

植物细胞的抗脱水反应及其重要蛋白产物

王君晖 刘峰 张毅翔 黄纯农

(浙江大学西溪校区生命科学学院 杭州 310012)

研究植物细胞的抗脱水反应具有十分重要的意义。首先,脱水是许多植物特别是重要农作物生长过程中面临的主要胁迫之一,开展细胞的抗脱水研究事关用基因工程手段培育抗旱植物新种质的基础理论。其次,低温是许多植物生长过程中面临的另一个重要胁迫,研究表明,植物细胞的脱水反应和低温反应有共同的过程,尽管这种交叉保护的机制目前还不清楚,但耐低温的研究往往和耐脱水的研究相联系。第三,植物种质的低温和超低温保存技术对植物生物工程研究和保护生物多样性研究均具十分重要的意义,而种质保存的核心问题是脱水和降温,因此开展植物抗脱水研究对植物种质保存也具指导意义。

最近十几年,特别是最近几年,植物抗脱水的分子生物学研究非常活跃,克隆了许多植物脱水相关蛋白的基因,研究了它们的生物学功能和表达调控。这些蛋白质不仅在种子成熟的自然过程中表达,也在环境给予的脱水、脱落酸添加、低温、高渗、盐胁迫和创伤等过程中表达。本文介绍的研究结果,有些是以种子成熟过程为研究对象得出,有些是以离体培养组织为研究材料得出的。国内,傅家瑞教授等实验室在种子脱水成熟和脱水蛋白表达方面做了不少工作^[1,2]。本文就植物细胞的抗脱水反应及其重要蛋白产物脱水蛋白(Dehydrins, DHN)作一综述。

一、植物细胞的抗脱水反应

1. 概述

植物细胞在感受脱水、高渗和低温等信号后,基因表达的产物可以分成两大类;一类是功能蛋白,主要包括离子通道蛋白,渗透物质合成酶,分子伴侣蛋白(如脱水蛋白)、晚胚胎发生富集蛋白(Late embryogenesis abundant proteins, LEA),蛋白酶和脱毒酶;另一类是调节蛋白,主要包括转录因子,蛋白激酶,磷脂酶C和一些信号分子。前一类物质主要用于抗脱水;后一类物质主要用于反应脱水,即用于脱水的感受、传导和抗脱水物质合成的调控^[3]。

植物细胞对脱水信息的处理是很复杂的一个过程,它涉及到脱水的感受、脱水信号传导和基因产物的诱导合成等几个分过程。每个分过程的具体内容,即植物脱水感受器的结构和功能,脱水信号的信使及其传递机制,脱水反应基因的表达调控,都是目前国内研究植物细胞脱水反应的热点内容。

2. 植物细胞抗脱水的基因表达控制

脱水、盐胁迫和低温等信号以及植物激素脱落酸(Absciscic acid, ABA)在植物脱水反应基因的表达调控中起着重要作用。利用ABA生物合成的缺失突变体和外源ABA添加试验,发现植物脱水反应基因可以分为三大类^[4]:(1)依赖ABA基因(ABA-requiring genes),只有添加外源ABA后突变体才表达的基因,如Em(Early-methionine-labelled)和rab28(Responding absciscic acid)等基因;(2)反应ABA基因(ABA-response genes),突变体面向外源ABA添加和脱水处理都能表达的基因,如rd29(Responding dehydration)等基因;(3)非

ABA 反应基因(non-ABA-response genes), 突变体只有面向脱水处理才表达的基因, 如拟南芥菜的一个脱水相关的跨膜通道蛋白基因。

一个反应 ABA 的顺式作用元件(Abscisic acid responding element, ABRE)已经找到, 其序列为 5' C/TACGTGGC3'。已经在 Em 和 rab 等许多脱水蛋白基因中发现了该序列, 但是, 有些脱水蛋白基因不含该序列也能反应 ABA, 这可能是因为 ABRE 有多种形式。与 ABRE 相作用的反式作用因子也已经识别, 如小麦的 EMBP-1 (Em binding protein) 和 水稻的 TAF-1 (Transcription activation factor), 均具亮氨酸锌指结构。

