

综 述

植物维生素 E 基因工程研究进展*

柴玉琼¹ 张玉红² 韩 凝^{1**} 朱睦元¹

(1 浙江大学生命科学学院 遗传学研究所 杭州 310058 2 西藏自治区农牧科学研究院 拉萨 850000)

摘要 维生素 E(vitamin E, VE)是一类由光合生物合成的、人类饮食中必不可少的两种抗氧化物质,分为生育酚和生育三烯酚两大类。除了生育酚类物质所具有的抗氧化作用外,生育三烯酚还有很强的降胆固醇、预防糖尿病、促进骨吸收、抗癌和神经保护的作用,因此,VE 被广泛应用于医药、食品、化妆品等行业中。本文主要综述了植物维生素 E 生物合成相关酶的研究进展以及利用基因工程手段提高植物维生素 E 活性的新策略。其中,多基因共转化、多基因操纵子及质体转化等方法为提高植物维生素 E 活性提供了新的思路。

关键词 维生素 E 基因工程 多基因操纵子 质体转化

中图分类号 Q78

维生素 E(vitamin E, VE)是由光合生物合成的生育酚类化合物的总称,天然 VE 由一个芳香杂环和类异戊二烯基侧链组成。根据侧链是否饱和和可以分为生育酚(tocopherol)和生育三烯酚(tocotrienol)两大类,根据芳香环上甲基位置和数目的不同每类又可分为 α 、 β 、 γ 、 δ 四种形式。这八种类型的维生素 E 是人体必需微量元素^[1],其中, α -生育酚活性最高,因为动物和人类具有 α -生育酚转运蛋白(α -tocopherol transfer protein, α -TTP),此蛋白对 α -生育酚高度亲和,优先吸收和利用 α -生育酚^[2]。

VE 是一种重要的抗氧化剂,也是一种强自由基清除剂。近来各种研究都表明,VE 对人体健康有积极的保护作用,它与机体的抗氧化作用及抗衰老有关。VE 不仅具有降血压,抗不育等功能,它还可以预防冠心病、乳腺癌的发生,保护大脑免受尼古丁引起的氧化胁迫^[3-5]。近年来,VE 在植物中的作用也日渐清晰,有报道称,VE 可以保护光合系统中色素、蛋白质和多聚不饱和脂肪酸免受活性氧(ROS)的损伤^[6]。也有推测,

VE 可能和其他抗氧化机制共同发挥作用来维持胞内氧化还原水平的平衡^[7]。还有研究证实,VE 参与调控多种生理过程,包括种子萌发、植株生长,叶片衰老和植物对外界胁迫的应激反应等等^[8]。鉴于以上功能,VE 被广泛应用于食品、药品、化妆品等行业中。目前,研究者已克隆了至少 7 个与维生素 E 合成相关酶的基因,本文就植物维生素 E 生物合成相关酶的研究进展以及利用基因工程手段提高植物维生素 E 活性的新策略进行简要综述。

1 维生素 E 在植物中的分布

生育酚广泛分布在植物所有绿色组织中,但种子中含量最多。生育三烯酚主要在大多数单子叶植物胚乳中存在,如小麦(*Triticum aestivum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)和大麦(*Hordeum vulgare* L.)。植物油是维生素 E 的天然来源。例如, α -生育酚是橄榄油和葵花油里主要的维生素形式,玉米油主要含 γ -生育酚,大豆油高含 δ -生育酚。生育三烯酚是棕榈油里主要的维生素形式,含量约为 940 mg/kg。米糠油里主要含 γ -生育三烯酚,谷物如燕麦(*Avena sativa* Linn.)、大麦和黑麦(*Secale cereal* L.)也含有丰富的生育三烯酚,大麦中生育三烯酚含量高达 910 mg/kg,燕麦中生育三烯酚也将

