

木本曼陀罗中一条新的 *TRI* 基因克隆与酶活功能鉴定

强 玮¹, 夏 科², 赵许朋³, 付 维¹, 满建民¹, 张明生^{1*}

(1. 贵州大学生命科学学院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
2. 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 3. 贵阳学院, 贵州 贵阳 550005)

摘要: 托品酮还原酶 I (tropinone reductase I, TRI) 是托品烷生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 合成途径中中游分支点处的关键酶, 可引导托品酮代谢流进入 TAs 合成, 因此是 TAs 代谢工程重要的靶标基因。本研究从木本曼陀罗 (*Datura arborea*) 中克隆到了一条新的 *TRI* 基因, 命名为 *DaTRI2* (GenBank 登录号为 MH705164)。*DaTRI2* 基因 cDNA 全长 1 135 bp, 与 *DaTRI* 序列一致性为 96.8%, 预测编码 272 个氨基酸。*DaTRI2* 蛋白具备茄科 TRI 保守的结合 NADPH 的 TGXXXGXG 基序、结合底物托品酮的 11 个保守氨基酸残基以及发挥催化活性的 N-S-Y-K 四联体基序。进化关系上, *DaTRI2* 和茄科的 TRI 成员聚为一支, 与 *Datura* 属的 TRI 亲缘关系最近。对 *DaTRI2* 进行原核表达, 纯化的重组蛋白能催化托品酮还原反应和托品氧化反应, 最适 pH 值分别为 8.0 和 9.6。*DaTRI2* 在 pH=6.4 时, 对托品酮的 K_m 和 V_{max} 分别为 210.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 69.6 $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ protein, 在 pH=9.6 时, 对托品的 K_m 和 V_{max} 分别为 188.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 114 $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ protein。qPCR 检测表明 *DaTRI2* 在幼叶中表达量最高, 其次是须根。*DaTRI2* 基因的克隆和酶活力分析为深入研究木本植物中 TAs 的生物合成分子机制奠定了基础, 同时为 TAs 代谢工程提供了一个更高效的候选靶基因。

关键词: 托品酮还原酶; 木本曼陀罗; 托品烷生物碱; 酶反应动力学

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0574-08

Cloning and enzymatic function characterization of a novel tropinone reductase I (*DaTRI 2*) in *Datura arborea*

QIANG Wei¹, XIA Ke², ZHAO Xu-peng³, FU Wei¹, MAN Jian-min¹, ZHANG Ming-sheng^{1*}

(1. School of Life Sciences / Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 3. Guiyang University, Guiyang 550005, China)

Abstract: Tropinone reductase I (TRI) is a key branch point enzyme in the midstream of tropane alkaloids (TAs) biosynthesis pathway and represents an important target for TAs metabolic engineering, which can lead to metabolic flux of substrate tropinone to TAs. A novel *TRI* gene was isolated from *Datura arborea*, a woody resource plant, and designated as *DaTRI2* (GenBank accession number is MH705164). The full-length cDNA of *DaTRI2* with 1 135 bp exhibits a high sequence homology (96.8%) with *DaTRI*, and is predicted to encode a protein of 347 amino acids. Deduced *DaTRI2* protein contain a conserved TGXXXGXG motif involved in NADPH binding, the catalytic N-S-Y-K tetrad motif and eleven amino acid residues important for binding to its substrate tropinone. The phylogenetic analysis revealed that *DaTRI2* and other TRIs from *Solanaceous* plants

收稿日期: 2018-11-05; 修回日期: 2018-12-06.

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2016YFC0502604); 贵州省科技计划重大专项课题 (黔科合平台人才[2017]5411-06); 贵州省科技创新人才团队建设专项资金 (黔科合平台人才[2016]5624); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字[2016]023); 贵州大学国家级重点培育项目 (黔科合平台人才[2017]5788); 贵州省中药材现代产业技术体系建设项目 (GZCYTX-02); 贵州大学引进人才科研项目 (贵大人基合字[2017]58).

*通讯作者 Tel: 13984378919, E-mail: mszhang@gzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0994

belong to the same cluster and DaTRI2 exhibited closest phylogenetic proximity to TRIs from *Datura*. DaTRI2 was expressed in *E. coli* and the purified recombinant protein can catalyze both tropinone reduction and tropine oxidation with an optimum pH value of 8.0 and 9.6, respectively. When tropinone was used as the substrate, the K_m and V_{max} values of DaTRI2 at pH 6.4 were $210.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $69.6 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein respectively, while the K_m and V_{max} values for tropine as the substrate were $188.03 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $114 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein respectively, at pH 9.6. *DaTRI2* transcript was most abundant in the young leaf, followed by the root. Cloning of *DaTRI2* gene and biochemical analysis of recombinant DaTRI2 facilitate further research on the molecular mechanism on TAs biosynthesis in woody plants and provide a more potent candidate for TAs metabolic engineering.

