

类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程

陶 俊^{1,2*} 张上隆¹ 徐昌杰¹ 安新民¹ 张良诚¹

(¹浙江大学果树分子生物学实验室 杭州 310029) (²扬州大学园艺系 扬州 225009)

摘 要 类胡萝卜素具有多种生物功能,尤其在保护人类健康方面起着重要的作用,如它们是合成维生素 A 的前体,能够增强人体免疫力和具有防癌抗癌的功效。人体自身不能合成类胡萝卜素,必须通过外界摄入,但类胡萝卜素在许多植物中含量较低,并且很难用化学方法合成。随着类胡萝卜素生物合成途径的阐明及其相关基因的克隆,运用基因工程手段调控类胡萝卜素的生物合成已成为可能。本文综述了微生物和高等植物类胡萝卜素生物合成途径中相关基因的克隆,以及运用这些基因通过异源微生物生产类胡萝卜素和提高作物类胡萝卜素含量的基因工程研究进展。

关键词 类胡萝卜素,微生物,植物,基因,基因工程

中图分类号 Q78 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)03-0276-06

类胡萝卜素通常是指 C₄₀ 的碳氢化合物(胡萝卜素)和它们的氧化衍生物(叶黄素)两大类色素的总称。它们在结构上由 8 个类异戊二烯单位浓缩形成,典型的 C₄₀ 类胡萝卜素携带紫罗酮环(ionone),在环上不同位置的氢原子可被氧基、羟基、环氧基代替^[1]。类胡萝卜素分子中最重要的部分是决定颜色和生物功能的共轭双键系统。类胡萝卜素是所有光合生物的基本成分,贮存在生物体的脂相中。在植物中,类胡萝卜素担当叶绿体光合作用的辅助色素和保护叶绿素免受强光破坏^[2,3],同时也是合成植物激素 ABA 的前体^[4]。除八氢番茄红素、六氢番茄红素等几种类胡萝卜素无色外,绝大多数类胡萝卜素呈黄色、橙色或红色^[5]。

约有 10% 的类胡萝卜素是维生素 A (V_A) 的前体^[6,7],人体缺乏 V_A 易得夜盲症。近年来,越来越多的医学研究表明,类胡萝卜素在猝灭自由基^[8]、增强人体免疫力^[9]、预防心血管疾病和防癌抗癌^[2,10]等保护人类健康方面起着更为重要的作用。人体血液中主要含有番茄红素、β-胡萝卜素、叶黄素、β-隐黄质、α-胡萝卜素等类胡萝卜素^[11],但人体不能合成类胡萝卜素,主要依赖饮食中类胡萝卜素的供应。一些重要的类胡萝卜素,如玉米黄素是眼睛斑点色素(Macular pigment)中不可缺少的成分,但在食品中含量并不丰富,也不能通过外界药物供给,若长期摄入不足对眼睛健康极为不利^[12]。随着类胡萝卜素药用价值的不断发现,人类对类胡萝卜素的种类和产量需求将越来越大。然而,类胡萝卜素很难用化学方法合成,迄今为止,只有少数几种类胡萝卜素,如 β-胡萝卜素、虾青素、角黄素等能通过化学合成商业生产,通过天然微生物发酵途径也能生产 β-胡萝卜素、虾青素,但所

占的市场份额微不足道^[13]。显然,类胡萝卜素目前这种生产状况已不能适应市场的需求。现代分子生物学研究手段的发展,使得类胡萝卜素生物合成途径中的一系列关键酶的基因被陆续分离鉴定,为通过 DNA 重组技术和遗传工程生产类胡萝卜素开辟了道路,近年来,有关这方面的研究在微生物和高等植物上取得重大突破。

1 类胡萝卜素的生物合成途径及其相关酶的基因克隆

1.1 类胡萝卜素的生物合成途径

通过生化分析、经典遗传学和近年来分子遗传学的研究,已经基本搞清楚类胡萝卜素生物合成的主要途径。然而对于复杂类胡萝卜素的末端基团、甲基基团及多烯烃链的额外修饰过程仍不太清楚^[14]。

