

植物维生素 B₆ 从头合成与代谢转换研究进展

黄龙全¹, 张剑韵²

(1 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2 安徽农业大学 外国语学院, 合肥 230036)

摘 要: 维生素 B₆ 是一组可相互转换的吡啶衍生物的总称, 包括吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛、磷酸吡哆醇、磷酸吡哆胺和磷酸吡哆醛。其中, 磷酸吡哆醛是 140 多种细胞酶的辅酶。至今发现两种 VB₆ 从头合成途径, DXP(1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸)依赖途径和 DXP 非依赖途径, 前者仅存在于大肠杆菌和少量其他细菌, 后者存在于其他所有 VB₆ 自养生物。除了 VB₆ 的从头合成, 所有细胞生物体内还存在一条相似的补救途径, 补救途径实现 VB₆ 各型的代谢转换。该文对近年来国内外有关植物 VB₆ 从头合成和代谢转换研究进展进行综述。

关键词: 植物; 维生素 B₆; 从头合成途径; 补救途径

中图分类号: Q563⁺.3

文献标志码: A

Review on the *de novo* Synthesis and Metabolic Conversions of Vitamin B₆ in Plants

HUANG Longquan¹, ZHANG Jianyun²

(1 School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 School of Foreign Languages, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Vitamin B₆ (VB₆) is a generic term referring to six interconvertible compounds, pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine and their phosphorylated derivatives, pyridoxine 5'-phosphate, pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxamine 5'-phosphate. Pyridoxal 5'-phosphate is the catalytically active form of VB₆, and acts as cofactor in more than 140 different enzyme reactions. VB₆ is synthesized *de novo* by two different enzymatic pathways, the DXP (1'-deoxy-D-xylulose-5'-phosphate)-dependent pathway of *E. coli* and a few other bacteria, and the DXP-independent pathway found in almost all other organisms, except for animals. In addition to the *de novo* pathways, another pathway is found in all organisms, and functions to convert the six different VB₆ forms between each other. This pathway is called the "salvage pathway". This article summarizes the current knowledge on the *de novo* synthetic pathway and the salvage pathway of VB₆ in plants.

Key words: plant; vitamin B₆; *de novo* synthetic pathway; salvage pathway

维生素 B₆ (VB₆) 是一组可相互转换的吡啶衍生物的总称, 包括吡哆醇 (pyridoxine, PN)、吡哆胺 (pyridoxamine, PM)、吡哆醛 (pyridoxal, PL)、磷酸吡哆醇 (pyridoxine 5'-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺 (pyridoxamine 5'-phosphate, PMP) 和磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP)。其中, PLP 是 140 多种细胞酶的辅酶, 在生物体内发挥广泛、重要

的作用。植物和微生物是自然界 VB₆ 的制造者, 动物从食物中获得 VB₆。在植物体内, PLP 作为胱硫醚合成酶^[1]、氨基环丙烷羧化物合成酶^[2]、丝氨酸棕榈酰转移酶^[3]、苏氨酸合成酶^[4]、胱硫醚裂合酶^[5]等的辅酶有详细研究; PLP 也是乙烯、叶绿素和生长素合成所必需的^[6-7]; PLP 还涉及亚油酸和淀粉的合成^[8]。近年来发现 VB₆ 也是抗氧化剂, 可有效淬

收稿日期: 2015-06-10; 修改稿收到日期: 2015-08-06

基金项目: 国家自然科学基金(31372262)

作者简介: 黄龙全(1957—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事 VB₆ 代谢的生物多样性研究。E-mail: lqhuang218@aliyun.com

灭单线态氧和超氧阴离子自由基^[9-10];它作为细胞信号传导的调节分子,对细胞膜上的离子通道具有调节作用^[11];它发挥抗逆作用,保护植物免受低温、紫外线、氧化、渗透压等环境胁迫的影响^[12-13]。无论是阐明 VB₆ 参与调控植物生长发育和环境反应的机理,通过遗传改良提高食源性植物的 VB₆ 含量,还是利用 VB₆ 的特殊生理功能提高植物的逆境适应能力,都依赖于对 VB₆ 代谢的研究。植物 VB₆ 代谢包括 VB₆ 的从头合成和合成后的代谢转换。本文综述了植物 VB₆ 从头合成与代谢转换的研究进展。

1 植物 VB₆ 的从头合成

1.1 自然界存在两种 VB₆ 从头合成途径

至今发现两种 VB₆ 从头合成途径(*de novo* synthetic pathway),两者的底物、产物和作用酶均不相同。首先发现的 DXP 依赖途径(DXP dependent pathway)在大肠杆菌有详细研究,利用 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DXP)和 4-磷酸羧基-苏氨酸首先合成 PNP,再经 PNP 氧化酶的作用,转变为 PLP 后用于细胞代谢过程^[14]。

另外一条途径 DXP 非依赖途径(DXP independent pathway)于 1999 年发现。该途径以谷氨酰胺、3-磷酸甘油醛(或磷酸二羟丙酮)和 5-磷酸核糖(或 5-磷酸核酮糖)为底物直接合成 PLP^[15-17](图

