

## 长春花次生代谢转录调控的分子机制

周晨, 赵淑娟\*, 胡之璧

上海中医药大学中药研究所国家中医药管理局中药资源与质量标准重点实验室, 上海 201203

### Molecular Mechanism of the Transcriptional Regulation to the Secondary Metabolites in *Catharanthus roseus*

ZHOU Chen, ZHAO Shu-Juan\*, HU Zhi-Bi

The SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Traditional Chinese Material Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**摘要:** 本文就长春花体内生物碱生物合成途径中受转录因子调控、外界因素对其诱导和调控以及作用机制的研究进展作介绍。

**关键词:** 长春花; 转录因子; 次生代谢; 生物碱

转录因子(transcription factor)是一类序列特异的DNA结合蛋白,它能与目的基因启动子区域的序列相互作用,调节mRNA的起始合成。它控制着真核生物正常发育和生理功能所必需的某些基因的协同表达。植物从外界环境的变化适应当中可获得合成某些化合物的原料和能量,这些化合物称为次生代谢产物,植物利用这些次生代谢物保护自己以抵御外界环境的伤害。很多植物的次生代谢产物具有药理活性,可用于治疗各种疾病。由于这些化合物很难用化学方法合成。因此,植物体是次生代谢产物的重要来源之一。

生物碱是一类含氮杂环小分子,它能够帮助植物抵御草食动物和病原体的侵害。生物碱的生物合成途径十分复杂,迄今为止,其生物合成途径研究最深入的是长春花[*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]中的萜类吲哚生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs)。长春花是夹竹桃科长春花属的一种药用植物,人们已从其根、茎、叶和种子中分离出100余种生物碱(van der Heijden等2004)。其中的单体(monomeric)如蛇根碱(serpentine)和阿玛碱(ajmalicine)分别用作安定药物和降低高血压。二聚体(dimeric)的生物碱如长春碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine)则广泛用来治疗癌症。这些二聚体的生物碱在植物体内的含量很低(St-Pierre等1999)。它们的前体,长春质碱(catharanthine)和文多灵(vindoline)就被分离出来用于体外合成长春碱。

为提高生物碱产量,人们曾经过多方面的尝试,

但没有成功。这可能是由于TIAs合成途径受植物体本身高度调控(Verpoorte等1999; Hughes等2004; Whitmer等2002)。TIAs生物合成途径的研究已发展到分子水平。人们将注意力集中到调控TIAs生物合成的启动子序列以及控制这些途径的转录因子上。如对异胡豆萜合成酶(strictosidine synthase, STR)和色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC)基因的研究表明,这2个基因启动子序列中都包含与紫外线照射和真菌激发子这样的胁迫信号相关的调控元件(Ouwerkerk等1999a, b; Ouwerkerk和Memelink 1999; Pasquali等1999)。

#### 1 JERE元件与ORCA2

茉莉酸(jasmonic acid, JA)以及挥发性的茉莉酸甲酯(methyl jasmonate ester, MeJA)统称为茉莉酮酸酯(jasmonate)。它作为一种植物胁迫信号,是诱导STR和TDC表达中的最重要的第二信使(Menke等1999b)。在长春花STR启动子中,对激发子和茉莉酮有应答作用的元件含有GCC盒的核心序列,是一种称做JERE(jasmonate and the elicitor-responsive element, 茉莉酮酸酯和激发子应答元件)的短序列(Menke等1999a)。其他一些高等植物启动子也已鉴定出不同的JA应答元件(JA-responsive

