

染色质重塑和高等植物开花时间控制

李 健 马力耕*

(河北师范大学分子细胞生物学研究室, 石家庄 050016)

摘要 染色质的结构和组成直接影响转录因子与基因启动子的结合, 并最终导致基因的活化或沉默。多年来在酵母和动物等领域的研究已经证实, 起关键调节作用的转录因子表达模式的建立和维持需要染色质重塑。外界和细胞内部信号介导的染色质重塑调控基因的表达, 并最终调控细胞的分化和生物个体的发育。近几年人们发现高等植物也存在与动物和酵母同源的参与染色质重塑的蛋白质因子。最近的研究结果表明, 决定高等植物开花时间关键基因的表达调控就是通过外界信号影响其染色质结构实现的。

关键词 染色质重塑; 开花时间控制; 春化途径; 自主途径

多细胞生物的细胞分化和个体发育都受来自外部和内部的多种信号调控, 这些信号通过一定的信号转导途径可以调节多个基因的表达, 并最终决定细胞的分化和发育。多年来以酵母、动物为模式, 人们证实高度有序的基因调节不但取决于基因本身的结构, 还决定于DNA和组蛋白一起构成的染色质的结构。

1 染色质重塑

除少数RNA病毒外, DNA几乎是所有生物遗传信息的携带者。在真核生物中, DNA和组蛋白一起被压缩成一个高度有序的结构, 称为染色质。核小体是染色质的基本结构单位, 由H2A、H2B、H3、H4各两个分子所组成的组蛋白八聚体构成核小体的核心, 每一个核小体中都有146 bp的DNA缠绕在组蛋白八聚体上, 核小体之间由组蛋白H1与DNA结合。长期以来, 人们普遍认为染色质是静态的、抑制转录的结构, 近年的研究表明, 染色质是高度动态的, 其丝状结构经常由于各种复合体的修饰而改变, 染色质结构影响着DNA复制、重组、修复以及转录控制等诸多方面^[1]。真核生物正是通过一系列转录调节因子对染色质修饰的精确控制来感受各种细胞和环境刺激, 从而使生物体表现出正确的时空发育。染色质重塑(chromatin remodeling)就是基因表达调控过程中所出现的一系列染色质结构变化的总称。染色质重塑已经成为目前生物学中最重要和前沿的研究领域之一, 以至于人们提出了与基因密码相对应的组蛋白密码来说明染色质重塑

在基因表达调控中的作用^[2,3]。

目前, 对染色质重塑的了解主要得益于人们在动物和微生物中的研究成果。染色质重塑主要包括3个方面。第一, 通过对突出于核小体核心结构之外的组蛋白氨基端尾巴的修饰来影响染色质的结构和基因表达。组蛋白修饰包括位点特异的磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化以及相应修饰基团的去除。例如, 组蛋白乙酰化可以解开染色质包装, 往往与转录激活有关, 而组蛋白脱乙酰化常常与转录抑制有关^[4]。第二, SWI/SNF和有关的染色质重塑复合体利用ATPase和解旋酶活性来改变核小体在DNA上的位置。ATP依赖的染色质重塑可以使与核小体结合的DNA暴露出来, 使核小体沿着DNA滑动并重新分布, 在改变单个核小体结构的同时改变染色质的高级结构, 从而在DNA修复、重组、复制及转录过程中调节全基因组的柔顺性和可接近性^[5]。第三, DNA的甲基化, 即对CpG中的胞嘧啶进行甲基化修饰。DNA甲基化可以以表观遗传的方式标记顺式调控序列从而调节转录因子与DNA的相互作用^[6], 也有人说DNA甲基化是通过形成不活跃的染色质结构来发挥其作用的^[7,8]。

人们在高等植物如拟南芥基因组中也发现了与动物和酵母同源的参与染色质重塑的蛋白质因子基

收稿日期: 2004-06-04 接受日期: 2004-10-18

国家杰出青年科学基金(No.30025024); 教育部骨干教师基金和教育部优秀教师基金资助

* 通讯作者。Tel: 0311-6269300, Fax: 0311-5829649, E-mail: ligeng.ma@yale.edu

因^[9]，而且幸运的是与动物中的这些因子基因突变导致其胚胎致死不同，植物中相关蛋白质因子基因的突变体可以成活并完成其生活史，从而使得人们可以利用植物为对象，研究这些基因在生物个体整个发育过程中的作用。

