

植物硫胺素的生物合成及功能

孙中兴, 魏德强, 杨梅, 蓝兴国*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 硫胺素是噻唑和嘧啶相连的二环化合物。在植物体内, 硫胺素主要以游离硫胺素、硫胺素单磷酸和硫胺素焦磷酸三种形式存在。在硫胺素的生物合成过程中, 嘧啶和噻唑部分分别合成, 最终偶联形成硫胺素焦磷酸形式。嘧啶合成酶(THIC)、噻唑合成酶(THI1)、硫胺素磷酸合成酶(TH1)和硫胺素焦磷酸激酶(TPK)是硫胺素合成途径中的关键酶, 调控植物体内硫胺素的合成。硫胺素在植物的生长发育、生物胁迫及非生物胁迫响应等方面具有重要的作用。

关键词: 硫胺素; 生物合成; 生长发育; 生物胁迫; 非生物胁迫

硫胺素(thiamine, TTP)也称维生素B1, 是生物体必需的一种维生素, 在柠檬酸循环、糖酵解和戊糖磷酸途径等代谢过程中起到辅酶的作用(Goyer 2010)。硫胺素在细菌、真菌和植物体内能够自身合成, 但在动物和人类体内不能合成。近些年来, 随着对硫胺素的研究深入, 发现硫胺素不仅参与植物的生长发育过程, 而且在植物生物和非生物胁迫响应等方面也有着重要的作用。

1 硫胺素的结构

在植物体内, 硫胺素主要以游离硫胺素、硫胺素单磷酸(thiamine monophosphate, TMP)和硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate, TPP)三种形式存在(图1)。其中, TPP作为主要活性物质起到辅酶的作用。在生理条件下, 硫胺素噻唑N3氮上具有正电荷的阳离子; 在酸性条件下, 硫胺素在嘧啶N1氮和噻唑N3氮上为正电荷; 在碱性条件下, 随着噻唑环的开放产生硫醇形式。

2 硫胺素生物合成途径

硫胺素的生物合成途径目前在模式植物拟南芥中研究较为详细, 主要由嘧啶和噻唑两部分组成, 最终偶联形成硫胺素焦磷酸形式(图2)。

嘧啶部分的生物合成是由5-氨基咪唑核糖核苷酸(5-aminoimidazole ribonucleotide, AIR)为底物, 在嘧啶合成酶(HET-P synthase, THIC)催化下合成4-氨基-2-甲基-5-羟甲基嘧啶单磷酸(4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine monophosphate, HMP-P) (Kong等2008)。这个过程需要S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)和还原性酰胺

NADH作为辅因子参与。HMP-P在硫胺素磷酸合成酶(thiamine phosphate synthase, TH1)的催化下形成4-氨基-2-甲基-5-羟甲基嘧啶焦磷酸(4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine diphosphate, HMP-PP) (Komeda等 1988)。

噻唑部分由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)和甘氨酸(glycine, Gly)作为底物, 经噻唑合成酶(HEP-T synthase, THI1)催化并借助硫供体形成腺苷噻唑(adenylated thiazole, ADT) (Machado等1996)。ADT在酶作用下形成4-氨基-2-甲基-5-羟甲基嘧啶磷酸(4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine phosphate, HET-P), 但对这个催化酶的认识尚不清楚。

硫胺素生物合成的两个前体HMP-PP和HET-P由TH1催化连接在一起形成TMP (Komeda等1988), 然后TMP磷酸酶(TMP phosphatase, TH2)将TMP去磷酸化成TTP (Mimura等2016)。而后TTP转运至细胞质溶胶, 细胞质中的硫胺素焦磷酸激酶(thiamine pyrophosphokinase, TPK)将其磷酸化成TPP。在TPK催化由游离硫胺素向TPP的转化过程中, 需要ATP以及Mg²⁺的协助(Ajjawi等2007; Martinis等2016)。TPP可作为细胞质、叶绿体和线粒体酶促反应的辅因子发挥其催化作用。

