

植物磷脂酶D 对环境胁迫的响应 和传导信号的功能*

王国泽, 茅林春, 潘 炘

(浙江大学 生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029)

[摘 要] 磷脂酶D (PLD) 是一种分解磷脂的多功能酶。文章介绍了PLD 的生化特性及其在信号转导中的作用, 概述了PLD 的调控机制及在机械损伤、低温、高渗透压、激素和微生物等环境胁迫下的响应。

[关键词] PLD; 信号转导; 环境胁迫

[中图分类号] Q 556⁺. 1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0147-08

磷脂酶D (PLD), 即磷脂酰胆碱磷脂水解酶 (EC 3.1.4.4), 是催化磷酸二脂酯键水解和碱基交换反应的一类酶的总称, 由Hanahan 在1947 年首次从胡萝卜中分离得到。PLD 分布在细菌到高等动植物的许多生物中, 具有宽广的底物特异性, 能广泛作用于许多磷脂及磷脂衍生物。近年来, 有关该酶的研究倍受关注, 许多研究表明^[1~7], PLD 的作用不仅在于通过水解细胞膜中的磷脂而影响膜的结构、功能和稳定性, 而且在信号转导、激素作用的发挥、细胞骨架组装、胞内蛋白激酶和肌动蛋白的有序化、细胞分裂的发生、穿膜运输、分泌作用、防御反应以及种子萌发和细胞衰老中都起重要作用。植物体的新陈代谢和生长发育主要受遗传基因和环境信息的调节控制。遗传基因规定个体发育的潜在模式, 而且在很大程度上受控于环境信息。近年来, 人们越来越注意到与信号转导有关的植物环境刺激因子的研究, 包括机械损伤、渗透胁迫、低温、激素、微生物等。PLD 和磷脂酸(PA) 参与细胞对一系列胁迫环境的反应, 但迄今仍不完全清楚PLD 的许多作用机理。

1 PLD 的生化特性及其在信号转导中的作用

对植物中PLD α 、PLD β 、PLD γ 、PLD δ 和PLD ζ 的生化特点研究表明^[6], 它们对Ca²⁺、PIP₂ (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate) 和游离脂肪酸的依赖程度不同, 种依赖性和对底物的选择性

为不同PLD 提供了一系列的识别特征。核苷酸和氨基酸序列的同源性和差异也预示着各种类型的PLD 在特性和功能上的共同点及区别。PLD α 是植物PLD 中最普遍的一种, 催化磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰甘油(PG)的水解, 但不能作用于磷脂酰肌醇(P)和磷脂酰丝氨酸(PS)的水解; 水解时需要Ca²⁺ (一般在20~ 100 mmol/L) 的协助, 才能表现出活性或最佳活性, 在钙离子浓度低时PIP₂ 也可激活PLD α ^[8~10]。PLD β 和PLD γ 除可催化PC、PE 和PG 外, 还可催化PS 和NAPE (N-乙酰PE), 其要求的Ca²⁺ 浓度为微摩尔浓度(μ mol/L), 在Ca²⁺ 浓度从 μ mol/L 上升至mmol/L 时活性逐渐增加, 至mmol/L 时活性则呈降低趋势。PLD α 在PC 单独作为底物时即可起作用, 而PLD β 的作用需要PIP₂ 协助, 即具有PIP₂ 依赖性^[11]。不同PLD 对钙离子和底物的不同要求, 存在着不同的激活机制。PLD δ 的特征是需要油酸激活, 其他的不饱和脂肪酸, 如亚油酸和亚麻酸的效果不及油酸, 至于硬脂酸和棕榈酸等饱和脂肪酸则完全没有效果。与含有C2 结构域的PLD 不同, 激活含PX (Phox homology)/PH (Pleckstrin homology) 结构域的PLD ζ 不需要Ca²⁺ 的参与。PLD ζ 需PIP₂ 的激活, 但与PLD β 和PLD γ 不同, 它的活性不需要PE 参与^[12]。另外, PLD 能与几种膜脂作用, PLD ζ 只选择性地水解PC。

由于PLD 既参与细胞膜的生物合成又参与其降解, 所以PLD 的基本功能是维持细胞膜的结构和

* [收稿日期] 2004-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371002)

[作者简介] 王国泽(1975-), 女, 内蒙古赤峰人, 在读博士, 主要从事果蔬采后生物技术研究。E-mail: lycw_gz@sohu.com

[通讯作者] 茅林春(1962-), 男, 浙江杭州人, 教授, 博士生导师, 主要从事果蔬采后生物技术研究。E-mail: linchun@zju.edu.cn

