

绒毡层小体，一种在花药绒毡层细胞中新发现的含油细胞器

罗鑫娟 刘旭昊 王新宇*

(兰州大学生命科学学院细胞生物学研究所, 兰州 730000)

摘要 绒毡层小体(tapetosome)是最近新发现的特异性出现在花药绒毡层细胞中的一种含油细胞器。现对这种细胞器的形态、结构、生化组成、与其他含油细胞器的不同以及它们在花粉外被形成过程中的作用和作用机制进行综述。

关键词 绒毡层小体; 造油体; 油质蛋白; 三酰甘油; 花粉外被

高等植物雄配子体(花粉)的发育依赖于绒毡层所提供的营养和其他物质。在花粉的发育晚期, 绒毡层细胞解体, 一些绒毡层特异基因产物从绒毡层细胞释放到花药室, 然后转运到花粉表面, 构成花粉外被(pollen coat)的一部分。绒毡层细胞功能异常, 将导致花粉败育或雄性不育。关于绒毡层对花粉发育重要性的认识是基于在目前发现的诸多雄性不育突变体中, 绝大多数是由于在绒毡层特异表达的基因发生突变的结果。关于绒毡层与花粉发育的关系, 目前在超微结构方面虽然有一定的研究^[1], 但对其中的生物化学过程仍知之甚少。最近有人^[2]从油菜花药绒毡层细胞中分离到一种以前在真核细胞中从未报道过的细胞器, 这种细胞器富含三酰甘油(triacylglycerol, TAG)和一些类似植物种子油质蛋白(oleosin)的蛋白质。他们称这种细胞器为绒毡层小体(tapetosome)。以下简要介绍这种新发现的细胞器的结构、生化组成以及他们在高等植物雄配子体(花粉)发育过程中的作用和作用机制。

1 绒毡层小体的形态、结构与生化组成

绒毡层小体呈球形, 直径大约 2~3 μm 。绒毡层小体内有许多小油滴, 平衡密度为 1.05 g/cm^3 , 是一种相对比较大, 富含脂质的细胞器, 在多种植物绒毡层细胞的细胞质中均可观察到这种细胞器^[3]。超微结构研究显示, 绒毡层小体没有电子致密的膜包被, 内部基质除含脂质滴外, 还有稠密的纤维结构和一些来自内质网(ER)的小泡。在绒毡层小体形成的活跃时期, 有时还发现大量的内质网附着并伸入到绒毡层小体上^[4]。因此, 有人推测绒毡层小体

这种细胞器的生物发生可能与内质网密切相关。此外, 绒毡层小体还具有一定的渗透性, 这种渗透性可能与内部存在的诸多小泡有关, 而每个小泡收缩或膨胀又取决于周围介质的渗透浓度。

目前, 通过蔗糖密度梯度离心, 绒毡层细胞内的绒毡层小体已被分离和纯化, 它们的生化组成也已基本确定, 其中含有一定特色的脂质和蛋白质成分。绒毡层小体约含 47% 的中性脂和 24% 的极性脂, 此外还含有一些蜡质和游离脂肪酸。中性脂的主要成分为 TAG。采用改进的提取方法, 结合薄层色谱分析证明, 绒毡层小体中的磷脂(极性脂)主要为磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)。绒毡层小体所含的蛋白质主要为类似植物种子油体(oil body)中油质蛋白的多肽。种子油质蛋白是一些分子量为 15~26 kDa 的小蛋白质^[5], 它们覆盖在油体的整个表面。一个油质蛋白分子根据氨基酸序列一般分为中央疏水区、C 端区域、N 端区域三个部分。

中央疏水区由 72 个疏水性氨基酸组成, 这 72 个连续的疏水氨基酸残基是油质蛋白的标志特征。这些疏水氨基酸残基序列很长, 足以形成一个发夹结构穿过油体表面的磷脂(PL)单分子层进入 TAG 基质内部。中央疏水区域的正中位置上有一个由 3 个脯氨酸和 1 个丝氨酸残基相互作用形成的“脯氨酸结”。“脯氨酸结”的形成使整个中央疏水区形成

