

专题介绍 Special Topics

高等植物的3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶

鞠世杰 阎秀峰*

东北林业大学森林资源与环境学院, 哈尔滨 150040

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Higher Plants

JU Shi-Jie, YAN Xiu-Feng*

College of Forest Resources and Environment, Northeast Forestry University, Harbin 150040

提要 介绍了植物3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)的结构和调控,并简略讨论了HMGR调控与植物类异戊二烯途径的关系。

关键词 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR); 基因家族; 调控; 类异戊二烯

类异戊二烯是一组结构各异且涉及细胞发育的许多方面的化合物。它们是由共同的前体异戊烯基焦磷酸(IPP)衍生而来。目前已知植物中的类异戊二烯有22 000多种,还有更多的种类尚未发现。这类物质与植物的初生代谢和次生代谢关系密切,例如膜的生物合成所需的甾醇类化合物,与电子传递有关的血红素A、叶绿素和泛醌的侧链,糖蛋白合成过程中所需的多萜醇,作为植物生长激素的赤霉素、脱落酸等,与光保护相关的类胡萝卜素,在植物与植物、植物与环境之间相互作用中起重要作用的单萜、倍半萜和二萜等化合物等。

早期研究认为甲羟戊酸(MVA)是IPP的唯一前体。3个乙酰辅酶A缩合生成3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA),随后在3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)的作用下生成MVA,MVA经焦磷酸化和脱羧作用形成5C的IPP。IPP作为“活化”的异戊二烯单元与其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)经头尾缩合生成10C的牻牛儿苗基焦磷酸(GPP)。第二个和第三个IPP依次加到GPP上分别形成法呢基焦磷酸(FPP)和牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸(GGPP)。IPP、GPP、FPP和GGPP可分别作为中间体在不同的酶的作用下形成不同C原子数的类异戊二烯化合物。

在哺乳动物中认为HMGR所催化的反应是不可逆的,因此推测这一步是甾醇合成的限速步

骤,并发现胆固醇的合成与HMGR活性相关^[1]。由于HMGR在调控胆固醇中起重要作用,所以人们将植物类异戊二烯途径研究的焦点也多集中在HMGR上。但植物中的HMGR是否起到限速酶的作用仍然是有争议的,尤其是最近在质体中发现了另外一条产生植物类异戊二烯的途径^[2,3]——丙酮酸/磷酸甘油醛代谢途径后,人们提出这样一个问题,即是否所有的类异戊二烯终产物合成都需要HMGR参与。为此,本文作一些介绍。

1 植物HMGR的结构及亚细胞定位

植物的HMGR结构与人和酵母的相似,都由4个部分组成:N-末端、跨膜区、连接区和C-末端区。具有催化活性的C-末端区和跨膜区在各植物种中高度保守。所有植物HMGR的催化区有4个保守的基元^[4]。在马铃薯HMGR1中分别是氨基酸残基243~252、273~283、370~377、577~590,其中包括酸性氨基酸Glu-247、Glu-278、Asp-372^[5]。这些残基可能与底物的识别和结合有关^[4]。还有单个的His(His-584),此残基在其它17种植物HMGR中也存在,并且在假单胞菌(*Pseudomonas mevalonii*)的HMGR中证明是催化活性所必需的^[6]。跨膜区由2个疏水基和1个亲水基组成,亲

收稿 2003-01-22 修定 2003-09-12

资助 国家自然科学基金资助项目(30070086,30271045)。

* 通讯作者(E-mail:yanxf@public.hr.hl.cn, Tel:0451-82192185)。

水基位于两疏水基之间。每个疏水区约20个氨基酸。由于疏水基与HMGR分子的膜定位有关已经得到证明,因此人们将这部分称为跨膜区^[7~9]。

无论从长度还是从氨基酸序列来说,各种植物的HMGR N-末端和连接区的差别都很大,但其中也有相对保守的部分,这些非保守区的保守序列决定其重要的功能^[10]。在目前发现的植物HMGR中,不保守的N-末端区的前6个碱基是保守的(这将在下一部分作说明)。多数植物HMGR的连接区都有PEST序列——富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的多肽序列,但拟南芥的HMGR2没有^[11]。目前已知这个序列与酶的快速降解有关,它能使蛋白快速降解,从而对蛋白进行调控^[12]。