Key words: tropinone reductase; *Datura arborea*; tropane alkaloid; enzymatic kinetics

托品烷生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 是一类具有重要医疗价值的抗胆碱药, 收录入《中国药典》并在临床上大量使用的包括 3 种: 莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱。作为一类基础用药, 这 3 种生物碱广泛应用于镇痛、麻醉、戒毒脱瘾、抗晕动药、改善微循环、治疗农药中毒和帕金森症等, 市场需求巨大^[1]。由于化学合成的高成本和环境污染问题, 目前, 市场上的 TAs 供应仍主要依赖于从茄科植物中提取。然而在大多数资源植物中, TAs 含量偏低, 导致生产成本高, 如颠茄是 TAs 商业药源, 2015 版《中国药典》要求其干草中莨菪碱含量不得低于 0.3%, 而野生颠茄中莨菪碱含量大约仅为干重的 0.02%~0.17%, 东莨菪碱含量更低, 约为 0.01%~0.08%^[2]。开发高 TAs 含量的新植物资源和利用代谢工程技术提高植物中 TAs 尤其是东莨菪碱含量是相关领域的研究热点。

植物代谢工程的开展依赖于对代谢产物合成途径的认识和改造。茄科植物中 TAs 生物合成途径的大体脉络已经清晰 (图 1), 其合成起始于鸟氨酸和精氨酸的脱羧, *N*-甲基腐胺转移酶 (PMT) 是上游第一个关键酶^[3], 负责催化生成 TAs 特异的合成前体 *N*-甲基腐胺。莨菪碱 6 β -羟化酶 (H6H) 是合成东莨菪碱的最后一个限速酶, 直接催化莨菪碱羟基化生成山莨菪碱和环氧化生成东莨菪碱^[4]。在途径中游存在一个代谢分支点, 分别由两个托品酮还原酶 (TR) 主导: TRI 催化托品酮还原为托品, 为 TAs 合成提供原料; 而 TRII 竞争底物托品酮, 将其还原为假托品, 并进一步代谢分流生成无用的代谢产物打碗花精 A3。所以, *TRI* 是 TAs 合成途径中游重要的关键酶基因, 其表达量的高低和酶活性的强弱决定 TAs 的合成和积累水平, 是研究 TAs 生物合成的关键靶标^[5]。目前, *TRI* 基因已从 7 种 TAs 资源植物中得到了克隆, 并进行了酶活性分析, 包括曼陀罗 (*D. stramonium*)^[6]、天仙子 (*H. niger*)^[7]、三分三 (*A. acutangulus*)^[8]、睡茄 (*Withania coagulans*)^[9]、南非醉茄 (*Withania somnifera*)^[10]、木本曼陀罗 (*D. arborea*)^[11] 和铃铛子 (*A. lurida*)^[12]。在颠茄、三分三和铃铛子三种

草本资源植物中的研究均表明, 超量表达 *TRI* 基因能显著地提高莨菪碱的含量, 同时极大地促进东莨菪碱的积累。

木本曼陀罗是少有的木本 TAs 资源植物, 之前的研究发现其相比草本资源植物, 生物量大, 东莨菪碱含量高, 是一种有较大开发利用价值的 TAs 新种质资源^[11,13]。本文作者前期已在木本曼陀罗中鉴定到了一条 *DaTRI* 基因, 体外重组酶活力测定表明 DaTRI 比同属的草本曼陀罗的 DsTRI 具有更高的底物亲和性和催化效率, 是一个优秀的代谢工程靶标基因^[11]。后续的研究中, 发现每次 PCR 都能克隆到一条与 *DaTRI* 高度相似但又存在显著差异的基因序列。本研究克隆到了这条新的 *TRI* 基因, 命名为 *DaTRI2*。对 *DaTRI2* 基因进行了详细的生物信息学分析和组织表达分析, 进而进行了大肠杆菌异源重组表达和重组蛋白的酶动力参数测定, 以期在生化和分子水平上为阐明木本曼陀罗中 TAs 的生物合成奠定基础, 同时为 TAs 代谢工程提供新的候选靶标。

材料与方法

材料 供试木本曼陀罗为西南大学校园保护植物, 材料的鉴定、采集与处理方法与先前的研究报道^[14]一致。

试剂 总 RNA 提取试剂盒为 RNAsimple Total RNA Kit (TIANGEN), RNA 反转录试剂盒为 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa), 高保真 Taq DNA 聚合酶为 PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa), 质粒提取及胶回收试剂盒为 BioSpin Gel Extraction Kit、BioSpin plasmid DNA Extraction Kit (BioFlux), T 载体、连接试剂盒、荧光定量相关试剂分别为 pMD19-T Vector、DNA Ligation 2.0、PrimeScript™ RT-PCR Kit 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (TaKaRa), 蛋白纯化用 Ni 柱为 ProteinIso® Ni-NTA Resin (全式金)。本研究所用引物及测序服务由上海英骏生物技术有限公司提供, 所有引物序列见表 1。

