

综述 Reviews

花青素合成中的 WD40 蛋白

闵远琴, 闫海芳*, 李玉花

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: 本文着重概述了不同植物中花青素合成WD40类转录调控因子的研究进展。

关键词: 花青素; WD40 蛋白; 转录调控

WD40 Proteins of Anthocyanin Biosynthesis in Plant

MIN Yuan-Qin, YAN Hai-Fang*, LI Yu-Hua

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: This review mainly outlines the research progress in transcription mediator WD40 proteins of anthocyanin biosynthesis in plant.

Key words: anthocyanin; WD40 proteins; transcript regulation

1 引言

花青素是植物次生代谢产物, 属类黄酮化合物。花青素的合成对于植物来说非常重要, 花青素不仅是保护性物质, 有助于植物应对环境胁迫, 如紫外线照射、营养元素缺乏以及低温损伤等 (Winkel-Shirley 2001; Teng 等 2005; Cominelli 等 2008; Lillo 等 2008; Olsen 等 2009; Rowan 等 2009), 而且, 花青素也能从分子水平上调控植物的次生生长 (Broun 2005), 其积累往往标志着某些发育阶段的开始 (Schneitz 等 1995; Debeaujon 等 2003)。花青素的合成途径在基因水平上已经研究得非常清楚 (Forkmann 和 Martens 2001)。花青素合成的相关基因不仅随着植物发育受到调控, 而且还在各种生理和非生理胁迫下, 受到各种转录调控因子的复合调控。各种转录因子所形成的复合物可以调控黄酮类色素在特定组织中的合成, 从而调控结构基因的表达, 以应对各种刺激 (Gonzalez 等 2008)。

自从由玉米 (*Zea mays*) 中克隆到第1个转录因子 C1 (colorless 1, Cone 等 1986), 人们就开始了在花青素合成的转录调控因子的研究。起初人们认为在植物中花青素转录激活基因由 Myb 和 Myc 两类组成, 二者的存在是开启花青素结构基因时空表达的关键。但 1997 年 de Vetten 等在矮牵牛 (*Petunia*

hybride) 中发现了 AN11 (anthocyanin 11), 随后在 1999 年 Walker 等发现了 TTG1 等 WD40 家族调控因子。WD40 转录调控因子的发现使得花青素调控机制的理论研究得到进一步的完善。目前, 已有多种花青素合成相关 WD40 重复蛋白得到鉴定。

2 WD40 蛋白的结构特征

WD40 蛋白是一类大的蛋白家族, 这类蛋白结构高度保守, 一般含有 4~16 个串联重复的 WD 基元。WD 基元存在于真核生物的 1%~2% 蛋白质中 (Madrona 和 Wilson 2004), 是一个高度保守的核心区域, 每个 WD 基元含有大约由 40 个氨基酸残基组成的保守序列, 该序列以 N 末端 11~24 个残基处 GH 二肽 (Gly-His, GH) 开始, C 末端以 WD 结尾 (Trp-Asp, WD) (Neer 等 1994; Smith 等 1999)。除了序列的相似性, WD40 蛋白表面氨基酸残基序列亦显示高度相似性, 并且在折叠以及空间结构等很多方面均相当保守 (Yu 等 2000)。最典型的 WD40 蛋白是 G β 亚基。G β 亚基呈 7 片扇叶式螺旋桨结构, 包

收稿 2010-03-25 修定 2010-06-10

资助 国家自然科学基金重点项目 (30730078) 和中央高校基本科研业务费专项资金 (DL09BA09)。

* 通讯作者 (E-mail: icyhf@yahoo.com; Tel: 0451-82191783)。

含7个WD40基元(Ramsay和Glover 2005), 每个基元的4个反式折叠组成1个片层(Sondek等1996)。Chothia等(1997)发现, 至少4个重复的WD基元才可以形成1个完整的 β 螺旋桨结构, 它通过1或2个片层参与WD40蛋白和其他蛋白的互作(Haar等1998)。该结构域赋予WD40蛋白家族成员一个共同的特征: 介导蛋白质之间的互作、调整多蛋白复合物的装配, 其重复的WD基元作为蛋白质互作的支架, 可以同时参与几个蛋白质的相互作用(Smith等1999; Tyers和Willems 1999), 但是缺乏DNA结合区域, 并且没有任何酶类的催化功能(Ramsay和Glover 2005)。

