

综 述

高等植物葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的研究进展

于定群, 汤浩茹, 张勇, 罗娅, 刘泽静

四川农业大学园艺学院, 四川 雅安 625014

于定群, 汤浩茹, 张勇, 等. 高等植物葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的研究进展. 生物工程学报, 2012, 28(7): 800–812.

Yu DQ, Tang HR, Zhang Y, et al. Research progress in glucose-6-phosphate dehydrogenase in higher plants. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 800–812.

摘 要: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是植物戊糖磷酸途径中的一个关键性调控酶。其主要生理功能是产生供生物合成需要的 NADPH 及一些中间产物; 此外还参与各种生物和非生物胁迫的应答反应。文中主要从葡萄糖-6-磷酸脱氢酶同工酶与调节机制等方面探讨了其生物学功能, 再从胁迫耐受、基因克隆、酶的缺失和替代等方面的研究进行综述, 并对已发表的高等植物中的 G6PDH 氨基酸序列进行聚类分析, 为今后该酶的研究提供参考。

关键词: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 胁迫耐受, 基因克隆, 缺失替代, 聚类分析

Research progress in glucose-6-phosphate dehydrogenase in higher plants

Dingqun Yu, Haoru Tang, Yong Zhang, Ya Luo, and Zejing Liu

College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China

Abstract: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) catalyzes the first and rate-limiting step of the oxidative pentose phosphate pathway, existing in both cytosolic and plastidic compartments of higher plants. Its main function is to provide reducing power (NADPH) and pentose phosphates for reductive biosynthesis and maintenance of the redox state of the cell. In addition, the expression of this enzyme is related to different biotic and abiotic stresses. In this review, we analyzed the isoenzyme, regulation and biological function of G6PDH. Meanwhile, we summarized the progress work of G6PDH involved in stress resistance, gene cloning, enzyme-deficiency and cluster analysis. Problems should be solved were also discussed.

Keywords: G6PDH, stress tolerance, gene cloning, enzyme-deficiency, cluster analysis

Received: December 9, 2011; **Accepted:** February 21, 2012

Supported by: Scientific Research Foundation of the Education Department of Sichuan Province (No. 09ZB050).

Corresponding author: Haoru Tang. Tel/Fax: +86-835-2882515; E-mail: htang@sicau.edu.cn

四川省教育厅青年基金项目 (No. 09ZB050) 资助。

戊糖磷酸途径是植物体中糖代谢的重要途径,其主要生理功能是产生还原性的供生物合成需要的 NADPH^[1-2],以及可供核酸代谢的磷酸戊糖和氨基酸与脂肪酸合成的一些中间产物^[3];同时在保持植物细胞的氧化还原平衡方面也起到非常重要的作用^[4-6]。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH, EC1.1.1.49) 催化戊糖磷酸途径的第一步不可逆氧化反应,是关键性调控酶^[7] (图 1)。动物体内 G6PDH 为 X 染色体连锁遗传,它的缺乏会导致

红细胞代谢紊乱^[8]、视网膜血管堵塞^[9]、酮病^[10]等,严重者可危及生命。而它的过表达会引起人体脂质代谢异常^[11],却能增加果蝇的寿命^[12]。在植物中,许多研究者从多种途径研究其与植物生长发育及各种环境胁迫的关系,以期更清楚地阐述戊糖磷酸途径及该酶可能的生理功能。文中就 G6PDH 的生物学特性、对各种逆境环境的响应机制、基因克隆、酶的缺失替代等方面的研究进行综述,并对已发表的高等植物中的 G6PDH 氨基酸序列进行聚类分析,为今后该酶的研究提供参考。

