

## 植物花青素生物合成中的调控基因

刘仕芸 黄艳岚 张树珍\*

中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101

### Regulatory Gene of Anthocyanin Biosynthesis in Plant

LIU Shi-Yun, HUANG Yan-Lan, ZHANG Shu-Zhen\*

State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China

**摘要** 文章概述了植物花青素的生物合成途径, 重点介绍了植物花青素调控基因在几个重要的模式植物中的调控特点及其调控机制。

**关键词** 花青素; 生物合成途径; 调控基因; 调控机制

花青素(anthocyanin)是一类广泛地存在于植物中的水溶性天然色素, 属类黄酮化合物。自然状态下花青素常与各种单糖形成花色苷, 由于具有吸光性而表现出红色、紫色和蓝色等色彩。花青素由1个基本的结构母核和不同的取代基组成。其基本结构母核是2-苯基苯并吡喃, 即花色基元, 大多数花青素在花色基元的3'、5'、7'碳位上有取代羟基。由于B环各碳位上的取代基不同(羟基或甲氧基), 形成了各种各样的花青素。现在已知的有近50种, 一般为6种花青素即天竺葵色素(pelargonidin)、矢车菊色素(cyanidin)、飞燕草色素(delphinidin)、芍药色素(peonidin)、牵牛色素(petunidin)和锦葵色素(malvidin)及其衍生物(Harborne和Williams 2001)。大量研究表明, 花青素具有抗氧化、抗突变、抗增生预防心脑血管疾病、保护肝脏、抑制肿瘤细胞发生等多种生理功能, 其抗氧化效果分别是维生素C、维生素E的20倍和50倍, 能清除氧自由基; 有预防和治疗100多种疾病的作用(赵保路1999; 张长贵等2006)。因此, 花青素在开发天然色素、保健食品和天然抗氧化剂中有一定研究价值。

#### 1 花青素的生物合成途径

20世纪80年代末至90年代初, 植物花青素和类黄酮物质代谢途径已较为清楚(Holton和Cornish 1995), 一般花青素的生物合成途径见图1。苯丙氨酸是花青素及其他类黄酮生物合成的直接前体, 由苯丙氨酸到花青素经历3个阶段, 第一阶段由苯丙氨酸到4-香豆酰CoA, 这是许多次生代

谢共有的, 该步骤受苯丙氨酸裂解酶(PAL)基因活性调控。第二阶段由4-香豆酰CoA和丙二酰CoA到二氢黄酮醇, 是类黄酮代谢的关键反应, 该阶段产生的黄烷酮和二氢黄酮醇在不同酶作用下, 可转化为花青素和其他类黄酮物质。第三阶段是各种花青素的合成, 至少有3个酶: 二氢黄酮醇还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS)和类黄酮3-葡萄糖基转移酶(3GT)能够将无色的二氢黄酮醇转化成有色的花色素。其中DFR催化二氢黄酮醇进一步还原成无色花色素, 再经过氧化、脱水和糖基化, 不同的无色花色素变成有色的花色素苷(砖红色的花葵素、紫红色的芍药花色素和蓝色的飞燕草色素)。这些花色素苷还可进一步糖基化、甲基化和酰基化形成不同的产物(Holton和Cornish 1995)。

#### 2 花青素转录因子的结构特点

植物花青素的时空合成机制已有深入的研究。已有的研究表明, 不同植物中的花青素生物合成受2类基因的共同控制, 一类是结构基因, 其编码生物合成途径中所需的酶; 另一类是调节基因, 其编码的转录因子调控结构基因的时空表达(Holton和Cornish 1995)。目前已分离和鉴定了3类花青素合成的转录因子: (1) R2R3-MYB蛋白; (2) myc家族的bHLH蛋白; (3) WD40蛋白

