

植物次生代谢物转运蛋白研究进展

严 黎¹, 张建红¹, 姜 丹², 罗红梅^{1*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

2. 天津药物研究院, 天津 300301

摘 要: 植物在生命活动中产生一系列的次生代谢物, 这些化合物在植物细胞内产生后, 将转运至特定细胞器进行储存, 或被分泌到细胞外。转运蛋白是一类膜蛋白, 可介导生物膜内外化学物质的跨膜转运及信号交换, 在植物次生代谢物的跨膜运输过程中发挥重要作用。阐明植物次生代谢物转运蛋白的转运功能, 有助于解析次生代谢物生物合成及利用途径的分子机制, 为开展药用植物活性次生代谢物的合成生物学研究提供重要元件。详细介绍了转运蛋白的结构与分类, 综述了近年来植物次生代谢物转运蛋白的研究进展, 总结了转运蛋白功能验证的研究方法, 为药用植物次生代谢物的生物合成途径解析及开发利用提供参考。

关键词: 转运蛋白; 次生代谢物; 跨膜运输; ABC 转运蛋白; 次生代谢工程

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)19-5065-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.027

Recent advances for plant secondary metabolite transporters

YAN Li¹, ZHANG Jian-hong¹, JIANG Dan², LUO Hong-mei¹

1. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: Plants produce a series of secondary metabolites in cells. These secondary metabolites will be transported to specific organelles for storage or secreted extracellularly. Transporters are a class of membrane proteins that mediate transmembrane transport of chemicals and intracellular signal exchange, and also play an important role in transmembrane transport of plant secondary metabolites. Identification of the function of the secondary metabolite transporters of medicinal plants will help to elucidate the biosynthetic pathways of secondary metabolites in medicinal plants and the molecular mechanism of the transport process of bioactive compounds. In this review, the structure and classification of plant transporters are described in detail. The research progress of plant secondary metabolic transporters and the methods for functional verification of transporter, which have been summarized in this article, will provide a basis for elucidating the biosynthetic pathways and utilization of secondary metabolites in medicinal plants.

Key words: transporters; secondary metabolites; transmembrane transport; ABC transporters; secondary metabolic engineering

植物细胞能够产生极其多样的特异性代谢产物, 并能够将其中一些代谢产物在细胞中积累至极高的浓度。植物已进化出多种策略来存储这些特异性的代谢物, 如在专门的细胞类型中积累, 或者将其整合在细胞的液泡中。植物次生代谢物是一类非植物生长发育所必需、但对植物适应环境起重要作用的小分子有机化合物, 这些化合物常具有特定的生物活性和较高的药用价值, 被广

泛应用于医药和农药研发以及化工领域。植物次生代谢物在植物细胞内合成后, 被运输到特定的细胞器中积累, 形成亚细胞区隔 (subcellular compartmentalization), 或被分泌到细胞外。转运蛋白在这些次生代谢物的积累、分泌过程中发挥关键作用。

转运蛋白 (transporter) 是一类具有跨膜转运功能的蛋白质, 广泛存在于植物、微生物、动物和人

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31570302); 国家自然科学基金资助项目 (81973422); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2016-I2M-3-016)

作者简介: 严 黎, 在读硕士研究生, 研究方向为药学。Tel: (010)57833085 E-mail: yanli1561@163.com

*通信作者 罗红梅, 研究员, 研究方向为药用植物次生代谢途径解析。Tel: (010)57833116 E-mail: hmluo@implad.ac.cn

类基因组中,在营养物质摄取、代谢产物释放以及信号转导等广泛的细胞活动中起着重要作用。这类蛋白通常以寡聚形式镶嵌于生物膜上,形成特殊的通道结构,介导物质的跨膜运输,是控制细胞物质交换的通道。在自然界,几乎所有具有生命活动的细胞都需要物质的跨膜运输,而在高等生物细胞中物质的跨膜运输更为复杂多样。相比于其他生物,植物具有类型更丰富的转运蛋白,这是植物在适应复杂陆地环境过程中逐渐进化的结果。植物中的转运蛋白定位于植物细胞质膜、液泡膜和其他细胞器膜上,通过调控各个部位特定物质(如次生代谢物、氨基酸、多肽、脂质、金属离子、植物激素等)的摄取和外排,调节细胞内外物质平衡,维持植物各项生理活动正常运行。

转运蛋白最早在原核生物中被发现,在植物中,转运蛋白的研究相对较为滞后。酵母和人类基因组转运蛋白家族的鉴定为植物转运蛋白研究提供了良好参考。人体转运蛋白缺陷可导致某些疾病(如唐氏综合症等);转运蛋白还可作为药物作用靶点,用于新型靶向药物的研发。植物中转运蛋白参与一些重要的基础生理过程,如花粉管发育、生长素运输、气孔运动以及植物防御等。解析转运蛋白功能有利于全面阐释植物生理活动的分子机制,并可将转运蛋白运用于合成生物学、基因工程应用研究,提高目标产物的产量,改良植物表型。本文将从植物转运蛋白分类和结构、转运蛋白功能、植物次生代谢产物转运蛋白研究进展以及转运蛋白研究方法等方面重点综述植物次生代谢物转运蛋白的研究进展,为开展药用植物重要活性次生代谢物的代谢工程以及合成生物学研究提供参考。

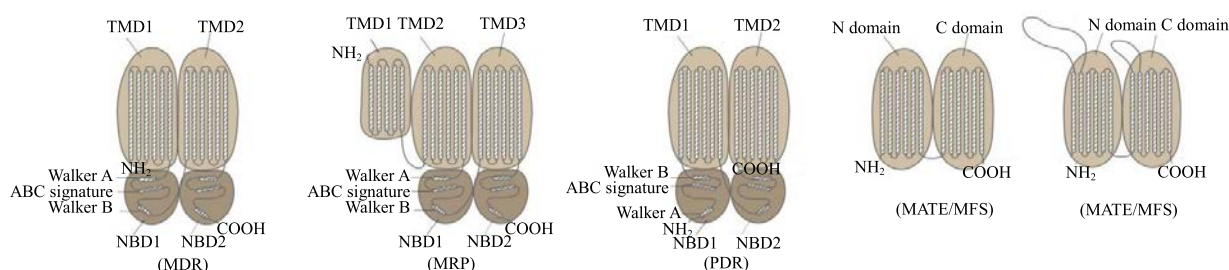
1 转运蛋白分类和结构

转运蛋白根据其是否具有与 ATP 结合的结构域可以分为 2 大类,一类是 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette, ABC),这类蛋白具有与 ATP 结合的结构域,其转运过程通过水解 ATP 获取能量;另一类是 H^+/Na^+ 梯度依赖转运蛋白,这类蛋白的转运过程依赖于离子交换。在过去的 20 年里,通过 X 射线晶体学鉴定的高分辨率转运蛋白的晶体结构的数量迅速增长,建立了大量转运蛋白的三维结构模型^[1]。

