

植物E3泛素连接酶的分类与功能

田爱梅^{1*} 于晖² 曹家树²

(¹西安文理学院生物与环境工程学院, 西安 710065; ²浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310058)

摘要 蛋白质泛素化作为一种重要的翻译后修饰, 通过介导特定蛋白质的降解, 广泛地参与到植物生长发育、胁迫响应、信号转导等一系列生命活动过程中, 在植物的生命周期中具有重要意义。E3泛素连接酶能够特异性地识别靶蛋白, 在泛素化途径中起决定性作用。因此, 研究植物E3泛素连接酶的功能及其作用机理具有重要的意义。该文介绍了目前E3泛素连接酶分类与功能方面的研究进展, 为深入探讨E3泛素连接酶在植物生命活动过程中的调控机制提供借鉴。

关键词 E3泛素连接酶; 分类; 功能

Classification and Function of E3 Ubiquitin Ligase in Plants

TIAN Aimei^{1*}, YU Hui², CAO Jiashu²

(¹College of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an 710065, China;

²Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Protein ubiquitination mediates the degradation of specific proteins as an important posttranslational modification, which is widely involved in a series of life processes, such as plant growth and development, stress response, signal transduction, etc. E3 ubiquitin ligase can specifically recognize target proteins and play a decisive role in the ubiquitin pathway. Therefore, it is of great significance to study the function and mechanism of plant E3 ubiquitin ligase. In this paper, the progress in the classification and function of E3 ubiquitin ligase are reviewed in order to provide references for further exploring the regulation mechanism of E3 ubiquitin ligase in plants.

Keywords E3 ubiquitin ligase; classification; function

泛素化系统是在细胞内发生的一种蛋白质降解体系。作为一种重要的翻译后修饰作用(post-translational modification, PTM), 蛋白质泛素化通过介导特定蛋白质的降解, 广泛地参与到植物生长发育、胁迫响应、信号转导等一系列生命活动过程中, 在植物的生命周期中具有重要意义^[1-3]。E3泛素连接酶是泛素化系统中识别靶蛋白质的关键酶, 在泛素化过程中发挥巨大作用。近年来, 随着基因组学、转录组学和蛋白组学的不断进步, 人们对蛋白质泛

素化认识日益丰富。对泛素化体系进行深入探究有助于更好地了解植物生命机理。

1 泛素及泛素化

泛素化修饰是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 在真核生物的生命过程中通过调节非正常折叠蛋白或短寿命蛋白的稳定性、改变蛋白的亚细胞定位、组装和活性进而影响其功能的发挥, 在真核生物的生长发育和响应生物及非生物胁迫等方面发挥重要

收稿日期: 2019-08-14

接受日期: 2019-12-05

国家自然科学基金(批准号: 31872128、31372083)、陕西省重点研发计划(批准号: 2019NY-035)和西安市科技创新项目(批准号: 2017CGWL04)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-88221008, E-mail: tianaimei@126.com

Received: August 14, 2019

Accepted: December 5, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31872128, 31372083), Shaanxi Province key Research and Development Program (Grant No.2019NY-035) and Xi'an Science and Technology Innovation Project (Grant No.2017CGWL04)

*Corresponding author. Tel: +86-29-88221008, E-mail: tianaimei@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5256>

功能^[4]。泛素蛋白是含有76个氨基酸的多肽。在脊椎动物和高等植物中, 泛素氨基酸序列绝对保守。动物、植物和微生物如真菌之间泛素的差异仅存在于2~3个残基^[5]。这种高度保守性说明, 不同物种间的泛素在功能上可以实现互换, 如在酿酒酵母中, 用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)泛素蛋白代替酵母泛素蛋白, 并未出现与酵母泛素表达菌株明显不同的结果^[6]。

蛋白质的泛素化是一个包括3种酶的复杂反应过程, 这3种酶是E1泛素激活酶、E2泛素结合酶和E3泛素连接酶。E1泛素激活酶水解ATP, 通过激活泛素, 在E1泛素激活酶和泛素间形成硫酯键, 活化的泛素通过交酯作用被转移到E2泛素结合酶上, 之后E3泛素连接酶将结合E2泛素结合酶的泛素特异地连接到底物蛋白上, 在26S蛋白酶体上靶蛋白最终被水解为较小的肽段^[7]。E3泛素连接酶能够特异性地识别靶蛋白, 在泛素途径中起决定性作用。与泛素连接的蛋白又被称为泛素连接酶。

2 E3泛素连接酶及其类型

E3泛素连接酶能够识别底物蛋白, 促进泛素向底物蛋白转移, 是泛素化反应的关键酶。E3泛素连接酶数量庞大, 种类繁多且功能最为复杂, 是当今研究的热点。拟南芥中有多于1 400个基因编码E3泛素连接酶, 水稻中E3泛素连接酶基因也有1 300多个^[7-8]。

根据其所包含的结构域及与底物的结合方式, E3泛素连接酶被分为HECT(homologous to e6-associated protein carboxyl terminus)、U-box、RING(really interesting new gene)以及CRLs(cullin-RING ligases)4类^[8]。其中, HECT、RING和U-box型E3泛素连接酶为单亚基E3泛素连接酶。而CRLs型E3泛素连接酶则为多亚基E3泛素连接酶。

HECT型E3泛素连接酶含有约350个氨基酸组成的保守结构域HECT。HECT型E3泛素连接酶通过结构域内的半胱氨酸(Cys)残基先与泛素形成硫酯中间体, 再将泛素与靶蛋白连接。HECT型E3泛素连接酶的数量在不同的物种之间差异很大。在拟南芥中鉴定了7个HECT型E3泛素连接酶^[9-10]。

