

植物肽类生长因子——植物硫肽激素- α

谢秀祯^{1,2,*} 林俏慧¹ 郭勇¹

¹华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640; ²海南师范学院生物系, 海口 571158

The Phytosulfokine- α , a Peptide Growth Factor Found in Plants

XIE Xiu-Zhen^{1,2,*}, LIN Qiao-Hui¹, GUO Yong¹

¹College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Science and Technology, Guangzhou 510640; ²Department of Biology, Hainan Normal College, Haikou 571158

提要 植物硫肽激素 α (phytosulfokine- α , PSK- α)是一个硫酸酯化的五肽,最初是从石刁柏叶肉细胞培养物的条件培养基中分离到的。它是在植物中发现的第一个肽类生长因子,在很低浓度下就能强烈地刺激低密度培养的植物细胞的增殖。此外,它还能促进植物细胞分化、器官发生和体细胞胚发生。由于它有分布的广泛性和极低的作用浓度,因此越来越受到人们的关注。该文介绍PSK- α 的发现、生理功能、基因的结构特点、前体的结构与加工、基因转化与表达、受体以及研究前景。

关键词 植物硫肽激素; 细胞增殖; 肽类生长因子

生物活性多肽是生物体内一种非常重要的物质,它以信号的形式调控着细胞的各种生理活动。在动物、细菌和酵母中,多肽作为激素、信息素和生长因子已得到广泛而深入的研究。可是,在植物中调控植物生理活动的植物激素,即目前国际公认的五大激素(生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯)以及茉莉酸和油菜素甾体类(BR_s),都是小分子有机化合物,以致长期以来人们一直认为在植物中不存在多肽类和蛋白质类激素。直到1991年, Pearce 等报道了一种与植物伤害信号转导有关的系统素(systemin)后,才确信植物中也存在多肽类激素。此后,人们借助分子生物学、分子遗传学和细胞生物学的方法,又先后在多种植物中分离到系统素、植物硫肽激素- α (phytosulfokine- α , PSK- α)和早期结瘤素(early nodulin 40, ENOD 40)等3类具有信号转导功能的内源寡肽^[1]。这些肽类生理活性物质的发现,突破了人们长期以来对植物激素化学本质认识的局限性,给植物生理学的研究留下了巨大的空间,同时也宣告一个新兴的研究领域——植物多肽信号转导——的诞生。植物硫肽激素- α 是第一种在植物中受到鉴定的肽类生长因子,它是一个硫酸酯化的五肽分子,能促进植物培养细胞,特别是低密度培养的植物细胞快速增殖,因而引起了人们的极大关注。

1 PSK- α 的发现

许多年来,人们已经知道游离的植物单细胞在进行悬浮培养时,其有丝分裂活性和分裂速率严格依赖于细胞的起始密度。当细胞起始密度低于 10^3 个 $\cdot L^{-1}$ 时,细胞不能分裂和增殖,但通过添加从快速生长的、高密度培养细胞的培养液中制备的条件培养基(conditioned medium, CM),便可诱导低密度培养细胞迅速增殖。同样,在用固体平板进行植物单细胞培养时,要想使单细胞分裂形成细胞团,植板细胞密度必须大于最低有效密度($10^4 \sim 10^5$ 个 $\cdot L^{-1}$),通过在新鲜培养基中加入条件培养基或者采用看护培养技术可以克服植板细胞密度的限制。由此,人们认为在条件培养基中存在一种或若干种促细胞分裂因子。可是,多年来尽管许多生理学家和生物化学家作了种种努力,试图在不同的培养系统中寻找和鉴定这种(些)因子,但由于缺乏一种足够灵敏的测定方法,故一直没有检测到这种(些)促细胞分裂因子。

1996年, Matsubayashi 和 Szkagami^[2]建立了一个灵敏的生物分析系统。在这一系统中,采用低密度的石刁柏(*asparagus*)叶肉细胞检测由高密度植物培养细胞释放出来的促细胞分裂因子。最

收稿 2004-02-09 修定 2004-06-28

* E-mail:xiexiuzhen@sina.com, Tel:020-85294413

后, 他们成功地从由石刁柏叶肉细胞培养液制备的条件培养基中鉴定到两种促细胞分裂因子, 并测得它们的结构为硫酸酯化的五肽 PSK- α [Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln]和四肽 PSK- β [Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr]。此后, 人们又陆续在水稻、玉米、胡萝卜和拟南芥等^[3~6]细胞培养液的条件培养基中鉴定到 PSK- α 。这些结果表明, 来自不同植物的 PSK- α , 其氨基酸序列是完全保守的。