功能。细胞膜中脂质的组成经常发生改变,有助于植物在变化的环境条件下调整细胞膜的生理生化特性,从而发挥最佳的生物学功能。PLD 活性失控会造成细胞膜功能紊乱,因此会导致不可逆的膜伤害,失去动态平衡^[13]。

由磷脂酶水解磷脂产生第二信使物质进行信号传递的过程称为磷酸—肌醇途径^[11]。在这一途径中,存在于细胞膜表面的信号受体是一种小分子蛋白(R),R 蛋白接受外部信号后构象发生改变,通过膜中的效应器激活膜中的磷脂酶(放大器),磷脂酶将磷脂水解,产生第二信使物质^[11]。PLD 为磷酸二酯酶,能催化磷酸二酯键水解,根据水解的磷脂不同可产生三磷酸肌醇(IP₃)、二脂酰甘油(DAG)、乙酰胆碱和磷脂酸(PA)等。IP₃、DAG、PA 及乙酰胆碱都是胞内第二信使物质,通过引起胞内Ca²⁺以及蛋白激酶K(PRK)系列中钙依赖性和钙非依赖性蛋白激酶(PKC)、促分裂蛋白激酶和PIP-5(phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases)激酶等的变化,引发一系列次级反应,进而完成细胞对外部信号的响应过程。对植物研究的大量资料表明^[14,15],PLD 可以通过一种或几种功能影响细胞活动,包括产生信使,与细胞的重要成分相互作用,改变离子流量,改变脂质组成和细胞膜的物理性质以及促进脂质的降解等。据报道^[7,16],PA 是一类脂质信使,能激活MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号流。Ca²⁺依赖蛋白激酶、NADPH 氧化酶和离子通道的活性。PA 与特异性蛋白结合,结合产物介导了NADPH 氧化酶的活化。其他可被PA 激活的酶,如PIP-5 激酶、磷脂酶C(PLC)、磷脂酶A₁(PLA₁)和磷脂酶A₂(PLA₂)均可参与脂质信号转导。PA 除作为直接的信号外,还可进一步代谢为其他脂质体,如DAG、溶血PA 和游离脂肪酸,它们同样具有信使功能,参与信号转导^[7,17]。越来越多的研究表明^[18~21],PLD 在ABA 信号转导中具有重要作用。另外,PLD 可与PLA₂、PLC、PIP-5 激酶等相互联系,共同在信号传导中发挥作用。

2 PLD 的调控

不同PLD 的不同生化特性,为研究PLD 的调控机制和功能提供了重要条件。Ca²⁺ 是磷脂酶的重要调控因子,PLD 的激活需Ca²⁺ 的参与。Sang 等^[22]研究表明,Ca²⁺ 抑制剂EGTA 可导致酶活性的丧失。

不同的PLD 激活对Ca²⁺ 的需求是不同的。PLD C₂ 区的存在是Ca²⁺ 激活的特异机制。在一系列信号转导蛋白和膜运输蛋白,如PKC、PLC 和PLA₂ 中都存在C₂ 区,此区域对膜上Ca²⁺ 调控的蛋白质翻译是必要的^[23]。Ca²⁺ 与PLD α 和PLD β 的结构域结合,诱导结构的改变,增加了C₂ 与PC 之间的亲和力^[24]。比较而言,PLD β 是在Ca²⁺ 和PIP₂ 协同作用下激活的,可能不需要离异作用就能从细胞膜上脱离下来。PIP₂ 与PLD β 在C₂ 结构域和催化区域结合,但是Ca²⁺ 能对此结合进行不同程度的调节^[25]。在Ca²⁺ 缺少或低水平条件下,PLD β 与PIP₂ 在C₂ 结构域结合,较高浓度的Ca²⁺ 抑制这种作用,却促进PIP₂ 与催化区域的结合,后者又会增强PC 的结合与降解^[24,25]。