类异戊二烯的合成主要在细胞质中进行,但也有一些是在质体(如类胡萝卜素、质体醌、维生素K)或线粒体(如泛醌)或特定的小泡(如橡胶)中合成的。虽然有研究认为HMGR活性也存在于质体和线粒体中^[13],但实验证明HMGR主要定位在内质网膜上^[10]。

先后有两个实验室^[9,10]分别在体外使植物HMGR转录物在有无狗胰腺微粒体的情况下进行表达,离心后发现HMGR与微粒体膜共沉降,表明植物HMGR能够嵌入微粒体膜中。他们进一步根据用蛋白酶K和Triton X-100(能使多肽从膜中释放)处理翻译物的方法证明得到的结果,并推测出一个可能的模型,即植物HMGR跨膜2次(人的HMGR跨膜为8次^[14])。其中2个疏水区就是跨膜的部分,分别称为H1和H2;N-末端、连接区和催化区都暴露在细胞质腔中,这与植物HMGR的催化作用主要发生在细胞质中的现象一致;只有2个疏水区之间的1个短的亲水区位于内质网腔内,称之为腔内序列(luminal sequence, LS)。也就是说HMGR是作为膜组成蛋白而存在的。这样的拓扑结构在番茄的HMGR1和HMGR2^[15]、拟南芥的HMGR1S、HMGR1L和HMGR2^[10]以及豌豆的HMGR1^[10]中已经得到证明。Denbow等^[15]证明,目前所知的各种植物中HMGR的2个疏水区都高度保守,因此推断植物HMGR都能嵌入微粒体膜,且膜中的拓扑结构相同。

Campos和Boronat^[10]还通过缺失实验,证明

H1和H2为HMGR定位于内质网膜上所必需,起信号肽的作用,并证明信号识别颗粒(SRP)也是HMGR蛋白能够正确定位所必需的。定位于内质网上的蛋白首先在细胞质基质中合成,随着肽链的延伸,当信号肽从核糖体中出现时,可被细胞质内的SRP识别并与之结合。在SRP的引导作用下,正在合成蛋白的多聚核糖体便结合到内质网膜上,新合成的肽链在SRP及内质网膜上受体的作用下进入内质网腔。在这个过程中信号肽和停止转移序列(stop transfer sequence)以特定的方向插入膜的双分子层中,成为跨膜区。在HMGR的跨膜转运过程中未见到信号肽被切除的过程。由于这种转移机制特异地存在于内质网中,并且迄今在植物HMGR序列中尚未发现可使蛋白定位于质体或线粒体的典型的转运肽,因此Campos和Boronat^[10]推测HMGR主要定位于内质网中,似乎不可能定位于质体或线粒体中。但这并不排除其它未发现的HMGR蛋白定位于质体和线粒体中,或HMGR仅最初定位在内质网中的可能。Campos和Boronat^[10]还发现大多数植物HMGR的N-末端有几个碱基的保守序列[MetAspXArgArgArg(X可以是Val、Ile、Leu或Ser)]。另有研究表明,停留于细胞质基质一侧的肽链末端的2个连续赖氨酸(KKXX)^[16]或精氨酸(RRXX)^[17]残基是蛋白保留在内质网膜上所必需的。它们的缺失或位置改变均会引起蛋白的错误定位^[18]。

Denbow等^[15]发现,番茄中HMGR2的LS内有N-连接的糖基化位点(天门冬酰胺),而HMGR1中则无。HMGR2有两个潜在的糖基化位点,另一个在H2的下游,位于细胞腔内,不能被糖基化。其它植物(如番茄、马铃薯、拟南芥、橡胶、烟草和长春花)的某些HMGR中也发现了相同的位点(将在第3部分作说明)。水稻中的HMGR,是报道中的第一个单子叶植物HMGR,其跨膜区与双子叶植物的同源性较低,LS内没有糖基化位点^[19]。

2 植物HMGR的调控

2.1 调控植物HMGR的几个因素 植物本身的生长发育和多种环境因子(如光、受伤、感染、激素、除草剂和甾类物质等)可以调控植物HMGR^[20]。

快速生长的植物组织中, HMGR 活性总是很高, 而成熟组织中的活性则相对较低^[21]。甜瓜 (*Cucumis melo*) 授粉后的果实生长初期 HMGR mRNA 上升, 末期明显下降, 成熟期间又显著上升^[22]。

