

植物叶绿素降解途径及其分子调控

唐蕾*, 毛忠贵

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡214122

摘要: 文章介绍了近年来在叶绿素降解产物结构解析和关键酶基因克隆方面的最新成果, 以及在此基础上的叶绿素降解途径修正及其分子调控机理研究。

关键词: 叶绿素; 降解产物; 基因克隆; 降解途径; 分子调控

Degradation Pathway of Plant Chlorophyll and Its Molecular Regulation

TANG Lei*, MAO Zhong-Gui

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: The modified chlorophyll degradation pathway and its molecular regulation were reviewed according to the new findings of chlorophyll catabolites and key enzyme genes during recent years.

Key words: chlorophyll; catabolite; gene cloning; degradation pathway; molecular regulation

叶绿素降解是一个非常普遍的自然现象, 在秋季树木落叶、作物衰老、果实成熟, 或生物的环境胁迫如低温、虫害、微生物侵染等情况下, 都可能发生。据统计, 全世界年均叶绿素的降解量约达 10^9 吨(Moser等2009a)。了解和人为控制叶绿素降解过程无疑会给环境生态学、农产品生产、加工和贮存等带来可观的价值。然而, 直到20世纪90年代, 随着降解产物结构分析和酶基因克隆(叶绿素酶、脱镁叶绿酸 a 单加氧酶和红色叶绿素代谢产物还原酶)的成功, 叶绿素降解之谜才逐渐被揭开。

近年来由于物质结构分析手段、全基因组序列解析和生物信息学的长足进步, 新的观点不断涌现, 从单纯的降解途径, 逐步深入到调控机制。本文将着重介绍自2007年以来, 在新的叶绿素降解产物结构解析、基因克隆手段的变化与新酶基因的发现、降解途径的修正以及分子调控机制方面的研究成果。

1 叶绿素降解产物的结构解析

降解产物的结构解析是了解降解代谢流向的关键。在相当长的一段时间内, 人们在衰老的叶片中找不到与叶绿素降解有关的衍生物, 重要的转折点是1991年Krättinger等发现了大麦中非荧光叶绿素代谢物(nonfluorescent chlorophyll catabolite from *Hordeum vulgare*, Hv-NCC-1, 图1)。Hv-NCC-1的结构提示人们两点: 第一、氧化开环是发

生在二氢吡吩大环的 α -位, 而不是先前所认为的 δ -位; 第二、降解物由叶绿素 a 衍生而来, 因此叶绿素 b 在植物体内先转化为叶绿素 a , 再行降解。之后研究人员在油菜、菠菜、烟草、拟南芥和玉米等植物叶片中发现了类似结构的化合物, 统称为NCCs。

1.1 高度修饰的荧光叶绿素代谢物(hFCCs)

NCCs被解析之后, 研究人员以脱镁叶绿酸 a 为底物, 进行体外转化, 相继鉴定了红色叶绿素代谢物(red chlorophyll catabolite, RCC)及其还原产物即初级荧光叶绿素代谢物(primary fluorescent chlo-

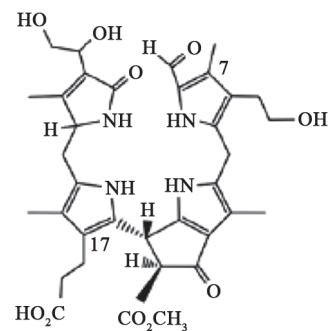


图1 Hv-NCC-1的结构示意图(Krättinger等1991)
Fig.1 Structure of Hv-NCC-1 (Krättinger et al 1991)

收稿 2011-05-26 修定 2011-09-06

资助 国家自然科学基金(30972057)。

* 通讯作者(E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn; Tel: 0510-85918296)。

