

## 植物八氢番茄红素脱氢酶(PDS)基因保守结构域模式与系统进化分析

席海秀, 李洪艳, 佟少明\*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁省植物生物工程重点实验室, 辽宁大连116081

**摘要:** 八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素生物合成过程中催化无色的八氢番茄红素形成有色的 $\zeta$ -类胡萝卜素的关键酶。本文选取公开发表的PDS及通过在NCBI数据库中搜索得到的43条来自于不同物种的PDS的氨基酸序列进行分析。通过CDD在线软件预测每条氨基酸序列保守结构域, 结果表明, 所选取序列均包含一个NAD(P)-binding domain保守结构域, 其长度为51个氨基酸, 不同物种保守结构域中氨基酸的突变集中在8个不同的位置上; 利用MEGA等软件进行多序列比对后构建系统进化树, 可以看到不同物种的PDS蛋白清晰地分类到各自的类群内, 和传统的分类学结果一致, 表明所有不同分支的PDS蛋白都是单系同源, 并不存在物种间的水平基因转移。

**关键词:** 八氢番茄红素脱氢酶; 保守结构域; 系统进化分析

## Conserved Motif and Phylogenetic Analysis of Phytoene Desaturase (PDS) Proteins in Plants

XI Hai-Xu, LI Hong-Yan, TONG Shao-Ming\*

School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Key Laboratory of Plant Biological of Liaoning Province, Dalian, Liaoning 116081, China

**Abstracts:** Phytoenedesaturase (PDS) is a key enzyme in carotenoids biosynthesis and can convert the phytoene into the carotene. 43 PDS sequences from various species retrieved from published studies and NCBI database were selected for further analysis. Our results showed that a conserved 51 aa motif of NAD(P)-binding domain was identified in all PDS proteins by CDD online analysis. The amino acid mutations of this motif in different species were found to focus on 8 sites. The phylogenetic analysis by MEGA showed that PDSs from different species could be grouped into individual branches and keep coincidences with the results in tradition taxonomy. Every branch represents a monophyletic origin and showed that there is no horizontal gene transfer among different species.

**Key words:** phytoene desaturase; conserve motif; phylogenetic analysis

类胡萝卜素是一种广泛存在于动、植物及微生物中的天然有机色素之一, 是含有多个共轭双键的萜烯类化合物。在高等植物叶肉细胞的叶绿体中, 类胡萝卜素作为天线色素主要分布在类囊体膜上; 在成熟果实和花瓣的有色体中主要集中在膜、油体和间质内的其他结构上。类胡萝卜素在光合作用中主要起到电子传递及光氧化保护剂的作用, 也是许多花和果实呈现黄色、红色和橘红色的原因之一(Sandmann 1994; Niyogi等1999), 同时, 类胡萝卜素也是植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)和独角金内酯(strigolactone, SL)合成的前体(Seo和Koshiba 2002; Ruyter-Spira等2013)。

类胡萝卜素在植物中的生物合成途径非常复杂, 其合成的前体物质为异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)。首先, 5碳的IPP在IPP异构酶

的作用下生成二甲基丙烯基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP), IPP与DMAPP互为异构体, 两者可以结合起来形成更大的分子; 然后, DMAPP在牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS)的作用下与IPP缩合, 依次生成10碳的牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)、15碳的法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)及20碳的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP); 2个GGPP经八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)合成一个40碳的八氢番茄红素(phytone), 八