1)。Ehrenschaft 等^[15]在研究尾孢菌(*C. nicotianae*)对自身毒素的抗性中发现了涉及 VB₆ 代谢的新基因,最初指定为单线态氧抗性基因 *SOR1*,后来鉴定为 *PDX1*。2001 年又从尾孢菌鉴定出涉及 VB₆ 合成的第 2 个基因 *PDX2*^[16]。目前已经明确 *PDX1* 和 *PDX2* 构成 PLP 合酶复合体(PLP synthase complex),*PDX2* 发挥谷氨酰胺酶的作用,催化从谷氨酰胺产生氨;*PDX1* 发挥闭环蛋白的作用,催化 5-磷酸核糖、3-磷酸甘油醛和氨的缩合,完成 PLP 的合成^[17]。DXP 非依赖途径的产物直接用于细胞代谢,生物效率高于 DXP 依赖途径,是自然界 VB₆ 的主要合成途径。DXP 非依赖途径通过谷氨酰胺将 VB₆ 和氨基酸代谢联系起来,通过丙糖和戊糖磷酸代谢池又将 VB₆ 与细胞能量途径联系起来。

1.2 植物通过 DXP 非依赖途径从头合成 VB₆

VB₆ 合成途径作用酶及其编码基因的鉴定是极为重要的一步。学术界很长时间认为植物通过 DXP 依赖途径合成 VB₆,但始终没有找到实验依据。作为植物逆境应答中 VB₆ 作用研究的一部分,2005 年 Denslow 等^[18]从烟草鉴定出 *PDX1* 和 *PDX2* 同源序列。使用兼并引物的基因扩增获得 2 个 *PDX1* 序列,彼此相差 15 个碱基,编码相同氨基酸序列,可能是 2 个等位基因或者 2 个拷贝。*PDX2* 为单拷贝基因,表达也远低于 *PDX1*。多个

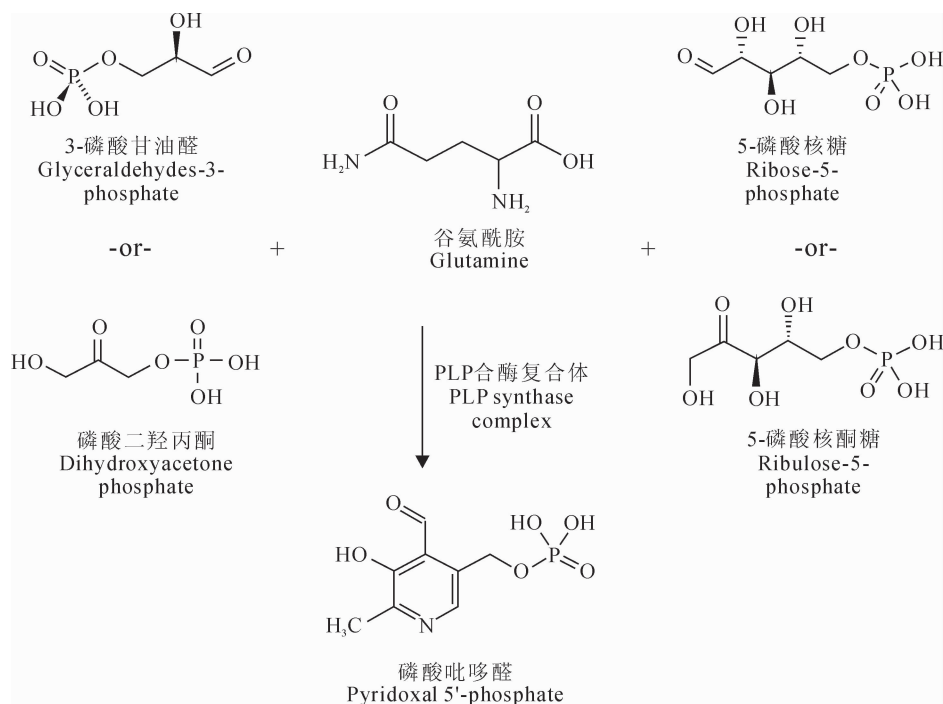


图1 DXP非依赖性维生素 B₆ 合成途径

Fig. 1 DXP independent vitamin B₆ synthetic pathway

研究小组从拟南芥也鉴定出 *PDX1* 和 *PDX2* 同源序列,并开展了更为深入的研究^[13,19-23]。目前已经明确植物通过 DXP 非依赖途径从头合成 VB₆。

