

花粉特异 F-box 基因及其表达产物可能参与的 SCF 途径

成建红 李天忠* 韩振海 许雪峰

中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094

Pollen Specific F-box Gene and Its Expressed Product Involved in Putative SCF Pathway

CHENG Jian-Hong, LI Tian-Zhong*, HAN Zhen-Hai, XU Xue-Feng

Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094

提要 泛素蛋白体目标性降解蛋白途径是许多细胞学过程的重要调节体系, 底物蛋白泛素化涉及3个酶激反应, 其中, 作为E3连接酶的SCF复合体对底物的识别是通过亚体F-box蛋白C末端的特异性结构实现的。利用染色体步移等方法, 最近在一些配子体型自交不亲和植物S-RNase基因近旁相继发现了一类花粉特异性表达的F-box基因, 从而预示泛素介导的SCF蛋白降解途径可能参与配子体自交不亲和反应。

关键词 泛素蛋白体降解途径; SCF复合体; 自交不亲和性; F-box蛋白质; 花粉S基因

细胞蛋白的表达和功能行为在部分程度上能通过翻译后的降解来互补调控, 有目标地降解细胞内蛋白是许多细胞程序调控的重要模式。真核细胞中目标蛋白的周转主要由保守的泛素(ubiquitin)途径介导, 它催化一个多泛素链共价连接到靶蛋白, 泛素链作为一个降解标记, 使得靶蛋白最终被26S蛋白体(proteasome)降解^[1]。泛素途径包括3个阶段性酶激反应: 在ATP作用下, 泛素首先被泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme) E1 激活, E1的一个保守的半胱氨酸与泛素C末端形成硫酯键; 随后泛素分子被转移到泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme) E2, 与E2的半胱氨酸再次形成一个硫酯键; 接下来泛素连接酶(ubiquitin ligase enzyme) E3促进泛素C末端和底物蛋白异肽键的形成, 泛素的赖氨酸残基继续连接其他泛素分子形成一个多泛素链。多泛素化的底物蛋白为26S蛋白体迅速识别完成降解过程, 泛素单体此后又被循环利用^[2], 相关步骤见图1。

真核生物体中包含少量的无明显特异性的类E1的异构重组体, E2量较大, 一些还具有特化的细胞功能。E3的结构复杂, 对泛素途径特异性底物的识别发挥关键性的作用。目前已发现的E3分子根据组成成分的不同分为4类: HECT、RING/U-box、APC复合体和SCF复合体。HECT和RING/U-box各由一个多肽组成, APC和SCF复合体为一个多亚体结构^[1, 4]。

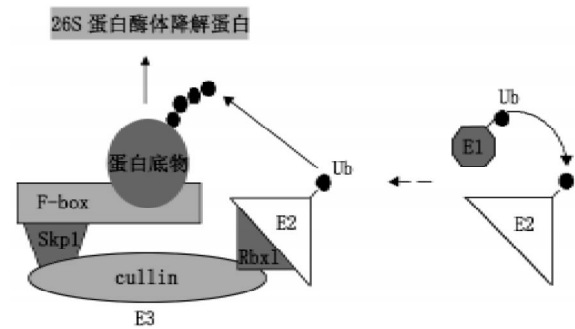


图1 SCF E3连接酶介导的多泛素化途径的几个关键环节^[3] 底物蛋白在该途径中被泛素标识, 最终在26S蛋白体作用下降解。

1 SCF复合体的结构与功能

SCF复合体为E3的一个主要类型。研究人员根据酵母双杂交、三杂交、免疫共沉淀、晶体构造研究等实验结果发现, SCF为一类环状结构的E3^[5], 一般由4个亚体构成: Cullin(酵母为Cdc53)、Skp1、Rbx1(亦指ROC1和HRT1)和一个F-box蛋白质(F-box protein, FBP)^[1, 2]。其可能的结构模型为前3个蛋白构成一个一般性骨架(图1): Cullin亚体作为一个大的骨架蛋白确保为E2展