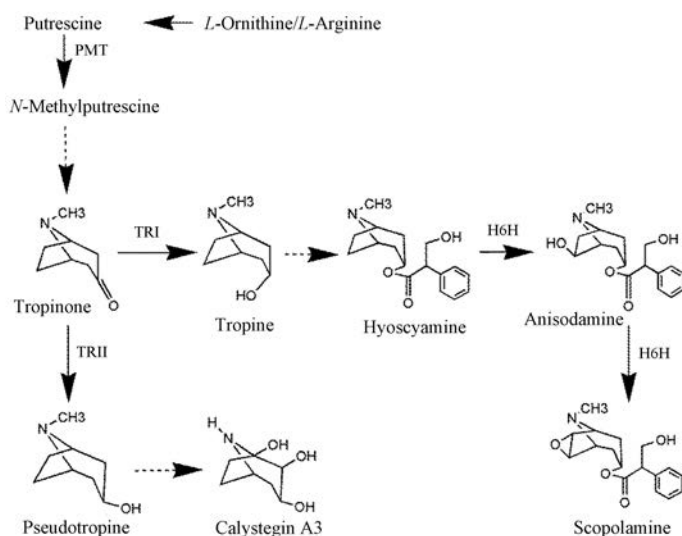


Figure 1 The biosynthetic pathway of tropane alkaloids in Solanaceae

其他试剂均为分析纯国产试剂。

cDNA的合成与 *DaTRI2* 基因克隆 以木本曼陀罗的须根为样品,按RNAsimple Total RNA Kit说明书提取RNA,用RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0试剂盒反转录获得第一链互补DNA(cDNA)。根据已鉴定的*DaTRI*基因序列^[1],在5'和3'UTR区域设计全长扩增引物F-*DaTRI2*-full和R-*DaTRI2*-full,以获得的cDNA为模板,用高保真酶进行PCR扩增。产物经电泳检测后,回收亚克隆入pMD19-T载体,转化大肠杆菌后送公司测序,测序结果可发现两条存在较大差异的TRI序列,一条为之前报道的*DaTRI*,另一条命名为*DaTRI2*。

***DaTRI2*的生物信息学分析** 在InforMax软件包的Vector NTI Suite 8.0软件中进行ORF查找和推导假定的氨基酸序列。在ExPASy Proteomics Server提供的在线工具ProtParam中进行*DaTRI2*编码蛋白的理化性质分析。采用SWISS-MODEL进行蛋白质三维结构同源比对建模,并在Weblab ViewerLite40软件中进行编辑。应用BLAST程序检索相似蛋白,用Clustal W对氨基酸序列进行多重比对,进而用MEGA NJ法

(Bootstrap 1000)构建系统进化树。

***DaTRI2*的大肠杆菌重组表达和纯化** 在*DaTRI2*基因编码区设计一对全长引物F-*DaTRI2*-pro和R-*DaTRI2*-pro,分别在两条引物5'端引入*Bam*H I和*Sac* I酶切位点,亚克隆入蛋白表达载体pET28a,然后导入大肠杆菌Rosseta (DE3)中进行诱导表达。菌液二活至OD₆₀₀=0.6~0.8时加入诱导剂IPTG至终浓度为0.5 mmol·L⁻¹,28℃继续诱导培养6 h。超声破碎菌体,离心获得粗酶液,按照ProteinIso®Ni-NTA Resin试剂盒说明进行亲和层析,收集的*DaTRI2*蛋白洗脱液用biosharp公司的透析袋(截留分子量为14 000 Da)进行透析除咪唑,最终获得纯化的*DaTRI2*蛋白。

***DaTRI2*的酶动力参数测定** *DaTRI2*酶活测定采用强玮等的方法^[11],简单来说,托品酮还原反应体系为:1 mL反应液中包含0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.4)、200 μmol·L⁻¹ NADPH、5 mmol·L⁻¹ Tropinone和20 μg TRI重组蛋白;托品氧化反应体系为:1 mL反应液中包含0.1 mol·L⁻¹甘氨酸(pH 9.6)、300 μmol·L⁻¹ NADP⁺、5 mmol·L⁻¹ Tropine和20 μg TRI重组蛋白,在HITACHI U-3010紫外分光光度计中检测OD_{340 nm}

Table 1 Primers designed for gene cloning, vector construction and real-time PCR detection

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature/°C
F- <i>DaTRI2</i> -full	CCCATCCCAAAATAGTTG	51
R- <i>DaTRI2</i> -full	GTGATGATAATAACAGAGAAC	
F- <i>qPGK</i>	TCGCTCTTGGAGAAGGTTGAC	59.5
R- <i>qPGK</i>	CTTGTCGCAATCACTACATCAG	
F- <i>q18S</i>	CAGATACCGTCTAGTCTCAAC	57
R- <i>q18S</i>	CAGCCTTGCGACCATACTC	
F- <i>qDaTRI2</i>	CGTGAGAAGCTTATGCAGACTG	58
R- <i>qDaTRI2</i>	CTTCAATAATGGATAAGCAATTTGG	
F- <i>DaTRI2</i> -pro	CGGATCCATGGAAGAATCAAAAGTGTCC	52
R- <i>DaTRI2</i> -pro	CGAGCTCGTGATGATAATAACAGAGAAC	

处吸光度变化。

实时荧光定量 PCR (qPCR) 同上方方法提取木本曼陀罗的主根、须根、老茎、嫩茎、老叶和嫩叶 6 个部位的总 RNA, 按 PrimeScript[®]RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行反转录, 得到 cDNA 第一链作为 qPCR 模板。使用 BIO-RAD IQTM5 Multicolor Real-Time PCR 仪, 参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect RealTime) 试剂盒说明书进行 qPCR 反应。反应条件及程序同强玮等的报道^[1]。以 PGK、18S 双基因作为内参, 根据 Pfaffl Method 方法计算基因的相对表达量。

结果与讨论

1 木本曼陀罗 *DaTRI2* 基因的克隆和序列分析

在 *DaTRI* 基因 cDNA 的 5' 和 3' UTR 区域设计全长扩增引物 F-*DaTRI2*-full 和 R-*DaTRI2*-full, 以木本曼陀罗须根 cDNA 为模版, 用高保真酶成功克隆到一条新 *TRI* 基因, 该基因全长 1 135 bp, 包含 69 bp 的 5' UTR、247 bp 的 3' UTR 和 816 bp 的编码区序列, 预测编码 272 个氨基酸。将该基因命名为 *DaTRI2*, GenBank 登陆号为 MH705164。 *DaTRI2* 与 *DaTRI* 在核苷酸序列水平上一致性为 96.8%, 差异碱基主要集中在编码区和 3' UTR, 编码区有 24 个碱基的差异, 3'

