

专题介绍 Special Topics

植物微管结合蛋白

张少斌, 刘曦, 张立军, 汪澈*, 洪丽华

沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161

Plant Microtubule-Associated Proteins

ZHANG Shao-Bin, LIU Xi, ZHANG Li-Jun, WANG Che*, HONG Li-Hua

Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

摘要: 本文介绍了植物微管结合蛋白MAP65家族各个成员WVD2、SPR1、EB1、MOR1、MAP200/TMBP200、AtMAP18、PLD、MAP190和SB401的研究进展。

关键词: 微管; 植物微管结合蛋白

微管(microtubule, MT)是由 α 、 β -微管蛋白异二聚体通过非共价键形成的管状结构。它与微丝(microfilament)、中间纤维(intermediate filament)共同构成真核生物的细胞骨架(cytoskeleton)。在许多生理活动中,微管通过微管结合蛋白调节自身的动态变化和不同细胞时期的列阵,如维持细胞形态与结构、参与胞质流动、调节细胞有丝分裂、控制细胞极性生长、细胞壁构建、细胞分化调控、信号转导等等(Cyr和Palevitz 1995; Lloyd 1994; Gundersen和Cook 1999; Hashimoto 2003; Mineyuki 2007)。因此微管结合蛋白对微管的调控机制一直受到广泛的关注,也是当今的研究热点之一。与动物相比,植物中微管结合蛋白的研究起步较晚。直到20世纪80年代,人们才发现一些植物微管结合蛋白,并对其化学结构及其在细胞中的功能进行了分析。近2年来,又发表了多篇关于新的植物微管结合蛋白以及植物微管结合蛋白的新功能的研究报道。这些研究结果表明,植物微管结合蛋白可以调控植物微管骨架的动态和组织,以及微管与其他细胞结构间的连接,从而在植物细胞的形态、分化和植物的生长、发育、适应逆境等生理过程中起作用(Yuan等1994; Bibikova等1999; Whittington等2001; Chan等2003b; Müller等2004; Wang等2007a; Caillaud等2008)。本文介绍近几年有关植物微管结合蛋白的研究进展。

1 植物微管结合蛋白

经典的微管结合蛋白定义是指在体外能通过数次聚合—解聚循环而富集到微管上,并且能够与

微管共纯化(co-purified)的蛋白(Hussey等2002; Hamada 2007)。近年来,随着研究技术的发展,人们发现了越来越多的微管结合蛋白,扩大了微管结合蛋白的内涵。现在的概念是指可以直接与微管结合,对微管具有调控作用的一类蛋白(Hamada 2007)。由于这些蛋白影响并调控着微管的动态生长和组装,因此称之为 microtubule-associated proteins (MAPs)。

按照功能划分,有的植物微管结合蛋白对微管的稳定、成束(bindling)、交联(cross-link)等起作用,调控了微管不同时期的列阵;有的则负责微管的剪切(severing)、解聚、聚合,调控微管的动态(depolymerization);有的则参与微管与其他细胞结构的连接(图1)。

2 调节微管列阵的植物微管结合蛋白

在细胞中微管总是有规律地组合在一起,形成独特的排列,即微管列阵(array)。在植物细胞周期中,不同时期的细胞具有不同的微管列阵,一般包括4种列阵,间期周质列阵(cortical array)、早前期微管带(preprophase band, PPB)、纺锤体列阵(spindle array)和成膜体列阵(phragmoplast array)

收稿 2008-11-21 修定 2009-01-19

资助 国家自然科学基金(30800054)、辽宁省教育厅基金(2008656)、植物生理与生物化学国家重点实验室开放课题(PPB08002)、沈阳农业大学青年基金(2007)和沈阳农业大学大学生创新设计(2008)。

* 通讯作者(E-mail: wangwangche@163.com; Tel: 024-88487163)。

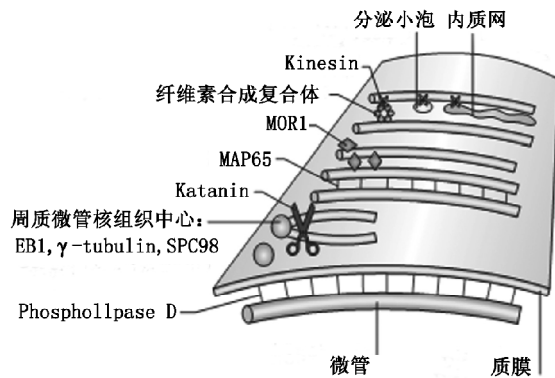


图1 植物微管结合蛋白的功能 (Lloyd 和 Chan 2004, 略有改动)

(Husse 等 2002)。各微管列阵随着细胞周期依次自然转化, 执行相应的功能, 早前期微管带预示着细胞分裂的位置, 纺锤体担负着染色体运动的功能, 成膜体参与新壁的建成, 周质微管的排列方向相对于细胞长轴而言, 有横向、纵向和斜向, 其不同的取向与细胞的伸长生长有密切关系(Hardham 和 Gunning 1978; Yuan 等 1994; Nakajima 等 2004)。微管列阵的形成需要不同蛋白的协助。迄今发现的一些植物微管结合蛋白都能够在微管之间形成横桥结构, 促进微管成束, 帮助微管形成不同列阵, 其中MAP65蛋白家族是目前研究最深入的一类植物微管结合蛋白。

