

拟南芥AtMKK1结构特征和信号转导功能研究进展

蔡国华, 王丽, 潘教文, 孔祥培, 李德全*

山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联途径在动物、植物和酵母中是高度保守的信号转导模型。MAPK级联途径通过“交谈”形成了复杂的信号传递网络, 将不同的细胞膜感受器与细胞应答联系起来, 响应生物和非生物胁迫, 并且在植物激素信号和生长发育进程中起重要的作用。MAPK级联途径由三种逐级磷酸化的蛋白激酶即MAPKKK、MAPKK和MAPK组成。AtMKK1是拟南芥MAPKK家族中的一员, 随着功能获得型突变体和功能缺失突变体的获得以及一些新型研究技术的应用, AtMKK1研究取得重要进展, 是目前研究较为详细的MAPKK。

关键词: AtMKK1; MAPK级联途径; 信号转导; 胁迫响应

Research Progress of Structure Characteristics and Signal Transduction Functions of AtMKK1 in *Arabidopsis*

CAI Guo-Hua, WANG Li, PAN Jiao-Wen, KONG Xiang-Pei, LI De-Quan*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades are highly conserved signal transduction model in animals, plants and yeast. MAPK cascades form the complex signal transmission network through the “cross-talk” to connect diverse cell membrane receptors with cellular responses to response biotic and abiotic stresses, and play a central role in the hormone signal, growth and development process. MAPK cascades are consisted of MAPKKK, MAPKK and MAPK, through sequential phosphorylation. With the application of the loss-of-function mutant, the gain-of-function mutant and some new research techniques, the research of AtMKK1 has been made great progress and so far AtMKK1 has been comprehensively detailed as a member of MAPKK in *Arabidopsis thaliana*.

Key words: AtMKK1; MAPK cascades; signal transduction; stress response

植物通过调节胞内代谢形成了精细复杂的信号转导机制来适应多变的环境, 将外界信号转换为胞内反应是通过一种典型的机制, 即促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)级联途径。促分裂原活化蛋白激酶级联途径是真核生物细胞信号转导途径中高度保守的信号组分, 并由三种逐级磷酸化的蛋白激酶组成: 即促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK/MEKK)、促分裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK/MEK)和促分裂原活化蛋白激酶(MAPK/MPK)。被上游质膜受体激酶激活的MAPKKK, 通过磷酸化MAPKK VII-VIII亚域中保守的S/T-X_{3,5}-S/T基序将其激活。激活的MAPKK通过磷酸化MAPK位于活化环(T-loop)中保守的T-X-Y基序的苏氨酸和酪氨酸残基将其激活。活化的MAPKs磷酸化和激活各种胞质或核底物, 包括其他激酶、转录因子

和细胞骨架结合蛋白等。这些MAPK底物在响应刺激和调节多种重要胞内反应中起重要的作用。MAPK活性的调节是通过专一的酪氨酸和丝氨酸磷酸酶所介导。一个特异的MAPK级联途径的形成和完整性是通过支架蛋白、共有对接域或锚定蛋白所调节(Chen等2012; Kumar等2012; Sinha等2011)。

MAPK级联途径在动物、植物和酵母中是保守的信号转导模型, 参与多种信号转导。当植物暴露在多种非生物和生物胁迫, 如低温、干旱、高盐、机械损伤、渗透胁迫、活性氧胁迫及病原菌侵染等时, MAPK被快速激活。拟南芥基因组分

收稿 2012-11-20 修定 2013-02-06

资助 国家自然科学基金项目(31071337和31271633)。

* 通讯作者(E-mail: dqli@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249137)。

析表明,目前至少存在20个MAPKs、10个MAPKKs和80个MAPKKKs (Champion等2004)。MAPK根据其编码蛋白序列T-X-Y基序的不同,可分为TEY和TDY类。TEY类根据系统发生关系进而又划分为A、B、C三亚类;TDY类单独列为D亚类,并且具有较长的C末端序列,这一类植物MAP激酶与哺乳动物和酵母的p38同源性较高,包括拟南芥中的AtMPK8、AtMPK9,水稻中的BWMK1。目前关于含TDY基序的MAPK功能研究主要集中在水稻中的BWMK1 (Cheong等2003)。MAPKK根据其蛋白序列相似性划分为A、B、C、D四个亚族(Rodriguez等2010)。而80个MAPKKK根据其蛋白催化结构域的差异性可将其分为3个主要亚组分:MEKK类、RAF类和ZIK类(Rao等2010)。MEKK类蛋白激酶主要有苜蓿中的OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1),拟南芥中的ANP1、ANP2、ANP3、YDA,烟草中的NPK1 (nicotiana protein kinase 1) (Nakagami等2004; Lukowitz等2004)。Raf类蛋白激酶主要有拟南芥中的EDR1 (enhanced disease resistance 1)和CTR1 (constitutive triple response 1) (Frye等2001)。而ZIK类与其他两类同源关系较远,有研究报道拟南芥中ZIK蛋白WNK1 (At3g04910) 参与调控昼夜节律(Rao等2010; Murakami-Kojima等2002)。