拟南芥 *PDX2* 也是单拷贝基因,位于 5 号染色体上(*At5g60540*),基因长度为 2 180 bp,含有 7 个外显子,转录长度为 768 bp,编码 255 个氨基酸、理论分子量为 27 303 Da 的蛋白。存在 3 个 *PDX1* 同系物,分别命名为 *AtPDX1.1*、*AtPDX1.2* 和 *AtPDX1.3*。*PDX1.1*(*At2g38230*)、*PDX1.2*(*At3g16050*)和 *PDX1.3*(*At5g01410*)分别位于 2 号、3 号和 5 号染色体上。*PDX1.1* 和 *PDX1.3* 具有 89% 的相似性,而与 *PDX1.2* 的相似性为 60%。拟南芥还存在一个小的不完全拷贝(*PDX1.4*),其与 *PDX1.1* 基因上游序列 33% 相同,在细胞代谢中可能没有作用。*PDX1* 同系物都没有基因内含子,提示其原核起源。*PDX1.1*、*PDX1.2* 和 *PDX1.3* 的转录长度分别为 1 053、1 380 和 1 297 bp。*PDX2* 对拟南芥的生长发育至关重要,突变体胚胎致死^[19,23]。因为难以获得 *PDX2* 的纯合突变体,所以大量的研究集中在 *PDX1* 同系物上^[13,19-22]。其中 *PDX1.3* 的转录丰度最高,突变体表型和 VB₆ 水平的变化最大,研究也最为详细。

PDX1.1 基因沉默植物出现萎黄和根系生长不良,而 *PDX1.1* 和 *PDX1.3* 基因都沉默植物叶片萎黄畸形,多数死亡,幸存植物的花朵小、未能结籽,提示 *PDX1.1* 和 *PDX1.3* 可能存在功能重叠^[21]。Titiz 等^[20]对 *PDX1.1* 和 *PDX1.3* 基因进行了 T-DNA 插入突变。*pdx1.3* 突变体的表型与 Wagner 等的结果非常相似,但 *pdx1.1* 突变体的 VB₆ 水平没有下降,也不呈现萎黄表型。Titiz 等也进行了 *PDX1.1* 和 *PDX1.3* 双突变,恶化的表型和致命的双突变也预示两基因至少部分功能重叠。但是,2 个基因的时空表达存在差异^[13,20-21],提示两者也可能具有相对独立的功能,在拟南芥基因组中都有存在的意义。拟南芥 *PDX1.2* 的作用还不清楚,基因插入突变体的表型与野生型没有差异^[21]。但拟南芥遭遇紫外线和氧化胁迫时 *PDX1.2* 转录上调^[22],提示 *PDX1.2* 可能在胁迫条件下发挥作用。

1.3 植物 VB₆ 的从头合成涉及逆境应答

烟草感染假单胞杆菌后 *PDX1* 和 *PDX2* 的基因表达下调,而水杨酸和茉莉酮酸甲酯处理可致基因短暂上调^[18]。Chen 等^[13]在分离干旱和盐胁迫响应蛋白互作伴侣的酵母双杂交实验中,首先分离出 *PDX1.3*。植物的根、茎、叶、花和长角果都能检测出

PDX1.3 的转录,基因的最强表达出现在脉管组织和保卫细胞。*pdx1.3* 突变体的叶绿体和根的生长异常,幼苗的根对盐和甘露醇敏感,提示 *PDX1.3* 蛋白涉及对渗透和离子胁迫的生物应答。*pdx1.3* 突变体根部缺乏色氨酸依赖性生长素的合成,这可能是出现短根表型的原因^[24]。2006 年,Wagner 等^[21]获得了 *PDX1.3* 基因 EMS 突变体 *rsr4-1*,突变体的蔗糖响应下降,呈现根生长退化、矮小和退绿叶。突变体的表型可以采用向生长媒体中添加 PL 的方法加以恢复,添加 PN、PM 或者 PLP 可部分恢复。

Denslow 等^[22]报道了非生物胁迫下拟南芥 PLP 合酶基因的应答调节。正常状态下,拟南芥 *PDX1.1* 和 *PDX1.3* 高水平表达,*PDX1.2* 不表达或低水平表达,*PDX2* 中间水平表达。在植物遭遇强光、低温、干旱、紫外线、百草枯和臭氧时,*PDX1* 和 *PDX2* 基因都上调。作者进一步分析多种胁迫因子对烟草 VB₆ 存在形态的影响,发现 PLP 水平不同程度地应答上升,并引起 PL 和 PN 的相应变化,随后回归对照水平^[25]。

2007 年 Herrero 等^[26]在烟草中表达尾孢菌 PLP 合成酶基因,尝试提高烟草的 VB₆ 含量。结果仅有一个株系 VB₆ 水平的增加达到显著水平,比野生型和转化对照系高出约 17%。然而,转化系烟草内源 *PDX1* 和 *PDX2* 基因的表达下降,提示植物 VB₆ 的从头合成受到严格调控。2011 年,Raschke 等^[27]在拟南芥过量表达 *PDX* 蛋白,获得了 VB₆ 含量显著增加的植株。他们还发现仅能提高 *PDX1* 的蛋白表达量,高 VB₆ 含量植株的生长期延长,细胞体积增大,对氧化胁迫的抵抗性也增强。

1.4 VB₆ 从头合成途径的细胞定位

PDX1 和 *PDX2* 复合体的细胞定位还存在争议。Tambasco-Studart 等报道所有 *PDX1* 和 *PDX2* 蛋白都定位于细胞溶质^[19]。然而,Chen 等^[13]把 *PDX1.3* 定位于细胞器和膜系统。Denslow 等^[21]也报道能够从质膜和细胞核观察到 *PDX2* 蛋白。从 SUBA 拟南芥亚细胞定位数据库汇总的亚细胞定位信息看,*PDX1* 和 *PDX2* 定位于细胞溶质和细胞器。基于预测程序,*PDX1.1*、*PDX1.3* 和 *PDX2* 定位于细胞溶质、线粒体和质体,*PDX1.2* 定位于细胞溶质和线粒体。