Learned^[23]发现, 黑暗中生长的拟南芥白化苗的 HMGR1 mRNA 水平比光下生长的植株高, 暗诱导后恢复一定强度的光照时 HMGR1 mRNA 减少。光对 HMGR mRNA 水平的抑制与辐射照度及辐射时间相关, 持续照红光和蓝光的植物中 HMGR mRNA 水平不同。他认为可能有多个光受体独立介导光对植物 HMGR 的作用, 或是一个光受体对红光和蓝光产生不同的反应。Korth等^[24]分析成熟马铃薯植株的顶端分生组织时, 发现黑暗抑制 HMGR 的活性和蛋白含量。

受损伤的马铃薯块茎中 HMGR 活性增高, 如果再接种马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 或用花生四烯酸 (一种倍半萜植保素的诱导剂) 处理, HMGR 活性会更高^[5], 随后甾醇类糖生物碱和植保素的水平也升高^[25, 26]。

经胆固醇或脱落酸处理的豌豆白化苗中 HMGR 活性下降, 赤霉素对其没有影响^[27]。甾醇 C-24甲基转移酶 I (sterol C-24 methyltransferase type I, SMT I) 是将环阿屯醇 (cycloartenol) 转化成 δ -24-烷基甾醇 (δ -24-alkyl sterols) 的第一个重要的酶。Holmberg等^[28]在研究烟草种子中 SMT I 的过程中发现, SMT I 超量表达, 内源环阿屯醇即减少, HMGR 活性上升, 从而改变代谢“碳流” (carbon flux) 以促进甾醇类物质的形成。Wentzinger等^[29]用特异抑制剂抑制烟草中的鲨烯合成酶和鲨烯环氧酶 (即减少内源甾醇类物质) 时, 植物体内 HMGR 活性即上升。

还有研究认为植物 HMGR 可能受钙调素和钙离子的调控, 但是这类结果彼此相互矛盾, 无法统一^[21]。Wititsuwannakul等^[30]报道, 在 Ca^{2+} 存在的情况下, 从橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 的橡胶中提纯的钙调素可使 HMGR 活性升高 2.5 倍, 此作用可被钙调素拮抗物抑制。实验证明钙调素可能是通过调控 HMGR 的可逆的磷酸化作用控制 HMGR 活性的。而 Russell等^[31]发现极少量的游离

Ca^{2+} 就能显著抑制豌豆中的 HMGR 活性, 并认为不是依赖 Ca^{2+} 的蛋白水解酶和蛋白激酶的作用。

2.2 植物 HMGR 在转录及转录后水平上的调控
人体中 HMGR 调控是多水平的, 有单基因的转录调控, 有 mRNA 的加工, 有翻译效率的调控, 还有通过磷酸化和变构改变酶活性以及降解等^[1]。

目前对植物 HMGR 活性调控研究得最多的是转录水平的调控。大多数的调控因子都引起植物 HMGR mRNA 水平的变化。Yang等^[32]证明, 受伤、花生四烯酸和感染致病菌都能使植物 HMGR mRNA 含量和酶活性上升, 加入放线菌酮 (一种蛋白合成抑制剂) 可降低受伤和病原体诱导的 HMGR 活性和植保素含量。这表明诱导产生的 HMGR 活性是从头合成的, 即调控可能发生在转录水平。Learned^[23]在研究光抑制拟南芥 HMGR mRNA 水平中, 用启动子-报告基因表达的方法证明此种抑制是 *hmg1* 启动子中顺式作用元件作用的结果, 因此认为这种调控也发生在转录水平。

对植物 HMGR 活性的其它水平调控的研究较少, 其原因主要是尚缺少有效的检测不同 HMGR 异构体蛋白含量和活性的方法, 但已有实验证明其它水平的调控是存在的。

Choi等^[5]发现, 诱导子诱导植物 HMGR mRNA 水平及其酶活性升高后一段时间还会恢复, 但酶活性恢复到对照水平后的一段时间内, HMGR2 mRNA 和 HMGR3 mRNA 仍处在高水平。Korth等^[24]在 *hmg2.2* cDNA 克隆的第 18 个密码子处插入编码 DYKDDDDK 的碱基序列, 并使之在转基因植物中表达 (DYKDDDDK 作为抗原决定部位, 其单克隆抗体有市售, 因此容易检测)。结果虽然在所有的组织中重组基因都能高水平转录, 但只有顶端分生组织中才有高水平的重组蛋白。在甜瓜成熟过程中, HMGR mRNA 水平显著升高, 但无酶活性^[22]。这些都证明转录后水平的调控是存在的。Wentzinger等^[29]用特异的抑制剂——鲨烯合成酶抑制剂 1 (squalenstatin-1) 和特比萘芬 (terbinafine) 分别抑制烟草中的鲨烯合成酶或鲨烯环氧酶后, HMGR 活性上升 2~4 倍, 抑制鲨烯合成酶也能使 HMGR mRNA 水平上升, 但鲨烯环氧酶的活性受抑后 HMGR mRNA 水平没有改变。这也说明转录后水平上的调控存在。