鉴于染色质构象的调节在动物和微生物基因表达、细胞分化和个体发育调控中发挥关键和广泛作用，近几年植物学家们也在从各个方面和层次研究染色质重塑过程对植物发育的影响。限于篇幅，这里主要讨论构成染色质的组蛋白修饰对植物发育的影响，没有涉及DNA甲基化修饰的有关进展。这方面的突破首先来自于人们对植物开花时间调控的研究。几个研究组的研究结果表明决定高等植物开花时间的关键基因的表达调控就是通过外界信号影响其染色质构象实现的。

2 开花时间控制

在植物的整个生活周期中，选择正确的开花时间是非常重要的。选择适当的时间开花可以使植株产生更多的、健康的种子，也有利于整个物种在自然选择中生存下来。植物由营养生长向生殖生长的转变是受诸多因素调节的，总的来说可以分为外部因素和内部因素两个方面：外部因素包括季节的变化、温度、日照时间、光照强度、营养条件等^[10]；内部因素主要包括发育时期、自身产生的激素浓度及分布等。面对这么多的影响因素，植物在漫长的进化过程中建立起了一个复杂的信号转导网络，来使植物感知这些影响因素，并根据这些影响因素对开花时间做出正确的选择^[11]。

拟南芥作为模式植物，已被广泛用于植物开花时间控制的研究。对拟南芥的研究表明，植物至少通过4条途径控制开花时间：光周期反应途径、春化反应途径、自主途径和赤霉素途径^[10-12]。所有这些途径最后均通过影响一些决定开花时间的关键基因的表达与否以及表达水平来实现它们对植物开花的控制。最近的研究结果表明其中至少有两个途径中的信号是通过调节决定开花时间关键基因的染色质构象发挥它们对这些关键基因表达调节的。

3 染色质重塑与春化反应途径

许多两年生植物和冬性一年生植物都需要经过一段时间的低温诱导(4~12周、1~10℃)，即所谓的春化作用，才能够正常开花，否则开花将推迟几

周甚至几个月，这种现象与这些植物的生长习性密切相关。以冬性一年生植物为例，它在夏季萌发，秋冬季进行营养生长，次年春季或夏季根据日照长度选择合适的时间开花，较长时间的低温诱导有利于植物区别秋季短期的温度波动和真正冬季的到来。

春化作用之所以成为两年生和冬性一年生植物正常开花的必要条件，是由于一个显性基因FRI的存在，该基因产物可以提高FLC mRNA的水平^[13,14]，而FLC基因编码一个MADS盒转录因子，这个转录因子主要通过抑制一些植物由营养生长转变为生殖生长所必需基因的激活来抑制开花^[15,16]。春化作用可以拮抗FRI基因的作用，降低FLC mRNA水平，从而促进开花(图1)^[15-17]。实验室常用的拟南芥生态型都是夏性一年生的，它们或是缺少有活性的FRI等位基因^[18,19]；或是只有一个弱的FLC等位基因^[19,20]，因而FLC基因表达水平比较低，开花比较早。由于在flc的无效突变体中，春化作用仍能促进植物开花，说明FLC基因不是春化作用唯一的靶基因，春化作用还可以不依赖于FLC基因的方式促进植物开花^[17]。

春化作用只是诱导植物开花的必要条件，而不是充分条件，经过春化处理的幼苗回到常温后不会立即开花，而需数周以后才能开花，低温诱导和开花之间这种明显的时间间隔表明植物细胞有记忆功能——经春化处理的植物回到常温后，FLC mRNA仍保持低水平，这种低水平不会因有丝分裂而改变^[10,21]。Amasino和Dean两个实验室近几年的研究工作表明，抑制FLC基因表达和使FLC mRNA保持低水平主要通过3个基因：VIN3^[22]、VRN1^[23]和VRN2^[21]，这3个基因的突变体vin3、vrn1和vrn2都对春化作用不敏感。

