

天仙子中参与托品烷生物碱生物合成的 *ArAT* 基因的克隆及功能鉴定

李笑^{1,2}, 强玮^{1,2}, 邱飞^{1,2}, 陈敏³, 兰小中⁴, 廖志华^{1,2}, 刘小强^{1,2*}

(1. 西南大学生命科学学院, 三峡库区教育部生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学-西藏农牧学院药用植物联合研发中心, 重庆 400715; 3. 西南大学药学院, 重庆 400715; 4. 西藏大学农牧学院, 西藏 850000)

摘要: 托品烷类生物碱是临床上广泛应用的抗胆碱药物, 其生物合成涉及到苯丙氨酸的转氨基反应。根据天仙子 (*Hyoscyamus niger*) 侧根和叶的转录组数据, 筛选到 3 条功能注释为芳香族氨基酸氨基转移酶的基因, 命名为 *HnArAT1*、*HnArAT2* 和 *HnArAT3*。通过序列同源性分析, 发现 *HnArAT3* 与颠茄的 *AbArAT4* 的氨基酸序列同源性最高, 两者为直系同源。组织表达谱显示, *HnArAT3* 基因在根中特异性表达, 与其他 3 个合成途径基因 (*PMT*、*TRI* 和 *H6H*) 表达模式相同。用病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 方法在天仙子植株中鉴定 *HnArAT3* 的功能, 对感染了病毒的植株, 用实时荧光定量 PCR 检测基因的表达量, HPLC 法测定托品烷类生物碱的含量。结果表明, 在 pTRV2-*HnArAT3* 干扰的植株中, *HnArAT3* 基因的表达量有显著下降, 3 种托品烷类生物碱莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱含量也有显著的降低。以上结果表明 *HnArAT3* 是天仙子中参与托品烷类生物碱生物合成的苯乳酸支路途径基因。*HnArAT3* 基因的克隆为进一步研究托品烷类生物碱的生物合成和代谢调控奠定了基础, 也为开展托品烷类生物碱的代谢工程研究提供了新的候选靶基因。

关键词: 天仙子; 芳香族氨基酸氨基转移酶; 病毒诱导的基因沉默; 托品烷类生物碱

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0172-08

Cloning and characterization of an aromatic amino acid aminotransferase (*ArAT*) gene involved in tropane alkaloid biosynthesis from *Hyoscyamus niger*

LI Xiao^{1,2}, QIANG Wei^{1,2}, QIU Fei^{1,2}, CHEN Min³, LAN Xiao-zhong⁴, LIAO Zhi-hua^{1,2},
LIU Xiao-qiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education of PRC, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. SWU-TAAHC Medicinal Plant Joint R&D Centre, Chongqing 400715, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 4. Agricultural and Husbandry College, Tibet University, Tibet 850000, China)

Abstract: Tropane alkaloids are anticholinergic drugs widely used clinically. Biosynthesis of tropane alkaloids in planta involves a step of transamination of phenylalanine. Based on the sequenced transcriptomes of lateral roots and leaves of *Hyoscyamus niger*, we found three annotated aromatic amino acid aminotransferases, which were respectively named *HnArAT1*, *HnArAT2* and *HnArAT3*. Sequence analysis showed that *HnArAT3* had highest similarity with the reported *Atropa belladonna* *AbArAT4*, which was involved in tropane alkaloid (TA) to provide the precursor of the phenyllactic acid moiety. Tissue expression pattern analysis indicated that *HnArAT3* was specifically expressed in lateral roots, where is the organ synthesizing tropane alkaloids. Then,

收稿日期: 2016-06-21; 修回日期: 2016-08-04.

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2011AA100605); 国家自然科学基金资助项目 (31370333); 教育部新世纪优秀人才计划资助项目 (NCET-12-0930); 中央高校基本科研业务费专项资助项目 (XDJK2013A024); 中央高校基本业务费专项资助项目 (XDJK2014C064).

*通讯作者 Tel/Fax: 86-23-68367146, E-mail: liuxq@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0601

method of virus induced gene silencing (VIGS) was used to characterize the function of HnArAT3 in *H. niger*. Gene expression analysis given by real-time quantitative PCR showed that all the transgenic lines had lower expression levels of *HnArAT3* than the non-transgenic control, and HPLC analysis of alkaloids demonstrated significant decrease in the contents of hyoscyamine, anisodamine and scopolamine in planta. These results suggested that HnArAT3 was involved in the phenyllactic acid branch of TA biosynthetic pathway. Molecular cloning and functional identification of HnArAT3 laid the foundation for further understanding of TA biosynthesis and metabolic regulation, and also provided a new candidate gene for engineering biosynthetic pathway of tropane alkaloids.