收稿日期:2014-09-25 修回日期:2014-10-17

* 国家自然科学基金(31171543),国家大麦产业技术体系(CARS-05)资助项目

**通讯作者,电子信箱:ninghan@zju.edu.cn

近 210 mg/kg^[2,9-10]。植物维生素 E 的含量不仅受自身基因型的控制,还受生长环境条件的影响^[11]。

2 维生素 E 的生物合成

据报道,维生素 E 在植物体中合成^[8,12]。维生素 E 合成需要两种底物:尿黑酸(HGA)和异戊烯基二磷酸(PrDP),HGA 由莽草酸途径产生,首先酪氨酸脱氨基生成对羟基苯丙酮酸(HPP),随后 HPP 在对羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)的氧化作用下生成 HGA。第二个底物 PrDP 由非甲羟戊酸途径产生,PrDP 有植基二磷酸(PDP)或牻牛儿牻牛儿焦磷酸(GGDP)两种形式,GGDP 可以直接用于生育三烯酚的合成,或者在牻牛儿牻牛儿基还原酶(GGR)的作用下生成 PDP,然后用于生育酚的合成^[13]。

维生素 E 合成的最初前体由尿黑酸(HGA)异戊二烯化获得。HGA 和 PDP/GGDP 在尿黑酸植基转移酶(HPT)/尿黑酸牻牛儿牻牛儿基转移酶(HGGT)的催化作用下生成 2-甲基-6-植基-苯醌(MPBQ)或 2-甲基-6-牻牛儿牻牛儿基-苯醌(MGGBQ)。MPBQ 是所有生育酚的共同前体,而 MGGBQ 是所有生育三烯酚的共同前体。

MPBQ 可以在生育酚环化酶(TC)的作用下生成 δ -生育酚,也可以在 2-甲基-6-植基苯醌甲基转移酶(MPBQ MT)作用下生成 2,3-二甲基-6-植基-苯醌(DMPBQ),然后在 TC 作用下生成 γ -生育酚。在生育酚甲基转移酶(γ -TMT)作用下 δ -生育酚和 γ -生育酚分别转化为 β -生育酚和 α -生育酚。有研究表明,MGGBQ 也以同样方式生成 δ -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 α -生育三烯酚^[14]。维生素 E 合成途径及相关酶如图 1 所示。

3 植物维生素 E 基因工程的研究

正如所有人体必需营养物质一样,人体自身不能合成维生素 E,必须每天从饮食中摄取一定量的 VE,目前人类摄取的 VE 主要来源于植物油^[15],所以如何提高植物中 VE 的活性至关重要。VE 的活性与 VE 总含量和组成密切相关,因此提高 VE 活性可以通过两种途径来实现:一是通过提高植物体内 VE 总含量来提高 VE 活性,二是提高 VE 中活性最高的 α -生育酚的比例。前者可以通过上调上游相关酶基因的表达如 TyrA, HPPD 等,提高 VE 合成前体的水平,间接提高 VE 含

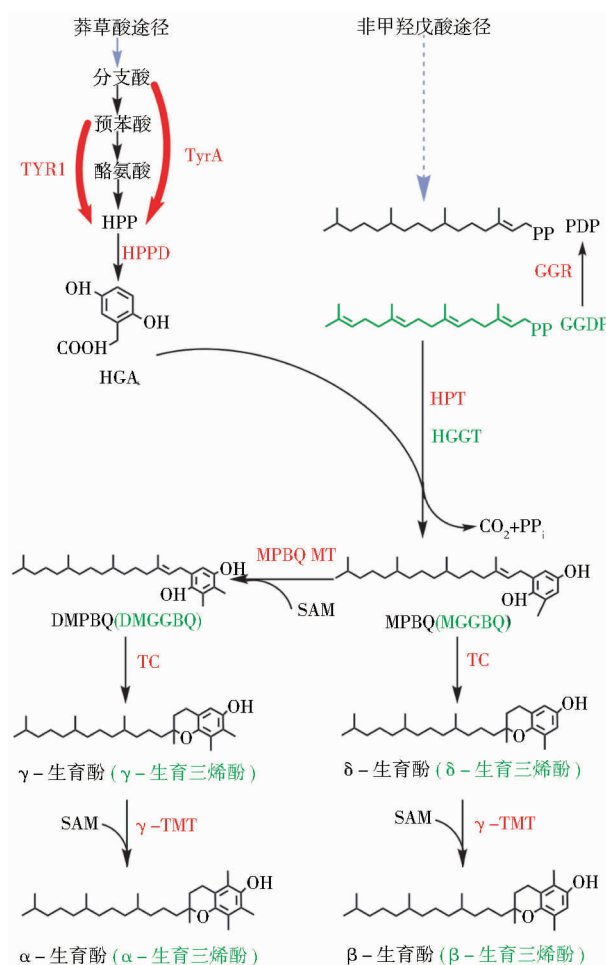


图 1 维生素 E 生物合成途径及相关酶

Fig. 1 Pathway of vitamin E biosynthesis and related enzymes

The related enzymes of vitamin E biosynthesis are indicated in red. Enzymes, compounds, and bonds specific to tocotrienol biosynthesis are indicated in green

