

植物 HY5 蛋白结构与功能的研究进展

张荔, 周波, 李玉花*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: HY5 (LONG HYPOCOTYL 5)为光形态建成的正调控因子,是光调控植物发育的分子开关。在光诱导的基因表达中, HY5调控着植物基因组中上千基因的表达,它既可以单独调控相关基因的表达,也可以与其他调控因子一起共同调控相关基因的表达。HY5蛋白除了在光形态建成中起作用外,还在植物激素的信号传递过程中起着极其重要的作用,它整合了光信号传递和植物激素的信号传递。本综述简要介绍HY5蛋白的结构、生理功能及其分子机制等方面有关的进展。

关键词: HY5; 光形态建成; 基因表达; 调控因子

Advances in the Structure and Function of HY5 in Plant

ZHANG Li, ZHOU Bo, LI Yu-Hua*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: HY5 (LONG HYPOCOTYL 5) is a regulator of photomorphogenic development and a light regulated developmental molecular switch. It regulates thousands of plant genes in the light-induced gene expression. HY5 can regulate the expression of related genes on its own or with other regulatory factors. Except the function in the photomorphogenesis, HY5 was also found to play an important role in the process of plant hormone signal transduction. It integrates the transduction of light signal and hormone signal. As the study and profound analysis of HY5, its structure, physiological function, and molecular mechanism were clarified gradually. A brief introduction about the progress of HY5 was reviewed.

Key words: HY5; photomorphogenesis; gene expression; regulator

1 HY5蛋白的性质与结构

HY5 (LONG HYPOCOTYL 5)是从拟南芥 *hy5* 突变体中克隆的与光形态建成相关的重要基因,其编码的蛋白由 168 个氨基酸组成,分子量是 18.5 kDa,为组成型核定位蛋白(Oyama 等 1997)。拟南芥中 HY5 基因编码的 HY5 是一个碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)类型的转录因子。其二级结构由两部分结构域组成: (1)高度灵活、无序的 N 末端结构域(1~110 位氨基酸); (2)包含卷曲螺旋的 LZ 结构域的 C 末端结构域(111~168 位氨基酸)(Yoon 等 2006)。这种结构决定了其在基因表达调控中的作用。

1.1 高度灵活、无序的 N 末端结构域 HY5 蛋白 N 末端 1~77 个氨基酸是蛋白质水解作用比较敏感的区域,在生理条件下不是完全随机的螺旋形式,而以一种“溶球体”(molten globule)的前体结构存在。N 端的 77 个氨基酸在和 COP1 相互作用中起着关键的作用(Chattopadhyay 等 1998),第 43~58 位

氨基酸是结合 COP1 的核心结构域。第 78~110 位的氨基酸组成了蛋白的基本区域(basic region, BR),为螺旋和溶球体的球状结构,其次级结构不稳定,通过与 DNA 的结合以稳定其三级结构(Yoon 等 2006)。

1.2 包含卷曲螺旋的 LZ 结构域的 C 末端结构 HY5 的 LZ 结构域(113~149 位氨基酸)不能被胰蛋白酶酶切水解,表明 LZ 的结构域中有一个稳定的次级结构(Yoon 等 2006)。研究表明 HY5 的 LZ 同型二聚体由 2 个 α 螺旋缠绕组成一个左手的超螺旋结构,每一个平行双链的 α 螺旋卷曲直径为 18 Å,长度为 60 Å。LZ 结构域中包含 n 个七碱基的重复,记为(abcdefg)n。亮氨酸是疏水性氨基酸,排列在 α 螺旋的一侧,所有带电荷的氨基酸残基排在另一侧,

收稿 2010-06-10 修定 2010-08-03

资助 国家自然科学基金(30730078, 30800082)、高等学校博士学科点专项科研基金(200802251039)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(07029)。

