

种子贮藏蛋白的运输、积累和基因表达调控

高新起^{1,2*}¹ 曲阜师范大学生命科学院, 曲阜 273165;² 中国农业大学植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 种子中贮藏蛋白的运输和积累途径主要有: (1)蛋白质合成后经内膜系统转移到蛋白质贮藏液泡(PSV)中积累; (2)合成的蛋白质直接在粗糙内质网的膜囊中积累形成蛋白质体; (3)贮藏蛋白不经高尔基体的加工由粗糙内质网上合成后直接运输到 PSV 中积累。贮藏蛋白基因的表达受该基因的顺式作用元件和反式作用因子的共同调控, 此外染色体的结构也影响贮藏蛋白基因的表达。

关键词 种子; 贮藏蛋白; 运输和积累; 基因表达调控

种子中的贮藏蛋白主要有两大类, 豆类作物中的球蛋白和禾谷类作物中的醇溶蛋白, 积累的部位主要是豆类作物的子叶以及禾谷类作物的胚乳和糊粉层。在胚发育的中后期, 贮藏蛋白特异的积累在这些组织细胞的液泡和内质网等细胞器中。细胞中所有积累贮藏蛋白形成的结构以前统称为蛋白质体(protein body, PB), 但是现在蛋白质体专指内质网膜囊中积累贮藏蛋白形成的结构, 而液泡中积累贮藏蛋白形成的结构称为蛋白质贮藏液泡(protein storage vacuole, PSV)^[1]。后者液泡膜含有两种特有的内在蛋白(α -TIP 和 δ -TIP)而不同于一般营养组织中的溶解性液泡(lytic vacuole)。

1 种子中贮藏蛋白的结构

用普通固定方法得到的电镜照片中, 蛋白质通常以块状形式沿液泡膜的内表面积。但是利用低温固定的方法制备的大豆子叶细胞中, 蛋白质以均匀分散的形式在液泡中积累^[1]。由于低温固定的固定速度快, 能更好的保存细胞的细微结构, 因此用普通固定方法得到的结果可能是一种假象。

在成熟种子中, 贮藏蛋白形成的结构通常大小不一。其原因可能是它们的起源不同或者所含有的蛋白质种类不同。例如玉米胚乳中, 直径大的蛋白质体含有 α 、 β 、 γ 、 δ 这 4 种玉米醇溶蛋白, 而小一些的蛋白质体仅含 β 、 γ 两种玉米醇溶蛋白^[2]。在禾谷类作物种子的 PSV 电镜照片上, 通常能观察到深浅相间的轮纹结构, 可能是在同一 PSV 中周期性积累贮藏蛋白形成的。

成熟种子的 PSV 的成份主要是可溶性贮藏蛋白, 有的还包括拟晶体^[3]。拟晶体是蛋白质在 PSV 中形成类似晶体的结构, 豆科植物种子中缺乏拟晶

体。对拟晶体的蛋白质成分了解较少, 在转基因的烟草种子中, 玉米 15 kDa 的醇溶谷蛋白主要积累在拟晶体中^[4]。此外许多植物的 PSV 中含有植酸钙镁晶体, 在透射电镜下观察 PSV, 经常发现空洞的结构, 可能是切片过程中植酸钙镁晶体丢失形成的。

2 贮藏蛋白的运输和积累

种子贮藏蛋白都是由附着在粗糙内质网表面的核糖体合成的, 然后穿过粗糙内质网的膜进入囊腔中。贮藏蛋白进入粗糙内质网的囊腔中是由位于新生肽链特定部位的信号肽引导的。在信号肽引导新生肽链穿过粗糙内质网膜进入囊腔后, 信号肽被切除。信号肽的切除对新生肽链的继续合成和贮藏蛋白质在粗糙内质网囊腔中的正确折叠、组装是必需的。贮藏蛋白在粗糙内质网的囊腔中形成寡聚体后接着被从合成部位运走, 在豌豆中发现贮藏蛋白在粗糙内质网囊腔中存留的半寿期只有 90 min^[5]。贮藏蛋白被运输到积累部位的途径是不一样的, 归纳起来有 3 种途径: (1)粗糙内质网上合成的贮藏蛋白经高尔基体加工后在 PSV 中积累; (2)贮藏蛋白直接积累在粗糙内质网的膜囊末端形成蛋白质体。(3)粗糙内质网上合成的贮藏蛋白不经高尔基体的加工直接运输到 PSV 中积累。