目前, 有关植物WD40蛋白的研究还不多, 主要局限于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) WD40蛋白家族。序列预测拟南芥基因组有269个WD40基因, 可分成143个亚家族(van Nocker和Ludwig 2003), 其中的113个亚家族成员在酵母、果蝇和人类中都存在同源基因(Skurat和Dietrich 2004), 它们在花青素合成、分生组织形成、幼苗发育、花发育、光信号传递和感知等方面具有重要的作用(Ullah等2003; Guitton等2004; Yamagishi等2005)。除拟南芥外, 已经从矮牵牛、玉米、紫苏(*Perilla frutescens*)、紫罗兰(*Matthiola incana*)等中克隆到部分编码WD40蛋白的基因。下面介绍这些基因在花青素合成中的功能作用。

3 花青素合成中的WD40蛋白

3.1 矮牵牛AN11蛋白 AN11含有5个WD重复基元(Neer等1994), 每个重复基元中包含保守的氨基和羧基终端的核心结构, 这些核心结构被短的氨基酸序列分隔开来。

细胞碎片实验显示AN11蛋白定位于细胞质中, 推测其对转录过程没有直接调控作用。在矮牵牛*an11*突变体中, 结构基因*DFR* (*dihydroflavonol-4-reductase*)的表达量下降, 但只影响花的色素积累, 组成型表达*AN2*可以恢复*an11*, 恢复*DFR*的表达活性, 这说明在花青素合成的调控途径中*AN11*位于*AN2*的上游(de Vetten等1997)。进一步研究证明*AN11*的转录与MYB类转录因子AN1和AN2的转录之间没有关系(de Vetten等1997; Quattrocchio

等1998), 然而, de Vetten等(1997)推测AN11有调控MYB类调控蛋白的活性作用。AN11在无色素形成的植物组织中也有表达, 并且在植物和动物的进化的过程中都表现出高度的保守性, 因此在调控花青素的合成外, AN11可能还具有更为广泛的功能(Joseph等1998), 如调控种子表皮细胞的形态等(de Vetten等1997)。

3.2 拟南芥TTG1 (transparent testa glabra1)蛋白

TTG1与矮牵牛AN11具有高度的同源性(Springob等2003)。拟南芥TTG1可以调控类黄酮/花青素的合成(Ramsay和Glover 2005)、种皮的发育以及叶表皮毛的形成(Larkin等1994, 1999; Walker等1999; Payne等2000; Ramsay和Glover 2005)。TTG1基因突变严重地影响所有这些发育过程, 表明了TTG1的广泛调控功能(Broun 2005)。TTG1影响DFR的功能, *ttg1*突变体的DFR催化受阻, TTG1可以诱导*DFR*的表达(Heller等1985)。玉米的*R*基因编码一个bHLH (basic helix-loop-helix)蛋白TT8 (transparent testa8), 与MYB转录因子互作, 控制花色素的合成, *R*基因能够补偿*ttg1*的突变, 可能在TTG1下游行使功能(Spelt等2000)。TTG1通过与bHLH类转录因子GL3 (*glabra3*)、EGL3 (enhancer of *glabra3*)和TT8 (Zhang等2003)以及MYB类转录因子拟南芥TT2 (transparent testa2)或PAP1 (production of anthocyanin pigment1) (Baudry等2004; Ramsay和Glover 2005)相互作用来实现控制花青素结构基因的时空表达(Nesi等2001)。

TTG1 C末端区域对于该蛋白功能发挥非常重要(Walker等1999)。Matsui和Ohme-Takagi (2009)研究显示, TTG1 C末端氨基酸序列中第309个至第341个氨基酸对于它和TT8的相互作用从而调控种皮颜色是必需的。

3.3 玉米PAC1 (pale aleurone color1)蛋白 在玉米中约有20个基因影响玉米花色素的产生, 其中*pac1*编码WD40蛋白(Ludwig等1989; Selinger和Chandler 1999; Carey等2004), 类似于花青素调控蛋白AN11和TTG1 (Selinger和Chandler 1999; Carey等2004)。 *pac1*缺失突变体中, *pac1*的缺失导致*a1*、*bz1*和*c2*这些花色素苷结构基因的表达都下调, 在

