

专论与综述 Review

植物的苹果酸代谢和转运

宋超, 张立军*, 贾永光, 崔国瑞, 崔震海, 朱延姝
沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161

Malate Metabolism and Transport in Plants

SONG Chao, ZHANG Li-Jun*, JIA Yong-Guang, CUI Guo-Rui, CUI Zhen-Hai, ZHU Yan-Shu
College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

摘要: 本文简要回顾了苹果酸代谢和转运的研究进展。

关键词: 苹果酸; 苹果酸代谢; 苹果酸转运; 苹果酸转运蛋白

苹果酸(malic acid, malate)是一种四碳二羧酸, 参与许多细胞代谢, 还作为碳素和还原力载体在细胞质与细胞器以及细胞器之间传递碳素和还原力。在线粒体中, 苹果酸是三羧酸(TCA)循环的中间产物。在C₄植物中, 苹果酸作为CO₂的载体, 将碳素由叶肉细胞转运到维管束鞘细胞中, 从而实现两种不同类型细胞在光合碳同化中的协同作用。苹果酸在CAM植物中, 在夜间贮藏于液泡中起CO₂载体的作用。苹果酸还参与气孔开闭的调节。在植物细胞内, 苹果酸是将不同细胞器的多种代谢联系起来物质, 参与多种代谢反应的调控(Scheibe 2004)。因此, 了解苹果酸与细胞内各种代谢过程的关系及其转运机制, 将有助于对植物细胞代谢整合和代谢调控的理解, 并为在C₃植物中建立C₄光合循环的研究提供理论依据。本文简要回顾这一领域的研究进展。

1 植物苹果酸代谢的关键酶

细胞通过苹果酸的合成和氧化反应使其行使还原力载体和碳素载体的功能。催化苹果酸合成和氧化的酶有延胡索酸酶、苹果酸合酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶。

1.1 延胡索酸酶 延胡索酸酶(fumarase, EC4.2.1.2)主要存在于线粒体中, 在三羧酸循环中催化延胡索酸发生可逆水合反应生成苹果酸。延胡索酸酶在动物和酵母的细胞质中也有存在, 虽然尚未见到此酶存在于植物细胞质中的实验证据, 但胡萝卜的组织培养细胞能够向胞外分泌延胡索酸酶(Kim和Lee 2002), 由此可推测此酶也可能存在于植物细胞质中。在结构上, 延胡索酸酶可分为两类: 一类仅在

原核生物和低等藻类中发现, 是由2个相同含铁硫亚基组成的二聚体, 亚基的分子量为57~60 kDa (Reaney等1993); 另一类存在于哺乳动物和高等植物中, 是由4个相同亚基构成的四聚体, 亚基的分子量为48~50 kDa (Suzuki等1989)。

在三羧酸循环中, 由延胡索酸酶催化生成的苹果酸, 可以被氧化产生NADH进入呼吸电子传递链进行氧化磷酸化生成ATP, 还可以通过反向转运促进线粒体吸收其它羧化底物。在非光合细胞中, 苹果酸也可通过苹果酸/草酰乙酸穿梭从线粒体中转运到细胞质中氧化产生还原力, 参与硝酸还原和过氧化体的羟基丙酮酸还原(Kromer 1995)。延胡索酸酶是三羧酸循环的重要控制点, 其活性受丙酮酸、 α -酮戊二酸、ATP、ADP和AMP的抑制(Behal和Oliver 1997)。在油料作物种子萌发的早期阶段, 脂肪酸部分通过乙醛酸途径转化为其它物质, 只有少部分中间产物进入三羧酸循环进行能量的产生。Falk等(1998)的研究表明, 随着油菜幼苗发育对能量需求的增加, 乙醛酸循环逐渐消失, 延胡索酸酶的活性逐渐提高, 而且, 延胡索酸酶活性在种子萌发期和幼苗发育早期主要受mRNA水平调控。转延胡索酸酶反义基因的研究表明, 抑制此酶的活性会降低呼吸速率, 但转基因的番茄植株在

收稿 2009-02-06 修定 2009-04-17

资助 辽宁省科技项目(2008208001)、辽宁省高校科研项目(2008S211)、沈阳市科技项目(1081191-3-00)和沈阳农业大学青年基金(2007)。

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

发育早期阶段高于野生型(Nunes-Nesi 等 2007), 这可能是由于此酶活性的下降有利于种子贮存物质向其它物质的转化, 这也提示人们, 在种子萌发的早期阶段适当的抑制呼吸作用可以促进幼苗的伸长生长。然而, 乙醛酸途径向三羧酸循环途径转换的调节机制尚不清楚。Shen 和 Oden (2002)的研究表明, 延胡索酸酶活性与欧洲云杉(*Picea abies*)、小干松(*Pinus contorta*)、垂枝桦(*Betula pendula*)和欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica*)种子的休眠程度密切相关, 是衡量这些植物种子休眠程度的可靠指标。这暗示高浓度的苹果酸可能与休眠种子的萌发启动有关。

Nast和Rober (1996)从马铃薯中克隆出延胡索酸酶基因(*StFum-1*), 此基因在花、幼叶、保卫细胞和块茎中高效表达, 其产物均含有典型的导肽序列。拟南芥的延胡索酸酶基因长 1770 bp, 酶蛋白的预测分子量为 52.8 kDa, 与来自其它真核生物和细菌中的 *Fum1* 基因高度同源(Behal 和 Oliver 1997)。Nunes-Nesi 等(2007)从番茄中克隆出延胡索酸酶的 cDNA。在动物和酵母中, 线粒体和细胞质型延胡索酸酶是由同一个基因编码的。在大鼠中, 胞质型和线粒体型酶通过不同的翻译起始点形成(Tuboi 等 1990); 而在酵母中, 同一翻译产物在内切蛋白酶作用下形成不同类型的酶(Stein 等 1994)。在植物中还缺少这方面的研究资料。

