

植物中花色苷转运蛋白研究进展

李 栋¹, 李 莉¹, 徐艳群^{1,2}, 罗自生^{1,2*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058; 2. 浙江大学宁波研究院, 宁波 315100)

摘 要: 花色苷是植物重要的次生代谢产物, 因其具有高抗氧化活性受到广泛关注。目前, 关于花色苷合成代谢途径及相关转录调控机制已有了较为深入的研究, 其相关结构基因及关键转录调控因子已在多种植物中被陆续鉴定与验证, 但对于花色苷合成后的运输机制的认识仍相对缺乏。花色苷合成主要发生在内质网中, 随后运送至液泡内进行储存。花色苷的运输过程主要包括囊泡运输及链接蛋白运输两种模式, 而转运蛋白在两种运输模式中均发挥重要作用。鉴定花色苷转运相关蛋白有助于深入了解花色苷的运输机制, 完善对花色苷代谢途径的认知。本文主要针对谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、ATP-结合框(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白、多药和毒性化合物排出转运蛋白(multidrug and toxic extrusion compound transporters, MATE)和胆红素异位酶(biliverdin transporter, BTL) 4 类花色苷转运相关蛋白的研究进展进行了概述。

关键词: 花色苷; 跨膜运输; 谷胱甘肽 S-转移酶; ATP-结合框转运蛋白; 多药和毒性化合物排出转运蛋白; 胆红素异位酶

Research progress of anthocyanin transporters in plants

LI Dong¹, LI Li¹, XU Yan-Qun^{1,2}, LUO Zi-Sheng^{1,2*}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Ningbo Research Institute, Zhejiang University, Ningbo 315100, China)

ABSTRACT: Anthocyanins are important secondary metabolites in plants, and they have received widely attention because of high antioxidant activity. To date, the pathway of anthocyanins biosynthesis and the mechanism of transcriptional regulation have been studied in depth. Structural genes and key transcriptional regulators have been successively identified in different plants. However, the transport mechanism of anthocyanins is still unclear. Anthocyanins are synthesized in the endoplasmic reticulum, and then transported to vacuoles for storage. Anthocyanin transport includes two modes: vesicular transport and ligandin transporter. Transporters play key roles in both two modes. Identifying anthocyanin transport-related proteins is helpful to understand the transport mechanism and anthocyanin metabolic pathways. This review summarized the research status and progress of four kinds of transporters: glutathione S-transferase (GST), ATP-binding cassette (ABC) transporters, multidrug and toxic extrusion compound (MATE) transporters and biliverdin transporter (BTL).

KEY WORDS: anthocyanin; transmembrane transport; glutathione S-transferase; ATP-binding cassette transporter; multidrug and toxic extrusion compound transporters; biliverdin transporter

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972114, 31772366)、浙江省重点研发计划项目(2018C02049)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31972114, 31772366) and the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2018C02049)

*通讯作者: 罗自生, 博士, 教授, 主要研究方向为采后保鲜及采后生物学。E-mail: luozisheng@zju.edu.cn

*Corresponding author: LUO Zi-Sheng, Ph.D, Professor, College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, No.866, Yuhangtang Road, Xihu District, Hangzhou 310058, China. E-mail: luozisheng@zju.edu.cn

1 引言

花色苷是植物重要的次生代谢产物,广泛存在于植物各器官特别是果实中。花色苷积累是果实成熟的重要标志,赋予果实鲜艳的色彩,吸引动物进行觅食,利于种子传播^[1,2]。同时,花色苷具有高抗氧化性,能够清除体内自由基,在植物抵御各类非生物胁迫如干旱、紫外辐射、盐胁迫等过程中发挥重要作用^[3,4]。近年来,大量研究表明膳食花色苷有助于延缓人体衰老,预防心脏病、癌症、中风等疾病的发生^[5,6]。因而膳食花色苷受到消费者的广泛关注。