2 PSK- α 的生理功能

PSK- α 和 PSK- β 都能刺激低密度培养的植物细胞增殖, 尽管 PSK- α 在条件培养基中的含量不到 PSK- β 的 20%, 但它的活性比 PSK- β 强得多。在石刁柏叶肉细胞培养系统中, PSK- α 表现出促细胞分裂活性的最低浓度为 1.0 nmol·L⁻¹, 而 PSK- β 为 10 nmol·mL⁻¹^[13]。在水稻、胡萝卜单细胞悬浮培养的过程中, 添加 PSK 后也得到同样的效果。在 PSK- α 的五肽分子中, N 末端的三肽片段是活性中心, 两个硫酸基团对于 PSK- α 表现其生物活性都是至关重要的。另外, 有实验证明 PSK- α 的产生通常要求有生长素和细胞分裂素同时存在, 因此, PSK- α 生物活性的表达与生长素和细胞分裂素介导的信号转导途径密切相关^[7]。

PSK- α 除了促进植物细胞增殖以外, 还能促进细胞分化^[4], 增加体细胞胚胎发生率^[5,8], 诱导愈伤组织侧根和侧芽形成^[9], 促进幼苗生长, 提高叶绿素含量^[10]。

3 PSK 基因及其结构特点

第一个完整的 PSK 基因(*OsPSK*)是从水稻细胞中提取出来的^[11], 它在基因组中只有 1 个拷贝, 由 2 个外显子(245 和 463 bp)和 1 个大内含子(1150 bp)组成, 具有一个非常保守的 GT-AG 内含子边界序列。第一个外显子包括 5' 端非编码区和 PP-PSK 约一半的编码区, 即这个前体 89 个氨基酸残基中的前 48 个, 包括起始氨基酸(甲硫氨酸); N 末端一个 22 个氨基酸的疏水区也包含在第一个外显子内。第二个外显子由 3' 端非编码区和 PP-PSK 其余的 41 个氨基酸残基的编码区组成。在这个区域内, 在紧靠 C 末端的位置, PSK- α 五肽序列只出现一次。分析的结果表明 *OsPSK* 基因 5' 上游区特性, 在 -68~-63 位点上有一个 TATA 盒(TATAA), 转录起始点就在其下游 62 核苷酸处(定为 +1)。

Yang 等^[6]用 BLAST 程序和 PSK- α 的结构域序列从拟南芥的基因组数据库中搜索表达序列标签(EST)时, 发现拟南芥基因组中有 4 个 PSK 基因, 它们分别存在于第 1、第 2、第 3 和第 5 条染色体上, 这揭示拟南芥基因组中存在一个编码 PSK 前体的基因家族。分析其中 2 个 PSK 基因(即 *AtPSK2* 和 *AtPSK3*)的结构特性的结果显示, *AtPSK2* 基因和 *AtPSK3* 基因全长分别为 686 和 698 bp, 分别编码 87 和 79 个氨基酸的 PSK- α 前体。两者在结构上与 *OsPSK* 基因非常相似, 都是由 2 个外显子和 1 个内含子组成。在编码的氨基酸序列中, N 末端都有一个 21~22 氨基酸的疏水区, PSK- α 五肽序列也只是在紧靠 C 末端的位置上出现一次且其本身及两侧的氨基酸序列都非常保守。但它们的内含子及 PSK- α 前体的大小不同, 整个前体肽的氨基酸序列以及内含子的序列也没有明显的相似性。

4 PSK- α 前体的结构及加工

尽管不同 PSK 基因的大小和编码的氨基酸序列不同, 但在 PSK 前体的 N 端都有一段疏水性的、由 21~22 个氨基酸组成的前导肽, 在靠近 C 端只有一个五肽 PSK- α 序列, 在 PSK- α 左右两侧都有与加工有关的天冬氨酸残基和碱性氨基酸残基。PSK- α 序列及紧靠它 N 端的 3 个氨基酸残基在已知的 PSK 前体中都是完全保守的。已经证明这 8 个氨基酸(HTDYIYTQ)区域对于 Tyr 的硫酸酯化有作用, 对 PSK 前体的翻译后修饰以及 PSK- α 的产生最为关键, 因此这个氨基酸区域被称为 PSK 结构域。

肽类激素和其他生物活性肽通常都是由前体经过加工而成的。因此人们推测 PSK 前体蛋白质(PP-PSK)也像动物前激素原一样, 通过其 N 端信号肽引导穿越内质网膜分泌到胞外空间, 在分泌过程中信号肽被切除。至于 PP-PSK 如何加工成 PSK- α , 还有待进一步研究。

