGT C-末端都含有一个 44 个氨基酸的特征性区域, 称为 PSPG 框, 被认为是 UDPG 的结合区域^[29]; UGT N-末端被认为是特异性结合甙元底物的区域, 根据甙元底物的不同特性, 相同亚类的 UGT 该区域具有有限的保守性^[30]。研究表明, 红景天属植物中的 UGTs 是催化酪醇糖基化合成红景天甙的关键酶^[4,9]。为明确酪醇的糖基化机制, 我们选择植物中以小分子简单酚类化合物 (与酪醇分子结构相似的化合物) 为甙元底物的 UGTs 保守区设计简并引物, 从高山红景天愈伤组织中分离了一个 *UGT* 基因, 国际糖基转移酶委员会命名其为 *UGT73B6*^[9]。序列分析结果表明, *UGT73B6* 与烟草 *Nicotiana tabacum* TOGT1、甜菜 *Beta vulgaris* *UGT73A4* 表现出 54% 的一致性^[31-32]。将 *UGT73B6* 置于双 35S 启动子 (CaMV 35S 和 TMV 35S) 的驱动下通过根癌农杆菌介导法转化回高山红景天, 检测 *UGT73B6* 过表达对红景天甙积累水平所产生的影响, 结果显示, *UGT73B6* 转基因愈伤组织和植株中的红景天甙含量较对照提高 1 倍。以上实验结果证明 *UGT73B6* 具有调控酪醇合成红景天甙的功能, *UGT73B6*

是红景天属植物中首个分离的与酪醇糖基化相关的 *UGT* 基因^[9]。然而在研究中同时发现, *UGT73B6* 在高山红景天叶片中不表达, 而叶片中含有微量的红景天甙, 说明红景天植物中还存在其他的 UGTs 能够调控酪醇的糖基化反应^[9]。

植物 *UGTs* 基因的分离和酶功能的验证是该领域研究的难点。其原因在于, 植物 UGTs 蛋白质一级结构序列相似性很低, 即使被认为结合 UDPG 的特征性结构域 PSPG 框也只有 43%~78% 的同源性, 而其他区域的同源性则低于 35%, 很难利用有限的保守区设计同源简并引物获得目标 UGTs; 另一方面由于植物次生代谢产物在植物体内担负着细胞解毒、物质交流、信号转导、防御机制等功能^[33-34], 绝大多数次生代谢产物属于环境诱导合成, 即使在植物体内存在, 负责其生物合成的关键基因 mRNA 丰度也很低, 本身特异性很差的简并引物和低丰度的模板结合的几率更低。UGTs 的催化性质鉴定一般通过体外表达及酶促反应系统实现。然而在体外研究系统中, UGTs 常表现出广泛的底物专一性, 例如烟草中的水杨酸糖基转移酶与羟基-苯甲酸和酰基-苯甲酸的亲和力要明显高于其天然底物——水杨酸 (Salicylic acid)^[35]。因此, UGTs 的底物特异性并不绝对, 它对于甙元分子表现出位置选择性和区域专一性, UGTs 的这种特性保证了植物在某种程度上的灵活性, 能够迅速适应环境改变和进化趋势^[36]。

针对 UGTs 的上述特点, 我们在后续研究中, 利用保守-简并杂合寡核苷酸引物 (Consensus-degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers, CODEHOP) 设计技术结合茉莉酸甲酯 (Methyl