UTR 有 11 个碱基的差异, 编码的蛋白质水平上仅有 8 个氨基酸不同 (图 2 中天蓝色高亮显示)。

2 *DaTRI2* 基因编码蛋白的生物信息学分析

2.1 理化性质分析 *DaTRI2* 蛋白由 272 个氨基酸组成, 预测分子质量为 29.562 9 kD, 理论等电点为 pI 为 6.06。

2.2 *DaTRI2* 编码蛋白序列相似性和功能基序分析 BLASTp 分析表明 *DaTRI2* 编码蛋白与其等位基因编码的 *DaTRI* 序列一致性最高, 达到 97%, 与 *D. stramonium* 的 *TRI* 序列一致性也较高, 为 95%, 其次为 *W. somnifera* (88%)、*A. luridus* (88%)、*A. acutangulus* (88%)、*H. niger* (88%)、*W. coagulans* (86%), 这些物种的 *TRIs* 蛋白均进行了功能鉴定, 蛋白质序列的高度一致暗示 *DaTRI2* 也具有相应的托品合成催化功能。 *DaTRI2* 具备必需的功能基序和保守氨基酸残基, 包括结合底物 NADPH 的 TGXXXGXXG 基序、短链脱氢酶 SDRs 特征性的 NNAG 基序 (*TRI* 属于 SDR 家族) (图 2 中红色高亮)、托品酮还原酶 *TRs* 的催化活性四连体基序 N-S-Y-K (图 2 中绿色高亮) (其中酪氨酸残基对催化活性是必需的) 以及与底物托品酮结合的 11 个保守氨基酸残基 (在 *DsTRI* 中其位置分别为 Val110、His112、Ile159、Ala160、Leu165、Val168、Val203、Leu208、Val209、Ile223 和 Phe226) (图 2 中黄色高亮)。

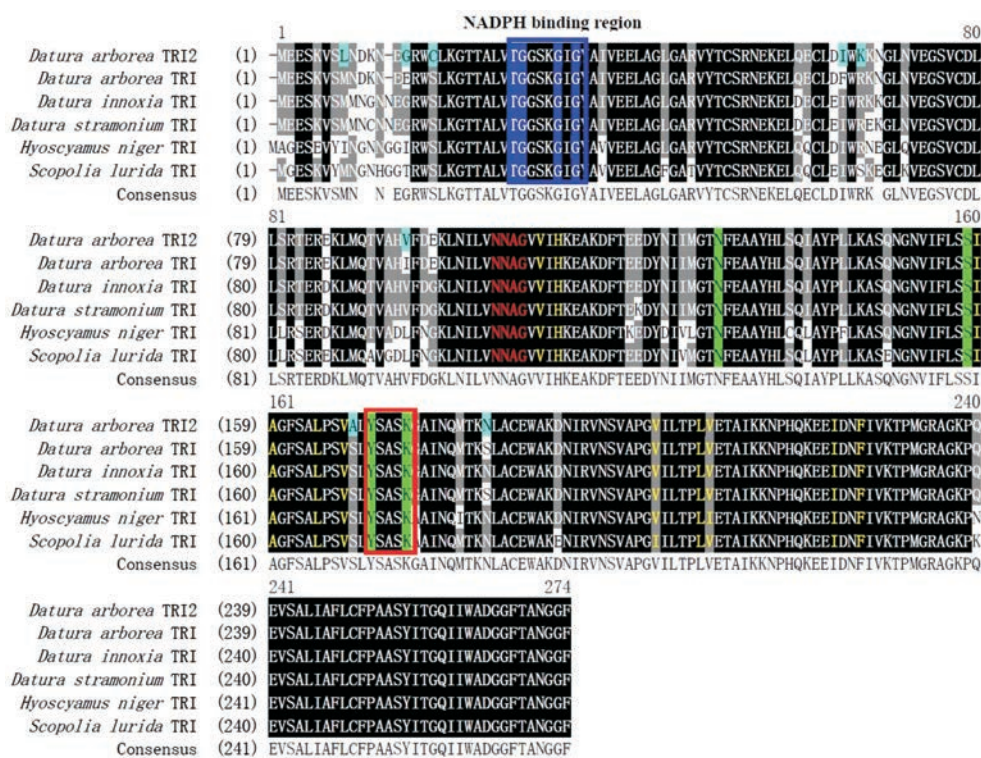


Figure 2 Comparison of tropinone reductase-1 2 from *D. arborea* (*DaTRI2*) with other known tropinone reductases by multiple sequence alignment. Identical and the conserved amino acids are shown in white on a black or grey background, respectively, and the non-conserved amino acids are shown in black on a white background

2.3 DaTRI2 编码蛋白三维建模 以曼陀罗的DsTRI 晶体结构 (1ae1. pdb) 为模板, 在 SWISS-MODEL Workspace 在线分析工具中对 DaTRI2 进行三维结构同源建模, 结果见图3。预测的 DaTRI2 三维结构呈同源二聚体, 在亚基的表面具有一个深的裂口, 构成了底物结合“口袋”, 这是酶与底物托品酮的结合部位。在“口袋”内部, 5个保守的氨基酸残基 (His111、Ala160、Val168、Ile223 和 Phe225) 与托品酮分子相互作用使之采取正确的方向与酶分子结合, 从而决定了产物的立体特异性, 该三维结构与预测的 DaTRI 三维结构基本相同。