在动物细胞中, 蛋白质酪氨酸硫酸酯化是一种普遍存在的翻译后修饰作用, 这种修饰作用往往会影响到酪氨酸蛋白质的生物活性(如缩胆囊肽)。PSK- α 是第一个从高等植物中分离到的具有硫酸酯化酪氨酸的肽。未硫酸酯化的 PSK- α 既没有与配基竞争性结合的活性也没有促细胞分裂活性^[3]。PSK- α 的硫酸基在与受体结合以及诱导受体分子发生变化以启动靶分子内的生理功能中发挥

作用^[12]。因此酪氨酸硫酸酯化对 PSK- α 表现其生物活性很重要。Yang 等^[13]的实验证明, 在胡萝卜细胞的微体膜上有酪氨酸蛋白磺基转移酶活性, 而这个酶的活性与它在 PSK 前体分泌前的硫酸酯化的作用是一致的。这些结果提示, 植物中可能普遍存有酪氨酸蛋白磺基转移酶, PP-PSK 被酪氨酸蛋白磺基转移酶硫酸酯化的机制可能与动物系统中的作用机制类似。

5 PSK 基因在转化细胞中的表达

Yang 等^[13]用带肌动蛋白启动子的有义和反义 *OsPSK* 基因转化水稻细胞的结果表明, PSK- α 和 PSK- β 在有义转化子的条件培养基中的积累量是对照的 1.6 倍, 而 PSK- α 和 PSK- β 在反义转化子条件培养基中的量要低于对照平均水平的 60%。当检测基因表达对细胞增殖的影响时, 发现有义转化子细胞的分裂速度比野生型细胞(对照)快 2 倍左右, 而反义转化子细胞则比野生型细胞慢得多。通过向培养基补充 PSK- α , 可以部分(38%~64%)弥补这种活性^[14]。他们用拟南芥做同样的实验也得到类似的结果^[6]。这些数据显示, PSK 基因是通过它的产物 PSK- α 促进植物细胞分裂的。

用 RNA 印迹分析检测到 PSK 基因在水稻 *Oc* 培养细胞和拟南芥培养细胞中的表达是组成型的, 其表达谱与 PSK 分泌到条件培养基的积累曲线以及细胞的增殖谱相吻合, 细胞分裂的最大速率发生在移植后第 7~10 天, 说明促进细胞迅速增殖的 PSK- α 的供应是连续不断的。RT-PCR 技术分析已经证明 *OsPSK* 基因在整个水稻苗期都在表达, 但 PP-PSK mRNA 在根尖和茎尖部位(细胞分裂最活跃的部位)含量最丰富。另外, 用 Northern 杂交也都检测到 *AtPSK2* 和 *AtPSK3* 基因在拟南芥中的转录产物。这表明 PSK- α 在完整植株中也会产生并发挥其生理作用, PSK- α 促进植物细胞增殖不仅在体外而且在体内也是重要的^[14]。

6 PSK- α 的受体

PSK- α 是一种在植物细胞脱分化和增殖中发挥关键作用的细胞间信号分子。它作为自分泌型生长因子发挥作用, 调节植物细胞的脱分化和增殖; 通过与其受体之间的相互作用激活基因, 进而促进细胞增殖。Matsubayashi 等^[3]已经证明 PSK- α 受体的存在。他们用 ³²S 标记的 PSK- α 进行结合分析的结果显示, 在悬浮培养的水稻细胞表面存在高亲和力的特异性饱和结合位点。这些

位点位于细胞质膜上, 每个细胞的最大结合位点数约为 10^4 个。这种结合的表现 K_d 值为 $1.4 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 这不仅与 PSK- α 的生理作用浓度相一致, 同时也与诱导 50% 游离细胞分裂的 PSK- α 浓度相近。此外, 用 [³²S]PSK- α 和几个人工合成的 PSK- α 类似物所做的竞争试验说明, 只有那些具有促细胞分裂活性的 PSK- α 类似物才能置换放射性 PSK- α 。可见, 在水稻细胞质膜上的确存在与 PSK- α 高度亲和性结合位点, 而且这种结合是特异的、饱和的、竞争性的和可逆的。在石刁柏、玉米、烟草、番茄和胡萝卜培养的细胞质膜部分也检测到这种特异性结合^[15]。这些结果暗示植物细胞增殖过程中涉及到一个受体介导的信号转导途径^[3]。后来, Matsubayashi 和 Sakagami^[16]通过光亲和和交联分析证明水稻细胞质膜上有 PSK- α 受体存在, 并推定它们是分子量为 120 和 160 kD 的糖蛋白, 糖链大小约为 10 kD。他们又采用基于配基的亲合层析法从胡萝卜 NC 细胞的微体部分纯化到一个 120 kD 的膜蛋白, 其相应的 cDNA 编码一个 1021 个氨基酸的受体激酶, 后者具有几种动物和植物激素受体(如 BRI1、CLV1)的一些特点, 即含有 1 个 N 端疏水信号序列、若干个胞外富含亮氨酸重复区(LRR)、1 个转膜结构域和 1 个细胞质激酶结构域。为了确定此种受体激酶是不是功能性 PSK- α 受体的组分, 他们分析了此种蛋白质对膜上 PSK- α 结合活性的影响, 结果显示, 此种蛋白的 cDNA 在胡萝卜有义转化细胞中的超量表达能对 PSK- α 作出应答而提高愈伤组织的生长速度(与对照相比)。与此相反, 反义链的表达则大大地抑制愈伤组织的生长。另外, 采用竞争结合分析比较几种 PSK- α 类似物的相对结合亲和性鉴定 PSK- α 结合活性特异性的结果显示, 未标记的 PSK- α (具有较强的生物活性)强烈抑制 [³H]PSK- α 结合到有义转化细胞膜上, 活性较低的 [1-4]PSK 抑制的程度也较低, 而没有活性的类似物 [2-5]PSK 则一点也不抑制。这个受体激酶对 PSK- α 有这样高的特异性和亲和性充分说明它就是与 PSK- α 直接结合的功能性受体的一个组分, 也就是说, PSK- α 和这个受体激酶是一个配基-受体对^[17]。所有这些都表明 PSK- α 是通过一个类似于哺乳动物的肽激素和生长因子的奇特信号转导途径促进植物细胞增殖的。

