

## 植物微丝骨架动态变化的调节

陈琼<sup>1</sup>, 黄善金<sup>2</sup>, 于荣<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; <sup>2</sup>中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100049

**摘要:** 由球形肌动蛋白聚合而成的微丝骨架, 又称肌动蛋白纤维, 它在细胞运动、细胞形态建成以及物质运输等诸多生命活动中发挥重要作用。细胞内微丝的解聚和聚合动态特性是微丝骨架行使功能的重要基础, 并受到如微丝结合蛋白、金属离子、小G蛋白等各种因素的严格控制。植物细胞微丝骨架的研究虽然晚于动物细胞, 但也取得了飞速发展。本文对植物细胞内微丝骨架动态变化的作用机制及一些主要调节因子的最新研究进展做一介绍。

**关键词:** 微丝动态变化; 微丝结合蛋白;  $Ca^{2+}$ ; 小G蛋白; 肌醇磷脂

## Regulation of Plant Actin Dynamics

CHEN Qiong<sup>1</sup>, HUANG Shan-Jin<sup>2</sup>, YU Rong<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** The actin cytoskeleton (microfilament, MF), also known as F-actin, is a filamentous polymer built from globular monomers called G-actin. It plays an important role in cell motility, cell morphogenesis, intracellular transport and many other life activities. It was found that the depolymerization and polymerization of actin dynamics could very well contribute to these cellular functions, and were strictly regulated by actin-binding proteins, metal ions, small G proteins, etc. It is now well agreed that following the numerous studies of animal microfilaments, the understanding of plant actin dynamics also has made a rapid progress. In this review, the regulating mechanism of plant actin dynamics would be discussed thoroughly.

**Key words:** actin dynamics; actin binding proteins; calcium ion; small G protein; phosphoinositide

### 1 微丝骨架(microfilament, MF)动态变化

微丝又称肌动蛋白纤维(filament actin, F-actin), 是细胞骨架的主要成员, 广泛存在于真核细胞中。肌动蛋白单体(global actin, G-actin)是构成微丝的基本单位, 多个 G-actin 按照一定方式聚合形成微丝, 二者处于聚合和解聚的动态平衡过程中。植物细胞内微丝骨架的功能是多种多样的, 在胞质环流、花粉管萌发、气孔运动、物质运输、内吞和外分泌等过程中均起着重要作用。微丝骨架解聚和聚合的动态变化是实现这些功能的关键。

在体外, 肌动蛋白聚合成微丝的动力学过程可以分为 3 个阶段, 即成核期(nucleation phase)、生长期(growth phase)及平衡期(equilibrium phase)。肌动蛋白在成核期开始聚合, 该时期也是整个组装过程的关键时期。起始时, G-actin 缓慢聚合形成一个较短的由 3~4 个亚基组成的寡聚体, 以此作为微丝组装的“种子”或“核心”(nucleus), 进入快速生长期。生长期肌动蛋白聚合成微丝片段时, 形

如箭头, 其一端被称为负端(pointed end), 另一端被称为正端(barded end)。微丝正端的聚合速度明显快于负端, 因为微丝的生长延长主要受 ATP 的调节, 一分子 G-actin 可结合一分子 ATP, 形成 ATP-actin, 它对微丝的正端有更高亲和力, 使正端生长聚合速度快于负端。ATP-actin 聚合到微丝纤维上, 成为 F-actin 后, ATP 随后水解为 ADP, ADP-actin 则容易发生脱落、解聚。最终, 整个体系会达到一个稳定状态, 即平衡期。此时, G-actin 加到微丝上的聚合速率与微丝解聚速率相等, 微丝的总长度维持相对稳定。

肌动蛋白的解聚并不是简单的聚合的逆过程, 这是因为肌动蛋白不能简单地由 ADP-actin 结合 Pi 转变成 ATP-actin。取而代之的是, 游离的 ADP-

收稿 2010-10-22 修定 2010-12-28

资助 国家自然科学基金(30870137)。

\* 通讯作者(E-mail: yurong@mail.cun.edu.cn; Tel: 010-68901692)。

actin在溶液中将结合的ADP迅速交换成ATP, 而这个过程可以由肌动蛋白结合蛋白(actin binding proteins, ABPs) profilin 加速其进行(Dos Remedios 等 2003)。很多 ABPs 对微丝的聚合和解聚过程有着重要的调节作用。此外, 由于微丝的聚合需要在高于一定的 G-actin 浓度(临界浓度)条件下才能发生, 因此, 细胞中 G-actin 的浓度对于微丝骨架也有一定作用。本文将从 ABPs、Ca<sup>2+</sup>、小 G 蛋白及磷酸肌醇信号分子等几方面进行具体论述。