jasmonate, MeJA) 诱导高山红景天植物材料 (植株和愈伤组织) 方法, 选择 UGTs 活性最高时的植物材料分离 mRNA, 分别从高山红景天根茎和愈伤组织中分离得到 2 个 UGTs, 国际糖基转移酶委员会分别命名为 *UGT72B14* 和 *UGT74R1* [37]。后续的工作中, *UGT72B14*、*UGT74R1* 连同上述工作中获得的 *UGT73B6* 一起进行了系统发育 (图 3)、表达特性、原核表达、体外酶促功能验证以及构建植物高效表达载体、利用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 介导建立高山红景天转基因毛状根体系, 从体外和体内两个实验系统分析上述基因功能 [37]。序列分析结果表明, *UGT72B14* 与蛇根木 *Rauvolfia serpentina* 熊果苷葡萄糖基转移酶 (Arbutin synthase, AS) [38] 一致性最高, 达到 61%; *UGT74R1* 与烟草 SAGT 一致性为 48%。系统发育分析结果表明 (图 3), *UGT72B14* 属于 E 组, 与蛇根木 AS 和拟南芥 *UGT72B1*、*UGT72E2* [39] 等聚合为一个分支, 蛇根木 AS 是对苯二酚 (Hydroquinone) UGT [38], 其甙元底物分子结构及糖基化位点与酪醇相似; *UGT74R1* 与烟草 SAGT、拟南芥 *UGT74F1*、*UGT74F2* 聚合为一个分支, 属于 L 组, 研究表明, SAGT 是一个水杨酸 UGT [35], 拟南芥 *UGT74F1*、*UGT74F2* 在体外也表现出很高的水杨酸活性 [39]; *UGT73B6* 则与烟草 TOGT1、拟南芥 *UGT73B3*、*UGT73B4* 属于 D 组, 烟草 TOGT1 对 4-香豆酸和咖啡酸 (Caffeic acid) 表现出很高的活性 [31]。

表达特性分析结果表明, *UGT72B14* 的优势表达部位为根茎, 与红景天甙积累规律一致; 而 *UGT74R1* 在愈伤组织中表达量较高, 而在根茎

中不表达 [37]; *UGT73B6* 在根茎、愈伤组织中均有一定量表达 [9]。体外酶促实验结果表明, 重组 *UGT72B14*、*UGT74R1* 和 *UGT73B6* 体外最适底物分别为酪醇、水杨酸和 4-香豆酸, 在体外条件下, 3 个酶均可以催化酪醇生成红景天甙 (图 4), 其中 *UGT72B14* 的活性最高, 其催化效率 (V_{\max}/K_m) 比 *UGT74R1* 和 *UGT73B6* 分别高 6.2 倍和 1.7 倍 [37]。为进一步验证 3 个基因的体内功能, 我们利用发根农杆菌介导建立了高山红景天转基因毛状根系统, 通过对转基因毛状根系统不断优化, *UGT72B14*、*UGT74R1* 和 *UGT73B6* 转基因毛状根株系红景天甙含量较对照均有增加, 其含量较转空载体毛状根株系对照分别提高 4.2、0.5 和 1.3 倍; 其中 *UGT72B14* 转基因株系红景天甙含量提升最为明显, 分别是 *UGT74R1* 和 *UGT73B6* 转基因株系的 8.4 和 3.2 倍, 说明 *UGT72B14* 是酪醇糖基化最适的 UGT; 另外, *UGT73B6* 转基因毛状根系统较转基因植株系统和愈伤组织系统红景天甙含量分别提高 3.1 和 1.2 倍, 说明转基因毛状根系统红景天甙合成效率更高 [37]。

UGT72B14 转录本主要存在于高山红景天根茎, 以及在体外和体内实验系统中表现出的酪醇糖基化高活性, 说明 *UGT72B14* 在红景天甙生物合成中担负着重要的功能; 而 *UGT73B6* 表达产物对于酪醇糖基化反应表现出较高活性, 且其在高山红景天根茎中表达量较高, 暗示着该基因可能参与红景天甙生物合成反应; *UGT74R1* 在根茎中不表达, 以及酪醇并非 *UGT74R1* 最适底物的特性, 说明该基因的功能与红景天甙生物合成缺乏关联 [37]。

