

DOI: 10.13376/j.cblls/2015150

文章编号: 1004-0374(2015)08-1091-04



黄三文, 研究员, 博士生导师。中国农业科学院蔬菜花卉研究所生物技术室主任, 中国农业科学院深圳农业基因组研究所副所长。研究领域包括植物基因组学、蔬菜分子生物学和分子育种研究, 主要致力于构建蔬菜全基因组设计育种的理论和方法体系, 打通“从基因组到新品种”的技术通路。共发表SCI论文 56 篇和学报级论文 40 余篇, 包括以通讯作者在 *Science*、*Nature*、*Nature Genetics* 和 *Plant Cell* 发表 6 篇重量级论文, 被引用 3 000 余次。曾获国家优秀留学生奖金、国家科技进步奖二等奖、十一五国家科技计划执行优秀团队奖、华耐园艺科技奖。2012 年获得国家杰出青年科学基金资助, 2013 年入选“百千万人才工程”国家级人选。

黄瓜苦味物质的代谢调控与合成生物学

尚 轶^{1,2}, 黄三文^{1,2*}

(1 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2 中国农业科学院深圳农业基因组研究所, 深圳 518124)

摘要: 苦味是影响蔬菜品质的不良性状。然而, 苦味物质对植物是“天然农药”, 可用以抵御虫害侵入; 对人类是消炎、保肝药, 同时还具有抗癌药物开发潜力。通过整合黄瓜基因组大数据及传统生物学研究手段, 共发现 11 个基因控制着黄瓜苦味形成。其中 9 个基因参与苦味合成, 2 个是调控苦味合成的“开关”基因。黄瓜苦味合成、调控及驯化分子机制的解析为综合利用及改良苦味物质创造了条件: (1) 通过精细调控叶片和果实中的苦味“开关”基因, 可培育叶苦果不苦的黄瓜, 既可利用苦味保护植物不受害虫侵害, 减少农药使用, 又可保障黄瓜优良的商品品质; (2) 利用合成生物学的方法体外大规模、快速合成和改良苦味物质, 为后期新型药物研发创造条件。

关键词: 黄瓜; 苦味; 代谢调控

中图分类号: Q493.9; S642.2 文献标志码: A

Bitterness metabolism in cucumber and synthetic biology

SHANG Yi^{1,2}, HUANG San-Wen^{1,2*}

(1 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2 Agricultural Genomic Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518124, China)

Abstract: Bitterness accumulated at edible tissues of vegetables would seriously affect their quality and marketability. However, the bitter compounds, cucurbitacins, help plants to wade off herbivores and are exploited by humans in form of traditional herbal medicines for their anti-inflammatory, hepatoprotective and potential anti-tumor properties. By integrating big genomic data of cucumber and multiple molecular research tools, 9-gene module (1 OSC, 7 P450s and 1 ACT) involved in the bitterness biosynthetic pathway and 2 bitterness regulators were unveiled. The discovery of bitterness biosynthesis, regulation and domestication in cucumber provides

收稿日期: 2015-03-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973项目”)(2012CB113900); 国家自然科学基金青年基金(31101550)

*通信作者: E-mail: huangsanwen@caas.cn

possibility to develop a new non-bitter cucumber by accurately tuning the bitterness biosynthesis in different plant tissues, which protect plants from herbivores with their own weapon systems but avoid the unpleasant bitter taste in the fruit. And this study also opens a door to metabolic engineering cucurbitacins as potential anti-tumor drugs.

Key words: cucumber; bitterness; metabolism

黄瓜源自喜马拉雅山脉南麓,是印度境内土生土长的植物。野生黄瓜植株比较矮小,果实呈球型且布满长长的果刺,再加上果实跟黄连一样非常苦,在印度一直被用作泻药^[1]。经过漫长的驯化过程,黄瓜植株和果实形态都发生了较大改变,最关键的是果实中不再积累苦味物质。不苦的黄瓜吃起来口感爽脆,果实中富含蛋白质和维生素,深受消费者喜爱,现已广泛种植于温带和热带地区。我国种植黄瓜的历史可追溯到西汉时期,《本草纲目》中记载黄瓜最早是由张骞(公元前164年~公元前114年)出使西域带回中原,这与现代黄瓜变异组研究得出的结论基本一致^[2]。目前黄瓜是我国第一大设施蔬菜作物,也是世界十大蔬菜之一。