3 植物 HMGR 基因的差别表达及其与植物类异戊二烯代谢途径的关系

在哺乳动物中, HMGR 是由单个基因编码的。而目前所有报道的植物中, 认为 HMGR 都是由一个基因家族编码, 且不同种植物中的同源基因的数目不同。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 HMGR 由 2 个基因编码^[8]; 橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 中至少由 2 个基因编码^[33]; 小麦 (*Triticum aestivum*) 中至少由 4 个基因编码^[34]; 番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中由 4 个基因编码^[35]; 水稻中由 3 个基因编码^[36]; 苹果中至少由 2 个基因编码^[37]。

在研究马铃薯基因家族中, 研究者们根据不同基因同源程度的差异, 认为同一个基因家族是由不同的亚基因家族组成的。例如, Choi 等^[5]用特异性探针进行 Southern 杂交和分析基因组克隆的结果表明, 马铃薯中至少有 7 个 *hmg1* 基因, 分别有 1~2 个 *hmg2* 和 *hmg3* 基因。Korth 等^[38]和陈大华等^[39]分离得到马铃薯 HMGR 亚基因家族成员的克隆, 并对其与其它马铃薯 HMGR 的同源关系及组织特异性表达进行了研究。Loguericio 等^[40]认为棉花的 HMGR1 和 HMGR2 也分别由独立的亚基因家族编码。

这些同源基因在细胞的不同发育时期和不同的胁迫条件下差异表达形成多个同工酶。植物 HMGR 基因的差异表达主要体现在其组织特异性表达和同一发育或环境因子作用下的差异表达上。

在马铃薯完全开放的花中 *hmg* 呈高水平表达, 而在其根、茎、花原基、花瓣中则是相对低的水平表达^[5]。Choi 等^[5]对马铃薯花的各部分作进一步研究表明, *hmg* 主要在花药中表达。其中的 *hmg1* 在花原基和花药中表达, 在花瓣和雌蕊中表达水平较低; *hmg2* 在根和花药中表达。 *hmg3* 只在花药中表达。Enjuto 等^[11]报道, *hmg1* 在拟南芥所有的组织中都呈相对高水平表达, 而 *hmg2* 表达水平较低, 且只限于幼苗、根和花序中。这一结果表明, *hmg2* 只在有快速分裂细胞的组织中表达。研究者们认为 *hmg1* 的广泛高水平表达可能是作为“看家基因”(house-keeping gene) 保证植物体内 *hmg* 的组成型表达; *hmg2* 的表达则是为满足细胞快速生长的需要, 用于合成特定的类

异戊二烯化合物。在橡胶中, 乙烯可以诱导 *hmg1* 的表达, 而且只在合成橡胶的部位——乳汁管中高度特异性的表达; *hmg3* 的表达不受乙烯影响, 而是作为“看家基因”在组织中呈组成型表达^[33]。在番茄中, *hmg1* 在快速生长的未成熟的果实中大量表达^[41], 这可能与合成甾类物质供膜形成有关。*hmg2* 受机械损伤、真菌诱导子和病原菌的诱导^[35], 表明它与防御机制有关。在苹果中, *hmg1* 呈组成型表达, *hmg2* 对果实发育和乙烯敏感^[37]。

