

丙酮酸磷酸双激酶及其基因结构

贾永光, 张立军*, 刘淳, 宋超, 崔震海, 朱延姝

沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161

Pyruvate Orthophosphate Dikinases and Their Gene Structure

JIA Yong-Guang, ZHANG Li-Jun*, LIU Chun, SONG Chao, CUI Zhen-Hai, ZHU Yan-Shu

Biological Science & Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

摘要: 丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)在植物C₄光合途径中催化CO₂原初受体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的形成。本文介绍PPDK的类型、分布、生理功能、活性调节、基因结构和C₄植物的PPDK基因转化C₃植物及其与转基因植株光合作用之间关系的研究进展。

关键词: 丙酮酸磷酸双激酶; 基因结构; 进化分析; 转基因

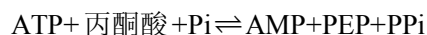
人们根据光合作用碳同化途径的不同,把高等植物分成3类:(1) C₃植物,这类植物的最初光合产物是三碳化合物3-磷酸甘油酸(3-phosphoglyceric acid, PGA),如水稻、小麦、棉花、大豆等大多数植物;(2) C₄植物,这类植物以四碳化合物草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)为最初产物,如甘蔗、玉米、高粱、稗草等;(3) CAM植物,CO₂同化途径与C₄植物类似,最初产物也是四碳化合物OAA,只是夜间吸收CO₂合成四碳化合物,白天利用四碳化合物释放的CO₂进行光合作用,如仙人掌、菠萝等。与C₃植物相比,C₄植物在高温、强光、干旱和低CO₂条件下,具有更高的光合效率、水分利用效率和氮素利用效率。C₄植物叶片中之所以存在C₄光合途径与其特有的叶片解剖结构(Brown和Hattersley 1989)和叶绿体分工(Voznesenskaya等2002)及其存在相应的高活性磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC; EC 4.1.1.31)、丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate orthophosphate dikinase, PPDK; EC 2.7.9.1)、苹果酸脱氢酶(NADP-malate dehydrogenase)和苹果酸酶(NADP-malic enzyme, NADP-ME)等有关。然而,研究发现在一些C₃植物中,也存在C₄光合途径的关键酶,也有一定的C₄循环存在,但其对光合作用的贡献很小。因此,当前作物育种领域的研究热点之一是采用转基因技术将C₄途径关键酶基因导入C₃植物中,以期在C₃植物叶片中建立或增强C₄循环。

PPDK是NADP-ME型植物C₄光合途径的关键酶之一,催化丙酮酸(pyruvate, Pyr)转化成CO₂的原初受体磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate,

PEP)。因此,将PPDK基因转入C₃作物并获得高效表达是改造C₃植物光合作用的重要环节,然而目前其转基因植株的光合作用表现并未达到预期目的(罗遵喜等2008)。因此需要对PPDK的分布、类型、催化机制及调节特点进行总结和分析,以期为基因工程改造C₃植物光合碳同化途径的研究提供参考。

1 植物中PPDK的分布、类型和生理功能

Hatch与Slack(1968)分别从甘蔗(*Saccharum officinarum*)、玉米(*Zea mays*)及高粱(*Sorghum vulgare*)叶片中分离出PPDK,通过放射性³²P标记证明PPDK催化的反应是:



Aoyagi和Nakamoto(1985)对小麦和玉米叶肉细胞(mesophyll cell, MC)及维管束鞘细胞(bundle sheath cell, BSC)的可溶性蛋白进行蛋白印迹(protein blot)分析时发现,玉米BSC中的PPDK含量约为MC中的十分之一,然而却是小麦叶片中的8倍。Aoyagi和Bassham(1984)用玉米PPDK特异性抗体分别检测来自小麦和玉米的mRNA体外翻译产物,发现二者均含有大小不同的两种PPDK蛋白,同时还发现PPDK蛋白既存在于胞质中,也存在于叶绿体中。

收稿 2008-12-11 修定 2009-02-19

资助 辽宁省科技厅攻关项目(2008208001)、辽宁省教育厅高校科研计划项目(2008S211)、沈阳市科技局科学研究计划项目(1081191-3-00)、沈阳农业大学青年基金(2007)。

* 通讯作者(E-mail: lijunzhang8@yahoo.com.cn; Tel: 024-88487163)。

分子量较大蛋白的N末端含有导肽, 进入叶绿体参与光合作用; 分子量较小蛋白的N末端不含有导肽, 存在于胞质中(Glackin 和 Grula 1990)。所以, 根据PPDK大小及其细胞内存在的位置, C₄植物和C₃植物的PPDK均可分为两大类: 存在于叶绿体中的C₄型丙酮酸磷酸双激酶(C₄PPDK)和胞质型丙酮酸磷酸双激酶(cyPPDK)。