1.2 苹果酸合酶 苹果酸合酶(malate synthase, EC 4.1.3.2)是乙醛酸体特有的酶类, 在乙醛酸循环过程中催化乙醛酸与乙酰 CoA 反应生成苹果酸。在许多高等植物种子中, 脂肪都是重要的储存物质之一。种子萌发过程中, 在乙醛酸体内, 脂肪氧化分解产生的乙酰 CoA 在苹果酸合酶催化下与乙醛酸反应生成苹果酸, 后者可进入细胞质通过糖的异生途径生成蔗糖, 也可通过苹果酸穿梭进入线粒体中, 参与三羧酸循环。在种子萌发过程中, 苹果酸合酶活性较高, 随着幼苗的生长, 种子中的脂肪不断减少, 苹果酸合酶活性也不断减弱, 乙醛酸循环逐渐消失。Comai 等(1989a)研究油菜中苹果酸合酶在时间和空间上表达的结果表明, 在油菜种子胚形成后期苹果酸合酶mRNA大量积累, 在子叶中的含量最高; 在干燥种子和处于萌发后期的胚中均有苹果酸合酶活性, 在幼苗期的子叶中活性最高, 而在新长出真叶中无活性。但有研究表明, 苹果酸合酶缺

失的拟南芥幼苗的生长速度和脂肪分解速度只是略低于野生型, 所以在拟南芥幼苗中可能存在其它脂肪转化的酶类(Cornah 等 2004)。Comai 等(1989a)采用RNA杂交等技术研究证明, 油菜的苹果酸合酶和其它乙醛酸循环酶类(如异柠檬酸裂解酶)在种子萌发过程中受转录和转录后调控。苹果酸合酶多肽含有 561 个氨基酸残基, 分子量为 63.7 kDa。Comai 等(1989b)从油菜中克隆出 5 种苹果酸合酶 cDNA, 这 5 种苹果酸合酶 mRNA 是由同一基因家族的高度保守成员编码的。

1.3 苹果酸脱氢酶 苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH, EC1.1.1.37)催化苹果酸发生可逆的脱氢反应, 将苹果酸脱氢转化为草酰乙酸或将草酰乙酸还原成苹果酸, 还可作为苹果酸转运系统的一部分, 平衡细胞各区域间的苹果酸分布(Scheibe 2004)。植物的 MDH 包括 2 种类型: 以 NADP^+ 为辅基的 MDH (NADP-MDH), 主要存在于叶绿体中, 也存在于细胞质; 而以 NAD^+ 为辅基的 MDH (NAD-MDH), 分布于线粒体、细胞质、过氧化体和乙醛酸体中(Gietl 1992)。MDH 是由相同或相似的亚基组成的二聚体或四聚体, 亚基分子量为 30~35 kDa。不同 MDH 的一级结构相似性较低, 但是, 与催化关键部位、辅助因子结合部位和亚基表面结合部位相关的序列具有较高的同源性, 此外, 与催化功能有关的三维结构组成元件高度保守且其三维结构十分相似(Goward 和 Nicholls 1994)。

在叶绿体中, 苹果酸脱氢酶催化反应的氢受体/氢供体为 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 。在 C_3 植物叶绿体中, MDH 催化草酰乙酸生成的苹果酸通过苹果酸/草酰乙酸穿梭转运到细胞质中(Gietl 1992), 氧化产生 NADH 为硝酸还原反应提供还原力(Backhausen 等 1994), 并且为氨基酸合成提供碳骨架。在 NADP-ME 型 C_4 植物(如玉米、甘蔗、高粱和马唐)叶肉细胞中, 由磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)与 HCO_3^- 反应生成的草酰乙酸进入叶绿体, 在那里被 MDH 还原为苹果酸, 后者转运到维管束鞘细胞叶绿体中, 脱羧释放 CO_2 参与卡尔文循环。这类植物叶肉细胞的叶绿体 MDH 活性是 C_3 植物的 10 倍(Gietl 1992), 且活性受光调节(Scheibe 2004)。

在线粒体内, MDH 主要催化苹果酸发生氧化反应, 生成的草酰乙酸参与三羧酸循环。线粒体 MDH 催化苹果酸脱氢生成 NADH, 这种催化反应与

呼吸电子传递链的细胞色素途径相偶联,因此受鱼藤酮和抗霉素A的抑制(Rustin等1980)。在光呼吸过程中,线粒体MDH可以催化草酰乙酸生成苹果酸,转运到过氧化体为甘油酸的生成提供还原力(Gietl 1992)。这表明苹果酸和线粒体MDH对线粒体和过氧化体之间的还原力交换起作用。

Sänenstrand和Strid(2004)的研究表明:在豌豆乙醛酸体 β -氧化过程中,MDH催化苹果酸氧化生成草酰乙酸;镉元素能够诱导成熟豌豆叶片表达乙醛酸体MDH。这说明乙醛酸体MDH的表达除受植物生长发育调节外,还受环境因子的调控。

在过氧化体中,MDH催化苹果酸脱氢产生NADH,为羟基丙酮酸转化为甘油酸提供还原力(Gietl 1992)。在拟南芥中有2种过氧化体MDH(pMDH1和pMDH2),pMDH1在幼苗中表达,而pMDH2在叶片中表达。在 C_3 植物叶肉细胞中,过氧化体参与光呼吸过程中的碳素和氮素的循环利用,是 C_3 植物抵御逆境的重要机制。但Cousins等(2008)的研究表明双缺失的拟南芥突变体光合效率只稍低于野生型,具有较高的 CO_2 补偿点,但在空气中仍能生长,表明在过氧化体中存在其它为羟基丙酮酸还原提供还原力的途径。这一事实说明,在植物体内苹果酸代谢网络的复杂性和不同代谢途径的互补性。

在细胞质中,MDH催化苹果酸氧化脱氢为硝酸还原过程提供还原力(Scheibe 2004)。在大豆幼苗和豆荚细胞质中,NAD-MDH催化苹果酸氧化生成的草酰乙酸参与细胞质中的硝酸还原(Imsande等2001)。拟南芥、菠菜和无根瘤的大豆在吸收同化铵盐时,根细胞质高水平表达NAD-MDH(Noctor和Foyer 1998)。这些实验都表明细胞质中的苹果酸和NAD-MDH对硝酸还原非常重要。Scheibe(2004)认为,苹果酸还可能作为一种氧化还原信号调控氮素的吸收和同化。

