

## 专题介绍 Special Topics

# 植物脱水素的结构和功能

邢鑫, 刘洋, 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

## Structure and Function of Plant Dehydrins

XING Xin, LIU Yang, LI De-Quan\*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

**摘要:** 脱水素(DHN)属于LEA蛋白(late embryogenesis abundant protein)第二家族成员, 具有广泛的生物学功能, 如防止细胞脱水, 稳定细胞膜, 结合金属离子, 清除羟基自由基防止膜脂过氧化, 保护冷敏感性酶活性, 作为分子伴侣和结合DNA/RNA的特性等。本文介绍脱水素的结构, 在植物器官、组织和亚细胞中的定位以及功能的研究进展。

**关键词:** 脱水素; 结构; 定位; 功能; 磷酸化修饰

干旱、低温和盐渍等非生物胁迫也常是影响植物生长发育的因素, 植物在受到这些胁迫信号刺激后, 会产生一系列响应蛋白来保护细胞代谢, 如转录因子、蛋白激酶、渗透物质合成酶、自由基清除酶、水通道蛋白和胚胎发育晚期丰富蛋白等, 合成一些亲水性蛋白是植物响应水分亏缺的一种主要应答过程(Allagulova Ch 等 2003; Ingram 和 Bartels 1996)。胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA)就是这些亲水蛋白的一种, 脱水素是 LEA 蛋白的第二家族。脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、伤害、紫外线、 $H_2O_2$ 、重金属、光周期等都在调控脱水素基因表达中起作用(Bac 等 2009; Sun 等 2006; Welling 等 2004; Xu 等 2008; Yamaguchi 和 Shinozaki 1994; Zhang 等 2006), 一些脱水素也可以在正常生长状态下组成型表达(Rodriguez 等 2005; Rorat 等 2006)。迄今, 脱水素的功能和作用机制还不很清楚, 人们多用体外或异源转化的方法研究脱水素的功能。在拟南芥中过表达小麦脱水素DHN5后, 转基因植物在高盐和渗透胁迫下的抗性增强(Brini 等 2007); 过表达柑橘脱水素基因的转基因烟草植株抵抗低温的能力明显高于野生型植株(Hara 等 2003); 在矮牵牛中过表达厚叶旋胡首苔BDN1 脱水素基因其保水能力及抗低温能力增强(王君丹等 2004); 酵母异源表达 LEA/DHN 后其抗渗透胁迫和冷胁迫的能力增强(Imai 等 1996; Swire-Clark 和 Marcotte 1999; Zhang 等 2000)。但在植物中过表达脱水素基因也有抗逆能力没有提高的例

子, 比如过表达菠菜脱水素CAP85的转基因烟草抗冻能力并没有明显的改变(Kaye 等 1998); 从更苏植物垂头菊中克隆的脱水素在烟草中过表达后其抗旱性也没有提高(Iturriaga 等 1992); 在拟南芥中过表达或反义抑制RAB18对拟南芥的抗冷和抗旱能力也没有明显的效果等(Lang 未发表的资料)。本文介绍近几年来脱水素的研究进展情况。

### 1 脱水素蛋白的结构特征

脱水素的分子量大小有 9 kDa (水稻, Wsi724) 到 200 kDa (小麦, Wcs200) 不等(Garay-Arroyo 等 2000), 与已知的酶没有明显的同源性。脱水素没有有序蛋白结构, 有很强的亲水性和热稳定性, 广泛存在于高等植物、藻类、酵母、线虫和细菌中(Campbell 和 Close 1997; Close 1997; Close 和 Lammers 1993; Li 等 1998; Mtwisha 等 1998)。也可存在于不同的植物器官和组织中, 在细胞水平上分别定位于细胞质(Houde 等 1995)、细胞核(Godoy 等 1994)、线粒体(Borovskii 等 2002)、叶绿体(Mueller 等 2003)、液泡(Heyen 等 2002), 或质膜边界(Danyluk 等 1998)中。

分析纯化的脱水素结构表明, 它无有序的二级/三级结构, 这种内部无折叠的高度随机结构使脱水素不仅有高的水合能力, 而且有利于其结合金属离子行使其特定的生理功能(Tompa 等 2006)。

收稿 2009-11-04 修定 2010-02-24

资助 国家自然科学基金(30871457)和教育部长江学者与创新团队发展计划(IRT0635)。

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

三氟乙醇(TFE)、十二烷基硫酸钠(SDS)具有体外模拟膜的特性,在TFE存在的条件下脱水素DSP16构象发生改变,呈现很好的 $\alpha$ 螺旋结构(Lisse等1996);在SDS存在的条件下,豌豆35-kDa脱水素也展现出很好的 $\alpha$ 螺旋结构,这可能是由于K片段形成的双亲性 $\alpha$ 螺旋结构调节造成的(Ismail等1999);玉米脱水素DHN1与膜结合后的构象常发生变化, $\alpha$ 螺旋含量也有增加(Koag等2003)。但不是所有的脱水素与体外模拟的膜结合后的构象都发生变化的,拟南芥脱水素Lti29与带负电荷的脂质结合,构象并不发生任何变化(Kovacs等2008)。紫外吸收和圆二色谱显示,溶液状态下大豆rGmDHN1是高度亲水的,无有序的结构,在12℃中有27%的残基为左手螺旋,温度升高到80℃时,只有15%的残基为左手螺旋(Soulages等2003)。拟南芥脱水素Cor47、Lti29、Lti30、Rab18在外界环境(包括温度、金属离子浓度、蛋白浓度、蛋白稳定剂 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )改变后其构象都没有发生变化(Mouillon等2006)。核磁共振和差异扫描热量测定的结果显示,无序化的ERD10不仅有很高的亲水力,而且能结合大量带电荷的溶液离子,这种蛋白在脱水条件下的功能可能是在保留水分的同时,也可阻止有害金属离子的增加(Tompa等2006)。玉米脱水素G50的结构预测分析表明,无序化占了75%,内部缺少折叠区,受热难使其凝聚,因此在100℃水溶液中仍可稳定存在,说明脱水素具有热