收稿 2005-12-27 修定 2006-06-22

\*通讯作者(E-mail: zhangsz@public.hk.hi.cn, Tel: 0898-66892735)。

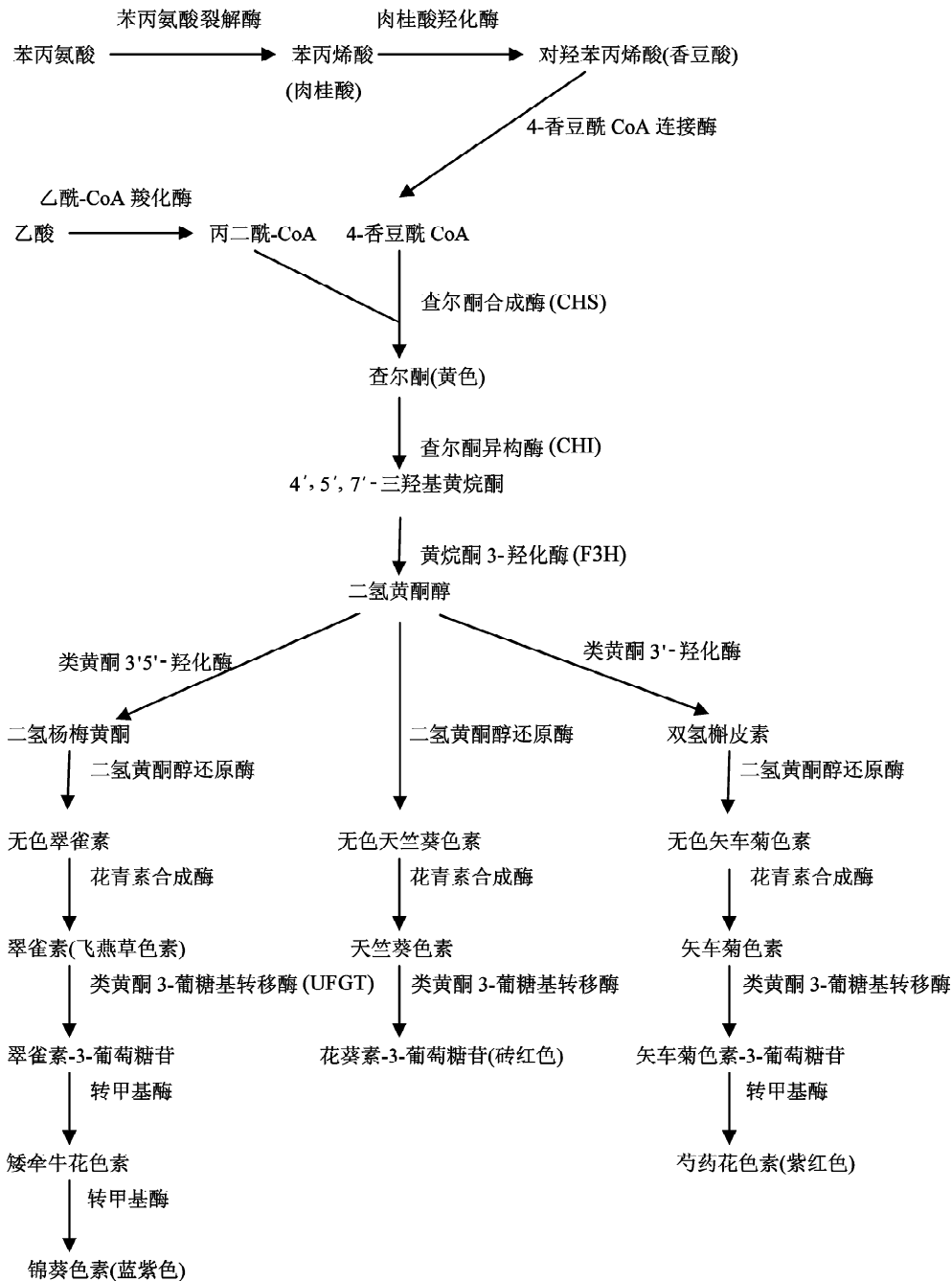


图1 花青素生物合成途径(Holton和Cornish 1995)

(Ramsay 和 Glover 2005)。表1是目前已经分离和鉴定的一些花青素调控基因。

MYB 蛋白包含保守的 Myb 结构域, 每个 Myb 结构域是一段约 51~52 个氨基酸的肽段, 包含有一系列的高度保守的氨基酸残基和间隔序列。首先是每隔约 18 个氨基酸间隔的色氨酸残基, 它们参与空间结构中疏水核心的形成。有时该残基会

被某个芳香族氨基酸或疏水氨基酸所取代。其次, 在每个保守的氨基酸前后都存在一些高度保守的氨基酸, 例如在第 1 个色氨酸的 C 末端通常是一簇酸性氨基酸。正是上述这些保守的氨基酸残基使得 Myb 结构域折叠成螺旋-螺旋-转角-螺旋(helix-helix-turn-helix, HHTH)结构。根据含有 Myb 结构域的数量, 可将 Myb 类蛋白分为 3 类:

表1 已经分离和鉴定的花青素调控基因

植物种类	转录因子类型	调控基因	参考文献
玉米 ( <i>Zea mays</i> )	MYB	<i>cl/pl</i>	Cone 等 1993
	bHLH	<i>rb</i>	Goff 等 1992
	bHLH	<i>in1</i>	Burr 等 1996
	WD40	<i>pac1</i>	Carey 等 2004
矮牵牛 ( <i>Petunia hybrida</i> )	MYB	<i>an2</i> 、 <i>an4</i>	Quattrocchio 等 1998, 1999
	bHLH	<i>an1</i> 、 <i>jaf13</i>	Spelt 等 2000
	WD40	<i>an11</i>	De Vetten 等 1997
金鱼草 ( <i>Antirrhinum majus</i> )	MYB	<i>roseal/2</i> 、 <i>venosa</i>	Martin 等 1991
	bHLH	<i>Delila</i> 、 <i>mutabilis</i>	Goodrich 等 1992
紫苏 ( <i>Perilla frutescens</i> )	MYB	<i>myb-p1</i>	Gong 等 1999
	bHLH	<i>myc-rp/gp</i> 、 <i>mycf3gl</i>	Gong 等 1999
	WD40	<i>pfwd</i>	Yamazaki 等 2003
拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	MYB	<i>tt2</i>	Nesi 等 2001
	MYB	<i>pap1</i> 、 <i>pap2</i>	Nesi 等 2001
	bHLH	<i>tt8</i>	Nesi 等 2000
	bHLH	<i>myc-146</i> 、 <i>gl3</i> 、 <i>egl3</i>	Ramsay 等 2003
	WD40	<i>ttgl</i>	Walker 等 1999
草莓 ( <i>Fragaria ananassa</i> )	MYB	<i>famyb1</i>	Aharoni 等 2001
葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )	MYB	<i>myba</i>	Kobayashi 等 2002
非洲菊 ( <i>Gerbera hybrida</i> )	bHLH	<i>gmyc1</i>	Elomaa 等 1998

含有 1 个 Myb 结构域的 Myb 蛋白 (R1), 含有 2 个 Myb 结构域的 Myb 蛋白 (R2R3) 以及含有 3 个 Myb 结构域的 Myb 蛋白 (R1R2R3)。花青素 R2R3-MYB 转录因子包含 R2、R3 2 个基序, 每个基序大约由 50 个氨基酸形成 HHTH 结构, 第 3 个螺旋是识别并结合短的 DNA 序列的关键 (Jiang 等 2004; Stracke 等 2001), 螺旋 3' 和 N 端臂中较少的残基负责与 DNA 特异性结合 (Lewin 2005)。现已在许多植物中分离鉴定出花青素 R2R3-MYB 转录因子, 包括玉米的 C1/P1、矮牵牛的 AN2、金鱼草的 Rosea、紫苏的 Myb-p1 和拟南芥的 TT2 等 (Liu 等 1999)。

bHLH 类转录因子具有碱性的螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 结构。有人比较多种单子叶植物和双子叶植物中 bHLH 类转录因子结构的结果表明, bHLH 蛋白有 4 个保守功能区域, 即交互作用区 (I)、酸性区 (A)、碱性的螺旋-环-螺旋区 (bHLH) 和 C 末端区域 (C) (Fan 等 2004, Buck 和 Atchley 2003)。bHLH 区域对 DNA 结合非常重要, 其中碱性区域 (basic domain), 通常由 15 个左右氨基酸组成; HLH 区域有 1 个由 40~50 个氨基酸残基组成的基序, 含有 2 个被环隔开的两性  $\alpha$  螺旋,

$\alpha$  螺旋由 15~16 个氨基酸组成。bHLH 蛋白二聚化后才能结合 DNA (Lewin 等 2005)。第 1 个 bHLH 蛋白质 (Lc) 是从玉米中鉴定出来的, Lc 与其他 Myb 家族的转录因子共同作用激活玉米中花青素的表达 (Ludwig 等 1989)。

WD40 重复蛋白是在植物细胞质中发现的, 它具有  $\beta$  螺旋桨蛋白组结构。其核心区域由 40 个氨基酸残基组成, 该区域包含甘氨酸-组氨酸二肽和色氨酸-天门冬氨酸二肽。这种基序在同样的蛋白中一般可串联 4~16 次。最典型的 WD40 重复蛋白是 G $\beta$  亚基。G $\beta$  亚单位是由 7 个桨叶组成的  $\beta$  螺旋桨结构, 包含 7 个 WD40 基序 (Ramsay 和 Glover 2005)。目前, 已有多种 WD40 重复蛋白得到鉴定, 如矮牵牛的 AN11、拟南芥的 TT1、紫苏的 PFWD 和玉米的 PAC1 等 (Carey 等 2004), 它们都在转录水平上调控花青素的生物合成途径。