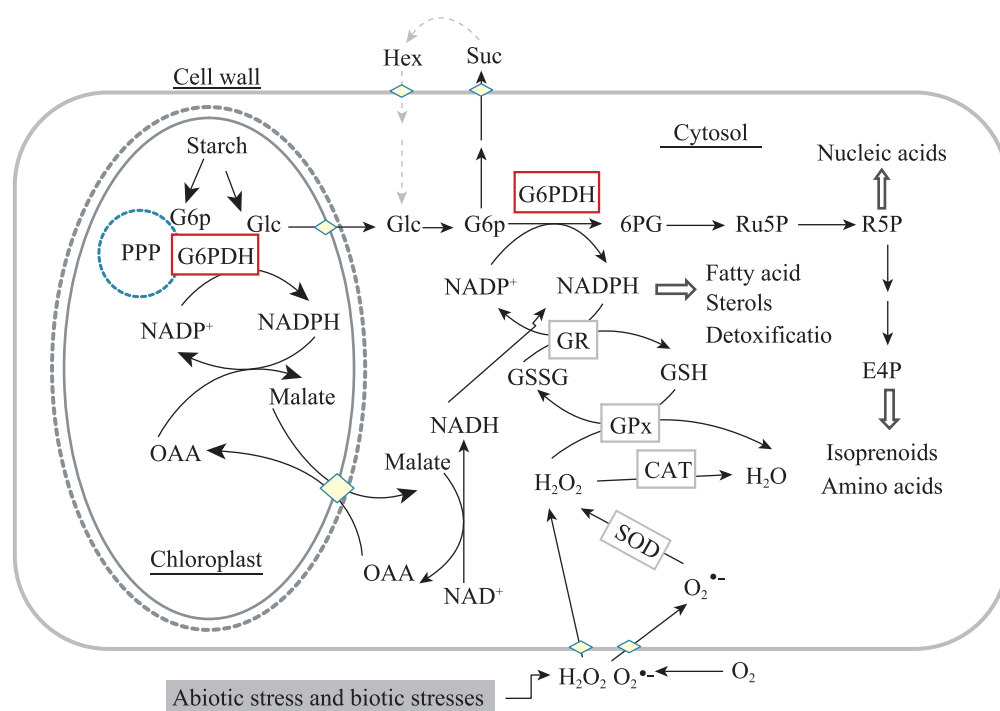


图 1 G6PDH 参与植物体内戊糖磷酸途径及抗氧化代谢示意图

Fig. 1 Role of G6PDH as rate-limiting step of the PPP for biosynthesis and anti-oxidant activity in higher plants. GS-SG: oxidized glutathione; GSH: reduced glutathione; Glc: glucose; Suc: sucrose; Hex: hexoses; G6P: glucose-6-phosphate; 6PG: 6-phosphogluconate; Ru5P: ribulose-5-phosphate; R5P: ribose-5-phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; SOD: superoxide dismutase; GR: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase.

1 G6PDH 的生物学特性研究

G6PDH 是磷酸戊糖途径的限速酶,控制着这条途径的碳流和还原力 NADPH 的产生^[13-14]。G6PDH 催化产生的 NADPH 不仅为细胞内某些生物大分子的生物合成提供了还原力,而且是还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 再生的唯一还原力^[15],因此 G6PDH 在细胞抵抗氧化胁迫的过程中起着重要的作用。

1.1 植物 G6PDH 同工酶类

在所有植物的胞质和质体中几乎都能检测到高浓度的 G6PDH 同工酶^[16]。质体 G6PDH 氨基酸序列比胞质 G6PDH 多一段约 60 个氨基酸左右的转运肽序列,该序列具有组织特异性,在不同的植物,即使同一植物体内同工酶间的这段序列差异也较大 (图 2)。目前,已在植物中发现了多种形式的 G6PDH 的同工酶类型,如在拟南芥中发现了 6 种 G6PDH 的同工酶类型,其中 2 种为胞质,4 种为质体类型^[17]。根据其氨基酸序列的差异及蛋白免疫特性,又可将质体 G6PDH 分为两类: P1 类型和 P2 类型。P1 的主要特性是被还原失活; P2 相对不易受到 NADPH 的反馈抑制。而且 P2 具有比 P1 更高的活性, P1 仅在叶片等绿色组织中表达较高, P2 在大多数组织中都有较高的表达,尤其在根中表达量最高^[18]。

1.2 植物 G6PDH 的调控

植物同时存在胞质和质体氧化戊糖磷酸途径。虽然 G6PDH 在提供 NADPH 过程中扮演着重要的角色,但胞质中的 G6PDH 没有变构调节

的性质,而可能受到其他复杂的调控。而质体类型的 G6PDH 除了受到 NADPH 的反馈抑制之外,还受到硫氧还原蛋白/铁氧还原蛋白系统的调节^[19]。此外,其他环境因子,如:光照、氮同化、氧化胁迫、高盐、病原菌、糖等,也会在 mRNA 水平或酶活力水平调控 G6PDH 酶活力。Hauschidl 和 von Schaewen^[20]发现,胞质 G6PDH 活性不受渗透压变化、磷酸化及氧化胁迫的影响,而质体 G6PDH 的活性受磷酸化及光暗条件的影响。因为在光下,光合作用提供充足的 NADPH,为了避免无效耗能,质体 G6PDH 往往钝化失活。除了这种反馈抑制外, Ben 和 Anderon^[21]还发现,光照可以调节 G6PDH 从叶绿体类囊体中释放入基质,从而实现对该酶的调控。

近年来,基因组水平上的分析表明, G6PDH 酶活力还受到细胞内氧化还原环境的调节。Wenderoth 等^[22]发现,如果将马铃薯质体 G6PDH 氨基酸中的 Cys149 和 Cys157 中的任何一个替换为 Ser,该酶活性就不再受氧化还原调节,证明了这两个 Cys 残基为氧化还原调节位点。为了查明质体 G6PDH 氧化还原位点的保守性, Wendt 等^[23]比较了来自马铃薯、烟草、菠菜等 8 种植物与红藻、绿藻共 10 个 G6PDH 氨基酸序列,发现质体 G6PDH 的辅酶结合区存在 6 个 Cys 残基,其中 3 个是非常保守的,包括 Cys149 和 Cys157。说明,保守氨基酸序列中 Cys 的氧化还原修饰也是 G6PDH 酶活力的调控方式之一。