收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-08-15

国家自然科学基金资助项目(No.30370709)

* 通讯作者。Tel: 0931-8912515, E-mail: wangxy@lzu.edu.cn

一个发夹结构。发夹结构有两个分别由 30 个氨基酸构成的 α 螺旋臂, 这两个臂被一个 12 个氨基酸组成的转角连接起来。不同种类的油质蛋白之间, 由这 72 个氨基酸构成的中央疏水区是高度保守的。所有油质蛋白中央疏水区的同一位点, 都包含 3 个脯氨酸和 1 个丝氨酸残基。

C 端区域长约 50~100 个氨基酸, 靠近中央疏水区的 30 个氨基酸可以形成一个两亲性的 α 螺旋结构, 这种 α 螺旋与带电荷的磷酸盐及油体表面磷脂层的胆碱基团在水平方向发生相互作用。在每个油质蛋白的 C 端部分, 都含有许多由一种或两种特异氨基酸(甘氨酸、脯氨酸-丙氨酸, 或赖氨酸-甘氨酸)组成的短肽重复序列。这些重复的短肽序列在不同油质蛋白中是不同的, 这些重复元件决定了油质蛋白的特异性。

N 端区域由 6~68 个亲水性氨基酸组成。油质蛋白的 N 端和 C 端区域位于油体的表面, 由于它们的双亲和性, 使得带正电荷的氨基酸残基朝向 TAG 基质, 而带负电荷的氨基酸残基朝向细胞基质。在种子萌发过程中, 油体表面油质蛋白的 N 端和 C 端区域可能作为受体与脂酶或者乙醛酸循环体结合。

油体以及其组分 TAG、磷脂、油质蛋白都是在内质网上合成的。TAG 和油质蛋白同时也在粗面内质网上合成, 合成的 TAG 首先储藏在内质网的疏水区(磷脂双层的酰基区), 随着 TAG 的合成与积累, TAG 体积增大并呈芽状, 然后形成一个被单层磷脂包被的芽状油体。合成的油质蛋白扩散到芽状油体的表面, 最后油体以出芽的形式与 ER 分离。

与种子油体的形成相似, 绒毡层小体中 TAG、油质蛋白以及绒毡层小体本身也是在粗面内质网上合成并以出芽方式形成的: TAG 脂滴形成后, 表面被磷脂和类油质蛋白(oleosin-like protein)组成的膜包被; 最后, 若干个这样的油滴和内质网小泡联合在一起, 形成了一个成熟的绒毡层小体。绒毡层小体中内质网小泡的作用可能是帮助油质蛋白从裂解的绒毡层细胞转移到花粉表面。

Oliveira 等^[6]和 Roberts 等^[11]意外地发现, 拟南芥和油菜花粉绒毡层细胞中存在着油质蛋白, 但并不知道绒毡层中是否存在着类似种子油体的细胞器。目前在绒毡层细胞中发现的油质蛋白仅限存在于虫媒传粉/自花传粉的十字花科植物, 尤其是油菜和拟南芥中。在拟南芥中有 9 个编码油质蛋白的基因, 其中有 8 个以串连的方式排列在五号染色体

上^[7~9]。这 8 个基因中的一个高效表达产生一个 53 kDa 的油质蛋白, 占有所有绒毡层类油质蛋白的 70%。油菜中也含有一些类似的油质蛋白基因^[10~12], 其中最活跃的一个基因编码产生一个分子量为 45 或 48 kDa 的高丰度油质蛋白, 此外还有一些编码 35 kDa 和 27~14 kDa 的低丰度多肽。48、45 和 35 kDa 多肽与植物种子的油质蛋白同源, 统称为类油质蛋白。定量免疫细胞化学研究表明, 花药中的类油质蛋白均特异性的与绒毡层小体内规则排列并呈六边形棋盘状的纤维网络结合在一起^[13]。