收稿 2013-08-30 修定 2013-10-24

资助 辽宁省教育厅重点实验室项目(2009S061)。

\* 通讯作者(E-mail: tongsm@163.com; Tel: 0411-85827080)。

氢番茄红素为植物体内合成的第一个类胡萝卜素分子;八氢番茄红素再经连续的脱氢作用及共轭双键的延长,在八氢番茄红素脱氢酶(phytoene-desaturase)催化下形成 $\zeta$ -类胡萝卜素,最后在 $\zeta$ -类胡萝卜素脱氢酶( $\zeta$ -carotene desaturase, ZDS)的作用下生成番茄红素(lycopene);至此,到了类胡萝卜素合成代谢的一个分支点,番茄红素可分别被环化为 $\alpha$ -胡萝卜素和 $\beta$ -胡萝卜素; $\alpha$ -胡萝卜素是在 $\beta$ -环化酶和 $\epsilon$ -环化酶的共同作用下生成, $\beta$ -胡萝卜素是在 $\beta$ -环化酶的单独作用下产生。 $\alpha$ -胡萝卜素和 $\beta$ -胡萝卜素再分别被羟基、甲氧基和酯键等基团修饰后形成叶黄素。一般情况下, $\alpha$ -胡萝卜素主要转化形成叶黄素, $\beta$ -胡萝卜素则转化为虾青素、玉米黄素等(Sandmann 1994; Hirschberg 2001; Van-Dien等2003; Botella-Pavia等2004)。

八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素生物合成途径中的一个重要的分支点,是催化无色的八氢番茄红素到有色的一类胡萝卜素的关键酶。目前,PDS基因已经从多种藻类和高等植物中被相继克隆和鉴别出来,如奇异球藻(Xu等2007)、柿子(Zhao等2011)、柑桔(Kita等2001)、番木瓜(Yan等2011)、西红柿(Mann等1994)、小麦(Cong等2010)、杜氏盐藻(朱跃辉等2005)、雨生红球藻(梁成伟等2009)、白菜型油菜(薛蕾等2011)、草莓(朱海生等2011)、棉花(徐大伟等2011)和中国水仙(陈段芬等2008)等。

研究发现,PDS基因在植物基因组中是以单拷贝形式存在,其编码蛋白位于植物叶绿体的类囊体上,与类囊体膜相连(Grunewald等2000)。PDS基因转录水平的表达在果实成熟过程中和光响应过程中会增加(Pecker等1992; Simkin等2003),在其他情况下细胞中的PDS含量保持恒定(Li等1996; Wetzler和Rodermeil 1998; Li等2013)。植物PDS的氨基酸序列通常是十分保守的,目前所有发现的所有PDS蛋白的C末端均含有一个保守结合域来结合NAD/NADP或是FAD。在植物中,PDS蛋白以两种形式存在:一种是可溶的但无酶活性的形式,另一种是与膜结合有酶活性的形式(Grunewald等2000),PDS的活性高低取决于其与质膜的结合度(Camara等1982; Grunewald等2000)。因为类胡萝卜素的合成是在细胞质中完成的,因此其合成过

程中的所需PDS首先要进入到细胞器,然后再经过转移后进入细胞质中才能发挥酶活性(Bartley等1991; Arias等2006)。

综上所述,在类胡萝卜素的生物合成过程中,作为限速酶的八氢番茄红素脱氢酶直接影响着类胡萝卜素的产率、光合作用及光保护等生理过程,故本文对研究植物PDS蛋白的保守结构模式及进化关系进行分析,为深入了解类胡萝卜素的生物合成的分子进化机制奠定基础,从而有助于我们进一步了解植物之间的进化关系。

## 材料与方法

### 1 数据库查询

PDS氨基酸序列的收集来自于已发表的文献以及在NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中,以phytoene desaturase作为关键词,采取phytoene desaturase [Protein Name] OR phytoene[All Fields] AND desaturase [All Fields]的策略表达式进行搜索,对搜索结果进行进一步筛选,去除编码序列不完整的条目,最后将搜集得到的所有PDS蛋白序列以fasta格式存盘。

### 2 保守结构域预测

将收集到的PDS蛋白序列分别输入到NCBI数据库中的CDD在线预测保守结构域软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)中,分别预测保守结构域,将预测到的每个保守结构域序列以fasta形式保存。