## 2 微丝骨架动态变化的调节

### 2.1 ABPs

与肌动蛋白结合的大量蛋白统称为 ABPs。微丝骨架通过 ABPs 来调节其解聚和聚合的动态变化, 进而对胞内外信号做出快速反应, 参与细胞的许多生理活动。

Dos Remedios 等人(2003)报道了 162 种不同的结合蛋白存在。根据 ABPs 的不同功能, 可以简单将 ABPs 分为 7 类: (1) 单体结合蛋白, 隔离 G-actin, 抑制微丝聚合, 如 thymosin  $\beta$ 4 和 DNase I; (2) 微丝解聚蛋白, 诱导 F-actin 向 G-actin 转化, 如 cofilin; (3) 微丝末端结合蛋白, 给微丝末端加帽, 阻止在微丝负端和正端进行的单体交换, 如 CapZ; (4) 微丝切割蛋白, 通过结合到 F-actin 的一侧将其切割成两段, 减小微丝的平均长度, 如 gelsolin 和 ADF/cofilin; (5) 交联蛋白, 包含至少两个与 F-actin 结合的位点, 更有利于形成微丝束、分枝微丝和三维网络, 如 Arp2/3; (6) 稳定蛋白, 结合到 F-actin 的侧面, 防止解聚的发生, 如 tropomyosin; (7) 马达蛋白, 以微丝为轨道, 在微丝上面移动, 如 myosin 家族。ABPs 不只限于一种分类, 例如 gelsolin 具有切割微丝的功能, 同时也具有给微丝正端加帽的能力; Arp2/3 复合体可使微丝成核、延伸, 并且也在肌动蛋白网络中建立分枝点。在这里我们对其中 4 个常见的结合蛋白进行介绍。

**2.1.1 profilin** profilin 是一种广泛存在于真核细胞中的高度保守的肌动蛋白单体结合蛋白, 分子量为 12~15 kDa, 1991 年 Valenta 在研究赤杨(*Betula verrucosa*)花粉的过敏源时首次在植物中发现。

高等植物中, profilin 分为两类, I 型与生殖相

关, II 型与生长相关, 它们的氨基酸序列有 27% 的差异。采用 RNA 分析、融合启动子及单克隆抗体技术, 对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生长及生殖过程中 profilin 进行研究, 证明拟南芥中 2 种 profilin (PRF4 和 PRF5) 主要在成熟花粉中表达, 而另外 3 种 profilin (PRF1、PRF2、PRF3) 则在几乎所有器官和组织中都表达(Kandasamy 等 2002)。

在动物中的研究发现 profilin 具有两种不同功能。在成核阶段, profilin 通过结合 G-actin 单体阻止肌动蛋白自发成核, 从而抑制微丝的聚合。延伸阶段, 如果微丝正端被加帽蛋白(如 CapZ)加帽, profilin 仅有稳定游离 G-actin 单体库数量的作用; 如微丝正端未被加帽, profilin 则可促进 G-actin 上核苷酸的交换, 结合 ATP-actin 的 profilin 集中在微丝正端聚合的区域, 促进单体结合到微丝上使微丝生长, 其聚合速率可达到每秒约 500 个 G-actin。

在植物方面, 1996 年 Christensen 等和 Karakesisoglou 等分别发现, 拟南芥及玉米(*Zea mays*)花粉的 profilin 可对基因敲除的酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)突变体进行功能互补, 表明虽然只有 25%~30% 氨基酸序列相同, 植物 profilin 很可能也具有非植物 profilin (non-plant profilin) 功能。与非植物系统相同的是, 植物 profilin 也具有抑制微丝聚合的作用, 它与 G-actin 以 1:1 的比例形成复合体, 可封存 G-actin, 从而抑制微丝的聚合。但是尚未发现植物 profilin 具有促进核苷酸 ATP/ADP 交换的功能。Perelroizen 等(1996)利用 PLP 凝胶层析柱(poly-L-proline sepharose column)纯化得到大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达的拟南芥 profilin 蛋白, 该蛋白就不能促进脊椎动物肌动蛋白核苷酸的交换。

除结合 G-actin 外, profilin 也可与磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>)及富含脯氨酸的蛋白结合, 它们都与信号转导系统有关。这些细胞信号可影响 profilin 对微丝骨架的调节功能, 详见 2.2.3 节。

另一方面, profilin 除可继续调节肌动蛋白动态变化外, 也有研究表明这类 profilin 还可以反馈调节一些信号分子。2000 年, Kovar 等发现玉米的两类

profilin 中, I 型 profilin 对于蚕豆(*Vicia faba*)质膜上的磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)有明显抑制作用。除了肌醇磷脂外, 蛋白磷酸化可能是 profilin 的另一种调节方式。1999 年 Guillen 和他的同事首次证明 profilin 在体外可发生磷酸化, 蚕豆幼苗 profilin 的磷酸化主要发生在酪氨酸残基上。Aparicio-Fabre 等(2006)利用提取混合根瘤菌(*Rhizobia*)培养的生长 18 d 的蚕豆幼苗 profilin 蛋白进行体外结合实验, 结果表明, profilin 分子中与富含脯氨酸蛋白结合的结构域中, 酪氨酸残基的磷酸化状态对 profilin 与 III 型磷酸肌醇 3- 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)能否形成复合体起决定作用。而 III 型 PI3K 复合体是植物细胞膜泡运输过程的调节因子, 因此通过形成 profilin-PI3K 复合体, profilin 将微丝骨架动态变化与内吞作用联系起来。

**2.1.2 ADF/cofilin 家族(actin-depolymerising factors/cofilin)** ADF/cofilin 是分子量为 15~22 kDa 的 ABPs 家族, 在所有真核细胞中都表达, 并且植物细胞中含量更为丰富。拟南芥悬浮细胞中, ADF/cofilin 与肌动蛋白以 1:1 比例存在, 叶片中则为 1:3 (Staiger 和 Blanchoin 2006)。ADF/cofilin 既可以结合 G-actin, 也可以结合 F-actin, 具有解聚微丝负端、切割微丝的功能。