量;也可以通过提高 VE 合成代谢关键酶的活性直接提高 VE 的含量。后者可以通过调控 γ -TMT 和 PrBQMT 的活性实现^[13-14, 16]。

目前,研究者已克隆了至少 7 个与维生素 E 合成相关酶的基因,其中包括:4-羟苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)、尿黑酸植基转移酶(HPT, VTE2 编码)、尿黑酸牻牛儿牻牛儿基转移酶(HGGT)、生育酚环化酶(TC, VTE1 编码)、甲基植基苯醌甲基转移酶(MPBQ MT, VTE3 编码)、生育酚甲基转移酶(γ -TMT, VTE4 编码),和植醇激酶(PK, VTE5 编码),并通过转基因的方法,检测了这些酶对植物体内维生素 E 合成的影响。相关的研究数据汇总于表 1。

3.1 HPPD

HPPD 是一种胞质酶,能催化 HPP 氧化生成 HGA, 从而提供 VE 合成所需要的芳香族前体。HPPD 是衰老相关基因家族(SAGs)的成员,例如,在氧化胁迫下,

大麦叶子中 HPPD 表达水平就会提高^[29]。过表达 *AtHPPD* 的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 株系中,HPPD 活性增加了 10 倍,对磺草

表 1 不同转基因植物叶子中维生素 E 的增加量

Table 1 Improvement of tocochromanol level in leaves of different transgenic plants

酶	受体植物	基因来源	生育酚	α-生育酚	生育三烯酚	文献
HPPD	拟南芥	拟南芥	43%	(88.1±7.5)%	无	[17]
HPT	莴苣	拟南芥	2 倍	不明显	无	[18]
HPT	拟南芥	拟南芥	4.4 倍	4.2 倍	无	[19]
HPT	烟草	集胞藻属	5 倍	约 5 倍	微量	[20]
HPT	番茄	集胞藻属	6 倍	显著	显著	[20]
HGGT	拟南芥	大麦	不明显	不明显	10~15 倍	[21]
TC	拟南芥	拟南芥	7 倍	不明显	无	[22]
TC	莴苣	拟南芥	2 倍	不明显	无	[18]
TyrA	拟南芥	大肠杆菌	不明显	不明显	显著	[23]
HPPD/TYR1	烟草	拟南芥/酵母	无	无	大量	[24]
HPPD/TyrA	拟南芥	拟南芥/大肠杆菌	不明显	不明显	显著	[23]
HPT/TC/TMT	烟草	集胞藻属/集胞藻属/拟南芥	显著	显著	显著	[20]

表 2 不同转基因植物种子中维生素 E 的增加量

Table 2 Improvement of tocochromanol level in seeds of different transgenic plants

酶	受体植物	基因来源	生育酚	α-生育酚	生育三烯酚	文献
HPPD	水稻	拟南芥	无	显著	微量	[25]
HPT	拟南芥	拟南芥	40%	不明显	无	[19]
HGGT	玉米	大麦	不明显	不明显	4-6 倍	[21]
γ-TMT	大豆	紫苏	不明显	10.4 倍	无	[26]
γ-TMT	芥菜	拟南芥	不明显	6 倍	无	[27]
HGGT/HPPD/TYR1	拟南芥	大麦/拟南芥/大肠杆菌	不明显	不明显	7.5 倍	[23]
TyrA/HPPD/GGR/HPT	大豆	欧文氏菌/拟南芥/拟南芥/拟南芥	不明显	不明显	10~15 倍	[28]