植物中MAP65家族是与酵母中的Ase1家族和脊椎动物中的PRC1家族同源的一类微管结合蛋白(Chan等2003b; Smertenko等2004)。Jiang和Sonobe(1993)用生化方法从烟草(*Nicotiana tabacum*)悬浮细胞BY-2中分离到了促微管成束的蛋白因子, 电泳分析发现这些组分中含有3个分子量为60~65 kDa蛋白以及一个分子量为100 kDa的蛋白, 其中分子量为65 kDa的蛋白组分可以促微管成束, 是一类新的植物微管结合蛋白, 被命名为MAP65。Chan等(1999)从胡萝卜(*Daucus carota* var. *sativa*)悬浮细胞中用微管垂钓方法得到与烟草BY-2中类似的3个MAP65蛋白。体外实验表明, 它们可以促微管成束, 电镜观察结果表明它们在微管之间可以形成直径为25~30 nm均匀分布的横桥结构。Hussey等(2002)通过序列比对推测在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中MAP65家族有9个成员, 分子量为54~80 kDa。到目前为止, 人们对MAP65家族各成员进行了深入研究。

2.1 MAP65-1 MAP65-1是最早发现, 也是目前研究最广泛的MAP65家族成员。Smertenko等(2000)在烟草悬浮细胞中发现了NtMAP65-1a、NtMAP65-1b和NtMAP65-1c这三个MAP65蛋白家族成员, 它们的基因同源性约为85%。体外实验表明, NtMAP65-1a可以沿微管富集并促进微管聚合, 但是不能促微管成束。体内免疫荧光标记的实验结果表明, NtMAP65-1a可以和周质微管、早前期微管、纺锤体和成膜体的中间交叠区微管(反向平行的微管交叠处)结合(Smertenko等2000)。NtMAP65-1b在体外可以结合微管并促微管成束, 但不促进微管聚合, 所以推测在烟草中NtMAP65-1b可能是维持反向平行微管束的调节因子(Wicker-Planquart等2004)。

Smertenko等(2004)的研究表明, 在拟南芥中AtMAP65-1在体外具有结合微管和促微管成束的功能, 并且AtMAP65-1的二聚体在微管间形成25 nm的横桥。Mao等(2005)得到了同样的结果。AtMAP65-1蛋白功能域的研究表明, 该蛋白的C端是微管结合域, 但是单独的C端不能促微管成束。进一步研究表明, C端1~494氨基酸序列可以结合微管, 但是不结合微管蛋白, 也没有促进微管聚合的效应。C端的495~587氨基酸序列可以促进微管聚合, 其功能与全长的蛋白相似(Li等2007)。AtMAP65-1蛋白的N端1~339氨基酸序列既不结合微管也不结合微管蛋白, 也不影响微管的动态, 但是能够帮助AtMAP65-1蛋白形成同源二聚体(Smertenko等2004)。以上的研究结果说明, 在AtMAP65-1氨基酸序列中, C端495~587氨基酸序列是结合微管蛋白、促微管聚合的主要功能域, N端的主要功能为形成同源二聚体, AtMAP65-1二聚体对微管成束和微管蛋白横桥结构的形成有重要作用(Smertenko等2004; Smertenko等2006)。AtMAP65-1蛋白的表达模式的研究结果表明, AtMAP65-1蛋白在整个细胞周期中均表达, 在细胞间期和周质微管中共定位, 分裂期定位于纺锤体中心区和成膜体微管的中间反向平行重叠区(Mao等2005; Smertenko等2004; Smertenko等2006), 这种定位与它的同源蛋白Ase1和PRC1相同。在拟南芥中, AtMAP65-1蛋白在除花药和萼片之外的其他植物器官中表达(Smertenko等2004)。MAP65-1蛋白作用机制的研究结果表明, NtMAP65-1a有磷酸

化位点, 可以被 CDKs 和 NRK1 磷酸化。进一步的研究还发现, NRK1 磷酸化会消弱 NtMAP65-1a 聚合微管的活性(Sasabe 等 2006)。Smertenko 等(2006)的分析发现 AtMAP65-1 上有 9 个磷酸化位点, 并且证明了激酶磷酸化 AtMAP65-1 蛋白的过程对该蛋白与微管的结合有调节作用(Smertenko 等 2006)。