* 通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191783)。

2个蛋白质分子平行排列形成二聚体(Yoon等2007)。拟南芥HY5的LZ结构域包含7个螺旋内部的氢键连接,并且形成了更多的盐桥,这比在其他LZ结构域中要多,形成了稳定的HY5的LZ结构域。其蛋白的C末端具有bZIP结构域,可直接与基因启动子作用元件G-box相结合,激活并诱导基因的表达。

2 HY5蛋白的生理功能

2.1 HY5蛋白在光形态建成中的作用 光不但提供给植物体能量,而且在植物整个生命过程中起着调节发育作用(Kendrick 1994)。生长在光下或者黑暗条件下的植物幼苗有着两种完全不同的发育模式,分别称为光形态建成(photomorphogenesis)和暗形态建成(skotomorphogenesis)。当幼苗在有光的条件下生长时,其下胚轴变短,子叶大且伸展,有发达的叶绿体,植株去黄化(de-etioletion),称为光形态建成;当植物幼苗生长在黑暗条件下,其下胚轴伸长,幼苗顶端弯曲,子叶小且萎缩,并且含有黄化质体,表现为暗形态建成。野生型拟南芥在光环境下,表现为光形态建成,但是其*hy5*突变体植株生长在光下时,表型为暗形态建成(Oyama等1997)。

在植物细胞中,光信号首先被光受体接收,然后通过信号传递形成细胞内的第二信使系统进而级联传递起到调节光形态建成的作用。目前已知的至少有三类接收光信号的光受体,即吸收红光和远红光(波长600~750 nm)的光敏色素(phytochrome)、吸收蓝光和UV-A(波长为320~500 nm)的隐花色素(cryptochrome)和吸收UV-B(波长为282~320 nm)的受体,但此受体迄今尚未分离到(Staub等1996)。

拟南芥过量表达HY5的转基因植株,在光下生长时,其下胚轴缩短,子叶大且伸展,有发达的叶绿体,植株去黄化,表现为光形态建成,表明HY5是光形态建成过程中一个正调控因子。但是有趣的是,在黑暗条件下,过量表达的HY5植株却不会表现为光形态建成的表型,表明了仅仅是HY5自身不足以引起植物的光形态建成,还有其他因子的协同作用(Ang等1998)。而且在各种光条件处理下,*hy5*突变体的下胚轴伸长的受抑制作用明显降低,说明HY5位于各种光受体信号转导途径的下游(Holm等2002; Ulm等2004)。

然而,在不同波长的光下,负责调节HY5积累的主要光受体也不同。在蓝光下,富集的CRY1和CRY2对HY5的积累起到十分重要的作用。目前主要认为CRY1和CRY2的作用模式为“分子内氧化还原模式”,蓝光信号启动了隐花色素本身的氧化还原反应,激活了隐花色素的C端,通过直接的蛋白质与蛋白质之间的相互作用使光形态建成负调控因子COP1(constitutively photomorphogenic 1)迅速钝化,继而消除了COP1对HY5和其他底物的降解, HY5积累之后可以促进光形态建成(Wang等2001)。在红光下,PHYB对于HY5的含量积累起着主要的作用,但是PHYA起到的作用很小。近期的研究表明,在控制拟南芥基因表达和发育过程中,红光和蓝光存在着协同作用,主要是通过红光光受体光敏色素PHYB和蓝光/UV-A光受体CRY的共同作用来实现。在远红外光下,PHYA、CRY1和CRY2都会影响HY5的含量。在植物体中HY5的含量和光形态建成发育的程度呈正相关(Osterlund等2000)。

HY5受蓝光诱导表达,在光形态建成中和其他受蓝光诱导表达的主要调控因子HYH(HY5-HOMOLOG)以及SPA1(SUPPRESSOR OF PHYA 1)和SPA4共同参与下胚轴伸长的抑制。在蓝光下,SPA1、HY5和HYH并不是立即就对下胚轴有抑制作用,但是它们又是蓝光下对下胚轴抑制作用所不可缺少的作用因子,SPA1、HY5和HYH的表达量在红光下有一个阈值,但是在蓝光下,SPA1、HY5和HYH的表达量有着明显的提高,从而导致了对于下胚轴持续的抑制作用(Sellaro等2009)。

