

# 利用基因工程提高植物维生素 E 营养品质的策略

王永飞, 马三梅

(暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632)

**摘要:** 维生素 E 是一种对植物、动物和人类都具有重要作用的脂溶性维生素。而植物则是人类维生素 E 的主要来源。对维生素 E 的结构和合成途径进行了简单的介绍, 并重点综述了利用基因工程提高植物维生素 E 营养品质的策略。这些策略主要包括导入编码影响维生素 E 总量相关酶的基因来提高维生素 E 的总量; 导入编码影响维生素 E 组成相关酶的基因, 提高  $\alpha$ -生育酚在总生育酚中所占的比例, 从而提高维生素 E 的活性。

**关键词:** 植物; 基因工程; 维生素 E; 生育酚

**中图分类号:** Q943; Q946.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0076-04

## Improving the vitamin E nutrition of plant by gene engineering

WANG Yong-fei, MA San-mei

(Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Vitamin E is an important class of lipid-soluble compounds with antioxidant activities that play a very important role in plant, animal and human being. Plant is the main resource of the vitamin E. Based on presenting a brief summary of the structure and biosynthesis pathway of vitamin E, the particular emphasis was placed on the methods that used to improve the vitamin E nutrition of plant by gene engineering in this review. This includes two complementary strategies: (i) Introducing the genes with encoding enzymes can increase the flux through the tocopherol biosynthetic pathway to produce elevated levels of total tocols; (ii) Introducing the genes which encoding enzymes can affect the composition of tocols and make  $\alpha$ -tocopherol the predominant form of vitamin E, so the activity of vitamin E is elevated.

**Key words:** plant; gene engineering; vitamin E; tocopherol

维生素 E 是人体和动物必须从食物中摄取的一种微量营养素, 是维持肌肉、中枢神经系统和血管正常代谢, 以及许多生理功能所必需的。维生素 E 具有很强的抗氧化能力, 能通过清除脂质过氧化所产生的自由基而稳定生物膜的脂双层, 使细胞免受过氧化物的伤害 (Brigelius-Floh 等, 1999)。近年来的研究表明, 每天摄入适量的维生素 E 可提高免疫功能, 防止或延缓人类许多慢性病的进程, 降低患心血管疾病和某些癌症的危险 (Vertuani 等, 2004)。在

临床上, 维生素 E 可用于治疗老年性痴呆病、高血压、冠心病、心肌梗塞、动脉硬化、血栓、不孕症、前列腺癌和阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease) 等 (Ajjawi 等, 2004)。在食品方面, 天然维生素 E 不仅营养丰富, 而且安全性高。主要是用于脂肪和含油食品的抗氧化剂, 保持加工食品稳定持久的新鲜风味。维生素 E 更适用于生产功能性保健和强化食品, 特别是用作婴幼儿食品的抗氧化剂和营养强化剂等。在饲料方面, 维生素 E 作为饲料添加剂,

收稿日期: 2004-10-08 修回日期: 2005-03-28

基金项目: 暨南大学博士启动基金 (692017, 692016) [Supported by Initial Foundation to Ph. D of Jinan University (692017, 692016)].

作者简介: 王永飞 (1972-), 男, 山西壶关县人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物基因工程的研究。

既是一种抗氧化剂,又可以提高动物免疫力,防治疾病,改善肉质等。在化妆品方面,天然维生素 E 易被皮肤吸收,能促进皮肤的新陈代谢和防止色素沉淀,改善皮肤弹性,且有美容、护肤、抗衰老等功能。因此,维生素 E 作为营养补充剂和抗氧化剂广泛应用于医药、保健品、食品、营养品、化妆品和饲料等行业中(雷炳福,2003;尤新,2000)。