1 黄瓜苦味物质是什么

由中草药变成可口的蔬菜,植物中发生了哪些变化而直接影响了它与人类的关系?要回答这个问题,首先需要知道黄瓜果实苦味是什么导致的。植物中有数以万计的大相对分子质量次生代谢化合物,它们在植物与外界环境相互作用过程中发挥非常重要的作用。其中萜类化合物是中草药中的一类比较重要的化合物,主要包含单萜、倍半萜、二萜和三萜等。黄瓜苦味正是由三萜化合物葫芦素C导致的^[3]。葫芦素是一类高度氧化的四环三萜化合物,仅在葫芦科植物中(黄瓜、西瓜和甜瓜等)被发现,如西瓜和甜瓜中分别富含葫芦素E和B^[4-5]。根据碳骨架氧化程度和氧化位置不同,葫芦素大致可分为葫芦素A~T^[6]。苦是这类化合物最显著的特点,因此,葫芦素也叫苦味素。极低量的葫芦素(0.1 mg/L)就能引起明显的苦味,比典型的苦味剂咖啡因还要苦100倍左右^[7]。

2 苦味与人类健康

对植物来说,极苦的葫芦素是最佳的防御武器,可用来抵御病虫害的侵入。葫芦素是保护植物的“绿色农药”,既是大部分广食性昆虫的防御剂,同时还是某些专食性昆虫的诱食剂,在葫芦科植物与昆虫互作、协同进化过程中发挥重要作用^[3,8-9]。而对人类而言,虽然苦味不受欢迎,但其巨大的药用潜

力足以引起人们的关注。在印度,极苦的野生黄瓜果实和叶片除了被用作泻药,还被用于治疗各种炎症^[6,10]。而我国明朝时期著名医师李时珍在《本草纲目》中也详细记载了甜瓜瓜蒂具有护肝及消炎的功效。现代医学研究发现,甜瓜瓜蒂中含有大量的葫芦素,正是它们发挥了消炎和保肝功效^[6,10]。因此,大量的葫芦素被提取出来并开发成治疗肝病的有效药物。近年来新发现的葫芦素药用价值引起了人们的关注:治疗癌症。葫芦素可通过特异阻断肿瘤细胞生长所需的JAK-STAT信号通路来抑制肝癌、膀胱癌、胰腺癌等癌细胞的扩散,可与其他抗癌药物一块使用,提高癌症治疗的效果^[10-12]。从这个角度来说,“良药苦口”是非常有道理的。

3 开发和利用苦味的瓶颈

虽然野生的葫芦科植物非常苦,但是,葫芦素在植物中的含量并不高,要获得足量多的葫芦素进行药物开发和治疗,就必须从植物材料中进行分离和纯化。不论是前期大面积的植物种植,还是后期复杂繁琐的纯化过程,都需要大量的时间和很高的成本。葫芦素属于结构复杂的大分子,利用化学方法进行合成的难度非常大,且面临环境污染的风险。因此,要进一步挖掘葫芦素的药物潜力,必须借助生物合成的方法进行生产,而生物合成的前提是植物中苦味物质合成代谢通路必须清楚。此外,由于驯化不完全,不少黄瓜品种在高温、干旱等逆境条件下生长,果实中仍会出现令人不悦的苦味,从而失去商品价值。因此,要保障优良的蔬菜品质,也必须对黄瓜苦味合成、调控及驯化机理进行解析。

4 黄瓜苦味代谢研究进展

4.1 控制叶片苦味的关键基因

前期研究发现有两个显性单基因遗传位点分别控制着黄瓜叶片苦味(*Bi*)和果实苦味(*Bt*),但是基因未知^[13-14]。黄瓜基因组和变异组图谱的绘制完成,给阐明葫芦科植物苦味物质形成的分子机理提供了研究基础^[2,15]。通过全基因组关联分析(GWAS)115份黄瓜核心种质资源重测序数据及叶片苦味表型数据,发现了与叶片苦味紧密连锁的SNP位点^[16]。