U-box结构域包含大约70个氨基酸, 与RING指结构域类似, 但它缺乏经典的锌螯合Cys和组氨酸(His)残基。植物中有较多的U-box型E3泛素连接酶。其中拟南芥有64个成员, 在水稻中有77个成员^[11-13],

说明这类蛋白在植物中发挥更多的作用。

RING结构域是一个由40~60个氨基酸组成富含Cys的区域, 由含有8个空间保守的Cys和His残基充当金属配体, 以螯合2个锌离子来实现泛素向靶蛋白的转移。因RING型E3泛素连接酶数量众多, 且其在植物发育过程和应激反应中功能特异, 目前关于RING型E3泛素连接酶的研究已逐渐成为热点。RING结构域和U-box结构域在结构上相似, RING和U-box型E3泛素连接酶直接将活化的泛素从E2泛素结合酶上转移到靶蛋白, 其本身并不与泛素发生作用^[1,14]。

CRLs型E3泛素连接酶具有高度多态性, 由cullin骨架蛋白、E2结合蛋白RBX1(RING Box 1)和结合cullin的底物识别亚基构成^[15-16]。拟南芥中已鉴定的5种经典的cullin蛋白(CUL1、CUL2、CUL3a、CUL3b和CUL4)属于E3泛素连接酶复合物的组分^[17]。

根据结合到底物蛋白上泛素的数量, E3泛素连接酶分为以下几种类型: 有的底物蛋白只能被单泛素化, 被称为单泛素化修饰; 有的底物蛋白存在多个赖氨酸残基, 在一定条件下会被多位点单泛素化, 被称为多泛素化修饰; 还有一些蛋白在单个赖氨酸位点会形成多聚泛素链, 根据连接泛素链的赖氨酸位点的不同多聚泛素链可分为单一、混合以及树枝状的结构, 被称为多聚泛素化修饰等^[17-18]。

3 植物E3泛素连接酶的生物学功能

利用翻译后修饰调节蛋白质活性使得植物能够快速且特异性地对各种刺激作出反应, 而不需要经过耗能反应从头合成蛋白质。泛素化降解特定的蛋白, 调控从生长发育到对胁迫刺激应答等一系列植物生理活动^[18-20]。泛素/26S蛋白酶体作为一个重要的调控系统, 参与细胞的重要生命活动过程, 如细胞生长与凋亡、信号转导、周期调控、生物与非生物胁迫。

3.1 植物E3泛素连接酶与胁迫响应

在植物生命过程中不可避免地要面临各种不利于生存的条件。与其他生理活动一样, 植物通过蛋白质来实现胁迫响应, 细胞中蛋白的种类和含量直接影响植物抗逆能力, 因此, 蛋白质泛素化在植物胁迫中显得尤为重要^[21]。

3.1.1 生物胁迫 E3泛素连接酶已被证实在植物免疫的多个阶段发挥关键作用^[22]。泛素化一般通过

两种方式来来调控植物免疫反应: 分别是由病原分子激发的和相关的效应蛋白激发的免疫反应^[23-24]。同时, E3泛素连接酶也通过结合囊泡运输成分或转录因子等核蛋白来调节病原体感知信号^[25]。

植物U-box型E3泛素连接酶(plant U-box E3 ubiquitin ligases, PUBs)在植物免疫反应中的作用已经得到了广泛报道。在苹果(*Malus domestica*)中, MdPUB29能够激活植物对真菌病原物的响应。过表达MdPUB29能提高苹果植株对真菌病原物的抗性, 在苹果愈伤组织中沉默MdPUB29基因, 组织对真菌病原物的抗性降低。在拟南芥中过表达MdPUB29, 拟南芥表现出对真菌病原物的抗性^[26]。此外研究者发现, 植物对真菌病原物的防御与水杨酸(salicylic acid, SA)的含量有关, MdPUB29能够通过调节水杨酸途径, 提高植物对病原微生物的防御^[26]。在棉花中抑制GhPUB17的活性, 可以提高棉花对黄萎病菌的抗性。注射黄萎病菌或用外源的茉莉酸(jasmonic acid, JA)或水杨酸处理能显著上调GhPUB17在棉花根中的表达水平, 敲除GhPUB17后棉花植株的根部对黄萎病的抗性增强, 而过表达GhPUB17的植株更容易感染病菌。进一步通过酵母双杂交实验发现, GhPUB17能与抗真菌蛋白GhCyP3互作, GhCyP3通过抑制GhPUB17的连接酶活性, 削弱棉花植株对黄萎病的抗性。这些结果表明, GhPUB17是棉花对黄萎病抗性的负调控因子^[27]。马铃薯(*Solanum tuberosum*) StPUB17和烟草(*Nicotiana benthamiana*) NbPUB17是晚疫病的正向调节因子。马铃薯StPUB17干涉植株和烟草病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS) NbPUB17植株表现出晚疫病加剧的表型^[28-29]。拟南芥Exo70B2是一种胞囊复合体的亚基, 影响植物对多种病原体的免疫应答。Exo70B2作为U-box型E3泛素连接酶PUB22、PUB23和PUB24共同的靶标, 负向调节植物的天然免疫(plant innate immunity, PTI)系统。