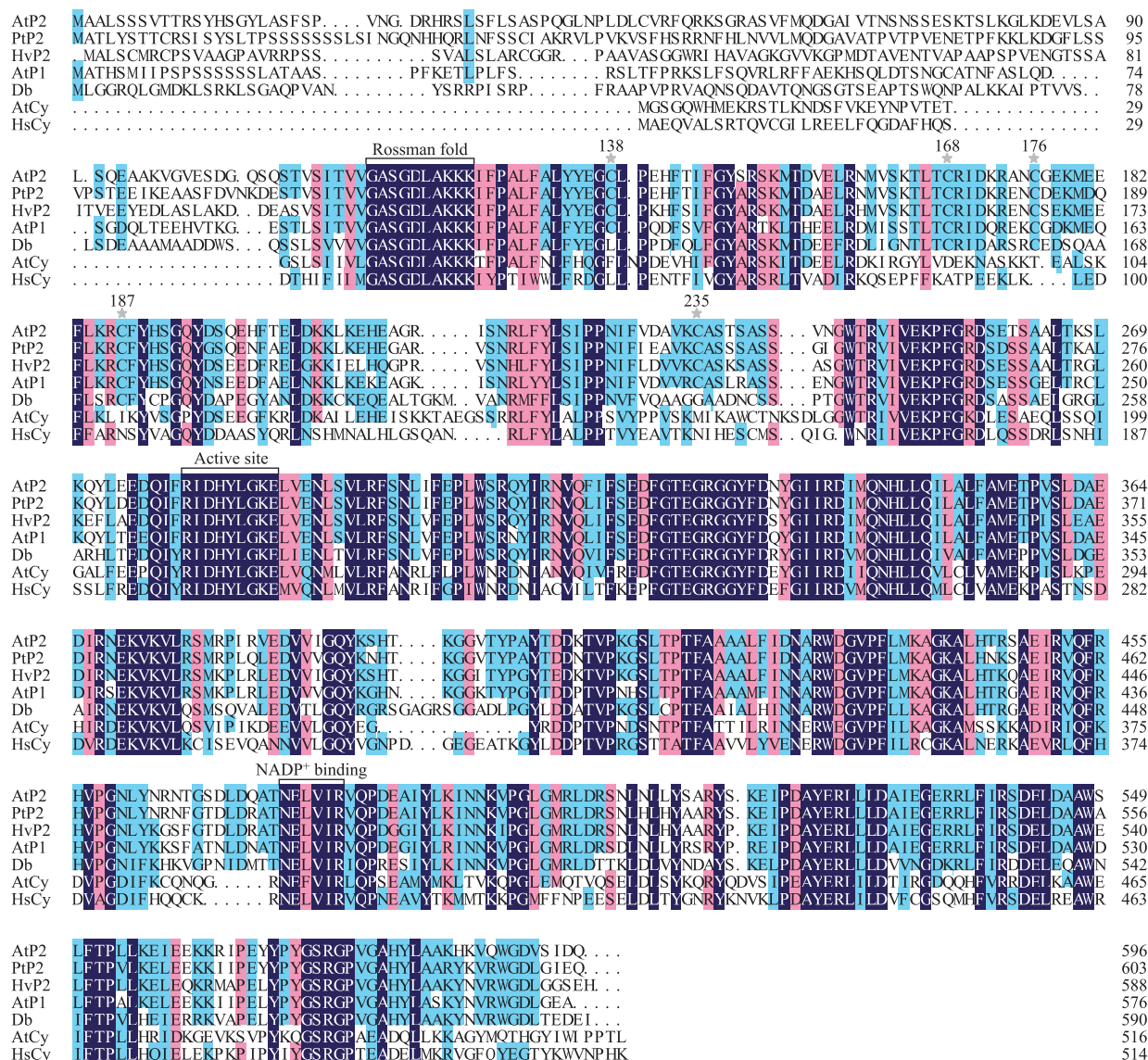


图2 不同来源的 G6PDH 氨基酸序列对比

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of G6PDHs from different kinds of organisms. *Arabidopsis thaliana*: AtCy, At3g27300.1; AtP, At5g35790.1; AtP2, At5g13110.1. *Hordeum vulgare*: HvP2, CAL44728. *Populus trichocarpa*: PtP2, estExt_Genewise1_v1.C_LG_I7789. *Dunaliella bioculata*: Db, AJ132346. *Homo sapiens*: HsCy, NP_001035810.1. Pentagram: cysteine residues.

2 G6PDH 与植物生长发育及各种环境胁迫的关系

植物处于各种各样的环境之中,许多研究报道认为, G6PDH 的活性涉及到植物细胞内许多

生理生化过程以及对不同环境胁迫耐受的过程。

2.1 G6PDH 与植物生长发育

在与植物生长发育的关系方面,研究较多的是 G6PDH 酶活力与种子发芽、休眠和一些次级

代谢产物等的关系。赵永华等^[24]发现,呼吸抑制剂 NaN_3 可以增加西洋参种子萌发过程中 G6PDH 的活性,加速西洋参种子休眠的解除,且低温能促进 NaN_3 的这种作用。Huang 等^[25]研究发现,水稻 *G6PDH* 基因在幼穗中的表达明显高于根、叶和胚,表明水稻 G6PDH 与穗发育密切相关,可能是水稻幼穗 PPP 代谢活跃为其发育提供所需的磷酸戊糖和其他一些中间产物。徐一兰等^[26]研究也发现,油菜开花后 G6PDH 活性逐渐增加,花后 24~31 d 达最高峰,并且与含油量也呈极显著正相关。陈超^[27]还发现, G6PDH 还具有抗氧化作用,能够延长红豆杉细胞活力,从而提高紫杉醇产量。

在植物生长发育过程中,戊糖磷酸途径是普遍存在的一条糖的分解代谢途径,但在不同的组织中所占的比重不同^[28]。它除提供能量外,还为其他生物合成提供多种原料。G6PDH 通过调控戊糖磷酸途径的代谢通量,从而为油料作物脂肪酸合成提供 NADPH,促进含油量增加;为某些代谢活跃的组织中核苷酸的合成提供 5-磷酸核糖,为芳香族氨基酸合成提供 4-磷酸赤藓糖。此外,此途径生成的核酮糖-5-磷酸可转化为核酮糖-1,5-二磷酸参与光合作用,增加糖类物质的积累。G6PDH 正是通过促进这些物质生成,从而促进细胞生长,调控生长发育。

2.2 G6PDH 参与植物生物胁迫的应答

G6PDH 与其他防御反应指标酶类似,参与植物防御反应,因它能提供更多的还原力 NADPH,所以能减轻过敏反应中的氧胁迫。叶建仁等^[29]研究松树针叶组织 G6PDH 活性和抗松针褐斑病的关系,发现抗病针叶中的 G6PDH 活