目前,有关植物花色苷合成及相关转录调控已有了较为深入的研究。花色苷合成途径在植物中具有保守性,其中涉及的关键酶类已在多种植物中被陆续鉴定与验证。花色苷合成途径属于类黄酮途径的衍生,其上游合成途径主要由查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)催化介导,是所有花色苷合成的共同途径^[7]。下游途径中的酶类包括黄烷酮 3'-羟化酶(flavanone 3'-hydroxylase, F3'H)、黄烷酮 3',5'-羟化酶(flavanone 3',5'-hydroxylase, F3'5'H)、二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)、类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶(flavonoids 3-O-glucosyltransferase, UFGT)等。上游产物二氢山柰酚经下游不同酶类催化最终形成不同种类花色苷^[7,8]。调控花色苷合成的转录因子主要包含 3 大类: MYB 转录因子、bHLH 转录因子和 WD40 转录因子。MYB 转录因子均含有保守的 Myb 结构域,根据结构域数量可分为 3 类,其中花色苷合成相关转录因子主要为 R2R3-MYB 亚族^[9,10]。不同 MYB 转录因子具有不同调控模式,例如草莓果实中 FaMYB1 负调控花色苷合成,而 FaMYB10 则正调控花色苷合成^[9]。植物中与花色苷合成相关的 bHLH 转录因子间具有很高的同源性,bHLH 转录因子需和 MYB 转录因子共同作用对花色苷代谢进行调控^[11]。与 bHLH 相似,WD40 转录因子在植物中也具有较高同源性。WD40 并不能直接调控花色苷合成,但能够同时与 MYB 和 bHLH 互作,起到对接作用,形成三元 MYB-bHLH-WD40 (MBW) 蛋白复合物^[11]。然而,花色苷合成后在胞内的运输机制目前仍不十分明确,相关研究工作有待进一步开展。本文主要针对谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、ATP-结合框(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白、多药和毒性化合物排出转运蛋白(multidrug and toxic extrusion compound transporters, MATE)和胆红素异位酶(bilitranslocase, BTL) 4 类花色苷转运相关蛋白的研究进展进行了概述,以期为花色苷的进一步研究提供理论基础。

2 花色苷转运模型

花色苷合成于内质网中,但主要积累于细胞液泡中。就花色苷如何从内质网转运至液泡中,Grotewold 等^[12]提出了囊泡运输(vesicular transport, VT)和连接蛋白运输(ligandin transporter, LT) 2 种模型。VT 模型指花色苷在内质网合成后由膜包被形成囊泡结构,向液泡迁移并最终呈递至液泡膜表面。除少部分囊泡与液泡膜相互融合释放花色苷至液泡内,多数花色苷利用液泡膜表面的各类转运蛋白运送至液泡中。而 LT 模型指运输蛋白与花色苷结合,将花色苷由合成位点运输至液泡表面,并利用液泡表面的转运蛋白最终进入液泡。因此,转运蛋白在 2 种运输模式中均具有重要作用。目前,植物中鉴定到的花色苷转运蛋白主要包含 4 类: 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST), ATP-结合框(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白,多药和毒性化合物排出转运蛋白(multidrug and toxic extrusion compound transporters, MATE)和胆红素异位酶(bilitranslocase, BTL)等^[13]。

2.1 GST 介导的花色苷转运

GST 最早被认为对多种化学杀虫剂及毒性有机化合物具有解毒作用^[14]。而其作为花色苷转运蛋白在 1995 年首次被 Marrs 等^[15]报道。该研究筛选得到玉米突变体 Bronze-2(BZ2),该突变体表现为矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyanidin 3-O-glucoside, Cy-3-G)在细胞质中积累。将 BZ2 转入花色苷缺失型拟南芥突变体 *ttg* 中,能够显著提高突变体中 GST 活性。进一步利用薄层色谱分离鉴定得到 Cy-3-G 与谷胱甘肽交联产物。而通过添加谷胱甘肽泵抑制剂钼酸盐能够有效抑制花色苷在液泡中的积累。根据上述研究结果推测 BZ2 编码玉米 GST 蛋白,交联 Cy-3-G 与谷胱甘肽,并在谷胱甘肽泵的作用下将 Cy-3-G 转运至液泡中。

随后,该团队又在花色变浅的矮牵牛花突变体中克隆得到编码花色苷转运相关 GST 蛋白的 AN9,并利用体外酵母实验验证了其 GST 活性^[16]。尽管序列分析结果显示 AN9 与 BZ2 氨基酸序列一致性仅有 12%,属于不同类型 GST,但 BZ2 能够修复 *an9* 突变体的表型。