2.1 贮藏蛋白通过内膜系统转移到 PSV 中

Chrispeels 等^[6]首先描述了粗糙内质网上合成的蛋白质经高尔基体转移到 PSV 中这一运输途径。常规透射电镜观察、免疫标记以及生化分析都提供了确切的证据证明贮藏蛋白在粗糙内质网上合成后经

过高尔基体转移到 PSV 中^[6-11]。此类蛋白质多为球蛋白, 在内质网囊腔的 pH 值条件下是可溶的^[12]; 在这些蛋白质前体的 N 端、C 端或者在成熟蛋白质的暴露区域有相似的分选信号(vacuolar sorting signal)。这些分选信号的共同特征是有一个疏水核心或者是具有 Asn-Pro-Ile-Arg 组成的模体(motif)^[13]。

2.1.1 贮藏蛋白从粗糙内质网转移到高尔基体中

内质网囊腔中的贮藏蛋白在内质网驻留(ER-resident)酶的作用下, 浓缩在内质网的特定位置。然后内质网以包被小泡(coated vesicle)的形式将贮藏蛋白转移到高尔基体中。至今对内质网上形成包被小泡的过程仍不清楚。根据以往的研究有两种模型解释这一过程^[14]: 一是主动运输模型(active transport model), 该模型认为从内质网上以包被小泡形式运输的蛋白质肽链结构中都有内质网输出信号(ER export signal)。含有该输出信号的蛋白质才能与分选受体(sorting receptor)结合, 从而诱导包被小泡的形成。而内质网的驻留蛋白质(如 BiP)因无内质网输出信号不能与分选受体结合, 不能形成包被小泡离开内质网; 二是集流模型(bulk-flow model), 该模型认为一种与小泡包被蛋白相互作用的跨膜蛋白能激发内质网以出芽的形式形成包被小泡。贮藏蛋白和内质网驻留蛋白都被包裹到这种小泡内, 但是内质网驻留蛋白因具有驻留信号能重新返回到内质网中。

包被小泡与高尔基体的 *cis* 面融合, 运输的蛋白质进入高尔基体。在酵母中研究发现, 从内质网上产生的包被小泡的外被是一种称为 COP II 的外被体(coatomer), 由两种蛋白质组成。COP II 外被体上含有 GTPase-sarlp, 在包被小泡运输的物质与高尔基体融合后, COP II 外被体在 GTP 存在的情况下从小泡上释放, 返回内质网^[15]。在植物中也已经发现了 COP II 外被体的成分和 SAR1 GTPase^[16]。

2.1.2 贮藏蛋白经高尔基体转移到 PSV 中

贮藏蛋白质依次经过高尔基体的 *cis* 膜囊、中间膜囊和 *trans* 膜囊, 被高尔基体内的酶修饰形成成熟的蛋白质^[17], 这些蛋白质仍以包被小泡的形式被运走。在高尔基体附近有 3 种小泡形成: 含有贮藏蛋白的小泡、含有细胞壁前体物质的小泡、网格蛋白包被的小泡(calthrin-coated vesicle, CCV)^[10]。最近的研究表明 CCV 并不承担运输贮藏蛋白的功能^[18]。含有贮藏蛋白的小泡电子密度较大, 称为电子浓密小泡(dense vesicle, DV), 将含有的贮藏蛋白运输到 PSV 中。DV 有大小两种, 直径分别为 100 nm 和 300~500 nm^[1]。但是在蓖麻胚乳细胞中发现 DV 的直径分别是 60 nm 和 220 nm^[19]。有的研究表明 DV 不仅来自于高尔基体的 *trans* 膜囊, *cis* 膜囊也能形成 DV, 这种 DV 的直径约为 100~200 nm, 不仅含有贮藏蛋