ADF/cofilin 可以加速微丝负端的解聚, 进而提高微丝的周转速率。其原因是, 与 ATP-actin 相比, ADF/cofilin 更易结合 ADP-actin, 因此 ADF/cofilin 并不能结合在富集 ATP-actin 的生长活跃的正端, 只有当 ATP 被水解、磷酸基团释放后, ADF/cofilin 才能与 ADP-actin 迅速结合。McCurdy 等(2001)通过电镜观察发现, ADF/cofilin 可快速结合有 ADP-actin 聚集的生长缓慢的微丝负端, 使微丝的每个肌动蛋白单位均产生 5° 弯折的构象变化, 研究者推测正是由于这一变化, 使 ADF/cofilin 具有解聚微丝负端的能力。ADF/cofilin 不仅可以促进 ADP-actin 单体从微丝上解离下来, 还可结合到释放的 ADP-actin 单体上, 抑制 ADP 与 ATP 的交换。

ADF/cofilin 的另一关键功能是切割微丝, 产生新的开放末端, 被认为是形成微丝网络的原因; 当然, 如果新的微丝末端被其他蛋白迅速加帽封住, 则

结果不同。除直接作用微丝骨架外, ADF/cofilin 也可以防止其他蛋白(如拟南芥中的成束蛋白 VILLIN1) 结合、解聚微丝。2001 年, Dong 等人在拟南芥中发现, 过量表达肌动蛋白解聚因子 1 (ADF1), 细胞内微丝束长度以及数量减少, 植物生长受到抑制。Augustine 等(2008)利用 RNAi 技术在小立碗藓(*Physcomitrella patens*)中发现, 缺失 ADF 同样会导致植株顶端生长受抑制, 微丝骨架结构发生以下明显变化: 野生型小立碗藓原丝体顶端表皮细胞中, 微丝束相互平行, 构成精细的流苏状 “fringe” 结构, “fringe” 之后, 微丝紧紧围绕叶绿体呈纵向排列; 而突变体中未见到微丝呈 “fringe” 组织排布, 取而代之的是若干个由一点发出的辐射状 “star” 结构, 以及微丝横向贯穿细胞的现象。进而用野生型 ADF 进行互补实验, 发现此时突变体可恢复微丝骨架正常排布, 顶端生长也重新趋于正常, 证明 ADF 对调节细胞内微丝的组织行为有着至关重要的作用。

ADF/cofilin 调控受许多因素调节, 如蛋白磷酸化、pH 和磷酸肌醇。1993 年, Morgan 等研究发现, N 末端 Ser 磷酸化使 ADF/cofilin 活性下降, 对肌动蛋白的亲合性明显降低, 并且不再抑制 G-actin 所结合的 ATP/ADP 的交换, 表明 ADF/cofilin 磷酸化状态对胞内微丝骨架重组起重要调节作用。2008 年, Augustine 等人对小立碗藓进行 ADF 磷酸化位点突变及互补实验时发现, 未发生磷酸化的突变体(S6A)能够产生微丝结构正常的植株, 而发生磷酸化的突变体(S6D)则出现极性消失且微丝排布紊乱的植株。实验证明 ADF 6 位丝氨酸的磷酸化对其行使功能, 与肌动蛋白共同调节植物顶端生长有重要作用。

pH 是影响 ADF/cofilin 与肌动蛋白结合的另一因素。低 pH 值时, ADF/cofilin 主要结合 F-actin, 高 pH 值则结合单体 G-actin。如玉米根中的 ZmADF3 提取物在 pH 6.0 时仅结合 F-actin, pH 9.0 时结合 G-actin (Gungabissoon 等 1998)。此外, pH 6.0 时, 拟南芥生长 10 d 的幼苗中 ADF/cofilin 结合 F-actin; pH 高于 7.4 时, 结合 G-actin (Yi 等 2005)。

PIP<sub>2</sub> 与 ADF/cofilin 的相互影响表现在两个方面, 详见 2.2.3。

**2.1.3 Arp2/3 复合体** 植物 Arp2/3 复合体是在对拟南芥基因组分析时首次发现的, 是由 7 个亚基组成的蛋白复合物, 这 7 个亚基包括两种肌动蛋白相关亚基 Arp2、Arp3 以及 5 种其他小蛋白(Arc)亚基 ARPC1、ARPC2、ARPC3、ARPC4、ARPC5。Arp2/3 复合体在体内和体外都可以促使肌动蛋白成核, 形成微丝侧枝, 进而连成微丝网络。

1997年 Welch 首先在李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)中观察到由 WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) 参与的 Arp2/3 诱导微丝成核的过程。胞外信号(如生长因子)通过 G 蛋白耦联受体激活 WASP, PIP<sub>2</sub> 也可能参与其中。被激活的 WASP 与 G-actin 及 Arp2/3 结合, Arp2/3 相当于提供了一个使微丝能够稳定生长的“核”结构, 新生微丝以此为生长点迅速聚合。此时至少有一个 Arp 亚基改变构象协助子微丝结合到原微丝上, 形成微丝侧枝。新的未被加帽蛋白加帽的子微丝负端与原微丝呈 70° 斜角结合, 留下生长的正端用来延伸, 这样就构成了微丝网络结构(Mathur等2003; Volkmann等2001)。

