

## 细胞色素 P450 与除草剂代谢

朱剑, 余潮, 阎新, 官杰, 朱友林\*

南昌大学生命科学学院江西省分子生物学与基因工程重点实验室, 南昌 330047

## Cytochrome P450 and Herbicide Metabolism

ZHU Jian, YU Chao, YAN Xin, GUAN Jie, ZHU You-Lin\*

Jiangxi Key Laboratory of Molecular Biology and Gene Engineering, College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**摘要:** 细胞色素 P450 是广泛存在于生物中的一类具有混合功能的血红素氧化酶。P450 对除草剂代谢的机制及反应类型是多样的, 与除草剂代谢相关的 P450 基因的植物转基因研究得到了具有不同除草剂抗性的转基因植物。文章就这方面的研究进展作介绍。

**关键词:** 细胞色素 P450; 除草剂代谢; 转基因植物

细胞色素 P450 (cytochrome P450, P450) 是广泛存在于生物中的一类具有混合功能的血红素氧化酶。它是一个古老的基因超家族, 大约起源于 35 亿年前, 是由一个基因经过复杂的生物进化历程产生的血红素蛋白基因家族的集合, 称之为细胞色素 P450 基因超家族 (cytochrome P450 superfamily) (Omura 1999)。由于它具有多样化的催化机制和功能, 自发现以来一直是研究的焦点之一 (Porter 和 Coon 1991)。

P450 在植物的次生代谢中有非常复杂而广泛的功能。P450 可以通过合成黄酮类、香豆素、生物碱等抑制昆虫、微生物和病毒对植物的侵害 (Schuler 1996), 从而到达植物保护的作用。P450 在用于癌症治疗的紫杉醇的合成过程中, 20 多个步骤中至少有 9 个步骤是它所介导的氧化反应 (Chau 等 2004)。P450 还可对植物体内的外源有毒物质如杀虫剂、杀草剂等进行修饰, 解除其对植物体的毒害作用 (Schuler 1996)。现代农业生产中, 除草剂的广泛使用促进了抗除草剂 P450 基因的挖掘和利用的研究, 本文就这方面的研究进展作一介绍。

### 1 P450 及其催化反应机制

生物中 P450 的种类多样。低等生物一般只有几种 P450, 例如, 研究较深入的浅灰链霉菌 (*Streptomyces griseolus*) 有 2 种 P450: P450U1 (*CYP105A1*) 和 P450U2 (*CYP105B1*) (Romesser 和 O'Keefe 1986)。高等生物中 P450 种类则多于低等

生物。动物中有 80 多种 P450, 植物中的 P450 则多达几百种。拟南芥和水稻的测序和生物信息学分析表明, 拟南芥有 246 个基因序列为功能预测或已经证实为 P450 的基因和 26 个假基因 (Paquette 等 2000), 而水稻中则有 356 个 P450 基因以及 99 个相关的假基因。植物中 P450 的基因数目约占整个基因组基因数目的 1% (Nelson 等 2004)。

P450 蛋白在原核生物中是可溶性蛋白, 易于分离纯化。在真核生物中, 它常常通过 N 端的疏水序列或者疏水环结合于线粒体内膜或内质网膜上, 因此真核生物 P450 蛋白的分离纯化非常困难。植物 P450 蛋白具有含量低、不稳定等特点, 同时细胞壁不易破碎, 加上酚类物质和色素 (叶绿素、类胡萝卜素) 等干扰物质含量高, 蛋白水解酶、脂肪酶、过氧化物酶等水解酶活性高, 使得植物 P450 蛋白的分离尤为困难 (Durst 1991)。目前, 只有几种植物的几种 P450 蛋白得到了分离纯化, 并成功在体外和 NADPH 结合, 从而形成 NADPH: P450 还原酶。Benveniste 等 (1989) 从玉米、马铃薯、鳄梨树、荆棘、郁金香和韭葱中分离纯化的 P450, 分子量为 45~65 kDa; Koch 和 Grisebach (1989) 测定大豆和毛地黄的 NADPH:

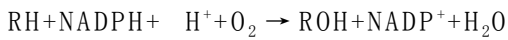
收稿 2006-08-24 修定 2007-01-04

资助 江西省科技厅攻关项目 (赣科技字 2000-8 号) 和江西省教育厅重大项目 (赣教技字 2005-47 号)。

\* 通讯作者 (E-mail: ylzhu1999@yahoo.com.cn; Tel: 0791-3969521)。

P450 还原酶分子量分别是 74 和 80 kDa; Topal 等 (1993) 纯化并首次证实郁金香的 2 种分子量分别为 52.4 和 54.5 kDa 的 P450 可在体外催化代谢除草剂 2, 4-D。

P450 必须与一系列相关蛋白组成多酶复合体才可以发挥氧化功能。这种 P450 酶系复合体是由 P450、细胞色素 b<sub>5</sub>、黄素蛋白-NADPH-P450 还原酶和磷脂等组成的, 它们共同组成电子传递体系(图 1), 催化的总反应为



反应中, RH 是底物, ROH 是氧化产物。P450 为整个酶系中的末端氧化酶, 其催化的反应是激活一个氧分子, 并将其中的一个分子氧插入到底物中, 同时还原另一个分子氧而形成水分子, 所以又称为单加氧酶。它不仅起活化氧分子作用,

同时还与底物结合决定催化反应中底物的专一性。因此, P450 在整个酶系的功能发挥中起关键作用。

## 2 P450对除草剂的代谢机制和反应类型

### 2.1 P450对除草剂的代谢机制

一般情况下, 植物对除草剂的抗性是由于植物本身具有代谢这些除草剂的能力。在植物体内, 通过代谢作用—缀合作用—分离3个阶段完成除草剂全部代谢过程(图 2), 从而解除除草剂的生物活性(苏少泉 2003)。第一阶段是植物进行除草剂代谢最重要的阶段, 通过官能团如一OH、—NH<sub>2</sub>、—SH、—COOH 的引入促使除草剂活性下降和极性增强, 因而其进一步代谢得以容易进行。在这一阶段中, P450 因其有多样化的催化机制, 所以可对不同类型的除草剂通过脱烷基化和(或)羟基化等作用进行修饰(向文胜等 1997)。

不同植物的 P450 对同一种除草剂有不同的代谢能力, 这是由于 P450 对除草剂的代谢有多种途径造成的。Sterling 和 Balke (1990) 报道, P450 催化代谢除草剂苯达松时, 在大豆的悬浮细胞培养细胞系中苯达松的 6 位和 8 位被羟基化, 并迅速和葡萄糖分子共轭合而解毒(图 2); 水稻中仅测定到苯达松的 6 位被羟基化, 而后和葡萄糖分子共轭合。除草剂绿麦隆(chlortoluron)在不同植物中的代谢也很好说明了这一情况: 对抗性杂草婆婆纳(*Veronica persica*)来说, 其半衰期小于 6 h, 代

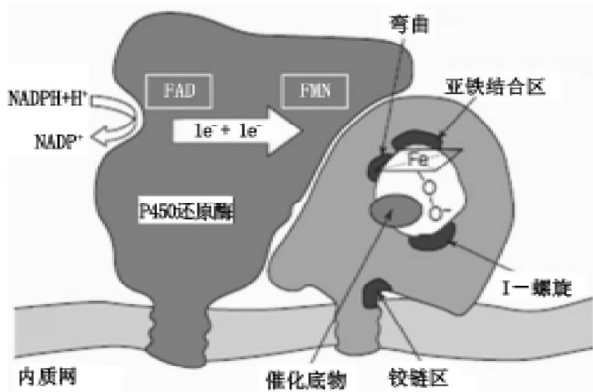


图1 P450酶系的结构(Durst 1991)