研究表明HY5还在长波长UV-B诱导的信号转导途径中起着重要的作用(Ulm和Nagy 2005)。HY5在UV-B光下快速转录激活,参与调控UV-B特异反应的基因群。UV RESISTANCE LOCUS 8(UVR8)是在拟南芥中鉴定出来的一个UV-B光反应特异性的复合物,可以调节UV保护应答反应。HY5及HYH均参与调节UVR8途径的应答,在缺失UVR8的情况下HY5和HYH转录因子不会调节UV-B的反应,表明HY5和HYH与UVR8是联系在一起作用的(Brown和Jenkins等2008)。

2.2 HY5 在植物激素的信号传递中的作用 HY5还在促进植物激素信号传递基因的转录中起着重要的作用, 在 *hy5* 突变体的幼苗中, 侧生根和根毛的数目明显增多, 并且形成速度加快, 主根的向重力性减低, 表明在 *hy5* 突变体的幼苗中生长素的合成量增加, 而细胞分裂素的合成量降低。对生长素的2个负调控因子 *AUXIN RESISTANT 2 (AXR2)* 和 *SOLITARY ROOT (SLR)* 基因转录水平分析表明, 它们在 *hy5* 突变体中都是低量表达的。进一步分析发现这2个基因的启动子都包含一个HY5的结合位点。体外结合研究表明, HY5可以结合到AXR2的启动子上, 说明HY5促进生长素的负调控因子AXR2和SLR的表达。因此, 在 *hy5* 突变体中, 生长素的负调控因子表达量降低导致生长素的合成增加。HY5既参与光信号诱导的基因转录调控又参与生长素信号基因的转录调控, 从而整合了光信号途径和植物激素的信号传递途径(Cluis等2004)。

Vandenbussche等(2007)发现HY5是隐花色素和细胞分裂素信号传递途径的集中点。拟南芥中, 依赖蓝光的光形态建成主要受隐花色素的调节, 如抑制下胚轴的伸长, 控制子叶的伸展, 调控光调节基因的表达。同样, 当外源细胞分裂素添加到发芽的植株上时, 发生了相似的形态建成反应, 表明隐花色素和细胞分裂素的信号途径中有着一定的连接。Lee等(2007)在实验中也发现了HY5蛋白除了调控光信号转导相关基因 *HFR1*、*PIF4*、*HYH* 和 *PKS1* 外, 还结合生长素途径、乙烯途径和赤霉素途径的很多靶基因, 如 *AUX/IAAs*、*ARFs* (*AUXIN RESPONSE FACTORS*)、*ERFs* (*ETHYLENE-RESPONSIVE FACTOR*)以及GA₁的抑制基因等, 这些也暗示了在控制基因表达中HY5整合了光和激素的信号。

3 HY5与其他蛋白的共调控作用

Hardtke等(2000)发现在拟南芥发育早期阶段HY5的含量达到顶峰, 通过凝胶过滤层析(*gel filtration chromatography*)试验表明HY5是150 kDa蛋白复合体的一部分, HY5和其他转录因子相互结合形成蛋白复合体。经过进一步的实验, 表明这一复合体在黑暗条件下和在光下生长的幼苗中都存在, 且

