

# ROP2参与植物生长素快速响应的膜泡运输调控

刘爱云 汤 宾 赵 燕 柳 叶 黄丽华 黄 好 张学文\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

**摘要** ROP2(Rho-related GTPases from plant)为植物中特有的小G蛋白Rho家族的成员,参与植物细胞信号转导过程。为了探讨其在生长素信号响应过程中对细胞膜泡运输的调控作用,构建了拟南芥ROP2过表达(*OX-ROP2*)、组成激活型表达(*CA-rop2*)和显性失活型表达(*DN-rop2*)的载体,分别转化到膜泡标记和生长素结合蛋白ABP1(auxin binding protein 1)调控表达的烟草BY2细胞系,结合生长素处理开展了ROP2对细胞生长素作用下膜泡运输的调控。在生长素IAA作用下,ROP2的过表达和组成激活型表达都能明显促进细胞的膜泡外排运输,而ROP2的显性失活型表达则抑制细胞膜泡外排运输。如果同时诱导细胞中ABP1过表达,能显著增强ROP2对膜泡外排运输的促进作用,而ABP1受干扰抑制表达时,ROP2的过表达及组成型激活表达对膜泡外排的促进作用都受到明显抑制。IAA处理细胞2 min时就可以观察到细胞对IAA信号响应的膜泡运输明显变化,此时细胞核向内膜系统、内膜系统向细胞质膜之间的膜泡外排运输逐渐增强,外排运输的方向趋向于生长素高浓度方向更活跃。该研究说明,植物ROP2参与生长素快速响应的信号转导途径,能促进膜泡朝向生长素浓度较高的一侧外排运输。

**关键词** 生长素快速响应;膜泡运输;ROP2

## The ROP2 Involves in the Auxin Rapidly Responsive Regulation of Vesicular Transport

Liu Aiyun, Tang Bin, Zhao Yan, Liu Ye, Huang Lihua, Huang Yu, Zhang Xuewen\*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Hunan 410128, China)

**Abstract** The ROP2 (Rho-related GTPases from plant), a member of the small G protein Rho family, are only found in plant and involved in cell signal transduction. In order to investigate the auxin signal response to regulating the cell vesicle transport, we cloned the cDNA of ROP2 from *Arabidopsis* and constructed the over expression (*OX-ROP2*) and constitutively active expression (*CA-rop2*) and the dominant negative (*DN-rop2*) vectors, and then transformed into membrane labeled BY-2 cell lines in which the expression auxin binding protein 1 (ABP1) is inducible. With the treatment of IAA that the over expression of ROP2 and the expression of constitutively active *CA-rop2* the cell vesicular exocytosis were obviously enhanced in the cells. The vesicular exocytosis became even more active when ABP1 was induced to over expression previously. However, the expression of dominant-negative *DN-rop2* inhibited the vesicular transport even the ABP1 was induced to over expression previously. The promotion of

收稿日期: 2016-03-01 接受日期: 2016-04-07

湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 15K060)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 0731-84673602, E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

Received: March 1, 2016 Accepted: April 7, 2016

This work was supported by the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Bureau (Grant No.15K060)

\*Corresponding author. Tel: +86-731-84673602, E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

网络出版时间: 2016-05-30 10:59:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160530.1059.004.html>

vesicular transport by *OX-ROP2* and *CA-rop2* was suppressed in ABP1 inhibited BY2 cells. Time-lapse observation suggested that vesicular transport induced by auxin occurred within 2 minutes only. When the cells were treated with a grade IAA, the vesicular transport from nucleus membrane to cytoplasm systems and then to plasma member appeared active and moved to auxin higher concentration side in *CA-rop2* and ABP1 over expressed BY2 cells. These results indicate that ROP2 is involved in the ABP1 mediated vesicular transport response in plant cell.

**Keywords** auxin signaling pathway; vesicular transport; ROP2

ROP(Rho-related GTPases from plant)蛋白质是植物中特有的小G蛋白,与Rho家族的CDC42、RHO和RAC同源<sup>[1]</sup>。1993年,*ROP*基因首次从豌豆中克隆出来<sup>[2]</sup>。植物中的Rho GTPase与真菌和动物中的Rho GTPase相似但又严格区分,形成一个植物中特有的亚家族,故被命名为ROP。由于与动物RAC的氨基酸序列具有高度同源性,也有人将它们称为RAC。模式植物拟南芥中有11种ROP<sup>[3]</sup>,作为细胞信号转导的重要分子开关,参与细胞骨架、分裂周期调控等信号转导过程。

ROP是唯一一类广泛存于高等植物中的信号小分子GTP结合蛋白,可能是植物中唯一的分子开关<sup>[4-6]</sup>。同时,ROP可以调控泛素/26S蛋白小体介导的蛋白质水解<sup>[7]</sup>,调节细胞内的氧化态环境<sup>[8]</sup>,参与细胞生长发育及环境响应等多种信号途径的调控。植物根毛、叶表皮细胞、花粉管的细胞极性生长和根的生长发育、气孔的闭合等多种过程的调控都有这类小G蛋白参与<sup>[9-13]</sup>。

植物生长素IAA(indole-3-acetic acid)是植物中一种重要的多功能内源激素,参与植物生长和发育的诸多过程,对植物的生长发育及形态建成有重要调节作用,该信号途径也为植物细胞所独有。