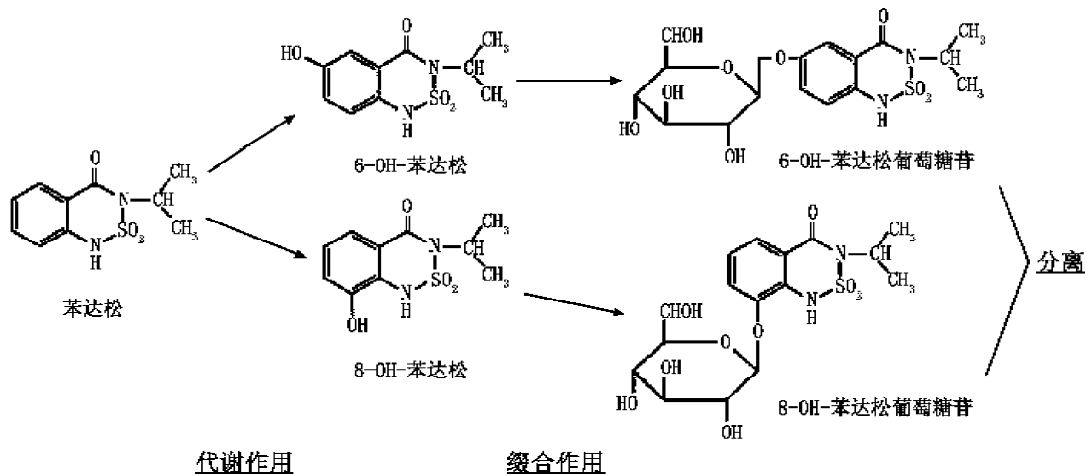


图2 除草剂苯达松的代谢过程(向太和等2004)

谢为叠氮脱甲基产物; 对其有一定抗性的冬小麦中, 其半衰期小于 24 h, 代谢为环甲基羟基化产物; 对其敏感的杂草看麦娘 (*Alopecurus myosuroides*) 中, 其半衰期大于 24 h, 代谢为对植物有毒害作用的一氮脱甲基产物 (Werck-Reichhart 等 2000)。体外实验对除草剂代谢的研究丰富了人们对除草剂代谢机制的认识, 对新除草剂的开发可能有指导意义。

## 2.2 P450催化除草剂代谢的反应类型

### 2.2.1 脱烷基化作用

最先证明植物P450具有除草剂抗性来自于含有P450的微粒体代谢除草剂的体外实验, 多数种类的除草剂被代谢为羟基化的烷烃、苯环或 *N*-、*S*-、*O*- 化的脱烷基产物以及它们的糖缀合物 (Werck-Reichhart 等 2000)。Frear 等 (1969) 最先报道棉花幼苗微粒体片段中的混合功能氧化酶对灭草隆 (monuron) 的代谢有作用, 这为植物 P450 酶系参与除草剂的代谢提供了直接证据。Cabanne 等 (1987) 报道, 小麦 P450 催化除草剂绿麦隆和异丙隆 (isoproturon) 在小麦植株体内代谢成 *N*-脱烷基产物, 2 种除草剂和 P450 抑制剂 1-氨基苯并三唑 (1-aminobenzotriazole, 1-ABT) 混合处理小麦幼苗后, 它们的 *N*-脱烷基产物明显比单用除草剂的少。Burnet 等 (1993) 在研究黑麦草 P450 催化三氮苯类除草剂西玛津时, 证实其代谢产物为 *N*-脱乙基化合物,  $70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 1-ABT 显著抑制 P450 对西玛津在黑麦草体内的代谢。

### 2.2.2 羟基化作用

羟基化可分为环甲基羟基化和芳环的羟基化。环甲基羟基化作用是位于苯环上的甲基基团被氧化生成相应的醇。在小麦、大麦和玉米这些对绿麦隆表现出抗性的作物中, 其主要通过环甲基羟基化作用和 *N*-脱甲基化作用代谢绿麦隆, 而 P450 酶系参与对绿麦隆环甲基羟基化作用似乎对除草剂的选择性和抗性更为重要 (Inui 等 1999; 张山等 2004)。关于芳环的甲基化则报道更多。Christopher 等 (1994) 证实, 杀虫剂马拉硫磷显著抑制黑麦草的一种异构体 P450 酶, 马拉硫磷用量为  $1 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$  时, 这种抗性杂草的半致死碌磺隆用量从  $29.315 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$  降到  $8.416 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。Topal 等 (1993) 第 1 次以除草剂 2, 4-D 为郁金香 2 种 P450 酶的底物, 直接证实这 2 种酶催化 2, 4-D 羟

基化代谢。Romano 等 (1993) 报道, P450 抑制剂 TC (telcycloclacis) 和 TF (tridiphane) 强烈抑制除草剂禾草灵和威霸在小麦和大麦体内的羟基化代谢, 谷光甘肽-S-转移酶也参加整个除草剂的代谢过程。Inui 等 (2001) 对人 CYP2C9 基因的水稻转基因研究的结果表明, 转基因水稻代谢绿磺隆和唑吡啶磺隆是通过芳环的羟基化作用进行的, 代谢分别产生羟基化绿磺隆和羟基化唑吡啶磺隆, 然后与葡萄糖形成轭合物, 从而降低这 2 种除草剂对水稻的毒性。