Larsen 等^[17]在康乃馨中筛选得到 *fl3* 突变体,其表型与 BZ2 玉米突变体及 *an9* 矮牵牛花突变体相类似,表现为花色苷着色变浅。通过在 *fl3* 突变体中异源表达 BZ2 或 AN9 基因发现 BZ2 和 AN9 均能够修复突变体表型,推测 *FL3* 编码参与花色苷转运的 GST 蛋白。

在拟南芥中,Kitamura 等^[18]利用离子束辐照获得突变株 *tt19*。该突变株表现为植株花色苷积累减少,种皮褐色色素积累减少。利用染色体移步技术分离得到 *TT19* 基因,经鉴定属于 GST 基因家族。在 *tt19* 突变体中异源表达矮牵牛基因 AN9 发现植株花色苷积累降低的表型能够被修复,但种皮褐色色素积累减少的表型并不能被修复。这表明

TT19 基因参与液泡摄取花色苷过程,但其功能与 *AN9* 并不完全一致。此外,研究还发现 *tt19* 突变体与野生型中原花青素前体积累水平有所差异,表明 *TT19* 不仅参与花色苷转运,同时也可能是原花青素前体的转运蛋白。

近年来,果实中的花色苷转运相关 GST 蛋白也被相继鉴定报道。Conn 等^[19]从葡萄悬浮培养细胞中纯化得到 5 种 GST 蛋白。通过分析 GST 基因及花色苷合成途径关键基因的转录水平发现 *VvGST1* 和 *VvGST4* 表达水平与花色苷积累具有显著正相关性。通过在玉米突变体 *BZ2* 中异源表达 *VvGST1* 和 *VvGST4* 发现其表型能够得到修复,进一步证实了 *VvGST1* 和 *VvGST4* 参与花色苷转运过程。此外,利用外源蔗糖、茉莉酸以及光照进行诱导表达实验发现 *VvGST1* 与 *VvGST4* 表达模式并不一致,说明 *VvGST1* 与 *VvGST4* 具有一定功能差异。

Luo 等^[20]在野生型草莓中筛选得到 *rap* 突变株,表现为植株茎段及叶片花色苷积累减少。利用瞬时基因沉默结果显示沉默 *RAP* 基因的草莓果实无法正常着色,表明 *RAP* 基因同时调控果实中花色苷的积累。结构域交换实验则证实 *RAP* 蛋白的 N 端与 C 端对其结合花色苷都有重要的作用。此外,Luo 等^[20]在拟南芥 *tt19* 突变体中异源表达 *RAP* 基因发现 *RAP* 能够修复拟南芥植株茎段的表型,但无法修复其种皮内色素积累降低的表型。

Cheng 等^[21]在梨树中鉴定得到编码花色苷转运相关 GST 蛋白的基因 *Riant*。该基因在红色梨花中表达但在其他杂色梨花中未检测到其表达。与 *RAP* 相类似,拟南芥 *tt19* 突变体中异源表达 *Riant* 基因能够修复其花色苷表型,但对种皮的原花青素积累无明显影响。

Hu 等^[22]在荔枝中鉴定到一个 GST 家族基因 *LcGST4*。其所编码蛋白的氨基酸序列与 *VvGST4*、*PhAN9*、*TT19* 氨基酸序列一致性分别为 69.63%、59.51%、57.48%。*LcGST4* 表达水平与花色苷积累呈显著正相关性,推测该基因编码蛋白可能参与花色苷转运。通过在拟南芥 *tt19* 突变体中异源表达 *LcGST4* 发现 *LcGST4* 同样仅能修复植株表型但无法修复种皮表型。

利用转录组测序及共表达网络分析,El-Sharkawy 等^[23]在花色苷缺失型黄皮苹果“Blondee”与其红皮亲本“Kidd's D-8”中鉴定到一个差异表达基因 *MadGST*。该基因与花色苷积累呈显著正相关性,推测其编码蛋白可能参与花色苷转运,但具体功能有待进一步验证。