在NADP-ME型的C₄植物中, PPDK催化丙酮酸生成PEP的反应在叶肉细胞叶绿体基质中完成。尽管PPDK催化的是可逆反应, 但受基质中高活性的焦磷酸酶和基质本身pH值等生理生化条件的影响, 以致该反应始终保持向生成PEP的方向进行。在叶肉细胞中, 叶绿体基质中生成的PEP被转运到胞质中与HCO₃⁻反应生成OAA, 再转回到叶绿体中, 被还原成苹果酸(Mal)。Mal被转运到维管束鞘细胞的叶绿体中, 氧化脱羧释放CO₂, 同时产生还原力和丙酮酸, 然后丙酮酸再转回到叶肉细胞的叶绿体中被PPDK催化生成PEP, 完成一个C₄循环。在NAD-ME型的C₄植物中, PEP羧化生成的OAA转变为天冬氨酸(Asp), 进入维管束鞘细胞的线粒体释放CO₂并产生丙酮酸, 在维管束鞘细胞的胞质中, 丙酮酸转变成丙氨酸(Ala)后转运回叶肉细胞叶绿体, 通过转氨作用生成丙酮酸后再由PPDK催化生成PEP。尽管在C₃植物中也存在PPDK, 但其含量较C₄型植物低很多, 以致它对C₃植物光合作用贡献很小。

PPDK不仅在C₄光合途径中起关键作用, 其催化产物PEP及后产物OAA、Mal等有机酸还是体内许多生化反应的前体物质。Aoyagi 和 Bassham (1984)采用放射性¹⁴C标记证明, PPDK催化丙酮酸产生的PEP为柠檬酸(citrate)、谷氨酸(Glu)的合成提供碳骨架。PEP还可能为Ala转变成其它四碳或五碳的氨基酸提供碳骨架。Kang等(2005)将T-DNA插入水稻PPDK基因的第五个内含子, 发现突变株的籽粒质量比野生型轻6%。他们进一步研究发现PPDK的mRNA主要定位于正在发育种籽粒的胚乳、糊粉粒及盾片中。因此, Kang等认为cyPPDK可能对灌浆期间的水稻种子物质代谢起调节作用。

另外, 植物一些重要的生理过程也受PPDK的催化次级产物的调节。Mal可以通过参与保卫细胞的水势调节来控制气孔开闭。Moons等(1998)

将水稻幼苗进行逐步干旱、低温、低浓度氧、高浓度盐以及甘露醇等胁迫处理后发现, 水稻绿色叶片中并没有cyPPDK的积累, 但根部和幼苗浸水部位的PPDK转录产物有一定程度的增加。在低氧情况下, 幼苗浸水部位PPDK活性提高40%左右, 这表明cyPPDK可能与植物在缺水及低氧逆境条件下的代谢反应有关。

2 PPDK的结构、催化机制和活性调节

2.1 PPDK蛋白的结构 成熟的PPDK均由4个相同的亚基组成(Sugiyama 1973)。C₄PPDK和cyPPDK的亚基均由胞质中的核糖体合成(Hague等1983)。Agarie等(1997)对陆生大莎草(*Eleocharis vivipara*) C₄PPDK和cyPPDK基因的开放阅读框架的研究表明: C₄PPDK亚基前体包含约947个氨基酸, 分子量约为103.4 kDa; cyPPDK亚基前体包含约884个氨基酸, 分子量约为95.9 kDa。在C₄PPDK亚基的N末端, 含有约69个氨基酸的导肽序列, 当该亚基进入叶绿体后, 导肽被切除, 此时的C₄PPDK亚基与cyPPDK亚基大小相近。玉米和小麦种子中的PPDK亚基大小均为94 kDa; 而两者叶片中的PPDK亚基大小为110 kDa, 其中包含进入叶绿体的16 kDa导肽(Aoyagi 和 Bassham 1986), 去掉导肽后, 叶片中的PPDK亚基与种子中的PPDK亚基分子量相近。

