

特约综述 Invited Review

高等植物维生素C和维生素E代谢调控

郭新波¹, 唐岳立², 孙小芬¹, 唐克轩^{1,2,*}¹复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 上海200433; ²上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究中心, 上海200240

摘要: 维生素C和维生素E是植物自身合成的抗氧化剂, 对植物发育具有重要调控作用。本文对近年来高等植物维生素C和维生素E合成途径、代谢调控、关键酶基因的克隆和转化进行了论述, 分析两种维生素之间的相互作用, 对该领域未来的研究方向进行了展望。

关键词: 高等植物; 维生素C; 维生素E; 代谢调控

Metabolic Regulation of Vitamins C and E in Higher Plants

GUO Xin-Bo¹, TANG Yue-Li², SUN Xiao-Fen¹, TANG Ke-Xuan^{1,2,*}¹State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; ²Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Vitamins C and E are antioxidants which are synthesized and play important regulatory roles in plants. In this review, the synthesis pathways of vitamins C and E and the regulation of their metabolism in higher plants are summarized. The isolation and transformation of genes encoding key enzymes involved in their syntheses, and the interaction of the two vitamins in plants are also surveyed. Finally, the directions of research in this field in the future are predicted.

Key words: higher plants; vitamin C; vitamin E; metabolic regulation

植物次生代谢产物是长期进化过程中植物对生态环境的一种适应, 在植物抵抗环境胁迫和参与生物竞争中扮演重要的角色, 是保证细胞生命活动和植物生长发育正常进行的非必需小分子化合物。植物次生代谢途径是高度分支的途径, 次生代谢产物在植物特定组织、器官合成, 其表达量也受到独立的调控。植物合成的次生代谢产物按其极性可分为水溶性物质(如维生素C)和脂溶性物质(如维生素E)两大类。维生素C和维生素E均为绿色植物细胞合成的抗氧化剂, 在清除自由基对细胞的伤害、提高植物抗胁迫能力方面具有重要作用。不同之处在于, 维生素C是一种水溶性的抗氧化剂, 游离于细胞质中, 可清除自由基, 或者参与到其他代谢途径的反应; 维生素E是一种脂溶性的抗氧化剂, 具有极性的头部和非极性的尾部, 通过非极性尾部嵌合在生物膜上, 在维持生物膜的完整性方面起到重要作用。二者在细胞中的合成途径与合成部位不同, 但其代谢过程却有着紧密的联系。维生素C通过细胞内谷胱甘肽循环参

与维生素E的代谢调控, 对维生素E还原性的维持起到重要作用。

1 植物维生素C代谢调控

维生素C又名抗坏血酸(L-ascorbic acid, ASA), 是植物和绝大多数动物体内合成的一种己糖内酯化合物(Gupta等1973; Smirnoff和Pallanca 1996)。人类和其他一些灵长类动物由于缺乏维生素C合成途径最后一个关键酶(L-古洛糖醛酸-1,4-内酯氧化酶)基因, 无法自身合成并储存维生素C, 必须从日常饮食中摄入(Gupta等1973)。当维生素C缺乏时, 人类会出现一些疾病症状, 如坏血病(Pimentel 2003)。新鲜的水果和蔬菜成为人类摄入维生素C的重要来源(Wrieden等2000)。维生素C作为植物代谢过程不可缺少的产物, 在植物的抗氧化能力

收稿 2011-06-13 修定 2011-07-21
资助 国家“973”计划(2007CB108805)和上海市重点学科项目(B209)。

* 通讯作者(E-mail: kxtang1@163.com; Tel: 021-65643552)。

(Noctor和Foyer 1998)、光合作用(Packer等1979; Rockholm和Yamamoto 1996; Smirnov 2000)和代谢调控(Pignocchi和Foyer 2003)方面也具有重要的生理学功能。

1.1 植物维生素C的生理功能

维生素C在植物中的生物化学功能概括起来可以分为四大类: (1)抗氧化作用。维生素C能够与活性氧(reactive oxygen species, ROS), 如单线态氧(singlet oxygen)、超氧阴离子(superoxide)及羟基自由基(hydroxyl radical, OH)等迅速反应, 参与有氧代谢过程中活性氧的去除(Kumar等2010)。另外, 维生素C还能够维持脂溶性抗氧化剂——维生素E的还原状态, 从而保护机体和正常代谢免受氧化胁迫造成的伤害(Uchendu等2010)。(2)酶的辅助因子(Mandl等2009)。维生素C作为羟化酶的辅助因子参与羟脯氨酸和羟赖氨酸的合成, 而富含羟脯氨酸的糖蛋白是细胞壁结构蛋白的重要组成部分, 因此维生素C作为羟化酶的辅助因子间接参与调节植物细胞的分裂(Matamoros等2006)、生长和伸长(Smirnov和Pallanca 1996), 调控细胞壁的代谢与膨大(Schopfer等2001)。同时, 维生素C还参与了乙烯、赤霉素、花青素合成等多条代谢途径(loanidi等2009), 在其中充当辅助因子, 因此, 维生素C对植物的生长发育具有重要的生理学功能。(3)电子传递中间体。体外实验表明维生素C参与了光合系统和线粒体的电子传递(Miyake和Asada 1992), 研究表明维生素C在跨膜清除自由基反应过程中, 可能对光合系统PSII起到了电子传递的作用(McCarrell等2008)。(4)信号调控元件。脱氢抗坏血酸(dehydro-L-ascorbic acid, DHA)能够形成胞壁草酸, 草酸与细胞间隙的 Ca^{2+} 形成结晶, 而 Ca^{2+} 又是细胞信号转导途径的重要调控元件, 通过控制细胞 Ca^{2+} 的水平间接调控多种代谢途径和基因的表达(Mahajan等2008)。

1.2 植物维生素C合成途径

维生素C作为人类食物中重要的“抗氧化剂”和“自由基清除剂”, 在植物和大多数动物中含量丰富, 动物中维生素C的合成途径在60年前就已研究清楚, 然而它在植物中的合成途径一直存在争议。关于高等植物维生素C的合成, 先后提出过碳链倒位途径、邻酮醛糖途径、L-半乳糖途径和糖

醛酸途径等学说(Smirnov和Wheeler 2000)。1998年Wheeler和Smirnov在总结前人研究的基础上提出了高等植物维生素C合成的Smirnov-Wheeler途径, 即L-半乳糖途径, 并认为半乳糖途径在植物维生素C合成中占主导地位, 但并不排除其他途径存在的可能性(Wheeler等1998)。Davey等(1999)对拟南芥悬浮细胞的研究发现, 植物体可以由半乳糖醛酸合成维生素C, 推测植物中可能存在糖醛酸途径合成维生素C这一支路。从草莓果实克隆的D-半乳糖醛酸还原酶基因在拟南芥中的研究结果证实了该推测(Agius等2003)。编码大鼠L-古洛糖醛酸-1,4-内酯氧化酶的基因在烟草和生菜中可以促进维生素C的含量提高(Jain和Nessler 2000)。Wagner等(2003)在研究维生素C代谢模式中发现在拟南芥中存在古洛糖酸, 推测植物中存在一个可以催化L-半乳糖醛酸-1,4-内酯和L-古洛糖醛酸-1,4-内酯相互转化的表异构酶, 他们提出植物可能存在一个类似于动物的维生素C合成途径。Lorence等(2004)的研究表明肌醇能够在肌醇加氧酶作用下生成为葡萄糖醛酸参与糖醛酸途径促进植物维生素C的合成。因此, 目前植物维生素C合成途径主要有4条: L-半乳糖途径、糖醛酸途径、L-古洛糖途径和肌醇途径(图1)。