稳定性和高溶解性(Ceccardi等1994)。

脱水素缺少半胱氨酸和色氨酸,含有高比例的带电荷和亲水性极性氨基酸。所有脱水素的最明显特征是都含有至少一个保守的由15个氨基酸(EKKGIMDKIKEKLPG)组成的富含赖氨酸片段,称为K片段,此片段在不同的物种间可能存在某个核苷酸的置换或结构上的修饰。在所有的保守区中,K片段是所有脱水素都具有的,它类似于阿朴脂蛋白和 $\alpha$ 核蛋白中能与膜脂结合的A2型双亲性 $\alpha$ 螺旋片段,这种双亲性螺旋片段具有很明显的极性和非极性头部。K片段形成的兼性 $\alpha$ 螺旋结构可通过疏水作用与部分变性的蛋白质或膜作用(Davidson等1998)。脱水素的其它典型特征是有系列丝氨酸(Ser)残基组成的S片段,在S片段后一般跟随着能与蛋白磷酸酶结合的位点,大多数由EDD或者DDE组成;由保守基序T/VDEYGNP组成的Y片段,通常位于脱水蛋白的N末端,Y片段与一些细菌和植物分子伴侣的核酸结合位点有同源性(Martin等1993)。另外,脱水素还有一些保守性稍差的富含极性氨基酸的 $\Phi$ 片段散落在保守区内,甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸在 $\Phi$ 片段中的含量较多, $\Phi$ 片段保守性因物种的不同稍有差异。除了这些保守区以外,很多脱水素还含一个类似核定位信号的序列(NLS)(Monroy等1993)。如玉米中的RAB17的类似NLS序列是由RRKK组成。这里以玉米脱水素RAB17为例(图1),说明典型的脱水素

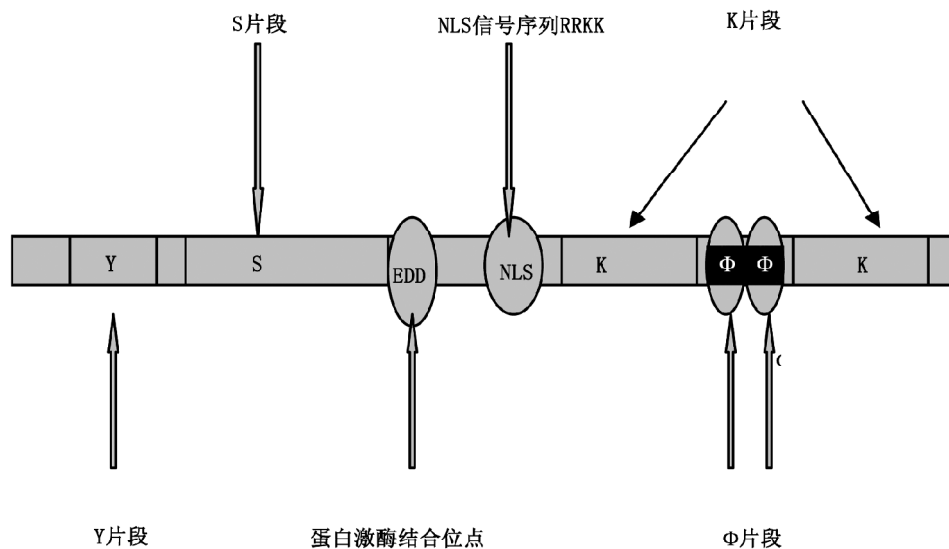


图1 玉米脱水素 Rab17 结构(Koag 等2003)

的结构。

根据 Y、S 和 K 片段的数量和排列顺序脱水素可分为 5 个不同的亚族:  $Y_nSK_2$ 、 $Y_2K_n$ 、 $SK_n$ 、 $K_n$  和  $K_nS$ 。其中  $K_n$  的 K 片段的起始序列不是 EKKG, 而是 E(H/Q)KEG。此外, 还有一些脱水素还难以确定其类型, 如繁缕叶片中的 H26 就具有  $SK_3S$  的结构, 它可能是介于  $SK_n$  和  $K_nS$  型之间的中间类型(孙歆等 2005)。

## 2 脱水素在植物器官、组织及亚细胞中的定位

### 2.1 器官、组织中的定位

脱水素广泛存在于不同的器官中。免疫组织化学分析表明, 脱水素在植物种子脱水状态下表达, 或在植物受到干旱、低温和高盐等逆境胁迫引起的细胞脱水下的各种器官中表达, 也可在植物正常生长状态下的各个器官中表达。