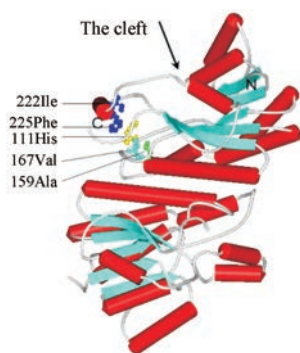


Figure 3 Three-dimensional structure of deduced DaTRI2

2.4 DaTRI2 系统进化树构建 在 NCBI 的非冗余蛋白数据库中选取各种 TAs 资源植物的 TRs 序列和一些假定的 TR 或 SDR 类似蛋白序列, 序列登录号为: *D. stramonium* TRI (AAA33281.1)、*D. stramonium* TRI (AIN39992.1)、*D. arborea* TRI (AIN39993.1)、*H. niger*

TRI (BAA85844.1)、*A. acutangulus* TRI (ACB71202.1)、*A. luridus* TRI (AGL76989.1)、*W. coagulans* TRI (AGB56644.1)、*W. somnifera* TRI (AGY46257.1)、*S. tuberosum* TRI (CAC34420.1)、*D. stramonium* TRII (AAA33282.1)、*H. niger* TRII (AAB09776.1)、*S. tuberosum* TRII (CAB52307.1)、*A. acutangulus* TRII (ACB71203.1)、*A. luridus* TRII (AGL76990.1)、*Dendrobium nobile* TRI (AFD23287.1)、*Zea mays* (ACG34080.1)、*Dendrobium nobile* TRII (AFD23289.1)、*Arabidopsis thaliana* (AAM10204.1) 和 *Cochlearia officinalis* (CAO02390.1)。采用 neighbor-joining 法构建 DaTRI2 的系统进化树 (图4)。DaTRI2 与茄科 TAs 资源植物的 TRI 聚入 Group I 分支, 并且和 *Datura* 属 TRI 的亲缘关系最近。所有茄科 TAs 资源植物的 TRII 聚入另一个 Group II 分支, 而非 TAs 资源植物的 TR 类似序列全部归于第三个分支 Group III。

3 DaTRI2 基因的原核表达

为了研究 DaTRI2 的催化功能, 对 *DaTRI2* 基因进行了大肠杆菌原核重组表达, 结果如图5。含 150 mmol·L⁻¹ 咪唑的洗脱液能有效地洗脱下重组 DaTRI2 酶蛋白, 在 SDS-PAGE 胶上, 重组蛋白分子质量接近 29.6 kD, 与预测一致。纯化的 DaTRI2 经透析除盐后用于酶活性测定。

4 DaTRI2 重组蛋白酶动力参数测定

4.1 最适 pH 值测定 用不同 pH 值的缓冲液测定 DaTRI2 的最适 pH 值, 结果见图6。DaTRI2 在体外可以催化可逆的氧化还原反应, 还原反应可以将托品酮

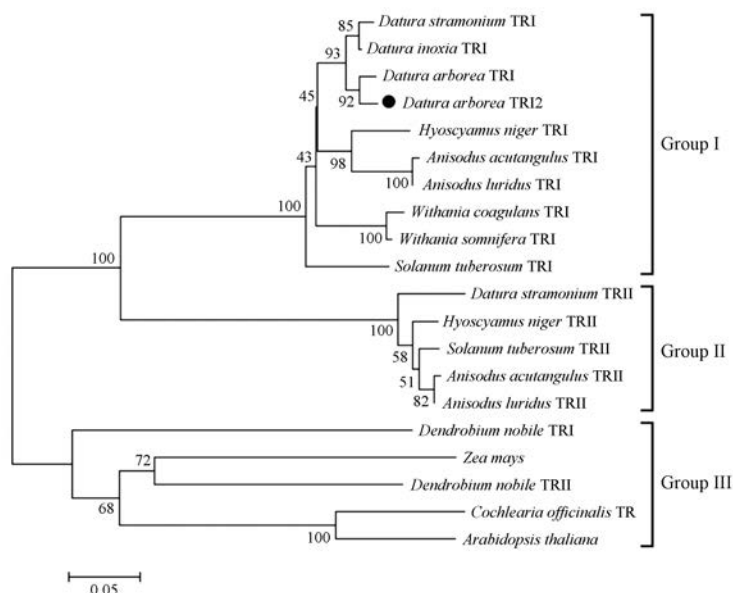


Figure 4 Phylogenetic relationship of DaTRI2 with other plant TRs. DaTRI2 was indicated with a black circle. The tree was constructed with maximum likelihood method in MEGA5.0

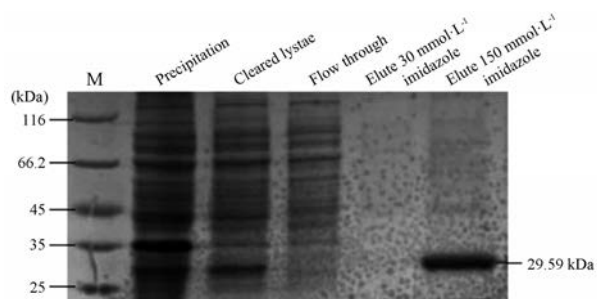


Figure 5 SDS-PAGE analysis of affinity purified His-tagged recombinant DaTRI2

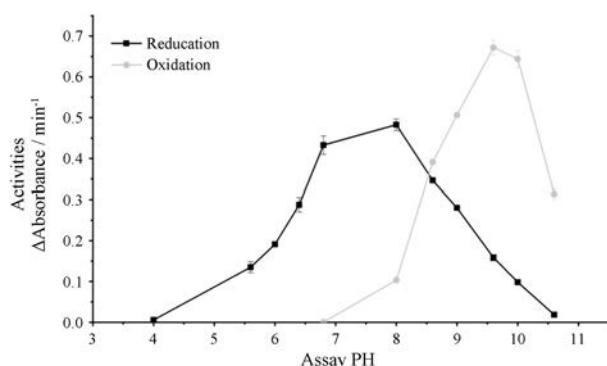


Figure 6 Effect of pH on catalytic activity of DaTRI2 for both reduction and oxidation reaction of tropinone and tropine, respectively