多条合成途径共存是植物在进化过程中形成的对生态环境和自身发育的适应和调节, 其中以L-半乳糖途径为主导, 其他合成途径作为分支对植物维生素C合成起补充作用。要清楚了解这几条合成途径之间的相互关系及转变过程, 需要对植物的特定生长环境和组织部位进行深入研究。例如, 糖醛酸途径出现在植物的生殖生长阶段, 此时植物叶片已经出现衰老, 合成维生素C的能力大大下降, 而细胞的膨大、花粉的发育和果实的成熟需要植物提供更多的维生素C以对抗外界环境的氧化胁迫, 因此植物利用胞壁裂解的多糖经糖醛酸途径转变为维生素C, 对种子的成熟和后代的延续起到了保护作用, 是植物适应环境的一种进化策略。

1.3 植物维生素C的分解代谢与再生循环

维生素C是一种水溶性维生素, 包含两个烯二醇基团, 在植物体内最主要的分解方式是提供电子被氧化, 成为植物的抗氧化剂(Davey等2000)。

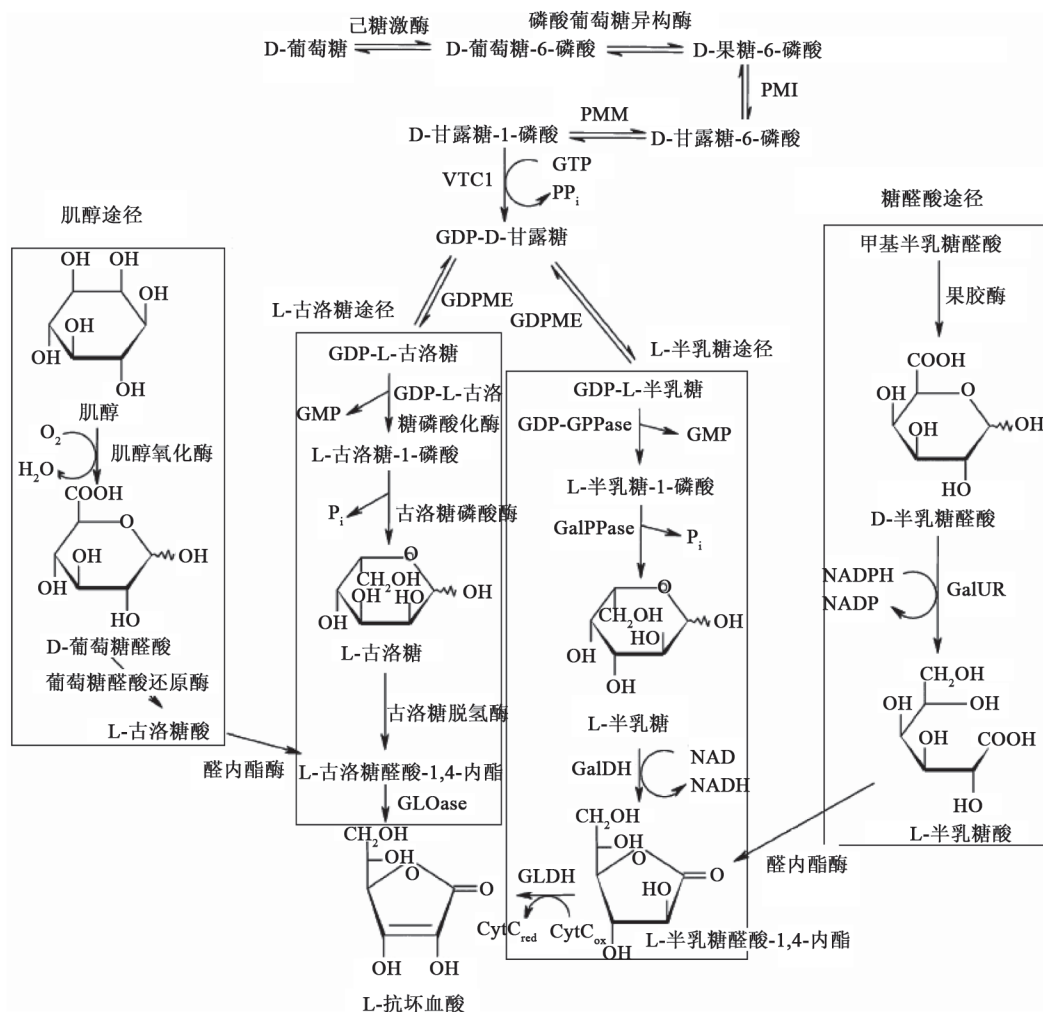


图1 植物维生素C合成途径(Smirnoff和Wheeler 2000)

Fig.1 The biosynthesis pathways of vitamin C in plants

维生素C合成有L-半乳糖途径、L-古洛糖途径、糖醛酸途径和肌醇途径这4条途径。其中L-半乳糖途径和L-古洛糖途径均由葡萄糖从头合成,在GDP-D-甘露糖处形成分支,然后分别经4步反应合成维生素C。维生素C在植物中以L-半乳糖途径为主要合成途径,在动物中以L-古洛糖为主要合成途径。糖醛酸途径和肌醇途径是维生素C合成的旁路途径,利用细胞代谢的中间产物作为底物进行维生素C合成。

催化维生素C分解的氧化酶主要有两个:抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase, AO) (Kato和Esaka 1999)和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX) (Davletova等2005)。维生素C在AO和APX作用下失去 H^+ 被氧化生成单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDA), MDA可在没有酶催化的情况下自身发生歧化反应生成维生素C和脱氢抗坏血酸(dehydro-L-ascorbic acid, DHA),也能够在单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDAR)作用下与NADH反应还原成维

生素C。DHA水解为2,3-二酮古洛糖酸(2,3-diketogulonic acid),或者在脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)作用下与谷胱甘肽(GSH)反应重新形成维生素C,使得维生素C再生,该过程被称之为抗坏血酸-谷胱甘肽循环(Noctor和Foyer 1998) (图2)。ASA最终代谢降解为草酸和酒石酸(Loewus 1999)。因此,维生素C成为生物体内最有效的还原剂之一,对清除自由基,保护和维持一些重要物质(如黄酮、多酚和维生素E等)的还原状态起着关键作用。

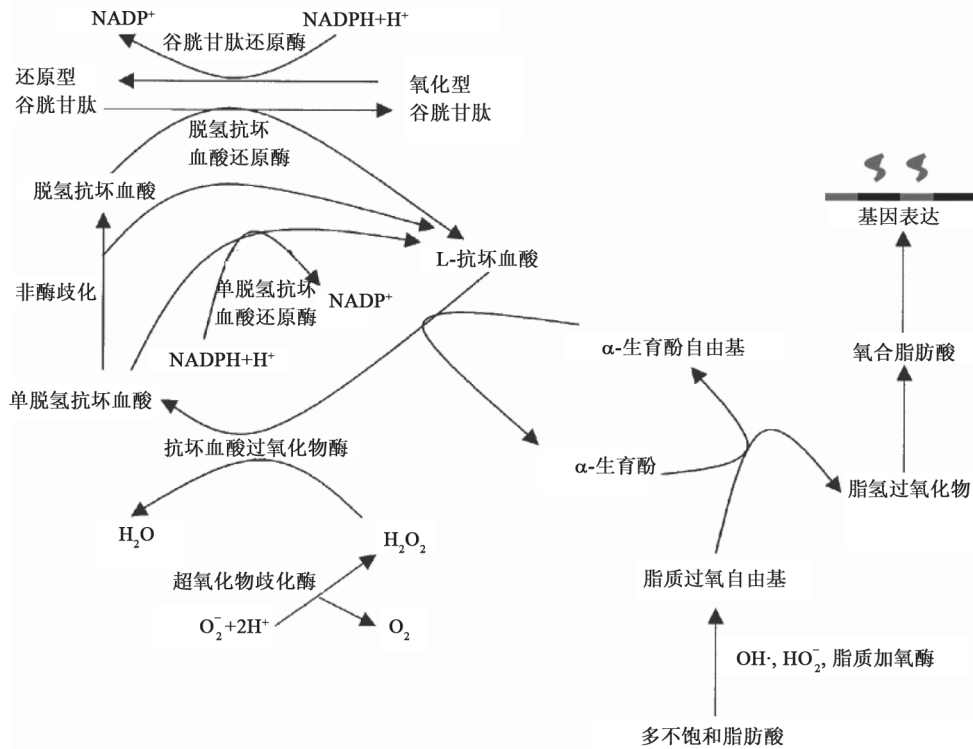


图2 抗坏血酸-谷胱甘肽-生育酚循环(Noctor和Foyer 1998)

