

植物的生长素结合蛋白

吴顺 萧浪涛* 鲁旭东

湖南农业大学植物激素重点实验室, 长沙 410128

Auxin-binding Proteins in Plants

WU Shun, XIAO Lang-Tao*, LU Xu-Dong

Key Laboratory of Phytohormones, Hunan Agricultural University, Changsha 410128

提要 就植物中分离出的多种生长素结合蛋白, 及其在植物体内的分布、分子结构和在生长素信号转导中的有关作用的研究进展作了介绍。

关键词 生长素结合蛋白; 分布; 信号转导

广泛存在于高等植物中的生长素类物质对植物生长发育有调节作用。为探讨生长素作用的原初过程, 寻找生长素受体已成为研究的热点之一。许多研究表明, 已发现的生长素结合蛋白(auxin-binding proteins, ABP)通过生长素调节过程中的信号转导途径, 参与生长素调节的植物生长发育过程; 其在细胞中的含量既关系到细胞的相对生长, 又直接影响细胞对生长素的敏感性。近年来, ABP研究已取得了较大的进展, 人们已从许多植物细胞中分离出了高纯度的ABP, 并对其结构、在植物细胞内的分布和功能作了较为深入的研究。本文就这方面的研究进展作简要介绍。

1 在植物体内的分布

ABP包括ABP-I(位于内质网膜上, 即ABP1)、ABP-II(可能位于液泡膜上)、ABP-III(位于质膜上)以及生长素运输抑制剂*N*-1-naphthylphthalamic acid (NPA)和2, 3, 5-三碘苯甲酸(TIBA)的结合蛋白(一般称为NPA结合蛋白, 位于质膜上)4类^[1, 2], 在植物细胞内广泛分布。细胞质膜、内膜系统和细胞核中都发现了ABP1的存在, 内质网是ABP1的主要分布场所, 细胞质中也发现了可溶性ABP1^[3]。Klämbt^[4]、Löbner和Klämbt^[5]认为玉米胚芽鞘的ABP定位于质膜外侧。Zettl等^[6]则在拟南芥的微粒体和质膜小泡中分离得到了一个分子量为24 kD的ABP。Diekmann等^[7]发现玉米的ABP1主要存在于内质网的内腔。Napier^[8]报道, 细胞核上存在有分子量为65 kD的ABP分子, 在细胞质中也发现有ABP的分布, 其分子

量有15、25、31、47、60 kD不等。

ABP在植物体内的分布与植物的生长部位有关。Shimomura和Watanabe^[9]用免疫组织化学技术研究玉米胚芽鞘中ABP的含量, 证明玉米胚芽鞘中ABP定位于表皮上。高启祥等^[10]观察烟草花梗薄层材料的结果表明, ABP1主要集中分布于表皮及亚表皮1~2层细胞内, 在皮层细胞中也有分布, 但后者含量明显低于前者, 并且皮层细胞中ABP1主要分布于细胞近膜区域, 说明ABP1在皮层细胞中的分布有差异性, 其分布是微区域化的。

质膜外侧存在ABP现已较为明确, 但大量的ABP则是存在于内质网中, 且ABP可以某种方式分泌到质膜和细胞壁上^[11]。玉米胚芽鞘的ABP主要分布在内质网的片层上, 而外源ABP也能调控依赖生长素的原生质体膜电位的变化。这些细胞内的ABP是如何起作用的? 对此, Cross^[12]提出了ABP可以透过细胞膜的循环假说。这个假说认为, 当与生长素反应时, ABP从内质网上被释放出来, 经过分泌途径到达细胞表面, 结合在细胞表面的某些位点上, 然后通过内吞作用返回到内质网。高浓度的生长素能加速ABP在内质网和细胞表面的循环。在ABP分泌过程中, 如果细胞壁的前体物质与它相互作用, 就可能对细胞壁的

