

植物果胶甲酯酶及其花粉特异基因的分离

刘乐承^{1,2} 曹家树^{2*}⁽¹⁾ 浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; ⁽²⁾ 长江大学园艺园林学院, 荆州 434025)

摘要 果胶甲酯酶与植物的多种重要生长发育过程有关, 是目前植物生物学研究中的一个热点。根据相关文献, 对植物果胶甲酯酶的结构模型、作用方式以及花粉特异的果胶甲酯酶基因的分离进行了综述。

关键词 果胶甲酯酶; 花粉; 基因; 分离

果胶甲酯酶[EC 3.1.1.11, pectin methylesterase (PME)或 pectinesterase(PE)]广泛存在于植物、真菌和细菌甚至昆虫中。在高等植物中, 果胶是植物细胞的初生壁和胞间层的主要成分, 而 PME 是一种细胞壁蛋白, 植物细胞壁中高度甲酯化的果胶通过 PME 的作用而脱甲基。已有的研究发现, 植物中 PME 以一种器官相关或时间相关的方式无所不在地表达, 它们通常以多种异构体的方式分布, 与多种生理过程有关, 如果实成熟、器官脱落、小孢子发育和花粉管伸长、种子萌发、抗病性、形成层细胞分化等^[1-4]。因此, PME 的研究是目前植物生物学研究中的一个热点问题。然而, 尽管随着分子生物学技术的发展, 有关 PME 的研究取得了长足的进展, 但是, 迄今为止的 PME 研究多数是关于果实及其成熟过程的, 而且对其结构、生理功能及其作用机制都还不很清楚。本文拟就植物 PME 的结构模型、作用方式以及花粉特异 PME 基因的分离进行综述。

1 植物 PME 的结构模型

至今已经发现, 在多种植物中 PME 具有多种异构体^[5-7], PME 是一个多基因家族, 通过对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组序列的系统分析, 已经确认拟南芥中存在 66 种 PME 相关基因^[8]。植物中 PME 具有多种异构体, 而且具有多种可能的功能。显然, 弄清 PME 的结构对分析其功能是十分重要的, 但是目前还很困难。因为如果通过过量表达后采用 X 射线晶体学分析 PME 的结构, 就能够很好地认识果胶与 PME 的相互作用。然而, 虽然在异源的原核系统和真核系统中已经得到了致病细菌和真菌的 PME^[9], 但是至今还没有高等植物 PME 过量表达的报道。这是因为在输出到质外体的过程中, 植物 PME 同工酶可能进行了生物体特异的转录后加工, 而这种加工是

它们结构与功能完整性的需要。因而, 验证已经分离出的 PME 相关基因的功能, 目前依然很困难^[10]。

现有的植物 PME 的结构是通过 *in silico* 法(利用计算机数据综合分析方法进行生物学研究)预测的^[11]。目前得到的这个模型(图 1)^[12], 是通过与黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的一个已知 PME 的三维结构相比较而建立的。在这个模型中, PME 是一个 β 螺旋蛋白质, 它是通过平行的 β 折叠卷曲进一个大的右手的圆柱形二级结构与一个具有 α 螺旋的回折(loop)所组成的。这个模型中有 4 个高度保守的色氨酸残基和 4 个严格保守的酪氨酸残基, 它们可能参与与底物的结合; 还有 3 个保守的苯基丙氨酸残基, 它们可能对形成平行的 β 折叠的疏水中心起着重要作用^[12]。将这个模型与一些蛋白质的结构进行比较发现, 它与已经通过晶检仪分析所观察到的细菌和真菌 PME 的结



图 1 植物果胶甲酯酶三维结构的同源模型^[12]

黄色: 平行的 β 折叠卷曲; 红色: 具有 α 螺旋的回折; 浅绿色: 色氨酸残基; 白色: 酪氨酸残基; 紫色: 苯基丙氨酸。

收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-04-11

国家自然科学基金项目(No.30370975)和浙江省重大科技项目(No.2005C12019-02)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

构最接近, 而且 Jenkins 等^[12]对菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)的 PME 晶体的三维结构的观察也证实了这一模型正确性。

Johansson 等^[13]以菊欧文氏菌作为研究模型, 采用分子置换法描述了胡萝卜 PME 的晶体结构: β 螺旋结构包含一个中央裂缝, 裂缝是顺着好几个芳香族残基排列的, 推测这个裂缝适合于果胶的黏附; 活性中心在裂缝的中央, 其中 Asp157 可能是作为亲核试剂, Asp136 则平衡酸/碱, 而 Gln113/Gln135 形成一个阴离子空穴来稳定过渡状态。这是对植物 PME 结构的第一次描述。