收稿 2009-12-02 修定 2010-02-10

资助 教育部高等学校博士学科点专项科研基金。

\* 通讯作者(E-mail: zhaoshujuan@126.com; Tel: 021-51322576)。

elements, JREs)。如拟南芥的 *VSP1* 启动子(Guerineau 等 2003)、马铃薯的 *LAP* 启动子(Boyer 等 2004)。在马铃薯的蛋白酶抑制剂基因(proteinase inhibitor PI-II, *PIN2*)的启动子(Kim 等 1992)和大豆的植物贮存蛋白 B (vegetative storage protein B, *VSPB*)的启动子(Mason 等 1993)中, JA 应答区域中包含一种类似 G-box 的基序; 在拟南芥中, 一种 GCC box 介导了 PLANT DEFENSIN1.2 (*PDF1.2*) 基因启动子对 JA 的应答(Brown 等 2003), 它不包含同 G-box 类似的序列。烟草的腐胺 -N- 甲基转移酶(putrescine-N-methyltransferase)启动子需要同时有 G-box 和 GCC 基序来共同应答茉莉酮(Xu 等 2004)。在长春花 *STR* 启动子中, 有人用 JERE 作为酵母单杂交的诱饵, 分离出一个编码 ORCA2 (octadecanoid-responsive *Catharanthus* AP2-domain protein 2)的 cDNA。ORCA2 是属于植物特异的 AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor, APETALA2/ 乙烯应答因子)家族的转录因子, 它结合到 AP2/ERF DNA 结合结构域中(Riechmann 和 Ratcliffe 2000)。茉莉酮可快速诱导 *ORCA2* 的转录, 通过与 JERE 的交互作用而激活 *STR* 的表达。这些结果表明, *ORCA2* 能控制茉莉酮应答的 *STR* 的表达, 也可能控制其他 TIAs 生物合成基因的表达。

## 2 核心转录因子 ORCA3

通过 T-DNA 激活标签技术从长春花细胞中分离出另一个与 TIAs 调控紧密有关的基因 *ORCA3* (van der Fits 和 Memelink 2000; van der Fits 等 2001)。ORCA3 同样可结合到 JERE 元件上激活 *STR* 的表达。*ORCA3* 的表达也受茉莉酮的诱导(van der Fits 和 Memelink 2001), 这表明 ORCA2 和 ORCA3 有可能协同调控着茉莉酮应答的生物碱合成。

在长春花细胞中, *ORCA3* 的过量表达可提高 *TDC*、*STR*、*CPR* [编码细胞色素 P450-氧化还原酶, 同香叶醇 -10- 羟化酶(geraniol-10-hydroxylase, G10H)共同作用]和脱乙酰氧基文多灵 -4- 羟化酶(desacetoxyvindoline 4-hydroxylase, D4H)这些生物碱合成基因的表达(图 1)。ORCA3 还调控 2 个编码初级代谢的酶邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase, AS $\alpha$ )和脱氧核酮糖磷酸合酶(*D*-1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, DXS), 这些酶与 TIAs 前体的形成有关。这些结果说明, ORCA3

