

植物中的磷脂酶D

张充 蒋继志* 廖祥儒 彭亮 安秀娟 杨磊
河北大学生命科学学院, 河北保定 071002

Phospholipase D in Plants

ZHANG Chong, JIANG Ji-Zhi*, LIAO Xiang-Ru, PENG Liang, AN Xiu-Juan, YANG Lei
College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei, 071002, China

摘要 介绍了植物磷脂酶D(PLD)的生化性质、克隆、基因组结构、氨基酸序列结构、活性调控、信号转导和细胞生理功能的研究进展。

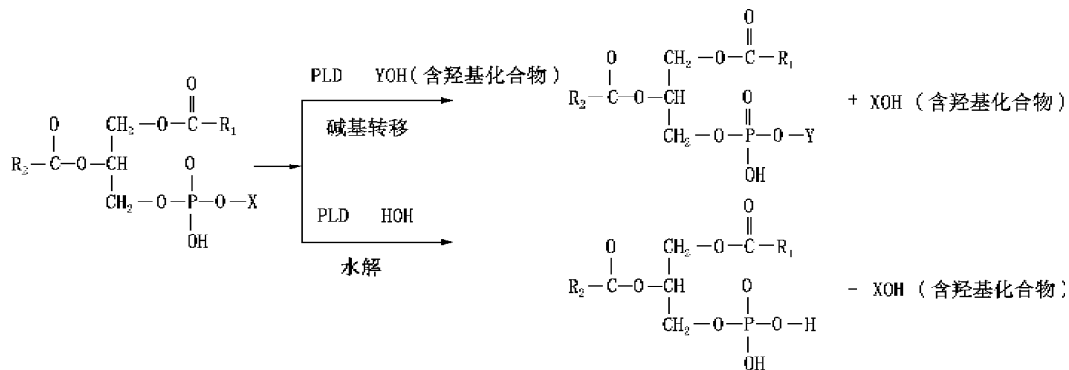
关键词 植物; 磷脂酶D

在已经发现的磷脂酶(phospholipase)中,根据它们水解磷脂分子的作用部位不同,可划分为4种类型,即A1、A2、C和D(PLA1、PLA2、PLC和PLD)。PLD(phospholipase D)即磷脂酰胆碱磷脂水解酶(EC 3.1.4.4),催化磷酸二酯键和碱基交换反应,广泛存在于各种植物体中^[1]。1994年,Wang等^[2]从蓖麻豆胚乳中分离提纯到PLD,并以其为寡聚核苷酸探针首次用反转录技术,经PCR克隆了cDNA。之后,多种植物PLD cDNA均克隆成功。植物PLD由复杂的基因家族编码。在拟南芥中发现7条编码PLD基因,位于不同的染色体上^[3],而且不同植物中PLD编码基因组成结构也有所差异^[4]。植物生长发育过程中,PLD mRNA表达量存在差异,且受植物激素

的影响^[4,5]。氨基酸一级结构含有HKD基序、Ca²⁺/磷脂结合C2区域、多磷脂酰肌醇(polyphosphatidylinositol phosphate, PIP₂)结合基序、前导肽、修饰位点^[3]。Ca²⁺、多磷酸肌醇等因子可调节PLD活性^[6~10]。植物PLD通过其信号转导途径,在细胞抗逆境、质膜重塑与增殖以及植物激素反应等生理过程中起作用^[3]。

1 生化性质

植物PLD催化水解磷脂分子中的磷酸和有机碱(如胆碱、乙醇胺)羟基成酯的键,水解产物为磷脂酸和有机碱。除水解作用外,植物PLD还能催化各种含羟基的化合物结合到磷脂的碱基上,形成新的磷脂,这一特性称为PLD磷脂转移特性^[2]。其反应式如下:



植物PLD广泛作用于许多磷脂和磷脂衍生物,对构成酯的碱基部分没有绝对的特异性要求。从植物中提纯的PLD α 能催化水解磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰甘油(phosphati-

