

膨胀素的结构与功能

张 维 郭得平 *

(浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310029)

摘要 膨胀素是植物细胞生长期间释放的一种能使细胞壁松弛的蛋白质, 是细胞壁伸展的关键调节剂, 对细胞生长有重要作用。膨胀素由庞大的基因家族编码, 分为 α -、 β -、 γ -和 δ -膨胀素。膨胀素有多种功能, 研究它对搞清生长机制有着重要的意义。

关键词 膨胀素; 细胞; 生长; 调节

植物细胞的生长是与细胞壁紧密相关的过程。细胞壁不但具有承受细胞产生的内部膨压的作用, 而且在细胞生长时要具有延展性。实际上, 对细胞壁的延展性起主导作用的是纤维素-半纤维素网络结构, 并且作用于这种网络结构的酶控制着细胞的生长过程。20世纪70~80年代, 人们普遍认为, 细胞壁在葡聚糖酶作用下松弛后, 植物细胞才得以生长。到了20世纪90年代初期, 两种新蛋白质[即木葡聚糖内转葡糖基酶和膨胀素(expansin)]的发现, 使人们的认识有了很大变化, 它们几乎同时被认为是真正的细胞壁松弛物质^[1]。木葡聚糖内转葡糖基酶使细胞壁松弛的原因是其能够破坏木葡聚糖和纤维素网络结构, 并在新的位置上形成新的联接。近几年, 国际上对膨胀素的研究方兴未艾, 是生化和分子生物学的热点之一, 引起了各国科学家的重视。现就膨胀素的基因结构、生物化学性质及作用机制给予进一步阐述。

根据酸生长理论, 在酸性环境条件下, 细胞壁中的一些酶被激活, 对酸不稳定的H键断裂, 导致细胞壁多糖分子间结构交织点破裂松弛, 引起细胞壁伸展。根据这个现象, McQueen-Mason等^[2]首次从黄瓜下胚轴细胞壁中鉴定出了分子量为30 000和29 000的两种蛋白质, 并可以使离体细胞壁在酸性环境下伸展。之后, 在燕麦胚芽鞘中也鉴定出一种具有类似性质的蛋白质, 其分子量为29 000^[3]。这种在酸性条件下使热失活的细胞壁恢复伸展活性的蛋白质被命名为膨胀素。膨胀素是能使离体细胞壁伸展的第一个内源细胞壁蛋白。

膨胀素的作用机制主要是使细胞壁上纤维素微纤丝与葡聚糖网络之间的H键破裂^[4,5]。膨胀素可直接诱导细胞壁的延伸, 而木葡聚糖内转葡糖基酶和

葡聚糖酶不具有此功能^[6]。研究结果显示, 细胞壁延伸过程似乎包含了初级和次级松弛的两个步骤^[7]。膨胀素作为初级细胞壁松弛因子可直接诱导膨压引起的细胞壁伸展, 而次级细胞壁松弛因子(如木葡聚糖内转葡糖基酶和葡聚糖酶)则主要修饰细胞壁的结构, 使其对初级细胞壁松弛过程的应答更有效。

1 膨胀素的基因家族

自从发现黄瓜中含有膨胀素之后^[2], 人们又陆续从拟南芥、水稻等多种植物中发现了膨胀素。通过对膨胀素的基因序列分析, 发现它们由一个庞大的多基因家族编码。拟南芥基因组含有38个编码膨胀素的ORFs。根据膨胀素蛋白序列的相似程度, 38个ORFs可分为3个亚单位。目前来看, 膨胀素多基因家族可分为4个独立的亚家族: α -、 β -、 γ -和 δ -膨胀素。在拟南芥中, α -膨胀素是最大的亚家族, 有26个成员, 与当初从黄瓜中分离到的第1个诱导细胞壁伸展的膨胀素高度相似^[2]。第2大亚家族是 β -膨胀素, 含有8个ORFs, 可分为3类(β_1 , β_2 , β_3)。 γ -膨胀素亚家族很小, 拟南芥中仅有2个具代表性的ORFs, 目前已发现2个成员。