3 硫胺素合成途径中的关键酶

THIC、TH1、THI1和TPK是硫胺素合成中的

收稿 2018-10-08 修定 2018-11-06
资助 中央高校基本科研业务费专项基金(2572018BD01)和国家自然科学基金(31870300)。

* 通讯作者(lanxingguo@nefu.edu.cn)

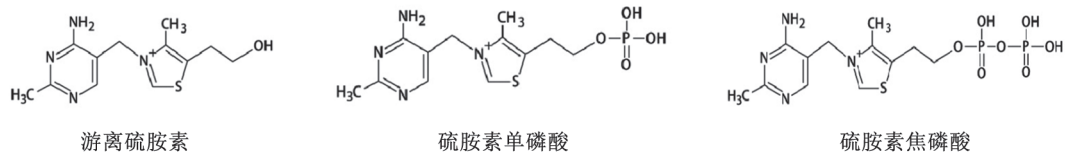


图1 硫胺素在植物体内存在的3种形式
Fig.1 Three structures of thiamine in plants

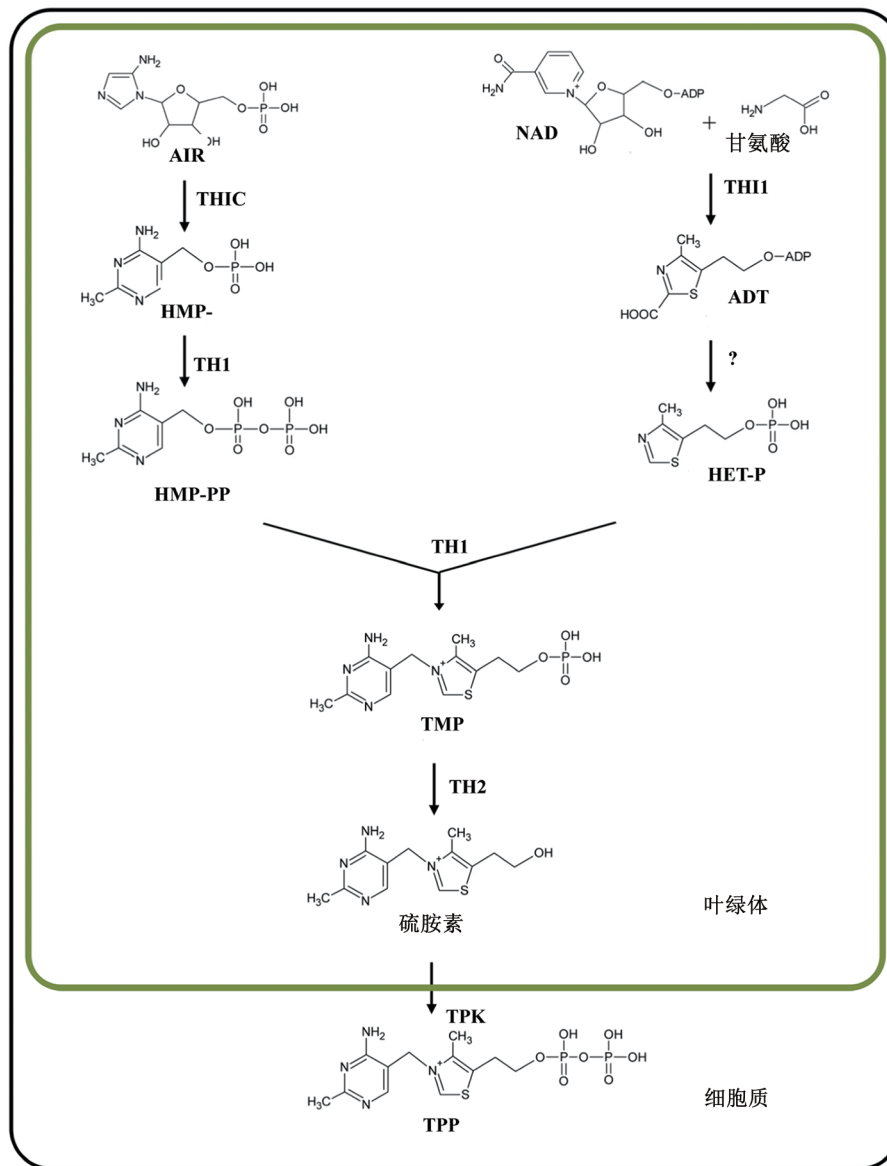


图2 植物硫胺素生物合成途径

Fig.2 Thiamine biosynthesis pathway in plants

ADT: adenylated thiazole, 腺苷化噻唑; AIR: 5-aminoimidazole ribonucleotide, 5-氨基咪唑核糖核苷酸; HEP-P: hydroxyethyl thiazole phosphate, 羟乙基噻唑磷酸; HMP-P: 4-amino-2-methyl-5-hydroxyl methyl pyrimidine monophosphate, 4-氨基-2-甲基-5-羟甲基嘧啶单磷酸; HMP-PP: 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethyl pyrimidine diphosphate, 4-氨基-2-甲基-5-羟甲基嘧啶焦磷酸; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; TH1: thiamine phosphate synthase, 硫胺素磷酸合成酶; TH2: TMP phosphatase, TMP磷酸酶; TH11: thiazole synthase, 噻唑合成酶; THIC: pyrimidine synthase, 嘧啶合成酶; TMP: thiamine monophosphate, 硫胺素单磷酸; TPK: thiamine pyrophosphate kinase, 硫胺素焦磷酸激酶; TPP: thiamine pyrophosphate, 硫胺素焦磷酸。根据Goyer (2017)的文献修改。

关键酶,对植物体内硫胺素的合成具有重要的调控作用。这些酶的突变体植株不能够正常生长发育,在幼苗期死亡,利用外源硫胺素可以帮助突变体植株恢复正常的生长发育(表1)。