拟南芥BOS1(BOTRYTIS SUSCEPTIBLE 1)是一种与胁迫和病原体反应有关的R2R3 MYB转录因子, BOI(Botrytis Susceptible 1 interactor)是核定位的RING型E3泛素连接酶, 与细胞中的BOS1相互作用^[30]。BOI能够将泛素蛋白转移到BOS1上并水解BOS1。BOI1表达的减少导致植物的对病原菌侵害的忍耐性降低。通过BOI RNAi获得的具有较低的BOI转录物水平的植株对灰葡萄孢菌(*Botrytis cin-*

rea)更敏感^[31]。在华东葡萄(*Vitis pseudoreticulata*)中, *VpUR9*基因的表达受白粉病和水杨酸的诱导, 转化*VpUR9*的转基因植株白粉病抗性受到抑制。与用白粉病菌或水杨酸处理的野生型植株相比, *VpUR9*转基因植株中一些抗性相关基因(如*NPRI*、*PR1*、*PR10*和*PAL*)的表达下调。这些结果表明, *VpUR9*负调控华东葡萄对白粉病的抗性^[32]。

3.1.2 非生物胁迫 植物经常暴露于干旱、极端温度和盐度变化等各种非生物胁迫中。为了在这种不利环境下生存, 植物在进化上发展了自己的抗性机制。几十年来, 研究者利用各种生化和遗传学手段来探究植物特定的应激反应途径, 研究表明, 泛素蛋白酶体系统与非生物胁迫反应途径密切相关。

HOS1(high expression of osmotically responsive gene 1)是一个RING型E3泛素连接酶。ICE1是调控低温诱导基因*CBF3*表达的转录因子, 泛素化分析发现, HOS1介导ICE1的泛素化。在-8 °C和-10 °C低温处理下, HOS1过表达幼苗的抗低温能力明显低于野生型。这些结果表明, HOS1负调控植物低温响应^[33]。水稻RING型E3泛素连接酶OsHCI1的表达受温度的影响。在拟南芥中过表达*OsHCII*, 植株耐热性增强。研究发现, 在高温下, OsHCI1沿着细胞骨架从高尔基体囊泡移动到细胞核, 通过单泛素化诱导底物核蛋白向细胞质转运, 该研究强调了E3泛素连接酶的核质分配在植物应激调节中的重要性^[34]。

DREB2A(dehydration-responsive element-binding protein 2A)是干旱响应基因的正向调节因子。RING型E3泛素连接酶DRIP1和DRIP2与细胞核中的DREB2A发生互作并利用泛素化途径调控植物体内DREB2A蛋白的含量。当遭受干旱胁迫时, 与野生型相比, 拟南芥*drip1drip2*双突变体植株在相同干旱条件下存活率更高^[35]。在适合的生存条件下, 植物体内有序进行DRIP1/DRIP2介导的DREB2A泛素化降解过程。然而, 干旱胁迫下, DREB2A蛋白的降解遭到阻碍, 致使DREB2A大量积累, 从而激活干旱响应基因表达, 提高了植物的抗旱性。DREB2A调节的干旱响应基因的表达受DRIP1的负调节。相比之下, 干旱诱导基因的表达在*drip1-1*和*drip2-1*的T-DNA插入突变体中略微增加。值得注意的是, 在缺水胁迫下, 干旱响应基因的表达在*drip1drip2*双突变体中显著增强, 暗示着DRIP1和DRIP2通过靶向降解DREB2A来实现对干旱胁迫的负调控^[36]。RGLG1(RING domain

ligase 1)和RGLG2, 作为RING型E3泛素连接酶, 与参与干旱和盐胁迫的AP2/ERF转录因子ERF53发生作用。当RGLG1和RGLG2功能丧失时, 植物耐旱性明显提升。体外泛素化实验揭示, RGLG1和RGLG2可以与ERF53发生作用并且实现泛素化。在拟南芥*rglg1rglg2*双突变体内, ERF53大量积累, 植物对干旱的忍耐力进一步提高^[37]。水稻OsDIS1是一个含RING保守结构域的E3泛素连接酶, 其参与水稻的干旱胁迫调节。在干旱条件下OsDIS1的表达上调。OsDIS1可能通过调节OsNek6蛋白翻译后修饰而在植物应激反应中发挥负面作用^[38-39]。此外水稻E3泛素连接酶基因OsSIRP2在盐胁迫下能被高度诱导, 过表达OsSIRP2能提高植物对盐和渗透胁迫的忍耐力^[40]。

XERICO编码一个相对较小的RING型E3泛素连接酶, 其转录水平受盐含量和渗透胁迫诱导。在种子萌发和幼苗早期生长期间, 过量表达XERICO的转基因拟南芥植株显示出对盐含量和渗透胁迫以及ABA(abscisic acid)的敏感性。在干旱胁迫下, XERICO提高了AtNCED3的表达^[41]。

在拟南芥中一个核定位的E3泛素连接酶基因AtATRF1(Al tolerance RING finger 1), 通过与一个和DNA修复和铝响应的相关基因AtATR互作并泛素化AtATR转录调控因子来调节拟南芥对铝的耐力。过表达AtATRF1基因能增强拟南芥对铝的抗性^[42]。

