

植物中的Dof 蛋白和Dof转录因子家族

郭晓芳 严海燕*

中国科学院武汉植物园, 武汉 430074

Dof Protein and Dof Transcription Factor Family in Plants

GUO Xiao-Fang, YAN Hai-Yan*

Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China

摘要 Dof (DNA binding with one finger)蛋白是植物所特有的一类转录因子。其N末端保守的单锌指Dof结构域是既与DNA又和蛋白相互作用的双重功能域,识别的核心序列是AAAG;其C末端氨基酸序列较为多变,是Dof蛋白的特异转录调控结构域。Dof类转录因子在植物中发挥着多种功能。拟南芥和水稻的Dof转录因子家族为Aa、Bb、Cc、Dd 4个同源基因群,同类群间可能具有相似或相反的功能。文章就这一问题的研究进展作了介绍。

关键词 转录因子; Dof; 单锌指结构

真核生物中,基因的转录通常受转录因子的调控。Dof (DNA binding with one finger)蛋白是植物所特有的一类转录因子,在果蝇、美丽线虫和酿酒酵母的基因组中尚未发现有dof基因的存在^[1]。它含有一个独特的富含Cys残基的单锌指保守结构域^[2],命名为Dof结构域。目前,已在多种单子叶植物和双子叶植物中发现了Dof蛋白^[2~13],在高等植物基因表达调控中起作用。本文简要介绍Dof蛋白和其研究进展。

1 Dof蛋白的结构、与DNA结合特性以及和其他蛋白的相互作用

1.1 结构 各种转录因子通常有一个比较保守的结构域与DNA结合,如亮氨酸拉链结构域、锌指结构域、hemeo结构域等^[14]。有的转录因子还包含有多个DNA结合结构域。例如,一些植物MYB蛋白[与DNA(GGTTTAG)_n或类似重复序列结合的蛋白]含有几个非完全重复的DNA结合结构域^[15];植物特异性的WRKY(其结构域含有非常保守的氨基酸序列WRKYGQK)转录因子也有不同数目的WRKY与DNA结合结构域,有人据此将WRKY蛋白分成几个亚类^[16]。与MYB蛋白和WRKY蛋白不同,Dof蛋白仅在其N末端有1个52个氨基酸组成的高度保守的Dof结构域,在此结构域中CX₂CX₂₁CX₂C基序形成一个单锌指结构,此单锌指结构中1个Zn²⁺与4个Cys残基共价结合(图1)。Zn²⁺和Cys残基对Dof蛋白的活性是必需的,二价离子螯合剂的存在以及对Cys残基的任何替换都

会使Dof蛋白失活,这已在多种Dof蛋白与DNA相互作用的研究中得到证明^[5,7,10,17]。此外,南瓜的Dof蛋白中两个芳香族氨基酸Tyr⁷³和Trp⁷⁴在南瓜Dof结构域中的位置分别与GATA1锌指蛋白和类固醇受体DNA识别螺旋中的Tyr和His以及两个Phe相同,都起着稳定Dof结构域结构的功能,因而对于南瓜的Dof蛋白与DNA的结合也是必需的^[13,17,18]。可以推测,不同Dof蛋白与DNA结合的Dof结构域中除了单锌指与DNA结合外,锌指旁边C侧链状结构中某些特定氨基酸也参与和DNA的结合,这些细微的变化有可能决定和不同的DNA序列的结合。Dof蛋白的转录调控结构域位于C末端,如玉米的ZmDof1的转录激活结构域是位于C末端的44个氨基酸残基^[19],其他Dof蛋白如拟南芥的OBP1、OBP2、OBP3和大麦的BPBF在C末端也有转录激活结构域^[9,20]。转录调控结构域的氨基酸序列较为多变,不具保守性,这与Dof蛋白功能的多样性是一致的。综上所述,Dof蛋白通常包含2个主要的结构域:一个位于N末端的保守的DNA结合结构域和一个位于C末端的调控结构域。在这两个结构域之间通常还有1个Ser骨架,可能作为分子铰链连接这两个