在动物及真菌中, Arp2/3 复合体受多种蛋白调节, 如 WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein)/SCAR (suppressor of cAMP receptor) 家族都可激活 Arp2/3。WAVE/SCAR 家族蛋白 C 端都包含 VCA (verprolin, central, acidic) 结构域, 被小 G 蛋白(cdc42等)激活的 WAVE/SCAR 可结合肌动蛋白单体(通过 V 域)及 Arp2/3 复合体(通过 CA 域)共同构成一个三重复合体, 肌动蛋白在此基础上生长成侧枝最终连成微丝网络(Stradal 和 Scita 2005)。VCA 结构域的磷酸化状态对其结合 Arp2/3 复合体有调节作用, 如 VCA 结构域中的丝氨酸发生磷酸化则可加强对 Arp2/3 的亲合性(Cory 等 2003)。

目前由于尚未找到适合的纯化材料, 使得对植物 Arp2/3 复合体的研究显得较为匮乏。利用动物 Arp2/3 的同源物互补拟南芥突变体, 及植物 Arp2/3 同源物互补酵母突变体发现, 动植物细胞中 Arp2/3 的功能是高度保守的(Mathur 2005)。在植物中, SCAR 是目前唯一被证实的 Arp2/3 复合体的激活因

子(Uhrig 等 2007)。2003 年 Mathur 等人研究发现, *Wurm* 和 *Distorted1* 基因分别编码拟南芥 Arp2 和 Arp3 蛋白, 这两个基因的突变会使植株出现叶表皮细胞随机伸展、根毛细胞弯曲等生长异常现象。玉米 *brk1* 突变体与之有相同的表型, 即叶表皮细胞裂叶(lobe)形成减少, 气孔副卫细胞由三角形变为不规则形态(Frank 和 Smith 2002)。El-Assal 等人(2004)在拟南芥 *grl* 和 *klk* 突变体中也发现与 Arp2/3 突变体的表型相似的表皮毛弯曲现象, 由此推测这两个基因产物参与 Arp2/3 复合体调节通路。2003 年, Li 等用 T-DNA 插入方法研究发现, 拟南芥 Arp2/3 通过决定细胞极性、调节细胞极性生长来控制细胞的形态发生, 其突变体叶表皮细胞及一些下胚轴表皮细胞生长异常, 细胞微丝排布散乱, 产生微丝小片段, 微丝横向连接增加, lobe 生长受到抑制。以上研究表明, Arp2/3 通过影响微丝骨架排布, 在维持植物细胞形态建成中有重要作用。

**2.1.4 凝溶胶蛋白(gelsolin)** gelsolin 属于肌动蛋白结合蛋白 villin/gelsolin/fragmin 超级家族, 该家族成员具有微丝封端功能, 其中一些还具有切割微丝(gelsolin、villin、fargmin)、促进微丝成束(villin)或成核(gelsolin、villin、fargmin)的作用。gelsolin 是该家族第一个被鉴定的成员, 也是目前发现的唯一对微摩尔浓度 Ca<sup>2+</sup> 依赖的 ABPs, 其分子量为 82~84 kDa, 由 6 个 gelsolin-like (G) 同源的结构域构成 (G1~G6), 具有切割、封端、成核多种功能, 在所有真核生物中均有表达。

已有大量文献报道动物 gelsolin 具有切割微丝的功能。Huang 等(2004)从虞美人(*Papaver rhoeas*)花粉中分离得到 80 kDa 的肌动蛋白相关蛋白(PrABP80), 质谱分析、序列比对及功能分析结果显示无论是分子量还是其所具有的功能, PrABP80 均与动物 gelsolin 一致, 属于植物中的 gelsolin。这是首次发现植物中的 gelsolin 蛋白, 并证明该结合蛋白可以对微丝进行有效切割。同时, gelsolin 的切割功能受 Ca<sup>2+</sup> 的调控, 当 gelsolin 结合 Ca<sup>2+</sup> 时, gelsolin 切割微丝的活性被激活, gelsolin G6 结构域发生翻转, 打破 G4 与 G6 的连接结构, 使得 G4 上的肌动蛋白结合位点暴露出来, 从而进一步结合微丝, 进行切割

和封端(Robinson 等 1999)。

并非所有人都认为 gelsolin 的主要功能是切割微丝, Gremm 和 Wegner (2000) 将  $\text{Ca}^{2+}$  浓度控制在一定范围( $0.05\sim 1.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )内, 向  $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的聚合微丝中加入不同浓度( $25\sim 100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 gelsolin, 随着 gelsolin 浓度的增加微丝发生解聚现象。这是由于 gelsolin 可作为加帽蛋白结合在微丝的正端, 其封端功能可以抑制微丝正端快速增长, 而此时微丝负端的解聚继续进行, 结果导致微丝整体迅速崩解。同时还发现 gelsolin 在微丝正端的加帽速率与游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成比例, 随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高, 加帽速率增加。 $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $0.095\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 加帽速率常数(rate constant)为  $5000\ \text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $0.26\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 加帽速率常数为  $12000\ \text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $1.33\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 加帽速率常数为  $60000\ \text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。由此研究者认为, 在微摩尔和亚微摩尔的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度条件下, gelsolin 的功能更像是一种受  $\text{Ca}^{2+}$  调控的加帽蛋白。当然, 微丝上 gelsolin 加帽是可逆的, 可以被移除, 在 G1-G2 结构域交界面的附近位点通过 gelsolin 与多聚磷酸肌醇(polyphosphatidylinositol, PPIs)间的相互作用能诱导 gelsolin 与微丝发生分离, 即从微丝上解离下 gelsolin, 使微丝正端暴露出来, 再次启动肌动蛋白的聚合(Su 等 2007)。