研究表明^[26],PLD 具有与磷酸肌醇磷脂相结合N 端的PX 和PH 域,调节PLD 与脂质间的交互作用。PIP₂ 水平变化可对PLD 进行有效调控。不仅PLD β 和PLD γ 都需PIP₂ 的激活,PLD α 在低Ca²⁺ 浓度时也需PIP₂ 的激活。PLD α 、PLD β 、PLD γ 的基因产物为钙依赖性蛋白,PLD β 和PLD γ 则为PIP₂ 依赖性蛋白,激活需要PIP₂ 的参与。而PLD α 为磷酸酰肌醇二磷酸(PIP₂) 非依赖性蛋白。PLD β 和PLD γ 都可以结合PIP₂。PLD 有两个PIP₂ 结合区域,一个位点是N 端C₂ 区,另一个是C 端的PIP₂ 结合基序(PLD α 中不存在)。三聚体G 蛋白也调控PLD,小分子G 蛋白(如ARF、Rho)可有效调控哺乳动物PLD 活性。ARF、Rho、PKC 通过协同作用激活PLD。据报道^[27],磷脂酶D₁(PLD₁)的PH 域对生物体外细胞膜的催化活性和定位是必须的。关于PH 域的突变体能改变PLD₁ 从细胞膜到细胞质转移的研究结果也证实了这种PH 域的功能^[28]。PLD₁ 是在PH 域内两个相邻的半胱氨酸(C240 和C241)上被棕榈酰化^[29]。这些半胱氨酸的变化会严重限制PLD₁ 的酰化作用,影响其在细胞膜上的定位,并且降低其活性^[28]。然而,单一的酰化作用不可能在其他PLD 的细胞膜靶向定位中发挥重要作用,如Spo14p 或老鼠PLD₂,因为这两种酶都不具有相邻的半胱氨酸残基。也有研究表明^[30],PH 域的缺失或突变对PLD₁ 或PLD₂ 活性的影响微乎其微。相反,被称为‘KR 框’的一段较小区域(PLD₁ 的氨基酸691~712 及PLD₂ 的氨基酸554~575)能够与磷酸肌醇发生相互作用,并为PIP₂ 激活PLD 的活性所依赖^[30]。近年来,更多的资料已表明^[31],生物体外有效的酶靶向作用需要PLD₂PH 域的协助。这个域的变化会导致酶的活化,

而酶的活性需要 PIP_2 来维持^[31]。

PLD 水解的亲脂产物 PA 和溶血 PA 都是第二信号分子, 在各种各样细胞中都有激活生化反应的作用。溶血 PA 也是重要的脂质调控子, 在 mmol/L 水平激活许多生化反应, 例如 DNA 合成酶、PLD 转移酶的激活和 DAG 转化为非信号分子, 产生没药磷脂酸 (bis-PA) 等。在动物细胞中, 虽然 PLD 能很快被激活, 但基质 PLD 的活性很低。另外, 新霉素可抑制 PLD β 和 PLD γ 的活性, 质量分数 0.1% 正丁醇可抑制 PLD α , PLD β 和 PLD γ 活性。通过对硼氯隆毒素、百日咳毒素、不可水解的 GTP 类似物等研究表明^[32, 33], G 蛋白能调控 PLD。用已克隆的并通过细菌表达的烟草 PLD α 和 G 蛋白 α 亚基 ($G\alpha$) 研究 G 蛋白调控 PLD 的机制, 结果发现 PLD α 和 $G\alpha$ 共同抑制 PLD α 的活性, 但含有 GTP γ 则降低这种抑制^[34]。所以, 可能是 $G\alpha$ 直接与 PLD α 相互作用, 且 $G\alpha$ 的激活免除了其对 PLD 的抑制。

3 PLD 对环境胁迫和激素的响应

植物在各种胁迫环境下迅速发生响应, 许多情况下信号转导与特异性磷脂酶的激活有关。PLD 可增强植物对不良环境胁迫的抵御能力, 如机械损伤、霜冻、冷害, 在此过程中 PLD 活性增加。

3.1 机械损伤

机械损伤条件下, PLD 被激活, 从而导致磷脂水解。PLD 的激活促进 PA 的形成, 伴随游离胆碱水平的增加, 表明磷脂酰胆碱是反应底物。PLD α 与该反应有关, 抑制拟南芥 PLD α 活性可减少机械损伤诱导的 PA, 同时也减少了能调控许多防御反应的茉莉酸的积累^[35]。大豆中, PA 诱导一种机械损伤活化的 49 ku 分裂素, 它能激活蛋白激酶 (MAPK), 通过 n-丁醇降低 PA 形成, 可以抑制机械损伤诱导 MAPK 的激活, 这一现象表明, 由 PLD 作用产生的 PA 在 MAPK 信号转导中具有信使功能^[36]。

机械损伤刺激膜结合 PLD 瞬间增加, 同时溶液中会减少同等数量的 PLD, 这一进程与磷脂减少密切相关^[37]。另有研究表明^[38], 与膜结合 PLD 的增加会导致脂质降解。例如, 经过辐射处理的花椰菜小花, 会立刻引起膜结合 PLD 活性的增加, 而这将加速细胞膜的降解。蓖麻叶片中膜结合 PLD 的增加, 也与磷脂降解的速率及叶片的衰老相关联^[39]。以上研究表明, 机械伤害引起 PLD 活性增强是由于膜结合 PLD 的增加所造成的, 其原因可能是 PLD 与膜结合会增加与底物结合的机会, 从而促进脂质水解。