### 3 花青素调控基因的调控机制

**3.1 玉米中花青素合成的调控** 高等植物花色苷生物合成由多步酶促反应完成, 每一步酶促反应均是调控基因作用的靶位点 (余迪求和李宝健 1997)。玉米是花色苷调控研究中的一个范例。在玉米中约有 20 个基因影响玉米花色苷的产生, 其

中8个基因的调节功能已得到鉴定: *r* (包括 *Lc*、*Sn*)、*b*、*c1*、*p1*、*p*、*vp1*、*in1*、*pac1* (Ludwig等1989; Carey等2004; 余迪求和李宝健1997; Selinger和Chandler 1999)。其中*r/b*家族成员(*r*、*Lc*、*sn*、*b*)和*c1/p1*家族成员(*c1*、*p1*)分别编码bHLH和MYB类转录因子(Cone等1993), *pac1*编码WD40重复蛋白。*in1*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, 另外, *vp1*在种子休眠中具有多重作用。

多年前, 玉米中花青素生物合成途径转录因子MYB蛋白与bHLH间的相互作用就已经得到证实。1992年, Goff等证实了bHLH蛋白R与MYB蛋白C1通过N末端相互作用调控植物组织中色素的产生; *c1*或*p1*必须依赖于*r/b*的共激活才能调节色素在糊粉层中的合成。*r*位点的等位基因比其他位点有更多的表型改变, 特别调节色素在糊粉层、胚、幼苗和成熟植株的其他组织中沉积(余迪求和李宝健1997)。3个*r*等位基因*r* (*p*)、*r* (*s*)、*r* (*lc*)的碱基长度均为2.5 kb。*r* (*s*)与*r* (*lc*)具有95%的同源性(Ludwig等1989)。*b*位点的等位基因(*b-peru*和*b-i*)也与*r*基因家族的其它成员有高度的同源性。与*r*位点相反, *b*位点的基因则很少影响糊粉层和幼苗的颜色, 但可调节成熟植物组织特别是叶鞘和苞叶的广谱颜色(Radicella等1991)。

*p*与*c1*同源性高达80%, 但其表达不依赖于*r/b*基因(Ramsay等2005)。*p*调控3-脱氧花色苷在子房壁、种皮和各种各样的花器官中合成(Cone等1993)。玉米的*vp1*基因编码的蛋白积累在胚和胚乳中, 能进一步转录激活*c1*基因的表达, 进而转录激活花色苷合成基因的表达, 产生色素。*vp1*发生突变(*vp1*突变体)不仅导致色素不能合成, 还影响种子的成熟, 这主要是因为*vp1*突变体对ABA不敏感, 而ABA对种子的发育、成熟、植物和种子休眠等起重要作用(Radicella等1991; Dooner等1991)。

*in1* (*intensifier1*)编码的bHLH蛋白与拟南芥的bHLH转录因子——TT8最为相似, *in1*突变会促进谷粒中花色苷增强。小片段的*in1*转录编码的bHLH蛋白与R和TT8同源, 但大量的转录则会导致错误的拼接, 这可能是该位点的抑制效应造

成的(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, 其编码的WD40蛋白近似于花青素调控蛋白AN11和TTG1 (Carey等2004; Selinger和Chandle 1999)。

**3.2 矮牵牛中花青素合成的调控** 矮牵牛中花青素合成的调控基因有*an1*、*an2*、*an4*、*an11*和*jaf13* (Spelt等2000; De Vetten等1997; Quattrocchio等1993, 1998; Davies和Schwinn 2003)。这5个基因对UF3GT酶的活性和*dfc* mRNA表达量均有类似的调控效应, 但他们在花青素生物合成早期不具有调控作用。有研究表明, 对矮牵牛花色苷的调控开始于*dfc*以后的各阶段(余迪求和李宝健1997)。