1.1 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白又称 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporters),因具有与 ATP 结合的结构域而得名。ABC 转运蛋白是一个庞大的蛋白家族,与动物和微藻等真核生物相比,植物拥有数量更多、功能更复杂的 ABC 转运蛋白^[2]。在拟南芥和水稻基因组中包含 120 个以上的 ABC 转运蛋白^[3],而目前已知人类基因组中有 48 个,酵母基因组中有大约 31 个该类转运蛋白。植物中 ABC 转运蛋白的这种进化趋势有利于植物适应复杂的陆地环境。在植物中,ABC 转运蛋白广泛存在于细胞质膜、液泡膜、线粒体内膜、叶绿体内膜和过氧化物酶体膜^[4-5],参与脂质、氨基酸、有机酸、重金属螯合物、多肽、生物碱、类固醇等物质的转运^[6];在植物对病原体的免疫应答、植物对食草动物防御、响应非生物环境胁迫(如紫外线照射)、调节植物生长发育等方面发挥重要作用^[7]。

ABC 转运蛋白一般由跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和核苷酸结合结构域(nucleotide-binding domain, NBD)组合形成(图 1)。这 2 种结构域有多种组合形式:包含 2 个 TMD



TMD-跨膜结构域 NBD-核苷酸结合结构域 Walker A、Walker B 和 ABC signature 为 NBD 包含的 3 个保守基序 TMD 和 NBD 按正向顺序排列表示为 TMD1-NBD1-TMD2-NBD2,按反向顺序排列表示为 NBD1-TMD1-NBD2-TMD2 MDR-多药耐药转运蛋白 MRP-多药耐药相关蛋白 PDR-多向抗药性转运蛋白 MATE-多药和有毒物排出家族 MFS-主要协助转运蛋白超家族 RND-抗性/结瘤/细胞分裂家族

TMD:transmembrane domain; NBD:nucleotide-binding domain; Walker A, Walker B and ABC signature are three conserved motifs contained in NBD; TMD and NBD are arranged in forward order as TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, and reverse order as NBD1-TMD1-NBD2-TMD2; MDR: multidrug resistance homolog; MRP: multidrug resistance-associated protein; PDR: pleiotropic drug resistance; MATE: multidrug and toxic compound extrusion family; MFS: major facilitator superfamily; RND: resistance/nodulation/cell division family

图 1 转运蛋白结构

Fig. 1 Structure of transporters

和 2 个 NBD 的转运蛋白为全转运子；而只含有 1 个 TMD 和 1 个 NBD 的转运蛋白称为半转运子^[5]，这些半转运子常以二聚体形式行使功能，相同的 2 个半转运子聚集为同型二聚体，不同的 2 个半转运子聚集为异型二聚体^[8]。只有 NBD 结构域的转运蛋白，可能不具有运输功能。对于全转运子，NBD 结构域嵌于细胞膜内侧，具有亲水性，包含几个序列高度保守的基序，如 Walker A、ABC 蛋白标签(ABC signature) 和 Walker B、以及保守性略差的 H 环、Q 环等基序^[9]。TMD 通常含有 6 个(螺旋片段，这些螺旋片段形成底物分子运输通道，并参与底物识

别^[10]。当底物与 TMD 结合后，将信号传递给 NBD；通常由 2 个 NBD 共同结合并水解 ATP 以提供能量，从而推动 TMD 构象发生变化，完成底物的跨膜转运^[11]，如图 2 所示。原核生物在向细胞内转运物质的过程中，有底物结合蛋白(substrate-binding protein, SBP)参与转运过程^[12]。转运蛋白具有特异性转运具有特殊结构物质的特点，同时具有底物立体结构专一性，即仅能转运底物，而不能转运底物的手型异构分子。在某些转运蛋白中还观察到共转运现象，即在某种转运底物存在的情况下，才能对另一种物质进行运输^[13]。

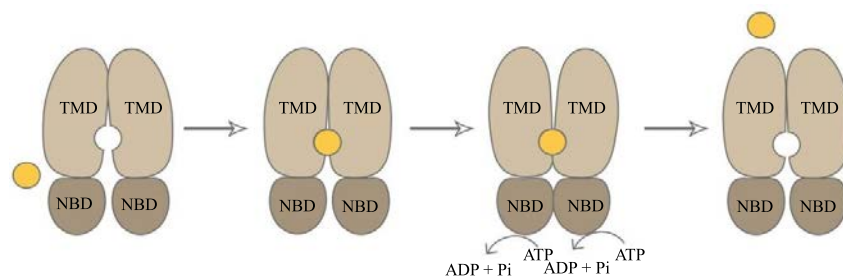


图 2 MDR 转运过程

Fig. 2 Transport process of MDR

对于大多数真核生物的 ABC 转运蛋白，2 个 TMD 和 2 个 NBD 这 4 个结构域通常在单个多肽上连续排列：一种是以正向顺序排列(TMD-NBD-TMD-NBD)，如多药耐药转运蛋白(multidrug resistance homolog, MDR)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)，但 MRP 相比 MDR 在 N 端多出 5 个跨膜 α 螺旋组成的 TMD 结构域；另一种是以反向顺序排列(NBD-TMD-NBD-TMD)，如多向抗药性转运蛋白(pleiotropic drug resistance, PDR)^[14]。在植物次生代谢物转运过程中研究的最广泛的 ABC 蛋白为 PDR、MDR 和 MRP 类转运蛋白^[10]。

对于 ABC 转运蛋白，通常根据转运特性、参与的生理过程以及转运底物等对其命名，如 Sánchez-Fernández、TC、ABCISSE 等命名系统，其中 Sánchez-Fernández 命名系统包含了大多数已知的转运蛋白。现统一采用国际人类基因组组织(The Human Genome Organisation, HUGO)认可的亚科命名法，这种方法根据 NBD 氨基酸序列的系统发育相关性，可将大多数真核生物的 ABC 转运蛋白家族分为 8 个亚家族(即 ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ADCE、ABCF、ABCG 和 ABCH)，但植

物中没有 ABCH 亚家族。表 1 显示了 HUGO 命名的亚家族与 Sánchez-Fernández 命名的亚家族的对应关系^[15]。

1.2 H^+/Na^+ 梯度依赖转运蛋白

H^+/Na^+ 梯度依赖转运蛋白包含“多药和有毒物排出家族”(multidrug and toxic compound extrusion family, MATE)、“主要协助转运蛋白超家族”(major facilitator superfamily, MFS)、“小多药耐药家族”(small multidrug resistance family, SMR)、以及“抗性/结瘤/细胞分裂家族”(resistance/nodulation/cell division family, RND)，后 3 种为 H^+ 依赖型转运蛋白，又称为质子依赖性转运蛋白。

MATE 家族转运蛋白广泛分布于原核生物和真核生物中，定位于细胞质膜、液泡膜、高尔基膜及囊泡膜等^[16]。这类转运蛋白具有较强的底物特异性，在外源性物质的排出、金属离子转运、重金属解毒、体内营养平衡和激素信号转导等广泛的生理过程中发挥作用^[17-18]。蛋白结构分析表明，MATE 家族转运蛋白通常有 12 个跨膜片段(transmembrane segment, TMS)，形成两个相似的平行排列的结构域即 N 端结构域(TM1-TM 6)和 C 端结构域(TM7-TM 12)。在 MFS 家族的膜转运蛋白中也可以