所有的类胡萝卜素均通过类异戊二烯化合物或萜类化合物途径合成。IPP(异戊烯焦磷酸)是该途径的前体物质,IPP 在 IPP 异构酶作用下生成 DMAPP(二甲基丙烯基二磷酸),然后再与 3 个 IPP 缩合依次生成 GPP(牻牛儿焦磷酸)、FPP(法尼基二磷酸)、GGPP(牻牛儿基牻牛儿焦磷酸)。2 个 GGPP 在 PSY(八氢番茄红素合成酶)作用下形成第一个无色的类胡萝卜素——八氢番茄红素。八氢番茄红素经过连续的脱氢反应,共轭双键延长,直至形成链孢红素、番茄红素。番茄红素在不同环化酶的作用下分别生成 α-胡萝卜素、β-胡萝卜素,在 α、β-胡萝卜素的 C4(C4') 位置引入酮基和(或)C3(C3') 位置引入羟基以及在 β-环上引入 C(5,6)-环氧基后,则形成结构更为复杂的叶黄素^[12,14-16](图 1)。

收稿日期 2001-09-28, 修回日期 2002-01-28。

基金项目 国家自然科学基金重点项目资助(No.39730340)。

* 通讯作者。Tel 86-571-86971009, Fax 86-571-86049815, E-mail taojun-un@zhuji.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

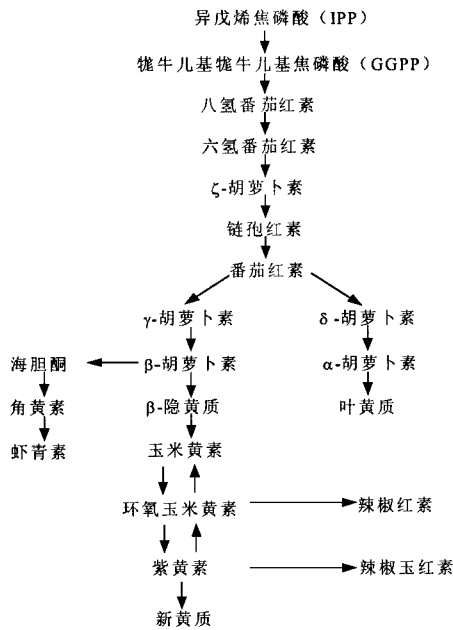


图 1 类胡萝卜素生物合成途径简图

Fig. 1 Simplified metabolic pathway of carotenoid biosynthesis

1.2 类胡萝卜素合成相关基因的克隆

目前,已从细菌、真菌、藻类和植物等生物中分离出 150 多个类胡萝卜素合成酶基因,它们分别编码 20 多种类胡萝卜素形成酶^[17](详见表 1)。

编码早期类胡萝卜素生物合成的酶,如 GGPP 合成酶、八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素脱氢酶的基因等占总体的一半以上,其中,八氢番茄红素脱氢酶基因包含两步、三步、四步和五步脱氢反应的不同基因。 β -番茄红素环化酶基因从细菌和植物中克隆到,它能促进双环类胡萝卜素形成; ϵ -番茄红素环化酶基因仅从植物中克隆到,除莴苣 ϵ -番茄红素环化酶基因外,一般只形成单环。迄今为止,仅有修饰类胡萝卜素 β -环的酶基因得到克隆,包括 β -胡萝卜素羟化酶、 β -胡萝卜素加氧酶(又称酮化酶)。在过去几年,已先后从植物上克隆到玉米黄素环氧酶、紫黄质脱环氧酶、辣椒红素/辣椒玉红素合成酶、新黄质合成酶。

2 微生物类胡萝卜素基因工程

应用 DNA 重组技术将外源基因导入微生物,利用微生物繁殖快、产量高的特点生产人们需要的、有商业价值的化学物质,是现代生物技术制药工业的主要发展方向^[20]。这一技术的关键是,作为外源基因宿主的微生物首先必须具备大量供目的化学物质合成的前体物质^[21]。有关类胡萝卜素的基因工程近年来在大肠杆菌和酵母上取得成功。

2.1 大肠杆菌

大肠杆菌不能合成类胡萝卜素,但它含有的成分如多萜醇、苯醌和甲基萘醌类维生素与类胡萝卜素一样,都是由共同前体 FPP 转化而来^[21]。因此,在理论上讲,向大肠杆菌中转入 crtE 后,可诱导体内部分 C 源转向类胡萝卜素的生物合成。

表 1 类胡萝卜素生物合成酶基因的克隆^[2,17-19]

