

植物磷脂酶 D 的分子生物学研究进展

王国泽, 贾晋, 莎娜 (内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头 014010)

摘要 综述了植物磷脂酶 D (PLD) 的基因研究进展及 PLD 的分类、结构和功能, 并对 PLD 的应用前景进行了展望。

关键词 PLD; 基因研究; 结构; 功能

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 21 - 09885 - 03

Research Progress on Biology Molecular of Phospholipase D in Plants

WANG Guo-ze et al (College of Mathematical, Physical Sciences and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010)

Abstract Prospected the research progress of phospholipase D (PLD) gene and its classification, structure and function. And prospected the application foreground of PLD.

Key words PLD; Gene research; Structure; Function

PLD 是大约半个世纪以前首先在植物中发现随后又在动物、真菌和细菌中发现的一种酶类, 它是植物体内主要的磷脂酶 (PLA1、PLA2 为动物体内主要的酶, PLC 在微生物中较丰富), 广泛存在于植物的各种组织中, 成熟初期的种子、萌发初期的幼苗以及生长和代谢活跃的部分 PLD 含量更为丰富。PLD 酶最先由 Hanahan 等从胡萝卜根和菠菜叶的提取物中得到^[1-3], 但由于 PLD 酶的多型性和不稳定性, 在此后很长的一段时间内人们一直认为只有植物中才含有 PLD。直到 1978 年才在动物和微生物 (细菌、真菌) 体内发现 PLD^[4-7], 并发现 PLD 不仅与细胞膜的结构及稳定性有关, 而且对胞内蛋白激酶、肌动蛋白的有序组织、细胞分裂的发生、膜泡运输、分泌作用等都具有重要的调控作用^[8-12]。磷脂酶 D 是一类特殊的酯键水解酶, 它可催化水解磷脂分子中的磷酸和有机碱羟基形成的酯 (即 4 位酯键), 水解产物为磷脂酸和有机碱。此外, 在特定条件下, PLD 还可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, 这一特性称为磷脂酶 D 的磷脂转移特性通常也称碱基交换反应^[13]。利用这一特性可对磷脂进行改性, 制备高纯度的单一磷脂和稀有磷脂。分子生物学的发展加快了人们对 PLD 的了解。所获得的分子信息使基因操纵 PLD 和了解 PLD 的细胞功能成为可能, 笔者综述了 PLD 的基因研究概况、PLD 的分类、结构和功能, 以期对相关研究提供参考。

1 磷脂酶 D (PLD) 的基因研究

Hanahan 等最先从胡萝卜根和白菜叶的提取物中获得 PLD 酶, 揭开了 PLD 研究的序幕^[3]。植物 PLD 主要集中于叶片、根和种子等器官中, 并随着植物生长发育的转变而变化。但磷脂酶 D 酶源狭窄且在生物体内含量极微, 提纯相当困难; 另外, PLD 酶的稳定性较差, 且只能在异相系统中发挥作用。由于 PLD 酶在生物体内的功能和作用机理尚不清楚, 且对其膜的结构缺乏了解。因此, 磷脂酶 D 的生物化学及分子生物学方面的研究一直没取得重要进展。1994 年王学敏等^[14]以萌发中蓖麻种子的子叶为试材, 经过提取、分

离与纯化, 获得有活性的 PLD 酶。他们以纯化的 PLD 酶的 N-端氨基酸序列为寡聚核苷酸探针, 从蓖麻中分离得到了 PLDcDNA 序列, 该序列是一个包含 2 426 个碱基对的开放阅读框架, 编码 808 个氨基酸的核苷酸序列, 转化和表达试验证明, 所获得的 cDNA 为 PLD 基因。随后获得的 3 种拟南芥 EST cDNA 克隆与蓖麻子 PLD 一样, 也具有重要的序列。其中一种 EST cDNA 克隆与已克隆到的蓖麻子 PLD 有大约 70% 的序列同源性, 另外 2 种 EST cDNA 克隆与 PLD 的序列同源性为 40% 左右。3 种 PLD 的 cDNA 全长序列是利用 5'-cDNA 末端从拟南芥中迅速扩增, 并结合 PCR 循环和 cDNA 文库筛选得到的^[15]。到目前为止, 已从蓖麻子^[14]、拟南芥^[15]、草莓^[16]、豇豆^[17]、甘蓝^[18]、烟草、茴芹^[19]、垂头菊、棉花^[20]、水稻^[21]、玉米^[21]中分离克隆到完整的 PLDcDNA 序列且其中已有部分得到纯化^[22-23]。