膜泡运输是一个通过囊泡转运将特定物质转运至相应靶位从而维持内稳态并促进细胞生长的过程,主要包含囊泡出芽、定向移动、拴留及膜融合四个步骤。植物通过特有的膜泡运输机制完成细胞内外及细胞器之间物质交换和信号转导,对植物发育及外部环境的响应起重要调控作用,如生长素极性的形成和信号转导就取决于生长素转运蛋白和受体通过膜泡运输调控其分布而实现。

柳叶等<sup>[14]</sup>证明,生长素通过ABP1(auxin binding protein 1)信号途径促进BY2细胞膜泡的外排,但信号是如何在细胞内转导而使细胞外的生长素信号施

加到内膜系统还未能清楚揭示,应该还有细胞内的其他分子参与了这一信号过程。我们选取植物独有的小G蛋白为对象,利用拟南芥*ROP2* cDNA构建了过表达*OX-ROP2*(over expression of *ROP2*)、组成激活型表达*CA-rop2*(constitutively active *ROP2*)和显性失活型表达*DN-rop2*(dominant negative *ROP2*)三种表达载体。将其分别转化到GFP-SCAMP2膜泡标记并转化了ABP1雌二醇诱导过表达和抑制表达的BY2细胞中,获得六种转基因细胞系。通过雌二醇调控ABP1表达与否并结合生长素处理,激光共聚焦观察不同处理的细胞膜泡运输调控,证明ROP2参与ABP1介导的生长素快速响应的膜泡运输调控。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株和载体及植物材料:大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、农杆菌LBA4404菌株及植物表达载体pWM101均由本实验室保存;克隆载体pMD18-T购自TaKaRa公司;拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、GFP-SCAMP2膜泡标记的雌二醇诱导OX-ABP1和anti-ABP1烟草BY2转化细胞系由本实验室培养保存。

试剂及仪器:Trizol购自Invitrogen公司;Revert-Aid<sup>TM</sup> First Strand Synthesis Kit反转录试剂盒购自TaKaRa公司;各种限制性核酸内切酶、T4连接酶购自Fermentas公司;DNA分子量标准Trans2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker、dNTPs、Taq酶均购自TransGen Biotech公司;通用质粒小量提试剂盒购自康为生物技术有限公司;DNA胶回收试剂盒购自Biotek公司;雌二醇和吲哚-3-乙酸购自Sigma公司。图片拍摄于湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室及园艺学重点学科实验室。

MS1培养基配方:4.43 g/L MS盐+100 mg/L 肌醇+200 mg/L磷酸二氢钾+1 mg/L盐酸硫胺素

(VB1)+0.2 mg/L 2,4-D+2 mg/L甘氨酸+30 g/L蔗糖, pH5.8; MS2培养基配方: 4.43 g/L MS盐+100 mg/L肌醇+200 mg/L磷酸二氢钾+1 mg/L盐酸硫胺素(VB1)+2 mg/L甘氨酸+30 g/L蔗糖, pH5.8。

## 1.2 方法

**1.2.1 拟南芥*AtROP2*基因的克隆** 根据GenBank公布的拟南芥*ROP2*基因序列(登录号: 838598), 设计扩增*AtROP2*基因的引物*AtROP2 UP*、*AtROP2 DN*(实验所用引物见表1)。Trizol法提取野生型拟南芥总RNA, 反转录成cDNA, 以cDNA为模板PCR扩增获得*AtROP2*。PCR产物连接pMD18-T载体, 热激法转入大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 菌落PCR及酶切检测均呈阳性的转化菌送铂尚生物(上海)有限公司测序。

**1.2.2 *CA-rop2*、*DN-rop2*基因的克隆** 根据Li等<sup>[15]</sup>的G15V *CA-rop2*和D121A *DN-rop2*基因序列设计引物, 用PCR的方法对*AtROP2*基因进行点突变。以pMD18-T-*AtROP2*质粒为模板, *CA-rop2 UP*、*AtROP2 DN*分别为上下游引物, 扩增*CA-rop2*基因; 以pMD18-T-*AtROP2*质粒为模板, 分别以*AtROP2 UP/DN-rop2 DN*和*DN-rop2 UP/AtROP2 DN*为上下游引物, 进行第一轮PCR扩增, 获得*DN-rop2*基因两个片段, 再以重叠PCR第一轮扩增获得的两个片段为模板, 以*AtROP2 UP/AtROP2 DN*为引物, 通过重叠PCR方法, 扩增得到*DN-rop2*目的片段。其中, *CA-rop2*在*AtROP2*基因的CDs区第41位引入一个碱基突变, 用T替换G, *DN-rop2*序列在*AtROP2*基因的CDs区第359位引入一个碱基突变, 用C替换A。CA-rop2或DN-rop2突变蛋白质永久性地结合GTP或GDP, 从而使ROP2依赖性信号处于持续激活或失活状态。

PCR产物连接pMD18-T载体转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 菌落PCR及酶切检测后测序。