收稿 2005-03-02 修定 2005-08-04
资助 河北省自然科学基金项目(300081)和河北省省级重点学科生物工程项目。
*通讯作者(E-mail: jiangjizhi@yahoo.com, Tel: 0312-5079364)。

dylglycerol, PG); PLD β 和PLD γ 也能催化水解PC、PE、PG, 但是与PLD α 反应条件不同。磷脂转移反应中, 磷脂酰基受体包括水、甲醇、乙醇、乙醇胺、甘油、丝氨酸、溶血磷脂(lysophospholipids)等。其中, 醇类受体要比水和羧酸(如柠檬酸)类受体的转化率高。研究醇类的结果表明, 当醇浓度小于 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 各种醇对PLD无抑制作用。在同一浓度下, 以各种醇类为底物的转化效率大小依次为: 伯醇>仲醇>叔醇, 一元醇>二元醇>三元醇^[1]。

已从多种植物中提纯了PLD。多数植物PLD的最适pH值为酸性, 且有时取决于 Ca^{2+} 浓度, 等电点范围为 $4.2\sim 5.0$, 分子量为 $75\sim 200 \text{ kD}$ 。有机溶剂和去污剂可刺激PLD活性, 例如乙醚和SDS。PLD离子试验中所需最适 Ca^{2+} 的浓度相比生理状态下要高得多, 为 $10\sim 100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但拟南芥中PLD β 所需的 Ca^{2+} 浓度只有亚微摩尔数量级^[1]。

2 克隆

1994年, Wang等^[2]从蓖麻豆胚乳中分离提纯了PLD, 并测定它的N末端氨基酸序列。他们还以其为寡聚核苷酸探针首次采用反转录技术, 经PCR克隆出了cDNA, 核苷酸序列为一个包含2426个碱基对的开放阅读框, 转入大肠杆菌中可得到表达, 编码出 92.4 kD 、808个氨基酸的功能性PLD, 具有水解酶和转移酶活性(表1)。随后, 从拟南芥中克隆出3种表达序列标签(expressed sequence tag, EST)。核酸序列分析表明, 其

表1 一部分已克隆的植物PLD cDNA及性质^[11]

基因	来源	cDNA及编码蛋白的特征
PLD α	拟南芥	2 806 bp, 809 个氨基酸, 91.8 kD
PLD β	拟南芥	3 309 bp, 968 个氨基酸, 10.9 kD
PLD γ	拟南芥	3 224 bp, 855 个氨基酸, 95.5 kD
PLD	水稻	3 040 bp, 812 个氨基酸, 82.0 kD
PLD	玉米	2 804 bp, 812 个氨基酸, 82.0 kD
PLD	蓖麻	2 834 bp, 808 个氨基酸, 92.4 kD

中1条EST与克隆的蓖麻豆PLD有70%同源性, 另外2条有40%同源性。根据从拟南芥中cDNA克隆的先后顺序, 依次命名为PLD α 、PLD β 、PLD γ ^[4]。之后, 从拟南芥中克隆出了第4条cDNA, 与PLD γ 具有高度同源性, 命名为PLD γ_2 。与PLD β 相比, PLD α 和两种PLD γ 有更高的同源性, 其氨基酸序列有65%的同源性, 而与PLD β 仅有40%的同源性。

3 PLD基因家族结构

植物PLD由复杂的基因家族编码。在拟南芥PLD基因研究中, 已测定出7条编码PLD的基因(图1), 其中4条位于染色体IV, 2条位于染色体II, 1条位于染色体III。PLD α 基因位于染色体III, PLD β 基因位于染色体II, PLD γ 和PLD γ_2 基因位于染色体IV。PLD γ 基因簇中发现的第3种编码PLD基因, 命名为PLD γ_3 。染色体IV和II上的另外两条编码PLD基因标记为PLD δ_1 和PLD δ_2 ^[3]。

最先从蓖麻中分离出的PLD基因含有4个外显子和3个内含子^[5]。拟南芥PLD α 以及水稻PLD1

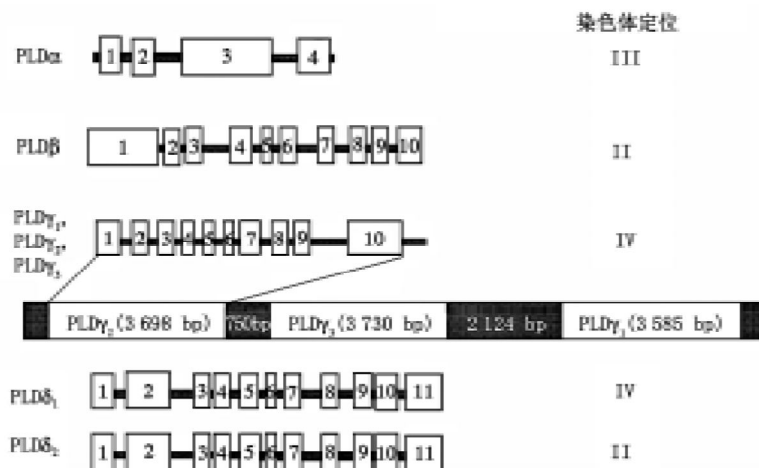


图1 拟南芥PLD基因家族结构及其在染色体定位^[3]