无论是C₃植物还是C₄植物, PPDK亚基的氨基酸序列都很相似。Rosche等(1994)研究发现, C₄植物 *Flaveria trinervia* 和 C₃植物 *Flaveria pringlei* 的成熟PPDK亚基的氨基酸序列相似性高达96%, 其导肽的氨基酸序列相似性也接近75%。C₃植物水稻至少含有2个PPDK基因, 其中一个基因推测的成熟编码产物与玉米的C₄PPDK成熟亚基的氨基酸序列同源性高达88%, 从C₃植物水稻中提取PPDK的全长cDNA, 叶绿体导肽的氨基酸序列同源性也达56% (Imaizumi等1997)。

2.2 PPDK的催化机制 迄今为止, 关于PPDK催化机制的证据主要来自微生物中PPDK蛋白的研究。Nakanishi等(2005)通过对玉米PPDK蛋白二聚体与PEP的配位反应证实: 植物的PPDK结构特点与微生物PPDK相同, 两者均需形成四聚体才有活性, 且两者都用含有组氨酸(His)残基的高度保守区域催化磷酸基转移。PPDK酶蛋白的结构可分为3个功能域: N末端ATP结合结构域、中央磷酸基转移结

构域和 C 末端 Pyr/PEP 结合结构域(Herzberg 等 1996; Tjaden 等 2006; Lin 等 2006)。PPDK 催化 PEP 生成的过程用旋转结构域机制解释(swiveling-domain mechanism) (Herzberg 等 1996)。具体过程如图 1 所示: ① ATP (AMP-P_βP_γ)与 PPDK 的 ATP 结构域结合, 其 P_βP_γ基团转移到酶分子中央结构域的

组氨酸残基(His)上形成 Enz-His-P_βP_γ, 同时生成 AMP, Enz-P_βP_γ的 P_γ基团再与游离磷酸 Pi 反应生成焦磷酸 P_γPi, 酶自身转变为 Enz-His-P_β; ②中央结构域旋转至 Pyr/PEP 结构域; ③中央结构域将所携带的磷酸基团转移给 Pyr/PEP 结构域结合的丙酮酸 (Pyr), 生成 PEP。

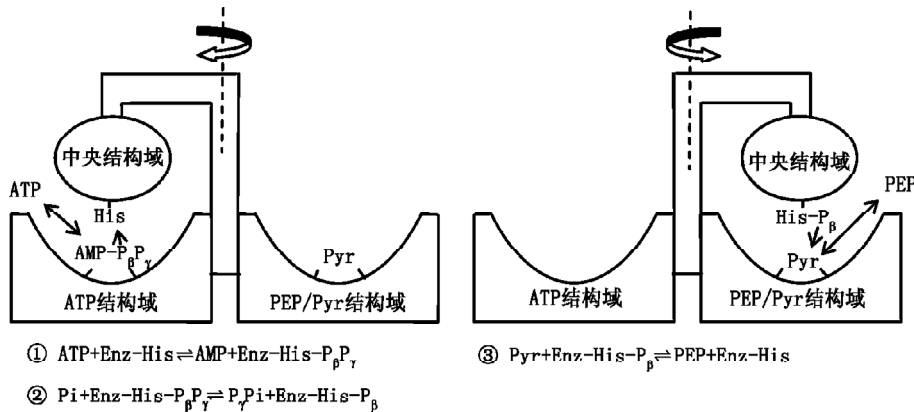


图1 PPDK 催化 PEP 生成反应示意图
根据文献(Herzberg 等 1996)改画。

2.3 PPDK 活性调节 在有游离 Mg^{2+} 存在的条件下, PPDK 四聚体才会具有活性。PPDK 活性受到氮素营养的调节, 以 KNO_3 为主要氮源的完全营养液离体培养玉米时, 成熟玉米叶中 PPDK 活性随氮浓度增加而增加(罗廉源和林植芳 1992)。在 C_4 植物中, PPDK 活性严格受光调节, 而这种调节是通过一种双功能调节蛋白(regulatory protein, RP)进行的。RP 可催化 PPDK 活性部位的苏氨酸(Thr)进行去磷酸化/磷酸化反应, 从而使 PPDK 具有活性或失去活性(Burnell 和 Hatch 1985)。RP 与一般的调节蛋白不同, 它有 3 个显著特点: 一是该蛋白集活化酶和去磷酸化酶于一身, 是双功能的, 而大多数调节酶或是活化酶或是去磷酸化酶, 两者是分开的(Smith 和 Walker 1996); 二是 RP 催化底物磷酸化时不以 ATP 作为辅因子, 而是用 ADP 提供的磷酸基团进行底物的磷酸化; 三是 RP 在催化底物去磷酸化时, 依赖无机磷酸, 生成焦磷酸, 这与大多数蛋白磷酸酶通过水解去磷酸化的机制不同(Ashton 等 1984)。在光照条件下, 胞质环境中的 ADP 浓度降低, RP 调节 PPDK 处于去磷酸化的有活性状态; 反之, 在黑暗条件下, 胞质环境中的 ADP 浓度增加, RP 对 PPDK 进行磷酸化而使其失去活性。