收稿 2003-05-20 修定 2003-10-22

资助 教育部留学生基金 [1999(363)]。

* 通讯作者 (E-mail: ltxiao@hunau.net, Tel: 0731-4635261)。

合成进行调控。在细胞表面, ABP 可以调控维护膜电势的相关酶的活性。所有这些反应都是生长素调控生长的组成部分。这个假说能较好地解释 ABP 在细胞不同部位的分布, 而且并不排斥其它信号转导机制, 特别是基因调控机制, 但这一假说还有待进一步验证。

2 结构与性质

随着对 ABP 研究的不断深入, 人们发现, 从各种不同种类植物体中提取得到的 ABP 在分子组成上具有较大的同源性, 但其性质却不尽相同。目前研究得较多的是来自玉米、拟南芥和天仙子等的 ABP。

2.1 组成与分子结构 蛋白质的组成和分子结构是决定蛋白质生物活性的基础, 它主要通过其构象的变化来行使它的生物学功能。现有的研究发现, 各种植物的 ABP 基因结构相似, 编码的前体蛋白都具有主要的功能性结构序列。在氨基末端有一疏水信号序列, 利于 ABP 在内质网膜间的穿透和转移, 起信号转导作用; 在羧基末端的 KDEL 四肽结构则使得 ABP 定位于内质网中的特定区域^[13]。从拟南芥内质网片层结构上分离得到 ABP 的 1 个 cDNA, 具有一个 594 个碱基的阅读框, 预测其氨基酸序列长度为 198 个氨基酸残基, 分子量为 22.044 kD, N 末端具有 33 个氨基酸残基的疏水性信号序列。体外研究表明, 成熟蛋白由 165 个氨基酸残基组成, 分子量为 18.641 kD^[14]。Zettl 等^[6]分离得到的 1 个拟南芥 ABP cDNA 克隆, 预测其氨基酸序列包括 212 个氨基酸残基, 相对分子量为 24.128 kD。Brown 和 Jones^[15]的研究认为, ABP1 是一个同型二聚体糖蛋白, 其亚基由 163 个氨基酸残基组成。用含光亲和标记的 5-N-[³H]-3-IAA 共价标记生长素结合位点内部或邻近氨基酸残基, 标记后的 ABP1 用胰岛素完全消化, 所得到的多肽用反相高效液体层析进行纯化。当 5-N-[³H]-3-IAA 浓度达到 0.5 mmol·L⁻¹ 时, 仅有 1 个多肽被专一性地标记, 而这个标记过程又可被 50 mmol·L⁻¹ 的 IAA 所阻碍, 表明这种相互作用是专一性的。序列分析表明, 第 134 位的天冬氨酸残基是光标记的专一性位点, 而第 136 位的色氨酸残基则可能是生长素芳香环的疏水性结合位点。玉米的 ABP1 则由 3 个组氨酸残基和 1 个谷氨酸残基组成 1 个结合部位, 内含 1 个金属阳离子, 这

个部位极其疏水。在第 2 和第 5 位的半胱氨酸残基间还有 1 个二硫键。当生长素结合到这个部位时, 羧酸酯与金属离子结合, 而芳香环则与第 151 位的色氨酸残基等疏水性氨基酸残基结合^[16]。David 等^[17]对 ABP1 羧基末端高度保守的氨基酸残基作定点突变时, 发现第 177 位的半胱氨酸残基、第 175 位的天冬氨酸残基和第 176 位的谷氨酸残基是 ABP1 折叠和在质膜上起作用的重要残基, ABP1 构象变化引发质膜信号传递。

2.2 理化性质 ABP 的功能发挥与外界条件有关。Schiavo 等^[18]报道, 在 pH 4.0~6.5 范围内, ABP 在 pH 5.5 时对 IAA 的结合量最大。玉米芽膜上提取纯化的 ABP 对生长素的亲和力在 pH 5.6 时, 亲和力最大; 而 pH 6.0 以下则不稳定^[19]。用免疫胶体金技术研究时发现, 玉米胚芽鞘原生质体 ABP 对温度有依赖性, 对生长素则有专一性^[7]。

