

植物蛋白负调控因子

尹锐, 柴友荣*

西南大学农学与生物科技学院, 农业部生物技术与作物品质改良重点实验室, 重庆市作物品质改良重点实验室, 重庆市油菜工程技术研究中心, 重庆 400716

Plant Protein Negative Regulators

YIN Rui, CHAI You-Rong*

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement of Ministry of Agriculture, Chongqing Key Laboratory of Crop Quality Improvement, Chongqing Rapeseed Engineering Research Center, Chongqing 400716, China

摘要: 介绍植物蛋白负调控因子的调控机制, 它们在激素调节、生长发育尤其是花器官形成、抗病性和耐逆性中的作用, 以及在激素信号、光敏色素信号、抗病信号、耐逆信号转导途径中的定位和作用的分子机制研究进展。

关键词: 植物蛋白; 负调控因子; 信号途径; 生长发育; 抗病性; 耐逆性

植物生长发育和对环境做出反应需要基因表达的精细调控, 它是由转录因子调节的。过去这方面多集中于植物转录正调控因子的研究, 现在植物负调控因子也开始受到重视, 部分已得到克隆, 甚至其功能机制也有一些阐明。

1 植物蛋白负调控因子的调控机制

1.1 通过基本转录复合物的作用阻止转录 有以下看法, 认为: (1)在转录过程中, 抑制子对 RNA 聚合酶的 C 端域(C-terminal domain, CTD)进行糖基化和去磷酸化, 在延伸过程中则对 CTD 在时空上进行变换修饰; (2)抑制转录起始复合物的成分如 TATA 盒结合蛋白(TATA-box binding protein, TBP)与 DNA 的结合; (3)抑制通用转录因子(general transcription factors, GTFs)间的相互作用, 如结合到 TBP 上, 阻止其他转录因子在启动子处的组装; (4)间接作用, 即结合到启动子上游的 DNA 高亲和位点, 招募更多的抑制子结合到 TATA 盒附近的 DNA 低亲和位点上, 阻止转录因子 IID (transcription factor IID, TFIID)结合到 TATA 盒 (Gaston 和 Jayaraman 2003)。

1.2 通过消除转录激活因子的作用进行转录抑制 激活子的功能可在很多水平上受抑制子的影响, 如核定位、与 DNA 的结合、刺激转录起始的能力 (Herschbach 和 Johnson 1993)等。一般认为可以通过以下几种方式进行: (1)占据了激活子在 DNA 上的结合部位而阻碍了激活子的结合; (2)与激活子发生相互作用而形成复合物, 使其不再具有与

DNA 结合的能力(Gaston 和 Jayaraman 2003); (3)与激活子相互作用, 阻断激活域的活性; (4)以类似辅助激活子的形式与激活子的激活域结合, 阻断激活子与其目标之间的作用(Liu 等 1999); (5)通过对激活子或辅助激活子的翻译后修饰、调节激活子的细胞内定位等方式抑制转录。

1.3 通过改变染色体结构进行转录抑制 基因沉默一般与异染色质相关, 可以通过染色体折叠使基因位于异染色质区来实现转录抑制(Schwechheimer 和 Bevan 1998)。

1.4 通过蛋白泛素化实现负调控 与蛋白质的产生及其翻译后的修饰一样, 蛋白质的降解对植物的代谢和生长发育也起调节作用。许多负调控因子可通过泛素蛋白酶体途径降解目的基因的转录激活子, 泛素化过程中泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素蛋白连接酶(E3)依次行使功能。E1 激活泛素分子, 并将激活的泛素连接到 E2 上。E3 识别目标蛋白, 通过直接作用将 E2 和目标蛋白在空间上拉近, 促进 E2 将泛素转移到目标蛋白; 另一种方式是 E2 将泛素转移到含有 HECT (homologous to E6-AP C-terminus)结构域的 E3 上, 再用 E3 为供体, 将泛素结合到目标蛋白上。泛素化过程如此循环下去, 泛素化水平即逐步提