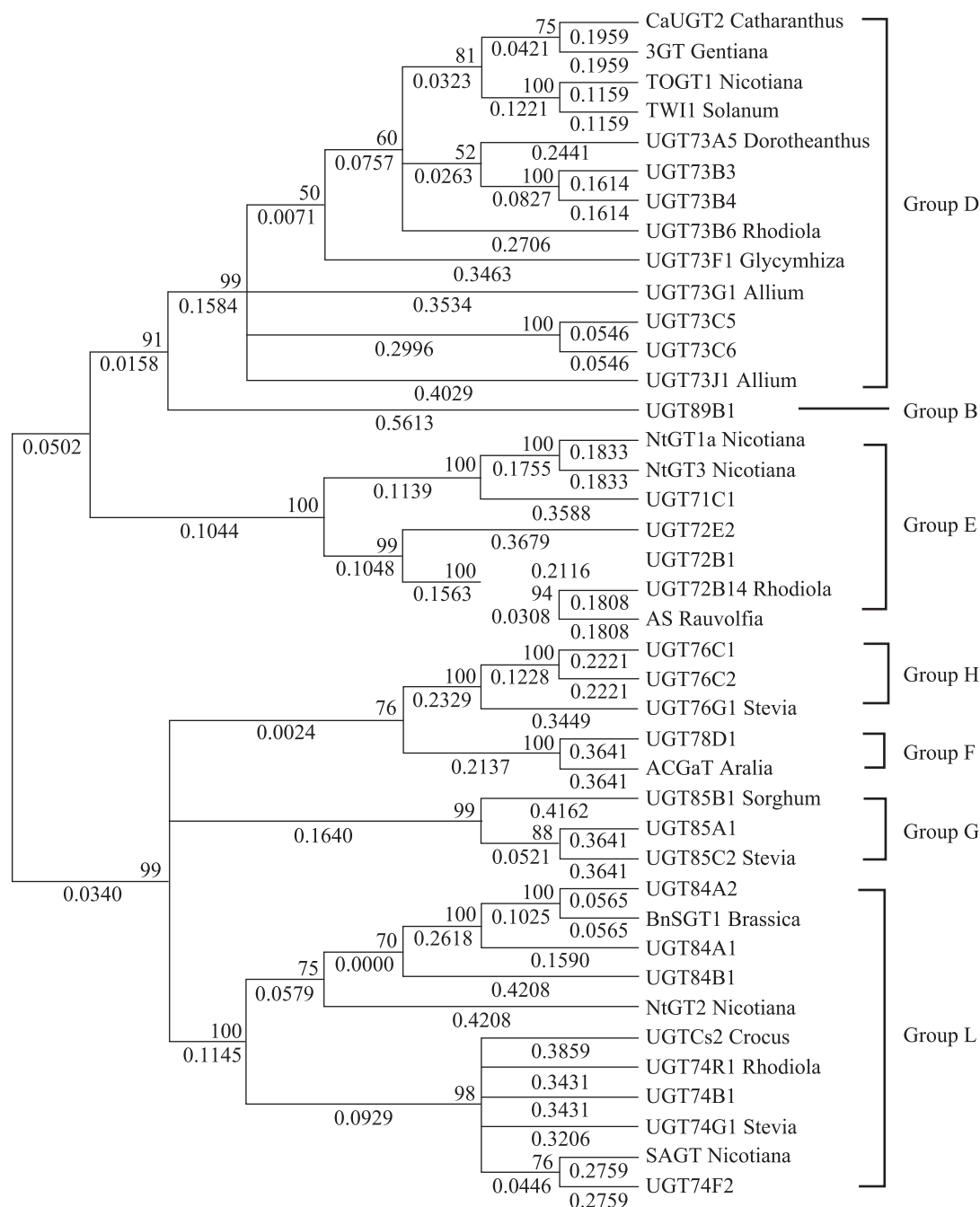


图 3 植物次生代谢产物 UDP-葡萄糖基转移酶 (UGTs) 系统进化分析^[37]

Fig. 3 Neighbor-joining tree of plant secondary product glycosyltransferases^[37]. Numbers at the forks are bootstrap values from 100 replicates, and the numbers at the branch are branch lengths.