rophyll catabolite, *pFCC*)。 *pFCC*在植物叶中经过修饰, 形成不同的荧光叶绿素代谢物(fluorescent chlorophyll catabolites, *FCCs*), 继而*FCCs*被转到液泡中, 在液泡的酸性条件下自发异构成为*NCCs*。近期, 研究者的注意力开始转向水果中四吡咯叶绿素降解产物的鉴定。在成熟的苹果皮和梨皮中发现了2种*NCCs*, 其结构与相应的衰老果树叶中的*NCCs*一致, 说明在衰老的叶片和成熟的果实中叶绿素降解途径是相同的(Kräutler 2008; Müller等2007)。但是Moser等(2008a, 2009b)对成熟香蕉皮的分析却弱化了上述观点, 原因是除了检测到*NCCs*之外, 还检测到被高度修饰的荧光叶绿素代谢物(hypermodified *FCCs*, *hFCCs*)。所谓高度修饰是指在C-17位上的酯化反应。通常, 叶绿素的植醇基被水解之后, 在C-17位上留下游离的丙酸基团, 该基团对于*FCCs*在酸性液泡中的自发异构是必须。在衰老的植物叶片中, *pFCC*的修饰不会发生在C-17位, *FCCs*能够自发异构为*NCCs*(图1), 因此在体内的降解产物中只有*NCCs*。而*pFCC*修饰为*hFCCs*时, C-17位的丙酸侧链被酯化, 阻碍了其向*NCCs*的异构, 因此在降解产物中可以检测到*hFCCs*。无独有偶, 在香蕉叶和白鹤芋叶中也发现了*hFCCs*(Banala等2010; Kräutler等2010)。 *hFCCs*的发现不仅扩展了人们对叶绿素降解产物生理作用的认识, 例如赋予成熟中的水果和秋天的落叶

可见的光学效应(Balana等2010; Moser等2008b), 同时也提示了在*pFCC*之后, 叶绿素降解途径开始分支(图2)。

1.2 叶绿素 α 烯醇式阴离子

尽管大多数学者认同叶绿素降解的关键是脱镁叶绿素 α 单加氧酶(pheophorbide α oxygenase, *PaO*)催化卟啉开环, 并因此将叶绿素降解途径称为*PaO*途径(图2), 但是仍然有学者坚持认为氧化酶类如叶绿素过氧化物酶(chlorophyll peroxidase)和叶绿素氧化酶(chlorophyll oxidase)参与了卟啉环周边基团的氧化或者二氢卟吩的开环成为胆红素类色素(bilibrubin-like pigments)。胆红素类色素进一步降解为吡咯化合物, 并最终分解成更小的碳和氮片段。由氧化酶类参与的叶绿素降解途径被称为氧化漂白途径(图2)。为了验证过氧化物酶在叶绿素降解中的功能, Hynninen等(2010)采用辣根过氧化物酶催化 H_2O_2 氧化叶绿素, 用薄层层析、紫外可见吸收、 1H 和 ^{13}C 核磁共振以及快原子轰击电离质谱分析氧化产物, 结果表明约60%的氧化产物为 $13^2(S)$ 和 $13^2(R)$ -羟基叶绿素 α 非对映异构体, 其余为少量的Mg-不稳定二氢卟吩 15^2 -甲酯、 17^3 -植酯。由于Mg-二氢卟吩不稳定, 所以产物中存在10%的紫色素副产物以及2种与叶绿素 α 烯醇式阴离子相类似的红色成分, 但产物中并没有胆红素类化合物, 即没有开环的四吡咯化合物存在。

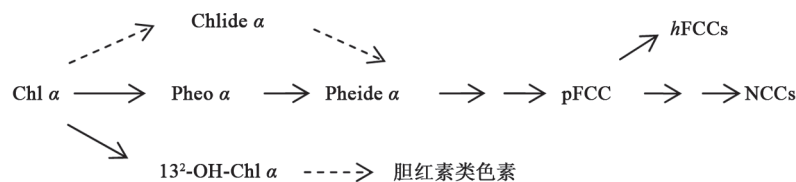


图2 高等植物中叶绿素的降解代谢途径

Fig.2 Degradation pathways for chlorophyll in higher plants

--> 为修正前的途径; Chl α : 叶绿素 α ; Pheo α : 脱镁叶绿素 α ; Chlide α : 脱植基叶绿素 α ; Pheide α : 脱镁叶绿酸 α ; *pFCC*: 初级荧光叶绿素代谢产物; *NCCs*: 非荧光叶绿素代谢产物; *hFCCs*: 高度修饰的荧光叶绿素代谢物。