2 植物 VB₆ 从头合成后的代谢转换

除了 VB₆ 的从头合成,细菌和真核生物细胞中还普遍存在一条相似的 PLP 补救途径,补救途径涉

及一系列酶的作用,通过 VB₆ 各型的代谢转换使得细胞能够直接利用外源 PN、PM 或 PL 来合成细胞代谢所需要的 PLP。补救途径在微生物和哺乳动物有详细研究。虽然 PLP 是占优势的辅酶型,其他形式的 VB₆ 在细胞中通过补救途径也保持动态平衡。

2.1 植物 PL 激酶

PL 激酶(PL kinase, EC 2.7.1.35)在金属阳离子的存在下,利用 ATP 催化 PL、PN 和 PM 的 5' 位醇基磷酸化,生成相应的磷酸酯型。从大肠杆菌发现两种 PL 激酶, *pdxk* 基因编码普通 PL 激酶,而 *pdxy* 基因编码的特殊 PL 激酶仅以 PL 为底物,且活性很低^[28-29]。目前,真核生物中仅发现 *pdxk* 基因,而多数原核生物同时具有 *pdxk* 和 *pdxy*。

2002、2004 和 2008 年,分别从拟南芥^[30]、小麦^[31]和油菜^[32]克隆出 PL 激酶基因。从拟南芥鉴定出的 At5g37850 与大肠杆菌 *pdxk* 同源,与哺乳动物 PL 激酶氨基酸序列的相似性大于 40%。At5g37850 也称 SOS4,其突变体对盐高度敏感。拟南芥 SOS4 基因在叶、茎、根和花均等表达,根尖高度表达,种子吸水 60 h 后可检测出 PL 激酶基因的表达。小麦基因组至少有 2 个 PL 激酶拷贝,在根、芽、穗和花药均有转录。油菜也有 2 个 PL 激酶拷贝,基因的转录受发育和环境的调节。目前还缺乏采用实验的方法对 PL 激酶进行细胞定位,预测结果表示存在于质体和线粒体。

拟南芥 SOS4 基因突变的研究证明 PL 激酶是一个新的盐耐受性决定因子,其突变体 *sos4* 萎黄,与野生型相比植株重量减轻,根部对蔗糖和盐高度敏感,存在 NaCl 时根的生长严重受损;突变体出乎预料地出现了 VB₆ 积累,其中 PLP 的增加量最为显著,其次是 PN 和 PM^[33]。PLP 的增加可能是因为从头合成途径基因的上调,因为 *sos4* 突变体 *PDX* 基因的转录量比野生型的高。除了对盐和蔗糖敏感, *sos4* 突变体耐旱而不耐寒。最近发现叶绿体依靠 PL 激酶维持磷酸酯型 VB₆ 水平^[34]。

2.2 植物 PNP 氧化酶

补救途径的另一个重要酶是 FMN 依赖性 PNP 氧化酶(PNP oxidase, EC 1.4.3.5),氧化底物 PNP 和 PMP 上的 4' 位醇基或氨基为醛基,生成 PLP。2007 年克隆出拟南芥 At5g49970 基因,编码蛋白由 3 个部分构成, N 端为叶绿体转运肽,中部为未知功能的 Yjef_N 区域, C 端为 PNP 氧化酶(PDX3)^[35]。Sang 等^[35]在大肠杆菌中表达该基因,通过酶活性分析证明了其功能。拟南芥 PNP 氧化酶在不同组

织中的表达存在差异,受光、热、ABA 和乙烯处理的上调,受干旱和 NaCl 的下调。生物信息学预测 PNP 氧化酶定位于叶绿体,也获得了 GFT-AtP-POX 融合实验的支持。Gonzalez 等^[33]采用对大肠杆菌 *pdxh* 突变体的互补实验,也验证了拟南芥 At5g49970 的 PNP 氧化酶功能。他们还对该基因进行了插入突变,2 个独立插入突变系氧化酶的活力均下降。*pdx3* 突变体的 VB₆ 总水平下降,而 VB₆ 各型与野生型相比较没有显著差异。生长在标准室内环境中的 *pdx3* 突变体比野生型对照矮小。高光照条件下, *pdx3* 突变体对增强的光照反应迟钝,植株重量无变化,而野生型在强光照条件下生长量增加。突变体对低温、盐与蔗糖引起的渗透压响应与野生型无区别。*pdx3* 突变体的 SOS₄ 以及从头合成途径基因,特别是 *PDX1.1* 基因的表达增强。虽然从头合成途径基因的表达增加,但 *pdx3* 突变体与野生型或者 *sos4* 突变体相比较, *PDX1* 的酶活力下降。2011 年 Sang 等^[36]又报道 PNP 氧化酶在细胞溶质和叶绿体中将 PNP 和 PMP 氧化为 PLP。