收稿 2004-06-14 修定 2004-11-02

资助 北京市重点实验室“果树逆境生理与分子生物学实验室”项目。

*通讯作者(E-mail: litianzhong1535@163.com, Tel: 010-62732853)。

示最佳的底物形式; Skp1 与 F-box 域紧密连接, 并促进 Cullin N 末端和 F-box 的相互作用; Rbx1 是一种小的环蛋白 (ring protein), 它可能介导 E2 与 Cullin 蛋白 C 端区域的互作, 推进泛素从 E2 到靶蛋白的转移^[3]。F-box 蛋白质是一类含有 F-box 结构域 (F-box motif) 的蛋白家族成员, 其基因大小为 430~2 000 bp 残基^[6]。Bai 等^[7]根据细胞周期蛋白 F 的 N 末端存在的一段同源序列, 揭示这一区域是在蛋白-蛋白互作中广泛存在的必需结构, 并将其命名为 F-box 结构域。F-box 域大约由 40~50 个氨基酸组成, 一般位于蛋白的 N 端, 是与 SCF 复合体中 Skp1 或 Skp1 类似蛋白的结合区域, C 端往往还存在一些与蛋白相互作用密切相关的二级结构, 如 L L R、W D 4 0、Kelch 重复、亮氨酸拉链、锌指结构等, 可特异性的结合磷酸化的底物^[5, 8, 9]。

通过悬滴漫射等方法, Zheng 等^[5]分析了融合蛋白反应产物 Cull1-Rbx1-Skp1-F-box^{Skp2} SCF 复合体的晶体结构 (图 2): Cull1 是一个拉长蛋白, 它由一个长柄和一个球状区构成。C 端球状区通过一个分子内的 β - 折叠与指环蛋白 Rbx1 结合, 形成一个双亚体的催化核心, 以便将泛素结合酶 E2 引入 SCF 复合体。长柄由 3 个重复部分组成 (repeat 1、2、3), 每个重复包括 5 个螺旋状的结构域 (A、B、C、D、E)。Cull1 的 N 端长柄顶部与底物识别复合体蛋白 Skp1-F-box^{Skp2} 结合。Cull1 构型跨度 110 Å, 将 Skp1-F-box^{Skp2} 和 Rbx1 亚体固定在一起, 该模型得到了 Cull1 消除固定骨架突变体的

实验验证。

SCF 途径最早是在出芽酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*) 细胞周期 G1~S 期转变过程中发现的, 酵母中只有当 G1 后期抑制子 Sic1 被降解后, DNA 才得以起始复制, 而 Sic1 在磷酸化后的降解是经 SCF 复合体 (Skp1、Cdc53、Rbx1 及 F-box 蛋白质 Cdc4) 识别继续完成泛素化降解途径的^[10]。哺乳动物中也存在 SCF 途径, 类似于酵母的细胞周期调控机制。人类 F-box 蛋白 SKP2 特异性识别磷酸化的细胞色素依赖性激酶 (CDK) 抑制子 p27 蛋白, p27 蛋白选择性降解是通过一个 SCF^{SKP2} 复合体催化完成的^[11]。在拟南芥、水稻等植物赤霉素 (GA) 信号途径的研究中发现, 泛素化能够通过蛋白酶体的蛋白水解信号激活转录因子^[12]。SCF 识别底物的先决条件是靶蛋白的磷酸化, GA 通过未能鉴定的蛋白激酶引发转录因子 DELLA 蛋白 AtRGA/OsSLR1 的磷酸化, 磷酸化的 DELLA 被 SCF 复合体识别, 导致 26S 蛋白体对其的降解反应。RGA 和 OsSLR1 的降解解除了茎伸长生长的抑制, 植物从而获得生长, 而在缺乏 GA 时, AtRGA 和 OsSLR1 抑制 GA 反应^[3]。新近在水稻中发现了一个重要的 F-box 蛋白——GID2 参与 GA 介导的 DELLA 蛋白 (SLR1) 的降解。研究表明, GID2 的表达优先发生在水稻 GA 的活跃合成之前, 酵母双杂交和免疫沉淀证明 GID2 是 SCF 复合体的一个组分, 与水稻 ASK1 同源体 OsSKP15 互作。活体 pull-down 测定显示 GID2 与 SLR1 特异性互作, 推断磷酸化的 SLR1 通过与 GID2 的互作亲和力被 SCF^{GID2} 复合体捕获, 从而为泛素途径介导 SLR1 的降解提供了进一步的实验证据^[13]。

真核生物中 SCF 途径参与涉及细胞循环、信号转导、转录等细胞蛋白的泛素化过程^[2]。这些众多的细胞程序反应主要通过 SCF 组成亚体的多样性实现的。水稻基因组编码至少 14 个参与 SCF 复合体组成的类 Skp1 蛋白, 拟南芥基因组包含至少 21 个 Skp1 同源体、11 个 Cullin 同源物、2 个 Rbx1 同源物和 694 个可能的 F-box 蛋白^[3]。在对拟南芥突变体分析时发现 9 个 F-box 蛋白基因有以下的作用: UFO 与花的形成有关, TIR1 与生长素反应有关, COI1 参与调控茉莉酸信号转导, FKFI 和 LKP2 参与昼夜节律的调控, EID1 对光敏