PPDK 对低温敏感。当温度低于 $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, PPDK 会由四聚体分裂成二聚体或单体而失去活性(Sugiyama 1973; Shirahashi 等 1978)。为了提高 PPDK 在冷胁迫下的稳定性, Ohta 等(2004)用农杆菌介导的转化系统, 将从一种黄菊属植物 *Flaveria brownii* 中分离到的耐冷型 PPDK cDNA 转入玉米, 并获得高表达植株, 该转基因玉米 PPDK 失活的临界温度较野生型降低 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

3 PPDK 基因结构与蛋白进化分析

3.1 PPDK 基因基本结构 在 C_4 植物玉米中有 2 个 PPDK 基因位点, 包含 3 个 PPDK 基因, 即 1 个 C_4 型 PPDK 基因(*C₄pdkZm*)和 2 个胞质型 PPDK 基因(*cypdkZm1* 和 *cypdkZm2*)。 *C₄pdkZm* 和 *cypdkZm1* 位于同一基因位点上, 属于双启动子系统, 而 *cypdkZm2* 位于另一位点上。 *cypdkZm1* 与 *cypdkZm2* 高度同源, 但两者启动子调节序列略有不同, *cypdkZm1* 富含 AT, 而 *cypdkZm2* 富含 AG (Sheen 1991)。 *C₄pdkZm* 全长为 12 kb, 含有 19 个外显子和 18 个内含子。单个外显子长度在 58~403 bp 之间, 而内含子长度在 78 bp~5.9 kb, 其第一个内含子长度达 5.9 kb, 含有 *cypdkZm1* 的启动子和转录起始位点(Matsuoka 1995)。双子叶 C_4 植物 *F. trinervia* 中,

仅存在一个 *PPDK* 基因位点, 包含 2 个基因 (*C₄PPDK* 和 *cyPPDK*), *F. trinervia* 的 *C₄PPDK* 全长为 13 kb, 较玉米多 2 个外显子和 2 个内含子 (Rosche 和 Westhoff 1995)。单子叶 *C₃* 水稻至少存在 2 个 *PPDK* 基因 (*C₄PPDK* 和 *cyPPDK*), 水稻的 *C₄PPDK* 和 *cyPPDK* 基因位于同一基因位点上, 也属于双启动子系统, 且水稻与玉米 *C₄PPDK* 蛋白同源性很高 (88%); 但水稻与 *F. trinervia* 的 *C₄PPDK* 基因结构相似, 也含有 21 个外显子和 20 个内含子, 而且比玉米多出的 2 个外显子所处的位置也相同 (Imaizumi 等 1997)。这表明这两个内含子在单子叶和双子叶植物分化前就已经存在于祖先基因中。

C₄ 植物中, *C₄PPDK* 基因主要在绿色叶片的叶肉细胞中表达, 而在叶的其他细胞或其他组织中表达量较低 (Matsuoka 1995)。*C₄PPDK* 基因在叶片中特异性的受光诱导表达。在玉米中, *PPD-1* 蛋白是 *C₄PPDK* 光诱导表达所必需的, 这个蛋白可与 *C₄pdkZm* 启动子 -316~-289 的序列特异性结合 (Matsuoka 和 Numazawa 1991)。玉米的 *C₄pdkZm* 基因启动子分为 2 个区段: 区段 1 位于 -327~-1 处, 除含有 *PPD-1* 结合位点外, 还包含一个与 *SV40* 的蛋白 *Sp1* 特异结合的位点, 并且其 3' 端存在 3 个连

续的 *SV40* 的增强子序列; 区段 2 在 -620~-328 之间, 含有 *PPD-2* 蛋白结合位点, 由于这个区段距基因的转录起始位点较远, 是否参与基因表达调控尚不明确 (Matsuoka 和 Numazawa 1991)。