种子中脱水素的表达量很高, 在成熟的子叶中, DHN-COG 蛋白占种子总蛋白的约 2% (Robertson 和 Chandler 1994)。玉米脱水素 RAB17 (DHN1,  $YSK_2$ ) 定位于胚的不同部位, *rab17* mRNA 先在胚轴中合成, 随着成熟 *rab17* mRNA 在胚的角质鳞片、胚轴细胞和原形成层中累积(Goday 等 1994)。豌豆的 DHN-COG ( $SK_2$ ) 主要定位在胚胎发育中后期的子叶中, 以及受脱水胁迫的幼苗中。胡萝卜的 ECP40 ( $YSK_2$ ) 定位于成熟种子的胚乳和受精卵发育而成的胚中(Kiyosue 等 1993)。此外, 定位在种子中的脱水素还有大豆 24-kDa (MAT1, YK) 和 26/27-kDa (MAT9, YK) 蛋白(Momma 等 1997, 2003)、豌豆 35-kDa 脱水素( $Y_2K$ ) (Ismail 等 1999) 等。

正常生长状态下有些脱水素也可以表达, 如小麦的 WCOR410 ( $SK_3$ ) 主要定位于根的维管交界区域及叶、花冠中(Danyluk 等 1998)。拟南芥 RAB18 ( $Y_2SK_2$ ) 特异性的累积在茎、叶和花的气孔保卫细胞中(Nylander 等 2001)。在植物受到干旱、低温和高盐胁迫时, 大多数的脱水素含量增加, 而且有的在正常生长状态下并不表达的其它组织中出现。例如, 在正常生长状态下, 拟南芥中的 ERD14 和 ERD10 (LTI29) 主要定位于根尖以及根的维管组织、茎、叶和花中, 而在冷胁迫下, 拟南芥的所有组织中都能检测到它们的存在(Nylander 等 2001)。茄属植物的 DHN24 和大麦属植物的 P-80 的累积也获得到相同的结果(Rorat 等 2006)。另外, 正常生长条件下, DSP14 (SK) 和 DSP16 DHN-like

( $YSK_2$ ) 蛋白可在种子、根和叶中检测到, 在干旱脱水条件下, 它们在各种类型的细胞中出现, 更多的累积在叶片的韧皮部筛管和种子的胚胎细胞中(Lisse 等 1996; Mtwisha 等 1998)。所有这些结果说明, 正常生长条件下, 某些脱水素可以在植物的某些器官中表达, 而在逆境条件下, 这些脱水素可能会在更多的器官或组织中出现。可见, 脱水素表达有其严格的器官和组织特异性。

### 2.2 亚细胞中的定位

在亚细胞水平上, 脱水素可定位于细胞质(Houde 等 1995)、细胞核(Goday 等 1994)、线粒体(Borovskii 等 2002)、叶绿体(Mueller 等 2003)、液泡(Heyen 等 2002) 和质膜边界(Danyluk 等 1998) 中, 但大多数定位于细胞质和细胞核中。

玉米脱水素 RAB17 ( $YSK_2$ ) 定位于细胞核和细胞质中, 其核定位依赖于 RAB17 内部 S 片段的磷酸化(Goday 等 1994); 番茄脱水蛋白 TAS14 在细胞质和细胞核中均有分布, 在细胞核中主要分布在常染色质和核仁中(Goday 等 1994)。值得注意的是, 小麦 WCS120 ( $K_6$ ) 蛋白和桃树 PCA60 (YK) 蛋白均没有 S 片段和核定位信号(NLS), 但它们定位于细胞质和细胞核中(Houde 等 1995; Wisniewski 等 1999)。有研究认为, WCS120 蛋白中大量的富含赖氨酸重复序列可能对其核定位有作用, 这说明存在另一种不依赖于脱水蛋白的磷酸化和 NLS 机制的存在, 致使  $K_6$  和 YK 型脱水蛋白能够进入细胞核。其它一些含有 S 片段的脱水素, 例如水稻中的 RAB21 ( $YSK_2$ ) (Mundy 和 Chua 1988)、白桦树中的类 RAB16 蛋白(Rinne 等 1999)、茄属植物的 DHN10 (KS) 和 DHN24 ( $SK_3$ ), 只存在于细胞质中(Rorat 等 2006)。此外, 小麦 WCOR410 ( $SK_3$ ) 定位于叶脉交界区域的细胞质膜边界上。一些似脱水素蛋白可定位在线粒体中(Schneider 等 1993), 如菠菜 CAP85 主要定位在细胞质中, 也结合于内质网上(Neven 等 1993)。拟南芥脱水素 ERD10 在没有经过冷适应的情况下, 有 1/3 定位于膜上(包括原生质膜、离子膜、液泡膜), 2/3 定位于细胞质中, 而经过冷适应以后, 其结果完全相反, 有 2/3 定位于质膜上, 而 1/3 定位于细胞质上, 说明在冷适应过程中 ERD10 可起稳定和 protect 细胞膜的作用, 并可重新定位(Puhakainen 等 2004)。总之, 脱水素不仅在不同的器官和组织中表达, 而且在亚细胞水平更有