2 PLD 分类

目前, 已从多种植物中克隆分离出了 PLD。PLD α 、PLD β 和 PLD γ 是依据其从拟南芥中克隆的顺序命名的^[15]。到目前为止, 在拟南芥中已鉴别出 12 种 PLD 基因, 依据基因构建、序列相似性、域的结构、生化性质和 cDNA 克隆顺序可将 PLD 分为 PLD α (1, 2, 3)、PLD β (1, 2)、PLD γ (1, 2, 3)、PLD δ 、PLD ϵ 及 PLD ζ (1, 2)6 类 (图 1)^[24]。另外, 可能来自于选择性剪切的 2 种 PLD δ cDNA 变体 PLD δ a 和 PLD δ b, 已被克隆出来^[25-26]。即拟南芥中 PLD 同工酶总数已超过 12 种。从植物中克隆的 PLD 基因多属于 PLD α ^[27], 包括拟南芥 PLD α 、甘蓝 PLD1 和 PLD2, 双子叶植物中 PLD 氨基酸序列的同源性约为 75 ± 80%, 而单子叶植物 PLD 氨基酸序列的同源性则为 90%。PLD β 与 PLD γ 的氨基酸和核苷酸序列较接近, 在氨基酸序列水平上, PLD β 与 PLD γ 大约具有 65% 的同源性, 而 PLD β 与拟南芥 PLD α 的同源性则大约为 40%。PLD γ 包括拟南芥 PLD γ 1 和 PLD γ 2, 两者具有 85% 以上的同源性。PLD β 包括拟南芥 PLD β 及一类来源于棉花的 PLD。

区分 PLD 的依据是伴随序列排列产生的具有共同催化特性和基因结构但种类不同的 PLD, PLD α 是常规植物中 PLD 的存在形式, 其最明显的特征是在体外达到最大活力时需 Ca²⁺ 催化。相似的情况在蓖麻籽 PLD^[14], 拟南芥 PLD α ^[28], 水稻 PLD1^[21] 及甘蓝 PLD^[29] 也得到了证实。已有研究表明, 拟南芥 PLD α 、水稻 PLD1 和蓖麻籽 PLD 具有相同

基金项目 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY07105)。

作者简介 王国泽 (1975 -), 女, 内蒙古教汉族人, 博士, 副教授, 从事农产品加工与贮藏方面的研究。

收稿日期 2009-04-01

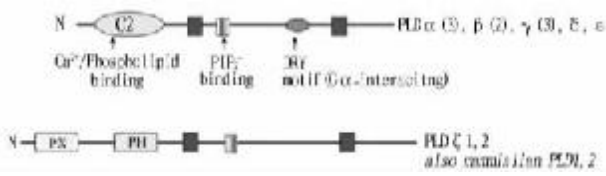


图1 拟南芥 PLD 结构域中的 C2-PLD 和 PX/PH-PLD

Fig. 1 C2-PLD and PX/PH-PLD in domain of *Arabidopsis thaliana* PLDs

的基因结构,说明来自不同植物的 PLD α 具有相同的基因系统及催化功能,而 PLD β 和 PLD γ 的催化特性与 PLD α 明显不同。

3 PLD 结构和功能分析

PLD 是一个多基因家族,具有多分子异质性,cDNA 序列具有高度保守性^[30]。植物中所有 PLD 基因都包括 2 个 H \times K \times \times \times D 基序,即 HKD1, HKD2。两基序间隔 320 个氨基酸。HKD 分别为 His(组氨酸)、Lys(赖氨酸)、Asp(天冬氨酸)。另外 HDK 基序还存在于其他磷脂合成酶中,例如病毒、细菌中的 PS(磷脂酰丝氨酸)合成酶和心磷脂合成酶^[30],说明这些酶可能具有 PLD 的一些特性,同时也说明 PLD 具有合成磷脂的功能。HKD 基序是 PLD 的标志序列,也是催化水解的活性部位。