### 3 PDS蛋白的多序列比对及进化树构建

将所有PDS蛋白序列导入到ClustalX软件中进行多序列比对,然后使用MEGA 5.1 (Tamura等2011)进化分析软件构建系统发生树,系统发生树的生成采用最大似然法(maximum likelihood, ML),模型设定为JTT matrix-based model。

## 结果与讨论

### 1 各物种PDS基因的收集

通过公开发表的文献以及在NCBI数据库中的搜索,从原核生物细菌、蓝藻到真核生物的真菌、藻类、苔藓、蕨类以及高等植物中都发现有PDS蛋白的存在,也表明PDS蛋白在很早以前就已经出现,是从水生生物逐渐过渡到陆地植物中

来。从PDS基因编码氨基酸的个数来看, 细菌为492~508 aa; 蓝藻为457~480 aa; 植物PDS基因编码氨基酸个数551~586 aa。原核生物PDS蛋白的氨基酸相对于真核生物而言较少, 也说明随着生物体不断进化, PDS的结构变得更加复杂化, 从而衍

生出PDS蛋白更多的生物学功能。

本文中选取了涉及到藻类、藓类、蕨类及高等植物等物种的43条编码PDS的氨基酸序列作为分析的对象, 序列所代表的物种及在NCBI数据库中的登录号见表1。

表1 各物种的PDS蛋白及其登录号

Table 1 PDS sequence and accession number of various speceis

种类	物种名	登录号	种类	物种名	登录号
绿藻与褐藻	<i>Bathycoccus prasinos</i>	CCO18703	双子叶植物	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	BAE79552
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001690859		<i>Citrus sinensis</i>	AEQ29525
	<i>Dunaliella salina</i>	ADD52599		<i>Cucumis melo</i>	AGK85258
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	CAA60479		<i>Daucus carota</i>	ABB52082
	<i>Micromonas</i> sp.	ACO65059		<i>Diospyros kaki</i>	ACY78343
	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	CBN77338		<i>Elaeagnus umbellata</i>	ACT34016
	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	ADR82199		<i>Fragaria ananassa</i>	ACR61393
藓类与蕨类	<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001783558		<i>Gentiana lutea</i>	BAB82462
	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002988989		<i>Glycine max</i>	AAA34001
单子叶植物	<i>Crocus sativus</i>	AAO24235		<i>Gossypium hirsutum</i>	ADV90865
	<i>Musa acuminata</i>	AFK76452		<i>Ipomoea</i> sp.	BAI47573
	<i>Narcissus tazetta</i>	AFH53816		<i>Momordica charantia</i>	AAR86105
	<i>Oncidium hybrid</i>	ACP27624		<i>Nicotiana benthamiana</i>	ABY25272
	<i>Oryza sativa</i>	AAD02489		<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002321104
	<i>Paphiopedilum armeniacum</i>	ADK54935	<i>Prunus armeniaca</i>	AAX33347	
	<i>Triticum aestivum</i>	ACL36586	<i>Scutellaria baicalensis</i>	AGN03855	
	<i>Zea mays</i>	AAC12846	<i>Solanum lycopersicum</i>	AAA68865	
	<i>Strelitzia reginae</i>	AGC74040	<i>Solanum tuberosum</i>	AAS17750	
双子叶植物	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAA20109	<i>Tagetes erecta</i>	AAG10426	
	<i>Brassica oleracea</i>	ABV46593	<i>Theobroma cacao</i>	EOY05074	
	<i>Capsicum annuum</i>	CAA48195	<i>Vitis vinifera</i>	AFP28796	
	<i>Carica papaya</i>	ABG72807			

