

研究通讯 Research Letter

植物新型肽类生长调节物质——植物磺肽素

陈新建* 杨艳会 陈军营 崔党群

河南农业大学农学院, 郑州 450002

A New Peptide Plant Growth Regulation Substance, Phytosulfokine (PSK)

CHEN Xin-Jian*, YANG Yan-Hui, CHEN Jun-Ying, CUI Dang-Qun

Department of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

提要 植物磺肽素是近年来在植物中发现的一种新的磺化短肽类生长调节物质。文章对植物磺肽素的发现及命名、生理作用、生物合成途径、作用机制及应用前景作了简要的介绍。

关键词 植物磺肽素; 生理效应; 生物合成

植物是否像动物那样存在着肽类生理活性物质, 一直是植物科学家感兴趣的问题。自1991年Pearce等^[1]从受伤的番茄叶片中分离出了一种由18个氨基酸组成的与植物伤害信号转导有关的系统素(systemin)之后, 才确信植物中确实存在着肽类生理活性物质。近年来, 已从多种植物中分离得到十多种肽类活性物质^[2], 它们调节着植物正常的生长发育。自1996年日本学者Matsubayashi和Sakagami^[3]发现并命名植物磺肽素(phytosulfokine, PSK)——一种短肽类活性物质至今, PSK由于其在许多方面具有植物生长调节物质的属性而引起广泛关注。本文就近几年PSK研究中取得的令人瞩目的成就作一简要介绍。

1 PSK的发现与命名

自20世纪80年代末, 有人在条件化培养基(conditioned medium, CM)中发现了能促进有丝分裂的“活性因子”, 并对其性质进行了描述。如在玉米细胞系中它是高度亲水的中性物质; 在胡萝卜细胞系中, 它是高度亲水的热稳定的物质^[3]。由于当时实验技术条件所限, 没能分离鉴定出CM中的活性因子。日本学者Matsubayashi和Sakagami^[3]在用石刁柏的叶肉细胞悬浮培养时, 发现植物细胞密度对培养细胞的分裂和增殖有很大的影响。在低于一定细胞密度时, 细胞不能分裂和增殖, 但当加入曾被使用过的所谓条件化CM培养基(即曾培养过一定的较高细胞密度的培养基)后, 会诱导植物单个细胞增殖。由此推测, CM

培养基中可能存在着某种能够刺激细胞分裂的“活性因子”。他们进一步研究表明: CM中的“活性因子”是热稳定的, 在链霉蛋白酶的作用下易分解, 初步判断此“活性因子”为肽类物质; 在糖苷酶的作用下很稳定, 说明此肽中没含糖侧链。在此基础上, 采用DEAE-Sephadex层析、高压液相色谱(HPLC)、质谱(MS)等技术从CM培养液中分离得到2种“活性因子”: 其一由5个氨基酸组成, 命名为植物磺肽素 α (phytosulfokine- α , PSK- α); 其二由4个氨基酸组成, 命名为植物磺肽素 β (phytosulfokine- β , PSK- β)。这两种多肽都含有2个酪氨酸(tyrosine), 且皆被硫酸磺化呈-Tyr-SO₃H结构, 形成磺化的酪氨酸残基, 其分子结构式分别为磺化的五肽[H-Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln-OH]和磺化的四

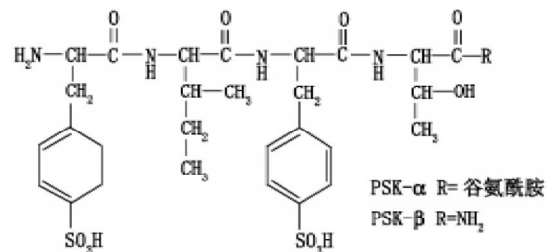


图1 PSK的分子结构

收稿 2005-01-21 修定 2005-08-01

资助 国家转基因植物及商品化专项基金(JY03-B-19-02)和河南省杰出人才创新基金(022100090)。

E-mail: xinjian1@yahoo.com, Tel: 0371-63978318

肽[H-Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-OH] (图1)。接着, Matsubayashi等^[4]从培养水稻细胞的悬浮培养液中提取了这类物质, 并鉴定其结构与起初在石刁柏的叶肉细胞中发现的PSK- α 和PSK- β 结构相同。在同一实验中, 他们用化学方法合成了PSK- α 和PSK- β , 并把化学合成的PSK加入到低密度植物细胞的培养液中, 发现植物细胞受到PSK的刺激而快速生长和增殖, 与石刁柏叶肉细胞CM培养基中的PSK的生理效应相同, 从而进一步证明PSK可以促进不同密度的植物细胞的生长和增殖。之后, 在玉米、胡萝卜、松树、番茄、石刁柏、水稻、烟草、鱼尾菊和日本柳杉等多种植物中发现PSK的存在。说明PSK广泛存在于不同植物中。