**1.2.3 表达载体的构建** 根据*AtROP2*基因的CDs区序列, 在上下游分别引入酶切位点*BamH I*和*Sal I*, 设计引物*ROP2 UP(BamH I)*和*ROP2 DN(Sal I)*。分别以上轮获得的pMD18-T-*AtROP2*质粒、pMD18-T-*CA-rop2*质粒及pMD18-T-*DN-rop2*质粒为载体为模板进行PCR扩增, 产物纯化后用*BamH I*和*Sal I*双酶切, 再与同样双酶切处理的表达载体pWM101连接, 转化大肠杆菌。菌落PCR及酶切检测获得pWM101-OX-*ROP2*过表达载体、pWM101-*CA-rop2*组成型激活载体和pWM101-*DN-rop2*显性抑制载体。

**1.2.4 BY-2细胞的转化** 电击法将三种表达载体分别转入农杆菌LBA4404, 以液体继代培养3次的GFP-SCAMP2膜泡标记并ABP1诱导过表达和抑制表达的烟草BY2转化细胞系为转化受体, 共培法分别转化OX-*ROP2*、*CA-rop2*和*DN-rop2*基因, 用潮霉素(30 mg/L)进行筛选。待新细胞团长出后, 转移至新的MS1培养基上二次筛选。选取4~5个二次筛选后生长较好的细胞团, CTAB法提取细胞总DNA进行PCR检测, 得到六种转化的细胞系。

**1.2.5 转基因BY-2细胞系的处理及显微观察** 将六种转化细胞系以7 d为一个周期在MS1液体培养基中继代培养3次, 取第3次继代培养3~4 d的悬浮细胞(对数期细胞), 800 r/min低速离心10 min, 收集细胞沉淀, MS2悬浮细胞沉淀, 26 °C、150 r/min暗培养12 h左右, 50目细胞筛过滤, 收集滤液, 800 r/min离心5 min, 细胞沉淀重悬于4 mL MS2培养基中, 加入40 nmol/L的雌二醇诱导12 h左右, 再加入终浓度为

表1 基因克隆所用引物

Table 1 Primers used in genes cloning

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>AtROP2 UP</i>	CTC CTA TAG GCT CCT CTC AAA GTC AT
<i>AtROP2 DN</i>	GAA ATG TCT CCC TTC ACG TCG A
<i>CA-rop2 UP</i>	ATG GCG TCA AGG TTT ATA AAG TGT GTG ACC GTC GGA GAT <u>G</u> T GCC GTC G
<i>DN-rop2 UP</i>	ACA AAA CTC <u>G</u> CT CTT CGA GA
<i>DN-rop2 DN</i>	TCT CGA AGA <u>G</u> CG AGT TTT GT
<i>ROP2 UP (BamH I)</i>	CGG <u>GAT CCA</u> TGG CGT CAA GGT TTA TAA AG
<i>ROP2 DN (Sal I)</i>	GCG TCG <u>ACT</u> TAG AGG TTT TTC TTA TCA CAA G

下划线为点突变位点或酶切位点。

The underlined are mutation site or restriction enzyme cutting site.

5 mg/L的IAA处理后进行显微观察。部分细胞不加雌二醇诱导处理。膜泡标记细胞和ABP1诱导调控的细胞在非诱导状态下作为对照。

## 2 结果

### 2.1 基因的克隆与检测

菌落PCR及酶切检测均得到目的大小的分子条带,克隆获得的*AtROP2*基因测序序列与GenBank数据库中的拟南芥*ROP2*基因cDNA序列完全一致。点突变获得的*CA-rop2*和*DN-rop2*基因cDNA分子的测序序列与Li等<sup>[15]</sup>的拟南芥*CA-rop2*和*DN-rop2*基因序列完全一致,均在设计位点成功进行了正确的点突变。

### 2.2 表达载体构建与检测

菌落PCR及酶切检测结果表明,成功构建了pWM101-OX-ROP2过表达载体、pWM101-CA-rop2组成激活型载体和pWM101-DN-rop2显性抑制载体。

### 2.3 BY-2细胞的转化

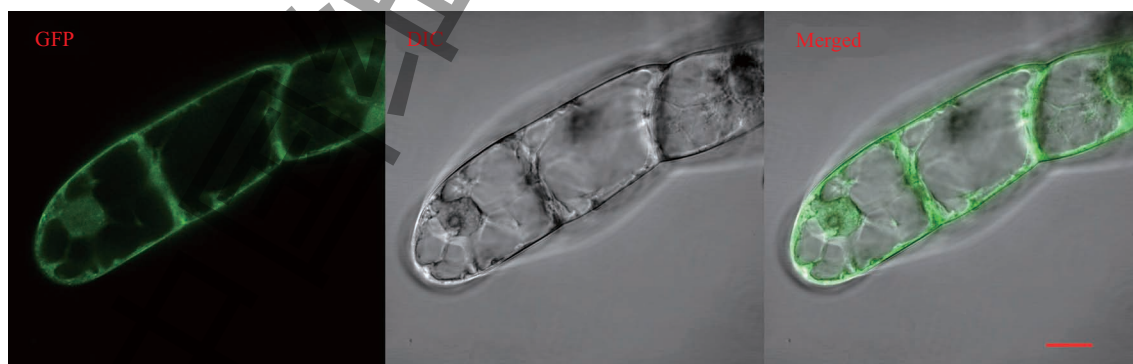
农杆菌侵染受体BY2细胞,铺板抗性筛选3周左右,对照平板上的细胞维持原来的状态,而转化平板上长出了亮黄饱满、表面湿润的新的细胞团突起。夹取长出的细胞团至新的培养基上二次筛选,10 d后部分转出的细胞团生长迅速,初步鉴定为转化细胞。而有些细胞团则停止生长,甚至失水死亡。对初步鉴定的细胞提取DNA分子检测,确定得到了所