酮(一种除草剂,HPPD 的高度专一性抑制剂)的抗性也提高了,生育酚含量只增加了 37%^[30]。过表达 *AtHPPD* 的水稻株系种子中,生育三烯酚的含量有微量的增加,但是生育酚的含量并没有变化,只是 α-生育酚和 γ-生育酚的相对比率有了显著提高^[25]。类似的结果在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 和 莴 苣 (*Lactuca sativa* L.) 中也有报道^[31-33]。这表明单独过表达 *HPPD* 不足以引起生育酚含量的大幅度增加。

Rippert 等^[24]以过表达 *AtHPPD* 的烟草为材料,转入 *TYR1* 基因,后代叶子中生育三烯酚大量积累,高达自身生育酚的 10 多倍,而野生烟草里不含生育三烯

酚。随后,Zhang 等^[23]在拟南芥中共表达 *AtHPPD* 和 *TyrA*,共表达株系后代叶子中 VE 含量约为野生型的 2~3 倍,其中生育三烯酚约占 VE 总量的 33%。此外,他们还分别获得了 *TyrA* 过表达株系和 *AtHPPD* 过表达株系,继而通过杂交的方法得到 *AtHPPD/TyrA* 转基因后代。*AtHPPD* 过表达株系生育酚含量和野生型相比较,没有明显变化,而 *TyrA* 过表达株系叶子中生育酚含量是野生型的 2~3 倍,通过杂交获得的 *AtHPPD/TyrA* 株系后代叶子中生育三烯酚的含量达到 VE 总量的 50%,而生育三烯酚在野生型拟南芥中是不存在的。Karunanandaa 等^[28]测定了共表达 *TyrA/AtHPPD* 的拟南芥和大豆种子中 HGA 的含量,发现 HGA 水平分别提

高了60和800倍,这可能是由于绕开酪氨酸反馈调节所致。在酪氨酸合成过程中,酪氨酸水平反馈抑制分支酸变位酶的活性,而共表达 *TyrA/HPPD* 的植物可以在不改变酪氨酸水平的情况下,直接从分支酸合成 HPP,继而合成 HGA 前体。因此,共表达 *TyrA/AtHPPD* 能够引起生育三烯酚含量的大幅增加。

3.2 HPT

HPT 是一种存在于叶绿体内的膜结合蛋白,催化 HGA 和 PDP 缩合生成 MPBQ^[34-35]。不论植物的营养器官还是生殖器官,HPT 表达水平都很高,但是花药例外。Yang 等^[12]对大麦颖果进行微阵列分析表明,HPT 的表达部位主要在胚中。

拟南芥 *vte2* 突变体种子的发育能力严重受损,这可能是由于多聚不饱和脂肪酸被氧化的缘故^[36]。还有研究发现低温处理8周后,拟南芥 *vte2* 突变体莲座叶变小,叶子萎黄^[12]。为了验证 HPT 是否是生育酚合成途径中的限速酶,Collakova 等^[19]通过转基因的方法获得了拟南芥过表达 *AtHPT* 株系,过表达株系叶子中,HPT 活性和生育酚含量分别增加了10倍和4.4倍;种子中 HPT 活性和生育酚含量分别增加了4倍和40%。此外,莴苣中过表达 *AtHPT* 或 *AtTC*,两种转基因株系生育酚含量都增加了两倍多,主要是 γ -生育酚得以增加所致^[18]。Karunanandaa 等^[28]在大豆中共表达 *EhTyrA/AtHPPD/AtGGR/AtHPT*,可以引起大豆种子中总 VE 含量提高10到15倍,主要得益于 δ -生育三烯酚的积累,这表明利用多基因协同作用同时提高 VE 合成前体的水平和下游关键酶的活性可以有效地提高 VE 含量。

3.3 HGGT

与 HPT 作用机制类似,HGGT 催化 HGA 和 GGDP 缩合生成 MGGBQ, Cahoon 等^[21]于2003年第一次从大麦、小麦和水稻种子中克隆得到 HGGT 序列,Northern 分析显示 HGGT 仅仅在大麦种子中表达,在叶子和根中检测不到相对应的 mRNA 水平,这和生育三烯酚的特异分布相一致。在大麦颖果发育阶段,HGGT 表达水平明显高于 HPT 表达水平,尤其是在授粉10d和16d后,但是授粉22d后测定发现,HGGT 主要在胚乳中表达,而 HPT 如前所述主要在胚中表达。