其特异性。

### 3 脱水素的功能

脱水素具有稳定细胞膜、清除自由基、结合金属离子、保护冷敏感性酶、保护细胞免受脱水伤害、分子伴侣的保护特性和DNA/RNA结合特性等功能。

**3.1 稳定细胞膜** 脱水素结合于膜质最直接的证据是玉米脱水素DHN1的研究(Koag等2003)。DHN1在体外可与包含酸性磷脂的脂囊泡结合,研究表明这种结合更偏于结合富含甘油磷脂酸(PA)的直径较小的囊泡上。圆二(CD)光谱分析表明, DHN1在结合到含磷脂的脂囊泡上后其蛋白呈 $\alpha$ 螺旋结构状。这种结合导致DHN1的 $\alpha$ 螺旋增加9%,这与在10%的十二烷基磺酸钠(SDS)存在的情况下的结果相同。体外实验结果暗示,植物体内的DHN1也在结合到囊泡上后,呈现 $\alpha$ 螺旋的结构形式,蛋白中的2个K片段参与与膜的结合。脱水素或胚胎发育晚期丰富蛋白可能在水膜表面上起与功能相关的构象变化,在逆境下结合到膜的表面以稳定囊泡或内膜结构的作用(Koag等2003)。最新的研究表明, K片段在结合过程中是必需的,并且结合后RAB17的构象变化主要依赖于K片段(Koag等2009)。ERD10、ERD14也可与膜上的酸性磷脂囊泡结合,但结合后ERD10、ERD14构象没有变化(Kovacs等2008)。

**3.2 清除自由基** 抗氧化作用可能是脱水素的一个基本功能,低温、干旱和高盐都可促使植物体内产生自由基。这些自由基实际上可和所有生物分子(膜质、DNA和蛋白)相互作用。由于蛋白质承担起很多生物功能的作用,它们的氧化可能导致蛋白自身酶的性质、结合特性或者功能的变化(Oracz等2007)。体外实验表明,柑橘(*Citrus unshiu* Marcov.)脱水素CuCOR19(K<sub>3</sub>S)可阻止膜质的过氧化反应,这种抑制脂质过氧化反应的能力强于清蛋白、谷胱甘肽、脯氨酸和蔗糖(Hara等2003)。因而推测脱水素作为自由基清除蛋白保护冷胁迫下的膜系统。羟基自由基对细胞具有很强的毒性,在细胞脱水条件下由植物体内的金属离子/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系统产生。CuCOR19还有清除羟基和过氧化氢自由基的能力, CuCOR19中的甘氨酸、组氨酸、赖氨酸残基是羟基的主要靶残基(Hara等2004)。

**3.3 结合金属离子** 拟南芥酸性脱水素ERD14、ERD10和COR47经CKII磷酸化后有钙离子结合活性,其中ERD14的结合能力最强;中性脱水素RAB18经CKII磷酸化后具有微量钙离子结合活性;碱性脱水素XERO<sub>2</sub>缺少S片段不能被CKII磷酸化,也不能结合钙离子。ERD14和ERD10可以在液泡膜附近累积,推测脱水素是起钙离子缓冲作用的或作为钙离子依赖型伴侣分子而作用的(Alsheikh等2003, 2005)。柑橘脱水素CuCOR15(KS)也具有结合金属离子的能力, Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>均能与CuCOR15结合,而Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>则不能。其中Cu<sup>2+</sup>的结合力最强,不同离子的结合能力依次为: Cu<sup>2+</sup>=Ni<sup>2+</sup>>Zn<sup>2+</sup>>Co<sup>2+</sup>=Fe<sup>3+</sup>, CuCOR15中的N末端的HKGEHHS GDHH序列是结合Cu<sup>2+</sup>的核心序列(Hara等2005)。芹菜脱水素VBA45位于液泡膜上,磷酸化后钙离子的结合能力可以提高100倍(Heyen等2002)。从蓖麻(*Ricinus communis* L.)幼苗中分离出一种KS型脱水蛋白ITP,它在韧皮部中具有长距离运输离子的能力,纯化的ITP在体外可结合Fe<sup>3+</sup>,也可结合Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>,但在体内只能与Fe<sup>3+</sup>结合(Kruger等2002)。

**3.4 保护冷敏感性酶的活性** 低温通过分裂亚基的方式促使低聚物蛋白活性降低,脱水素在溶液状态下呈随机卷曲结构(Close 1997),这种结构可能在保护细胞冷敏感性酶过程中起作用。柑橘CuCOR19(K<sub>3</sub>S)有保护过氧化氢酶和乳酸脱氢酶的活性,且这种能力强于一些相容性物质,如蔗糖、甜菜碱、脯氨酸、牛血清蛋白(BSA)等(Hara等2001)。体外实验表明,用液氮反复几次冻-解冻后,PCA60(YK)具有保护乳酸脱氢酶活性的功能(Wisniewski等1999)。一些从桦木(*Betula pubescens*)中分离的脱水素在聚乙二醇存在情况下,可增强 $\alpha$ -淀粉酶的活性(Rinne等1999)。脱水素P-80和大麦DHN5都是K<sub>9</sub>型冷调控脱水素,两者在冻融过程中保护乙醇脱氢酶(LDH)的能力相似,LDH活性保护能力仅次于拟南芥脱水素COR15a,这种保护冷敏感性酶能力的大小与K片段的数量无关(Artus等1996; Bravo等2003)。这些结果表明,低温逆境下一些脱水素可能起保护冷敏感酶活性的作用。