PSK作为“活性因子”, 普遍存在于单子叶植物和双子叶植物中。其类似物如磺化氨基酸、磺化二肽、磺化三肽、磺化四肽和在Tyr不同部位磺化的产物, 均不及PSK的活性^[5]。

沈世华和朱至清^[2]将PSK译为“植物硫素”。我们认为此译名值得商榷。其一, 植物硫素容易和植物营养元素——硫元素相混淆, 而不能表示为植物生长调节物质或植物激素; 其二, 此物质为四肽或五肽, 用“植物硫素”不能反映其肽的属性; 其三, 名词“硫化”和“磺化”在概念上有一定的差别, 一般认为, 在无机物上加“硫酸”为硫化, 在有机物上加硫酸为“磺化”, PSK显然为后者。鉴于此, 我们认为应翻译为“植物磺肽素”为妥, 所以本文均以“植物磺肽素”为phytosulfokine的中文名, 简称为PSK。

植物体内发现这样的短肽类生长调节物质, 是一个饶有兴趣的问题, 因为多年来植物学家一直在争论, 植物体内是否也存在着像动物肽激素那样的生理活性物质。继系统素等肽类生理活性物质发现之后, PSK的发现又进一步对这一问题给出了肯定的回答, 也为植物生长调节物质的研究开辟了一个新领域。

2 PSK的生理效应

PSK的研究尚处于起步阶段, 许多生理效应尚未验证。现就目前所取得的实验结果概述如下。

2.1 促进悬浮细胞生长和增殖 PSK最显著的生理效应是促进悬浮细胞的生长和增殖。Matsubayashi和Sakagami^[3]在石刁柏叶肉细胞悬浮培养时发现: 起始细胞密度对悬浮培养细胞的有丝分裂活动有很大影响, 当细胞密度为 4.0×10^4 个 \cdot mL⁻¹以下时, 细胞基本不能增殖。用 4.0×10^4 个 \cdot mL⁻¹作为起始细胞密度, 在含不同浓度CM的培养基中培养。由于CM中含有活性因子(PSK), 使原本由于细胞密度不够而不能增殖的细胞具有了生长和增殖能力, 且随着CM含量的增加而有丝分裂能力增强。采用HPLC等技术, 可以计算出所添加的CM中PSK的含量。由于此反应的专一性和灵敏性, 使之成为一种有效的PSK生物鉴定技术。通过这种方法测试, 发现CM培养基中的PSK- α 最小作用浓度为 10×10^{-9} mol \cdot L⁻¹, ED₅₀为 3.8×10^{-9} mol \cdot L⁻¹; PSK- β 最小作用浓度为 1.0×10^{-8} mol \cdot L⁻¹, ED₅₀为 3.7×10^{-8} mol \cdot L⁻¹。Matsubayashi等^[4]用浓度为 10^{-8} mol \cdot L⁻¹的PSK- α 培养的水稻原生质细胞也同样受到强烈地刺激而增殖。

2.2 促进导管分化和胚性细胞形成 Matsubayashi等^[6]发现, 在PSK的最适作用浓度为 10^{-9} mol \cdot L⁻¹时, 可以促进鱼尾菊叶肉细胞导管的分化。Hanai等^[7]在胡萝卜的组织培养中, 加入PSK可以明显地促进体细胞胚的形成。Igasaki等^[8]发现, 在有聚乙二醇(PEG)存在的情况下, PSK可以加速日本柳杉胚性细胞的发育进程并强烈地刺激体细胞胚的形成。由PSK诱导所形成的体细胞胚可以正常地分化出子叶、胚轴、根和幼苗。

2.3 调节花粉的群体效应 Chen等^[9]把不同密度烟草花粉粒进行悬浮培养时, 发现花粉萌发的频率随着花粉粒密度的增加而增大。当花粉细胞密度低于 625 粒 \cdot mL⁻¹时, 花粉几乎不能萌发。当在不能萌发的低密度的花粉培养液中加入CM培养液(来自花粉粒的密度 1×10^4 粒 \cdot mL⁻¹培养12 h的培养基)时, 花粉萌发量显著增多。用酶联免疫吸附技术可以测定出所用的CM培养液中PSK- α 的浓度为 4×10^{-10} mol \cdot L⁻¹。这表明PSK- α 在花粉群体效应中起调节作用。