白, 还含有其他功能蛋白质^[20]。

许多研究中都观察到液泡在积累蛋白质的同时发生分裂的现象, 即由一个大液泡分隔出许多小的液泡(PSV)^[1,11,21,22], 分割的方式是通过液泡膜的向内生长或者液泡的缢裂。Craig 等^[23]用光镜观察发现豌豆子叶细胞中由一个大液泡分隔成许多小 PSV 后, 总的液泡膜面积增大了 1000 倍。液泡膜总面积的增大有利于蛋白质向 PSV 中运输, 可能与此时蛋白质在 PSV 中迅速积累相适应。在豌豆子叶细胞中发现分裂形成许多 PSV 的大液泡是在细胞积累蛋白质时重新形成的, 而并非是细胞中原有的大液泡^[24]。在小麦胚乳中, 积累蛋白质的 PSV 是原液泡相互融合形成的, 而原液泡并非来自于细胞中原先存在的大液泡, 而是由位于蛋白质表面电子透明的小泡融合形成的^[25]。如果 PSV 来源于原先已存在的大液泡, 而非重新形成的, 那么大液泡在分割成许多小液泡的同时, 液泡的化学成分特别是蛋白酶的成分肯定要发生变化, 以利于贮存蛋白质的积累。

此外, 在荞麦不同发育时期的子叶细胞质中都观察到来源于高尔基体、含蛋白质的电子不透明小泡, 而且在成熟的子叶中仍然存在; 推测荞麦子叶细胞中这种小泡不仅起到向 PSV 运输蛋白质的作用, 也可能直接起到贮存蛋白质的作用^[11], 但是这种推测仍有待于进一步验证。

2.2 贮藏蛋白在粗糙内质网的膜囊中积累形成蛋白质体

水稻胚乳细胞中内质网合成两种贮藏蛋白: 谷蛋白和醇溶谷蛋白, 其中谷蛋白经高尔基体转运到 PSV 中积累, 醇溶谷蛋白则直接在内质网的膜囊中积累形成蛋白质体^[26]。通过常规电镜和免疫电镜技术在高粱^[9]、苕苳^[27]胚乳细胞和大豆^[21]子叶细胞中都曾观察到贮藏蛋白在内质网膜囊中积累形成蛋白质体。这种蛋白质体表面有一层内质网膜包被, 表面附着核糖体, 有时还能观察到蛋白质体表面的膜与内质网相连。

大多数的内质网驻留蛋白(如 BiP)在其 C 端有共同的氨基酸序列 KDEL 或 HDEL(Lys(His)-Asp-Glu-Leu), 但是醇溶谷蛋白无此序列^[28]。最初认为醇溶谷蛋白在内质网膜囊中积累可能与这些蛋白质的疏水特性或者与内质网膜囊中较强的离子环境有关。在玉米、大麦、小麦中研究发现醇溶谷蛋白在内质网中形成蛋白质体与贫硫醇溶谷蛋白和富硫醇溶谷蛋白的相互作用有关^[1]。但是贮藏蛋白在内质网膜囊中的积累并不是随机的, 而是积累在特定的区域, 因此贮藏蛋白在内质网膜囊中的积累不会仅仅决定于以上两种因素, 可能还有特定的细胞因子参与这一过程^[1]。

在小麦^[25]和水稻^[29]醇溶谷蛋白质体形成过程中有 BiP 的参与, 其作用在于使醇溶谷蛋白虽无内质网驻留信号, 但却可以驻留在内质网中, 促进醇溶谷蛋白分子正确折叠并形成蛋白质体。醇溶谷蛋白在内质网膜囊中的积累可能不仅仅决定于蛋白质分子的相互作用, 研究发现水稻醇溶谷蛋白的 mRNA 除作为合成蛋白质的模板以外, 还有指导醇溶谷蛋白在内质网膜囊中积累形成蛋白质体的功能^[26]。