MAPK级联途径通过相互“交谈(cross-talk)”形成复杂的信号传递网络,从而有效地传递各种特异信号,响应各种不同的生物和非生物胁迫,进而适应多变的外界环境。

作为一种模式植物,拟南芥的研究较清楚。随着拟南芥基因组测序的完成,各MAPKK基因核苷酸序列和蛋白结构研究更加清晰。本文通过对拟南芥MAPK级联途径中“交谈”MAPKK水平中的AtMKK1进行总结,综述近些年来对AtMKK1的研究成果,以便更全面了解其结构特征和信号转导功能。

1 拟南芥中的MAPKK

拟南芥基因组数据分析显示MAPKK的数量是MAPK的一半,这表明MAPKKs可能激活多种MAPKs,并且各种信号转导途径之间的“交谈”可能集中在植物MAPKK这一水平。植物中的MAPKKs磷酸化位点的序列不同于哺乳动物激酶,植物

MAPKKs含有保守的S/TXXXXXS/T,哺乳动物相应激酶含有S/TXXXS/T,然而这种保守的序列在拟南芥MKK10中不存在,因为MKK10这个区域中有3个氨基酸残基缺失(Cheong等2003)。根据序列相似性,拟南芥中MKKs分为A~D四个亚组:A亚组MKK包括MKK1、MKK2和MKK6;B亚组到目前为止只分离到MKK3, MKK3有一个编码核转移因子(nuclear transfer factor, NTF)的延伸区,NTF域可促进蛋白进入核内,这表明含NTF域的MAPKK参与蛋白在胞质与核之间的转移(Kumar等2008; Nakagami等2005; Rodriguez等2010);C亚组包括MKK4和MKK5;D亚组包含MKK7、MKK8、MKK9和MKK10,其中C、D亚组中的MKKs基因没有内含子。拟南芥MAPKKs的N端延伸区有一个MAPK停泊位点,即[K/R][K/R][K/R]_{x(1-6)}[L/X][L/V/I] (Kumar等2008; Rodriguez等2010)。

研究表明拟南芥MKKs参与各种生物和非生物胁迫响应(表1)。体外激酶实验和酵母双杂交实验分析证实,拟南芥中的MKK1和MKK2被认为是MPK4的上游组分(Huang等2000)。拟南芥MKK2-MPK4/MPK6级联途径可以被冷冻、盐胁迫和胁迫诱导的MEKK1所激活,并且MKK2过表达株系表现出MPK4和MPK6组成型活性,上调胁迫诱导相关基因表达,增强冷冻和高盐胁迫抗性(Teige等2004)。据报道MKK1和MKK2在由MEKK1、MPK4和MKS1调控的防御信号途径中功能重叠(Qiu等2008)。研究表明,AtMKK9在非生物胁迫响应中是一个负调控子(Alzwy和Morris 2007),在乙烯和植物抗毒素生物合成途径中使多种基因上调表达(Xu等2008)。AtMKK3参与茉莉酸介导的发育信号调控(Takahashi等2007)。AtMKK7正调控植物的基础和系统性获得抗性(systemic acquired resistance, SAR) (Zhang等2007)。组成活化形式的MKK4和MKK5可以激活MPK3和MPK6,导致鞭毛蛋白22诱导的受体类激酶(FLG22-induced receptor-like kinase 1, FRK1)和转录因子WRKY22、WRKY29的转录激活(Asai等2002),同时MKK4和MKK5在胚乳发育和气孔分化方面起作用。虽然拟南芥中许多MKKs在MAPK信号模型中功能重叠,但各成员在生物和非生物胁迫、细胞分裂分化、激素信号途径等方面均发挥作用。

表1 拟南芥MKKs参与的各种响应

Table 1 List of MKKs involving in various responses in *Arabidopsis*

MKKs	信号	级联途径	参考文献
MKK1	冷、干旱、高盐、氧化胁迫、损伤、病原菌	MEKK1-MKK1-MPK4-MKS1/WRKY33; MKK1-MPK6; MKK1-MPK4	Xing等2008 Meszaros等2006
MKK2	冷、盐、茉莉酸、水杨酸、先天性免疫	MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6; MKK2-MPK4	Teige等2004 Brader等2007
MKK3	病原菌、茉莉酸、衰老	MKK3-MPK1/2/7/14; MKK3-MPK6	Doczi等2007 Takahashi等2007
MKK4	过氧化氢、先天性免疫、气孔发育	MEKK1-MKK4/5-MPK3/6; YODA-MKK4/5-MPK3/6	Asai等2002 Wang等2007
MKK5	过氧化氢、先天性免疫、气孔发育	MEKK1-MKK4/5-MPK3/6; YODA-MKK4/5-MPK3/6	Asai等2002 Wang等2007
MKK6	侧根形成	MKK6-MPK13	Zeng等2011
MKK7	假单胞杆菌、霜霉菌生长素极性运输	MKK7-MPK2/MPK12/MPK15	Zhang等2007 Mou等2002
MKK9	盐、乙烯、植保素合成、衰老	MKK9-MPK3/6	Alzwiy和Morris 2007 Xu等2008 Yoo等2008 Zhou等2009