*an1*、*an2*、*an4*、*an11*和*jaf13*分别编码3类转录因子。其中, *an1*和*jaf13*编码bHLH转录因子(Spelt等2000); *an2*和*an4*编码R2R3-Myb转录激活蛋白(Quattrocchio等1999); *an11*编码细胞质WD40重复蛋白(De Vetten等1997)。*an1*基因与结构基因*Dfc*具有同源性, 直接调控*dfc*编码的DFR, *an1*表达依赖于*an2*的活性。与*an1*相比, *jaf13*则不依赖于*an2* (Davies和Schwinn 2003), 其编码的bHLH蛋白JAF13与玉米的*Lc*和金鱼草的DEL具有高度同源性, 且与*Lc*同源性达55%, 与DEL高达71%, 认为是玉米中R的后裔。除了共同拥有bHLH区域外, JAF13在其N端含有200个氨基酸的高度保守序列(Quattrocchio等1993)。突变株表型显示, *an2*应答于花冠和花枝中花青素生物合成途径; 假定在其它组织中存在特定基因与*an2*功能相似的话, 那么这个基因便是*an4*, *an4*突变株表型显示其主要作用于花药(Quattrocchio等1998)。遗传学研究表明, 由*an1*、*an2*和*an4*编码的转录因子以一种新的复杂体系作用, 在叶中异位表达*an2*会诱导*an1*的表达, 而在花药中*an1*的表达则依赖于*an4*, 这表明*an1*位于*an2*和*an4*调控的下游(Spelt等2000)。

*an11*是组成型表达, 且不依赖于*an1*和*an2*。*an11*编码的WD40重复蛋白包含5个WD40重复基序, 每个重复基序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 是矮牵牛细胞质的组成部分(De Vetten等1997)。遗传学分析表明, 在矮牵牛花瓣 *an11* 突变体中, 过度表达 *an2* 可以恢复花青素结构基因 *dfc* 的活性, 而在 *an2* 突变体中过度表达 *35s-an11* 却不能激活 *dfc-Luc* 的表达。由此可见, *an11* 调控位于 *an2* 的上游, 可以在 mRNA 水平调控 *an2* 的后转录而控制 *dfc* 结构基因的转录。因此, 它是作为一个保守的级联传导信号而调节 *an2* 的功能的(De Vetten等1997; Dooner等1991)。

**3.3 金鱼草中花青素合成的调控** 金鱼草中花青素的生物合成的方式和强度受多个调节基因的共同控制, 目前已经鉴定出 6 个花青素调控基因: *delila*、*eluta*、*mutabilis*、*roseal*、*rosea2* 和 *venosa* (Martin等1991; Davies和Schwinn 2003)。它们主要对花青素生物合成途径的后阶段起调节作用, 而对早期 CHS 和 CHI 阶段仅表现微量调控(Martin等1991)。其中, *delila* 和 *mutabilis* 编码 bHLH 转录因子; *roseal*、*rosea2* 和 *venosa* 属于 MYB 基因家族。这些基因相互作用形成了金鱼草花青素调控的复杂体系(Goodrich等1992)。

*del* 基因作用于花冠、萼片、子叶和茎等组织, 对花青素生物合成途径中(F3H到UFGT)的结构基因的表达至关重要(Martin等1991), 其基因序列与玉米的 *R* 基因家族有高度的相似性, 在金鱼草花冠组织, *delila* 位点编码一个由644个氨基酸组成的 bHLH 蛋白质, 与玉米 *R* 基因家族编码的蛋白质具有广泛的同源性。其酸性转录激活区域由 134 个氨基酸组成, 其中包含 27 个酸性氨基酸残基和 2 个碱性氨基酸残基(Liu等1999)。*mutabilis* 仅作用于萼片, 有研究显示, *del* 基因能够补足 *mutabilis* 基因突变株的表型(Martin等1991; Davies和Schwinn 2003)。

与 *del* 基因相反, *eluta* 限制色素在花冠中的产生, 使之产生不同的花色样式(余迪求和李宝健1997)。在 *EL/EL* 纯合体中, 所有花色素的积累比全红的 *el* 植株减少 8~10 倍, 其中 *EL* 对结构基因 *DFR* 和 *UFGT* 的影响最大, 其转录水平仅为 *el* 植株的 10%~20%, 从而引起 *EL* 花中花青素表达量的减少(Martin等1991)。

*rosea* 位点会引起花青素更多的表型改变, 它

似乎直接调控结构基因的转录, 特别是调控植物组织表皮内外间花青素的分布和变化(Dooner等1991)。*rosea1* 促进色素积累增加, *rosea2* 则相反。另一个 MYB 基因 *venosa*, 限制色素在表皮细胞中产生纹理, 而形成显著的脉络(Davies和Schwinn 2003)。