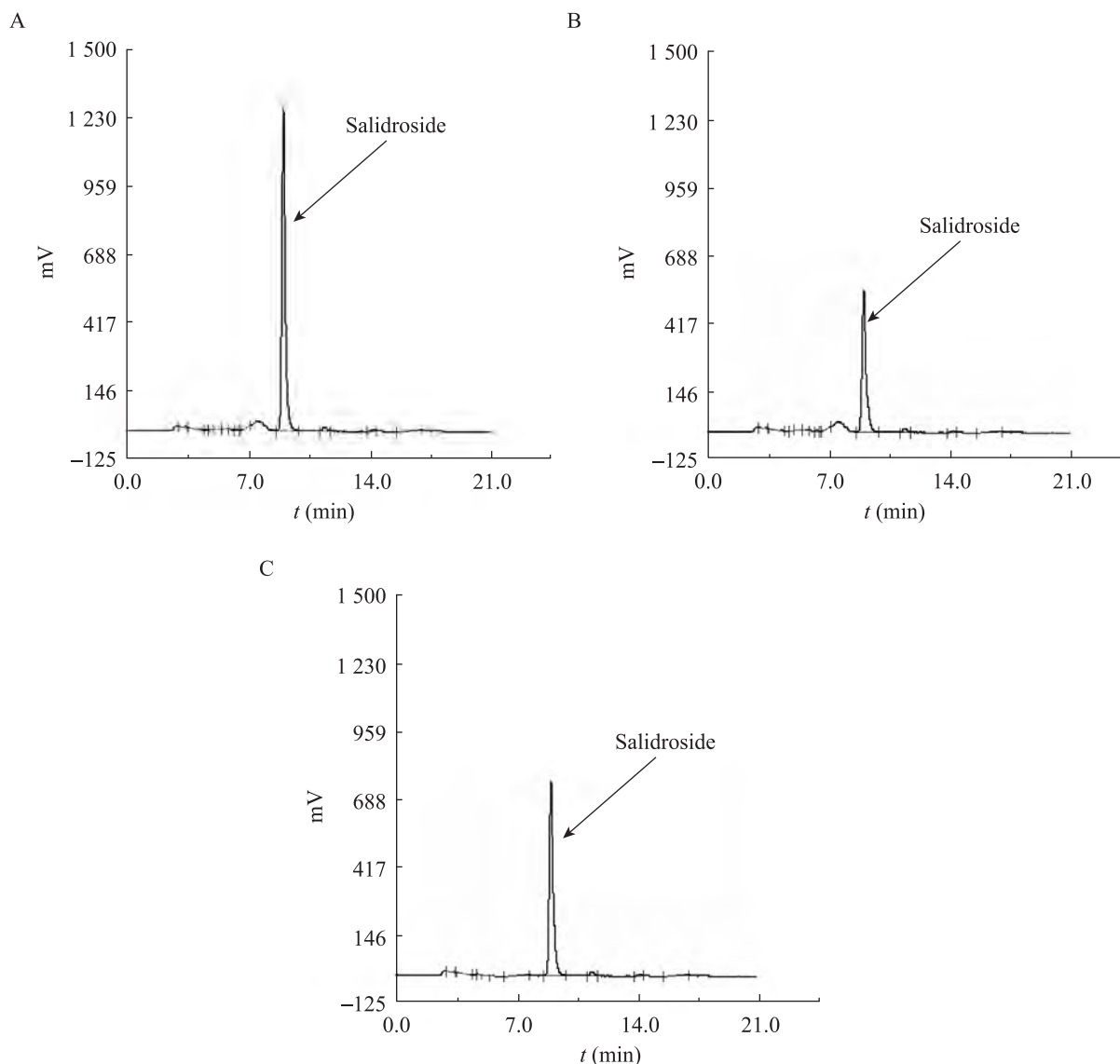


图 4 重组 UGT72B14 (A)、UGT74R1 (B) 及 UGT73B6 (C) 体外酶促反应 HPLC 测定结果^[37]

Fig. 4 HPLC elution profiles of enzyme reaction products of UGTs^[37]. Enzyme reaction products of recombinant UGT72B14 (A), recombinant UGT74R1 (B) and recombinant UGT73B6 (C).