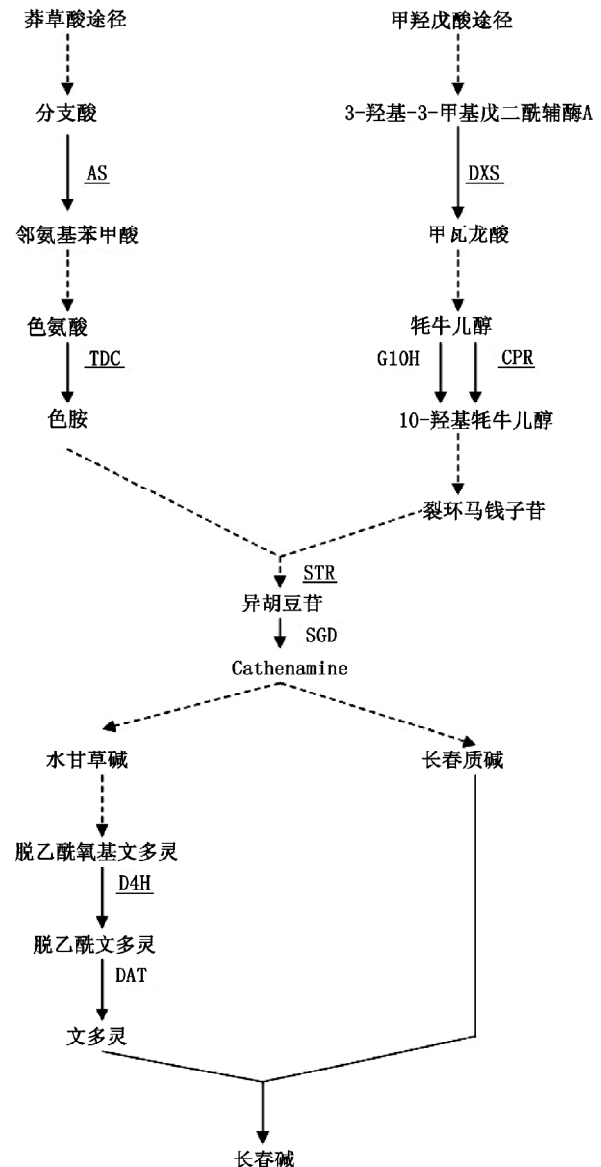


图 1 长春花生物碱代谢途径及受 ORCA3 调控作用示意

前期由来自莽草酸途径的色胺和由甲羟戊酸途径的裂环马钱子苷, 在异胡豆苷合成酶(*STR*)催化作用下偶合成异胡豆苷。后期经多步反应生成的文多灵与长春质碱偶合生成长春碱。实线: 一步反应; 虚线: 多步反应; 下划线: 在悬浮细胞中受 ORCA3 调控的酶。AS: 邻氨基苯甲酸合酶; TDC: 色氨酸脱羧酶; DXS: 脱氧核酮糖磷酸合酶; G10H: 香叶醇 -10- 羟化酶; CPR: 细胞色素 P450-氧化还原酶; STR: 异胡豆苷合成酶; SGD: 异胡豆苷  $\beta$ -D 糖苷酶; D4H: 脱乙酰氧基文多灵 -4- 羟化酶; DAT: 脱乙酰文多灵乙酰转移酶。

是长春花中 TIAs 合成的核心调控子, 它能够调控 TIAs 代谢途径中的多步反应, 并且能激活 TIAs 前体的合成。然而, ORCA3 不能调控编码 G10H 和

脱乙酰文多灵乙酰转移酶(deacetylindoline acetyltransferase, DAT)的基因。过量表达 ORCA3 的转基因细胞明显积累更多的色氨酸和色胺。当过量表达 ORCA3 的细胞加入萜类化合物的前体马钱子苷(loganin)后, TIAs 的产量提高; 而不加马钱子苷的则检测不到 TIAs。这些结果说明萜类化合物的支路是受限制的。

在长春花毛状根中, 尽管 ORCA3 的过量表达可以受诱导, 但 ORCA3 的过量表达并不能提高 TIAs 的含量(Peebles 等 2009)。当 ORCA3 过量表达时, 长春花毛状根中 *ASα*、*DXS*、*STR*、*SLS* (secologanin synthase, 开联番木鳖苷合成酶)和 *ZCT* (zinc finger *Catharanthus* transcription factor, 锌指长春花转录因子)的 mRNA 转录本也随之提高; *TDC*、*G10H*、*CPR*、*GBFs* (G-box binding factor, G-box 结合因子)和 *ORCA2* 保持恒定; *SGD* 降低。这种变化与长春花悬浮细胞中的实验结果不尽相同: *ASα*、*DXS* 和 *STR* 和 *G10H* 的变化一致。而 *SGD*、*TDC* 和 *CPR* 不一样。在细胞中, 这 3 个基因的转录本在 ORCA3 过量表达时都提高。在长春花毛状根和悬浮培养细胞中 ORCA3 对这些基因的不同调控情况说明, 在不同的培养物中 TIAs 的合成有不同的调控机制。*SLS*、*ZCTs*、*GBFs*、*ORCA2* 与 ORCA3 相互关系的研究未见报道。此外, 研究还发现, 长春花毛状根中 ORCA3 不过量表达, 单独增加 JA 含量可以提高 TIAs 的合成。

ORCA3 基因的表达也受茉莉酸甲酯(MeJA)的快速诱导, 这意味着 ORCA3 不仅能够自动调节自

我的表达水平, 还受其上游的启动子的调控(Vom Endt 等 2007)。*ORCA3* 基因上游是一种双节的(bipartite) JRE 启动子, 它是由一种决定 *ORCA3* 表达高低水平的定量序列(quantitative sequence)以及一种决定 JA 应答开/关的定性序列(qualitative sequence)构成的。采用酵母单杂交方法寻找对应的转录因子, 分离到 4 类 DNA 结合蛋白。其中一类具有一种单独的 AT 钩(AT-hook) DNA 结合基序可以与定量序列相结合, 它作为一种激活子可以提高 *ORCA3* 对 JA 的应答反应。而 JRE 中的定性序列, 似乎也可以在非诱导期与抑制子相结合。*ORCA3* 的激活可以同时通过 AT 钩结合定量序列和定性序列的去阻遏而实现, 这里的定性序列只能是一种关闭开关。而在其他的一些实验中, 定性序列在诱导状态下还能结合 bHLH 型激活子, 这时抑制子和诱导子可能是不同的蛋白或者是相同的蛋白(bHLH)在两种激活状态下的转换。