7 结束语

尽管近年来有关PSK- α 和PP-PSK的研究已经取得了许多重要的成果, 但仍有许多问题尚待阐明。如PP-PSK是否包含有更多的活性肽? PP-PSK的生物合成、区室化、修饰、加工和转运的详细情况是怎样的? PSK- α 受体是否具有一个胞内催化激酶结构域? 胞内信号转导机制是如何牵涉到该激酶的? 此外, 虽然已有资料表明PSK- α 的生理作用与细胞分裂和分化有关, 但它的作用机制、信号转导途径以及它与其他激素的关系和它在调节发育过程中的作用都还有待进一步探究; PSK基因在完整植株中的作用模式也需要通过在植物中实施反遗传操作方法给予解答。可以相信, 随着研究的不断深入, 有关这个活性多肽的更多奥秘将会得到揭示。这不仅使植物细胞信号转导的研究空间得到拓展, 而且还将加深人们对植物一些生理现象的认识。例如, 在分子水平上阐明PSK- α 及其受体在信号转导过程中的作用机制, 将对植物全能性的研究产生影响, 也有助于揭示植物中配基-受体相互作用机制; 进一步克隆和分析PSK- α 受体基因将为研究PSK促进植物细胞增殖以及它与其他信号系统和植物激素之间的关系提供一个比较有效的方法。在应用中, 通过构建PSK基因的转化细胞或植株, 可望克服现有植物单细胞培养技术的不足, 植物细胞株的培养和筛选将变得更加容易, 从而推动植物细胞育种技术的发展。

参考文献

- Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H et al. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(7): 825~830
- 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(15):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
- 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(1):27~32
- 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
- Matsubayashi Y, Matsunaga E, Furuya A et al. Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine- α , in stimulation of asparagus cell proliferation. *Planta*, 1999, 207(4):559~565
- Kobayashi T, Eun C, Hanai H et al. Phytosulfokine- α , a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *J Exp Bot*, 1999, 50(336):1123~1128
- Yang G, Shen S, Kobayashi T. Stimulatory effects of a novel peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α , on the adventitious bud formation from callus of *Antirrhinum majus*. *Plant Biotechnol*, 1999, 16(3):231~234
- Yamakawa S, Matsubayashi Y, Sakagami Y et al. 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(12):2240~2243
- Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H et al. Molecular cloning and characterization of *OsPSK*, a gene encoding a precursor for phytosulfokine- α , required for rice cell proliferation. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(5):635~647
- Matsubayashi Y, Hanai H, Hara O et al. Active fragments and analogs of the plant growth factor, phytosulfokine: structure-activity relationships. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(1):209~214
- Yang H, Morita A, Matsubayashi Y et al. A rapid efficient system of *Agrobacterium* infection-mediated transient gene expression in rice Oc cells and its application for analysis of the expression and antisense suppression of prephytosulfokine, a precursor of phytosulfokine- α , encoded by *OsPSK* gene. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(6):811~816
- 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(9): 13560~13565
- Matsubayashi Y, Sakagami Y. Characterization of specific binding sites for a mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma-membrane fraction derived from *Oryza sativa* L. *Eur J Biochem*, 1999, 262:666~671
- Matsubayashi Y, Sakagami Y. 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine- α , in rice plasma membranes. *J Biol Chem*, 2000, 275(20):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(5572): 1470~1472