2.3 植物 PL 还原酶

PL 还原酶(PL reductase, EC 1.1.1.65)也称为 PN 脱氢酶,利用 NADPH 将 PL 还原成 PN,反应在体外是可逆的,但在体内逆反应几乎不可能发生。2004 年, Morita 等^[37]发现裂殖酵母 PL 还原酶基因突变体能够在缺乏 VB₆ 的合成培养基上生长,认为该酶对酵母生存而言是非必要的,仅涉及 PL 转变为 PN 后的细胞排出。

2011 年,采用序列同源比对的方法从拟南芥鉴定出 PL 还原酶(PLR1),在酵母 PL 还原酶缺失突变体中表达 AtPLR1 编码区域,验证了该酶催化 NADPH 依赖性 PL 的还原反应^[38]。采用 T-DNA 插入突变的研究发现, *plr1* 突变体 VB₆ 从头合成途径基因的表达水平变化不大,而补救途径作用酶 *PDX3* 和 *SOS4* 基因的表达发生显著变化。并且, *pdx3* 和 *sos4* 突变体 *AtPLR1* 基因的表达也上调。高效液相色谱的分析结果显示,2 个 *plr1* 突变体 VB₆ 总水平下降,其中 PL、PLP、PM 和 PMP 水平显著下降,而 PN 和 PNP 没有显著变化。突变体 PL 水平下降和 PN 水平没有变化是很意外的,提示 *AtPLR1* 基因的表达产物可能不是唯一的 PL 还原反应的作用酶。突变体的根系生长正常,但植株明显小于野生型;对低温和高光照的抵抗性与野生型没有差异,但明显受 NaCl 和甘露醇的抑制,提示

PL 还原酶也可能涉及植物对渗透胁迫的抵抗性。

植物的叶际是一个复杂的生态系统,具有丰富的微生物多样性。这些微生物改变植物体表微环境和参与物质循环。VB₆ 是水溶性维生素,其跨膜转移已有广泛的研究,很早就明确只有非磷酸酯型 VB₆ 能够穿越细胞膜。植物即可以从环境中吸收 VB₆,过量 VB₆ 也向环境释放^[39]。我们发现叶际微生物在烟草叶面可以将来源于叶组织的 PL 还原为 PN,提示植物 PL 的还原可能还存在叶际微生物的作用^[40]。

2.4 烟草 VB₆ 的代谢转换与调控

作为重要经济作物和模式植物,烟草 VB₆ 从头合成途径最早被阐明。我们以组培烟草为材料构建无菌实验模型,解析了植物体内 VB₆ 的代谢转换,获得了代谢转换的重要调控信息。采用底物(PL、PM 和 PN)饲喂和应答分析的研究发现,烟草叶片组织中 PLP 保持稳定、PL 水平受到控制,PL 还原为 PN 以及 PM 与 PL 的相互转化是 VB₆ 代谢转换的重要内容^[39]。在建立以 HPLC 检测为基础的 VB₆ 代谢酶活性检测方法的基础上,从烟草叶片组织鉴定出 PL 激酶、PNP 氧化酶、PL 还原酶,以及酶促 PM-PL 转换和 PLP 水解脱磷酸反应,在体外最适反应条件下,叶片组织粗提液中这些酶的催化活力分别为 0.15、0.10、0.08、0.64 和 23.08 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹,在代谢酶活力水平上探讨了植物体内 VB₆ 的代谢转换^[41]。我们的研究结果提示 PLP → PL → PN 是植物(烟草)体内 VB₆ 从头合成后代

谢转换的主体流向,PL 激酶和 PNP 氧化酶构成的 PLP 补救合成以及酶促 PM 和 PL 的相互转换是 VB₆ 主体代谢的补充(图 2)。

2.5 烟草 PLP 磷酸酶的初步鉴定

PLP 的水解在动物和微生物有详细研究,受特异和非特异性磷酸酶的作用。碱性磷酸酶涉及维持细胞外 PLP 浓度的稳定,而酸性磷酸酶涉及细胞内 PLP 浓度的稳定。1992 年从人红细胞纯化出特异性 PLP 磷酸酶^[42],2003 年从人脑克隆出 PLP 磷酸酶基因^[43],从老鼠组织 cDNA 中也克隆出 PLP 磷酸酶基因。我们以 PLP 为底物,从烟草纯化出水解 PLP、PMP 和 PNP 的磷酸酶。该酶为二聚体结构、分子量约为 50 kD,是一个新的非特异性酸性磷酸酶^[44]。植物体内是否存在特异性 PLP 磷酸酶还有待进一步的研究。

2.6 烟草 PL 和 PM 相互转换作用酶的初步鉴定

很早就发现某些生物体内存在 PL 和 PM 的相互转换。从大肠杆菌和兔肝纯化出 PM-草酰乙酸转氨酶,该酶可逆性地催化 PM 和草酰乙酸、PL 和天冬氨酸之间的转氨反应,但是最终被认为是一个未知转氨酶的脱辅基形式^[45]。因为该文作者发现从猪心纯化出的谷氨酸-草酰乙酸转氨酶在脱去辅酶 PLP 或者 PMP 后,也能够催化 PM 和酮酸之间的转氨反应。PM-丙酮酸转氨酶(PM-pyruvate aminotransferase, EC 2.6.1.30)和 PMP-α-酮戊二酸转氨酶(PMP-α-ketoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.54)是目前已经明确和仅有的 PLP 非依