Key words: *Hyoscyamus niger*; aromatic amino acid aminotransferase; virus induced gene silencing; tropane alkaloids

托品烷类生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 包括莨菪碱 (hyoscyamine)、山莨菪碱 (anisodamine) 和东莨菪碱 (scopolamine), 是一类在茄科植物中合成的次生代谢产物^[1]。TAs 作为抗胆碱药物作用于副交感神经, 其中莨菪碱及其衍生物已普遍用于临床, 如治疗因平滑肌痉挛引起的各种内脏绞痛、全麻的术前给药以及治疗帕金森、抗休克、解有机磷中毒等^[2]。TAs 在植物侧根中合成并储存, 也可以转运到植物地上部位储存。由于 TAs 的化学合成复杂且昂贵, 因此目前尚未实现商业化生产, 而主要依赖于从少数茄科植物中提取, 如天仙子 (*Hyoscyamus niger*)、颠茄 (*Atropa belladonna*) 和曼陀罗 (*Datura stramonium*) 等。因此, 研究 TAs 生物合成途径上的相关基因, 进而采用次生代谢工程提高植物中 TAs 的含量具有重要意义。近些年来, 通过分子生物学手段克隆并鉴定了 TAs 合成途径的一系列相关基因, 如 *N*-甲基腐胺

转移酶 (putrescine *N*-methyltransferase)^[3]、托品酮还原酶 I (tropinone reductase I, TRI)^[4]和莨菪碱-6 β -羟化酶 (hyoscyamine-6 β -hydroxylase, H6H)^[5]。但总体而言, TAs 生物合成途径仍未完全解析, 比如部分关键步骤包括苯乳酸支路途径仍有待研究。由苯丙氨酸经过苯丙酮酸到苯乳酸的支路途径从理论上推测仅需转氨和还原两步反应 (图 1), 但是相关的酶和基因有待鉴定和克隆。

氨基转移酶 (aminotransferases) 催化氨基酸与其相应的酮酸之间的可逆反应, 其中氨基酸作为氨基的供体, 而酮酸则作为氨基的受体。氨基转移酶在生物体内参与众多代谢途径, 包括氨基酸的合成与分解、维生素的合成、碳氮代谢、次生代谢、糖质新生等^[6]。放射性前体饲喂实验表明苯丙酮酸是 TAs 的合成前体, 其来源于苯丙氨酸的转氨反应^[7]。植物中存在一类芳香族氨基酸氨基转移酶 (aromatic amino

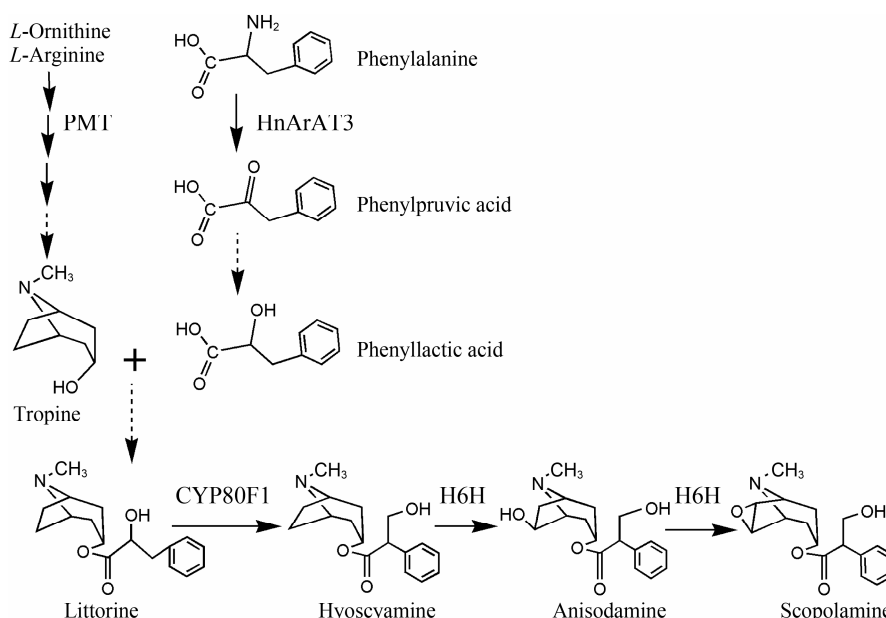


Figure 1 The biosynthetic pathway of TAs in *Solanaceae* plants. Dashed arrows indicate unknown or unidentified reactions or reaction of multiple steps

acid aminotransferase, ArAT), 非特异性地催化苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 3 种芳香族氨基酸的转氨过程。2014 年, Bedewitz 等^[8]首次通过分析颠茄各组织转录组数据库, 采用病毒诱导的基因沉默技术 (virus-induced gene silencing, VIGS), 克隆并鉴定了参与 TAs 生物合成的 *AbArAT4* 基因, 该基因编码的蛋白能够优先以苯丙氨酸为底物, 通过转氨反应生成苯丙酮酸。目前在其他 TAs 资源植物中还未见该基因的报道。

本实验室已完成天仙子侧根和叶片组织的转录组测序, 通过对转录组数据分析, 筛选到 3 条功能注释为 *ArAT* 的基因。在本研究中拟采用生物信息学、数字表达谱分析等方法锁定在天仙子中可能参与 TAs 生物合成的 *ArAT* 基因并对其进行功能验证, 为进一步阐明 TAs 生物合成过程和开展代谢工程研究奠定基础。