在 *ORCA3* 过量表达的长春花毛状根株系中, *ORCA3* 的转录本含量大幅度提高。这可能激活一种反馈抑制的负调控, 可抵消 *ORCA3* 转录的提高。如负调控子 *ZCT*, 可以通过结合到 *STR* 和 *TDC* 的启动子而抑制这 2 个基因的表达。*ORCA3* 转录本的增加可同时提高 *ZCT1*、*ZCT2* 和 *ZCT3* 的转录。

TIAs 在转录水平上对 JA 的瞬时应答说明, 长春花是紧密控制 TIAs 代谢的, 并且在添加外源 JA 后能很快将整个代谢系统降低到原始水平。最近有人报道一种在拟南芥中可与 JA 调控有关的 JAZ 蛋白家族(Chini 等 2007; Thines 等 2007), 此蛋白通常与转录因子结合后可抑制它的活性。JA- 异亮氨酸复合物与 COI1 的相互作用可促使 COI1 与 JAZ 蛋白结合。结合后 JAZ 降解, 进而促使防御基因和 JAZ 蛋白重新转录。这种重新合成的 JAZ 又转而抑制转录因子(Farmer 2007)。这一机制可能在 JA 调控 TIAs 的过程中发生作用, 但在长春花中还没有发现 JAZ 蛋白家族。

### 3 其他几种转录因子

尽管 ORCA3 在调控 TIAs 代谢过程中起作用, 但它还不足以调控整条代谢途径。还有其他一些转录因子也与代谢过程相关。用 *STR* 启动子的一个增强子结构域作为酵母单杂交的诱饵, 分离到与荷兰芹(parsley)类 MYB 转录因子 BPF1 同系的长春

表 1 悬浮细胞和毛状根中 ORCA3 对关键酶基因作用的比较

基因	悬浮细胞	毛状根
<i>ASα</i>	+	+
<i>TDC</i>	+	无变化
<i>DXS</i>	+	+
<i>CPR</i>	+	无变化
<i>G10H</i>	无变化	无变化
<i>SLS</i>	未见报道	+
<i>STR</i>	+	+
<i>SGD</i>	+	-
<i>ZCTs</i>	未见报道	+
<i>GBFs</i>	未见报道	无变化
<i>ORCA2</i>	未见报道	无变化

"+" 表示有效果, "-" 表示无效果。

花转录因子 CrBPF1 (*Catharanthus roseus* box P-binding factor-1, 长春花 P-box 结合因子 1) (van der Fits 等 2000)。CrBPF1 受激发子的诱导, 但这个激发子不是 JA。这说明激发子诱导 STR 的表达是经由茉莉酸依赖和非依赖途径的。STR 启动子中还包含一个植物中保守的启动子元件 G-box (5'-CAC GTC-3' 在动物基因中称为 E-box) 与 JERE 元件毗连 (Sibérial 等 2001)。用 G-box 作为酵母单杂交的诱饵分离出一个结合于 G-box 的转录因子 CrGBF (*Catharanthus roseus* G-box binding factors, 长春花 G-box 结合因子)。CrGBF1 和 CrGBF2 在 JA 和 ORCA3 的作用下没有提高, 在长春花中激活 CrGBF 的调控信号之一是酵母提取物 (yeast extract, YE)。这表明 CrGBF 对 STR 的作用在特定器官、组织和细胞中还依赖其他的转录因子。GBF 在 ORCA3 出现的情况下则可能成为激发子。在长春花中, CrGBF1 和 CrGBF2 会抑制 STR 的表达。在其他植物中, G-box 是一种对植物激素、紫外线照射和厌氧环境这些信号产生有应答的元件, 大多数情况是作为一个激活子存在的 (Menkens 等 1995), 只有少数是抑制子。如大豆的 GH3 基因的启动子中含有一种对生长素产生应答的 G-box 元件, 它可与转录因子 SGBF-2 相结合作用 (Liu 等 1997)。有人认为, 在长春花中生长素也可能是诱导 CrGBF 的激发子。CrGBF 在体外还可以结合 TDC 启动子上的类 G-box 元件, 这说明 CrGBF 能够协同调控几个 TIAs 代谢途径中的基因。钝化 CrGBF 转录因子可去除 TIAs 的阻遏, 尤其是萜类代谢途径。这种效应与 ORCA3 过表达相组合, 能够提高 TIAs 的合成。另一种 STR 启动子的转录因子含有亮氨酸拉链结构 (leucine zipper) 和 MYC 类 bHLH 的转录因子 CrMYC (*Catharanthus roseus* MYC-type bHLH transcription factors) (Pré 等 2000)。重组的 CrMYC 在体外可结合 STR 启动子的 G-box。CrMYC 的表达则可受 JA 和真菌诱导子诱导。