2.2 MAP65-3 Müller等(2004)在研究一个拟南芥胞质分裂异常的突变体时发现了MAP65-3, 研究的结果表明, *AtMAP65-3* 基因的 C 端突变导致该蛋白不能正常表达、不能结合微管, 因此引起了胞质分裂异常的表型(Müller 等 2004)。*Atmap65-3* 突变体的根生长异常, 与野生型的根相比, 突变体的根更短、更粗。进一步观察发现, 突变体根部的细胞多为大而不规则的膨胀细胞, 细胞内有多个已复制的核, 成膜体微管的中间区域不正常地变宽, 这些结果说明在细胞周期中, AtMAP65-3 蛋白功能的缺失虽然没有影响细胞核的复制, 却影响了胞质的正常分裂。免疫荧光定位显示, AtMAP65-3 蛋白在间期不结合周质微管, 在分裂期特异结合早前期带, 在分裂后期结合纺锤体和成膜体中间部位。免疫荧光定位实验发现, 在间期的细胞中没有检测到 AtMAP65-3, 说明 AtMAP65-3 蛋白在植物细胞间期没有表达(Müller 等 2004)。Van Damme 等(2004)通过 GFP 融合蛋白标记以及免疫荧光定位均发现, AtMAP65-3 在细胞分裂后期纺锤体以及成膜体上有分布, 而在中期纺锤体上没有检测到 AtMAP65-3 的定位。因此 AtMAP65-3 可能参与成膜体微管中间区域的反向平行微管之间的连接, 并且辅助微管正端聚合, 维持成膜体中空区域的适当宽度(Mülle 等 2004)。Caillaud 等(2008)发现 AtMAP65-3 在线虫引起寄主巨大细胞的发生过程中起作用。他们通过研究 *Atmap65-3* 基因突变体发现, AtMAP65-3 通过影响细胞分裂早期和晚期的微管列阵, 参与调控了巨大细胞形成细胞板的过程, 因此 AtMAP65-3 蛋白功能缺失后, 巨大细胞虽然能够形成, 但是不能分化, 最终死亡。

2.3 MAP65 家族的其他蛋白 Van Damme 等(2004)将拟南芥 *MAP65* 家族成员中的 1、3、4、5 和 8 分别与 *GFP* 构建形成融合基因并在悬浮细胞中表达, 融合蛋白细胞定位的观察发现, 在 4 个微管列阵中, 不同成员有各自特异性的分布。AtMAP65-4 在细胞间期不能与周质微管结合, 分布在核周围, 随

着纺锤体的形成, 出现在纺锤体的两端。AtMAP65-5 的体内定位与 AtMAP65-1 相似, 但是 *AtMAP65-5* 过表达植株细胞中的微管对微管特异性解聚药剂 oryzalin 有一定的抗性。AtMAP65-8 同样和周质微管结合, 但不是以连续状态而是以点状分布。AtMAP65-8 也出现在纺锤体的两极, 故推测该蛋白是一个结合微管负端的蛋白(Van Damme 等 2004)。

Mao 等(2005)研究 AtMAP65-6 时发现, 虽然 AtMAP65-6 和 AtMAP65-1 的同源性很高, 但在功能和定位上都表现出了各自的特异性。在体外 AtMAP65-6 不能促进微管聚合, 不能形成较大的微管束, 也没有在低温下稳定微管的功能。但是, AtMAP65-6 能够使微管形成网络状结构, 这一结构中的微管大部分都是以单根状态存在的, 仅在交界处形成少量的小微管束, 微管间的横桥仅有 10 nm。盐处理时, 这种微管结构的稳定性比 AtMAP65-1 形成的微管束更强。免疫荧光染色结果表明, 该蛋白在细胞间期定位在线粒体上, 因此推测植物细胞中线粒体可能通过微管结合蛋白与微管联系(Mao 等 2005)。

总之, 作为植物中一类重要的微管结合蛋白, MAP65 家族功能的研究结果表明, 植物中 MAP65 家族的不同成员定位在不同的微管列阵, 行使不同的功能(Wasteneys 和 Yang 2004)。

2.4 WVD2 (WAVE-DAMPENED2) WVD2 是一个保守的、分子量为 23 kDa 的高度亲水性蛋白(Yuen 等 2003)。虽然序列分析表明 WVD2 没有明显的微管结合域, 但体外试验表明 WVD2 可以与微管结合, 促微管成束。由于 WVD2 的分子量较小, 因此它的成束方式即连接微管的方式可能与 AtMAP65-1 不同。*WVD2* 过量表达植株的根和黄化下胚轴以右手螺旋方式生长, 莲座叶叶柄以左手螺旋方式生长, 这些表型说明它与细胞的极性生长有关(Yuen 等 2003)。

2.5 SPR1 (SPIRAL1) 和 EB1 SPR1 和 EB1 都是微管正端结合蛋白。SPR1 是植物特有的一类微管结合蛋白, 分子量为 12 kDa。拟南芥中有 6 个 SPR1 同源蛋白(Nakajima 等 2006)。Furutani 等(2000)最先发现, *SPR1* 突变体的根和黄化下胚轴扭曲生长, 进一步研究发现, 该表型是由于皮层和内皮层细胞极性生长受阻引起的, *SPR1* 突变体的周质微管排列异常。Sedbrook 等(2004)分离得到 *SPR1* 的等位基