最近研究表明,HGGT 在生育三烯酚流量调控方面亦是一种关键酶。已有报道称^[21],过表达 *HbHGGT* 的拟南芥后代叶子中,总 VE 含量提高了10到15倍,生育三烯酚大量积累,而生育三烯酚在野生型叶子中并不存在,

γ -生育三烯酚占 VE 总量的85%。玉米胚中特异性表达 *HbHGGT* 的后代中,生育三烯酚含量提高了将近20倍,总 VE 含量提高了4到6倍,生育三烯酚占总 VE 含量的74%,而野生型中仅占15~20%,其中, γ -生育三烯酚仍是 VE 的主要形式。随后,Yang 等^[12]又对 HGGT 的功能进行分析,他们把 *HGGT* 转到拟南芥 *vte2* 突变体内,发现后代叶子中既可以积累生育酚也可以积累生育三烯酚,主要形式是 γ -生育三烯酚,此外,在 *vte2* 突变体内过表达 *HGGT* 还可以挽救由于缺乏 HPT 带来的生理缺陷。2013年,Zhang 等^[23]在拟南芥里共表达 *HGGT/HPPD/TyrA* 三个关键基因,他们发现,单独表达 *HGGT* 的后代种子中 VE 含量提高了4.5倍,共表达株系后代种子中生育酚含量提高了7.9倍, δ -生育三烯酚都是主要的形式。*HGGT* 过表达既然可以引起 δ -生育三烯酚的大量积累,那么在此基础上, γ -TMT 和 PrBQMT 的参与对生育三烯酚活性的影响有待于后续研究。

3.4 TC

如图1所示,TC 催化 VE 合成路线下游的环化步骤。研究表明,TC 在改变 VE 组成方面发挥重要作用。据报道,拟南芥 *vte1* 突变体不能合成生育酚,过表达 *VTE1* 的拟南芥叶子中生育酚总量提高了7倍,但主要是 γ -生育酚的增加, α -生育酚含量没有明显变化^[22]。*vte1* 缺陷型拟南芥中生育酚的减少可以引起抗坏血酸盐(AsA)和谷胱甘肽(GSH)的增加,反之,过表达 *VTE1* 植株中生育酚的增加导致抗坏血酸盐和谷胱甘肽含量的减少。2010年,有类似的研究^[17]也表明,过表达 *VTE1*, γ -生育酚的含量有明显增加,但是 α -生育酚含量却没大的改变,只占总生育酚含量的59.2%,VE 的积累同样会导致 AsA 和 GSH 水平的降低。VE、AsA 和 GSH 三者之间通过 Halliwell-Asada 循环相互影响,这对维持植物体内氧化还原内稳态以及维持植物生理活动有着重要的影响。

3.5 γ -TMT

植物 VE 合成途径中, γ -TMT 的功能主要是催化 δ -生育(三烯)酚和 γ -生育(三烯)酚甲基化生成 β -生育(三烯)酚和 α -生育(三烯)酚。Collakova 等^[37]发现,是 γ -TMT 活性限制了 α -生育酚和 β -生育酚的合成,而非 SAM 水平。

有许多研究都表明, γ -TMT 可以用来改善 VE 的组成,提高 VE 的活性。大豆种子中特异性表达紫苏(*Perilla frutescens* (L.) Britt.) γ -TMT,后代种子中 α -生

育酚和 β -生育酚含量分别提高了 10.4 倍和 14.9 倍^[26]。芥菜 (*Brassica juncea* (L.) Czern.) 中特异性表达 *AtTMT*, 后代种子中 α -生育酚含量提高了 6 倍^[27]。在拟南芥 *35S:HPT1/35S: γ -TMT* 共表达株系叶子和种子中, VE 活性分别是野生型的 3.2 和 12 倍, 种子中活性相对较低的 γ -生育酚完全转化为活性高的 α -生育酚形式^[19]。因此, 提高下游关键酶 γ -TMT 的表达可以正向拉动 VE 生物合成, 若要显著增加最终产物量, 则需同时提高上游关键酶的表达。