花药中的类油质蛋白是一个变异性非常大的群体, 唯一共同的地方就是它们的氨基酸序列中存在一个类似种子油质蛋白的中央疏水区。花药类油质蛋白和种子油质蛋白除具有相同的中央结构域外, 花药类油质蛋白和种子油质蛋白在翻译时都插入到内质网膜上, 这样, 油质蛋白的中央疏水区域便在双分子层膜内被保护起来, N 端和 C 端区中带负电荷的氨基酸残基面向细胞质基质, 因而它们对蛋白酶的作用比较敏感^[13~15]。通过定点诱变分析还发现, 位于花药类油质蛋白的中央疏水区, 特别是富含脯氨酸的区域, 对于种子油质蛋白通过内质网最终到达在油体的积累位点起关键作用^[15]。

2 绒毡层小体与造油体在形态与生化组成上的差异

造油体(elaioplast)也是在植物花粉形成后期, 在绒毡层细胞内出现的一种含油细胞器。但造油体的形态结构与生化组成与绒毡层小体明显不同(表 1)。造油体也呈球形, 直径 3~4 μm , 大小与绒毡层小体接近, 但平衡密度(1.02 g/cm³)比绒毡层小体的要小。此外, 造油体有双层膜包被, 基质内含大量直径为 0.2~0.6 μm 的脂质球。造油体通常存在于一些不能进行光合作用的器官和组织中, 是一种不能进行光合作用的质体。

表 1 绒毡层小体、造油体及油体的形态结构与生化组成

	绒毡层小体	造油体	油体	成熟花粉外被
形状	球形	球形	球形	
直径(μm)	2~3	3~4	0.65	
外膜系统	无	有	有	
渗透性	有	无	无	
中性脂主要成分	TAG	固醇酯, TAG	TAG	固醇酯
极性脂成分	PA, PC, PE	MGD, PC, PE		未鉴定的 PL
特异蛋白质	类油质蛋白	PAP	油质蛋白	油质蛋白 C 端与 N 端部分

造油体所含的脂类化合物主要包括中性脂、游离脂肪酸和极性脂。中性脂主要为固醇酯和 TAG, 固醇酯的种类主要为豆固醇、菜油甾醇、谷固醇和胆固醇^[16]。固醇和固醇酯存在于所有的植物组织中, 一般情况下, 固醇存在于各种生物膜上, 而固醇酯则存在于细胞质脂质体中。无论是植物、动物还是真菌中, 若产生过量的固醇, 这些固醇就会以固醇酯滴的形式储存在细胞质中。造油体中的极性脂主要为单半乳糖二酰甘油(monogalactosyl diacylglycerol, MGD)。在叶绿体类囊体膜中, MGD 是含量最丰富的脂质, 但在质体外几乎不存在 MGD。薄层色谱分析还证明, 造油体中的磷脂主要为磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺, 还有一些溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺和半乳糖甘油。造油体的主要作用可能是提供花粉壁形成所需的固醇酯, 但关于固醇酯在花粉外被中的具体作用目前尚不清楚, 推测可能是在花粉表面形成一个防水层。

造油体不含类油质蛋白, 但含若干种 31~36 kDa 的质体脂结合蛋白(PAP), 这些脂结合蛋白与存在于有色体和叶绿体中的质体脂结合蛋白同源^[17]。Hernandez-Pinzon 等^[16]的研究结果发现, 油菜造油体中的 34 kDa 的 PAP 在 3 mm 大的花蕾花药中含量最丰富。随后, PAP 的含量水平迅速下降。而绒毡层细胞在花蕾 4~5 mm 时, 裂解达到最大值。说明 PAP 含量的峰值出现在绒毡层细胞裂解之前的一个较短的时间内, 这可能意味着在绒毡层细胞分解之前, PAP 就已经开始裂解了。

3 绒毡层小体的功能与作用机制

绒毡层细胞是代谢非常活跃的并且控制小孢子成熟的唯一花药孢子体细胞。在花药发育的早期阶段, 绒毡层细胞含丰富的粗面内质网和分泌小泡; 到了花药发育的中期, 绒毡层细胞暂时成为未来成熟花粉外被成分的储存室; 到花药发育的晚期, 绒毡层降解并分泌一些特异基因产物到花粉表面构成花粉外被的一部分——花粉鞘(pollenkitt)或含油层(tryphine)。然而以前并不清楚绒毡层细胞分泌的这些特异基因产物是什么, 它们通过怎样的后加工过程被转运到花粉表面与花粉结合并发挥作用的。最近发现这些特异的、与花粉外被结合的产物是来自于绒毡层小体的类油质蛋白和造油体的固醇酯。现已发现, 当绒毡层退化降解时, 绒毡层小体和造油体释放到花药室中, 并附着到花粉外被的裂隙中。

这一过程并非随机进行的, 有人推测可能与预先沉积在花粉裂隙内的、并且源自绒毡层的蛋白质原纤维有关。此外还发现: (1)花粉表面存在的高丰度类油质蛋白, 其中大部分都是大分子量(53、45、48 kDa)的类油质蛋白; (2)当绒毡层小体与花粉壁接触时, 绒毡层小体所携带的 45 和 48 kDa 类油质蛋白被特异性的内切性蛋白酶水解成两个部分, 即亲水的 C 端区、N 端区和中央疏水区^[10]。高度可变的 C 端区被内切酶从全长蛋白质中切割下来后, 与花粉外被成分紧密结合, 在花粉壁内发挥结构上的作用。现已发现, 十字花科植物的花粉外被中含大量的类油质蛋白 C 端序列, 这些序列在花粉脱水时有稳定不同花粉外被成分的作用, 以及在亲和反应完成后, 有促使花粉吸水 and 萌发的作用。据报道, 在许多成熟的类油质蛋白中, 甘氨酸残基随机卷曲而成的二级结构以及甘氨酸残基高频率的出现, 可以促进水分结合, 并引导水分从柱头乳突转运到萌发花粉粒的内部^[18]。

绒毡层小体类油质蛋白的另一酶切产物——N 端区域, 仅在成熟花粉外被中偶尔存在。由此推断, 绒毡层小体类油质蛋白的 N 端区可能与油质蛋白最初在绒毡层小体表面的定向有关, 很可能扮演着维持这些复杂的细胞器结构完整的角色。

在绒毡层小体和造油体所包含的主要脂类化合物中, 目前发现只有那些来自造油体的、含量丰富的固醇酯才可以在成熟花粉表面保持完整形态, 并在花粉表面形成一个防水层。油菜的绒毡层小体虽富含 TAG, 但在成熟花粉壁上迄今没有发现 TAG 或由 TAG 代谢而生成的脂肪酸。所以认为绒毡层小体 TAG 有可能在绒毡层裂解之前在绒毡层内部发挥作用——为含有大量线粒体的绒毡层细胞的最后发育提供能量。当绒毡层细胞退化降解之后, 绒毡层小体中的 TAG 要么可能在花药室中被脂酶或者 β 氧化作用所代谢, 要么可能穿过花粉外被, 被转运到花粉内部进一步被代谢和利用^[16]。后者的可能性似乎更大一点, 因为有研究发现, 编码与 TAG 代谢有关的乙醛酸循环体酶的基因, 在油菜花粉发育的中期阶段(绒毡层细胞裂解阶段)特定表达^[19]。

PAP 是绒毡层中造油体的主要蛋白质, 但在花粉外被上, 目前尚未发现存在任何来自造油体的 PAP, 表明造油体 PAP 与花粉外被的形成无关。

在种子油体中, 行使生理功能的首要成分是 TAG, 油质蛋白起辅助作用, 而在绒毡层小体中,

油质蛋白似乎是行使生理功能的主要成分, TAG 起辅助作用。由于油质蛋白分子双亲和性的特点, 它们在花粉和柱头上发挥双重作用: 一方面作为乳化剂使来自造油体的固醇酯均匀地分布在花粉表面, 另一方面帮助把水分吸收到花粉表面促进花粉管的萌发和伸长。固醇酯和其他一些中性脂都是非双亲和性的, 其他花粉外被成分都没有吸收水分的作用, 所以只有含量丰富并具有双亲和性的油质蛋白才能发挥这样的功能。