ABA 与许多生理过程有关, 茉莉酸和紫外线等处理也会引起 ABA 的变化, 细胞通过耦合元件(Coupling element, CE)将脱水相关的 ABA 变化和其他生理过程引起的 ABA 变化区分开来。大麦(*Hordeum vulgare*)HVA22 基因中 CE-1 的核酸序列为 TGCCACCGG^[5]。

特异的脱水反应元件(Drought response element, DRE)也被找到, 其核酸序列为 TACCGACAT^[6], 还确定了相应的反式作用因子。DRE 的核心区域是 CCGAC, 故又称胞嘧啶重复序列(C-repeating sequence)。最近, Stockinger 等^[7]克隆了能与 C 重复序列识别结合的转录因子(C-repeating binding factor, CBF)的基因 CBF1, CBF1 蛋白的分子量是 24KD, 具一个潜在的核定位区域, 一个可能的酸性激活区域, 一个典型的 AP2/EREBP 区域(AP2 是拟南芥花发育有关的反式作用因子, EREBP 是乙烯反应元件结合蛋白, 两者有同源性)。在酵母中表达 CBF1, 能激活带有 DRE 的报告基因的转录^[7]。

同一种 ABA 浓度, 或同样的脱水处理, 对不同器官的脱水反应基因的表达调控并不一样, 对不同发育时期的同一器官的脱水反应基因的表达调控也不一样, 说明脱水反应基因的表达还受到发育信息的调控。目前, 已经开始了发育反应元件的研究。

3. 植物细胞抗脱水的信号传导

最近, Shinozaki 和 Yamaguchi-Shinozaki 对植物细胞反应水胁迫的基因表达和信号传导过程作了综述^[3], 他们把植物脱水的信息处理通路分成两大类: 一类是脱落酸依赖型, 另一类是非脱落酸依赖型。第一大类可以细分为两种, 一是直接受 ABRE 及其反式作用因子调控, 反应快, 不需其他中间蛋白合成, 二是需要有中间蛋白合成, 即先有脱落酸的累积, 再引起转录因子的合成, 转录因子作用于靶序列后促成基因表达。第二大类也可以细分为两种, 一种能被脱水、盐迫和低温诱导, 另一种能被脱水和盐迫诱导, 不能被低温诱导。这种分类方法的优点是, 对反应脱水的信号传导过程可以认识得比较清楚, 缺点是对于那些既能反应脱落酸又能反应脱水的基因, 很难被清晰地体现出来。

4. 提高植物细胞抗冻力和抗脱水力的新途径

通过转基因手段提高植物抗冻和抗脱水力的一般方法是向细胞导入某些功能蛋白的基因, 如渗透压调节物质合成酶基因、抗冻蛋白基因和脱水蛋白基因等。导入这些基因, 对提高植物的抗冻力和抗脱水力起到一定作用。但是, 一般情况下, 植物抗冻性和抗脱水性是受多基因控制的, 这些基因的产物需要相互作用, 因此, 在许多情况下, 把单个基因导入细胞并不能取得十分理想的效果。但是, 要把多个功能蛋白基因同时进行稳定转化, 这在遗传工程上又是不可能的。

在研究植物反应脱水和低温的信息处理过程中, 发现调节蛋白(如各种反式作用因子等)在反应脱水和反应低温的基因表达调控中起着重要作用。如果导入调节蛋白的基因, 将开启一大片抗脱水和抗低温蛋白的表达, 无疑将大大提高转基因的效果, 有效提高细胞的抗冻性和抗脱水性。最近, 美国学者 Thomashow 领导的实验室将 CBF₁ 基因导入拟南芥菜, 诱导了一系列 COR 蛋白(低温调节蛋白)的表达, 使未驯化的植株就有很高的抗冻力^[8,9]。CBF₁ 蛋白

结合到 DRE(脱水反应元件)后,能开启一大片反应脱水和反应低温的基因表达。以前,只将单一 COR15a 基因导入拟南芥菜,尽管在离体叶绿体或叶肉原生质体中观察到抗冻性提高,但拟南芥植株未见抗冻力提高^[10]。