除具有切割、封端功能外, gelsolin 还具有成核作用。微丝早期的研究结果显示 gelsolin 可与两分子的 G-actin 结合形成复合体, 该复合体可作为微丝聚合所需的稳定的“核”结构启动微丝的聚合。gelsolin 通过消除成核延迟期(lag phase)来发挥其成核、聚合的作用, 高浓度的 gelsolin 及微摩尔范围内的  $\text{Ca}^{2+}$  甚至可使成核延迟期消失(Yokota 等 2005)。

## 2.2 信号分子

### 2.2.1 $\text{Ca}^{2+}$

早在 1987 年, Kohno 和 Shimmen 使用一种  $\text{Ca}^{2+}$  载体 A23187 处理麝香百合(*Lilium longiflorum*)花粉管, 观察到微丝发生了明显断裂, 由此推测  $\text{Ca}^{2+}$  可能参与调节微丝骨架动态变化, 这是关于  $\text{Ca}^{2+}$  对微丝骨架调节的最早研究结果。直到 2004 年 Huang 等通过荧光显微镜直接观察到了罂粟花粉的微丝结合蛋白 PrABP80 能够在  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$  条件

下切断微丝, 首次证明了植物微丝结合蛋白可在体外对 F-actin 进行有效切割, 并且活性受  $\text{Ca}^{2+}$  调节。

目前发现  $\text{Ca}^{2+}$  对微丝骨架动态分布的调控主要有两种方式, 一种是直接作用于微丝结合蛋白, 如 profilin、gelsolin 及成帽蛋白(capping protein)。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高时, profilin 可以封存更多的 G-actin 单体, 使得 profilin-actin 结合到微丝上的能力下降, 微丝聚合减少。 $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, gelsolin 表现出切割活性; 当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $10\sim 100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时它仅具有封闭微丝末端的功能。成帽蛋白则可在  $\text{Ca}^{2+}$  条件下发挥封端功能, 阻断微丝正端的聚合反应, 其成核作用得到促进, 产生较多新的核来竞争游离的单体(Huang 等 2004)。

$\text{Ca}^{2+}$  调控的另一种方式是通过钙调素(CaM)作用于微丝结合蛋白, 来实施对微丝骨架的调控。当有  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 存在时, 百合花粉 villins 蛋白家族中的 P-135-ABP 可以与 G-actin 形成复合体, 缩短肌动蛋白单体起始聚合时的延迟期, 加速微丝聚合, 促进花粉管基部(basal)及中部区域(shank region)微丝成束。但在花粉管顶端约  $20\ \mu\text{m}$  的区域内, 该处具有相对高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, 增强 villins 解聚、切割微丝的活性, 对顶端微丝产生抑制作用(Yokota 等 2005)。在应用外源 CaM 诱导拟南芥气孔关闭实验中, CaM 使保卫细胞的微丝骨架由长而辐射状分布的聚合态逐步发生解聚, 气孔关闭。外源 CaM 能明显诱导保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高, 用  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA 将游离  $\text{Ca}^{2+}$  螯合掉后, 外源 CaM 诱导的气孔关闭作用被抑制。由此推测保卫细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  可能是细胞外 CaM 调控微丝骨架解聚的信号转导中的一个重要的上游组分。此外, 微丝解聚剂细胞松弛素 D (CD) 和微丝骨架稳定剂 phalloidin 也可影响外源 CaM 诱导气孔关闭过程。药理学实验发现, 单独用  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CD 和  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  phalloidin 处理拟南芥表皮条, 对气孔的开关运动没有明显的影响; 但 CD 能明显促进  $10^{-9}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  外源 CaM 诱导的气孔关闭, CD 与 CaM 共同处理 20 min 时气孔孔径下降了 58%, 而仅用 CaM 处理的气孔孔径只下降了 22%; 同样, phalloidin 与 CaM 共同处理叶片表皮条 60 min 时, 气孔孔径仅下降了 25%, 而对照

(+CaM)此时的气孔孔径减少了70%。表明保卫细胞微丝骨架的解聚能明显地促进外源CaM诱导的气孔关闭运动,微丝的聚合则抑制这一过程(肖玉梅等2004)。

随着研究的逐步深入,人们发现微丝骨架的动态变化反过来也可调节胞内Ca<sup>2+</sup>的浓度。利用一种Ca<sup>2+</sup>荧光指示剂(Fluo 3-AM)研究肌动蛋白动力学对蚕豆保卫细胞Ca<sup>2+</sup>浓度的影响时发现,对照条件下蚕豆原生质体荧光状态稳定,加入20 μmol·L<sup>-1</sup> CD处理20 min使微丝发生解聚后, Ca<sup>2+</sup>浓度增加,但加入100 μmol·L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>通道抑制因子(Gd<sup>3+</sup>)后, CD引起的荧光增强被削弱,显示微丝解聚可能会激活质膜上的Ca<sup>2+</sup>通道,引起Ca<sup>2+</sup>内流,使胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加,荧光强度增大(Zhang等2007)。

