

# 拟南芥尿黑酸双加氧酶基因突变体转录组分析

陈哲卿, 廖家妮, 胡超, 任春梅, 黄丽华

湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙

收稿日期: 2023年5月11日; 录用日期: 2023年7月10日; 发布日期: 2023年7月21日

## 摘要

尿黑酸双加氧酶(Homogentisate dioxygenase, HGO)催化酪氨酸降解代谢第三步反应。HGO突变会促进拟南芥生长。该研究对拟南芥hgo突变体和野生型的转录组进行分析,探究HGO影响拟南芥生长的机制。结果表明,突变体和野生型间1413个基因表达存在差异;其中741个基因在突变体中表达上调,672个基因在突变体中表达下调。GO功能注释显示,差异基因显著富集在生长素响应、氨基酸代谢、谷胱甘肽代谢等过程。KEGG通路分析显示,差异基因主要涉及苯丙烷类生物合成、类黄酮生物合成、MAPK信号途径、谷胱甘肽代谢、植物激素信号传导、淀粉和蔗糖代谢等通路。研究结果表明HGO可能通过影响苯丙烷类生物合成和激素信号传导等调控拟南芥生长。该研究结果可为进一步探究酪氨酸降解代谢在植物中的功能奠定基础。

## 关键词

拟南芥, 尿黑酸双加氧酶, 酪氨酸降解代谢, 转录组

# Transcriptome Analysis of the Homogentisate Dioxygenase Mutant of *Arabidopsis Thaliana*

Zheqing Chen, Jiani Liao, Chao Hu, Chunmei Ren, Lihua Huang

College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

Received: May 11<sup>th</sup>, 2023; accepted: Jul. 10<sup>th</sup>, 2023; published: Jul. 21<sup>st</sup>, 2023

## Abstract

Homogentisate dioxygenase (HGO) catalyzes the third step of tyrosine catabolism. HGO mutation promoted growth of *Arabidopsis*. Transcriptome sequencing of the *hgo* mutant and wild type was performed to elucidate the mechanism of HGO function. The results were as follows: 1413 diffe-

rentially expressed genes were identified between the mutant and wild type. Among them, 741 genes were up-regulated, and 672 genes were down-regulated in the mutant. GO annotation analysis indicated that these genes were significantly enriched in auxin response, amino acid metabolism, and glutathione metabolism. KEGG revealed that differentially expressed genes mainly participated in phenylpropanoid biosynthesis, flavonoid biosynthesis, MAPK signaling pathway, glutathione metabolism, plant hormone signal transduction, starch and sucrose metabolism. The data suggested that HGO might regulate Arabidopsis development by modulating phenylpropanoid biosynthesis and plant hormone signal transduction, providing a basis for exploring function of tyrosine catabolism in plants.

## Keywords

*Arabidopsis Thaliana*, Homogentisate Dioxygenase, Tyrosine Catabolism, Transcriptome

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

酪氨酸在酪氨酸氨基转移酶和对羟基苯丙酮酸双氧化酶作用下生成尿黑酸；尿黑酸经尿黑酸双加氧酶(Homogentisate dioxygenase, HGO)催化形成马来酰乙酰乙酸；马来酰乙酰乙酸经马来酰乙酰乙酸异构酶和延胡索酰乙酰乙酸水解酶催化降解为乙酰乙酸和延胡索酸；乙酰乙酸和延胡索酸再通过三羧酸循环分解[1]。酪氨酸降解是维持动物生长发育所必需的代谢途径。酪氨酸氨基转移酶、对羟基苯丙酮酸双氧化酶和延胡索酰乙酰乙酸水解酶突变会引起动物酪氨酸血症[2] [3] [4]。HGO 突变会引发人尿黑酸尿症[5]。在植物中，酪氨酸是很多代谢物的合成前体[6]。一些酪氨酸代谢物不但影响植物生长发育，而且还具有药用价值[6]。因此，大量研究集中于植物酪氨酸及其代谢物的合成，而酪氨酸降解相关研究相对较少。一些研究表明，酪氨酸降解相关酶突变也会影响植物发育。例如延胡索酰乙酰乙酸水解酶基因突变会影响拟南芥和水稻的发育[7] [8]。此外，相对于其它蛋白质氨基酸，酪氨酸降解过程中会产生更多的能量，其降解可能在植物细胞能量恢复过程中发挥重要作用[9]。尽管在拟南芥等植物中证实酪氨酸降解途径具有重要功能，但是由于现有研究资料有限，该代谢途径在植物中的功能还没有完全清楚。