Table 1 Gene cloning of carotenoid biosynthetic enzyme				
酶	基因	生物	登录号	
类胡萝卜素骨架的构建				
GGPP 合成酶	<i>crtE</i>	欧文氏菌	D90087	
	<i>crtE</i>	集胞藻	D90899	
	<i>al-3</i>	粗糙脉孢霉	X53979	
	<i>Ggps</i>	拟南芥	L25813	
	<i>Ggps</i>	辣椒	P80042	
八氢番茄红素合成酶				
<i>crtB</i>	<i>crtB</i>	农杆菌	D58420	
	<i>crtB</i>	集胞藻	X69172	
	<i>al-2</i>	粗糙脉孢霉	L27652	
	<i>Psy</i>	拟南芥	L25812	
	<i>Psy</i>	黄水仙	X78814	
	<i>Psy1</i>	番茄	A21360	
<i>Psy2</i>	番茄	L23424		
无环类胡萝卜素的生物合成				
八氢番茄红素脱氢酶				
<i>Pds</i>	<i>Pds</i>	拟南芥	L16237	
	<i>Pds</i>	玉米	L39266	
	<i>Pds</i>	黄水仙	X78815	
	<i>Pds</i>	番茄	M88683	
	<i>crtP</i>	集胞藻	X62574	
	<i>crtI</i>	荚膜红细菌	Z11165	
	<i>crtI</i>	欧文氏菌	D90087	
	<i>al-1</i>	粗糙脉孢霉	M57465	
	ζ -胡萝卜素脱氢酶	<i>crtQ</i>	集胞藻	X62574
		<i>Zds</i>	拟南芥	U38550
<i>Zds</i>		辣椒	X68058	
链孢红素羟化酶	<i>crtC</i>	球形红杆菌	X82458	
	链孢红素甲氧化脱氢酶	<i>crtD</i>	荚膜红细菌	Z11165
		<i>crtF</i>	球形红杆菌	X82458
	链孢红素羟基-氧-转甲基酶	<i>crtA</i>	荚膜红细菌	Z11165
	球形成(加)氧酶			
环化类胡萝卜素生物合成				
番茄红素 β 环化酶				
<i>crtY</i>	<i>crtY</i>	欧文氏菌	D90087	
	<i>crtY</i>	集胞藻	X74599	
	β -Lyc	拟南芥	Z29211	
番茄红素 ϵ 环化酶	ϵ -Lyc	拟南芥	U50738	
β -胡萝卜素羟化酶	<i>crtZ</i>	农杆菌	D58420	
	<i>Beh</i>	拟南芥	U58919	
	<i>Beh</i>	辣椒	Y09225	
	玉米黄素转葡萄糖基酶	<i>crtX</i>	欧文氏菌	M87280
β -胡萝卜素(4)加氧酶	<i>crtW</i>	农杆菌	D58420	
	<i>crtW</i>	产碱杆菌	D58422	
	<i>crtO</i>	集胞藻	D64004	
	<i>CrtO1</i>	雨生红球藻	X86782	
<i>Bkt</i>	<i>Bkt</i>		/D45881	
	<i>Zep1</i>	拟南芥	T45502	
紫黄质脱环氧酶	<i>Zep1</i>	辣椒	X91491	
	<i>Vde1</i>	拟南芥	N37612	
紫黄质裂解酶	<i>Vp14</i>	玉米	U95953	
辣椒红素/辣椒玉红素合成酶	<i>Ces</i>	辣椒	X77289	
β -胡萝卜素脱氢酶	<i>crtU</i>	灰色链霉菌	X95596	
新黄质合成酶	<i>Nxs</i>	马铃薯	AJ272136	

Rose^[23]等利用大肠杆菌载体 pACCYC184 建立起 3 个携带欧文氏菌类胡萝卜素合成基因的质粒:pACCRT-EIB(载有 *crtE*)、pACCART-ETX(载有 *crtE* 和 *crtX*)和 pACC

CAR25 Δ ertX 载有 *ertE*、*B*、*I*、*Y*、*Z*);将它们转入 JM101 大肠杆菌转化体系后,分别生产出 200~500 $\mu\text{g/g}$ DW 的番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄素^[24,25]。Misawa 等研究发现,如果将上述质粒的 *ertE* 去除,它们也能生产类胡萝卜素,但产量降为原来的 2%~4%^[26]。这一结果表明在大肠杆菌中类胡萝卜素生物合成的最终前体是 GGPP,而非 FPP,但大肠杆菌 GGPP 的含量远远低于 FPP,引入编码 *ertE* 增加了 FPP 向 GGPP 的转化。