**3.4 紫苏中花青素合成的调控** 紫苏按颜色分类分为红色和绿色 2 个品种, 其花青素生物合成途径的调控主要存在于红色紫苏中。在紫苏中, 花青素合成的调控基因包括 *myc-f3g1*、*myc-rp/gp*、*myb-p1* 和 *pfwd*。*myc-f3g1* 和 *myc-rp* 编码 bHLH 类转录因子(Gong等1999); *myb-p1* 编码 R2R3-MYB 蛋白; *pfwd* 编码的转录因子具有 WD40 重复结构(Yamazaki等2003)。

*myc-f3g1* 直接调控紫苏花青素结构基因的表达, 并且只在红色的紫苏中发现, Yamazaki 等(2003)认为这是决定紫苏颜色红绿差异的主要因素之一。据推断, 它的氨基酸顺序与矮牵牛的 *an1* 有高度的同源性。*myc-f3g1* 受光的诱导, 这种表达方式与 *myb-p1* 类似(Quattrocchio等1993)。

以金鱼草的 *delila* cDNA 为探针从红色紫苏中分离出 *myc-rp* 基因, 在红色和绿色紫苏的叶和根中都能表达, 且不受光的诱导。分析显示 MYC-RP 的氨基酸序列与 *Delila* 有 64% 的同源性(Gong等1999)。同样以 *myc-rp* 为探针, 在绿色紫苏中分离出 *myc-rp* 的等位基因——*myc-gp*。MYC-RP 与 MYC-GP 唯一的不同在于 MYC-GP 的第 132 位丝氨酸为丙氨酸所替换, 异位表达显示二者都能导致烟草和西红柿中花青素的增加(Quattrocchio等1993)。

MYB-P1 DNA 结合域由相应的 R3 重复和 R2 重复的最后 6 个氨基酸组成。红色紫苏的叶片中 *myb-p1* 的 mRNA 水平是绿色中的 10 倍多, 与其它调节基因一样, *myb-p1* 同样受光的诱导。MYB-P1 与其它 MYC 类蛋白相互作用对花青素的形成是必须的, 且 MYB-P1 极可能是形成红色紫苏的决定性因素之一(Quattrocchio等1993)。

过度表达 *pfwd* 不仅可以增加花青素的积累, 还会引起其空间表达发生变化。在酵母双杂交系统中, PFWD 与 MYC-RP 有强烈的交互作用, 可从细胞质中转移到细胞核上。同样 MYC-F3G1 在

核上的位点也可能受PFWD和MYC-RP交互作用的调控(Yamazaki等2003)。

**3.5 拟南芥中花青素合成的调控** 在拟南芥中,已鉴定出至少6种花青素合成的调控基因,包括*tt1*、*tt2*、*tt8* (Walker等1999; Nesi等2000, 2001)和*pap1*, 以及*myc-146*和*gl3*基因(Ramsay等2003)。*tt1*和*tt8*、*gl3*和*myc-146*分别编码WD40重复蛋白、bHLH蛋白, *tt2*和*pap1*编码R2R3-MYB蛋白。

*tt1*和*tt8*在拟南芥秧苗的花青素生物合成途径中激活结构基因的表达(Nesi等2001)。在拟南芥长脚果中,花青素的表达和原花青素的调控因子bHLH-TT8需要TTG1发挥功能。因此,TTG1似乎在TT8的上游行使功能(Spelt等2000)。*tt1*与矮牵牛的*an11*具有高度的同源性(Walker等1999)。*tt8*编码典型的bHLH蛋白,分子量大小约为59.2 kd。*tt8*基因与编码bHLH蛋白的*an1*基因和玉米的*in1*基因有高度的相似性。有趣的是,TT8与AN1都具有激活效应,而IN1却是花青素生物合成途径的抑制子。因此认为,调控基因的调控框架包括调控子的功能的等级划分,不能单靠同源性来预测(Nesi等2000)。

*tt2*应答于拟南芥未成熟的长角果中*dfr*基因的表达。细胞分析显示*tt2*主要作用于长角果中类黄酮生物途径后期的遗传控制(Walker等1999)。*tt2*编码的MYB蛋白具有258个氨基酸残基,其中DNA结合域包含50个氨基酸残基,形成一个螺旋-螺旋-环-螺旋(HHLH)的模式。第3个螺旋氨基酸残基是DNA识别区,最为保守(Nesi等2001)。在庞大的R2R3-MYB蛋白家族中,TT2与水稻OsMYB3基因产物有极高的相似性,尤其在DNA结合域,二者氨基酸同源率高达84%,而与玉米C1为74%;与矮牵牛的AN2为66%;与PAP1为65%。另外,在TT2与OsMYB3之间的MYB下游区域有一段短的序列(139-VXXIRTKAI/LRS/N150)是保守的,而令人惊奇的是,TT2的C末端与其他拟南芥MYB蛋白竟没有明显相似的地方。基于这些数据,有人认为TT2基因在庞大的R2R3-MYB蛋白家族中明确显示出是一个崭新的成员(Walker等1999)。