HGO 是酪氨酸降解中的重要酶。HGO 突变会导致大豆叶及种子中积累高浓度的尿黑酸，并且提高大豆对除草剂的抗性[10]。水稻 HGO 基因表达受 ABA 和盐胁迫等因子的调控[11]。在拟南芥中，HGO 编码基因只有一个，其表达受干旱和黑暗诱导[1] [12]。HGO 突变也会使拟南芥种子中含有高浓度的尿黑酸[10]。我们前期研究发现，在 MS 培养基上生长，*hgo* 突变体比野生型植株大[13]。这些研究结果表明，HGO 对植物生长有调节作用。目前，HGO 影响植物生长的分子机制仍不清楚。转录组分析是通过对生物组织或细胞在特定发育时期或生理状态下的所有转录本进行测序，了解转录水平上的表达调控机制[14]。该技术被广泛地应用于生物学研究中[14]。目前有关植物 *hgo* 突变体转录组的研究很鲜见。本研究通过观察 *hgo* 突变体在土壤中生长的表型，并采用高通量转录组测序，比较分析野生型拟南芥和突变体中差异表达基因，对差异表达基因的功能和通路进行注释，探析 HGO 影响拟南芥生长的分子机制。研究结果可为进一步探究植物酪氨酸降解途径的功能奠定基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col-0)和 *hgo* 突变体由湖南农业大学作物基因工程实验室提供。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 拟南芥的培养

拟南芥种子用无菌水润湿后, 4℃处理 3 d, 再种植于含等比例东北黑土和蛭石的营养土中, 23℃、16 h 光照/8 h 黑暗培养。

#### 2.2.2. RNA 提取、cDNA 文库构建和转录组测序

取 3 周大拟南芥植株, 采用 TRIpure Reagent (Aidlab 公司)提取总 RNA。紫外分光光度法结合琼脂糖凝胶电泳技术检测 RNA 纯度、浓度和完整性。cDNA 文库构建及转录组测序委托北京百迈客生物技术公司进行。测序获取的原始数据经质量控制之后, 获得高质量序列。通过 HISAT2 [15]将高质量序列与拟南芥参考基因组 (*Arabidopsis thaliana*.TAIR10.45.genome.fa, [ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release45/fasta/arabidopsis\\_thaliana](ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release45/fasta/arabidopsis_thaliana))进行比对; 采用 StringTie [16]对比对的序列进行组装, 重构转录组用于后续分析。

#### 2.2.3. 差异表达基因分析

以 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)为指标衡量基因表达水平 [17]。采用 DESeq2 分析 *hgo* 突变体和野生型间差异表达基因 [18]。以 Fold Change  $\geq 2$  或  $\leq -2$ , 且 FDR  $< 0.01$  作为筛选差异表达基因的标准; Fold Change 表示突变体和野生型间表达量的比值; FDR 是对差异显著性  $p$  值进行校正得到的错误发现率。将差异表达基因与 KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG、GO 和 KEGG 等数据库进行比对, 获取差异基因功能和通路的注释信息。

## 3. 结果与分析

### 3.1. *hgo* 突变体表型

突变体种子春化后, 播种于土壤中, 观察突变体表型。结果显示, 突变体种子发芽与野生型种子发芽没有明显差异。生长 2 周后, 突变体植株比野生植株大(图 1)。

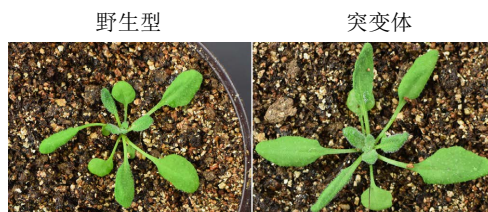


Figure 1. Phenotype of the *hgo* mutant  
图 1. *hgo* 突变体表型

### 3.2. *hgo* 突变体转录组分析

#### 3.2.1. 差异表达基因分析

为了探究 HGO 影响拟南芥生长的机制, 对突变体和野生型植株进行转录组测序。数据分析表明, 突

变体和野生型间有 1413 个基因表达存在差异。其中突变体中表达上调的基因有 741 个，表达下调的基因有 672 个。将差异基因与 GO、KEGG、KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG 数据库进行比对，1397 个基因被注释。其中在 GO 数据库中注释的基因数目为 1211，在 KEGG 数据库中注释的基因数目为 973，在 KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG 数据库中注释的基因数目分别为 580、1397、1210、1138、1267 (表 1)。