3.1 THIC

THIC是嘧啶合成酶,涉及植物硫胺素嘧啶部分的合成过程。在拟南芥中,THIC由644个氨基酸组成,理论等电点为5.99,分子质量约为72 kDa。在蛋白结构上包含了[Fe-S]簇,该[Fe-S]簇起到了稳定THIC蛋白构象的作用(Raschke等2007)。THIC转录本主要存在于绿色组织中,在光合作用强的植物组织中更加丰富,在根、茎中几乎无法检测到。在植物受到外界的环境胁迫时,THIC的表达量增加(Wong等2006; Tunc-Ozdemir等2009)。蛋白质亚细胞定位研究发现,THIC位于叶绿体基质中(Raschke等2007; Kong等2008)。拟南芥*thiC*突变体幼苗叶片颜色苍白,幼苗期死亡,在培养基中补充硫胺素,可以恢复并维持幼苗正常生长(Kong等2008)。

3.2 THI1

THI1是噻唑合成酶,涉及植物硫胺素噻唑部分的合成过程。在拟南芥中,THI1由349个氨基酸组成,理论等电点为5.82,分子质量约为37 kDa (Machado等1996; Godoi等2006)。THI1是目前发现的涉及噻唑部分生物合成的唯一合成酶(Li等2016)。THI1主要表达在植物绿色组织中,根中含量较少(Nagae等2016)。在外界病原体侵染、氧化应激、盐、高温等胁迫下,THI1表达量上升(Wong等2006),而且THI1蛋白活性及含量均有所增加(Tunc-Ozdemir等2009)。THI1突变导致了植物发育异常,叶片白色,幼苗期死亡(Machado等1996; Nagae等2016)。在植物线粒体中也检测到了THI1的存在,其主要涉及DNA的损伤修复(Machado等1996)。

3.3 TH1

TH1是硫胺素磷酸合成酶,在植物硫胺素噻唑部分HMP-P磷酸化成HMP-PP以及噻唑和嘧啶的连接方面发挥重要的作用。在拟南芥中,TH1共由522个氨基酸组成,理论等电点为6.11,分子质量约为56 kDa。TH1的转录本在植物的根、茎、叶中均有检测到,而且在叶中的表达量最高(Kim等1998)。植物受到氧化应激胁迫时,TH1表达量增高,并且蛋白表达量也增高(Rapala-Kozik等2008; Tunc-Ozdemir等2009)。拟南芥*th1*突变体中,叶片白黄色,仅叶缘有少量毛状体,幼苗期死亡,补充硫胺素能够恢复正常。但补充HMP以及HEP时,突变体依然无法正常合成TMP (Ajjawi等2006)。这些研究表明,TH1对于其体内硫胺素的生物合成是必需的。