HY5以磷酸化和非磷酸化的形式调控着光、暗形态建成的发生, 进而也表明了HY5是和其他转录因子结合在一起共同起作用。

研究证实植物叶中特异表达基因 *RbcS1* 和花青素的生物合成过程中起作用的 *CHS* 基因的表达受光诱导, 但是HY5与 *CHS* (*chalcone synthase*)和 *RbcS1A* (*RIBULOSE BIPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A*)这2个基因的启动子结合活性却不受光暗转换条件的影响, 即HY5自身不能激活 *CHS* 和 *RbcS1A* 的转录。最近发现的MYB12作为 *CHS* 基因表达的调控因子, 其表达同样受HY5的调控。HY5激活下游转录调控因子MYB12后, 与MYB12共同调控 *CHS* 基因的表达。而且HY5和MYB12的突变体均会导致 *CHS* 表达量下降, 说明HY5和MYB12作为 *CHS* 的激活转录因子对 *CHS* 的表达是必不可少的(Lee等2007)。

生物昼夜节律是由转录高峰在黄昏的TOC1、ELF4和转录高峰在黎明的CCA1、LHY来调控的(Yanovsky和Kay2003)。TOC1、ELF4与CCA1、LHY也是相互作用的, TOC1和ELF4激活了CCA1和LHY的转录, 而CCA1和LHY则对TOC1和ELF4的转录有抑制作用。这种反馈调节维持了生物周期节律。研究表明HY5可以结合在这4种基因的启动子上, 而且在光下和黑暗条件下HY5对这些基因启动子的结合都很稳定, 这个结果同样证实了仅仅HY5自身不足以激活转录。说明可能存在其他一些共同作用的因子或者是HY5的修饰作用激活了转录过程(Lee等2007)。

LZF1 (*light-regulated zinc finger protein 1*), 一个B-box型的转录因子, 位于HY5下游的基因, 是对拟南芥去黄化起作用的一类基因。LZF1的表达主要受到光和HY5的调节, 在体内HY5结合在LZF1的启动子上, 通过和其他转录因子共同作用激活LZF1的转录, 在LZF1过量表达体中, PAPI/MYB75的表达升高, 导致了转基因拟南芥中花青素的超积累(Chang等2008)。

PIF3 (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3*)是basic helix-loop-helix (bHLH)蛋白中的一员, 参与光信号转导并调控基因表达, 在花青素生

物合成中起正调控作用(Kim等2003),但PIF3必须在HY5存在的情况下才能有作用。而在持续的光条件下,PIF3和HY5在转录或者翻译水平均不存在相互调节的作用,进一步分析表明PIF3和HY5在植物体内通过直接与相关基因启动子的不同区域相结合调节其表达(Shin等2007)。

4 HY5蛋白的降解调控

在拟南芥光形态建成抑制因子中,COP1可以和HY5直接作用进行蛋白酶体途径的降解,调控相关基因的表达(Osterlund等2000)。拟南芥中的COP1是一个由675个氨基酸组成的分子量76 kDa的可溶性核蛋白,具有N-末端环形锌指结合域(ring finger zinc binding domain)、一个卷曲的螺旋区域(coiled-coil domain)和C-末端,而C-末端是与三聚体蛋白的 β -亚基类似的WD-40重复区域(WD-40 repeats)(Deng等1992)。COP1亚细胞定位的光调控是受核定位信号(NLS)和细胞质定位信号(CLS)的协作来实现的(Stacey等1999)。在光照条件下,COP1从细胞核中转移到细胞质,HY5积累启动光形态建成(Oyama等1997)。而在黑暗条件下,COP1从细胞质转移到细胞核中,靶作用于未磷酸化的HY5,通过泛素化途径降解(Hardtke等2000; Osterlund等2000)。瞬时表达分析表明植物细胞内COP1和HY5直接相互作用,COP1蛋白的WD-40结构域起关键作用(Ang等1998),而HY5的N末端1~77个氨基酸也是必不可少的(Ang等1998; Yoon等2006)。

Datta等(2007)在拟南芥中还发现了一种光形态建成的正调控因子SALT TOLERANCE HOMOLOG2 (STH2),它与COP1和HY5都具有相互作用,为COP1的抑制因子,其B-box功能域可以直接与G-box结合激活转录,可单独或与HY5共同调控光形态建成反应。这表明STH2作为光形态建成的正调控因子可以抑制COP1的表达,从而减少COP1对HY5的降解,使HY5能正调控相关基因的表达。