1.4 苹果酸酶 苹果酸酶(malate enzyme, ME)以二价金属离子作为辅助因子,催化苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸、 CO_2 和NAD(P)H(Edwards和Andreo 1992)。植物的ME可分为两大类:(1)NAD-ME(EC1.1.1.39),主要存在于线粒体中(Artus和Edwards 1985);(2)NADP-ME(EC1.1.1.40),分为胞质型NADP-ME和质体型NADP-ME,胞质型NADP-ME存在于细胞质中,而质体型NADP-ME存

在于质体和叶绿体中(程玉祥和柳参奎 2007)。

在NAD-ME型 C_4 植物的叶肉细胞线粒体中,MDH催化草酰乙酸还原为苹果酸,后者转入维管束鞘细胞线粒体,在NAD-ME催化下脱羧形成 CO_2 , CO_2 转移到叶绿体中进入卡尔文循环(李卫华等1999)。在CAM植物中,胞质型NADP-ME催化苹果酸脱羧,生成的 CO_2 参与叶绿体中的卡尔文循环(王晨等1997),生成的丙酮酸转运到线粒体中参与三羧酸循环(Day和Hanson 1977)。

线粒体中NAD-ME催化苹果酸脱羧,产生的丙酮酸参与三羧酸循环(Jenner等2001),具有调控氧化磷酸化的作用。当植物受到伤害时,NAD-ME的活性增强。Palmer(1976)的研究表明在有鱼藤酮和氰化物存在的条件下,外加 NAD^+ 促进马铃薯块茎线粒体NAD-ME催化的苹果酸氧化,说明线粒体NAD-ME对鱼藤酮不敏感(Rustin等1980),并与抗氰途径相偶联(Rustin和Lance 1986)。线粒体苹果酸的NAD-ME氧化途径是线粒体呼吸代谢多样性的组成部分,其存在可以增强植物适应外界环境变化的能力。

C_4 植物叶片维管鞘细胞叶绿体中含有丰富的NADP-ME,能够催化来自叶肉细胞的苹果酸脱羧产生 CO_2 ,为Rubisco提供碳源(Casati等1999),这是NADP-ME型 C_4 植物有较高光合效率的重要原因。Kromer和Scheibe(1996)的研究证明叶绿体中的质体型NADP-ME催化苹果酸脱羧产生的一部分丙酮酸,参与叶绿体中脂肪酸的合成。在蓖麻等油料作物种子中,白色体中的质体型NADP-ME可为长链脂肪酸合成提供NADPH和丙酮酸(Smith等1992)。

细胞质中NADP-ME催化反应的产物丙酮酸和NADPH参与植物防御反应和对环境胁迫的反应。Crecelius等(2003)发现,经过寒冷锻炼的黑麦具有较高的NADP-ME活性。Misalski等(2008)研究松叶菊属植物时发现,盐胁迫下,NADP-ME活性增强3.9~17.7倍。植物受到物理损伤和UV-B伤害时会诱导木质素合成,并在细胞壁内和细胞壁间逐渐沉积。还有研究表明,NADP-ME催化的反应可为木质素单体的合成提供NADPH(Casati等1999)。NADP-ME催化苹果酸脱羧形成的丙酮酸还参与莽草酸途径,并形成丙酮酸族氨基酸和一些与防御反应有关的次生代谢物质(Casati等1999)。

2 植物苹果酸转运蛋白

在细胞质膜和细胞器膜上存在多种苹果酸转运蛋白负责苹果酸的跨膜转运,从而将细胞内各个亚细胞区域的苹果酸代谢联系起来,从而实现碳素和还原力在细胞质与线粒体、叶绿体、过氧化体和乙醛酸体之间的有效分配。

2.1 叶绿体苹果酸转运蛋白 叶绿体内膜上存在3种苹果酸转运蛋白: 苹果酸/ α -酮戊二酸转运蛋白、苹果酸/谷氨酸转运蛋白和苹果酸/草酰乙酸转运蛋白(Brautigam等2008)。

苹果酸/ α -酮戊二酸转运蛋白(DiT1)主要负责苹果酸向叶绿体外转运和 α -酮戊二酸向内转运(Weber等1995; Schneidereit等2006)。苹果酸/谷氨酸转运蛋白(DiT2)负责苹果酸向内转运和谷氨酸向外转运(Renné等2003)。在玉米中, DiT1称为DCT(1~3),而DiT2称为OMT1(Taniguchi等2002, 2004)。DCT1和OMT1在叶肉细胞叶绿体膜上大量表达,而DCT2/3在维管束鞘细胞叶绿体膜上大量表达(Taniguchi等2004; Majeran等2008)。Taniguchi等(2004)认为,DCT2/3在维管束鞘细胞叶绿体膜可能执行输入苹果酸的功能。这个观点与Renné等(2003)的研究结果不一致。Schneidereit等(2006)采用反义RNA技术促使烟草植株中的DiT1表达沉默后,苹果酸输出能力减弱,因而叶片中有机酸积累,氨基酸的合成也受到抑制,光合速率下降,蔗糖合成能力降低(Hodges 2002; Lancien等

2000)。这表明光合作用与叶绿体的苹果酸输出和 α -酮戊二酸的输入有关。Woo等(1987)和Renné等(2003)研究苹果酸、 α -酮戊二酸和谷氨酸在叶绿体膜上转运动力学的结果表明, DiT1和DiT2通过苹果酸穿梭将 α -酮戊二酸的输入和谷氨酸的输出偶联在一起(图1)。

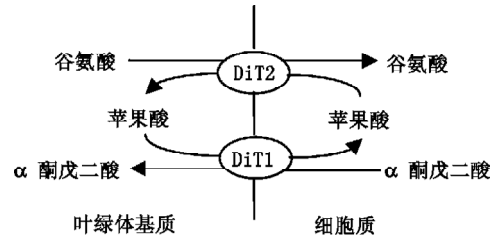


图1 叶绿体苹果酸/谷氨酸和苹果酸/ α -酮戊二酸转运的协同模式(根据Renné等2003, 稍有改动)