2 基因克隆手段的变化与新酶基因的发现

经典的基因克隆通常始于蛋白的分离纯化。自从1912年Stoll等发现叶绿素酶催化叶绿素的脱植基反应以来, 研究人员就开始从各种植物材料和藻类中分离纯化与叶绿素降解相关的酶类, 并试图从分子水平上认识它们的结构与催化机理。

但是直到1999年以色列和日本的两个研究小组才首次克隆了柑桔和藜的叶绿素酶基因(Jacob-Wilk等1999; Tsuchiya等1999), 此时, 距他们于1993年纯化柑桔叶绿素酶和1997年纯化藜叶绿素酶, 并分别得到N端氨基酸序列和中间氨基酸序列片段, 已历经6年和2年的时间。从植物中提纯蛋白的困难,

以及从部分蛋白的氨基酸序列获得全基因序列、在微生物宿主中表达、并验证其活性所耗费的大量时间和精力,可能是导致对叶绿素降解的认识长期停留在生理与生化水平的原因之一。随着分子生物学的发展、全基因组测序的成功,大量的基因序列信息可以从公共的数据库中获得。因此目前研究者更倾向于利用生物信息学的方法,从基因序列数据库中找到可能的目标基因,在宿主中表达便于纯化的融合蛋白,进而获得目标蛋白,进行蛋白结构预测和酶学性质分析,确定其生理功能。与经典方法相比,这种方法大大加快了基因克隆的速度。

2.1 叶绿素酶同功酶的基因克隆与酶学性质分析

叶绿素酶基因克隆的成功是叶绿素降解研究的重大突破之一,但是由此也引发了一系列的争议,其中同功酶的作用是重要的一个方面。

叶绿素酶同功酶的分子解析始于拟南芥中的AtCLH1和AtCLH2 (Tsuchiya等1999),两者在细胞内的定位以及对植物激素诱导所产生的反应均有不同,AtCLH2具有典型的叶绿体导向肽,而AtCLH1却没有。植物衰老促进剂甲基茉莉酸可以增加AtCLH1 mRNA的浓度以及相应蛋白质含量和叶绿素酶活力,而AtCLH2 mRNA的浓度却不受甲基茉莉酸的影响。Lee等(2010)根据已报道的叶绿素酶蛋白的保守区域设计简并引物,从青花菜的cDNA文库中扩增得到青花菜叶绿素酶开放阅读框(open reading frame, ORF)的部分片段,再利用5'/3' cDNA末端快速扩增(5'/3' rapid amplification of cDNA ends, RACE)得到3条全长cDNA *BoCLH1*、*BoCLH2*以及*BoCLH3*,氨基酸序列分析显示它们含有高度保守的脂肪酶基序(GXSXG)。但是*BoCLH3*缺少作为催化三联体(丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸)的组氨酸残基。N端序列预测表明,*BoCLH1*和*BoCLH2*具有典型的叶绿体导向序列,而*BoCLH3*含有质膜导向序列。*BoCLH1*、*BoCLH2*和*BoCLH3*的预测分子量分别是34.7、35.3和23.5 kDa。将3种同功酶的ORF经PCR扩增后,插入表达载体,在大肠杆菌中表达蔗糖结合蛋白与叶绿素酶融合蛋白(MBP-CLHs)。融合蛋白经过支链淀粉树脂亲和层析纯化,Factor Xa蛋白酶切除MBP,以及DEAE Sepharose Fast Flow离子交换柱

层析,得到3种叶绿素酶同功酶蛋白(*BoCLH1*、*BoCLH2*和*BoCLH3*)。酶学分析显示重组*BoCLH3*的叶绿素酶活性非常低,原因可能是催化三联体的不完整。*BoCLH1*更适合水解脱镁叶绿素,而*BoCLH2*和*BoCLH3*水解叶绿素和脱镁叶绿素的水平相当。*BoCLH1*和*BoCLH2*在pH稳定性和最适温度上有明显的不同。*BoCLHs*的不同特性提示它们在青花菜中可能发挥不同的功能(Lee等2010)。