近来, Lu 等^[20]通过构建多基因操纵子, 把集胞藻属 (*Synechocystis*) HPT, TC, γ -TMT 利用基因枪的方法单一或一并转入烟草 (*N. tabacum* L.) 和番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 叶绿体内, *Nt-SyHPT* 过表达株系 VE 含量是野生型的 5 倍, 主要是 α -生育酚含量的增加, *Nt-Top2* (三个基因共转) 过表达株系 VE 含量增加更显著, 和 *Nt-SyHPT* 株系相比较, 生育三烯酚更加充足。这表明, 一旦 HPT 瓶颈被解除, TC 成为 VE 合成通路中的限速酶, 共表达 HPT 和下游通路中的关键酶, VE 含量可以大幅度提高。冷胁迫试验表明, 以上转基因株系都表现出对氧化胁迫耐受力增强。番茄 *Sl-SyHPT* 过表达株系成熟叶子中, VE 含量是野生型的 6 倍, *Sl-Top2* (三个基因共转) 过表达株系 VE 含量增加高达 10 倍, 番茄果实里表达不明显。以上结果表明, 多基因共表达株系可以兼具改变 VE 组成以及提高 VE 总量的功能。

此外, Van Eenennaam 等^[38]发现过表达 *PrBQMT* 也可以改变 VE 的组成, 过表达 *PrBQMT* 的大豆种子中, δ -生育酚和 β -生育酚几乎完全转变成 α -生育酚和 γ -生育酚。近来, Ischebeck 等^[39]发现植醇和 PDP 之间存在一条通路; Valentin 等^[40]克隆出编码植醇激酶的 *VTE5* 基因, 这些发现为研究生育酚的合成提供了新思路。

4 展 望

尽管生育三烯酚占 VE 家族成员的半数, 但对其研究仅仅占总数的 1%。生育三烯酚具有很强的降胆固醇、预防糖尿病、促进骨吸收、抗癌和神经保护的作用, 这些功能是生育酚不具有的^[9-10]。那么有望利用基因工程的方法共表达 *HGGT/HPPD/TYR1* 或 *TyrA / HPPD/GGR/HPT* 来提高生育三烯酚的含量。在此基础上, 还可以过表达 γ -TMT, 增加 α -生育三烯酚的含量, 提高生育三烯酚的活性, 使维生素 E 更好的应用于人类健康保护方面。

复杂的代谢通路 (如 VE 合成途径) 需要多基因协同表达才能完成, 已经熟知, 在植物质体 (叶绿体) 中, 基因以操纵子形式排列, 首先形成多顺反子转录本, 进一步加工成单顺反子 mRNA。质体基因组表达有以下三个优势: 首先, 它可以避免受到表观基因沉默的影响, 其次, 目的基因可以通过同源重组插入到质体基因组的特定部位, 一般是在基因间隔区, 那么转基因拷贝数和插入位点相对确定, 转基因工作量大大降低。再次, 质体 DNA 是母系遗传, 质体转化可以降低花药基因传递的风险。近来, 有学者通过人工合成 *HPT/TC/TMT* 多基因操纵子, 同时利用一种小 RNA 元件 (被称为顺反子间表达元件, 即 IEE) 使操纵子转录本分割成稳定的单顺反子单元, 经由质体转化, 可显著提高烟草叶子中 α -生育酚和生育三烯酚的含量^[20]。人工合成多基因操纵子质体转化技术, 为其表达 VE 合成途径中的多种限速酶提供一种新思路, 同时为多基因稳定转化提供了一种高效的方法, 使得新的生化代谢通路引入到植物中成为了可能。

维生素 E (VE)、抗坏血酸盐 (AsA) 和谷胱甘肽 (GSH) 都是人体内不可或缺的抗氧化剂, 但如上文提到的, VE 的过量积累会导致 AsA 和 GSH 水平的降低, 但是在特殊情况下需要三者单独或共同发挥作用, 那么如何在三者之中寻求一种更优的平衡也是一个不可忽视的问题。

维生素 E 作为脂溶性维生素, 对酸和热较稳定, 一旦遇碱, 遇氧都能迅速被氧化, 同时由于其不溶于水, 因此很难广泛应用。目前研究出一种新型的微囊化技术, 它可以将维生素 E 包裹到特定的水溶性壁材中, 避免维生素 E 与外界接触, 从而增强了稳定性和水溶性, 便于保存, 随着天然维生素 E 微胶囊化的发展, VE 将会广泛应用于食品、医药、化妆品等行业中^[5, 41-42]。

参考文献

- [1] Hofius D, Sonnewald U. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *TRENDS in Plant Science*, 2003, 8(1): 6-8.
- [2] Zingg J M. Vitamin E: an overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*, 2007, 28(5-6): 400-422.
- [3] Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89(5): 1649S-1656S.
- [4] Zhang C X, Ho S C, Chen Y M, et al. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *Int J Cancer*, 2009, 125(1): 181-188.