2 拟南芥AtMKK1的结构特征

AtMKK1基因位于拟南芥4号染色体上, 含有8个外显子和7个内含子, 开放阅读框包含1 062个核苷酸, 编码354个氨基酸, 涵盖蛋白激酶催化域的11个保守亚域残基。预测的蛋白分子量为39.147 kDa, pH为7.53。它与AtMKK2、AtMKK6同属于A1亚组。AtMKK1的氨基酸序列的中心部位(第1到第11亚域)与各种物种的类MEK1蛋白密切相关。Bardwell和Thorner (1996)已证实MKKs的N端存在11个氨基酸序列可作为特异的、高亲和力的MAPK停泊位点。AtMKK1的氨基末端第8~15个氨基酸(PNPICLPP)组成该序列基序, 因此可能参与识别和与MAPK的结合。动物和酵母的MAPKKs在其S/TXXXS/T保守基序中的丝氨酸或丝氨酸残基被磷酸化而激活, 而在植物中如拟南芥、烟草和玉米等分离的MAPKKs在相应的位点有保守的序列S/TXXXXXS/T。AtMKK1有动物和植物MAPKKs共有的保守序列, 即T218-X-S220-X-X-X-S224, 这些丝氨酸和苏氨酸残基被上游的蛋白激酶所磷酸化(Matsuoka等2002)。在动物中首次鉴定出在MEK1、MEK2的IX-X亚域中存在富含脯氨酸的序列, 这个序列可能参与同RAF的结

合, 并且该序列在一些其他MKKs中也存在, 但是在AtMKK1、AtMKK2和烟草NPK2中不存在(Morris等1997)。

相关文献报导AtMKK1的表达量在根中最高, 在花、幼叶和幼苗中较高, 但是在莲座叶和茎叶中较低(Matsuoka等2002)。用DNAMAN 6.0软件和TMHMM Server v.2.0软件分别对AtMKK1的疏水性和跨膜区进行分析, 结果(图1和2)表明AtMKK1蛋白不存在跨膜区, 说明不是跨膜蛋白, 很可能是核蛋白或胞质蛋白。同时利用SWISS MODEL软件对AtMKK1的三级结构进行了预测(图3)。

通过Blast程序, 从GenBank检测到与AtMKK1同源性较近的一些不同植物(如烟草、水稻、玉米、番茄、苹果和欧芹)中的MAPKK基因, 利用DNAMAN 6.0软件, 对来自于不同MAPKK蛋白进行分子聚类分析, 构建了MAPKK1蛋白的系统进化树(图4)。据氨基酸序列相似性比对, 发现AtMKK1与MdMKK1相似度最高达到65.57%, 与AtMKK2、LeMKK1、PcMKK2、NtSIPKK1、OsMKK1、ZmMEK1和AtMKK6相似度分别为63.93%、63.66%、63.39%、63.11%、58.74%、52.04%和50.82%。