2.4 提高植物的耐热性 Yamakawa等^[10]用PSK- α 处理拟南芥幼苗时, 发现在高夜温下, 处理过的

幼苗叶片生长势与未做处理的有明显差异。在夜间高温条件下处理的叶片和常温下的叶片生长势相同, 而未做处理的拟南芥的生长势明显减弱。用 PSK 的类似物, 磺化的酪氨酸和别的植物细胞分裂素处理时, 高温下绿叶的生长势均不及 PSK 处理的效果。这说明 PSK 不仅能促进细胞增殖, 而且还可增强植物的耐热性。

3 PSK的生物合成

为了探寻 PSK 的基因, Yang 等^[11]构建了 10 天龄水稻幼苗的 cDNA 文库。根据 PSK 的氨基酸的序列, 推测并合成了 96 种寡聚核苷酸(15 个)序列, 并用同位素 ³²P 标记的这些寡聚核苷酸作为探针, 在文库中筛选阳性克隆。得到的阳性克隆经过测序找到了水稻 PSK 前体物的基因——*OsPSK*。*OsPSK* 的 cDNA 中共有 725 个碱基对, 其中 5' 端非编码区有 16 个 GA 重复, PSK 的前体物含有 89 个氨基酸, 分子量为 9.8 kD, 等电点为 6.48。在它的 N 末端是一个由 22 个疏水氨基酸残基组成的可以解离的肽段, 此肽段具有明显的信号肽的特征。PSK- α 产生在其前体物序列内近 C 末端的位置上。他们进一步分析表明: *OsPSK* 含有 2 个外显子和 1 个内含子, 氨基酸的 80~84 个残基为 PSK- α 序列, 位于第 2 个外显子的 -COOH 末端的第 5 个氨基酸残基处。在其 cDNA 序列的上游, 有几个内在的调控因子, 包含 1 个 CAAT- 盒、3 个 CCAAT- 盒、1 个类似增强子核心序列和 3 个 E- 盒。用其上游序列的不同长度与报告基因(*GUS*)融合构建了植物表达载体。转化水稻后, 测定 *GUS* 的活性时见到, 在距转录起始点 1.9 kb 处报告基因表达达最高水平。PSK 前体物基因的启动子为组成性表达, 并且强度明显超过 CaMV35S。

Yang 等^[12]曾在拟南芥中克隆出 4 个 PSK 基因(*AtPSK*)。最近, 在 GenBank 已有小麦、石刁柏、拟南芥、芸薹、日本柳杉、茄属、玉米、高粱、松树、松叶菊、树棉、大豆、红花菜豆、胡萝卜和鱼尾菊等多种植物中 PSK 前体物的基因序列登录。测序结果表明不同植物中 PSK 基因序列差异性较大。

在动物细胞中, 蛋白质翻译后酪氨酸 O- 位的磺化是非常普遍的现象。催化这一反应的是酪氨酸酰蛋白磺基转移酶(tyrosylprotein sulfotransferase,

TPST)。Hanai 等^[13]根据动物中的研究结果, 建立了植物 TPST 的体外研究系统。根据水稻 PSK 前体物的基因序列, 人工合成了十四肽作为酶作用的底物, 以植物不同膜组分作为酶源加入上述分析系统中, 结果发现: 在水稻、石刁柏、胡萝卜微粒体膜组分表现出 TPST 活性。在 PSK 五肽两端的酸性氨基酸(均为天门冬氨酸)残基在 Tyr 磺化中起关键作用。他们还进一步研究发现, 石刁柏的 TPST 是一个膜结合蛋白, 定位于高尔基体上, 其最适 pH 值范围较宽, 在 7.0~8.5 范围内都有活性, 在锰离子存在时表现出最大活性。TPST 作为一种新型植物磺基转移酶, 在植物中尚属首次发现, 这也为植物体内蛋白质翻译后修饰的研究增加了新的内容。

在 PSK 前体物的氨基末端有一个疏水 22 个氨基酸的信号肽, 这一信号肽在动物活性肽和动物肽激素中广泛存在, 而目前在植物中已鉴定出的信号肽仅有 4 种: 系统素、PSK、CLAVATA3 和 SCR/SP11^[14]。信号肽 PSK 前体物也可能像动物肽激素那样为内肽酶分解, 其细节还不清楚。实验证明 PSK- β 来源于 PSK- α 的外肽酶降解。其整个生物合成的轮廓途径大致如图 2 所示。