## 1 维生素 E 的结构

维生素 E 是母育酚(tocol)不同异构体的总称。而母育酚是在苯环上含有多个甲基的酚的苯并二氢吡喃衍生物,由一个疏水侧链和一个芳香环的极性头部组成(欧阳青等,2003)。根据侧链的饱和度可分为生育酚(tocopherol, T)和三烯生育酚(tocotrienol)两大类。生育酚含有饱和的侧链;而三烯生育酚含有不饱和的侧链。每类依芳香环上甲基数目和位置的不同又分别分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -生育酚和  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -三烯生育酚。 $\alpha$ -型有 3 个甲基, $\beta$ -和  $\gamma$ -型有 2 个甲基,而  $\delta$ -型仅有 1 个甲基。在植物体内,主要的维生素 E 为生育酚;三烯生育酚在植物中的确切功能现在还未知(胡英考,2004)。

## 2 植物体内生育酚的合成途径

高等植物通过一系列的酶促反应合成生育酚(欧阳青等,2003;胡英考,2004;Hofius 等,2003)。整个途径的第一步是疏水尾部及芳香环头部的合成。疏水尾部源于非甲羟戊酸途径(non-mevalonate pathway)产生的异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)。3 分子的 IPP 在双牻牛儿基二磷酸(geranylgeranyl diphosphate synthases, GGDP)合酶(synthase)的催化下依次线形地添加到其异构体二甲基丙烯焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)上而生成  $C_{20}$  的 GGDP。GGDP 随后在 GGDP 还原酶(reductase)的作用下,逐步还原形成生育酚的饱和侧链——叶绿醇二磷酸(phytyldiphosphate, PDP)。芳香环头部来自酪氨酸降解途径(tyrosine catabolism pathway)的对羟甲基丙酮酸(4-hydroxyphenylpyruvate, HPP)。HPP 在对羟甲基丙酮酸双加氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)的催化下合成尿黑酸(homogentisic acid, HGA)。

生育酚生物合成的第二步是 HGA 在尿黑酸叶绿醇转移酶(homogentisate phytyltransferase, HPT)催化下,与 PDP 发生缩合反应,生成 2-甲基-6-叶绿醇苯醌(2-methyl-6-phytylbenzoquinone, MPBQ)。

生育酚合成的第三步是甲基化和环化。MPBQ 在 MPBQ 甲基转移酶(methyltransferase, MT)的催化下,生成 2,3-二甲基-6-叶绿醇苯醌(2,3-dimethyl-6-phytylbenzoquinone, DMPBQ)。MPBQ 和 DMPBQ 在生育酚环化酶(tocopherol cyclase, TC)的催化下,分别生成  $\delta$ -和  $\gamma$ -生育酚。而后,在  $\gamma$ -生育酚甲基转移酶( $\gamma$ -tocopherol methyl-transferase,  $\gamma$ -TMT)的催化下, $\delta$ -和  $\gamma$ -生育酚分别生成  $\beta$ -和  $\alpha$ -生育酚。生育酚合成的途径可简单地总结如图 1。

## 3 利用基因工程提高植物体维生素 E 营养品质的策略

### 3.1 维生素 E 合成相关酶基因的克隆

目前已从植物中鉴定和克隆的与维生素 E 合成相关酶的基因有 GGDP 合酶、GGDP 还原酶、HPT、HPPD、TC 和  $\gamma$ -TMT 等基因(Ajjawi 等,2004;欧阳青等,2003;胡英考,2004;Hofius 等,2003)。根据编码的酶在合成途径中所起的作用可以将这些基因分成两大类:一类主要影响维生素 E 的总量,包括 GGDP 合酶、GGDP 还原酶、HPT 和 HPPD 基因,它们主要通过调节合成途径的流向而影响维生素 E 的总量;另一类主要影响维生素 E 的成分,即  $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ -生育酚的相对含量,包括 TC 和  $\gamma$ -TMT 基因,它们主要是通过调节植物组织中生育酚的成分而影响维生素 E 的活性。这是由于动物和人体肝脏中的生育酚结合蛋白(tocopherol-binding protein, TBP)对  $\alpha$ -生育酚具有高度的专一性,从而保证优先结合  $\alpha$ -生育酚。所以在生育酚和三烯生育酚中, $\alpha$ -生育酚的生理活性最高,并被人体优先吸收和利用。其它 3 种生育酚( $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -生育酚)的相对活性分别为 50%、10%和 3%; $\alpha$ -三烯生育酚的约为 30%,而其它三烯生育酚的约为 10%(Kamal-Eldin 等,1996)。

