

- gene of tomato. *Plant Physiol*, 1991, **97** (3): 900~ 906
- 25 Pyee J, Yu H, Kolattukudy P E. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch Biochem Biophys*, 1994, **311** (2): 460~ 468
- 26 Cammue B P, Thevissen K, Hendriks M, *et al.* A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol*, 1995, **109** (2): 445 ~ 455
- 27 Torres-Schumann S, Godoy J A, Pintor-Toro J A. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol Biol*, 1992, **18** (5): 749~ 757
- 28 张明永, 徐是雄, Chye M L, 等. 一种水稻酰基辅酶 A 结合蛋白 cDNA 的鉴定. *植物生理学报*, 1999, **25** (4): 327~ 331
Zhang M Y, Xu S X, Chye M L, *et al.* *Acta Phytophysiological Sinica*, 1999, **25** (4): 327~ 331

Progress in the Studies of Lipid-transfer Protein.

ZHANG Ming-Yong, LIANG Cheng-Ye (*South China Institute of Botany, The Chinese Academy of*

Sciences, Guangzhou 510650, China).

Abstract Lipid-transfer proteins (LTPs) are a group of basic, small (9 ku) proteins which transfer lipids between biomembranes by *in vitro* assays. So they are thought to participate in the lipid transferring during biomembrane synthesis. Their purification, structure, gene expression and biological functions have been studied in various monocotyledonous and dicotyledonous plants. The latest studies found that they are secreted and located in the cell wall, and that it is suggested that plant LTPs are possibly related with cutin formation, defense reactions against phytopathogens and plant adaptation to various environmental stresses.

Key words lipid-transfer protein, lipid, plant

植物抗脱水胁迫的分子机制

熊清 王伯初¹⁾ 段传人

(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要 主要介绍植物在脱水胁迫下, 逆激基因产物的功能和胁迫信号的转导过程. 逆激基因产物的功能可分为两类: 一类起“保护”作用, 另一类起“调节”作用. 在脱水胁迫起始信号和基因表达之间至少存在四条信号转导通路, 两条依赖脱落酸 (ABA), 两条不依赖 ABA, 依赖 ABA 的途径中有 1 条必须有蛋白质合成. 不依赖 ABA 的途径中有 1 条与低温胁迫应答有共同的信号转导通路.

关键词 干旱, 盐渍, 低温, 脱水, 信号转导, 基因表达

学科分类号 Q756

植物在其生长过程中, 要受许多不良环境因素的影响. 为了适应环境, 在长期的进化中, 植物已逐渐建立起适应和抗性机制. 如干旱、盐渍、低温等外界因子引起的脱水胁迫 (water stress) 能使植物体内产生一系列生理和生化变化, 并诱导许多特殊基因进行表达, 这些逆激基因产物的功能及其表达调控, 近年来一直备受学术界的关注. 本文将主要介绍植物在脱水胁迫下, 逆激基因产物的功能以及胁迫信号转导和逆激基因表达调控方面的研究进展.

1 脱水胁迫诱导的逆激基因产物的功能

干旱、低温、盐渍等外界因子引起的脱水胁迫能够诱导植物体内的许多基因进行表达, 为了了解

这些基因表达产物在植物逆境应答中的作用, Shinozaki等通过差示筛选法和 PCR 法从拟南芥中克隆了 40 多个干旱诱导基因, 并将克隆到的基因序列与基因库里已知功能的序列相比较^[1~4], 经分析后认为, 脱水胁迫诱导基因产物的功能大致可分为两种类型^[3,5].

第一类是在植物的抗性中起作用的蛋白质. 这些蛋白质可细分为以下五种: 第一种是一类水通道蛋白, 如主要内在蛋白 (MIP) 等. 这类蛋白质可以形成选择性的水运输通道, 提高细胞膜的透水性, 便于水分摄入, 从而使脱水胁迫下的细胞保持

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (023) 65102507, E-mail: bio< bio@cqu.edu.cn

收稿日期: 1999-04-28, 修回日期: 1999-10-20

一定的膨压, 以维持正常的生命活动. 第二种是保护生物大分子及膜结构的蛋白质, 如抗冻蛋白及胚胎发生晚期丰富蛋白 (LEA) 等. 这类蛋白质多具有保守的序列单元, 含较多的极性氨基酸残基, 它们一般具有热稳定性, 不易变性, 可创造一种起保护作用的水相环境, 防止其他蛋白质进一步变性, 甚至能帮助已变性的蛋白质复性. 第三种是合成渗透保护物质 (如脯氨酸、甜菜碱及多元醇等) 的关键酶类, 如脯氨酸合成酶等. 这类酶可通过诱导渗透保护物质的生物合成来降低细胞的渗透势, 提高植物的抗胁迫能力. 第四种是具保护作用的蛋白酶类, 如巯基蛋白酶 (thiol protease) 等. 此酶可降解变性蛋白质, 为新蛋白质的合成储备原料. 第五种是具有解毒作用的酶类, 如超氧化物歧化酶 (SOD) 等. 植物在逆境因素的作用下会产生高度反应性氧自由基 (ROS), 而此酶类可抵御由 ROS 所引起的氧化损伤和致死效应, 从而提高植物抗胁迫能力.