还原为托品, 为 TAs 的合成提供前体, 氧化反应则将托品氧化为托品酮, 导致底物积累。对还原反应来说, DaTRI2 在酸性和碱性范围内 (pH 4.0~pH 10.6) 均有催化活性, 其最适 pH 值为 8.0, 而氧化反应只在中性和碱性条件下才能发生, 且最适 pH 值为 9.6。在各自最适 pH 值下, 氧化活性要显著高于还原活性。

4.2 酶动力参数测定 本研究分别测定了 pH 6.4 (细胞生理条件) 和 pH 9.6 两个 pH 条件下 DaTRI2 的还原反应和氧化反应酶动力参数 (表 2)。酶的氧化反应无论在底物亲和性 (K_m 值越小, 亲和性越高)、最大反应速度 (V_{max}) 和催化常数 (K_{cat}) 上, 都要高于还原反应。在碱性条件下, DaTRI2 对底物的 K_m 值为 $188 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而偏酸条件下, K_m 值为 $210 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DaTRI2 对托品的亲和性略高于托品酮, 但是对托品的反应速度 (V_{max} 值为 114) 却显著高于托品酮 (V_{max} 值为 69.6)。综合来看, DaTRI2 对托品有很高的氧化反应催

化效率 (K_{cat}/K_m 值为 17 819), 而对托品酮的还原反应催化效率要低 45%, K_{cat}/K_m 值仅为 9 714。体外的酶活力测定表明 DaTRI2 是一个有功能的托品酮还原酶, 但其在体内的实际催化方向还要依赖于具体的生理 pH 条件。

5 *DaTRI2* 基因组织表达谱分析

采用实时荧光定量 PCR 技术 (qPCR), *18S* 和 *PGK* 双基因作为内参, 检测 *DaTRI2* 基因在木本曼陀罗不同组织部位的表达量: 在转录水平上, *DaTRI2* 在幼叶中表达量最高, 在须根中其次, 约为幼叶的 50%, 主根、幼茎和成熟叶中表达量微弱, 而在成熟茎中几乎检测不到表达 (图 7)。

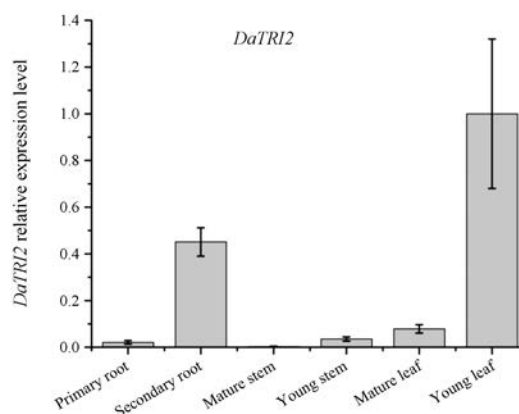


Figure 7 Real time PCR based comparative of the expression of *DaTRI2* gene in different tissues of *D. arborea*

讨论

利用植物代谢工程技术是实现植物中价值次生代谢产物大量获取的最有潜力的方法, 通过对代谢途径的遗传改造或调控机制的遗传修饰, 已经实现了对青蒿^[15]、长春花^[16]、三七^[17]、丹参^[18]和颠茄^[19]等药用植物中目标代谢产物含量的有效提高, 展现出诱人的前景。托品酮还原酶 I (*TRI*) 是 TAs 代谢工程中的有效的靶标基因: 在颠茄植株中超表达曼陀罗的 *TRI* 基因, 莨菪碱含量提高了 3 倍, 东莨菪碱含量提高了 5 倍^[20]; 三分三发根中超表达内源 *TRI* 基因, 使莨菪碱和东莨菪碱含量分别提高了 1.87 倍和 8 倍^[8]; 最新报道在藏药铃铛子发根中超表达弱活性的内源 *TRI* 基因, 分别也使莨菪碱和东莨菪碱含量达到了对照的 2.9 倍和 3.2 倍^[12]。上述研究中, 不同来源的 *TRI* 具有不同的催化

Table 2 Kinetic parameters of DaTRI2 and DaTRI catalyzed reaction

Enzyme	Substrate	pH Assay	$V_{max}/\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	$K_m/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	K_{cat}/s^{-1}	$K_{cat}/K_m/\text{s}^{-1}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$
DaTRI2	Tropinone	6.4	69.6 ± 1.2	210.05 ± 7.54	2.04 ± 0.35	9 714
	Tropine	9.6	114 ± 3.6	188.03 ± 1.84	3.35 ± 0.11	17 819
DaTRI ^[11]	Tropinone	6.4	88.30 ± 1.81	2.65 ± 0.19	2.93 ± 0.06	1 106
	Tropine	9.6	171.62 ± 5.42	560 ± 0.04	5.69 ± 0.18	10 161