**3.5 保护细胞免受脱水伤害** 在植物受到干旱失水时,脱水素能够部分替代水分子,保持细胞液处于

溶解状态,从而避免细胞结构的破坏,稳定膜结构以及保护蛋白质的结构和功能(Close 1996)。有些研究表明,脱水素转录水平和蛋白水平的累积量与植物的冻害、干旱和盐害的程度呈正相关。Puhakainen等(2004)在拟南芥中同时过表达几个拟南芥脱水素基因后, LTI29 (ERD10, SK<sub>3</sub>)和LTI30 (K<sub>6</sub>)可增强冷冻耐受性,并且提高其在低温下的存活率。小麦脱水蛋白 WCS410 在脱水条件下常聚集在细胞外膜和细胞间隙中,氨基酸序列分析显示,该蛋白含有大量酸性和富含羟基的氨基酸,这就促使其具有与膜上磷脂和类固醇相互作用的能力,脱水过程中膜水分的丧失会改变膜的相变温度,造成不可逆的伤害。而 WCS410 的兼亲  $\alpha$  螺旋区域将替代水分的位置,其分子内羟基与磷脂分子中的极性键形成氢键使膜脂的状态仍与未脱水状态类似, WCS410 中的酸性、碱性和中性基团分别与膜脂中不同种类的膜脂分子结合,可防止脂类分子间的相互作用,从而阻止膜融合或双层膜脂向非双层膜相中的六角形 II 相的转变,而在高盐条件下, WCS410 中的带电基团从彼此之间的相互作用转变为与离子结合,形成盐桥,阻止盐类结晶,从而保护细胞(Danyluk 等 1998)。

**3.6 分子伴侣的保护和 DNA/RNA 结合特性** 一些脱水素确实与分子伴侣有着一定的序列同源性(Mouillon 等 2006)。Goyal 等(2005)报道 LEA 蛋白家族的第一族和第三族的 LEA 蛋白具有防止柠檬酸合酶的热聚合和乳酸脱氢酶的冷聚合的分子伴侣活性,其保护效果依赖于海藻糖。线虫的 LEA3 族蛋白也具有更好的蛋白稳定功能和防止热聚合的功能(Chakrabortee 等 2007)。最近, Kovacs 等(2008)证明拟南芥脱水素 ERD10 和 ERD14 也具有分子伴侣的活性。这 2 个无序的脱水素都有广泛的底物特异性,以及阻止热聚合或保护溶解酵素、乙醇脱氢酶、荧光素酶、柠檬酸盐合酶失活的作用。

TAS14 在核内主要分布在染色质中,所以有人推测其与转录调节有关,但在体外的凝胶阻滞实验中并没有检测到 TAS14 与随机寡聚核苷酸的结合(Godoy 等 1994)。这种脱水素究竟能不能与核酸结合?最近, Hara 等(2009)用凝胶阻滞实验、滤膜结合实验、Southwestern blot 实验证明,在 Zn<sup>2+</sup> 存在的情况下 CuCOR15 能与 DNA 结合, tRNA 也能

与 DNA 竞争性的与 CuCOR15 作用,其序列中富含组氨酸区域和 Polysine 区域两者均参与了这一结合过程。其中 Zn<sup>2+</sup> 的作用更为重要,这极大地丰富了人们对脱水素的认识。

**3.7 在逆境胁迫中的作用** 逆境胁迫下植物体内脱水素的累积量与获得的抗性成正相关(Nylander 等 2001; Rodriguez 等 2005; Danyluk 等 1998; 张晓娟等 2007)。植物、酵母和大肠杆菌中过表达脱水素基因已用来阐述逆境下脱水素的潜在生物学功能。在拟南芥中过表达玉米脱水素 Rab17, 转基因植物脯氨酸和糖含量增加,其渗透胁迫能力也加强(Fifueras 等 2004); 拟南芥中过表达小麦脱水素 DHN5 后,转基因植物在高盐和渗透胁迫下的抗性增强(Brini 等 2007); Xu 等(2008)报道,从芥菜 (*Brassica juncea*) 中克隆的 2 个脱水素基因 B<sub>j</sub>DHN<sub>2</sub>/B<sub>j</sub>DHN<sub>3</sub> 受重金属诱导,在重金属胁迫下,其转基因烟草比野生型的丙二醛含量和电解质外渗低,认为这种抗性的提高是由于 B<sub>j</sub>DHN<sub>2</sub>/B<sub>j</sub>DHN<sub>3</sub> 削弱膜脂过氧化和保护细胞膜所造成(Xu 等 2008); 冷适应后,转小麦脱水素 WCOR410 的转基因草莓叶片的冷冻抗性提高 5 °C 左右, WCOR410 经过冷适应后,能部分的从细胞质转移到细胞外膜,于是细胞的结构稳定(Houde 等 2004); 马铃薯 Y<sub>2</sub>K-型脱水素 LE4 在啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中过表达后,酵母的抗冻性和抗盐性增强(Zhang 等 2000); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中过表达大豆脱水素 ZLDE2 后其对 NaCl 的抗性增强(Lan 等 2005)。这些结果说明脱水素作为 LEA 蛋白中的一个大的家族,在逆境胁迫下呈现出多种生物学功能,提高植物抗性只是其中一个方面。

