

植物热激蛋白 HSP100/ClpB 及其在提高植物抗热性和抗寒性中的应用

许声涛, 孙文香, 田进平, 王崇英*

兰州大学生命科学学院细胞生物学研究所, 兰州 730000

Plant Heat Shock Protein HSP100/ClpB and Its Applications in Improvement of Heat and Cold Resistances in Plants

XU Sheng-Tao, SUN Wen-Xiang, TIAN Jin-Ping, WANG Chong-Ying*

Institute of Cell Biology, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

摘要: 文章介绍了植物热激蛋白HSP100/ClpB的表达及其与抗逆性的关系, 以及HSP100/ClpB在提高植物抗逆性应用中的研究进展, 并对这一领域未来可能的发展方向作了展望。

关键词: 热激蛋白; HSP100/ClpB; 热激转录因子(HSFs); 抗逆性

生物体在高温、盐渍、干旱、饥饿和重金属离子等环境胁迫下诱导合成的一类应激蛋白——热激蛋白(heat shock protein, HSP)是当今分子生物学、蛋白质生物化学和植物抗逆生理学的研究热点之一(张建国等 2005; Lee 等 2005; Batra 等 2007)。在逆境条件下, 热激蛋白作为分子伴侣促进其他蛋白的重新折叠、稳定、组装、胞内运输和降解, 对受损蛋白的修复和细胞的存活都有作用(Sangster 和 Queitsch 2005; 翁锦周和洪月云 2006)。根据分子量大小, 植物热激蛋白家族通常分为五大类: HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子量的热激蛋白(small heat shock protein, sHSP)。ClpB 是分子量最大的热激蛋白(约 100 kDa), 属于HSP100家族, 因此也称为HSP100/ClpB (casein lytic proteinase B)。HSP100/ClpB 广泛存在于细菌、酵母和高等植物中, 具有高度的保守性, 能溶解蛋白聚集颗粒, 调节植物的生长发育, 是微生物和植物获得耐热性的因子(Lee等2005; Yang等 2006; Gulli 等 2007)。植物 HSP100 不仅在热激条件下表达, 植物处于高盐、干旱、ABA 和冷激等胁迫环境中也能表达, 并赋予植物耐受其他胁迫因子的功能(Agarwal 等 2001; 秦佳等 2007)。在高等植物中人们已经克隆了HSP100/ClpB家族的若干基因, 并对其蛋白进行了结构、定位和功能分析。根据系统进化关系和亚细胞定位, 植物 HSP100/ClpB分为定位于细胞质或细胞核的胞质型(主要为HSP101)及定位于叶绿体(ClpB-p)和线粒体(ClpB-m)

的细胞器型两大类(Batra 等 2007)。

逆境胁迫是影响植物生长和作物产量的限制性因素, 深入了解HSP100/ClpB与植物抗逆性的关系, 揭示植物抗逆的分子机制, 对降低逆境对植物的伤害和提高作物的产量来说十分重要(邵玲和陈向荣 2005; 张建国等 2005)。关于HSP100/ClpB 的一级结构、各结构域的功能以及作用机制已经有了较为详细的介绍(杨金莹等2006a), 本文不再赘述, 仅就 HSP100/ClpB 基因的表达及其与抗逆性的关系, 以及HSP100/ClpB在提高植物抗逆性中的研究进展进行概述。

1 植物 HSP100/ClpB 的表达与调控

HSP100/ClpB 的表达是植物获得抗逆性的基础, 只有 HSP100/ClpB 高效表达, 植物才能更好地适应逆境胁迫。在植物的整个生命周期中, HSP100/ClpB的表达具有器官特异性, 且受RNA转录水平和转录后水平的调控(Young 等 2001)。在正常生长条件下, 拟南芥热激蛋白 AtHSP101 在各个组织器官中几乎检测不到, 即只有微量表达, 但在高温胁迫时, AtHSP101 表达量急剧增加和积累, 并对高温耐受有调节作用。当温度从 22 上升到 45 时, 拟南芥受热激诱导, 高水平表达AtHSP101,