GST 是目前研究最为深入的花色苷转运蛋白,上述研究为 GST 参与花色苷转运提供了重要生物学证据。但仍 有 2 个重要问题有待进一步探讨:1、拟南芥 *tt19* 突变体异源表达多种植物 GST 蛋白发现这些 GST 蛋白均仅能修复茎段的表型,而无法修复种皮表型,这表明拟南芥茎段及种皮着色调控机制可能存在差异,且 *TT19* 可能具有其他已知花色苷转运相关 GST 蛋白所没有的功能。有关 *TT19*

如何调控种皮着色有待进一步进行研究。2、不同果实中花色苷组分不同,与拟南芥中花色苷差异显著。但所鉴定得到的 GST 蛋白均可修复拟南芥茎段表型,这是否表明 GST 蛋白同时具有转运多种花色苷底物的功能,相关底物特异性研究尚待开展。

2.2 MRP-型 ABC 转运蛋白介导的花色苷转运

ABC 转运蛋白目前已知的最大蛋白家族,能够利用 ATP 水解产生的能量进行主动跨膜转运^[24]。ABC 转运蛋白包含 13 个亚家族,分别负责转运不同底物,包括外源物质、金属离子、生长素、苹果酸盐等^[25-28]。而花色苷转运相关 ABC 蛋白目前仅在水稻、玉米及葡萄中有见相关报道。

Goodman 等^[29]鉴定到编码 MRP 型 ABC 转运蛋白基因 *ZmMrp3*。亚细胞定位结果显示 *ZmMRP3* 定位于液泡膜,与花色苷转运发生位点一致。利用基因沉默构建得到的突变体表现为色素错位定位以及花色苷积累减少,但对花色苷产生种类无影响。上述结果表明 *ZmMRP3* 可能参与花色苷转运。此外,研究还发现沉默 *ZmMrp3* 基因对糊粉层组织表型无影响,推测糊粉层中 *ZmMrp3* 另一同源基因 *ZmMrp4* 可能在花色苷转运过程中起主要作用。

在水稻中,Zhu 等^[30]利用生物信息学分析鉴定得到 *ZmMrp3* 同源基因 *OsMRP15*。*OsMRP15* 属 MRP 型 ABC 转运蛋白,与 *ZmMRP3* 具有高度序列一致性,相似蛋白质结构及相同结构域。表达分析结果显示 *OsMRP15* 与 2 个花色苷合成相关转录调控因子 *OsB1* 和 *OsC1* 共表达。根据以上结果推测 *OsMRP15* 可能编码花色苷转运蛋白,但相关验证工作仍有待进一步开展。

Francisco 等^[31]在葡萄中鉴定得到 ABC 家族转运蛋白 *ABCC1*。蛋白定位于液泡膜上。时空表达分析表明 *ABCC1* 在外果皮中高表达,且在果实成熟阶段表达水平显著上升。体外转运实验结果表明 *ABCC1* 特异性转运锦葵素-3-葡萄糖苷,且这一转运过程严格依赖谷胱甘肽。利用丁硫氨酸亚砷胺降低葡萄根尖组织中谷胱甘肽含量发现花色苷积累显著下降,进一步证实谷胱甘肽在 *ABCC1* 转运锦葵素-3-葡萄糖苷过程中具有重要作用。

花色苷转运相关 ABC 蛋白的研究目前仍较为缺乏,仅在葡萄中具有直接证据验证其转运功能并明确其转运底物。*ZmMrp3* 转运底物有待进一步验证,而 *OsMRP15* 转运功能也有待进一步确认。

2.3 MATE 转运蛋白介导的花色苷转运

MATE 蛋白最早由 Morita 等^[32]在副溶血性弧菌和大肠杆菌中鉴定得到。此后,该家族蛋白被证明在不同物种间具有广泛的保守性。目前,MATE 家族转运蛋白已被证明具有多种生物学功能,包括异性生物物质排出,离子迁移,铝解毒,花色苷及其他类黄酮物质转运,植物激素转运等^[33-37]。拟南芥 *TT12* 蛋白是最早被报道的类黄酮转运相