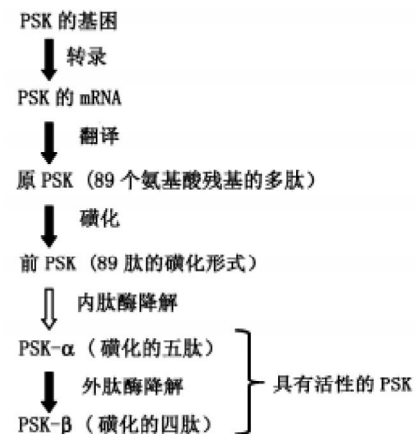


图 2 PSK 的生物合成途径^[11~14]

白色箭头表示尚未研究的领域。

4 PSK的作用机制

4.1 PSK 受体 为了深入研究 PSK 的作用机制, Matsubayashi 和 Sakagami^[15]分别用水稻细胞、胡萝卜细胞和烟草(BY-2)细胞进行培养, 并提取其细胞质膜, 作为实验材料, 用化学合成放射性同

位素标记 ^{125}I -PSK- α 的类似物(^{125}I -AS-PSK- α)作为激素供体,把 ^{125}I -AS-PSK- α 加入到水稻质膜提取成分中,经过温育后用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离质膜蛋白。在所测试的3种植物中都发现了120和160 kD特定的蛋白质结合谱带。测定其亲和力得出这两种蛋白的表现 K_d 值分别为5.0和5.4 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用 ^3H 作为放射性同位素标记的PSK- α 处理胡萝卜、玉米、芦笋和番茄质膜细胞发现时也有受体蛋白存在,说明PSK受体普遍存在于高等植物中。

Matsubayashi等^[15,16]用亲和层析的方法从胡萝卜微粒体部分中提纯到一个分子量为120 kD的膜蛋白。此蛋白可以和PSK特异地结合,其cDNA编码一个1021个氨基酸残基的受体激酶。此酶由胞外(extracellular)富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeat, LRR)部分、1个跨膜的结构域和1个胞质激酶结构域组成。其中,在胞外富含亮氨酸的重复序列部分含有21个LRR首尾相接的序列,每个LRR又有24个氨基酸残基。在第18个LRR中另含有一个36个氨基酸的相对独立的结构域。这一结构域也存在于油菜素内酯(BR)受体BRI1中,且是受体作用的关键部位。将此激酶在胡萝卜中超量表达,会使转基因的愈伤组织在PSK存在的情况下生长加快,同时,与放射性同位素标记 ^3H -PSK- α 的结合位点大量增加,从而证明PSK和这一受体激酶为一配体-受体对。

PSK与受体结合时并不是每个部位都同等重要。Matsubayashi和Sakagami^[3,15]用PSK- α 的类似物与受体结合的研究结果表明:PSK- α 的-COOH末端的2个氨基酸残基在PSK与受体结合时不起作用,而起关键作用的是 NH_2 端磺化的三肽,且第1个磺化的酪氨酸Tyr1比第2个磺化的酪氨酸Tyr3的作用更大,未磺化的酪氨酸没有活性。由此也可以看出,PSK的活性部位位于 NH_2 端磺化的三肽上。

4.2 PSK与IAA和CTK之间的关系 为了研究PSK的生理活动是否受IAA和CTK的影响,Matsubayashi等^[17]建立了竞争性酶连接免疫吸附分析体系。他们把石刁柏叶肉细胞悬浮培养在含有 α -萘乙酸和6-苄基嘌呤的培养基溶液中,48 h后有PSK- α 的产物发现,96 h后细胞才分裂。这说明

细胞分裂是在PSK- α 出现之后才进行的。但当培养基中去掉这两种植物激素的任何一种时,PSK- α 的含量大大下降。他们同时用一个荧光染料和微密度计量方法测定了由PSK- α 启动的细胞循环进程。当把石刁柏叶肉细胞从活体中取出时,细胞处于 G_0/G_1 ,只有在培养基溶液中同时存在 α -萘乙酸、6-苄基嘌呤和PSK- α 三因子时,细胞循环进程才能启动。这些结果表明,PSK- α 的产生和生物活性的表达与生长素和细胞分裂素调节的信号传递途径密切相关。

在培养悬浮细胞时,即使在IAA/CTK充足的条件下^[17],细胞脱分化的相对速率也受细胞密度严格控制,这说明在此途径中还存在着其他的胞内信号。在细胞悬浮培养液中,浓度为 $10\times 10^{-9}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PSK,可以克服由于细胞密度不一所造成的细胞分裂相对速率的差异。据此认为,PSK显然就是这种胞内的信号,或者是其中的一种。在 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平的浓度下,PSK可以和IAA/CTK一起调节植物细胞的脱分化和再分化。由此可见,PSK与IAA和CTK间的关系是复杂的,尚待进一步研究。