Fig.2 The cycle of ascorbic acid-GSH-tocopherol

细胞因胁迫而产生的活性氧簇(ROS)游离于胞质中被维生素C捕获,通过抗坏血酸过氧化物酶作用清除。维生素C因参与清除自由基而分解为脱氢抗坏血酸,脱氢抗坏血酸在谷胱甘肽的作用下重新形成维生素C。游离的自由基攻击质膜上的多不饱和脂肪酸产生脂质自由基,脂质自由基被膜上嵌合的生育酚还原为脂质过氧化物进入信号通路调控基因的表达。生育酚被氧化释放的生育酚自由基在维生素C的作用下被还原为生育酚,重新回到质膜上。

1.4 维生素C代谢调控关键酶基因的克隆与表达分析

目前已从多种植物中克隆到维生素C合成的L半乳糖途径关键酶基因,对其他旁路途径的关键酶基因也进行了分离鉴定。

(1)磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase, PMI)。该酶催化果糖-6-磷酸形成甘露糖-6-磷酸(图1),是指导磷酸己糖进入甘露糖代谢的第一步。早期研究表明,PMI在植物中表达量极低甚至缺失(Herold和Lewis 1977),虽然通过外源添加D-甘露糖可以合成甘露糖-6-磷酸,但是对植物有毒,这是因为少量的6-磷酸-D-甘露糖变为6-磷酸-D-果糖和葡萄糖磷酸会造成植物细胞磷酸盐缺失和ATP供应不足(Loughman等1989; Pego等1999; Stein和Hansen 1999),说明PMI可能具有传递能量的作用。但一些主要以甘露聚糖作为光合产

物和能量储备的物种则需要比较高的PMI活性(Rumpho等1983)。因此,除非有其他途径可以提供磷酸甘露糖,否则所有植物都应该含有PMI。目前该方面的工作有待进一步研究。

(2)磷酸甘露糖变位酶(phosphomannose mutase, PMM)。该酶催化甘露糖磷酸上的磷酸基团由第6位转化到第1位(图1)(Loughman等1989)。植物磷酸甘露糖变位酶的特性目前研究的较少,与其他生物相比,它也需要低浓度的寡糖二磷酸激活反应(Oesterhelt等1997)。在玉米中的研究发现,存在两种有PMM活性的酶:一种酶特异识别甘露糖磷酸,另一种酶对甘露糖磷酸和葡萄糖磷酸具有相同的活性(Popova等1998)。目前已在细菌、酵母和一些哺乳动物中克隆得到编码PMM的基因(Dwivedi等1996; Elling等1996; Hansen等1997)。

(3) GDP-D-甘露糖焦磷酸酶(GDP-D-mannose pyrophosphorylase, GMP或VTC1)。该酶催化甘露糖-1-磷酸转化为GDP-D-甘露糖(图1), 被认为是进入半乳糖途径的第一步反应。目前已经从多种植物中克隆得到编码GMP的基因, 如烟草(GenBank: AB066279) (Tabata等2002)、土豆(GenBank: AF022716) (Keller等1999)、拟南芥(GenBank: AF076484)等。对拟南芥*vtc1*缺陷突变体的研究表明, GDP-D-甘露糖焦磷酸酶活性下降, 维生素C含量也随之降低(Gabriela和Munstedt 2003), 这有力地证明了高等植物维生素C合成的L-半乳糖途径。

(4) GDP-D-甘露糖表异构酶(GDP-D-mannose-3,5-epimerase, GDPME)。该酶催化GDP-D-甘露糖向GDP-L-半乳糖的转变(图1), 该反应为可逆反应, 对维持细胞内GDP-D-甘露糖和GDP-D-半乳糖的平衡关系具有重要意义, 也是维生素C反馈调节的关键环节。1998年, Wheeler等从豌豆、拟南芥等植物中分离鉴定出该酶。随后, Wolucka等(2001)从拟南芥中克隆获得了编码GDPME的基因。在拟南芥中的研究发现, 该酶由2个亚基组成, 至少催化2个显著的叉向异构反应, 叉向异构反应的规律与该酶的分子构型有关。因此推测, 该酶在拟南芥维生素C合成中具有调控作用, 通过控制进入L-半乳糖途径的碳元素多少来决定维生素C合成的量, 这种调控可能受细胞的不同氧化还原状态和内外环境胁迫的影响。目前已从水稻中克隆获得编码GDPME的基因序列, 该基因在不同物种间高度保守(Watanabe等2006)。

(5) GDP-L-半乳糖磷酸化酶(GDP-L-galactose phosphorylase, GDP-GPPase)。该酶催化GDP-L-半乳糖脱掉一个磷酸生成L-半乳糖-1-磷酸(图1)。体外实验表明, GDP-L-半乳糖向L-半乳糖的转变是依次完成, 先释放一个磷酸基团生成L-半乳糖-1-磷酸, 而后再水解成L-半乳糖(Barber 1971)。2007年, Laing等从拟南芥中克隆得到编码GDP-L-半乳糖磷酸化酶的基因*vtc2* (At4g26850)。拟南芥GDP-L-半乳糖磷酸化酶的*vtc2*和*vtc5*突变体研究表明, *vtc5*的缺失突变使维生素C含量相比野生型下降了80%, 双基因的缺失则会造成幼苗期生长停滞, 外源添加维生素C或者L-半乳糖之后生长恢复正常(Dowdle等2007)。Bulley等(2009)在猕猴桃中

的研究发现维生素C的含量与GDP-GPPase基因的表达量成正比, 将猕猴桃GDP-GPPase基因在拟南芥中过表达, 拟南芥维生素C含量相比野生型提高了4倍。这表明GDP-L-半乳糖磷酸化酶催化了维生素C合成途径的第一个关键步骤。最近从线虫克隆获得GDP-GPPase的同源基因, 研究表明该酶具有GDP-己糖-磷酸化酶活性(Adler等2011)。

(6) L-半乳糖-1-P-磷酸酶(L-galactose-1-P phosphatase, GalPPase)。该酶催化L-半乳糖-1-磷酸向L-半乳糖的转变(图1)。最初的研究认为GDP-L-半乳糖向L-半乳糖的转变是由一个酶催化完成, 2006年Conklin等从拟南芥中克隆得到编码L-半乳糖-1-P-磷酸酶的基因*vtc4* (At3g02870), 并对其突变体进行研究表明, *vtc4*缺失突变的植株中维生素C含量相比野生型下降了50%。由于在植物体中L-半乳糖专用于维生素C合成, 所以GalPPase的活性高低对植物体内维生素C含量影响很大。

(7) L-半乳糖脱氢酶(L-galactose dehydrogenase, L-GalDH)。在该酶的作用下, L半乳糖第1号位上的C被氧化, 生成L-半乳糖醛酸-1,4-内酯(图1)。该酶最早从豌豆幼苗中纯化获得, 随后在拟南芥和豌豆中克隆获得编码该酶的基因*L-GalDH* (Smirnoff 2001)。该酶对NAD的特异性要强于NADP, 能够识别L-古洛糖和L-山梨糖, 在拟南芥中还能识别L-果糖。然而, 其他的常见醛糖(D-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-甘露糖和D-葡萄糖)并不被氧化(Smirnoff 2001)。与植物中的醛糖脱氢酶不同, 细菌, 哺乳动物和真菌中有许多其他的C1醛糖脱氢酶具有较宽泛的底物特异性, 但是与糖的结合能力却要低90% (Smirnoff 2001)。Mieda等(2004)从菠菜中克隆获得编码L-GalDH的基因序列, 该基因序列在猕猴桃、苹果和拟南芥等物种间高度保守。