2.2 脱镁叶绿素酶

对于叶绿素酶的另一个争议点是叶绿素酶是否在叶绿素降解中发挥关键作用。理由有两点:其一是叶绿素酶的细胞内定位。研究者利用已克隆基因的N端氨基酸导向肽分析、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的荧光定位、密度梯度离心以及电泳分析,得出了不同的结论。究竟叶绿素酶是定位于质体、叶绿体还是细胞质,众说不一。例如Schenk等(2007)使用GFP与AtCLH1和AtCLH2的C端及N端分别形成融合蛋白,考察它们在拟南芥叶肉细胞中的定位,结果表明没有任何一个同功酶定位于叶绿体。而Shemer等(2008)采用原位免疫荧光分析发现,柠檬的叶绿素酶存在于乙烯诱导的果皮细胞质体中,大部分与叶绿素结合。其二是*AtCLH1*和*AtCLH2*基因的单敲除和双敲除并未阻止衰老过程中叶绿素的降解,*AtCLH1*的RNAi沉默对降解的影响很小(Schenk等2007)。因此,研究者怀疑是否真正负责去植基作用的酶尚未找到。

Schelbert等(2009)在拟南芥信息资源库中搜索含有 α/β 水解酶特征的蛋白质,共得到462种,再从中寻找具有叶绿体导向肽预测的蛋白,共得到42种,其中功能未知的有30种,分别属于24个基因座。根据微阵列表达分析,其中3个基因与叶片衰老有关,通过研究它们的T-DNA插入突变体和双敲除突变体,发现*Atg13800*的缺失导致持绿现象的发生。此外,*Atg13800*的表达与*PAO*基因的表达高度相关。由此推测*Atg13800*可能是真正意义上的叶绿素酶基因。为了证实*Atg13800*的去植基活性,研究者将无叶绿体导向肽的部分与MBP在大肠杆菌中融合表达。随后以叶绿素*a/b*以及脱镁叶绿素*a/b*为底物检测其活性,发现该蛋白专一催化脱镁

叶绿素生成脱镁叶绿酸, 因此将其命名为脱镁叶绿素酶(pheophytinase, PPH) (Schelbert等2009)。

2.3 叶绿素 b 还原酶

至今, 在已鉴定的叶绿素降解产物中, 除了拟南芥的 At -NCC-3之外, 在C-7位上均含有甲基(图1), 即叶绿素 a 的特征性取代基团(Moser等2009a), 因此叶绿素 b 向叶绿素 a 的转化被认为是叶绿素 b 降解的先决条件。这一转化过程由两种酶催化完成, 它们是NADPH-依赖的叶绿素 b 还原酶和铁氧还蛋白依赖羟甲基-叶绿素还原酶。2007年Kusaba等在水稻的持绿突变体中, 采用图位克隆技术, 克隆了 $NYC1$ 基因(NON -YELLOW COLORING 1), 结果表明它是编码叶绿体定位并带有3个跨膜结构域的短链脱氢酶/还原酶。数据库检索表明它与水稻和拟南芥中的 NOL ($NYC1$ -LIKE)高度相似。研究者将扩增的 NOL 片段插入pGEX-3X质粒, 构建谷胱甘肽S-转移酶的融合蛋白, 并在大肠杆菌(BL21 DE3)中表达, 细胞抽提物与叶绿素 b 反应后, 采用高效液相色谱分析产物羟甲基-叶绿素, 证实了 NOL 的体外叶绿素 b 还原酶活性。

3 降解代谢途径的修正

由于叶绿素降解途径是根据降解产物及其催化酶类提出的, 所以产物结构的确认以及新酶类的发现, 使人们重新认识原有推论并加以补充与修正(图2)。

3.1 脱镁反应先于脱植基作用

PPH的成功克隆将脱植基反应的底物由叶绿素 a 更正为脱镁叶绿素 a , 即脱镁反应先于脱植基反应(Eckardt 2009), 但是对这一结论目前仍有争议, 具体表现为: 第一、叶绿素酶依旧参与了乙烯诱导的果实成熟时叶绿素降解(Shemer等2008)。第二、在自然成熟的柑桔中叶绿素酶 $CHLASE1$ 的表达与品种有关。Jacob-Wilk等(1999)发现柑桔(*Citrus sinensis* cv. Valencia)在自然成熟时 $CHLASE1$ 为低水平组成型表达, 而Distefano等(2009)比较了2种卡莱门汀柑桔(*C. clementina* Hort. Ex Tanaka) ‘Comune’和‘Tardivo’, 结果表明‘Comune’的 $CHLASE1$ 表达在桔皮变黄时瞬时增加, 随后降低, 而‘Tardivo’ $CHLASE1$ 则始终为低水平表达。因此PPH在水果叶绿素降解中的作用仍有待考证。第三、在有些植物品种中依旧不能排除叶绿素酶的功能。