2.3 内质网合成的蛋白质, 不经高尔基体直接运输到 PSV 中积累

在烟草叶肉原生质体中发现 PSV 中含有来自内质网的膜成分, 利用表达 α -TIP CT 报告基因的烟草研究表明, 来自内质网的小泡能特异的在 PSV 中积累, 最终形成种子 PSV 的拟晶体结构^[3]。但是来自于内质网的含蛋白质的小泡如何进入 PSV 积累却有不同的研究结果。

Levanony 等^[25]发现小麦胚乳内的醇溶谷蛋白在内质网上合成并积累形成蛋白质体, 蛋白质体脱离内质网后表面附着许多电子透明的小泡, 小泡相互融合形成原液泡(provacuole)。蛋白质体则以自体吞噬的方式进入原液泡中积累。进入原液泡内的蛋白质体的膜被液泡内的酶降解后相互融合。原液泡融合形成 PSV 过程中无高尔基体的参与。原液泡膜的来源仍不清楚, 研究发现原液泡膜上有 α -TIP(液泡膜的内在蛋白)和焦磷酸酶, 这两种蛋白质都是液泡膜的标志蛋白, 也是由高尔基体形成液泡的标志^[1], 因此原液泡膜可能来自于高尔基体。

在西葫芦子叶细胞中存在直径 200~400 nm 小泡, 因其含有贮藏蛋白(清蛋白和球蛋白)的前体被称为积累蛋白质前体小泡(precursor-accumulating vesicles, PAC 小泡), 具有将贮藏蛋白运输到 PSV 的作用。PAC 小泡的中央是由蛋白质前体组成的电子密度高的核心, 周围是电子透明的区域。通过染色方法, 发现电子透明的区域是由许多进入 PAC 小泡的更小的泡组成的。由于 PAC 小泡的转移不能被莫能菌素(抑制高尔基体小泡参与的转移过程)抑制, 证明该过程中没有高尔基体参与^[30]。但是在 PSV 小泡的电子透明区域有糖基化蛋白存在, 糖基化蛋白含有经高尔基体加工才能形成的聚糖侧链, 表明 PSV 小泡形成过程中有高尔基体酶的参与^[30]。另外 PSV 小泡的膜上有液泡分选受体(vacuole-sorting receptor), 而液泡分选受体通常存在于高尔基体膜上, 具有指导小泡将内容物运到液泡的作用^[31]。由此来看, 虽然高尔基体未参与小麦胚乳中含醇溶谷蛋白的蛋白质体和西葫芦子叶细胞中含贮存蛋白的 PAC 小泡转运到液泡的过程, 但它可能在原液泡和 PAC 小泡的形成过程中起作用。

Levanony 等^[25]认为小麦中蛋白质体小泡是以自体吞噬的方式进入液泡的, 而 Hara-Nishimura 等^[30]认为西葫芦子叶细胞中的 PAC 小泡是通过膜的融合将贮藏蛋白运输到液泡中。而自体吞噬和膜的融合是两种完全不同的过程, 可能涉及不同类型膜蛋白的相互作用^[6]。一般认为自体吞噬只涉及一种膜的融合过程, 而 PAC 小泡与液泡的融合与两种膜的相互作用有关。究竟哪一种研究结果准确或者两种方式在蛋白质的积累过程中都存在仍需进一步研究。

我们在荞麦子叶蛋白质积累过程中观察到聚合粗糙内质网, 这些聚合的粗糙内质网可能直接将合成的蛋白质分泌到细胞质中形成贮藏蛋白团块, 但不清楚这些蛋白质是否最终要被运输到 PSV 中^[31]。