种子的糊粉层没有花青素的积累,但是种皮的花青素合成并不受到影响,这点与 *ttg1* 不同(Selinger 和 Chandler 1999; Carey 等 2004)。可能由于基因的遗传冗余现象等原因, *PAC1* 在种皮花青素合成中的作用并不明显。由于 *ttg1* 能充分互补 *pac1* 功能, *PAC1* 和 *TTG1* 在功能上应是等价的,因此, *PAC1* 和 *TTG1* 这2种调控蛋白在生物学功能上的差异可能是由与 *TTG1* 和 *PAC1* 相互作用的不同调控因子以及它们共同形成的相互作用导致的,而不是由 *TTG1* 和 *PAC1* 本身的功能差异引起的(Broun 2005)。

in1 (*intensifier 1*)是花青素结构基因表达的抑制基因,它编码的蛋白具有 bHLH 结构, *in1* 突变会促进谷粒中花色素增强(Burr 等 1996), *pac1* 处于 *in1* 的上位调控,应答于玉米种子糊粉层、角质鳞片以及根部中花青素的生物合成。

3.4 紫苏 PFWD 蛋白 Yamazaki 等(2003)在紫苏叶子中发现了花青素合成相关的 PFWD 蛋白,在拟南芥中过量表达 PFWD 可以增加花青素的合成。PFWD 含 4 个 WD 重复序列,氨基酸序列与 AN11 和 *TTG1* 分别有 81.3% 和 77.8% 的相似度,相当保守,在 PFWD 的 3' 非转录区有 4 个 TATT 基序,增加了 mRNA 的稳定性(Reeves 等 1987)。PFWD 蛋白存在许多翻译后修饰,最典型的是 N-糖基化、磷酸化以及烷基化。真核生物中, N-烷基化蛋白主要锚定于原生质膜或者其他细胞内膜上(Resh 1999)。PFWD 蛋白可能与膜系统相关。PFWD N 末端的一段氨基酸序列与核定位信号 NLS 序列相似,但亚细胞定位实验证明,该蛋白定位于细胞质中(Stacey 等 1999),推测 PFWD 可能通过与 MYC 家族蛋白共同作用,可从细胞质中转移到细胞核上,在花青素合成等信号转导途径在起着信号传递的作用(Yamazaki 等 2003)。

PFWD 在各种组织中广泛表达,即使是无色素积累的组织中, PFWD cDNA 序列在红色和绿色紫苏中无核苷酸差异。PFWD 可能与拟南芥 *TTG1* 相似,参与多重调控途径。拟南芥中过量表达 PFWD 明显增多了表皮毛的数量,但 *TTG1* 过量表达却对表皮毛数量无影响(Stacey 等 1999)。同时,

PFWD 的过量还影响到植物的其他发育甚至对植物是致死性的伤害,相比之下,其他的转录因子,如 MYB 或者 MYC 家族成员的作用途径较窄,只作用于花青素的积累。PFWD 蛋白可能负调控发育过程中一些重要蛋白(Yamazaki 等 2003)。

3.5 紫罗兰 TTG1 蛋白 早在 1949 年, Kappert 就已经发现紫罗兰 e、f、g 位点参与花青素的合成。其中 e 位点编码一种典型的 WD40 重复蛋白,该基因 3' 非翻译区没有内含子,与拟南芥 *ttg1* 编码区核苷酸序列有 85.3% 的相似性,所编码的蛋白质与 *TTG1* 蛋白有高达 96.2% 的同源性(Dressel 和 Hemleben 2009)。

紫罗兰 e 位点突变株系 17 (W158R) 只有一个核苷酸发生突变,致使在 WD 模块中的色氨酸突变为精氨酸,导致该蛋白的调控功能缺失, *DFR* 不表达,花青素的合成阻断,根毛形成以及种皮发育和色素形成也受到阻断,开白色花朵并且表面光滑。

3.6 棉花(*Gossypium hirsutum*) GhTTG 蛋白 Humphries 等(2005)从棉花中也克隆到 4 个 *TTG1* 基因的同源体 *GhTTG1~4*,且这 4 个 WD40 基因与矮牵牛 *AN11*、紫苏 *PFWD* 等也表现了高度的相似性。而且, *GhTTG1* 和 *GhTTG3* 基因除了能够恢复拟南芥 *ttg1* 突变体的毛状体的形成,也能够弥补开白花的 *ttg1* 突变体中花青素的缺陷,同时它们在棉花纤维的起始、分化中具有重要的作用,可能替代 *TTG1* 在植物毛状体起始和花青素途径中作用。因此,推测 *GhTTG1* 和 *GhTTG3* 在拟南芥毛状体和棉花纤维的发育过程中的作用机制类似。