VIN3基因由4个外显子组成，编码含有600个氨基酸残基的蛋白质，包含一个推测的核定位序列、一个PHD(plant homeodomain)结构域和一个FNIII(fibronectin type)结构域^[22]；PHD结构域经常

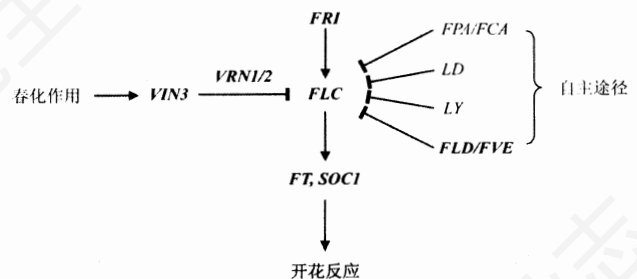


图1 春化作用和自主途径对植物开花调控模式^[11]

发现于染色质重塑复合体的蛋白质中, FNIII 结构域常常参与蛋白质-蛋白质相互作用。VIN3 基因只有在低温诱导足够长的时间(即经过春化作用)才开始表达, 其表达量与低温诱导时间成正比, 与 FLC 基因的表达量成反比; VIN3 基因和 FLC 基因的组织特异表达模式相同, 都只在分生组织中表达; 在低温诱导过程中和低温诱导后, *vin3* 突变体中 FLC 基因的表达都不能被抑制, 表明 VIN3 基因负责或参与抑制 FLC 基因的表达^[22]。

VRN1 基因编码一个含有 341 个氨基酸残基的 Myb 相关的 DNA 结合蛋白, 包含两个推测的 B3 DNA 结合域、两个预测的 PEST 区和一个推测的核定位信号^[23]。VRN2 基因编码一个包含 445 个氨基酸残基的锌指蛋白, 与拟南芥的 *fertilization-independent seeds 2 (FIS2)*、*embryonic flower 2 (EMF2)* 和果蝇的 *SU[Z]12* 有非常高的同源性^[21]。VRN1 基因在各个组织和各个发育时期都有中等水平的表达, 且表达水平不受春化作用的影响^[23]; VRN2 基因虽然表达水平较低或只在少数细胞群中表达, 其表达水平也不受春化作用的影响^[21]。在 *vrn1* 和 *vrn2* 突变体中, 春化处理可以抑制 FLC 基因的表达, 但经过春化处理的植物回到常温后, FLC mRNA 恢复到原来的水平, 也就是说, VRN1 基因和 VRN2 基因负责 FLC 基因抑制的维持^[21, 23]。

由于人们普遍认为 PHD 结构域参与蛋白质-蛋白质相互作用, 它常见于染色质重塑复合体各个成员的分子结构中^[22], 而 VRN2 的动物同源蛋白 SU[Z]12 是 ESC-E(Z)Pc-G 复合体的成员, Pc-G 蛋白在多种蛋白质复合体中, 通过对组蛋白氨基端特异氨基酸的脱乙酰化和甲基化修饰使染色质保持沉默状态^[21, 24], 因而人们有理由推测 VIN3、VRN1 和 VRN2 对 FLC 基因表达调控是通过调节 FLC 基因染色质中组蛋白不同化学修饰状态实现的。为了证实这种推测, Sung 等^[22]以及 Bastow 等^[24]同时利用染色质免疫沉淀(ChIP)方法分别检测了 FLC 基因位点组蛋白在野生型、*vin3*、*vrn1* 和 *vrn2* 中的乙酰化和甲基化状态。他们发现春化处理时, 野生型 FLC 基因位点组蛋白 H3 的 Lys9 和 Lys14 的乙酰化水平降低, 而 *vin3* 突变体中该位点乙酰化程度不变, 说明 VIN3 通过调节组蛋白的脱乙酰化参与春化过程中 FLC 基因沉默的建立。春化处理时和春化处理后, 野生型 FLC 基因位点组蛋白 H3 的 Lys27 和 Lys9 的甲基化程度增加; 而 *vin3* 和 *vrn2* 突变体中, 组蛋白分子中