5 PSK的应用

由于植物细胞的增殖受到起始细胞密度的严格控制,在起始细胞密度较低的愈伤组织或悬浮培养细胞的繁殖与保存一直是一个棘手的问题。例如,在某些植物转基因时,经抗生素严格筛选后所存活下来的少量的转基因细胞的增殖与分化十分困难,从而影响转基因技术的应用。Matsubayashi等^[18]在用农杆菌介导胡萝卜胚轴基因转化时,于选择性培养基中加入 $10^{-8}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSK后的结果表明:转基因细胞的恢复力从未经转基因细胞的7%增加到39%,恢复能力提高了5倍。在用PSK的处理中,大多数细胞分化,并形成正常的幼苗、子叶和根,最终长成植株。这是植物磺胺素PSK首次成功地应用于转基因技术领域,由于PSK在转基因时有特殊的生理作用,作者形象比称之为“化学护理”(chemical nursing)。

6 结语

近几年来,日本Matsubayashi研究小组对PSK连续做了大量的工作,取得了可喜的成就,已经初步显示出PSK有植物磺胺类激素的属性。由

于PSK的研究还刚刚起步, 因此尚未引起广泛关注。虽然先后在玉米、胡萝卜、番茄、石刁柏、水稻、烟草、鱼尾菊和日本柳杉等植物中已经发现其存在, 但还不足10种, 因此, 就其广泛性上受到人们的质疑, 而且, 目前PSK的工作仅限于日本学者Matsubayashi的研究小组, 尚未见到其它实验室的工作。因此, 对PSK的认知仍需大量发掘与验证。植物体内是否普遍存在PSK或其类似生长调节物质? 它们是否是植物生长发育过程中所必需的? 在植物细胞生长和增殖中是否起主导作用? 它通过怎样的生理机制引起细胞生长和增殖? PSK前体基因表达是如何调控的? 前体物的磺化处理 and 内肽切割是怎样进行的? PSK的运输途径又是为何? 这一系列问题都待进一步研究。

值得注意的是, 蛋白质的磺化在动物中是普遍存在的, 磺化是TPST催化下进行的, 磺化后的蛋白质与分子识别有关。在植物中, 蛋白或短肽的磺化目前仅发现此1例, 催化这一反应酶的研究还刚刚起步, 仅测到活性, 而对其蛋白及其基因的分离鉴定尚未见报道。植物磺化反应的广泛性、意义和机制也可能成为今后植物生理与分子生物学领域中研究热点之一。

参考文献

- Pearce G, Strydom D, Johnson S et al. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase-inhibitor proteins. *Science*, 1991, 253: 895~898
- 沈世华, 朱至清. 新型植物生长调节物质——激素性多肽的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16: 648~652
- Matsubayashi Y, Sakagami Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 7623~7627
- Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13357~13362
- Bahyrycz A, Matsubayashi Y, Ogawa M et al. Plant peptide hormone phytosulfokine (PSK- α): synthesis of new analogues and their biological evaluation. *J Pept Sci*, 2004, 10: 462~469
- Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N et al. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *Plant Physiol*, 1999, 120: 1043~1048
- Hanai H, Matsuno T, Yamamoto M et al. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 27~32
- Igasaki T, Akashi N, Ujino-Ihara T et al. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 1412~1416
- Chen YF, Matsubayashi Y, Sakagami Y. Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta*, 2000, 211: 752~755
- Yamakawa S, Matsubayashi Y, Sakagami Y. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63: 2240~2243
- Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K et al. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13560~13565
- Yang H, Matsubayashi Y, Nakamura K et al. Diversity of *Arabidopsis* genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. *Plant Physiol*, 2001, 127: 842~851
- Hanai H, Nakayama D, Yang H et al. Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine *O*-sulfation of prophytosulfokine variants *in vitro*. *FEBS Lett*, 2000, 470: 97~101
- Matsubayashi Y. Ligand-receptor pairs in plant peptide signaling. *J Cell Sci*, 2003, 116: 3863~3870
- Matsubayashi Y, Sakagami Y. 120- and 160-kDa receptors of endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine- α , in rice plasma membranes. *J Biol Chem*, 2000, 275: 15520~15525
- Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A et al. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science*, 2002, 296: 1470~1472
- Matsubayashi Y, Morita A, Matsunaga E et al. Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine- α , in stimulation of asparagus cell proliferation. *Planta*, 1999, 207: 559~565
- Matsubayashi Y, Goto T, Sakagami Y. Chemical nursing: phytosulfokine improves genetic transformation efficiency by promoting the proliferation of surviving cells on selective media. *Plant Cell Rep*, 2004, 23: 155~158