对拟南芥和水稻基因结构及氨基酸的序列分析表明, β -膨胀素和 α -膨胀素有同样的保守区, 可能是从同一个祖先基因进化而来^[8]。早期陆生蕨类植物中含有两个 α -膨胀素基因, 分别为Rd-EXP1和Mq-EXP1, 其中Rd-EXP1对调节水生植物主茎的伸长起作用^[9]。

收稿日期: 2004-01-12 接受日期: 2004-03-15

* 通讯作者。Tel: 0571-86971121, Fax: 0571-86049815, E-mail:

dpguo@zju.edu.cn

β -膨胀素基因在禾本科植物中大量存在,可调节水稻的节间伸长,并且在GA或伤害的诱导下其作用更明显^[10]。目前所知,至少有一种 β -膨胀素具有能在酸性条件下诱导细胞壁伸展的活性,有典型的 α -膨胀素的特点^[11]。

γ -膨胀素的蛋白质序列比 α -膨胀素和 β -膨胀素要短,不具有成熟蛋白质的完整C末端。但有些植物中的 γ -膨胀素不具有膨胀素的活性^[12]。至今为止, γ -膨胀素的功能尚不清楚。从系统发育的角度看, γ -膨胀素可能是最古老的一个亚家族,是存在于陆地植物中最具代表性的膨胀素。它还可能起信号作用,调节植物气孔开闭及细胞的水分平衡^[13]。

在水稻和拟南芥中还有许多未知的膨胀素。根据序列相似性和系统发育史分析,发现了 δ -膨胀素,它能编码大小和 γ -膨胀素相似的截短型膨胀素。比较而言, δ -膨胀素能编码截短型蛋白质,该蛋白质的序列与一般膨胀素的C末端高度相似,但缺少一半N末端序列。 δ -膨胀素有一个较短的由约24个氨基酸构成的N末端信号肽。因此, δ -膨胀素是一个独立的群体,可能是单子叶植物的代表性亚家族。水稻基因组中有18个 δ -膨胀素基因,其中10个位于6号染色体上,而含量最丰富的 δ -膨胀素是Exp δ 1.14和Exp δ 1.5^[8]。

2 膨胀素的结构序列

尽管膨胀素的蛋白质结构还不完全清楚,但序列分析表明它至少有两个主要的结构域^[14]。其中一个结构域为结合区域,其C末端与Group-II花粉过敏原蛋白有50%的相似。该花粉过敏原蛋白具有在花粉分泌到柱头上后使细胞壁松弛的潜在功能,说明它的作用与膨胀素相似。Group-II花粉过敏原蛋白表面有一些利于与多聚糖结合的芳香基,但其与纤维素结合结构域不完全相似^[15]。

另一个结构域为催化区域,其序列与45-家族的内转葡糖基酶的催化区域有一定的相似性^[16],该序列的30%左右已确定,含有一些半胱氨酸,可能是保守蛋白折叠物。另外,大多数膨胀素中酶的催化位点上His-Phe-Asp结构也很保守^[17]。利用该保守性可以用更灵敏的方法来检测膨胀素的内转葡糖基酶的活性。膨胀素与内转葡糖基酶的相似性很难解释,可能膨胀素是通过转糖化机制起作用:首先切割多聚糖的主链,然后连接到另一相似聚合物的末端^[18]。

3 膨胀素的生物化学性质

通常,研究膨胀素的活性仅利用其粗提物,难以揭示膨胀素作用的详细分子过程。主要有几个因素的影响:首先,膨胀素含量较低,难以纯化,而且大多数组织含有一种以上的同系物;其次,分析膨胀素需要精密的仪器,以及大量的蛋白质,而且,具有活性的重组膨胀素难以制备。大多数有关膨胀素活性的报道来源于黄瓜 α -膨胀素CsExp1,它通过破坏纤维素微纤丝和交联多聚糖之间的氢键,诱导细胞壁的延伸^[19-21]。

膨胀素的部分生化性质如下:

(1)膨胀素既缺乏外切葡聚糖苷酶和木葡聚糖内转葡糖基酶活性,也没有内切水解酶的活性,而具有类似于衣藻的孵化酶和细菌的自溶素的作用。它不能改变木葡聚糖的分子大小、细胞壁衬质多糖溶液的黏滞性,不能水解果胶、半纤维素、纤维素、木葡聚糖及其他衬质主要成分,可以和细胞壁成分专一结合而不打断共价键,可能影响对细胞壁聚合体和细胞壁胁迫伸展有利的非共价键。