cyPPDK 基因一般在 *C₃* 和 *C₄* 植物的非光合组织中表达。Aoyagi 和 Bassham (1984) 在玉米种子和多种 *C₃* 植物中检测到 *cyPPDK*。Imaizumi 等 (1997) 发现非胁迫条件下水稻的根、茎、叶等各种器官以及发育中的种子中都存在 *cyPPDK* 基因的表达产物。Glackin 和 Grula (1990) 在玉米根和黄化叶片中也发现了 *cyPPDK*。Maddaloni 等 (1996) 证明玉米胚乳的 *cypdkZm1* 基因的表达受 *Opaque2* 蛋白 (*O2*) 的调控。*O2* 是碱性 / 赖氨酸拉链类转录调控因子, 在玉米胚乳发育过程中, *O2* 还调控 α -zein 贮藏蛋白基因和 *b32* 蛋白基因的表达。Maddaloni 等 (1996) 通过 DNA 酶 I 步移分析发现在 *cypdkZm1* 启动子存在一段与 *O2* 特异性结合的序列。与野生型相比, *O2* 蛋白基因缺失时玉米胚乳中 *cyPPDK1* 及其 mRNA 的含量明显下降, 因此认为 *O2* 可能对胚乳发育过程中 *cyPPDK1* 的表达起调节作用。

3.2 *PPDK* 的进化分析 通过软件 Clustalx 和 MEGA 对表 1 中 13 个 *C₄PPDK* 基因编码的氨基酸序列进行

表 1 部分高等植物的 *PPDK* 基因

植物属名	植物种名及类型	基因		编码蛋白长度 /aa	GenBank 登录号
		类型	长度 /bp		
黄花菊属 (<i>Flaveria</i>)	<i>F. trinervia</i> , <i>C₄</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 105	953	X57141
		基因组 DNA	14 645	907	X79095
	<i>F. pringlei</i> , <i>C₃</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 195	956	X75516
	<i>F. bidentis</i> , <i>C₄</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 005	953	U08400
	<i>F. brownii</i> , <i>C₃-C₄</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 161	955	U08399
玉米属 (<i>Zea</i>)	<i>Z. mays</i> , <i>C₄</i>	基因组 DNA	10 806	955	X79192
		<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 171	947	J03901
日中花属 (<i>Mesembryanthemum</i>)	<i>M. crystallinum</i> , CAM	基因组 DNA	5 519	947	M58656
		<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 165	949	X82489
稗草属 (<i>Echinochloa</i>)	<i>E. vivipara</i> , <i>C₄</i>	基因组 DNA	12 248	949	X78347
		<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 144	947	D86337
水稻属 (<i>Oryza</i>)	<i>O. sativa</i> , <i>C₃</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	2 838	945	AY792619
		<i>CyPPDK</i> mRNA	3 073	887	OSA004965
甘蔗属 (<i>Saccharum</i>)	<i>S. officinarum</i> , <i>C₄</i>	<i>CyPPDK</i> mRNA	3 073	887	AJ004965
		<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 331	947	D87745
		<i>CyPPDK</i> mRNA	3 058	887	XM_468806
高粱属 (<i>Sorghum</i>)	<i>S. bicolor</i> , <i>C₄</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 172	947	AF194026
芒属 (<i>Miscanthus</i>)	<i>M. × giganteus</i> , <i>C₄</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 131	948	AY268138
拟南芥属 (<i>Arabidopsis</i>)	<i>A. thaliana</i> , <i>C₃</i>	<i>C₄PPDK</i> mRNA	3 314	947	AY262272
			2 990	956	NM_179060

系统进化分析的PPDK进化树(图2)表明,玉米、水稻和稗草等禾本科植物之间PPDK蛋白的同源性较高,与黄花菊属、拟南芥属及日中花属的PPDK蛋白同源性较远。即同科属间不同PPDK类型差异较小,而同类型PPDK在不同科属间的差异较大。水稻C₄PPDK与玉米C₄PPDK的氨基酸同源性为88%,与*F. trinervia*和*F. brownii*的同源性为79%,

与冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)的同源性为80%。Matsuoka (1995)认为玉米和水稻的C₄PPDK基因是从禾本科C₃和C₄植物分化前就已经存在的一个祖先基因进化来的。从进化的角度看,采用转C₄植物PPDK基因的方式改造C₃植物光合碳同化途径具有可行性。