叶绿体膜上的苹果酸/草酰乙酸转运蛋白具有输出苹果酸和输入草酰乙酸的作用。这种转运能够为细胞质、过氧化体和线粒体提供还原力,苹果酸也可再转运到液泡储存(Martinoia和Rentsch1994)。叶绿体草酰乙酸/苹果酸转运蛋白的转运过程在光暗条件下都可进行(Scheibe2004)。在光照条件下,绿色组织叶绿体光反应产生的还原力,通过苹果酸/草酰乙酸穿梭转运到细胞质中(图2);在黑暗条件下,绿色组织叶绿体及非绿色组织质体的苹果酸/草酰乙酸穿梭将淀粉分解过程产生的还原

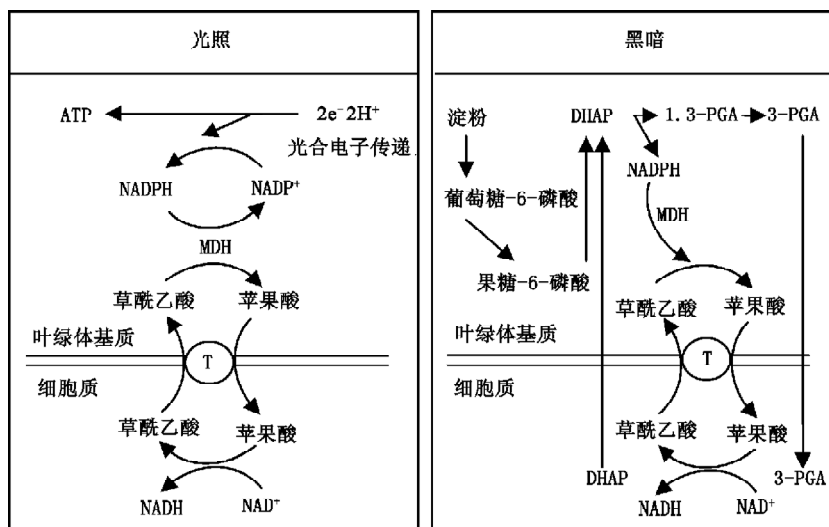


图2 光下和暗中叶绿体膜的苹果酸/草酰乙酸转运(根据Scheibe等2004, 略有改动)

T: 苹果酸/草酰乙酸转运蛋白; DHAP: 磷酸二羟丙酮; 1,3-PGA: 1,3-二磷酸甘油酸; 3-PGA: 3-磷酸甘油酸。

力,以苹果酸形式转运到细胞质中(图2)。Heineke等(1991)的工作表明菠菜叶绿体膜苹果酸/草酰乙酸穿梭受到叶绿体内NADP-MDH活性与跨叶绿体内膜氧化还原梯度的调控,他们认为叶绿体膜苹果酸/草酰乙酸转运蛋白的转运作用能够维持叶绿体和细胞质所需的氧化还原状态。

2.2 线粒体苹果酸转运蛋白 现已发现在线粒体内膜上存在4种苹果酸转运蛋白:苹果酸/柠檬酸转运蛋白、苹果酸/磷酸转运蛋白、苹果酸/草酰乙酸转运蛋白和苹果酸/ α -酮戊二酸转运蛋白(Martinoia和Rentsch 1994)。

线粒体苹果酸/柠檬酸转运蛋白负责苹果酸向内转运和柠檬酸向外转运。细胞质中由NAD-MDH脱氢酶催化生成的苹果酸,可转运到线粒体中。柠檬酸作为苹果酸转运的平衡离子,由线粒体转运到细胞质中,转变为 α -酮戊二酸,参与 NH_3 的同化(Martinoia和Rentsch 1994)。柠檬酸还是磷酸果糖激酶的变构抑制剂,可使糖酵解减速,而实现植物呼吸作用的反馈调节。与动物相比,植物线粒体苹果酸/柠檬酸转运蛋白的转运能力较低,受高浓度1,2,3-苯三甲酸和N-丁基丙二酸的抑制(McIntosh和Oliver 1992)。

苹果酸/磷酸转运蛋白负责苹果酸向内转运和磷酸向外转运。这种苹果酸转运蛋白对苹果酸的 K_m 值为 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对磷酸离子的 K_m 值为 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Martinoia和Rentsch 1994)。采用单克隆抗体技术获得的这种转运蛋白的分子量约为26 kDa(Vivekananda等1988)。苹果酸/磷酸转运蛋白和丙酮酸/ OH^- 转运蛋白能够为线粒体三羧酸循环提供反应底物,是三羧酸循环中间产物的补充机制。

苹果酸/草酰乙酸转运蛋白在植物绿色组织和非绿色组织的线粒体内膜上均有存在(Zoglowek等1988),负责苹果酸向外和草酰乙酸向内转运。但也有人认为线粒体内膜上苹果酸与草酰乙酸的交换运输可能是通过两种单向转运蛋白分别催化完成(Oliver和Walker 1984)。这方面还缺少蛋白和分子水平的研究证据。由线粒体输出的苹果酸在细胞质中氧化脱氢,卸下的还原力用于细胞质中各种代谢,而形成的草酰乙酸转运回线粒体,维持三羧酸循环的草酰乙酸水平(图3)。线粒体具有向过氧化体高水平转运苹果酸的能力,通过这种转运几乎

将甘氨酸氧化形成的全部还原力转运到过氧化体中,以维持光呼吸的进行(Ebbighausen等1987)。Pastore等(2003)的工作表明,硬粒小麦和烟草线粒体中的NADH氧化速率受到苹果酸/草酰乙酸穿梭的限制。在生理条件下的苹果酸/草酰乙酸穿梭能够逆浓度梯度进行,以致细胞质中苹果酸浓度高出草酰乙酸100倍(Stern等1952),转运不受外界高浓度苹果酸和其它二羧酸的抑制(Oliver和Walker 1984),但受线粒体内草酰乙酸浓度的调控(Zoglowek等1988)。这表明苹果酸向外转运对维持线粒体内的氧化还原状态(NADH/NAD^+)至关重要。