材料与方法

材料 天仙子种子由兰小中教授采集鉴定, 天仙子实生苗由本实验培养。采用种子直接萌发, 培养基质为蛭石、PINDSTRUP 营养土、珍珠岩 (比例为 6:3:1); 光周期为 16 h; 温度为 24 °C。待植株长至 5~6 厘米, 出现 2 片完全展开真叶, 即可开展 VIGS 试验。

RNA 的提取与 cDNA 的合成 取适量天仙子植株的根和叶在液氮中研磨, 按照 RNA simple Total RNA Kit 说明书提取总 RNA, 电泳检测 RNA 的完整性, 同时使用 Nanodrop 2000 测定 A_{260}/A_{280} 的比值分析 RNA 的浓度和纯度, 并反转成 cDNA, 用于基因克隆。

天仙子转录组数据分析 根据本实验室前期完成的天仙子侧根和叶片 2 种组织的转录组测序数据 (未发表), 利用 BioEdit 软件进行本地 BLAST 分析, 筛选 *HnArATs* 的 UniGene 进行序列分析, 同时对 *HnArATs* 基因的数字表达谱进行分析。

生物信息学分析 使用 Vector NTI Suite8.0 软件进行序列比对分析、ORF 的查找及核苷酸的翻译、氨基酸序列多重比对; 用 MEGA4.1 构建进化树, 重复次数为 1 000 次。

***HnArAT3* 基因编码区的扩增** 根据 EST 序列, 设计 1 对简并引物 HnArAT3-F: 5'-CCGGGATCCCCA CTACTTCCATATTCTCTCA-3' 和 HnArAT3-R: 5'-CCGGAGCTCCTTGCATTTTCATGCTCGTC-3', 以天仙子根的 cDNA 为模板进行开放阅读框的序列扩增。

基因表达量检测 使用 iScript™ cDNA Synthesis

Kit 试剂盒将天仙子根和叶的 RNA 进行反转录, 得到的 cDNA 做为荧光定量 PCR 检测模板, 以 18S rRNA 作为内参检测各基因的表达式。所用引物见表 1。

Table 1 Primers designed for real-time PCR detection

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Fq <i>HnArAT3</i>	5'-CCTCTGCTTCTCTATTTTGCATTG-3'
Rq <i>HnArAT3</i>	5'-TTTGTTCATGATCATCCCTTCT-3'
Fq <i>PMT</i>	5'-CTACCTAGCAGCAGGATTTCG-3'
Rq <i>PMT</i>	5'-GGTCAGAAGAGTCCACAATAATG-3'
Fq <i>TRI</i>	5'-AGGACAACATTCGGGTCAATTCAG-3'
Rq <i>TRI</i>	5'-AGCAGCAGGGAAGCAAAGAAAG-3'
Fq <i>H6H</i>	5'-GCCAGACCCAAGTTCAAC-3'
Rq <i>H6H</i>	5'-CAGCAATCCAGGTAGCATCC-3'

病毒诱导的基因沉默 本研究所用 VIGS 法参照 Li 等^[9]的方法, 略有修改。根据 EST 序列, 设计引物 HnArAT3TRV-F: 5'-CCGCTCGAGGGAGCAATGTTT CTCATGGT-3' 和 HnArAT3TRV-R: 5'-CCG GAATCC TTGCATTTTCATGCTCGTC-3', 克隆 *HnArAT3* 带有部分编码框区 237 bp 及 3'非编码区的 152 bp 特异片段, 将片段直接连接到 pTRV2 载体, 命名为 pTRV2-HnArAT3, 经测序验证后用于后续实验。将 pTRV1、pTRV2、pTRV2-HnPDS 和 pTRV2-HnArAT3 分别转化农杆菌 GV3101, 48 h 后将单菌落挑于 1 mL YEP 培养基+50 mg·L⁻¹ 利福平 (rifampicin, Rif) +50 mg·L⁻¹ 卡那霉素 (kanamycin, Kan) +10 mg·L⁻¹ 硫酸庆大霉素 (gentamycin sulfate, Gen) 28 °C 过夜活化, PCR 检测相应工程菌。将 1 mL 菌液接种到 10 mL (Kan+Rif+Gen) YEP 液体培养基中, 28 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养过夜, 次日将活化菌液室温 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 用缓冲液 [10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、10 mmol·L⁻¹ 2-(N-吗啉)乙磺酸-水合物、20 μmol·L⁻¹ AS(乙酰丁香酮)] 重悬菌体至 $A_{600}=1.0$, 室温静止 3~5 h, 注射前将 pTRV1 分别与所有 pTRV2 重组载体的农杆菌按 1:1 混合, 用去针头的注射器从幼嫩叶片的背面注射, 使菌液充满整个叶片。将注射后的植株放在 22 °C 暗培养 48 h 后正常培养, 15 天后取侵染植株的根进行基因表达式分析; 45 天后取侵染植株进行生物碱分析。

生物碱提取与 HPLC 检测 天仙子植株生物碱的提取及检测参照本实验室发表的方法^[10, 11]。莨菪碱、山莨菪碱及东莨菪碱的标品均购自 Sigma 公司, HPLC 检测使用岛津高效液相色谱仪 (泵: LC-20AD, 柱温箱: CTO-20A, 自动进样器: STL-20A, 检测器:

SPD-M20A), Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。

结果

1 *HnArATs* 基因序列分析

根据转录组测序数据的功能注释, 筛选到 3 条注释为“芳香族氨基酸转移酶 (ArAT)”的 UniGene 序列, 分别命名为 *HnArAT1*、*HnArAT2* 和 *HnArAT3*。*HnArAT1* UniGene 全长 2 642 bp, 包含一个 963 bp 的开放读码框, 编码 320 个氨基酸残基; *HnArAT2* UniGene 全长 1 493 bp, 包含一个 1 251 bp 的开放读码框, 编码 416 个氨基酸残基; *HnArAT3* UniGene 全长 1 571 bp, 包含一个 1 260 bp 的开放读码框, 编码 419 个氨基酸残基。

2 *HnArATs* 基因的数字表达谱分析

通过天仙子侧根和叶两个组织部位的转录组测序结果, 分析 *HnArAT1*、*HnArAT2* 和 *HnArAT3* 3 条基因的数字表达谱 (图 2)。*HnArAT1* 基因在根和叶中均有表达, 但根中表达量高于叶; *HnArAT2* 特异性在叶中表达; 而 *HnArAT3* 特异性在根中表达, 叶中表达量甚微, 其表达模式与 TAs 生物合成途径中其他合成途径基因 (*PMT*、*TRI* 和 *H6H*)^[12-15]一致, 暗示 *HnArAT3* 可能是参与托品烷生物碱合成的基因。

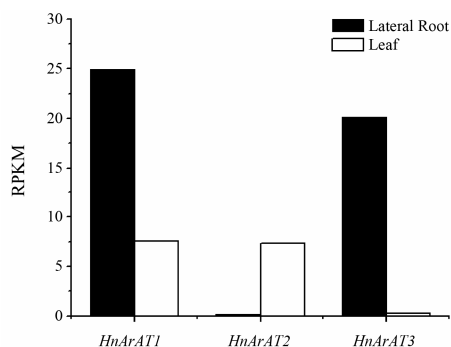


Figure 2 Digital expression patterns of *HnArATs* in lateral roots and leaf

3 *HnArATs* 基因编码蛋白的生物信息学分析

将推导的 *HnArAT1*、*HnArAT2* 和 *HnArAT3* 蛋白氨基酸序列与其他茄科植物、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和罂粟 (*Papaver somniferum*) 等物种中已经报道的 ArAT 家族蛋白序列一起用 neighbor-joining 方法构建系统进化树 (图 3), 进行亲缘关系分析。结果表明 *HnArAT3* 在分子进化上与 *AbArAT4* 的亲缘关系最近, 聚为同一支。*AbArAT4* 是目前 ArAT 家族中唯一的已被鉴定参与托品烷生物碱生物合成的酶,