(8) L-半乳糖醛酸-1,4-内酯脱氢酶(L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, L-GLDH)。该酶是植物维生素C合成途径最后一个关键酶, 催化L-半乳糖醛酸-1,4-内酯生成终产物L-抗坏血酸(图1)。Siendones等(1999)对豌豆的研究表明, GLDH是植物线粒体内膜上的一种固有蛋白。通过分离线粒体研究抑制GLDH酶的氧化效果, 显示细胞色素C是L-半乳糖醛酸-1,4-内酯的电子受体(Bartoli等2000)。

对甘薯GLDH序列预测结果表明GLDH蛋白在膜外表面有3个可能的跨膜区和一个FDA结合位点(Imai等1998)。从花椰菜(Ostergaard等1997)和甘薯(Imai等1998)中克隆得到编码GLDH的基因序列,对其氨基酸序列进行分析发现,前83~91个氨基酸残基是典型的线粒体信号序列,能够从成熟蛋白上切下,保守的定位到线粒体上。对大多数来源的GLDH分析表明,该酶对底物特异性较强,专一作用于L-半乳糖醛酸-1,4-内酯。然而,在水芹、草莓和大豆的所有组织中都发现有由L-古洛糖醛酸-1,4-内酯转变成维生素C的过程,部分纯化的土豆GLDH也能催化上述过程。这种差异有3种可能的解释:第一,GLDH有多个同工型,其中有的可以利用古洛糖醛酸内酯作为底物,土豆微粒体中存在一种蛋白有20%的GLDH活性,与线粒体来源的酶有不同的免疫活性(Bartoli等2000);第二,存在独立的酶将古洛糖醛酸内酯特异性氧化;第三,古洛糖醛酸内酯发生差向异构化转变成半乳糖醛酸内酯(Baig等1970)。Liu等(2011)对水稻发育过程中的GLDH表达与功能分析表明,GLDH通过调控叶绿素的合成影响植物光合效率,对植物生长和结实具有重要功能,并保护植物免受ROS胁迫的伤害。

(9) L-古洛糖醛酸-1,4-内酯氧化酶(L-gulonolactone oxidase, GLOase)。该酶为动物维生素C合成途径最后一步催化酶。1987年, Koshizaka从大鼠肝脏中纯化出GLOase并克隆得到其编码序列cDNA (Koshizaka等1988)。2000年, Jain和Nessler用大鼠GLOase基因转化烟草、生菜,使其维生素

C含量提高4~7倍(表1)。在拟南芥*vtc1*突变体中异源表达大鼠GLOase基因能恢复其维生素C含量(Radzio等2003)。目前仍不清楚该酶是否对已知植物维生素C合成的前体物质L-半乳糖醛酸-1,4-内酯起作用,或者植物体本身就可以产生L-古洛糖醛酸-1,4-内酯。

(10) D-半乳糖醛酸还原酶(D-galacturonate reductase, GalUR)。GalUR是植物糖醛酸途径合成维生素C的一个关键酶,催化D-半乳糖醛酸转变为L-半乳糖酸。GalUR是糖醛酸转变途径中目前惟一获得基因克隆的重要酶类。Agius等(2003)从草莓果实中克隆并鉴定了编码GalUR的cDNA序列,它主要在草莓发育晚期生殖器官表达。将草莓GalUR基因转化拟南芥,使拟南芥叶片维生素C含量提高2~3倍(表1) (Agius等2003)。Upadhyaya等(2009)在土豆中过量表达草莓GalUR基因,使其维生素C含量提高了2倍(表1),对抗非生物胁迫的能力也得到了一定提高。

1.5 代谢工程提高植物维生素C产量

植物维生素C的代谢途径和相关基因的研究成果为通过基因工程技术提高维生素C的产量打开了新的局面。理论上,可以通过调节维生素C生物合成和分解代谢相关酶的表达水平和活性来实现植物维生素C的积累的调控。植物代谢途径的限速步骤对代谢产物的积累具有决定作用,这些限速步骤往往位于代谢的分岔口或者合成的下游。对植物维生素C产量的改良,可以通过3条途径实现:第一,提高合成途径关键酶基因的表达水平;第二,促进维生素C的再生循环,提高ASA/

表1 高等植物维生素C代谢途径研究概述

Table 1 Summary of studies on metabolism pathway to vitamin C with metabolic engineering methods in higher plants

受体植株	转化基因	基因来源	维生素C含量提高量	文献
拟南芥	<i>PMM</i>	拟南芥	0.3倍	Qian等2007
拟南芥	<i>MIOX4</i>	拟南芥	2~3倍	Lorence等2004
拟南芥	<i>GalUR</i>	草莓	2~3倍	Agius等2003
土豆	<i>GalUR</i>	草莓	1.6~2倍	Upadhyaya等2009
烟草	<i>GalDH</i>	拟南芥	无改变	Gatzek 2002
烟草	<i>GLDH</i>	花椰菜	0.3倍	Smirnov 2001
BY-2烟草细胞	<i>GLDH</i>	烟草	2倍	Tokunaga等2005
生菜和烟草	<i>GLOase</i>	大鼠	4~7倍	Jain和Nessler 2000
拟南芥	<i>GLOase</i>	大鼠	2~3倍	Radzio等2003
烟草和玉米	<i>DHAR</i>	小麦	2~4倍	Chen等2006
拟南芥	<i>DHAR</i>	水稻	0.25倍	Ushimaru等2006

DHA的比例; 第三, 抑制维生素C的降解代谢。目前通过基因工程技术调节植物体内合成和代谢途径中限速酶的表达量和活性, 调控植物维生素C积累水平已有很多报道(表1)。

2 植物维生素E代谢调控

维生素E作为人类必需的营养元素, 在自然界主要分布在植物的叶子和果实中。维生素E最初作为一个单词出现是在1922年, Evans和Bishop将其定义为“一种在动物繁殖过程中起重要作用的营养元素”(Munne-Bosch等2007)。起初维生素E一直被当做一种抗氧化剂研究和应用。随着在动物和人类上的研究越来越深入, 维生素E的更多功能被逐渐发现。维生素E在植物上的研究是近些年才开始的, 主要集中在维生素E的合成方面。

2.1 维生素E的化学结构

在高等植物中, 维生素E被称为生育烷醇可能更为合适, 它可以通过光合作用合成, 无需饮食摄入(Munne-Bosch等2007)。生育烷醇由一个芳香族环和一个聚异戊二烯链组成, 其中生育酚为饱和和异戊二烯链, 而生育三烯酚的聚异戊二烯链含有3个不饱和双键。根据芳香环上的甲基数目和位置不同, 两类生育烷醇又可分为 α -、 β -、 γ -和 δ -四种构型(Shaikhali和Baier 2010) (表1)。尽管两种生育烷醇均属于脂溶性分子, 但是它们的生化特性却因异戊二烯链而不同, 因此造就了它们不同的生理功能。生育酚存在于几乎所有的光合植物中, 而生育三烯酚仅在某些特定的植物类群中发现。即使在同一植物中, 二者也存在于不同的组织部位, 具有不同的功能, 如生育酚、生育三烯酚等构型的物质在PSI和PSII中分别当做电子传递载体和抗氧化脂质。天然合成的维生素E具有单一的同分异构体, 而化学合成的维生素E却生成了8种不同的同分异构体, 具有不同的生物学活性。

表2 维生素E的化学构型和生物活性
Table 2 The chemical configurations and biological activities of vitamin E

生育酚/生育三烯酚	R ₁	R ₂	相对活性
α	CH ₃	CH ₃	100% vs 30%
β	CH ₃	H	50% vs 5%
γ	H	CH ₃	10% vs 0%
δ	H	H	3% vs 0%