**2.2.2 小G蛋白超家族** 小G蛋白超家族是单体鸟嘌呤核苷GTP结合蛋白,分子量较小,为20~30 kDa,区别于异三聚体G蛋白,人们通常称之为小G蛋白。该家族成员都具有保守的结构特征,包括4个GTP结合域和一个效应器分子结合域。小G蛋白家族至少分为5个亚家族,包括Ras、Rho、Rab、Arf和Ran,每个亚家族在细胞中起着不同的作用。其中,Rho家族成员被认为是小G蛋白家族中调控微丝骨架及细胞极性生长的重要因子。根据生理功能和序列同源性,Rho GTPase又主要分为3个亚家族:Rho、Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate)和cdc42 (cell division cycle 42)。Rho和cdc42存在于酵母及多种动物中,Rac仅在动物中发现。豌豆中首次鉴定出与Rho GTPase相关的蛋白(Rho-related GTPases),它们的氨基酸序列与Rho亚家族有45%~64%的同源性,与其他成员有30%相同。继此之后,Rho-related GTPases已被证实在大量的植物中都存在,它们其中的一个主要生理功能便是调控微丝骨架的形成及细胞信号转导。通过系统发生学分析(phylogenetic analysis)证明这些由Rho、Rac或cdc42 GTPases进化而来的Rho-related GTPases属于一个特定的家族,因为这类亚家族迄今只在植物中发现,所以命名为ROP (Rho-related GTPase from plants),拟南芥中存在11个ROP GTPase,在玉米中则至少存在9个(王昕和

种康2005; Yang 2002)。

拟南芥ROP1~ROP6在肌动蛋白动力学、极性生长、根毛发育中发挥不同作用。其中ROP1和ROP5优先定位于花粉管顶端区域的质膜,调控花粉管顶端生长;ROP2和ROP4定位于伸长的根毛尖端,调节根毛生长;ROP1、ROP3和ROP5在花粉粒中表达,在花粉管生长中起作用(Jones 2002; Li等1999)。最近研究结果表明,激活的ROPs可以促进烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉管顶端的微丝动态组装及形成Ca<sup>2+</sup>浓度梯度,而这两个过程对于花粉管的生长至关重要。顶端肌动蛋白组装成微丝纤维,构成膜泡运输的轨道,蛋白质、脂类等生物大分子装载于膜泡中沿微丝轨道运送到生长位点;随后Ca<sup>2+</sup>的积累可调节膜泡与顶端的质膜发生融合,使生物大分子顺利从运输小泡中卸载于目的地(Yang 2002)。Gu等(2005)对拟南芥控制花粉管极性生长的两个ROP受体RIC3 (ROP-interactive CRIB motif-containing protein 3)和RIC4进行结构、功能分析发现,ROP1可激活受体RIC3引起花粉管顶端区域Ca<sup>2+</sup>的积累,激活RIC4则引起微丝的聚合。在根毛生长过程中,ROPs也以相同的调节方式参与其中。

除通过信号转导通路调控微丝骨架外,ROPs也可与微丝结合蛋白发生相互作用。由ROP活性增强引起的拟南芥花粉管去极性生长现象可被提高的ADF水平所削弱。当ADF第6位丝氨酸突变为丙氨酸时,其削弱ROPs的能力以及与肌动蛋白结合的能力均增强,但phospho-mimicking突变可抑制该情况的发生,这说明ADF的磷酸化状态在其与ROPs的相互作用中具有举足轻重的地位(Nibau等2006; Fu等2005)。

**2.2.3 肌醇磷脂信号系统** PIP<sub>2</sub>是肌醇磷脂信号系统的重要组成成分之一,在微丝骨架的动态调节方面,PIP<sub>2</sub>主要是使微丝维持聚合状态,参与微丝与质膜的相互作用以及微丝骨架排布的重建。

PIP<sub>2</sub>可以多种方式促进微丝的聚合:(1)激活N-WASP及Arp2/3。PIP<sub>2</sub>是N-WASP的激活因子,在PIP<sub>2</sub>作用下Arp2/3可与N-WASP C端VCA结构域

结合,增加Arp2/3对微丝的亲和力并激活成核和分枝活性,促进微丝的聚合。N-WASP还可结合活化态的小G蛋白Cdc42,然后再由此促进Arp2/3调节的微丝装配(Suetsugu等2001)。(2)结合并削弱微丝切割蛋白的活性。PIP<sub>2</sub>可与具有切割微丝功能的微丝结合蛋白如profilin、gelsolin、ADF/cofilin结合,抑制它们与肌动蛋白的结合,削弱对微丝的解聚能力。如结合PIP<sub>2</sub>后,profilin则不能与G-actin结合,这使得profilin对微丝聚合的抑制作用下降。PIP<sub>2</sub>与ADF/cofilin的相互影响表现在两个方面:一方面,磷脂酰肌醇-4-磷酸(phosphatidylinositol-4-phosphate, PIP)及PIP<sub>2</sub>可抑制ADF/cofilin活性,玉米ZmADF3在有PIP和PIP<sub>2</sub>条件下,活性降低2%~17%;另一方面,ZmADF3反过来可抑制催化PIP<sub>2</sub>水解的PLC的活性,50 μmol·L<sup>-1</sup> PIP<sub>2</sub>条件下,蚕豆叶片质膜上PLC的活性随ZmADF3浓度的升高而下降,当加入2 μmol·L<sup>-1</sup> ZmADF3时,PLC活性下降50% (Gungabissoon等1998)。(3)促进CapG等加帽蛋白与G-actin解离,保持微丝正端的开放状态,使单体不断装配到未被封闭的微丝末端,微丝迅速生长延伸(Logan和Mandato 2006)。

除影响微丝的聚合,PIP<sub>2</sub>还可以调节微丝与微丝之间的连接以及微丝与质膜间的固着。例如,PIP<sub>2</sub>既可提高交联蛋白α-actinin与微丝的连接能力,在微丝之间形成横桥,连接成束;也可促进vinculin、talin和ERM (ezrin/radixin/moesin)家族蛋白发生构象变化,以便将微丝骨架锚定在质膜上(Sechi和Wehland 2000)。