随着类油质蛋白的酶解, 绒毡层小体在花粉壁的裂隙上高度压缩。此外, 在花粉成熟的最后阶段, 作为花粉外被包装过程的一部分, 来自造油体的脂肪滴在油质蛋白疏水元件的作用下凝聚并且与其他花粉外被成分(如苯丙氨酸和类胡萝卜素)相黏附^[1]。

4 小结

从以上可以看出, 绒毡层小体在形态、结构和化学组成方面不同于种子细胞中的油体和绒毡层细胞中的造油体, 也不同于目前所知道的其他真核细胞中的细胞器, 所以可能代表一种新发现的细胞器。同时绒毡层小体中的类油质蛋白亦参与了花粉外被的形成。通过简单的原位形态学鉴定, 绒毡层小体出现在包括双子叶和单子叶植物在内的各种植物的绒毡层细胞中^[20], 然而比较详细的研究仅限于油菜绒毡层中的绒毡层小体, 对其他植物绒毡层中绒毡层小体的研究相对较少, 因此, 其他植物绒毡层中绒毡层小体的性质与油菜绒毡层中的绒毡层小体是否相似, 还有待于研究。其次, 花粉外被中含有一些特殊成分, 这些成分对于花粉和柱头的接触以及其后的成功授粉是必需的。对于这些特殊的成分, 目前仅在虫媒或自花传粉的植物, 尤其是油菜和拟南芥有较充分的研究。这些植物的花粉外被很厚且含有固醇酯、多种非极性脂质和类油质蛋白。脂质在花粉表面可形成防水层, 而具有双亲和性特点的油质蛋白可能与花粉萌发过程中的吸水

有关。这些构成花粉外被的主要脂质和蛋白质最初是在绒毡层细胞中合成并进行积累的。当绒毡层细胞裂解后, 这些脂质和蛋白质释放到小孢子表面, 形成花粉外被。而对风媒植物(主要是玉米)的花粉研究发现, 风媒植物花粉的外壁较薄^[21], 外壁中含有一些未知性质的中性脂质和一种 35 kDa 的木聚糖酶。当花粉与柱头接触时, 花粉释放木聚糖酶使柱头表面的木聚糖水解, 由此导致花粉管生长通路的形成以及使花粉管进入胚珠。由此可见, 对不同传粉类型的植物(双子叶和单子叶植物)而言, 绒毡层小体并非与所有植物成熟花粉外被的形成有关, 不同植物种类的绒毡层细胞是否合成并分泌不同的特殊成分, 并最终沉积到花粉表面也需要进一步的研究。此外, 在绒毡层细胞中发现的类油质蛋白仅限存在于虫媒传粉/自花传粉的十字花科植物。其他植物的绒毡层细胞是否存在类似的油质蛋白, 以及它们会发挥什么样的生理作用也有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Dickinson HG *et al. Micron Microsc Acta*, 1985, **16**: 255
- [2] Wu SS *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 12711
- [3] Piffanelli P *et al. Sex Plant Reprod*, 1998, **11**: 65
- [4] Wang TW *et al. Plant J*, 1997, **11**: 475
- [5] Alexander LG *et al. Planta*, 2002, **214**: 546
- [6] de Oliveira DE *et al. Plant J*, 1993, **3**: 495
- [7] Kim HU *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 22677
- [8] Fiebig A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 3286
- [9] Schein M *et al. Mol Biol Evol*, 2004, **21**: 659
- [10] Ross JH *et al. Plant J*, 1996, **9**: 625
- [11] Roberts LS *et al. Plant J*, 1994, **6**: 927
- [12] Ruiter RK *et al. J Plant Physiol*, 1997, **150**: 85
- [13] Huang AHC. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, **43**: 177
- [14] Jeanrenaud B *et al. Adipose Tissue: Regulation and Metabolic Function*, New York: Academic, 1990
- [15] Osafune T *et al. J Electron Microsc*, 1990, **39**: 372
- [16] Hernandez-Pinzon I *et al. Planta*, 1999, **208**: 588
- [17] Pozueta-Romero J *et al. Plant Physiol*, 1997, **115**: 1185
- [18] Dickinson H. *Sex Plant Reprod*, 1995, **8**: 1
- [19] Zhang JZ *et al. Plant Physiol*, 1994, **104**: 857
- [20] Hesse M *et al. The Tapetum: Cytology, Function, Biochemistry and Evolution*, Vienna: Springer, 1993
- [21] Wu SS *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 49055