也有研究表明, ABP 具有酶的活性。Bilang 等^[20]分离纯化的无芒天仙子 (*Hyoscyamus muticus*) 的可溶性 ABP 中部分氨基酸序列与烟草 (ParB) 和玉米 (GT32) 的谷胱甘肽转移酶 (GST) 序列具有高度的同源性和有很高的 GST 活性, 说明 ABP 可能是 GST。从拟南芥中克隆到的 ABP 的 1 个 cDNA, 其预测的蛋白质序列与 GST 具有类似结构。它在大肠杆菌中表达后, 其抽提液有很高的 GST 活性, 且具有底物专一性^[6]。另外, 生长素结合的 GST 大量存在于天仙子根和茎中, 少量存在于叶和花芽中, IAA 或萘乙酸对其稳定态 mRNA 没有影响, 但 2,4-D 和 2,3-二氧苯氧基乙酸能增加 mRNA 水平。因而推测 2,4-D 是作为 GST 的底物, IAA 则是结合在细胞内配体结合蛋白位点而起作用的^[21]。

3 在生长素信号转导中的作用

一般认为, 植物体内生长素的信号转导必须通过生长素与质膜上的 ABP 结合, 然后通过生长素-蛋白复合物与膜内受体蛋白相互作用, 将信号转换为受体结合位点的物理化学状态的改变, 这种变化再通过膜上的某些信号转换系统将信号放大, 使外界信号透膜而进入细胞内^[22], 最终引起植物体内的各种生理生化反应。

3.1 受体功能 ABP 具有生长素受体的功能。存在于内质网中的 ABP 很可能是作为生长素受体同生长素一起调节植物体的生长发育过程^[5, 23]。

Steffens等^[24]研究拟南芥和玉米ABP (AtERabp1和ZmERabp1) 抗原决定簇的抗体对生长素作用的影响观察到, 随着作用于AtERabp1羧基末端抗体的增加, 拟南芥胚轴原生质体对生长素的反应逐渐被抑制; 而随着作用于生长素结合域的抗体的增加, 则诱导产生的是类似于生长素处理引起的增长反应。人工合成的ZmERabp1羧基末端多肽也能引起类似的玉米胚芽鞘原生质体增长反应。这表明, 引起原生质体增长的生长素信号是通过细胞外的ABP1识别的。Löbler和Klämbt^[5]发现, 生长素诱导的玉米胚芽鞘生长能够被ABP免疫球蛋白抗体所抑制, 同时, 胚芽鞘分裂时的生长素反应也大大减弱。拟南芥ABP1 cDNA在转基因烟草离体叶中诱导表达后细胞体积变大, 而完整植株中ABP1诱导表达后, 细胞体积也变大, 且叶片形态正常。玉米中ZmERabp1诱导则是通过增加细胞数量来响应生长素的调节反应的。ABP1上有一个寡肽区域可能是结合生长素的位点。抗该区域的单克隆抗体可以在无生长素的条件下模拟生长素直接与ABP1的生长素结合位点作用, 诱导气孔张开, 降低保卫细胞内pH值。人工合成的ZmERabp1羧基末端的12个残基(Pz152~163)多肽也能诱导保卫细胞碱性化, 引起气孔关闭。上述结果表明, ABP是作为生长素受体参与依赖生长素的生理反应过程, 进而调控植物生长发育的^[25, 26]。

3.2 与质膜超极化的关系 生长素引起的质膜超极化与ABP有关。ABP参与质膜对生长素的识别过程, 它能从质膜外侧激活生长素的信号转导途径。Leblanc等^[27]用拟南芥ABP和类似于ABP羧基末端的人工合成多肽与烟草原生质体相互作用, 发现两者都可以引起原生质体的超极化反应。Ephritikhine等^[28]研究生长素敏感性改变的烟草突变体的质膜超极化特性的结果表明, ABP1抗体可以降低生长素诱导的跨膜电位的改变(生长素诱导的质膜超极化特性), 且随着抗体浓度的增加, 跨膜电位变化减小。倪迪安等^[29]以转ABP基因烟草为材料, 研究ABP基因转移与生长素诱导的烟草原生质体质膜超极化特性、原生质体培养过程中对生长素的敏感性三者之间的关系。结果表明, 转正义ABP基因烟草达到最大超极化的NAA浓度小于对照, 原生质体培养中对生长素的敏感