表 1 HUGO 分类系统和 Sánchez-Fernández 分类系统对照

Table 1 A comparison of HUGO subfamily and Sánchez - Fernández subfamily

HUGO 分类系统	Sánchez-Fernández 分类系统
ABCA	AOH (ABC one homologs)、ATH (ABC two homologs)
ABCB	MDR (Multidrug resistance homolog)、ATM (ABC transporter of the mitochondria)、TAP (Transporter associated with antigen processing)
ABCC	MRP (Multidrug resistance associated protein)
ABCD	PMP (Peroxisomal membrane protein)
ABCE	RLI (RNase L inhibitor)
ABCF	GCN (General control non-repressible)
ABCG	WBC (White-brown complex homologue)、PDR (Pleiotropic drug resistance)
ABCH	无

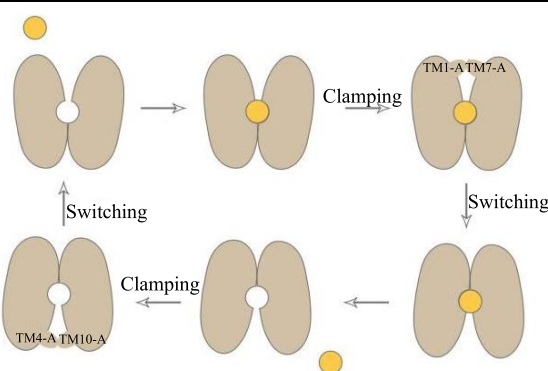
观察到相似平行排列的结构域^[19]。在对拟南芥 AtDTX14 (MATE 亚家族) 蛋白结构的研究中发现, 该蛋白的转运过程有“向内开放”和“向外开放”的构象变化, 这是该类转运蛋白转运底物的重要机制^[20]。

MFS 参与细胞外排过程, 有多种底物, 从小分子 (包括有机和无机离子) 到复杂的生物大分子 (如肽和脂质分子) 等均可作为该类转运蛋白的底物^[21]。这类转运蛋白具有 12 或 14 个跨膜片段, 同样具有 N 端结构域和 C 端结构域 (图 1)。MFS 符合早期提出的“摇臂开关”模型 (the rocker-switch model), 将 N 端结构域和 C 端结构域聚合界面上的中心结合位点作为旋转轴, 通过在这个旋转轴上摇动 N 端结构域和 C 端结构域, 使转运蛋白发生构象变化, 从而实现底物在膜另一侧的释放^[22]。Quistgaard 等^[23]结合以观察到的蛋白质构象变化, 提出“钳位开关”模型 (the clamp-and-switch model), 对“摇臂开关”模型进行修正。这种模型表明转运蛋白的转运过程需要经过一个构象循环, 包括向内打开、向内关闭、向外打开和向外关闭 4 种状态来完成底物转运的过程, 在向内关闭和向外关闭的过程, 主要由“门控残基” (gating residues) 形成“钳位结构”^[24], 如图 3 所示。RND 家族也具有底物特异性, 预测其结构域包含 12 个跨膜片段, 其中在 TM1-TM2 和 TM7-TM8 之间有 2 个“大环”。SMR 家族蛋白是结构域数量最少的 H⁺/Na⁺ 梯度依赖转运蛋白, 仅有 4 个跨膜片段。

2 转运蛋白的功能

2.1 跨膜运输

物质有多种跨膜转运方式, 如物质的自由扩散、以及胞吞、胞吐等过程, 而转运蛋白介导的跨膜物质运输是一种有选择性的定向运输方式, 尤其在生



A-门控残基的一部分, 参与门控残基之间的相互作用 TM1-A-TM1 上 A 基序 TM4-A-TM4 上的 A 基序 TM7-A-TM7 上的 A 基序 TM10-A-TM10 上的 A 基序
A-motif is a part of gate residues and participates in gating residues interactions TM1-A-A-motif in TM1 TM4-A-A-motif in TM4 TM7-A-A-motif in TM7 TM10-A-A-motif in TM10

图 3 MFS 转运过程

Fig. 3 Transport process of MFS

物活性物质的转运过程中发挥重要作用。转运蛋白可转运的物质种类非常广泛, 从小分子物质到部分大分子物质 (如次生代谢物、初生代谢物、金属离子、植物激素、氨基酸、多肽、脂质和表面蜡质等)^[25-26]。植物产生的次生代谢物可能对植物本身有害, 如生物碱类, 植物体内存在着“自我耐受”机制来调控和适应这些化合物, 并通过转运蛋白将这些物质转运到特定细胞器 (如液泡) 储存, 形成亚细胞区隔, 保护植物细胞免受损害^[27]。转运蛋白不仅参与物质在细胞内的运输与分布, 还参与邻接组织之间的物质分配, 以及物质从“源”到“库”的积累等过程。跨膜运输是转运蛋白的基本功能, 转运蛋白通过控制特定化合物的摄取和外排, 对组织、器官、细胞、以及亚细胞水平的物质进行调控, 进而影响植物生长发育等生理过程。

2.2 生长调节

转运蛋白参与了植物生长发育过程中的大多数生理过程,对生命周期各个阶段物质的转运和分配有重要作用。转运蛋白是细胞的“门户”,是信号分子进入到细胞的第 1 个通道。MATE 蛋白通过控制植物激素转运而影响植物顶端生长和衰老过程来调控植物的生长发育^[28]。ABCB 亚家族也有相似功能,参与生长素的极性运输^[29]。转运蛋白还参与营养物质的吸收,如葡萄糖的摄取、根对无机盐的吸收,以及表面蜡质的沉积、种子中植酸(phytate)的积累等过程^[30]。

除了植物本身固有的生理活动,转运蛋白还在植物与环境的互作中起着重要作用,如落叶期液泡中花青素的积累、受到昆虫啃食后防御物质的分泌、干旱时保卫细胞的运动等过程均需要转运蛋白的参与。这些转运蛋白帮助植物适应环境胁迫,有效提高植物抗逆性。

2.3 其他作用

也有许多 ABC 转运蛋白不参与物质运输,而是参与 DNA 修复、基因表达的转录和调控等细胞过程^[31]。ABC 转运蛋白还可作为膜定位导入物(localized membrane importers),存在于内质网上特定结构域,参与细胞自噬过程,这种活性的内质网结构域可能会在液泡中形成管状的液泡内陷,将花青素等次生代谢物包装成自噬体样容器,这可能是液泡和外泌体囊泡发生的重要机制^[12]。

3 植物次生代谢物的跨膜转运蛋白

植物的次生代谢物具有不同生物活性,一些次生代谢物可能在植物体内有减少紫外线伤害、保护植物免受病原体和食草动物侵害的作用;也有一些次生代谢物可能是植物与其他生物体相互作用的必要介质,如化感物质或昆虫引诱剂以促进植物授粉等。这些次生代谢物功能的实现,与这些化合物的积累和分泌过程的调控密切相关^[7]。植物次生代谢物有许多种类,根据生源途径可将植物的主要次生代谢物分为生物碱、萜类化合物、酚类化合物等三大类。