例如在西葫芦叶和烟草细胞中异源过量表达叶绿素酶, 促进了在这些叶组织中叶绿素的降解(Harpaz-Sand等2007)。第四、即使是同一种植物品种, 不同研究者的结论也不一致。例如Büchert等(2011)在评价衰老的青花菜组织中叶绿素酶和PPH的作用时发现, 叶绿素酶的表达与典型的衰老相关基因的表达没有关联, 两个叶绿素酶同功酶 $BoCLH1$ 和 $BoCLH2$ 中的一个在衰老时表达水平下降, 激素处理对基因表达的影响与观察到的叶绿素含量不相匹配。而PPH的表达形式与之相反, 在衰老诱导的前3 d是增加的, 此后保持低水平。采后护绿处理大多抑制了PPH的表达, 延迟了叶绿素的降解。该结果支持了PPH负责叶绿素降解中的脱植基反应。与Büchert的结论相反, Chen等(2008)在含有反义叶绿素酶基因 $BoCLH1$ 的转基因青花菜中发现采后叶绿素的降解被延迟了, 说明叶绿素酶在采后叶绿素降解中起到关键作用。尽管存在上述争议, 现有的证据表明至少在水稻和拟南芥叶衰老时, 叶绿素酶可能是不活跃的。

3.2 降解途径的分支

降解途径的分支表现在两个方面: 一方面在总体叶绿素降解上, 虽然PaO途径被一般认同, 但是否有氧化漂白支路与之并行? 氧化产物分析表明在衰老的植物叶片、成熟的果皮以及体外酶促反应中存在 13^2 -OH-Chl a (Roca等2007), 但是胆红素类色素极有可能是在检测过程中人为造成的(Hynninen等2010)。因为目前尚缺乏充分的证据证实 13^2 -OH-Chl a 之后的降解产物, 因此对氧化漂白的认识只能终止于 13^2 -OH-Chl a (图2)。

另一方面, $hFCC$ 的发现使原有的PaO途径自 $pFCC$ 之后产生2条分支: 一条是 $pFCC$ 经过修饰酶修饰, 成为 $FCCs$, 转入液泡后异构为 $NCCs$; 另外一条是 $pFCC$ 经高度修饰, 即C17位的丙酸侧链酯化, 终止于 $hFCCs$ 阶段(图2)。

4 降解途径的分子调控

叶绿素是光合作用中吸收光能的关键成分, 但是正是由于它的吸光性决定了其潜在的胞内光毒性。所以叶绿素的合成与降解在植物发育过程中是被严格调控的。与叶绿素的合成调控相比, 叶绿素的降解调控知之甚少。近期的成果主要集中在以下两个方面。

4.1 持绿蛋白(SGR)的调控

分析持绿突变体(stay-green mutant)是研究叶绿素降解调控的重要手段。有证据表明持绿蛋白(stay-green, SGR, 在拟南芥和高羊茅中曾被称为 *NYE1*)与叶绿素降解调控有关。例如Ren等(2007)比较了野生型拟南芥 *Col* 与 *nye1-1* 突变体在黑暗诱导下的叶绿素降解, 结果表明在第6天时突变体的叶绿素持有量为50%, 而野生型仅为10%。Barry等(2008)在分析果实成熟时叶绿素降解受到抑制的西红柿突变体 *green-flesh (gf)* 和辣椒突变体 *chlorophyll retainer (cl)* 时, 发现两类突变体在SGR上均发生了氨基酸替代。Borovsky和Paran (2008)进一步测序了野生型辣椒和 *cl* 突变体的SGR, 发现在114位上精氨酸取代了色氨酸。此外SGR的表达在果实成熟时被诱导, 并且与叶绿素含量的降低相一致, 表明SGR可能是果实成熟时调控叶绿素降解的蛋白之一(Borovsky等2008)。