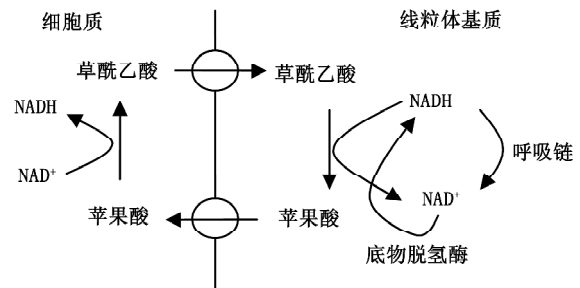


图3 线粒体内膜的苹果酸/草酰乙酸转运
(根据Zoglowek等1988,略有改动)

线粒体苹果酸/ α -酮戊二酸转运蛋白负责苹果酸向外转运和 α -酮戊二酸向内转运。这种转运蛋白也可以进行 α -酮戊二酸与丙二酸、琥珀酸、草酰乙酸的反向转运(Lanoue和Schooiwerth 1979)。关于这个蛋白还未见到其它的研究报道。

2.3 液泡苹果酸转运蛋白 液泡膜上负责苹果酸吸收和释放的转运蛋白为阴离子通道,其作用是通过苹果酸的转运调节液泡内外的代谢反应、渗透势和电化学环境(Luttge 1987)。

Hafke等(2003)用膜片钳技术研究CAM植物大叶落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)液泡膜苹果酸转运蛋白,确定一种内向整流的阴离子通道是液泡吸收苹果酸的主要途径。它的转运是一个耗能过程,驱动力是V-ATPase和V-Ppiase(Luttge等2002)。液泡每吸收1分子苹果酸,需向内泵入2个 H^+ (Luttge 1987)。这种转运蛋白对多种二羧酸具有选择性,延胡索酸较苹果酸更容易进入液泡(White和Smith 1989)。

负责释放苹果酸的通道蛋白可能具有苹果酸

特异性(Luttge 等 2002)。Hedrich 和 Neher (1987) 发现,液泡膜上存在一种转运能力低的膜电压依赖型通道蛋白,可能负责苹果酸的向外转运。轮藻细胞质中高浓度的 Ca^{2+} 能够促进液泡中苹果酸的释放,细胞质苹果酸浓度也影响液泡中苹果酸的释放(Williamson 和 Ashley 1982)。Hafke 等(2003)认为,在不断变化的环境条件下,液泡对苹果酸的吸收和释放会受到不同程度调节,以保持细胞内部代谢反应平衡。

2.4 过氧化体苹果酸转运蛋白 过氧化体中的苹果酸主要作用是为羟基丙酮酸转化成甘油酸提供还原力(Agepati 等 1998)。过氧化体膜对 NADH 和 NAD 的通透性非常小,其跨膜转运必须依赖苹果酸穿梭(李朝霞等 2003)。现在的看法认为细胞质中的苹果酸通过过氧化体膜上的苹果酸/草酰乙酸转运蛋白(Cousins 2008)和苹果酸/天冬氨酸转运蛋白(Reumann 2000)转运到过氧化体中。

2.5 乙醛酸体苹果酸转运蛋白 Mettler 和 Beevers (1980)认为乙醛酸体膜上存在苹果酸/天冬氨酸转运蛋白,负责苹果酸的外向转运。Reumann 等(1997)研究蓖麻乙醛酸体膜上的孔蛋白,结果表明,其电生理学性质与菠菜叶片过氧化体膜的孔蛋白极其相似,对 C_4 酸具有较高的亲和力。

2.6 细胞膜苹果酸转运蛋白 植物细胞可以通过细胞膜上的苹果酸转运蛋白,在细胞之间或细胞与外界之间进行苹果酸的交换。研究较多的是植物根部铝敏感型苹果酸转运蛋白和保卫细胞膜阴离子通道蛋白(张蜀秋等 2000)。Hoekenga 等(2006)发现拟南芥根尖细胞细胞膜上存在一种铝敏感型苹果酸转运蛋白(*AtALMT1*),在小麦根中也有存在(*TaALMT1*) (Pineros 等 2008)。ALMT1 负责向胞外分泌苹果酸,与土壤中 Al^{3+} 螯合成无毒复合物,同时可能向内转运 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 等离子,这对植物解除铝毒害具有一定的意义(李德华等 2004)。此外,刘晓忠等(1993)的工作表明耐涝玉米品种的根系能够积累一定量的苹果酸,认为根部苹果酸代谢是调节涝渍条件下乙醇发酵的重要因素。Hedrich 和 Marten (1993)用膜片钳位技术在蚕豆保卫细胞细胞膜上发现的一种阴离子通道(GCAC)有微弱苹果酸转运能力(透过能力: $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- >> \text{苹果酸}$)。但这种苹果酸转运的意义还不清楚。