**3.8 翻译后的磷酸化修饰** 逆境条件下不仅需要相关逆境蛋白的表达,有时还需要一些可迅速改变蛋白质生化特性的翻译后修饰作用。

蛋白质磷酸化是脱水素转录后修饰的一种方式。最早有关脱水素磷酸化的报道是玉米 RAB17 (YSK<sub>2</sub>型)(Vilardell 等 1990), S 片段是受磷酸化的位点,紧接着 S 片段的 EDD 是蛋白激酶 II 识别位点,将 EDD 突变成 AAA,这样 RAB17 不容易被磷酸化,结果在转基因拟南芥中,其在细胞核中的比例大量减少,表明 DHN1 的磷酸化对其向核转运是关键的一步,它可能通过结合于特异的蛋白或直接向核转

运(Jensen等1998)。另外, RAB17与NLS(核定位信号)的结合还依赖于RAB17的磷酸化(Goday等1994)。Riera等(2004)将RAB17和mRAB17(EDD突变成AAA)的转基因拟南芥种子在含 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl的MS培养基上培养后, 转RAB17拟南芥的发芽速率比转mRAB17基因和未转基因的拟南芥明显推迟, 说明RAB17的磷酸化对种子发芽率有作用。在番茄植物体内TAS14是一种磷酸化的蛋白, 它含有酪氨酸蛋白激酶II(CKII)和依赖cAMP蛋白激酶(cAMP-PK)的磷酸化位点, 体外实验证实, 此蛋白可被CKII和cAMP-PK磷酸化, 番茄TAS14(YSK<sub>2</sub>) (Godoy等1994)、垂头菊(*Craterostigma plantagineum*) DSP16(Lisse等1996)、芹菜(*Apium graveolens*) VCaB45(Heyen等2002)、拟南芥ERD14(SK<sub>2</sub>) (Alsheikh等2003)的磷酸化不参与它们的核定位。ERD14和VcaB45的磷酸化还与它们的结合钙离子有关(Alsheikh等2003; Heyen等2002)。Alsheikh等(2005)用蛋白激酶CK2处理不同类型的拟南芥脱水素后, 凡是具有S片段的脱水素都能被磷酸化, 但不具有S片段的则不能被磷酸化, 此外, 类型不同的脱水素磷酸化后它们的功能可能不同。酸性脱水素磷酸化后能和阳离子结合, 特别是Ca<sup>2+</sup>, 而碱性和中性脱水素即使被磷酸化也不具有离子结合能力。另外, 用碱性磷酸酶处理磷酸化状态的脱水素后, 所有类型的脱水素都失去离子结合能力, 这说明脱水素的离子结合能力与磷酸化紧密相关, 脱水素的磷酸化对在细胞中行使功能很重要(Alsheikh等2005)。Mouillon等(2008)用模拟细胞内部环境的方法发现磷酸化的拟南芥脱水素Lti29和Cor47并不改变脱水素的构象。此外, 磷酸化程度不同的同一种脱水素, 由于所带电荷不同, 它们在蛋白电泳中的泳动速率也不同, 根据这些结果可以判断脱水素蛋白的磷酸化程度(Alsheikh等2005)。

此外, 还有报道称, 从越橘中克隆的一种脱水素基因编码K<sub>5</sub>型脱水素, 这种蛋白在翻译后也能被糖基化修饰(Rorat 2006)。

#### 4 结语

脱水素的研究已经有20多年的历史, 但其功能和作用机制的研究还处于推测阶段, 尚缺少直接的实验证据。现有的证据表明, 脱落酸(ABA)、赤

霉素(GA)、水杨酸(SA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、伤害、紫外线、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、重金属、光周期等都能调控脱水素基因的表达(Bae等2009; Sun等2006; Welling等2004; Xu等2008; Yamaguchi和Shinozaki 1994; Zhang等2006)。而有些脱水素可在正常生长条件下在植物体内呈组成型的表达(Rodriguez等2005; Rorat等2006), Nylander等(2001)认为, 脱水素的这种组成型表达可能对正常生长条件下的植株起到一种本底上的防护作用, 也可能是在胁迫应答之前对植物体提供的一种早期保护。植物体拥有一种复杂交错的信号转导系统, 脱水素基因的表达存在依赖ABA途径和不依赖ABA途径, 低温、干旱、高盐等逆境胁迫都可促进植物体内ABA含量增加, 介导脱水素的表达; 有些脱水素的表达也有独立的不依赖ABA途径(孙歆等2005)。正常生长条件下, 茄属脱水素DHN24只在茎、块茎和根中表达, 而在叶中不表达; 低温处理后, 在块茎、转运器官、茎尖部分表达增加; 干旱处理后, 表达只在茎尖部分增加。这些结果表明脱水素DHN24的表达在不受胁迫时受器官特异因子调控; 在冷适应过程中, 受与冷信号有关的影响因子和器官特异因子共同调控(Rorat等2006)。所以, 在多种逆境胁迫条件下, 脱水素基因表达模式的研究方向, 应该以整个植物体为研究对象, 同时从器官特异因子和各种环境因子进行综合分析, 这不仅可从分子水平上对植物的抗逆境胁迫的部分机制作出阐明, 而且还可为脱水素抗逆分子机制的系统研究建立基础。