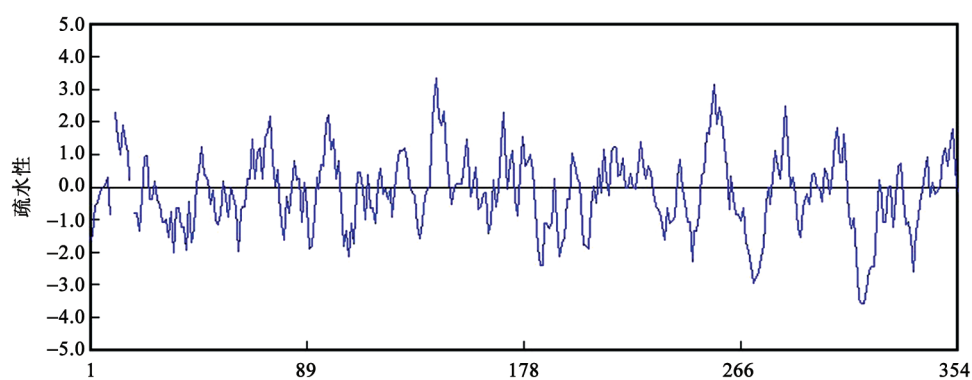


图1 AtMKK1疏水性的分析

Fig.1 Hydrophobicity plot analysis of the predicated polypeptide of AtMKK1

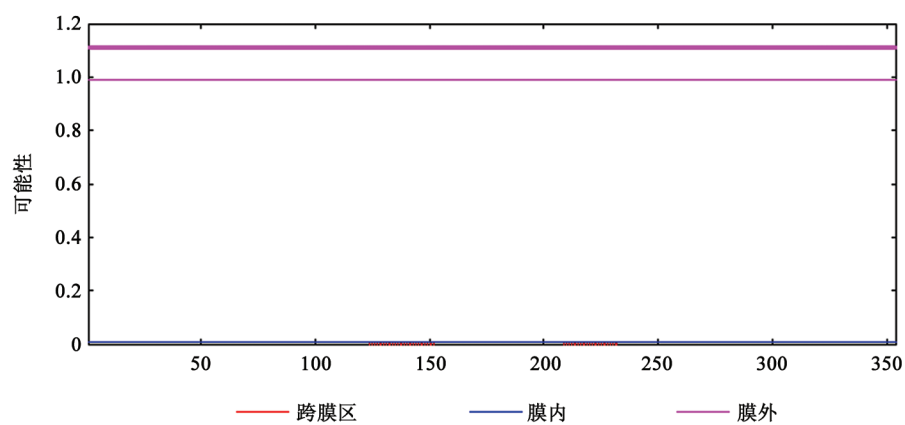


图2 AtMKK1跨膜区分析

Fig.2 Transmembrane domain analysis of AtMKK1

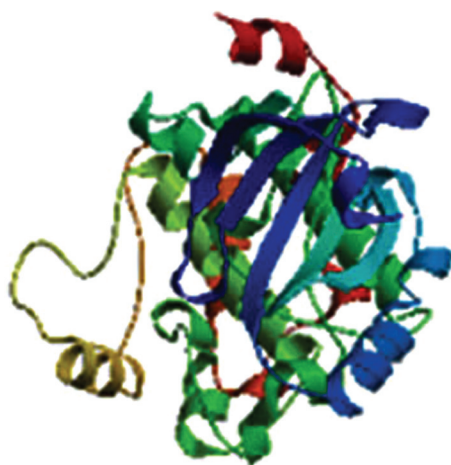


图3 AtMKK1三级结构分析

Fig.3 Tertiary structure analysis of AtMKK1

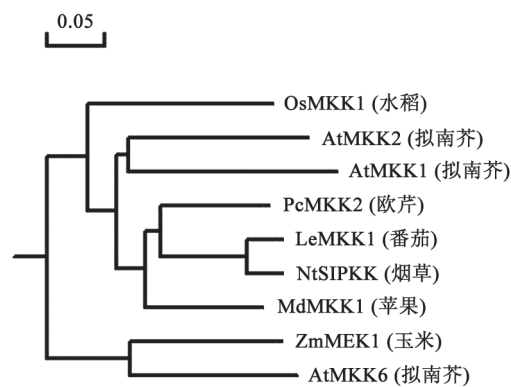


图4 AtMKK1与其他MAPKKs的系统遗传树

Fig.4 Phylogenetic relationships of AtMKK1 and other MAPKKs

3 AtMKK1参与的信号转导

植物暴露在多变的外界环境, 经常受到各种

非生物、生物以及病原菌的侵袭, 为了适应其生活环境, 植物在长期进化过程中形成了完整的信号转导机制。目前, 已经从植物中发现多个MAPK

及其级联途径, 通过感应外界刺激, 将信号放大、传递、转换, 引起一系列生理生化反应以响应这些刺激。

3.1 AtMKK1参与非生物胁迫信号转导

非生物胁迫包括温度(高温和低温)、盐分、干旱、臭氧、紫外线和渗透胁迫等。植物体内有特殊的机制可应对这些非生物胁迫。例如, 植物可以合成与抵御胁迫有关的激素如脱落酸(abscisic acid, ABA)。ABA可触发第二响应以及特殊基因的表达, 进而提高植物对非生物胁迫的耐性。

Ichimura等(1998)和Mizoguchi等(1998)利用酵母双杂交技术鉴定出植物中第一条完整的MAPK级联途径: AtMEKK1-AtMEK1-AtMPK4, 并证明其能传递干旱和机械损伤信号。并且Hadiarto等(2006)又证明AtMEKK1能与下游的MKK1和MKK2相互作用, 并更倾向于MKK1, 且这种互作只出现在损伤处理早期。此外, Huang等(2000)在体外实验同样证实了AtMKK1可以通过磷酸化AtMPK4的苏氨酸残基而将其激活。

Matsuoka等(2002)等利用免疫沉淀和免疫印迹法研究了拟南芥幼苗中AtMKK1在各种胁迫刺激如损伤、冷、干旱和高盐下的磷酸化活性。研究表明, AtMKK1的磷酸化活性可以被这些刺激诱导增强, 但AtMKK1蛋白表达水平并没有显著改变。在这些胁迫下, AtMKK1活性随时间的延长而变化。在机械损伤幼苗中, AtMKK1的活性快速、短暂地增强; 在冷害处理下, AtMKK1的活性是持续增强; 当拟南芥幼苗暴露在干旱条件下, AtMKK1的活性在30 min就达到最大程度; 用300 mmol·L⁻¹的NaCl处理拟南芥幼苗, AtMKK1的活性逐渐增强并且在2 h达最大水平。这表明, AtMKK1在非生物胁迫中的作用是通过翻译后修饰水平实现的, 而非通过诱导蛋白表达实现的。