Choi 等^[5]报道, 受伤可在 24 h 内诱导马铃薯块茎中总 HMGR mRNA 水平升高, 并且 HMGR1 mRNA、HMGR2 mRNA、HMGR3 mRNA 水平都升高; 用花生四烯酸和受伤同时处理块茎时发现总 HMGR mRNA 是单纯伤诱导的 3 倍。与伤诱导不同的是, 不同的同源基因对花生四烯酸的反应不同: HMGR1 mRNA 受抑制, 其最高水平是单纯伤诱导的最高水平的 10%; HMGR2 mRNA 和 HMGR3 mRNA 水平显著增高, 是单纯伤诱导的 2~3 倍, HMGR3 mRNA 在处理 18 h 时达到最大, 而 HMGR2 mRNA 则在 24 h 达到最大。这类 *hmg* 转录水平的变化与前人报道的酶水平^[26]以及甾醇类/甾类糖生物碱和倍半萜物质含量变化^[42]是一致的。有理由认为, 花生四烯酸是通过抑制和诱导不同基因的表达, 而改变代谢途径中的“碳流”方向, 使其由合成甾类物质转为合成倍半萜类植保素。当用另一种脂肪酸——亚油酸(可引起细胞死亡)处理受伤马铃薯块茎时, 可得到不同的诱导模式, 即可抑制受伤诱导的 HMGR2 mRNA 水平, 并稍能提高 HMGR1 mRNA 和 HMGR3 mRNA 水平。这些同源基因的差别表达可能是为满足植物合成不同的类异戊二烯产物的需要。

番茄 *hmg1* 在果实快速生长时高水平表达^[41], *hmg2* 在果实生长的时候不表达, 但在成熟过程中似乎是为了合成番茄红素可被激活并大量表达^[43]。Rodríguez-Concepción 和 Gruissem^[44]用花生四烯酸处理正在生长的番茄果实, 可在同一组织中同时抑制 *hmg1* 和诱导 *hmg2* 的表达。由于 *hmg1* 表达受到抑制, 果实生长也受到阻碍, 这说明 *hmg1* 表达是果实生长所必需的, *hmg2* 不能代替。由

于花生四烯酸的作用, *hmg2* 的表达可提前诱导出来, 果实也提前变红, 但加入一种特异的 HMGR 活性抑制剂 (mevinolin) 并不影响番茄红素的合成。其它实验中用抑制剂抑制 HMGR 的活性对叶绿素和类胡萝卜素合成也都几乎没有影响, 但甾类化合物的合成和生长则受抑^[41, 45]。产生这种现象的原因可能有两种: 一种是早期合成的中间体已经能够满足合成番茄红素的需要, 合成过程中的其它步骤起决定性作用; 另一种是类胡萝卜素是由最新发现的另一条类异戊二烯途径——丙酮酸/磷酸甘油醛途径或其它途径合成的。实际上, Lois 等^[46]曾证实番茄果实成熟早期丙酮酸/磷酸甘油醛代谢途径中的第一个酶 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) 对番茄红素的形成有调控作用。

在不同的发育时期和不同环境因子的作用下, HMGR 基因家族不同基因的差异表达及不同的 HMGR 同工酶可能在决定代谢中间体合成哪种类异戊二烯终产物 (至少是甾类和植保素类) 中起重要作用, 不同功能基因有其结构上的特点。Denbow 等^[15]发现已研究过的植物中, 那些呈组成型表达的, 或与细胞快速生长时膜的形成有关的, 或与鲨烯合成酶活性一致的 HMGR 都没有 LS 内的 N-连接的糖基化位点 (如番茄 HMGR1、马铃薯 HMGR1、拟南芥 HMGR1、橡胶 HMGR3); 其在双子叶植物中的表达与防御物质或其它次生代谢物质的合成有关的 HMGR, 以及与倍半萜环化酶活性相关的 HMGR (如番茄 HMGR2、橡胶 HMGR1、烟草和长春花的 HMGR5), 都有糖基化位点。

4 结束语

植物类异戊二烯途径是一条极其复杂的多分支的代谢途径, HMGR 被认为是其限速酶而备受关注。但随着研究的深入, 对 HMGR 是否具有限速酶的作用还有争议。一方面, 一些研究发现诱导植物类异戊二烯的合成 (尤其是倍半萜) 的同时伴随着 HMGR 活性的增加^[26, 47]。另一方面, 以¹⁴C 标记的乙酸和³H 标记的甲羟戊酸进行的脉冲标记实验, 以及测定鲨烯合成酶和倍半萜环化酶活性的结果, 却表明鲨烯合成酶和倍半萜环化酶也严格调控植物类异戊二烯途径的碳流方向, 并且认为它们催化的反应可能是主要的调控位点^[42, 48]。为了