(2)细胞壁中膨胀素的含量很低。黄瓜膨胀素促进细胞壁伸展的活性可维持数小时,致使伸展达40%以上,外源膨胀素能使热失活的细胞壁完全恢复伸展性,可见膨胀素起着催化作用而非结构物质。

(3)膨胀素对pH变化敏感。黄瓜EXP30和EXP29的活性范围较广,最适活性在pH 3.5~4.5。燕麦EXP29的最适活性在pH 4.5。

(4)膨胀素活性具有高度的专一性,表现在:
①结构专一性。细胞壁部分具有活性,细胞质可溶性部分不具备活性。
②组织专一性。其活性仅限于迅速生长的细胞中,茎基部和子叶的提取物无活性。
③种属专一性。黄瓜膨胀素能够恢复热失活的其他植物细胞壁伸展,恢复能力依次为:双子叶植物的茎>石蒜科单子叶植物的叶>禾本科单子叶植物的胚芽鞘。
④底物专一性。如CsExp1能够诱导纤维素微纤丝和木葡聚糖复合物的延伸,但不能诱导其他交联多聚糖复合物的延伸,具有高度的底物专一性^[22]。

4 膨胀素对生长的调节

4.1 作用方式

膨胀素以一种可逆的(非水解的)方式与细胞壁中纤维素微纤丝表面紧密结合的衬质聚合体发生作用,使多聚物网络间的非共价键断裂,从而引起壁

伸展。该过程不改变壁的共价结构，但具有打断葡聚糖间 H 键的能力。膨胀素只在细胞壁处于紧绷状态时才发挥起作用。但在膨胀素作用或非作用状态下，细胞壁滑动没什么区别^[23,24]。有两种可能的解释，第一，膨胀素诱导壁滑动的时间短。第二，膨胀素量少且就近作用于细胞壁，意味着任何时间只有一部分细胞壁多糖与膨胀素发生作用，这种细微作用在检测时，可能被非膨胀素引起的多聚糖滑动所掩盖^[25]。

相对于传统的细胞壁松弛的酶催化理论，Cosgrove^[14]提出另一种作用模式，认为膨胀素弱化细胞壁多聚糖间的非共价键，导致一些聚合体滑动。膨胀素充分利用细胞壁上的机械能，催化细胞壁聚合体发生缓慢滑动。膨胀素的运动可能仅限于沿着纤维素微纤丝的表面进行侧向扩散，这些连续的扩散能使膨胀素到达微纤丝的表面，使其周围与基质的连接松弛，从而引起链式运动和压力释放（图 1）。

4.2 细胞壁的软化及破裂

膨胀素的作用不仅仅是使细胞壁伸展，还有其他的功能。如玉米花粉中的 β -膨胀素对玉米须有延伸活性^[26]。这种蛋白质从水化的花粉粒释放到柱头的表面，使柱头组织软化，然后利于花粉管的穿透和进入。有趣的是，近来发现一个类似于 β -膨胀素的物质在烟草授粉期间的柱头表面可高浓度表达^[27]，也说明一些 β -膨胀素的这种作用在双子叶植物上是保守的。

近来，膨胀素在水果软化、导管组织分化和离层高度表达的报道较多。Rose 等^[28]发现一种膨胀素，它只在番茄的软化期间表达，该基因的高度表达可使果实软化加快，减少这种膨胀素在转基因番茄植物中的表达，可使果实软化过程变慢^[29]。这可能是由于膨胀素利于果实中葡聚糖壁成分的破坏。

但是膨胀素在转基因番茄中的表达分析却不足以说明它加快或降低了细胞壁的破裂。虽然膨胀素诱导水果软化的机制不是很清楚，但已鉴定出不同果实中与成熟相关的膨胀素^[30,31]。

通过 α -和 β -膨胀素的 RNA 杂交表明，膨胀素基因的表达大部分存在于正在发育的导管组织中^[32]。目前已知，至少有 6 种膨胀素基因在植物正在分化的导管组织中表达，这些膨胀素可能与植物中的原生木质成分的侵入生长有关^[33]。但也发现它们在叶肉细胞分化成为导管期间的表达，可能与次级细胞壁的形成或初级细胞壁的分解有关^[34]。