性明显高于感病针叶,并认为植物染病时,戊糖磷酸途径的中间产物可能与抗病过程中防卫反应有关。Sindelar 和 Sindelarova^[30]用马铃薯花叶病毒侵染烟草后发现,随着侵染时间延长,胞质和质体 G6PDH 酶活力均呈线性增加。

植物受到病原微生物侵染后,机体内发生一系列的变化,主要表现在细胞死亡和活性氧产生。一方面细胞的死亡可以有效地阻止病原菌侵染和传播;另一方面机体内发生一系列的抗氧化代谢,产生活性氧。Scharte 等^[6]和 Asai 等^[31]研究发现,植物在病原菌侵染后,伴随着过敏性细胞死亡和活性氧产生, G6PDH 酶活力增加。G6PDH 催化产生的 NADPH 可以直接通过质膜上的 NADPH 氧化酶的作用脱氢,清除活性氧;也可以通过细胞内一系列抗氧化酶的相互作用,清除活性氧,消除细胞危害(图 1)。

2.3 G6PDH 参与植物非生物胁迫的应答

在低温胁迫方面,Sagisak^[32]研究发现,在低温贮藏下杨树枝条内 G6PDH 活性明显增加,而这种酶的钝化或失活会导致枝条冻害的发生;Lin 等^[7]在杨树中发现, G6PDH 可能参与超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性的调节和抗冻性的低温诱导。在盐胁迫方面,王晓敏^[15]发现不仅在盐胁迫而且在正常的生长环境下, G6PDH 对维持细胞内的 GSH 水平都起着非常重要的作用;Valderrama 和 Corpas^[33]发现,盐胁迫导致了 G6PDH 和其他脱氢代谢酶类的活性增加,从而降低活性氧水平,由此说明, G6PDH 是植物抗盐氧化过程中的一个抗性酶;Nemoto 和 Sasakuma^[34]发现,0.15 mol/L NaCl 处理 2 h 之后,

小麦 G6PDH 表达量开始积累,到 12 h 时达到最大值。此外,在紫花苜蓿受重金属铜胁迫^[35],大豆受干旱胁迫时^[36],也发现 G6PDH 的活性有不同程度的提高。

植物在不适宜的环境时会产生一系列的应答反应,活性氧的产生便是其中之一。G6PDH 催化产生 NADPH 通过与其他抗氧化酶 SOD、POD、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 等的相互作用清除有害的活性氧 (图 1)。如果生物体缺乏这些保护酶机制,则很难在逆境中存活。

3 植物 G6PDH 基因的克隆及表达

1994 年, Graeve 等^[37]首次从马铃薯的 cDNA 文库中分离了马铃薯胞质 *G6PDH* 基因,该基因与动物^[38]、酵母^[39]中获得的 *G6PDH* 的核苷酸相似性明显高于细菌来源的 *G6PDH* 基因,推导的氨基酸序列缺少转运肽序列以及其对二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 的不敏感都证明了该 cDNA 编码的是胞质 *G6PDH*。1995 年, Fahrendorf 等^[40]克隆得到苜蓿 *G6PDH* 基因,该基因的氨基酸序列没有转运肽序列,也没有相应得氧化还原 Cys 位点,属于胞质基因。2000 年, Nemoto 和 Sasakuma^[34]利用 DDRT-PCR 技术结合 RACE 的方法克隆得到小麦胞质 *G6PDH* 基因。随后, Schaewen 等^[41]利用 RT-PCR 结合 RACE 技术首次得到了来源于马铃薯的质体 *G6PDH* 基因,其氨基酸序列 N 端明显长于胞质基因,推测其为转运肽序列。Knihgt 等^[42]在烟草中获得了质体 *G6PDH* 基因,并且还得到了该基因的基因组序列。序列比对分析表明,该基因属于 P2 类的质

体 *G6PDH*, 其基因组大小为 7 kb, 包括 10 个外显子, 编码 593 个氨基酸, IDHYLGKE 是 G6PDH 的底物激活位点, 在该基因的上游找到了可能的 RNA 聚合酶 II 结合位点 (TATA box) 和 2 个可能的重要启动子元件, 一个是与亚硝酸盐调节有关的 NIT2 结合位点 (TATCTA/G), 另一个是热激因子结合位点 HSF (AGAAA)。他们发现, 在烟草根和叶片中, KNO₃ 能诱导该基因增强表达, 而且根诱导增强的倍数要高于叶。随着生物技术的发展, 黄骥等^[25]和 Hou 等^[43]利用新型电子克隆的方法分别克隆得到水稻胞质和质体 *G6PDH* 基因。最近, 林元震等^[44-45]克隆了杨树的 *G6PDH* 基因并获得该基因上游的启动子序列, 该序列具有启动子的基本元件 TATA-box、CAAT-box, 而且还包含多个胁迫诱导元件, 如低温诱导元件 LTR, 盐诱导元件 GT-1, 抗冻、缺水、脱落酸、抗寒元件 MYB 和 MYC, 以及光响应元件 L-box、G-box、3AF-1、TC 丰富区等。这些研究从基因的角度印证该酶参与各种环境胁迫的应答。

目前已在为数不多的植物中分离了 *G6PDH* 基因, 但是随着基因组学和测序技术的发展, 将会获得越来越多的 *G6PDH* 基因, 为通过转基因技术改造植物品种奠定基础。