因此,利用基因工程,可以采用下列 2 条途径来改良植物的维生素 E 营养品质:第一:导入编码影响维生素 E 总量相关酶的基因,提高植物维生素 E 的总量;第二:导入编码影响维生素 E 的组分相关酶的基因,提高  $\alpha$ -生育酚在总生育酚中所占的比例,从而提高维生素 E 的活性。

### 3.2 导入编码影响维生素 E 总量相关酶的基因, 提高植物体内维生素 E 的总量

3.2.1 HPPD 基因 HPPD 催化 HPP 形成 HGA, 在植物基因组中过量表达 HPPD 基因可以提高植物维生素 E 的含量。例如在过量表达 HPPD 基因的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, HPPD 酶活性至少比对照植株增加 10 倍, 种子和叶子中的生育酚含量也分别增加了 37% 和 28% (Tsegayea 等, 2002)。

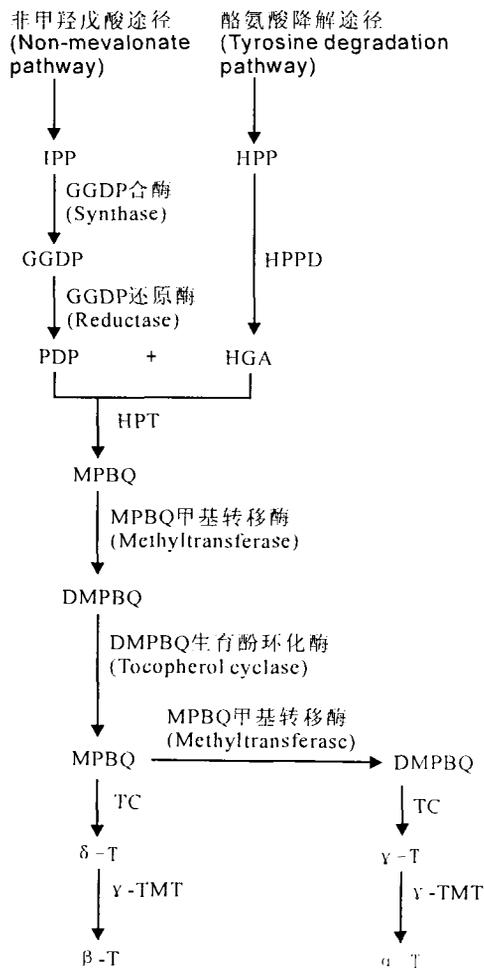


图 1 植物体内的生育酚合成途径

Fig. 1 Tocopherol biosynthesis in plants

Falk 等 (2003) 将大麦 (*Hordeum vulgare*) 的 HPPD 基因在 35S 启动子的控制下在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中过量表达。结果发现, 在转基因植株中, HGA 的合成能力增加 10 倍, 种子中维生素 E 的含量增加两倍。

另外, Rippert 等 (2004) 在已过量表达拟南芥 HPPD 基因的烟草中再导入酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的预苯酚脱氢酶 (prephenate dehydro-

genase) 基因, 结果发现, 三烯生育酚在转基因植株的叶子中大量积累, 而在野生型植株的叶子中是无法检测到三烯生育酚。

3.2.2 HPT 基因 Collakova 等 (2003) 将 HPT 基因导入拟南芥基因组, 使之在拟南芥中组成型表达, 结果发现, 在转基因植株的叶片中, HPT 的酶活性比野生型植株的增加 10 倍, 生育酚的总量比野生型植株增加 4.4 倍; 在种子中, HPT 酶活性比野生型植株增加了 4 倍, 生育酚的总含量比野生型植株增加 40%。Savidge 等 (2002) 在拟南芥中过量表达拟南芥的 HPT 基因, 在转基因植株种子中也得到了同样的结果, 但生育酚含量的增加数量是较低的, 和野生类型的转基因植株水平相比, 增加的量为 0.4 ~ 2 倍。