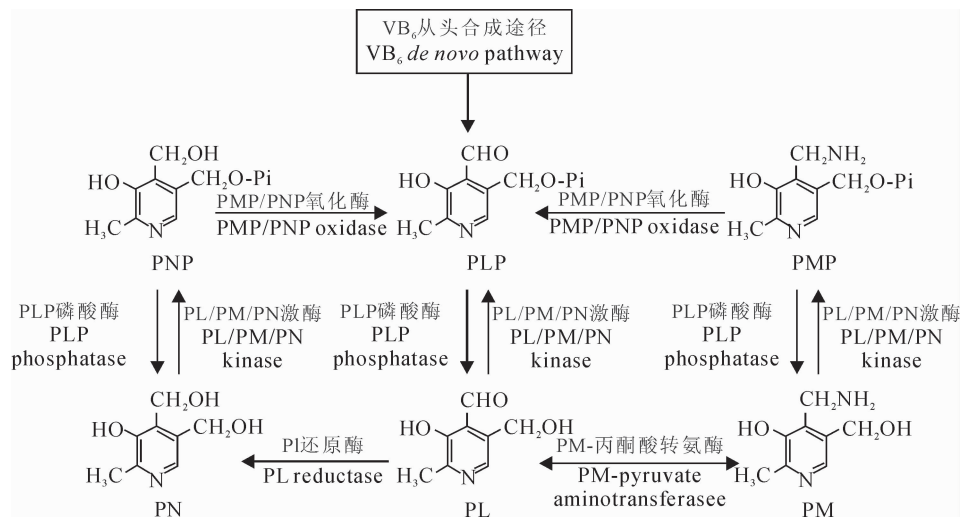


图 2 烟草体内维生素 B₆ 代谢转换示意图^[39]

粗箭头表示主体代谢流向

Fig. 2 Postulated interconversions of different vitamin B₆ forms in tobacco plants^[39]

Thick arrow shows the predominant VB₆ metabolic flux

赖性转氨酶,特异性地以 VB₆ 为底物而非辅酶,参与 VB₆ 代谢转换^[46-47]。我们在发现烟草体内存在 PM 和 PL 相互转换的基础上,进一步纯化出其作用酶。结果表明烟草体内存在 PM-丙酮酸转氨酶,对 PM 和 PL 的相互转换发挥主导作用,同时也明确烟草的谷氨酸-草酰乙酸转氨酶在脱去辅酶后,能够催化 PM 和草酰乙酸或者 α -酮戊二酸之间的转氨反应^[48]。

3 展 望

植物合成的 VB₆ 对植物自身的生长发育和逆境适应,以及人和动物营养具有重要意义。植物 VB₆ 从头合成途径已经明确,研究积累也较丰富,而代谢转换尚未明了,还有许多不明之处。PN 葡萄糖苷(PN glucoside)是植物体内特有的 VB₆ 衍生物^[49],可能受 UDP-葡萄糖依赖性葡糖基转移酶(UDP-glucose-dependent glucosyltransferase)的作用由 PN 生成。植物体内水解 PLP、PMP 和 PNP 的磷酸酶、PM-丙酮酸转氨酶以及催化生成 PN 葡萄糖苷的葡糖基转移酶,都还需要在基因水平上加以明确。虽然从拟南芥鉴定出 PL 还原酶基因,但

T-DNA插入突变的研究结果显示该基因的表达产物不是唯一的作用酶^[37]。植物体内 PL 的还原和 PN 的形成还需要更加深入的研究。

同时,从植物检出 4-吡哆酸(4-pyridoxic acid)^[50],尽管其起源和去向还是未解之谜,但提出了 VB₆ 的异化问题。因为 4-吡哆酸在哺乳动物是排泄型 VB₆,在微生物是 VB₆ 降解途径的一个中间产物。至今从细菌发现两种 VB₆ 降解途径,PM-丙酮酸转氨酶是降解途径 I 的重要作用酶^[51]。从烟草分离出 PM-丙酮酸转氨酶,暗示植物体内可能存在 VB₆ 降解途径 I。对植物 VB₆ 降解的研究具有重要意义,是 VB₆ 代谢平衡机制的重要内容,还将为今后通过基因工程技术提高食源性植物的 VB₆ 含量提供靶标基因。

另外,植物的质体、线粒体和过氧化物酶体等都存在重要的 PLP 依赖酶,这些酶的活力受制于细胞器内 PLP 的平衡供给。PLP 不能通过质膜,并且 PLP 的 4'位醛基非常活泼,极易与伯胺和仲胺形成醛亚胺结构。PLP 与非 VB₆ 蛋白的非特异性结合将导致生理功能的紊乱。因此,植物 VB₆ 从头合成与代谢转换的调控机制也是亟待研究的重要科学问题。