二、植物细胞的脱水蛋白

1. 脱水蛋白的广泛存在

脱水蛋白是植物抗脱水的基因产物中研究得较为深入的一类蛋白。在研究早期,由于每个研究者的实验材料、研究体系和研究兴趣的不同,使植物反应水缺失和低温蛋白的命名比较混乱。随着研究的深入,人们发现 LEA-I、DHN、许多 RAB 以及一些 EM、RD、ERD(Early responding dehydration proteins)、MAT (Maturation proteins)、CAS (Cold-acclimation-specific proteins)、COR (Cold-regulation proteins) 和 WCS (Wheat cold-specific proteins) 等共享高度保守的序列,因此,把这类蛋白质统称为脱水蛋白(DHN)。

根据最新资料^[11],已在 67 种被子植物,3 种裸子植物中发现了脱水蛋白;也在蓝细菌和酵母中发现了脱水蛋白。傅家瑞教授报道的花生热稳定蛋白,很可能是一些脱水蛋白^[2]。

2. 脱水蛋白的生化组成

脱水蛋白由几个各具特色的典型区域组成,这些区域可以有多种排列组合。主要区域有:(1) K 区(赖氨酸区),是一个富含赖氨酸的保守序列,呈两性 α -螺旋结构。在高等和低等生物中,这个区域的氨基酸组成一般为 EKKGIMDKIKEKLP^[12]。人工合成的这段多肽的抗体可用于检测植物脱水蛋白。Close 对近 70 个植物脱水蛋白的这段区域作了分析比较^[11]。(2) S 区(丝氨酸区),这是一段可磷酸化的丝氨酸链,据估计,它可能与信号传导有关。由于不是每种脱水蛋白都有这个区域,据此,可将脱水蛋白分成两类,一类具 S 区,如大麦 DHN1-4,萝卜 LEA2 和水稻 RAB21 等;另一

类不具 S 区,如大麦 DHN5,小麦 WCS120 和菠菜 CAP85 (Cold acclimation proteins) 等。(3) Y 区(酪氨酸区),是氮末端的一个保守区域,常见的氨基酸组成为 T/VDEYGNP。(4) Φ 区(连接区),其序列不那么保守,往往串联重复地分布于上述区域之间。大多数脱水蛋白 Φ 区富含甘氨酸和极性氨基酸(尤其是苏氨酸),亲水性强。

Close 用 YSK 模型缩写脱水蛋白的组成结构^[11]。如大麦 DHN1 也写成 YSK₂ 模式,表示它有两个 K 区,一个 Y 区和一个 S 区;大麦 DHN5 也写成 K₉,表示它有 9 个 K 区,无 Y 区,无 S 区。 Φ 区一般不在脱水蛋白类型的缩写中体现出来。如玉米脱水蛋白的实际组成为 Φ Y Φ SK Φ K,可缩写为 YSK₂。

脱水蛋白富含极性氨基酸,具有高度的亲水性和热稳定性,能在高温下保持分子构象不变^[13]。目前发现的脱水蛋白其氨基酸数目在 82 到 575 之间。脱水蛋白可沉积在细胞质之内膜系统的表面,也可沉积在细胞核中。用免疫印迹分析发现,大麦幼苗中至少有 10 种脱水蛋白,分子量在 15-100KD 之间。脱水蛋白在一些胚中占总可溶蛋白的 1%,有些细胞中可达 10%^[14]。禾谷作物的脱水蛋白还被进行了血清学比较和基因定位研究^[15]。深入比较被子植物和裸子植物、高等生物和蓝藻等脱水蛋白的差异,可以加深对脱水蛋白和脱水反应的认识。

3. 脱水蛋白的可能功能

到目前为止,脱水蛋白的功能都是推测的。脱水蛋白 K 区的 α -螺旋具不对称的三夹板结构,易于和脂类及蛋白质结合;高极性的 Φ 区以氢键和大分子的极性区域结合,构造了新的亲水表面,阻止了大分子的凝固。目前,流行着几种作用机制的解释。

(1) 离子封包作用,脱水蛋白的两性 α -螺旋能选择性地吸附溶质,如磷酸根离子^[16,17]。(2) 水替代作用,脱水蛋白能在脱水条件下通过静电作用包被细胞膜表面,形成替代性的水帘,保护细胞膜的稳定性^[18]。(3) 水结合作用,