4 植物 G6PDH 的缺失和替代

随着 Hannond 等^[46]、Zamore 等^[47]和 Gisela^[48] RNAi 作用机制模型的提出, RNAi 已被广泛用作研究基因功能的一种手段^[49-51]。早在 2004 年, Debnam 等^[52]研究了在转入内源的质体 P2 型的 *G6PDH* 基因的有义链和无义链后发现, 转基因烟草中 P2 型 *G6PDH* 基因的表达发生了巨大的改变, 但对胞质 G6PDH 酶活力并没有显著的影响。

响。并且发现,转入有义链的比转入无义链的蔗糖、葡萄糖和果糖的含量高。接着, Scharte 等^[6]将拟南芥根在氮饥饿诱导中高度表达的质体 P2 型 *G6PDH* 基因,经过改造后转入易感病型烟草,用于胞质型 *G6PDH* 基因的表达,并使用 RNAi 技术干扰其内源的胞质 *G6PDH* 基因表达,由此获得了胞质 *G6PDH* 同工替代植株。研究发现,胞质同工替代酶提高了植物的防御能力,增强了植物的抗性。有意思的是在同工替代的植株中,同工替代酶的含量降低,说明同工替代系植株的抗性和酶含量是两个独立的过程,并且酶的质量而非数量对植物非常重要。他们认为同工替代酶在优化代谢途径方面显示出更大的潜力。最近, Asai 等^[31]将内源的胞质类型的 *G6PDH* 基因和两种质体类型的 *G6PDH* 基因 (*P1* 和 *P2*) 分别转入烟草,干扰内源基因的表达,发现在 *P2* 型基因沉默的植株过敏性细胞死亡和活性氧等物质含量下降,认为质体 *P2* 型 *G6PDH* 与植物过敏性细胞死亡和活性氧的产生相关。

5 已报道的植物 *G6PDH* 的关系

参照 Cardi 等^[53]的方法,利用从 NCBI 蛋白质序列数据库中搜索获得的拟南芥质体 *P2-G6PDH* 的蛋白质序列,采用 BlastP 或者 tblastn 的方式在 NCBI 数据库中和其他基因组数据库中进行搜索。所有的数据获得来自 NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>), *Oryza sativa* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), *Sorghum bicolor* (<http://genome.jgipsf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html>), *Populus trichocarpa* (http://genome.jgipsf.org/poptr1_1/Poptr1_1.home.html)。核苷酸序列比对采用 ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/

[clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)), 分子量和等电点的采用 ExPASy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html), 转运肽切割位点采用 ChloroP^[54]和 TargetP^[55]预测,系统发育树的构建采用 MEGA 4 的 NJ 构建^[56]。

将拟南芥胞质、质体 *P1* 和 *P2* 三种类型,大麦 *P2* 类型,杨树 *P2* 类型,杜氏藻以及人的 *G6PDH* 氨基酸序列进行序列比对。其分别代表单/双子叶植物、木本植物、低等植物、哺乳动物以及胞质、*P1*、*P2* 三种类型的 *G6PDH* 氨基酸序列的差异,结果见图 2。不同来源 *G6PDH* 的序列比对发现,胞质和质体源于不同的进化历程。胞质 *G6PDH* 约含有 510 个氨基酸,分子量约 58 kDa; *P2* 比 *P1* 多 10 个左右氨基酸,约含有 590 个氨基酸,分子量约为 66 kDa。质体氨基酸序列在 N-端比胞质 *G6PDH* 多一段约 60 个氨基酸左右的转运肽序列,该序列在被运输入质体之后将被切除,切后的蛋白质序列与胞质的蛋白质类似。7 种 *G6PDH* 序列均含有保守的 rossman 结构域、活性部位以及 NADP⁺结合位点。这结果与 Wakao 和 Benning^[17]以及 Cardi 等^[53]的结果一致,但与 UniProtKB/Swiss-Pro 数据库的数据不同,因此有必要对该酶的蛋白质结构进行深入研究。此外,在保守的 NADP⁺结合位点结构中第 3 位的氨基酸不同,在胞质中为苯丙氨酸,而在质体和人体中则为亮氨酸,这可能与特定区域 NADP⁺的结合有关。

根据拟南芥 *P2* 序列分析质体序列中的半胱氨酸的保守性,发现 5 个半胱氨酸残基,即 Cys138、Cys168、Cys176、Cys187 和 Cys235。其中 Cys168、Cys176、Cys187 在高等植物及藻

类植物中都是高度保守的。Cys138 在一些植物的 P1 中为色氨酸，在藻类中为亮氨酸；而 Cys235 在一些植物的 P1 中为丝氨酸，在藻类中为甘氨酸。而且藻类与质体类型 G6PDH 氨基酸序列相似性大，支持绿藻是高等植物祖先的观点。

已报道的 37 条高等植物 G6PDH 氨基酸序列聚类结果见图 3，序列的分子量、等电点及预测的转运肽切割位点见表 1。所选择的 37 条序列相似性从 80%~99%，可聚为 3 类，即 Cluster I 为胞质类型、Cluster II 为质体 P2 类型和 Cluster III 质体 P1 类型。Cluster I 包含单子叶植物和双子叶植物 2 个子群，各类群内序列相似性大。单子叶植物子群包含禾本科大麦、小麦、玉米、高粱等植物，双子叶子群包含拟南芥、烟草、马铃薯、杨树等植物。在质体类型 Cluster II 和 Cluster III 中同样如此。植物胞质或质体同一类型的酶氨基酸序列可能会有多条，如杨树质体 P2 和拟南芥的胞质中发现两条 G6PDH 序列，这可能源于基因的特殊复制事件。这些与 Wakao 和 Benning^[17]、Asai 等^[31]和 Cardi 等^[54]的研究结果一致。此外，