3.1 生物碱类化合物转运蛋白

生物碱(alkaloids)是一类含氮的碱性有机化合物,有着与碱相似的化学性质,是一类活跃的化学物质,同时也具有很高的药用价值,如长春碱、小檗碱等。在植物中,生物碱可能具有防御功能,如卡美拉辛、辣椒醇、尼古丁等。植物合成的一些

生物碱可能对植物细胞有潜在毒性,在合成后需被运输储存至特定细胞器(如液泡);或者通过长距离运输,转运至特定的器官(如根或叶片)进行积累^[32]。目前,鉴定到一些参与生物碱类化合物转运的转运蛋白(表 2)。

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 是长春碱或长春新碱的主要植物来源,而长春碱和长春新碱可作为治疗各种癌症的天然药物。长春碱或长春新碱由吲哚生物碱合成途径(terpenoid indole alkaloid, TIA)产生。Champagne 等^[33]对长春花蛋白质组进行了检测,通过双向荧光差异凝胶电泳(two-dimensional differential gel electrophoresis, 2D-DIGE)对 2 种产生萜类吲哚生物碱的不同独立细胞系进行比较蛋白质组分析,发现 358 个蛋白质在数量上至少有 2 倍的差异。并从 1 663 种蛋白质中筛选到了 16 种可能参与次生代谢物转运的蛋白。一些单萜吲哚生物碱,包括重要的化疗药物长春碱、长春新碱和其他衍生物都是由长春质碱(catharanthine)和文多灵(vindoline)偶联而来。Yu 等^[34]鉴定到一种主要在幼叶表皮表达的长春碱转运蛋白 CrTPT2,利用长春碱处理可激活 CrTPT2 基因的表达,增加了植物叶片中长春质碱-文多灵二聚体的水平。系统发育分析表明,CrTPT2 与植物参与表皮分泌的关键转运蛋白相似,可能是单萜吲哚生物碱合成途径(monoterpenoid indole alkaloids, MIAs)特有的转运蛋白,介导植物生物碱的分泌。

Miao 等^[35]在雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中克隆到一种 MDR 转运蛋白 TwMDR1,该转运蛋白能运输雷公藤次碱(wilforine)和雷公藤晋碱(wilforgine)进入毛状根;过表达 TwMDR1 的烟草细胞能有效地向细胞内部转运雷公藤次碱和雷公藤晋碱,在雷公藤悬浮细胞中沉默表达 TwMDR1,增加了雷公藤次碱和雷公藤晋碱分泌。

卡美拉辛(camalexin)是一种与植物防御相关的生物碱,Khare 等^[36]在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 叶中发现,AtABCG34 能特异性转运卡美拉辛。AtABCG34 突变体分泌的卡美拉辛较少,对病原菌高度敏感;而过表达 AtABCG34 的植物分泌更多的卡美拉辛到叶片表面,对病原菌有更强的抵抗力;外源性卡美拉辛处理后,AtABCG34 突变体表现出敏感性。

辣椒碱(capsidiol)产生于被病原菌侵袭的植

物组织中,通过抑制病原菌生长,在入侵后的植物体内发挥防御作用。Shibata 等^[37]利用病毒诱导基因沉默的筛选方法,在本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* L. 中鉴定了 2 个基因 NbABCG1 和 NbABCG2,在病原菌侵染部位观察到这 2 个基因编码的转运蛋白在细胞膜处大量积累;功能验证实验结果表明这两种转运蛋白可能参与了辣椒碱的分泌。Bienert 等^[38]在烟草 *Nicotiana tabacum* L. 植株中发现,沉默表达 NtABCG5,导致转基因烟草植株对尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schl. 的敏感性略有增加,且更易生长烟草天蛾幼虫,表明这种 NtABCG5 转运蛋白参与了烟草对草食性天蛾的抗性反应。

尼古丁(nicotine)是一种吡啶生物碱,植物产生的尼古丁有防御草食性动物的作用。在烟草中,尼古丁产生于根部,通过木质部长距离运输,主要在叶片中积累。Morita 等^[39]研究发现,NtJAT1 和 NtJAT2 这 2 种 MATE 转运蛋白参与这一转运过程。

NtJAT1 在烟草根、茎、叶中均有表达,并定位于叶片细胞的胞质中;可以识别烟草内源性生物碱,介导生物碱在或叶片表面的分泌和在液泡中的积累。而在酵母细胞中表达的 NtJAT1 主要定位于细胞膜上,具有外排尼古丁的活性。NtJAT2 定位于叶片的液泡膜,能将尼古丁转运到液泡中,对叶片中烟碱的分布发挥调节作用^[40]。Shoji 等^[41]验证了在烟草根中与尼古丁转运相关的 MATE 转运蛋白 NtMATE1 和 NtMATE2,特异性表达于根部,能将尼古丁从细胞质转运至液泡中储存。

Shitan 等^[42]在黄连 *Coptis japonica* Makino 中验证了 CjABCB2 的功能,Northern 杂交分析表明,CjABCB2 在小檗碱的库器官根茎中表达丰度较高。膜分离(membrane separation)和原位杂交(*in situ* hybridization)结果表明,在小檗碱由根向根茎转运的过程中,CjABCB2 可能参与小檗碱在根茎木质部周围细胞的跨膜转运。

表 2 生物碱转运蛋白

Table 2 Transporters of alkaloid compounds

转运蛋白名称	类型	表达部位	植物来源	功能	文献
TwMDR1	ABCB	叶	雷公藤	向细胞内转运雷公藤次碱、雷公藤晋碱	35
AtABCG34	ABCG	叶	拟南芥	分泌卡美拉辛	36
NbABCG1	ABCG	叶	本氏烟草	转运辣椒醇	37
NbABCG2	ABCG	叶	本氏烟草	转运辣椒醇	37
NtABCG5	ABCG	叶	本氏烟草	转运一种未查明的杀虫化合物	38
JAT1	MATE	根、茎、叶	烟草	转运尼古丁至绿叶液泡中积累	39
JAT2	MATE	叶	烟草	转运尼古丁至叶片液泡中的积累	40
MATE1	MATE	根	烟草	转运尼古丁至液泡中的积累	41
MATE2	MATE	根	烟草	转运尼古丁至液泡中的积累	41
CjABCB2	ABCB	根	黄连	转运小檗碱	42

3.2 萜类化合物转运蛋白

萜类化合物(terpenoids)是由异戊二烯单元组成的复杂化合物,多数以各种含氧衍生物如醇、酮、酯类及糖苷的形式存在,该类化合物是植物次生代谢物种类最多的一类化合物,现已知的萜类化合物已超过 3 万种。植物产生的萜类化合物具有强烈的抑菌杀菌、防御和趋避害虫的作用,帮助植物适应环境,并能促进植物生长发育^[43]。植物中,参与萜类化合物转运的相关蛋白列于表 3。

Crouzet 等^[44]以 MeJA、萘乙酸和二萜化合物为诱导剂,观察了这些诱导剂对烟草 BY2 细胞诱导分泌的效果,发现 NtPDR1 的异源表达增加了烟草细