3.4 TPK

TPK是硫胺素焦磷酸激酶,将细胞质溶胶的TTP磷酸化成TPP。在拟南芥中发现有AtTPK1和AtTPK2 (Ajjawi等2007),这两个蛋白氨基酸序列一致性为93% (Ajjawi等2007)。AtTPK1由267个保守的氨基酸组成,理论等电点为5.31,分子质量约为30 kDa; AtTPK2由180个氨基酸组成,理论等电点为5.64,分子质量约为20 kDa。AtTPK1和AtTPK2在根、茎、叶中均有表达,但在叶中表达量较高。在氧化应激条件下,TPKs表达量增高(Tunc Ozdemir等2009)。单个TPK的拟南芥突变体与野生型表型没有变化,并且可以合成硫胺素;但在双突变植株体内,几乎不产生TPP,并在幼苗期死亡(Ajjawi等2007)。

4 硫胺素在植物体内的功能

4.1 硫胺素对植物生长发育的影响

TPP是硫胺素的活性形式,其作为辅酶参与糖

表1 拟南芥硫胺素缺陷型表型

Table 1 Thiamine-deficient phenotypes in *Arabidopsis thaliana*

基因名	拟南芥基因号	突变体表型	文献来源
THIC	AT2G29630	幼苗期死亡,叶片颜色苍白,有些位点突变表现对温度敏感,补充外源硫胺素恢复正常	Kong等2008
THI1	AT5G54770	叶片白色,补充外源硫胺素恢复正常	Machado等1996
TH1	AT1G22940	幼苗期死亡,叶片白黄色,仅叶缘有少量毛状体,补充外源硫胺素恢复正常	Komeda等1988
TPK1/2	AT1G02880/ AT2G44750	幼苗期死亡,体内TTP含量高于野生型,TPP含量比野生型低32倍,补充外源硫胺素恢复正常	Ajjawi等2007

酵解、三羧酸循环以及戊糖磷酸途径等代谢途径。硫胺素缺乏导致植物新陈代谢率减慢,淀粉、蔗糖以及氨基酸残基积累量增高,光合作用能力下降和呼吸作用减弱,无法正常合成叶绿素以及类胡萝卜素,植物叶片颜色褪绿(Bocobza等2013)。在拟南芥硫胺素合成的突变体中,植株生长缓慢并且在幼苗期死亡,可以通过补充外源硫胺素维持植物正常生长。在玉米(*Zea mays*)分生组织硫胺素缺陷型*blkl-R*突变体中,茎尖高度明显低于野生型,而且花序的形成和新生叶片的数量受到影响(Woodward等2010)。这些研究表明,硫胺素在植物的生长发育过程中具有重要的作用。

4.2 硫胺素参与生物胁迫响应

目前发现,硫胺素参与生物胁迫响应的机理依赖于水杨酸(salicylic acid, SA)信号途径(Ahn等2005; Boubakri等2016)。致病相关蛋白(pathogenesis-related protein, PR)通过SA触发植物的系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)。在对植物进行外源硫胺素预处理情况下,病源体侵染时,植物会快速且大量地积累PR相关mRNA,使植物抵抗病原体抗性的能力增强;而且还发现H₂O₂参与了硫胺素诱导植物防御体系的建立(Ahn等2007)。此外,硫胺素处理能够增强拟南芥对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的抗性、黄瓜(*Cucumis sativus*)对炭疽病和白粉病的抗性(Ahn等2005)以及水稻(*Oryza sativa*)对抗纹枯病的抗性(Bahuguna等2012)。此外,对棕榈树(*Trachycarpus fortunei*)幼苗接种内生真菌,可以提高根部硫胺素的含量(Kamarudin等2017)。这些研究表明,硫胺素在植物生物胁迫过程中具有重要的作用。