因, 命名为 *Sku6*。试验证明, 在微管生长时 *Sku6*/*SPR1* 与微管的正端结合, 微管解聚时从微管正端脱落。同年, Nakajima 等(2004)证实, *SPR1* 与周质微管共定位, 在快速伸长细胞中表达水平高。这些结果表明, *SPR1* 能够调控植物周质微管, 并且影响植物细胞生长方向(Nakajima 等 2004; Sedbrook 等 2004; Nakajima 等 2006)。

EB1首先在动物中发现, 是一个微管正端结合蛋白, 在植物中也存在它的同源蛋白。Chan 等(2003a)用GFP标记AtEB1, 发现在拟南芥悬浮细胞中 AtEB1 定位在成膜体列阵、纺锤体列阵和周质微管列阵上。在纺锤体列阵中 AtEB1 分布在微管的负端, 在周质微管列阵中集中分布在微管的正端或以点状结构分布在微管生长的初始端或缩短的末端方向, 这种点状结构可能代表微管的成核位置, 表明微管的成核位点具有流动性。同年, Mathur 等(2003)的实验结果表明AtEB1-GFP融合蛋白的拟南芥转基因植株中, AtEB1主要分布在微管的正端, 并且在内质网上分布, 因此AtEB1可能参与调控了内质网结构的变化, 从而影响了细胞极性生长。这两个实验室不同的研究结果可能由于使用了不同表达体系, 也显示了EB1功能的复杂性(Hamada 2007)。

3 调节微管动态变化的微管结合蛋白

微管骨架是一种具有极性的蛋白结构。由于微管两端存在着不同的极性, 因此两端的生长速率不同, 在细胞中微管始终处于高度的动态变化之中。这种动态变化是微管最重要的特性之一, 也是微管行使功能所必需的。随着对微管动态特性研究的不断深入, 已发现了一些调节微管聚合和解聚的植物微管结合蛋白。

3.1 促进微管聚合因子 植物中促进微管聚合的微管结合蛋白主要有拟南芥中的 *MOR1* 和烟草中 *MAP200/TMBP200*, 这两种蛋白都与动物中的微管结合蛋白 *MAP215* 蛋白家族高度同源。在 *MAP215* 家族中, 不但动植物中的蛋白成员序列具有高度同源性(Gard等1987; Hamada 2007), 它们的生化特性也类似, 因此认为它们可能对微管的调节机制是相同的。

3.1.1 MOR1 (microtubule organization 1) 拟南芥中的 *MOR1* 与爪蟾卵的微管结合蛋白 *XMAP215* 是同源蛋白, 属于同一家族(Whittington 等 2001)。该蛋白的分子量约为 217 kDa (Whittington 等 2001)。

Whittington 等(2001)发现拟南芥 *mor1* 突变体与野生型相比, 对温度更敏感。蛋白序列比对表明, 该蛋白也是动物微管结合蛋白 *MAP215* 的同源蛋白。*mor1* 突变体微管列阵的观察结果表明, 在 21 °C 下 *mor1* 突变体的周质微管的状态与野生型没有区别, 但是将突变体转移到 29 °C 下以后, 该突变体与野生型相比, 其周质微管逐渐变成短小、无规律的片断, 丧失了微管规则的横向平行排列结构。免疫荧光染色发现, 该蛋白可以与细胞周期中各微管列阵共定位。Kawamura 等(2006)进一步研究 *mor1* 突变体的细胞分裂时发现, 突变体细胞的染色体分离和胞质分裂延迟, 纺锤体以及成膜体的结构异常, 但是纺锤体与成膜体中的微管没有严重的片断化(Twell 等 2002; Kawamura 等 2006)。因此认为该蛋白可能调控了植物细胞周质微管的稳定性。

3.1.2 MAP200/TMBP200 烟草中的 *MAP200* 也是爪蟾卵的微管结合蛋白 *XMAP215* 的同源蛋白(Hamada 等 2004)。该蛋白是 Hamada 等(2004)用生化方法纯化出来的一个新的微管结合蛋白, 通过序列比对发现它的部分氨基酸序列与 *MOR1/XMAP215* 同源。在整个细胞周期中, *MAP200* 能够与各时期的微管列阵结合。体外实验发现, *MAP200* 不仅能够促进微管聚合, 而且能够增加微管的数目, 实验体系中微管数量与 *MAP200* 浓度正相关(Hamada 等 2004)。体内实验表明, 除了 *MAP200*, 还有一些蛋白与细胞质中的非聚合状态的微管蛋白结合, 与体外实验结果一致。Hamada 等(2004)认为 *MAP200* 通过结合微管蛋白的寡聚体在微管聚合初期作为微管聚合的种子, 在微管进入伸长期后它又作为一个运输载体将微管蛋白寡聚体运送到微管的正端并与微管结合, 从而促进了微管的聚合。在烟草中另一个微管结合蛋白 *TMBP200* 的特异性抗体可以识别 *MAP200*, 因此认为 *TMBP200* 和 *MAP200* 是同一基因的产物, 也属于 *MAP215* 家族蛋白(Hamada 等 2004)。它们之间的区别在于, *MAP200* 是从在间期细胞中纯化的, 而 *TMBP200* 是从分裂末期的细胞中分离到的, *TMBP200* 可以促微管成束, 在成束的微管间形成 15 nm 的横桥结构(Yasuhara 等 2002)。