2 植物 PME 的作用方式

果胶是植物细胞的初生壁和胞间层的主要成分, 主要由同聚半乳糖醛酸(homogalacturonan)和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 I (rhamnogalacturonan-I)组成^[14]。合成和分泌到细胞壁的果胶在被 PME 切割前高度酯化, PME 负责植物细胞壁中果胶的脱甲基, 使得果胶随后能在多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)和果胶裂解酶(pectate lyase)等酶的共同作用下降解^[2]。

在高等植物中, PME 是一种细胞壁蛋白质, 在 PME cDNA 中, 靠近 N 末端的序列具有信号肽的典型特征, 其作用是引导这个蛋白质向细胞壁移动^[10]。同聚半乳糖醛酸是果胶的主要成分, 它是一种由(1, 4)- α -半乳糖酸(GalUA)组成的线形残基。有研究表明, 这些果胶是在高尔基体中合成和甲酯化后, 以高度甲酯化的状态分泌到细胞壁中的。随后, 在半乳糖链上, 果胶被与细胞壁结合的 PME 脱甲酯, 转变成含甲氧基的基团, 并释放甲醇和质子^[15]。

尽管 PME 作用的生化方式已经很清楚, 即 PME 催化果胶脱甲酯并释放质子和甲醇, 但是证明 PME 在植物生理学上的作用却很困难。因为, PME 是植物界普遍存在的一种酶, 脱酯的和非脱酯的果胶在结构和分布上具有多样性^[16], 因而 PME 对果胶的修饰也十分复杂, 这种修饰作用在植物生长和发育中的功能还很不清楚。

成熟 PME 进入细胞壁后, 可能有不同的作用方式。过去的 20 多年来, 普遍接受的假设是, PME 沿着果胶链或线性地或随机地作用于同聚半乳糖醛酸^[17]。一般认为, 大多数植物的果胶脱酯方式是, PME 沿着半乳糖链线性地起作用, 由于在相邻果胶链的自由羧基团之间形成 Ca^{2+} 桥, 果胶趋向于凝胶化, 而内源多聚半乳糖醛酸酶对这种凝胶的作用有限, 果

胶凝胶化的结果是细胞壁变硬^[18]。而且认为碱性 PME 通过这种方式起作用。例如, 在烟草花粉管中, 果胶脱甲酯和凝胶化可能发生在伸长顶端区域以下的壁中, 而酯化果胶在花粉管壁的顶端特别丰富, 显然是由花粉管壁产生的碱性异构体 PME 使果胶凝胶化而加固了管壁^[19]。

果胶脱酯的另一种方式是由于脱酯过程降低了局部的 pH, 能够激发多种使细胞壁松弛的水解酶的活性, 如多聚半乳糖酸酶和果胶裂解酶, 从而促进细胞壁的延展或生长^[20,21]。PME 的这种作用方式被认为是酸性生长模式, PME 与果胶水解酶一起起作用, 引起果胶的随机降解, 但这种降解不能导致果胶的凝胶化。

从结果上看, PME 的活动可以导致细胞壁硬化或细胞壁松弛。研究发现, 这一对相反的效果与特异的 PME 异构体有关, 或者取决于微环境——尤其是非原质体的 pH 和二价阳离子^[18,22]。有证据表明, 细胞壁中 PME 的活性受结合于果胶物质上的 Ca^{2+} 离子调节^[23]。

以前, 由于认为酸性 PME 只限于在真菌中存在, 因而简单地假设随机脱甲酯依赖于酸性 PME, 而线性脱甲酯依赖于碱性 PME。然而, 近来更多的研究表明, PME 活性也依赖于 pH 和果胶甲酯化的初始程度。因为一些异构体能在酸性条件下随机地作用, 但在碱性条件下线性地作用, 而且在给定的 pH 下对于高度甲酯化的果胶一些异构体比另一些更有效^[18,24]; 同时, 阳离子可以提高 PME 活性, 而且三价阳离子比二价阳离子更有效, 而二价阳离子又比一价阳离子有效^[25]。在不同的浓度下, 阳离子可能也改变 PME 与其底物的亲和性。因此, 成熟 PME 的作用方式受到很多因素的调节, 这既反映了这种酶的复杂性, 也改变了把 PME 分成“碱性-线性脱甲酯”和“酸性-随机脱甲酯”两类的简单假说。显然, PME 的作用方式及其作用机制还需要深入系统的研究。