4.3 硫胺素参与植物非生物胁迫响应

在盐、渗透压以及氧化应激胁迫下,三种形式的硫胺素含量均升高(Rapala-Kozik等2012)。而且也发现硫胺素合成途径关键酶*TH11*、*TH1C*、*TH1*、*TPK*的mRNA转录水平均提高(Rapala-Kozik等2012)。百草枯诱导的氧化损伤导致拟南芥根部生长缓慢,但施加外源硫胺素后,拟南芥根部的硫胺素含量升高并且生长情况有所缓解(Tunc-Ozdemir等2009)。施加外源硫胺素于向日葵(*Helianthus annuus*)的根部,发现其相对含水量、叶绿素含量、可溶性糖含量升高,Na⁺、Ca²⁺和Cl⁻含量降低,K⁺

含量升高,可以缓解盐胁迫带来的诱导损伤(Sayed和Gadallah 2002)。此外,还发现植物对非生物胁迫诱导损伤的耐受度和硫胺素的含量呈正相关性(Rapala-Kozik等2008; Guan等2014)。这些研究说明,植物通过积累硫胺素提高对非生物胁迫响应的能力。

5 总结和展望

目前,人们通过硫氨酸生物合成途径关键酶等方面的研究,在农作物硫胺素生物强化(biofortification)上也取得了一定的进展(Goyer 2017; Minhas等2018; Strobbe和Van Der Straeten 2018)。通过提高食物中硫胺素的含量,为解决硫胺素匮乏等问题提供了新的思路,但目前对硫氨酸生物合成及功能方面的研究还存在一些问题:(1)目前对于噻唑和嘧啶合成途径中相关酶的生化功能方面的研究较少,需要进一步阐释;(2)硫胺素的合成主要存在于植物的绿色组织中,然而在植物生长过程中任何部位都需要硫胺素参与,对于硫胺素在植物体内的定位和运输途径需要进一步探索;(3)硫胺素参与植物代谢调控的分子机制仍不清楚;(4)硫胺素在植物生长发育方面的功能研究需要进一步拓展。只有详细地解析硫胺素合成及其生物学功能方面的问题,人们才能够更有效地提高农作物中硫胺素的含量。随着基因组编辑技术(如CRISPR-Cas9系统)及系统生物学等相关技术的发展,可以期待该方面在未来会有更大的突破。

参考文献(References)

- Ahn IP, Kim S, Lee YH (2005). Vitamin B₁ functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol*, 138 (3): 1505–1515
- Ahn IP, Kim S, Lee YH, et al (2007). Vitamin B₁-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the *NPR1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143 (2): 838–848
- Ajjawi I, Rodriguez MA, Cushman J, et al (2007). Thiamin pyrophosphokinase is required for thiamin cofactor activation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 65 (1–2): 151–162
- Ajjawi I, Tsegaye Y, Shintani D (2006). Determination of the genetic, molecular, and biochemical basis of the *Arabidopsis thaliana* thiamin auxotroph *th1*. *Arch Biochem Biophys*, 459 (1): 107–114
- Bahuguna RN, Joshi R, Shukla A, et al (2012). Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in

- rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol Bioch*, 57: 159–167
- Bocobza SE, Malitsky S, Araújo WL, et al (2013). Orchestration of thiamin biosynthesis and central metabolism by combined action of the thiamin pyrophosphate riboswitch and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 288–307
- Boubakri H, Gargouri M, Mliki A, et al (2016). Vitamins for enhancing plant resistance. *Planta*, 244 (3): 529–543
- Godoi PHC, Galhardo RS, Luche DD, et al (2006). Structure of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 281 (41): 30957–30966
- Goyer A (2010). Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 71 (15): 1615–1624
- Goyer A (2017). Thiamin biofortification of crops. *Curr Opin Biotech*, 44: 1–7
- Guan JC, Hasnain G, Garrett TJ, et al (2014). Divisions of labor in the thiamin biosynthetic pathway among organs of maize. *Front Plant Sci*, 5: 370
- Kamarudin AN, Lai KS, Lamasudin DU, et al (2017). Enhancement of thiamine biosynthesis in oil palm seedlings by colonization of endophytic fungus *Hendersonia toruloides*. *Front Plant Sci*. 8: 1799
- Kim YS, Nosaka K, Downs DM, et al (1998). A *Brassica* cDNA clone encoding a bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase involved in thiamin biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 37 (6): 955–966
- Komeda Y, Tanaka M, Nishimune T (1988). A *th-1* mutant of *Arabidopsis thaliana* is defective for a thiamin-phosphate-synthesizing enzyme: thiamin phosphate pyrophosphorylase. *Plant Physiol*, 88 (2): 248–250
- Kong D, Zhu Y, Wu H, et al (2008). *AtTHIC*, a gene involved in thiamine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res*, 18 (5): 566–576
- Li CL, Wang M, Wu XM, et al (2016). THI1, a thiamine thiazole synthase, interacts with Ca²⁺-dependent protein kinase CPK33 and modulates the S-type anion channels and stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 170 (2): 1090–1104
- Machado CR, de Oliveira RLC, Boiteux S, et al (1996). *THI1*, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Mol Biol*, 31 (3): 585–593
- Martinis J, Gas-Pascual E, Szydłowski N, et al (2016). Long distance transport of thiamine (vitamin B₁) is concomitant with that of polyamines. *Plant Physiol*, 171: 542–553
- Mimura M, Zallot R, Niehaus TD, et al (2016). *Arabidopsis TH2* encodes the orphan enzyme thiamin monophosphate phosphatase. *Plant Cell*, 28 (10): 2683–2696
- Minhas AP, Tuli R, Puri S (2018). Pathway editing targets for thiamine biofortification in rice grains. *Front Plant Sci*, 9: 975
- Nagae M, Parniske M, Kawaguchi M, et al (2016). The thiamine biosynthesis gene *THI1* promotes nodule growth and seed maturation. *Plant Physiol*, 172 (3): 2033–2043
- Rapala-Kozik M, Kowalska E, Ostrowska K (2008). Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *J Exp Bot*, 59 (15): 4133–4143
- Rapala-Kozik M, Wolak N, Kujda M, et al (2012). The up-regulation of thiamine (vitamin B₁) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC Plant Biol*, 12: 2
- Raschke M, Bürkle L, Müller N, et al (2007). Vitamin B1 biosynthesis in plants requires the essential iron-sulfur cluster protein, THIC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (49): 19637–19642
- Sayed SA, Gadallah MAA (2002). Effects of shoot and root application of thiamin on salt-stressed sunflower plants. *Plant Growth Regul*, 36 (1): 71–80
- Strobbe S, Van Der Straeten D (2018). Toward eradication of B-vitamin deficiencies: considerations for crop biofortification. *Front Plant Sci*, 9: 443
- Tunc-Ozdemir M, Miller G, Song L, et al (2009). Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 151: 421–432
- Wong CE, Li Y, Labbe A (2006). Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *Thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140 (4): 1437–1450
- Woodward JB, Abeydeera ND, Paul D, et al (2010). A maize thiamine auxotroph is defective in shoot meristem maintenance. *Plant Cell*, 22 (10): 3305–3317

Biosynthesis and function of thiamine in plants

SUN Zhong-Xing, WEI De-Qiang, YANG Mei, LAN Xing-Guo*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Thiamine is a bicyclic compound linked by thiazole and pyrimidine. In plants, thiamine exists in the forms of free thiamine, thiamine monophosphate (TMP) and thiamine pyrophosphate (TPP). Thiamine is synthesized from pyrimidine and thiazole, and finally coupled to form thiamine pyrophosphate. THIC, THI1, TH1 and TPK are key enzymes in the thiamine synthesis pathway, and their activities have significant effects on the synthesis of thiamine. Thiamine plays important roles in plant growth and development, and biotic and abiotic stresses.

Key words: thiamine; biosynthesis; growth and development; biotic stress; abiotic stress

Received 2018-10-08 Accepted 2018-11-06

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572018BD01), and the National Natural Science Foundation of China (31870300).

*Corresponding author (lanxingguo@nefu.edu.cn).