PLD 活性增加不是由于 mRNA 或蛋白水平的增加, 而是 PLD 向细胞膜转移的结果^[40]。向缓冲液中添加生理浓度的 Ca^{2+} 可以增强这种向微粒体的转移作用, 原因之一可能是机械伤害引起原生质膜中 PLD 和 PLA 的协同激活, 这将导致叶绿体中游离脂肪酸释放量的增加、茉莉酸的生物合成和下游防御基因的激活。近来研究表明^[41], 受到机械伤害的蓖麻叶游离亚麻酸的增加与由 PLD 介导的磷脂水解有关, 间接说明了机械伤害的蓖麻叶在信号转导过程中 PLA 与 PLD 的协同作用。这些结果与以前的分析一致, 表明在机械伤害的数分钟内, PLA 和 PLD 的作用产物会在几种植物中增加。鉴定茉莉酸结构上游的专一性脂质介导体, 对搞清这一作用模型有着重要意义。

Ryu 等报道^[37], 生理浓度 Ca^{2+} 会引起与膜结合 PLD 的增加, 这表明 PLD 的胞内转移作用可能是由 Ca^{2+} 介导的。由于 Ca^{2+} 、机械损伤、激素等环境胁迫条件下都会立刻增加细胞质中 Ca^{2+} , 因此可以推断, 由于机械损伤导致与膜结合 PLD 活性的增加, 可能是细胞质中 Ca^{2+} 流引起的。已有研究表明^[42], Ca^{2+} 能在细胞体外调节植物 PLD 活性, 蓖麻、水稻、燕麦 PLD 的一个共同序列是 Ca^{2+} 的结合域。通过对 *S. trep. tanyces* 的研究发现^[43], PLD 与膜上小泡的结合具有一定 Ca^{2+} 依赖性, 这表明 Ca^{2+} 与 PLD 的结合会改变其构型, 增强 PLD 与膜的结合。

3.2 低温

PLD 的存在有细胞膜结合和细胞质结合两种形式。许多研究已经证明了膜脂降解酶在冷害中的作用, PLD 的活性与植物对冷害与冻害条件的响应有密切联系。冻害条件下小麦中 PLD 活性增加^[44]。冷害可能是由于某一特定的冷藏温度下, PLD 等降解酶类被细胞膜硬化所激活。微粒体中, 当温度从 2 升高到 10 时, PLD 活性增加 30% ~ 40%, 并在 6 到 10 达到最大值^[13]。

Parkin 等^[45]研究表明, 果实冷藏 7 d 后再升温会使 PLD 活性提高。冷害条件下, 黄瓜果实中 PC 比 PA 优先降解, 再次升温过程中 PC 含量随脂质过氧化反应比率的升高而暂时性增加。所以, PLD 活性提高是冷害条件下的次级反应。黄瓜植株叶片在低温胁迫时 PC 的降解也要优先于磷脂^[46]。由于生物膜是一个流动相, 所以 PC 的减少可能会进一步增加组织对冷害胁迫的敏感性。冷害条件下, 黄瓜果实中 PLD 的激活, 可能是细胞膜脂质过氧化反应和磷脂酶作用的间接反映。这两个过程产生的 Ca^{2+} 载体会

使细胞内 Ca^{2+} 增加,从而激活PLD^[47]。

冷害引起的膜硬化在某种程度上会激活PLD,它是引起植物系统磷脂降解反应中的起始酶类。PA是 Ca^{2+} 载体,因此,低温引起磷脂降解,使细胞膜中的PA过量积累,导致离子载体释放出 Ca^{2+} ,并激活自身催化的膜脂质的降解。此外,由于冷害诱导膜结构异常,从钙库里渗漏出来的 Ca^{2+} 同样也能加速细胞膜降解。

3.3 渗透胁迫

Ca^{2+} 在植物许多生理过程中起重要作用, Ca^{2+} 能在较低的微摩尔和毫摩尔水平上激活PLD。结合态 Ca^{2+} 可使植物避免膜损害和离子渗漏,并增加细胞壁结构。以黄瓜为材料的研究表明^[48], Ca^{2+} 缺乏可减少膜结合态 Ca^{2+} ,降低PLD活性,导致膜结合酶活性和膜结构的紊乱,膜中蛋白质水平未改变,磷脂和中性脂水平下降,磷脂酰肌醇含量下降,但PA增加。 Ca^{2+} 能对脂质进行保护,延迟衰老,且随叶肉细胞和蛋白质含量下降,磷脂不饱和程度及脂肪酸含量上升,但磷脂类型并不发生变化^[48]。PLD α 与细胞质膜结合,在机械损伤和 Ca^{2+} 等刺激下会从细胞质转运到细胞膜。PC单独存在的小泡中,PLD α 活性需 mmol/L 水平的 Ca^{2+} 激活。在细胞体外,由于降低pH或改变底物脂质组成等情况而使所需 Ca^{2+} 降到生理浓度,对PLD造成胁迫^[29]。