第二类是在信号转导和逆激基因表达过程中起调节作用的蛋白质因子. 在植物胁迫信号的传递过程中, 涉及到为数众多的信号分子, 主要包括以下几种: 第一种是与第二信使生成有关的酶类, 如磷脂酶等. 该酶能够将磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (PIP₂) 水解成二脂酰甘油 (DG) 和三磷酸肌醇 (IP₃), IP₃ 能够诱导贮存于内质网的 Ca²⁺ 释入胞液内, 从而启动胞内信号转导过程. 第二种是与逆激基因表达调控有关的转录因子, 如 MYC、MYB、bZIP、EREBP/AP₂ 等, 后有详述. 第三种是与蛋白质磷酸化有关的蛋白激酶类, 其中最重要的莫过于促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联中所包括的三个关键的激酶 MAPK、MAPKK 和 MAPKKK. 目前已从植物中克隆了大量的 MAPK 级联途径成员, 它们大多数与植物的环境胁迫反应有关. 因此, 可以推测 MAPK 级联途径在植物胁迫信号的传递过程中可能占据相当重要的作用, 但植物中 MAPK 级联成员之间的相互作用机制还有待进一步阐明.

2 脱水胁迫信号转导及逆激基因的表达调控

2.1 受体

脱水引起植物细胞渗透势发生改变, 造成渗透胁迫. 在细菌和酵母中, 感受渗透胁迫是通过“二元调控体系”来实现的^[6,7]. 酵母中的“二元调控体系”包括三个成员: Sln1p、Ypd1p 和 Ssk1p. 通

过四步磷酸化作用: Sln1p-His 576 (H₁) → Sln1p-Asp 1144 (D₁) → Ypd1p-His 64 (H₂) → Ssk1p-Asp 554 (D₂) 传递胞外信息. 其中, Sln1p 是一种新型的传感蛋白 (sensor), 一般以同源二聚体的形式跨膜存在. Shinozaki 等^[5]已从拟南芥中分离出一个编码 Sln1 同源物的 ATHK1 基因, 据分析, ATHK1 和 Sln1 一样有一个典型的组氨酸激酶结构域和一个输入结构域, ATHK1 能够使 Sln1 突变株恢复功能, 表明 ATHK1 有与 Sln1 相类似的功能, 而且 ATHK1 基因受干旱、盐渍、低温信号的正调节, 这些结果说明 ATHK1 可能在脱水信号转导中起着传感器的作用, 一个相似的渗透感受机制也可能存在于植物的逆境应答中. 在高等植物中, 另外两个二元调控组氨酸蛋白激酶 (two component histidine kinase) ETR1 和 CKII 分别在乙烯和细胞分裂素的信号转导过程中起着传感器的作用^[8,9]. 所以可以推测, 在植物的各种信号转导途径中, 二元调控组氨酸蛋白激酶可能起着受体的作用.

2.2 下游信号转导

Shinozaki 等^[3,4]详细研究了脱水胁迫下拟南芥基因的表达调控. 他们认为, 在脱水胁迫起始信号与基因表达之间至少存在四条独立的信号传递途径, 2 条依赖 ABA, 2 条不依赖 ABA, 依赖 ABA 的途径中有 1 条必须有蛋白质合成, 不依赖 ABA 的途径中有 1 条与低温胁迫应答有共同的信号转导通路 (图 1). 现将这四条信号传递途径分述如下:

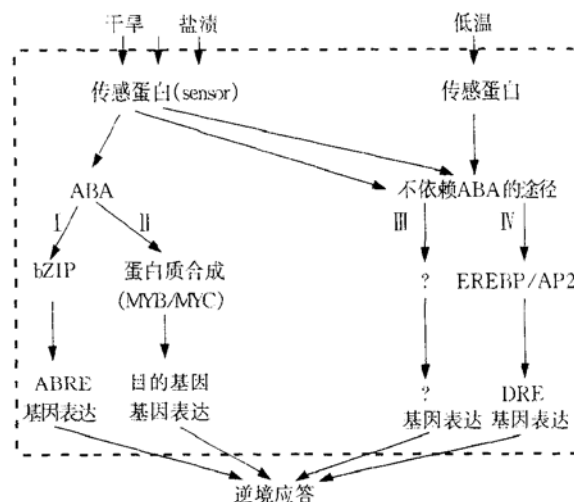


图 1 脱水胁迫起始信号与基因表达之间信号通路示意图

a. 依赖 ABA 但不需要蛋白质合成的信号传递途径 (I).