脱水蛋白的这种结构,易于形成两性的随机卷曲,在这个过程中能结合水分子,也能结合细胞膜和其他生物大分子^[17]。(4)分子伴侣作用,脱水蛋白的亲水区域结合了水分子以后,形成一个水套。水套通过优先排斥机制,阻止其他蛋白质的变性^[12]。(5)丝氨酸链的信号传导作用,许多脱水蛋白有丝氨酸链,通过丝氨酸链的磷酸化和去磷酸化,能将脱水信号传向细胞核^[19]。

Close认为,(2),(3)和(4)这三种功能的本质是一样的,都可以叫表面活性剂功能或分子伴侣作用^[11]。

4. 研究脱水蛋白的几个新热点

研究脱水蛋白有几个新的热点方向。Ker-mode比较了顽拗型和正常型植物的脱水蛋白表达^[20],他们发现,顽拗型种子(特别是热带潮湿地区)不经历成熟性脱水,其顽拗的原因至少有一部分是因为不能积累足够多的脱水蛋白或某些特殊的脱水蛋白,特别是在种子从水缺失转向萌发和生长的过程中。向脱水敏感细胞导入脱水蛋白基因,既是直接阐明脱水蛋白功能的好途径,也是对培育抗旱植物新种质的一种尝试,已经有人开展了这方面的研究^[10]。另外,脱水蛋白在超低温保存中的作用也开始被研究^[21,22]。

三、小 结

植物细胞的抗脱水反应研究主要包括脱水感受、脱水信号传导和抗脱水基因产物的诱导合成等三方面内容。

脱落酸、脱水和低温胁迫、发育状态等因素参与了植物细胞的抗脱水反应,与这些过程相关的许多顺式作用元件和反式作用因子已被发现。转化反式作用因子的基因,能开启一大片抗冻抗脱水基因的表达,是用基因工程手段提高植物细胞抗冻和抗脱水力的新途径。

脱水蛋白是植物细胞抗脱水的基因产物中研究得较多的一种,本文综述了脱水蛋白的生化特征和可能功能。今后的研究热点可能是进

一步了解它们在细胞抗脱水中发挥作用的分子过程。

参 考 文 献

- [1] 汤学军,傅家瑞,1997,植物学通报,14:13-18.
- [2] 杨晓泉,姜效成,傅家瑞,1998,植物学报,40:337-342.
- [3] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, 1997, *Plant Physiol.*, 115:327-334.
- [4] Bray EA, 1993, *Plant Physiol.*, 103:1035-1040.
- [5] Shen Q, Ho T-HD, 1995, *The Plant Cell*, 7: 295-307.
- [6] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 1994, *The Plant Cell*, 6:251-264.
- [7] Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:1035-1040.
- [8] Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, et al., 1998, *Science*, 280:104.
- [9] Pennisi E, 1998, *Science*, 280:36.
- [10] Artus NN, Uemura M, Steponkus PL et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 13404-13409.
- [11] Close TJ, 1997, *Physiologia Plantarum*, 100:291-296.
- [12] Close TJ, 1996, *Physiologia Plantarum*, 97: 795-803.
- [13] Russouw PS, Farrant J, Brandt W et al., 1997, *Seed Science Research*, 7(2): 117-124.
- [14] Close TJ, 1993, *Cryobiology*, 30:234-235.
- [15] Close TJ, Chandler PM, 1990, *Aust. J. Plant Physiol.*, 17:333-344.
- [16] Close TJ, Fenton RD, Moonan F. 1993. *Plant Mol. Biol.*, 23:279-286.
- [17] Dure N L, 1993, *The Plant Journal*, 3:363-369.
- [18] Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL et al., 1993, *The Plant Cell*, 5:769-780.
- [19] Goday A, Jensen AB, Cullianez-Macia FA, et al., 1994, *The Plant Cell*, 6:351-360.
- [20] Kermode AR, 1997, *Seed Science Research*, 7(2):75-96.
- [21] Reinhoud PJ, Versteeg I, van Iren F et al., 1997, *Cryo-Letters*, 18:69.
- [22] Luo J, Reed BM, 1997, *Cryobiology*, 34:240-250.