进一步阐明 HMGR 在控制植物类异戊二烯途径的代谢“碳流”中的作用, Chappell 等^[49]将仓鼠的 HMGR cDNA 转入烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中, 并使其组成型表达, 结果总 HMGR 活性增加 3~6 倍, 甾醇类物质的总量增加 3~10 倍。但一些甾醇类终产物 (如谷甾醇、菜油甾醇和豆甾醇) 只增加 2 倍, 而环阿屯醇 (甾醇合成过程中的一个中间体) 却增加 100 多倍。这些表明总甾醇类物质似乎受 HMGR 活性的调控, 但在环阿屯醇合成之后必然还有一种或多种酶决定着甾醇类产物的合成。其它类异戊二烯产物 (如类胡萝卜素、倍半萜植保素和叶绿素的植醇链) 在转基因植物中都未发生相应的变化。丙酮酸/磷酸甘油醛途径的发现更让人们怀疑, 是否所有的类异戊二烯物质的合成都需要 HMGR 的存在。在类异戊二烯途径中找到限速步骤本身或许就是错误的, 因为它是一条复杂的受多因素控制的途径。

即使如此, HMGR 在植物的生长发育特别是次生代谢过程中仍然起重要作用, 至少它在甾类化合物、倍半萜植保素和三萜合成中的作用是肯定的。另外, 还有研究证明, HMGR 活性与花的发育有关^[38]。贮藏过程中的苹果皮中 α -金合欢烯是由经典的甲羟戊酸途径合成的^[37]。Yang 等^[32]在研究机械损伤对马铃薯的影响时, 发现双峰诱导现象, 即在受伤后半小时就诱导 HMGR 基因转录, 并迅速恢复, 而另一个峰值则出现在受伤 14 h 后, HMGR 基因表达的启动机制是目前发现的最快的保护机制。HMGR 基因家族是研究植物防御反应的良好系统, 进一步研究其启动子, 寻找这种快速反应机制的作用因子或病原菌感染的作用部位, 将有助于人们通过调控代谢途径增强植物的抗病性。有人已对 *hmg* 的启动子作了初步研究^[19, 33, 40, 50], 但都单纯是从结构上进行了一些描述, 并未对其中的顺式成分和相应的反式作用因子作更深入的研究。

另外, HMGR 的亚细胞定位仍不清楚, 这可能要在找到能探测特异的 HMGR 异构体蛋白的免疫探针时方可以解决。

参考文献

- 1 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway.

- Nature, 1990, 302:608~609
- 2 Eisenreich W, Menhard B, Hylands PJ et al. Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:6431~6436
 - 3 Lange BM, Wildung MR, McCaskill D et al. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:2100~2104
 - 4 Wang Y, Darnay BG, Rodwell VW. Identification of the principal catalytically important acidic residues of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J Biol Chem, 1990, 265:21634~21641
 - 5 Choi D, Ward BL, Bostock RM. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. Plant Cell, 1992, 4:1333~1344
 - 6 Darnay BG, Wang Y, Rodwell VW. Identification of the catalytically important histidine of HMG-CoA reductase. J Biol Chem, 1992, 267:15064~15070
 - 7 Caelles C, Ferrer A, Balcells L et al. Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Plant Mol Biol, 1989, 13:627~638
 - 8 Learned RM, Fink GR. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:2779~2783
 - 9 Denbow CJ, Lang S, Cramer CL. The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases: sequence, microsomal targeting, and glycosylation. J Biol Chem, 1996, 271:9710~9715
 - 10 Campos N, Boronat A. Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Plant Cell, 1995, 7:2163~2174
 - 11 Enjuto M, Balcells L, Campos N et al. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:927~931
 - 12 Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science, 1986, 234:364~368
 - 13 Brooker JD, Russell DW. Subcellular localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Pisum sativum* seedlings. Arch Biochem Biophys, 1975, 167:730~737
 - 14 Olender EH, Simoni RD. The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. J Biol Chem, 1992, 267:4223~4235
 - 15 Denbow CJ, Lang S, Cramer CL. Targeting and membrane orientation of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Plant Physiol, 1995, 108 (suppl):144
 - 16 Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol, 1993, 121:317~333
 - 17 Schutze M-P, Peterson PA, Jackson MR. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. EMBO J, 1994, 13:1696~1705
 - 18 Teasdale RD, Jackson MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996, 12:27~54
 - 19 Nelson AJ, Doerner PW, Zhu Q et al. Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene that is elicitor inducible. Plant Mol Biol, 1994, 25:401~412
 - 20 Bach TJ. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants—a review. Lipids, 1995, 30:191~202
 - 21 Stermer BA, Bianchini GM, Korth KL. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. J Lipid Res, 1994, 35:1133~1140
 - 22 Kato-Emori S, Higashi K, Hosoya K et al. Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo* L. reticulatus). Mol Genet Genomics, 2001, 265:135~142
 - 23 Learned RM. Light suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expressed in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 1996, 110:645~655
 - 24 Korth KL, Jaggard DAW, Dixon RA. Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. Plant J, 2000, 23:507~516
 - 25 Oba K, Kondo K, Donke N et al. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in potato tubers after slicing, fungal infection or chemical treatment, and some properties of the enzyme. Plant Cell Physiol, 1985, 26:873~880
 - 26 Stermer BA, Bostock RM. Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. Plant Physiol, 1987, 84:404~408
 - 27 Brooker JD, Russell DW. Regulation of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Pisum sativum* seedlings. Arch Biochem Biophys, 1979, 198:323~334
 - 28 Holmberg N, Harker M, Gibbard CL et al. Sterol C-24 methyltransferase type I controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed. Plant Physiol, 2002, 130:303~311
 - 29 Wentzinger LF, Bach TJ, Hartmann M-A. Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Plant Physiol, 2002, 130:334~346
 - 30 Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Dumkong S. *Hevea*