植物中 PLD α 为酸性磷脂酶,细胞 pH 值为 4.5~5.0 时具有较高的活性。PLD β 的基因同源率为 75%,基因长度为 2 863 个碱基对,编码区为 +93~+968,分子量为 109 kD。PLD γ 的基因同源率为 85%,基因长度为 3 234 个碱基对,编码区为 +312~+2872,共编码 855 个氨基酸,分子量为 96 kD,PI 为 6.9。PLD γ 与 PLD β 的基因同源率为 66%,PLD γ 与 PLD α 的基因同源率为 41%,可见,PLD β 与 PLD γ 的结构更相似。根据 PLD 序列的分析结果,可将拟南芥 PLD 分为 2 类:C2-PLD 和 PX/PH-PLDs^[24]。前一类包括 PLD α 、PLD β 、PLD γ 和 PLD δ ,这些 PLD 都具有一个 Ca²⁺ 依赖性磷脂结合的折叠结构区域即 C2 结构域(图 1)^[24,31];后一类 PLD 由 PLD ζ 组成,其拥有 PX 和 PH 结构域,PX 结构域首先从 p47^{phox} 蛋白中鉴定分离出来,它是噬菌细胞 NADPH 氧化酶的一种成分^[32],该蛋白组分具有一个保守的富含脯氨酸的序列,可使磷酸肌醇和蛋白质与 SH3 结构域结合。由图 2 可知,7 种 PLD 基因中 4 种 PLD 基因位于染色体 IV,2 种 PLD 基因位于染色体 II,1 种 PLD 基因位于染色体 III。其中,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 位于染色体 IV^[33],另外 3 种 PLD 基因的 cDNA 还没有被分离出来,因此,这些基因是否表达还不十分清楚。在 PLD γ 基因簇中,第 3 个基因被命名为 PLD γ 3 (AL07806, 染色体 IV)。根据基因结构、基因之间氨基酸序列的同源性及已克隆的 PLD cDNA 尝试性的将染色体 IV (AF013293) 和 II (AC004708) 上的基因分为第 4 类,即 PLD δ 1 和 PLD δ 2。基因结构的保守性说明不同植物种类的 PLD α 具有相同的祖先。来自拟南芥的 PLD β 和 3 种 PLD γ 基因都由 10 种外显子组成。染色体 IV 上顺序排列的 3 种 PLD γ 基因簇具有相似的外显子-内含子空间序列模式,但其与 PLD β 基因具有明显区别,而 2 种 PLD δ 基因具有 11 种外显子和相同的基因结构。

最近已从拟南芥中鉴定出了含 SH3 的蛋白,研究表明,

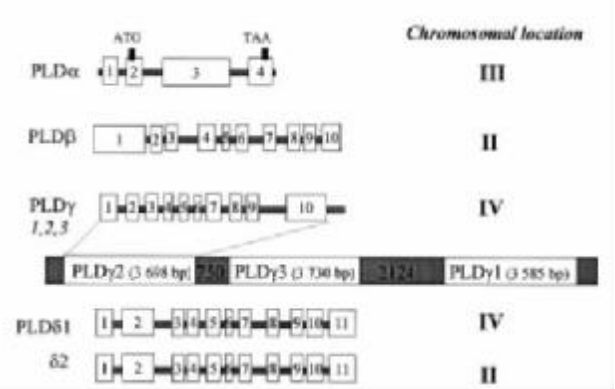


图2 拟南芥 PLD 基因结构和染色体组成

Fig. 2 The gene structure and chromosome composition of PLD in *Arabidopsis thaliana*

这些蛋白在运输包被网格蛋白的泡囊中起着重要作用^[34]。PH 结构域大约含有 120 个氨基酸序列,目前已在 100 多种蛋白质中发现了此种序列^[35]。PH 结构域与磷酸肌醇结合后其特异性改变。另外,哺乳动物 PLD 也具有 PX/PH 结构域^[36-37]。事实上,PLD ζ 结构域的结构和序列与哺乳动物 PLD 的相似性较其与拟南芥 PLD 的相似性更高。

4 前景与展望

PLD 在植物生长过程中起着重要作用,如种子萌发、成熟及植株衰老等。另外,PLD 还可增强植物对不良环境的抵御能力,如机械损伤、霜冻、冷害等。目前,利用从蓖麻、烟草、拟南芥等植物中克隆的 PLD 的 cDNA,通过构建 PLD 的超表达结构和 PLD 的反义基因,已成功获得蓖麻、烟草、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。与正常植株相比,转反义 PLD α 植株可明显延迟脱落酸和乙烯催化的拟南芥叶片衰老,表现为叶片黄化延迟、离子渗漏降低、光合作用增加。另外,转化植株的抗寒性明显高于野生型,在逐渐诱导下,转基因拟南芥在 -10℃ 下仍可旺盛生长,植株健壮,而野生型拟南芥几乎不能存活。转反义 PLD γ 基因的拟南芥植株耐盐能力大大提高,种子萌发速度和幼苗生长健壮程度显著大于非转基因植株。说明 PLD 是多功能基因,在植物育种中具有广阔的应用前景。将转基因技术和常规育种技术相结合,可选育出具有抗旱、抗寒、抗病或抗盐等性状的种质,大大降低各种生物胁迫和非生物胁迫对植物的破坏程度。