Xing等(2007)用Northern方法检测到*Atmkk1*突变体植株中由于干旱和高盐胁迫激活的*CAT1*的表达受到抑制, 而*CAT2*、*CAT3*的表达几乎没有明显变化。MAPKK的特异性抑制剂PD98059能抑制干旱、高盐胁迫调节的*CAT1*表达, 而对*CAT2*和*CAT3*的表达没有影响。这些结果证实了AtMKK1参与干旱和盐分诱导的*CAT1*信号转导途径, 不参与*CAT2*和*CAT3*的信号转导途径。同时, 在干旱处理

下, 90%的*Atmkk1*突变体植株死亡, 高于70%的AtMKK1超表达植株仍然存活; 同样在高盐胁迫下, AtMKK1超表达植株种子萌发率高于90%, *Atmkk1*突变体种子萌发率仅20%。AtMKK1超表达植株种子在干旱和高盐胁迫下的萌发率显著高于*Atmkk1*突变体植株种子。这表明AtMKK1在干旱和高盐胁迫中起重要的作用。此外, Teige等(2004)通过体外激酶实验证实一种β-葡聚糖海带多糖可以激活AtMKK1。

3.2 AtMKK1参与生物胁迫信号转导

AtMKK1参与的生物胁迫响应主要是由病原菌引起的先天性免疫反应。MAPK级联途径在调节植物先天免疫反应中发挥着重要作用。植物通过病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)和对种族特异病原因子的识别感应病原菌, 从而产生防御机制。Flg22是来源于细菌鞭毛蛋白由一个保守的22个氨基酸组成的片段, Pep13是一个来源于大豆疫霉菌42 kDa糖蛋白的由13个氨基酸组成的寡肽, 以及真菌蛋白中一个22 kDa的木聚糖, 它们在各种植物中作为病原体相关分子模式, 诱导广泛的病原体相关反应(Boller 2005)。Flg22的受体是FLS2, FLS2携带受体激酶的特征: 一个预测信号肽、一个胞外高度保守的富含亮氨酸的受体激酶域(leucine-rich repeat receptor kinase, LRR-RK)、一个跨膜域和一个胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶域(Chinchilla等2006; Sun等2006)。据相关报道, 诱导的FLS2和brassinosteroid insensitive 1-associated kinase (BAK1)的复合物可触发MAPK级联途径(Chinchilla等2007)。

最近研究报道, 外源AtMKK1可被flg22诱导而激活, 并且确定MPK4是MKK1作用的最适底物。在flg22诱导后, 功能缺失突变体的*Atmkk1*植株中MPK4和其他2个flg22诱导的MAPKs (MPK3和MPK6)活性被削弱, *WRKY22*、*WRKY40*和*WRKY53*的表达明显上调, 一些氧化胁迫相关基因以及细胞壁相关基因的表达显著上调, 而3个鞭毛蛋白抑制的生长素响应基因表达显著下调, 这表明AtMKK1负调控鞭毛蛋白响应基因的表达。功能缺失突变体的*mkk1*植株表现出对有毒和无毒的假单胞杆菌缺乏抵抗力(Meszáros等2006)。

Ichimura等(1998)通过酵母双杂交实验在拟南

芥中证实了一条体外互作的信号通路: MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4。Gao等(2008)用双分子荧光互补实验(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)在体内证实MEKK1与MKK1/MKK2在质膜发生互作, MKK1/MKK2与MPK4在质膜和核内都发生了互作。这表明MEKK1感应上游信号起初发生在质膜, 随后通过下游激酶MKK1/MKK2和MPK4转移到核内。功能缺失的*mekk1*、*mkk1/mkk2*、*mpk4*突变体植株表现出自发的细胞死亡、病原菌相关基因的组成型表达以及对病原菌抵抗响应。此外, 被flg22激活的MPK4在*mkk1/mkk2*双突变体中活性受到削弱。研究还表明, MPK4的下游底物是MKS1和转录因子WRKY33, MPK4与具有完整N末端的MKS1、WRKY33相互作用形成三元复合物, 进而通过*PR1*基因的表达, 水杨酸的积累等来抵抗病原菌。综上所述拟南芥中存在MAPK级联途径MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4-MKS1/WRKY33, 负调控植物的先天性免疫反应(Andreasson和Ellis 2011; Qiu等2008; Rasmussen等2012)。

近期Kong等(2012)报道证实拟南芥MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4负调控免疫反应的另一机制。拟南芥*SUM1*编码MEKK2, 酵母双杂和免疫共沉淀证明了MEKK2的N端与MPK4发生互作, MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4级联途径负调控MEKK2, 但MEKK2作为SUM2介导植物先天性免疫的正调节子, 在细胞死亡和防御响应中起作用。

3.3 AtMKK1参与活性氧信号转导

活性氧(ROS)信号在植物各种生理反应中扮演重要角色, 包括病原体防御和气孔开闭(Li等2011)。另一方面, ROS产生过剩对植物的正常生长发育是有害的, 这表明植物保持一个适宜的氧化还原平衡状态是必需的。