关 MATE 蛋白。Debeaujon 等^[38]筛选得到突变体 *tt12*, 表现为种子着色变浅, 呈淡棕色。利用显微镜观察发现 *tt12* 突变体中原花青素在内皮细胞液泡中的沉积明显降低。进一步地 Marinova 等^[39]利用亚细胞定位证明 TT12 蛋白位于细胞液泡膜上。体外酵母囊泡运输实验结果显示 TT12 蛋白能够在 ATP 存在条件下特异性运输 Cy3G 及表儿茶素 3'-葡萄糖苷(epicatechin 3'-glucoside, E3'G)^[39,40]。Cy3G 与 E3'G 间存在一定竞争性抑制。低浓度 E3'G 能够有效抑制 Cy3G 的转运, 而 Cy3G 仅在高浓度下会对 E3'G 转运起到抑制作用, 表明 TT12 可能优先转运 E3'G^[40]。突变体 *tt12* 由于缺少 E3'G 转运蛋白 TT12, 导致液泡内原花青素水平下降, 呈现种子着色变浅表型。

随后, TT12 在番茄、苜蓿、葡萄等植物中的同源蛋白被相继报道。利用 SMART cDNA 凝胶印记杂交技术, Mathews 等^[41]在过表达 *ANT1* 的番茄中鉴定得到类似于 TT12 家族基因的 *MTP77*。MTP77 蛋白与 TT12 的氨基酸序列一致性为 36%, 推测可能参与花色苷的胞内转运。

Zhao 等^[42]在苜蓿中鉴定得到与 AtTT12 具有 69.6% 氨基酸序列一致的蛋白 MtMATE1。MtMATE1 定位于液泡膜上, 能够转运 Cy3G 与 E3'G, 且相较于 AtTT12 更加偏好底物 E3'G。敲除 *MtMATE1* 的苜蓿突变株产生与拟南芥 *tt12* 突变株相似表型。而在 *tt12* 突变株中表达 MtMATE1 蛋白能够修复突变株的表型, 进一步证明了 MtMATE1 蛋白与 AtTT12 蛋白的同源性。另一苜蓿 MATE 蛋白 MtMATE2 与 AtTT12 的氨基酸序列一致性为 38.5%, 但与番茄中 MATE 转运蛋白 SIMTP77 的序列一致性达 65.7%^[42]。*MtMATE2* 主要在苜蓿叶片及花中表达。体外转运实验表明 MtMATE2 蛋白负责转运多种黄酮苷类物质, 如 Cy3G 和飞燕草素-3-O-葡萄糖苷, 其中对丙二酰基化的黄酮苷底物具有更高的转运效能。敲除 *MtMATE2* 的苜蓿突变株表现为花与叶片中色素减少, 表明 MtMATE2 蛋白参与这些组织中的类黄酮积累^[42]。

在葡萄中, Gomez 等^[13]鉴定到 2 种 MATE 转运蛋白, VvAM1 和 VvAM3。他们与番茄中 MATE 转运蛋白 SIMTP77 的氨基酸序列一致性分别为 69% 和 67%。2 种 MATE 蛋白均在葡萄果皮中特异性表达。研究表明 VvAM3 的表达水平与花色苷含量一致, 但 VvAM1 表达则与花色苷积累则没有一致性。亚细胞定位结果显示 2 种 MATE 转运蛋白均主要存在于小囊泡, 参与囊泡介导的花色苷转运^[43]。VvAM1 与 VvAM3 在 MgATP 存在条件下特异性运送酰基化花色苷, 但对 Cy3G 等非酰基化花色苷无转运活性^[13]。此外, Pérez-Díaz 等^[44]报道了 2 种与 AtTT12 同源性较高的 MATE 蛋白 VvMATE1(71.3%) 和 VvMATE2(72.8%)。VvMATE1 和 VvMATE2 基因主要在种子发育早期表达, 其表达水平与原花青素积累水平相一致。利用拟南芥原生质体的亚细胞定位实验表明 VvMATE1 蛋白位于液泡膜上而

VvMATE2 则定位于高尔基体中, 表明 2 种 MATE 蛋白可能参与不同路径的类黄酮转运。

利用 AtTT12 氨基酸序列, Frank 等^[45]在苹果中鉴定到 2 个同源 MATE 转运蛋白, MdMATE1 和 MdMATE2, 与 AtTT12 蛋白氨基酸序列一致性分别达 75.1% 和 72.0%。与 MtMATE1 类似, 在 *tt12* 突变株中表达 MdMATE1 或 MdMATE2 蛋白也可修复突变株的表型。