3.2 微管去稳定因子 动物中有多个微管去稳定因子, 如剑蛋白(Katanin)、Op18和 *MACK/Kin I Kinesin* 蛋白家族。这些蛋白对微管的调控主要是改变微

管端部结构使微管去稳定或者直接将微管切割成较小的片断而使微管去稳定。拟南芥中已发现了Katanin的同源蛋白(Hamada 2007)。

3.2.1 剑蛋白(Katanin) Katanin是最初在动物中发现的一种能够切割微管的蛋白,被命名为剑蛋白(McNally和Vale 1993; Burk等2001)。该蛋白由一个60 kDa的亚基(p60)和一个80 kDa (p80)的亚基组成, p60属于ATPase家族,具有切割微管的作用, p80负责连接微管组织中心,调节p60的活性(McNally和Vale 1993; Burk等2001)。Burk等(2001)从拟南芥基因组中克隆到一个基因,编码的蛋白命名为AtKTN1,与动物中Katanin p60亚基同源。拟南芥野生型植株G1期的细胞中微管从细胞核上脱离并迅速解聚,而在*Atktn1*缺失突变体的G1期细胞中,微管从细胞核上脱离下来后可以存在很长时间(Burk等2001)。进一步研究发现,该蛋白在体外能够与微管结合,并且在ATP存在的条件下能够切割微管。AtKTN1切割微管的活性与体系中微管蛋白的比例相关,在体系中AtKTN1与微管蛋白比例较低的情况下,AtKTN1的ATPase活性会大幅增加,因此切割微管的活性增强;而当体系中AtKTN1与微管蛋白比例较高的情况下,AtKTN1的ATPase活性会受到明显抑制,同时切割微管的活性减弱(Stoppin-Mellet等2002)。在体内AtKTN1具有切割微管的作用,使微管去稳定。另外,AtKTN1在体内能够影响细胞壁物质的合成,并在许多植物生长发育的过程中起作用,如细胞极性生长、激素的信号传递和根毛的发育等(Burk等2001; Burk和Ye 2002; Lloyd和Chan 2004; Stoppin-Mellet等2006; Brodersen等2008)。AtKTN1是植物中发现的第一个使微管片段化的蛋白。

3.2.2 AtMAP18 Wang等(2007b)在拟南芥中发现了一种新的植物微管结合蛋白,能够使微管去稳定,被命名为AtMAP18。在拟南芥中,AtMAP18是通过动物微管结合蛋白MAP1B(Noble等1989)的微管结合域VVEKKEE不完全重复序列比对发现的。AtMAP18的分子量为18.5 kDa,在168个氨基酸中,有8个MAP1B微管结合域V-V-E-K-K-N/E-E的不完全特征重复序列。体内实验证实,AtMAP18蛋白在微管上呈点状分布,说明AtMAP18蛋白可能只与微管某些部位结合。浊度法实验表明,AtMAP18的浓度越高,抑制微管聚合的作用越明显。荧光观

察的结果与浊度法的实验结果一致。AtMAP18的多克隆抗体分析和GUS活性均显示AtMAP18蛋白在花和根器官中分布。在*AtMAP18*过表达的纯合转基因植株中,大部分细胞的形态均发生异常,如子叶的砌砖式细胞(pavement cell)、根表皮细胞、下胚轴表皮细胞和皮层细胞。这些细胞形态的改变都与细胞极性生长相关(图2)。*AtMAP18*过表达植株和RNAi突变体的微管药理学研究表明,与野生型相比,过表达植株对微管解聚药剂更敏感, RNAi突变体对微管解聚药剂则表现出一定的抗性。这些结果证明了AtMAP18蛋白是植物细胞内的一种新的微管去稳定因子(Wang等2007b)。

3.3 负责微管与其他细胞结构间连接的微管结合蛋白 微管通过与其他细胞结构连接在植物形态建成、植物信号转导等过程中起作用。已有研究证实,周质微管与质膜间有桥联结构存在(Hardham和Gunning 1978; Marc等1996)。在许多情况下,微管与微丝相互协作发挥生理作用。因此微管与质膜、微丝之间的连接蛋白也是一类非常重要的植物微管结合蛋白。

3.3.1 周质微管与质膜的连接蛋白-磷脂酶D (PLD)