### 2.2.3 脱硫化作用 and 催化酯键断裂

相对来说, 生物体内催化脱硫化作用和催化酯键断裂的除草剂代谢反应较少。Inui 等 (2000) 报道, 人肝脏来源的 CYP2C19 基因能够通过 *O*-脱甲基化和硫代氨基甲酸酯键的裂解而代谢稗草畏的。红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) K2-3 的 P450 (PB21) 能催化苯氧丁酸酯类除草剂 2, 4-DB 酯键的断裂 (Strauber 等 2003)。

## 3 抗除草剂P450基因的克隆与植物转基因

培育具有除草剂抗性的作物品种是现代农业生物技术的一个重要目标, 实现这一目标的前提是对除草剂抗性机制的了解和对除草剂具有代谢功能的基因的克隆。近些年来, 人们已从不同的生物体中分离鉴定了一些对除草剂具有代谢功能的 P450 基因, 并开始培育抗除草剂转 P450 基因植物的研究。将 P450 基因转入到植物中, 从而培育具有代谢除草剂的转基因植物, 可以扩大和提高生产中除草剂的应用范围和高效性, 还可以用于除草剂污染地区的植物净化 (phytoremediation), 以降低土壤或水体中农药的残留 (邱星辉和冷欣夫 2002)。在抗除草剂 P450 转基因植物的研究中, 不同物种来源的 P450 基因已得到广泛的应用。下面分类进行介绍。

### 3.1 细菌抗除草剂 P450

相对于动植物而言, 细菌 P450 的种类少很多。有研究认为, 细菌 P450 很少是细菌必需的, 而是与其抵抗逆境胁迫和消除有毒物质的危害有关系。人们已从细菌中克隆到了几个除草剂抗性的 P450, 例如 Nagy 等 (1995) 在红球菌 (*Rhodococcus* sp.) 菌株 NI86P21 中发现了参与硫代氨基甲酸酯类除草剂菌达灭 (*S*-ethyl

dipropylcarbamothioate, EPTC) 和三氮苯类除草剂莠去津降解的P450基因; Strauber等(2003)在红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) K2-3中发现了能够催化苯氧丁酸酯类除草剂2, 4-DB的酯键裂解的P450基因。

细菌中研究比较清楚的抗除草剂P450是浅灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*)的P450U1(*CYP105A1*), 早期的研究证明其具有磺酰脲类除草剂的代谢活性, 它的代谢产物与植物代谢这些除草剂的产物相同, 这为植物转基因的研究提供了依据。O'Keefe等(1994)将P450U1导入烟草并得到表达, 但在除草剂代谢活性研究中发现, 此种基因只有在叶绿体中表达后才能表现出对磺酰脲类除草剂R7402的脱烷基化催化活性。R7402的代谢产物对植物会产生剧毒, 当P450U1在整株中表达时, 用外源的R7402处理即会导致整株死亡。P450U1在绒毡层特异启动子控制下只能在绒毡层组织中表达, 如果此时用R7402处理未成熟的花, 则会产生雄性不育。因此P450U1-R7402体系不仅可用作负选择性标记鉴别转基因植物, 而且通过此途径还可培育植物雄性不育系供植物杂交制种用, 这在植物杂种优势利用中有重要价值(O'Keefe等1994; 杨致荣等2003)。值得指出的是, 最近有报道认为P450U1对维生素D有代谢作用, 这显示P450催化反应是多样化的(Sawada等2004)。

**3.2 动物抗除草剂P450** 肝脏微粒体P450是动物对有毒物质代谢起主要作用的酶类, 它们可以通过氧化作用代谢多种类型的有毒物质, 其中也包括除草剂。据报道, 存在于人肝脏里面的11种P450蛋白(CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1和CYP3A4)几乎覆盖了90%依赖P450的有毒物质代谢作用(Funae等1998), 它们对不同类型除草剂同样表现出代谢作用。不仅如此, 在单个P450基因转基因的研究中发现, 单个P450蛋白对多种类型除草剂表现出交叉抗性。最为典型的是, CYP1A1、CYP2B6、CYP2C9和CYP2C19可分别代谢14、11、7和7种不同类型的除草剂(Ohkawa 2001)。