该位点导致 *Csa6G088690* 基因 393 位的氨基酸从半胱氨酸变为酪氨酸, 叶片从苦变成不苦。*Csa6G-088690* 编码 2,3 氧化角鲨烯环化酶 (OSC), 与西葫芦中发现的葫芦素合成酶 (CPQ) 具有 80% 的同源性^[17]。酵母中 *Csa6G088690* 催化 2,3 氧化角鲨烯环化生成葫芦二烯醇, 而 393 位氨基酸突变后酶的活性完全丧失。因此, *Csa6G088690* 就是 *Bi*, 负责催化苦味合成第一步关键限速步骤^[16]。*Bi* 上的 SNP 突变可用做分子靶标, 筛选苦味合成中断的黄瓜品种, 确保果实中无苦味产生, 保障黄瓜的商品品质。

4.2 调控苦味合成的“开关”基因

既然 *Bi* 参与苦味合成, 那么控制果实苦味的 *Bt* 究竟是什么基因? 由于 *Bt* 控制的果实苦味性状与驯化过程密切相关, *Bt* 很可能是受到选择的驯化基因。在黄瓜变异组研究中, 根据驯化区域筛选及图位克隆的结果, *Bt* 被定位到 5 号染色体 422 kb 的范围内, 共有 67 个候选基因^[3]。在进一步缩小候选基因时, 田间自然和人工无苦味突变体的发现为锁定 *Bt* 提供了线索。通过对突变体重测序分析, 找到了调控叶片苦味合成的基因 *Bl* (bitter leaf), 它编码一个 bHLH 转录因子, 可与 *Bi* 启动子互作直接调控 *Bi* 表达, 发生在 *Bl* 上的两个 SNP 突变均导致叶片从苦变成不苦。因此, *Bl* 是叶片中特异调控苦味合成的“开关”基因。*Bl*、*Csa5G157220*、*Csa5G157230* 三个基因均为 bHLH 转录因子, 且都在 67 个 *Bt* 候选基因范围中, 但 *Csa5G157230* 和 *Bi* 在野生的黄瓜果实中大量表达, 在栽培的不苦的黄瓜果实中则都不表达, 这与苦味在野生和栽培黄瓜果实中的含量一致。此外, *Csa5G157230* 在 115 份核心种质资源果实中的表达量也与 *Bi* 表达量及苦味含量呈正相关。与 *Bl* 功能类似, *Csa5G157230* 也能直接调控 *Bi* 表达。因此, *Csa5G157230* 很有可能就是 *Bt* 基因, 是果实中特异调控苦味合成的“开关”基因。突变发生在 *Bt* 启动子区域, 降低了果实中 *Bt* 表达量, 最终导致果实中苦味含量减少, 最终被选择并固定下来。最直接的证据是 *Bt* 起始密码子前 1 601 处的碱基 (SNP1601) 与逆境导致的果实苦味密切相关: 当 SNP1601 是 G 时, 胁迫诱导果实中 *Bt* 表达迅速升高, *Bi* 及苦味含量也随之升高, 导致原本不苦的黄瓜果实变苦; 而突变成 A 后, 果实则不再变苦。

4.3 苦味合成通路解析

发现 *Bi*、*Bl* 和 *Bt* 三个关键苦味基因为无苦味黄瓜品种培育打下了良好的理论基础, 尤其是两个

与苦味表型紧密连锁的 SNP 分子靶标, 将确保蔬菜的品质不受苦味影响。然而, 要进一步利用生物合成的方法生产葫芦素, 只克隆 *Bi* 是远远不够的。*Bi* 催化生成的葫芦二烯醇还需被 P450 和乙酰转移酶 (ACT) 进一步氧化和乙酰化, 才能最终生成葫芦素。*Bi* 所在染色体周围 35 kb 范围内有 3 个基因编码 P450, 1 个基因编码 ACT, 这些基因在不同黄瓜组织中的表达情况与 *Bi* 一致, 且也能被 *Bl* 和 *Bt* 直接调控。植物中次生代谢产物合成基因往往在基因组上成簇分布^[18-19], 黄瓜苦味合成基因极有可能也以基因簇的形式存在。进一步从全基因组范围筛选与 *Bi* 共表达, 且被 *Bl* 和 *Bt* 共调控的 P450 和 ACT, 最终将苦味合成候选基因从原来 4 个扩展到 8 个 (7 个编码 P450, 1 个编码 ACT)。这些候选合成基因在黄瓜叶片中的表达调低后均能导致叶中苦味含量下降, 从而间接证明它们参与了苦味合成^[16]。为了进一步说明它们的催化机制, 从两方面对黄瓜苦味代谢研究体系进行了优化: (1) 整合上游合成基因到酵母基因组中, 提高酵母中 2,3 氧化角鲨烯及葫芦二烯醇的含量; (2) 从 1 000 kg 苦的黄瓜叶片中分离纯化可能的葫芦烷型化合物, 用于苦味合成中间产物解析。最终鉴定出参与苦味合成第二、第三步以及最后一步的酶基因^[16], 即 *Csa5G903540* 氧化葫芦二烯醇生成 19 羟基葫芦二烯醇; *Csa6G088160* 继续氧化 19 羟基葫芦二烯醇生成 19,25 二羟基葫芦二烯醇; *Csa6G088700* 催化去乙酰基葫芦素 C 生成葫芦素 C。上述研究为阐明整个苦味合成通路打下了良好的基础, 剩余苦味合成步骤正在解析中。