许多在脱水素在逆境条件下大量表达, 环境恢复到正常后又迅速消失。如在干旱条件下, 拟南芥脱水素ERD10和ERD14的表达量可占胞内全部可溶性蛋白的4%, 如此高的表达量预示脱水素可能在极端环境下起作用, 但逆境恢复后, 又如何呢? 最近的研究表明, 拟南芥脱水素ERD10和ERD14具有高度无序的结构, 这种结构对多种蛋白酶敏感, 可以成为多种蛋白酶的底物(Kovacs等2008), 这是不是脱水素降解的一种方式呢? 值得探讨。

过表达脱水素基因可提高转基因植株对逆境胁迫的抗性, 但有时过表达单一脱水素基因的转基因植物, 其抗性并没有明显提高, Puhakainen等(2004)分别将拟南芥脱水素RAB18、COR47和LTI29、LTI30同时转入拟南芥后, 其转基因植株

的抗低温能力明显增强,其在冻害胁迫下的存活率也提高。实际上,表达脱水素基因的酵母或大肠杆菌在高盐、渗透胁迫或低温逆境中抗性的增强是有一定局限性的,在啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中过表达LEA2族蛋白LE4和LEA3族蛋白HVA1后,其对NaCl的抗性提高,表达HVA1的菌株同时对KCl的抗性也提高,而LE4则没有这样的效果(Zhang等2000)。Lan等(2005)将大豆的LEA1族PM11、LEA2族ZLDE-2、LEA3族PM30转到大肠杆菌(*Escherichia coli*)后,表达PM11和PM30的菌株其在800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、700 mmol·L<sup>-1</sup> KCl和4 °C条件的生长延滞期更短,而表达ZLDE2的菌株只是在800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl条件下才有一定的抗性。这些结果表明LEA3族蛋白可赋予转基因的体系更强的抗逆性。更有趣的是,在正常生长条件下,大肠杆菌中过表达拟南芥的LEA2族和LEA4族蛋白后,菌株的生长居然会受抑制(Campos等2006),其中机制也应该探讨。

### 参考文献

- 孙歆, 雷韬, 袁澍, 林宏辉(2005). 脱水素研究进展. 武汉植物学研究, 23 (3): 299~304
- 王君丹, 胡骞雷, 魏晓, 于鹏之, 车代第, 林忠平(2004). 脱水素基因转化的矮牵牛对干旱胁迫的反应. 分子植物育种, 2 (3): 369~374
- 张晓娟, 张林生, 杨颖(2007). 水分胁迫下小麦类脱水素基因表达的半定量RT-PCR分析. 西北植物学报, 27 (11): 2158~2162
- Allagulova Ch R, Gimalov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry*, 68: 945~951
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK (2003). Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J Biol Chem*, 278: 40882~40889
- Alsheikh MK, Svensson JT, Randall SK (2005). Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ*, 28: 1114~1122
- Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin C, Thomashow MF (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 13404~13409
- Bae EK, Lee H, Lee JS, Noh EW (2009). Differential expression of a poplar SK<sub>2</sub>-type dehydrin gene in response to various stressors. *BMB Rep*, 42: 439~443
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol*, 2: 5
- Bravo L, Gallardo J, Navarrete A, Olave N Martínez J, Alberdi M, Close TJ, Corcuera LJ (2003). Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol Plant*, 118: 262~269
- Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K (2007). Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 26: 2017~2026
- Campbell SA, Close TJ (1997). Dehydrins: genes, proteins, and association with phenotypic traits. *New Phytol*, 137: 61~74
- Campos F, Zamudio F, Covarrubias AA (2006). Two different late embryogenesis abundant proteins from *Arabidopsis thaliana* contain specific domains that inhibit *Escherichia coli* growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 406~413
- Ceccardi TL, Meyer NC, Close TJ (1994). Purification of a maize dehydrin. *Protein Expr Purif*, 5: 266~269
- Chakrabortee S, Boschetti C, Walton LJ, Sarkar S, Rubinsztein DC, Tunnacliffe A (2007). Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 18073~18078
- Close TJ (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant*, 97: 795~803
- Close TJ (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100: 291~296
- Close TJ, Lammers PJ (1993). An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol*, 101: 773~779
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10: 623~638
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, 273: 9443~9449
- Fifueras BM, Pujal J, Saleh A, Save R, Pages M, Goday A (2004). Maize Rab17 overexpression in *Arabidopsis* plants promotes osmotic stress tolerance. *Ann Appl Biol*, 144: 251~257
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*, 275: 5668~5674
- Goday A, Jensen AB, Culiñez-Macia FA, Mar Alba M, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pages M (1994). The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*, 6: 351~360
- Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo RM, Pintor-Toro JA (1994). Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol*, 26: 1921~1934
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J*, 388:

- 151~157
- Hara M, Terashima S, Kuboi T (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J Plant Physiol*, 158: 1333~1339
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217: 290~298
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2004). Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiol Biochem*, 42: 657~662
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J Exp Bot*, 56: 2695~2703
- Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, Kuboi T (2009). DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant Cell Environ*, 32: 532~541
- Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK (2002). The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol*, 130: 675~687
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S, Sarhan F (1995). Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J*, 8: 583~593
- Imai R, Chang L, Ohta A, Bray EA, Takagi M (1996). A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170: 243~248
- Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 377~403
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999). Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol*, 120: 237~244
- Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1992). Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 20: 555~558
- Jensen AB, Goday A, Figueras M, Jessop AC, Pages M (1998). Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant J*, 13: 691~697
- Kaye C, Neven L, Hofig A, Li QB, Haskell D, Guy C (1998). Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. *Plant Physiol*, 116: 1367~1377
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kamada H, Harada H (1993). cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 21: 1053~1068
- Koag MC, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol*, 131: 309~316
- Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ (2009). The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol*, 150: 1503~1514
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol*, 147: 381~390
- Kruger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R (2002). A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem*, 277: 25062~25069
- Lan Y, Cai D, Zheng YZ (2005). Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (*Lea*) genes to investigate enhanced stress tolerance. *J Integrat Plant Biol*, 47: 613~621
- Li R, Brawley SH, TJ C (1998). Proteins immunologically related to dehydrins in *fucooid algae*. *J Phycol*, 34: 642~650
- Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R (1996). The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biol Chem*, 377: 555~561
- Martin J, Geromanos S, Tempst P, Hartl FU (1993). Identification of nucleotide-binding regions in the chaperonin proteins GroEL and GroES. *Nature*, 366: 279~282
- Momma M, Haraguchi K, Saito M, Chikuni K, Harada K (1997). Purification and characterization of the acid soluble 26-kDa polypeptide from soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61: 1286~1291
- Momma M, Kaneko S, Haraguchi K, Matsukura U (2003). Peptide mapping and assessment of cryoprotective activity of 26/27-kDa dehydrin from soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67: 1832~1835
- Monroy AF, Castonguay Y, Laberge S, Sarhan F, Vezina LP, Dhindsa RS (1993). A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol*, 102: 873~879
- Mouillon JM, Gustafsson P, Harryson P (2006). Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiol*, 141: 638~650
- Mouillon JM, Eriksson SK, Harryson P (2008). Mimicking the plant-cell interior under water stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiol*, 148: 1925~1937
- Mtwisha L, Brandt W, McCready S, Lindsey GG (1998). HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol*, 37: 513~521
- Mueller JK, Heckathorn SA, Fernando D (2003). Identification of a chloroplast dehydrin in leaves of mature plants. *Int J Plant Sci*, 164: 535~542
- Mundy J, Chua NH (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J*, 7: 2279~2286
- Neven LG, Haskell DW, Hofig A, Li QB, Guy CL (1993). Characterization of a spinach gene responsive to low tem-



- perature and water stress. *Plant Mol Biol*, 21: 291~305
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 45: 263~279
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J*, 50: 452~465
- Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 54: 743~753
- Riera M, Figueras M, Lopez C, Goday A, Pages M (2004). Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 9879~9884
- Rinne PL, Kaikuranta PL, van der Plas LH, van der Schoot C (1999). Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*, 209: 377~388
- Robertson M, Chandler PM (1994). A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with an atypical pattern of expression. *Plant Mol Biol*, 26: 805~816
- Rodriguez EM, Svensson JT, Malatrasi M, Choi DW, Close TJ (2005). Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor Appl Genet*, 110: 852~828
- Rorat T, Szabala BM, Grygorowicz WJ, Wojtowicz B, Yin Z, Rey P (2006). Expression of SK<sub>3</sub>-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*, 224: 205~221
- Rorat T (2006). Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett*, 11: 536~556
- Schneider K, Wells B, Schmelzer E, Salamini F, Bartels D (1993). Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta*, 189: 120~131
- Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC (2003). Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiol*, 131: 963~975
- Sun X, Yuan S, Lin HH (2006). Salicylic acid decreases the levels of dehydrin-like proteins in *Tibetan hulless* barley leaves under water stress. *Z Naturforsch C*, 61: 245~250
- Swire-Clark GA, Marcotte WR (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol*, 39: 117~128
- Tompa P, Banki P, Bokor M, Kamasa P, Kovacs D, Lasanda G, Tompa K (2006). Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophys J*, 91: 2243~2249
- Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martinez MC, Torne JM, Pages M (1990). Gene, sequence, developmental regulation and protein phosphorylation of RAB17 in maize. *Plant Mol Biol*, 14: 423~432
- Welling A, Rinne P, Vihera-Aarnio A, Kontunen-Soppela S, Heino P, Palva ET (2004). Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *J Exp Bot*, 55: 507~516
- Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, Close TJ, Yu XM, Griffith M (1999). Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol Plant*, 105: 600~608
- Xu J, Zhang YX, Wei W, Han L, Guan ZQ, Wang Z, Chai TY (2008). BJDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. *Mol Biotechnol*, 38: 91~98
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251~264
- Zhang L, Ohta A, Takagi M, Imai R (2000). Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J Biochem*, 127: 611~616
- Zhang Y, Li J, Yu F, Cong L, Wang L, Burkard G, Chai T (2006). Cloning and expression analysis of SKn-type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. *Mol Biotechnol*, 32: 205~218