效率, 导致对 TAs 提高的幅度有明显差异, 这一点在以 *H6H* 为靶标基因的 TAs 代谢工程中体现的尤为明显。东莨菪碱是比莨菪碱药用价值和市场需求更高的原料药, *H6H* 可以催化莨菪碱转化为东莨菪碱, 在颠茄发根中超表达内源的 *PMT* (另一靶标基因) 和 *H6H* 基因, 虽然东莨菪碱含量提高了 8 倍, 但底物莨菪碱仍有大部分残留^[21], 而在颠茄植株中超表达更高活性的烟草 *PMT* 和莨菪 *H6H* 基因, 叶中几乎全是东莨菪碱^[9]。因此, 优秀靶标基因的筛选是植物代谢工程成功的关键, 获取高催化效率的 *TRI* 基因对 TAs 代谢工程具有十分重要的意义。

传统的 *TRI* 基因来源于各种草本 TAs 资源植物, 而木本资源植物来源的 *TRI* 还没有研究。本实验室近期从木本曼陀罗根中克隆到一条 *DaTRI* 基因, 重组蛋白酶活性表明 *DaTRI* 比 *DsTRI* 具有更高的底物亲和性, 其催化效率是 *DsTRI* 的 2 倍^[11]。本研究进一步发掘木本曼陀罗的功能基因, 又分离到一条新的 *TRI* 序列, 命名为 *DaTRI2*。 *DaTRI2* 具备功能性 *TRI* 所要求的所有保守基序和位点, 包括两个底物结合中心和四连体催化残基; 在序列上与曼陀罗属的 *TRI* 高度一致; 预测的 *DaTRI2* 三级结构也具备结合底物的“口袋”结构和保守氨基酸残基。这些结果均强烈暗示 *DaTRI2* 编码一个有功能的 *TRI* 酶蛋白。

为进一步验证 *DaTRI2* 的酶催化功能并研究其活性的强弱, 通过大肠杆菌重组表达和亲和层析, 成功获得了纯化的重组 *DaTRI2* 蛋白。 *DaTRI2* 能催化可逆的托品酮还原反应和托品氧化反应。还原反应的最适 pH 值为 8.0, 这和已报道的草本 *TRIs* 最适 pH 偏酸性不一致 (莨菪 *HnTRI*、曼陀罗 *DsTRI* 和醉茄 *WsTRI* 的最适 pH 值分别为 6.1、6.4 和 6.7)^[11], 但却和 *DaTRI* 和辣根菜 *CoTRI* 的相同^[22], 表明不同科属、木本和草本的 *TRI* 间存在一定差异。 *DaTRI2* 在碱性条件下能够反向催化托品氧化为托品酮, 最适 pH 值为 9.6, 与 *DsTRI* 的最适 pH=9.9 接近。细胞质是偏酸性的环境, *TRI* 在细胞质中参与代谢且 *DsTRI* 和 *DaTRI* 均是在 pH=6.4 进行酶动力学参数测定, 为便于比较, 本研究也选择 pH=6.4 作为测定条件。 *DaTRI2* 比 *DaTRI* 对托品酮具有更高的亲和力 (K_m 值分别为 $0.210 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 但最大反应速度要稍低 (V_{\max} 分别为 69.6 和 88.3), 综合来看, *DaTRI2* 的体外催化效率是 *DaTRI* 的 8.8 倍, 而 *DaTRI* 的已报道催化活性要高于 *DsTRI*, 所以 *DaTRI2* 是一个更高效的托品酮还原酶蛋白。尽管在氧化反应的最适 pH=9.6 下, *DaTRI2* 对托品的亲和性和催化效率要高于还原反应, 但在细胞质的生理酸性条件下, 氧化反应不大可能发生, 还原托品酮生成

托品才是 *DaTRI2* 的催化方向。

在草本的资源植物中, TAs 一般在植物的须根中合成, 包括 *TRI* 在内的 TAs 合成途径基因均特异性地在须根中表达^[6,7,12]。从木本曼陀罗中克隆的第一条 *DaTRI* 虽然在须根中表达量最高, 但是在植株其他部位均有不同程度的组成性表达^[11], 本研究中 *DaTRI2* 却呈现不同的表达模式, 在幼叶中表达量最高, 须根中其次, 表明在木本曼陀罗中须根并不是 TAs 合成的唯一部位。有趣的是, *DaTRI2* 的表达模式与本曼陀罗中另一个合成途径基因 *DaH6H* 的表达模式非常相似。 *H6H* 位于 *TRI* 下游, 直接催化东莨菪碱的合成。在草本资源植物中, *H6H* 也是在须根中特异性表达, 而近期报道的 *DaH6H* 却主要在叶中表达, 须根中其次^[14], 新近报道的澳洲茄属植物 *Duboisia myoporoides* 的 *DmH6H* 基因也在叶中表达量最丰富^[23]。这两个基因相似的组织表达模式正好相互印证: TAs 在木本曼陀罗中的合成可能是多部位的, 其中最主要的是须根和叶。

根据已有信息来看, *DaTRI2* 可能是 *DaTRI* 的等位基因, 两者序列相似性极高, 但组织表达存在较大差异。在药用植物青蒿中, 青蒿素合成途径下游基因 *cyp71av1*^[24] 和参与调控的转录因子 *AaWRKY1* 也存在等位基因^[25] 的报道, 这主要是因为栽培青蒿有不同的品种或生态型。木本曼陀罗也存在白花、黄花和红花等不同的品种, 其是否还存在其他活性不同的 TAs 合成途径基因的等位基因, 还有待后续的研究。