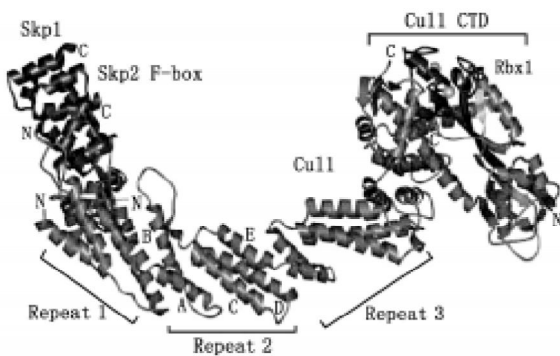


图2 Cull1-Rbx1-Skp1-F-box^{Skp2}四合体的整体结构^[5]

自左至右 Skp1、F-box^{Skp2}、Cull1 和 Rbx1 分别被标记为深浅不同的颜色。Repeat 2 示组成 Cullin 重复结构域的 5 个螺旋 (A、B、C、D、E)。

色素一特异性光信号转导具有重要作用, ORE9 调控叶的衰老, MAX 2 参与选择性抑制副芽形成, SON1 调控对病原体的防卫反应^[14], ZTL 除调控昼夜节律外在光形态建成的控制中又有新的开拓性发现^[15]。

到目前为止, 还未在植物中找到 SCF E3 连接酶与底物相互作用的直接证据, 这将是今后泛素蛋白降解途径研究的重要内容之一。

2 配子体自交不亲和花粉F-box基因

广泛存在于显花植物的自交不亲和性(SI), 是植物克服遗传相关近缘体自身繁殖, 促进种内基因交流的一种进化机制。大部分植物的自交不亲和性受复等位基因的单一位点或基因座S位点控制。配子体自交不亲和(GSI)植物已知的S位点花柱基因编码产物是一系列由引导组织分泌的S-RNase^[16], 在雌蕊拒斥花粉中起着类似于细胞毒素的作用^[17, 18]。抑制机制是长期以来植物自交不亲和性研究的中心议题, 这一问题迫切需要通过克隆和分离花粉S基因得到解决。

根据预测的GSI花粉S基因可能的几个特征: 与S-RNase基因连锁遗传、配子体特异表达、具有S等位基因多态性的特点, Lai等^[19]采用S位点内染色体步移法, 于2002年从金鱼草(*Antirrhinum*) S₂S₄的BAC(bacterial artificial chromosome)文库中筛选得到了一个含S₂-RNase全长基因的64 kb的S位点BAC克隆, 并从中首次获得了一个S₂位点内花粉和花药特异性表达的编码F-box蛋白的新基因——*AhSLF-S₂*。该基因全长1986 bp, 其蛋白N端有一个保守的F-box结构域, 距S₂-RNase基因只有9 kb, 是一个S位点内具有配子体特异性表达模式的多态性基因。推断该基因可能就是金鱼草中介导GSI反应的花粉S基因(*Sp*)。此结果在自交不亲和研究领域引起了广泛关注。

2003年, Ushijima等^[20]在分析蔷薇科植物扁桃(*Prunus dulcis*)S位点的70 kb片段时, 也发现了2个花粉表达的F-box基因, 其中*SFB*表现出S单元型特异的多态性, 物理位置与S-RNase基因相距30 kb以内, 并与之连锁遗传, 且不发生重组, 具有花粉S基因特征。初步研究表明*SFB*与GSI系统中蛋白酶体水解途径有关。同年, Entani等^[21]对蔷薇科植物梅(*Prunus mume*)构建的包含

S₁、S₇的S位点DNA片段的cosmid文库克隆进行了序列测定, 开放式阅读框(ORF)预示其中有4个基因编码43~49 kD的N末端具有保守的F-box结构域的蛋白。这些基因与*AhSLF-S₂*有微弱的同源性(大约25%氨基酸同源), 而其中只有PmSLF-S₁、PmSLF-S₇的C末端区含有几个被富含装载蛋白和半胱氨酸的保守序列包围的高变的短域, *PmSLF*在S₁、S₇等位基因间具有较高的序列多态性(81.3%氨基酸同源), 并在花粉中特异性表达。推测*SLF*为最有可能的参与梅自交不亲和识别反应的花粉S基因。随后, Yamane等^[22]在比较自交不亲和和甜樱桃种(*Prunus avium*)和一个自交亲和酸樱桃种(*P. cerasu*)的S单元型时, 发现了一个新的N端具有F-box域的蛋白基因*PaSFB6*。它十分靠近S₆-RNase基因(相距约380 bp), 并在花粉中特异表达。