参考文献:

- [1] RAVANEL S, DROUX M, DOUCE R. Methionine biosynthesis in higher plants. I. Purification and characterization of cystathionine gamma-synthase from spinach chloroplasts[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 316: 572—584.
- [2] ZHOU H, WANG HW, ZHU K, *et al.* The multiple roles of conserved arginine 286 of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase. Coenzyme binding, substrate binding, and beyond[J]. *Plant Physiol.*, 1999, 121: 913—919.
- [3] TAMUR K, NISHIURA H, MORI J, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding serine palmitoyl transferase in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, 28: 745—747.
- [4] THOMAZEAU K, CURIEN G, DUMAS R, *et al.* Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Protein Sci.*, 2001, 10: 638—648.
- [5] BREITINGER U, CLAUSEN T, EHLERT S, *et al.* The three dimensional structure of cystathionine beta-lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity [J]. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 631—642.
- [6] TAO Y, FERRER JL, LJUNG K, *et al.* Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants [J]. *Cell*, 2008, 133: 164—176.
- [7] VAVILIN DV, VERMAAS WF. Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria [J]. *Physiol. Plant*, 2002, 115: 9—24.
- [8] MOONEY S, HELLMANN H. Vitamin B₆: killing two birds with one stone? [J]. *Phytochem.*, 2010, 71: 495—501.
- [9] PREISS J, BALL K, HUTNEY J, *et al.* Regulatory mechanisms involved in the biosynthesis of starch [J]. *Pure Appl. Chem.*, 1991, 63: 535—544.
- [10] BILSKI P, LI MY, EHRENSHAFT M, *et al.* Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants [J]. *Photochem Photobiol.*, 2000, 71: 129—134.
- [11] PALMIERI L, AGRIMI G, RUNSWICK MJ, *et al.* Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate[J]. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 1 916—1 922.

- [12] SHI H, XIONG L, STEVENSON B, *et al.* The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B₆ in plant salt tolerance [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 575–588.
- [13] CHEN H, XIONG L. Pyridoxine is required for postembryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses [J]. *Plant J.*, 2005, 44: 396–408.
- [14] MITTENHUBER G. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B₆ (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways [J]. *J. Mol. Microb. Biotech.*, 2001, 3: 1–20.
- [15] EHRENSHAFT M, BILSKI P, LI MY, *et al.* A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B₆ biosynthesis [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 9 374–9 378.
- [16] EHRENSHAFT M, DAUB ME. Isolation of *PDX2*, a second novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria [J]. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 3 383–3 390.
- [17] FITZPATRICK TB, MOCCAND C, ROUX C. Vitamin B₆ biosynthesis: charting the mechanistic landscape [J]. *Chem. Biochem.*, 2010, 11: 1 185–1 193.
- [18] DENSLOW S, WALLS A, DAUB M. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B₆ vitamers during plant defense responses [J]. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 2005, 66: 244–255.
- [19] TAMBASCO-Studart M, TITIZ O, RASCHLE T, *et al.* Vitamin B₆ biosynthesis in higher plants [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102: 13 687–13 692.
- [20] TITIZ O, TAMBASCO-Studart M, WARZYCH E, *et al.* *PDX1* is essential for vitamin B₆ biosynthesis, development and stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant J.*, 2006, 48: 933–946.
- [21] WAGNER S, BERNHARDT A, LEUENDORF JE, *et al.* Analysis of the *Arabidopsis* *sr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the *PDX1* protein family in metabolism, development, and vitamin B₆ biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 1 722–1 735.
- [22] DENSLOW SA, RUESCHHOFF EE, DAUB ME. Regulation of the *Arabidopsis thaliana* vitamin B₆ biosynthesis genes by abiotic stress [J]. *Plant Physiol Biochem.*, 2007, 45: 152–161.
- [23] TAMBASCO-Studart M, TEWS I, AMRHEIN N, *et al.* Functional analysis of *PDX2* from *Arabidopsis*, a glutaminase involved in vitamin B₆ biosynthesis [J]. *Plant Physiol.*, 2007, 144: 915–925.
- [24] CHEN H, XIONG L. The short-rooted vitamin B₆-deficient mutant *pdx1* has impaired local auxin biosynthesis [J]. *Planta*, 2009, 229: 1 303–1 310.
- [25] HUANG SH, ZHANG JY, WANG LH, *et al.* Effect of abiotic stress on the abundance of different vitamin B₆ vitamers in tobacco plants [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, 66: 63–67.
- [26] HERRERO S, DAUB M. Genetic manipulation of vitamin B₆ biosynthesis in tobacco and fungi uncovers limitations to up-regulation of the pathway [J]. *Plant Sci.*, 2007, 172: 609–620.
- [27] RASCHKE M, BOYCHEVA S, CREVECOEUR M, *et al.* Enhanced levels of vitamin B₆ increase aerial organ size and positively affect stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant J.*, 2011, 66: 414–432.
- [28] YANG Y, ZHAO G, WINKLER ME. Identification of the *pdxK* gene that encodes pyridoxine (vitamin B₆) kinase in *Escherichia coli* K-12 [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, 141: 89–95.
- [29] YANG Y, TSUI HC, MAN TK, *et al.* Identification and function of the *pdxY* gene, which encodes a novel pyridoxal kinase involved in the salvage pathway of pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis in *Escherichia coli* K-12 [J]. *J. Bacteriol.*, 1998, 180: 1 814–1 821.
- [30] LUM HK, KWOK F, LO S. Cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* pyridoxal kinase [J]. *Planta*, 2002, 215: 870–879.
- [31] WANG H, LIU D, LIU C, *et al.* The pyridoxal kinase gene *tapdxxk* from wheat complements vitamin B₆ synthesis-defective *Escherichia coli* [J]. *J. Plant Physiol.*, 2004, 161: 1 053–1 060.
- [32] YU SW, LUO LJ. Expression analysis of a novel pyridoxal kinase messenger RNA splice variant, *PLK*, in oil rape suffering abiotic stress and phytohormones [J]. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2008, 40: 1 005–1 014.
- [33] GONZALEZ E, DANEHOWER D, DAUB ME. Vitamin levels, stress response, enzyme activity, and gene regulation of *Arabidopsis* lines mutant in the pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (*PDX3*) and the pyridoxal kinase (*SOS4*) genes involved in the vitamin B₆ salvage pathway [J]. *Plant Physiol.*, 2007, 145: 985–996.
- [34] RUESCHHOFF EE, GILLIKIN JW, SEDEROFF HW, *et al.* The *SOS4* pyridoxal kinase is required for maintenance of vitamin B₆-mediated processes in chloroplasts [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, 83: 281–291.
- [35] SANG Y, BARBOSA J M, WU H, *et al.* Identification of a pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 344–348.