2.2 维生素E在植物中的生理功能

维生素E是一种亲脂性分子, 通过它的聚异戊二烯链嵌合到膜上, 而色烷醇环头部则摇摆于膜的脂-水相交区域(Gomez-Fernandez等1989)。尽管目前还没有直接证据表明维生素E在膜上发挥脂溶性抗氧化剂作用, 但是至少可以证明维生素E对维持膜的稳定性起到了重要作用(Wang和Quinn 2000)。维生素E优良的抗氧化作用主要归功于它的色烷醇环头部能够提供酚醛双键给脂质自由基(Kamal-Eldin和Appelqvist 1996)。在均质溶液中, α -生育酚/生育三烯酚因为色烷醇环上的羟基更容易被电子释放底物捕获而具有更强的供氢能力, 这是衡量维生素E抗氧化能力的主要因素。然而生物膜的组成并非均质分布, 而是一个复杂的组成, 极性的头部和非极性的脂肪酸交错在一起。因此, α -生育酚的抗氧化能力不但依靠它特殊的化学结构, 而且依赖于它在膜上的流动性和分布密度(Serbinova等1991)。正己烷的体外分析实验表明 α -生育酚和 α -生育三烯酚具有相同的抗氧化能力, 但是当加入磷脂脂质体之后, α -生育三烯酚表现出更强的过氧自由基清除能力(Suzuki等1993)。有人推测 α -生育酚在膜上的分布并非均匀, 而是侧重于在流动性比较强的多不饱和脂肪酸区域(Gomez-fernandez等1989)。生育酚在叶绿体中大量存在, 它能够保护脂质双分子层上的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)免受脂过氧化酶的攻击, 对保护光合器官的完整性方面起着重要作用(Wang和Quinn 2000) (图2)。一直以来的观点是, 植物中的生育酚含量越高, 其抗氧化能力就越强。对拟南芥突变体*vte1*和*vte2*的研究表明, 生育酚通过调控基因表达参与脂质氧化的防御反应, 在延长种子寿命和保护幼苗脂质氧化过程中起着重要作用(DellaPenna等2006; Sattler等2004)。最近研究表明, 叶绿体膜上的 α -生育酚在低浓度的情况下反而表现出很高的生物学活性, 过多的生育酚积累反而会产生负面效应, 增强膜的流动性, 破坏光合系统膜的稳定性(Hincha 2008)。DellaPenna等(2010)对拟南芥种子在成熟和老化的研究表明, 生育酚是维持种子休眠状态和正常萌发的重要脂质抗氧化剂。由此可见, 作为抗氧化剂, 维生素E起的基本作用是清除脂质自由基和保护膜

脂稳定性。

通过植物突变体和转基因生育酚缺陷株系的研究发现,生育酚还具有除抗氧化以外的其他生物学功能。拟南芥*vte1*和*vte2*突变体的研究发现,生育酚通过调控叶片光合物质的运输,影响碳水化合物化合物的代谢、分配和积累(Sattler等2003)。Munne-Bosch等对百合花器官发育过程中生育酚含量和分布的研究表明,生育酚参与了花器官的发育和衰老的过程(Munne-Bosch和Arrom 2010)。生育酚也参与植物的信号转导和基因表达调控(Munne-Bosch 2005; Munne-Bosch等2007)。同时,在低温、高温、强光、盐胁迫和干旱等不同胁迫处理的情况下,野生型植株的生育酚含量上升,相对应的生育酚合成基因的表达也增强(Collakova和DellaPenna 2003),而生育酚缺陷型的植株则由于生育酚合成基因的表达不足而表现出不同的表型,表明生育酚对环境胁迫具有一定的抵抗能力(Abbasi等2007; Maeda等2008)。对烟草悬浮细胞的研究表明,生育酚参与有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)的信号途径,通过负调控激活MAPK信号通路对胁迫的应答

(Hyun等2011)。随着分子生物学技术的出现和不断更新,利用遗传突变和转基因操作的方法改变维生素E在植物中的表达水平,生育酚和生育三烯酚的更多功能将被逐渐发现。

2.3 维生素E的植物合成途径

自20世纪90年代,以模式植物拟南芥和蓝藻为研究对象,对维生素E合成途径进行研究。植物维生素E的生物合成主要利用了来自两条不同代谢途径的化合物作为前体,来自酪氨酸代谢相关的莽草酸途径(shikimate metabolic pathway)产物尿黑酸(homogentisic acid, HGA)生成了维生素E的亲水性头部;来自非甲羟戊酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径产物植基焦磷酸(phytyldiphosphate, PDP)或牻牛儿牻牛儿焦磷酸(geranylgeranyl-diphosphate, GGDP)生成疏水性尾部,其中PDP是产生生育酚的必要前体(Rohmer 2003),GGDP是产生生育三烯酚的必要前体(Cahoon等2003)(图3)。

尽管维生素E生物合成途径阐明已经有近20年的时间,编码合成途径关键酶的基因直到最近才被分离鉴定。目前已知至少有5种酶直接参与了维生素E的合成过程(DellaPenna 2005a, b; Della-

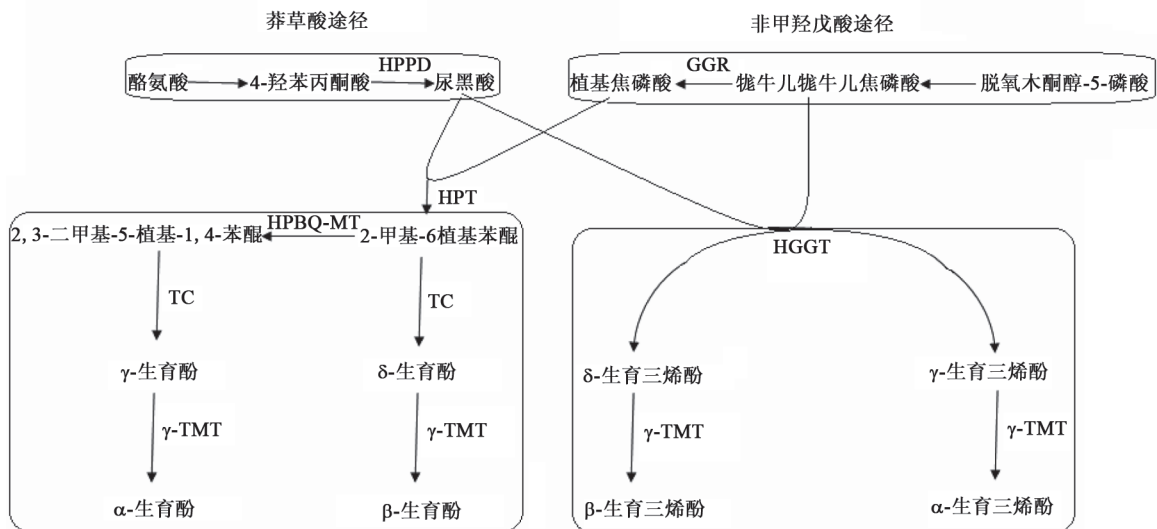


图3 植物维生素E合成途径(DellaPenna和Pogson 2006)

Fig.3 The biosynthesis pathway of vitamin E in plants

维生素E的合成经由两条途径完成,莽草酸途径和非甲羟戊酸途径。莽草酸途径以酪氨酸为最初底物,经由4-羟苯丙酮酸在p-羟苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)的作用下生成尿黑酸。非甲羟戊酸途径以脱氧木酮糖-5-磷酸为底物生成牻牛儿牻牛儿焦磷酸和植基焦磷酸。尿黑酸和植基焦磷酸在尿黑酸植基转移酶(HPT)作用下生成2-甲基-6-植基苯醌,2-甲基-6-植基苯醌在2-甲基-6-植基苯醌甲基转移酶(HPBQ-MT)作用下生成2,3-二甲基-5-植基-1,4-苯醌。2-甲基-6-植基苯醌和2,3-二甲基-5-植基-1,4-苯醌在环化酶(TC)作用下分别生成 δ -生育酚和 γ -生育酚。尿黑酸和牻牛儿牻牛儿焦磷酸在尿黑酸牻牛儿牻牛儿基转移酶(HGGT)作用下生成 δ -生育三烯酚和 γ -生育三烯酚。 δ -生育三烯酚/生育三烯酚和 γ -生育三烯酚可在 γ -生育三烯酚甲基转移酶(γ -TMT)作用下分别生成 β -生育三烯酚/生育三烯酚和 α -生育三烯酚/生育三烯酚。