蔷薇科多个花粉S基因的发现使GSI花粉S基因的研究掀起了一个高潮, 这是SI研究中的一项重大突破。特别重要的是, 这些多态性基因编码的F-box蛋白有可能参与构建了SCF复合体, 这将预示泛素介导的蛋白降解途径可能参与了自交不亲和反应中一些重要蛋白的降解, 导致识别反应的发生。图3列举了新近在金鱼草、扁桃、樱桃中发现的几个花粉F-box基因推测的F-box域的氨基酸序列, 并同拟南芥*AtTIR1*进行了比较。在这6个F-box的结构域(motif)结构中, 第27、29氨基酸残基具有一致的赖氨酸(K)和色氨酸(W); 相比之下, 前5个花粉特异表达的F-box基因具有更高的相似性, 第10、11、18、19、21、22、27、29、32、33、35、38、42、43氨基酸

PaSFB3	LAKNEILIDILWRLPA.ESLIRFLCTQESDILGSSSFVPTHL... 43
PaSFB6	LAKNDILIDILWRLPA.ESLVRFLCTQESDILGSSSFISTHL... 43
PdSFBa	PKKKEILIDILWRLPA.ESLVRFLFTQESDILGSSSFVSTHL... 42
PdSFBb	LAKKETILIDILWRLPA.ESLVRFLCTQESDILGSSSFVSTHL... 43
AhSLF-S ₂	FPKQVISEILLFSSV.ESLVRFCVSSKCSLISNDFFIMHL... 43
AtTIR1	FP.EEVLKHEVTFIQLIDRNSVSLVKSSTELE...RACRRKIFIG 43
Consensus	k w

图3 几个F-box蛋白F-box结构域序列的比较

氨基酸序列注册号分别为 PaSFB3: BAC81148.1, PaSFB6: BAC81149.1, PdSFBa: AB092966, PdSFBb: AB092967, AhSLF-S₂: AJ297974, AtTIR1: AF327430。

残基位置(PdSFBa第34个处缺失)完全一致, 占到了该序列氨基酸总数的32.79%。而蔷薇科的4个序列完全一致的氨基酸残基达到了72.09%(31个), 6个序列中仅第30个残基差异最大。

3 花粉F-box基因的功能预测

配子体自交不亲和植物中, 含有雌蕊S基因型之一的花粉在柱头萌发后, 花粉管在花柱中的生长受到抑制, 不能正常到达子房室完成受精。抑制剂模型认为花柱中由两个等位基因产生的S-RNase都会进入花粉管, 而花粉S基因产物会抑制外源S-RNase的作用, 同源的S-RNase保留下来最终导致自花花粉管内RNA的降解^[23, 24]。花粉特异性表达的F-box蛋白基因的发现, 使得SCF途径介入配子体自交不亲和反应成为新一轮自交不亲和研究的一个重要起点。研究预测自交不亲和反应中SCF的底物蛋白可能是雌蕊表达的S-RNase。SCF组成之一的花粉S基因产物F-box蛋白特异性识别异源S-RNase, 将其捕获并标记泛素使其降解, 而同源S-RNase被保留下来, 作为细胞毒素分解自花花粉管内的RNA^[25], 自花的花粉管在花柱内发生生理变化而停长, 异花的花粉管则继续伸长, 最终完成双受精。Qiao等^[26]应用免疫共沉淀、酵母双杂交等技术分析了金鱼草花粉F-box基因*AhSLF-S₂*表达产物与S-RNase间的互作反应, 发现*AhSLF-S₂*蛋白与S-RNase及两个已知的SCF亚体——Cullin1(CUL1)-like和Ask1-like有着物理互作, 在亲和授粉中S-RNase被泛素/26S蛋白体蛋白降解途径抑制, 而不亲和反应的S-RNase活性可能通过泛素/26S蛋白体蛋白降解途径保留下来。进一步的转基因研究表明:*AhSLF-S₂*和*AhS₂-RNase*在自交不亲和矮牵牛(*Petunia hybrida*)花柱和花粉中正常表达; 带有番茄(*Lycopersicon esculentum*)花粉特异启动子*LAT52*的*AhSLF-S₂*在自交不亲和矮牵牛花粉中并不影响内源SLF或SLF-like的表达。几个独立转基因材料传粉实验均表现出自交亲和性, 推测是由于两个不同花粉S等位基因的竞争性互作的结果^[27]。Ushijima等^[28]在对人工突变自交亲和型甜樱桃(*Prunus avium*)*S^f*基因和自然突变自交亲和型梅(*P. mume*)*S^f*的核苷酸序列分析表明, 亲和突变是由于花粉特异性F-box基因*SFB^f*部分缺失或*SFB^f*