3 植物花粉特异 PME 基因的分离

在植物花药的发育过程中, 约有 20 000 个基因在花粉中表达, 但其中仅有约 10% 的基因在花粉中特异表达^[26]。迄今已经分离得到了 150 多个花粉特异表达的基因^[27], 其中花粉和 / 或花粉管特异表达的 PME 和 PME 类基因却屈指可数。

Albani 等^[28]从甘蓝型油菜(*Brassica napus*)基因组文库中筛选分离到了小孢子发育过程中高表达的基

因 *Bp19*。 *Bp19* 约 63 kDa, 有一个具有信号肽特征的高疏水氨基酸末端区域。该蛋白质羧基部分开始于第 269 个氨基酸, 并与番茄^[29]和植物致病菌菊欧文氏菌^[30]的 *PME* 序列很相似, 而且这 3 个蛋白质中的 4 个短的结构域特别保守, 代表了负责酶活性的催化位点。 *Bp19* 在雌蕊、花瓣、叶茎、种子、子叶、下胚轴和根中都不表达, 仅在花粉中特异表达, 其 mRNA 在单核小孢子中开始积累, 不断增加至发育后期达到一个高峰, 但是在成熟花粉中急剧下降。 *Bp19* 是植物中克隆到的第一个花粉特异的 *PME* 基因。

Mu 等^[1]从矮牵牛(*Petunia inflata*) cDNA 文库中筛选分离到了一个编码一个 41.5 kDa 蛋白质的 *PPE1* 基因, 其序列与包括甘蓝型油菜^[28]和番茄^[29]在内的多种植物、细菌和真菌的 *PME* 基因存在序列相似性, 并具有一个 102 bp 的内含子。 *PPE1* 基因在花粉发育过程中特异表达, 其 mRNA 首先在含有单核小孢子的花药中检测到, 在成熟花粉中达到最高水平, 并在离体萌发的花粉管中维持一个高水平, 这种表达模式说明 *PPE1* 基因的产物对花粉的发育、萌发和(或)花粉管的伸长可能起着作用。

Wakeley 等^[31]从玉米(*Zea mays*)花粉 cDNA 文库中差异筛选出了在花粉中特异表达基因的 cDNA 克隆, 其中一组克隆与植物和真菌 *PME* 具有相似性(18%~41%); Southern 印迹表明从这一组中得到的 *ZmC5* 是一个具有至少两个成员的小的基因家族。它是在花粉发育后期特异表达的, 这一组织特异表达特性在采用 *ZmC5* 启动子/GUS 嵌合体结构的烟草转基因植株中得到了进一步证实, 表明 *ZmC5* 的 *PME* 类基因产物可能在花粉管伸长中起作用。 Jiang 等^[32]对拟南芥的研究证明编码 *PME* 的 *VGD1* 基因的产物确实是植物花粉管伸长所需要的。

Qiu 等^[33]报道并在 GenBank 上登录了紫花苜蓿(*Medicago sativa*)一个推测的编码 *PME* 的花粉特异 cDNA 序列。后来 Rodríguez-Llorente 等^[7]采用简并引物从苜蓿(*M. sativa* 或 *M. truncatula*)中扩增出了 *PME* 基因家族, 他们从 17 个独立的 PCR 扩增片断中鉴定出了分属于 2 个基因家族的 8 个不同的基因序列, 其中 *MtPEF1* 和 *MtPEF2* 基因与 Qiu 等所报道的紫花苜蓿花粉特异 *PME* 基因的序列同源性分别高达 92% 和 93%。这两个基因的序列中存在一个 93 bp 的内含子, 由于它们在染色体上总是成簇出现, 推测它们是通过复制方式产生的。进一步研究表明它们在花中特异表达, 特别是在花蕾和未开放的花中强表

达。

采用“PCR 步移”策略, Roger 等^[34]分离到了亚麻(*Linum usitatissimum*) *Lupme3* 基因编码序列上游的一个 1.9 kb 的调节区域; 推测的 *Lupme3* 启动子与 GUS 报告基因的协同表达显示, 这个从下胚轴分离的 *PME* 的 cDNA, 不仅主要在根系中表达, 而且在花药和萌发的花粉粒中也表达。采用这个 cDNA 序列的反义转化烟草, 其花粉内容物减少的同时, 不仅花粉细胞壁的雕纹急剧减少, 而且花粉萌发率降低、花粉管表面发生了变化, 说明 *PME* 在花粉细胞壁成熟和花粉管伸长中起着作用^[35]。