RUAN等^[43]通过酵母双杂交筛选到2个E3泛素连接酶SDEL1和SDEL2, 它们调节与磷胁迫相关的蛋白SPX4的降解。SDEL1和SDEL2定位于细胞核和细胞质中, 具有E3泛素连接酶活性, 通过泛素化SPX4来调节其稳定性。进一步的研究发现, 水稻中1个中心调控因子PHR2在磷胁迫条件下通过与SPX4互作能与SDELs竞争, 这保护了SPX4免受泛素化和降解。与SDEL1和SDEL2的生化功能相一致, 即使在磷充足的条件下, 过表达SDEL1或SDEL2, 会导致磷的过量积累和磷的饥饿信号的诱导。反之, 其功能缺失突变体表现出磷积累的下降和磷饥饿信号的减弱。该研究揭示, SDEL1和SDEL2促进SPX4的降解, 进而调节PHR2的活性并调控磷的动态平衡以及对外界磷的可利用性的响应信号。水稻E3泛素连接酶OsSPL11受低氮胁迫的调控。低氮胁迫强烈诱导了OsSPL11在该基因过表达植株根部的表达, 相比野生型水稻植株, *spl11*突变体的根密度在低氮

条件下降低。研究者还发现, OsSPL11调控低氮胁迫诱导的叶片衰老。与野生型水稻相比, 低氮胁迫下的*spl11*突变体植株出现早期衰老。低氮胁迫下在*spl11*突变体植株中一些典型衰老相关基因表达显著上调, 病斑表型受到抑制, 同时防御和细胞死亡相关的基因表达降低。这些结果表明, OsSPL11是水稻对低氮胁迫的正调控因子^[44]。

3.1.3 植物E3泛素连接酶与植物激素 植物利用激素来感知内源和外源信号。已有大量证据表明, 蛋白质泛素化与生长素(auxin)、脱落酸(abscisic acid)、茉莉酸、水杨酸、乙烯(ethylene)等植物激素的产生、感知、信号转导和输出存在直接联系。

泛素化修饰通过调节蛋白稳定性和活性及其所参与的内膜运输途径对ABA信号进行调控, 实现对脱落酸的合成和信号转导过程的关键因子的调控, 进而影响植物对ABA的响应, 参与植物生长发育过程及对干旱、盐和冷胁迫等不良环境的应答^[4]。

ABA作为植物主要的激素之一, 在控制非生物胁迫下的细胞生理反应如渗透调节、高盐和寒冷以及胚胎发育、植物的种子和芽休眠、发芽、子叶绿化、营养生长和开花等发育过程中发挥重要作用^[41-45]。揭示ABA信号机制的最大难点在于ABA受体的确定。最近, 关于ABA受体和ABA信号传导蛋白的泛素化已经被广泛报道, 这暗示着泛素化在ABA信号传导机制中的重要性。RING型E3泛素连接酶RSL1(single-subunit ring-type E3 ubiquitin ligase 1)在质膜上与PYR/PYL/RCAR家族的PYL1和PYL4互作。RSL1在体外泛素化PYR1和PYL4, RSL1的表达可以影响到ABA的灵敏性, 并可以推动体内的PYR1和PYL4受体发生降解, 这些结果为PYR1和PYL4是RSL1的泛素化底提供了证据。AIP2(ABI3-interacting protein 2)是一个具有RING结构域的E3泛素连接酶, 它可以体外泛素化ABA信号通路中的下游基因ABI3^[46-47]。CUL4-DDB1骨架的E3泛素连接酶利用DWA1和DWA2作为底物识别亚基, 在细胞核中充当ABI5含量的负调节物。*dwa1*、*dwa2*和*cul4*拟南芥突变体对ABA、盐以及干旱的敏感性提高, 并且在ABA处理后盐以及干旱胁迫和ABA响应基因表达上调^[48]。另外, CUL^{BPM}E3泛素连接酶通过降解ABA诱导转录因子ATHB6来减少拟南芥对胁迫环境的敏感性^[49]。拟南芥E3泛素连接酶SINA(seven in absentia)与一种作为正调控因子的核

蛋白CDKG1(cyclin dependent kinase G1)互作, 调节植物对ABA和渗透胁迫的响应^[50]。

茉莉酸及其前体和衍生物被统称为茉莉酮酯(jasmonates, JAs), 广泛分布于植物的幼嫩组织以及有性生殖器官^[51-52]。JAs诱导特定代谢来调节创伤反应。JAs通过调节植物对温度、干旱和盐等非生物胁迫的响应, 进一步提高植物适应性, 从而改善植物在不利条件下的生长和发育。泛素化作为蛋白降解的主要路径参与JA的合成、信号转导等过程。

JAZ(jasmonate ZIM-domain)蛋白是MYC2活性的抑制因子。JAZ蛋白对JA信号通路起负调控作用, JA感知会引发植物中特定代谢物的产生。在藜苜蓿中, JA诱导三萜皂苷的产生, E3泛素连接酶MtMKB1(MAKIBISHI1)调节JA引起藜苜蓿三萜皂苷产生的过程^[53]。RGLG3和RGLG4这两个拟南芥E3泛素连接酶作为JA反应的正调节因子存在功能冗余现象。另外, RGLG3和RGLG4还涉及在调节真菌病原体串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)感染引起的免疫反应SA和JA的交叉调节^[54]。然而, RGLG3和RGLG4在这些过程中具体的分子机制以及RGLG3和RGLG4的泛素化靶标仍有待进一步挖掘。拟南芥PUB10属于U-box型E3泛素连接酶, 以26S蛋白酶体的方式降解MYC2。PUB10及PUB11均可结合MYC3和MYC4, 但目前尚未对这些MYC2相关转录因子的泛素化进行更为深入的研究。虽然在PUB10功能缺失植株中MYC2的积累有所增加, 但MYC2仍然是一种不稳定的蛋白质, 推测可能存在其他的E3泛素连接酶来共同控制植物中MYC2的蛋白水平^[55]。