性增加; 而转反义ABP基因烟草达到最大超极化的NAA浓度则大于对照, 原生质体培养中对生长素的敏感性降低。以上表明, ABP参与质膜的超极化反应过程, 并与生长素诱导的植物生物学效应密切相关。

3.3 与组织器官分化的关系 通过将外源拟南芥ABP基因转入柑橘及烟草获得表达后, 可以改变植株自身的生长素作用效果和它对生长素的敏感性, 说明生长素在不同植物体内对生长发育的作用效果各不相同, 而且受相应的ABP基因控制^[13]。外源生长素在浓度低或很低时可能促进成花, 在浓度较高时则往往明显抑制成花。有研究表明, 黄瓜子叶培养物成花时, 花原基形成前后子叶柄内源IAA水平有剧降的趋势。pH 7.0处理后, 黄瓜子叶柄中内源游离IAA水平显著下降。pH 7.0处理之所以能促进成花, 推测可能是促进了ABP基因表达而引起子叶柄中内源IAA水平下降之故^[30]。高启祥等^[10]在营养芽不同分化时期细胞的原生质体中加入兔抗草莓ABP1抗体后置于4℃下过夜, 次日用CPW液充分洗涤后将原生质体转入与异硫氰酸荧光素耦联的羊抗兔抗体缓冲液中, 于37℃下保温1 h, 洗涤、封片后用激光共聚焦扫描显微镜进行断层扫描。结果发现, 在培养5、10、15、20 d的细胞中ABP1的荧光明显强于对照, 不仅在膜及近膜区域, 而且是在整个胞质内部都有较强的荧光, 表明细胞分化旺盛期ABP1的表达量明显增加。细胞分化后期(20 d以后), 原生质体中ABP1含量减少, 其荧光强度与培养前薄层细胞原生质体中荧光强度又趋接近。可见, 在细胞分化过程中ABP1含量呈动态变化, ABP1相对含量与细胞分化程度密切相关。在烟草花梗不同细胞中的ABP1分布不同, 在细胞分化过程中ABP1的表达量也有差异, 这表明ABP1与细胞分化有明显的联系, ABP1积极参与细胞分化过程。张洪霞等^[31]报道, 正义和反义ABP基因转入烟草后, 能明显影响烟草再生植株的开花、结实和内源IAA水平。表明ABP基因的表达状况有可能影响内源游离IAA水平, 以致影响成花。

3.4 对阳离子通道的调控 细胞质中进行着频繁的生化反应, 离子内环境要保持稳态。细胞是如何保持细胞质离子浓度的稳态的? 除了细胞区室化外, 还需要通过质膜、液泡膜中存在的具有蛋白