与蓖麻豆 PLD 有相同的基因结构^[12]。基因结构的保守性暗示不同种类植物 PLD 可能来源于同一祖先。拟南芥 PLD β 和 3 种 PLD γ 基因分别含有 10 个外显子。染色体 IV 上的 PLD γ_5 基因内含子、外显子间隔距离及基因片段长度相似, 而与 PLD β 基因明显不同。PLD γ_1 、PLD γ_2 和 PLD γ_3 分别长约 3 585、3 698、3 730 bp, PLD γ_2 与 PLD γ_3 间隔 750 bp, PLD γ_3 与 PLD γ_1 间隔 2 124 bp。PLD δ 基因均含有 11 个外显子, 并且结构相同。

4 基因表达

4.1 生长发育过程中 mRNA 水平的变化 通过 RNA 印记法检测技术, 发现 PLD α mRNA 在代谢水平旺盛的发育组织中含量丰富, 而在成熟组织中则大为减少, 在水稻、茴芹 (*Pimpinella brachycarpa*) 和大豆中 PLD α mRNA 在种子萌发期表达量增加^[3]。mRNA 转录水平的变化是其发育过程中启动子活性变化的结果。拟南芥中 PLD α 、PLD β 、PLD γ 可重叠表达, 但在同一组织中三者的表达量均不同^[4]。PLD α mRNA 在根、茎、花组织中含量最高, 叶、苗、果组织中含量次之, 而在干燥的种子中几乎没有。PLD γ mRNA 在根、花组织中含量较高, 果实中次之。PLD β mRNA 总体水平比 PLD α 或 PLD γ mRNA 低, 但其在发育过程中的转录调节不同, 某些组织中转录水平高, 果实、花、叶中的 PLD β mRNA 含量比 PLD α 和 PLD γ mRNA 高得多^[4]。

4.2 植物激素对 PLD 基因表达的影响 一些植物激素可以调节 PLD 启动子活性, 从而影响 PLD 基因表达^[5]。烟草幼苗以植物激素处理后, 如 ABA 可提高叶肉细胞和根部分支交叉区域 PLD 启动子活性; 咪喃甲基腺嘌呤和赤霉素则抑制叶中和分生组织中 PLD 启动子活性。拟南芥叶片以 ABA 和乙烯处理后, 其 PLD α RNA、蛋白和活性水平均有提高^[3]。

5 PLD 氨基酸序列结构

5.1 HKD 基序 真核生物中 PLD 氨基酸序列均包含 2 个 “HxKxxxD” 基序, 即 “组氨酸 x 赖氨酸 xxx 天门冬氨酸” 基序, 分别称为 HKD1 和 HKD2 (图 2)。植物中 HKD1 和 HKD2 两个基序相距约 320 个氨基酸^[13, 14]。HKD 基序是催化水解的活性部位, PLD 以保守的组氨酸残基对底物进行

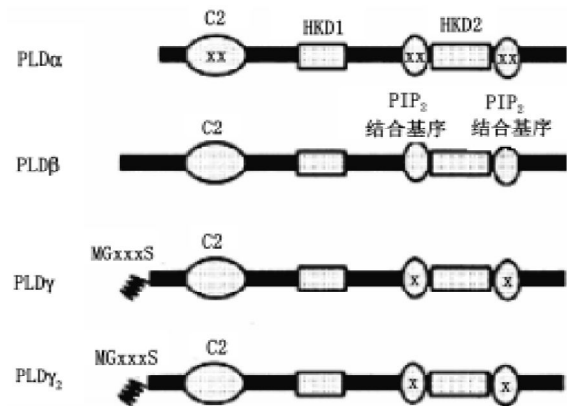


图2 PLD氨基酸序列结构^[15]

亲和攻击, 通过两步乒乓反应机制, 水解断裂 P—O 键^[13]。H、K、D 残基在 PLD 活性中的作用已在酵母 PLD 特异位点诱变实验中得到证明, 改变其中任何一个残基都会导致 PLD 活性的丧失^[13]。