随着科学技术的不断发展,PLD 的分子生物学研究将取得更大的成就和可喜的应用成果。

参考文献

- [1] HANAHAHAN D J, CHAIKOFF I L. The phosphorus-containing lipids of the carrot[J]. J Bio Chem, 1947, 168: 233-240.
- [2] HANAHAHAN D J, CHAIKOFF I L. A new phospholipid-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping[J]. J Bio Chem, 1947, 169: 699-705.
- [3] HANAHAHAN D J, CHAIKOFF I L. On the nature of the phosphorus-containing lipids of cabbage leaves and their relation to a phospholipid-splitting enzyme contained in these leaves[J]. J Bio Chem, 1948, 172: 191-198.
- [4] SIATO M, KANFER J. Phosphatidylhydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction[J]. Arch Biochem Biophys, 1975, 169: 318-323.
- [5] HELLER M. Phospholipase D[J]. Adv Lipid Res, 1978, 16: 267-326.
- [6] HAMMOND S M, ALSHULER Y M, SUNG T, et al. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family[J]. J Biol Chem, 1995, 270:

- 29640–29643.
- [7] CHALIFOUR R J, KANFER J N. Microsomal phospholipase D of rat brain and lung tissue[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1980, 96: 742–747.
- [8] MUNNIK T, IRIVINE R F, Musgrave A. Phospholipid signalling in plants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1398: 222–272.
- [9] WANG X. The role of phospholipase D in signal transduction cascade [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 456–462.
- [10] COLLEY W C, SUNG T, FROHMAN M A. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization [J]. *Curr Biol*, 1997, 7: 191–201.
- [11] BOWMAN E P, UHLINGER D J, LAMBETH J D. Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 21509–21512.
- [12] COCKCROFT S. Phospholipase D: regulation by GTPase and protein kinase C and physiological relevance [J]. *Prog Lipid Res*, 1996, 35 (4): 345–370.
- [13] WAITE M. The phospholipase [M]. New York and London: Plenum Press, 1987: 467.
- [14] WANG X, XU L, ZHANG L. Cloning and expression of phosphatidylcholine -hydrolyzing PLD from *Ricinus communis* L. [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 20312–20317.
- [15] QIN W, PAPPAN K, WANG X. Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLD γ and regulation of plant PLD γ , - β and - α by polyphosphoinositides and calcium [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 28267–28273.
- [16] YUAN H Y, CHEN L G, PALIYATH G, et al. Murr characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D α cDNA from strawberry fruits [J]. *Plant Physiol Bio*, 2005, 43: 535–547.
- [17] AMADIOHA A C, OBI V I. Control of anthracnose disease of cowpea by *Cymbopogon* [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 1257–1265.
- [18] PANNENBERG I, MANSFELD J, ULBRICH-HOFMANN R. Identification of two isoenzymes (accession nos. AF090444 and AF090445) of phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1102.
- [19] CHA Y Y, LEE K W, KIM J C, et al. Nucleotide sequence of a cDNA encoding phospholipase D (accession no. U96438) from *Pimpinella bruchycurpu* (PGR 97-092) [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114: 1135–1136.
- [20] NYKIFORUK C, LAROCHE A, WESELAKE R J. Isolation and sequence analysis of a novel cDNA encoding a putative diacylglycerol acyltransferase from a microspore-derived cell suspension culture of *Brassica napus* L. cv Jet Neuf (Accession No. AF155224) [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120: 1207.
- [21] UEKI J, MORIOKA S, KOMARI T, et al. Purification and characterization of phospholipase D (PLD) from rice and cloning of cDNA for phospholipase D from rice and maize [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 903–914.
- [22] YASSINE BEN ALIA, FRÉDÉRIC CARRIÉREA, ABDELKARIM ABOUSALHAMA. High-level constitutive expression in *Pichia pastoris* and one-step purification of phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 51: 162–169.
- [23] YOSHIKI Y, EMMANUELLE D, CATHERINE A, et al. Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLD γ , an *Arabidopsis thaliana* phospholipase D [J]. *FEBS Letters*, 2008, 582: 685–690.
- [24] WANG X M. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses plant [J]. *Physiology*, 2005, 139: 566–573.
- [25] KATAGIRI T, TAKAHASHI S, SHINOZAKI K. Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD δ , in dehydration-inducibile accumulation of phosphatidic acid in stress signaling [J]. *Plant J*, 2001, 26: 595–605.
- [26] WANG C, WANG X. A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1102–1112.
- [27] WANG X. Plant phospholipases [J]. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol*, 2001, 52: 211–231.
- [28] LU F, ZHENG S Q, WANG X M. Antisense suppression of phospholipase D1 retards abscisic acid and ethylene-promoted senescence of post-harvest *Arabidopsis* leaves [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9: 2183–2196.
- [29] ABOUSALHAM A, RIVIERE M, TEISSERE M, et al. Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1158: 1–7.
- [30] WANG X M. The role of phospholipase D in signal cascades [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120: 645–651.
- [31] ZHENG L, KRISHNAMOORTHY R, ZOLKIEWSKI M, et al. Distinct Ca^{2+} binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 19700–19706.
- [32] SATO T K, OVERDUIN M, EMR S D. Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains [J]. *Science*, 2001, 294: 1881–1885.
- [33] WANG X. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions [J]. *Progress in Lipid Research*, 2000, 39: 109–149.
- [34] LAM B C, SAGE T L, BIANCHI F, et al. Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 2499–2512.
- [35] LEMMON M A, FERGUSON K M. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains [J]. *Bio Chem J*, 2000, 350: 1–18.
- [36] FROHMAN M A, SUNG T C, MORRIS A J. Mammalian phospholipase D structure and regulation [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1439: 175–186.
- [37] LISCOVITCH M, CZARNY M, FIUCCI G, et al. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family [J]. *Biochem J*, 2000, 345: 401–415.