收稿 2007-10-30 修定 2008-01-18

资助 国家自然科学基金(30771237)和国家“863”项目(2006AA10Z110)。

* 通讯作者(E-mail: chaiyourong1@163.com)。

高, 目标蛋白也就运输到26S蛋白酶体中进行降解。

1.5 蛋白磷酸化/去磷酸化与转录调节 蛋白质磷酸化是细胞信号传递系统的组成部分, 在生命活动中扮演重要角色; 其逆反应是去磷酸化, 对于保持磷酸化信号的平衡十分重要。某些负调控因子可被蛋白磷酸化激活, 进而行使负调控功能, 如番茄AGC家族(依赖cAMP的蛋白激酶A、依赖cGMP的蛋白激酶G、依赖磷脂的蛋白激酶C)蛋白激酶成员Adi3的磷酸化可抑制植株依赖丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK)的坏死部位的形成(Devarenne等2006)。而某些蛋白通过自身的去磷酸化也可以行使负调控功能, 如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径的灭活是通过许多蛋白磷酸脂酶TXY基序的去磷酸化介导的。蛋白激酶2C(PP2C)是一类具有多种功能的蛋白磷酸酶, 在生物界许多逆境诱导的MAPK途径中充当负调控因子, 在调节由环境胁迫如冷害、干旱、损伤等激活的信号通路中起作用。磷酸脂酶MP2C、ABI2和AtP2CHA有相似的激活酪蛋白功能, 但只有MP2C能够去磷酸化并抑制盐胁迫诱导的MAPK信号途径(Meskiene等2003; Schweighofer等2004; 胡晓丽和李德全2007)。

2 植物蛋白负调控因子与植物激素调节

2.1 负调控因子与ABA信号途径 ABA抑制种子萌发, 对ABA不敏感的突变体*abi*和ABA超敏感的突变体已得到鉴定。*ABI1*和*ABI2*基因编码同源的2C型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶, 是ABA信号途径的负调控因子, 且它们在种子形成与休眠、叶片蒸腾期间的功能并不相互冗余(Leung和Giraudat 1998; Gosti等1999)。*ABI3*和*ABI5*均编码转录因子, 而*ABI3*是*ABI5*适当表达所必需的(Giraudat等1992; Finkelstein和Lynch 2000)。*ABI3*蛋白不稳定, 能够与含有一个RING结构域的AIP2蛋白作用, RING结构区的C₂₃₀、C₂₃₁是AIP2蛋白E3连接酶活性必需的。AIP2能结合*ABI3*的B2+B3结构域, 结合能力较与*ABI3*的A1+B1结构域的结合能力强, 但却只泛素化后者。促进AIP2的表达会导致*ABI3*蛋白水平下降, AIP2 RING突变体的*ABI3*水平显著提高(Zhang等2005)。AFP结合*ABI5*并促进其降解, AFP-*ABI5*

复合体位于核体中, 该核体也包含RING基序的E3连接酶COP1(von Arnim和Deng 1993; Hardtke和Deng 2000), 含有COP1的核体是蛋白失活和降解的场所(Wang等2001), *ABI5*是否是核体中COP1或者其他E3连接酶作用的底物(Lopez-Molina等2003), 尚不清楚。

ABA和各种非生物胁迫均能激活植物基因的表达, 这些胁迫活性基因的转录是由依赖ABA和非依赖ABA两种信号途径介导的。ABA反应基因的启动子区含有脱落酸响应元件(ABA-responsive element, ABRE)(Shen和Ho 1995)。*TMAC2*基因的转录起始位点上游600 bp区间含有3个ABRE, 它是ABA信号途径的负调控因子, 超量表达后植物对ABA和NaCl敏感性降低, 根系短小, 花期推迟, 淀粉的合成量过度增加, 开花相关基因*SOCI/AGL20*、*SEP3/AGL9*和淀粉降解相关基因*SEX1*的表达丰度明显减少(Huang和Wu 2007)。许多胁迫基因的激活不依赖ABA, 它们的启动子区含有脱水响应元件/C-重复(dehydration-responsive element/C-repeat, DRE/CRT)等, 可对渗透胁迫和低温做出反应(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 1994)。