收稿 2004-12-07 修定 2005-03-07

资助 中国科学院创新基金启动经费(08025125)。

*通讯作者(E-mail: haiyan@rose.whio.ac.cn, Tel: 027-87617011)。

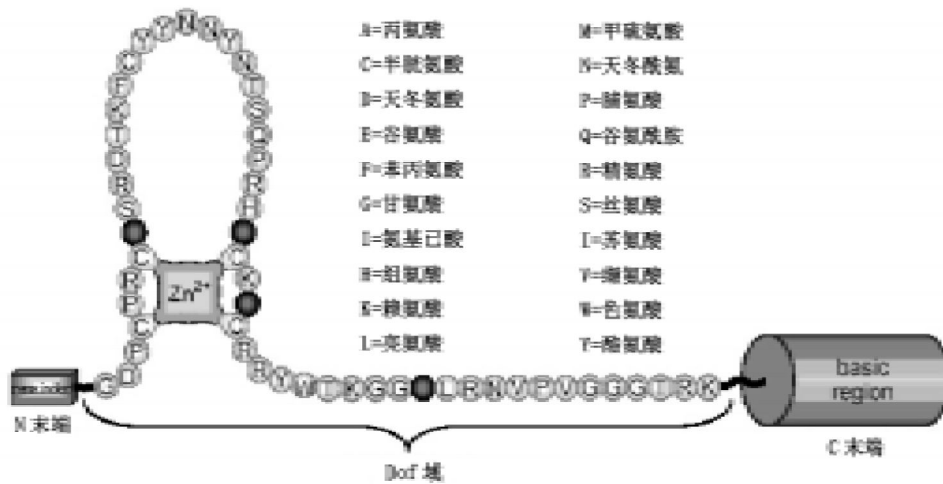


图1 Dof蛋白的基本结构

原图由德国 RWTH Aachen 大学生物第一学院 Markus Cavalari 提供 (未发表)。图中显示的是玉米 Dof1 (gi2130126) 和 Dof2 (gi2130124) 的氨基酸序列。在 N 末端 Dof 蛋白有一个高度保守的结构域, 而 C 末端的氨基酸序列则常多变。Dof1 和 Dof2 仅有 4 个氨基酸残基不同, 即黑色圆圈处。

结构域^[21]。

1.2 与 Dof 蛋白结合的 DNA 序列特异性 Dof 蛋白以其 Dof 结构域与不同的植物特异性基因的启动子相互作用, 在每一个 Dof 蛋白的 DNA 结合序列中均存在有 AAAG 序列^[4~6, 8~11, 22~24], 只有一个例外, 即南瓜中的 Dof 蛋白 AOBP 识别 AGTA 序列^[7]。Yanagisawa 等^[25]采用随机合成的 DNA 进行了结合位点选择实验, 并对玉米的 4 种 Dof 蛋白 (Dof2、Dof2、Dof3 和 PBF) 的 DNA 结合序列进行系统分析的结果表明, 所有能够和 Dof 蛋白结合的寡聚核苷酸均含有 AAAG 序列, 而且在这个序列上的任何单个突变都会取消 Dof 蛋白与 DNA 结合的特性, 这说明 AAAG 序列是 Dof 蛋白识别的核心序列。而在此核心序列之外的外侧序列对 Dof 的 DNA 结合特性也有一定的影响。如玉米的 Dof1 和 Dof2 蛋白与 C₄ 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 基因启动子上的 AAAAG 序列有很强的结合能力, 与 GAAAG 序列的结合能力较弱, 而与 CAAAG 序列则不能结合^[23]。此外, AAAG 的数目对 Dof 与 DNA 的结合能力也有影响: 2 个串联重复的 AAAG 基序表现出比 1 个 AAAG 基序约 2 倍高的 DNA 亲和力^[25]。但是, 外侧序列对 Dof-DNA 相互作用的影响是有限的, 仅在某种程度上影响二者的相互

作用。目前, 这方面的研究很少。其他的转录因子, 如蛋白-蛋白之间的相互作用以及转录后的修饰对 Dof 蛋白与其目标序列的特异性相互作用也有影响^[25, 26]。

1.3 Dof 蛋白与其他蛋白的相互作用 Dof 结构域是一个双功能的结构域, 它不仅介导与 DNA 的结合, 而且介导蛋白与蛋白之间的相互作用^[27, 28]。这种作用通常影响与 DNA 的结合, 有时 Dof 与其他转录因子通过与 DNA 的协同结合作用共同调节基因的转录^[26]。Zhang 等^[4]最先报道了这一蛋白与其它蛋白之间的相互作用, 如拟南芥的 Dof 蛋白 OBP1 就是通过其与 bZIP (basic leucine-zipper) 蛋白 OBF4、OBF5 的特异性相互作用而分离到的, OBP1 通过其 Dof 结构域可以促进 OBF 与 DNA 的结合^[6, 11]。另一个 Dof-bZIP 的相互作用例子是 PBF (玉米的一种胚乳特异性 Dof 蛋白) 与 O2 (玉米的一种 bZIP 蛋白, 参与胚乳特异性基因的表达) 之间的相互作用^[6]。此外, O2 在胚乳中的另一个靶启动子 cyPPDK 基因的启动子同时也是叶肉细胞中 ZmDof1 的靶目标^[24]。