在干旱、盐渍等逆境胁迫下, 植物体内 ABA

的含量会发生明显的变化, 而且在胁迫下表达的许多基因同时也受外源 ABA 的诱导, 这表明 ABA 参与了植物逆境信号的传递过程. 而且, 这些逆激基因的表达调控研究显示^[10~12], 在依赖 ABA 的信号传递途径中有一条不需要蛋白质的合成. 经序列分析发现, 这些 ABA 诱导基因的启动子区域包含一个保守的序列 (PyACGTGGC), 这个序列被称作 ABA 反应元件 (ABRE), 对一些受 ABA 诱导的逆激基因的表达起顺式调节作用. ABRE 是从小麦的 Em 基因和水稻的 rab 基因中首先分离得到的. 许多 ABRE 结合蛋白也已被分离, 经比较后发现, 这些蛋白质大都包含有一个保守的亮氨酸拉链 (bZIP) 结构域, ABRE 中的核心序列 ACGT 周围的核苷酸决定了 bZIP 蛋白的结合特异性^[13]. 而且 Shen 等^[14]发现, ABRE 是通过先形成 ABRE 响应复合体而起调控作用的, 至于 ABA 活化 bZIP 蛋白并使其结合到 ABRE 上从而调控基因表达的机制现在还不甚清楚, 还需要对这些 bZIP 蛋白的结构和功能作进一步分析.

b. 依赖 ABA 且需要蛋白质合成的信号传递途径 (II).

在脱水胁迫下, 几个逆激基因对 ABA 的响应需要蛋白质的生物合成, 最典型的例子如拟南芥的一个干旱诱导基因 rd22, rd22 启动子中一个 67 bp 的片段对于 ABA 的响应是必需的, 这个片段中包含了几个保守的 DNA 结合蛋白的识别位点, 即两个 MYC 识别位点和一个 MYB 识别位点, 其中第一个 MYC 位点和 MYB 位点是 rd22 脱水诱导表达中的顺式作用元件^[12, 15].

Abe 等^[16]用 67 bp 的 DNA 片段作探针通过 DNA-配体结合法 (DNA-ligand-binding method) 克隆了一个编码 MYC 同源物的基因, 称作 rd22BP1. rd22BP1 编码的蛋白质与其他 MYC 一样, 有一个典型的 DNA 识别结构域, 且 rd22BP1 蛋白能与 67 bp 片段中的第一个 MYC 识别位点发生特异性结合, 经 RNA 凝胶印迹分析显示, rd22BP1 基因能在脱水胁迫中先于 rd22 基因而被诱导. 这表明 MYC 及其同源物可能在 rd22 基因的脱水诱导表达中起转录因子的作用. 同时, Urao 等^[17]研究发现一个编码 MYB 同源物的基因 Atmyb2 能被干旱、盐渍以及外源 ABA 诱导, 且重组的 ATMYB2 蛋白能与 rd22 基因启动子中 67 bp 片段中的 MYB 识别位点结合. 因此可以推测, MYC 和 MYB 蛋白在 rd22 基因的脱水诱导表达中

协同作用, 共同激活 rd22 基因的转录.

c. 不依赖 ABA 的信号传递途径 (III、IV).

在干旱、盐渍、低温等一些外界因子的诱导下, 一些基因如 rd29A、kin1、cor6.6、cor47 等能在 ABA 缺失突变株 (aba) 和 ABA 不敏感突变株 (abi) 中表达, 说明这些逆激基因的表达不需要 ABA 的存在^[11, 12, 18, 19]. 对这些基因进行序列分析后表明, 一个被称作脱水反应元件 (DRE) 的 9 bp 的保守序列 (TACCGACAT) 在 rd29A 基因的脱水诱导表达中是必需的. DRE 相关序列已在许多低温和干旱诱导基因的启动子中被发现^[12, 18]. 这表明 DRE 元件涉及到逆激基因的诱导表达调控, 与 DRE 相互作用的转录因子也在经脱水处理的拟南芥细胞核抽提物中被检测到^[20], 另外几个 DRE 结合蛋白的 cDNA 也已通过酵母一次杂交筛选法 (yeast one hybrid screening method) 被克隆^[21]. 这些 DRE 结合蛋白都包含一个与乙烯应答中涉及的 EREBP 蛋白和花形态发生中涉及的 AP2 蛋白中的 EREBP/AP2 结构域相类似的 DNA 结合结构域, 对这些转录因子的进一步分析将会使我们更好地懂得这一信号传递途径.