需的六种转化细胞系。

### 2.4 转基因BY-2细胞系的处理和观察

2.4.1 膜泡标记蛋白荧光分布观察 取正常培养的对数期膜泡荧光标记的烟草BY2细胞,激光共聚焦显微镜观察(图1),在细胞核周围,细胞膜和初生细胞壁都有明显的荧光分布,细胞质内也有点状及网状荧光分布,与细胞内膜系统的分布基本一致。通过荧光观察可以较好地反映出细胞内膜泡运输的情况。

2.4.2 ROP2过表达(*OX-ROP2*)、组成激活型表达(*CA-rop2*)及显性抑制型表达(*DN-rop2*)的膜泡运输 取对数生长期的转化细胞转入不含生长素(auxin free)的MS2培养基中饥饿培养24 h以去除其对外源生长素处理结果的干扰。加入终浓度为5 mg/L的IAA处理后进行荧光显微镜观察(图2)。与对照细胞比较,IAA处理后,*OX-ROP2*及*CA-rop2*的BY2细胞膜泡运输变得非常活跃,无论是细胞核周围、细胞质膜,还是初生细胞壁,都有较明显的荧光分布,而转化*DN-rop2*的BY2细胞,膜泡外排运输受到明显抑制,内膜系统的荧光几乎消失,细胞质膜及细胞核附近的荧光也有所减弱,只有初生细胞壁有稍强的荧光。未进行IAA处理的对照转化细胞荧光分布结果与前者没有太大区别,表明膜泡运输响应生长素信号,激活了膜泡的外排。ROP2的过表达和组成激活型表达的促进作用说明其参与生长素响应的信号转导,参与细胞膜泡外排运输的调控。

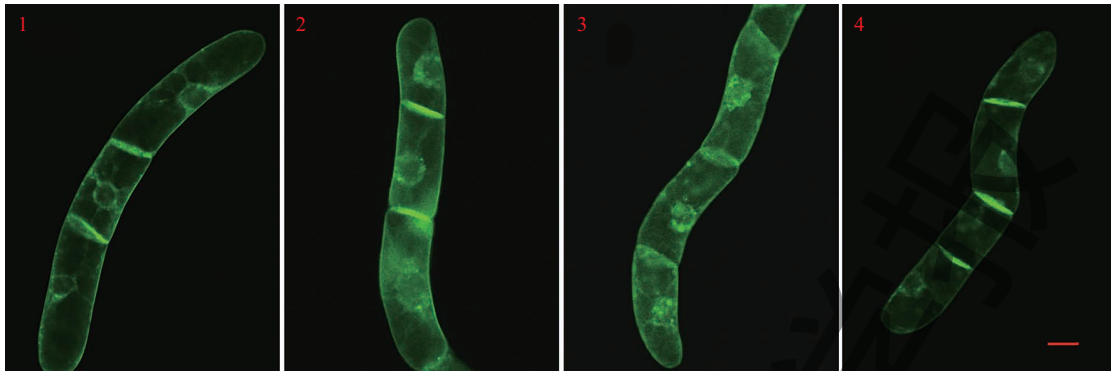


GFP荧光显微观察及微分干涉观察膜泡荧光标记蛋白SCAMP2-GFP在烟草BY2细胞中分布结果,观察所用细胞为正常培养至对数期的膜泡荧光标记BY2细胞,表明细胞膜系统得到良好的标记。标尺=10 μm。

Localization of the membrane labeled fusion protein SCAMP2-GFP in BY2 cells by GFP fluorescence and DIC observation. The log phase cells were used for observation. Scale bar=10 μm.

图1 激光共聚焦显微镜观察SCAMP2-GFP膜泡标记的BY2细胞

Fig.1 The BY2 membrane labeled with SCAMP2-GFP observed under laser scanning confocal microscope