Penna和Pogson 2006), 除2-甲基-6-植基苯醌甲基转移酶(MPBQ-MT)的编码基因之外, 其余4个关键酶基因在拟南芥和蓝藻中具高度保守性(Chen等2006)。p-羟苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)是维生素E合成途径第一个关键酶, 该酶在胞质中催化4-羟苯丙酮酸成为尿黑酸(Garcia等1999)。编码HPPD的基因序列已在胡萝卜、拟南芥、大麦和蓝藻(PCC 6803)等植物中鉴定(Dähnhardt等2002; Falk等2002; Garcia等1997, 1999)。第二个调控维生素E合成的关键酶是尿黑酸植基转移酶(HPT), 该酶催化尿黑酸和植基焦磷酸生成2-甲基-6-植基苯醌。编码该酶的基因已在蓝藻(PCC 6803)和拟南芥中鉴定, 基因序列与叶绿素合成酶相似(Collakova和DellaPenna 2001)。从大麦、小麦和水稻等单子叶植物中分离的尿黑酸牻牛儿苗基转移酶基因HGGT与拟南芥来源的HPT基因在序列上有40%~50%的相似性, 因此推测HGGT是HPT的一个双功能酶, 它对牻牛儿苗焦磷酸(GGDP)的底物特异性要强于植基焦磷酸(PDP) (Cahoon等2003)。2-甲基-6-植基苯醌甲基转移酶(MPBQ-MT)是维生素E合成途径的第3个关键酶, 该酶对最终产物的甲基数目和位置具有决定作用。最早在蓝藻(PCC 6803)中获得编码该酶的基因, 随后又在拟南芥中发现其同功酶基因序列。虽然这两个来源不同的酶具有相同的功能, 并且其底物特异性也接近, 但是二者的氨基酸相似性却低于20%, 说明两种完全不相关的基因可以通过趋同进化产生同样的功能(Chen等2006)。环化酶(TC)是催化直接生成维生素E的第一个关键酶。现已在蓝藻(PCC 6803)、拟南芥和玉米等很多物种克隆得到编码TC的基因, 对拟南芥TC的氨基酸序列进行分析, 发现其具有N端叶绿体前导肽序列, 而成熟的蛋白则缺失N端74个氨基酸的信号序列, 说明在高等植物中, TC定位于叶绿体膜(Provencher等2001)。 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)催化 δ - γ -生育酚和生育三烯酚分别生成 α - β -生育酚和生育三烯酚, 是维生素E生物合成途径的最后一步, 对 α -生育酚的积累至关重要。依赖基因组学的方法, 利用拟南芥HPPD基因在蓝藻(PCC 6803)基因组数据库检索, 发现 γ -TMT基因序列; 再利用蓝藻 γ -TMT氨基酸序列检索拟南芥EST数据库, 获得 γ -TMT的cDNA序列, 分析其氨基

酸序列, 该蛋白定位于质体膜上。比较二者的氨基酸序列相似性, 可高达66%, 说明 γ -TMT在物种间具有高度保守性(Shintani和DellaPenna 1998)。

2.4 代谢工程改善植物维生素E的组成和积累

代谢工程研究提高蔬菜和油料作物的维生素E含量具有重要的社会效益和巨大的经济价值。目前在拟南芥、烟草、油菜、大豆、玉米、生菜和马铃薯等作物中已经开展维生素E基因工程研究, 并取得了一定的成功。总的来说, 维生素E基因工程研究大体有两种思路和策略: (1)提高维生素E的总量, 使所有种类的生育酚含量都得以提高; (2)改变维生素E各组分的比例, 将其他种类的生育酚类物质都转化为维生素E活性最高的 α -生育酚。表3概述了通过基因工程提高植物维生素E的研究进展。

3 抗坏血酸-谷胱甘肽-生育酚循环与植物胁迫

植物在生长发育过程中, 容易因生态环境改变遭受氧化胁迫, 细胞内产生大量的活性氧簇(ROS)。ROS是细胞对抗胁迫的一个指标, 同时也是细胞内胁迫应急反应通路的一个信号分子, 它的含量水平受ROS清除机制(酶和非酶抗氧化剂)的严格控制。正常情况下, 细胞内的抗氧化剂与ROS维持在一个相对平衡的水平, 一旦细胞内的这种动态平衡被打破, 产生的ROS超过抗氧化剂所能承受的范围, 就会导致细胞的凋亡。ROS攻击细胞质膜上的PUFA, 通过脂质过氧化作用形成脂氢过氧化物(ROOH)。植物叶绿体中存在大量的生育酚, 可以保护PUFA免受自由基的破坏。在持续强光照射下, 植物叶片中生育酚的含量会显著增加, 参与清除由于光胁迫产生的自由基。Collakova等用强光诱导野生型拟南芥, 发现叶片中总生育酚含量比非胁迫对照组含量增加了18倍(Collakova和DellaPenna 2003)。Havaux等(2005)利用基因敲出技术将蓝藻HPPD编码基因敲出, 完全阻断生育酚及其中间产物的合成, 但是蓝藻在强光下能够正常生长。该现象说明生育酚并非光胁迫下控制胁迫的惟一因素, 其他一些抗氧化剂或者保护机制可能在生育酚缺乏时替代其功能。拟南芥缺陷突变体研究发现, 生育酚的缺乏造成抗坏血酸和谷胱甘肽的积累, 反之, 过量表达VTE-1导致抗坏血酸和谷胱甘肽的含量下调(DellaPenna等2006; Sat-

表3 高等植物维生素E生物合成途径研究概述

Table 3 Summary of studies on biosynthesis pathway to vitamin E with metabolic engineering methods in higher plants

受体植株	转化基因	基因来源	维生素E含量和组成的改变		参考文献
			叶片	果实	
拟南芥	<i>HPPD</i>	拟南芥	4.4倍	1.4倍	Collakova和DellaPenna 2003
拟南芥	<i>HPT</i>	拟南芥	无改变	1.6倍	Savidge等2002
拟南芥	<i>HPT</i> 和 γ - <i>TMT</i>	拟南芥	无改变	12倍	Collakova和DellaPenna 2003
拟南芥	<i>HGGT</i>	拟南芥	10~15倍	N.A.	Cahoon等2003
拟南芥	<i>TC</i>	拟南芥	7倍	N.A.	Kanwischer等2005
烟草	<i>HPPD</i>	大麦	2倍	1.5倍	Falk等2005
烟草	<i>HPPD</i> 和 <i>PDH</i>	酵母	10倍(T3/T)	N.A.	Matringe等2005; Rippert等2004
烟草	<i>GGPP</i> 还原酶	烟草	4~6倍	2~3倍	Grimm和Tanaka 2003
油菜	<i>HPPD</i> , <i>tyrA</i> , <i>VTE2</i>	拟南芥	无改变	3.7倍	Karunanandaa等2005
大豆	<i>HPPD</i> , <i>tyrA</i> , <i>VTE2</i> , <i>GGH</i>	拟南芥	无改变	15倍	Karunanandaa等2005
玉米	<i>HGGT</i>	大麦	无改变	6倍	Cahoon等2003
生菜	γ - <i>TMT</i>	拟南芥	1.3 (α -/ γ -T)	N.A.	Cho等2005
生菜	<i>TC</i>	拟南芥	2倍	N.A.	Lee等2007

tlar等2004)。该现象表明,生育酚、抗坏血酸和谷胱甘肽之间存在一种动态的平衡关系。在植物生理代谢过程中,生育酚参与脂质抗氧化反应调控基因的表达,自身被氧化失去活性。维生素C是一种小分子抗氧化剂,在抵御植物胁迫过程中起到重要作用,能够被迅速氧化分解形成单脱氢抗坏血酸和脱氢抗坏血酸。在这个分解过程中,维生素C接受电子,成为电子传递受体;而氧化态的生育酚自由基可以作为电子供体接受 H^+ 而被还原;氧化态的抗坏血酸可以在抗坏血酸还原酶的作用下传递电子给GSH而被还原成维生素C,氧化态的谷胱甘肽(GSSG)可以被谷胱甘肽还原酶(GR)重新还原,该循环被称之为抗坏血酸-谷胱甘肽-生育酚循环。在这个循环过程中,生育酚的抗氧化反应可通过抗坏血酸的参与被循环利用,而抗坏血酸的缺失则会造成生育酚含量的不可逆下调(图2)。Munne-Bosch通过对拟南芥 $vtc1$ 缺失突变体的研究发现,在严重缺水的情况下,由于抗坏血酸的合成受阻,生育酚的含量也出现下调(Munne-Bosch和Alegre 2002)。由此可见,维生素C在该循环过程中起到了瓶颈的作用。