在动物P450研究中, *CYP1A1*的作用很重要。人、小鼠和猪的*CYP1A1*都可在植物中得到表达, 并对多种除草剂表现出交叉抗性。转基因研究的*CYP1A1*是始于小鼠, Inui等以小鼠*CYP1A1*对烟草(Inui等1998)和马铃薯(Inui等1999)进行转基因分析的结果表明, 转基因植株对几种不同种类的除草剂表现出交叉抗性。Inui等(1999)报道, 表达人*CYP1A1*基因的转基因马铃薯对绿麦隆、莠去津、噻草醚、甲基苯噻隆和达草灭可表现出交叉耐受性。但Yamada等(2002b)发现, 转入鼠*CYP1A1*基因的马铃薯对达草灭则不表现出耐受性, 他们认为这可能是鼠的*CYP1A1*代谢达草灭的活性比人*CYP1A1*和鼠肝脏中其他P450的低。这也说明, 来源于不同哺乳动物的P450酶系代谢除草剂的活性存在着差异。在其他一些P450的转基因研究中也得到了一些有意义的结论。Hirose等(2005)对人*CYP2B6*, Kawahigashi等(2005)对猪*CYP2B22*和*CYP2C49*的水稻转基因研究的结果表明, 转基因水稻对更多种除草剂表现出比非转基因株更强的代谢作用, 这对培育开发除草剂耐受性水稻和减少农用化学品对环境的影响来说是很有意义的。

为了得到对更多的除草剂具有代谢作用的转基因植株, 将多个P450基因共同进行植物转化是一种很好的思路。Inui等(2000)的研究表明, 同时表达*CYP1A1*、*CYP2B6*和*CYP2C19*的转基因马铃薯不仅对各自所对应的除草剂具有耐受性, 而且也只有同时转入3种P450基因后才表现出对稗草畏有较强的耐受性。他们认为, 这可能是由于稗草畏经*CYP2C19*代谢后, 再经*CYP1A1*和(或)*CYP2B6*进一步代谢造成的。Kawahigashi等(2006)进一步研究的结果表明, 同时表达*CYP1A1*、*CYP2B6*和*CYP2C19*的转基因水稻可表现出与3种除草剂共同转入马铃薯后对多种除草剂的代谢能力相似。随着公众对转基因产品的认可, 此种转基因水稻有可能进入商品化生产, 这对除草剂耐受性品种的选育和环境污染物的消除是意义重要的。

由于P450代谢体系不仅需要作为末端氧化作用的P450氧化酶, 而且其氧的传递还包括NADPH-P450还原酶等其他成分, 因此同时转化

NADPH-P450 还原酶, 代谢效率将可能得到进一步提高。家蝇 *CYP6D1* 转基因的分析表明, NADPH-P450 还原酶在不同物种中也有非常高的保守性, 这为异源转化 P450 氧化酶和还原酶的融合蛋白提供了理论依据 (Korytko等2000)。Shiota等 (1994) 研究烟草中表达小鼠 *CYP1A1* 和酵母 NADPH-P450 还原酶的融合蛋白的结果表明, 此种融合蛋白定位于微粒体上, 其代谢 7-二氧基香豆素和苯并芘的能力比未转基因的植株高约 10 倍。这说明在融合蛋白中高效的电子转移可使其代谢除草剂的能力得到加强。Shiota等 (1996) 用标记  $^{14}\text{C}$  的绿麦隆的实验表明, 融合蛋白转化株和非转化株吸收和转移绿麦隆并无多大区别, 但融合蛋白转化株可产生非转化株所没有的 4-羧基苯基类代谢产物。这进一步显示, 融合蛋白转化株对更多种和更大量的除草剂可能有代谢作用。