**Table 1.** Annotation of differentially expressed genes in *hgo* mutant and wild type

**表 1.** *hgo* 突变体与野生型间差异表达基因注释

| 数据库        | 基因数  | 占比(%) |
|------------|------|-------|
| GO         | 1211 | 85.70 |
| KEGG       | 973  | 68.86 |
| KOG        | 580  | 41.05 |
| NR         | 1397 | 98.87 |
| Pfam       | 1210 | 85.63 |
| Swiss-Prot | 1138 | 80.54 |
| eggNOG     | 1267 | 89.67 |

### 3.2.2. 差异表达基因 GO 功能注释

对突变体和野生型中差异表达基因进行功能注释，结果见表 2。在生物过程中，差异基因在胁迫响应、防御响应、生长素响应、氨基酸代谢和谷胱甘肽代谢方面显著富集；在细胞组分中，差异基因在质膜部分、细胞壁、质外体、共质体和质体膜方面显著富集；在分子功能方面，差异基因在氧化还原酶活性、谷胱甘肽转移酶活性以及谷胱甘肽、黄酮类和碳水化合物结合等方面显著富集(表 2)。

**Table 2.** GO functional classification of differentially expressed genes

**表 2.** 差异基因 GO 功能分类

| 生物过程   |                       | 细胞组分 |                        | 分子功能      |                       |
|--------|-----------------------|------|------------------------|-----------|-----------------------|
| 注释     | 显著性                   | 注释   | 显著性                    | 注释        | 显著性                   |
| 胁迫响应   | $1.01 \times 10^{-3}$ | 质膜部分 | $5.29 \times 10^{-7}$  | 氧化还原酶活性   | $4.43 \times 10^{-3}$ |
| 防御响应   | $3.32 \times 10^{-7}$ | 细胞壁  | $6.38 \times 10^{-10}$ | 谷胱甘肽转移酶活性 | $1.07 \times 10^{-3}$ |
| 生长素响应  | $1.71 \times 10^{-6}$ | 质外体  | $3.71 \times 10^{-7}$  | 谷胱甘肽结合    | $7.78 \times 10^{-3}$ |
| 氨基酸代谢  | $3.45 \times 10^{-4}$ | 共质体  | $2.69 \times 10^{-4}$  | 黄酮类结合     | $1.65 \times 10^{-3}$ |
| 谷胱甘肽代谢 | $5.49 \times 10^{-4}$ | 质体膜  | $5.56 \times 10^{-3}$  | 碳水化合物结合   | $7.77 \times 10^{-3}$ |

### 3.2.3. 差异表达基因 KEGG 通路注释

**Table 3.** KEGG pathway of differentially expressed genes

**表 3.** 差异基因 KEGG 通路注释

| 代谢通路      | 基因数量 | 显著性                   | 富集因子 |
|-----------|------|-----------------------|------|
| 苯丙烷类生物合成  | 45   | $4.90 \times 10^{-8}$ | 2.74 |
| MAPK 信号途径 | 44   | 0.048                 | 1.68 |
| 类黄酮生物合成   | 11   | 0.097                 | 3.03 |
| 谷胱甘肽代谢    | 16   | 0.292                 | 2.18 |
| 植物激素信号传导  | 51   | 0.790                 | 1.41 |
| 淀粉和蔗糖代谢   | 22   | 1.000                 | 1.07 |

为了进一步了解差异表达基因的功能,对差异基因的通路进行富集分析。结果显示,差异基因参与了细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、代谢和有机系统 5 大类中 115 条代谢途径。其中富集在苯丙烷类生物合成途径中的差异基因有 45 个,富集在 MAPK 信号途径的差异基因有 44 个,富集在类黄酮生物合成的差异基因 11 个,富集在谷胱甘肽代谢的差异基因有 16 个,富集在植物激素信号传导的差异基因有 51 个,富集在淀粉和蔗糖代谢的差异基因有 22 个(表 3)。