收稿 2008-01-28 修定 2008-06-27

资助 国家基础科学人才培养基金(J0630644)和国家自然科学基金(30370087)。

* 通讯作者(E-mail: wangcy@lzu.edu.cn; Tel: 0931-8914155)。

同时获得耐热性增强,能够很好地适应高温胁迫(Lee等2007; Larkindale和 Vierling 2008)。前期的研究表明, HSP101在小麦、玉米、芸芥(*Brassica napus*)和水稻成熟种子中都有积累(Singla等1998),但是随着种子的吸胀萌发, HSP101在各种组织中的含量逐渐下降,直至检测不到。不过,水稻种子萌发12 d后仍可在根尖和叶片中检测到低水平的HSP101,这很有可能是新合成的(Singla等1998; Young等2001)。

Young等(2001)比较系统地研究了热激和非热激条件下玉米HSP101的表达水平,结果表明HSP101的表达具有明显的组织器官特异性,而且即使在同一组织器官中,其mRNA和蛋白质的表达水平也不相同。HSP101在正在发育中的雄花、穗、须、胚乳和胚中表达量丰富;在营养分生组织和花分生组织中表达量欠丰富;在开花期的花药、成熟花粉、根和叶中表达水平更低。受热激后不同器官中 *hsp101* 的表达调控不同: (1)在营养分生组织区、花分生组织区、完全长大的叶片、幼穗和根中, *hsp101* 的 mRNA 水平增加, HSP101 蛋白的水平也增加; (2)在开花期的雄花中, *hsp101* 的 mRNA 水平上升,但 *hsp101* 的蛋白水平却没有上升; (3)在发育着的叶片和有丝分裂前期的雄花中, *hsp101* 的 mRNA 水平没有增加,而 HSP101 表达的水平却增加; (4)在开花期的花药、成熟的花粉、发育中的胚乳和胚中, *hsp101* 的 mRNA 水平和 *hsp101* 的蛋白水平上升很少或没有上升。

包括 HSP100/ClpB 在内的所有热激蛋白的表达均受热激转录因子(heat shock transcription factors, HSFs)的调控。植物热激转录因子是一个大的蛋白家族,它的高丰度性和基因表达的灵活性使植物能很好地适应逆境胁迫。热激转录因子介导胁迫基因的活化,是植物获得耐热性的调节因子。在高温胁迫下,热激转录因子高效表达并结合于热激蛋白启动子的热激元件(heat shock element, HSE)的共有序列“nGAAnnTCCn”上,从而吸引其他转录因子形成转录复合体,促进热激蛋白的表达(翁锦周和洪月云 2006; Nishizawa 等 2006)。过量表达热激转录因子基因的转基因拟南芥,其热激蛋白基因表达明显上调,同时也获得很强的高温胁迫耐受能力(Nishizawa 等 2006)。组成性表达的 AtHsfA1a和AtHsfA1b对处于热激状态的拟南芥中

热激蛋白基因的早期表达是必需的,热激诱导的 AtHsfA2 是拟南芥获得耐热性的主要调节因子。Charng等(2007)在研究 AtHsfA2 突变体热激蛋白的表达水平时观察到,缺失 *HsfA2* 的拟南芥突变体在受到 37 °C 热激时,其 *hsp70* 和 *hsp101* 的转录水平明显下降。他们分别将野生型拟南芥、*HsfA2* 突变体和 *hsp101* 突变体放在 37 °C 下预处理 1 h 后再在室温下进行 2 d 的恢复性生长,而后再给予 44 °C 的热激处理 45 min,结果在热激恢复期的第 8 天时,野生型拟南芥获得耐热性的强度逐渐降低,但还能存活至 72 h,而 *HsfA2* 突变体和 *hsp101* 突变体则对高温敏感,并很快枯萎死亡,且两种突变体内 HSP101 的表达水平都显著下降。在番茄中, *LeHsfA1* 的过量表达能够提高番茄对高温胁迫的耐受能力,如果采用反义 RNA 技术使转基因番茄的 *LeHsfA1* 表达量下降,则高温耐受性也明显下降;而过量表达 *LeHsfA1* 后这些番茄又能重新获得热耐受能力(Mishra 等 2002)。这些结果说明,热激转录因子的表达可增强 HSP100/ClpB 热激蛋白的表达,进而增强转基因植物的耐热性。迄今,关于 HSP100/ClpB 表达调控的研究报道还比较少,尚待进一步研究。

2 HSP100/ClpB 与植物的抗逆性

植物的整个生长周期常处于各种各样的胁迫环境中,伴随着生长发育的进程逐渐形成各种抗逆境胁迫的能力。Bowen 等(2002)报道,苹果细胞悬浮液先经 38 °C 热激处理 1 h,然后又在 42 °C 致死温度下处理 1 h,其获得的热耐受性和存活率均高于直接置于 42 °C 下处理 1 h 的情况。他们进一步的研究表明,38 °C 的热激处理可诱导大量热激蛋白的表达,因而细胞能在致死温度下存活。HSP100/ClpB 与植物抗逆性的获得密切相关,其合成后植物即很快地适应外界环境胁迫,表现出很强的抗逆性。人们对酵母 HSP104 在耐热中的作用研究得最早,也最清楚。酵母中的 HSP104 是植物 HSP101 的同源物,在高温胁迫下,野生型酵母与 *hsp104* 的缺失突变体($\Delta hsp104$)的生长和死亡率是一样的,如果先给予一个温和的热刺激,后给予高温胁迫时,野生型酵母可获得耐热性,而酵母突变体则失去耐受致死高温的能力。如用野生型的 HSP104 基因转化酵母突变体,则突变体细胞耐受高温胁迫的能力又重新恢复,说明 HSP104 是热耐受的关键分子

(Sanchez 和 Lindquist 1990)。这项研究为后来研究植物中HSP100/ClpB参与热耐受作用提供了借鉴和方法。而且,大豆和拟南芥的HSP101都能够恢复酵母 $\Delta hsp104$ 的表型,表明HSP101在功能上与酵母HSP104是互补的(Gurley 2000; 杨金莹等 2006a)。Gurley (2000)报道,在拟南芥种子萌发的早期阶段,组成型表达HSP101的种子比野生型种子对高温的耐受时间更长。高等植物HSP100/ClpB具有耐热功能的更直接证据是Hong和Vierling (2000)对拟南芥HSP101突变体 *hot1* 的分析。*hot1-1* 是由一个保守的谷氨酸残基转变为赖氨酸残基后引起的错义突变,突变体中HSP101表达量正常,但突变体幼苗和萌发种子对高温的耐受能力却受到严重影响。而 *hot1-1* 突变体能够通过转化野生型HSP101得到补救从而恢复野生型表型。*hot1-3* 是T-DNA插入HSP101基因第二个外显子而获得的突变体,没有HSP101的表达。在无外界胁迫时 *hot1-3* 的生长和发育同野生型一致。但 *hot1-3* 在热胁迫条件下却表现出与 *hot1-1* 相似的表型。*hot1* 突变体提供的直接证据表明AtHSP101是拟南芥产生热耐受能力所必需的(Quietsch等 2000; Hong 和 Vierling 2000; Lee等 2007)。据 Nieto-Sotelo 等 (2002)报道,玉米中的HSP101对玉米基础耐热性(basal thermotolerance)和获得耐热性(acquired thermotolerance)均比较重要,它们参与植物热耐受过程,是植物热耐受的关键分子。Srikanthbabu 等 (2002)用“温度诱导反应”技术(temperature induction response technique, TIR)筛选具有热耐受能力的豌豆时,将32种不同基因型的豌豆(*Pisum sativum*)种子先以30℃热激,后再49℃高温处理,在恢复的后期筛选存活的种子。结果存活的种子中积累大量的HSP104、HSP90和高水平的HSP18.1及HSP70。其中热耐受的Acc.623基因型豌豆比热敏感的Acc.476基因型豌豆表达HSP104的水平更高,且获得热耐受性时的热激起始温度也更高。杨金莹等(2006b)用农杆菌介导法将CaMV 35S驱动的反义 *Lehsp110/ClpB* cDNA片段导入番茄后,在高温下转化反义基因的番茄株系中LeHSP110/ClpB的mRNA水平明显低于未转基因株系,转基因株系的光系统II(PSII)对高温胁迫更加敏感,由此说明HSP110/ClpB在植物耐热性中的确起作用。

通常,一种逆境可以诱导植物对另一种逆境的

抗性。HSP100/ClpB不仅与热激胁迫有关,它还受ABA、冷胁迫、干旱和高盐等逆境胁迫的诱导,在上述胁迫环境下,HSP100/ClpB合成增加,耐受多种胁迫的能力提高。黄上志等(2004)报道,萌发的水稻种子经42℃热激处理后,水稻幼苗的耐冷性明显增强,其热激蛋白合成水平也急剧升高。Tanaka等(2002)用基因芯片技术检测红树榄钱(*Avicennia marina*)的全基因组以鉴定高盐条件下表达的基因时,克隆到HSP100蛋白家族的同源物基因,说明HSP100/ClpB可能与盐耐受性有关。另外,Agarwal等(2003)报道,植物HSP100/ClpB还能促使酵母的 *hsp104* 缺失突变体获得抗砷能力,不过,其分子机制还不清楚,有待进一步研究。此项研究也启示我们可以用HSP100/ClpB过量表达的方法培育具有抗砷能力的农作物品种。最近,我们在筛选T-DNA插入的拟南芥启动子诱捕系(promoter trap lines)时也分离到一个多效突变体,此突变体对高温和高盐胁迫非常敏感,在此胁迫条件下其生长发育严重受阻,不能进入生殖生长阶段。对突变体相关基因的克隆和核苷酸序列比对分析时发现,此基因位于第IV号染色体上,为热激蛋白相关基因,暂命名为 *Athspr* (heat shock protein-related in *Arabidopsis thaliana*),它编码一个含有1017个氨基酸的蛋白质,分子量约为113.8 kDa,具有与HSP101相似的ATP结合及水解活性(我们实验室尚未报道的资料)。但是目前除了知道AtHSP101与高温和高盐的耐受性有关外,还不清楚它是否属于HSP100家族以及它与HSP101之间是否存在相互作用。因此,对 *Athspr* 突变体及其相关基因的功能分析不仅能够揭示 *Athspr* 在植物正常生长发育和抗逆境胁迫中的作用,而且还有助于我们了解HSP100/ClpB的作用机制和调控方式,为将来有目的地利用HSP101改良植物抗逆性状提供有意义的信息。

关于细胞器型HSP100/ClpB在植物热耐受中的作用还存在一定的争议。不过,多数研究认为细胞器型的HSP100/ClpB在植物耐逆性中是有作用的。Keeler等(2000)在研究定位于利马豆线粒体上的HSP100/ClpB时,发现其对热耐受能力的提高起作用。杨金莹等(2006b)用农杆菌介导法将CaMV 35S启动子驱动的定位于叶绿体基质的反义 *Lehsp100/clpB* cDNA片段导入番茄叶中, Northern杂交的结果表明,高温下转基因株系中LeHSP100/

ClpB的mRNA水平明显低于非转基因植株,热适应后的转基因番茄中PSII的获得耐热性也明显低于非转基因植株,说明叶绿体HSP100/ClpB在植物获得耐热性中起作用。但Lee等(2007)却发现拟南芥中叶绿体型*ClpB-p*和线粒体型*ClpB-m*的突变并没有表现出类似于*hot1*突变对高温敏感的表现。最近,秦佳等(2007)报道组成型表达叶绿体*hsp100/clpB*的转基因番茄比非转基因番茄表现出较轻的冷胁迫症状。

HSP100/ClpB赋予植物耐受逆境胁迫的能力与其分子伴侣功能直接相关。有研究表明,高温下植物产生的热激蛋白可以保护机体蛋白质免遭损伤或修复已受损伤的蛋白质,从而对植物起保护作用(邵玲和陈向荣2005)。Agarwal等(2003)的研究表明,植物HSP101可以溶解酵母*hsp104*突变体中的蛋白聚集颗粒。Lee等(2005)在研究拟南芥HSP100/ClpB时发现,热激后蛋白聚集体的溶解需要HSP101与sHSP分子伴侣系统的相互作用。近来的研究认为,HSP100/ClpB可能与sHSP、HSP70及HSP90一起形成一个分子伴侣网络(Bosl等2006),溶解高温造成的蛋白聚集体,从而保护植物细胞免受逆境胁迫的伤害。

3 HSP100/ClpB在提高植物抗逆性中的应用

高于植物正常生长温度的热胁迫会打乱细胞内的代谢平衡,影响细胞的生长和增殖甚至导致细胞死亡。植物一生都要面对环境中温度的变化以及各种其他非生物胁迫的影响,全世界农业每年由于高温、干旱和其他胁迫环境的影响承受着巨大的损失(Kotak等2007)。随着转基因技术的飞速发展,人们已经将转基因技术成功应用于植物育种,通过转基因技术构建具有优良性状的粮食作物和经济作物,从而给人类带来了巨大的经济效益和社会效益。Lee等(1994)将从大豆中分离克隆出来的*hsp101* cDNA通过基因工程方法导入缺失*hsp104*的酵母突变体后,缺失*hsp104*的酵母突变体在50的环境下依然能够存活下来,此酵母突变体可以恢复获得耐热性的能力。此项研究启发人们试图将植物的HSP100/ClpB基因转入农作物中以获得所需的抗逆性状。根据HSP101过量表达或表达不足都不影响植物的正常生长和发育的结果,人们对构建*hsp100/clpB*转基因植物产生了极大兴趣,即采用基因工程手段获得过量表达HSP100/ClpB的转基因植

物以提高植物或作物的抗逆性,从而提高植物的活力和作物产量。近年来,人们已在这方面进行了一些非常有价值的探索,并获得了一些抗逆性明显增强的转基因株系。

3.1 提高植物的耐热性 高温损伤生殖细胞的育性,致使作物产量下降,而一些热激蛋白(HSP101、HSP70、sHSP)的表达则会降低这种损伤,这就启迪人们用基因工程的方法提高作物育性和产量(Young等2004)。Katiyar-Agarwal等(2003)以水稻栽培种‘Pusa basmati 1’成熟种子盾片的胚性愈伤组织为材料,通过农杆菌介导法将拟南芥*Athsp101* cDNA转入受体细胞,获得了再生植株及其后代,Southern印迹杂交和遗传技术分析表明*Athsp101*已经整合进水稻基因组,且能稳定过量表达。*Athsp101*在后代中的分离符合单基因孟德尔分离规律。转基因水稻在45~50℃热激下也能存活,且在随后的28℃恢复期中长势良好,而非转基因水稻则枯萎死亡,表明转基因水稻比非转基因水稻更能耐受高温胁迫。Western和Northern杂交表明,转基因水稻中低分子量的热激蛋白和Clp的其他家族蛋白如ClpC和ClpA的表达都没有变化,说明转基因水稻的高温耐受性是HSP101过量表达所致。而且,转基因植株在正常温度下的生长发育与非转基因植株没有明显差别,表明HSP101的过量表达并不影响植物的正常生长和发育,这为水稻在热胁迫下不至于减产提供了保证。当今由于温室效应导致全球温度的持续升高,而这些转基因水稻品种的出现对未来的粮食生产无疑是一个积极的信号。因此,可以采用表达过量HSP101的转基因技术,以产生具有耐受热胁迫的水稻植株,从而改变种植时间以更好地促进前期作物和后续作物的播种,并扩展到其他由于高温胁迫而不适合生长的地区种植,最终减少高温对农业生产的危害。

Chang等(2007)采用农杆菌介导法将水稻(*Oryza sativa*)的*hsp101* cDNA转入烟草(*Nicotiana tabacum*)中,*hsp101*的过量表达对烟草的生长发育并没有表现出明显的作用,而在转基因烟草的子代即T₂代中,转基因株系比非转基因株系表现出更强的耐受高温胁迫的能力。杨爱芳等(2006)以2个草地早熟禾栽培品种‘Nassau’和‘Mardona’为受体,用农杆菌介导的方法将来源于玉米编码HSP101的*hsp101*导入丛生芽中,培育出了转基因株系。这

一株系在 49 ℃ 下进行 1 h 的高温胁迫处理和恢复培养 2 周后, 转基因株系仅有轻度的枯黄, 其存活率为 75.56%, 而非转基因株系则全部死亡, 说明转基因株系比非转基因系具有更高的耐受高温胁迫的能力。他们还观察到高温处理前, 转基因株系和非转基因系的叶中游离脯氨酸含量没有明显差异, 经过 12 h 的 37 ℃ 高温处理后, 转基因株系叶中游离脯氨酸含量增加 2.5 倍左右。

此外, 增强拟南芥热激转录因子 AtHsf1 的表达和降低不饱和脂肪酸的表达都可以很好地减轻高温胁迫对植物的伤害。为了从水稻中分离到适应高温胁迫的基因, Yokotani 等(2008)将水稻 cDNA 文库中的全部基因分别转入拟南芥, 并从大约 20 000 个转基因系中筛选到一个热耐受系——R04333, 该系可表达水稻热激转录因子 OsHsfA2e。OsHsfA2e 是水稻 5 个 A2 型热激转录因子中的一个, 它在水稻种子中受高温诱导表达。OsHsfA2e 定位于核质, 其 C 端具有很强的转录激活活性。基因芯片分析表明, 在非胁迫条件下过量表达 OsHsfA2e 的转化拟南芥能够促进 sHSP 和 HSP70 的高水平表达, R04333 系也显示出对高盐胁迫的耐受性。这些研究表明, 在植物分子育种中也可以构建热激转录因子的转基因植物或作物以应对外界环境的胁迫。

HSFA9 在种子发育的后期表达, 是种子特有的热激转录因子。Prieto-Dapena 等(2006)报道, 太阳花 (*Helianthus annuus*) 的热激转录因子 HaHSFA9 基因转入烟草 (*Nicotiana tabacum*) 种子后, HSP101 即大量积累, 且转基因的烟草种子维持较高水平的基础耐热性和获得耐热性。HaHSFA9 基因的过量表达并不影响烟草种子的形态和总的种子产量, 说明 HaHSFA9 基因对烟草的生长发育没有造成实质性的伤害。HaHSFA9 基因也存在于其他的单子叶和双子叶植物中, 这就启发人们可采用遗传转化方法过量表达 HaHSFA9 基因, 增加 HSP101 的表达水平, 以提高其他经济作物种子的活性。

3.2 提高植物的耐冷性 低温是植物区域性分布的主要生态限制因子, 低温冷害也是农业生产中的不利条件, 近年来人们发现热激蛋白在增强植物耐冷性中也有应用价值。

已有研究表明, 叶绿体的 PSII 对低温环境胁迫十分敏感, 因而植物光合作用和存活能力下降。在 4 ℃ 低温胁迫下, 组成型表达叶绿体小分子热激蛋白 HSP21 的转基因番茄可以保护叶绿体的 PSII, 保

证光合作用的有效进行, 从而提高番茄的耐冷性 (Neta-Sharir 等 2005)。Guo 等(2007)克隆了甜椒的小分子热激蛋白 CaHSP26 基因, 并用农杆菌介导法将 *CaHsp26* 转化烟草后, 转基因烟草在接受热激后的 48 h 内受到 4 ℃ 冷激时, *CaHsp26* 依然能够进行转录。在弱光冷激条件下, 表达 CaHSP26 的转基因烟草其 PSII 的光化学效率, 即叶绿素可变荧光与最大荧光的比值 (F_v/F_m) 和氧化色素 P700 值均高于野生型, 说明在弱光低温胁迫下 CaHSP26 对 PSII 和 PSI 可起保护作用。

除了上述小分子热激蛋白在抗冷性中起作用外, HSP101 在冷胁迫的耐受性中也发挥作用。最近, 秦佳等(2007)采用基因工程方法将 CaMV35S 启动子驱动的定位于番茄叶绿体基质中的 *hsp100/clpB* 导入番茄, 使之组成型表达, 发现在 4 ℃ 低温下处理 21 d 后, 转基因番茄比未转基因番茄表现出较轻的冷胁迫症状。 F_v/F_m 能够反映 PSII 的光能转化效率, 而低温胁迫会损伤 PSII 从而导致 F_v/F_m 的下降。在 4 ℃ 低温胁迫下, 非转基因番茄植株的 F_v/F_m 值下降 21.2%, 而转基因番茄的 F_v/F_m 值只下降 9.1%; 胁迫解除后, 转基因番茄的 F_v/F_m 值恢复缓慢, 而非转基因植株则迅速死亡。这表明, 低温胁迫条件下, 组成型表达的叶绿体 ClpB 可以保护转基因番茄的 PSII, 维持较高的 PSII 水平, 致使番茄的耐冷性提高, 这为作物抗冻育种工作提供了新的应用前景。但是, 目前 *hsp100/clpB* 转基因植物在抗旱和耐盐中的应用还比较少, 预计今后这方面的研究将会引起人们的极大关注。

4 结语

虽然近年来人们对植物 HSP100/ClpB 结构和功能的研究取得了一定的进展, 但是其深度还远远不够。相信随着研究工作的进一步深入, 这一领域的研究在未来若干年内仍然是热点之一。其未来的研究可能主要集中在以下几个方面。

(1) 研究植物 HSP100/ClpB 的表达及其执行分子伴侣功能的机制, 这对揭示植物细胞抗逆性本质来说, 无疑是有意义的。

(2) 继续研究定位于细胞器中的 HSP100/ClpB 在植物发育和抵抗逆境胁迫中的作用。虽然细胞器型 HSP100/ClpB 的研究刚刚开始, 但它在植物中发挥的生物功能不容忽视。

(3) 根据 HSP100/ClpB 的表达调控特点, 应该从两个方面着手研究提高植物的抗逆性: 一是通过调

控顺式作用元件和反式作用元件,使其在转录水平和翻译水平上得到加强,从而增强植物本身高效表达 *hsp100/clpB* 的能力;二是在转基因植物中过量表达 *hsp100/clpB*, 以增强逆境耐受性。

(4)更加深入地研究HSP100/ClpB表达的诱导机制和功能,从而推动用基因工程方法改良植物性状的进程,给人类带来经济效益和社会效益。而转基因植物的研究又将反过来增加人们对HSP100/ClpB功能的了解。因此,HSP100/ClpB转基因植物的构建仍然是今后研究的重点。

(5)越来越多的资料证明,植物发挥抗逆性功能不仅是依靠单纯的HSP100/ClpB,而是通过很多分子相互协作的网络系统实现的,这就启示人们研究HSP100/ClpB时,还应该与其上游和下游相互作用的分子伴侣蛋白结合起来进行综合研究,这样才能对植物中HSP100/ClpB的作用及其机制有更确切的了解。

参考文献

- 黄上志, 黄祥富, 林晓东, 张以顺, 刘军, 傅家瑞(2004). 热激对水稻幼苗耐冷性及热激蛋白合成的诱导. 植物生理与分子生物学学报, 30 (2): 189~194
- 秦佳, 杨金莹, 伊淑莹, 赵春梅, 李明辉, 刘箭(2007). 组成型表达的 *ClpB* 基因提高番茄植株的耐冷性. 植物生理学通讯, 43 (1): 16~20
- 邵玲, 陈向荣(2005). 热激蛋白与植物的抗逆性. 北方园艺, (3): 73~74
- 翁锦周, 洪月云(2006). 植物热激转录因子在非生物逆境中的作用. 分子植物育种, 4 (1): 88~94
- 杨爱芳, 王娟, 王婷婷, 何影, 张举仁(2006). 利用农杆菌介导法将热激蛋白基因 *hsp101* 转入草地早熟禾. 2006年中国植物生理学会植物逆境生理生态与分子生物学学术研讨会, 乌鲁木齐
- 杨金莹, 孙爱清, 刘箭(2006a). 热激蛋白 ClpB 的结构和功能. 植物生理学通讯, 42 (2): 326~330
- 杨金莹, 孙颖, 孙爱清, 伊淑莹, 刘箭(2006b). 番茄 *LeHsp110/ClpB* 基因的分子克隆及其对植物耐热性的影响. 生物工程学报, 22 (1): 52~57
- 张建国, 何彩云, 段爱国, 殷继艳(2005). 植物热激蛋白研究进展. 福建林学院学报, 25 (2): 187~192
- Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Sahi C, Gallie DR, Grover A (2001). *Arabidopsis thaliana* HSP100 proteins: kith and kin. Cell Stress Chaperones, 6 (3): 219~224
- Agarwal M, Sahi C, Katiyar-Agarwal S, Agarwal S, Young T, Gallie DR, Sharma VM, Ganesan K, Grover A (2003). Molecular characterization of rice *hsp101*: complementation of yeast *hsp104* mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. Plant Mol Biol, 51: 543~553
- Batra G, Chauhan VS, Singh A, Sarkar NK, Grover A (2007). Complexity of rice *Hsp100* gene family: lessons from rice genome sequence data. J Biosci, 32: 611~619
- Bosl B, Grimminger V, Walter S (2006). The molecular chaperone Hsp104—a molecular machine for protein disaggregation. J Struct Biol, 156: 139~148
- Bowen J, Lay-Yee M, Plummer K, Ferguson L (2002). The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. J Plant Physiol, 159: 599~606
- Chang CC, Huang PS, Lin HU, Lu CH (2007). Transactivation of protein expression by rice HSP101 in planta and using *Hsp101* as a selection marker for transformation. Plant Cell Physiol, 48 (8): 1098~1107
- Chang YY, Liu HC, Liu NY, Chi WT, Wang CN, Chang SH, Wang TT (2007). A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 143: 251~262
- Gulli M, Corradi M, Rampino P, Marmioli N, Perrotta C (2007). Four members of the *HSP101* gene family are differently regulated in *Triticum durum* Desf. FEBS Lett, 581 (25): 4841~4849
- Guo SJ, Zhou HY, Zhang XS, Li XG, Meng QW (2007). Overexpression of *CaHSP26* in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance. J Plant Physiol, 164: 126~136
- Gurley WB (2000). HSP101: A key component for the acquisition of thermotolerance in plants. Plant Cell, 12: 457~460
- Hong SW, Vierling E (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. Proc Natl Acad Sci USA, 97 (8): 4392~4397
- Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A (2003). Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of *hsp101*. Plant Mol Biol, 51: 677~686
- Keeler SJ, Boettger CM, Haynes JG, Kuches KA, Johnson MM, Thureen DL, Keeler Jr CL, Kitto SL (2000). Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of Lima bean. Plant Physiol, 123: 1121~1132
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD (2007). Complexity of the heat stress response in plants. Curr Opin Plant Biol, 10 (3): 310~316
- Larkindale J, Vierling E (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. Plant Physiol, 146: 748~761
- Lee U, Rioflorida I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER, Vierling E (2007). The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. Plant J, 49: 115~127
- Lee U, Wie C, Escobar M, Williams B, Hong SW, Vierling E

- (2005). Genetic analysis reveals domain interactions of *Arabidopsis* Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system. *Plant Cell*, 17: 559~571
- Lee YJ, Nagao RT, Key JL (1994). A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast *HSP104* deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell*, 6 (12): 1889~1897
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf KD (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev*, 16: 1555~1567
- Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, Weiss D (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell*, 17 (6): 1829~1838
- Nieto-Sotelo J, Martinez LM, Ponce G, Cassab GI, Alagon A, Meeley RB, Ribaut JM, Yang R (2002). Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell*, 14: 1621~1633
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S (2006). *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J*, 48: 535~547
- Prieto-Dapena P, Castano R, Almoguera C, Jordano J (2006). Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol*, 142: 1102~1112
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 12: 479~492
- Sanchez Y, Lindquist SL (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, 248 (4959): 1112~1115
- Sangster TA, Queitsch C (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (1): 86~92
- Singla SL, Pareek A, Krush AK, Grover A (1998). Distribution patterns of 104 kDa stress-associated protein in rice. *Plant Mol Biol*, 37: 911~919
- Srikanthbabu V, Ganeshkumar, Krishnaprasad BT, Gopalakrishna R, Savitha M, Udayakumar M (2002). Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response technique (TIR). *J Plant Physiol*, 159: 535~545
- Tanaka S, Ikeda K, Ono M, Miyasaka H (2002). Isolation of several anti-stress genes from a mangrove plant *Avicennia marina*. *World J Microbiol Biotechnol*, 18: 801~804
- Yang JY, Sun Y, Sun AQ, Yi SY, Qin YJ, Li MH, Liu J (2006). The involvement of chloroplast HSP100/ClpB in the acquired thermotolerance in tomato. *Plant Mol Biol*, 62: 385~395
- Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui M, Hirochika H, Iwabuchi M, Oda M (2008). Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 227: 957~967
- Young LW, Wilen RW, Bonhan-Smith PC (2004). High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *J Exp Bot*, 55 (396): 485~495
- Young TE, Ling J, Geisler-Lee CJ, Tanguay RL, Caldwell C, Gallie DR (2001). Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiol*, 127: 777~791