3 苹果酸在植物联系不同亚细胞场所代谢中的作用

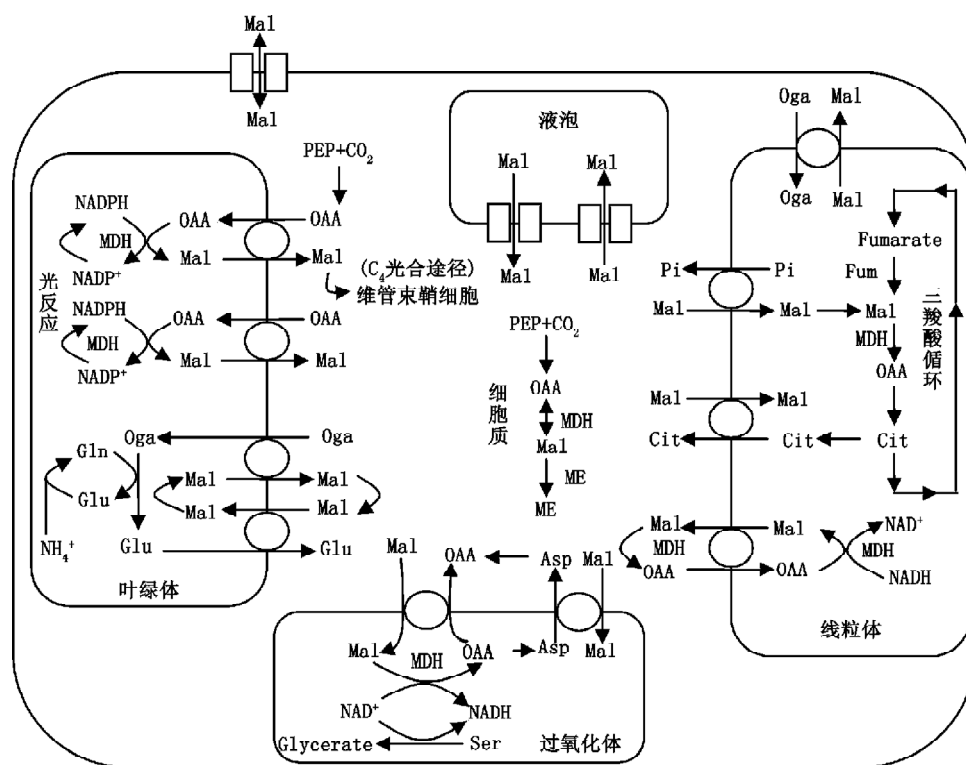
苹果酸不仅参与许多亚细胞场所的代谢活动,还作为碳素和还原力载体将不同亚细胞场所的相关代谢活动联系起来(图4),起稳定亚细胞场所内部环境和协调不同亚细胞场所代谢活动的作用。在各亚细胞场所(线粒体、叶绿体、过氧化体、液泡和细胞质)苹果酸代谢和转运的主要作用是保持细胞内不同区域还原力的代谢平衡。在强光下叶绿体光反应生成的ATP和NADPH数量超出卡尔文循环所需ATP和NADPH量的几个数量级(Huner 等 1998),过剩的还原力需要在短时间内高效率的转运出去,苹果酸是其中的重要转运途径之一。线粒体也可借助于苹果酸穿梭来维持自身的氧化还原状态,并与细胞质交换碳素和还原力(Kromer 等 1988)。在过氧化体、叶绿体和线粒体共同完成光呼吸代谢的过程中,过氧化体甘油酸的合成所需要的还原力也是通过苹果酸穿梭转运的(Raghavendra 和 Padmasree 2003)。

以上事实说明,在植物体内苹果酸代谢网络是复杂的,不同的代谢途径之间是互补的。

4 结语

综上所述,苹果酸是将不同亚细胞场所多种代谢过程联系起来的重要碳素和能量载体,对细胞的代谢调控有重要作用。由于苹果酸在细胞内的代谢和转运涉及到多种细胞器、酶和转运蛋白,其调节机制非常复杂,在某些方面的研究资料还有限,所以目前还不能清楚的了解苹果酸在植物细胞内代谢和转运过程的每个细节,也不能提出一个调节模型。因此,还需要深入研究,否则将影响与苹果酸代谢和转运有关的代谢调控研究的进展,例如,在 C_3 植物中建立 C_4 光合循环就离不开对苹果酸代谢和转运的调控。因此我们认为,在现有的研究工作的基础上,可在如下几个方面展开研究,这将有助于人们对植物苹果酸代谢和转运的进一步了解。

(1)苹果酸代谢酶在基因水平上的表达调节机制,例如,在植物中是否存在细胞质型延胡索酸酶?此外,在种子萌发时的延胡索酸酶基因表达或活性是如何调节的?在不同环境条件下,植物是如何控制苹果酸脱氢酶的催化方向而调节细胞代谢的?苹果酸合酶在乙醛酸循环中的地位如何,也需研究(Cornah 等 2004)。

图4 光照条件下C₃植物光合细胞的苹果酸转运

Mal: 苹果酸; OAA: 草酰乙酸; Glu: 谷氨酸; Oga: α -酮戊二酸; Cit: 柠檬酸; Asp: 天冬氨酸; Pi: 磷酸; Gln: 谷氨酰胺; Fum: 延胡索酸; Pyr: 丙酮酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; Glycerate: 甘油酸; Ser: 丝氨酸。

(2)苹果酸转运蛋白的结构、转运调节及分子基础。在叶绿体膜和线粒体膜上既存在苹果酸的外向转运,也存在内向转运,这两种转运是由不同类型的转运蛋白分别进行的,还是由同一种类型的转运蛋白进行的?如果是后者,转运方向的转换是如何调节的?这个问题的阐明将会有助于在C₃植物中建立C₄光合循环的尝试和探讨。在线粒体内膜上苹果酸与草酰乙酸的交换运输如果可以通过两种单向转运蛋白分别催化完成的话,那么两种蛋白之间的调控机制又是怎样的?迄今还缺少蛋白和分子水平上的证据。

(3)苹果酸的调节作用及机制。从理论上推测苹果酸除作为碳源和还原力载体参与代谢活动以外,还可能对许多细胞代谢应具有直接的调节作用,但迄今还很少见到这方面的研究报道。但有报道暗示,认为存在这方面的可能性。例如,在兼性CAM植物冰叶日中花叶片中,延胡索酸酶活性远低于C₃植物(Miszalski等2008),一般认为,CAM植物中的苹果酸含量是较高的。此外,延胡索酸酶活性与云杉、小干松、垂枝桦和欧洲山毛榉种子的休