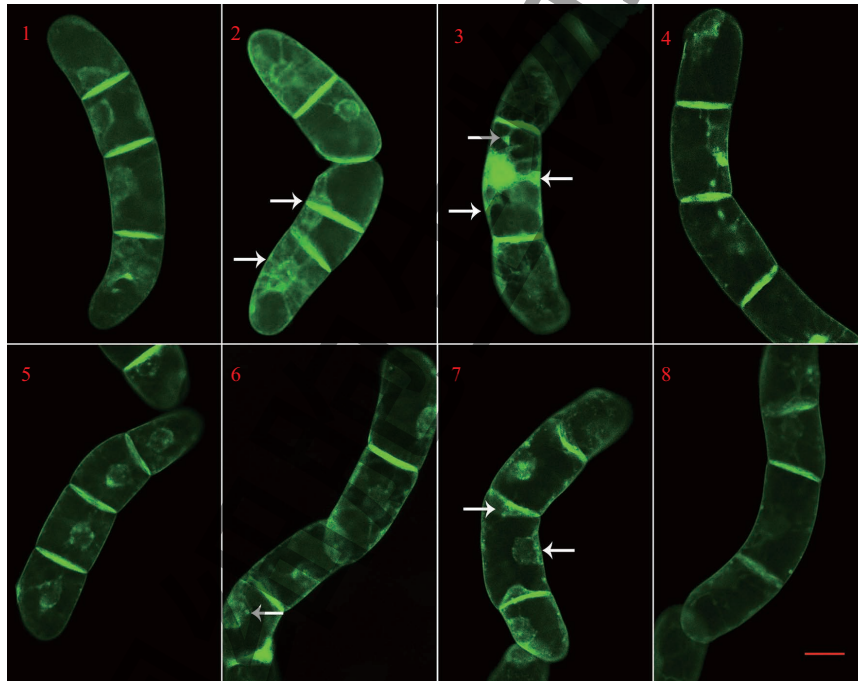


1: 对照细胞; 2: *OX-ROP2* BY2细胞; 3: *CA-rop2* BY2细胞; 4: *DN-rop2* BY2细胞。所有细胞生长素饥饿(auxin free)培养24 h后加入终浓度为5 mg/L的IAA处理, 激光共聚焦显微镜观察。标尺=20 μm。

1: control BY2 cells; 2: *OX-ROP2* BY2 cells; 3: *CA-rop2* BY2 cells; 4: *DN-rop2* BY2 cells. All cells were observed by CLSM with IAA treatment at a final concentration of 5 mg/L after cultured in auxin free media for 24 h. Scale bar=20 μm.

图2 ROP2不同调控的转化BY-2细胞膜泡运输激光扫描共聚焦显微镜观察

Fig.2 Observation of the vesicular transport in ROP2 regulated transgenic BY-2 cells under laser scanning confocal microscopy



1: OX-ABP1细胞; 2-4: OX-ABP1细胞系转*OX-ROP2*、*CA-rop2*、*DN-rop2* BY2细胞; 5: anti-ABP1细胞; 6-8: anti-ABP1细胞系转*OX-ROP2*、*CA-rop2*、*DN-rop2* BY2细胞; 细胞经生长素饥饿(auxin free)培养12 h后加雌二醇处理12 h诱导OX-ABP1或anti-ABP1的表达, 再以终浓度为5 mg/L的IAA处理后进行激光共聚焦显微镜观察, 白色箭头表示膜泡运输增强最活跃之处。标尺=20 μm。

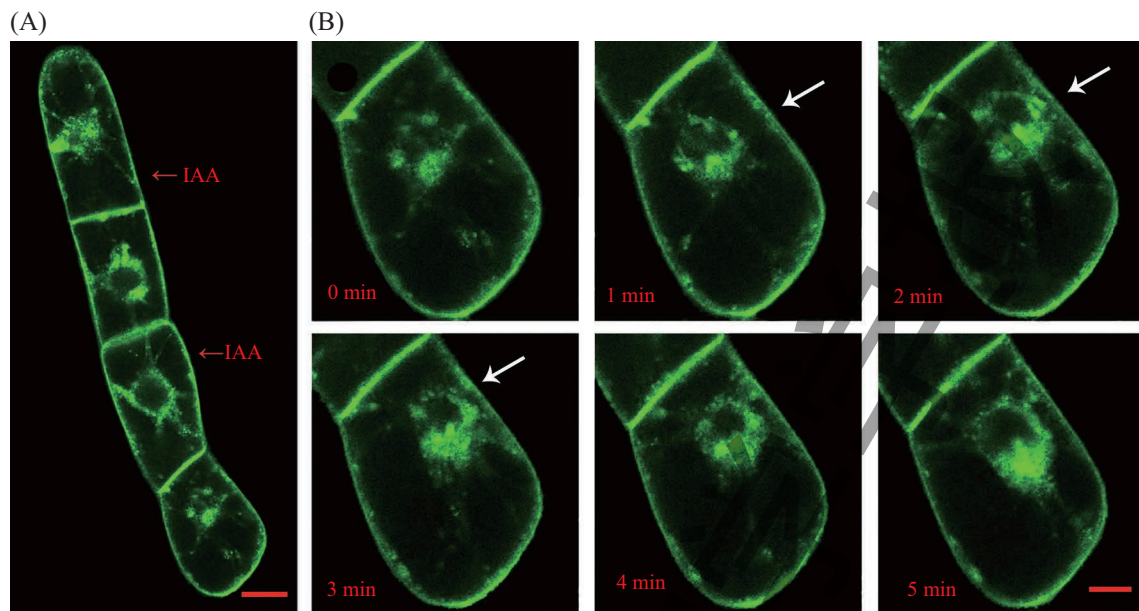
1: OX-ABP1 cell lines; 2-4: retransformed BY2 cells of *OX-ROP2*, *CA-rop2*, *DN-rop2* in OX-ABP1 cell lines; 5: anti-ABP1 cell lines; 6-8: retransformed BY2 cells of *OX-ROP2*, *CA-rop2*, *DN-rop2* in anti-ABP1 cell lines; All cells were treated with estradiol for 12 h to induce OX-ABP1 or anti-ABP1 expression after cultured in auxin free media for 12 h and observed by CLSM with IAA treatment at a final concentration of 5 mg/L. White arrows indicate vesicular transport enhancement. Scale bar=20 μm.