据报道, 胁迫、SA、ROS以及MAPK级联途径是紧密联系的(Pitzschke和Hirt 2009; Nakagami等2006)。Pitzschke等(2009)证实由拟南芥中MEKK1和MPK4组成的MAPK通路可维持ROS的稳态。性状和分子分析揭示AtMKK1和AtMKK2也是这个通路的成员, 调节ROS和SA的积累。基因表达分析表明32个转录因子对由ROS引起的反应有强烈的响应, 其中20个转录因子主要通过At-

MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4通路被调控。总之, MAPK级联途径在由ROS和SA触发的胁迫信号中有重要作用。

真菌激发子Pep13、细菌激发子以及一些非生物胁迫都能够诱导植株产生ROS并激活MAPK, 而MAPK的激活反过来可以调节ROS的积累, 这样形成一个反馈环。但MAPK调节ROS的产量与ROS调控MAPK活性的机制有待进一步探究。

在氧化防御体系中, 过氧化氢酶是一种有效的H₂O₂清除剂, 在保护细胞免受氧化胁迫及控制细胞内活性氧浓度中起重要作用。Teige等(2004)通过激酶实验证实H₂O₂可以激活AtMKK1。

3.4 AtMKK1参与ABA的信号转导

ABA不仅是一种逆境激素, 在植物抗旱、抗寒、抗盐中具有重要作用, 还可以调节植物的生长发育进程, 促进种子内蛋白质和脂类的合成, 引起气孔关闭, 促进种子休眠, 抑制种子萌发及萌发后再生长, 抑制植物由营养生长向生殖生长的转变, 而且ABA还是一种重要信号分子, 将外界不良的环境刺激转化为细胞可识别信号, 诱导胁迫相关基因的表达, 引发相应的生理响应, 以对抗不良反应(Hirayama和Shinozaki 2007; Ding等2008; Liu 2012)。ABA已被证明作为一个调节许多胁迫响应的信号, 在触发H₂O₂的产生中起作用(Li等2011)。

Xing等(2008)发现拟南芥中MKK1-MPK6信号通路参与ABA调控的*CAT1*表达以及H₂O₂产生。MAPK的抑制剂PD98059能抑制ABA介导的*CAT1*表达。*CAT1*表达在*mkk1*突变体中被抑制, 而在MKK1过表达植株中显著增强, 并且H₂O₂的产量也增多。这表明ABA诱导的*CAT1*表达是受MAPK级联途径调节的, 即MKK1-MPK6-H₂O₂。H₂O₂作为这个MAPK通路的信号成分, 在逆境中起重要的作用, 并且*CAT1*在胁迫响应中的功能不仅仅是ROS清除剂, 而且在H₂O₂信号中起反馈调节作用。与*CAT1*相对, *CAT2*的表达似乎受MEKK1和MPK4的调节, 它们协同参与植物防御和SA积累(Li等2011)。

Xing等(2009)发现拟南芥MKK1-MPK6通路参与ABA诱导的种子萌发。ABA处理后, 野生型拟南芥种子的萌发严重受到抑制, 而*mkk1*、*mpk6*、*mkk1/mpk6*突变体植株表现出对ABA强烈的抗性, 相反, MKK1和MPK6过表达植株表现出对

ABA超敏感。同时研究了AtMKK1-AtMPK6通路在种子萌发后的发育(如主根的长度和幼苗的鲜重)对ABA的响应,得出相似的结果。

据报道, H₂O₂可以作为调控ABA诱导气孔关闭的第二信使(Pei等2000; Schroeder等2001)。Xing等(2007)发现在AtMKK1能够调节保卫细胞中ABA引发的H₂O₂的产生。由此进一步证实AtMKK1参与ABA诱导的气孔关闭。

3.5 AtMKK1参与糖信号转导

研究报道, ABA和葡萄糖是控制种子萌发和早期幼苗发育的重要因子(Rolland等2002), 葡萄糖相关的信号转导途径与ABA信号在多种生命进程中特别是种子萌发时功能重叠(Gibson 2005), 而且ABA和糖信号经常以一种难以理解的方式相互作用, 例如, 糖能够抑制拟南芥种子的萌发, 然而有证据表明, 施加外源糖能够缓解ABA对种子萌发的抑制效应(Dekkers等2004; Price等2003)。