眠程度密切相关,这些都暗示苹果酸参与延胡索酸酶的基因表达或活性的调节(参与种子萌发启动的调节)。

(4)苹果酸在液泡膜、乙醛酸体膜、过氧化体膜和细胞膜的转运蛋白的研究也应给予更多的关注。

参考文献

- 程玉祥, 柳参奎(2007). 水稻NADP-苹果酸酶的原核表达、纯化和抗体制备. 植物生理学通讯, 43 (5): 847~851
- 李朝霞, 赵世杰, 孟庆伟(2003). 光呼吸途径及其功能. 植物学通报, 20 (2): 190~197
- 李德华, 黄升谋, 贺立源, 刘武定(2004). 植物根系有机酸的分泌和解铝毒作用. 植物生理学通讯, 40 (4): 505~510
- 李卫华, 郝乃斌, 戈巧英, 张其德(1999). C₃植物中C₄途径的研究进展. 植物学通报, 16 (2): 97~106
- 刘晓忠, 汪宗立, 高煜珠(1993). 涝渍逆境下玉米根系苹果酸代谢与耐涝性的关系. 植物生理学通讯, 26 (6): 413~415
- 王晨, 尉亚辉, 吴丽园(1997). NADP-苹果酸酶活性变化及其在CAM运行中的调节. 西北植物学报, 17 (2): 200~204
- 张蜀秋, 刘新, 姜成后(2000). 保卫细胞碳代谢与气孔运动. 植物学通报, 17 (4): 345~351
- Artus N, Edwards G (1985). NAD-malic enzyme from plants. FEBS Lett, 182: 225~233

- Agepati SR, Sigrun R, Hans WH (1998). Participation of mitochondria metabolism in photorespiration. *Plant Physiol*, 116: 1333~1337
- Backhausen JE, Kitzmann C, Scheibe R (1994). Competition between electron acceptors in photosynthesis: regulation of the malate valve during CO₂ fixation and nitrite reduction. *Photosynth Res*, 42: 75~86
- Behal RH, Oliver DJ (1997). Biochemical and molecular characterization of fumarase from plants. Cloning, sequencing, and expression of the *Arabidopsis thaliana* fumarase gene; purification and characterization of *Pisum sativum* fumarase enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 347: 65~74
- Brautigam A, Hofmann-Benning S, Weber APM (2008). Comparative proteomics of chloroplast envelopes from C₃ and C₄ plants reveals specific adaptations of the plastid envelope to C₄ photosynthesis and candidate proteins required for maintaining C₄ metabolite fluxes. *Plant Physiol*, 148: 568~579
- Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS (1999). Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth Res*, 61: 99~105
- Comai L, Baden CS, Harada JJ (1989b). Deduced sequence of a malate synthase polypeptide encoded by a subclass of the gene family. *J Biol Chem*, 264 (5): 2778~2782
- Comai L, Dietrich RA, Maslyar DJ, Baden CS, Harada JJ (1989a). Coordinate expression of transcriptionally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in *Brassica napus* L. *Plant Cell*, 1: 293~300
- Cornah JE, Germain V, Ward JL, Beale MH, Smith SM (2004). Lipid utilization, gluconeogenesis, and seedling growth in *Arabidopsis* mutants lacking the glyoxylate cycle enzyme malate synthase. *J Biol Chem*, 279 (41): 42916~42923
- Cousins AB, Pracharoenwattana I, Zhou WX, Smith SM, Badger MR (2008). Peroxisomal malate dehydrogenase is not essential for photorespiration in *Arabidopsis* but its absence causes an increase in the stoichiometry of photorespiratory CO₂ release. *Plant Physiol*, 148: 786~795
- Crecelius F, Streb P, Feierabend J (2003). Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *J Exp Bot*, 54 (384): 1075~1083
- Day DA, Hanson JB (1977). Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria. *Plant Physiol*, 59: 630~635
- Ebbighausen H, Hatch MD, Lilley RM, Kromer S, Stitt M, Heldt HW (1987). On the functions of malate-oxalacetate shuttles in a plant cell. In AL Moore, RB Beechey (eds). *Plant Mitochondria: Structural, Functional and Physiological Aspects*. New York Plenum Press, 171~180
- Edwards GE, Andreo CS (1992). NADP-malic enzyme from plants. *Photosynth Res*, 31: 1845~1857
- Falk KL, Behal RH, Xiang CB, Oliver DJ (1998). Metabolic bypass of the tricarboxylic acid cycle during lipid mobilization in germinating oilseeds. *Plant Physiol*, 117: 473~481
- Gietl C (1992). Partitioning of malate dehydrogenase isoenzymes into glyoxysomes, mitochondria, and chloroplasts. *Plant Physiol*, 100: 557~559
- Goward CR, Nicholls DJ (1994). Malate dehydrogenase A model for structure evolution and catalysis. *Protein Sci*, 3: 1883~1888
- Hafke JB, Hafke Y, Smith JAC, Luttge U, Thiel G (2003). Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier. *Plant J*, 35: 116~128
- Hedrich R, Neher E (1987). Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature*, 329: 833~836
- Hedrich R, Marten I (1993). Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *EMBO J*, 12 (3): 897~901
- Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flugge UI, Heldt HW (1991). Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol*, 95: 1131~1137
- Hodges M (2002). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J Exp Bot*, 53: 905~916
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T et al (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (25): 9738~9743
- Huner NPA, Öquist G, Sarhan F (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci*, 3: 224~230
- Imsande J, Berkemeyer M, Scheibe R, Schumann U, Gietl C, Palmer RG (2001). A soybean plastid-targeted NADH-malate dehydrogenase: cloning and expression analysis. *Am J Bot*, 88: 2136~2142
- Jenner HL, Winning BM, Millar AH, Tomlinson KL, Leaver CJ, Hill SA (2001). NAD-malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol*, 126: 1139~1149
- Kim SH, Lee WS (2002). Participation of extracellular fumarase in the utilization of malate in cultured carrot cells. *Plant Cell Rep*, 20: 1087~1092
- Kromer S (1995). Respiration during photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 45~70
- Kromer S, Scheibe R (1996). Function of the chloroplastic malate valve for respiration during photosynthesis. *Biochem Soc Trans*, 24: 761~766
- Kromer S, Stitt M, Heldt HW (1988). Mitochondrial oxidative phosphorylation participating in photosynthetic metabolism of a leaf cell. *FEBS Lett*, 226: 352~356
- Lancien M, Gadal P, Hodges M (2000). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol*, 123: 817~824
- Lanoue JF, Schooiwerth AC (1979). Metabolite transport in mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 48: 871~922
- Luttge U (1987). Carbon dioxide and water demand: Crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in ecophysiological work. *New Phytol*, 106: 593~629
- Luttge U, Pfeifer T, Schliebs EF, Ratajczak R (2002). The role of vacuolar malate-transport capacity in Crassulacean acid metabolism and nitrate nutrition. *Higher malate-transport*