在高渗透胁迫环境下,西红柿、紫花苜蓿、绿藻(*Chlamydomonas*)和拟南芥脱水叶片中的PLD和PA产物增加^[30,49]。ABA在调节植物渗透胁迫反应中具有重要作用,水分胁迫时ABA浓度增加,PLD被活化。高渗透引起PLD活性增加的原因之一可能是对ABA的响应,也可能是PLD激活对传递ABA非依赖性ABA积累信号具有重要作用。渗透胁迫与PA水平升高有关。绿藻以及悬浮培养的番茄和紫花苜蓿细胞中,在氯化钠胁迫情况下,PA会迅速积累,其他渗透物,如蔗糖和甘露醇等也有效果,说明高渗透压是该反应的效应器。当*Cratogeomys*处于干旱时,数分钟内不仅特异PLD表达增加,而且PLD活性也会增强^[31]。用ABA处理植物时则没有这样的现象发生,表明干旱和ABA激活不同的PLD。另外,PLD的激活可导致其他脂质信使转变成溶血PA、游离脂肪酸、DAG或DAG焦磷酸盐。在高渗透胁迫条件下,已形成的PA会在脂质激酶作用下转成DAG焦磷酸盐,也可能在一种PA水解的PLA作用下转成溶血PA^[30,31]。

3.4 脱落酸

脱落酸(abscisic acid, ABA),植物天然产生的主要生长抑制物质,是与植物衰老、低温和水分胁迫反应相关的一类激素。它的主要作用是抑制植物生长,其作用机理可能与抑制RNA和蛋白质的生物合成有关。在逆境条件下,ABA一方面能抑制正常条件下RNA和蛋白质的生物合成,另一方面,又能促使新的胁迫蛋白的生成。近来研究表明^[7],PLD的激活是ABA的下游反应,导致PA水平增加。相关证据是蓖麻中ABA能迅速诱导PLD基因的表达^[39]。用ABA处理的叶片同样具有很高的PLD活性,这是由于微粒体细胞膜中可溶成分转运到底物脂质中造成的。GUS引物分析法证实了ABA诱导PLD的表达^[50],抑制拟南芥的PLD α ,也使ABA诱导的衰老过程得到了延缓。

Ritchie和Gilroy报道^[51],大麦糊粉层原生质体加入ABA后,10 min内PLD活性提高,PA也明显积累。在糊粉层原生质体中直接加入PA,产生类似ABA的效应:抑制 α -淀粉酶、降低胞质 Ca^{2+} 浓度(而GA提高胞质 Ca^{2+} 浓度),并且诱导ABA调节的ASI(amyloses ubtilisin inhibitor 淀粉酶枯草溶菌素抑制物)、RAB(responsive to ABA)蛋白产生。在ABA处理前20 min内加入质量分数0.1% 1-正丁醇,以抑制PLD产物(PA)的产生,导致对ABA调节过程的阻遏。这种阻遏作用与ABA激活PLD在时间上是吻合的,而且可以被同时加入PA逆转。以上结果说明,ABA可激活PLD,产生PA,而后者参与启动糊粉层对ABA的响应,但PA启动的下游事件尚未清楚。对大麦糊粉细胞和*Vicia faba*保卫细胞原生质体研究表明^[51],PLD及其脂质产物PA在调节ABA与赤霉素诱导反应的对抗性中具有重要作用,并且ABA能促进气孔关闭。另外,PLD α 的过量表达会使烟草植株ABA更加敏感,并减少蒸腾失水。通过研究N-酰基乙醇野芝麻碱进一步证明了PLD在ABA反应中的作用。这些分子抑制PLD α 的活性,对PLD β 1或PLD γ 1无影响,在烟草和*Camelina canm unis*中能延缓ABA引起的气孔关闭和失水。PLD α 对气孔关闭和失水的影响与启动G α 十分相似。已有研究表明^[34],烟草中PLD α 可与G α 直接作用,大麦糊粉细胞中ABA-G蛋白-PLD信号复合体与细胞质膜结合。用n-丁醇处理水稻原生质体会使PLD的作用产物PA部分转变为磷脂酰丁醇,抑制AB II-5调控的几种ABA诱导基因的表达,这些结果都表明,PLD调控ABA诱导的基因表

达^[30, 52]。在蚕豆叶片中, 蚕豆保卫细胞原生质体中加入 42 ku ABA 结合蛋白, 使 ABA 诱导的 PLD 激活程度降低^[20], 这说明 ABA 结合蛋白可能是 ABA-G α -PLD 信号复合体的一部分。综合上述结果分析, PLD α 和 G α 具有类似 ABA 的功能, PLD α 构成植物对 ABA 和水分胁迫反应的关键因素, 其他型 PLD 也可能参与 ABA 信号传递途径。