- calmodulin: regulation of the activity of latex 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Phytochem*, 1990, 29:1755~1758
- 31 Russell DW, Knight JS, Wilson TM. Pea seedling HMG-CoA reductases: regulation of activity *in vitro* by phosphorylation and Ca^{2+} , and posttranslational control *in vivo* by phytochrome and isoprenoid hormones. In: Randall DD, Blevins DG, Larson RL (eds). *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*. Columbia: University of Missouri-Columbia, 1985. 191~206
- 32 Yang Z, Park H, Lacy GH et al. Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell*, 1991, 3:397~405
- 33 Chye ML, Tan CT, Chua NH. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*; HMG1 and HMG3 are differentially expressed. *Plant Mol Biol*, 1992, 19:473~484
- 34 Aoyagi K, Beyou A, Moon K et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol*, 1993, 102:623~628
- 35 Park H-S, Denbow CJ, Cramer CL. Structure and nucleotide sequence of tomato HMG2 encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Mol Biol*, 1992, 20:327~331
- 36 Ha SH, Lee SW, Kim YM et al. Molecular characterization of *Hmg2* gene encoding a 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase in rice. *Mol Cells*, 2001, 11:295~302
- 37 Rupasinghe HPV, Almquist KC, Paliyath G et al. Cloning of *hmg1* and *hmg2* cDNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and their expression and activity in relation to alpha-farnesene synthesis in apple. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39:933~947
- 38 Korth KL, Stermer BA, Bhattacharyya MK et al. HMG-CoA reductase gene families that differentially accumulate transcripts in potato tubers are developmentally expressed in floral tissues. *Plant Mol Biol*, 1997, 33:545~551
- 39 陈大华, 叶和春, 李国凤等. 马铃薯 HMGR 基因的克隆、序列分析及其表达特征. *植物学报*, 2000, 42:724~727
- 40 Loguercio LL, Scott HC, Trolinder NL et al. Hmg-CoA reductase gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): unique structural features and differential expression of *hmg2* potentially associated with synthesis of specific isoprenoids in developing embryos. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40:750~761
- 41 Narita JO, Gruijssem W. Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell*, 1989, 1:181~190
- 42 Vögeli U, Chappell J. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol*, 1998, 88:1291~1296
- 43 Gillaspay G, Ben-David H, Gruijssem W. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell*, 1993, 5:1439~1451
- 44 Rodríguez-Concepción M, Gruijssem W. Arachidonic acid alters tomato *HMG* expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol*, 1999, 119:41~48
- 45 Bach TJ, Lichtenthaler HK. Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. *Physiol Plant*, 1983, 59:50~60
- 46 Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J*, 2000, 22: 503~513
- 47 Chappell J, Nable R. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol*, 1987, 85:469~473
- 48 Chappell J, Vonlancken C, Vögeli U et al. Sterol and sesquiterpene biosynthesis during a growth cycle of tobacco cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 1989, 8:48~52
- 49 Chappell J, Wolf F, Proulx J et al. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol*, 1995, 109: 1337~1343
- 50 Daraselia ND, Tarchevskaya S, Narita JO. The promoter for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression. *Plant Physiol*, 1996, 112:727~733