图3 ABP1诱导表达后转基因细胞激光扫描共聚焦显微镜观察

Fig.3 Observation of transgenic BY-2 cells after inducing ABP1 expression by CLSM

2.4.3 ABP1对ROP2调节生长素响应的膜泡运输的影响 以40 nmol/L雌二醇处理OX-ABP1、anti-ABP1及转化细胞, 诱导12 h后进行荧光显微观察(图3)。

与未诱导的细胞(图2)相比较, ABP1诱导过表达后, 除转*DN-rop2*的BY2细胞荧光无明显变化外, 其他细胞系的荧光都有所增强, 在细胞质膜、初生细胞壁



A: IAA处理起始细胞荧光分布图, 红色箭头表示生长素扩散方向, 标尺=20  $\mu\text{m}$ ; B: 底端细胞生长素处理0~5 min荧光分布放大图, 标尺=10  $\mu\text{m}$ ; 细胞生长素饥饿(auxin free)培养12 h后加入雌二醇处理12 h诱导ABP1过表达, 制片观察时从一侧滴加IAA, 使其扩散形成浓度梯度。观察到细胞膜泡2 min时就明显朝向生长素高浓度方向开始活跃运输。白色箭头指示膜泡运输朝向的细胞侧。

A: fluorescence distribution of BY2 cells began to treat with IAA; The red arrows represent the auxin diffusion direction; Scale bar=20  $\mu\text{m}$ . B: the bottom cell's interval fluorescence distribution treated with IAA in 0-5 min; Scale bar=10  $\mu\text{m}$ . Cells were treated with estradiol for 12 h to induce ABP1 over expression after cultured the cells in auxin free medium for 12 h, and IAA was added from one direction to form a degradation pattern. The vesicular transports are observed activation in short 2 min by IAA treatment. They are transported toward the direction of IAA higher concentration as white arrows indicated.

图4 生长素浓度梯度处理的OX-ABP1细胞系转CA-rop2 BY2单细胞定时膜泡观察

Fig.4 Time-lapse observation of single OX-ABP1 and CA-rop2 BY2 cell in degrade IAA treatment

及细胞核周围荧光信号增强明显, 膜泡运输趋于活跃。在转CA-rop2的BY2细胞中, 细胞核周围与细胞质膜及初生细胞壁之间的膜泡运输非常活跃, 膜泡外排活动增强, 进而促进细胞的极性生长。而ABP1抑制表达的细胞系荧光相对前者都有一定程度的削弱, DN-rop2细胞系的细胞核周围都只能看到较弱的散点荧光分布, OX-ROP2和CA-rop2细胞系的荧光总体有所增强, 但增强效果受到明显抑制, 外排运输受到一定影响。

2.4.4 生长素快速响应膜泡运输观察 雌二醇诱导ABP1充分表达后, 取转化CA-rop2的细胞制片观察, 从一侧添加外源生长素, 扩散形成浓度梯度, 设置0、1、2、3、4、5 min(通过染料标记观察IAA作用的时间), 选取同一细胞, 对其进行时间梯度荧光显微镜观察(图4)。在0~5 min内, 随着时间的推移, 细胞内膜系统荧光逐渐增强, 1 min时膜泡即产生对生长素的响应, 细胞核周围荧光增强明显, 向周围扩

散运输, 2 min时膜泡逐渐向生长素浓度较高一侧靠近, 也有部分受细胞间的极性影响向初生细胞壁运输, 细胞质膜变化不明显。表明IAA处理后2 min时, 细胞内膜系统的膜泡运输趋于活跃, 由细胞核向内膜系统、内膜系统向细胞质膜之间的膜泡外排运输逐渐增强, 且趋向生长素高浓度方向运输。证明了膜泡运输在2 min内对生长素的响应就已建立, 是一个快速响应的过程。

### 3 讨论

目前认识的生长素信号途径至少有两条。一是植物生长素通过与F-box蛋白家族的TIR1(transport inhibitor response protein 1)受体结合, 促进TIR1等受体与IAA/AUX转录抑制因子之间的相互作用, 激活泛素化蛋白质降解过程, 从而启动特定基因的转录, 改变基因表达模式, 进而影响植物的生长发育<sup>[16-18]</sup>。其二是生长素直接作用于细胞质, 导致细

胞极化和细胞扩张<sup>[19-20]</sup>等的快速响应途径。该途径不涉及基因的表达,植物细胞在很短时间内就会对生长素信号进行响应,ABP1被认为是该信号途径最有可能的受体蛋白<sup>[20-21]</sup>。尽管目前关于ABP1在植物中的功能存在一定争议,早期的许多研究表明,ABP1在植物生长发育过程中发挥重大作用。ABP1参与生长素诱导的细胞分裂及伸长,对早期胚胎发育、细胞形态建成、根叶的发育扩展、PIN蛋白亚细胞分布有重大影响<sup>[9,22-28]</sup>。