## 4. 讨论与结论

### 4.1. 讨论

一些研究表明,酪氨酸降解途径对植物生长发育有重要影响,但是该代谢途径在植物中的功能还需进一步揭示。HGO 催化酪氨酸降解第三步反应[1]。我们发现,HGO 基因突变会促进拟南芥生长[13](图 1)。为了探究 HGO 影响拟南芥生长的机制,该研究对 *hgo* 突变体和野生型拟南芥的转录组进行比较分析,结果显示,在突变体和野生型间有 1413 个基因的表达存在差异。对差异表达基因进行功能和代谢通路注释,发现富集在苯丙烷类生物合成、MAPK 信号途径、植物激素信号传导、淀粉和蔗糖代谢通路中的基因较多(表 3)。苯丙烷类生物合成途径是植物重要的次生代谢途径。通过该途径植物合成木质素、黄酮类及酚类等苯丙烷类化合物。这些苯丙烷类化合物在植物生长发育和响应逆境胁迫中有重要作用[19]。酪氨酸是植物苯丙烷类生物合成的前体物质之一[19]。在差异表达基因中,苯丙烷类生物合成相关基因有 45 个,其中 42 个基因在突变体中的表达上调。实验结果表明,HGO 突变可能促使酪氨酸通过苯丙烷类合成途径转化成苯丙烷类化合物。对大豆 HGO 基因突变体进行研究发现,HGO 突变使大豆叶及种子中积累了高浓度的尿黑酸[10]。在植物中,尿黑酸可以进一步转化成维生素 E [10]。与野生型种子比较,突变体种子中维生素 E 含量提高,说明 HGO 突变促使尿黑酸向维生素 E 转化。根据这些研究结果推测,酪氨酸降解抑制可能会促使酪氨酸及其降解代谢中间产物向其他代谢产物转化。MAPK 信号途径在植物发育和对生物胁迫和非生物胁迫响应中起着重要调节作用[20]。与野生型比较,该信号途径中有 44 个基因在突变体中的表达发生了改变。其中 37 个基因在突变体中表达上调,7 个基因表达下调。此外,生长素、水杨酸等信号途径中一些基因的表达在野生型和突变体间也存在差异。脱落酸等植物激素不但影响植物发育,也影响植物对逆境的响应[21]。干旱处理会提高拟南芥中 HGO 的表达量[12]。这些研究结果表明,HGO 不但影响拟南芥发育,而且可能影响拟南芥对胁迫的响应;并且 HGO 可能通过复杂的网络调控拟南芥生长;酪氨酸降解途径可能与苯丙烷类生物合成途径、激素信号途径等其他代谢途径相互作用,共同影响拟南芥发育。大豆 HGO 突变会影响其对除草剂的抗性[10]。根据这些研究结果推测,HGO 及酪氨酸降解途径可能参与了植物对逆境胁迫的响应,其在植物逆境胁迫中的功能还需要进一步探析。

### 4.2. 结论

本研究对 *hgo* 突变体在土壤中生长的表型及其转录组进行分析,发现 HGO 突变影响了苯丙烷类生物合成、MAPK 信号途径、植物激素信号传导、淀粉和蔗糖等代谢通路中的基因表达,促进拟南芥的生长。

## 基金项目

本论文由大学生创新训练项目(S202110537019)支助。

## 参考文献

- [1] Dixon, D.P. and Edwards, R. (2006) Enzymes of Tyrosine Catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **171**, 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.04.008>
- [2] Macias, I., Lafin, A., Bernardo-Seisdedos, G., Gil, D., Gonzalez, E., Falcon-Perez, J.M. and Millet, O. (2019) Heredita-