胞对二萜的耐受性。蛋白质印迹分析和原位免疫杂交定位显示 NtPDR1 定位于细胞膜;NtPDR1 可转运二萜化合物,进而通过转运该类化合物参与植物防御。

在非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 卵母细胞中表达的拟南芥转运蛋白 AtNPF2.9 可向胞内运输环烯醚萜苷类。Larsen 等^[45]在长春花中鉴定了 8 条 AtNPF2.9 同源序列,其中 CrNPF2.4、CrNPF2.5 和 CrNPF2.6 能够将环烯醚萜苷-7-脱氧葡萄糖酸(iridoid glucosides 7-deoxyloganic acid)、马钱子苷酸(loganic acid)、马钱子苷(loganin)和裂环马钱子苷(secologanin)转运至卵母细胞。这 3 种转运蛋

表 3 萜类化合物转运蛋白
Table 3 Transporters of terpenoid

转运蛋白名称	类型	表达部位	植物来源	功能	文献
NtPDR1	ABCG	侧根和长有腺毛的叶	烟草 BY2	悬浮细胞通过转运二萜参与植物防御	44
CrNPF2.4、CrNPF2.5、CrNPF2.6	NPF	叶	长春花	转运环烯醚萜苷 7-脱氧葡萄糖酸、马钱子苷酸、马钱子苷和裂环马钱子苷至卵母细胞	45
PgPDR3	ABCG	根和不定根	人参	转运人参次生代谢物（可能转运人参皂苷）	47
CsABCC4a	ABCC	柱头	西红花	转运西红花苷至液泡中积累	48

白不仅转运单一物质，而且还转运多种中间产物。

张儒等^[46]根据 PDR 基因保守的区域设计简并引物，并在人参 *Panax ginseng* 中克隆到一条转运蛋白 PgPDR 基因，该转运蛋白 C 端具有 Walker A、ABC 标签和 Walker B 这 3 个保守结构域，与 AtPDR1 的氨基酸序列相似性可达到 86%。半定量 RT-PCR 证实 PgPDR 的表达受 MeJA 诱导，与 MeJA 诱导的人参皂苷合成酶基因表达有相似的变化趋势。推测 PgPDR 可能与人参皂苷合成途径有关^[46]。Zhang 等^[47]在 MeJA 处理的人参细胞中检测到一个 PDR 转运蛋白 PgPDR3，并对其全长 cDNA 进行了克隆，与其他植物 PDR 具有高度相似性，同样也具有 C 端 Walker A、ABC 标签和 Walker B 这 3 个保守结构域。实时定量 PCR（quantitative RT-PCR）分析表明，MeJA 处理后，相比于人参的叶、种子和芽，在根和不定根中 PgPDR3 基因被强烈诱导表达，这暗示 PgPDR3 基因在 MeJA 诱导的人参细胞次生代谢物的积累

过程中具有潜在作用。

Demurtas 等^[48]在西红花 *Crocus sativus* L. 中验证了西红花苷转运蛋白 CsABCC4a，该蛋白与西红花苷在柱头液泡中的积累密切相关。CsABCC4a 融合 GFP 转入烟草中表达，观察到该基因主要表达于液泡膜。该基因在酵母中表达后，提取酵母微粒体进行转运分析，可检测到 CsABCC4a 高效转运顺式西红花苷。该研究发现 CsABCC4a 具有共转运现象，只存在反式西红花苷时不能对其进行转运。在顺式西红花苷存在的条件下，才能对反式西红花苷进行转运。

3.3 酚类化合物转运蛋白

酚类化合物（phenol compounds）具有抗氧化作用、抗癌、抗逆等作用^[49]。广义的酚类化合物包括黄酮类、简单酚类及醌类化合物。黄酮类化合物是植物界中分布最为广泛的酚类化合物，以色原酮为基础，在药用植物中多以糖甙的形式存在，如紫草素、花青素、香豆素等，具有重要的药理活性^[50]。已鉴定的参与酚类化合物转运的转运蛋白如表 4 所示。

表 4 酚类化合物转运蛋白
Table 4 Transporters of phenol compound

转运蛋白名称	类型	表达部位	植物来源	功能	文献
LeMRP	ABCC	叶	紫草	转运紫草素	51
VcMATEs	MATE	果	蓝莓	可能参与类黄酮的转运	52
Fett12	MATE	根、茎、叶、花	荞麦	转运原花青素	53
DTX18	MATE	叶	拟南芥	向外转运香豆素	54
MtABCG10	ABCG	根	蒺藜苜蓿	转运类黄酮	55
PhPDR2	ABCG	叶和毛状体	矮牵牛	表达于叶柄的毛状体，向细胞外分泌矮牵牛甙酮和矮牵牛苷	56

紫草素（shikonin）及其衍生物是紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Gaertn. 根中重要的次生代谢物，LeMRP 是从紫草中分离出的一种 ABC 转运蛋白基因。在酵母细胞异源表达系统中进行功能验证表明 LeMRP 可能参与紫草素转运。在转基因紫草毛状根（hairy roots）中，LeMRP 过表达比对照株系产生更多紫草素。RT-PCR 结果显示，LeMRP 过表达株系中 4 个参与紫草素生物合成的关键酶基

因（LePAL、HMGR、Le4CL、LePGT）表达显著上调。LeMRP RNAi 转基因株系降低了中紫草素的积累，有效下调了上述 4 个关键酶基因的表达水平。利用 ABC 蛋白抑制剂，如叠氮（azide）和丁硫氨酸亚砷胺（buthionine sulfoximine）处理毛状根，可显著抑制紫草素在毛状根中的积累^[51]。

Chen 等^[52]在蓝莓 *Vaccinium spp* L. 果实转录组中发现 33 个 MATE 转运蛋白基因，这些 MATE 可

能参与了类黄酮化合物的转运；其中 8 个全长的 MATE 基因被克隆。系统发育分析表明，VcMATE2、VcMATE3、VcMATE5、VcMATE7、VcMATE8、VcMATE9 与类黄酮转运蛋白聚类较近，可能参与了类黄酮的转运；VcMATE1 和 VcMATE4 可能参与与其他次生代谢物的转运或有毒阳离子的外排。qPCR 实验结果表明，8 个 VcMATE 基因的表达谱与花青素的积累呈现相关性。

常雪玲等^[53]在荞麦 *Fagopyrum esculentum* L. 中克隆到 2 种 MATE 蛋白基因，分别为 FeTT12 和 FeMATE3。FeTT12 是一种花青素转运蛋白，系统进化分析显示 FeTT12 与其他物种，如川桑 *Morus notabilis* L. MnTT12 蛋白同源性的 77.3%，与拟南芥 TT12 蛋白同源性为 41.5%。表达分析表明 FeTT12 在荞麦叶中高表达，FeMATE3 与 FeMATE2 序列相似性达到 96.33%，后者与 Al^{3+} 胁迫相关，推测 FeMATE3 可能参与荞麦的 Al^{3+} 胁迫响应。