等电点预测结果表明，P2 的等电点大于 P1 的等电点大于胞质的等电点，这可能与适应不同的环境以及酶活性调控有关。

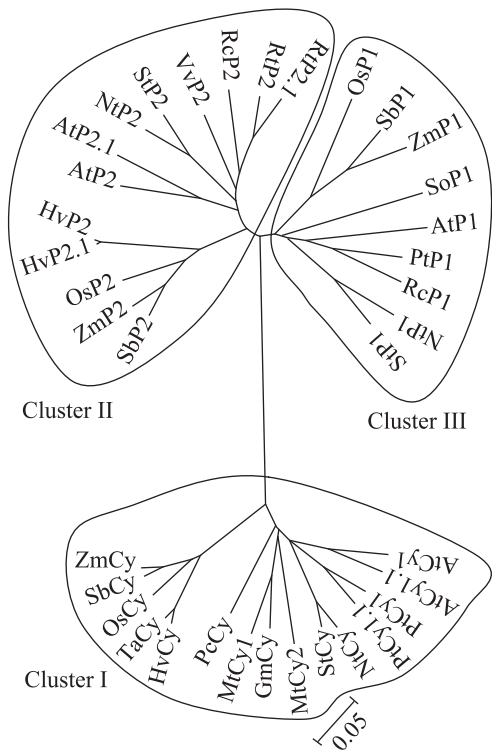


图 3 高等植物 37 条 G6PDHs 的聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of 37 G6PDHs in higher plants.
Cy: cytosolic-G6PDH; P1: P1-G6PDH; P2: P2-G6PDH.

表 1 序列名称和登录号
Table 1 Sequence and accession number

Serial number	Species	G6PDHs	Length (aa)	Mv (kDa)	pI	Transit peptide	Accession No.
1	<i>Solanum tuberosum</i>	StCy	511	58.5	5.97	—	CAA52442.1
2	<i>Solanum tuberosum</i>	StP1	577	65.7	6.88	63	CAA58775.1
3	<i>Solanum tuberosum</i>	StP2	582	66.3	8.54	61	CAB52708.1
4	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtCy	510	58.5	6.32	—	CAA04992.1
5	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtP1	588	66.8	6.89	66	CAA04994.1
6	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtP2	593	67.4	8.80	16	AAF87216.1
7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCy1	516	59.2	8.60	—	At3g27300.1

续表 1

8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCy1.1	515	59.1	6.37	—	At5g40760.1
9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtP1	576	65.4	7.83	50	At5g35790.1
10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtP2	596	67.2	8.48	50	At5g13110.1
11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtP2.1	599	67.4	7.2	57	At1g24280.1
12	<i>Oryza sativa</i>	OsCy	505	57.7	6.49	—	LOC_Os02g38840.1
13	<i>Oryza sativa</i>	OsP1	577	64.8	8.50	46	LOC_Os03g29950
14	<i>Oryza sativa</i>	OsP2	588	66.1	8.40	32	LOC_Os07g22350
15	<i>Zea mays</i>	ZmCy	507	57.6	6.31	—	NP_00115068
16	<i>Zea mays</i>	ZmP1	605	68.3	8.95	73	NP_001169871.1
17	<i>Zea mays</i>	ZmP2	598	67.1	8.36	57	ACG29334
18	<i>Populus trichocarpa</i>	PtCy1	514	59.2	6.27	—	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XVII0625
19	<i>Populus trichocarpa</i>	PtCy1.1	510	58.5	6.07	—	grail3.0054015801
20	<i>Populus trichocarpa</i>	PtP1	571	65.1	8.49	59	fgenes4_pm.C_LG_XIV000487
21	<i>Populus trichocarpa</i>	PtP2	603	68.3	8.24	65	estExt_Genewise1_v1.C_LG_I7789
22	<i>Populus trichocarpa</i>	PtP2.1	600	67.9	8.27	62	eugene3.00031378
23	<i>Ricinus communis</i>	RcP1	593	68.0	8.40	78	XM_002530175.1
24	<i>Ricinus communis</i>	RcP2	600	68.2	7.59	61	XP_002514877.1
25	<i>Medicago truncatula</i>	MtCy1	515	58.9	5.85	—	Q42919
26	<i>Medicago truncatula</i>	MtCy2	515	58.5	7.17	—	ACJ85742
27	<i>Sorghum bicolor</i>	SbCy	507	57.8	6.45	—	estExt_Genewise1.C_chr_65912
28	<i>Sorghum bicolor</i>	SbP1	570	64.1	9.05	52	fgenes1_pg.C_chr_1003339
29	<i>Sorghum bicolor</i>	SbP2	596	66.7	8.58	41	estExt_Genewise1Plus.C_chr_60876
30	<i>Hordeum vulgare</i>	HvCy	511	58.0	6.26	—	FJ790424
31	<i>Hordeum vulgare</i>	HvP2	588	65.5	8.41	38	CAL44728
32	<i>Hordeum vulgare</i>	HvP2.1	589	65.6	8.23	39	BAJ94515.1
33	<i>Petroselinum crispum</i>	PcCy	495	57.2	6.10	—	AAB69318.1
34	<i>Triticum aestivum</i>	TaCy	513	58.3	5.92	—	BAA97663.1
35	<i>Vitis vinifera</i>	VvP2	585	66.1	7.18	38	XP_002266930.1
36	<i>Spinacia oleracea</i>	SoP1	574	65.3	7.29	18	AJ000182.1
37	<i>Glycine max</i>	GmCy	518	59.3	6.32	—	AEI54339.1

All transit peptide cleavage sites predict by methods of ChloroP and TargetP except StP1, NtP1, StP2 and OsP1 by UniProt Database.