3.7 油菜(*Brassica napus*) BnTTG 蛋白 利用同源克隆策略从油菜中克隆了 2 个编码 WD40 调控蛋白的基因。它们分别被命名为 *BnTTG1-1* 和 *BnTTG1-2*, NCBI 保守域预测的结果表明 2 个基因均有 WD40 的保守域以及相应的基元,其二级结构符合 WD40 转录因子的结构特征。半定量 RT-PCR 表明, *BnTTG1-1* 和 *BnTTG1-2* 的表达与 *AtTTG1* 很相似,在油菜的主要组织器官都表达,可能在油菜种皮色素的形成中有重要的调控作用(Lu 等 2007)。

4 WD40 蛋白的进化

WD40 重复蛋白是一个古老的蛋白家族,从动

物(包括两侧对称动物和水螅)、真菌、粘菌盘基网柄菌到植物, 在所有的已经测定的真核基因组中都存在(van Nocker 和 Ludwig 2003), 这种普遍性说明现代真核生物WD40家族起源非常早, 但是在原核基因组中, 只在鱼腥藻、蓝藻以及嗜热单孢菌属有发现(<http://bmerc-www.bu.edu/wdrepeat/>), 而大肠杆菌、其他细菌基因组中以及古细菌中无WD40重复蛋白, 这意味着原核WD40蛋白可能起源于古老的蓝藻类细菌(或者可能是线粒体起源的)(Martin 和 Russell 2002)。

在所有研究过的WD40蛋白中, WD结构域都是作为蛋白质互作的支点, 但是这个家族蛋白的作用范围相当广泛, 并且具有选择性, 在不同的领域与不同的蛋白质相互作用。较之植物, 在动物基因组中, 该家族蛋白有更多的重复单元, 增加了其功能多样性(van Nocker 和 Ludwig 2003)。但是在动物WD40家族还没有发现可以与MYB和bHLH相互作用的成员, 只脊椎动物c-Myc被认为具有激活WD40的功能(Bishop 等 1991)。在植物界多种高等植物表皮表型的调控中WD40家族蛋白与MYB和bHLH形成的这样一个调控网络调控可以追溯至12亿年前。

花青素合成中WD40蛋白都属于同一个进化支, 并且在功能上, 它们都能通过形成特定的结构与其他蛋白质相互作用。在拟南芥*ttg1*突变体中易位表达拟南芥TTG1蛋白的类似WD40蛋白可以弥补突变体的很多表型, 这表明这些蛋白的作用机理相似, 都能与某一类蛋白结合发挥作用(Steven和Philip 2003)。遗传学分析和酵母双杂交显示, 这类调控WD40蛋白能与bHLH和MYB类蛋白共同调控花青素的合成(Bernhardt 等 2003; Payne 等 2000; Zhang 等 2003)。

事实上, 在很多植物中, TTG1不仅仅调控花青素的合成, 例如, 拟南芥TTG1还正调控种皮色素合成、根毛的发育、决定表皮毛的分化、负调控子叶下胚轴气孔细胞运动(Berger 等 1998; Walker等1999); 矮牵牛的AN11还调控种子表皮细胞的形态(de Vetten 等 1997)。与拟南芥相比, 矮牵牛AN11和玉米PAC1只表现出微弱的基因多效

性。这可能与长期以来对这两种植物的驯化有关, 这些蛋白失去了一些性状的控制功能, 只局限或者集中在花青素合成的调控中, 而在拟南芥中却得到进一步发展(Broun 2005)。

在拟南芥和紫罗兰中, 编码花青素合成酶的结构基因, 如*CHS* (*chalcone synthase*)、*DFR* 中GC含量相似, 对紫罗兰*ttg1*和拟南芥*ttg1*碱基GC含量做一个比较显示, 紫罗兰*ttg1*有更丰富的GC含量, 分别为54.1%和46.1%, 拟南芥中较大一部分C碱基位点被中性的T取代。这种GC含量的差异却没有显著的影响到氨基酸组成, 并且这种高比例的GC值不是生态型, 而是进化的结果(Torres 等 1990)。此外, 单子叶植物, 玉米花青素合成WD40家族成员*pac1*的基因也有更高的GC含量。有些TTG1蛋白在功能上还不能确定, 如苹果属和松叶菊属。进化树对这些TTG1以及类似TTG1蛋白分析显示紫罗兰TTG1、拟南芥AtAN11以及棉花TTG2和TTG4 (Humphries 等 2005)、玉米MP1 (Carey 等 2004)代表的是WD40家族中的另一个分支。