器官脱落与细胞壁的裂解有密切关系。例如，*AthEXP10* 的启动子使 GUS 报告基因在转基因的拟南芥叶柄中表达，因此这种膨胀素可能与叶柄脱落有关^[35]。现在已经确定了一种膨胀素的转录产物，该转录产物在叶柄脱落区可被乙烯诱导而形成。随着该转录产物的表达，膨胀素活性不断增加。研究发现，膨胀素还与种子萌发期间的胚乳活化密切相关^[36]。

4.3 对生长的调节

由于膨胀素能诱导细胞壁的延伸，所以其在生长方面的作用被普遍认可。最初发现黄瓜下胚轴的膨胀素活性来自于正在生长的组织，进一步研究表明膨胀素活性、转录产物和生长速率之间存在正相关。

膨胀素调节生长的功能通过其对营养分生组织叶原基的作用可以证实。Fleming 等^[37]发现局部应用膨胀素可诱导番茄分生组织产生不正常的叶原基，这些叶原基不能长成正常的叶片。而且研究还发现它不仅能诱导叶原基的生成，还可重复叶片发育的整个过程，从而形成正常的叶片^[22]。除此之外，膨胀素在诱导根毛发育过程中也起着相似的作用^[41]。

膨胀素在植物的生长中起着关键作用，因此其

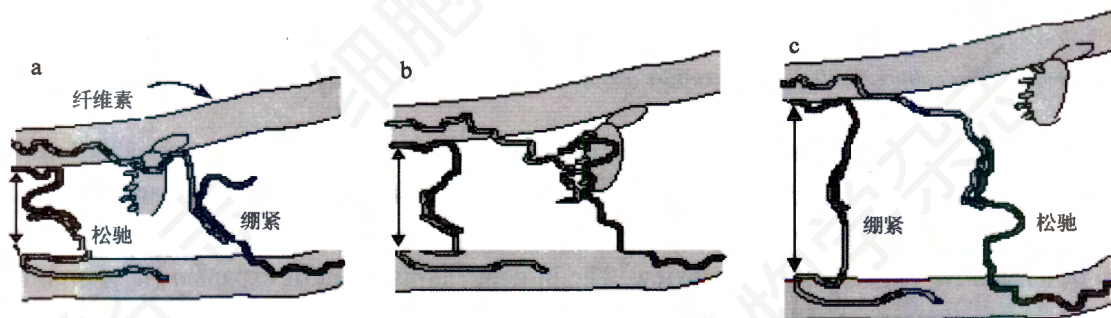


图 1 膨胀素的作用模型^[14]

纤维素微纤丝通过多聚糖(线状结构)连接。这些多聚糖相互连接或与微纤丝表面连接。膨胀素蛋白(椭圆形)通过破坏多聚糖与微纤丝表面(a)的连接或微纤丝之间(b)的连接而引起机械胁迫，导致细胞壁多聚物的重新排列(c)。

含量的增加或减少将影响植物生长。已经证实膨胀素的过表达会加快转基因植物的生长^[38,39]。但并不是所有的植物生长过程都需要膨胀素的参与,有些植物叶片细胞膨大期间并无膨胀素转录产物的累积。例如,在番茄植株中,重组黄瓜膨胀素的高水平表达反而使番茄的生长速率降低^[40]。通过 α -膨胀素活性和Western印迹分析,发现在迅速生长的组织中膨胀素的含量较低,但随着生长速率的降低,膨胀素含量却会上升^[41]。

4.4 膨胀素的突变体

膨胀素突变体是研究其功能的理想材料。通过将T-DNA插入到膨胀素基因中已经获得了拟南芥突变体,它们的表现型差异很大。在苔藓植物中,发现一些膨胀素基因的突变体表现型差异不明显,可能是与膨胀素家族的其他功能有关^[42]。因此,通过在其他膨胀素基因上的不断研究,有可能发现表现型差异明显的突变体。