## 2 PDS蛋白保守结构域的预测

利用CDD在线分析预测软件预测出了表1中每条PDS序列的保守结构域, 结果表明, 在蛋白序列的C末端均含有一个保守结构域: NAD(P)-binding rossmann-like domain, 此结构域为氨基酸脱氢酶的辅酶结合域, 具有一个 $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ 螺旋结构, 隶属于Rossmann折叠大家族中的成员, 作用原理是以辅酶NAD(P)作为辅助因子催化氨基酸脱氨基形成酮酸, 作用期间会涉及到众多的氢键作用力与范德华力。目前, 在谷氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸脱氢酶、莽草酸脱氢酶、苹果酸氧化还原酶和谷氨酰tRNA还原酶等蛋白中都发现有此类成员存在。

在分析中发现, PDS保守结构域的长度为51 aa, 保守结构域长度的不同会引起高级结构的

同, 从而影响与辅酶的结合, 导致其功能的变化, 这是在进化过程中一个正向选择的结果。根据植物NAD(P)-binding rossmann-like domain保守结构域氨基酸变化的程度, 利用ClustalX软件进行保守结构域的比对分析后, 发现构成藻类、苔藓及高等植物的保守结构域的氨基酸序列存在着差异(表2)。

结果(表2)显示, PDS的保守结构域中氨基酸的突变主要集中在8个位置的氨基酸上, 分别是第5、7、8、11、23、25、44和49号氨基酸, 突变的氨基酸基本都会与其较高等或较低等植物保守结构域序列中的等位置氨基酸相一致。

在提取物种的PDS蛋白序列时, 除了直接以“phytoene desaturase”为关键词在NCBI数据库中

表2 PDS蛋白的保守结构域模式

Table 2 Pattern of conserved motif in PDS sequence

种类	结构模式
褐藻	X4-K-X1-VV-X2-A-X11-Q-X1-K-X18-VQN-X2-T-X2
绿藻	X4-H-X1-IV-X2-G-X11-K-X1-E-X18-MQN-X2-K-X2
藓类植物	X4-I-X1-IL-X2-A-X11-K-X1-K-X18-MQN-X2-G-X2
蕨类植物	X4-I-X1-IV-X2-A-X11-K-X1-K-X18-VQN-X2-G-X2
单子叶植物	X4-K-X1-IL-X2-A-X11-K-X1-E-X18-VQN-X2-G-X2
双子叶植物	X4-K-X1-IL-X2-A-X11-K-X1-D-X18-IQN-X2-G-X2