2000年,Borevitz和他的合作者报道了*pap1*

(production of anthocyanin pigment 1)位点,编码拟南芥MYB75转录因子。过度表达*pap1*会破坏拟南芥植物组织中花青素积累的调控,并伴随苯丙烷类生物途径广泛的转录激活。*pap1*编码的MYB75蛋白与矮牵牛的AN2蛋白有高度的相似性(Nesi等2001)。

另外2个bHLH基因——*glabra3* (*GL3*)和*myc-146*可能控制花青素生物合成途径后期基因的表达,如LDOX (leucoanthocyanidin dioxygenase)。Northern杂交显示,*myc-146*在花蕾和花中高度地表达,而*gl3*表达不仅在花和花蕾中,还存在于根、树叶和茎中(Ramsay等2003)。将*gl3*和*myc-146*异位表达在*Matthiola incana*的一个开白色花突变种的花瓣上能够补足花青素的缺乏。因此,在*Matthiola incana*突变种中,*gl3*和*myc-146*都能激活花青素的生物合成(Ramsay等2003)。在花和长角果中,MYC-146可以与TTG1和MYB蛋白质(可能是PAP1或TT2)互相作用控制花青素结构基因的时空表达(Nesi等2001)。*myc-146*基因中6个内含子的位置与*lc*、*b*和*jafl3*中相同,这些基因都包含着共同的进化起源(Ramsay等2003)。

有关花青素合成调控机制的假说很多。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。随后,WD40调控基因的发现使得花青素的调控机制得到进一步的完善。在植物中花青素的调控基因在功能上是等同的,只是在种间对结构基因启动子的调控上存在差异(Quattrocchio等1998)。例如,在矮牵牛中*an2*不能调控花青素生物合成途径前期基因的表达,然而在玉米中*an2*可以激活早期基因的表达,因为P1编码的MYB蛋白在宿主中同样需要早期和晚期的激活(Quattrocchio等1993)。随着研究的进一步深入,2类蛋白的交互作用相继被发现。在玉米中,Lc蛋白与MYB家族转录因子相互作用共同激活花青素的表达。在其它物种中也是一致的,Lc类似蛋白同样需要MYB的参与共同实现花青素合成的调控。除了实际的交互作用在Goff等(1992)示范的bHLH和MYB蛋白质之间,在紫苏中也发现转录因子间有交互作用。拟南芥和紫苏在bHLH和PAC1进化枝之间交互作用也已发现。

WD40 重复蛋白 TTG1 和 bHLH 蛋白以及其他的调控蛋白都确定了 bHLH、MYB 和 WD40 重复蛋白之间的相互作用。在紫苏中, 双酵母杂交系统研究显示, MYC-RP 与 MYC-F3G1、MYB-P1 和 WD40 重复蛋白 PFWD 相互作用激活报告基因的表达。而 MYB-P1、MYC-F3G1 和 WD40 重复蛋白 PFWD 三者之间并无交互作用, 只是以 MYC-RP 为支点形成一个复合体共同激活结构基因的表达(Quattrocchio 等 1993)。因此, 产生的一个广泛的假设认为是由 MYB、bHLH 和 WD40 蛋白质形成 1 个三合一的复合蛋白, 应答于植物组织中特异性状的调控, 这包括花青素的积累、根须的生长和外壳黏液的产生等。对这个复合体的认识简单的说法是该复合物以 bHLH 蛋白为中心, 与 WD40 重复蛋白和另一边的 MYB 蛋白相互作用。虽然这种解释可能是正确的, 但仍很复杂。第一, 在拟南芥长脚果中, 花青素的表达和原花青素的调控因子 bHLH、TT8 都需要 TTG1 发挥功能(Nesi 等 2000)。这样一来, TTG1 似乎是在 bHLH 的上游行使功能的。第二, 在矮牵牛中, AN2 和 AN4 编码的 MYB 蛋白质可激活 bHLH *an1* mRNA 的积聚(Spelt 等 2000)。因此认为, 在这些双子叶植物中, 一些调控基因是处于其他调控蛋白质下游的调控。其中一种可能性是一旦每个蛋白质得到表达, 它就能够与其他蛋白产生相互影响。这样, 所形成的调控组合又可以附加地对调控子的表达加以调控, 从而促进花青素生物途径的特异表达。例如, 在拟南芥中, TTG1、MYC-146 或 GL3 和 MYB 转录因子可互作形成复合体共同激活 TT8 的表达(Ramsay 等 2003)。所以, 尽管 bHLH、MYB 和 WD40 重复蛋白作为花青素生物合成途径的调控者已经在双子叶和单子叶植物中得到人们的认可, 但这三者的调控机制还需要进一步探讨(Carey 等 2004)。