- [5] 黄筱生. 天然维生素 E 与人体健康. 中国油脂, 2003, 28 (1):35-36.
Huang X S. Natural vitamin E and health. China Oils and Fats, 2003, 28(1):35-36.
- [6] Semchuk N M, Lushchak O V, Falk J, et al. Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown Arabidopsis thaliana. Plant Physiol Biochem, 2009, 47(5): 384-390.
- [7] Foyer C H, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell, 2005, 17(7):1866-1875.
- [8] Falk J, Munne-Bosch S. Tocochromanol functions in plants: antioxidant and beyond. J Exp Bot, 2010, 61(6): 1549-1566.
- [9] Sen C K, Khanna S, Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. Mol Aspects Med, 2007, 28(5-6): 692-728.
- [10] Aggarwal B B, Sundaram C, Prasad S, et al. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. Biochem Pharmacol, 2010, 80 (11): 1613-1631.
- [11] 张玉红, 巴桑玉珍, 寿建昕, 等. 不同基因型大麦品种大麦油及其母育酚含量的变异规律. 麦类作物学报, 2007, 27 (4): 721 -724.
Zhang Y H, BaSang Y Z, Shou J X, et al. Variability of oil and tocol content in different barley cultivars. Journal of Triticeae Crops, 2007, 27 (4): 721 -724.
- [12] Yang W, Cahoon R E, Hunter S C, et al. Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. Plant J, 2011, 65(2): 206-217.
- [13] Hunter S C, Cahoon E B. Enhancing vitamin E in oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. Lipids, 2007, 42(2): 97-108.
- [14] 钱文成, 陶苏丹, 陈德富, 等. 植物维生素 E 代谢工程研究. 生物学通报, 2006, 41(12):13-15.
Qian W C, Tao S D, Chen D F, et al. Progress of plant Vitamin E metabolic engineering. Bulletin of Biology, 2006, 41(12):13-15.
- [15] Fitzpatrick T B, Basset G J, Borel P, et al. Vitamin deficiencies in humans: can plant science help?. Plant Cell, 2012, 24(2): 395-414.
- [16] 胡英考. 植物维生素 E 合成及其生物技术改良. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1):32-35.
Hu Y K. Molecular biology and biotechnology improvement of vitamin E biosynthesis in plant. China Biotechnology, 2004, 24 (1):32-35.
- [17] Li Y, Zhou Y, Wang Z, et al. Engineering tocopherol biosynthetic pathway in Arabidopsis leaves and its effect on antioxidant metabolism. Plant Science, 2010, 178 (3): 312-320.
- [18] Harish M C, Dachinamoorthy P, Balamurugan S, et al. Overexpression of homogentisate phytyltransferase (HPT) and tocopherol cyclase (TC) enhances α -tocopherol content in transgenic tobacco. Biologia Plantarum, 2012, 57(2): 395-400.
- [19] Collakova E, Dellapenna D. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. Plant Physiol, 2003, 131(2): 632-642.
- [20] Lu Y, Rijzaani H, Karcher D, et al. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(8): E623-632.
- [21] Cahoon E B, Hall S E, Ripp K G, et al. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. Nat Biotechnol, 2003, 21 (9): 1082-1087.
- [22] Kanwischer M, Porfirova S, Bergmuller E, et al. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of Arabidopsis affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. Plant Physiol, 2005, 137(2): 713-723.
- [23] Zhang C, Cahoon R E, Hunter S C, et al. Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production. Plant J, 2013, 73 (4): 628-639.
- [24] Rippert P, Scimemi C, Dubald M, et al. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. Plant Physiol, 2004, 134(1): 92-100.
- [25] Farre G, Sudhakar D, Naqvi S, et al. Transgenic rice grains expressing a heterologous rho-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase shift tocopherol synthesis from the gamma to the alpha isoform without increasing absolute tocopherol levels. Transgenic Res, 2012, 21(5): 1093-1097.
- [26] Tavva V S, Kim Y H, Kagan I A, et al. Increased alpha-tocopherol content in soybean seed overexpressing the Perilla frutescens gamma-tocopherol methyltransferase gene. Plant Cell Rep, 2007, 26(1): 61-70.
- [27] Yusuf M A, Sarin N B. Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of Brassica juncea with gamma-TMT gene for increased alpha-tocopherol content. Transgenic Res, 2007, 16(1): 109-113.
- [28] Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, et al. Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. Metab Eng, 2005, 7(5-6): 384-400.
- [29] Falk J, Krauß N, Dähnhardt D, et al. The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is