Chen 等^[46]在越橘中克隆得到 8 条 MATE 基因的全长 cDNA 序列。系统发生分析结果表明其中 6 个 MATE 基因属于类黄酮转运蛋白大类。进一步地定量 PCR 结果显示这些 MATE 基因的表达与花色苷积累存在相关性, 说明他们可能参与花色苷的转运过程。

Chen 等^[47]根据 AtTT12 序列在草莓中鉴定到 MATE 蛋白 FaTT12-1。*FaTT12-1* 在草莓营养器官与生殖器官中均有表达, 幼嫩器官中表达量较高。利用病毒介导的基因沉默实验结果显示沉默 *FaTT12-1* 后草莓果实并未产生明显的视觉变化, 花色苷水平无明显差异, 但原花青素含量显著降低。这表明 *FaTT12-1* 可能特异性调控草莓果实原花青素的积累。目前, MATE 家族转运蛋白相关研究工作仅在拟南芥、苜蓿 2 种模式植物及葡萄果实中已取得了系统性的开展, 但在其他植物中相关工作仍不完善, 其转运功能及底物特异性仍需进一步验证。此外, 上述研究显示多种 MATE 转运蛋白特异性转运酰基化花色苷或对酰基化花色苷具有更高转运活性, 花色苷的酰基化如何影响 MATE 蛋白转运活性有待进行深入探讨。

2.4 BTL 介导的花色苷转运

BTL 是存在于鼠肝脏细胞质膜上的转运蛋白, 被证实能够介导花色苷转运^[48]。目前, 植物中花色苷转运相关 BTL 蛋白仅在康乃馨及葡萄中有见报道。Passamonti 等^[49]在康乃馨花瓣中鉴定到一种鼠肝脏 BTL 同系物。免疫荧光实验结果显示该蛋白特异性存在于花瓣表皮细胞中, 推测其可能参与花色苷跨膜转运。在红色葡萄中, Bertolini 等^[50]利用免疫组织化学及免疫化学分析鉴定得到定位于微粒体膜上的 BTL 同系物。该蛋白在果皮及果肉组织中同时存在, 且果皮中含量显著高于果肉中。时空表达分析结果显示其表达水平与果实花色苷积累水平具有显著正相关性, 推测该 BTL 同系物可能参与花色苷转运过程。而在白色葡萄中, BTL 则很有可能参与无色类黄酮及其前体物质的转运^[50]。然而, 上述结果均缺乏直接生物学证据对 BTL 运输功能进行验证。

3 结论与展望

目前, 花色苷转运蛋白相关研究仍处于起步阶段。已知 4 类花色苷转运蛋白中, 仅 GST 及 MATE 蛋白功能在拟南芥、葡萄等个别植物中进行了系统的验证工作, 利用亚

细胞定位、体外酵母转运实验、基因敲除及回补等生物学手段明确了转运蛋白的定位、转运活性及底物特异性, 而 ABC 和 BTL 转运蛋白的研究仍缺乏有力的分子生物学证据。以下方面的研究工作有待未来进一步深入开展: (1) 已有研究表明花色苷转运蛋白具有底物特异性, 一个转运蛋白仅能对一种或少数几种花色苷进行转运。然而, 自然界中存在大量不同花色苷, 一种植物中也存在十几种甚至几十种花色苷, 这意味着可能存在一个巨大的花色苷转运蛋白家族对不同花色苷进行转运。转运蛋白鉴定工作以及相应的底物特异性研究需要进一步开展。(2) 目前所鉴定得到的转运蛋白主要存在于液泡膜上, 个别定位于囊泡或高尔基体中, 而细胞膜上是否存在花色苷转运蛋白, 花色苷是否会在胞间进行传递等问题需要进行进一步的回答。

近年来, 花色苷合成相关转录调控机制研究取得了一定的突破, 多家族转录因子如 MYB、bHLH、WD40 等被陆续证明参与花色苷合成转录调控。然而, 有关花色苷转运蛋白合成相关转录调控机制目前仍少有报道, 相关工作需在未来深入开展。