4 总结与展望

在过去的几十年内,遗传学、发育生物学、细胞生物学和分子生物学的技术和方法不断更新,并在植物中广泛应用,使得维生素C和维生素E代谢途径的研究取得了较大的突破。维生素C和维

生素E的合成与分解途径已被清晰、完整地描绘出来,代谢途径关键酶基因的克隆与功能鉴定已在很多物种中完成。突变体的应用为研究代谢途径关键酶基因的作用和调控方式提供了捷径。遗传工程的出现,特别是基因工程技术在生物育种上的应用,通过增强或者抑制代谢途径中关键酶基因的表达水平,达到提高一种或多种代谢产物在植物中积累量的目的,改善农作物特殊营养品质。

尽管植物维生素C和维生素E代谢调控研究已取得较大进展,相关的基因也已分离鉴定,但是目前的研究还停留于单条代谢通路阶段,还有很多未知的研究空间有待探索。第一,植物维生素C四种合成途径的进化关系,在植物发育不同阶段所起的作用以及它们在不同器官的转换机制;第二,通过维生素E在亚细胞水平上的定位、吸收和转运的研究,了解维生素E在植物对环境的抗逆胁迫调控中的贡献;第三,利用现代色谱技术研究植物发育不同阶段,维生素C和维生素E之间的协同作用关系,精确描述两种代谢产物对细胞周期的调控机制,定量分析细胞不同时期代谢产物的变化情况,绘制细胞周期的次生代谢物谱;第四,通过系统生物学的方法研究多条代谢通路,分析不同次生代谢通路以及次生代谢途径与初生代谢途径之间的网络关系;第五,通过对多个代谢通路的同时调控,重组植物次生代谢物谱,增强植物对生态

环境的适应能力, 为培育高产优质的作物奠定基础。

参考文献

- Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2007). Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 143: 1720~1738
- Adler LN, Gomez TA, Clarke SG, Linster CL (2011). A novel GDP-D-glucose phosphorylase involved in quality control of the nucleoside diphosphate sugar pool in *Caenorhabditis elegans* and mammals. *J Biol Chem*, 286: 21511~21523
- Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Bottella MA, Valpuesta V (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol*, 21: 177~181
- Baig MM, Kelly S, Loewus F (1970). L-Ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulonono-1,4-lactone and L-galactono-1,4-lactone. *Plant Physiol*, 46: 277~280
- Barber GA (1971). The synthesis of L-glucose by plant enzyme systems. *Arch Biochem Biophys*, 147: 619~623
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol*, 123: 335~343
- Bulley SM, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schunemann N, Wright M, MacRae E, Gleave A, Laing W (2009). Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J Exp Bot*, 60: 765~778
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ (2003). Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol*, 21: 1082~1087
- Chen SY, Li HJ, Liu GS (2006). Progress of vitamin E metabolic engineering in plants. *Transgenic Res*, 15: 655~665
- Cho EA, Lee CA, Kim YS, Baek SH, de los Reyes BG, Yun SJ (2005). Expression of gamma-tocopherol methyltransferase transgene improves tocopherol composition in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Mol Cells*, 19: 16~22
- Collakova E, DellaPenna D (2001). Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127: 1113~1124
- Collakova E, DellaPenna D (2003). The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol*, 133: 930~940
- Conklin PL, Gatzek S, Wheeler GL, Dowdle J, Raymond MJ, Rolinski S, Isupov M, Littlechild JA, Smirnov N (2006). *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem*, 281: 15662~15670
- Dähnhardt D, Falk J, Appel J, van der Kooij TA, Schulz-Friedrich R, Krupinska K (2002). The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *FEBS Lett*, 523: 177~181
- Davey MW, Gilot C, Persiau G, Ostergaard J, Han Y, Bauw GC, Van Montagu MC (1999). Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiol*, 121: 535~543
- Davey MW, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnov N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agr*, 80: 825~860
- Davletova S, Rizhsky L, Liang HJ, Zhong SQ, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 268~281
- DellaPenna D (2005a). Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant Sci*, 10: 574~579
- DellaPenna D (2005b). A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J Plant Physiol*, 162: 729~737
- DellaPenna D, Pogson BJ (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 711~738
- DellaPenna D, Mene-Saffrane L, Jones AD (2010). Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 17815~17820
- DellaPenna D, Sattler SE, Mene-Saffrane L, Farmer EE, Krischke M, Mueller MJ (2006). Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell*, 18: 3706~3720
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnov N (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J*, 52: 673~689
- Dwivedi K, Post AF, Bullerjahn S (1996). Cloning and functional analysis of the *pmmA* gene encoding phosphomannomutase from the photosynthetic prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. *Biochim Biophys Acta*, 1290: 210~214
- Elling L, Ritter JE, Verseck S (1996). Expression, purification and characterization of recombinant phosphomannomutase and GDP- α -D-mannose pyrophosphorylase from *Salmonella enterica*, group B, for the synthesis of GDP- α -D-mannose from D-mannose. *Glycobiology*, 6: 591~597
- Falk J, Brosch M, Schafer A, Braun S, Krupinska K (2005). Characterization of transplastomic tobacco plants with a plastid localized barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *J Plant Physiol*, 162: 738~742
- Falk J, Krauss N, Dähnhardt D, Krupinska K (2002). The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *J Plant Physiol*, 159: 1245~1253
- Gabriela C, Munstedt H (2003). Strain hardening of various polyolefins in uniaxial elongational flow. *J Rheol*, 47: 619~630
- Garcia I, Rodgers M, Pepin R, Hsieh TF, Matringe M (1999). Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 119: 1507~1516
- Garcia I, Rodgers M, Lenne C, Rolland A, Sailland A, Matringe M