E3泛素连接酶也参与了水杨酸、生长素和乙烯、油菜素内脂等激素响应过程^[56]。U-box结构域家族E3泛素连接酶PUB13通过SA途径来调控植物的开花时间^[57]。当生长素存在时, SCF^{TIR1/AFB}复合体降解转录抑制因子AUX或IAA家族蛋白^[58]。拟南芥E3泛素连接酶基因HOS1在胚轴延长过程中负调控生长素的合成。在光照条件下, HOS1缺失突变体为长胚轴, 而在黑暗条件下为短胚轴, 这与生长素过量生成突变体表型一致。在HOS1突变体中, 生长素合成基因如YUCS、CYP7932被上调, 而内源生长素水平增加。总之, HOS1在拟南芥胚轴延长过程中调控生长素的合成可能与光和生长素信号有关^[59]。XBAT32通过泛素化乙烯生物合成酶ACS4和ACS7来参与乙烯的产生进而影响侧根的生长^[60-61]。

3.2 植物E3泛素连接酶与花粉发育

花粉发育是植物有性生殖的重要一环, 与种子的质量、雄性不育、自交不亲和等农产品性状息息相关。在花粉发育、授粉和受精过程中, 花粉壁不仅为雄配子提供保护, 而且还在花粉和柱头交流中起作用^[62]。花粉壁结构的破坏往往会造成花粉缺陷, 导致部分或完全的雄性不育^[63-65]。植物花粉壁的正常发育是有性生殖的先决条件, 解析花粉壁如何正常有效发育具有重大的指导意义。花粉壁由花粉外壁和内壁组成, 花粉内壁的正常形成对维持花粉粒形态、花粉萌发和花粉管伸长有积极作用。泛素介导的降解作用参与植物花粉发育。拟南芥HUB1和HUB2蛋白在H2Bub1单泛素化途径中具有E3泛素连接酶功能, 其同源基因OsHUB1和OsHUB2参与水稻花药后期发育, 在水稻的雄性生殖发育中发挥着重要作用。oshub突变体减数分裂后的花药表现出绒毡层发育异常、花粉败育的性状^[66]。花药开裂是雄蕊发育的必要过程。在这个过程中, 花药子房释放成熟的花粉粒进行授粉。磷脂酶A1蛋白DAD1(deficient in anther dehiscence 1)催化JA生物合成的起始步骤即从叶绿体膜中释放 α -亚麻酸, 而ad1突变体的花药无法正常开裂且花粉没有活力, 并出现畸形, 最终导致雄性不育^[66-67]。然而, 施用外源JA可以恢复花粉育性。当植物中E3泛素连接酶DAF(defective in anther dehiscence-activating factor)的表达被抑制时, 植物也会产生与dad1突变体相同的表型^[67]。AtPUB4是一个U-box型E3泛素连接酶。T-DNA插入获得的突变体Atpub4莲座丛变小, 叶子变狭窄, 花和花瓣变短, 花粉粒彼此黏附与不完全退化的绒毡层细胞的残余物相连, 花粉粒不能正常地从开裂的花药散出, 花粉外壁畸形, 植物育性受损^[68-69]。这些研究表明, E3泛素连接酶与植物生殖发育密切相关。

我们课题组在对白菜雄性不育相关基因msLTP进行功能分析时发现, RING型E3泛素连接酶(Bra015092)可以与msLTP基因的启动子区结合调控msLTP的表达, 进而在花粉发育过程中行使功能, 目前该E3泛素连接酶基因(Bra015092)在花粉发育过程中的确切功能分析正在进行中(未发表)。这将为研究E3泛素连接酶在生殖发育中的功能提供新的依据, 为全面解析蛋白质泛素化途径提供借鉴。

3.3 其他功能

E3泛素连接酶对底物的修饰分为单泛素化和

多聚泛素化修饰,由E3与底物的相对比例决定。多聚泛素化修饰的靶蛋白一般被26S的蛋白酶体所降解,从而对细胞周期调控、胞吞作用、DNA修复、信号转导、蛋白质的质量控制、细胞凋亡、亚细胞定位等过程具有重要的作用^[68-69]。最近的研究发现,拟南芥中泛素连接酶拮抗调控UV-B信号的应答。黄烯课题组^[70]在前期研究UVR8亚细胞定位与活性调控机制的基础上,为进一步阐释植物如何平衡UV-B信号的“油门”与“刹车”,从探究拟南芥对HY5的负调控机制入手,鉴定出两个新的泛素连接酶复合体CUL4-DDB1底物受体,即同源蛋白RUP1和RUP2。它们是HY5的互作因子,与CUL4-DDB1

在UV-B下组装成泛素连接酶复合体,通过26S蛋白酶体途径介导HY5蛋白进行降解,从而实现对光形态建成的抑制。大豆E3泛素连接酶基因*GmAIRP1*能够通过激活抗氧化酶活性、提高渗透调节物质的积累来增强植物抵御高盐和干旱胁迫的能力,在植物响应高盐和干旱胁迫中发挥正调控作用。在高盐和干旱胁迫下,*GmAIRP1*基因的表达能更有效地启动植株的抗氧化酶系统,提高抗氧化酶活性,以降低胁迫对膜的损伤程度,同时可以借助脯氨酸含量的提高来增强植株的渗透调节能力,从而增强植株抵御逆境的能力^[71]。一些常见植物中的E3泛素连接酶基因类型及其功能过程见表1。