质性质的离子运转体来调节离子的内流和外流。ABP₅₇ 是一个具有受体功能的ABP, 它能直接激活质膜上H⁺-ATPase。IAA与ABP₅₇ 主结合部位结合后, ABP₅₇ 构象发生变化, 于是ABP₅₇ 与质膜上H⁺-ATPase的亲合力显著增加^[32]。Thiel等^[22]用玉米ABP1表面结构域的人工合成多肽, 研究其对缺失生长素的蚕豆保卫细胞生长素相关的K⁺通道活性的影响, 结果表明, 只有ABP1羧基末端的多肽才具有活性, 它主要激活外流的K⁺通道, 而对内流的K⁺通道似乎没有作用。同时, 蚕豆保卫细胞经荧光染料标记后, 用双波长激光共聚焦扫描显微镜扫描时发现, ABP1羧基末端的多肽能引起胞质迅速碱化, pH值变化幅度达0.4 ± 0.1, 且这一过程是可逆的。这表明, 玉米生长素-ABP复合物中的ABPzml羧基末端域与胞质pH变化相耦联, 并存在一个相关联的胞内信号级联系统。Millner等^[33]采用人工合成的5 mmol·L⁻¹ ZmABP1羧基末端12个残基的多肽(A6.1)处理蚕豆保卫细胞后, 发现其可引起内流的K⁺通道呈可逆性关闭。Baully等^[34]将ABP羧基末端的KDEL四肽结构分别突变成HDEL、KEQL和KDELGL肽链结构, 并将它们分别转入烟草后, 得到大量不同的转基因烟草株系。分析这些不同形式的ABP与生长素结合的动力学的结果表明, 它们的动力学曲线与经过纯化的玉米ABP和生长素结合的动力学曲线基本一致。同时, 他们把转基因烟草的完整保卫细胞固定在双管微电极上研究生长素调控的生理反应时, 发现K⁺流动依赖于生长素的变化。外源生长素亦能调节质膜中K⁺的通过, 且这一过程与生长素浓度有关。各种转基因烟草植株中ABP1的过量表达均会大大增强植株对生长素的敏感性。这表明, 烟草保卫细胞中K⁺通道对生长素的敏感性至少是部分受ABP1的调控的。

4 结束语

ABP在生长素作用机制研究中, 特别是ABP定位的研究中有很重要的地位, 是阐明作用机制的关键。近几年来, ABP的研究已取得较大进展, 不但从植物细胞中分离出了多种高纯度的ABP, 掌握了其作用的初步实验证据, 而且较深入地研究了ABP cDNA的克隆、结构和表达, 这些为以后进一步研究生长素受体及其

信号转导途径提供了理论基础。但仍有许多问题尚未得到全面认识。已经证明, 多种ABP分别参与生长素信号转导途径, 但对这些蛋白的胞内定位、活性和编码基因表达的精细调控还有待进一步研究, 特别是对ABP如何控制生长素调控植物生长发育的过程的研究尚处于起步阶段。目前对ABP的研究主要集中在拟南芥、玉米和天仙子等几种植物, 今后应扩大植物的研究范围, 以明确ABP的分布、结构和功能。另外, 一般认为, 生长素受体位于细胞质膜上, 而大量的ABP却分布在内质网上, 两者之间的关系也待研究。考虑到植物体内在长期进化过程中发展和形成了一套完整的信号转导系统, 各信号系统之间彼此相互作用, 因此ABP调控的信号转导与其它信号转导间的联系尚待验证。总之, 随着分子生物学和遗传学的发展, 寻找新的突变体和采用基因工程技术从分子和细胞两个水平上研究ABP及其参与的信号转导过程, 将会进一步增加人们对生长素作用机制及其对植物生长发育调控的分子机制的认识。

参考文献

- 1 Chen JG, Ullah H, Young JC et al. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev*, 2001, 15(7):902~911
- 2 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1999. 429
- 3 倪迪安, 许智宏. 生长素的生物合成、代谢、受体和极性运输. *植物生理学通讯*, 2001, 37(4):346~352
- 4 Klämbt D. A view about the function of auxin-binding proteins at plasma membranes. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(6):1045~1050
- 5 Löbler M, Klämbt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Location of a putative auxin receptor. *J Biol Chem*, 1985, 260(17):9854~9859
- 6 Zettl R, Schell J, Palme K. Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-³H] indole-3-acetic acid: Identification of a glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:689~693
- 7 Diekmann W, Venis MA, Robinson DG. Auxin induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:3425~3429
- 8 Napier RM. Towards an understanding of ABP1. *J Exp Bot*, 1995, 46:1787~1795
- 9 Shimomura S, Watanabe S. Auxin receptors in plasma membrane. *Membrane*, 1993, 18:34~42
- 10 高启祥, 李颖章, 刘淑兰. 烟草薄层培养生长素结合蛋白ABP1的定位和ABP1在细胞分化中的变化. *植物学报*, 2001, 43(10):1018~1023
- 11 Johns AM, Herman EM. KDEL-containing auxin-binding pro-