5 展望

膨胀素的发现已有20多年,人们已经逐渐认识到它在细胞壁延伸中所起的决定作用。膨胀素还参与其他与细胞壁相关的过程。对膨胀素的研究还不是很多,因此有必要进一步扩大研究对象和范围,以确切了解膨胀素的结构、功能和作用机制等。例如,它是否是通过破坏多聚物的交织点而起作用?不同膨胀素的底物特异性是什么?它是否具有蛋白质激素的性质或是作为一种细胞壁信号分子?这一系列问题还有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

[1] Fry SC *et al. Biochem J*, 1992, **282**: 821

- [2] McQueen-Mason S *et al. Plant Cell*, 1992, **4**: 1425
 [3] Li ZC *et al. Planta*, 1993, **191**: 349
 [4] McQueen-Mason S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6574
 [5] McQueen-Mason SJ *et al. Plant Physiol*, 1995, **107**: 87
 [6] Cosgrove DJ *et al. J Exp Bot*, 1994, **45**: 1711
 [7] Cosgrove DJ *et al. Plant Physiol Biochem*, 2000, **38**: 109
 [8] Lee Y *et al. Curr Opin Plant Biol*, 2001, **4**: 527
 [9] Kim JH *et al. Planta*, 2000, **212**: 85
 [10] Lee Y *et al. Plant Physiol*, 2001, **127**: 645
 [11] Cosgrove DJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 6559
 [12] Ceccardi TL *et al. Plant Mol Biol*, 1998, **38**: 775
 [13] Ludidi NN *et al. J Mol Evol*, 2002, **54**: 587
 [14] Cosgrove DJ. *Nature*, 2000, **407**: 321
 [15] Mattinen ML *et al. Eur J Biochem*, 1998, **256**: 279
 [16] Henrissat B *et al. FEBS Lett*, 1998, **425**: 352
 [17] Davies GJ *et al. Nature*, 1993, **365**: 362
 [18] Fry SC. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, **46**: 497
 [19] Rochange SF *et al. Planta*, 2000, **211**: 583
 [20] Harrison EP *et al. J Exp Bot*, 2001, **52**: 1437
 [21] Pine S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 11812
 [22] Whiteny SEC *et al. Plant J*, 2000, **22**: 327
 [23] 龙程等. *植物生理学通讯*, 1997, **33**: 208
 [24] Fenwick KM *et al. Phytochemistry*, 1999, **51**: 17
 [25] Cosgrove DJ. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, **3**: 73
 [26] Cosgrove DJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 6559
 [27] Pezzotti M *et al. Plant Mol Biol*, 2002, **49**: 187
 [28] Rose JKC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 5955
 [29] Brummell DA *et al. Plant Cell*, 1999, **11**: 2203
 [30] Hiwasa K *et al. Physiol Plant*, 2003, **117**: 564
 [31] Mbeguie-A-Mbeguie D *et al. Plant Physiol Biochem*, 2002, **40**: 445
 [32] Li Y *et al. Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**: 603
 [33] Im KH *et al. Plant Physiol*, 2000, **123**: 463
 [34] Milioni D *et al. Plant Mol Biol*, 2001, **47**: 221
 [35] Cho HT *et al. Plant Cell*, 2002, **14**: 3237
 [36] Chen F *et al. Plant Physiol*, 2000, **124**: 1265
 [37] Fleming AJ *et al. Science*, 1997, **276**: 1415
 [38] Cho HT *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 9783
 [39] Lee DK *et al. Plant Physiol*, 2003, **131**: 985
 [40] Rochange SF *et al. Plant Mol Biol*, 2001, **46**: 581
 [41] Reidy B *et al. Plant Mol Biol*, 2001, **46**: 491
 [42] Schipper O *et al. Plant Mol Biol*, 2002, **50**: 789

Structure and Function of Expansins

Wei Zhang, De-Ping Guo*

(Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Expansins are proteins secreted by plant cells, which are key regulators of wall extension during growth, and play very important role in cell growth. Expansins are commonly encoded by substantial gene families, and have been divided into four subfamilies, referred to as α , β , γ - and δ -expansins. A couple of functional roles have been described for expansins in this review. The in-depth exploration of expansins is of significance in understanding the mechanism of cell growth.

Key words expansin; cell; growth; regulation

Received: January 12, 2004 Accepted: March 15, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971121, Fax: 86-571-86049815, E-mail: dpguo@zju.edu.cn