这两个 Lys 的甲基化水平都不变; *vrn1* 突变体中, 只有组蛋白 Lys27 的甲基化程度增加, Lys9 的甲基化程度不变, 表明 VRN2 调节组蛋白 H3 Lys27 和 Lys9 的甲基化, VRN1 只调节 H3 Lys9 的甲基化, 而 VIN3 的作用在 VRN1 和 VRN2 的上游(图 1)。综合上述结果, Sung 等^[22]提出了一个春化作用的分子机制模型: VIN3 是 FLC 基因位点组蛋白脱乙酰化所必需的, 该位点组蛋白的脱乙酰化通过 VRN1 和 VRN2 的参与导致组蛋白的甲基化和有丝分裂稳定的异染色质的形成。在动物和微生物系统中, 组蛋白修饰是由一个蛋白质复合体共同作用完成的, 但在春化过程中和春化处理后与 VIN3、VRN1 和(或)VRN2 一起抑制 FLC 基因表达的其他蛋白质组分目前还不清楚。

4 染色质重塑与开花自主途径

拟南芥中已知的开花自主途径突变体包括 *fca*、*fy*、*fpa*、*ld*、*fld* 和 *fve*。这些突变体无论在长日照还是短日照条件下, 都表现为开花时间延迟。但经过春化作用后, 这些突变体的开花时间都能恢复正常^[25, 26]; 这些突变体的另一个共同特点就是 FLC mRNA 水平都高于野生型, 即它们之所以开花时间延迟是由于 FLC mRNA 水平的增高。因此, 野生型植株中自主途径是抑制 FLC 基因表达的^[15], 所以 FLC 基因的突变可以抑制自主途径突变体开花时间延迟的表型^[17]。FLC 基因是春化反应途径和自主途径的交叉点(图 1)。

自主途径的几个基因已经相继被克隆。其中 LD 蛋白含有一个同源异型框和一个核定位序列, 可能是一个转录因子^[27]; FCA 基因和 FPA 基因都编码 RNA 结合蛋白, 暗示自主途径中可能存在着转录后调节^[28, 29], Quesada 等^[30]最近发现 FCA 通过负反馈调节来限制 FCA 活性, 从而控制开花时间; FY 编码一个保守蛋白, 可能参与 mRNA 编辑^[31]。这些蛋白质因子调节 FLC 基因表达的确切机制目前还不清楚。

最近, 两个实验室分别克隆了 FLD 和 FVE 基因。他们的研究表明, 这两个基因编码的蛋白质可能是通过参与染色质重塑过程来调控植物开花时间的。He 等^[32]发现 FLD 是人类蛋白 KIAA0601 在植物中的同源蛋白, FLD 和 KIAA0601 除含有一个与人类和玉米的多胺氧化酶相似的结构域外, 还含有一个 SWIRM 结构域。许多参与染色质重塑的蛋白质

都有 SWIRM 结构域。由于 KIAA0601 是人类组蛋白脱乙酰酶 1,2(HDAC1/2) 共抑制复合体的一个成员, 而该复合体通过组蛋白的脱乙酰化抑制基因表达, 因此 He 等^[32]推测 FLD 可能也在组蛋白脱乙酰化过程中发挥作用。为了证实这一点, 他们利用染色质免疫沉淀(ChIP)技术比较了野生型和 *fld* 突变体中 FLC 染色质组蛋白的乙酰化水平, 结果发现在 *fld* 突变体中, 组蛋白 H4 的乙酰化水平明显提高; 进而作者通过一系列 FLC 基因内部结构的缺失突变发现 FLC 基因的第二个内含子是组蛋白脱乙酰化所必需的。与野生型相比, 在其他自主途径的突变体中(除 *fve* 突变体外)FLC 组蛋白乙酰化水平都没有明显变化。上述结果表明 FLD 本身并不是 HDAC, 而很可能是某种 HDAC 复合体中的组分, 它通过参与调节 FLC 染色质的乙酰化状态来进一步调节 FLC 基因的表达水平。至此, 我们有理由推测拟南芥中的有关 HDAC 可能直接参与这个过程。拟南芥基因组中, 人类 HDAC1/2 的同源蛋白共有 4 个: AtHDA1, AtHDA6, AtHDA7 和 AtHDA9。但遗憾的是目前这些基因的突变体中并未发现类似 *fld* 的表型。我们目前的初步结果表明可能的原因是基因之间的功能互补使得单一基因的突变不会对开花时间产生明显影响(未发表资料)。相信随着对这些基因研究的深入会很快揭开这个迷。