综合前人研究结果,可以确定红景天甙生物合成和贮存的主要部位为红景天根茎,由于 UGTs 具有广泛的底物专一性,因此,除了 UGT72B14,确认红景天根茎中是否还存在对于醌醇糖基化反应更为专一的 UGTs 将是下一步工

作的重点。

3 结论与展望

红景天甙是红景天属植物中公认的功效成分,由于资源的稀缺,使利用现代生物技术分子

调控目标化合物的生物合成成为研究热点。通过系统研究, 否定了酪醇来源于苯丙烷代谢途径的可能性, 进一步的工作证实, 酪醇作为一种苯乙烷类化合物衍生物, 其生物合成来源于酪氨酸起源的生物碱代谢途径。后续研究中, 有两方面工作需要重点考虑, 一是在原有工作基础上, 需要对酪氨酸脱羧酶起始的红景天甙生物合成途径两步中间反应, 尤其是更为关键的酪胺单氧化酶基因的存在及其调控方式进行进一步确认和分析, 另一方面需要确认酪氨酸转氨酶是否具有调控酪醇生物合成的相关功能; 二是确认红景天根茎中是否还存在对于酪醇糖基化反应更为专一的 UGTs。

REFERENCES

- [1] Fu KJ, Ohba H, Gilbert MG. *Rhodiola*. Flora of China, 2009, 8: 251.
- [2] Yousef GG, Grace MH, Cheng DM, *et al.* Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species. *Phytochemistry*, 2006, 67(21): 2380–2391.
- [3] Tolonen A, Hohtola A, Jalonen J. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization techniques in the analysis of the main constituents from *Rhodiola rosea* extracts by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2003, 38(8): 845–853.
- [4] Xu JF, Su ZG, Feng PS. Activity of tyrosol glucosyltransferase and improved salidroside production through biotransformation of tyrosol in *Rhodiola sachalinensis* cell cultures. *J Biotechnol*, 1998, 61(1): 69–73.
- [5] Mao GX, Deng HB, Yuan LG, *et al.* Protective role of salidroside against aging in a mouse model induced by D-galactose. *Biomed Environ Sci*, 2010, 23(2): 161–166.
- [6] Ouyang JF, Lou J, Yan C, *et al.* In-vitro promoted differentiation of mesenchymal stem cells towards hepatocytes induced by salidroside. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(4): 530–538.
- [7] Zu YG, Tang Y. Ecological analysis on sexual reproductive produce and endangered reason of *Rhodiola sachalinensis*. *Bull Botanical Res*, 1998, 18(3): 336–340.
祖元刚, 唐艳. 高山红景天有性生殖过程及濒危原因的生态学分析. *植物研究*, 1998, 18(3): 336–340.
- [8] Meng QY, Jiang ML, Zhong WT, *et al.* Controlling the root-rot disease of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor with pesticides. *Chin J Shenyang Agric Univ*, 1994, 25(4): 264–267.
孟庆勇, 姜明兰, 钟文田, *等*. 药剂防治高山红景天根腐病初步研究. *沈阳农业大学学报*, 1994, 25(4): 264–267.
- [9] Ma L Q, Liu B Y, Gao D Y, *et al.* Molecular cloning and overexpression of a novel UDP-glucosyltransferase elevating salidroside levels in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 989–999.
- [10] Li W, Du GS, Huang QN. Salidroside contents and related enzymatic activities in *Rhodiola kirilowii* callus. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2005, 25(8), 1645–1648.
李伟, 杜桂森, 黄勤妮. 狭叶红景天愈伤组织中红景天甙含量及相关代谢酶活力的研究. *西北植物学报*, 2005, 25(8): 1645–1648.
- [11] Xu JF, Su ZG. Regulation of metabolism for improved salidroside production in cell suspension culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor: the effect of precursors. *Nat Prod Res Dev*, 1997, 10(2): 8–14.
许建峰, 苏志国, 冯朴荪. 高山红景天细胞悬浮培养中红景天甙生物合成代谢的调控 I: 前体的影响. *天然产物研究与开发*, 1997, 10(2): 8–14.
- [12] Landtag J, Baumert A, Degenkolb T, *et al.* Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. *Phytochemistry*, 2002, 60(7): 683–689.