本研究首次在 TAs 资源植物中克隆到了一条高活性的 *TRI* 等位基因 *DaTRI2*, 重组酶动力学测定表明其相比已报道的 *DaTRI* 和 *DsTRI* 具有更高的催化效率, 结合其下游 *DaH6H* 基因的组织表达谱, *DaTRI2* 在幼叶中的高水平表达暗示 TAs 在木本曼陀罗中的合成不同于草本资源植物, 叶也是重要的 TAs 合成部位。 *DaTRI2* 的克隆为研究木本植物中 TAs 的生物合成机制奠定了基础, 同时也提供了新的强有效靶标基因。

References

- [1] Wang X, Chen M, Yang C, et al. Enhancing the scopolamine production in transgenic plants of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes [J]. *Physiol Plant*, 2011, 143: 309-315.
- [2] Zárate R, Hermosin B, Cantos M, et al. Tropane alkaloid distribution in *Atropa baetica*. plants [J]. *J Chem Ecol*, 1997, 23: 2059-2066.
- [3] Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T. Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle [J].

- Plant Cell Physiol, 1999, 40: 289-297.
- [4] Suzuki K, Yun DJ, Chen XY, et al. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 β -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers [J]. Plant Mol Biol, 1999, 40: 141-152.
- [5] Dräger B. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 327-337.
- [6] Nakajima K, Hashimoto T, Yamada Y. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90: 9591-9595.
- [7] Nakajima K, Oshita Y, Yamada Y, et al. Insight into the molecular evolution of two tropinone reductases [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63: 1819-1822.
- [8] Kai G, Li L, Jiang Y, et al. Molecular cloning and characterization of two tropinone reductases in *Anisodus acutangulus* and enhancement of tropane alkaloid production in AaTRI-transformed hairy roots [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2011, 54: 177-186.
- [9] Kushwaha AK, Sangwan NS, Tripathi S, et al. Molecular cloning and catalytic characterization of a recombinant tropine biosynthetic tropinone reductase from *Withania coagulans* leaf [J]. Gene, 2013, 516: 238-247.
- [10] Kushwaha AK, Sangwan NS, Trivedi PK, et al. Tropine forming tropinone reductase gene from *Withania somnifera* (Ashwagandha): biochemical characteristics of the recombinant enzyme and novel physiological overtones of tissue-wide gene expression patterns [J]. PLoS One, 2013, 8: e74777.
- [11] Qiang W, Xia K, Zhang Q, et al. Functional characterisation of a tropine-forming reductase gene from *Brugmansia arborea*, a woody plant species producing tropane alkaloids [J]. Photochemistry, 2016, 127: 12-22.
- [12] Zhao K, Zeng J, Zhao T, et al. Enhancing tropane alkaloid production based on the functional identification of tropine-forming reductase in *Scopolia lurida*, a Tibetan medicinal plant [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1745.
- [13] Qiang W, Wang YX, Zhang QZ, et al. Expression pattern of genes involved in tropane alkaloids biosynthesis and tropane alkaloids accumulation in *Atropa belladonna* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 52-58.
- [14] Qiang W, Hou YL, Li X, et al. Cloning and expression of the key enzyme hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene (*DaH6H*) in scopolamine biosynthesis of *Datura arborea* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 1346-1355.
- [15] Zhang F, Xiang L, Yu Q, et al. Artemisinin biosynthesis promoting kinase 1 positively regulates artemisinin biosynthesis through phosphorylating AabZIP1 [J]. J Exp Bot, 2018, 69: 1109-1123.
- [16] Verma P, Mathur AK, Khan SA, et al. Transgenic studies for modulating terpenoid indole alkaloids pathway in *Catharanthus roseus*: present status and future options [J]. Phytochem Rev, 2017, 16: 19-54.
- [17] Deng B, Zhang P, Ge F, et al. Enhancement of triterpenoid saponins biosynthesis in *Panax notoginseng* cells by co-overexpressions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and squalene synthase genes [J]. Biochem Eng J, 2017, 122: 38-46.
- [18] Shi M, Luo XQ, Ju GH, et al. Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 2523-2530.
- [19] Xia K, Liu X, Zhang Q, et al. Promoting scopolamine biosynthesis in transgenic *Atropa belladonna* plants with *pmt* and *h6h* overexpression under field conditions [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 106: 46-53.
- [20] Richter U, Rothe G, Fabian AK, et al. Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures [J]. J Exp Bot, 2005, 56: 645-652.
- [21] Long SP, Lu Y, Wang YX, et al. Enhancement of tropane alkaloids production in transgenic hair roots of *Atropa belladonna* by overexpressing endogenous genes *AbPMT* and *AbH6H* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 243-249.
- [22] Brock A, Brandt W, Dräger B. The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction [J]. Plant J, 2008, 54: 388-401.
- [23] Kohnen KL, Sezgin S, Spitteller M, et al. Localization and organization of scopolamine biosynthesis in *Duboisia myoporoides* R. Br. [J]. Plant Cell Physiol, 2017, 59: 107-118.
- [24] Wang H, Han J, Kanagarajan S, et al. Trichome-specific expression of the amorpha-4,11-diene 12-hydroxylase (*cyp71av1*) gene, encoding a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, as reported by a promoter-GUS fusion [J]. Plant Mol Biol, 2013, 81: 119-138.
- [25] Han J, Wang H, Lundgren A, et al. Effects of overexpression of *AaWRKY1* on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. Phytochemistry, 2014, 102: 89-96.