6 展望

虽然随着基因组和蛋白质组的发展,许多研究者获得了大量转录序列,但是分析催化特定生化通路中单一路径反应的酶,仍然是一种十分重要的策略^[57]。

已有研究报道人体的 G6PDH 晶体结构^[58]及三维结构模型^[59],以探讨 G6PDH 缺失突变体对机体的影响。但植物 G6PDH 结构的研究目前还未见报道。G6PDHs 作为植物 PPP 途径中起关键性调控酶,对其结构研究将有助于更深入了解该酶调控机制,从而进一步了解此 G6PDHs 在植物中的规律和功能,为基因改良植物做准备。

虽然众多研究认为质体 P2 型 G6PDHs 在植物中发挥着重要的作用,推测其可能是因为质体 G6PDH 保守氨基酸序列中的 Cys 残基的氧化还原修饰有关,但其半胱氨酸的具体氧化还原调节的分子机理仍然不清楚。因此,今后有必要对其进行深入研究,以了解其具体调控机制。

由于 RNAi 具有高度的序列专一性和有效的干扰活力,因此,它可以在不破坏基因结构或不引起基因突变的情况下,敲除某种基因,以研究它的功能。已有研究表明 RNAi 能够在哺乳动物中抑制特定基因的表达,制作多种表型,而且抑制基因表达的时间可以控制在发育的任何阶段,产生类似基因敲除的效应。但是,它用于转基因植物 G6PDHs 的研究才刚刚开始。因此,有必要运用这种新技术,研究各种质体和胞质 G6PDHs 基因参与植物生长发育及抵抗各种生物和非生物的环境胁迫的调控机制,将有利于我们全面地

认识 G6PDH 的功能。

REFERENCES

- [1] Esposito S, Massaro G, Vona V, et al. Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta*, 2003, 216: 639–647.
- [2] Hutchings D, Rawsthorne S, Emes MJ. Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot*, 2005, 56(412): 577–585.
- [3] Huang J, Wang JF, Zhang HS. Advances on plant pentose phosphate pathway and its key enzymes. *Chin Bull Bot*, 2004, 21(2): 139–145.
黄骥, 王建飞, 张红生. 植物戊糖磷酸途径及其两个关键酶的研究进展. *植物学通报*, 2004, 21(2): 139–145.
- [4] Kruger NJ, Von Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(3): 236–246.
- [5] Scheibe R. Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol Plant*, 2004, 120(1): 21–26.
- [6] Scharte J, Schön H, Tjaden Z, et al. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(19): 8061–8066.
- [7] Lin SZ, Zhang ZY, Liu WF, et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, 31(1): 34–40.
- [8] Spolarics Z, Condon MR, Siddiqi M, et al. Red blood cell dysfunction in septic glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(6): H2118–H2126.
- [9] Pinna A, Carru C, Solinas G, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in retinal vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,

- 2007, 48(6): 2747–2752.
- [10] Sobngwi E, Gautier JF, Kevorkian JP, et al. High prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency without gene mutation suggests a novel genetic mechanism predisposing to ketosis-prone diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(8): 4446–4451.
- [11] Park J, Rho HK, Kim KH, et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 5146–5157.
- [12] Legan SK, Rebrin I, Mockett RJ, et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase extends the life span of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32492–32499.
- [13] Geigenberger P, Kolbe A, Tiessen A. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot*, 2005, 56(416): 1469–1479.
- [14] Eicks M, Maurino V, Knappe S, et al. The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol*, 2002, 128(2): 512–522.
- [15] Wang XM. Studies on the mechanism of regulations of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptation of reed callus to salt stress[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2008.
王晓敏. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在芦苇愈伤组织盐适应性中调节作用的机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- [16] Dennis DT, Miernyk JA. Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Annu Rev Plant Metab*, 1982, 33: 23–50.
- [17] Wakao S, Benning C. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2004, 41(2): 243–256.
- [18] Wendt UK, Wenderoth I, Tegeler A, et al. Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J*, 2000, 23(6): 723–733.
- [19] Wakao S, Andre C, Benning C. Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 146(1): 277–288.
- [20] Hauschild R, Von Schaewen A. Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol*, 2003, 133(1): 47–62.
- [21] Ben-Bassat D, Anderson LE. Light-induced release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase to the stroma in pea chloroplasts. *Plant Physiol*, 1981, 68(2): 279–283.
- [22] Wenderoth I, Scheibe R, Von Schaewen A. Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1997, 272(43): 26985–26989.
- [23] Wendt UK, Hauschild R, Lange C, et al. Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plant. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(3): 487–494.
- [24] Zhao YH, Liu HQ, Yang SL, et al. Affection of respiratory inhibitor NaN_3 on dormancy relieving and germination of *Panax quinquefolium* seed and its synergistic effect with low temperature. *Prim J Chin Mat Med*, 2000, 14(4): 6–7.
赵永华, 刘惠卿, 杨世林, 等. 呼吸抑制剂 NaN_3 对西洋参种子休眠和萌发的影响及其与温度的相互作用. *基层中药杂志*, 2000, 14(4): 6–7.
- [25] Huang J, Zhang HS, Wang JF, et al. Molecular cloning and characterization of rice 6-phosphogluconate dehydrogenase gene that is up-regulated by salt stress. *Mol Biol Rep*, 2003, 30(4): 223–227.
- [26] Xu YL, Guan CY, Tan TL, et al. Changes of oil content and oil biosynthesis-related enzymes activities and their correlation during seed formation in *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 2008, 34(10): 1854–1857.
徐一兰, 官春云, 谭太龙, 等. 油菜种子形成中