- [13] Ellis BE. Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry*, 1983, 22(9): 1941–1943.
- [14] Yao K, De Luca V, Brisson N. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 1995, 7(11): 1787–1799.
- [15] Facchini PJ, Huber-Allanach KL, Tari LW. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 2000, 54(2): 121–138.
- [16] Bate NJ, Orr J, Ni W, et al. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(16): 7608–7612.
- [17] Ma LQ, Gao DY, Wang YN, et al. Effects of overexpression of endogenous phenylalanine ammonia-lyase (PALs1) on accumulation of salidroside in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Biol*, 2008, 10(3): 323–333.
- [18] Cavin JF, Barthelmebs L, Davies C. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(5): 1939–1944.
- [19] Zhang JX, Ma LQ, Yu HS, et al. A tyrosine decarboxylase catalyzes the initial reaction of the salidroside biosynthesis pathway in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(8): 1443–1453.
- [20] Gyorgy Z, Jaakola L, Neubauer P, et al. Isolation and genotype-dependent, organ-specific expression analysis of a *Rhodiola rosea* cDNA encoding tyrosine decarboxylase. *J Plant Physiol*, 2009, 166(14): 1581–1586.
- [21] Banthorpe DV. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. *Nat Prod Rep*, 1994, 11(3): 303–328.
- [22] Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 1997, 7(4): 255–269.
- [23] Ross J, Li Y, Lim E, et al. Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol*, 2001, 2(2): 3004.1–3004.6.
- [24] Li Y, Baldauf S, Lim EK, et al. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2001, 276(6): 4338–4343.
- [25] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): 233–238.
- [26] Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1997, 326(3): 929–939.
- [27] Paquette S, Moller BL, Bak S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 399–413.
- [28] Achnine L, Huhman DV, Farag MA, et al. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 2005, 41(6): 875–887.
- [29] Hundle BS, O'Brien DA, Alberti M, et al. Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(19): 9321–9325.
- [30] Meech R, Mackenzie PI. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1997, 24(12): 907–915.
- [31] Fraissinet-Tachet L, Baltz R, Chong J, et al. Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives,

- including salicylic acid. FEBS Lett, 1998, 437(3): 319–323.
- [32] Isayenkova J, Wray V, Nimtz M, et al. Cloning and functional characterisation of two regioselective flavonoid glucosyltransferases from *Beta vulgaris*. Phytochemistry, 2006, 67(15): 1598–1612.
- [33] Gachon CM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. Trends Plant Sci, 2005, 10(11): 542–549.
- [34] Chong J, Baltz R, Schmitt C, et al. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. Plant Cell, 2002, 14(5): 1093–1107.
- [35] Lee HI, Raskin I. Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. J Biol Chem, 1999, 274(51): 36637–36642.
- [36] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. Trends Plant Sci, 2000, 5(9): 380–386.
- [37] Yu HS, Ma LQ, Zhang JX, et al. Characterization of glycosyltransferases responsible for salidroside biosynthesis in *Rhodiola sachalinensis*. Phytochemistry, 2011, 72(9): 862–870.
- [38] Hefner T, Arend J, Warzecha H, et al. Arbutin synthase, a novel member of the NRD1beta glucosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. Bioorg Med Chem, 2002, 10(6): 1731–1741.
- [39] Lim EK, Doucet CJ, Li Y, et al. The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. J Biol Chem, 2002, 277(1): 586–592.

关于启用新账号的通知

我编辑部自 2012 年 2 月 20 日起, 将正式启用新的银行账号, 新的账户信息如下:

账户名称: 中国科学院微生物研究所

开户行: 中国农业银行股份有限公司北京科学园分理处

账号: 11251101040000848

凡向本刊编辑部转账的单位及个人, 请自 2 月 20 日起按新账号转款。为了快速到账, 稿件审理费和发表费建议使用银行转账方式汇款, 汇款时请务必注明稿件编号, 感谢您的合作!

《生物工程学报》编辑部

2012-2-17