表1 部分常见植物的E3泛素连接酶类型及其功能

Table 1 E3 ubiquitin ligases types and their functions in some common plants

物种 Species	名称 Name	类型 Type	功能 Function	参考文献 Reference
<i>Triticum aestivum</i>	TaSDIR1	RING	Response to abiotic stress	[21]
<i>Oryza sativa</i>	ZFRG1	RING	Regulating the response process of drought stress	[66]
<i>Oryza sativa</i>	SPL11	U-box	Negative regulation of plant immune response	[23]
<i>Oryza sativa</i>	PUB44	U-box	The target protein xopXoo regulates the immune response by directly interacting with ospub44	[26]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PUB13	U-box	Regulation of Arabidopsis development (including plant and leaf size, flowering time), cell death and resistance signaling	[57]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PUB30 PUB31	U-box	The responses of atpub30 and atpub31 to salt stress during germination were negatively and positively regulated, respectively	[29]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CPR1	F-box	Negative regulation of plant immune response	[30,33]
<i>Gossypium spp</i>	GhRING1-like	RING	Positive regulation of plant drought resistance through ABA dependent pathway	[27]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	SINA1	RING	The development of tomato fruit size may be controlled by the influence of cell size and number on the thickness of peel	[17,19]
<i>Glycine max</i>	GmAIRP1	RING	playing a positive role in plant response to high salt and drought stress	[40]
<i>Vitis pseudoreticulata</i>	EIRP1	RING	Eirp1 positively regulates plant disease resistance through protein degradation of negative regulator vpwky11	[32,43]
<i>Nicotiana tabacum</i>	CMPG1	U-box	Through the inhibition of signal transduction and pathogen perception by target protein avr3, plant immune response is positively regulated	[24,71]
<i>Piper Nigrum</i>	CaRING1	RING	Ubiquitination involved in the induction of cell death and the defense response of pathogenic microorganisms	[44]
<i>Brassica campestris</i>	ARC1	U-box	Through the target protein srk2 like kinase, the immunoreaction is positively regulated, which is involved in the signal transduction process of self compatibility	[65]

4 结语与展望

E3泛素连接酶家族庞大且功能较为复杂, 是当今研究的热点。在泛素化过程中通过泛素活化酶、结合酶和连接酶协同作用将泛素分子连接到靶蛋白上, 然后在26S蛋白酶体催化下靶蛋白发生降解。因此, E3泛素连接酶作为泛素化-蛋白酶途径的重要组成部分是目前研究植物生长发育与胁迫响应机制的重点。但目前有关E3泛素连接酶在通过染色质泛素化促进DNA修复或转录调控方面的机理还不明确; 为了进一步理解E3泛素连接酶在非生物胁迫中的确切功能, 破译E3泛素连接酶与激素信号和代谢之间的联系也已成为当务之急; 又如MdPUB29作为一个E3泛素连接酶, 是否通过泛素化其他蛋白, 经由26S蛋白酶体调控SA途径, 进而增强了植物的抗病性? 揭示全面系统的E3泛素连接酶HOS1调控胚轴延伸有关的调控因子的分子组成及信号网络的研究工作有待进一步深入。

参考文献 (References)

- [1] STONE S L, HERBORG H, ANDREW T, et al. Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137(1): 13-30.
- [2] LIU H, STONE S. E3 ubiquitin ligases and abscisic acid signaling [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6(3): 344-8.
- [3] 魏东, 邓堂刚, 叶茂. 去泛素化酶与细胞周期调控[J]. *中国细胞生物学学报*(WEI D, DEND T G, YE M. Deubiquitinase and cell cycle regulation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(3): 1-9.
- [4] 于菲菲, 谢旗. 泛素化修饰调控脱落酸介导的信号途径[J]. *遗传*(YU F F, XIE Q. Ubiquitination modification precisely modulates the ABA signaling pathway in plants [J]. *Hereditas*), 2017, 39(8): 692-706.
- [5] CALLIS J, VIERSTRA R D. Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants [J]. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol*, 1989, 6: 1-30.
- [6] LING R, COLON E, DAHMUS M E, et al. Histidine-tagged ubiquitin substitutes for wild-type ubiquitin in *Saccharomyces cerevisiae* and facilitates isolation and identification of *in vivo* substrates of the ubiquitin pathway [J]. *Anal Biochem*, 2000, 282(1): 54-64.
- [7] NAGELS D A, PAUWELS L, GOOSSENS A. The ubiquitin system and jasmonate signaling [J]. *Plants*, 2016, 5(1): 6.
- [8] VIERSTRA R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10(6): 385-97.
- [9] HUIBREGTSE J M, SCHEFFNER M, BEAUDEDON S, et al. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(11): 2563-7.
- [10] DOWNESB M, STUPAR R J, GINGERICH D D, et al. The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development [J]. *Plant J*, 2003, 35(6): 729-42.
- [11] AZEVEDO C, SANTOS-ROSA M J, SHIRASU K. The U-box protein family in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(8): 354-8.
- [12] WIBORG J, OSHEA C, SKRIVER K. Biochemical function of typical and variant *Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases [J]. *Biochem J*, 2008, 413(3): 447-57.
- [13] ZENG L R, PARK C H, VENU R C, et al. Classification, expression pattern, and E3 ligase activity assay of rice U-box-containing proteins [J]. *Mol Plant*, 2008, 1(5): 800-15.
- [14] YEE D, GORING D R. The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates [J]. *J EXP BOT*, 2009, 60(4): 1109-21.
- [15] CHEN L, HELLMANN H. Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(5): 1388-404.
- [16] CALLIS J. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book*, 2014, 12: e0174.
- [17] HOTTON S K, CALLIS J. Regulation of cullin RING ligases [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 467-89.
- [18] 杨珍珍, 王志龙, 卢向阳, 等. 水稻泛素连接酶功能研究进展 [J]. *中国农学通报*(YANG Z Z, WANG Z L, LU X Y, et al. The advance in functional studies of rice ubiquitin ligases [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2013, 29(18): 1-5.
- [19] MOON J, PARRY G, ESTELLE M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development [J]. *Plant Cell*, 2004, (12): 3181-95.
- [20] VIERSTRA R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10(6): 385-97.
- [21] 张燕, 夏更寿, 傅伟红, 等. 泛素化E3连接酶在植物抗非生物胁迫中功能的研究进展[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*[ZHANG Y, XIA G S, FU W H, et al. Roles of plant ubiquitin E3 ligase under abiotic stress [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*], 2018, 36(5): 79-85.
- [22] MARINOD, PEETERSN, RIVAS S. Focus issue on ubiquitin in plant biology: ubiquitination during plant immune signaling [J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(1): 15-27.
- [23] FURLAN G, KLINKENBERG J, TRUJILLO J. Regulation of plant immune receptors by ubiquitination [J]. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 238.
- [24] LI B, LU D, SHAN L. Ubiquitination of pattern recognition receptors in plant innate immunity [J]. *Mol Plant Pathol*, 2014, 15(7): 737-46.
- [25] ZHOU B, ZENG L. Conventional and unconventional ubiquitination in plant immunity [J]. *Mol Plant Pathol*, 2017, 18(9): 1313-30.
- [26] HAN P L, DONG Y H, GU K D, et al. The apple U-box E3 ubiquitin ligase MdPUB29 contributes to activate plant immune response to the fungal pathogen *Botryosphaeria dothidea* [J]. *Planta*, 2019, 249: 1177-88.
- [27] QIN T, LIU S M, ZHANG Z N, et al. GhCYP3 improves the resistance of cotton to *Verticillium dahliae* by inhibiting the E3 ubiquitin ligase activity of GhPUB17 [J]. *Plant Mol Biol*, 2019, 99: 379-93.
- [28] TIAN Z D, LIU J, XIE C H. Isolation of resistance related-genes to *Phytophthora infestans* with suppression subtractive hybridization in the R-gene-free potato [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(7): 597-605.
- [29] HE Q, MCLELLAN H, BOEVINK P C, et al. U-box E3 ubiquitin