为了使转基因抗除草剂植物得到更好的应用, 研究如何改造其表达特性很有意义。用马铃薯未成熟块茎特异性表达启动子 (patatin class-I promoter) 表达 P450 基因可使其在未成熟块茎中特异性表达, Yamada 等 (2002a) 构建的块茎中特异性表达小鼠 *CYP1A1* 的转基因马铃薯, 其代谢除草剂等环境污染物的能力比非转基因的得到了加强, 而且由于特异性启动子的加入, 降解存在于土壤中的有毒污染物质也就更有针对性。有人根据苯并噻二唑 (benzothiadiazole, BTH) 特异性诱导的启动子 (烟草 *PR1a* 启动子) 和小鼠 *CYP1A1* 的组合进行转基因的结果认为 (Yamada 等 2002b), 转基因烟草表达 *CYP1A1* 的活性受 BTH 的调控, 这样, 转基因植株在应用过程中可能更具有可控制性。

**3.3 植物抗除草剂P450** 植物中抗除草剂P450基因的克隆和异源转化研究较晚, 1993年第1次从植物中得到了具有除草剂抗性的 P450 基因 (*CYP73A1*)。它是从向日葵 (*Helianthus tuberosus*) 中得到的, 对其进行酵母的异源表达显示它有催化绿麦隆的环甲基羟基化作用。但在活体 (*in vivo*) 情况下, 其代谢的主要产物是脱甲基绿麦隆。这说明在植物体 *CYP73A1* 内对绿麦隆的代谢只有很小的作用 (Pierrel等1994)。

植物中具有除草剂抗性的P450比动物P450具

有更严格的底物专一性, 一般很少会对几类除草剂表现出交叉抗性, 但对催化底物的专一性来说, 代谢效率可能得到提高。有人从大豆 cDNA 文库中筛选到一个能够特异性代谢苯基脲类除草剂的 P450 (*CYP71A10*), 其代谢活性比其野生株型有明显增加 (Siminszky等1999)。Yamada等 (2000) 将从 2, 4-D 诱导的烟草中分离的 *CYP81B2* 和 *CYP71A11* 转入酵母中表达的结果, 证明 *CYP81B2* 和 *CYP71A11* 分别是通过环甲基羟基化作用和 N-脱甲基化作用催化绿麦隆代谢的。

与哺乳动物中共表达 P450 还原酶相似, Siminszky等 (2003) 以大豆 *CYP71A10* 和大豆中的一个 P450 还原酶共同构建表达载体并进行烟草转基因分析的结果表明, 此种转基因烟草与只转化 *CYP71A10* 的转基因烟草相比, 其苯基脲类除草剂的代谢能力增强 20%~23%。这些和转化哺乳动物 P450 氧化酶和还原酶的融合蛋白的结果表明, 在 P450 酶系中电子链传递的协同效应对整个酶系的作用更大。但并不是所有的融合蛋白都能发挥出高效的代谢活性。如从向日葵中克隆的具有诱导表达活性的 *CYP76B1*, 能够催化和促进苯基脲类除草剂的快速氧化脱烷基作用而对其解毒 (Didierjean等2002)。以 *CYP76B1* 和 P450 还原酶的融合蛋白进行转基因的结果表明, 融合蛋白对除草剂的代谢能力反而比单独的 *CYP76B1* 转基因低很多。这暗示融合蛋白表达中蛋白的稳定性很可能下降, 因而其活性降低 (Didierjean等2002)。

#### 4 结语

在抗除草剂转基因作物的应用中, 动物 P450 基因发挥了重要的作用。来自动物肝脏的 P450 基因 (Funae等1998) 已经成功构建了多种具有除草剂抗性的作物品种, 它们在研究 P450 对除草剂的作用机制和抗除草剂 P450 基因、蛋白的特性中已得到广泛的应用。迄今, 植物抗除草剂 P450 基因中只有少数几种得到分离鉴定, 并且已经分离鉴定的抗除草剂 P450 基因分散在多个作物不同基因家族中, 因而分离克隆新的植物 P450 基因已成为当前研究的热点之一。随着拟南芥和水稻基因组序列的揭示, DNA 序列水平的分析将成为获得植物抗除草剂 P450 基因的重要手段。

目前, 转基因作物的产业化也是社会关注的热点。研究抗除草剂P450基因的转基因植物, 一方面可以在农业生产中更高效和环保地利用除草剂, 培育具有多种除草剂抗性的作物, 从而可以更好地杀灭杂草, 并防止杂草的抗性增强; 另一方面, 培育此类转基因植物在除草剂污染区域的生物修复中可能也有一定的应用前景。