5 HY5蛋白的作用元件

在植物的光控发育过程中,通过一系列信号转导,激活相应的转录级联反应。Lee等(2007)发现

在拟南芥光信号传递过程,由phyA和phyB介导调控的基因中,有超过60%的基因是HY5结合的靶基因,而且在早期反应阶段HY5对phyA和phyB所介导的光控基因的表达起着重要作用。基因表达谱分析表明,HY5在光诱导相关基因表达的调控中,既可以作为正调控因子也可以作为负调控因子起作用,而且在器官特异基因表达分析中,HY5对各器官光诱导基因的表达谱的调控是相似的。

在HY5所调控基因的启动子中会含有HY5作用的顺式作用元件,除了G-box (CACGTG)结合位点外,还有CG hybrid (GACGTG)、CA hybrid (GACGTA)、Z-box (ATACGTGT)均可作为HY5作用的靶位点(Lee等2007; Shin等2007),它们属于含有ACGT元件(ACE)结合序列家族,为bZIP类蛋白的潜在结合位点。但G-box又同时为bHLH类蛋白所结合的E-box (CANNTG)结合序列家族。序列分析发现在花青素合成代谢结构基因的启动子区除了含有G-box元件外,还含有多个ACE和E-box元件。试验表明HY5结合在G-box和ACE元件上,而PIF3结合在G-box和E-box元件上(Shin等2007),因此,HY5在调控花青素合成相关基因的表达中可能与其他调控因子存在竞争调控。

6 小结与展望

综上所述,在HY5调控植物光形态建成的过程中,红光、远红光、蓝光、UV-A和UV-B均可影响HY5的积累,而且HY5是位于光信号转导的下游调控相关功能基因的表达;在植物生长发育过程中,HY5整合了光信号途径和植物激素的信号传递途径,调控激素相关基因的表达,同时还参与生物昼夜节律的调控。在分子水平上,主要通过HY5蛋白磷酸化水平、COP1介导的泛素化降解、与其他调控因子形成复合物的共调控、以及与其他调控因子竞争结合位点来调控相关基因的表达(图1)。

自从拟南芥中分离鉴定出HY5蛋白以来,许多学者对植物HY5进行了深入研究,其结构、功能及其分子机制也逐渐得到阐明,但植物HY5蛋白仅仅是高等植物光信号传递网络中的一个调控因子,光形态建成的调节机理仍尚未完全明了。HY5与