5.2 Ca²⁺/磷脂结合 C2 区域 所有植物 PLD 的 N 末端均含有 C2 区域 (图 2), 该结构区域大概含有 130 个氨基酸残基, 是 Ca²⁺、磷脂以及其它效应物结合的区域^[11]。采用 X-衍射和核磁共振技术研究发现, C2 区域由 8 个 β 折叠组成三明治式结构, 每个 β 折叠由 4~5 个氨基酸残基组成^[14]。Ca²⁺ 可与 C2 区域内几个保守的酸性氨基酸残基结合, 定位于一个双向环状结构内。PLD β 与 PLD γ 的 C2 区域内分别具有 4~5 个结合 Ca²⁺ 的保守的酸性氨基酸残基, 而 PLD α 的 C2 区域内有 2 个结合位点 (xx) 分别被带正电荷和中性电荷的氨基酸所取代, 改变了 PLD α 与 Ca²⁺ 结合的专一性^[11]。因此, C2 区域的不同, 可能是 PLD α 与 PLD β 和 PLD γ 生化特征不同的结构基础。

5.3 PIP₂ 结合基序 在拟南芥 PLD β 中发现, 位于 C 末端第 2 个 HKD 基序附近含有 1 个 “RxxxxKxRR” 和 1 个 “RKxRxxxxR” 基序, 这两个基序与 PIP₂ 联结有关^[16] (图 2)。不仅 PLD β 和 PLD γ 活化时需要 PIP₂, Ca²⁺ 浓度低时 PLD α 也可为 PIP₂ 激活。实验证明, PLD α 、 β 、 γ 都是选择性地与 PIP₂ 结合。PLD γ 中的上述 2 个基序氨基酸残基与 PLD β 有较高同源性, 而 PLD α 中的序列同源性则较低, 一些残基为酸性氨基酸代替^[4]。三者 PIP₂ 结合区域上的不同导致与 PIP₂ 的结合能力有差异, 这也是 PIP₂ 进行活性调节的基础。

5.4 前导肽 根据测定纯化的PLD的N末端氨基酸序列, 人们推测 PLD α 含有一段前导肽序列。Wang 等^[2]的研究表明, 蓖麻 PLD 的 N 末端前有一段 30 个氨基酸的前导肽。在水稻和甘蓝 PLD 中也分别含有 46 和 35 个氨基酸的前导肽序列。前导肽在成熟过程中可能被去除, 其功能尚不清楚。而 PLD β 和 PLD γ 中是否含有前导肽也未确定。

5.5 修饰位点 序列分析表明, PLD 一级结构中有多个位点能够发生蛋白修饰作用, 包括糖基化、磷酸化和酰基化。拟南芥 PLD α 、 β 、 γ 分别含有 1、4、5 个糖基化位点。大豆 PLD 能与半刀豆素 A 相互作用, 半刀豆素 A 是一种血细胞凝集素, 是多聚糖抗体, 可特异吸附糖蛋白, 这暗示大豆 PLD 具有糖基化位点^[5]。磷酸化位点可通过依赖钙调蛋白激酶、蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶修饰。磷酸化修饰作用在哺乳动物 PLD 中已经得到证实, 而在植物 PLD 中还没有找到直接的证据。PLD γ N 末端含有一个十四烷基化保守序列“MGxxS”, 被认为是豆蔻酸化位点^[1](图 2)。豆蔻酸盐具有疏水性, 可使酶蛋白能够与膜脂联结; 另一方面, 蛋白质的豆蔻酸化作用对其结构稳定和调节与目的蛋白的相互作用非常重要^[3]。

6 活性调控

6.1 Ca²⁺调控 Ca²⁺是植物 PLD 重要的活性调节因子, 大多数植物 PLD 为 Ca²⁺ 依赖型, 对 Ca²⁺ 浓度需求也不同。拟南芥中 3 种 PLD 同工酶在不同 Ca²⁺ 浓度下的活性不同, PLD α 活性激活所需要的 Ca²⁺ 浓度达到毫摩尔水平, 而在相同条件下 PLD β 、PLD γ 活性则受抑制。PLD β 对 Ca²⁺ 的依赖性与 PLD γ 相似, 缺 Ca²⁺ 不表现活性, 最大活性的 Ca²⁺ 浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 毫摩尔浓度下活性受抑^[7](图 3)。实验表明 Ca²⁺ 调节 PLD α 活性与 pH 值有关。pH 4.5~5.5 条件下, PLD α 达到最大活性时需要微摩尔浓度的 Ca²⁺; pH 6.0 以上时, 活性达到最大值时则需要毫摩尔浓度的 Ca²⁺。PLD β 、PLD γ 对 pH 值不敏感, pH 6.0~7.5 下均表现活性, 最适 pH 为 7.0^[6]。