使用经典作图法以及基因组和转录组数据资源的组合遗传分析法(a combination of genetic analysis), 至少有5组SGR基因在2007年前后被成功鉴定(Ren等2007; Jiang等2007; Park等2007; Armstead 2007)。其中后一种方法对非模式植物的SGR鉴定更为有效。对不同植物来源的SGR进行比较, 发现它们均含有保守C端基序、可变区、高度同源核心区 and 叶绿体导向肽。尽管基序中存在4个半胱氨酸残基, 可能与分子内和分子间的交联或者氧化还原调节有关, 但是功能尚不清楚(Sato等2007; Ren等2007; Jiang等2007)。

对于SGR是如何调控叶绿素降解的有不同观点。一种认为SGR通过影响PAO的活性调控降解过程。因为SGR的缺失仅与PAO活性和表达量的降低有关, 并不影响其他叶绿素降解酶类; 而且在有些时候, 脱镁叶绿酸的水平会有所上升, 说明阻断发生在PAO。但是近期的研究表明在水稻突变体 *sgr-2* 和拟南芥 *nye 1-1* 中PAO的表达并没有改变。在一些SGR突变体中(如豌豆J12775), PAO的丰度与其相对应的野生型一样, 而且脱镁叶绿酸的积累与PAO活性无关, 所以SGR的作用独立于PAO (Aubry 2008)。

另外一种观点认为SGR突变体在衰老过程中具有保持叶绿素-结合蛋白的能力, 特别是SGR缺

陷株的捕光复合物II (light harvesting complex II, LHCII) 亚基非常稳定, 因此SGR的作用可能是先于叶绿素降解之前降解LHC蛋白。但是, 目前看来该观点可能也不正确, 因为在已鉴定的SGR蛋白中并不含有任何已知的(如水解酶)结构域。

Park等(2007)将SGR在烟草中过量表达, 体内分析表明叶绿素和LHCPII相互作用, 在类囊体膜上形成SGR-LHCPII复合物。因此现在的观点更倾向于SGR通过直接的相互作用引起SGR-LHCPII解聚, 从而调控叶绿素和无叶绿素的LHCPII的降解。

在研究果实成熟中SGR的作用时发现, 柑桔 (*Citrus sinensis*) 的自发突变体 *navel negra (nan)* 在果实成熟的不同阶段叶绿素合成和降解基因的表达正常。与野生型相比, 乙烯诱导虽未能明显促进 *nan* 叶绿素的降解, 但是叶绿素酶和PaO的表达却与野生型相似, 说明突变体在叶绿素降解代谢的主要酶反应步骤上没有变化。与以往的持绿突变体不同, SGR的氨基酸序列并没有发生改变, 在果实成熟前后SGR基因始终为低水平表达, 降解代谢物包括脱植基叶绿素 *a*, 脱镁叶绿酸 *a* 的累积形式与野生型亦无明显差异, 叶绿素酶的活性同时存在于野生型植株和突变体之中。因此认为SGR不是影响叶绿素降解的特定组分, 而可能涉及到上游的调控步骤(Alós等2008)。

从以上分析不难看出, SGR对叶绿素降解调控机理的认识尚待进一步深入。Ren等(2010)报道了一个新的与 *NYE1* 共调节的持绿基因 *CRN1 (Coregulated with NYE1)*, 在 *crn1-1* 突变体中, 叶绿素的降解受到抑制; 在黑暗处理4 d后, 各种叶绿素结合蛋白, 特别是LHCPII三聚体明显地保留下来。因此 *CRN1* 被认为在叶绿素-蛋白复合体的降解以及维持叶衰老时剩余光合作用能力上起到重要作用。与SGR不同, *CRN1* 是一种新的水解酶蛋白 (Ren等2010)。

4.2 酶的调节

由于叶绿素酶是首先被克隆的与叶绿素降解有关的酶类, 因此对降解途径酶的调节是从叶绿素酶开始的, 尽管目前认为PPH才是脱植基作用的关键酶。Harpaz-Saad等(2007)将前体和成熟的柑桔叶绿素酶在西葫芦 (*Cucurbita pepo*) 植株和烟草

(*Nicotiana tabacum*)原生质体中进行表达, 结果表明全长的柑桔叶绿素酶在原生质体中导致的叶绿素降解有限, 在整体植株中也没有可见的叶退色现象; 而表达缺少了N末端21个氨基酸的叶绿素酶却引起了在烟草原生质体和西葫芦叶中叶绿素的大量降解, 累积的光毒物质即脱植基叶绿素使得西葫芦叶片在低光照强度下明显黄萎, 在自然光下呈现类病变坏死(lesion-mimic), 所以通过翻译后调节使得叶绿素酶成为了降解的限速酶。