- expressed during oxidative stress. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159(11): 1245-1253.
- [30] Tsegaye Y, K. Shintani D, DellaPenna D, et al. Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem*, 2002, 40: 913-920.
- [31] Falk J, Brosch M, Schafer A, et al. Characterization of transplastomic tobacco plants with a plastid localized barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *J Plant Physiol*, 2005, 162(7): 738-742.
- [32] Kramer C M, Launis K L, Traber M G, et al. Vitamin E levels in soybean (*Glycine max* L. Merr.) expressing a p-hydroxyphenylpyruvate gene from oat (*Avena sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 2014, 62(15): 3453-3457.
- [33] Ren W, Zhao L, Zhang L, et al. Molecular cloning and characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene from *Lactuca sativa*. *J Plant Physiol*, 2011, 168(10): 1076-1083.
- [34] Collakova E, Dellapenna D. Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 1113-1124.
- [35] Savidge B, Weiss J D, Wong Y H, et al. Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 321-332.
- [36] Sattler S E. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell Online*, 2004, 16(6): 1419-1432.
- [37] Collakova E, Dellapenna D. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol*, 2003, 133(2): 930-940.
- [38] Van Eenennaam A L, Lincoln K, Durrett T P, et al. Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis mutant* to soy oil. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 3007-3019.
- [39] Ischebeck T, Zbierzak A M, Kanwischer M, et al. A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 281(5): 2470-2477.
- [40] Valentin H E, Lincoln K, Moshiri F, et al. The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell*, 2006, 18(1): 212-224.
- [41] 孙昱, 吴文忠, 李延志, 等. 一种天然维生素 E 微囊的制备及其性能表征. *大连工业大学学报*, 2011, 30(6): 400-403.
- Sun Y, Wu W Z, Li Y Z, et al. Microencapsulation and characterization of natural vitamin E. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2011, 30(6): 400-403.
- [42] 马云标, 朱科学, 周惠明. 维生素 E 微胶囊的理化性质表征. *中国油脂*, 2010, 35(1): 55-59.
- Ma Y B, Zhu K X, Zhou H M. Physicochemical characteristics of microencapsulated vitamin E. *China Oils and Fats*, 2010, 35(1): 55-59.

Progress in Genetic Engineering of Plant Vitamin E

CHAI Yu-qiong¹ ZHANG Yu-hong² HAN Ning¹ ZHU Mu-yuan¹

(1 Institute of Genetics, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(2 Tibet Academy of Agricultural and Husbandry Science, Lhasa 850000, China)

Abstract Photosynthetic organisms synthesize the amphipathic antioxidant called vitamin E which are essential components of the human diet. Tocopherol and tocotrienol comprise the vitamin E class in plants. Besides the antioxidant properties, the tocotrienol forms of natural vitamin E also help to lower cholesterol, prevent diabetes, promote bone resorption and reduce the risk of cancer and neurological diseases. Thus vitamin E is widely used in pharmaceutical, food and cosmetic industries. In this review, current knowledge on vitamin E biosynthesis pathway and related enzymes was described. Moreover, recent studies on genetic engineering to enhance and alter vitamin E content and composition in plants were summarized. Co-expression of multiple genes in vitamin E biosynthesis pathway and plastid transformation by using synthetic multigene operons have provided new strategies to increase vitamin E production in plants.

Key words Vitamin E Genetic engineering Multigene operon Plastid transformation