这一结果强烈地暗示 *HnArAT3* 在天仙子中很可能行使相同的功能。因此, 本研究中对 *HnArAT3* 基因进行了分析和功能验证。

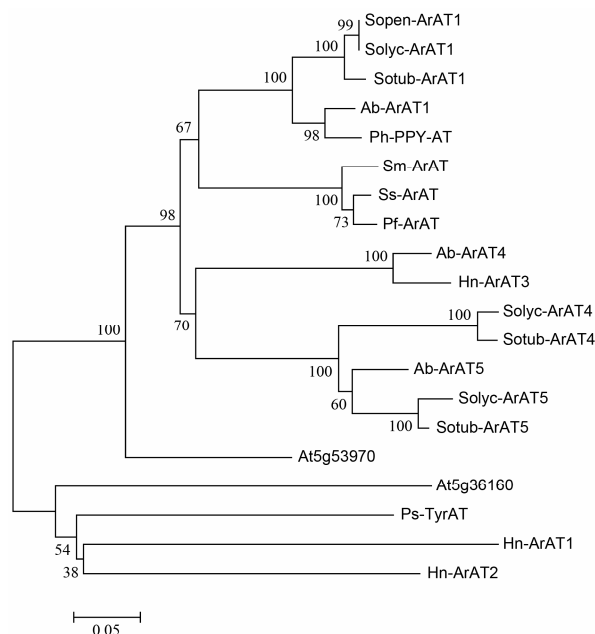


Figure 3 Phylogenetic analysis of plant ArATs by neighbor-joining method on MEGA 4.1. GenBank accession numbers are as follows: Sopen-ArAT1: *Solanum pennellii*, aromatic amino acid aminotransferase, ADZ24702; Solyc-ArAT1: *Solanum lycopersicum*, tyrosine aminotransferase, Solyc10g007110; Sotub-ArAT1: *Solanum tuberosum*, tyrosine aminotransferase, Sotub10g008150; Ab-ArAT1: *Atropa belladonna*, aromatic amino acid aminotransferase, KC954703; Ph-PPY-AT: *Petunia hybrida*, phenylpyruvate aminotransferase, AHA62827; Sm-ArAT: *Salvia miltiorrhiza*, tyrosine aminotransferase, ABC60050; Ss-ArAT: *Solenostemon scutellarioides*, tyrosine aminotransferase, CAD30341; Pf-ArAT: *Perilla frutescens*, tyrosine aminotransferase, ADO17550; Ab-ArAT4: *Atropa belladonna*, aromatic amino acid aminotransferase, KC954706; Hn-ArAT3: *Hyoscyamus niger*, aromatic amino acid aminotransferase, KX058486; Solyc-ArAT4: *Solanum lycopersicum*, tyrosine aminotransferase, Solyc12g096240; Sotub-ArAT4: *Solanum tuberosum*, tyrosine aminotransferase, Sotub12g028590; Ab-ArAT5: *Atropa belladonna*, aromatic amino acid aminotransferase, KC954707; Solyc-ArAT5: *Solanum lycopersicum*, tyrosine aminotransferase, Solyc12g088000; Sotub-ArAT5: *Solanum tuberosum*, tyrosine aminotransferase, Sotub12g026080; At5G53970: *Arabidopsis thaliana*, tyrosine aminotransferase, AT5G53970; At5G36150: *Arabidopsis thaliana*, tyrosine aminotransferase, AT5G36150; Ps-Tyr-AT: *Papaver somniferum*, tyrosine aminotransferase, GU370929. Hn-ArAT1: *Hyoscyamus niger*, tyrosine aminotransferase; Hn-ArAT2: *Hyoscyamus niger*, tyrosine aminotransferase

分析 *HnArAT3* UniGene 的假定 5'-UTR, 在预测的开放阅读框起始密码子 ATG 上游同一相位 105 bp 处, 存在一个终止密码子 TAA, 表明该 UniGene 序列包含一个完整的开放阅读框, 长 1 260 bp, 编码 419

个氨基酸。用高保真酶扩增该开放阅读框序列 (图 4), 测序结果与 Unigene 序列完全一致, 将该基因提交 NCBI, 获得 GenBank 登录号为 KX058486。BLASTp 分析结果表明, HnArAT3 蛋白序列与 AbArAT4 的序列一致性最高, 达到 90.7%, 与 At5g36160 及 At5g53970 的序列一致性分别为 51.5% 和 60.2%, 与罂粟的 Ps-TyrAT 序列一致性为 50%, 与矮牵牛 (*Petunia hybrida*) PH-PPY-AT 序列一致性为 62.4%。氨基酸多重序列比对结果表明 HnArAT3 与其他物种的 ArATs 一样, 在 249 位氨基酸残基处, 均存在保守的酪氨酸催化残基, 同时, 结合磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphate) 辅因子的另外 9 个氨基酸残基在相应的位置也都十分保守 (图 5)。以上结果表明 HnArAT3 很可能为