Nakashima 等^[22]研究发现, 有几个干旱诱导基因如 rd19、rd21、erd1 等既不受低温也不受外源 ABA 的诱导, 这表明在植物脱水应答反应中存在第四条信号传递途径. 关于这条途径中所涉及的信号分子和顺式作用元件都不太清楚, 还需对这些基因的启动子作进一步研究, 以获得更多的信息.

3 展 望

植物的抗逆应答过程是一个涉及到众多基因, 受多途径调控的复杂过程. 在过去的 10 年里, 人们对脱水胁迫诱导基因产物的功能及表达调控进行了深入的研究, 取得了可喜的进展, 但仍存在许多问题需要解决, 为了进一步阐明植物抗脱水胁迫的分子机制, 笔者认为今后的研究可能会集中在以下几个方面: 逆激基因产物的分离纯化及功能鉴定, 信号转导途径中所涉及的蛋白质因子之间的相互作用, 各信号转导途径间的相互影响以及逆激基因的启动子中顺式作用元件与转录因子之间相互作用的机制等等. 总之, 阐明植物的抗脱水胁迫分子机制, 并通过现代生物技术培育出耐盐、耐旱、耐低温的植物新品种, 在理论上和实践上都具有重大意义.

参 考 文 献

- 1 Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, *et al.* Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*, 1992, **33** (2): 217~ 224
- 2 Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L: identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Mol Biol*, 1994, **25** (5): 791~ 798
- 3 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol*, 1997, **115** (1): 327~ 334
- 4 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought stress. In: Sato K, Murata N, eds. *Stress Responses of Photosynthetic Organisms*. Amsterdam: Elsevier, 1998. 141 ~ 163
- 5 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Mizoguchi T, *et al.* Molecular responses to water stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*, 1998, **111** (3): 345~ 351
- 6 Wurgler-Murphy S M, Saito S. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci*, 1997, **22** (5): 172~ 176
- 7 Posas F, Wurgler-Murphy S M, Maeda T, *et al.* Yeast HOG1 MAPK cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in SLN1-YPD1-SSK1 two component osmosensor. *Cell*, 1996, **86** (6): 865~ 875
- 8 Chang C. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm? *Trends Biol Sci*, 1996, **21** (4): 129~ 133
- 9 Kakimoto T. CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 1996, **274** (5289): 982 ~ 985
- 10 Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, *et al.* Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Mol Biol*, 1994, **26** (5): 1557~ 1577
- 11 Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, **47**: 377~ 403
- 12 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, **7** (2): 161~ 167
- 13 Menkes A E, Schindler U, Cashmore A R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20** (12): 506~ 510
- 14 Shen Q, Ho T H D. Functional dissection of an abscisic acid (ABA) -inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell*, 1995, **7** (2): 295~ 307
- 15 Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet*, 1995, **247** (4): 391~ 398
- 16 Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, *et al.* Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1997, **9** (10): 1859~ 1868
- 17 Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, *et al.* An *Arabidopsis* MYB homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 1993, **5** (11): 1529~ 1539
- 18 Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In: Meyrowitz Z, Somerville C, eds. *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 100~ 135
- 19 Bray E A. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, 1997, **2** (1): 48~ 54
- 20 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, **6** (2): 251~ 264
- 21 Stockinger E J, Glimour S J, Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the c-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (3): 1035~ 1040
- 22 Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, *et al.* A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1997, **12** (4): 851~ 861

Molecular Mechanism of Water-Stress Response in Plant. XIONG Qing, WANG Bo-Chu, DUAN Chuan-Ren (*Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China*).

Abstract The function of water-stress-inducible gene products and signal transduction in water-stress response was mainly introduced. Genes induced during water-stress conditions are thought to function not only in protecting cells from water deficit but also in the regulation of genes for signal transduction in water stress response. At least four independent signal transduction pathways exist between the initial dehydration signal and gene expression, two are ABA independent and two are ABA dependent, one of the ABA-dependent pathways requires protein biosynthesis, one of the ABA-independent pathways overlaps with that of the cold response.

Key words drought, high salinity, low temperature, dehydration, signal transduction, gene expression