随后不久, Ausin 等^[33]克隆了自主途径的另一个基因 FVE, 通过序列分析他们发现, FVE(或 AtMSI4)是酵母 MSI、哺乳动物成视网膜细胞瘤相关蛋白(retinoblastoma-associated protein)RbAp46 和 RbAp48 在植物中的同源蛋白, 利用免疫沉淀技术, 他们证明 FVE 和玉米成视网膜细胞瘤同源蛋白(ZmRBR1)之间存在相互作用, 这暗示着 FVE 可能是成视网膜细胞瘤蛋白复合体的成员。由于在酵母和动物系统中, 成视网膜细胞瘤蛋白复合体是通过募集 HD1/RPD3 脱乙酰化酶来抑制基因转录的, 因此他们推测 FVE 抑制 FLC 表达的机制可能与此相似。ChIP 实验结果证实 *fve* 突变体中 FLC 组蛋白乙酰化程度确实比野生型高, 表明 FVE 是 FLC 染色质组蛋白脱乙酰化所必需的^[33]。

在同一时间, Kim 等^[34]在研究植物的冷适应反应时筛选到了一个能在常温或暗中组成型表达冷诱导基因的突变体 *acg1*, 它不论在长日照还是短日照条件下开花都比野生型晚, 并且春化可以逆转这种开花延迟的表型, 表明 *acg1* 是自主途径的突变体。

FVE 基因被克隆后, 通过连锁分析, Kim 等^[34]确定 *acg1* 就是 *fve*, FVE 的突变使得 HDAC 介导的转录抑制被解除, 导致冷诱导基因在常温下的异常表达。Kim 等^[34]认为, FVE 在冷适应反应和调节开花时间中的双重作用, 可能是对早春温度波动的一种适应; Amasio^[35]进一步推测, FVE 可能通过一个有 FLD 的 HDAC 复合体控制开花时间, 而通过一个没有 FLD 的复合体调节冷反应基因。

5 结论和展望

组织特异和发育阶段特异基因表达的调控常常是通过组蛋白修饰来实现的, 在很多情况下, 通过一系列的组蛋白修饰在特定位点形成异染色质可以解释基因的渐成式调节。最近, 在开花时间控制中的这些研究结果就表明, 春化反应途径和自主途径对开花时间的调节都是通过改变开花抑制基因 FLC 的染色质结构来抑制其表达而促进开花的。在很短的时间内, 植物开花时间控制研究领域连续取得突破性进展应该说不是偶然的, 而是这些植物学领域的先驱们努力的结果。虽然, 与 VIN3、VRN1、VRN2、FLD 和 FVE 共同起作用的蛋白质复合体的其他成员目前还不清楚, 但将染色质重塑理论引入了开花时间控制, 已经使人们对开花时间控制的分子机制有了更加深入的理解, 也使春化作用这个古老的研究领域有了几乎最现代的解释, 同时也使人们更加坚信这些在酵母、动物和植物中保守的、参与染色质重塑过程的蛋白质因子会在植物发育中发挥重要作用。

同时也注意到, 虽然在动物和微生物系统中染色质修饰的机制、参与染色质修饰的蛋白质复合体的组成、染色质修饰对动物和微生物基因表达和细胞发育的影响等方面已经取得了很大进展, 但植物方面的有关工作还是刚刚开始。在植物生物学领域, 染色质构象调控机制以及在植物发育中的作用将会是一个很有前景的研究领域。有关的研究工作可能包括用生物化学手段研究参与染色质化学修饰的蛋白质复合体的组成和结构; 通过遗传学方法研究这些保守的蛋白质因子在植物发育中的作用; 通过功能基因组学的思路和技术研究这些保守蛋白质因子在全基因组水平的靶基因和靶位点以及植物特异的调控染色质构象蛋白的作用和机制等。鉴于染色质重塑过程对整个基因组的影响是全面而广泛的, 随着研究的深入, 有充分的理由相信染色质重