3 贮藏蛋白基因的表达调控

5000 个种子中表达基因的 microarray 结果显示, 10% 的基因表达量大于或等于叶片和根中表达量的 10 倍, 在这其中包括种子贮藏蛋白的基因, 以及调节这些基因表达的调节因子的基因^[32]。多数植物种子贮藏蛋白是比较小的多基因家族编码的。例如拟南芥的 2S 清蛋白是由 5 个基因编码(at2S1~at2S5), 这 5 个基因的产物都能在种子中检测到^[33]。虽然种子贮藏蛋白基因主要在胚发育的中后期表达, 但是不同基因的表达时间和表达部位各不相同。利用基因启动子加报告基因的方法研究种子贮藏蛋白的时空表达模式, 发现贮藏蛋白的表达水平和组织特异性是在基因的转录水平上调节的, 受基因的顺式作用元件和反式作用因子相互作用的调节。At2S1 主要在拟南芥胚轴中表达, 而 At2S2 和 At2S3 则在整个胚中表达, 利用 At2S1 和 At2S2 杂合启动子的方法, 发现在启动子区中有一段序列特异调控 2S 清蛋白在胚的栅栏组织和表皮细胞中表达, 而这一段的侧翼序列可能调控 mRNA 的表达水平^[34]。拟南芥油体蛋白(oleosin)基因启动子不同的区段对该基因表达有不同的调控作用, 例如该基因在胚发育早期阶段表达的水平受 -2500 bp 到 -1100 bp 的一段序列调节, 渗透胁迫下该基因的表达受到 -400 bp 到 -200 bp 区段的调控^[35]。对豆类和禾谷类作物种子贮藏蛋白基因顺式作用元件的分析表明, 启动子区都含有 RY 重复模体^[36], 作为增强子加强这些基因在胚中的表达, 同时抑制这些基因在营养组织中的表达。菜豆种子贮藏蛋白 β -phaseolin 基因启动子调节该基因只在胚中表达, 不在营养组织中表达^[37]。突变体的分析已鉴定出一些与 RY 重复模体互相作用的转录因子 ABI3、VP1 和 FUS3, 这些蛋白质都包含 B1、B2、B3 结构域的 2 个或者 3 个^[38]。拟南芥 *abi3* (abscisic acid-insensitive 3)、

fus3 (*fusca 3*)、*lec1* (*leafy cotyledon 1*)突变体的种子对脱水敏感,同时种子中贮藏蛋白的含量显著降低,研究发现这些转录因子(*ABI3*、*FUS3*、*LEC1*)对贮藏蛋白基因的表达起到重要的调控作用。事实上,这些转录因子不仅是通过与RY重复序列相互作用来调节贮藏蛋白基因的表达,它们还能够独立起作用。这表明除B1、B2、B3结构域以外的区域可能在调控贮藏蛋白基因的表达过程中也起重要作用^[32]。

编码拟南芥2S清蛋白的5个基因中有4个基因是在一条染色体上成簇排列的,利用转基因的方法使这4个基因在基因组原先位置的拷贝数增加一倍,结果它们的表达水平得到很大的提高^[34],这表明2S清蛋白基因在基因组中的组织能影响基因的表达水平。另外体外实验发现,菜豆蛋白基因启动子区核小体位置在胚的组织中与在其他组织中的位置不同,这种位置的改变更有利于转录因子靠近^[36,39],表明染色体的结构能影响了贮藏蛋白基因的表达。