5 WD40蛋白的调控机理

WD40蛋白是高度保守的(在不合成花青素的生物体中也如此)。目前, TTG1及类TTG1蛋白的作用模式还不清楚。只知道这类WD40蛋白的表达相当广泛, 可以与bHLH类以及MYB类调控因子广泛的作用, 定位于细胞质或细胞核中(Baudry 等 2004; de Vetten 等 1997; Sompornpailin 等 2002)。具体的分子功能仍不清楚, 其作用机制并不能简单的用它们所包含的WD序列来定义。

通过酵母双杂交实验推测WD40类转录因子可能介导与其作用的调控因子从细胞质转移到细胞核中, 如矮牵牛AN11、紫苏PFWD定位于细胞质中(de Vetten 等 1997), 然而当PFWD与bHLH类调控因子(PFMYC)共同作用时, 一部分PFWD蛋白转移至细胞核中, 这意味着这类WD40蛋白可能直接参与到转录水平的激活中(Zhang 等 2003)。拟南芥TTG1与MYB类转录因子(AtTT2)和bHLH蛋白(AtTT8)共同作用可以促进转录。AtTTG1增加一个转录激活结构域可以增强效果, 显示AtTTG1可

以参与到转录复合体中(Baudry 等 2004)。然而 TTG1 可能不是 bHLH 以及 MYB 类转录因子的核定位所必需的, 因为 bHLH 类转录因子的过量表达可以回复 *ttg1* 突变体中 TTG1 的功能缺失(Payne 等 2000)。

拟南芥 TTG1 多效型调控多种生理功能, 可以解释为 TTG1 作为蛋白相互作用的支架(Ramsay 和 Glover 2005)。在玉米、拟南芥和矮牵牛中的研究表明, WD40 蛋白可以和 MYB 以及 bHLH 蛋白相互作用, 以 WD40/Myb/bHLH (Wmb) 的调控模式共同调节花青素的合成(de Vetten 等 1997; Quattrocchio 等 1998; Walker 等 1999; Spelt 等 2000, 2002; Morita 等 2006; Schwinn 等 2006)。

在 Wmb 调控复合体中, TTG1 仅仅是作为介导 MYB 和 bHLH 相互作用的桥梁, 还是在细胞核中起着更为活跃的功能? 一些酵母和人类 WD40 蛋白, 如果蝇调控蛋白 GRO (Groucho) 以及它在人类中的同源物 TLE1 (Fishe 和 Caudy 1998; Chen 和 Courey 2000) 同 TTG1 一样, 与 bHLH 类转录因子相互作用参与基因的调控网络。与之不同的是, GRO 和 TLE1 通常都与转录抑制因子一起形成负调控复合体。然而, 有趣的是, 这 2 种蛋白还可以与具有 Runt 结构域蛋白作用, 而该蛋白既可以作为靶基因的激活子也可以作为抑制子, 这取决于靶基因启动子(Aronson 等 1997)。尽管 TTG1 与 GRO/TLE1 所含 WD40 基序不同, 但是在结构预测上它们很相近: C 末端都有 β -螺旋桨结构, 可以作为蛋白相互作用的支点(Walker 等 1999)。GRO 的一个很重要的特点是可以中心结构域中未乙酰化的组蛋白与染色质不同位点结合形成抑制转录的环境(Chen 等 1999)。已经发现了一些参与染色质重塑植物 WD40 蛋白, 如 AtMSI1 (*Arabidopsis thaliana* multicopy suppressor of *Ira 1*), 它可以与含 6 个 WD 单元的 FIE (fertilization independent endosperm) 以及 Medea (polycomb-group protein MEA) 相互作用, 使染色质处于抑制转录的环境, 从而使得植物在受精之前抑制形成胚乳, 调控种子的发育(Luo 等 1999; Ohad 等 1999; Köhler 等 2003)。它们与 TTG1 的同源性较低但极显著。同样的, TTG1 可能也参

与到染色质重塑中, 克服染色质抑制转录。其作用机制可能是与在 bHLH-MYB 形成复合体中作用相同。TTG1 可以直接与染色质重组蛋白相作用, 如组蛋白乙酰基转移酶, “打开”染色质, 或者是干扰染色质重塑系统中抑制转录的调控因子(Broun 2005)。