Cahoon 等 (2003) 从大麦、小麦 (*Triticum aestivum*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 中鉴定出了一个 HPT 突变体。它的序列明显地和以前已鉴定的 HPT 不同。该蛋白质的功能分析表明, 它具有尿黑酸二萜牛儿基转移酶 (homogentisate geranylgeranyltransferases, HGGT) 活性。HGGT 催化一个和 HPT 类似的反应, 不同之处在于它的底物不是 PDP, 而是 GGDP。HGGT 是三烯生育酚合成中的一个限速酶, 因此, 将 HGGT 基因导入植物, 也可以提高植物的维生素 E 的总量。例如在拟南芥叶子中过量表达大麦的 HGGT 基因导致叶子中维生素 E 活性增加 15~20 倍; 在玉米 (*Zea mays*) 的种子中过量表达玉米的 HGGT 的基因导致三烯生育酚水平增加 20 倍。然而, 由于三烯生育酚不能象  $\alpha$ -生育酚一样很好地被人体吸收, 因此在玉米种子中过量表达 HGGT 导致三烯生育酚大量增加并不能使这些植物维生素 E 的营养价值增加很多。但是, 由于三烯生育酚在体外具有较高的抗氧化活性 (Kamal-Eldin 等, 1996), 因此具有高水平三烯生育酚的转基因植物可以作为化学抗氧化剂在工业中应用, 例如可以作为油漆、涂料和亲脂性产品的氧化稳定剂。并且, 现已报道, 三烯生育酚在降低人类胆固醇中也许具有一定的治疗作用 (Theriat, 1999)。

另外, 通过过量表达编码脱氧木酮糖磷酸合成酶 (deoxy-xylulose-phosphate synthase) 的基因来增加非甲羟戊酸途径的总流量例如 IPP, 也可以引起拟南芥叶片中生育酚含量 40% 的增加 (Estevez 等, 2001)。

### 3.3 导入编码影响维生素 E 组成相关酶的基因, 提高 $\alpha$ -生育酚在总生育酚中所占的比例

催化生育酚合成途径最后步骤的酶, 尤其  $\gamma$ -TMT 和 TC 等对决定生育酚的成分是重要的。例如在拟南芥中过量表达  $\gamma$ -TMT 基因使  $\alpha$ -生育酚的含量由原来占总生育酚含量的 1% 上升到 85%~95%, 与野生型植株相比, 种子中的  $\alpha$ -生育酚水平增加 80 倍以上。这是通过分子操作在植物组织中提高维生素 E 活性的第一成功事例(Shintani 等, 1998)。

在大豆(*Glycine max*)种子中不能积累  $\alpha$ -生育酚, 但是可以积累  $\delta$ -和  $\gamma$ -生育酚。孟山都公司(Monsanto Company)的 Van Eenennaam 等(2003)将拟南芥的  $\gamma$ -TMT 基因导入大豆基因组, 使其在大豆种子中过量表达, 结果发现,  $\gamma$ -TMT 过量表达导致 95% 的  $\delta$ -和  $\gamma$ -生育酚转化为  $\alpha$ -生育酚, 维生素 E 的活性增加 5 倍。

中国科学院微生物研究所的欧阳青等(2003)从结球甘蓝(*Brassica oleracea*)中也克隆得到了  $\gamma$ -TMT 基因, 并在大肠杆菌中表达出了具有生物活性的  $\gamma$ -TMT, 目前正在进行有关改良油料作物油质的尝试。