- (1997). Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA. *Biochem J*, 325: 761~769
- Gatzek S, Wheeler GL, Smirnov N (2002). Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J*, 30: 541~553
- Gomez-Fernandez JC, Villalain J, Aranda FJ, Ortiz A, Micol V, Coutinho A, Berberan-Santos MN, Prieto MJ (1989). Localization of alpha-tocopherol in membranes. *Ann N Y Acad Sci*, 570: 109~120
- Grimm B, Tanaka R (2003). Manipulation of tocopherol content in transgenic plants. US Patent
- Gupta SD, Choudhury PK, Chatterjee IB (1973). Synthesis of L-ascorbic acid from D-glucurono-1,4-lactone conjugates by different species of animals. *Int J Biochem*, 4: 309~314
- Hansen SH, Frank SR, Casanova JE (1997). Cloning and characterization of human phosphomannomutase, a mammalian homologue of yeast SEC53. *Glycobiology*, 7: 829~834
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dormann P (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17: 3451~3469
- Herold A, Lewis DH (1977). Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study role of orthophosphate. *New Phytol*, 79: 1~40
- Hincha DK (2008). Effects of α -tocopherol (vitamin E) on the stability and lipid dynamics of model membranes mimicking the lipid composition of plant chloroplast membranes. *FEBS Lett*, 582: 3687~3692
- Hyun T, Kumar K, Rao K, Sinha A, Roitsch T (2011). Role of α -tocopherol in cellular signaling: α -tocopherol inhibits stress-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Plant Biotechnol Rep*, 5: 19~25
- Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Oba K, Hirai M (1998). L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol*, 39: 1350~1358
- Ioannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Melidou I, Giovannonni J, Kanellis AK (2009). Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J Exp Bot*, 60: 663~678
- Jain AK, Nessler CL (2000). Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breeding*, 6: 73~78
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671~701
- Kanwischer M, Porfirova S, Bergmuller E, Dormann P (2005). Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol*, 137: 713~723
- Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, Baszis SR, Jensen PK, Wong YH, Jiang J, Venkatramesh M, Gruys KJ, Moshiri F et al (2005). Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metab Eng*, 7: 384~400
- Kato N, Esaka M (1999). Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol Plant*, 105: 321~329
- Keller R, Springer F, Renz A, Kossmann J (1999). Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J*, 19: 131~141
- Koshizaka T, Nishikimi M, Ozawa T, Yagi K (1988). Isolation and sequence analysis of a complementary DNA encoding rat liver L-gulonolactone oxidase, a key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 263: 1619~1621
- Kumar V, Rani A, Dixit AK, Pratap D, Bhatnagar D (2010). A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. *Food Res Int*, 43: 323~328
- Laing WA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM (2007). The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 9534~9539
- Lee K, Lee SM, Park SR, Jung J, Moon JK, Cheong JJ, Kim M (2007). Overexpression of *Arabidopsis* homogentisate phytyltransferase or tocopherol cyclase elevates vitamin E content by increasing gamma-tocopherol level in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Mol Cells*, 24: 301~306
- Liu YH, Yu L, Wang RZ (2011). Level of ascorbic acid in transgenic rice for l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase overexpressing or suppressed is associated with plant growth and seed set. *Acta Physiol Plant*, 33: 1353~1363
- Loewus FA (1999). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, 52: 193~210
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004). *myo*-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol*, 134: 1200~1205
- Loughman BC, Ratcliffe RG, Southon TE (1989). Observations on the cytoplasmic and vacuolar orthophosphate pools in leaf tissues using *in vivo* ^{31}P -NMR spectroscopy. *FEBS Lett*, 242: 279~284
- Maeda H, Sage TL, Isaac G, Welti R, Dellapenna D (2008). Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. *Plant Cell*, 20: 452~470
- Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys*, 471: 146~158
- Mandl J, Szarka A, Banhegyi G (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Brit J Pharmacol*, 157: 1097~1110
- Matamoros MA, Loscos J, Coronado MJ, Ramos J, Sato S, Testillano PS, Tabata S, Becana M (2006). Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules. *Plant Physiol*, 141: 1068~1077
- Matringe M, Sailland A, Pelissier B, Rolland A, Zink O (2005). p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Manag Sci*, 61: 269~276

- McCarrell EM, Gould SW, Fielder MD, Kelly AF, El Sankary W, Naughton DP (2008). Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C. *BMC Complement Altern Med*, 8: 64
- Mieda T, Yabuta Y, Rapolu M, Motoki T, Takeda T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2004). Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol*, 45: 1271~1279
- Miyake C, Asada K (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol*, 33: 541~553
- Munne-Bosch S (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol*, 162: 743~748
- Munne-Bosch S, Alegre L (2002). Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett*, 524: 145~148
- Munne-Bosch S, Arrom L (2010). Tocopherol composition in flower organs of *Lilium* and its variations during natural and artificial senescence. *Plant Sci*, 179: 289~295
- Munne-Bosch S, Weiler EW, Alegre L, Muller M, Duchting P, Falk J (2007). α -Tocopherol may influence cellular signaling by modulating jasmonic acid levels in plants. *Planta*, 225: 681~691
- Noctor G, Foyer CH (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 249~279
- Oesterhelt C, Schnarrenberger C, Gross W (1997). The reaction mechanism of phosphomannomutase in plants. *FEBS Lett*, 401: 35~37
- Ostergaard J, Persiau G, Davey MW, Bauw G, VanMontagu M (1997). Isolation of a cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants—Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *J Biol Chem*, 272: 30009~30016
- Packer JE, Slater TF, Willson RL (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278: 737~738
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1999). Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol*, 119: 1017~1023
- Pignocchi C, Foyer CH (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 379~389
- Pimentel L (2003). Scurvy: historical review and current diagnostic approach. *Am J Emerg Med*, 21: 328~332
- Popova TN, Matasova LV, Lapotko AA (1998). Purification, separation and characterization of phosphoglucomutase and phosphomannomutase from maize leaves. *Biochem Mol Biol Int*, 46: 461~470
- Provencher LM, Miao L, Sinha N, Lucas WJ (2001). Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell*, 13: 1127~1141
- Qian WQ, Yu CM, Qin HJ, Liu X, Zhang AM, Johansen IE, Wang DW (2007). Molecular and functional analysis of phosphomannomutase (PMM) from higher plants and genetic evidence for the involvement of PMM in ascorbic acid biosynthesis in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 49: 399~413
- Radzio JA, Lorence A, Chevone BI, Nessler CL (2003). L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient *Arabidopsis* (*vtc*) mutants. *Plant Mol Biol*, 53: 837~844
- Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M (2004). Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol*, 134: 92~100
- Rockholm DC, Yamamoto HY (1996). Violaxanthin de-epoxidase (Purification of a 43-kilodalton luminal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride). *Plant Physiol*, 110: 697~703
- Rohmer M (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure Appl Chem*, 75: 375~387
- Rumpho ME, Edwards GE, Loescher WH (1983). A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves: activity and localization of key enzymes. *Plant Physiol*, 73: 869~873
- Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, DellaPenna D (2003). Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol*, 132: 2184~2195
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D (2004). Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16: 1419~1432
- Savidge B, Weiss JD, Wong YHH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE (2002). Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129: 321~332
- Schopfer P, Lapierre C, Nolte T (2001). Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: Mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification. *Physiol Plant*, 111: 83~92
- Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Free Radic Biol Med*, 10: 263~75
- Shaikhali J, Baier M (2010). Ascorbate regulation of 2-Cys peroxiredoxin-A promoter activity is light-dependent. *J Plant Physiol*, 167: 461~467
- Shintani D, DellaPenna D (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 282: 2098~2100
- Siendones E, Gonzalez-Reyes JA, Santos-Ocana C, Navas P, Cordoba F (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol*, 120: 907~912
- Smirnov N (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos T Roy Soc B*, 355: 1455~1464
- Smirnov N (2001). L-Ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm*, 61: 241~266

- Smirnoff N, Pallanca JE (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem Soc T*, 24: 472~478
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000). Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol*, 35: 291~314
- Stein JC, Hansen G (1999). Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol*, 121: 71~79
- Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, Kagan VE, Packer L (1993). Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*, 32: 10692~10699
- Tabata K, Takaoka T, Esaka M (2002). Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry*, 61: 631~635
- Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M (2005). Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta*, 220: 854~863
- Uchendu EE, Leonard SW, Traber MG, Reed BM (2010). Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Rep*, 29: 25~35
- Upadhyaya CP, Hemavathi, Young KE, Akula N, Kim HS, Heung JJ, Oh OM, Aswath CR, Chun SC, Kim DH, Park SW (2009). Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Sci*, 177: 659~667
- Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, Daicho K, Naito M, Yamauchi Y, Nonaka H, Amako K, Yamawaki K, Murata N (2006). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol*, 163: 1179~1184
- Wagner C, Sefkow M, Kopka J (2003). Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry*, 62: 887~900
- Wang X, Quinn PJ (2000). The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol Membr Biol*, 17: 143~156
- Watanabe K, Suzuki K, Kitamura S (2006). Characterization of a GDP-D-mannose 3",5"-epimerase from rice. *Phytochemistry*, 67: 338~346
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365~369
- Wolucka BA, Davey MW, Boerjan W (2001). A high-performance liquid chromatography radio method for determination of L-ascorbic acid and guanosine 5'-diphosphate-L-galactose, key metabolites of the plant vitamin C pathway. *Anal Biochem*, 294: 161~168
- Wrieden WL, Hannah MK, Bolton-Smith C, Tavendale R, Morrison C, Tunstall-Pedoe H (2000). Plasma vitamin C and food choice in the third Glasgow MONICA population survey. *J Epidemiol Commun H*, 54: 355~360