Ca²⁺ 调节 PLD 活性可能通过多种途径。其中一种可以通过与 PLD 分子之间联结, 改变酶分子构象, 使 PLD 易于与质膜联结或易于与底物进行催化反应。另外, Ca²⁺ 可以根据质膜的电荷和形

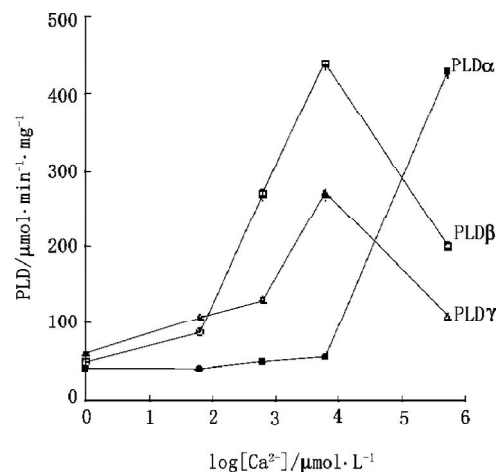


图 3 Ca²⁺ 浓度对 PLD α 、 β 、 γ 活性的影响^[7]

反应条件为: pH 7.0, 底物(0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 含有 87% (摩尔百分数) PE、5.1% PC、7.9% PIP₂。

状选择 PLD 膜定位点。序列分析表明, PLD 分子至少含有 1 个 Ca²⁺ 联结位点, 即 N 末端 C2 区域。Ca²⁺ 与 C2 区域联结后折叠, 并且这种联结可促进酶分子与质膜联结^[8]。

植物细胞质中 Ca²⁺ 浓度在 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 数量级, 而在细胞器内, 如内质网、液泡内 Ca²⁺ 浓度可达到 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。在外界环境刺激下, 如机械损伤、热、冷和渗透胁迫, 植物细胞内 Ca²⁺ 浓度便处于一种动态平衡状态, 促进 PLD 与质膜联结, 活性也随之变化, 进而发挥其功能^[9]。

6.2 PIP₂调节 PIP₂是调节 PLD 活性的另一个重要因子。PLD β 、PLD γ 对 PIP₂ 具有依赖性, PIP₂ 或磷脂肌醇(phosphatidylinositol phosphate, PIP) 不能为磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、PE、PG、磷脂酰肌醇磷酸(phosphatidylinositol, PI)或磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)取代^[3]。研究发现, 以 PC-PE-PIP 为底物时, PIP₂ 作为 PLD β 活性激活剂的最低浓度为 0.1% (摩尔百分数), 最大活性需 PIP₂ 为 7.9%。PLD α 在 Ca²⁺ 离子浓度达到或接近最适水平时, 其活性不依赖 PIP₂, 但在非最适水平($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时, PIP₂ 对其活性有激活作用。PLD α 在 PIP₂ 浓度达到 20% 前, 活性随浓度增加升高; PLD β 、PLD γ 则在 PIP₂ 浓度超过 8% 时, 活性受抑制^[15]。

PIP₂ 与 PLD 分子联结可能是其活性激活和/或与质膜联结的必要步骤。PLD 与 PIP₂ 之间的亲和

力依序为 $PLD\beta > PLD\gamma > PLD\alpha$ ^[15]。PLD与 PIP_2 联结需在 Ca^{2+} 浓度低于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时发生,这可能是由于 Ca^{2+} 和 PIP_2 竞争联结位点所致。目前,已发现植物PLD中含有2个 PIP_2 联结位点。一个是位于第2个HKD基序附近的 PIP_2 联结基序, $(R/K)_{xxxx}(R/K)_x(R/K)(R/K)$ ^[16]。PLD β 含有该基序; PLD γ 含有其中3/4精氨酸或赖氨酸残基; PLD α 中则有2个氨基酸残基发生改变,因而其与 PIP_2 的亲合力降低。另外一个结合位点是C2区域。在高浓度 Ca^{2+} 下, PLD α 无需 PIP_2 激活, Ca^{2+} 可以调整其构象,使其适于与底物结合,并联结至膜;而在低浓度 Ca^{2+} 下,带有负电荷的 PIP_2 通过与C2区域内带正电荷的R、K残基相互吸引作用,增加PLD α 与底物亲合的能力^[4, 9, 14]。PLD β 、PLD γ 对 PIP_2 的需求则与 Ca^{2+} 浓度无关,这暗示PLD α 对 PIP_2 的需求只是改变与底物的亲合力,而PLD β 、PLD γ 还与催化反应激活有关^[17]。