Marc等(1996)从烟草悬浮细胞BY-2中用微管蛋白亲和柱分离到一个90 kDa的蛋白,在体内与周质微管共定位。Gardiner等(2001)进一步研究发现,该蛋白具有一个钙依赖的脂质结合域,具有磷脂酶D活性,因此确定这个蛋白为一种磷脂酶D (PLD),并且证明该蛋白在体内可以同时结合周质微管和质膜,因此该蛋白可能是周质微管和质膜之间的桥梁(Marc等1996; Gardiner等2001)。在拟南芥基因组中有12个PLD基因,经比对发现,该蛋白与拟南芥中的PLD δ 为同源蛋白(Gardiner等2001; Wang 2002)。PLD水解质膜上的脂类,产生磷脂酸(phosphatidic acid, PA)。而PA是信号转导和骨架重排等生理过程的中间调节物质(key mediator),因此推测PLD具有将激素以及体外环境信号传递给微管并引起微管结构变化的功能(Marc等1996; Gardiner等2001; Wang 2002)。体内PLD可被正丁醇(1-butanol)激活,并产生不具活性的磷脂酰正丁醇(phosphatidylbutanol),但不产生PA。Gardiner等(2003)用正丁醇处理拟南芥,发现周质微管阵列被破坏,根和子叶形态异常。Dhonukshe等(2003)用正丁醇处理烟草悬浮细胞BY-2,发现周质

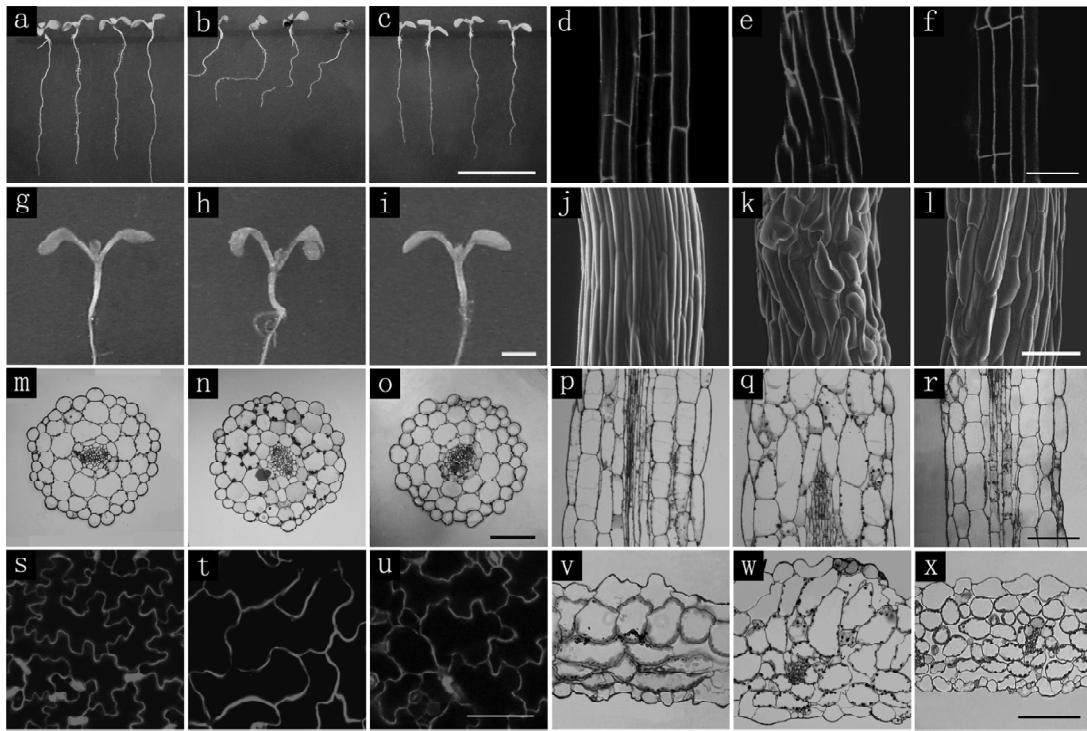


图2 AtMAP18 蛋白对植物细胞异向性生长的影响(Wang 等 2007b)

左边起, 第一、四列为野生型, 第二、五列为 *AtMAP18* 过表达植株, 第三、六列为 *AtMAP18* RNAi 植株。第一行为植物根及根细胞形态, 第二行为植物下胚轴及其细胞形态, 第三行为下胚轴细胞的横切和纵切, 第四行为植物子叶砌砖式细胞形态。

微管从质膜上掉下来, 并且部分解聚。这些结果表明, 正丁醇破坏了PLD与微管之间的连接并引起列周质微管阵列重组, 周质微管结合到质膜的过程是通过 PLD-PA 复合体介导的。PLD 是目前公认的微管与质膜间的连接蛋白(Wang 2002)。

3.3.2 微管、微丝间连接蛋白 在细胞中, 微管骨架和微丝骨架的关系非常密切。例如在微管的4个列阵中都有微丝骨架的参与, 同时微丝还参与了微管列阵的形成过程(Wastneys 和 Yang 2004)。花粉管生长过程和拟南芥子叶砌砖式细胞的形态构成等(Anderhag 等 2000; Fu 等 2005)。在动物中已报道了很多同时连接微丝、微管的蛋白, 如 MAP1B、MAP2、Tau 蛋白、MACF 等 10 种蛋白因子都对微管、微丝骨架系统有调节作用(Wastneys 和 Yang 2004)。植物中相关的报道较少, MAP190 和 SB401 这两个植物微管结合蛋白可以同时作用于微丝和微管, 并且将这两种骨架联系在一起。

3.3.2.1 MAP190 MAP190是从BY-2细胞中分离得到的(Igarashi等2000), 它既可以结合微管也可以结合微丝, 在体外有促微管、微丝成束的功能。体内免疫荧光显示MAP190蛋白定位在核上, 在细胞

分裂过程中结合到纺锤体和成膜体上(Igarashi 等 2000)。Hussey 等(2002)发现 MAP190 蛋白 C 端有一个内质网定位信号, N端有一个类钙调蛋白的结构域(calmodulin like domain)。因此 MAP190 可能在细胞分裂过程中以钙依赖的方式将微丝、微管和内质网连接在一起。另外, 通过序列比对还发现拟南芥中存在一个MAP190的同源蛋白(Hussey 等 2002)。

3.3.2.2 SB401 SB401 是 Liu 等(1997)从萌发的马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)花粉cDNA文库中分离得到的。SB401 蛋白的氨基酸序列中包含 6 个 V-V-E-K-K-N/E-E 的不完全重复序列, 这些重复序列与动物神经细胞中微管结合蛋白MAP1B的微管结合域的核心特征序列(K-K-E/N-E)高度保守, 因此 SB401 蛋白可能是一种新的植物微管结合蛋白。通过微管共沉淀实验以及体外和体内 SB401 与微管共定位的实验, SB401被证明是一种新的植物微管结合蛋白, 可以调节微管聚合和微管结构。进一步研究的结果表明, SB401蛋白还可以结合微丝, 促微丝成束。由于 SB401 蛋白在体外可以结合微管和微丝, 并促使两者成束。因此在分析该蛋白与微

管、微丝的结合能力时发现,当实验体系中SB401浓度较低时,SB401优先结合微管,当SB401浓度较高时,它可以将微管和微丝连接到一起,形成“微管-微丝束”复合结构(Huang等2007)。因此SB401是一种新的连接微管和微丝的植物微管结合蛋白。

4 结束语

植物微管骨架的发现已经有40多年,随着植物微管结合蛋白研究的深入,人们对微管的动态、组织有了更加深刻的认识。尤其是近几年植物微管结合蛋白的研究得到了快速发展,2007年继Katanin蛋白(Burk等2001)之后又发现了拟南芥AtMAP18是一个新的微管去稳定因子(Wang等2007b),继MAP190(Hussey等2002)之后又证明了SB401是一个新的微管、微丝结合蛋白等(Huang等2007)。2008年发现微管可以参与microRNA的活动(Caillaud等2008),参与线虫引起寄主巨大细胞发生的过程等。这些研究结果表明微管可能还有其他的功能。相信不久的将来,植物微管结合蛋白的研究会有更多、更新的发现。

参考文献

- Anderhag P, Hepler PK, Lazzaro MD (2000). Microtubules and microfilaments are both responsible for pollen tube elongation in the conifer *Picea abies*. *Protoplasma*, 214: 141~157
- Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S (1999). Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 17: 657~665
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320 (5880): 1185~1190
- Burk DH, Ye ZH (2002). Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell*, 14 (9): 2145~2160
- Burk DH, Liu B, Zhong R, Morrison WH, Ye ZH (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell*, 13 (4): 807~827
- Caillaud MC, Lecomte P, Jammes F, Quentin M, Pagnotta S, Andrio E, de Almeida Engler J, Marfaing N, Gounon P, Abad P et al (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20 (2): 423~437
- Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW (2003a). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*, 5 (11): 967~971
- Chan J, Mao G, Smertenko A, Hussey PJ, Naldrett M, Bottrill A, Lloyd CW (2003b). Identification of a MAP65 isoform involved in directional expansion of plant cells. *FEBS Lett*, 534: 161~163
- Chan J, Jensen CG, Jensen LCW, Bush M, Lloyd CW (1999). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 14931~14936
- Cyr RJ, Palevitz BA (1995). Organization of cortical microtubules in plant cells. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 65~71
- Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TWJ, Munnik T (2003). Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell*, 15: 2666~2679
- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteney G, Yang Z (2005). *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell*, 120: 687~700
- Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T (2000). The *SPIRAL* genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 127: 4443~4453
- Gard DL, Kirschner MW (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol*, 105 (5): 2203~2215
- Gardiner J, Collings DA, Harper JD, Marc J (2003). The effects of the phospholipase D-antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 44: 687~696
- Gardiner JC, Harper JDI, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, Marc J (2001). A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell*, 13: 2143~2158
- Gundersen GG, Cook TA (1999). Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 81~94
- Hamada T (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *J Plant Res*, 120: 79~98
- Hashimoto T (2003). Dynamics and regulation of plant interphase microtubules: a comparative view. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 568~576
- Hardham AR, Gunning BES (1978). Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J Cell Biol*, 77 (1): 14~34
- Huang S, Jin L, Du J, Zhao Q, Ou G, Ao G, Yuan M (2007). SB401, a pollen-specific protein from *Solanum berthaultii*, binds to and bundles microtubules and F-actin. *Plant J*, 51 (3): 406~418
- Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol*, 50: 915~924
- Igarashi H, Orii H, Mori H, Shimmen T, Sonobe S (2000). Isolation of a novel 190 kDa protein from tobacco BY-2 cells: possible involvement in the interaction between actin filaments and microtubules. *Plant Cell Physiol*, 41: 920~931
- Jiang CJ, Sonobe S (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci*, 105: 891~901
- Li H, Yuan M, Mao TL (2007). AtMAP65-1 binds to tubulin dimers