另外一类与降解调控有关的酶是叶绿素还原酶, Kusaba等(2007)发现水稻中*NYC1*和*NOL*编码叶绿素**b**还原酶, 催化叶绿素**b**转化为7-羟甲基叶绿素**a**。在水稻中*nyc1*和*nol*突变体均表现出持绿现象, 即在衰老阶段叶绿素降解受到抑制, 而且LHCP II被选择性的保留。*nyc1*和*nol*的双敲除与单敲除突变体相比, 叶绿素降解的抑制没有明显增加。免疫沉淀分析表明*NOL*和*NYC1*在体外可以相互作用, 推测在体内二者作为一种复合体的形式共存于类囊体膜上起到叶绿素**b**还原酶的功能(Kusaba等2007; Sato等2009)。

5 结束语

与20年前相比, 人们对叶绿素降解的认识无论是在降解产物的结构分析, 还是相关酶与调控蛋白的编码基因克隆方面都取得了长足进展。PAO途径被认为在高等植物中普遍存在, *hFCCs*的发现说明该途径存在分支。但是, 就植物体在不同条件下的叶绿素降解而言, 是否伴随有其他途径, 有待进一步证实。目前对于叶绿素降解调控的研究, 多集中于SGR和LHCP II-叶绿素复合体, 有关调控的分子信号, 降解产物与关键酶之间的相互作用等尚不清楚, 值得深入探究。

参考文献

- Alós E, Roca M, Iglesias DJ, Mínguez-Mosquera MI, Damasceno CMB, Thannhauser TW, Rose JKC, Talón M, Cercós M (2008). An evaluation of the basis and consequences of a Stay-Green mutation in the *navel negra* Citrus mutant using transcriptomic and proteomic profiling and metabolite analysis. *Plant Physiol*, 147: 1300~1315
- Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L et al (2007). Cross-species identification of Mendel's I locus. *Science*, 315: 73
- Aubry S, Mani J, Hörtensteiner S (2008). Stay-green protein, defective in Mendel's green cotyledon mutant, acts independent and upstream of pheophorbide a oxygenase in the chlorophyll catabolic pathway. *Plant Mol Biol*, 67: 243~256
- Banala S, Moser S, Müller T, Kreuz CR, Holzinger A, Lütz C, Kräutler B (2010). Hypermodified fluorescent chlorophyll catabolites: source of blue luminescence in senescent leaves. *Angew Chem Int Ed*, 49: 5174~5177
- Barry CS, McQuinn RP, Chung MY, Besuden A, Giovannoni JJ (2008). Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiol*, 147: 179~187
- Borovsky Y, Paran I (2008). Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. *Theor Appl Genet*, 117: 235~240
- Büchert AM, Civello PM, Martínez GA (2011). Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytylation during senescence of broccoli. *J Plant Physiol*, 168 (4): 337~343
- Chen LFO, Lin CH, Kelkar SM, Chang YM, Shaw JF (2008). Transgenic broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with antisense chlorophyllase (BoCLH1) delays postharvest yellowing. *Plant Sci*, 174: 25~31
- Distefano G, LasCasas G, Caruso M, Todaro A, Rapisarda P, LaMal-fas S, Gentile A, Tribulato E (2009). Physiological and molecular analysis of the maturation process in fruits of clementine mandarin and one of its late-ripening mutants. *J Agric Food Chem*, 57: 7974~7982
- Eckardt NA (2009). A new chlorophyll degradation pathway. *Plant Cell*, 21: 700
- Harpoz-Saad S, Azoulay T, Arazi T, Ben-Yaakov E, Mett A, Shibolet YM, Hörtensteiner S, Gidoni D, Gal-On A, Goldschmidt EE et al (2007). Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated. *Plant Cell*, 19: 1007~1022
- Hynninen P, Kaartinen V, Kolehmäinen E (2010). Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophyll a with hydrogen peroxide Characterization of the products and mechanism of the reaction. *Biochim Biophys Acta*, 1797: 531~542
- Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt EE, Riou J, Eyal Y (1999). Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase 1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant J*, 20: 653~661
- Jiang H, Li M, Liang N, Yan H, Wei Y, Xu X, Liu J, Xu Z, Chen F, Wu G (2007). Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *Plant J*, 52: 197~209
- Kräutler B (2008). Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites in leaves and fruit. *Photochem Photobiol Sci*, 7: 1114~1120
- Kräutler B, Banala S, Moser S, Vergeiner C, Müller T, Lütz C, Holzinger A (2010). A novel blue fluorescent chlorophyll catabolite accumulates in senescent leaves of the peace lily (*Spathiphyllum wallisii*) and indicates a divergent path of chlorophyll breakdown. *FEBS Lett*, 584: 4215~4221
- Kräutler B, Jaun B, Bortlik K, Schellenberg M, Matile P (1991). On the enigma of chlorophyll degradation: the constitution of a secoporphinoid catabolite. *Angew Chem Int Ed Engl*, 30 (10):