植物体内 PIP_2 分布不均匀,以质膜中含量最高。 PIP_2 对PLD β 、PLD γ 、PLD α 活性调节作用在质膜发生,因此与质膜 PIP_2 的含量变化决定了活性的变化。质膜 PIP_2 含量又与自由 PIP_2 有关。自由 PIP_2 处于动态平衡状态,外界环境变化可导致自由 PIP_2 含量发生变化,进而引起信号级联反应的发生^[18]。

6.3 其它活性调节因子 在对PLD α 、 β 、 γ 进行底物特异性实验过程中发现, PLD β 、 γ 活性激发需要底物中含有PE。PE是非片状结构的脂质,易于形成一种“headgroup”倒转的六角相构象^[19]。而倒转的六角相结构被认为是不易存在于生物膜中的,因此遂认为,非片状脂质是通过改变质膜弯曲率对质膜产生影响的,并进而导致膜联结PLD与底物的亲和力的变化^[19]。另外,三聚体G蛋白也可调控植物PLD活性;新霉素可抑制PLD β 和PLD γ 的活性;0.1%的正丁醇可抑制PLD α 、PLD β 和PLD γ 的活性^[3]。

7 PLD信号转导及其在细胞生理活动中的作用

7.1 信号转导作用 PLD酶水解磷脂生成PA和1个自由“headgroup”(如胆碱)^[7]。PA是细胞内信息传递的第二信号分子,有很多作用(图4)。PA可以激活蛋白激酶K(protein kinase, PRK)系列中的 Ca^{2+} 依赖性和非依赖性激酶(如protein kinase C, PKC)、细胞分裂激活蛋白激酶、PIP-5激酶、PLC和PLA2等。PA还可作为中间体参与脂类合成,如二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)、溶血磷脂酸(lysoPA)的游离脂肪酸的合成等。PA与其特异性蛋白结合可以介导NADPH氧化酶的活化。PA还是某些油脂生物合成的中心前体,因此它可以改变膜的成分。如PA可以去磷酸化形成DAG和自

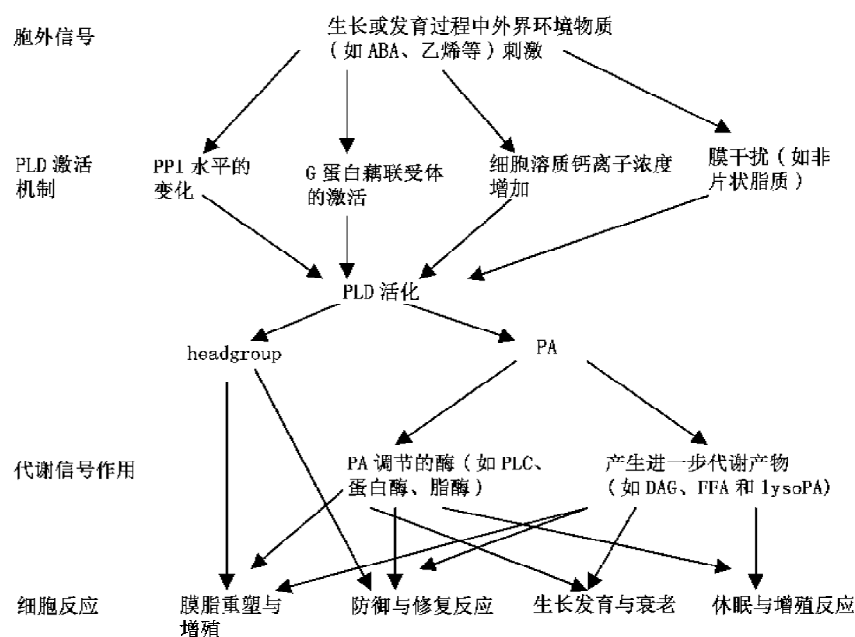


图4 植物PLD激活和信号转导机制^[20]