- 含油量与其合成相关酶活性的变化及其相关性. 作物学报, 2008, 34(10): 1854–1857.
- [27] Chen C. Study on the role of G6PD in the elicitor-mediated taxol biosynthesis and the mechanism of its antioxidation [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2004.
- 陈超. G6PD 在诱导合成紫杉醇中的作用及其抗氧化机理研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2004.
- [28] Wang Z. Plant Physiology. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- 王忠. 植物生理学. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [29] Ye JR, Huang SH, Li CD, et al. Studies on the relation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phenylalanine ammonia lyase in slash needles with resistance to brown spot needle blight. Sci Silvae Sin, 1994, 30(5): 430–435.
- 叶建仁, 黄素红, 李传道, 等. 磷酸葡萄糖脱氢酶和苯丙氨酸解氨酶与抗松针褐斑病的关系. 林业科学, 1994, 30(5): 430–435.
- [30] Šindelář L, Šindelářová M. Correlation of viral RNA biosynthesis with glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and host resistance. Planta, 2002, 215(5): 862–869.
- [31] Asai S, Yoshioka M, Nomura H, et al. A plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase is responsible for hypersensitive response cell death and reactive oxygen species production. J Gen Plant Pathol, 2011, 77(3): 152–162.
- [32] Sagisaka S. Injuries of cold acclimatized poplar twigs resulting from enzyme inactivation and substrate depression during frozen storage at ambient temperatures for a long period. Plant Cell Physiol, 1985, 26(6): 1135–1145.
- [33] Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, et al. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. Plant Cell Environ, 2006, 29: 1449–1459.
- [34] Nemoto Y, Sasakuma T. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Sci, 2000, 158(1/2): 53–60.
- [35] Wang SH, Zhang H, He QY. Effects of copper stress on *Medicago sativa* seedlings leaf antioxidative system. Chin J Appl Ecol, 2011, 22(9): 2285–2290.
- 王松华, 张华, 何庆元. 铜胁迫对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化系统的影响. 应用生态学报, 2011, 22(9): 2285–2290.
- [36] Wang H. Methyl jasmonate in soybean the protective effect of drought adaptation in the physiological response[D]. Beijing: Central University for Nationalities, 2011.
- 王慧. 茉莉酸甲酯在大豆抗旱适应中保护作用的生理响应[D]. 北京: 中央民族大学, 2011.
- [37] Graeve K, Schaewen A, Scheibe R. Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato. Plant J, 1994, 5(3): 353–361.
- [38] Persico MG, Viglietto G, Martini G, et al. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. Nucleic Acids Res, 1986, 14(6): 2511–2522.
- [39] Thomas D, Cherest H, Surdin-Kerjan Y. Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. EMBO J, 1991, 10(3): 547–553.
- [40] Fahrendorf T, Ni WT, Shorrosh BS, et al. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. Plant Mol Biol, 1995, 28(5): 885–900.
- [41] von Schaewen A, Langenkamper G, Graeve K, et al. Molecular characterization of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato in comparison to its cytosolic counterpart. Plant Physiol, 1995, 109(4): 1327–1335.
- [42] Knight JS, Emes MJ, Debnam PM. Isolation and characterisation of a full-length genomic clone

- encoding a plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 2001, 212(4): 499–507.
- [43] Hou FY, Huang J, Lu JF. Isolation and expression analysis of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Gen Sin*, 2006, 33(5): 441–448.
- [44] Lin YZ. Gene cloning, structure analysis and function identification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Populus suaveolens*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006.
林元震. 甜杨葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因克隆及结构分析与功能鉴定[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [45] Lin YZ, Zhang ZY, Guo H, et al. Isolation and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) promoter from poplar. *Gen Appl Biol*, 2009, 28(3): 445–449.
林元震, 张志毅, 郭海, 等. 杨树葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)基因启动子的克隆与分析. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(3): 445–449.
- [46] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, 404(6775): 293–296.
- [47] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101(1): 25–33.
- [48] Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science*, 2002, 296(5571): 1260–1263.
- [49] Montgomery MK. RNA interference: historical overview and significance. *Methods Mol Biol*, 2004, 265: 3–21.
- [50] Kavi HH, Fernandez H, Xie WW, et al. Genetics and biochemistry of RNAi in *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 320: 37–75.
- [51] Nowotny M, Yang W. Structural and functional modules in RNA interference. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, 19(3): 286–293.
- [52] Debnam PM, Fernie AR, Leisse A, et al. Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. *samsun*) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J*, 2004, 38(1): 49–59.
- [53] Cardi M, Chibani K, Cafasso D, et al. Absciscic acid effects on activity and expression of barley (*Hordeum vulgare*) plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Exp Bot*, 2011, 62(11): 4013–4023.
- [54] Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*, 1999, 8(5): 978–984.
- [55] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, 300(4): 1005–1016.
- [56] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [57] White JA, Todd J, Newman T, et al. A new set of arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol*, 2000, 124(4): 1582–1594.
- [58] Au SWN, Gover S, Lam VMS, et al. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 2000, 8(3): 293–303.
- [59] Kiani F, Schwarzl S, Fischer S, et al. Three-dimensional modeling of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants from German ancestry. *PLoS One*, 200, 2(7): e625.