塑过程将可能参与植物生长发育的各个方面。

参考文献 (References)

- [1] Hayes JJ *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**: 124
 [2] Jenuwein T *et al. Science*, 2001, **293**: 1074
 [3] Turner BM. *Cell*, 2002, **111**: 285
 [4] Berger SL. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, **12**: 142
 [5] Flaus A *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**: 148
 [6] Bird AP *et al. Cell*, 1999, **99**: 451
 [7] Jones PL *et al. Nat Genet*, 1998, **19**: 187
 [8] Nan X *et al. Nature*, 1998, **393**: 386
 [9] Wagner D. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**: 20
 [10] Simpson GG. *et al. Science*, 2002, **296**: 285
 [11] Mouradov A *et al. Plant Cell*, 2002, **14**: S111
 [12] 雍伟东等. *科学通报*, 2000, **45**: 455
 [13] Lee I *et al. Mol Gen Genet*, 1993, **237**: 171
 [14] Clarke JH *et al. Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 81
 [15] Michaels SD *et al. Plant Cell*, 1999, **11**: 949
 [16] Sheldon CC *et al. Plant Cell*, 1999, **11**: 445
 [17] Michaels SD *et al. Plant Cell*, 2001, **13**: 935
 [18] Johanson U *et al. Science*, 2000, **290**: 344
 [19] Gazzani S *et al. Plant Physiol*, 2003, **132**: 1107
 [20] Michaels SD *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 10102
 [21] Gendall AR *et al. Cell*, 2001, **107**: 525
 [22] Sung S *et al. Nature*, 2004, **427**: 159
 [23] Levy YY *et al. Science*, 2002, **297**: 243
 [24] Bastow R *et al. Nature*, 2004, **427**: 164
 [25] Martinez-Zapater JM *et al. Plant Physiol*, 1990, **92**: 770
 [26] Koornneef M *et al. Mol Gen Genet*, 1991, **229**: 57
 [27] Lee I *et al. Plant Cell*, 1994, **6**: 75
 [28] Macknight R *et al. Cell*, 1997, **89**: 737
 [29] Schomburg FM *et al. Plant Cell*, 2001, **13**: 1427
 [30] Quesada V *et al. EMBO J*, 2003, **22**: 3142
 [31] Simpson GG *et al. Cell*, 2003, **113**: 777
 [32] He Y *et al. Science*, 2003, **302**: 1751
 [33] Ausin I *et al. Nat Genet*, 2004, **36**: 162
 [34] Kim HJ *et al. Nat Genet*, 2004, **36**: 167
 [35] Amasino R. *Nat Genet*, 2004, **36**: 111

Chromatin Remodeling and Flowering Time Control in Higher Plant

Jian Li, Li-Geng Ma*

(Laboratory of Molecular Cell Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract The changes in conformational structure and composition of chromatin led to the activation or silence of genes through mediating the combination between transcription factors and gene promoter directly. The studies in yeast and animal system had suggested that chromatin remodeling was required for the establishment and maintenance of the expression pattern of the transcription factors, which played an important role in regulation of gene expression. The environmental signals regulated gene expression and eventually controlled cell differentiation and individual development through chromatin remodeling regulation. The protein mediators involved in chromatin remodeling in yeast and animal system had also been found in higher plant. Recent studies indicated that external signals mediate chromatin conformational structure to regulate the expression of the key genes which control the flower time. This paper provided briefly summary the progresses in this field.

Key words chromatin remodeling; flowering time control; vernalization pathway; autonomous pathway

Received: June 4, 2004

Accepted: October 18, 2004

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.30025024) and the Program for Excellent and Key Junior Faculty from Ministry of Education of China

*Corresponding author. Tel: 86-311-6269300, Fax: 86-311-5820649, E-mail: ligeng.ma@yale.edu