### 参考文献

- 余迪求, 李宝健(1997). 花色苷生物合成的遗传和发育调控. 植物生理学通讯, 33 (1): 71~77
- 张长贵, 董加宝, 王祯旭(2006). 原花色素及其开发应用. 四川食品与发酵, 42: 8~12
- 赵保路(1999). 氧自由基和天然抗氧化剂. 北京: 科学出版社, 367~378
- Lewin B (2005). 余龙, 江松敏, 赵寿元译. *Genes VIII*. 北京: 科学出版社, 725~729
- Aharoni A, De Vos CHR, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JNM, O'nonnell AP (2001). The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J*, 28: 319~332
- Buck MJ, Atchley WR (2003). Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *J Mol Evol*, 56: 742~750
- Burr FA, Burr B, Scheffler BE, Blewitt M, Wienand U, Matz EC (1996). The maize repressor-like gene *intensifier1* shares homology with the *r1/bl* 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 GLABRAL* gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (2): 450~464
- Cone KC, Cocciolone SM, Burr FA, Burr B (1993). Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in the plant. *Plant Cell*, 5 (12): 1795~1805
- Davies KM, Schwinn KE (2003). Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct Plant Biol*, 30 (9): 913~925
- De Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (1997). The *an1* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Genes Dev*, 11: 1422~1434
- Dooner HK, Robbins TP, Dooner HK, Jorgensen RA (1991). Genetic and development control of anthocyanin biosynthesis. *Annu Rev Genet*, 25: 173~199
- Elomaa P, Mehto M, Kotilainen M, Helariutta Y, Nevalainen L, Teeri TH (1998). A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonol-4-reductase (*dfr*) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J*, 16: 93~99
- Fan CZ, Purugganan MD, Thomasa DT, Wiegmann BM (2004). Heterogeneous evolution of the *Myc*-like anthocyanin regulatory gene and its phylogenetic utility in *Cornus L.* (Cornaceae). *Mol Phyl Evol*, 33: 580~594
- Goff SA, Cone KC, Chandler VL (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev*, 6: 864~875
- Gong ZZ, Yamagishi E, Yamazaki M, Saito K (1999). A constitutively expressed *Myc*-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molecular characterization, heterologous expression in transgenic plants and

- transactivation in yeast cells. *Plant Mol Biol*, 41: 33~44
- Goodrich J, Carpenter R, Coen ES (1992). A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell*, 68: 955~964
- Harborne JB, Williams CA (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Roy Soc Chem*, 18: 310~333
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 1071~1083
- Jiang C, Gu J, Chopra S, Gu X, Peterson T (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene*, 326: 13~22
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215: 924~933
- Liu L, White MJ, MacRae TH (1999). Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem*, 262: 247~257
- 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: 7092~7096
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J*, 1: 37~49
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L (2000). The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell*, 12: 1863~1878
- 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
- Quattrocchio F, Wing JF, Leppen HTC, Mol JNM, Koes RE (1993). Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell*, 5: 1497~1512
- Quattrocchio F, Wing JF, van der Woude K, Mol JNM, 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: 475~488
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R (1999). Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell*, 11: 1433~1444
- Radicella JP, Turks D, Chandler VL (1991). Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding *B-Peru*, a regulatory protein of the anthocyanin pathway from maize. *Plant Mol Biol*, 17: 127~130
- Ramsay NA, Glover BJ (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci*, 10 (2): 63~70
- Ramsay NA, Walker AR, Mooney M, Gray JC (2003). Two basic-helix-loop-helix genes (*MYC-146* and *GL3*) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant. *Plant Mol Biol*, 52: 679~688
- 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
- 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
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001). The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 447~456
- 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
- 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