后来人们又发现可结合 STR 和 TDC 启动子的锌指结合蛋白 ZCT1、ZCT2、ZCT3 (zinc finger *Catharanthus* transcription factor, 锌指长春花转录因子, IIIA 型 zinc finger 转录因子家族的成员) (Pauw 等 2004)。它们能够抑制 STR 和 TDC 启动子的激活, 是这 2 个启动子的抑制子。真菌诱导子可以诱

导 ZCT 的表达, YE 也能够快速诱导 ZCT 的表达, 同时还能增加 JA 的水平。JA 可提高 ORCAs 的表达, ORCAs 进而可以激活 STR 和 TDC 的转录。因此认为 ZCT 和 STR 启动子的结合可抵消 ORCA2、ORCA3 对 STR 和 TDC 的激活作用。

根据上述研究结果, Peebles 等 (2009) 将一些转录因子和调控方式概括如图 2 所示模式。

#### 4 *G10H* 和 *DAT* 的启动子

长春花代谢途径中其他一些关键酶基因启动子的研究也陆续有报道。*G10H* 是甲羟戊酸途径中的关键酶。*G10H* 启动子的研究证实, 该启动子可以为 JA 和真菌诱导子所诱导, 并且具有组织特异性 (Suttipanta 等 2007)。同时还鉴定出 3 个可能具有增强子效果的顺式元件, 这些区域与 STR 和 TDC 启动子中的元件不同。*G10H* 对 ORCAs 也没有应答反应。这说明在 JA 诱导 *G10H* 转录的调控中可能存在另一种信号级联传导通路, 因此在 TIAs 的代谢途径中很可能还有其他的调控方式和转录因子。这说明 TIAs 合成的调控网络比已知的更为复杂。

文多灵合成的最后一步反应是由 DAT 催化的, 该基因的转录受到光的诱导。DAT 基因上游克隆到 1 773 bp 的启动子序列 (Wang 等 2010), 其中含有很多在其他植物中已经鉴定出的光诱导应答元件。与 *G10H* 一样, DAT 的表达也不受 ORCA 转录因子的调控, 但 MeJA 仍能诱导 DAT 的表达。这说明还有其他转录因子参与了 MeJA 诱导 DAT 表达的过程。在 DAT 启动子中还发现了 3 个连续的 TGACG 基序。TGACG 基序是从大麦的脂氧合酶 1 (lipoxygenase 1) 中鉴定出的与 MeJA 信号转导有关的转录因子结合位点 (Rouster 等 1997)。长春花生物碱代谢途径中其他关键酶基因如 STR、TDC 和 *G10H* 的启动子中尚未发现有 TGACG 基序。在大麦脂氧合酶 1 基因启动子中此序列的定点突变可促使 MeJA 的诱导失效, 但长春花 DAT 启动子中的此种基序的突变却不能完全消除 MeJA 的诱导。

#### 5 结语

STR、TDC 等基因启动子的分离、克隆的方法是先构建全基因组文库, 然后用结构基因的片断做探针, 筛选出与之相连的片断并测序。近年来, 基因组步行 (genome walking) 实验逐渐成为一种成熟的克隆上游启动子的手段, *G10H*、*DAT* 的克隆

