

拟南芥 WD40 蛋白

杨红玉^{1,*}, 张学琴²¹ 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092; ² 中国农业大学生物学院, 北京 100094WD40 Proteins in *Arabidopsis*YANG Hong-Yu^{1,*}, ZHANG Xue-Qin²¹ College of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China; ² College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

摘要: 拟南芥植物中已经鉴定出十几个WD40蛋白。本文介绍这些蛋白在拟南芥生长发育过程中的功能及其分子机制的研究进展。

关键词: 拟南芥; WD40蛋白; 功能; 作用机制

WD40 蛋白含有约 40 个氨基酸的保守序列。该序列以甘氨酸-组氨酸(Gly-His)开始, 以色氨酸-天冬氨酸(Trp-Asp, WD)结尾, 因此称为 WD40 基序(Simon 等 1991), 而含有此种基序的蛋白称作 WD40 蛋白。

WD40 蛋白质中含有 1~10 个串联的 WD40 基序(Neer 等 1994)。此蛋白最早发现于哺乳动物的异源 G 蛋白(Fong 等 1986)。一般认为 WD40 蛋白存在于真核生物中, 但有人在蓝藻中也发现过(Grigorieva 和 Shestakov 1982; Janda 等 1996)。WD40 蛋白具有广泛的生物化学和细胞生物学功能, 如参与细胞分裂和胞质移动、细胞程序性死亡、光信号感受和传导、细胞运动、花发育、开花等过程(Smith 等 1999; Li 和 Roberts 2001)。Nock 和 Ludwig (2003)预测拟南芥基因组序列基因后, 认为拟南芥基因组共有多达 269 个 WD40 基因, 并将其分成 143 个亚家族, 其中的 113 个亚家族成员在酵母、果蝇和人类中都存在同源基因, 这说明 WD40 蛋白在生物体中具有功能保守性。拟南芥 WD40 蛋白功能和作用机理的研究具有普遍意义, 本文就这方面的研究作一介绍。

1 参与配子体发育的 WD40 蛋白

拟南芥生活周期包含世代交替。其中孢子体生长发育包含胚胎发生、萌发过程、营养发育和生殖发育等阶段; 配子体发育则包括雌、雄配子体的形成和卵、精细胞的产生。WD40 蛋白参与上述过程的诸多生理活动。

1.1 SWA1 蛋白 SWA1 (SLOW WALKER1)有 6 个 WD 重复单元。SWA1 的丧失导致拟南芥配子体雌性半不育突变。*swa1* 突变体的雌配子体发育是不同步的, 也就是说, 在同样的雌蕊中, *swa1* 胚囊的发育停滞在 2、4、或 8 核时期。雄性育性也部分受到影响。通过延迟授粉, 一部分 *swa1* 胚囊能够发育成有功能的雌配子体。这些研究表明, 配子体的有丝分裂周期进展受到干扰, 因而受到不同程度的延缓。SAW1 位于细胞核仁中, 是酵母核仁蛋白 UTP15 的同源物。UTP15 是 U3 复合物的成分之一, 参与核仁中 rRNA 18S 前体的加工(Dragon 等 2002)。在经 RNAi 负调控 SWA1 表达的 *saw1* 纯合突变体中, 发现有很多未加工的 18S rRNA 前体积聚, 说明 SWA1 的主要功能与 UTP15 类似, 它通过参与 rRNA 的加工过程推进细胞有丝分裂周期的进展(Shi 等 2005)。

1.2 FIE 蛋白 最初发现 *FIE* (*FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM*)基因突变会影响拟南芥雌配子体的发育。*fie* 突变体在未受精情况下, 胚珠中央细胞进行复制, 启动胚乳的发育(Ohad 等 1999)。Luo 等(2000)也观察到在 *FIE* 启动子::*GUS* 的转基因植株未受精时, *GUS* 只在胚囊的中央细胞核中表达。但在受精之后, *fie* 胚细胞的扩增

收稿 2008-05-21 修定 2008-07-24

资助 国家自然科学基金(30860121, 30770204)和植物生理学与生物化学国家重点实验室开放基金(PPB08010)。

* E-mail: yanghongyukm@126.com; Tel: 0871-5515265

和形态发生受到抑制。这些观察说明 FIE 的功能是在受精之前抑制胚乳的发育, 而受精之后则促进胚和胚乳的发育(Sørensen 等 2001)。

FIE的功能不仅仅局限于雌配子体的发育, FIE 缺陷可造成多种突变表型, 如生长受阻, 叶片狭小, 顶端优势消失。在生殖期则产生各种花器官基因异位表达的表型, 这说明 FIE 具有维持正常的营养生长和器官形态, 在植物发育未达到成熟时有抑制花形成的功能(Kinoshita 等 2001)。FIE 属于 PcG (POLYCOMB GROUP)蛋白质, 含有6个WD重复单元。酵母双杂交证明 FIE 能够与植物的其他 PcG 蛋白如 CLF (CURLY LEAF)互作。推测它们在体内形成 PcG 复合物, 维持对各种同源异型框和 MADS 盒基因表达的限制模式(Katz 等 2004)。

1.3 APAM2蛋白 杨红玉等鉴定了一个含3个WD重复单元的基因 *APAM2* (*ARABIDOPSIS POLLEN ABORTION MUTANT*), 该基因缺失会导致拟南芥配子体型雄性不育(Yang 等 2007)。表达模式分析表明, *APAM2* 在孢子体和配子体内广泛表达。但尚未发现与之同源的已知蛋白, 其作用机制还待进一步研究。

2 参与胚胎发育的 WD40 蛋白

参与胚胎发育的 WD40 蛋白是 TAN 蛋白。TAN (TANMEI/EMB2757)缺失的种子在荚果中呈现黄白色, 干燥条件下皱缩、呈现紫色, 不能萌发, 说明 TAN 是胚胎致死突变。显微观察发现 *tan* 突变体胚的形态与野生型有显著差异, *tan* 胚细胞生长不正常, 有花色素积累; 胚根尖透明; 子叶不形成毛状体; 贮存蛋白和脂肪积累出现缺陷。上述现象说明 TAN 在拟南芥胚胎发育早期的形态建成和晚期的成熟阶段都发挥作用。TAN 含有 7 个 WD 重复单元, 而且在整个植物发育期都有表达。因此推测 TAN 可能通过与其他蛋白形成调节复合物来行使其功能(Yamagishi 等 2005)。

3 影响初生和次生发育的 WD40 蛋白

拟南芥的初生发育是指根、茎的延长和产生分支。次生发育则是指根、茎的加粗(Leyser 和 Day 2006)。根和茎的延长是由它们的顶端分生组织的细胞分裂和延伸决定的。而根茎的加粗往往与次生加厚分不开。随着拟南芥茎的逐渐成熟, 叶片和其表皮毛的产生和分布都会以一种可预知的方式进行。迄今发现有些 WD40 蛋白通过影响根、

茎顶端分生组织和花茎细胞壁次生生长的调控来参与植物的初生和次生发育。

3.1 VCA蛋白 在22 条件下生长的 *varicose* (*vcs*) 突变体植株比野生型的小, 叶片狭窄、不对称, 侧根数量减少。但是当置于 16 条件下培育时, 突变体的叶除了叶片顶点呈尖状外, 表型与野生型无异。如果生长在 29 高温下, 表型突变更厉害, 叶片变成黄白色, 更加狭长, 具有偏上性; 茎顶端呈现愈伤组织状生长。与野生型茎顶端分生组织 (shoot apical meristem, SAM) 辐射柱状突起相比较, *vcs* 突变体的 SAM 小、扁平, 细胞空泡、缺乏分层组织, 且高温条件下差异更加明显。*vcs* 突变体叶片的栅栏组织疏松、叶肉组织中有大小不同的不规则空细胞。叶脉数量减少、增厚; 由于次生叶脉数量急剧下降, 网隙明显增大, 叶脉模式异常。在生长素极性运输抑制剂存在的情况下, *vcs* 突变表型, 尤其是叶脉模式异常更加严重, 但对生长素的反应不受影响, 说明生长素的极性运输可能作为信号诱导叶脉的形成。VCS 的 N 末端有脯氨酸富含区域和 2 个 WD 重复单元(Deyholos 等 2003)。由于 VCA 互作的下游蛋白尚未知道, 所以现在很难说明其作用的分子机制。

3.2 FRA3蛋白 FRA3 (FRAGILE FIBER3)参与纤维细胞次生细胞壁的合成和肌动蛋白的组织。磷脂酰肌醇 -4,5- 二磷酸 [phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PtdIns (4,5) P₂] 不仅作为细胞信号分子二酯酰甘油和三磷酸肌醇的前体, 而且通过与肌动蛋白的相关蛋白, 如(肌动蛋白)抑制蛋白、 α - 辅肌动蛋白、粘着斑蛋白和凝溶胶蛋白结合来调节囊泡运输和肌动蛋白的组织(Takenawa 和 Itoh 2001)。磷酸肌醇信号转导的终止是通过磷酸肌醇的磷酸酯酶(phosphatases, PTases)水解磷酸肌醇的 3,4,5 位磷酸来实现的。根据水解磷酸的位置 PTase 分为 4 组, 即 1-,3-,4- 或 5- 磷酸酯酶, 其中 5-磷酸酶(5PTase)又分成二类, 第 I 类水解水溶性底物 Ins (1,4,5) P₃ 和 Ins (1,3,4,5) P₄, 第 II 类既水解水溶性底物, 还可以水解磷酸肌醇 PtdIns (4,5) P₂ 和 PtdIns (3,4,5) P₃。FRA3 为第 II 类的 5PTase, 此酶的 N 末端含有 6 个 WD 重复单元, C 末端有 5PTase 催化结构域, 对 PtdIns (4,5) P₂ 的亲合性最高。

拟南芥花茎在维管束之间发育出 3~4 层纤维细胞, 这些纤维对成熟茎的机械强度起很大作用。

第II类5PTase功能缺失的*fra3*突变体茎的机械强度显著下降, 维管束间纤维细胞次生壁的厚度明显减小, 导管壁也比野生型的薄。纤维细胞壁的组分分析表明FRA3的突变导致葡萄糖的含量下降37%, 其他组分不受影响, 说明突变主要影响纤维素含量。免疫标记的显微观察表明,*fra3*突变体的纤维细胞内的丝状肌动蛋白(F-actin)网组织明显松散。因此, 认为FRA3通过对磷酸肌醇代谢的调节参与次生细胞壁的合成和肌动蛋白的组织(Zhong等2004)。

拟南芥的FRA3蛋白中含有WD结构域, 这在已知的酵母和动物的5PTase中均未查明(Berdy等2001)。而拟南芥中的*At5PTase12~14*所编码的5PTase酶蛋白都含有WD结构域, 它们之间在对底物的亲和力和诱导因子上存在差别(Zhong和Ye2004)。但对WD结构域是如何起作用的还缺乏深入的研究。

3.3 TTG蛋白 拟南芥表皮毛是从表皮伸出的单个表皮细胞, 一般有3个分支。*ttg1*突变体的一个特点是缺乏表皮毛。另外TTG1功能缺失还造成种皮透明, 种子没有休眠就直接萌发, 植株完全缺少花青素, 具有异常的根发育模式等突变表型。进一步的研究发现*ttg1*突变体色素合成途径中的黄烷酮醇-4-还原酶催化受阻。玉米的*R*基因能够补偿TTG1的突变。*R*基因编码一个bHLH蛋白, 与MYB转录因子互作, 控制花色素的合成(Lloyd等1992)。TTG1基因编码的蛋白可能也与此类转录因子互作, 因为TTG1为一个含有4个WD重复的蛋白(Walker等1999)。但TTG1与什么蛋白互作尚不清楚。

4 参与花发育和开花过程的WD40蛋白

参与发育过程调控的基因无论是在动物和植物中, 都能在特殊类型的细胞中表达, 而在不需要它的细胞中则保持沉默。植物有各种调节基因激活和沉默的机制, 其中基因转录水平调控和染色质水平调节是很重要的。由于一个转录因子往往可以调节多个决定某种特定细胞行为的基因, 所以就可以独自或以组合的方式控制细胞的发育命运, 因而有关发育的研究常常涉及调控因子活性的机制。关于WD40蛋白作为转录因子的抑制子、协抑制子或激活子等参与染色质水平修饰, 参与调控发育的研究取得了一些成果。

4.1 LUG 拟南芥花器官从外向内由萼片、花冠、

雄蕊群和雌蕊构成, 由5种花器官特征的基因决定。5种基因为*APETALA1 (AP1)*、*APETALA2 (AP2)*、*APETALA3 (AP3)*、*PIAILLATA (PI)*和*AGAMOUS (AG)*, 分成A、B和C三类。这些花的同源异型基因全都编码与DNA结合的转录因子, 激活花器官特异性的发育程序。其中C类基因*AG*决定内两轮, 与正常的雄蕊和心皮形成有关, 只在内两轮中表达。在*leunig (lug)*和*apetala2 (ap2)*突变体中, *AG*基因异位地在花的外两轮表达, 导致萼片转化成心皮, 花冠转化成雄蕊, 说明LUG的重要功能是在花的外两轮中抑制*AG*的表达(Liu和Meyerowitz 1995; Drews等1991)。同时LUG是一个多效调节因子, *lug*突变体还出现其他与*AG*无关的表型缺陷, 这包括柱头裂开、心皮和胚珠发育不正常、雌性和雄性育性降低, 花和叶子狭窄等(Roe等1997; Schneitz等1997; Liu等2000)。

分子分析表明, LUG的C末端含有7个WD重复, 2个谷氨酰胺富含区域(Conner和Liu 2000)。不仅结构上与酵母的TUP1、果蝇的Groucho(GRO)等协抑制子相似(Williams和Trumbly 1990; Parkhurst 1998), 而且LUG的转录抑制和参与多个细胞过程调节等功能也与TUP1和GRO相似, 这说明LUG可能通过与TUP1和GRO相似的机制起作用。在拟南芥花器官的外轮, LUG可能通过与*AG*等同源异型基因的顺式调节原件互作, 抑制其转录。由于LUG没有DNA结合基序, 因此, LUG不可能直接与*AG*顺式调节原件互作调节*AG*的转录, 很可能与其他蛋白互作或招募其他蛋白来执行转录的负调控。而且LUG与转录因子的互作可能是通过WD重复单元的。因为突变表型最严重的是失去最后一个WD重复单元的*lug-14*突变体, 说明WD重复对LUG的功能行使是不可或缺的(Conner和Liu 2000)。另外LUG的表型和表达的广泛与LUG功能的多样性一致。LUG可能在不同的组织或发育阶段与不同的DNA结合因子互作, 行使不同的功能。

4.2 FY FY在拟南芥从营养生长转向生殖生长过程起重要作用。长日照启动拟南芥的开花, 但有一些关键的抑制因子如转录因子*FLOWERING LOCUS C (FLC)*则拮抗这种启动。高水平的*FLC* mRNA与开花延迟显著相关。而*FLC*的表达受自主途径的下调(Hepworth等2002)。自主途径的发

现是从6个晚花突变体 *fca*、*fy*、*fve*、*fld*、*ld* 和 *fpa* 的研究而来的(Koornneef等1998; Simpson和Dean 2002)。其中FCA (也称开花时间控制蛋白) 是 *FLC* 的负调节因子, 为一个RNA结合蛋白, 除了含RNA结合结构域以外, 还含有WW蛋白互作结构域, 与FCA蛋白WW结构域互作的是自主途径中的另一个蛋白FY, 它负调控FCA的表达。FY含有7个重复的WD单元和Pro-Pro-Leu-Pro结构域, 与酵母菌的RNA 3'末端加工因子Rfs2p同源, 在真核生物蛋白中保守性很高。

关于FY对FCA调节的分子机制问题, 迄今已研究得较为清楚。FCA的表达水平是通过自身pre-mRNA加工进行调节的, FCA pre-mRNA内可以在不同的多聚腺苷酸位点形成3'末端, 得到不同的成熟mRNA。FY蛋白则协助FCA有效地选择近启动子的多聚腺苷酸位点来形成3'末端(Simpson等2003; Quesada等2003), 表达成有活性的FCA蛋白。

FY除了帮助FCA的自动调节表达以外, 还参与*FLC*的表达。因为*fy1*和*fy2*突变体内积累大量的*FLC* mRNA, 开花时间推迟。因此FCA/FY的互作导致开花抑制因子*FLC*的下调, 其下调的机制是FCA可能控制*FLC*转录本3'末端的形成, 而FY则可能为此种RNA 3'末端的加工提供作用场所。

4.3 MS11、FAS1和FAS2 *AtMS11* 功能缺失产生多种异常表型, 子叶和叶子形状改变, 影响分生组织功能; 花形态异常, 胚珠发育受到干扰最终导致完全雌性不育。进一步的分析揭示, *AtMS11* 是维持同源异型基因*AG*和*AP2*在正确的时间和器官中表达不可缺失的蛋白。*MS11* 含5个WD重复, 是染色质排列因子CAF-1 (chromatin assembly factor) 中的组分, 在CAF-1调节的染色质组装中也发挥作用。*AtMS11* 缺失时, 异染色质的形成发生缺陷, 说明*AtMS11*在维持染色质结构中起关键作用(Hennig等2003)。

蛋白质互作的研究表明, *AtMS11* 与拟南芥的眼癌相关蛋白和组蛋白脱乙酰基酶互作。与眼癌相关蛋白互作的含WD重复的蛋白在动物和植物中都很保守, 如番茄的LeMS11和哺乳动物的RbAp48和RBP等蛋白。关于RbAP48作用的分子机制是比较清楚的, 它作为接头将脱乙酰酶和染色质的特异性区域连接起来, 以便脱乙酰基酶工作。

因为组蛋白的乙酰化程度降低是与转录因子结构域的失活相关, 是染色质水平基因沉默调控的主要方式(Wolffe和Pruss 1996; Ach等1997; Hennig等2003)。因此推测, *AtMS11* 也是通过此种机制抑制同源异型基因的异位表达, 从而保证花器官的正常发育。

拟南芥的染色质排列因子CAF-1中还有FAS1和FAS2蛋白(FASCIATA), 它们是WD40蛋白(Kaya等2001)。*fas*突变体的*WUSCHEL* (*WUS*)基因在茎顶端分生组织和*SCARECROW* (*SCR*)基因在根顶端分生组织的表达状态均出现缺失, 导致茎和根顶端分生组织的无序化(Leyser和Furner 1992), 因此推断CAF-1在维持茎和根分生组织的建立中起作用。

4.4 CYP71 亲环素属于亲免疫蛋白超级家族, 其功能是帮助蛋白折叠, 转运, 或作为组织超分子结构的支架蛋白(Bose等1996; Goel等2001)。亲环素CYCLOPHILIN71 (*CYP71*)含有4个WD重复, 定位于细胞核中, 在拟南芥的基因抑制和器官发生中起作用。*CYP71* 缺失突变体 *cyp71* 显示多方面的发育异常, 包括顶端分生组织活性减少; 侧面器官形成的延迟; 叶脉式样改变导致叶子变形; 根生长抑制; 花原基发生缺陷, 花和雄蕊的数目减少, 心皮数增加; 花形态不正常等。表达谱表明, *CYP71* 在根、茎、叶和花中都有表达(He等2004), 发育早期表达局限于子叶尖端和RAM、SAM中。

CYP71 的功能缺失导致分生组织发育调节基因*KNOX I*类中的*KNAT1*、*KNAT2*和*STA*, 花发育的同源异型基因, 如*AG*和*AP2*基因, 发生异位激活。之前的研究表明, *KNOX I*类基因特异性地在SAM区域表达, 其功能是抑制侧面器官的发端(Lincoln等1994; Chuck等1996)。染色质免疫共沉淀实验的结果显示, 突变体中*CYP71*与*KNAT1*和*STA*互作的位点是在靶基因的染色质H3上, 致使H3K27的甲基化减少。*cyp71*突变体的叶子变形, 并且叶子中有*KNOX I*类基因异位表达, 说明*KNOX I*类基因在叶子中的抑制状态受到干扰。

由于*CYP71*参与靶基因染色质的组蛋白甲基化, 因此, 它很可能是作为大分子复合物参与基因激活或抑制过程中必不可少的染色质结构的组装和/或维持活动的。有研究表明, *STM*编码区域内H3 (H3K27)的甲基化对于在侧面器官中抑制此种基

因是必需的(Schubert等2006), 于是 *cyp71* 突变体内靶基因座的组蛋白修饰发生了改变, 导致 *STM* 和 *KNAT1* 的抑制解除。

另外, 与染色质组装的调节相关的基因 *FAS1*、*FAS2* 和 *MSI* 编码 CAF-1 亚基, 这些基因的突变均造成 SAM 和 RAM 的异常。这 3 个基因编码的蛋白也都含有 WD40 结构域, 虽然现在对 WD40 在 CAF-1 亚基中的作用不清楚, 对 CAF-1 如何调节基因的表达也不了解, 但 *CYP71*、*FAS1*、*FAS2* 和 *MSI* 等一组基因的研究表明, WD40 蛋白在染色质调控过程中是通过与组蛋白互作发挥作用的。

5 与信号转导相关的 WD40 蛋白

5.1 AGB1 1994年 Weiss等首次在拟南芥中克隆到 *AGB1* 的 cDNA, 发现 *AGB1* 蛋白含有 7 个 WD 重复结构域, 氨基酸序列与人类异源 G 蛋白的 β 亚基有 50% 的相同。*AGB1* 在体外能够与拟南芥 G 蛋白的 γ 亚基结合(Mason 和 Botella 2000, 2001), 存在于质膜中(Obrdlik等2000), 这些特性都说明 *AGB1* 蛋白是拟南芥异源 G 蛋白的 β 亚基。*AGB1* 缺失所产生的效应是多方面的, 突变表型为叶子变小变薄、荚果缩小, 胚轴变短且直径增加, 侧根数目明显增多, 根细胞分裂模式发生改变。这些表型与生长素所打开的基因的去阻遏相关, 用生长素处理能够逆转突变表型, 说明 *AGB1* 作为生长素信号传导的负调节因子起作用。而在荚果宽度和叶片长度的生长调控中, *AGB1* 可能在一个由类受体激酶 ER (ERECTA) 调控的生长发育途径中发挥作用(Lease等2001)。

agb1 的突变位点在第一个 WD 重复区域, 说明 WD 结构域对于 *AGB1* 的功能是不可缺少的(Hamm等1998), 但对其作用的分子机制还缺乏了解。

5.2 COP1 一般认为黄化幼苗是抑制光形态建成的一个结果。拟南芥的遗传分析证明其中有一系列的调控基因在黑暗中发挥作用, 抑制植物的光形态建成途径。拟南芥从暗适应发育到光适应发育的转变受一个由调控幼苗光形态发生的正、负调节蛋白组成的网络的控制(Hardtke等2000; Neff等2000)。网络中的一个蛋白 COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1) 是 WD40 蛋白质。COP1 功能缺失的 *copl* 突变体幼苗在持续黑暗条件下会出现与光下野生型幼苗一致的表型, 说明 COP1 是黑暗中光形态发生的负调控蛋白(Deng 和 Quail

1992)。它在黑暗条件下生长的幼苗中被激活, 光下通过光敏色素和隐花色素的作用分解失活, 其中隐花色素可能直接导致它的失活(Wang等2001)。COP1 的 N 末端有一个卷曲的螺旋(coiled-coil) 结构域, 接着有一个锌指结构域, C 端有 7 个 WD 重复单元, 参与泛素-蛋白连接, 将泛素连接到其他蛋白上, 给它们贴上降解的标签, 然后通过蛋白酶体将其分解。经 COP1 促进泛素化的重要的靶蛋白是 HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5) 和 HYH。HY5 和 HYH 都是 bZIP 家族转录因子, 促进那些光形态建成促进基因的转录(Holm等2002)。野生型的拟南芥在黑暗条件下, 由于 COP1 对 HY5 和 HYH 的分解加快, 以致促进光形态建成基因的转录抑制, 植株保持暗适应形态。但是 COP1 本身并没有泛素连接酶活性。因此认为可能有泛素通过 COP1 与其底物发生关系的中间物。有人认为能够与 COP1 互作的还有 CIP8 (COP1 interacting protein 8)。CIP8 具有泛素连接酶活性, 与 CIP8 结合的是一个 E2 泛素结合酶 AtUBC8 (Hardtke等2002)。

COP1 与 HY5 互作的分子机制已有了一些报道, COP1 的锌指结构域被删除时并不影响和 HY5 的互作。卷曲的螺旋结构域被删除时, 互作能力下降一半。但锌指和卷曲的螺旋结构域同时删除, 或者删除 WD40 结构域后, COP1 和 HY5 几乎就不能互作(McNellis等1996; Ang等1998)。这些研究支持了认为 COP1 与 HYH 的互作主要是通过 WD40 结构域的说法(Holm等2001)。COP1 与 CIP8 的互作也是通过 WD40 结构域的。COP1 与各种蛋白的互作机制已经有了较明确的概念, 即认为通过 COP1 将泛素连接到 HY5 或 HYH 上, 给它们贴上降解的标签, 缩短这些蛋白的半衰期, 是通过 COP1 的 WD40 结构域与 CIP8 和 AtUBC8 模块以及 HY5 或 HYH 进行互作的, COP1 作为多个蛋白互作平台, 使植物在黑暗中抑制光形态建成的发育得以进行。

5.3 SPA SPA 蛋白包括一组蛋白 SPA1、SPA2、SPA3 和 SPA4, 为细胞核定位的 WD 蛋白。除了 SPA4 以外, 其他 SPA 还含有一个卷曲的螺旋结构域和一个类激酶区域, 这些均是光敏色素 A 信号转导途径中的负调节因子(Hoecker等1999; Laubinger等2003, 2004)。主要抑制幼苗的光形态建成。4 个基因的功能有冗余, 也有区别。*SPA1* 和 *SPA2* 对暗中生长的幼苗起主要作用, 而 *SPA3* 和 *SPA4* 主要

调节成年植株的伸长。*SPA2*对在黑暗条件下生长幼苗的光形态建成产生抑制作用,而对光下生长的苗则无作用。*COP1*是黑暗条件下幼苗光形态建成的关键抑制因子,但其活性通过光受体作用被抑制。*SPA*是处于光受体与*COP1*之间的抑制因子,*SPA*的4个成员可能是通过与*COP1*形成复合物来调节*COP1*活性的。研究表明,*SPA*与*COP1*是通过它们的卷曲的螺旋结构域进行互作的(Hoecker和Quail 2001; Yang等2006),并不是WD结构域,但是干扰*SPA*的WD重复会导致其功能的完全丧失,因此认为WD结构域可能是*SPA*之间或同其他蛋白一起与*COP1*形成复合物,在不同的条件和发育阶段起作用。

5.4 PRL1 *PRL1* (PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1)的C末端含有7个WD重复单元和核定位序列,对葡萄糖、冷冻和多种激素产生反应。葡萄糖抑制在植物调节碳代谢中很重要。供给葡萄糖会导致参与叶绿素合成、卡尔文循环、糖生成作用和淀粉降解等基因的表达发生转录/转录后下调,与之相反的是,参与糖酵解、防卫反应、硝酸和磷酸盐代谢、花色素以及储存蛋白合成等基因的表达则被激活(Jang等1997)。*prl1*突变体叶内的葡萄糖、果糖、淀粉、叶绿素和花色素积累说明*PRL1*参与碳代谢途径中葡萄糖的抑制,*PRL1*可能是作为负调节因子而拮抗葡萄糖抑制因子活性的。同时*prl1*对脱落酸、生长素、细胞分裂素等激素的敏感性也明显增加,说明*PRL1*作用的多效性。而且这种多效性可能与葡萄糖、激素和光信号转导途径之间存在密切的交叉作用有关,因为*PRL1*突变造成的很多发育、激素和分子的改变只有在光照条件下生长的植物中才能测定到。*prl1*突变体的光形态建成正常也说明*PRL1*基因的调节功能依赖于光,独立于光受体调节的光信号转导途径(Németh等1998)。

与*PRL1*互作的蛋白是一个细胞核输入受体ATHKAP2,因此推测*PRL1*在细胞核输入调节过程中起作用。但*PRL1*在葡萄糖抑制与细胞核输入中所起的作用是其功能多效性的体现呢,还是两者之间存在关联呢?根据现有的研究资料还无法肯定。

6 参与细胞内转运的AtSeh1蛋白

细胞内的转运蛋白往往是经过共翻译转运到内质网中,然后再转运到高尔基体复合体内。在高

尔基体转运网(trans-Golgi network, TGN)中积累的蛋白运转到下游的细胞器,如包涵体或液泡前体和质膜中(Gu等2001)。经过包涵体和液泡前体的融合,蛋白最终转移到溶酶体和液泡中(Babst 2005)。

TGN在蛋白的转运中起作用,蛋白在运往下游细胞器之前需要分类后再运转,很多蛋白,如网格蛋白(clathrin)、SNAREs、小GTP结合蛋白、发动蛋白相关蛋白2A (AtDRP2A,又称为ADL6)和肌动蛋白丝均参与这种TGN囊泡转运(Ahmed等2000; Bassham等2000; Park等2005)。拟南芥植物中与AtDRP2A互作的蛋白是一个WD40蛋白AtSeh1。AtSeh1有4个WD重复单元,3个位于N末端,1个分布在C末端。它与AtDRP2A的血小板-白细胞C激酶底物(普列克底物蛋白,pleckstrin)同源物结构域互作,其互作位点就是PtdIns3P(磷脂酰肌醇三磷酸)和AtDRP2A互作的位点(Jin等2001),因此AtSeh1与PtdIns3P之间存在竞争。AtSeh1抑制PHD和磷脂之间的互作是通过影响AtDRP2A与膜的联系而调节其活性的。研究表明,细胞中AtSeh1分布于细胞核、高尔基体和液泡前体中,至于其是否可能在细胞核中起作用尚不清楚,但其在高尔基体和液泡前体中的存在以及它对AtDRP2A和脂质结合的影响,说明AtSeh1在囊泡转运中是起作用的。

总之,WD40蛋白主要通过其WD结构域与其他蛋白互作,参与了拟南芥植物体内众多代谢反应的调控。从目前的研究资料来看,WD40蛋白常常具有多种不同的结合伙伴。WD40蛋白与不同蛋白的互作是否与参与调控不同代谢途径相关联,从而表现出功能的多效性和复杂性,目前还没有深入的研究,这都是将来需要进一步研究的问题。

参考文献

- Leyser O, Day S. 瞿礼嘉, 邓兴旺译(2006). 植物的发育机制. 北京: 高等教育出版社
- Ach RA, Taranto P, Gruissem W (1997). A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell*, 9: 1595~1606
- Ahmed SU, Rojo E, Kovaleva V, Venkataraman S, Dombrowski JE, Matsuoka K, Raikhel NV (2000). The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol*, 149: 1335~1344
- 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*, 1: 213~222
- Babst M (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic*, 6: 2~9
- Bassham DC, Raikhel NV (2000). Unique features of the plant vacuolar sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 491~495
- Berdy SE, Kudla J, Gruissem W, Gillaspay GE (2001). Molecular characterization of At5Pase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol triphosphate signaling. *Plant Physiol*, 126: 801~810
- Bose S, Weikl T, Bugl H, Buchner J (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*, 274: 1715~1717
- Chuck G, Lincoln C, Hake S (1996). KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 8: 1277~1289
- Conner J, Liu Z (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12902~12907
- Dean C, Simpson GG (2003). Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *EMBO J*, 22: 3142~3152
- Deng XW, Quail PH (1992). Genetic and phenotypic characterization of *cop1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2: 83~95
- Deyholos MK, Cavaness GF, Hall B, King E, Punwani J, Norman JV, Sieburth LE (2003). VARICOSE, a WD-domain protein, is required for leaf blade development. *Development*, 130: 6577~6588
- Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, Wormsley S, Settlege RE, Shabanowitz J, Osheim Y et al (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417: 967~970
- Drews GN, Bowman JL, Meyerowitz EM (1991). Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell*, 65: 991~1002
- Fong HKW, Hurley JB, Hopkins RS, Miake-Lye R, Johnson MS, Doolittle RF, Simon MI (1986). Repetitive segmental structure of the transducin β subunit: Homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2162~2166
- Goel M, Garcia R, Estacion M, Schilling WP (2001). Regulation of *Drosophila* TRPL channels by immunophilin FKBP59. *J Biol Chem*, 276: 38762~38773
- Grigorieva G, Shestakov S (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett*, 13: 367~370
- Gu F, Crump CM, Thomas G (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci*, 58: 1067~1084
- Hamm HE (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*, 273: 669~672
- Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K, Deng XW (2000). HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by a phosphorylation within its COP1 binding domain. *EMBO J*, 19: 4997~5006
- Hardtke CS, Okamoto H, Stoop-Myer C, Deng XW (2002). Biochemical evidence for ubiquitin ligase activity of the *Arabidopsis* COP1 interacting protein 8 (CIP8). *Plant J*, 30: 385~394
- He Z, Li L, Luan S (2004). Immunophilins and parvulins. super-family of peptidyl prolyl isomerases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134: 1248~1267
- Hennig L, Taranto P, Walser M, Schönrock N, Gruissem W (2003). *Arabidopsis* MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development*, 130: 2555~2565
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *EMBO J*, 21: 4327~4337
- Hoecker U, Tepperman JM, Quail PH (1999). SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science*, 284: 496~499
- Hoecker U, Quail PH (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 276: 38173~38178
- Holm M, Hardtke CS, Gaudet R, Deng XW (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J*, 20: 118~127
- Holm M, Ma LG, Qu LiJ, Deng XW (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 16: 1247~1259
- Janda L, Tichy P, Spizek J, Petricek M (1996). A deduced *Thermomonospora curvata* protein containing serine/threonine protein kinase and WD-repeat domains. *J Bacteriol*, 178: 1487~1489
- Jang JC, León P, Zhou L, Sheen J (1997). Hexokinase as sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9: 5~19
- Jin JB, Kim YA, Kim SJ, Lee SH, Kim DH, Cheong GW, Hwang I (2001). A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 1511~1526
- Katz A, Oliva M, Mosquna A, Hakim O, Ohad N (2004). FIE and CURLY LEAF polycomb protein interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J*, 37: 707~719
- Kaya H, Shibahara K, Taoka K, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T (2001). *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*, 104: 131~142
- Kinoshita T, Harad JJ, Goldberg RB, Fischer RL (2001). Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 14156~14161
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Soppe W (1998). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 345~370
- Laubinger S, Fittinghoff K, Hoecker U (2004). The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in sup-

- pression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2293~2306
- Laubinger S, Hoecker U (2003). The SPA1-like proteins SPA3 and SPA4 repress photomorphogenesis in the light. *Plant J*, 35: 373~385
- Lease KA, Wen J, Li J, Doke JT, Liscum E, Walker JC (2001). A mutant *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein γ subunit affects leaf, flower, and fruit development. *Plant Cell*, 13: 2631~2641
- Leyser HMO, Furner IJ, (1992). Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 116: 397~403
- Li D, Roberts R (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58: 2085~2097
- Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S (1994). A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, 6: 1859~1876
- Liu Z, Franks RG, Klink V (2000). Photoreceptors in signal transduction: pathways of enlightenment. *Plant Cell*, 12: 1~14
- Liu Z, Meyerowitz EM (1995). *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development*, 121: 975~991
- Lloyd AM, Walbot V, Davis RW (1992). Anthocyanin production in dicots activated by maize anthocyanin-specific regulators *R* and *Cl*. *Science*, 258: 1773~1775
- Luo M, Bilodeau P, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury A (2000). Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA*, and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 10637~10642
- Mason MG, Botella JR (2000). Completing the heterotrimer: Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 14784~14788
- Mason MG, Botella JR (2001). Isolation of a novel G-protein γ -subunit from *Arabidopsis thaliana* and its interaction with *G γ* . *Biochim Biophys Acta*, 1520: 147~153
- McNellis TW, Torii KU, Deng XW (1996). Expression of an N-terminal fragment of *COP1* confers a dominant-negative effect on light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 8: 1491~1503
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371: 297~300
- Neff MM, Fankhauser C, Chory J (2000). Light: an indicator of time and place. *Genes Dev*, 14: 257~271
- Németh K, Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kálmán Z, Stankovic-Stangeland B, Bakó L, Mathur J, Ökrész L, Stabe S et al (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by *PRL1*, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 12: 3059~3073
- Nocker S, Ludwig P (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 4: 1~11
- Obrdlik P, Neuhaus G, Merkle T (2000). Plant heterotrimeric G protein β subunit is associated with membranes via protein interactions involving coiled-coil formation. *FEBS Lett*, 476: 208~212
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, Hannon M, Michaeli D, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (1999). Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell*, 11: 407~415
- Park M, Lee D, Lee GJ, Hwang I (2005). *AtRMR1* functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J Cell Biol* 170: 757~767
- Parkhurst SM (1998). Groucho: marking its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends Genet*, 14: 130~132
- Quesada V, Macknight R, Dean C, Simpson GG (2003). Autoregulation of the site of 3' end formation in *FCA* pre-mRNA prevents precocious flowering. *EMBO J*, 22: 3142~3152
- Roe JL, Nemhauser JL, Zambryski PC (1997). *TOUSLED* participates in apical tissue formation during gynoecium development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 9: 335~353
- Schneitz K, Hulskamp M, Kopczak S, Pruitt R (1997). Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124: 1367~1376
- Schubert D, Primavesi L, Bishopp A, Roberts G, Doonan J, Jenuwein T, Goodrich J (2006). Silencing by plant polycombgroup genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J*, 25: 4638~4649
- Shi DQ, Liu J, Xiang YH, Ye D, Sundaresan V, Yang WC (2005). *Slow Walker1*, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. *Plant Cell*, 17: 2340~2354
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252: 802~808
- Simpson GG, Dean C (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*, 296: 285~289
- Simpson GG, Dijkwel PP, Quesada V, Henderson I, Dean C (2003). *FY* is an RNA 3' end-processing factor that interacts with *FCA* to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell*, 113: 777~787
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 24: 181~185
- Sørensen MB, Chaudhury AM, Robert H, Bancharel E, Berger F (2001). Polycomb group genes control pattern formation in plant seed. *Curr Biol*, 11: 277~281
- Takenawa T, Itoh T (2001). Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1533: 190~206
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant*

- Cell, 11: 1337~1349
- 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
- Weiss CA, Garnaat CW, Mukai K, Hu Y, Ma H (1994). Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein beta-subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 9554~9558
- Williams FE, Trumbly RJ (1990). Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10: 6500~6511
- Wolffe AP, Pruss D (1996). Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. *Cell*, 84: 817~819
- Yamagishi K, Nagata N, Yee KM, Braybrook SA, Pelletier J, Fujioka S, Yoshida S, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2005). TANMEI/EMB2757 encodes a WD repeat protein required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139: 163~173
- Yang HY, Li WS, Cheng SN (2007). Isolation and characterization of 4 gametophytic male sterile mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Sci Bull*, 52: 1949~1956
- Yang J, Wang H (2006). The central coiled-coil domain and carboxyl-terminal WD-repeat domain of *Arabidopsis* SPA1 are responsible for mediating repression of light signaling. *Plant J*, 47: 564~576
- Zhong R, Burk DH, Morrison WH, Yea ZH (2004). FRAGILE FIBER3, an *Arabidopsis* gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell*, 16: 3242~3259
- Zhong R, Ye ZH (2004). Molecular and biochemical characterization of three WD-repeat domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 45: 1720~1728