Dof 结构域同样也介导 Dof 蛋白与其他类型的蛋白之间的相互作用, 如 Dof 蛋白与高流动性基团结合的染色质 (chromatin-associated high mobility group, HMG) 之间的相互作用, 不同 HMG 蛋白提

高 Dof 蛋白的 DNA 结合性的程度不同^[29, 30]。

不同家族的转录因子进行的复合调控可能是对转录因子在体外与体内作用有差异的一个比较合理的解释^[31]。Dof 结构域的双重功能可能有助于其在体内对靶基因的正确激活或抑制。而蛋白-蛋白之间的相互作用在转录调控中的真正意义还需要体内研究的证据。同样, 尽管在 Dof 结构域中存有保守的氨基酸序列, 但并不能说明是什么在决定着蛋白-蛋白之间的相互作用。

除了 Dof 结构域外, Dof 蛋白 C 端区域也是与其他蛋白作用的区域。与保守的 Dof 结构域不同, C 末端变化多样, 它很可能通过与不同类型调控蛋白或物质的反应, 受不同途径信号的调控而激活或抑制基因的转录。这种多样性可能是 Dof 功能多样性的基础之一, 也能够说明为什么同类 Dof 基因在同一类功能中起作用^[21]。

已经确定, 玉米 Dof1、拟南芥 OBP1~3、大麦 PBF 的转录激活区域定位于每个蛋白多变的 C 末端^[9, 19, 20]。玉米 Dof1 的转录激活区不仅作用于植物细胞, 也作用于动物和酵母细胞^[19]。大麦 PBF 和 SAD (scutellum and aleurone-expressed Dof) 还与动植物中均存在的 MYB 转录因子相互作用^[20, 32]。MYB 结合位点和 Dof 结合位点对 MYB 蛋白激活靶基因的转录都是必需的^[20], 表明靶基因转录的调控受多个调控因子的协同作用。

以上显示, 作为转录因子, Dof 蛋白不仅通过 Dof 结构域直接和 DNA 结合, 并在此区域还与其他调控因子或蛋白结合, 由调节与 DNA 的结合而调控基因的转录, 而且与许多转录因子一样, 在 C 末端专门有与其他蛋白或因子结合激活或抑制基因转录的区域。这些不同位点调控的组合可能是 Dof 蛋白功能多样性的结构基础。

2 Dof 蛋白的生物学功能

在多种植物特异性基因的启动子中都发现有 Dof 蛋白结合元件, 这表明 Dof 蛋白有多种功能, 参与植物多种生命活动的调控。玉米的 Dof1 是一系列光应答基因的调控元件, 包括 C₄ 植物的 PEPC 基因^[23, 24]; 玉米的 PBF 以及与其同源的大麦和小麦 PBF 转录因子控制胚乳特异性贮藏蛋白基因的表达^[6, 9]; 拟南芥 OBP1 在水杨酸和氧化胁迫信号的诱导下, 可调控植物防御基因的表达^[4, 22]; 拟南芥的

DAG1 和 DAG2 在种子萌发过程中起调控作用^[12]。此外, Dof 蛋白还参与调控植物激素应答基因的表达, 如烟草的 Dof 蛋白 NtBBF1 在顶端分生组织和微管组织中是生长素诱导表达的植物癌基因 *rolB* 的激活子^[5, 32]。Dof 蛋白也参与植物基因的负调控。一个典型的例子是, 南瓜的 Dof 蛋白 AOBP 结合到生长素诱导表达的抗坏血酸氧化酶基因启动子的沉默子区域后, 可抑制其表达^[7]。一些受赤霉素诱导的基因表达过程中也有 Dof 蛋白参与。例如, 水稻的 OsDof3 可能是种子萌发过程中赤霉素信号途径的一个组分^[10]。最近, 有人报道番茄中 Dof 蛋白参与保卫细胞特异基因的表达调控^[11]。尽管 Dof 蛋白的每一种功能还没有得到完全证实, 但它参与植物多种生命过程的调控是毫无疑问的(表1)。

表1 几种Dof蛋白的功能

Dof蛋白	Dof蛋白可能的功能	植物种类	参考文献
ZmDof1	调控光应答基因的表达	玉米	23, 24
PBF	控制胚乳特异性基因的表达	玉米	6
BPBF		大麦	8
WPBF		小麦	8
OBP1	参与植物的防御反应	拟南芥	4, 22
PsDof1		豌豆	3
DAG1	调控种子萌发	拟南芥	34
DAG2		拟南芥	12
NtBBF1	调控生长素应答基因的表达	烟草	5, 33
AOBP		南瓜	9
OsDof3	赤霉素信号途径的组分	水稻	10
StDof1	调控保卫细胞特异基因的表达	番茄	11