5 展望

黄瓜苦味合成、调控及驯化分子机制的解析, 为综合利用苦味物质葫芦素创造了契机。通过控制叶片和果实中的“开关”基因 *Bl* 和 *Bt*, 可培育一个新的“超级黄瓜”品种: 既能利用自身合成的苦味物质进行虫害防御, 减少农药使用; 又可确保果实中无苦味合成, 保障蔬菜商品品质。此外, 随着合成生物学技术已趋成熟, 生物合成大分子化合物已成为可能。采用类似体外合成青蒿素的技术^[20], 将整个葫芦素合成代谢通路导入酵母基因组, 通过发酵的方式快速、高效合成和改良葫芦素, 为未来开发新的抗癌药物提供了新的思路和借鉴。

[参 考 文 献]

[1] Dwivedi NK, Dhariwal OP, Krishnan SG, et al.

- Distribution and extent of diversity in *Cucumis* species in the Aravalli ranges of India. *Genet Resour Crop Evol*, 2010, 57: 443-52
- [2] Qi JJ, Liu X, Shen D, et al. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nat Genet*, 2013, 45: 1510-5
- [3] Balkema-Boomstra AG, Zijlstra S, Verstappen FWA, et al. Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite (*Tetranychus urticae*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Chem Ecol*, 2003, 29: 225-35
- [4] Lester G. Melon (*Cucumis melo* L.) fruit nutritional quality and health functionality. *HortTech*, 1997, 7: 222-7
- [5] Matsuo K, DeMilo AB, Schroder RF, et al. Rapid high-performance liquid chromatography method to quantitate elaterinide in juice and reconstituted residues from a bitter mutant of Hawkesbury watermelon. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 2755-9
- [6] Chen JC, Chiu MH, Nie RL, et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep*, 2005, 22: 386-99
- [7] Horie H, Ito H, Ippoushi K, et al. Cucurbitacin C-bitter principle in cucumber plants. *Jap Agr Res Q*, 2007, 41: 65
- [8] Da Costa CP, Jones CM. Cucumber beetle resistance and mite susceptibility controlled by the bitter gene in *Cucumis sativus* L. *Science*, 1971, 172: 1145-6
- [9] Metcalf RL, Metcalf RA, Rhodes AM. Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 3769-72
- [10] Chen XP, Bao JL, Guo JJ, et al. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 2012, 23: 777-87
- [11] Blaskovich MA, Sun JZ, Cantor A, et al. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res*, 2003, 63: 1270-9
- [12] Thoennissen NH, Iwanski GB, Doan NB, et al. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 2009, 69: 5876-84
- [13] Pierce L, Wehner TC. Review of genes and linkage groups in cucumber. *Hortscience*, 1990, 25: 605-15
- [14] Walters SA, Shetty NV, Wehner TC. Segregation and linkage of several genes in cucumber. *J Am Soc Hortic Sci*, 2001, 126: 442-50
- [15] Huang SW, Li RQ, Zhang ZZ, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet*, 2009, 41: 1275-81
- [16] Shang Y, Ma YS, Zhang HM, et al. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, 2014, 346: 1084-8
- [17] Shibuya M, Adachi S, Ebizuka Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron*, 2004, 60: 6995-7003
- [18] Nützmann HW, Osbourn A. Gene clustering in plant specialized metabolism. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 26: 91-9
- [19] Chae L, Kim T, Nilo-Poyanco R, et al. Genomic signatures of specialized metabolism in plants. *Science*, 2014, 344: 510-3
- [20] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528-32