

专论与综述 Reviews

植物的肌动蛋白结合蛋白

韩利波, 陈志玲*

首都师范大学生命科学学院, 北京 100037

Plant Actin-binding Proteins

HAN Li-Bo, CHEN Zhi-Ling*

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China

摘要: 文章介绍植物细胞内几类肌动蛋白结合蛋白(如:前纤维蛋白、形成素、肌动蛋白相关蛋白2/3复合体、肌动蛋白解聚因子和成束蛋白)的结构、性质和功能的研究进展。

关键词: 植物; 微丝骨架; 肌动蛋白结合蛋白

微丝又称肌动蛋白纤维, 是细胞骨架的主要成员, 广泛存在于真核细胞中。现已查明微丝骨架参与细胞内众多的生理活动, 如胞质环流、细胞分裂、染色体迁移、细胞壁构建和细胞器定位、顶端生长、信号转导等。因此从微丝骨架发现之日起就成为人们研究的热点之一。

细胞中的肌动蛋白以两种形式存在, 即球状肌动蛋白(global actin, G-actin)和微丝(filament actin, F-actin), 多个单体肌动蛋白按照一定方式聚合形成微丝, 二者处于动态的聚合解聚的平衡过程中。与动物细胞及酵母细胞的微丝骨架相比, 植物细胞中的微丝骨架的动态变化更为活跃。有研究表明, 酵母细胞中大多数的肌动蛋白以微丝形式存在(Karpova等1995), 而玉米及虞美人的花粉中只有5%~10%的肌动蛋白以微丝形式存在(Gibbon等1999; Snowman等2002), 烟草悬浮细胞中1%~2%的肌动蛋白以微丝形式存在(Wang等2005)。由此可见, 植物肌动蛋白具有独特的动力学特性, 而这种独特的动力学特性受一系列细胞内外信号调控, 其中肌动蛋白结合蛋白(actin-binding proteins, ABPs)扮演着非常重要的角色, 肌动蛋白结合蛋白可以结合单体肌动蛋白或微丝, 对微丝的解聚聚合过程以及三维网状结构进行调节。

植物细胞 ABPs 的研究起步较晚, 目前分离获得的 ABPs 有十余种, 主要包括前纤维蛋白、形成素、肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体、肌动蛋白解聚因子和成束蛋白等。

1 前纤维蛋白(profilin)

前纤维蛋白是最早得到鉴定的肌动蛋白结合蛋白, 其分子量为 12~15 kDa, 广泛分布在真核细胞中。植物细胞中的前纤维蛋白是 1991 年 Valenta 等研究赤扬花粉中的致敏源时发现的, 1993 年, Valenta 证实为肌动蛋白结合蛋白(Valenta 等 1991, 1993)。此后, 人们对植物前纤维蛋白的结构、性质及功能进行了深入的研究, 取得了一些重要进展。

不同来源的前纤维蛋白一级结构的保守性较低, 但是三维结构很相似(Fedorov 等 1997)。从三维结构来看, 前纤维蛋白的中央都是由 7 条反向平行的 β - 折叠构成的球形分子, N 末端和 C 末端是相互靠近的 α - 螺旋结构, 位于同一个平面上, 前纤维蛋白有 3 个结构域, 这些结构域分别负责与肌动蛋白、磷脂酰肌醇以及富含脯氨酸的蛋白的结合。

前纤维蛋白是含量最为丰富的肌动蛋白结合蛋白, 对于微丝骨架的动态特性具有较为复杂的影响。非植物系统的研究表明, 前纤维蛋白一方面可以通过结合单体肌动蛋白阻止微丝的聚合, 另一方面可以通过提高结合于单体肌动蛋白的 ATP 和 ADP 之间的交换速度促进微丝的聚合。在

收稿 2008-01-09 修定 2008-05-06

资助 国家自然科学基金(30100091)。

* 通讯作者(E-mail: Zhilingch@sina.com; Tel: 010-68901494)。

植物中, 还未见前纤维蛋白有促进核苷酸交换的能力, 而玉米的前纤维蛋白还轻微抑制花粉单体肌动蛋白的核苷酸交换(Kovar等2000), 但最近的研究发现, 拟南芥中腺苷酸环化酶相关蛋白可以直接提高单体肌动蛋白的核苷酸交换能力, 进而对肌动蛋白库中未聚合的ATP-肌动蛋白进行调控(Chaudhry等2007)。任海云等(2000)用紫外检测和共沉淀的方法研究玉米花粉内源前纤维蛋白对丝状肌动蛋白的调节时发现, 前纤维蛋白在体外能够封存单体肌动蛋白, 从而使微丝的聚合速度和程度减少, 未发现前纤维蛋白促进微丝聚合。Staiger等(1994)采用显微注射技术向紫露草雄蕊毛细胞中注入前纤维蛋白增加细胞内前纤维蛋白的浓度后, 发现胞质环流停滞, 跨液泡的微丝束受到破坏; 而Wang等(2005)在烟草悬浮细胞中过量表达前纤维蛋白时, 细胞中微丝的含量提高。这些研究表明, 前纤维蛋白的功能十分复杂, 可能是不同的前纤维蛋白异型体在不同的细胞和不同的发育阶段具有不同的功能。

前纤维蛋白除了与单体肌动蛋白结合外, 还可以结合磷脂酰肌醇, 如: 磷脂酰肌醇二磷酸(phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, PIP₂)。磷脂酰肌醇二磷酸因与前纤维蛋白结合而得到保护, 不为磷脂酶C(phospholipase C, PLC)水解, 但磷脂酶C磷酸化修饰以后, 便能克服前纤维蛋白对磷脂酰肌醇二磷酸的保护而将其水解(Todderud等1990)。磷脂酰肌醇二磷酸是第二信使1,4,5-三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-triphosphate, IP₃)的直接前体, 而1,4,5-三磷酸肌醇则启动Ca²⁺信号, 于是前纤维蛋白将微丝骨架的动态与信号转导途径联系起来。有研究表明, 玉米根毛顶端中磷脂酰肌醇二磷酸与前纤维蛋白共分布, 并呈梯度分布特点, 以1~5 μmol·L⁻¹的胡蜂毒肽(mastoparan)处理水解磷脂酰肌醇二磷酸后, 原来在根毛顶部呈弥散状分布的肌动蛋白帽形成清晰的微丝束, 进而导致顶端生长停止(Braun等1999)。由此可见, 磷脂信号通路调节着微丝骨架的动态组装。

前纤维蛋白还可以与富含脯氨酸的蛋白质结合, 如: 形成素相关蛋白(formin-related protein), 在植物细胞中, 它是仅有的一类富含脯氨酸并能与前纤维蛋白结合的蛋白, 也是重要的肌动蛋白结合蛋白。

2 形成素(formin)

形成素蛋白即FH蛋白(formin homology protein), 是一类肌动蛋白成核因子(Zigmond 2004)。除少数蛋白如形成素蛋白C外, 大多数形成素蛋白都有两个基本结构域: 富含脯氨酸的FH1结构域和高度保守的FH2结构域。FH1结构域对于与前纤维蛋白的结合是必需的, FH2结构域是与肌动蛋白相互作用的结构域, 而且是形成素蛋白的识别特征。尽管目前从植物中鉴定获得了一些形成素蛋白家族成员, 但是关于植物形成素蛋白的功能研究还不多。

在拟南芥基因组中发现至少存在着21个编码形成素蛋白的基因。Cheung和Wu(2004)发现, 拟南芥形成素蛋白1(*Arabidopsis formin 1*, AtFH1)在花粉管中过量表达可诱导形成大量的从细胞膜发出的微丝束, 并且引起花粉管生长的极性丧失, 导致花粉管变粗, 生长停止; 而适度过量的拟南芥形成素蛋白1则能促进花粉管的生长。这说明拟南芥形成素蛋白1对细胞的极性生长是非常重要的。此外, 还有研究显示, 包含拟南芥形成素蛋白8的FH1结构域和FH2结构域的重组蛋白可以在体外促进肌动蛋白成核, 降低临界浓度, 降低正端聚合速度以及剪切的作用, 拟南芥形成素蛋白8在拟南芥中过量表达, 导致根毛细胞形态发生明显的变化, 伴随有细胞内微丝骨架分布的异常(Yi等2005); 拟南芥形成素蛋白5的突变会使胚乳的胞质分裂发生推迟(Ingouff等2005)。这些结果表明, 植物中的形成素蛋白对植物细胞的极性生长、形态发生和细胞分裂都有作用。

基于形成素蛋白结构上的特点, Yi等(2005)首次利用体外系统证实拟南芥形成素蛋白8的FH1结构域可直接介导拟南芥形成素蛋白8与前纤维蛋白的相互作用, 并推测结合单体肌动蛋白的前纤维蛋白与结合在丝状肌动蛋白正端的拟南芥形成素蛋白8的FH1结构域相互作用, 进而将单体肌动蛋白递交给FH2结构域, 随后由FH2结构域通过某种机制将单体肌动蛋白加入至丝状肌动蛋白正端。由此我们可以看出, 不同的肌动蛋白结合蛋白之间对微丝的动态进行着协同调节。

3 肌动蛋白相关蛋白2/3复合体(actin-related protein 2/3 complex, Arp2/3复合体)

肌动蛋白相关蛋白2/3复合体是除形成素蛋白

之外的另一类肌动蛋白成核因子, 它由7种亚基组成, 分别是 Arp2、Arp3、Arapc/p41、Arapc2/p31、Arapc3/p21、Arapc4/p20 和 Arapc5/p16, 其中和肌动蛋白相关的亚基为 Arp2和Arp3 (Higgs和Pollard 2001)。活化的肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体与已有的微丝结合并诱导形成新的微丝, 进而产生具分支的微丝组成的网络(Amann 和 Pollard 2001)。

在拟南芥基因组中已经发现编码上述7种亚基的基因。Mathur 等(2003)发现, 在拟南芥中 *wurm*和*distorted1*基因分别编码肌动蛋白相关蛋白 2 和肌动蛋白相关蛋白 3, 而这2个基因的突变可导致多种类型细胞的生长发生异常, 如: 叶片表皮毛细胞的伸展方向随机, 根毛细胞变得弯曲等等; 他们的进一步研究发现, 细胞形态的变化与细胞内丝状肌动蛋白的分布异常密切相关。Li 等(2003)用 T-DNA 插入方法研究肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体时发现, 肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体通过调节微丝的动态在叶的形态建成中发挥重要作用。由此可以看出, 肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体在维持细胞形态中有至关重要的功能。但是, 有研究表明, 在肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体活性缺失的情况下, 植物也能生长并完成其生长周期, 表明肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体对于基于肌动蛋白的细胞生理活动不是必需的, 可能有其特殊的调控机制。其中 SCAR 蛋白是目前植物中唯一得到证实的肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体激活因子(Uhrig 等 2007)。

4 肌动蛋白解聚因子(actin depolymerizing factor, ADF)

肌动蛋白解聚因子是一类分子量较小且高度保守的肌动蛋白结合蛋白, 它既能结合单体肌动蛋白, 也能结合微丝, 通过提高微丝负端的解聚速度来解聚微丝, 从而提高微丝的周转率(Carlier 等 1997)。植物中有大量的编码肌动蛋白解聚因子的基因, 并且在同一种植物中往往存在多个肌动蛋白解聚因子异型体, 例如: 在拟南芥中有12种肌动蛋白解聚因子异型体, 玉米中有3种肌动蛋白解聚因子异型体, 这些异型体在表达模式上不尽相同, 推测这些异型体可能在进化过程中产生了某种功能上的差异(张成伟等 2007)。

在拟南芥中过量表达肌动蛋白解聚因子 1

时, 粗的微丝束消失, 组织和细胞生长受到抑制; 抑制肌动蛋白解聚因子 1 表达时, 则能促进微丝束的形成(Dong 等 2001)。Hussey 等(1998)采用显微注射技术将玉米花粉特异的肌动蛋白解聚因子(ZmADF1)注入到紫露草雄蕊毛细胞中, 横向的微丝束取代了原来纵向排列的微丝束, 说明肌动蛋白解聚因子含量增加引起微丝的分布发生重排。

研究肌动蛋白解聚因子活性调控时发现, 其受以下几个因素调节: (1) 靠近 N 末端的 Ser 的磷酸化能够降低 ADF 的活性(Allwood 等 2002)。(2) pH 的影响。当 pH 为 6.0 时, 它结合丝状肌动蛋白; 当 pH 高于 7.4 时, 它结合单体肌动蛋白(Yi 等 2005)。(3) 受磷脂酰肌醇二磷酸调节。磷脂酰肌醇二磷酸帮助肌动蛋白解聚因子结合到细胞膜上来影响肌动蛋白的动态变化。肌动蛋白解聚因子由于受质子、 Ca^{2+} 以及磷脂酰肌醇二磷酸这些花粉管生长调控因子的调控而被认为能影响花粉管的生长, 从而影响植物的发育。

5 成束蛋白(fimbrin)

成束蛋白是一类肌动蛋白成束蛋白, 含有2个肌动蛋白结合结构域(actin-binding domain, ABD), 此外, 在靠近 N 末端头部含有2个“EF-手”的基序(EF-hand motif)。其中每个肌动蛋白结合结构域都是由一对串连的CH结构域(calponin-homology domain)组成(图1) (Castresana 和 Sarsate 1995; Klein 等 2004), 与其他含有一个肌动蛋白结合结构域的肌动蛋白成束蛋白(如 α -辅肌肌动蛋白、红膜肽等)不同的是, 成束蛋白以单体形式使相邻的微丝交联成束状。植物中关于成束蛋白的第一篇报道是1997年Cruz-Ortega等从受铝胁迫的小麦中分离获得成束蛋白的 cDNA 部分序列; 随后, 1998年, McCurdy 和 Kim 又从拟南芥中分离得到拟南芥成束蛋白 1 cDNA 的全长序列, 拟南芥成束蛋白 1 结构的分析表明, 其与非植物的成束蛋白不同之处在于拟南芥成束蛋白 1 的 C 末端多了一段尾部序列, 迄今这段序列的功能还不清楚



图1 成束蛋白的结构
根据文献(Klein 等 2004)改画。

楚(McCurdy 等 1998)。

体外生化分析表明,原核表达的拟南芥成束蛋白1可以结合并交联花粉微丝,通常是1:4(mol ATFIM1: mol G-actin)的比例结合肌动蛋白,表现出稳定微丝的特性(Kovar 等 2000)。以俄勒冈绿488(Oregon Green 488)荧光标记的重组拟南芥成束蛋白1低浓度($10\sim 30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)注入到紫露草雄蕊毛细胞中,发现它对微丝骨架的功能几乎没有影响,激光共聚焦扫描显微镜下可观察到周质细密的微丝骨架以及跨液泡的胞质束中较粗的微丝束(Kovar 等 2000)。采用GFP-FABD2融合蛋白可以观察到拟南芥幼苗不同部位细胞中微丝骨架的分布,如:伸长的下胚轴表皮细胞中纵向排列的粗的微丝束和叶片表皮毛细胞中围绕核的明显的微丝网络等(Voigt 等 2005),从而更加肯定成束蛋白在植物细胞微丝骨架动态调控中起作用。

6 结语

与动物和酵母细胞相比,植物细胞的微丝骨架具有独特的动力学特性,而这些特性是微丝骨架发挥重要生物学功能的基础。微丝的动态特性是严格受肌动蛋白结合蛋白的时空调控来实现的,但各个肌动蛋白结合蛋白如何调控微丝动态以及不同的肌动蛋白结合蛋白之间如何协作来完成调控却知之甚少。因此,对已知的肌动蛋白结合蛋白进行详细的功能分析,了解其调节微丝动态的分子机制,无疑是今后一个非常重要的研究方向。

此外,植物体内每个肌动蛋白结合蛋白家族都由多个成员组成,它们的分布具有组织和器官特异性,不同的成员可能执行不同的功能。到目前为止,肌动蛋白单体表面还存在一些位点尚未发现与之结合的相关蛋白,这些位点可能受到某些未知的肌动蛋白结合蛋白的调控,随着植物基因组序列信息的不断丰富,陆续鉴定出新的具有与肌动蛋白作用潜力的基因将是毫无疑问的,但这些基因编码的蛋白质在体外如何调控肌动蛋白的动态特性以及在体内如何参与微丝骨架的动态组装,无疑是应该关注的问题。

总之,结合生物信息学、遗传学、分子生物学等方法,采用基因克隆、植物体过量表达以及干扰表达体系等突变体系统,新的肌动蛋白结合蛋白将不断发现,从而为进一步揭示肌动蛋白结合蛋白在植物细胞中的功能陆续提供新的线索和

依据。

参考文献

- 任海云, 易克喜, 荆艳萍(2000). 前纤维蛋白影响花粉肌动蛋白体外聚合分析. 植物学报, 42 (5): 476~479
- 张成伟, 郭林林, 王秀兰, 张辉, 石海燕, 许文亮, 李学宝(2007). 4个棉花 ADF 基因的分子鉴定及其差异表达. 遗传学报, 34 (4): 347~354
- Allwood EG, Anthony RG, Smertenko AP, Reichelt S, Drobak BK, Doonan JH, Weeds AG, Hussey PJ (2002). Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LlADF1. Plant Cell, 14: 2915~2927
- Amann K, Pollard TD (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 15009~15013
- Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzal D (1999). Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. Planta, 209: 435~443
- Carlier MF, Laurent V, Santolinin J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua N-H, Pantaloni D (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. J Cell Biol, 136 (6): 1307~1323
- Castresana J, Saraste M (1995). Does Vav bind to F-actin through a CH domain? FEBS Lett, 374: 149~151
- Chaudhry F, Guerin C, von Withsch M, Blanchoin L, Staiger CJ (2007). Identification of *Arabidopsis* cyclase-associated protein 1 as the first nucleotide exchange factor for plant actin. Mol Biol Cell, 18: 3002~3014
- Cheung AY, Wu HM (2004). Overexpression of an *Arabidopsis* forming stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. Plant Cell, 16 (1): 257~269
- Cruz-Ortega R, Cushman JC, Ownby JD (1997). cDNA clones encoding 1,3- β -glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by AI toxicity in wheat root. Plant Physiol, 114: 1453~1460
- Dong CH, Xia GX, Hong Y, Ramachandran S, Kost B, Chua NH (2001). ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. Plant Cell, 13 (6): 1333~1346
- Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC (1997). The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. Structure, 5: 33~45
- Gibbon BN, Kovar DR, Staiger CJ (1999). Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. Plant Cell, 11: 2349~2363
- Higgs HN, Pollard TD (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. Annu Rev Biochem, 70: 649~676
- Hussey PJ, Yuan M, Calder G, Khan S, Lloyd CW (1998). Microinjection of pollen-specific actin-depolymerizing factor, ZmADF1, reorientates F-actin strands in *Trades-*

- cantia* stamen hair cells. *Plant J*, 14 (3): 353~357
- Ingouff M, Fitz Gerald JN, Guerin C, Robert H, Sorensen MB, Van Damme D, Geelen D, Blanchoin L, Berger F (2005). Plant forming AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator involved in cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 7: 374~380
- Karpova TS, Tatchell K, Copper JA (1995). Actin filaments in yeast are unstable in the absence of the capping protein or fimbrin. *J Cell Biol*, 131: 1483~1493
- Klein MG, Shi WX, Ramagopal U, Tseng Y, Wirtz D, Kovar DR, Staiger CJ, Almo SC (2004). Structure of the actin crosslinking core of fimbrin. *Structure*, 12: 999~1013
- Kovar DR, Drobak BK, Staiger CJ (2000). Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell*, 12: 583~598
- Li S, Blanchoin L, Yang ZB, Lord EM (2003). The putative *Arabidopsis* Arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol*, 132: 2034~2044
- 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, Kim M (1998). Molecular cloning of a novel fimbrin-like cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 36: 23~31
- Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Frank-Tong VE, Staiger CJ (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell*, 14: 2613~2626
- Staiger CJ, Yuan M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW (1994). Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr Biol*, 4 (3): 215~219
- Todderud G, Wahl ML, Rhee SG, Carpenter G (1990). Stimulation of phospholipase C- γ 1 membrane association by epidermal growth factor. *Science*, 249: 296~298
- 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-independent cell morphogenesis. *Development*, 134: 967~977
- Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, 253: 557~560
- Valenta R, Ferreira F, Grote M, Swoboda I, Vrtala S, Duchene M, Deviller P, Meagher RB, Mckinney E, Heberle-Bors R et al (1993). Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *J Biol Chem*, 268: 22777~22781
- Voigt B, Timmers ACJ, Samaj J, Muller J, Baluska F, Menzel D (2005). GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Eur J Cell Biol*, 84: 595~608
- Wang HY, Yu Y, Chen Z-L, Xia G-X (2005). Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (*GhPFN1*) in tobacco suspension cells. *Planta*, 222: 594~603
- 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
- Zigmond SH (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 99~105