玉米 Dof1 在碳骨架合成中是关键性的调控因子; 它在拟南芥中过量表达可促进与碳骨架合成有关酶表达的增加, 一些氨基酸含量的提高和葡萄糖含量的减少, 转 Dof1 基因的拟南芥植株中氮含量提高 30%, 在低氮条件下拟南芥生长也可有所改善^[35]。Dof 蛋白的此类型特定调控功能, 为采用基因工程改良农产品品质和植物生长特性提供了可能。

3 Dof 转录因子家族的系统发育

了解 Dof 蛋白的进化情况有助于研究它的结构和功能。由于拟南芥和水稻的全基因组序列已经十分清楚, 所以目前对 Dof 转录因子家族的系统发育研究主要集中在这两种植物, 它们可分别

作为双子叶植物和单子叶植物的代表。根据拟南芥全基因组序列分析推断在其基因组中有 37 个 Dof 基因,但在 AtDof1.9 基因的 Dof 结构域中有一个中止密码子,因此有人认为是一个假基因。Lijavetzky 等^[36]将这 36 个 Dof 基因分为 A、B、C、D 4 个同源基因群或亚家族,其中 B、C、D 3 组又可根据内含子和 Dof 结构域之外的共同蛋白基序的有无进一步分成几个亚组,如 B1、B2、C1、C2.1、C2.2、C3 等。水稻的 Dof 转录因子家族包括 30 个 Dof 蛋白,采用与拟南芥同样的方法,水稻的 Dof 转录因子家族也可分为 a、b、c、d 4 组或 4 个亚家族。其中, c、d 两组又可分为 c1、c2、d1、d2、d3 几个亚组。为了研究 Dof 基因家族内部的进化关系,Lijavetzky 等^[36]将来自拟南芥和水稻的 66 个 Dof 蛋白综合起来绘制了一个进化树,整棵树的布局包括组和亚组的组织都与拟南芥和水稻各自的进化树很相似。这棵树上显示出可能的直系(直向)同源(orthologous)基因和并系(平行)同源(paralogous)基因以及可能的基因丢失事件^[36]。最近,分析基因组范围的结果表明,拟南芥的基因组可能起源于 10~20 亿年前的 4 次不同的大规模基因组重复(large-scale genome duplication)。显然,这种基因组的重复会导致 Dof 基因的大量扩增。例如,在系统发育树上相隔很近的 2 个 Dof 基因编码的 AtDof3.2 和 AtDof5.3 蛋白有顺序相同的 5 个保守区域,每个区域只有极少数氨基酸不同,表明这两个基因的产生就是基因组重复后变异的结果^[21]。目前,人们对基因扩增与功能的多样性之间关系知道的还很有限,但仍然可以预测,同一个亚组中的基因表现出重叠的或相关的功能,事实也的确如此。如 OsDof3 是一个在水稻种子萌发过程中受 GA 诱导而在其盾板和胚乳中特异表达的 Dof 基因,它与与胚乳发育相关的其他 Dof 蛋白(PBF、BPBF、WPBF)归为一组;拟南芥的两个关系非常密切的 Dof 基因 *DAG1* (AtDof3.7) 和 *DAG2* (AtDof2.5) 都参与种子萌发的调控,尽管它们的作用相反,但仍可归为同一个亚组^[22]。因此,研究 Dof 蛋白系统进化不仅可以揭示 Dof 基因的起源与分化,而且对预测其功能也有很大的帮助。

4 结束语

Dof 共同的单锌指结构为转录调控识别启动子

中的共有结构,其两侧不同类和亚类的保守序列很可能受各种网络信号调控和通过影响 Dof 蛋白的空间结构决定特异 Dof 位点识别的特异功能区,决定 Dof 识别的特异性和网络信号调控的特异性。所以,研究 Dof 蛋白各组 and 亚组中保守序列功能将不仅可为 Dof 家族基因的结构和功能勾勒出关键的轮廓图,也可为整个信号传递网络的研究积累资料。如果信号调控区域功能能够单独存在,而特定 Dof DNA 序列的 Dof 结合蛋白又是已知的,那么,还可以根据需要,人工组合新的 Dof 调控蛋白,为基因工程提供新的基因。