Xing等(2009)提出AtMKK1-AtMPK6信号可能在糖信号调控的种子萌发中起重要作用, 用葡萄糖处理拟南芥野生型、*mkk1*、*mpk6*、*mkk1/mpk6*突变体、MKK1-OE、MPK6-OE过表达植株, 发现在种子萌发中功能缺失的*mkk1*、*mpk6*、*mkk1/mpk6*突变体表现出对葡萄糖不敏感, 相反, AtMKK1和AtMPK6超表达植株表现出对葡萄糖过敏。Xing等为了排除葡萄糖的渗透效应对种子萌发抑制的影响, 用甘露醇处理排除了这一假想。这说明葡萄糖对种子萌发的抑制效应是通过一条特异的葡萄糖信号通路。相比单突变体, 双突变体*mkk1/mpk6*表现出对葡萄糖及葡萄糖诱导的基因表达更加不敏感。这意味着AtMPK6可能不是AtMKK1参与种子萌发葡萄糖信号途径的唯一底物。与这一假设一致的是, 有报道AtMPK3参与种子萌发的调控(Laloi等2004)。但是AtMKK1与下游MAPKs相互作用的机制有待进一步研究。同时Xing等(2009)研究了AtMKK1-AtMPK6通路在种子萌发后的发育中(如主根的长度和幼苗的鲜重)对葡萄糖的响应, 并进一步研究了葡萄糖抑制种子萌发的机制是葡萄糖能够正调控一些基因(如*NCED3*和*ABA2*)的表达, 进而诱导ABA的合成。

3.6 AtMKK1参与种子萌发

据相关文献报道, 在拟南芥中ABA调节的种子休眠后再萌发或者需要后熟过程或者需要冷层

积(Bewley 1997)。Xing等(2009)通过用功能缺失型拟南芥*mkk1*、*mpk6*、*mkk1/mpk6*突变体植株探讨了层积对种子萌发的影响, 发现未经过层化处理, *mkk1/mpk6*拟南芥突变体植株种子相比野生型种子有相当高的萌发率。层积处理显著促进了野生型种子的萌发, 后熟过程同样显著地促进了野生型种子的萌发。这表明后熟和层化过程对于拟南芥*mkk1*、*mpk6*、*mkk1/mpk6*突变体种子萌发并不是必须的, 然而后熟和层积是限制野生型植株种子萌发的重要因素。

4 结语

据报道, 许多MAPK信号模型功能重叠(Kumar等2012)。植物MAPK级联途径基因模型清楚地表明, 相比其他MAPK成员, 植物利用相对较少数目的MAPKKs参与信号转导。拟南芥和水稻中MAPKKs的数目仅是MAPKs的一半。这些研究表明, 同一MAPKK可能在许多MAPK模型中起作用。MAPKKs可能就是信号聚集的“焦点”, 因为在某些信号刺激下, 它们能够激活多个MAPKs。这说明作为MAPK级联途径中心成分的MAPKKs在从MAPKKs向多种MAPKs传递信号途径中的重要性。

利用遗传分析和蛋白磷酸化及蛋白互作方法研究表明, 植物MAPKKs中相关联的成员有相似的功能和靶底物。例如, 拟南芥中A亚族的AtMKK1与AtMKK2可以激活AtMPK4, 共同参与病原菌引发的先天性免疫反应(Qiu等2008)。

随着MAPK基因的分离和鉴定, MAPK级联途径在信号转导中的作用研究不断深入, 为探究植物对逆境胁迫的响应和生长发育的分子机制提供了新的方向。MAPK级联途径参与的信号转导途径之间往往相互“交谈”构成了复杂的信号网络, 然而细胞如何调控各种信号转导的特异性, 其机理有待进一步阐明。随着研究技术的不断发展和逐步成熟, 我们需要运用更加新颖的方法和策略, 如病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)、RNA干涉(RNA interference, RNAi)技术、反向遗传学技术(reverse genetic approaches)、功能缺失/获得型突变体等; 同时运用蛋白互作的方法, 如酵母双杂交、pull-down、免疫共沉淀、蛋白质芯片、双分子荧光互补技术、结合转录组学数据及蛋白组学方法、基因敲除和基因插入等进一步

分离鉴定MAPK级联途径的上游信号分子、作用底物及调控因子,检测蛋白质的定位情况及蛋白质之间互作的发生部位等,以便充分探明MAPK级联途径的机理,并阐明其潜在的信号转导机制。