- capacity in ice plant after Crassulacean acid metabolism-induction and in tobacco under nitrate nutrition. *Plant Physiol*, 124: 1335~1347
- Majeran W, Zybailov B, Ytterberg AJ, Dunsmore J, Sun Q, van Wijk KJ (2008). Consequences of C₄ differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1609~1638
- Martinoia E, Rentsch D (1994). Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 45: 447~467
- McIntosh CA, Oliver DJ (1992). Isolation and characterization of the tricarboxylate transporter from pea mitochondria. *Plant Physiol*, 100: 2030~2034
- Mettler IJ, Beevers H (1980). Oxidation of NADH in glyoxysomes by a malate-aspartate shuttle. *Plant Physiol*, 66: 555~560
- Miszalski Z, Niewiadomska E, Slesak I, Lüttge U, Kluge M, Ratajczak R (2008). The effect of irradiance on carboxylating/decarboxylating enzymes and fumarase activities in *Mesembryanthemum crystallinum* L. exposed to salinity stress. *Plant Biol*, 3 (1): 17~23
- Nast C, Rober MB (1996). Molecular characterization of potato fumarate hydratase and functional expression in *Escherichia Coli*. *Plant Physiol*, 112: 1219~1227
- Noctor G, Foyer CH (1998). A re-evaluation of the ATP: NADP budget during C₃ photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity. *J Exp Bot*, 49: 1895~1908
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J*, 50 (6): 1093~1106
- Oliver DJ, Walker GH (1984). Characterization of the transport of oxalacetate by pea leaf mitochondria. *Plant Physiol*, 76: 409~413
- Palmer JM (1976). The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol*, 27: 133~157
- Pastore D, Pede SD, Passarella S (2003). Isolated durum wheat and potato cell mitochondria oxidize externally added NADH mostly via the malate/oxaloacetate shuttle with a rate that depends on the carrier-mediated transport. *Plant Physiol*, 133: 2029~2039
- Pineros MA, Cancado GMA, Kochian LV (2008). Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus Oocytes*: functional and structural implications. *Plant Physiol*, 147: 2131~2146
- Raghavendra AS, Padmasree K (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci*, 8 (11): 546~553
- Reaney SK, Bungard SJ, Guest JR (1993). Molecular and enzymological evidence for two classes of fumarase in *Bacillus stearothermophilus* (var. non-diastaticus). *J Gen Microbiol*, 139: 403~416
- Renné P, Dresen U, Hebbeker U, Hille D, Flugge UI, Westhoff P, Weber APM (2003). The Arabidopsis mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *Plant J*, 35: 316~331
- Reumann S, Bettermann M, Benz, R, Heldt HW (1997). Evidence for the presence of a porin in the membrane of glyoxysomes of Castor bean. *Plant Physiol*, 115: 891~899
- Reumann S (2000). The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol Chem*, 381: 639~648
- Rustin P, Lance C (1986). Malate metabolism in leaf mitochondria from the Crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe blossfeldiana* poelln. *Plant Physiol*, 81: 1039~1043
- Rustin P, Moreau F, Lance C (1980). Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway. *Plant Physiol*, 66: 457~462
- Sävenstrand H, Strid Å (2004). A *Pisum sativum* glyoxysomal malate dehydrogenase induced by cadmium exposure. *Mitochondrial DNA*, 15 (3): 206~208
- Scheibe R (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol Plant*, 120: 21~26
- Schneiderei J, Hausler RE, Fiene G, Kaiser WM, Weber APM (2006). Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. *Plant J*, 45: 206~224
- Shen TY, Oden PC (2002). Relationship between seed vigour and fumarase activity in *Picea abies*, *Pinus contorta*, *Betula pendula* and *Fagus sylvatica*. *Seed Sci Technol*, 30: 177~186
- Smith RG, Gauthier DA, Dennis DT, Turpin DH (1992). Malate and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiol*, 98: 1233~1238
- Stern JR, Ochoa S, Lynen F (1952). Enzymatic synthesis of citric acid. V. Reaction of acetyl coenzyme A. *J Biol Chem*, 198: 313~320
- Suzuki T, Sato M, Yoshida T, Tuboi S (1989). Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single gene. *J Biol Chem*, 264: 2581~2586
- Stein I, Peleg Y, Even-Ram S, Pines O (1994). The single translation product of the *FUM1* gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14: 4770~4778
- Taniguchi Y, Nagasaki J, Kawasaki M, Miyake H, Sugiyama T, Taniguchi M (2004). Differentiation of dicarboxylate transporters in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Cell Physiol*, 45: 187~200
- Taniguchi M, Taniguchi Y, Kawasaki M, Takeda S, Kato T, Sato S, Tabata S, Miyake H, Sugiyama T (2002). Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 43: 706~717
- Tuboi S, Suzuki T, Sato M, Yoshida T (1990). Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid se-

- quences are encoded from a single mRNA with two alternative in-phase AUG initiation sites. *Adv Enzyme Regul*, 30: 289~304
- Vivekananda J, Beck CF, Oliver DJ (1988). Monoclonal antibodies as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem*, 263: 4782~4788
- Weber A, Menzlaff E, Arbinger B, Gutensohn M, Eckerskorn C, Flugge UI (1995). The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelopemembranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochemistry*, 34: 2621~2627
- White PJ, Smith JAC (1989). Proton and anion transport at the tonoplast in Crassulacean acid metabolism plants: specificity of the malate-influx system in *Kalanchoe daigremontiana*. *Planta*, 179: 265~274
- Williamson RE, Ashley CC (1982). Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature*, 296: 647~651
- Woo KC, Flugge UI, Heldt HW (1987). A two-translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in the light. *Plant Physiol*, 84: 624~632
- Zoglowek C, Kromer S, Heldt HW (1988). Oxaloacetate and malate transport by plant mitochondria. *Plant Physiol*, 87: 109~115