香豆素具有抑制害虫孢子萌发的作用，Dobritzsch 等^[54]在拟南芥疫霉菌孢子处理的叶片进行代谢物分析，可检测到羟基肉桂酸酰胺香豆素。将香豆素的生物合成途径的香豆蔻酰基辅酶 A (agmatine N4-p-coumaroyl transferase ACT) 和 MATE 型转运蛋白 DTX18 转入马铃薯中，发现转基因马铃薯分泌较高水平的胍基丁胺 (agmatine) 和腐胺 (putrescine) 偶联物，并产生了疫霉病抗性，说明 DTX18 是一种特异性较强的羟基肉桂酸酰胺转运蛋白。

Banasiak 等^[55]在对豆科植物蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn 的研究中发现，真菌多糖处理蒺藜苜蓿根系，会提高 MtABCG10 基因的表达水平。在蒺藜苜蓿毛状根中沉默表达 MtABCG10 导致苯丙氨酸途径衍生的苯丙素类 (phenylpropanoid) 及其前体的积累降低且易受镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schl. 的侵染，分析结果表明 MtABCG10 可能在植物防御反应过程中调节类黄酮的合成和积累水平。

矮牵牛酮 (petuniasterone) 和矮牵牛苷 (petuniolide) 是矮牵牛 *Petunia axillaris* (J. D. Hooker) Vilmorin 对抗昆虫的有效毒素。在矮牵牛中鉴定到 PhPDR2 基因主要表达于叶柄的多细胞腺毛中，与表皮毛的化学防御相关。通过 RNA 干扰下调 PhPDR2 的表达，转基因植株对叶食多翅目昆虫 *Spodoptera littoralis* 的敏感性显著提高，而矮牵牛酮和矮牵牛苷的含量在转基因植株显著

降低。这些研究结果表明，PhPDR2 在调控矮牵牛叶片和毛状体 (trichomes) 中矮牵牛酮水平方面发挥主导作用，从而提高了矮牵牛的耐草食性 (herbivory resistance) 的能力^[56]。

4 转运蛋白研究方法

4.1 基因预测分析

植物次生代谢物的生物合成途径通常与转运蛋白密切相关，因此，转运蛋白通常与其转运底物的合成酶的表达水平呈现一致性^[57]。在西红花中，通过转运蛋白基因与西红花苷合成上游途径酶 CsCCD2 基因的表达相关性分析 ($\rho=0.99$)，初步预测了转运蛋白 CsABCC4a 与西红花苷合成和积累具有相关性^[48]，转录组差异基因表达分析、全基因组扫描 (genome-wide scanning) 分析、结合基因本体论 (Gene Ontology, GO) 分析、基因组通路分析 (KEGG)、同源性搜索等方法^[58-59]已广泛应用于转运蛋白的基因鉴定研究中。在铁皮石斛基因组和转录组数据中，初步鉴定了 88 个铁皮石斛 ABC 转运蛋白，基于蛋白同源性分析，预测到 4 个参与脱落酸、生长素等激素运输的转运蛋白^[60]。

采用 2D-DIGE 技术可以对不同代谢途径的独立细胞系的蛋白质组进行比较，对差异表达的蛋白初步筛选。对 2 种不同萜类呾生物碱代谢的独立细胞系的蛋白质组进行比较，发现差异蛋白^[33]。转运蛋白通常具有与功能相关的特异性结构域，可通过与已知功能的转运蛋白进行同源性分析和蛋白质结构域分析等方法预测未知转运蛋白的功能。通过与拟南芥基因组对比，在番茄基因组中鉴定了 154 个 ABC 转运蛋白，并通过系统发育分析，预测了部分蛋白的功能^[61]。

电生理学方法可用来测定转运蛋白的结构动力学性质，但在低转运效率 (low turnover) 的转运蛋白或来自细菌和细胞器的转运蛋白的应用上具有一定局限性。固体支持膜 (solid-supported membrane, SSM) 是一种敏感的、无细胞的电生理检测技术，从细胞培养或天然组织中重组脂质蛋白体或囊泡的纯化蛋白被吸附到含有 SSM 的传感器上，底物或配体通过快速的溶液交换，由传感器记录瞬时电流。目前利用这项技术测量了大约 100 种不同的转运蛋白，包括共转运蛋白、离子泵和离子通道等^[62]。

4.2 蛋白定位分析

一些常见的方法可用于确定转运蛋白的亚细胞定位和表达部位，如 GFP 融合蛋白亚细胞定位检测

技术,融合 GFP 的目的蛋白与 Marker 蛋白(如 FM4-64 为细胞膜定位, γ TIP-RFP 为液泡膜定位, CFP-HDEL 为内质网定位)进行共定位检测,可对目的蛋白的亚细胞表达部位进行鉴定。在烟草中表达 NtABCG5-GFP 融合蛋白,结果显示烟草 NtABCG5 与 FM4-64 共定位系数最高,可推定该蛋白定位于细胞膜。GUS 染色技术可用于确定蛋白表达的组织部位。在 NtABCG5 的启动子控制下, GUS 的免疫印迹结果显示, NtABCG5 转基因植株与野生型植株相比,该基因在根、茎和花中均有较高表达水平,但在叶片中仅在叶缘表达^[38]。

4.3 功能验证

基因敲除技术(knockout)可验证相关的摄取类转运蛋白的功能,利用单个基因敲除并结合表型分析,选择性的筛选具有特定功能的蛋白是一个比较便捷的方法^[63]。在一个基于基因组学构建的酵母基因缺失突变体中,利用竞争实验和细胞毒性进行筛选,测试了 26 种不同的药物,并确定了 18 种底物进入酵母细胞所需的转运蛋白^[64]。

但大多数植物基因组都比较复杂,而且没有完整的基因组序列信息,因此构建突变体的方法非常困难。激素诱导促进目的基因过表达,也是一个常用的验证转运蛋白功能的方法。通过对过表达株系的表型观测、基因表达量检测以及相关产物的变化可对转运蛋白功能进行鉴定。茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、茉莉酸(jasmonate, JA)等为常见的诱导激素,不同诱导剂的处理效果可能会有一定差异。Khare 等^[36]在验证抗菌转运蛋白实验中,使用 MeJA 处理拟南芥后, AtABCG34 的表达在 1 h 增加 7 倍,水杨酸处理后, AtABCG34 的表达只少量增加。在某些信号通路中, MeJA 诱导可能没有效果。例如,在蒺藜苜蓿中, MeJA 和其他胁迫因子如 SA 或脱落酸的诱导处理对 MtABCG10 的表达无明显影响,其原因可能是因为 MtABCG10 启动子区的 W-box 顺式作用元件的核心 TGAC 基序被 WRKY 转录因子识别,推测 MtABCG10 的表达可能受 PAMP(pathogen-associated molecular patterns)/MAPK/WRKY 信号通路的影响,与 MeJA 和 SA 介导的通路无关^[55]。JA 是一种植物激素,在多种植物发育过程和防御反应中起着第二信使的作用,也可用于特定植物转运蛋白的诱导表达^[65]。

烟草 BY2 (N. tabacum cv. Bright Yellow 2, BY2)