参考文献

- Alzwy IA, Morris PC (2007). A mutation in the *Arabidopsis* MAP kinase kinase 9 gene results in enhanced seedling stress tolerance. *Plant Sci*, 173 (3): 302~308
- Andreasson E, Ellis B (2010). Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends Plant Sci*, 15 (2): 106~113
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002). MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415 (6875): 977~983
- Bardwell L, Thorner J (1996). A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem Sci*, 21: 373~374
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055~1066
- Boller T (2005). Peptide signaling in plant development and self/non-self perception. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 116~122
- Brader G, Djamei A, Teige M, Palva ET, Hirt H (2007). The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20 (5): 589~596
- Champion A, Picaud A, Henry Y (2004). Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends Plant Sci*, 9 (3): 123~129
- Chen L, Hu W, Tan S, Wang M, Ma Z, Zhou S, Deng X, Zhang Y, Huang C, Yang G et al (2012). Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in *brachypodium distachyon*. *PLOS ONE*, 7 (10): 1~19
- Cheng YH, Moon BC, Kim JK, Kim CY, Kim MC, Kim IH, Park CY, Kim JC, Park O, Koo SC et al (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol*, 132: 1961~1972
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18: 465~476
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defense. *Nature*, 448: 497~500
- Dekkers BJ, Schuurmans JA, Smeekens SC (2004). Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218: 579~588
- Ding Y, Kalo P, Yendrek C, Sun J, Liang Y, Marsh JF, Harris JM, Oldroyd G (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation and in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 20 (10): 2681~2695
- Doczi R, Brader G, Pettko-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H (2007). The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell*, 19 (10): 3266~3279
- Frye CA, Tang D, Innes RW (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *PNAS*, 98: 373~378
- Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y (2008). MEK1-MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res*, 18: 1190~1198
- Gibson SI (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 93~102
- Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y, Azuma T, Yasuda T (2006). Activation of *Arabidopsis* MAPK kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta*, 223: 708~713
- Hirayama T, Shinozaki K (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci*, 12 (8): 343~351
- Huang Y, Li H, Gupta R, Morris PC, Luan Sh, Kieber J (2000). AtMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol*, 122: 1301~1310
- Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998). Isolation of AtMEKK1 (a MAP kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 253: 532~543
- Kong Q, Qu N, Gao M, Zhang Z, Ding X, Yang F, Li Y, Dong OX, Chen S, Li X et al (2012). The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (5): 2225~2236
- Kumar K, Rao KP, Sharma P, Sinha AK (2008). Differential regulation of rice mitogen activated protein kinase kinase (MKK) by abiotic stress. *Plant Physiol Biochem*, 46: 891~897
- Kumar K, Wankhede DP, Sinha AK (2012). Signal convergence through the lenses of MAP kinase: paradigms of stress and hormone signaling in plants. *Front Biol*, DOI 10.1007/s11515-012-1207-1
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004). Reactive oxygen signaling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 323~328
- Li R, Guo C, Li X, G J, L W, Xiao K (2011). Plant mitogen-activated protein kinases and their roles in mediation of signal transduction in abiotic stresses. *Front Agric China*, 5 (2): 187~195
- Liu YK (2012). Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Rep*, 31: 1~12
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004). A MAPKK kinase gene regulates extra embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*, 116: 109~119
- Matsuoka D, Nanmori T, Sato K, Fukami Y, Kikkawa U, Yasuda T (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J*, 29 (5): 637~647
- Meszáros T, Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardoczky V, Teige M, Koncz C, Peck S et al (2006). The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in

- defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J*, 48: 485~498
- Mizoguchi T, Ichimura K, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998). Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett*, 437: 56~60
- Morris PC, Guerrier D, Leung J, Giraudat J (1997). Cloning and characterization of MEK, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. *Plant Mol Biol*, 35: 1057~1064
- Mou Z, Wang X, Fu Z, Dai Y, Han C, Ouyang J, Bao F, Hu Y, Li J (2002). Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 2031~2043
- Murakami-Kojima M, Nakamichi N, Yamshino T, Mizuno T (2002). The APRR3 component of the clock-associated APRR1/TOC1 quintet is phosphorylated by a novel protein kinase belonging to the WNK family, the gene for which is also transcribed rhythmically in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 43 (6): 675~683
- Nakagami H, Kiegerl S, Hirt H (2004). OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem*, 279: 26959~26966
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Plant Sci*, 10 (7): 339~346
- Nakagami H, Soukupova H, Schikora A, Zarsky V, Hirt H (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281: 38697~38704
- Pei ZM, Murata Y, Bening G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 406: 731~734
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H (2009). A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signaling. *Mol Plant*, 2 (1): 120~137
- Pitzschke A, Hirt H (2009). Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol*, 149: 606~615
- Price J, Li TC, Kang SG, Na JK, Jang JC (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 132: 1424~1438
- Qiu JL, Zhou L, Yun BW, Nielsen HB, Fiil BK, Petersen K, Mackinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC (2008). *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol*, 148: 212~222
- Rao KP, Richa T, Kumar K, Raghuram B, Sinha AK (2010). *In silico* analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase gene family in rice. *DNA Res*, 17: 139~153
- Rasmussen MW, Roux M, Petersen M, Mundy J (2012). MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Front Plant Sci*, 3 (169): 1~6
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14: S185~S205
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 621~649
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001). Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410: 327~330
- Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behavior*, 6 (2): 196~203
- Sun W, Dunning FM, Pfund C, Weingarten R, Bent AF (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2*-dependent defenses. *Plant Cell*, 18: 764~779
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 805~818
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 15 (1): 141~152
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (1): 63~73
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 283 (40): 26996~27006
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2007). AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 58 (11): 2969~2981
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 54: 440~451
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2009). AtMKK1 and AtMPK6 are involved in abscisic acid and sugar signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Mol Biol*, 70: 725~736
- Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signaling. *Nature*, 451 (7180): 789~795
- Zeng Q, Sritubtim S, Ellis BE (2011). AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behavior*, 6 (10): 1436~1439
- Zhang X, Dai Y, Xiong Y, DeFraia C, Li J, Dong X, Mou Z (2007). Overexpression of *Arabidopsis* MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *Plant J*, 52 (6): 1066~1079
- Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S (2009). An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiol*, 150: 167~177