信号分子PIP<sub>2</sub>在PLC作用下可被分解为1,4,5-三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-trisphosphate, IP<sub>3</sub>)及二酰基甘油(diacylglycerol, DAG),其分解产物也参与微丝骨架的动态调节。一方面,PIP<sub>2</sub>水解后使profilin重新得到释放,与G-actin结合的几率提高,抑制G-actin单体聚合形成微丝。另一方面,IP<sub>3</sub>增加胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度,当Ca<sup>2+</sup>浓度升高时,profilin可封存更多的G-actin,以及可激活切割蛋白(如gelsolin和cofilin)的切割功能,从多个途径来减少微丝聚合,使微丝网络结构发生解聚和片段化。反过来, Ca<sup>2+</sup>在PLC水解PIP<sub>2</sub>的过程中也有一定的负调

控作用。在拟南芥种子萌发过程中,ABA诱导PLC-IP<sub>3</sub>信号途径是一个对Ca<sup>2+</sup>依赖的途径,AtPLC1基因的表达需要胞质中Ca<sup>2+</sup>的增加来激活,但Ca<sup>2+</sup>的浓度增至毫摩尔水平时,PLC的优先底物则由PIP<sub>2</sub>变为PIP,不再生成IP<sub>3</sub> (Saunders等2002)。这种作用在对水稻(*Oryza sativa*)糊粉层细胞研究中也得到证明(Kashem等2000)。DAG在膜上可激活蛋白激酶C (protein kinase C, PKC), PKC使既结合质膜又结合微丝的底物MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)发生磷酸化,磷酸化的MARCKS仍与微丝结合但脱离质膜,其结果是微丝骨架结构刚性下降;反之,去磷酸化的MARCKS可交联微丝,将其固定于膜上(McCurdy等2001)。PKC通过磷酸化,调节一系列蛋白的活性,如酶、受体、转运蛋白、细胞骨架成分等。

### 3 结语

目前,关于植物细胞微丝骨架动力学调控机制的研究越来越细致,其中,诸如肌动蛋白结合蛋白、金属离子、小G蛋白、磷酸肌醇等各种作用因子的功能不断被挖掘,但在细胞整个庞大而精密的调控网络中,必然存在许多未知。如紫露草(*Tradescantia virginiana*)雄蕊毛细胞、拟南芥及玉米根毛细胞等间期细胞核中均发现大量的微丝结合蛋白profilin的积累(Braun等1999; Baluska等2001; Valster等2003),那么它们与细胞质中的肌动蛋白是否存在联系,两者是否对微丝骨架的动态变化有一个协同作用,以及核中的profilin是否在基因表达调控及胞质微丝的动态行为之间架起一个更快捷的信号通路,这些都将是该领域的重要研究方向。此外,微管骨架作为植物细胞骨架系统中唯一的另一个组成成分(目前植物中尚未发现中间纤维骨架成分),2003年Ketelaar等人已发现在拟南芥根毛生长的方向性及立体空间定位上,微管和微丝之间存在着一定的相互作用。那么,在微丝骨架动态变化的调节过程中,微管骨架是否能作为其上游信号通路的一个因子参与其中呢?我们相信随着更多技术和新方法的发展与应用,植物微丝骨架的精细结构及其在生长过程中的调节机制均会被剖析,谜底将一一解开。