### 参考文献

- 邱星辉, 冷欣夫(2002). 细胞色素P450与除草剂抗性转基因植物. 生命科学, 14(3): 168~170
- 苏少泉(2003). 除草剂在植物体内的代谢与选择性及使用. 现代农药, 2(6): 14~17
- 向太和, 杨剑波, 黄大年(2004). 水稻突变体对除草剂苯达松敏感致死的机理研究. 农药, 43(5): 217~220
- 向文胜, 苏少泉, 赵长山(1997). 植物细胞色素P-450(Cyt-P450)对除草剂的代谢作用. 东北农业大学学报, 28(2): 193~200
- 杨致荣, 毛雪, 杨致芬, 李润植(2003). 细胞色素P450基因及其在植物改良中的应用. 遗传, 25(2): 237~240
- 张山, 李平, 刘德立(2004). 细胞色素P450酶系与除草剂代谢. 中国生物工程杂志, 24(10): 18~21
- Benveniste I, Lesot A, Hasenfratz MP, Durst F (1989). Immunochemical characterization of NADPH-cytochrome P-450 reductase from Jerusalem artichoke and other higher plants. Biochem J, 259(3): 847~853
- Burnet MWM, Loveys BR, Holtum JAM, Powles SB (1993). Increased detoxification is a mechanism of simazine resistance in *Lolium rigidum*. Pestic Biochem Physiol, 46: 207~218
- Cabanne F, Huby D, Gaillardon P, Scalla R, Durst F (1987). Effect of the cytochrome P450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat. Pestic Biochem Physiol, 28: 371~380
- Chau M, Jennewein S, Walker K, Croteau R (2004). Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 $\beta$ -hydroxylase. Chem Biol, 11(5): 663~672
- Christopher JT, Preston C, Powles SB (1994). Malathion antagonises metabolism-based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. Pestic Biochem Physiol, 49: 172~182
- Didierjean L, Gondet L, Perkins R, Lau S-MC, Schaller H, O'Keefe DP, Werck-Reichhart D (2002). Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke. Plant Physiol, 130: 179~189
- Durst F (1991). Biochemistry and physiology of plant cytochrome P450. In: Ruckpaul K, Rein H (eds). Microbial and Plant Cytochrome P450. London: Taylor and Francis, 191~233
- Frear DS, Swanson HR, Tanaka FS (1969). N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. Phytochemistry, 8: 2157~2169
- Funae Y, Obata N, Kirigami S (1998). Multiple function of cytochrome P450. Kan Tan Sui, 37: 91~98
- Hirose S, Kawahigashi H, Ozawa K, Shiota N, Inui H, Ohkawa H, Ohkawa YJ (2005). Transgenic rice containing human CYP2B6 detoxifies various classes of herbicides. J Agr Food Chem, 53(9): 3461~3467
- Inui H, Kodama T, Ohkawa Y, Ohkawa H (2000). Herbicide metabolism and cross-tolerance in transgenic potato plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. Pestic Biochem Physiol, 66: 116~129
- Inui H, Shiota N, Ido Y, Inoue T, Hirose S, Kawahigashi H, Ohkawa Y, Ohkawa H (2001). Herbicide metabolism and tolerance in the transgenic rice plants expressing human CYP2C9 and CYP2C19. Pestic Biochem Physiol, 71(3): 156~169
- Inui H, Shiota N, Ishige T, Ohkawa Y, Ohkawa H (1998). Herbicide metabolism and resistance of transgenic potato plants expressing rat cytochrome P4501A1. Breeding Sci, 48: 135~143
- Inui H, Ueyama Y, Shiota N, Ohkawa Y, Ohkawa H (1999). Herbicide metabolism and cross tolerance in transgenic potato plants expressing human CYP1A1. Pestic Biochem Physiol, 64: 33~46
- Kawahigashi H, Hirose S, Inui H, Ohkawa H (2005). Enhanced herbicide cross-tolerance in transgenic rice plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. Plant Sci, 168: 773~781
- Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, Ohkawa Y (2006). Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. J Agr Food Chem, 54(8): 2985~2991
- Kochs G, Grisebach H (1989). Phytoalexin synthesis in soybean: purification and reconstitution of cytochrome P450 3,9-dihydroxypterocarpan 6 $\alpha$ -hydroxylase and separation from cytochrome P450 cinnamate 4-hydroxylase. Arch Biochem Biophys, 237: 543~553
- Korytko PJ, MacLntyre RJ, Scott JG (2000). Expression and activity of a house-fly cytochrome P450, CYP6D1, in *Drosophila melanogaster*. Insect Mol Biol, 9(5): 441~449
- Nagy I, Schoofs G, Compennolle F, Proost P, Vanderleyden J, de Mot R (1995). Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (*S*-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. J Bacteriol, 177: 676~687
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart, Bak S (2004). Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. Plant Physiol, 135: 756~772