3.5 乙 烯

许多研究表明^[7], PA 和 PLD 参与乙烯诱导反应。拟南芥叶子用乙烯处理后 PLD α 基因的表达、蛋白水平、酶活性都增加。用乙烯处理后, 抗 PLD α 植株的衰老症状明显推迟。在悬浮培养的胡萝卜细胞中, 同样证明了乙烯能激活 PLD。溶血磷脂酰乙醇胺是一种在生物体外能抑制 PLD 活性的脂质, 可延缓叶子、花和采后果实的衰老^[53]。

CTR1(乙烯反应中在乙烯受体下游发挥作用的负调控剂)在 MAPK 信号传输组成中, 占有十分重要的地位^[7]。CTR1 中与 PA 结合的氨基酸序列保守程度不一, PA 能否真正结合并影响其定位和活性还需进一步证明。在这种情况下, 乙烯会激活 PLD, 随后形成的 PA 将使 CTR1 在远离乙烯受体 ETR1 的地方重新定位, 释放出 ETR1 激活其他下游反应。

3.6 病原微生物

PLD 在植物抵御病害的防卫信号产生中不可缺少。水稻白叶枯病侵染时, PLD α 活性明显提高, 抗病性品种尤为显著^[5]。PLD α 聚集于病菌与植物相接触的质膜部位, 这可能暗示 PLD 参与对病菌的抵御过程。用木聚糖酶处理烟草细胞时, 很快便可看到 N-乙酰乙醇胺 (NAE) 的释放, NAE 是 PLD β 和 PLD γ (而不是 PLD α) 水解 NAPE 的产物^[1, 54]。

水稻叶片中, 病原菌的侵染使 PLD 的活性和定位发生改变^[5]。在豆类幼苗期致瘤因素刺激 PLD 的活性, 并减少通过 n-丁醇抑制根毛的变形而造成 PA 的合成^[33]。在番茄悬浮细胞中, 通过真菌木聚糖酶引物处理增加 PLD β 的表达, 但是其他 4 种特异性番茄 PLD 基因并未发生改变。引物增加了 PA 合成量, 这是 PLD 和 PLC 与甘油二酯激酶共同作用的结果^[55]。水稻与病原菌的相互作用表明, 除了 PIP₂-PLC 基因的翻译受到诱导外, PLD α 基因表达也会增加。在相互抑制作用中, 新的 PLD α 蛋白往往定位在原生质膜上病原菌的入侵位点^[5]。在植物与病原菌的相互作用过程中, 短期改变磷脂酶活性可能涉及对病原菌的感应, 长期改变磷脂酶活性则可能会引起细胞骨架的改变及膜的重新组装(或降解)。

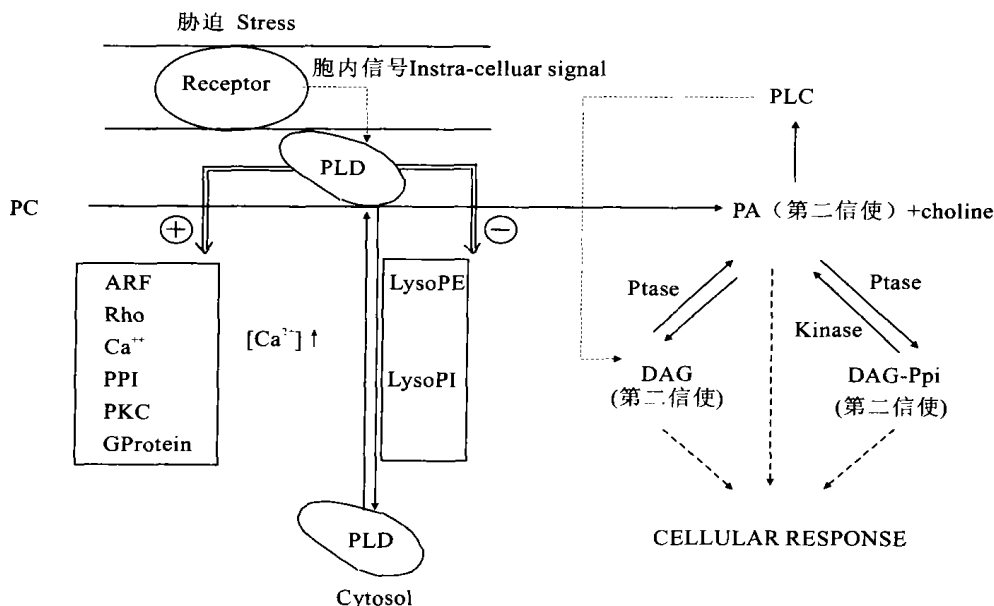


图1 PLD 生理功能及其对环境响应的细胞信号传导

Fig 1 A model depicting possible physiological function of PLD in responses to environmental stress and signal pathways