悬浮细胞系是一种植物细胞模型, BY2 细胞可以运用于研究植物转运蛋白,在烟草 BY2 细胞系中验证了水稻 OsHAK5 对钾盐运输的功能,增强了转基因 BY2 细胞抗盐胁迫的作用^[66]。在烟草 BY2 细胞系中验证了酵母 PDR5 基因的功能,通过检测 PDR5 转基因 BY2 细胞排出成分,可验证 PDR5 的转入提高了植物悬浮培养细胞中次生代谢物的分泌水平^[67]。

5 结语与展望

植物次生代谢物通常具有多种生物活性,尤其是药用植物中的生物碱、萜类化合物等,在医药、农药和化工等领域广泛应用,而天然的次生代谢物在植物中积累的水平极低。现代药物研发仍然主要依赖于从植物中提取天然药用成分。从植物中分离目的产物的量极为有限,目前可通过合成生物学方法提高目的产物的产量^[68],转运蛋白的运用可提高工程菌中目标产物的产量。转运蛋白的编码基因常位于次生代谢物生物合成基因簇中,当基因簇所合成的目标化合物合成量较多而无法正常运转到其他部位进行储存时,会在合成部位形成负反馈调节机制,影响目标化合物的产量。Wang 等^[69]以紫穗槐二烯(amorphadiene)和贝壳杉烯(kaurene)为模型化合物,在大肠杆菌 *E. coli* 中测试转运蛋白对紫穗槐二烯和贝壳杉烯生产量的影响。过表达、组装和微调各种转运蛋白元件,成功地验证过表达 AcrB 和 TolC 这 2 个转运蛋白基因,有效地提高紫穗槐二烯和贝壳杉烯的产率; TolC、TolC、AcrB 组合提高了紫穗槐二烯的产率(118%),为提高生物燃料的产量提供了一个新思路。转运蛋白还可应用于基因工程,在转基因植物中,最近研究已经鉴定了许多转运蛋白的功能,这将有助于在植物细胞中或通过利用微生物合成生物学研究系统生产有价值的化合物,可利用将转运蛋白整合在代谢通路中以提高目标产物的代谢通量,展示了转运蛋白在次生代谢工程和合成生物学研究中的良好应用前景。

本文综述了具有代表性的植物次生代谢物转运蛋白的研究进展,总结了 ABC 转运蛋白研究实例,加深对该类转运蛋白功能的认知。了解有价值的植物次生代谢物的整个转运过程,将有助于发现转运蛋白家族的新特性、新规律。在天然产物生物合成中,转运蛋白制约着次生代谢物的产量。以转运蛋白为工程目标,以合成生物学理论和技术为指导,有望实现定向、高效地提高次生代谢物的生产量。进一步鉴定转运蛋白的功能,特别是研究转运蛋白

的底物特异性机制,对于将转运蛋白应用于有价值的目标化合物的代谢工程或合成生物学研究具有重要意义。未来还需继续探索和尝试新的转运蛋白研究方法和策略,随着基因组测序技术的发展,越来越多的植物尤其是药用植物的全基因组被测序,如丹参^[70]、三七^[71]等,这些药用植物体内富含多种活性次生代谢物,其全基因组数据为转运蛋白分析提供了丰富的遗传信息,推动了转运蛋白在植物活性次生代谢物合成生物学研究中的应用。

参考文献

- [1] Seeger M A. Membrane transporter research in times of countless structures [J]. *Biochim et Biophys Acta BBA - Biomembr*, 2018, 1860(4): 804-808.
- [2] Hwang J U, Song W Y, Hong D, *et al.* Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(3): 338-355.
- [3] Schulz B, Kolukisaoglu H Ü. Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(4): 1010-1016.
- [4] Yazaki K, Shitan N, Sugiyama A, *et al.* Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants [M]. *Int Rev Cell Mol Bio*, 2009, 276: 263-299.
- [5] 邵若玄, 沈忆珂, 周文彬, 等. 植物 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白研究进展 [J]. *浙江农林大学学报*, 2013, 30(5): 761-768.
- [6] Goossens A, Häkkinen S T, Laakso I, *et al.* Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 1161-1164.
- [7] Yazaki K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(4): 1183-1191.
- [8] 徐 杏, 邱 杰, 徐 扬, 等. 水稻 ABCB 转运蛋白基因的分子进化和表达分析 [J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(2): 127-136.
- [9] 张 儒, 黄景嘉, 谢小雷, 等. 植物 PDR 型 ABC 转运蛋白的结构及功能 [J]. *生命的化学*, 2011, 31(1): 112-119.
- [10] Nuruzzaman M, Zhang R, Cao H Z, *et al.* Plant pleiotropic drug resistance transporters: Transport mechanism, gene expression, and function [J]. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(8): 729-740.
- [11] 谢小东, 程廷才, 王根洪, 等. 植物 ABC 和 MATE 转运蛋白与次生代谢物跨膜转运 [J]. *植物生理学报*, 2011, 47(8): 752-758.
- [12] Procko E, O'Mara M L, Bennett W F D, *et al.* The mechanism of ABC transporters: General lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter [J]. *FASEB J*, 2009, 23(5): 1287-1302.
- [13] Klein M, Martinoia E, Hoffmann-Thoma G, *et al.* A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: Regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates [J]. *Plant J*, 2000, 21(3): 289-304.
- [14] Theodoulou F L, Kerr I D. ABC transporter research: Going strong 40 years on [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(5): 1033-1040.
- [15] Verrier P J, Bird D, Burla B, *et al.* Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory [J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(4): 151-159.
- [16] 吴远双, 宋毅豪, 吴宝尧, 等. 植物多药和有毒化合物排出转运蛋白研究进展 [J]. *广西植物*, 2018, 38(11): 1534-1544.
- [17] 王立光. 拟南芥内膜 Na^+ , K^+/H^+ 反向转运体研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2019, 35(8): 1424-1432.
- [18] Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family [J]. *Biochim et Biophys Acta BBA - Proteins Proteom*, 2009, 1794(5): 763-768.
- [19] Lu M. Structures of multidrug and toxic compound extrusion transporters and their mechanistic implications [J]. *Channels*, 2016, 10(2): 88-100.
- [20] Miyauchi H, Moriyama S, Kusakizako T, *et al.* Structural basis for xenobiotic extrusion by eukaryotic MATE transporter [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-9.
- [21] K Redhu A, Shah A H, Prasad R. MFS transporters of *Candida* species and their role in clinical drug resistance [J]. *FEMS Yeast Res*, 2016, 16(4): 43-49.
- [22] Law C J, Maloney P C, Wang D N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2008, 62: 289-305.
- [23] Quistgaard E M, Löw C, Guettou F, *et al.* Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(2): 123.
- [24] LV H, Li J H, Wu Y Y, *et al.* Transporter and its engineering for secondary metabolites [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14): 6119-6130.
- [25] 徐世琦, 李 贺, 邓伊亦, 等. 沙棘 CAT 家族基因的生物信息学分析 [J]. *天津农业科学*, 2019, 25(5): 1-4.
- [26] Li L, Li D L, Liu S Z, *et al.* The maize glossy13 gene, cloned via BSR-Seq and Seq-walking encodes a putative ABC transporter required for the normal accumulation of epicuticular waxes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82333.
- [27] Shitan N. Secondary metabolites in plants: Transport and