X表示相同氨基酸的个数。

搜索外, 还可以通过表2列出的PDS蛋白的保守结构域, 利用BlastP程序或者tBlastx的程序在数据库中进行搜索, 以期获得更多物种的PDS蛋白序列。

### 3 PDS蛋白的系统发育分析

采用最大似然法(ML)、最大简约法(MP)以及邻接法(NJ)对所选取的序列进行进化树的构建, 结果(图1)发现, 每种算法得到了相同的进化树拓扑

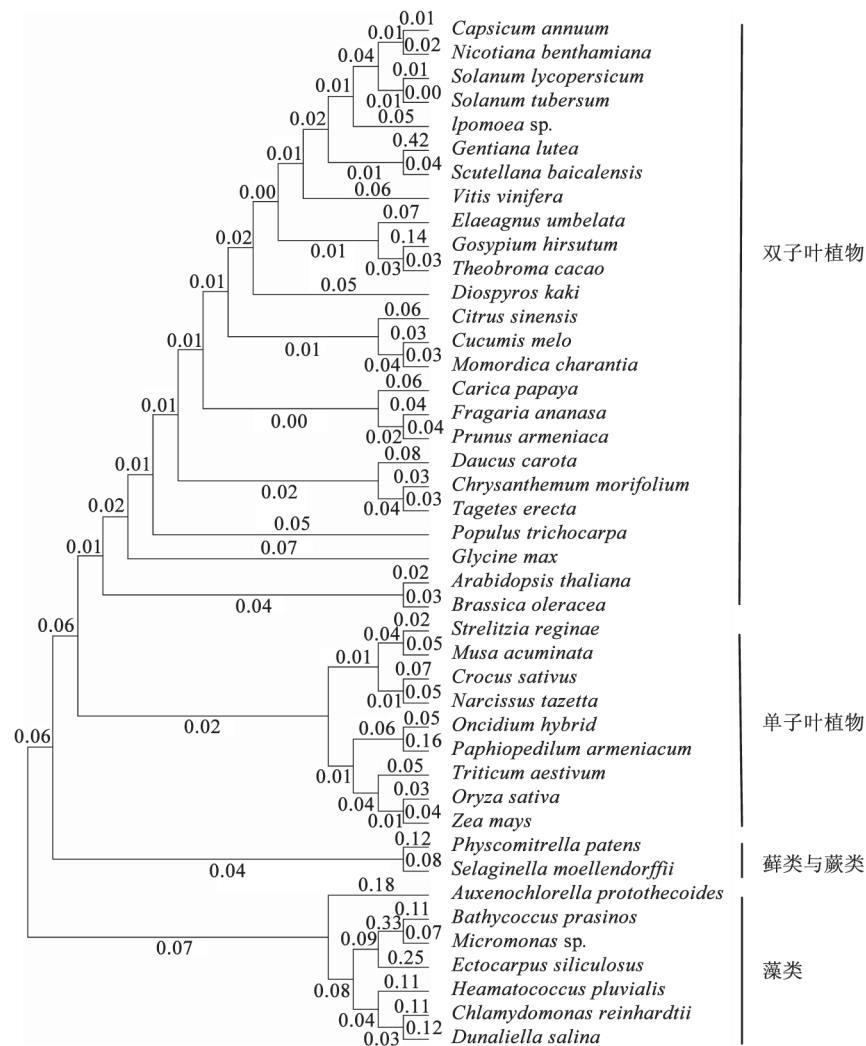


图1 植物PDS蛋白的系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of PDS proteins in plants

结构, 所选取的43条PDS蛋白经多序列比对并构建进化树分析以后可以看到其清晰的分为四大枝。藻类单独分为一枝, 并处在PDS蛋白分枝的底部; 藓类和蕨类植物临近藻类形成另外一个分枝; 单子叶植物和双子叶植物分别各形成一个大的分枝。此进化树能够将不同的物种清晰地聚类到各自的类别中, 与传统的分类学结果一致, 证明了PDS蛋白作为系统进化分析的可行性。由于PDS蛋白序列之间的相似程度很高, 所有不同分支的PDS蛋白可能都是单系同源的, 不存在物种间的水平基因转移。

目前, 对于PDS基因的功能研究已取得了较大进展, 并在藻类、高等植物的许多物种中都克隆得到了PDS基因, 但系统进化方面的研究相对较少。在长期的进化中, 由于氨基酸密码子简并性的存在, 编码蛋白的基因核苷酸序列会发生替换, 这种变化可能是同义替换也可能是非同义替换, 而非同义替换大多数会被达尔文正选择加速, 朝着好的方向进化, 研究各物种的PDS蛋白序列将有助于我们更进一步了解植物之间的进化关系。