6 展望

目前, 虽已在矮牵牛、拟南芥、玉米、紫苏、紫罗兰等多种植物中鉴定了花青素合成相关的 WD40 类转录因子。但要全面认识 WD40 类转录因子的功能还有许多工作要做, 包括以下几个方面。

(1) 各物种中 WD40 类转录因子的鉴定。WD40 重复蛋白是一个古老的蛋白家族, 随着更多生物基因组测序工作的完成, 将会有更多生物的 WD40 基因序列得到鉴定, 这将为研究不同生物 WD40 类转录因子的进化关系提供良好的数据, 也为进一步阐明整个 WD40 大家族的进化历史以及研究基因结构进化历史提供更多的分析材料。

(2) 花青素合成相关的 WD40 类转录因子的功能研究, 以及各转录因子之间如何相互作用并共同调节花青素的生物合成。

(3) 通过 WD40 类转录因子基因的遗传转化控制花卉和果实的颜色, 实现品种改良。

参考文献

- Aronson BD, Fisher AL, Blechman K, Caudy M, Gergen JP (1997). Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol Cell Biol*, 17: 5581~5587
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39: 366~380
- Bernhardt C, Lee MM, Gonzalez A, Zhang F, Lloyd A, Schiefelbein J (2003). The bHLH genes *GLABRA3 (GL3)* and *ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)* specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development*, 130: 6431~6439
- Bishop JM, Eilers M, Katzen AL, Kornberg T, Ramsay G, Schirm S (1991). MYB and MYC in the cell cycle. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 56: 99~107
- Broun P (2005). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 272~279

- Burr FA, Burr B, Scheffler BE, Blewitt M, Wienand U, Matz EC (1996). The maize repressor-like gene *intensifier1* shares homology with the *r1/b1* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell*, 8: 1249~1259
- Carey CC, Strahle JT, Selinger DA, Chandler VL (2004). Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (2): 450~464
- Chen GQ, Courey AJ (2000). Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene*, 249: 1~16
- Chen GQ, Fernandez J, Mische S, Courey AJ (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in *Drosophila* development. *Gene Dev*, 13: 2218~2230
- Chothia C, Hubard T, Brenner S, Barns H, Murzin A (1997). Protein folds in the all- β and all- α classes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26: 597~627
- Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, Tonelli C (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 165: 886~894
- Cone KC, Burr FA, Benjamin B (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 9631~9635
- Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M, Lepiniec L (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell*, 15: 2514~2531
- de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (1997). The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Gene Dev*, 11: 1422~1434
- Dressel A, Hemleben V (2009). Transparent Testa Glabra 1 (TTG1) and TTG1-like genes in *Matthiola incana* R. Br. and related Brassicaceae and mutation in the WD-40 motif. *Plant Biology*, 11: 204~212
- Fisher AL, Caudy M (1998). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Gene Dev*, 12: 1931~1940
- Forkmann G, Martens S (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin Biotech*, 12: 155~160
- Gonzalez A, Zhao MZ, Leavitt JM, Lloyd AM (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 53 (5): 814~827
- Guitton AE, Page DR, Chambrier P, Lionnet C, Faure JE, Grossniklaus U, Berger F (2004). Identification of new members of fertilisation independent seed polycomb group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131: 2971~2981
- Haar ET, Musacchio A, Harrison SC, Kirchhausen T (1998). Atomic structure of clathrin: a β propeller terminal domain joins an α zigzag linker. *Cell*, 95: 563~573
- Heller W, Forkmann G, Britsch L, Grisebach H (1985). Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3,4-*cis*-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 165: 284~287
- Humphries JA, Walker AR, Timmis JN, Orford SJ (2005). Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (TTG1) gene. *Plant Mol Biol*, 57: 67~81
- Köhler C, Hennig L, Bouveret R, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Grussem W (2003). *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE *Polycomb* group complex and required for seed development. *EMBO J*, 22 (18): 4804~4814
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Lloyd AM, Papanozzi ET, Marks MD (1994). Roles of the *GLABROUS1* and *TRANSPARENT TESTA GLABRA* genes in *Arabidopsis* trichome development. *Plant Cell*, 6 (8): 1065~1076
- Larkin JC, Walker JD, Bolognesi-Winfield AC, Gray JC, Walker AR (1999). Allele-specific interactions between *ttg* and *gll* during trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 151: 1591~1604
- Lillo C, Lea US, Ruoff P (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ*, 31: 587~601
- Lu J, Li JN, Wang SG, Lei B, Chai YR (2007). Molecular cloning of two ortholog genes of *Arabidopsis thaliana* TTG1 from oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Biotechnology*, 34 (2): 170~172
- Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, Wessler SR (1989). *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 (18): 7092~7096
- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury AM (1999). Genes controlling fertilization independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 296~301
- Madrona AY, Wilson DK (2004). The structure of Ski8p, a protein regulating mRNA degradation: implications for WD protein structure. *Protein Sci*, 13 (6): 1557~1565
- Martin W, Russell MJ (2002). On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci*, 358: 59~85