- ligase PUB17 acts in the nucleus to promote specific immune pathways triggered by *Phytophthora infestans* [J]. J Exp Bot, 2015, 66(11): 3189-99.
- [30] LUO H, LALUK K, LAI Z, et al. The *Arabidopsis* Botrytis Susceptible1 Interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses [J]. Plant Physiol, 2010, 154(4): 1766-82.
- [31] MENGISTE T, CHEN X, SALMERON J, et al. The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2003, 15(11): 2551-65.
- [32] DAI L M, XIE X Q, YANG Y Z, et al. VpUR9, a novel RING-type ubiquitin ligase gene from *Vitis pseudoreticulata*, is involved in powdery mildew response in transgenic *V. vinifera* plants [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2017, 131: 41-9.
- [33] DONG C H, AGARWAL M, ZHANG Y, et al. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(21): 8281-6.
- [34] LIM S D, CHO H Y, YONG C P, et al. The rice RING finger E3 ligase, OsHCI1, drives nuclear export of multiple substrate proteins and its heterogeneous overexpression enhances acquired thermotolerance [J]. J Exp Bot, 2013, 64(10): 2899-914.
- [35] MORIMOTO K, MIZOI J, QIN F, et al. Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A is required but not sufficient for the induction of target genes under conditions of stress [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80457.
- [36] SAKUMA Y, MARUYAMAK, OSAKABE Y, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression [J]. Plant Cell, 2006, 18(5): 1292-309.
- [37] CHENG M C, HSIEH E J, CHEN J H, et al. *Arabidopsis* RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with atERF53 and negatively regulates the plant drought stress response [J]. Plant Physiol, 2012, 158(2): 363-75.
- [38] NING Y, JANTASURIYARAT C, ZHAO Q, et al. The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice [J]. Plant Physiol, 2011, 157(1): 242-55.
- [39] SAKAI T, HANNIE VAN DER H, NISHIOKA M, et al. Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in *Arabidopsis* [J]. Plant J 2010, 53(1): 157-71.
- [40] CHAPAGAIN S, PARK Y C, KIM J H, et al. *Oryza sativa* salt-induced RING E3 ligase 2 (OsSIRP2) acts as a positive regulator of transketolase in plant response to salinity and osmotic stress [J]. Planta, 2018, 247: 925-39.
- [41] KO J H, YANG S H, HAN K H. Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis [J]. Plant J, 2006, 47(3): 343-55.
- [42] QIN X M, HUANG S, LIU Y Q, et al. Overexpression of a RING finger ubiquitin ligase gene AtATRF1 enhances aluminium tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Plant Biol, 2017, 60: 66-74.
- [43] RUAN W Y, GUO M N, WANG X Q. Two RING-finger ubiquitin E3 ligases regulate the degradation of SPX4, an internal phosphate sensor, for phosphate homeostasis and signaling in Rice [J]. Molecular Plant, 2019, 12(8): 1060-74.
- [44] AMY T. 水稻低氮胁迫和细菌侵染应答基因OsSPL11和OsRP-1的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [45] CHINNUSAMY V, GONG Z Z, ZHU J K. Absciscic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses [J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50(10): 1187-95.
- [46] RAGHAVENDRA A S, GONUGUNTA V K, CHRISTMANN A, et al. ABA perception and signalling [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(7): 395-401.
- [47] ZHANG X, GARRETON V, CHUA N H. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation [J]. Gene Dev, 2005, 19(13): 1532-43.
- [48] LEE J H, YOON H J, TERZAGHI W, et al. DWA1 and DWA2, two *Arabidopsis* DWD protein components of CUL4-based E3 ligases, act together as negative regulators in ABA signal transduction [J]. Plant Cell, 2010, 22(6): 1716-32.
- [49] LECHNER E, LEONHARDT N, EISLER H, et al. MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling [J]. Dev Cell, 2011, 21(6): 1116-28.
- [50] CHEN Y, FOKAR M, KANG M, et al. Phosphorylation of *Arabidopsis* SINA2 by CDKG1 affects its ubiquitin ligase activity [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18: 147.
- [51] WASTERACK C, HAUSE B. Jmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development [J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2002, 72(72): 165-221.
- [52] 毛舒香, 王军伟, 徐浩然, 等. 十字花科蔬菜萝卜硫素合成代谢相关基因及外源调控[J]. 中国细胞生物学学报(MAO S X, WANG J W, XU H R, et al. Anabolism relative genes and allogenic material regulation of sulforaphane in Cruciferous vegetables [J]. Chinese Journal of Cell Biology) 2018, 40(8): 1415-23.
- [53] POLLIER J, MOSES T, GONZALEZGUZMAN M, et al. The protein quality control system manages plant defence compound synthesis [J]. Nature 2013, 504(7478): 148-52.
- [54] ZHANG X, WU Q, REN J, et al. Two novel RING-type ubiquitin ligases, RGLG3 and RGLG4, are essential for jasmonate-mediated responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2012, 160(12): 808-22.
- [55] JUNG C, ZHAO P, SEO J S, et al. PLANT U-BOX PROTEIN10 regulates MYC2 stability in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2015, 27(7): 2016-31.
- [56] BRAUMANNI, URBAN W, PREU A, et al. Semi-dwarf barley (*Hordeum vulgare* L.) brh2 and ari-1 mutants are deficient in a U-box E3 ubiquitinligase [J]. Plant Growth Regul, 2018, 86: 223-34.
- [57] LI W, AHN I P, NING Y, et al. The U-Box/ARM E3 ligase PUB13 regulates cell death, defense, and flowering time in *Arabidops* [J]. Plant Physiol, 2012, 159(1): 239-50.
- [58] GRAY W M, KEPINSKI S, ROUSE D, et al. Auxin regulates SCF-dependent degradation of AUX/IAA proteins [J]. Nature, 2001, 414(6861): 271-6.
- [59] LEE K, SEO P J. The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase HOS1 contributes to auxin biosynthesis in the control of hypocotyl elongation [J]. Plant Growth Regul, 2015, 76: 157-65.
- [60] PRASAD M E, SCHOFIELD A, LYZENGA W, et al. *Arabidopsis* RING E3 ligase XBAT32 regulates lateral root production through its role in ethylene biosynthesis [J]. Plant Physiol, 2010, 153(4): 1587-96.
- [61] LYZENGA W J, BOOTH J K, STONE S L. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-