采用 cDNA-AFLP 技术结合 RACE 技术, 王永勤等^[36]从‘矮脚黄’普通白菜(*B. campestris ssp. chinensis var. communis*)核雄性不育两用系中分离得到了一个与白菜核雄性不育相关基因 *BcMF3* 的 cDNA 序列, 该序列与 *Bp19* 基因^[28]具有高达 99% 的相似性, 与大白菜 *PME* 基因部分序列 mRNA(L48178)和拟南芥 *PME* 类基因(AY093237、NM116082、AY084580)的相似性也分别达到 98%、88%、87% 和 87%; RT-PCR 表明, *BcMF3* 基因只在普通白菜核不育两用系的可育株系的花蕾中特异表达, 在可育株系其他组织和不育株系的所有组织中都不表达, 表明 *BcMF3* 是一个在其花药或花粉中特异表达的基因。随后, 刘乐承等^[37]采用反义 RNA 技术在拟南芥中抑制 *BcMF3* 的表达, 发现转基因植株中约 50% 的花粉败育, 证明 *BcMF3* 确实在拟南芥花粉发育过程中起着重要作用。

采用矮牵牛花粉 cDNA 克隆 *PME1* 作为探针, Bosch 等^[38]从烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉 cDNA 文库中, 筛选到了几个编码同一个 *PME* 的独立 cDNA 克隆, 其中的 *NtPPME1* 编码一个 60.3 kDa 的蛋白质, 其推测的氨基酸序列中存在一个信号肽, 其结构域中还有一个推测的 *PME* 抑制物结构域; RT-PCR 表明, 在烟草主要组织中, 这个 *PME* 仅仅在花粉和花粉管中表达。随后 Bosch 等^[39]采用沉默 *NtPPME1*, 导致了植物体内的花粉管伸长的不强烈但显著的降低, 而整个花粉的 *PME* 活性没有受到显著影响。虽然造成所观察到的表型的准确机制不清楚, 但推测可能是为了维持顶端细胞壁的强度和可塑性间的平衡, 细胞必须维持一个接近的 *PME* 活性调节水平。

在模式植物拟南芥中, Tian 等^[40]分离到一个新的花粉特异的 *PME* 基因 *AtPPME1*, 并采用反向遗传学的方法证明, 该基因参与决定花粉管的形状及其伸长

速度。事实上,人们早就在拟南芥中发现 *QRT1*、*QRT2* 和 *QRT3* 基因是其花粉正常发育所需要的^[41,42]。Francis等^[43]采用正向和反向遗传学相结合,分离到了引起 *qrt1* 表型的基因,数据库注解预测 *QRT1* 编码一种 PME,而且在大肠杆菌中表达的 *QRT1* 具有 PME 活性,而且在减数分裂完成后 *QRT1* 立刻在花药中表达,但是 *QRT1* 启动子在发育的保卫细胞、下胚轴和根的过渡区、侧根突出体区域和花蜜腺等许多发育组织中均具有活性。*QRT1* 在不同的组织中具有如此复杂的表达类型,而奇怪的是与 *qrt1* 突变体相关的表型却只有四分体花粉。

虽然目前已经比较清楚 PME 在成熟花粉和花粉管伸长中的功能,但是对其在花粉发育过程中的功能却有待于阐明^[35]。由于包括花粉母细胞在内的大多数植物初生细胞壁主要包含纤维素、半纤维素和果胶^[14],而在花粉成熟过程中,未酯化的果胶位于幼小花粉粒的原外壁和成熟花粉粒的内壁^[44]。据此,Rhee等^[42]结合自己的研究推测,花粉母细胞果胶在细胞与细胞的黏附机制中起着重要的作用,因而小孢子释放过程中的 PME 对于小孢子的分开可能起着重要作用。

4 小结

花粉发育是植物繁殖过程中的一个重要阶段,因而一直是植物科学研究领域中的一个热点。而 PME 在植物的生长发育过程中可能具有多种生理功能,使其在花粉发育方面的研究特别引人注目。尽管花粉特异 PME 的研究已经取得了长足的进展,但是,其结构、生理功能及其作用机制都还不很清楚。目前,在一个异源的系统中过量表达植物 PME 仍然是一个挑战,而这种过量表达不仅能够获得用于晶检仪直接观察所需足够数量的 PME,而且能获得单一特异性的抗 PME 抗体,而它能对 PME 单个异构体或 PME 的不同部分起作用,使 PME 的分泌途径直观可见,还可通过它对细胞壁中的果胶与 PME 进行协同定位^[2]。随着分子生物学技术的发展,相信这一瓶颈不久将被打破,这不仅有利于揭示花粉发育等植物生长发育的分子机制,而且可为人为调节和利用植物的雄性不育性