通过近年的研究,人们对 Dof 转录因子已经有了一定的认识。可以相信,随着基因组大规模测序技术以及比较基因组学的发展,其他植物中的 Dof 蛋白也将会陆续发现。采用插入突变、RNA 干扰(RNAi)以及转基因技术结合植物的表型分析,人们对 Dof 蛋白具体功能的认识将会更加深入。另外,采用基因瞬时表达分析、迁移率变动实验等手段,进一步阐明 Dof 蛋白调控功能也应是今后研究这一问题的方向之一。

参考文献

- 1 Richmann JL, Heard J, Martin G et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290: 2105~2110
- 2 Yanagisawa S. A novel DNA binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic Acid Res*, 1995, 23: 3403~3410
- 3 Nakamura N, Marutani M, Sanematsu S et al. Phylogenetic classification of Dof-type transcription factors in pea (*Pisum sativum*). *Plant Biotechnol*, 2003, 20(3): 247~252
- 4 Zhang B, Chen W, Foley RC et al. Interaction between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to *ocs* element promoter sequences. *Plant Cell*, 1995, 7: 2241~2252
- 5 De Paolis A, Sabatini S, De Pascalis L et al. A *rolB* regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *Plant J*, 1996, 10: 215~223
- 6 Vicente-Carbajosa J, Moose SP, Parsons RL et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interact with the basic leucine zipper transcription activator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7685~7690
- 7 Kisu Y, Ono T, Shimofurutani N et al. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39: 1054~1064
- 8 Mena M, Vicente-Carbajosa J, Schmidt RJ et al. An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved

- in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J*, 1998, 16: 53~62
- 9 Kang H-G, Singh KB. Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J*, 2000, 21: 329~339
- 10 Washio K. Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1520: 54~62
- 11 Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J*, 2001, 28: 455~464
- 12 Gualberti G, Papi M, Bellucci L et al. Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*, 2002, 14: 1253~1263
- 13 Shimofurutani N, Kisu Y, Suzuki M et al. Functional analysis of the Dof domain, a zinc finger proteins DNA-binding domain, in a pumpkin DNA-binding protein AOBP. *FEBS Lett*, 1998, 430: 251~256
- 14 刘强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用. *科学通报*, 2000, 45(14): 1465~1474
- 15 Jin H, Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB gene family. *Plant Mol Biol*, 1999, 41: 577~585
- 16 Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 199~206
- 17 Memura Y, Ishiduka T, Yamamoto R et al. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. *Plant J*, 2004, 37: 741~749
- 18 Kisu Y, Esaka M, Suzuki M. Putative zinc-binding domain of plant transcription factor, AOBP, is related to DNA-binding domains of steroid hormone receptors and GATA1. *Proc Jpn Acad*, 1995, 71(B): 288~292
- 19 Yanagisawa S. The transcriptional activation domain of the plant-specific Dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 813~822
- 20 Diaz I, Vicente-Carbajosa J, Abraham Z et al. The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activate endosperm-specific genes during seed germination. *Plant J*, 2002, 29: 453~464
- 21 Yanagisawa S. The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(12): 555~560
- 22 Chen W, Chao G, Singh KB. The promoter of an H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP-binding sites. *Plant J*, 1996, 10: 955~966
- 23 Yanagisawa S, Sheen J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1998, 10: 75~89
- 24 Yanagisawa S. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J*, 2000, 21: 281~288
- 25 Yanagisawa S, Schmidt RJ. Diversity and similarity among recognition sequence of Dof transcription factors. *Plant J*, 1999, 17(2): 209~214
- 26 Yanagisawa S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(4): 386~391
- 27 Mackay JP, Crossley M. Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23: 1~4
- 28 Cavalari M, Moller C, Offermann S et al. The interaction of DOF transcription factors with nucleosomes depends on the positioning of the binding site and is facilitated by maize HMGB5. *Biochemistry*, 2003, 42: 2149~2157
- 29 Yanagisawa S. Dof DNA binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions. *Eur J Biochem*, 1997, 250: 403~410
- 30 Krohn NM, Yanagisawa S, Grasser KD. Specificity of the stimulatory interaction between chromosomal HMGB proteins and the transcription factors Dof2 and its negative regulation by protein kinase Ck2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 2002, 277: 32438~32444
- 31 Singh KB. Transcription regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1111~1120
- 32 Isabel-LaMoneda I, Diaz I, Martinez M et al. SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds. *Plant J*, 2003, 33(2): 329~340
- 33 Baumann K, De Paolis A, Costantino P et al. The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the *roIB* oncogene in plants. *Plant Cell*, 1999, 11: 323~333
- 34 Papi M, Sabatini S, Bouchez D et al. Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev*, 2000, 14: 28~33
- 35 Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H et al. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(20): 7833~7838
- 36 Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. *BMC Evol Biol*, 2003, 3: 17~27