## 参考文献

- 王昕, 种康(2005). 植物小 G 蛋白功能的研究进展. 植物学通报, 22 (1): 1~10
- 肖玉梅, 陈玉玲, 黄荣峰, 陈珈, 王学臣(2004). 拟南芥保卫细胞微丝骨架的解聚可能参与了细胞外钙调素诱导的气孔关闭. 中国科学 C 辑生命科学, 34 (2): 129~135
- Aparicio-Fabre R, Guillen G, Estrada G, Olivares-Grajales J, Gurrola G, Sanchez F (2006). Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline-binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*. Plant J, 47: 491~500
- Augustine RC, Vidali L, Kleinman KP, Bezanilla M (2008). Actin depolymerizing factor is essential for viability in plants, and its phosphoregulation is important for tip growth. Plant J, 54: 863~875
- Baluska F, von Witsch M, Peters M, Hlavacka A, Volkmann D (2001). Mastoparan alters subcellular distribution of profilin and remodels F-actin cytoskeleton in cells of maize root apices. Plant Cell Physiol, 42 (9): 912~922
- Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzel D (1999). Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. Planta, 209: 435~443
- Christensen HEM, Ramachandran S, Tan C-T, Surana U, Dong C-H, Chau N-H (1996). *Arabidopsis* profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. Plant J, 10 (2): 269~279
- Cory GOC, Cramer R, Blanchoin L, Ridley AJ (2003). Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. Mol Cell, 11: 1229~1239
- Dong C-H, Kost B, Xia G, Chua N-H (2001). Molecular identification and characterization of the *Arabidopsis AtADF1*, *AtADF5* and *AtADF6* genes. Plant Mol Biol, 45: 517~527
- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol Rev, 83: 433~473
- El-Assal Sel-D, Le J, Basu D, Mallery EL, Szymanski DB (2004). *Arabidopsis GNARLED* encodes a *NAP125* homolog that positively regulates *ARP2/3*. Curr Biol, 14: 1405~1409
- Frank MJ, Smith LG (2002). A small, novel protein highly conserved in plants and animals promotes the polarized growth and division of maize leaf epidermal cells. Curr Biol, 12: 849~853
- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z (2005). *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. Cell, 120: 687~700
- Gremm D, Wegner A (2000). Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein. Eur J Biochem, 267: 4339~4345
- Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, Yang Z (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. J Cell Biol, 169 (1): 127~138
- Guillen G, Valdes-Lopez V, Noguez R, Olivares J, Rodriguez-Zapata LC, Perez H, Vidali L, Villanueva MA, Sanchez F (1999). Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated *in vivo* by phosphorylation on tyrosine residues. Plant J, 19 (5): 497~508
- Gungabissoon RA, Jiang C-J, Drobak BK, Maciver SK, Hussey PJ (1998). Interaction of maize actin-depolymerising factor with actin and phosphoinositides and its inhibition of plant phospholipase C. Plant J, 16 (6): 689~696
- Huang S, Blanchoin L, Chaudhry F, Franklin-Tong VE, Staiger CJ (2004). A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. J Biol Chem, 279: 23364~23375
- Jones MA, Shen J-J, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson CS (2002). The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. Plant Cell, 14: 763~776
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB (2002). Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. Cell Motil Cytoskel, 52: 22~32
- Karakesisoglou I, Schleicher M, Gibbon BC, Staiger CJ (1996). Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin-deficient *Dictyostelium* cells. Cell Motil Cytoskel, 34: 36~47
- Kashem MA, Itoh K, Iwabuchi S, Hori H, Mitsui T (2000). Possible involvement of phosphoinositide- $Ca^{2+}$  signaling in the regulation of  $\alpha$ -amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiol, 41 (4): 399~407
- Ketelaar T, de Ruijter NCA, Emons AMC (2003). Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. Plant Cell, 15: 285~292
- Kovar DR, Drobak BK, Staiger CJ (2000). Maize profilin isoforms are functionally distinct. Plant Cell, 12: 583~598
- Li H, Lin Y, Heath RM, Zhu MX, Yang Z (1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. Plant Cell, 11: 1731~1742
- Li S, Blanchoin L, Yang Z, Lord EM (2003). The putative *Arabidopsis* Arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. Plant Physiol, 132: 2034~2044
- Logan MR, Mandato CA (2006). Regulation of the actin cytoskeleton by  $PIP_2$  in cytokinesis. Biol Cell, 98: 377~388
- Mathur J (2005). The ARP2/3 complex: giving plant cells a lead-



- ing edge. *Bioessays*, 27: 377~387
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Hulskamp M (2003). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 1632~1645
- McCurdy DW, Kovar DR, Staiger CJ (2001). Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*, 215: 89~104
- Morgan TE, Lockerbie RO, Minamide LS, Browning MD, Bamburg JR (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol*, 122: 623~633
- Nibau C, Wu H-M, Cheung AY (2006). RAC/ROP GTPases: 'hubs' for signal integration and diversification in plants. *Trends Plant Sci*, 11 (6): 309~315
- Perelroizen I, Didry D, Christensen H, Chua N-H, Carlier M-F (1996). Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly. *J Biol Chem*, 271: 12302~12309
- Robinson RC, Mejillano M, Le VP, Burtnick LD, Yin HL, Choe S (1999). Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. *Science*, 286: 1939~1942
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA (2002). PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129: 3533~3544
- Sechi AS, Wehland J (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci*, 113: 3685~3695
- Staiger CJ, Blanchoin L (2006). Actin dynamics: old friends with new stories. *Plant Biol*, 9: 554~562
- Stradal TEB, Scita G (2005). Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 18: 4~10
- Su H, Wang T, Dong H, Ren H (2007). The villin/gelsolin/fragmin superfamily proteins in plants. *J Integr Plant Biol*, 49 (8): 1183~1191
- Suetsugu S, Miki H, Yamaguchi H, Obinata T, Takenawa T (2001). Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J Cell Sci*, 114: 4533~4542
- Uhrig J, Mutondo M, Zimmermann I, Deeks MJ, Machesky LM, Thomas P, Uhrig S, Rambke C, Hussey PJ, Hulskamp M (2007). The role of *Arabidopsis* SCAR genes in ARP2-ARP3-dependent cell morphogenesis. *Development*, 134: 967~977
- Valster AH, Vidali L, Hepler PK (2003). Nuclear localization of profilin during the cell cycle in *Tradescantia virginiana* stamen hair cells. *Protoplasma*, 222: 85~95
- Volkman N, Amann KJ, Stoilova-McPhie S, Egile C, Winter DC, Hazelwood L, Heuser JE, Li R, Pollard TD, Hanein D (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science*, 293: 2456~2459
- Yang Z (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, S375~S388
- Yi K, Guo C, Chen D, Zhao B, Yang B, Ren H (2005). Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 138: 1071~1082
- Yokota E, Tominaga M, Mabuchi I, Tsuji Y, Staiger CJ, Oiwa K, Shimmen T (2005). Plant villin, lily P-135-ABP, possesses G-actin binding activity and accelerates the polymerization and depolymerization of actin in a Ca<sup>2+</sup>-sensitive manner. *Plant Cell Physiol*, 46 (10): 1690~1703
- Zhang W, Fan L-M, Wu W-H (2007). Osmo-sensitive and stretch-activated calcium-permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics. *Plant Physiol*, 143: 1140~1151