### 参考文献

- 陈段芬, 彭镇华, 高志民(2008). 中国水仙八氢番茄红素脱氢酶基因(PDS)的克隆及表达分析. 分子植物育种, 6 (3): 574~578
- 梁成伟, 檀琼萍, 苏忠亮, 魏魏, 秦松(2009). 雨生红球藻八氢番茄红素脱氢酶pds基因上游序列的分离和分析. 海洋通报, 28 (6): 46~50
- 徐大伟, 张雨良, 檀根甲(2011). 棉花八氢番茄红素脱氢酶GhPDS1基因的克隆与表达谱分析. 棉花学报, (03): 200~204
- 薛蕾, 闫贵欣, 伍晓明, 高桂珍, 陈碧云, 许颀(2011). 白菜型油菜八氢番茄红素脱氢酶基因PDS3的克隆与序列分析. 中国油料作物学报, (06): 622~627
- 朱海生, 李永平, 温庆放, 林琿(2011). 草莓八氢番茄红素脱氢酶基因pds的克隆及特征分析. 园艺学报, (01): 55~60
- 朱跃辉, 姜建国, 林庆生(2005). 盐藻八氢番茄红素脱氢酶cDNA的分离及序列分析. 食品与发酵工业, (09): 25~27
- Arias RS, Dayan FE, Michel A, Howell J, Scheffler BE (2006). Characterization of a higher plant herbicide-resistant phytoene desaturase and its use as a selectable marker. Plant Biotechnol J, 4 (2): 263~273
- Bartley, GE, Viitanen PV, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J, Scolnik PA (1991). Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 88 (15): 6532~6536
- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. Plant J, 40 (2): 188~199
- Camara B, Bardat F, Moneger R (1982). Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum* chromoplasts. Eur J Biochem, 127 (2): 255~258
- Cong L, Wang C, Li Z, Chen L, Yang G, Wang Y, He G (2010). cDNA cloning and expression analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) phytoene and zeta-carotene desaturase genes. Mol Biol Rep, 37 (7): 3351~3361
- Grunewald K, Eckert M, Hirschberg J, Hagen C (2000). Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, chlorophyceae). Plant Physiol, 122 (4): 1261~1268
- Hirschberg J (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Curr Opin Plant Biol, 4 (3): 210~218
- Kita M, Komatsu A, Omura M, Yano M, Ikoma Y, Moriguchi T (2001). Cloning and expression of CitPDS1, a gene encoding phytoene desaturase in citrus. Biosci Biotechnol Biochem, 65 (6): 1424~1428
- Li M, Gan Z, Cui Y, Shi C, Shi X (2013). Structure and function characterization of the phytoene desaturase related to the lutein biosynthesis in *Chlorella protothecoides* CS-41. Mol Biol Rep, 40 (4): 3351~3361
- Li ZH, Matthews PD, Burr B, Wurtzel ET (1996). Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. Plant Mol Biol, 30 (2): 269~279.
- Mann V, Pecker I, Hirschberg J (1994). Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (*Pds*) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Mol Biol, 24 (3): 429~434
- Niyogi KK (1999). PHOTOPROTECTION REVISITED: genetic and molecular approaches. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 333~359
- Pecker I, Chamovitz D, Linden H, Sandmann G, Hirschberg J (1992). A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. Proc Natl Acad Sci USA, 89 (11): 4962~4966
- Ruyter-Spira C, Al-Babili S, van der Krol S, Bouwmeester H (2013). The biology of strigolactones. Trends Plant Sci, 18 (2): 72~83
- Sandmann G (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. Eur J Biochem, 223 (1): 7~24
- Seo M, Koshiba T (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. Trends Plant Sci, 7 (1): 41~48
- Simkin AJ, Zhu C, Kuntz M, Sandmann G (2003). Light-dark

- regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J Plant Physiol*, 160 (5): 439~443
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731~2739
- Van-Dien SJ, Marx CJ, O'Brien BN, Lidstrom ME (2003). Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. *Appl Environ Microbiol*, 69 (12): 7563~7566
- Wetzel CM, Rodermel SR (1998). Regulation of phytoene desaturase expression is independent of leaf pigment content in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 37 (6): 1045~1053
- Xu Z, Tian B, Sun Z, Lin J, Hua Y (2007). Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology*, 153 (5): 1642~1652
- Yan P, Gao XZ, Shen WT, Zhou P (2011). Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase genes in *Carica papaya*. *Mol Biol Rep*, 38 (2): 785~791
- Zhao D, Zhou C, Kong F, Tao J (2011). Cloning of phytoene desaturase and expression analysis of carotenogenic genes in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Mol Biol Rep*, 38 (6): 3935~3943