AbArAT4 的直系同源基因, 在天仙子中催化苯丙氨酸的转氨反应。

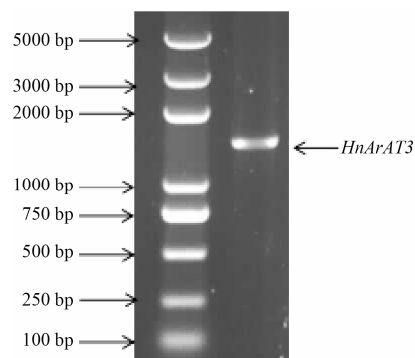


Figure 4 Cloning of the coding sequence of HnArAT3

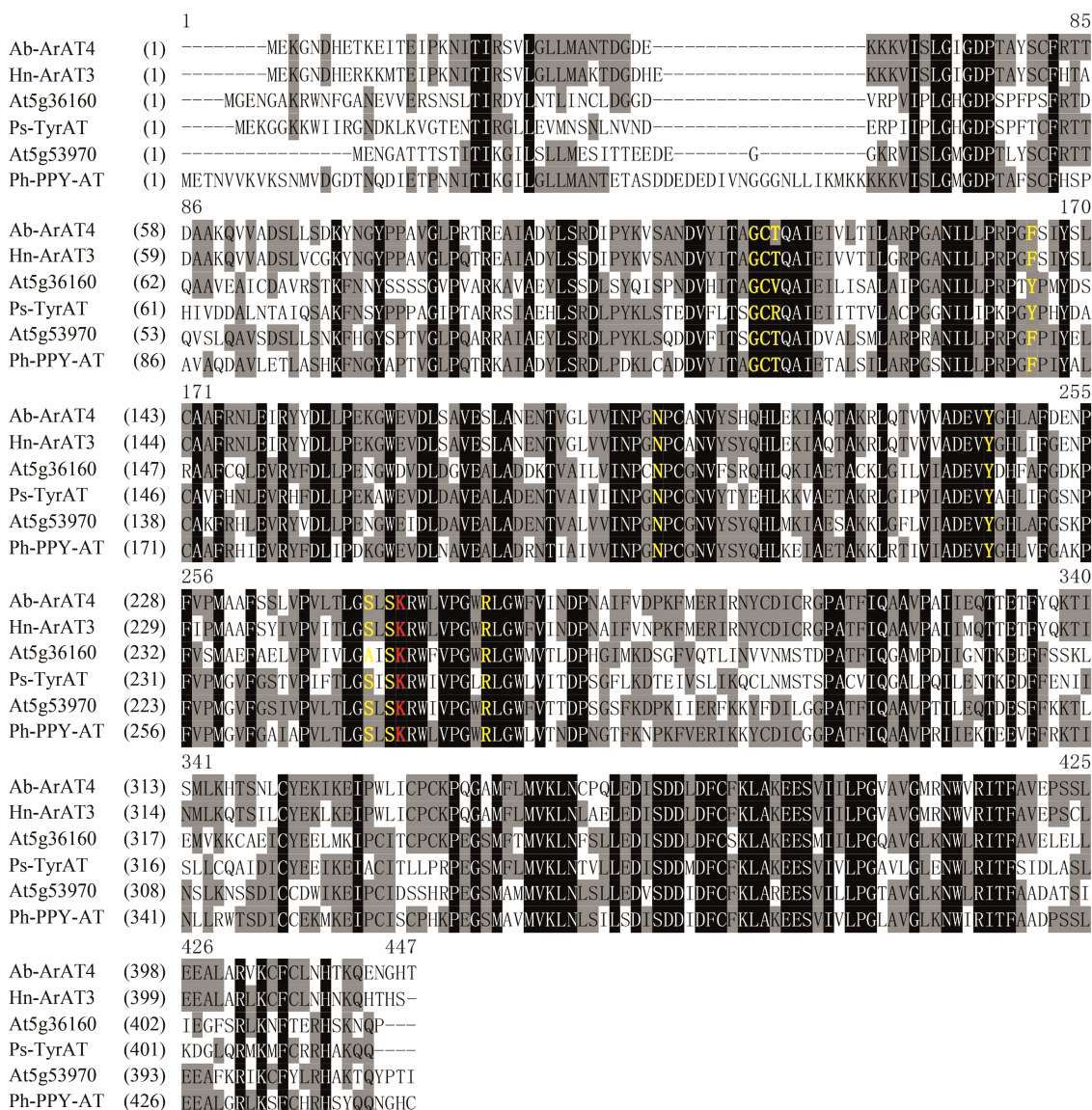


Figure 5 Multiple alignments of plant ArATs. The identical amino acids were showed in white with black background and the conserved amino acids were showed in black with gray background, the catalytic lysine is shown in red and conserved residues required for binding of the pyridoxal 5'-phosphate cofactor are shown in gold

4 TAs 途径基因的组织表达谱分析

利用荧光定量 PCR 检测 *HnArAT3* 基因在天仙子植株根和叶中的表达量, 同时也检测了另外 3 个 TAs 生物合成途径基因 *PMT*、*H6H* 和 *TRI* 相应的组织表达情况。结果见图 6, *PMT*、*H6H*、*TRI* 均在根中大量表达, *HnArAT3* 基因的表达模式与数字表达谱基本一致, 主要在根中表达, 在叶中表达较少, 与上述 3 个合成途径基因有相同的组织表达特异性。因此, *HnArAT3* 基因很可能参与了托品烷生物碱的合成。

5 *HnArAT3* 体内功能的鉴定

前期本实验室采用病毒诱导的基因沉默方法 (VIGS) 沉默了天仙子中的 *PDS* 基因, 观察到了明显的光漂白现象, 本研究采用此方法在天仙子植株中鉴定 *HnArAT3* 基因的功能。利用农杆菌注射的方法浸染天仙子, 侵染 15 天后, 实时荧光定量 PCR 检测侵染植株根的 *HnArAT3* 基因表达量, 发现相比注射空载体 pTRV2 的对照植株, pTRV2-*HnArAT3* 干扰植株中 *HnArAT3* 的基因表达量下降了 70%~80% (图 7), 表明目的基因已被成功沉默; 45 天后, 检测侵染植株中莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱的含量, 结果见图 8, 以 pTRV2 空载体侵染的植株作为对照, 在浸染 pTRV2-*HnArAT3* 的植株中几乎检测不到莨菪碱; 山莨菪碱含量降低了 55%; 东莨菪碱的含量极显著降

低, 只有对照的 21%, 说明通过 VIGS 沉默 *HnArAT3* 基因后, 天仙子植株中托品烷类物质合成受到抑制, 这些结果证实 *HnArAT3* 基因在天仙子中参与了 TAs 的生物合成。

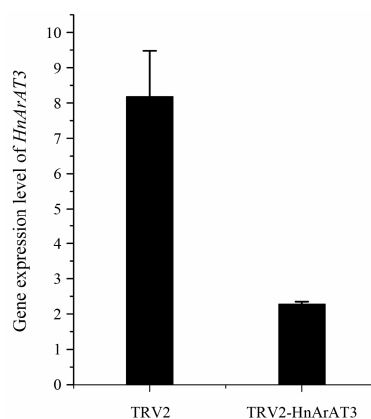


Figure 7 Expression of *HnArAT3* in the root of inoculation by qPCR analysis. Data are presented as the mean. $n=9$, $\bar{x} \pm s$