高等植物含有复杂的内膜系统,通过特有的膜泡运输机制完成细胞内及细胞间的物质交流及信号转导,膜泡运输受阻可能会影响植物的发育及信号转导<sup>[29]</sup>。当网格蛋白聚集向细胞质膜运输时,ABP1促进细胞的内存作用,而生长素与ABP1结合后,网格蛋白介导的PIN蛋白胞吞作用受到抑制,从而抑制细胞膜的内在化。ABP1可能通过抑制PIN蛋白内在化使其滞留于质膜上来引导生长素流的极性化<sup>[19,28]</sup>。同时,生长素作用于ABP1后,促进细胞内膜泡外排运输<sup>[14]</sup>。对网格蛋白介导的内存作用研究还发现,ROP2抑制PIN1蛋白的内在化,对网格蛋白介导的内存作用负调控<sup>[30]</sup>。

根据Cross的细胞膜循环假说,质膜上的ABP1与生长素结合后,抑制网格蛋白聚集,使膜泡内在化受阻,膜泡运输更趋向于外排,将与膜泡结合的生长素极性运输PIN向生长素高浓度方向聚集<sup>[31]</sup>。本研究表明,在生长素IAA作用下,ROP2组成激活型表达和过表达促进了烟草BY2细胞中ABP1介导的膜泡外排运输,而ROP2的显性失活表达则抑制了膜泡外排运输。诱导ABP1过表达增强了ROP2对膜泡外排运输的促进作用。ABP1干扰抑制表达时,ROP2的过表达及组成激活型表达对膜泡外排的促进作用受到明显抑制,但与受体细胞比较有一定的增强。这些结果表明,ROP2参与ABP1介导的膜泡外排运输信号途径,同时,ROP2不完全受ABP1调控,当ABP1受到抑制时,可能有其他未知的信号通路填补了部分ABP1的功能空缺。

TIR1受体介导的生长素信号通路由于涉及基因的表达,至少需要10~15 min的响应时间<sup>[20]</sup>,而ABP1对生长素的响应是一个快速响应过程,在很短时间内就能产生。ABP1介导生长素对PIN内在化的

抑制作用5 min内即能产生<sup>[28]</sup>。我们的研究也表明,生长素通过ABP1介导ROP2调控膜泡外排运输在2 min内就会得到响应,细胞核向内膜系统、内膜系统向细胞质膜之间的膜泡外排运输逐渐增强且趋向于生长素高浓度方向运输,是一个快速响应的过程。

分布于细胞质膜上的ABP1能与生长素结合,但本身不具有跨膜域和胞内功能域,ABP1将胞外的生长素信号传递至胞内引起原生质响应需要借助跨膜停靠蛋白的辅助<sup>[9,28,32]</sup>。Xu等<sup>[33]</sup>研究发现,TMK受体与ABP1相互作用,将胞外生长素信号转导并激活与细胞膜相关的ROPs,从而导致拟南芥细胞骨架和叶表皮细胞形态的改变。他们由此提出,TMKs/ABP1生长素感知复合体介导植物生长素信号激活ROPs信号途径,调节非转录细胞质响应及相关反应的可能模型。Xu等<sup>[9]</sup>之前在研究叶表皮相嵌模型时发现,ROP2介导的生长素信号通路促进嵌合凸起的形成,而ROP6介导的生长素信号通路与嵌合凹陷有关。ROP2通过RIC4引导肌动蛋白微丝的聚集抑制PIN内存,ROP6则通过激活RIC1抑制ROP2的活性进而影响细胞形态的建成。本研究表明,IAA处理转*CA-rop2*的BY2细胞后,细胞核周围与细胞质膜及初生细胞壁之间的膜泡运输非常活跃,膜泡外排活动增强,进而促进细胞的极性生长。ROP2可能通过类似的信号通路引导肌动蛋白运动,促进细胞膜泡外排运输,进而影响细胞形态的建成。

在研究酵母外排活动时发现,EXO70(exocyst复合体的一个亚基)与Rho GTPase的互作是外排调控的关键<sup>[33]</sup>,拟南芥中EXO70A1调控管状细胞囊泡转运,进而影响次生细胞壁的增长<sup>[34]</sup>。在动物和酵母系统中,Rho GTPase直接与EXO70结合<sup>[35-36]</sup>,而植物中的EXO70没有保守的C-端结合位点<sup>[37]</sup>,ROPs与exocyst复合体的互作可能普遍需要中间蛋白质的连接。拟南芥中ICR1介导ROPs与Sec3的互作<sup>[38]</sup>,RIC7介导ROP2与EXO70B1的互作,EXO70B1与RIC7结合可能抑制自身功能活性<sup>[13]</sup>。我们推测,ABP1可能通过影响ROP2与EXO70互作间接调控植物细胞膜泡外排运输。

尽管ABP1的功能存在着很大争议,Zhao等<sup>[39]</sup>的研究表明,该基因并非拟南芥中重要基因,但也有

大量的研究证明该基因表达的ABP1作为生长素信号途径的重要一员,尤其在细胞对生长素快速响应过程中起受体的作用<sup>[40]</sup>。当然,植物生长素信号途径还没有完全揭示。随着研究的深入,生长素快速响应途径的作用和分子机制会得到越来越清晰的了解。