将农杆菌的 *ertW* 和 *ertZ* 与 pBluescript II 的 *lac* 启动子连接后,插入 pBluescript II 载体构成质粒 pAK916(载有 *ertW*)和 pAK96K(载有 *ertW* 和 *ertZ*)^[27,28]。将这两个质粒分别和 pACCAR16 Δ ertX。或 pACCAR25 Δ ertX 一起转入 JM101 大肠杆菌菌株,结果类胡萝卜素总量达到 400~500 $\mu\text{g/g}$ DW^[29]。但是,不同基因组合生成的类胡萝卜素不同,(pAK916 和 pACCAR16 Δ ertX)菌株只产生角黄素,而(pAK96K 和 pACCAR16 Δ ertX)或(pAK916 和 pACCAR25 Δ ertX)菌株,除积累最终产物虾青素外,还积累了从 β -胡萝卜素到虾青素的一系列中间产物。这可能是 *ertW* 和 *ertZ* 的酶竞争同一底物的缘故^[27]。

然而,目前商业生产类胡萝卜素的微生物,如杜氏藻、红球藻,产量已达到 50mg/g DW^[30]。虽然上述研究实现了利用大肠杆菌合成类胡萝卜素的目标,但产量仅有 10~500 $\mu\text{g/g}$ DW,较之杜氏藻、红球藻等实在太低,因此,有必要在此基础上加以改进。Misawa 等^[29]设想,如果提高大肠杆菌类异戊二烯途径中 IPP 的产量和 IPP 到 GGPP 的转化效率,增加 C 源向类胡萝卜素生物合成途径的转化量,可进一步提高类胡萝卜素产量。根据这一思路,Wang 等通过 IPP 异构酶和 GGPP 合成酶在大肠杆菌体内的超量表达,使大肠杆菌的虾青素产量提高 50 倍^[31]。Albrecht 等通过 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶基因、脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶和 IPP 异构酶在大肠杆菌体内的超量表达使大肠杆菌中 β -胡萝卜素和玉米黄素的产量提高 3.5 倍,最终产量达 1.5mg/g DW^[32]。然而如果再增加 IPP 的合成,则对大肠杆菌菌株产生毒害甚至严重致死,这可能是由于大肠杆菌中用于贮存类胡萝卜素的膜负荷超载。

2.2 酵母

目前,用于类胡萝卜素生物合成研究主要以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和产元假丝酵母(*Candida utilis*)两种为材料。

2.2.1 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*):酿酒酵母不能合成类胡萝卜素,但体内积累的麦角固醇也是类异戊二烯化合物。麦角固醇与类胡萝卜素的生物合成途径在 FPP 分叉,这样,通过引入欧文氏菌 *ertE* 竞争 FPP,能够将部分 FPP 从麦角固醇生物合成途径转向类胡萝卜素的生物合成途径。

Yamano 等^[33]将欧文氏菌的 *ertE*、*ertB* 和 *ertI*,分别用酵母 *PGK*(磷酸甘油酸酯激酶),*GAL 7*,和 *GAP*(3-磷酸甘油醛脱氢酶)基因的启动子和终止子连接后,插入到酵母载体 YEp13 上建立一个质粒 Y514。该质粒转入 *S. cerevisiae* R7

酵母后产生了 113 $\mu\text{g/g}$ DW 的番茄红素,约占 10%的麦角固醇转向了类胡萝卜素的合成。

将欧文氏菌 *ertY* 基因用 *ADH 1* 启动子和 *HIP 1* 终止子连接后插入 Y513 质粒构建质粒 Y5143 载有 Y5143 的酵母转化体 *S. cerevisiae* R7 积累了 103 $\mu\text{g/g}$ DW 的 β -胡萝卜素,以及少量其它的类胡萝卜素中间产物^[33]。

Ausich 等^[34]报导,通过欧文氏菌的类胡萝卜素合成基因的遗传操作,在酿酒酵母转化体上获得了番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄素。