讨论

植物代谢产物生物合成分子生物学的研究是开展植物次生代谢工程的前提与基础。托品烷类生物碱生物合成途径经过 20 多年的研究, 部分限速步骤已经基本清楚, 通过生化和分子生物学手段也鉴定到

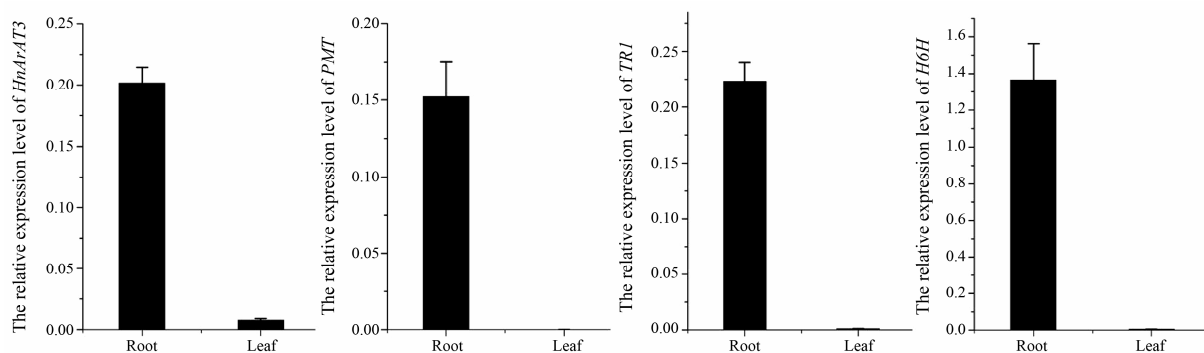


Figure 6 Expression profiles of *HnArAT3*, *PMT*, *TRI*, *H6H* in different tissues

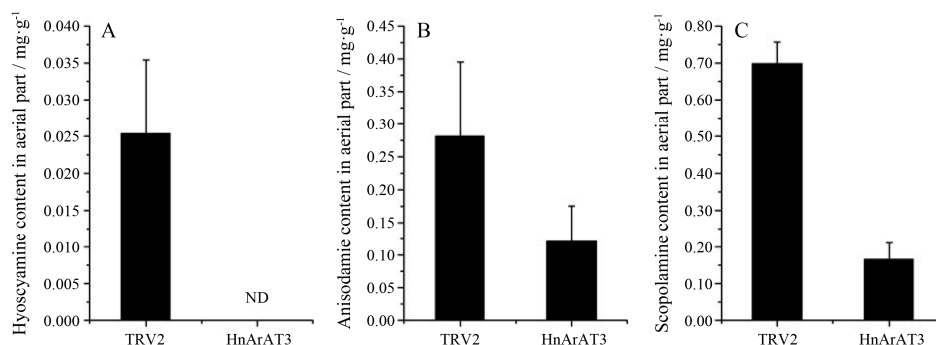


Figure 8 The contents of tropane alkaloids in the plants of silenced *HnArAT3*. A: Hyoscyamine; B: Anisodamine; C: Scopolamine; ND: Not detectable. Data are presented as the mean. $n=9$, $\bar{x} \pm s$

了相关限速酶基因并作为代谢工程靶点进行资源植物的遗传改造,取得了良好的效果。但是该途径仍然存在一些未知酶促反应步骤,限制了对其合成调控机制的研究和进一步代谢工程的应用,这些合成途径的盲点包括从苯丙氨酸到苯乳酸合成的支路途径、苯乳酸如何与托品缩合生成海螺碱以及海螺碱的分子重排中间体在未知的醇脱氢酶作用下生成莨菪碱。苯乳酸支路途径为托品烷类生物碱合成提供了托品酸骨架结构,曼陀罗发根的刺激子诱导实验表明苯乳酸支路途径与主流途径受到 MeJA 信号不同的调控^[16]。TAs 生物合成涉及到的转氨酶基因也仅在颠茄中有孤例报道^[8]。

基于转录组测序和合成途径基因组表达谱特征来发现和锁定未知的合成途径基因是一种行之有效的方法。在颠茄、曼陀罗和天仙子等植物中,托品烷类生物碱只在须根中合成,已鉴定的一些合成途径特异性的基因如 *PMT*、*CYP80F1* 和 *H6H* 等也都在须根中特异性地表达(颠茄 *H6H* 在花粉中也表达)。正是基于这种组织表达特异性, Bedewitz 等^[8]从筛选出的颠茄 6 条 *AbArAT* 基因中,首次鉴定到了须根特异性表达并且参与托品烷类生物碱生物合成的 *AbArAT4* 基因。本研究也是基于该方法,从天仙子转录组数据库中筛选出了 3 条 *HnArAT* 基因,数字表达谱分析发现只有 *HnArAT3* 在须根中特异性的表达,与天仙子中 *PMT*、*TRI* 和 *H6H* 基因的组织表达谱一致,经过进化树分析及多重氨基酸序列比对,*HnArAT3* 与 *AbArAT4* 的序列同源性最高,达到 90.1%;亲缘关系也最近,为直系同源基因;两者均均含有保守的赖氨酸活性位点和辅酶结合位点。这些结果提供了初步的证据表明 *HnArAT3* 可能参与了天仙子中托品烷类生物碱的合成。