参考文献

- [1] Stintzing FC, Carle R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition [J]. Trends Food Sci Tech, 2004, 15(1): 19–38.
- [2] Ogata J, Kanno Y, Itoh Y, et al. Anthocyanin biosynthesis in roses [J]. Nature, 2005, 435(7043): 757–758.
- [3] Vanden EW, El ESK. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? [J]. Environ Exp Bot, 2014, 108: 4–13.
- [4] Asad SA, Muhammad S, Farooq M, et al. Anthocyanin production in the hyperaccumulator plant *Nocca caerulea* response to herbivory and zinc stress [J]. Acta Physiol Plant, 2015, 37(1): 1715.
- [5] Belwal T, Nabavi SF, Nabavi SM, et al. Dietary anthocyanins and insulin resistance: when food becomes a medicine [J]. Nutrients, 2017, 9(10): 1111–1118.
- [6] Kent K, Charlton KE, Netzel M, et al. Food-based anthocyanin intake and cognitive outcomes in human intervention trials: a systematic review [J]. J Hum Nutr Diet, 2017, 30(3): 260–274.
- [7] Liu Y, Tikunov Y, Schouten RE, et al. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in *Solanaceous* vegetables: A review [J]. Front Chem, 2018, 6(52): 1–5.
- [8] Pfeiffer P, Hegedus A. Review of the molecular genetics of flavonoid biosynthesis in fruits [J]. Acta Aliment Hung, 2011, 40(1): 150–163.
- [9] Medina PL, Cumpido LG, Amil RF, et al. MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria ananassa* fruits [J]. J Exp Bot, 2014, 65(2): 401–417.
- [10] Czemplak S, Heppel SC, Bogs J. R2R3 MYB transcription factors: key regulators of the flavonoid biosynthetic pathway in grapevine [J]. Protoplasma, 2012, 249(2): 109–118.
- [11] Liu YJ, Hou H, Jiang XL, et al. A WD40 repeat protein from *Camellia sinensis* regulates anthocyanin and proanthocyanidin accumulation through the formation of MYB-bHLH-WD40 ternary complexes [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1686–1689.
- [12] Grotewold E, Davies K. Trafficking and sequestration of anthocyanins [J]. Nat Prod Commun, 2008, 3(8): 1251–1258.
- [13] Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, et al. Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters [J]. Plant Physiol, 2009, 150(1): 402–415.
- [14] Tew KD, Ronai Z. GST function in drug and stress response [J]. Drug Resist Updates, 1999, 2(3): 143–147.
- [15] Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, et al. A glutathione-S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2* [J]. Nature, 1995, 375(6530): 397–400.
- [16] Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, et al. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases [J]. Plant Cell, 1998, 10(7): 1135–1149.
- [17] Larsen ES, Alfenito MR, Briggs WR, et al. A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize *Bz2* and petunia *An9* [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21(9): 900–904.
- [18] Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2004, 37(1): 104–114.
- [19] Conn S, Curtin C, Bezier A, et al. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins [J]. J Exp Bot, 2008, 59(13): 3621–3634.
- [20] Luo HF, Dai C, Li YP, et al. Reduced anthocyanins in petioles codes for a GST anthocyanin transporter that is essential for the foliage and fruit coloration in strawberry [J]. J Exp Bot, 2018, 69(10): 2595–2608.
- [21] Cheng J, Liao L, Zhou H, et al. A small indel mutation in an anthocyanin transporter causes variegated colouration of peach flowers [J]. J Exp Bot, 2015, 66(22): 7227–7239.
- [22] Hu B, Zhao JT, Lai B, et al. LcGST4 is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in litchi *chinensis* Sonn [J]. Plant Cell Rep, 2016, 35(4): 831–843.
- [23] El SI, Liang D, Xu KN. Transcriptome analysis of an apple (*Malus domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation [J]. J Exp Bot, 2015, 66(22): 7359–7376.
- [24] Yazaki K. Transporters of secondary metabolites [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8(3): 301–307.
- [25] Mentewab A, Stewart CN. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(10): 1177.
- [26] Moons A. *Ospdr9*, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots [J]. Febs Lett, 2003, 553(3): 370–376.
- [27] Jenness MK, Carraro N, Pritchard CA, et al. The *Arabidopsis* ATP-BINDING CASSETTE transporter ABCB21 regulates auxin levels in cotyledons, the root pericycle, and leaves [J]. Front Plant Sci, 2019, 10(806): 1–5.
- [28] Lee M, Choi Y, Burla B, et al. The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂ [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(10): 1217–1223.
- [29] Goodman CD, Casati P, Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays* [J]. Plant Cell, 2004,