由脂肪酸(free fat acid, FFA),也可通过乙酰水解酶或PLA形成lysoPA。“headgroup”组分也有调节作用,与其有关的*N*-乙酰乙醇胺(*N*-aceayl-ethanolamine, NAE)与病原体入侵植物时的最初激发过程有关。“headgroup”也可与不同区域内的酰基形成新的磷脂,或与同一区域内的不同酰基反应,这一过程可以改变膜脂组成。

7.2 在细胞生理活动中的作用

7.2.1 介导植物激素的生理活动 PLD与种子萌发有关^[20]。在蓖麻、水稻和大豆种子发芽以及秧苗期,其PLD活力明显增高,而在干瘪水稻种子中无PLD表达。脱落酸(ABA)和赤霉素(GA)在种子休眠和萌发过程中是一对互为拮抗的调控因子,谷物中GA可提高淀粉酶的合成和分泌,将淀粉转化为萌发所需的能量,而ABA抑制此酶的分泌,推迟种子萌发。PLD酶解产物PA加入到大麦胚乳中会产生类似ABA对GA反应那样的抑制,并激发ABA诱导的基因表达,这提示PLD可能与控制种子萌发中信号介导有关系。

PLD在植物衰老过程中起作用^[21]。将ABA注入离体的PLD功能缺失植株的叶中后,叶衰老明显滞后,具体表现为叶黄化延迟,并仍保持较高的叶绿素含量和光合活性,磷脂含量无明显下降等。未作ABA处理的PLD功能缺失植株与非功能缺失植株的离体叶片在衰老进程上无明显差别,且二者的生长发育也没有明显差异。因此可以认为,PLD并非直接促进植物衰老,而是在植物激素导致的衰老过程中起介导作用。

ABA通过影响调节气孔保卫细胞膨压的因子而调节气孔的开闭^[22]。ABA能够活化非选择性Ca²⁺通道,使细胞膜去极化,从而增加K⁺引起的气孔关闭;同时,ABA使K⁺进入通道失活,而激活K⁺流出通道,便进一步增进气孔关闭。研究ABA如何调节离子通道活性变化的结果表明,PLD介导了ABA对离子通道的影响^[22]。用PA处理保卫细胞抑制K⁺内流,可诱导气孔关闭并抑制气孔开放。用PLD转磷酸基竞争性抑制剂1-丁醇处理细胞时,ABA不能诱导PA的产生,可部分削弱ABA对气孔打开的抑制以及对气孔关闭的诱导。这一现象提示,在保卫细胞中ABA可活化PLD而产生PA,PA再进一步与ABA诱导的细胞

反应发生联系。

7.2.2 抗逆反应 在众多胁迫条件(如病原体侵入、辐射、创伤等)下,植物PLD调节的生理活动都显著增强。如水稻抗病性植株在受到一种特异病原体侵染后,PLD基因表达量增高,而易感病的植株则无增加现象^[23]。荧光抗体标记的结果显示,随着病原体的侵入,抗性植株PLD逐渐聚集于质膜上病原体的侵入位点,而易感病的植株则均匀分布。这暗示PLD表达量与质膜上分布变化的差异可能是植株抗病性有异的原因。

又如 γ 射线作用下,花椰菜花瓣组织中积累PA和氧化脂质^[24]。PLD \rightarrow PA 磷脂酶 \rightarrow 酰基水解酶是分解自由脂肪酸的主要途径,自由脂肪酸和氧化脂质如茉莉酮酸(jasmonic acid, JA)有调节细胞防御辐射胁迫的功能。番茄在UV-射线辐射下,PLD介导的JA合成途径,可激活防御和修复基因功能。机械创伤作用下,植物体内PA含量迅速增加2~4倍^[25]。自由胆碱水平提高而磷酸胆碱水平无明显变化,暗示PA含量提高是由于PLD活性的提高,而非PLC或DAG激酶引起。其机制是PLD活性激活后,PLD介导的信号转导激活亚麻酸积累,于是JA合成,进而激活防御基因的表达。

7.2.3 膜脂重塑与增殖 植物细胞的许多生理功能与膜脂组成有关。PA是调节甘油酯,如磷脂、糖脂类、甘油三酯的中心物质^[26],PLD水解磷脂后释放的PA和“headgroup”是合成甘油酯的底物。甘油酯合成的变化,可引起生长/分化/防御应急反应过程中质膜组成发生变化。在新生和生长的组织内,如出芽分生组织、下胚轴和腋芽中,PLD基因高效表达。PLD在细胞生长增殖过程中起促进有丝分裂信号的作用,并为膜脂合成和重塑提供中间体。