2.2.2 产元假丝酵母(*Candida utilis*):产元假丝酵母具备大规模生产单细胞蛋白的能力,是生产谷胱甘肽和 RNA 等几种化学试剂的宿主^[35,36],同时人们发现,它体内积累的麦角固醇含量是酿酒酵母的 2~3 倍^[37],因此,通过基因工程技术利用产元假丝酵母生产类胡萝卜素更具有应用前景。

利用编码核糖体蛋白的修饰基因 *L41* 作为抗药标记建立起一个转化体系^[38]。将欧文氏菌的 *ertE*、*ertB* 和 *ertI* 分别用 *GAP*、*PGK* 和 *PMA*(质膜 ATP 酶)的启动子和终止子连接后与修饰基因 *L41* 一起构成 pCLEB13-2 质粒,再转入 *C. utilis* IFO 0988 菌株,结果产生 758 $\mu\text{g/g}$ DW 番茄红素和 407 $\mu\text{g/g}$ DW 八氢番茄红素,约有 35%的麦角固醇转向了类胡萝卜素的合成。应用 4~6 个相应的类胡萝卜素合成基因在合成 β -胡萝卜素和虾青素方面也取得成功^[39]。

为进一步提高酵母类胡萝卜素产量,Shimada 等采取了两条措施,一是使 3-羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因超量表达调控 MVA 途径,增加萜类化合物前体物质的供应;另一是通过甾醇途径的竞争,破坏编码角鲨烯合成的基因表达,从而阻止麦角固醇的生物合成,促进 GGPP 向类胡萝卜素的合成方向转化。结果获得了能生产番茄红素 7.8mg/gDW 的酵母菌株。这一结果标记着微生物类胡萝卜素基因工程已从理论研究向商业化生产迈进^[40]。

3 植物类胡萝卜素生物合成的基因工程

维生素 A 缺乏是现今发展中国家普遍存在的严重问题,尤其是年老、嗜烟和酗酒的人群。 β -胡萝卜素是维生素的主要前体。据世界卫生组织估测,由于维生素 A 的营养水平不足导致每年至少 200 万人死亡,其中主要是学龄前儿童^[41]。因此,植物类胡萝卜素合成的基因工程主要以提高作物中 β -胡萝卜素的含量为主要研究目标,并已在水稻、油菜、番茄等作物上取得重大突破。

3.1 水稻^[42]

水稻胚乳虽然能够合成并积累 GGPP,却不能形成类胡萝卜素。如果通过基因工程技术使其生产 β -胡萝卜素,则可望减轻在亚洲、非洲、南美洲等地区 V_A 缺乏的状况。

根据类胡萝卜素的生物合成途径,若要将 GGPP 转化成 β -胡萝卜素,在水稻中必须完成 4 步不同的生化反应,为此必须将 *Psy*、*Pds*、*Zds*、 β -*Lcy* 基因一起转入水稻植株。由于细菌八氢番茄红素脱氢酶(*ertI*)能够完成两个植物脱氢酶 *Pds* 和 *Zds* 的共同作用,故可将基因减为 *Psy*、*ertI* 和 β -*Lcy* 三个

成员。研究人员分别将黄水仙的 *Psy*、 β -*Lcy* 基因连接到胚乳特异表达的谷蛋白启动子上,细菌八氢番茄红素降解酶基因 *crtI* 连接到花椰菜斑点病毒 35S 启动子上,然后一起构成表达载体转入到一个日本水稻品种。结果获得了胚乳呈黄色的“金大米”种子中含有 β -胡萝卜素,此外,还意外含有大量的玉米黄素、叶黄素。这一结果表明 β -胡萝卜素羟化酶基因(*Bch*)可能和 β -*Lcy* 一起在正常水稻胚中组成型表达,或者受番茄红素形成的诱导表达。转基因水稻胚乳中 β -胡萝卜素的含量最高达 $1.6\mu\text{g/g DW}$ 。如今,“金大米”已经被捐赠给设在菲律宾的国际水稻研究所,用于开发富含 β -胡萝卜素的水稻新品种。

3.2 油菜^[43]