- ry Tyrosinemia Type I-Associated Mutations in Fumarylacetoacetate Hydrolase Reduce the Enzyme Stability and Increase its Aggregation Rate. *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 13051-13060. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009367>
- [3] Culic, V., Betz, R.C., Refke, M., Fumic, K. and Pavelic, J. (2011) Tyrosinemia Type II (Richner-Hanhart Syndrome): A New Mutation in the TAT Gene. *European Journal of Medical Genetics*, **54**, 205-208. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.11.013>
- [4] Barroso, F., Correia, J., Bandeira, A., Carmona, C., Vilarinho, L., Almeida, M., Rocha, J.C. and Martins, E. (2020) Tyrosinemia Type III: A Case Report of Siblings and Literature Review. *Revista Paulista de Pediatria*, **38**, e2018158. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2020/38/2018158>
- [5] Davison, A.S., Hughes, A.T., Milan, A.M., Sireau, N., Gallagher, J.A. and Ranganath, L.R. (2020) Alkaptonuria-Many Questions Answered, Further Challenges Beckon. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, **57**, 106-120. <https://doi.org/10.1177/0004563219879957>
- [6] Schenck, C.A. and Maeda, H.A. (2018) Tyrosine Biosynthesis, Metabolism and Catabolism in Plants. *Phytochemistry*, **149**, 82-102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.003>
- [7] Han, C., Ren, C., Zhi, T., Zhou, Z., Liu, Y., Chen, F., Peng, W. and Xie, D. (2013) Disruption of Fumarylacetoacetate Hydrolase Causes Spontaneous Cell Death under Short-day Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **162**, 1956-1964. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216804>
- [8] Hu, C., Huang, L., Chen, Y., Liu, J., Wang, Z., Gao, B., Zhu, Q. and Ren, C. (2021) Fumarylacetoacetate Hydrolase Is Required for Fertility in Rice. *Planta*, **253**, Article No. 122. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03632-1>
- [9] Hildebrandt, T.M., Nunes Nesi, A., Araújo, W.L. and Braun, H.P. (2015) Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*, **8**, 1563-1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- [10] Stacey, M.G., Cahoon, R.E., Nguyen, H.T., Cui, Y., Sato, S., Nguyen, C.T., Phoka, N., Clark, K.M., Liang, Y., Forrester, J., Batek, J., Do, P.T., Slepser, D.A., Clemente, T.E., Cahoon, E.B. and Stacey, G. (2016) Identification of Homogentisate Dioxygenase as a Target for Vitamin E Biofortification in Oilseeds. *Plant Physiology*, **172**, 1506-1518. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00941>
- [11] 陈彦成, 赵杨, 刘之熙, 黄丽华, 任春梅. 不同光周期及不同胁迫对水稻 OsHGO 基因表达的影响[J]. 湖南农业科学, 2019(7): 1-3, 8.
- [12] Heinemann, B. and Hildebrandt, T.M. (2021) The Role of Amino Acid Metabolism in Signaling and Metabolic Adaptation to Stress-Induced Energy Deficiency in Plants. *Journal of Experimental Botany*, **72**, 4634-4645. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab182>
- [13] 陈彦成, 钱伟超, 彭志红, 任春梅. 酪氨酸及酪氨酸降解途径中 HGO 基因突变对拟南芥幼苗生长的影响[J]. 作物研究, 2014, 28(3): 251-253.
- [14] 薛守宇, 朱涛, 李冰冰, 李涛涛. 转录组和代谢组联合分析在植物中的应用研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2022, 42(3): 1-13.
- [15] Kim, D., Langmead, B. and Salzberg, S.L. (2015) HISAT: A Fast Spliced Aligner with Low Memory Requirements. *Nature Methods*, **12**, 357-360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- [16] Perteua, M., Perteua, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T. and Salzberg, S.L. (2015) StringTie Enables Improved Reconstruction of a Transcriptome from RNA-seq Reads. *Nature Biotechnology*, **33**, 290-295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
- [17] Florea, L., Song, L. and Salzberg, S.L. (2013) Thousands of Exon Skipping Events Differentiate Among Splicing Patterns in Sixteen Human Tissues. *F1000Research*, **2**, 188. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-188.v1>
- [18] Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-seq Data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**, Article No. 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- [19] Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S. and Neutelings, G. (2016) Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in Plant Science*, **7**, Article 735. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00735>
- [20] Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J. and Hirt, H. (2014) The Role of ABA and MAPK Signaling Pathways in Plant Abiotic Stress Responses. *Biotechnology Advances*, **32**, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.006>
- [21] Brookbank, B.P., Patel, J., Gazzarrini, S. and Nambara, E. (2021) Role of Basal ABA in Plant Growth and Development. *Genes*, **12**, Article 1936. <https://doi.org/10.3390/genes12121936>