- 16(7): 1812–1826.
- [30] Zhu QL, Xie XR, Zhang J, *et al.* In silico analysis of a MRP transporter gene reveals its possible role in anthocyanins or flavonoids transport in *Oryza sativa* [J]. *American J Plant Sci*, 2013, 4(3): 555.
- [31] Francisco RM, Regalado A, Ageorges A, *et al.* ABC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-*O*-glucosides [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(5): 1840–1854.
- [32] Morita Y, Kodama K, Shiota S, *et al.* NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 1998, 42(7): 1778–1782.
- [33] Takanashi K, Shitan N, Yazaki K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants [J]. *Plant Biotechnol-Nar*, 2014, 31(5): 417–430.
- [34] Ma QB, Yi R, Li L, *et al.* *GsMATE* encoding a multidrug and toxic compound extrusion transporter enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Bmc Plant Biol*, 2018, 18(212): 2–7.
- [35] Keshewani M, Gromiha MM, Fukui K, *et al.* Identification of novel natural inhibitor for NorM-a multidrug and toxic compound extrusion transporter - an *in silico* molecular modeling and simulation studies [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, 35(1): 58–77.
- [36] Jagessar KL, Mchaourab HS, Claxton DP. The N-terminal domain of an archaeal multidrug and toxin extrusion (MATE) transporter mediates proton coupling required for prokaryotic drug resistance [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(34): 12807–12814.
- [37] Morita M, Shitan N, Sawada K, *et al.* Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum* [J]. *P Natl Acad Sci Usa*, 2009, 106(7): 2447–2452.
- [38] Debeaujon I, Peeters A, Leon-Kloosterziel KM, *et al.* The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(4): 853–871.
- [39] Marinova K, Pourcel L, Weder B, *et al.* The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(6): 2023–2038.
- [40] Zhao J, Dixon RA. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-*O*-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 991–991.
- [41] Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, *et al.* Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1689–1703.
- [42] Zhao J, Huhman D, Shadle G, *et al.* MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1536–1555.
- [43] Gomez C, Conejero G, Torregrosa L, *et al.* In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthomate transporters and GST [J]. *Plant J*, 2011, 67(6): 960–970.
- [44] Perez DR, Ryngajllo M, Perez DJ, *et al.* *VvMATE1* and *VvMATE2* encode putative proanthocyanidin transporters expressed during berry development in *Vitisvinifera* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(7): 1147–1159.
- [45] Frank S, Keck M, Sagasser M, *et al.* Two differentially expressed *MATE* factor genes from apple complement the *Arabidopsis transparent testa12* mutant [J]. *Plant Biol*, 2011, 13(1): 42–50.
- [46] Chen L, Liu YS, Liu HD, *et al.* Identification and expression analysis of MATE genes involved in flavonoid transport in blueberry plants [J]. *PLoS One*, 2015, 10: 1–6.
- [47] Chen SY, Tang YM, Hu YY, *et al.* *FaTT12-1*, a multidrug and toxin extrusion (MATE) member involved in proanthocyanidin transport in strawberry fruits [J]. *Sci Hortic*, 2018, 231: 158–165.
- [48] Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase [J]. *Biochem Bioph Res*, 2002, 296(3): 631–636.
- [49] Passamonti S, Cocolo A, Braidot E, *et al.* Characterization of electrogenicbromosulfophthalein transport in carnation petal microsomes and its inhibition by antibodies against bilitranslocase [J]. *Febs J*, 2005, 272(13): 3282–3296.
- [50] Bertolini A, Peresson C, Petrusa E, *et al.* Identification and localization of the bilitranslocase homologue in white grape berries (*Vitisvinifera* L.) during ripening [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(13): 3861–3871.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李 栋, 博士研究生, 主要研究方向为采后保鲜及采后生物学。
E-mail: dong_li@zju.edu.cn



罗自生, 教授, 主要研究方向为采后保鲜及采后生物学。
E-mail: luozisheng@zju.edu.cn