贮藏蛋白在特定的时间、细胞和组织中合成并积累是植物生长发育过程中一系列精确调控的过程之一。种子的贮藏蛋白不仅为幼苗的发育提供物质基础,也是人类和动物食物中蛋白质的主要来源。研究种子贮藏蛋白积累的途径以及贮藏蛋白基因的表达调控将为通过生物工程的方式提高作物种子中蛋白质特别是有益蛋白质的含量提供理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Herman EM *et al. Plant Cell*, 1999, **11**: 601
- [2] Lopes MA *et al. Crop Sci*, 1991, **31**: 1655
- [3] Jiang L *et al. J Cell Bio*, 2000, **150**: 755
- [4] Hoffman LM *et al. EMBO J*, 1987, **6**: 3213
- [5] Chrispeels MJ *et al. J Cell Biol*, 1982, **93**: 5
- [6] Chrispeels MJ *et al. Plant Physiol*, 2000, **123**: 1227
- [7] Hara-Nishimura I *et al. Protoplasma*, 1987, **136**: 49
- [8] Kim W T *et al. Planta*, 1998, **176**: 173
- [9] Krishnan HB *et al. Protoplasma*, 1988, **144**: 25
- [10] Marty F. *Plant Cell*, 1999, **11**: 587
- [11] 高新起等. *实验生物学报*, 2002, **35**: 283
- [12] Vitale A *et al. J Exp Bot*, 1993, **44**: 1417
- [13] Chrispeels MJ *et al. Cell*, 1992, **68**: 613
- [14] Vitale A *et al. Plant Cell*, 1999, **11**: 615
- [15] Sanderfoot A A *et al. Plant Cell*, 1999, **11**: 629
- [16] Robinson DG *et al. J Exp Bot*, 1998, **49**: 1263
- [17] Yaklich B *et al. Plant Sci*, 1995, **107**: 57
- [18] Hohli I *et al. J Cell Sci*, 1996, **109**: 2539
- [19] Brown MJ *et al. Can J Bot*, 1990, **68**: 2353
- [20] Robinson DG *et al. Seed Sci Res*, 1999, **9**: 267
- [21] 郑易之等. *植物学报*, 1990, **32**: 97
- [22] 高新起等. *云南植物研究*, 2000, **4**: 451
- [23] Craig S *et al. Austr J Plant Physiol*, 1980, **7**: 329
- [24] Robinson DG *et al. J Plant Physiol*, 1995, **145**: 654
- [25] Levanony H *et al. J Cell Biol*, 1992, **119**: 1117
- [26] Li X *et al. Cell*, 1993, **72**: 869
- [27] 高荣歧等. *植物学报*, 1994, **36**(增刊): 37
- [28] Li X *et al. Science*, 1993, **262**: 1054
- [29] Shimada T *et al. Plant Cell Physiol*, 1997, **38**: 1414
- [30] Hara-Nishimura I I *et al. Plant Cell*, 1998, **10**: 825
- [31] 高新起等. *植物研究*, 2002, **22**: 30
- [32] Fujiwara T *et al. Storage Proteins*. In: Somerville CR *et al.* (eds.) *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, 2002
- [33] van der Klei H *et al. Plant Physiol*, 1993, **101**: 1415
- [34] Conceicao Ada S *et al. Plant J*, 1994, **5**: 493
- [35] Plant AL *et al. Plant Mol Biol*, 1994, **25**: 193
- [36] Bobb AJ *et al. Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 641
- [37] Chandrasekharan MB *et al. Plant J*, 2003, **33**: 853
- [38] Kurup S *et al. Plant J*, 2000, **21**: 143
- [39] Li G *et al. Plant Mol Biol*, 2001, **46**: 121

Transportation and Accumulation of Storage Protein and Regulation of Genes Expression in Seeds

Xin-Qi Gao^{1,2*}

¹College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China;

²State key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract There are three transportation and accumulation routes of storage protein in seed: (1) storage protein is transported to protein storage vacuole (PSV) via endomembrane system and accumulated in PSV; (2) storage protein is accumulated in lumen of rough endoplasmic reticulum and become protein body; (3) storage protein is transported to PSV and accumulated in them, but dictyosome is not involved in this process. Regulation of seed storage protein genes expression is controlled under the interaction of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors of these genes. Gene organization and chromatin structure are also been shown to be involved in seed-specific expression of the storage protein gene.

Key words seed; storage protein; transportation and accumulation; gene expression

Received: February 20, 2004 Accepted: August 24, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-10-62733434, E-mail: gxq72@sohu.com