具插入片段导致两个表达蛋白C端高变区缺失, 从而表现出自交亲和性。这些结果为证明*AhSLF*和*SFB*控制花粉自交不亲和功能提供了直接证据, 为进一步对GSI基因座表达产物的功能研究做了有意义的探索。

GSI反应的机制随着花粉特异性表达的F-box基因的发现而变得日趋明朗, 但是还需要大量实验为F-box基因表达产物可能参与的SCF复合体与底物蛋白的互作反应提供实验证据。自交不亲和和识别过程可能涉及不止一条途径, 相信经过科研人员的不断努力, 植物自交不亲和性的研究工作将在不久的将来得到预期的令人振奋的发现。

参考文献

- 1 Risseuw EP, Daskalchuk TE, Banks TW et al. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant J*, 2003, 34:753~767
- 2 del Pozo JC, Estelle M. F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(2):123~128
- 3 Itoh H, Matsuoka M, Steber CM. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(10):492~497
- 4 Craig KL, Tyers M. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999, 72:299~328
- 5 Zheng N, Schulman AB, Song LZ et al. Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F-box^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 2002, 146:703~709
- 6 王洪云, 黄剑, 赖钊等. 植物F-box蛋白质及其研究进展. *科学通报*, 2002, 47(12):891~895
- 7 Bai C, Sen P, Hofmen K et al. Skp1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 1996, 86:263~274
- 8 Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol*, 2000, 1(5):3002.1~3002.7
- 9 Andrade MA, Gonzalez-Guzman M, Serrano R et al. A combination of the F-box motif and kelch repeats defines a large *Arabidopsis* family of F-box proteins. *Plant Mol Biol*, 2001, 46:603~614
- 10 Schwob E, Bohm T, Mendenhall MD et al. The B-type cyclin kinase inhibitor P40^{Skp1} controls the G₁ to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 1994, 79:233~244
- 11 Carraano AC, Eytan E. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, 1999, 1:193~199

- 12 Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, 2002, 296 (5571):1254~1258
- 13 Gomi K, Sasaki A, Itoh H et al. GID2, an G-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberelin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J*, 2004, 37:626~634
- 14 Zhang S, Sandal N, Polowick PL et al. Proliferating folial organs (Pfo), a lotus japonicus gene required for specifying floral meristem determinacy and organ identity, encodes an F-box protein. *Plant J*, 2003, 33:607~619
- 15 Soners DE, Kim WY, Geng RS. The F-box protein AEITLUPE confers dosage-dependent control in the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell*, 2004, 16:769~782
- 16 McClure BA, Haring V, Ebert PR et al. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, 1989, 342:955~957
- 17 Lee HS, Huang S, Kao TH. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 1994, 367:560~563
- 18 Murfett J, Atherton TL, Mou B et al. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 1994, 367:563~566
- 19 Lai Z, Ma W, Han B et al. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol*, 2002, 50:29~42
- 20 Ushijima K, Sassa H, Kusaba M et al. Characterization of the S-locus region of almond (*Prunus dulcis*): analysis of a somaclonal mutant and a cosmid contig for an S haplotype. *Genetics*, 2003, 158:379~386
- 21 Entani T, Iwano M, Shiba H et al. Comparative analysis of the self-incompatibility (S) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells*, 2003, 8:203~213
- 22 Yamane H, Ikeda K, Ushijima K et al. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44 (7):764~769
- 23 Thompson RD, Kirch HH. The S-locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet*, 1992, 8:381~387
- 24 McCubbin AG, Kao TH. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16:333~364
- 25 Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2:169~178
- 26 Qiao H, Wang H, Zhao L et al. The F-box protein *AhSLF-S₂* physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 2004, 16:582~595
- 27 Qiao H, Wang F, Zhao L et al. The F-box protein *AhSLF-S2* controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, 2004, 16:2307~2322
- 28 Ushijima K, Yamane H, Watari A et al. The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J*, 2004, 39:573~586