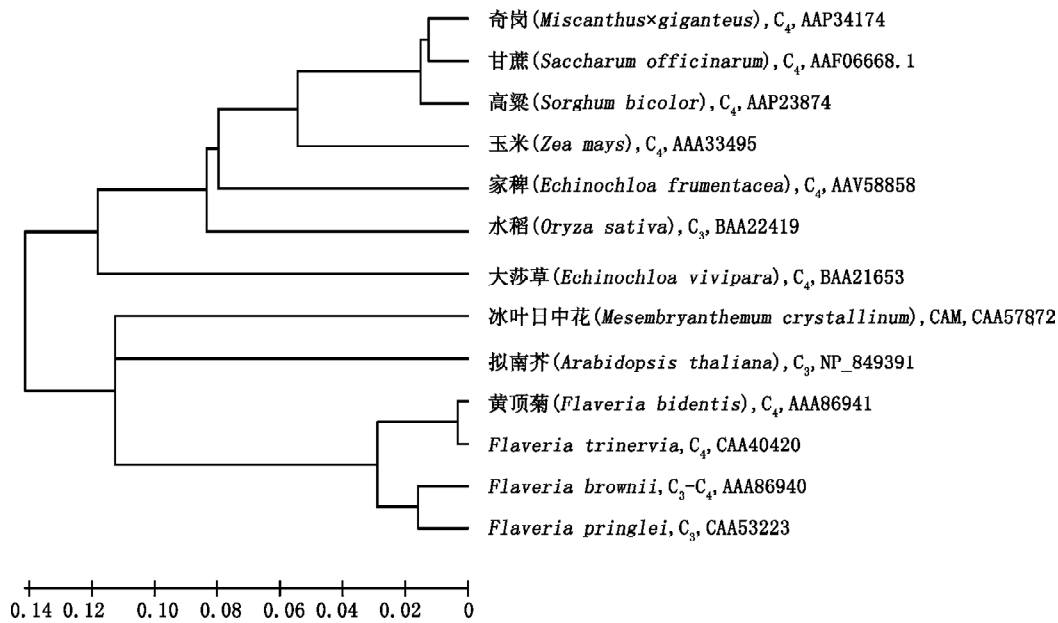


图2 部分高等植物PPDK蛋白的进化关系

4 转PPDK基因的C₃植物

到目前为止,在烟草、马铃薯、拟南芥和水稻等C₃植物中已经成功实现PPDK的过量表达。Ishimaru等(1997)将RbcS启动子和CaMV35S启动子共同控制的玉米PPDK基因转入拟南芥中,获得PPDK活性为非转基因植株4倍的转基因植株,且能在叶绿体中稳定表达。将玉米的PPDK基因转入马铃薯中,获得的转基因植株PPDK活性提高5倍(Ishimaru等1998)。Sheriff等(1998)将兼性CAM植物冰叶日中花的质体PPDK基因导入烟草,其叶片和种子中PPDK含量均得到提高。Ku等(1999)将玉米PPDK基因转入水稻,转基因植株的PPDK活性提高20倍,达到玉米的40.3%。

将C₄植物高活性PPDK基因单独转入C₃植物后,转基因植株的碳代谢和其它代谢有所改变,但对光合速率和产量的影响报道不一。Ishimaru等(1997)发现,在转基因拟南芥植株中,PPDK活性的

提高并不影响Rubisco、PEPC、NADP-ME的酶活性。在转基因马铃薯叶中PEP含量略有升高, Mal有较大升高,同时 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著增大,表明PEPC参与CO₂的初始固定,也表明PPDK活性的提高可以导致转基因植株部分运转C₄型光合碳同化代谢(Ishimaru等1998)。Sheriff等(1998)将来自兼性CAM植物冰叶日中花的质体型PPDK基因转入烟草中表达,转基因植株单个蒴果的种子数量和种子总重量都高于野生型。Zhang等(2007)将玉米PPDK基因导入籼稻品种‘IR64’后,将获得的转基因植株栽培于温室中,其剑叶全氮含量高于非转基因植株,且产量也有提高。一些转PPDK基因植物,如拟南芥(Ishimaru等1997)、烟草(Ishimaru等1998)和水稻(Wang和Li 2008)中,光合CO₂交换没有变化。Sheriff等(1998)采用除去PPDK基因转运肽序列的方法使其在细胞质中表达,转基因植株产生的种子比野生型少,高表达的转基因植株几乎

不产生种子,所有转基因植株的种子和叶片中游离氨基酸的组成与野生型不同,但根中游离氨基酸没有变化。Ku等(1999)的研究表明过表达玉米PPDK可提高转基因水稻叶中含氮量,但Rubisco和叶绿素含量下降,CO₂同化速率也下降,而CO₂补偿点没有变化;乳熟期的种子中PPDK过表达对糙米中的氮含量和C/N没有影响。在转C₄PPDK基因的马铃薯叶中丙酮酸几乎被耗尽(Ishimaru等1998),Wang和Li(2008)研究表明转基因的水稻在强光下的光抑制作用增强。