- 1-carboxylate synthase [J]. *Plant J*, 2012, 71(1): 23-34.
- [62] ZINKL G M, ZWIEBEL B I, GRIER D G, et al. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine [J]. *Development*, 1999, 126(23): 5431-40.
- [63] WILSON Z A, ZHANG D. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development [J]. *J Exp Bot* 2009, 60(5): 1479-92.
- [64] 常玉花, 周鹊, 杨仲南, 等. 拟南芥雄性不育突变体ms1142的遗传定位与功能分析[J]. *植物学报*(CHANG Y H, ZHOU Q, YANG Z N, et al. Genetic mapping and functional analysis of *Arabidopsis thaliana* male sterile mutant *ms1142* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*), 2010, 45 (4): 404-10.
- [65] 林苏娥. 白菜花粉壁发育相关的四个多糖代谢基因的表达分析与功能鉴定[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [66] CAO H, LI X, WANG Z, et al. Histone H2B monoubiquitination mediated by OsHUB1 and OsHUB2 is involved in anther development by regulating tapetum degradation related genes in Rice [J]. *Plant Physiol*, 2015, 168(4): 1389-405.
- [67] ITO T, NAGATA N, YOSHIBA Y, et al. *Arabidopsis* MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3549-62.
- [68] PENG Y J, SHIH C F, YANG J Y, et al. A RING-type E3 ligase controls anther dehiscence by activating the jasmonate biosynthetic pathway gene DEFECTIVE in ANTHR DEHISCENCE1 in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2013, 74(2): 310-27.
- [69] WANG P, XUE L, BATELLI G, et al. Quantitative phosphor proteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(27): 11205-10.
- [70] 徐婷婷. 拟南芥中两种E3泛素连接酶拮抗调控UV-B信号的应答[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*[XU T T. Antagonistic regulation of UV-B signal by two E3 ubiquitin ligases in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*], 2019, 58(3): 299.
- [71] 张雅文, 沈祥娟, 张静, 等. 大豆E3泛素连接酶基因GmAIRP1的同源克隆及在烟草中的功能鉴定[J]. *植物遗传资源学报*(ZHANG YW, SHEN X J, ZHANG J, et al. Homologous cloning of soybean E3 ubiquitin ligase gene GmAIRP1 and its functional identification in Tobacco [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*), 2019, 20(4): 1011-9.