- Matsui K, Ohme-Takagi M (2009). Detection of protein-protein interactions in plants using the transrepressive activity of the EAR motif repression domain. *Plant J*, 61 (4): 570~578
- Morita Y, Saitoh M, Hoshino A, Nitasaka E, Iida S (2006). Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of *c* and *ca* mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol*, 47: 457~470
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371: 297~300
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L (2001). The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell*, 13: 2099~2114
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, Hannon M, Michaeli D, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (1999). Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell*, 11: 407~415
- Olsen KM, Slimestad R, Lea US, Brede C, Lovdal T, Ruoff P, Verheul M, Lillo C (2009). Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant Cell Environ*, 32: 286~299
- Payne GT, Zhang F, Lloyd AM (2000). *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics*, 156: 1349~1362
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Joseph NM, Koes R (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J*, 13 (4): 475~488
- Ramsay NA, Glover BJ (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci*, 10 (2): 63~70
- Reeves R, Elton TS, Nissen MS, Lehn D, Johnson KR (1987). Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 6531~6535
- Resh MD (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1451: 1~16
- Rowan DD, Cao M, Lin-Wang K, Cooney JM, Jensen DJ, Austin PT, Hunt MB, Norling C, Hellens RP, Schaffer RJ, et al (2009). Environmental regulation of leaf colour in red *35S:PAP1 Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 182: 102~115
- Schneitz K, Hülskamp M, Pruitt RE (1995). Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J*, 7 (5): 731~749
- Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K, Martin C (2006). A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 18: 831~851
- Selinger DA, Chandler VL (1999). A mutation in the *pale aleurone color1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. *Plant Cell*, 11: 5~14
- Skurat AV, Dietrich AD (2004). Phosphorylation of Ser⁶⁴⁰ in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem*, 279: 2490~2498
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 24 (5): 181~185
- Sompornpailin K, Makita Y, Yamazaki M, Saito K (2002). A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol*, 50: 485~495
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB (1996). Crystal structure of a G protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1Å resolution. *Nature*, 379 (6563): 369~374
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R (2000). *anthocyanin1* of *petunia* encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell*, 12: 1619~1632
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, Koes R (2002). ANTHOCYANIN1 of *petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell*, 14: 2121~2135
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 20: 288~303
- Stacey MG, Hicks SN, von Arnim AG (1999). Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1. *Plant Cell*, 11: 349~364
- Steven VN, Philip L (2003). The WD-repeat proteins superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 4 (50): 1471~2164
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S (2005). Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the *MYB75/PAP1* gene. *Plant Physiol*, 139: 1840~1852
- Torres RA, Ganai M, Hemleben V (1990). GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J Mol Evol*, 30: 170~181
- Tyers M, Willems AR (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science*, 284 (5414): 603~604
- Ullah H, Chen JG, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Ecker JR, Jones AM (2003). The β -subunit of the *Arabidopsis*

- G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell*, 15: 393~409
- van Nocker S, Ludwig P (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 4: 50
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC (1999). The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*, 11: 1337~1350
- Winkel-Shirley B (2001). Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 126: 485~493
- Yamagishi K, Nagata N, Yee KM, Braybrook SA, Pelletier J, Fujioka S, Yoshida S, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2005). *TANME1/EMB2757* encodes a WD repeat protein required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139 (1): 163~173
- Yamazaki M, Makita Y, Springob K, Saito K (2003). Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochem Eng J*, 14: 191~197
- Yu LH, Gaitatzes C, Neer E, Smith TF (2000). Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein Sci*, 9 (12): 2470~2476
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*, 130: 4859~4869