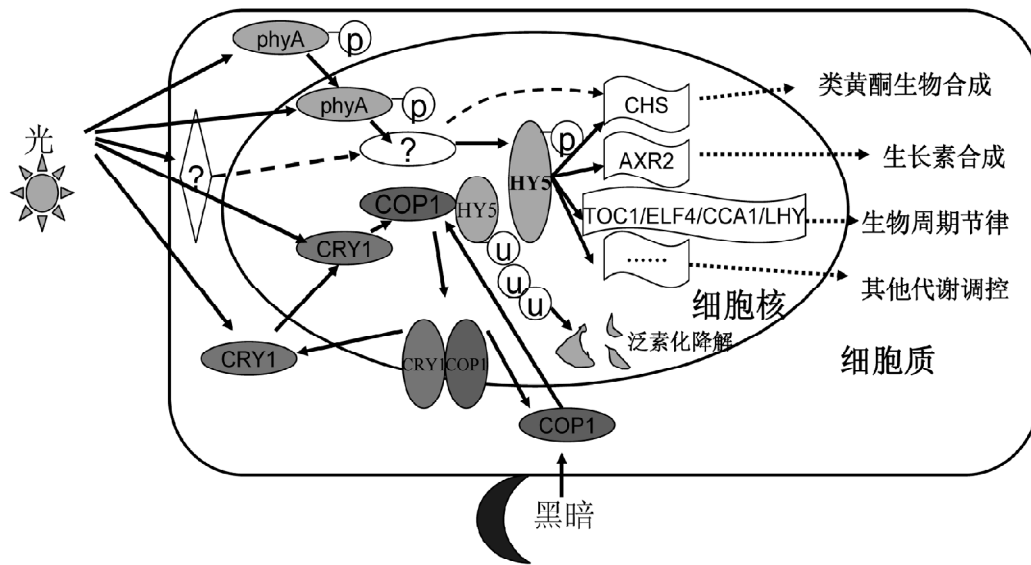


图1 植物细胞内 HY5 介导的光信号转导和形态建成

Fig.1 The light signal transduction and morphogenesis mediated by HY5 in the intracellular of plant

p 表示磷酸化; u 表示泛素化。

其他蛋白的协同作用机制还不明确, 因此, 无论从广度还是从深度都有待于进一步深入研究。

参考文献

- Ang LH, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer A, Deng XW (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell Biol*, 1: 213~222
- Brown BA, Jenkins GI (2008). UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiol*, 146: 576~588
- Chang CS, Li YH, Chen LT, Chen WC, Hsieh WP, Shin J, Jane WN, Chou SJ, Choi G, Hu JM et al (2008). LZFI, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in *Arabidopsis* de-etiolation. *Plant J*, 54: 205~219
- Chattopadhyay S, Ang LH, Puente P, Deng XW, Wei N (1998). *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell*, 10: 673~684
- Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS (2004). The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J*, 38: 332~347
- Datta S, Hettiarachchi C, Johansson H, Holm M (2007). SALT TOLERANCE HOMOLOG2, a B-box protein in *Arabidopsis* that activates transcription and positively regulates light-mediated development. *Plant Cell*, 19: 3242~3255
- Deng XW, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA, Quail PH (1992). COP1: an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G_{β} homologous domain. *Cell*, 71: 791~801
- Hardtke CS, Gohta K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K, Deng XW (2000). HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J*, 19: 4997~5006
- Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Gene Dev*, 16: 1247~1259
- Kendrick RE, Kronenberg GHM (1994). *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 491~535
- Kim J, Yi H, Choi G, Shin B, Song PS, Choi G (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, 15: 2399~2407
- Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng XW (2007). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell*, 19: 731~749
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405: 462~466
- Oyama T, Shimura Y, Okada K (1997). The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*, 11: 2983~2995
- Sellaro R, Hoecker U, Yanovsky M, Chory J, Casal JJ (2009). Synergism of red and blue light in the control of *Arabidopsis*

- gene expression and development. *Curr Biol*, 19: 1216~1220
- Shin J, Park E, Choi G (2007). PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J*, 49: 981~994
- Stacey MG, Hicks SN, von Arnim AG (1999). Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1. *Plant Cell*, 11: 349~364
- Staub JM, Wei N, Deng XW (1996). Evidence for FUS6 as a component of the nuclear-localized COP9 complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 8: 2047~2056
- Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Mate Z, Adam E, Oakeley EJ, Schafer E, Nagy F (2004). Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 1397~1402
- Ulm R, Nagy F (2005). Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (5): 477~482
- Vandenbussche F, Habricot Y, Condiff AS, Maldiney R, Van der Straeten D, Ahmad M (2007). HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 49: 428~441
- Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW (2001). Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, 294: 154~158
- Yanovsky MJ, Kay SA (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 265~276
- Yoon MK, Kim HM, Choi G, Lee JO, Choi BS (2007). Structural basis for the conformational integrity of the *Arabidopsis thaliana* HY5 leucine zipper homodimer. *J Biol Chem*, 282: 12989~13002
- Yoon MK, Shin J, Choi G, Choi BS (2006). Intrinsically unstructured N-terminal domain of bZIP transcription factor HY5. *Proteins*, 65: 856~866