提供理论依据和应用指导。

参考文献(References)

- [1] Mu JH et al. *Plant Mol Biol*, 1994, **25**: 539
- [2] Micheli F. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 414
- [3] Valette-Collet O et al. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, **16**: 360
- [4] Wietholter N et al. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, **16**: 945
- [5] Micheli F et al. *Gene*, 1998, **220**: 13
- [6] Li YQ et al. *Planta*, 2002, **214**: 734
- [7] Rodríguez-Llorente ID et al. *Plant J*, 2004, **39**: 587
- [8] The Arabidopsis Genome Initiative. *Nature*, 2000, **408**: 796
- [9] Christgau S et al. *Biochem J*, 1996, **319**: 705
- [10] Gaffe J et al. *Plant Physiol*, 1997, **114**: 1547
- [11] Goodenough P et al. In: Savidge R et al. (eds.) *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*, Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000, 305
- [12] Jenkins J et al. *J Mol Biol*, 2001, **305**: 951
- [13] Johansson K et al. *FEBS Lett*, 2002, **514**: 551
- [14] Carpita NC et al. *Plant J*, 1993, **3**: 1
- [15] Sterling JD et al. *Plant Physiol*, 2001, **127**: 360
- [16] Liners F et al. *Protoplasma*, 1992, **170**: 10
- [17] Markovic O et al. *Experientia*, 1984, **40**: 842
- [18] Catoire L et al. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 33150
- [19] Li YQ et al. *Sex Plant Reprod*, 1994, **7**: 145
- [20] Wen F et al. *Plant Cell*, 1999, **11**: 1129
- [21] Ren C et al. *Plant Physiol*, 2000, **124**: 231
- [22] Charnay D et al. *Eur J Biochem*, 1992, **205**: 711
- [23] Nari J et al. *Biochem*, 1991, **279**: 343
- [24] Denès JM et al. *Carbohydr Res*, 2000, **327**: 385
- [25] Schmohl N et al. *Physiol Plant*, 2000, **109**: 419
- [26] Honys D et al. *Plant Physiol*, 2003, **132**: 640
- [27] Twell D. In: Roberts JA (eds.) *Plant Reproduction*, Vol.6, Sheffield: Sheffield Academic Press, 2002, 86
- [28] Albani D et al. *Plant Mol Biol*, 1991, **16**: 501
- [29] Ray J et al. *Eur J Biochem*, 1988, **174**: 119
- [30] Plastow GS et al. *Mol Microbiol*, 1988, **2**: 247
- [31] Wakeley PR et al. *Plant Mol Biol*, 1998, **37**: 187
- [32] Jiang LX et al. *Plant Cell*, 2005, **17**: 584
- [33] Qiu X et al. *Plant Physiol*, 1995, **109**: 1127
- [34] Roger D et al. *Plant Sci*, 2001, **160**: 713
- [35] Lacoux J et al. *Protoplasma*, 2003, **222**: 205
- [36] 王永勤等. *遗传学报*, 2004, **31**: 1302
- [37] Liu LC et al. *Agri Sci China*, 2006, **5**: 339
- [38] Bosch M et al. *Plant Physiol*, 2005, **138**: 1334
- [39] Bosch M et al. *Planta*, 2006, **223**: 736
- [40] Preuss D et al. *Science*, 1994, **264**: 1458
- [41] Tian GW et al. *Dev Biol*, 2006, **294**: 83
- [42] Rhee SY et al. *Plant Physiol*, 2003, **133**: 1170
- [43] Francis KE et al. *Plant Physiol*, 2006, **142**: 1004
- [44] Aouali N et al. *Planta*, 2001, **213**: 71

Pectin Methylesterase and Isolation of Its Pollen-specific Genes

Le-Cheng Liu^{1,2}, Jia-Shu Cao^{2*}

(¹*Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;*

²*Department of Horticulture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)*

Abstract Pectin methylesterase (PME) or pectinesterase (PE) has been suggested to be involved in many important developmental processes in plants. Presently, research of PME is a hotpot in plant biology. This paper reviewed the structure model and the action mode of plant PME, and the isolation of pollen-specific *PME*.

Key words pectin methylesterase; pollen; gene; isolation

Received: January 10, 2007 Accepted: January 10, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370975) and the Key for Sci-technology Project of Zhejiang Province (No.2005C12019-02)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn