

## 植物生长素受体

胡应红, 李正国\*, 宋红丽, 杨迎伍

重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市高校功能基因与调控新技术重点实验室, 重庆 400044

### Auxin Receptor in Plants

HU Ying-Hong, LI Zheng-Guo\*, SONG Hong-Li, YANG Ying-Wu

Genetic Engineering Research Center, College of Bioengineering, Chongqing University, Key Laboratory of Functional Gene and Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission, Chongqing 400044, China

**摘要:** 扼要介绍了生长素结合蛋白 ABP1 和泛素-蛋白酶体 SCF<sup>TIR1</sup> 作为生长素受体研究的新进展, 并以这2种受体为基础初步分析了植物生长素受体体系的内容和范围。

**关键词:** 生长素受体; ABP1; TIR1; AFB

植物生长素的研究已有 100 多年, 但在生长素受体领域却一直停滞不前, 极大地阻碍了生长素信号转导途径的研究。直到 2005 年, Dharmasiri、Kepinski 和 Leyser 在 *Nature* 上连续发表了 2 篇论文, 确定 TIR1 为植物生长素受体, 从而引起了科学界的高度关注 (Parry 和 Estelle 2006; 康宗利和杨玉红 2006)。

在 TIR1 被确定为生长素受体之前, 生长素受体的研究重点是生长素结合蛋白 (auxin-binding protein 1, ABP1)。2001 年, 对烟草叶细胞的研究结果表明, ABP1 主要介导低浓度 (高亲和力) 生长素的反应, 调节细胞伸长生长 (Chen 等 2001)。同年, 美国北卡罗莱纳大学 Jones 研究组从拟南芥中成功分离到 ABP1 的首株突变体, 并发现 ABP1 为正常细胞分裂和伸长所必需, 参与胚的形态建成 (Chen 等 2001)。之后, Napier 和 Venis 研究组揭示了 ABP1 三维晶体结构的奥秘, 并确定了 ABP1 的生长素结合位点 (Woo 等 2002)。

这些研究结果为 ABP1 的生物学功能提供了分子生物学和遗传学的证据, 表明它具有生长素受体的功能。这一成果被刊登于 *Genes & Development* 的封面 (April 1, 2001)。但至今没有证据表明它与生长素诱导的基因表达有关。

#### 1 TIR1受体功能的确定

生长素受体的另一个研究方向是泛素化降解途径。早期的研究表明, TIR1 (*transport in-*

*hibitor response 1*) 编码 F-box 蛋白, 并且这种 SCF<sup>TIR1</sup> 为生长素反应必需 (Ruegger 等 1998)。一旦确定了 TIR1 是 F-box 蛋白, 就需要分离与其结合的底物。早期的研究证实 Aux/IAA 蛋白的稳定化修饰阻碍生长素反应, 并且生长素能促进它的快速降解 (Gray 等 2001; 吴蓓等 2005); 在细胞提取液中, Aux/IAA 蛋白 (IAA7) 能与 TIR1 结合 (Gray 等 2001); 在级联反应中, IAA7 Domain II 的 30 个氨基酸残基能与 TIR1 结合 (Kepinski 和 Leyser 2004)。这些研究结果证实, Aux/IAA 蛋白就是 SCF<sup>TIR1</sup> 的底物, 并且它的 Domain II 在这 2 种蛋白互作中起作用。但至今还不清楚是什么因素促进了这 2 种蛋白质的相互作用, 这些因素又是如何与生长素感知相联系的。

在去除膜结构的细胞提取液中, Aux/IAA 蛋白能与 SCF<sup>TIR1</sup> 结合, 证明生长素受体和相关联的信号传递蛋白是可溶的 (Dharmasiri 等 2003)。在动物和真菌中, 底物蛋白的修饰作用 (尤其是磷酸化作用) 是特异性识别所必需的。但在植物中, 基因学和药理学研究证实这种磷酸化作用对 Aux/IAA 蛋白的识别不是必需的 (Dharmasiri 等 2003;

收稿 2006-06-27 修定 2007-01-17

资助 国家自然科学基金项目 (30471214 和 30371006) 和中法先进研究计划项目 (PRA BT04-01)。

\*通讯作者 (E-mail: zhengguoli@cqu.edu.cn; Tel: 023-65120483)。

Kepinski和Leyser 2004)。另外, Domain II的光谱分析也没有发现依赖于生长素的修饰变化。这些结果证明生长素不是通过改变Aux/IAA蛋白的构象来促进其与TIR1相互作用(Kepinski和Leyser 2004)。

这就引发出一个问题, 是否存在别的蛋白质促进二者的相互作用。在 $[^3\text{H}]$ -IAA存在的条件下进行级联反应时, 发现IAA能与 $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ 结合, 且细胞提取液中TIR1的浓度越大放射性标记就越强, 这证明IAA是与TIR1或相关蛋白特异性结合的(Kepinski和Leyser 2005; Dharmasiri等2005a)。为了弄清楚生长素究竟是与TIR1还是其他相关蛋白结合, 采用在光滑爪蟾(*Xenopus laevis*)胚胎或昆虫体内异源合成的TIR1进行级联实验的结果表明, 在有生长素存在的条件下TIR1能与IAA7的Domain II结合, 从而充分证明了TIR1就是生长素受体(Kepinski和Leyser 2005; Dharmasiri等2005a)。

由此可以推断出整个生长素信号转导的大概脉络, 即 $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ 、Aux/IAA和ARFs (auxin response factors)承担从生长素到基因表达的信号转导作用。

## 2 TIR1的生长素结合位点

上述结果证实生长素能与 $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ 结合, 这种结合进而促进 $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ -Aux/IAA的相互作用。但到目前为止, 仍不清楚TIR1是在什么位点、如何与生长素结合的。

首先应该指出的是, 不能排除TIR1和Aux/IAA Domain II均为生长素结合所必需的可能性; 其次, 在TIR1具体结合位点的问题上, Estelle和Leyser的研究组都证实F-box蛋白对生长素调控的 $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ -Aux/IAA结合是必需的。缺失F-box蛋白或其保守区域发生点突变, 这种结合作用就大大削弱甚至消失(Kepinski和Leyser 2005; Dharmasiri等2005a)。可能由于TIR1首先必须与微生物中SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1), 或拟南芥中的ASK1 (*Arabidopsis* serine/threonine kinase 1)相互作用后, 才能与生长素和底物结合。虽然已证实这些区域彼此存在着功能上的依赖性, 但仍然不能确定结合位点的具体位置。因此需要进一步纯化F-box蛋白后才可以研究这一问题; 相

比之下, ABP1的生长素结合位点已经研究得比较清楚(Woo等2002)。目前, 人们已对TIR1和ABP1的序列进行比较, 证明它们之间没有相似之处。

## 3 TIR1/AFB基因家族

如果TIR1是唯一的生长素受体, 那么功能缺失突变株应该是致死的, 但实际情况并非如此。拟南芥Aux/IAA基因(如*bd1/iaa12*)发生功能获得突变的植株常表现出强烈的生长素反应减弱的表型, 而*tir1*突变株虽然表现出一定的抗生长素的表型, 但很难与野生型植株区分开来(Ruegger等1998)。这可能是因为拟南芥中存在3个密切相关蛋白(afb1、afb2和afb3)之故。afb (auxin-signaling F-box protein)不仅与TIR1有高度同源性, 同时也含有亮氨酸重复区域; 另外, afb与IAA7的互作也是依赖于生长素的。从这些结果来看, afb蛋白很可能也是生长素受体(Dharmasiri等2005b)。

用突变体进一步研究表明, 拟南芥TIR1/afb基因发生单一突变, 其表型很难与野生型相区分, 而三重(如*tir1*、*afb2*、*afb3*)和四重(如*tir1*、*afb1*、*afb2*、*afb3*)突变的植株则出现强烈的表型变化: 胚胎出现严重的缺陷, 种子萌发受到抑制; 不能生根, 只有一片子叶; 即使能萌发成幼苗, 但缺少根毛, 向地性也较差; 成熟植株叶簇生, 数目减少并高度卷曲; 花序茎变短, 分支变多等。这些表型同*bd1/iaa12*或*mp/arf5*突变株很相似, 因此可以推断三重和四重突变体中幼苗的致死是由IAA12和IAA13的累积引起的。事实上, 在*tir1afb2afb3*突变株中, BDL/IAA12蛋白质的水平确实升高了(Dharmasiri等2005b)。

综上所述, TIR1/afb家族可能是一个生长素受体组群, 它们担当了重复性的受体功能, 并且这种功能的重复性是系统化的, 因而某一成员的突变并不会导致致死表型的出现。因此, 需要进一步取得这个家族在组织特异性方面的数据。

但是, TIR1/afb可能不是植物细胞中唯一的生长素受体。有很多生长素反应, 如不可能在转录水平上实现的生长素反应, 则可能不是由TIR1/afb介导的。

## 4 ABP1和TIR1亲和活性的比较

据报道, 异源表达的拟南芥 $\text{SCF}^{\text{TIR1}}$ 对IAA具

有较高亲和活性, 离解常数(dissociation constant,  $K_d$ )为25 nmol·L<sup>-1</sup> (Kepinski和Leyser 2005)和84 nmol·L<sup>-1</sup> (Dharmasiri等2005a); 而对1-NAA的亲亲和活性以微摩为单位, 其值小于 IAA; 与2, 4-D的亲亲和活性较低; 与2-NAA、色氨酸均无亲和活性(Kepinski和Leyser 2005; Dharmasiri等2005a)。大豆的ABP1与1-NAA具有较高亲和活性,  $K_d$ 为50~200 nmol·L<sup>-1</sup>; 与2-NAA的亲亲和活性类似于1-NAA; 与IAA的亲亲和活性稍低, 为5~10 μmol·L<sup>-1</sup>; 与2, 4-D的亲亲和活性较低; 与色氨酸无亲和活性(Napier等2002; Vennis和Napier 1995)。由此可见, 2种蛋白对生长素的选择性是不同的, SCF<sup>TIR1</sup>更倾向于与IAA结合, 而ABP1则倾向于与2-NAA和1-NAA结合。但2种蛋白质与色氨酸均无结合活性, 且与2, 4-D的亲亲和活性均较低。另外, 由于内部转运载体的存在, 以致2, 4-D在细胞中的浓度较高(Delbarre等1996), 并且它能够通过新陈代谢作用而趋向稳定化, 所以其作用比生长素更稳定、更持久(Delbarre等1994)。由此看来, 在任何浓度下, 虽然亲和活性较低, 但仍能表现出较强的生长素反应。

另外, 2种蛋白亲和活性所依赖的pH值是不同的。大豆的ABP1与1-NAA结合作用的最适pH值是5.0~5.5, 在pH值为7.0时也有部分亲和活性, 与对应细胞区域的pH值一致(细胞表面pH值为5.0~6.0, Napier 1995); 但拟南芥SCF<sup>TIR1</sup>-IAA级联实验的pH值为7.2 (Dharmasiri等2005a)和7.5 (Kepinski和Leyser 2005), 虽然没有证据证明SCF<sup>TIR1</sup>的亲亲和活性依赖于pH值, 但其具有最高亲和活性的pH值与对应细胞区域的pH值也是一致的(细胞核pH值为7.2~7.5)。

由以上结果可以看出, SCF<sup>TIR1</sup>和ABP1的区别主要有两方面: 一方面是对生长素的选择性不同; 另一方面是亲和活性所依赖的pH值不同。

同时可以发现, SCF<sup>TIR1</sup>和ABP1对于生长素的选择性和亲和活性与其对应的细胞区域是一致的, 因而可以推断ABP1是位于细胞表面的生长素受体, 而SCF<sup>TIR1</sup>是位于细胞核区域的生长素受体, 由于2种蛋白质所处的区域不同, 所以它们所介导的生长素反应过程必然不同。

## 5 生长素受体体系

目前, 在植物生长素受体领域研究得最多的是ABP1, 但至今没有证据表明它与生长素诱导的基因表达有关。TIR1的研究始于上世纪末期, 但直到2005年才在拟南芥中被确认为生长素受体, 它介导的信号转导模式中, 生长素通过与TIR1直接结合来促进Aux/IAA-SCF<sup>TIR1</sup>的互作, 即Aux/IAA蛋白通过泛素化途径水解。此种模式看似完美, 但过于简单, 因为从目前的研究结果来看, TIR1家族并不是唯一的生长素受体。拟南芥在施加外源生长素10~15 min时出现第一个快速生长期, 30 min时达峰值, 之后生长速率下降; 在生长素的持续作用下, 60 min出现第二峰, 之后生长速率趋于恒定(Badescu和Napier 2006)。由于蛋白质的水解作用和基因的转录激活需要时间, 于是生长素所诱发的生长素反应遂有一定的反应滞后期, 由此看来, 生长素诱导的快速反应不太可能是由TIR1介导的。

从目前的实验技术来看, 要测定植物细胞中一种新蛋白质产生需要多少时间是很困难的。早期的生长素诱导产物可在几分钟内产生(Abel和Theologis 1996), 还有一些蛋白质产生的时间范围是10~15 min。即便考虑RNA调节的可能性, 5 min之内产生的生长素反应也不可能由TIR1介导。而滞后期为10~15 min的生长素反应, 其反应时间与TIR1介导的生长素反应一致, 这类反应可能由TIR1介导。

有一些细胞反应的滞后期为5 min, 它们大多数发生在质膜区域, 并与生长素诱导的离子运输和细胞膨胀有关, 这些反应由ABP1介导; 还有一些不能与任何已发现的受体体系相联系, 如MAP激酶(mitogen-activated protein kinase)的激活(Mockaitis和Howell 2000)。

植物中还有2类生长素反应不可能由TIR1介导: 一类是由胞外受体介导的生长素反应。豌豆胚芽鞘部位施加外源生长素的实验证实细胞表面的受体介导了细胞的伸长反应(Vennis等1990); 采用玉米胚芽鞘和拟南芥下胚轴原生质体直接暴露质膜表面的实验也证实胞外受体与离子跨膜运输和原生质体膨胀有关(Steffens等2001)。在这些例子中, 受体可能为ABP1。

在豌豆中采用抗 ABP1 的抗体的实验中, 胞外抗体可阻断 1-NAA 引起的生长素反应, 而 IAA 引起的反应没有被阻断 (Yamagami 等 2004), 这暗示有 2 条完全不同的信号转导途径: 一条由 ABP1 介导; 另外一条由较低生理浓度的 IAA 诱导产生, 由 TIR1 介导。

植物中还有一些反应不能与任何已知受体相联系, 如生长素诱导的生长素极性运输, 外输载体 PIN (pinformed) 蛋白的作用很大 (Geldner 等 2003)。最新的研究结果表明, 微摩尔浓度的 IAA、1-NAA 和 2, 4-D 能阻止 PIN 蛋白和质膜上其他组成性循环物质的内吞作用 (Paciorek 等 2005)。由于内吞作用的减弱, 外输载体即在质膜外表面累积, 生长素外输作用增强, 这就为生长素引起的暂时性极性运输提供了一个合理的解释 (Paciorek 等 2005)。虽然这个论断尚需进一步验证, 但如果真如此, 这就是一个新的生长素反应, 因而应进一步分离新的生长素受体。

总之, 植物的生长素受体体系是一个错综复杂的体系, 这些受体是一个庞大的组群, 它们彼此共同协调完成不同的生长素反应。就目前 ABP1 和 TIR1 中所取得的结果来谈受体体系还为时过早, 但不可否认, 这些结果将促进植物生长素受体体系的研究不断深入。

## 6 结语

TIR1 作为生长素受体的发现和确证具有里程碑式的意义, 但并不意味着已经找到了所有的生长素受体, 理清了所有信号转导支路。相反, TIR1 的生长素受体功能的确认引发了更多亟待解决的问题。其中最重要的问题是生长素的具体作用机制, 即生长素如何促进 TIR1-Aux/IAA 相互作用, TIR1 在什么位点, 如何与生长素和底物结合。这有 2 种可能: 一种可能是生长素与 TIR1 结合使其构象发生改变, 与底物结合; 另一种可能是生长素只是起使 TIR1-Aux/IAA 结合稳定化的作用。这还需要进一步参考其他激素受体结合位点研究中的已有结果, 制定生长素受体研究的可行性方案。

TIR1/AFB 家族是一个生长素受体组群, 它们担当重复性的受体功能, 并且这种功能是系统化的, 因此, 需要进一步建立转基因株系以获得组

织特异性方面的结果。生长素直接与泛素连接酶 (E3) 作用, 中间没有信号转导支路, 所以依赖于生长素的 Aux/IAA 蛋白的降解作用非常迅速, 是否自然界就是利用这种机制调控 SCF 底物的降解作用? 至少在植物中的回答是肯定的。植物和动物中有大量 F-box 蛋白, 除了 TIR1 是生长素受体之外, 最新的研究结果表明 F-box 蛋白也是茉莉酸 (jasmonic acid, JA) (Devoto 等 2002; Xu 等 2002) 和赤霉素 (gibberellic acid, GA) (Ueguchi-Tanaka 等 2005; Fleet 和 Sun 2005) 的受体。究竟它们之中有多少成员直接受小分子激素配体的调节, 值得深入研究。

通过比较 ABP1 和 TIR1 的亲合性和活性, 分析植物生长素受体体系, 不难发现 ABP1 主要介导反应迅速和定位于质膜区域的生长素反应, 这类反应主要包括离子跨膜运输和原生质体膨胀两个方面。而 TIR1 主要介导由胞内生长素诱导, 在转录水平上实现的生长素反应。但仅是这 2 种受体还不能解释所有的生长素反应过程。因此还应进一步研究生长素的其他反应过程, 分离新的生长素受体, 以完善生长素受体体系和信号转导途径。

## 参考文献

- 康宗利, 杨玉红 (2006). 生长素受体之谜得到初步破解. 植物生理学通讯, 42 (1): 105~108
- 吴蓓, 吴建勇, 蔡刘体, 李运合, 黄学林 (2005). 生长素反应因子. 植物生理学通讯, 41 (3): 273~278
- Abel S, Theologis A (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiol*, 111: 9~17
- Badescu GO, Napier RM (2006). Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci*, 11: 217~223
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev*, 15: 902~911
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, 198: 532~541
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Morgat JL, Barbier-Brygoo H (1994). Uptake, accumulation and metabolism of auxins in tobacco leaf protoplasts. *Planta*, 195: 159~167
- Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-

- ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J*, 32: 457~466
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 441~445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M (2003). Auxin action in a cell free system. *Curr Biol*, 13: 1418~1422
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev Cell*, 9: 109~119
- Fleet CM, Sun TP (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 77~85
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112: 219~230
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001). Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414: 271~276
- Kepinski S, Leyser O (2004). Auxin-induced SCF<sup>TIR1</sup>-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCF<sup>TIR1</sup> complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 12381~12386
- Kepinski S, Leyser O (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 446~451
- Mockaitis K, Howell SH (2000). Auxin induces mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 24: 785~796
- Napier RM (1995). Towards an understanding of ABP1. *J Exp Bot*, 46: 1787~1795
- Napier RM, David KM, Perrot-Rechenmann C (2002). A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol Biol*, 49: 339~348
- Paciorek T, Zažímalová E, Ruthardt N, Petrášek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N et al (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435: 1251~1256
- Parry G, Estelle M (2006). Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 18: 152~156
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev*, 12: 198~207
- Steffens B, Feckler C, Palme K, Christian M, Bottger M, Luthen H (2001). The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J*, 27: 591~599
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I (2005). *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437: 693~698
- Vennis MA, Napier RM (1995). Auxin receptor and auxin binding proteins. *Crit Rev Plant Sci*, 14: 27~47
- Vennis MA, Thomas EW, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G, Guern J (1990). Impermeant auxin analogues have auxin activity. *Planta*, 182: 232~235
- Woo EJ, Marshall J, Baulry J, Chen JG, Vennis M, Napier RM, Pickersgill RW (2002). Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO J*, 21: 2877~2885
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D (2002). The SCF (COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 1919~1935
- Yamagami M, Haga K, Napier RM, Iino M (2004). Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiol*, 134: 735~747