将欧氏杆菌 *crtB* 与油菜种子特异启动子构建成种子特异表达载体转入到油菜,结果转基因油菜的胚呈橙色,而对照呈绿色,种子中类胡萝卜素含量增加 50 倍,达到 $1600\mu\text{g/g FW}$,其主要类胡萝卜素成分为 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素。这种“金色菜油”在抗拒 V_A 的缺乏方面具有重要的应用前景,如今已被孟山多(Monsanto)公司和设在印度的 Tata 能源研究所合作开发。

3.3 番茄

Bramley 等^[44]将番茄 *Psy* 基因反义导入番茄,结果 GGPP 积累而类胡萝卜素含量大大下降,表明 *Psy* 基因在番茄类胡萝卜素生物合成中起限速作用。Fray 和 Grierson^[45]等将番茄 *Psy* 基因正义导入番茄黄果突变体,果实成熟时重新积累番茄红素,接着, Fray 等^[46]将番茄 *Psy* 基因正义导入番茄,结果 *Psy* 的 cDNA 在转基因番茄中的组成型表达导致了离区和幼果类胡萝卜素异常生成,植株矮化,果实形成番茄红素的时间提早,但含量却比野生型低。Rosati 等将从番茄自身克隆到的 β -番茄红素环化酶基因正义导入番茄植株,结果果实中 β -胡萝卜素含量增加 3.8 倍,但类胡萝卜素总量基本不变^[47]。

番茄红素在抗氧化和防癌方面的功能日益受到人们的关注,研究人员试图让类胡萝卜素生物合成途径中的早期酶(*Psy*、*Pds*)过度表达来提高番茄果实中的番茄红素含量。Römer 和 Fraser 等将细菌八氢番茄红素脱氢酶基因(*crtI*)和花椰菜斑点病毒 35S 启动子构成组成型表达载体转入番茄,结果令人失望,不仅番茄红素的含量没有增加,而且类胡萝卜素的总量减半^[48]。但好的是 β -胡萝卜素含量提高到原来的 3 倍,占总量的 50%,约 $5\text{mg}/100\text{g}$,从而使得这些番茄呈橙色。这是由于 *crtI* 转入番茄后 β -*Lcy* 的 mRNA 水平增加 1.7 倍^[41]。

3.4 烟草

Misawa 等^[49]将细菌八氢番茄红素基因正义导入烟草, β -胡萝卜素合成增强,同时对除草剂 norflurazon 抗性增强。Kumagai 等^[50]将辣椒红/辣椒玉红素合成酶基因正义导入野生烟草,植株呈橙色,叶片中积累辣椒红素,含量占类胡萝卜素总量的 36%。

将在酮类类胡萝卜素生物合成中起关键作用的编码 β -

C-4 氧化酶的基因 *crtO*^[51]与番茄 *Pds* 基因启动子结合转入烟草后,植株叶片中类胡萝卜素成分及含量没有改变,表明由 *Pds* 启动子调控的组织特异表达的酮化酶可能在叶绿体中不表达,但在花的蜜腺有色体中积累高浓度的酮类类胡萝卜素,类胡萝卜素总量增加 40%。其中主要成分为虾青素,使花的颜色从黄变红。结构分析显示,转基因烟草形成的虾青素与水生物形成的天然虾青素具有相同的空间螺旋特性(3S3'S)^[52],这一结果表明,通过基因操作利用植物生产特定的、有商品价值的类胡萝卜素也是切实可行的。

4 结 语

在微生物中,通过类胡萝卜素基因工程已能将类胡萝卜素合成向设定的方向发展,并且成功地克服了类胡萝卜素的前体物质,如 IPP、GGPP 等萜类化合物供应不足的“瓶颈”。接下来摆在人们面前的主要问题是如何提高微生物对类胡萝卜素的贮存能力。因此,今后微生物类胡萝卜素基因工程的研究方向应转向提高微生物脂类物质水平及其与类胡萝卜素分子整合能力,若是这一问题被解决,则通过异源寄主发酵生产类胡萝卜素将会进入商品化阶段。