## 致谢——

植物激素与生长发育湖南省重点实验室、湖南省园艺学重点学科实验室提供扫描激光观察。

## 参考文献 (References)

- Zheng ZL, Yang ZB. The Rop GTPase: An emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol* 2000; 44(44): 1-9.
- Yang ZB, Watson JC. Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(18): 8732-6.
- Yang ZB. Small GTPases: Signaling switches in plants. *Plant Cell* 2002; 14(1): 375-88.
- Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(2): 330-7.
- Ridley A. What initiates actin polymerization? *Genome Biol* 2000; 1(1): 1-3.
- Perez P, Rincon SA. Rho GTPases: Regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* 2010; 426(3): 243-53.
- Tao LZ, Cheung AY, Nibau C, Wu HM. Rac-GTPases in tobacco and *Arabidopsis* mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain Aux/IAA proteins. *Plant Cell* 2005; 17(8): 2369-83.
- Park J, Choi HJ, Lee S, Lee T, Yang Z, Lee Y. Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol* 2000; 124(2): 725-32.
- Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen JG, Wu MJ, *et al.* Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* 2010; 143(1): 99-110.
- Jones MA, Shen JJ, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson CS. The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* 2002; 14: 763-76.
- Lee YJ, Yang Z. Tip growth: Signaling in the apical dome. *Curr Opin Plant Biol* 2008; 11(6): 662-71.
- Jeon BW, Hwang JU, Hwang Y, Song WY, Fu Y, Gu Y, *et al.* The *Arabidopsis* small G protein ROP2 is activated by light in guard cells and inhibits light-induced stomatal opening. *Plant Cell* 2008; 20(1): 75-87.
- Hong D, Jeon BW, Kim SY, Hwang JU, Lee Y. The ROP2-RIC7 pathway negatively regulates light-induced stomatal opening by inhibiting exocyst subunit Exo70B1 in *Arabidopsis*. *New Phytol* 2016; 209(2): 624-35.
- 柳叶, 王亚红, 黄好, 陈宗星, 赵燕, 张学文. 植物生长素通过ABP1促进细胞膜泡的外排运输. *中国细胞生物学学报* (Liu Ye, Wang Yahong, Huang Yu, Chen Zongxing, Zhao Yan, Zhang Xuewen. ABP1 mediates auxin accelerating of vesicular exocytosis in plant. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(9): 1250-6.
- Li H, Shen JJ, Zheng ZL, Lin Y, Yang Z. The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001; 126(2): 670-84.
- Leyser O. Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr Biol* 2006; 16(11): 424-33.
- Tan X, Calderon-Villalobos LL, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; 446(7136): 640-5.
- Mockaitis K, Estelle M. Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 55-80.
- Dhonukshe P, Tanaka H, Goh T, Ebine K, Mahonen AP, Prasad K, *et al.* Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 2008; 456(7224): 962-6.
- Badescu GO, Napier RM. Receptors for auxin: Will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci* 2006; 11(5): 217-23.
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* 2001; 15(7): 902-11.
- Braun N, Wyrzykowska J, Muller P, David K, Couch D, Perrot-Rechenmann C, *et al.* Conditional repression of auxin binding protein 1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 2008; 20(10): 2746-62.
- Jones AM, Herman EM. KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol* 1993; 101(2): 595-606.
- Jones AM, Im KH, Savka MA, Wu MJ, DeWitt NG, Shillito R, *et al.* Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* 1998; 282(5391): 1114-7.
- Shi JH, Yang ZB. Is ABP1 an auxin receptor yet? *Mol Plant* 2011; 4(4): 635-40.
- Tomas A, Braun N, Muller P, Khodus T, Paponov IA, Palme K, *et al.* The auxin binding protein 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One* 2009; 4(9): e6648.
- Chen JG, Shimomura S, Sitbon F, Sandberg G, Jones AM. The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *Plant J* 2001; 28(6): 607-17.
- Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, *et al.* ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 2010; 143(1): 111-21.
- Surpin M, Raikhel N. Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2004; 5(2): 100-9.
- Nagawa S, Xu TD, Lin DS, Dhonukshe P, Zhang XX, Friml J, *et al.* ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Biol* 2012; 10(4): e1001299.
- Cross JW. Cycling of auxin-binding protein through the plant cell: Pathways in auxin signal transduction. *New Biol* 1991; 3(8):



- 813-9.
- 32 Klamt D. A view about the function of auxin-binding proteins at plasma membranes. *Plant Mol Biol* 1990; 14(6): 1045-50.
- 33 Xu T, Dai N, Chen J, Nagawa S, Cao M, Li HJ, *et al.* Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling. *Science* 2014; 343(6174): 1025-8.
- 34 Wu H, Turner C, Gardner J, Temple B, Brenwald P. The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Mol Biol Cell* 2010; 21(3): 430-42.
- 35 Dong G, Hutagalung AH, Fu C, Novick P, Reinisch KM. The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(12): 1094-100.
- 36 He B, Xi F, Zhang X, Zhang J, Guo W. Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J* 2007; 26: 4053-65.
- 37 Zarsky V, Cvrckova F, Potocky M, Hala M. Exocytosis and cell polarity in plants-exocyst and recycling domains. *New Phytol* 2009; 183(2): 255-72.
- 38 Lavy M, Bloch D, Hazak O, Gutman I, Poraty L, Sorek N, *et al.* A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr Biol* 2007; 17(11): 947-52.
- 39 Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao YD. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(7): 2275-80.
- 40 Grones P, Friml J. Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J Cell Sci* 2015; 128(1): 1-7.

中国细胞生物学