VIGS 是一种广泛应用的研究新基因功能的反向遗传学技术,具有高通量、快捷和简便有效等特点。利用该技术最近已成功鉴定出 *CYP80F1* 和 *ArAT4* 这两个合成途径基因,进一步完善了托品烷类生物碱生物合成途径。在已有的研究中,前人用烟草脆裂病毒系统成功在黑莨菪 (*Hyoscyamus muticus*) 和颠茄中建立了 VIGS 体系^[8,9]。本研究也利用该系统和方法,以 PDS 为标志基因成功在天仙子中观察到了光漂白现象,漂白率达到 100% (数据未显示),表明天仙子对该病毒系统非常敏感,基于该系统的 VIGS 在天仙子中相当高效。构建了 VIGS 沉默载体 pTRV2-*HnArAT3*, 进行天仙子侵染实验,初步鉴定了 *HnArAT3* 在天仙子体内的功能。实时荧光定量 PCR

检测到 *HnArAT3* 基因的表达量下降了 70%~80%; HPLC 检测沉默效果,生物碱含量降低 50%~100%。这一结果明确表明 *HnArAT3* 是天仙子托品烷类生物碱生物合成的苯乳酸支路途径基因。

植物中通常存在多条芳香族氨基酸氨基转移酶,它们都能不同程度地以苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸作为氨基供体,主要以 α -酮戊二酸作为氨基受体,生成相应的酮酸和谷氨酸,但新近克隆的参与托品烷类生物碱合成的 *AbArAT4* 却几乎只以 4-HPP 为氨基受体,优先以苯丙氨酸为氨基供体,转氨生成相应的酪氨酸和苯丙酮酸,而苯丙酮酸是托品烷类生物碱的合成前体。最近分别从矮牵牛和甜瓜中发现两个芳香族氨基酸氨基转移酶 *Ph-PPY-AT*^[17]和 *Cm-ArAT1*^[18],它们都以酪氨酸和苯丙酮酸为底物,生成苯丙氨酸和 4-HPP。芳香族氨基酸氨基转移酶能催化可逆的反应,与 *AbArAT4* 不同的是,*Ph-PPY-AT* 优先催化苯丙氨酸和 4-HPP 的合成,其活性是相应反向反应的 2 倍;而 *AbArAT4* 优先催化苯丙酮酸和酪氨酸的合成,其活性是相应反向反应的 250 倍。这些结果表明,*AbArAT4* 是颠茄中特有的参与次生代谢物托品烷类生物碱合成的转氨酶,而 *Ph-PPY-AT* 和 *Cm-ArAT1* 等转氨酶可能只是在植物体芳香族氨基酸稳态中发挥作用。*HnArAT3* 是否具有和 *AbArAT4* 类似的酶活力特征还有待进一步研究。

本研究从天仙子中鉴定到了托品烷类生物碱生物合成支路途径的 *HnArAT3* 基因,为进一步研究托品烷类生物碱的生物合成和代谢调控奠定了基础,也为开展托品烷类生物碱代谢工程研究提供了新的候选靶基因。

References

- [1] Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2001, 52: 29–66.
- [2] Liu Y, Zhang JT, Yang J. Comparative study on the pharmacological effects of some *Scopolia* alkaloid derivatives [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, 22: 725–729.
- [3] 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.
- [4] 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 USA, 1993, 90: 9591–9595.
- [5] Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T, et al. Molecular cloning of hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger* [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 9460–9464.
- [6] Liepman AH, Olsen LJ. Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Crit Rev Plant Sci, 2004, 23: 73–89.
- [7] Robins RJ, Woolley JG, Ansarin M, et al. Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures [J]. Planta, 1994, 194: 86–94.
- [8] Bedewitz MA, Góngora-Castillo E, Uebler JB, et al. A root-expressed *L*-phenylalanine: 4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase is required for tropane alkaloid biosynthesis in *Atropa belladonna* [J]. Plant Cell, 2014, 26: 3745–3762.
- [9] Li R, Reed DW, Liu E, et al. Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement [J]. Chem Biol, 2006, 13: 513–520.
- [10] Xia K, Liu XQ, Zhang QZ, 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.
- [11] Wang XR, Chen M, Yang CX, 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.
- [12] Hashimoto T, Yukihito Y, Yamada Y. Putrescine and putrescine N-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus* [J]. Planta, 1989, 178: 123–130.
- [13] Nakajima K, Hashimoto T. Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40: 1099–1107.
- [14] Hashimoto T, Hayashi A, Amano Y, et al. Hyoscyamine-6-beta-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 4648–4653.
- [15] 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.
- [16] Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium* [J]. Phytochemistry, 1999, 50: 53–56.
- [17] Yoo H, Widhalm J R, Qian Y, et al. An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2833.
- [18] Gonda I, Bar E, Portnoy V, et al. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. [J]. J Exp Bot, 2010, 61: 1111–1123.