4 展 望

PLD 在胁迫信号的转导过程中起着重要作用(图1)。由于膜上磷脂代谢途径的复杂性以及细胞内信号途径的多样性,目前对于 PLD 感应外界胁迫和传递信号的途径和功能尚未明确。采用分子生物学的最新方法,深入研究 PLD 在植物生长和成熟衰老

中的作用机制,不仅能更好地了解磷脂酶的调控及生理作用,而且能进一步阐明植物对环境因子的感应和适应机制。PLD 基因表达调控和 PLD 作用机理比较复杂,PLD 多型性鉴定和纯化及其表达与组织细胞或生长阶段的相关性还不十分清楚,同型性的调控机制及其与其他信号系统的相互影响也有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Munnik T, Irvine R F, Musgrave A. Phospholipid signalling in plants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1398: 222- 272
- [2] Wang X M. The role of phospholipase D in signal transduction cascade[J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 456- 462
- [3] 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
- [4] Lee S, Suh S, Kim S, et al Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants[J]. *Plant*, 1997, 12: 547- 556
- [5] Young S, Wang X M, Leach J E. Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistances with *Xanthomonas oryzae pv oryzae*[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 1079- 1090
- [6] Katagiri T, Takahashi S, Shinozaki K. Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, a PLD δ in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signaling[J]. *Plant J*, 2001, 26: 595- 605
- [7] Munnik T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(5): 227- 233
- [8] Pappan K, Austin-Brown S, Chapman K D, et al Substrate selectivities and lipid modulation of phospholipase D α , β and γ from plants[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 353: 131- 140
- [9] Pappan K, Qin W, Dyer J H, et al Molecular cloning and functional analysis of polyphospho-Inositide-dependent phospholipase D, PLD β from *Arabidopsis*[J]. *Biol Chem*, 1997a, 272: 7055- 7061
- [10] Pappan K, Zheng S, Wang X. Identification and characterization of a novel phospholipase D that requires polyphosphoinositide and submicromolar calcium for activity in *Arabidopsis*[J]. *Biol Chem*, 1997b, 272: 7048- 7054
- [11] Wang X M. The role of phospholipase D in signal cascades[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120: 645- 651
- [12] Qin C, Wang X M. The *Arabidopsis* phospholipase D family: characterization of a Ca^{2+} -independent and phosphatidylcholine selective PLD ζ with distinct regulatory domains[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128: 1057- 1068
- [13] Pinheiro R G. Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1998, 36(3): 213- 224
- [14] Munnik T, Musgrave A. Phospholipid signaling in plants: holding on to phospholipids D[J]. *Sci STKE*, 2001, 111: 42
- [15] Wang X M. Plant phospholipases[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 211- 231
- [16] Wang X. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions[J]. *Prog Lipid Res*, 2000, 39: 109- 149
- [17] Wang X M. Molecular analysis of phospholipase D[J]. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 261- 266
- [18] Gampala S S, Hagenbeek D, Rock C D. Functional interactions of lanthanum and phospholipase D with the abscisic acid signaling effectors VP1 and ABI-1 in rice protoplasts[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 9855- 9860
- [19] Gampala S S, Finkelstein R R, Sun S S, et al ABI5 interacts with abscisic acid signaling effectors in rice protoplasts[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 1689- 1694
- [20] Zhang D P, Wu Z Y, Li X Y, et al Purification and identification of a 42-kiloDalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128: 714- 725
- [21] Jacob T, Ritchie S, Asmann S M, et al Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 12192- 12197
- [22] Sang Y, Cui D, Wang X M. Phospholipase D and phosphatidic acid mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1449- 1458
- [23] Sung T C, Roper R L, Zhang Y, et al Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity[J]. *EMBO*, 1997, 16: 4519- 4530
- [24] Zheng L, Krishnamoorthi R, Zolkiewski M, et al Distinct Ca^{2+} binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and