- Ohkawa H (2001). Herbicide resistance crops expressing xenobiotic metabolizing P450 genes. Japan-Australia Seminar, Utsunomiya University, 5 (7): 12~16
- O'Keefe DP, Tepperman JM, Dean C, Leto KJ, Erbes DL, Odell JT (1994). Plant expression of a bacterial cytochrome P450 that catalyzes activation of a sulfonylurea pro-herbicide. *Plant Physiol*, 105 (2): 473~482
- Omura T (1999). Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 690~698
- Paquette SM, Bak S, Feyereisen R (2000). Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol*, 19: 307~317
- Pierrel MA, Batard Y, Kazmaier M, Mignotte-Vieux C, Durst F, Werck-Reichhart D (1994). Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur J Biochem*, 224: 835~844
- Porter TJ, Coon MJ (1991). Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, 266 (21): 13469~13472
- Romano ML, Stephenson GR, Tal A, Hall JC (1993). The effect of monooxygenase and glutathione S-transferase inhibitors on the metabolism of diclofop methyl and fenoxaprop-ethyl in barley and wheat. *Pestic Biochem Physiol*, 46: 181~189
- Romesser JA, O'Keefe DP (1986). Induction of cytochrome P450-dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseolus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 140: 650~659
- Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, Kusudo T, Shinkyo R, Ohta M, Inouye K (2004). Conversion of vitamin D<sub>3</sub> to  $\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450U-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 320 (1): 156~164
- Schuler MA (1996). Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci*, 15: 235~284
- Shiota N, Inui H, Ohkawa H (1996). Metabolism of the herbicide chlortoluron in transgenic tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *Pestic Biochem Physiol*, 54 (3): 190~198
- Shiota N, Nagasawa A, Sakaki T, Yabusaki Y, Ohkawa H (1994). Herbicide-resistant tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *Plant Physiol*, 106: 17~23
- Siminszky B, Corbin FT, Ward ER, Fleischmann TJ, Devey R (1999). Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1750~1755
- Siminszky B, Freytag AM, Sheldon BS, Dewey RE (2003). Co-expression of a NADPH:P450 reductase enhances CYP71A10-dependent phenylurea metabolism in tobacco. *Pestic Biochem Physiol*, 77: 35~43
- Sterling TM, Balke NE (1990). Bentazon uptake and metabolism by cultured plant cells in the presence of monooxygenase inhibitors and cinnamic acid. *Pestic Biochem Physiol*, 38: 66~75
- Strauber H, Muller RH, Babel W (2003). Evidence of cytochrome P450-catalyzed cleavage of the ether bond of phenoxybutyrate herbicides in *Rhodococcus erythropolis* K2-3. *Biodegradation*, 14 (1): 41~50
- Topal A, Adams N, Dauterman WC, Hodgson E, Kelly SL (1993). Purification and herbicide metabolism studies on tulip (*Tulipa gesneriana*) cytochrome P450. *Pestic Sci*, 38: 9~15
- Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci*, 5 (3): 116~123
- Yamada T, Ishige T, Shiota N, Inui H, Ohkawa H, Ohkawa Y (2002a). Enhancement of metabolizing herbicides in young tubers of transgenic potato plants with the rat *CYP1A1* gene. *Theor Appl Genet*, 105 (4): 515~520
- Yamada T, Kambara Y, Imaishi H, Ohkawa H (2000). Molecular cloning of novel cytochrome P450 species induced by chemical treatments in cultured tobacco cells. *Pestic Biochem Physiol*, 68: 11~25
- Yamada T, Ohashi Y, Ohshima M (2002b). Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the rat *CYP1A1* gene. *Theor Appl Genet*, 104: 308~314