此外,PLD在高尔基体中的新生小泡释放、胞吞和胞吐以及细胞极性分化等植物生理过程中也有作用^[3]。

8 结束语

自1947年Hanahan和Chaikoff^[27]在胡萝卜中首次发现磷脂酶D以来,人们相继在多种植物中获得提纯。同时,有关PLD的生化性质、基因结构、一级结构的研究也有了很大突破^[1~3]。用

从蓖麻、烟草、拟南芥等中克隆得到的 P L D cDNA 已成功地获得蓖麻、烟草和拟南芥的转化植株, 从而获得了许多具有特殊性状的植株及其后代。这类转化植株与野生型相比, 均明显提高抗冻性、耐盐能力、种子萌发和幼苗生长速度, 衰老过程延缓^[14]。这些结果表明 PLD 在植物细胞生理过程中是重要的, 给植物育种开拓了良好的前景。另外, 由于它在多种代谢途径中有调控作用^[20~26], 因而, 近年来其与信号转导已成为研究的热点。随着研究的进一步深入, PLD 的功能和其参与信号转导的研究将会有新的突破。

参考文献

- Heller M. Phospholipase D. *Adv Lipid Res*, 1978, 16: 267~326
- Wang X, Xu L, Zheng L. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem*, 1994, 269: 20312~20317
- Wang X. Multiple forms of phospholipase D in plant: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular function. *Prog Lipid Res*, 2000, 39: 109~149
- Xu L, Zheng S, Zheng L et al. Promoter analysis and expression of a phospholipase D gene from castor bean. *Plant Physiol*, 1997, 115: 387~395
- Qin W, Pappan K, Wang X. Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLD γ and regulation of PLD γ , β , and α by polyphosphoinositides and calcium. *J Biol Chem*, 1997, 272: 28267~28273
- Rakhimov MM, Mad'Yaroy SR, Kholodkova TI et al. Influence of calcium ions on the enzymatic hydrolysis of phospholipids as a function of the physical state of the substrate. *Biochem*, 1978, 43: 343~353
- Pappan K, Wang X. Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1439: 151~166
- Ryu SB, Wang X. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochem Biophys Acta*, 1996, 1303: 243~250
- Knight MR, Smith SM, Trewavas AJ. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4967~4972
- Pappan K, Zheng S, Wang X. Identification and characterization of a novel plant phospholipase D that requires polyphosphoinositides and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*. *Biol Chem*, 1997, 272: 7048~7054
- 林芳, 许智宏, 薛红卫. 植物信号传导中的磷脂酶. *植物学报*, 2001, 43(10): 991~1002
- Dyer JH, Zheng H, Wang X. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D from *Arabidopsis* (Accession No. U36381) (PGR 95-096). *Plant Physiol*, 1995, 109: 1497
- Pointing CP, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that include phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci*, 1996, 5: 914~922
- 崔德才, 温孚江. 磷脂酶D(PLD)在植物信号转导中的作用. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2000, 31(2): 115~119
- Pointing CP, Parker PJ. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs δ , ϵ , η , θ , phospholipases GAPs, and perforin. *Protein Sci*, 1996, 5: 162~166
- Shao X, Davletov BA, Sutton RB et al. Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science*, 1996, 273: 248~251
- Drobak BK. Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol*, 1993, 102: 705~709
- Hetherington AM, Drobak BK. Inositol-containing lipids in higher plant. *Prog Lipid Res*, 1992, 31: 53~63
- Cullis PR, Hope MJ, Tilcock CPS. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipid*, 1986, 40: 127~144
- Wang X, Dyer JH, Zheng L. Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 306: 486~494
- Fan L, Zheng S, Wang X. Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 1997, 9: 2183~2196
- Leung J, Giraudat J. Abscisic acid signaltransduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 199~222
- Young SA, Wang X, Leach JE. Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Cell*, 1996, 8: 1079~1090
- Voisine R, Vezina L, Willemot C. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of Q-irradiated cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiol*, 1993, 102: 213~218
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 12053~12058
- Kent C. Eukaryotic phospholipids biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 315~343
- Hanahan DJ, Chaikoff IL. A new phospholipid-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J Biol Chem*, 1947, 169: 699~705