- [36] SANG Y, Locy B, GOERTZEN, L R, *et al.* Expression, *in vivo* localization and phylogenetic analysis of a pyridoxine 5'-phosphate oxidase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2011, 49: 88—95.
- [37] MORITA T, TAKEGAWA K, YAGI T. Disruption of the *plr1t* gene encoding pyridoxal reductase of *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *J. Biochem.*, 2004, 135: 225—230.
- [38] HERREROS, GONZALEZE, GILLIKIN JW, *et al.* Identification and characterization of a pyridoxal reductase involved in the vitamin B₆ salvage pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76: 157—169.
- [39] HUANG SH, ZENG HB, ZHANG JY, *et al.* Interconversions of different vitamin B₆ forms in tobacco plants [J]. *Phytochem.*, 2011, 72: 2 124—2 129.
- [40] HUANG SH, ZHANG JY, TAO Z, *et al.* Enzymatic conversion from pyridoxal to pyridoxine caused by microorganisms within tobacco phyllosphere [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2014, 85: 9—13.
- [41] HUANG SH, ZENG HB, ZHANG JY, *et al.* Characterization of enzymes involved in the interconversions of different vitamin B₆ forms in tobacco plants [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2011, 49: 1 299—1 305.
- [42] FONDA ML. Purification and characterization of vitamin B₆-phosphate phosphatase from human erythrocytes [J]. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267: 15 978—15 983.
- [43] JANG YM, KIM DW, KANG TC, *et al.* Human pyridoxal phosphatase. Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution [J]. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 50 040—50 046.
- [44] HUANG S H, ZHANG J Y, MA YP, *et al.* Characterization of an acid phosphatase responsible for hydrolysis of pyridoxal 5'-phosphate in tobacco plants [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2012, 57: 114—119.
- [45] WADA H, SNELL EE. Enzymatic transamination of pyridoxamine; I. With oxaloacetate and α -ketoglutarate [J]. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237: 127—132.
- [46] YOSHIKANE Y, YOKOCHI N, OHNISHI K, *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of pyridoxamine-pyruvate transaminase [J]. *Biochem J.*, 2006, 396: 499—507.
- [47] TANI Y, UKITA M, OGATA K. Studies on vitamin B₆ metabolism in microorganisms; part X. Further purification and characterization of pyridoxamine 5'-phosphate- α -ketoglutarate transaminase from *Clostridium kaimantoi* [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1972, 36: 181—188.
- [48] HUANG SH, ZHANG JY, WU M, *et al.* Enzymatic transamination of pyridoxamine in tobacco plants [J]. *Plant Sci.*, 2013, 212: 55—59.
- [49] GREGORY JF, INK SL. Identification and quantification of pyridoxine- β -glucoside as a major form of vitamin B₆ in plant-derived foods [J]. *J. Agr. Food Chem.*, 1987, 35: 76—82.
- [50] SAMPSON DA, EOFF LA, YAN XL, *et al.* Analysis of free and glycosylated vitamin B₆ in wheat by high-performance liquid chromatography [J]. *Cereal Chemistry*, 1995, 72: 217—221.
- [51] GE F, YOKOSHI N, YOSHIKANE Y, *et al.* Gene identification and characterization of the pyridoxine degradative enzyme 4-pyridoxic acid dehydrogenase from the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* MAFF303099 [J]. *J. Biochem.*, 2008, 143: 603—609.

(编辑:裴阿卫)