- tein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol*, 1993, 101:595~606
- 12 Cross JW. Cycling of auxin-binding protein through the plant cell: pathways in auxin signal transduction. *New Biol*, 1991, 3(8): 813~819
- 13 谢永红, 张云贵, 甘霖等. 生长素结合蛋白基因克隆及在柑桔中的表达效应研究. *西南园艺*, 2002, 30(2):1~4
- 14 Palme K, Hesse T, Campos N et al. Molecular analysis of an auxin-binding protein gene located on chromosome 4 of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1992, 4(2):193~201
- 15 Brown JC, Jones AM. Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein I. *J Biol Chem*, 1994, 269(33):21136~21140
- 16 Woo EJ, Marshall J, Baully J et al. Crystal structure of auxin-binding protein I in complex with auxin. *EMBO J*, 2002, 21(12): 2877~2885
- 17 David K, Carnero-Diaz E, Leblanc N et al. Conformational dynamics underlie the activity of the auxin-binding protein, Nt-abp1. *J Biol Chem*, 2001, 276(37):34517~34523
- 18 Schiavo FL, Filippini F, Cozzahi F et al. Modulation of auxin-binding protein in cell suspensions. I. Differential response of carrot embryo cultures. *Plant Physiol*, 1991, 97:60~64
- 19 Shimomura S, Sotobayashi T, Futai M et al. Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *J Biochem*, 1986, 99(5):1513~1524
- 20 Bilanz J, Macdonald H, King PJ et al. A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione S-transferase. *Plant Physiol*, 1993, 102(1):29~34
- 21 Bilanz J, Sturm A. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiol*, 1995, 109(1):253~260
- 22 Thiel G, Blatt MR, Fricker MD et al. Modulation of K⁺ channels in *Vicia* stomatal guard cell by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(24):11493~11497
- 23 Leblanc N, David K, Grosclaude J et al. A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 1999, 274(40):28314~28320
- 24 Steffens B, Feckler C, Palme K et al. The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J*, 2001, 27(6):591~599
- 25 Alan M. Jones, Kyung-Hoam I, Michael A et al. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein I. *Science*, 1998, 282:1111~1117
- 26 Gehring CA, McConchie RM, Venis MA et al. Auxin-binding-protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH. *Planta*, 1998, 205(4):581~586
- 27 Leblanc N, Perrot-Rechenmann C, Barbier-Brygoo H. The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. *FEBS Lett*, 1999, 449(1):57~60
- 28 Ephritikhine G, Barbier-Brygoo H, Muller JF et al. Auxin effect on the transmembrane exhibiting a differential sensitivity to auxin. *Plant Physiol*, 1987, 83:801~804
- 29 倪迪安, 王凌健, 许智宏等. 转正义和反义abp基因烟草原生质体膜超极化特性及其培养. *中国科学(C辑)*, 1998, 28(5): 393~397
- 30 杜勤, 姜维梅, 梁海曼等. 黄瓜子叶培养物的花芽分化和ABP基因表达间的关系. *浙江大学学报(理学版)*, 2000, 27(4): 459~463
- 31 张洪霞, 白永延, 许智宏. 生长素结合蛋白cDNA的克隆及其在烟草中的表达. *植物生理学报*, 1997, 23(2):111~116
- 32 Kim YS, Min JK, Kim D et al. A soluble auxin-binding protein, ABP₅₇, purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem*, 2001, 276(14): 10730~10736
- 33 Millner PA, White IR, Groarke DA et al. Novel strategies to an auxin-evoked transport control. *Symp Soc Exp Biol*, 1994, 48: 203~213
- 34 Baully JM, Sealy IM, Macdonald H et al. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. *Plant Physiol*, 2000, 124(3):1229~1238