- 1315~1317
- Kusaba M, Ito H, Morita R, Lida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirichika H, Nishimura M et al (2007). Rice NON-YELLOW COLORING 1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell*, 19: 1362~1375
- Lee G, Chepyshko H, Chen H, Chu C, Chou Y, Akoh CC, Shaw J (2010). Genes and biochemical characterization of three novel chlorophyllase isozymes from *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem*, 58: 8651~8657
- Moser S, Müller T, Ebert MO, Jockusch S, Turro NJ, Kräutler B (2008a). Blue luminescence of ripening bananas. *Angew Chem Int Ed*, 47: 8954~8957
- Moser S, Müller T, Holzinger A, Lutz C, Jockusch S, Turro NJ, Kräutler B (2009b). Fluorescent chlorophyll catabolites in bananas light up blue halos of cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 15538~15543
- Moser S, Müller T, Oberhuber M, Kräutler B (2009a). Chlorophyll catabolites-chemical and structural footprints of a fascinating biological phenomenon. *Eur J Org Chem*, 2009: 21~31
- Moser S, Ulrich M, Müller T, Kräutler B (2008b). A yellow chlorophyll catabolite is a pigment of the fall colours. *Photochem Photobiol Sci*, 7: 1577~1581
- Müller T, Ulrich M, Ongania KH, Kräutler B (2007). Colorless tetrapyrrolic chlorophyll catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants. *Angew Chem Int Ed*, 46: 8699~8702
- Park S, Yu J, Park J, Li J, Yoo S, Lee N, Lee S, Jeong S, Seo HS, Koh H et al (2007). The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, 19: 1649~1664
- Ren G, An K, Liao Y, Zhou X, Cao Y, Zhao H, Ge X, Kuai B (2007). Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 144: 1429~1441
- Ren G, Zhou Q, Wu S, Zhang Y, Zhang L, Huang J, Sun Z, Kuai B (2010). Reverse Genetic identification of CRN1 and its distinctive role in chlorophyll degradation in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 52 (5): 496~504
- Roca M, Gandual-Rojas B, Minguez-Mosquera I (2007). Varietal differences in catabolic intermediates of chlorophylls in *Olea europaea* (L.) fruit cvs. Arbequina and Blanqueta. *Postharvest Biol Technol*, 44: 150~156
- Sato Y, Morita R, Katsuma S, Nishimura M, Tanaka A, Kusaba M (2009). Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll *b* and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J*, 57: 120~131
- Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M (2007). Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 14169~14174
- Schelbert S, Aubry S, Burla B, Agne B, Kessler F, Krupinska K, Hörtensteiner S (2009). Pheophytin pheophorbide hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 767~785
- Schenk N, Schelbert S, Kanwischer M, Goldschmidt EE, Dörmann P, Hörtensteiner S (2007). The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 581: 5517~5525
- Shemer TA, Harpaz-Saad S, Belausov E, Lovat N, Krokhn O, Spicer V, Standing KG, Goldschmidt EE, Eyal Y (2008). *Citrus* chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: a study of chlorophyllase expression, posttranslational processing kinetics, and in situ intracellular localization. *Plant Physiol*, 148: 108~118
- Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, Iwamatsu A, Shimada H, Masuda T, Takamiya K (1999). Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 15362~15367