通过类胡萝卜素基因工程获得“金大米”和“金油菜”极大地增强了人们开展植物类胡萝卜素基因工程的信心。但是,与微生物相比,大多数植物本身存在着一个复杂的类胡萝卜素合成途径。目前,人们对内源类胡萝卜素合成的相关基因在不同植物中如何表达及调控知之有限,这使得人们在调控植物类胡萝卜素生物合成的基因工程研究方面因缺乏理论基础而带有盲目性。此外,通过基因工程改变类胡萝卜素的合成途径可能会干扰植物其它萜类化合物,如植物激素 GA 等的生物合成,影响植株的正常生长,因而更增加了植物类胡萝卜素合成基因工程研究的难度。因此,在今后的植物类胡萝卜素基因工程研究中,除首先研究植物本身原来内源类胡萝卜素的基因表达特点外,还要研究外源基因的导入对原来内源类胡萝卜素基因表达及其它萜类化合物的影响,以期增加植物类胡萝卜素基因工程的技术可行性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 1995, 7: 1015 ~ 1026
- [2] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*, 1995, 7: 1027 ~ 1038
- [3] Niyogi K K. Photoprotection revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 391 ~ 417
- [4] Rock C D, Zeevaert J A D. The ABA mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7496 ~ 7499
- [5] Goodwin T W, Britton G. Distribution and analysis of carotenoids. In: Goodwin TW (Ed.), *Plant Pigments*. Academic Press, London, 1988, pp. 61 ~ 132

- and Biochemistry. Plenum, New York, 1989, pp. 279 ~ 291
- [7] Matsuno T. Xanthophylls as precursors of retinoids. *Pure Appl Chem*, 1991, **63**: 81 ~ 88
- [8] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem*, 1991, **63**: 141 ~ 146
- [9] Jyonouchi H, Hill J, Tomita Y *et al.* Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of β -carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in *in vivo* culturesystem. *Nutr Cancer*, 1991, **16**: 93 ~ 105
- [10] Giovannucci E, Ascherio A, Rimm E B *et al.* Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, **87**: 1767 ~ 1776
- [11] Bieri J G, Brown E D, Smith J C. Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr*, 1985, **8**: 473 ~ 484
- [12] Sandmann G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**(1): 14 ~ 17
- [13] Sandmann G, Albrecht M, Schnurr G *et al.* The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Tibtech*, 1999, **17**: 233 ~ 237
- [14] Britton G: Overview of carotenoid biosynthesis. In *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*, vol 3. Edited by Britton G, Pfander H, Liaaen-Jensen S. Basel: Birkhäuser, 1998: 13 ~ 147
- [15] Grünwald K, Hagen C: β -carotene is the intermediate exported from the chloroplast during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis*. *J Applied Phycol*, 2001, **13**: 89 ~ 93
- [16] Hirschberg J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, **4**: 210 ~ 218
- [17] Hirschberg J, Cohen M, Harker M *et al.* Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl Chem*, 1997, **69**: 2151 ~ 2158
- [18] Schmimidt-Dannert C. Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**: 255 ~ 261
- [19] Al-Babli S, Huguency P, Schledz *et al.* Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett*, 2000, **485**: 168 ~ 172
- [20] Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**: 1668 ~ 1675
- [21] Murdock D, Ensley B D, Serdar C *et al.* Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1993, **11**: 381 ~ 386
- [22] Sherman M M, Petersen L A, Poulter C D. Isolation and characterization of isoprene mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 3619 ~ 3628
- [23] Rose R E. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 355
- [24] Ruther A, Misawa N, Böger P *et al.* Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**: 162 ~ 167
- [25] Kajiwara S, Fraser P D, Kondo K *et al.* Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1997, **324**: 421 ~ 426
- [26] Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K *et al.* Elucidation of the *Erwinia uredevora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 6704 ~ 6712
- [27] Misawa N, Kajiwara S, Kondo K *et al.* Canthaxanthin biosynthesis by the conversion of methylene to keto groups in a hydrocarbon β -carotene by a single gene. *Biochem Biophys Res Com*, 1995, **209**: 867 ~ 876
- [28] Misawa N, Satomi Y, Kondo K *et al.* Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 6575 ~ 6584
- [29] Misawa N, Shimada H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotechnol*, 1998, **59**: 169 ~ 181
- [30] Johnson E A, Schroeder W A. Microbial carotenoids. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1995, **53**: 119 ~ 178
- [31] Wang C W, Oh M K, Liao J C. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62**: 235 ~ 241
- [32] Albrecht M, Misawa N, Sandmann G. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids beta-carotene and zeaxanthin. *Biotechnol Lett*, 1999, **21**: 791 ~ 795
- [33] Yamano S, Ishii T, Nakagawa M *et al.* Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio-ci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**: 1112 ~ 1114
- [34] Ausich R L, Brinkhaus F L, Mukharji I *et al.* B. Biosynthesis of carotenoids in genetically engineered hosts. *Patent Application PCT: US*, 1991, **91**: 01458
- [35] Boze H, Moulin G, Galzy P. Production of food and fodder yeasts. *Crit Rev Biotechnol*, 1992, **12**: 65 ~ 86
- [36] Ichii T, Takehara S, Konno H *et al.* Development of a new commercial-scale airlift fermentor for rapid growth of yeast. *J Ferment Bioeng*, 1993, **75**: 375 ~ 379
- [37] Miura Y, Kondo K, Shimada H *et al.* Production of lycopene by the food yeast *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(2 ~ 3): 306 ~ 308
- [38] Kondo K, Saito T, Kajiwara S *et al.* A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 7171 ~ 7177
- [39] Miura Y, Kondo K, Saito T *et al.* Production of the carotenoids lycopene, β -carotene and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *App Environ Microbiol*, 1998, **64**: 1226 ~ 1229
- [40] Shimada H, Kondo K, Fraser P *et al.* Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2676 ~ 2680
- [41] Giuliano G, Aquilani R, Dharmapuri S. Metabolic engineering of