另外, 在拟南芥种子中特异表达锌指蛋白转录因子(zinc finger protein transcription factors, ZFP-TFs), 可以增加  $\gamma$ -TMT 基因的表达, 从而提高种子中的  $\alpha$ -生育酚的含量(Alison 等, 2004)。

## 4 结论和展望

利用基因工程改良植物的维生素 E 营养品质, 不仅有助于人们从日常膳食中获得高水平的生育酚, 达到增强体质, 防病治病的目的; 而且还可以降低维生素 E 的生产成本, 提高维生素 E 产品的数量和质量, 这在医药、保健品、食品、营养品、化妆品和饲料等生产中具有广泛的应用前景。我们相信, 随着植物分子生物学的深入研究和生物技术的不断完善和发展, 利用基因工程改良植物维生素 E 营养品质的研究将会取得更大的进展。

### 参考文献:

Ajjawi I, Shintani D. 2004. Engineered plants with elevated vitamin E; a nutraceutical success story[J]. *Trends Biotech*, **22**(3): 104-107.

Alison L, Van Eenennaam, Venkatramesh M, et al. 2004. Elevation of seed  $\alpha$ -tocopherol levels using plant-based transcription factors targeted to an endogenous locus[J]. *Metabolic Engineering*, **6**: 101-108.

Brigelius-Floh ER, Traber M G. 1999. Vitamin E; Function and metabolism[J]. *The FASEB J*, **13**: 1 145-1 155.

Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, et al. 2003. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content[J]. *Nat Biotechnol*, **21**: 1 082-1 087.

Collakova E, DellaPenna D. 2003. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, **131**(2): 632-642.

Estevez JM, Cantero A, Reindl A, et al. 2001. 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants[J]. *J Biol Chem*, **276**: 22 901-22 909.

Falk J, Andersen G, Kernebeck B, et al. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of vitamin E content in seeds but not in leaves[J]. *FEBS Lett*, **540**: 35-40.

Hofius D, Sonnewald U. 2003. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology[J]. *Trends Plant Sci*, **8**: 6-8.

Hu YK(胡英考). 2004. Molecular biology and biotechnology improvement of vitamin E biosynthesis in plant(植物维生素 E 合成及其生物技术改良)[J]. *China Biotechnol*(中国生物工程杂志), **24**(1): 32-35.

Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols[J]. *Lipids*, **31**: 671-701.

Lei BF(雷炳福). 2003. Industrialization prospect of natural vitamin E of China(我国天然维生素 E 产业化前景初探)[J]. *Chin Oil Fat*(中国油脂), **28**(4): 49-51.

Ou YQ(欧阳青), Cai WQ(蔡文启). 2003. Biosynthesis pathway of nature vitamin E(天然维生素 E 的生物合成途径)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **39**(5): 501-507.

Rippert P, Scimemi C, Dubald M, et al. 2004. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance[J]. *Plant Physiol*, **134**(1): 92-100.

Savidge B, Weiss JD, Wong YHH, et al. 2002. Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. Pcc 6803 and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, **129**: 321-332.

Shintani D, DellaPenna D. 1998. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering[J]. *Science*, **282**: 2 098-2 100.

Theriault A. 1999. Tocotrienol; a review of its therapeutic potential[J]. *Clin Biochem*, **32**: 309-319.

Tsegayea Y, Shintania DK, DellaPenna D. 2002. Overexpression of the enzymes p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relationship to tocopherol biosynthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, **40**: 913-920.

Van Eenennaam A L, Lincoln K, Durrett T P, et al. 2003. Engineering vitamin E content; From *Arabidopsis* mutant to soy oil[J]. *Plant Cell*, **15**(12): 3 007-3 019.

Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview[J]. *Cur Pharmaceutical Design*, **10**(14): 1 677-1 694.

You X(尤新). 2000. The function and application prospect of natural vitamin E(天然维生素 E 的功能和开发前景)[J]. *Sci Technol Food Industry*(食品工业科技), **21**(4): 5-61.