- [24] [J]. *Biol Chem*, 2000, 275: 19700- 19706
- [25] Zheng L, Shan J, Krishnamoorthi R, et al Activation of plant phospholipase D by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate: characterization of binding site and mode of action[J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 4546- 4553
- [26] Freyberg Z. 'Slip, sliding away': Phospholipase D and the Golgi apparatus[J]. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13: 540- 546
- [27] Hodgkin M N, Masson M R, Powner D, et al Phospholipase D regulation and localization is dependent upon a phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate specific PH domain[J]. *Curr Biol*, 2000, 10: 43- 46
- [28] Sugars J M, Celtek S, Manifava M, et al Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain[J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 29152- 29161
- [29] Sugars J M, Celtek S, Manifava M, et al Fatty acylation of phospholipase D1 on cysteine residues 240 and 241 determines localization on intracellular membranes[J]. *Biol Chem*, 1999, 274, 30023- 30027
- [30] Sciorra V A, Rudge S A, Prestwich G D, et al Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 5911- 5921
- [31] Sciorra V A, Rudge S A, Wang J, et al Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes[J]. *Cell Biol*, 2002, 159: 1039- 1049
- [32] Ritchie S, Gilroy S Absciscic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane[J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 693- 702
- [33] Hartog M, Musgrave A, Munnik T. Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation[J]. *Plant J*, 2001, 25: 55- 65
- [34] Lein W, Saalbach G Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1530: 172- 183
- [35] Wang C, Zien C, Aftihile M, et al Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 2237- 2246
- [36] Lee S, Hirt H, Lee Y. Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*[J]. *Plant J*, 2001, 26: 479- 486
- [37] Ryu S B, Wang X M. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1303: 243- 250
- [38] Voisine R, Vezina L P, Willemot C. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of [γ]-irradiated cauliflower (*Brassica oleracea* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1993, 102: 213- 218
- [39] Ryu S B, Wang X M. Expression of phospholipase D during castor bean leaf senescence[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 713- 719
- [40] Chapman K D. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress[J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3 (11): 419- 426
- [41] Sang Y, Cui D, Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1449- 1458
- [42] 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
- [43] Yamamoto J, Konto A, Handa T. Regulation of phospholipase D activity by neutral lipids in egg-yolk phosphatidylcholine small unilamellar vesicles and by calcium ion in aqueous medium[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1233: 21- 26
- [44] Willemot C. Lipid degradation of polar lipids in frost damaged winter wheat crown and root tissue[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22: 861- 863
- [45] Parkin K L, Kuo S J. Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv Hybrid C) fruit[J]. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1049- 1056
- [46] Flores A, Grau A, Laurich F, et al Effect of new terpenoid analogues of abscisic acid on chilling and freezing resistance[J]. *Plant Physiol*, 1988, 132: 362- 369
- [47] Leshem Y Y. Membrane phospholipids catabolism and Ca^{2+} activity in control of senescence[J]. *Plant Physiol*, 1987, 69: 551- 559
- [48] Piyasiri A J, Yapa, Kurasaki T, et al Changes of some membrane-associated enzyme activities and degradation of membrane phospholipids in cucumber roots due to Ca^{2+} starvation[J]. *Plant Cell Physiol*, 1986, 27(2): 223- 232
- [49] Frank W, Munnik T, Kerkman K, et al Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 111- 124
- [50] Xu L, Zheng S, Zheng L, et al Promoter analysis and expression of a phospholipase D gene from castor bean[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 387- 395
- [51] Ritchie S M, Gilroy S Absciscic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2697- 2702
- [52] Sato T K, Overduin M, Emr S D, et al Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains[J]. *Science*, 2001, 294:

1881- 1885

- [53] Ryu S B, Karlsson B H, Ozgen M, et al Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 12717- 12721
- [54] Ryu S B, Wang X M. Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves[J]. Bilchin Biophys Acta, 1998, 1393: 193- 202
- [55] Van Der Luit A H, Piatti T, van Doorn A, et al Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate[J]. Plant Physiol, 2000, 123: 1507- 1516

Functions of phospholipases D in responses to environmental stress and signal transduction

WANG Guo-ze, MAO Lin-chun, PAN Xin

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029 China)

Abstract: Phospholipases D (PLD) is a multifunctional enzyme that can hydrolyze phospholipids. This article introduced the biochemical properties and functional regulation of PLD, and its role in signal transduction. In addition, responses of PLD to different environmental stresses including wounding, chilling, osmotic stress, hormone, microbes were also reviewed based on the up-dated advances in research.

Key words: phospholipase D; signal transduction; environmental stress

(上接第146页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0107-EA

Study on properties of α -amylase from *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris* 8004

CHEN Hong-ge, CHEN Jian, WANG Xu, HU Yu, MA Xiang-dong

(College of Biotechnology and Food Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The α -amylase derived from *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris* 8004 was confirmed as extracellular enzyme by two totally different methods and there was only one type α -amylase existing. The α -amylase was purified by PAGE, and SDS-PAGE indicated its molecular weight was 52 ku. The optimum temperature and pH of this enzyme was 50 and pH 6.2. Stability tests showed that this α -amylase was unstable at higher temperature, yet it was quite stable in wide pH range of 4.86- 10.47.

Key words: *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*; α -amylase; enzyme property