(上接第 9880 页)

而消化主要发生在后胃部分^[8]。同时后胃细胞较大, 可通过胞吞作用进行营养物质的吸收。笔者试验中观测到细胞内含有较多的嗜伊红颗粒和空泡, 这可能就是胞吞作用所吸收的营养大分子物质。

参考文献

- [1] WALKER K F. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786 [J]. *Hydrobiologia*, 1981, 81: 159–167.
- [2] CIROS-PEREZ J, GOMEZ A, SERRA M. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *Bibericus* sp. [J]. *Journal of Plankton Research*, 2001, 23 (12): 1311–1328.
- [3] Y'UFERA M. Studies on *Brachionus* (Rotifera): an example of interaction between fundamental and applied research [J]. *Hydrobiologia*, 2001, 446/447: 383–392.
- [4] SNELL T W, JANSSEN C R. Rotifers in ecotoxicology: a review [J]. *Hydrobiologia*, 1995, 313/314: 231–247.
- [5] 周利, 相建海, 郑严. 不同年度收存的褶皱臂尾轮虫休眠卵的孵化机制与胚胎激活效果的研究 [J]. *海洋与湖泊*, 2002, 33 (6): 648–656.
- [6] KLEINOW W. Stereopictures of internal structures and trophi of rotifers [J]. *Hydrobiologia*, 1998, 387/388: 123–129.
- [7] GIULIO MELONE. The rotifer corona by SEM [J]. *Hydrobiologia*, 1998, 387/388: 131–134.
- [8] KLEINOW W, WRATIL H, Kühle K, et al. Electron microscope studies of the digestive tract of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) [J]. *Zoomorphology*, 1991, 111: 67–80.
- [9] YU J P, CUI S J. Ultrastructure of the rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. *Hydrobiologia*, 1997, 358: 95–103.
- [10] 周雪莹, 崔龙渡, 陆瑶. 幼龄皱纹盘鲍消化系统的组织学研究 [J]. *烟台大学学报*, 2001, 14 (2): 125–130.
- [11] WURDAK E S, GILBERT J J. Polymorphism in the rotifer *Asplanchna sieboldi*: fine structure of saccate, cruciform and campanulate females [J]. *Cell Tissue Res*, 1976, 169 (4): 435–448.
- [12] WURDAK E S. Ultrastructure and histochemistry of the stomach of *Asplanchna sieboldi* [J]. *Hydrobiologia*, 1987, 147: 361–371.