- to promote tubulin assembly. *J Biochem Mol Biol*, 40: 218~225
- Liu JQ, Seul U, Thompson R (1997). Cloning and characterization of a pollen-specific cDNA encoding a glutamic-acid-rich protein (GARP) from potato *Solanum berthaultii*. *Plant Mol Biol*, 33: 291~300
- Lloyd C, Chan J (2004). Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 13~22
- Lloyd C (1994). Why should stationary plant cells have such dynamic microtubule? *Mol Biol Cell*, 5: 1277~1280
- Marc J, Sharkey DE, Durso NA, Zhang M, Cyr RJ (1996). Isolation of a 90-kD microtubule-associated protein from tobacco membranes. *Plant Cell*, 8 (11): 2127~2138
- Mao G, Chan J, Calder G, Doonan JH, Lloyd CW (2005). Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *Plant J*, 43 (4): 469~478
- Mao T, Jin L, Li H, Liu B, Yuan M (2005). Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol*, 138: 654~662
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Srinivas BP, Hülskamp M (2003). A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Curr Biol*, 13 (22): 1991~1997
- McNally FJ, Vale RD (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, 75 (3): 419~429
- Mineyuki Y (2007). Plant microtubule studies: past and present. *J Plant Res*, 120: 45~51
- Müller S, Smertenko A, Wagner V, Heinrich M, Hussey PJ, Hauser MT (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65 ? /PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr Biol*, 14 (5): 412~417
- Nakajima K, Kawamura T, Hashimoto T (2006). Role of the *SPIRAL1* gene family in anisotropic growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 47: 513~522
- Nakajima K, Furutani I, Tachimoto H, Matsubara H, Hashimoto T (2004). *SPIRAL1* encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, 16: 1178~1190
- Noble M, Lewis SA, Cowan NJ (1989). The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol*, 109: 3367~3376
- Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Sonobe S, Igarashi H, Itoh TJ, Hidaka M, Machida Y (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev*, 20: 1004~1014
- Sedbrook JC, Ehrhardt DW, Fisher SE, Scheible WR, Somervilleb CR (2004). The *Arabidopsis* *SKU6/SPIRAL1* gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell*, 16: 1506~1520
- Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bögre L, Hussey PJ (2006). Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci*, 119: 3227~3237
- Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, Sonobe S, Lloyd C, Hauser MT, Hussey PJ (2004). The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell*, 16: 2035~2047
- Smertenko A, Saleh N, Igarashi H, Mori H, Hauser-Hahn I, Jiang CJ, Sonobe S, Lloyd CW, Hussey PJ (2000). A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat Cell Biol*, 2: 750~753
- Stoppin-Mellet V, Gaillard J, Vantard M (2006). Katanin's severing activity favors bundling of cortical microtubules in plants. *Plant J*, 46 (6): 1009~1017
- Stoppin-Mellet V, Gaillard J, Vantard M (2002). Functional evidence for *in vitro* microtubule severing by the plant katanin homologue. *Biochem J*, 365: 337~342
- Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ (2002). MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat Cell Biol*, 4 (9): 711~714
- Van Damme D, Van Poucke K, Boutant E, Ritzenthaler C, Inzé D, Geelen D (2004). *In vivo* dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol*, 136 (4): 3956~3967
- Wang C, Li J, Yuan M (2007a). Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 48 (11): 1534~1547
- Wang X (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 5 (5): 408~414
- Wang X, Zhu L, Liu B, Wang C, Jin L, Zhao Q, Yuan M (2007b). *Arabidopsis* MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell*, 19: 877~889
- Wasteneys GO, Yang Z (2004). New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiol*, 136: 3884~3891
- Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteneys GO (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature*, 411: 610~613
- Wicker-Planquart C, Stoppin-Mellet V, Blanchoin L, Vantard M (2004). Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *Plant J*, 39: 126~134
- Yasuhara H, Muraoka M, Shogaki H, Mori H, Sonobe S (2002). TMBP200, a microtubule bundling polypeptide isolated from telophase tobacco BY-2 cells is a MOR1 homologue. *Plant Cell Physiol*, 43 (6): 595~603
- Yuan M, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW (1994). Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 6050~6053
- Yuen CYL, Pearlman RS, Silo-suh L, Hilson P, Carroll KL, Masson PH (2003). WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 131: 493~506