虽然C₄PPDK基因转入C₃植物能够过表达,并引起转基因植株碳代谢途径的变化(Ishimaru等1998),但在多数情况下对光合速率影响不大,没有达到增大C₃植物光合作用的预期目的。这可能与C₃植物叶肉细胞中缺少C₄途径其它高活性关键酶与之匹配,或C₃叶肉细胞的内环境不同于C₄植物有关,使转入的C₄PPDK难以发挥作用。同时,单一高活性表达C₄PPDK基因甚至会引起细胞的代谢紊乱(Ishimaru等1998; Wang和Li2008)。Ku等(2001)将玉米PPDK的基因与C₄途径的另一关键酶PEPC在各自启动子的控制下同时转入水稻,水稻的光合能力提高35%,稻谷产量增加22%。张边江等(2008)报道对转PEPC+PPDK+ME3个基因的水稻植株喷施NaHSO₃后,其光合速率达到玉米的82%。因此认为,在改造C₃植物光合碳循环时,需要对多个关键环节进行改造,这样方可提高光合效率。

5 结语

目前,虽然C₄PPDK作为C₄光合途径关键酶已为人们所熟知,cyPPDK的相关生理功能也积累了一定的研究基础,但是随着C₄PPDK基因转化C₃植物研究的深入,许多问题仍有待思考和解决。例如:C₃植物中,内源C₄PPDK对其光合及碳代谢有何作用?同一植株体内,C₄PPDK和cyPPDK基因的表达量是否存在特定比值关系?植株生长发育过程中,双启动子系统如何调控C₄PPDK和cyPPDK基因的时空表达?如何在C₃植物中建立适合外源C₄PPDK发挥作用的内环境?从C₃植物到C₄植物,C₄PPDK及其它光合关键酶的变化是否与两者的解剖结构进化存在相关性?相信随着研究技术与手段的不断完善和研究思路的不断开阔,这些令人迷惑的问题将逐渐被解决。

参考文献

- 罗廉源,林植芳(1992). 氮素营养对丙酮酸磷酸二激酶的调节. 植物生理学通讯, 28 (1): 40~42
- 罗遵喜,张树珍,杨本鹏(2008). C₄光合关键酶基因转化C₃植物. 植物生理学通讯, 44 (2): 187~193
- 张边江,陈全战,焦德茂(2008). 转C₄光合固碳相关基因水稻的研究进展. 植物学通报, 25 (2): 161~166
- Agarie S, Kai M, Takatsuji H, Ueno O (1997). Expression of C₃ and C₄ photosynthetic characteristics in the amphibious plant *Eleocharis vivipara*: structure and analysis of the expression of isogenes for pyruvate, orthophosphate dikinase. Plant Mol Biol, 34: 363~369
- Aoyagi K, Bassham JA (1984). Pyruvate orthophosphate dikinase of C₃ seeds and leaves as compared to the enzyme from maize. Plant Physiol, 75: 387~392
- Aoyagi K, Bassham JA (1986). Appearance and accumulation of C₄ carbon pathway enzymes in developing wheat leaves. Plant Physiol, 80: 334~340
- Aoyagi K, Nakamoto H (1985). Pyruvate, Pi dikinase in bundle sheath strands as well as in mesophyll cells in maize leaves. Plant Physiol, 78: 661~664
- Ashton AR, Burnell JN, Hatch MD (1984). Regulation of C₄ photosynthesis: inactivation of pyruvate, Pi dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis. Arch Biochem Biophys, 230: 492~503
- Brown RH, Hattersley PW (1989). Leaf anatomy of C₃-C₄ species as related to evolution of C₄ photosynthesis. Plant Physiol, 91: 1543~1550
- Burnell JN, Hatch MD (1985). Regulation of C₄ photosynthesis: purification and properties of the protein catalyzing ADP-mediated inactivation and Pi-mediated activation of pyruvate, Pi dikinase. Arch Biochem Biophys, 237: 490~503
- Glackin CA, Grula JW (1990). Organ-specific transcripts of different size and abundance derive from the same pyruvate, orthophosphate dikinase gene in maize. Proc Natl Acad Sci USA, 87 (8): 3004~3008
- Hague DR, Uhler M, Collins PD (1983). Cloning of cDNA for pyruvate, Pi dikinase from maize leaves. Nucleic Acids Res, 11 (14): 4853~4865
- Hatch MD, Slack CR (1968). A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C₄ dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem J, 106: 141~146
- Herzberg O, Chen CCH, Kapadia G, McGuire M, Carroll LJ, Noh SJ, Dunaway-Mariano D (1996). Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 2652~2657
- Imaizumi N, Ku MS, Ishihara K, Samejima M, Kaneko S, Matsuoka M (1997). Characterisation of the gene for pyruvate orthophosphate dikinase from rice, a C₃ plant, and a comparison of structure and expression between C₃ and C₄ genes for this protein. Plant Mol Biol, 34: 701~716
- Ishimaru K, Ishikawa H, Matsuoka M, Ohsugi R (1997). Analysis of a C₄ maize pyruvate, orthophosphate dikinase expressed