Tapetosome, An Oil-accumulating Organelle Newly Found in Tapetum Cells of Anthers

Xin-Juan Luo, Xu-Hao Liu, Xin-Yu Wang*

(Institute for Cell Biology, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Tapetosome is a type of lipid-containing organelles recently discovered in tapetum cells of anthers. This review will make a brief introduction of the morphological, structural and biochemical properties of tapetosome, and its differences with other lipid-containing organelles. Finally we will talk about the functions and mechanisms of the tapetosome in the formation of pollen coat.

Key words tapetosome; elaioplast; oleosin; triacylglycerol; pollen coat

Received: May 23, 2005 Accepted: August 15, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370709)

*Corresponding author. Tel: 86-931-8912515, E-mail: wangxy@lzu.edu.cn

中国细胞生物学学会 2006 年活动计划表

序号	活动名称	主要内容	时间	规模(人)	地点	联系人	电话及电子邮件
1	医学细胞生物学专业委员会暨江、浙、闽细胞生物学学会学术大会	组织专家、学者就细胞生物学医学方面进行学术交流	5月19~20日	200~300	杭州	李继承	0571-87217451 lijc@mail.hz.zj.cn
2	名词审定会议	对细胞生物学领域的专有名词进行审定	4月	20	待定	杨瑾	021-54922856 cscb@sibs.ac.cn
3	信号转导培训班	组织信号转导方面的培训班	上半年	50~60	北京	陈晔光	010-62795184 ygchen@tsinghua.edu.cn
4	第二届小鼠基因组改造及疾病模型暑期学习班	通过理论课、讲座、实验的方式提高从事遗传工程小鼠方面工作的技术员或教师理论水平以及实验技能	假期	20	南京	高翔	025-88641598 gaoxiang@nju.edu.cn
5	中南地区肿瘤靶向治疗技术研讨会	中南地区肿瘤靶向治疗技术研讨	6月	250	张家界	张积仁	020-61643200 zhangjiren@hotmail.com
6	放射粒子植入技术研讨会	对放射粒子植入技术规范科学化使用进行研讨	7月	250	待定	张积仁	020-61643200 zhangjiren@hotmail.com
7	第六期全国“研究性教学及细胞生物学精品课程建设”研讨会	邀请国内名师专家,介绍其研究性教学探索与实践、细胞生物学精品课程建设、教学改革、立体化教材建设等经验和成果	7月	50	威海	辛华	0531-8382046 xinhua@sdu.edu.cn
8	国际肿瘤靶向治疗技术大会	邀请国际肿瘤靶向治疗学会(IATTT)30名理事,对肿瘤靶向治疗技术进行国际研讨	9月	600	广州	张积仁	020-61643200 zhangjiren@hotmail.com
9	第五届亚太细胞生物学组织(APOCB)学术大会	本次大会将组织亚太地区从事细胞生物学研究的专家学者参加,会议将分若干个分会场对细胞生物学最新的发展进行学术交流。	10月	600~700	北京	何大澄	010-58808439 dhe@bnu.edu.cn
10	八届四次理事会议	讨论学会2006年底工作计划以及2007年第九届细胞生物学全体会员大会暨学术会议筹备情况,并组团参加2007年第六届海峡两岸细胞生物学学术研讨会	10月	84	北京	杨瑾	021-54922856 cscb@sibs.ac.cn