- [42] Ye X , Al Babili S , Kloti A *et al.* Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* , 2000 , **287** :303 ~ 305
- [43] Shewmaker C K , Sheehy J A , Daley M *et al.* Seed specific overexpression of phytoene synthase : increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* , 1999 , **20** :401 ~ 412
- [44] Bramley P , Teulier C , Blain I *et al.* Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to pTOM5. *Plant J* , 1992 , **2** :343 ~ 349
- [45] Fray R G , Grierson D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing , complementation and co-suppression. *Plant Mol Biol* , 1993 , **22** :589 ~ 602
- [46] Fray R G , Wallace A , Fraser P D *et al.* Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J* , 1995 , **8** :693 ~ 701
- [47] Rosati C , Aquilani R , Dharmapuri S *et al.* Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J* , 2000 , **24** :413 ~ 420
- [48] Römer S , Fraser P D , Kiano J W *et al.* Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* , 2000 , **18** :666 ~ 669
- [49] Misawa N , Yamano S , Linden H *et al.* Functional expression of the *Erwinia uredevora* carotenoid biosynthesis gene *crtl* in transgenic plants showing an increase of beta-carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. *Plant J* , 1993 , **4** :833 ~ 840
- [50] Kumagai M H , Donson J , della-Cioppa G *et al.* Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with viral-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1995 , **92** :1679 ~ 1683
- [51] Lotan T , Hirschberg J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4 oxygenase , that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis* . *FEBS Lett* , 1995 , **364** :125 ~ 128
- [52] Mann V , Harker M , Pecker I *et al.* Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol* , 2000 , **18** :888 ~ 892

Gene and Gene Engineering of Carotenoid Biosynthesis

TAO Jun^{1,2*} ZHANG Shang-Long¹ XU Chang-Jie¹ AN Xin-Min¹ ZHANG Liang-Cheng¹

¹Laboratory of Fruit Molecular Biology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 ;

²Department of Horticulture , Yangzhou University , Yangzhou 225009 , China)

Abstract Carotenoids have a range of diverse biological functions and actions , especially playing an important role in human health with provitamin A activity , anti-cancer activity , enhancing immune ability and so on. Human body can't synthesis carotenoids by itself and must absorb them from outside. However , carotenoid contents in many plant are very low , and many kinds of carotenoid are difficult to produce by chemical ways. With the elucidation of carotenoid biosynthetic pathway and cloning genes of relative enzymes from microorganisms and higher plants , it is possible to regulate carotenoid biosynthesis via genetic engineering. This article reviews gene cloning of carotenoid biosynthetic enzymes in microorganisms and higher plants , and advances in the studies of carotenoid production in heterologous microorganisms and crop plants using gene-manipulated carotenoid biosynthesis.

Key words carotenoid , microorganisms , plant , gene , gene engineering

Received 09-28-2001

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China (No.39730340).

* Corresponding author. Tel 86-571-86971009 ; Fax 86-571-86049815 ; E-mail: taojun@zhuohu.com.cn ; journals@im.ac.cn ; <http://journals.im.ac.cn>