- in C₃ transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci*, 129: 57~64
- Ishimaru K, Ohkawa Y, Ishige T, Tobias DJ, Ohsugi R (1998). Elevated pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C₃ transgenic potatoes with a C₄ maize PPDK gene. *Physiol Plant*, 103: 340~346
- Kang HG, Park S, Matsuoka M, An G (2005). White-core endosperm *floury endosperm-4* in rice is generated by knockout mutations in the C₄-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (*OsPPDKB*). *Plant J*, 42: 901~911
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M (1999). High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol*, 17: 76~80
- Ku MSB, Cho DH, Li X, Jiao DM, Pinto M, Miyao M, Matsuoka M (2001). Introduction of genes encoding C₄ photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences. In: Goode JA, Chadwick DC (eds). *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality*. Novartis Foundation Symposia. New York: John Wiley and Sons, 236: 100~116
- Lin Y, Lusin JD, Ye D, Dunaway-Mariano D, Ames JB (2006). Examination of the structure, stability, and catalytic potential in the engineered phosphoryl carrier domain of pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry*, 45: 1702~1711
- Maddaloni M, Donini G, Balconi C, Rizzi E, Gallusci P, Forlani F, Lohmer S, Thompson R, Salamini F, Motto M (1996). The transcriptional activator *Opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Mol Gen Genet*, 250: 647~654
- Matsuoka M (1995). The gene for pyruvate, orthophosphate dikinase in C₄ plants: structure, regulation and evolution. *Plant Cell Physiol*, 36 (6): 937~943
- Matsuoka M, Numazawa T (1991). *CIS*-acting elements in the pyruvate, orthophosphate dikinase gene from maize. *Mol Gen Genet*, 228: 143~152
- Moons A, Valcke R, Montagu VM (1998). Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C₃ plant. *Plant J*, 15 (1): 89~98
- Nakanishi T, Nakatsu T, Matsuoka M, Sakata K, Kato H (2005). Crystal structures of pyruvate phosphate dikinase from maize revealed an alternative conformation in the swiveling-domain motion. *Biochemistry*, 44: 1136~1144
- Ohta S, Ishida Y, Usami S (2004). Expression of cold-tolerant pyruvate, orthophosphate dikinase cDNA, and heterotetramer formation in transgenic maize plants. *Transgenic Res*, 13: 475~485
- Rosche E, Streubel M, Westhoff P (1994). Primary structure of the photosynthetic pyruvate orthophosphate dikinase of the C₃ plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate orthophosphate dikinase sequences in C₃, C₃-C₄ and C₄ *Flaveria* species. *Plant Mol Biol*, 26: 763~769
- Rosche E, Westhoff P (1995). Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C₄ plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae). *Plant Mol Biol*, 29: 663~678
- Sheen J (1991). Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. *Plant Cell*, 3: 225~245
- Sheriff A, Meyer H, Riedel E, Schmitt JM, Lapke C (1998). The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a C₃ plant with respect to the intracellular location of the enzyme. *Plant Sci*, 136: 43~57
- Shirahashi K, Hayakawa S, Sugiyama T (1978). Cold lability of pyruvate, orthophosphate dikinase in the maize leaf. *Plant Physiol*, 62: 826~830
- Smith RD, Walker JC (1996). Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 101~125
- Sugiyama T (1973). Purification, molecular, and catalytic properties of pyruvate phosphate dikinase from the maize leaf. *Biochemistry*, 12: 2862~2868
- Tjaden B, Plagens A, Dorr C, Siebers B, Hensel R (2006). Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Mol Microbiol*, 60: 287~298
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE (2002). Proof of C₄ photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J*, 31 (5): 649~662
- Wang JM, Li RZ (2008). Integration of C₄-specific *ppdk* gene of *Echinochloa* to C₃ upland rice and its photosynthesis characteristics analysis. *African J Biotech*, 7 (6): 783~787
- Zhang JF, Datta SK, Wang GY, Xie HA (2007). Integration of C₄-specific *PPDK* gene of maize to C₃ rice and its characteristics in relation to photosynthesis. *Front Agr China*, 1 (3): 243~249