- self-tolerance mechanisms [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(7): 1283-1293.
- [28] Upadhyay N, Kar D, Deepak Mahajan B, *et al.* The multitasking abilities of MATE transporters in plants [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(18): 4643-4656.
- [29] Cho M, Cho H. The function of ABCB transporters in auxin transport [J]. *Plant Signal Behav*, 2013, 8(2): e22990.
- [30] Kang J, Park J, Choi H, *et al.* Plant ABC transporters [J]. *Arab Book*, 2011, 9: e0153.
- [31] Braz A S K, Finnegan J, Waterhouse P, *et al.* A plant orthologue of RNase L inhibitor (RLI) is induced in plants showing RNA interference [J]. *J Mol Evol*, 2004, 59(1): 20-30.
- [32] Facchini P J, de Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: Model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants [J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 763-784.
- [33] Champagne A, Rischer H, Oksman-Caldentey K M, *et al.* In-depth proteome mining of cultured *Catharanthus roseus* cells identifies candidate proteins involved in the synthesis and transport of secondary metabolites [J]. *Proteomics*, 2012, 12(23/24): 3536-3547.
- [34] Yu F, de Luca V. ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(39): 15830-15835.
- [35] Miao G P, Han J, Zhang J F, *et al.* A MDR transporter contributes to the different extracellular production of sesquiterpene pyridine alkaloids between adventitious root and hairy root liquid cultures of *Tripterygium wilfordii* Hook.f [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 95(1/2): 51-62.
- [36] Khare D, Choi H, Huh S U, *et al.* *Arabidopsis* ABCG34 contributes to defense against necrotrophic pathogens by mediating the secretion of camalexin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(28): E5712-E5720.
- [37] Shibata Y, Ojika M, Sugiyama A, *et al.* The full-size ABCG transporters Nb-ABCG1 and Nb-ABCG2 function in pre- and postinvasion defense against *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 1163-1181.
- [38] Bienert M D, Siegmund S E G, Drozak A, *et al.* A pleiotropic drug resistance transporter in *Nicotiana tabacum* is involved in defense against the herbivore *Manduca sexta* [J]. *Plant J*, 2012, 72(5): 745-757.
- [39] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(7): 2447-2452.
- [40] Shitan N, Hayashida M, Yazaki K. Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum* [J]. *Plant Signal Behav*, 2015, 10(7): e1035852.
- [41] Shoji T, Inai K, Yazaki Y, *et al.* Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots [J]. *Plant Physiol*, 2008, 149(2): 708-718.
- [42] Shitan N, Dalmás F, Dan K, *et al.* Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 109-116.
- [43] 刘琬菁, 吕海舟, 李 滢, 等. 植物萜类合酶研究新进展 [J]. *植物生理学报*, 2017, 53(7): 1139-1149.
- [44] Crouzet J, Roland J, Peeters E, *et al.* NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 82(1/2): 181-192.
- [45] Larsen B, Fuller V L, Pollier J, *et al.* Identification of iridoid glucoside transporters in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(9): 1507-1518.
- [46] 张 儒, 黄景嘉, 谢小雷, 等. 人参多耐药性转运蛋白基因保守区序列的克隆及分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(8): 1590-1594.
- [47] Zhang R, Huang J J, Zhu J, *et al.* Isolation and characterization of a novel PDR-type ABC transporter gene PgPDR3 from *Panax ginseng* C.A. Meyer induced by methyl jasmonate [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(11): 6195-6204.
- [48] Demurtas O C, de Brito Francisco R, Diretto G, *et al.* ABCC transporters mediate the vacuolar accumulation of crocins in saffron stigmas [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(11): 2789-2804.
- [49] 王玲平, 周生茂, 戴丹丽, 等. 植物酚类物质研究进展 [J]. *浙江农业学报*, 2010, 22(5): 696-701.
- [50] 鲁守平, 隋新霞, 孙 群, 等. 药用植物次生代谢的生物学作用及生态环境因子的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(6): 1027-1032.
- [51] Zhu Y, Chu S J, Luo Y L, *et al.* Involvement of LeMRP, an ATP-binding cassette transporter, in shikonin transport and biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Biol*, 2018, 20(2): 365-373.
- [52] Chen L, Liu Y S, Liu H D, *et al.* Identification and expression analysis of MATE genes involved in flavonoid transport in blueberry plants [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118578.
- [53] 常雪玲, 张宗文, 李艳琴, 等. 荞麦 mate 的克隆及表达

- 分析 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(11): 2038-2048.
- [54] Dobritzsch M, Lübken T, Eschen-Lippold L, *et al.* MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(2): 583-596.
- [55] Banasiak J, Biała W, Staszków A, *et al.* A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(4): 1005-1015.
- [56] Sasse J, Schlegel M, Borghi L, *et al.* *Petunia hybrida* PDR2 is involved in herbivore defense by controlling steroidal contents in trichomes [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(12): 2725-2739.
- [57] Krause D J, Kominek J, Oplente D A, *et al.* Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(43): 11030-11035.
- [58] Santos A L D, Chaves-Silva S, Yang L N, *et al.* Global analysis of the MATE gene family of metabolite transporters in tomato [J]. *BMC Plant Biol*, 2017, 17(1): 185-192.
- [59] Amano I, Kitajima S, Suzuki H, *et al.* Transcriptome analysis of *Petunia axillaris* flowers reveals genes involved in morphological differentiation and metabolite transport [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198936.
- [60] 阎波, 刘思思, 陈娟, 等. 药用植物铁皮石斛 ABC 转运蛋白基因的鉴定及其差异表达分析 [J]. 药学学报, 2018, 53(7): 1177-1189.
- [61] Ofori P A, Mizuno A, Suzuki M, *et al.* Genome-wide analysis of ATP binding cassette (ABC) transporters in tomato [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200854.
- [62] Bazzone A, Barthmes M, Fendler K. *SSM-based Electrophysiology for Transporter Research* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2017.
- [63] Kell D B, Swainston N, Pir P, *et al.* Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(4): 237-246.
- [64] Lanthaler K, Bilsland E, Dobson P D, *et al.* Genome-wide assessment of the carriers involved in the cellular uptake of drugs: A model system in yeast [J]. *BMC Biol*, 2011, 9(1): 1-14.
- [65] Shitan N, Sugiyama A, Yazaki K. Functional analysis of jasmonic acid-responsive secondary metabolite transporters [J]. *Jasmonate Signal*, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-414-2_19.
- [66] Horie T, Sugawara M, Okada T, *et al.* Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(3): 346-356.
- [67] Goossens A, Häkkinen S T, Laakso I, *et al.* Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 1161-1164.
- [68] Falcone Ferreyra M L, Rius S P, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications [J]. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 222.
- [69] Wang J F, Xiong Z Q, Li S Y, *et al.* Enhancing isoprenoid production through systematically assembling and modulating efflux pumps in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(18): 8057-8067.
- [70] Xu H B, Song J Y, Luo H M, *et al.* Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(6): 949-952.
- [71] Chen W, Kui L, Zhang G H, *et al.* Whole-genome sequencing and analysis of the Chinese herbal plant *Panax notoginseng* [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(6): 899-902.