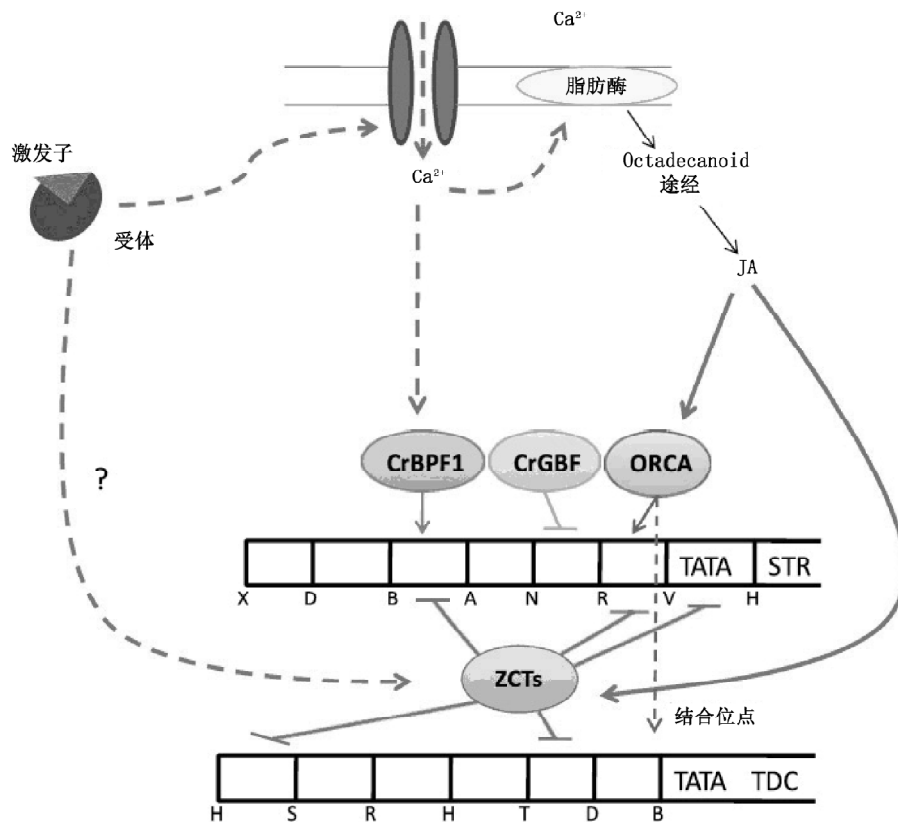


图2 长春花 *STR* 和 *TDC* 基因启动子的调控(Peebles 等 2009)

激发子打开钙离子通道, 钙离子浓度提高后产生更多的茉莉酸。茉莉酸激活 ORCA 转录因子后, *STR* 和 *TDC* 的表达提高。茉莉酸同时还增加 ZCT 的转录, ZCT 可抑制 *STR* 和 *TDC* 的表达。钙离子通道还可提高 CrBPF1 的含量。CrGBF 可抑制 *STR* 的表达。

均采用了此方法。目前, 在长春花生物合成关键酶基因中除 *STR*、*TDC*、*G10H* 以及 *DAT* 以外, 其他的启动子克隆还未见报道。我们实验室用基因组步行的方法, 也已经克隆到 *D4H* 上游部分启动子序列, 其相关研究还在进行中。

启动子的功能研究主要集中在两个方面: 一是用酵母单杂交的方法分离、筛选出与启动子元件相结合的转录因子, 并研究这些转录因子在激活子的调控下对结构基因的作用; 二是将启动子的不同片断连接到植物表达载体上, 转化入植物体, 如长春花和拟南芥, 研究其组织特异性表达。近年来, 瞬时表达测定(transient expression assay)的迅速发展已成为一种不需要转基因植株、不受环境因素制约和快速稳定的新方法。启动子片断可通过农杆菌介导转入长春花细胞中, 可用于研究该片断在外源激活子作用下的活性。

已有的研究表明, 在长春花的转录因子中, 有

的对多个基因有激活功能, 如 ORCAs; 有的只针对一个基因有激活作用, 如 CrBPF; 有的具有抑制作用, 如 ZCT; 有的转录因子本身的转录还受其他转录因子的调控, 如 AT 钩蛋白调控 ORCA3 等。这些转录因子的作用, 不仅受外界环境因素的作用(如 JA), 还受植物体内多种生理功能严密控制。加入 JA 后, ORCA3 的过量表达虽然有提高, 但并不能增加 TIAs 的转录, 这暗示可能还有其他更多的正向转录因子存在, 需要深入研究。为了提高 TIAs 的合成, 不仅要过量表达正调控因子, 还要抑制负调控因子, 在这两者中间取得平衡。只有对整个复杂的调控网络取得更加深刻的了解以后, 人们才可能采用这些工具, 为未来这一领域的基因工程建立基础。

#### 参考文献

- Boter M, Ruz-Rivero O, Abdeen A, Prat S (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 18: 1577~1591

- Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 132: 1020~1032
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR et al (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448: 666~671
- Farmer EE (2007). Jasmonate perception machinery. *Nature*, 448: 659~660
- Guerineau F, Benjdia M, Zhou DX (2003). A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana* *vsp1* promoter. *J Exp Bot*, 54: 1153~1162
- Hughes EH, Hong SB, Gibson SI, Shanks JV, San KY (2004). Expression of a feedback-resistant anthranilate synthase in *Catharanthus roseus* hairy roots provides evidence for tight regulation of terpenoid indole alkaloid levels. *Biotechnol Bioeng*, 86: 718~727
- Kim SR, Choi JL, Costa MA, An G (1992). Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. *Plant Physiol*, 99: 627~631
- Liu ZB, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997). A G-box-binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain. *Plant Physiol*, 115: 397~407
- Mason HS, DeWald DB, Mullet JE (1993). Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *Plant Cell*, 5: 241~251
- Menke FL, Champion A, Kijne JW, Memelink J (1999a). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J*, 18: 4455~4463
- Menke FL, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J (1999b). Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 119: 1289~1296
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci*, 20: 506~510
- Ouwerkerk PB, Hallard D, Verpoorte R, Memelink J (1999a). Identification of UV-B light-responsive regions in the promoter of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol*, 41: 491~503
- Ouwerkerk PB, Memelink J (1999). Elicitor-responsive promoter regions in the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol*, 39: 129~136
- Ouwerkerk PB, Trimborn TO, Hilliou F, Memelink J (1999b). Nuclear factors GT-1 and 3AF1 interact with multiple sequences within the promoter of the *Tdc* gene from Madagascar periwinkle: GT-1 is involved in UV light-induced expression. *Mol Gen Genet*, 261: 610~622
- Pasquali G, Erven AS, Ouwerkerk PB, Menke FL, Memelink J (1999). The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol Biol*, 39: 1299~1310
- Pauw B, Hilliou FA, Martin VS, Chatel G, de Wolf CJ, Champion A, Pré M, van Duijn B, Kijne JW, van der Fits L, Memelink J (2004). Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem*, 279: 52490~52497
- Peebles CAM, Hughes EH, Shanks JV, San KY (2009). Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. *Metab Eng*, 11: 76~86
- Pré M, Sibérl Y, Memelink J, Champion A, Doireau P, Gantet P (2000). Isolation by the yeast one-hybrid system of cDNAs encoding transcription factors that bind to the G-box element of the strictosidine synthase gene promoter from *Catharanthus roseus*. *Int J Bio-Chrom*, 5: 229~244
- Riechmann JL, Ratcliffe OJ (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 423~434
- Rouster J, Leah R, Mundy J, Cameron-Mills V (1997). Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J*, 11: 513~523
- Sibérl Y, Benhamron S, Memelink J, Giglioli-Guivarc'h N, Thiersault M, Boisson B, Doireau P, Gantet P (2001). *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures. *Plant Mol Biol*, 45: 477~488
- St-Pierre B, Vazquez-Flota FA, De Luca V (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intracellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, 11: 887~900
- Suttipanta N, Pattanaik S, Gunjan S, Xie CH, Littleton J, Yuan L (2007). Promoter analysis of the *Catharanthus roseus* geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1769: 139~148
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448: 661~665
- van der Fits L, Hilliou F, Memelink J (2001). T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species. *Transgenic Res*, 10: 513~521
- van der Fits L, Memelink J (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289: 295~297
- van der Fits L, Memelink J (2001). The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate responsive pro-

- moter element. *Plant J*, 25: 43~53
- van der Fits L, Zhang H, Menke FL, Deneka M, Memelink J (2000). A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a jasmonate-independent signal transduction pathway. *Plant Mol Biol*, 44: 675~685
- van der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W, Hallard D, Verpoorte R (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem*, 11: 607~628
- Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG, Memelink J (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol Lett*, 21: 467~479
- Vom Endt D, Silva MS, Kijne JW, Pasquali G, Memelink J (2007). Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins. *Plant Physiol*, 144: 1680~1689
- Wang Q, Yuan F, Pan QF, Li MY, Wang GF, Zhao JY, Tang KX (2010). Isolation and functional analysis of the *Catharanthus roseus* deacetylvindoline-4-*O*-acetyltransferase gene promoter. *Plant Cell Rep*, 29: 185~192
- Whitmer S, van der Heijden R, Verpoorte R (2002). Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *J Biotechnol*, 96: 193~203
- Xu B, Timko M (2004). Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine *N*-methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements. *Plant Mol Biol*, 55: 743~761