在ABA信号途径中许多转录因子通过抑制其他胁迫基因的转录行使功能。拟南芥*FIERY1*编码一个肌醇磷酸盐-1-磷酸脂酶, *FRY1*基因突变引起ABA反应和胁迫处理后*RD29A-LUC*报告基因表达水平升高。经低温、渗透胁迫或ABA处理的*fry1*突变体中胁迫反应基因*KIN1*、*COR15A*、*HSP70*、*ADH*的表达水平也有显著升高, ABA处理的*fry1*突变体植株中IP₃的积累水平比野生型的明显增多, 这表明磷酸肌醇介导植物ABA和胁迫信号传导通路, 而它们的流量对于削弱ABA和胁迫信号起关键作用(Xiong等2001)。蛋白磷酸酶2A的一个催化亚基PP2Ac-2能抑制ABA反应, PP2Ac-2的功能缺失突变体中ABA调节基因*RD26*、*DREB-1B*和*DREB-1C*的表达水平明显提高(Pernas等2007)。*ERD15*是拟南芥ABA反应的负调控因子, 影响其对非生物胁迫的耐性和抗病性, *ERD15*超量表达后病原菌侵染的抗性增强(Kariola等2006)。拟南芥转录因子ROP10也参与负调控ABA信号, 它是似RHO的植物小G蛋白(RHO-like small G protein of plants, ROP)亚类中

的GTP酶,定位于细胞膜上(Zheng等2002)。

2.2 负调控因子与GA信号途径 在赤霉素信号转导的中间组分中, DWARF1 (D1)、PHOR1 (PHOTOPERIOD RESPONSIVE1)、PICKLE (PKL)、SLEEPY1 (SLY1)和一些MYB蛋白是正调控因子, 而SHI (SHORT INTERNODES)、SPINDLY (SPY)、RGA/GAI等则起负调控因子的作用(王荣和张根发2007)。根据拟南芥的SPY、RGA、GAI基因所建立的GA信号转导模型为: 在GA生物合成缺失时, SPY能修饰和激活DELLA (DELLA-domain containing protein, 含DELLA结构域蛋白)亚族蛋白RGA和GAI, 抑制GA诱导基因的表达(Lovegrove和Hooley 2000; Sun 2000)。GA反应通过E3泛素蛋白连接酶SCF^{SLY1}泛素化降解GAI和RGA, 从而解除GAI和RGA对GA反应的抑制, 促进各种依赖GA的过程(Fu等2004), 但迄今转录因子RGA和GAI所调节的靶基因中得到克隆的不多。大麦的SPY是糊粉层中GA反应的负调控因子, 酵母双杂交证明, 不同种类的蛋白可与SPY相互作用, 其中定位于细胞核中的转录因子HSIMYB和HSINAC能抑制糊粉层中GA所调节的 α -淀粉酶基因表达(Robertson 2004)。RGL1调控GA反应途径, 在种子萌发中的作用比GAI和RGA更为显著, RGL1与其他的DELLA蛋白表达特征不同, 它除在花中显著表达外, 在发育的心皮和花粉囊中也能表达。所有的DELLA亚族蛋白成员可能在GA信号转导途径中发挥各自独立的和相互重叠的生物学功能(Wen和Chang

2002)。GID1是GA的可溶性受体, 它与DELLA蛋白负调控因子SLR1作用(Ueguchi-Tanaka等2005)。GA也可诱导SLR1的磷酸化, F-盒蛋白同时能够与磷酸化形式的SLR1作用, 将SLR1交给SCF^{GID2}复合物, 随后SLR1通过26S蛋白酶体途径降解(Gomi等2004)(图1)。因此认为GA也能刺激受体与负调控因子之间的相互作用, 诱导负调控因子的迅速降解, 进而促进植物的生长发育。

2.3 负调控因子与生长素信号途径 3种早期生长素响应蛋白——生长素/吲哚乙酸蛋白(Aux/IAA)、生长素响应因子(auxin response factor, ARF)和泛素介导的蛋白降解途径组分在生长素的信号转导中起着关键性的作用。目前的研究结果支持负调控模型的说法, 即Aux/IAA蛋白以生长素依赖的方式通过泛素相关的蛋白降解机制为26S蛋白酶降解。当Aux/IAA-Aux/IAA以及Aux/IAA-ARF二聚体含量降低时, ARF-ARF水平升高, ARF-ARF结合在生长素调控基因启动子的生长素响应元件(AuxRE)上调一系列基因的表达, 进而引导植物的正常生长和发育(蒋素梅等2005)。没有生长素信号时, 稳定的负调控蛋白Aux/IAA竞争性地与ARF形成异源二聚体, 阻遏ARF与生长素诱导基因ARE的启动子结合, 抑制生长素调节基因的转录; 当有生长素信号时, 生长素可以结合受体TIR1, 促使F-box蛋白TIR1识别Aux/IAA, 增强SCF^{TIR1}与Aux/IAA的互作, Aux/IAA的丰度由于泛素介导的蛋白降解作用而下降, Aux/IAA同

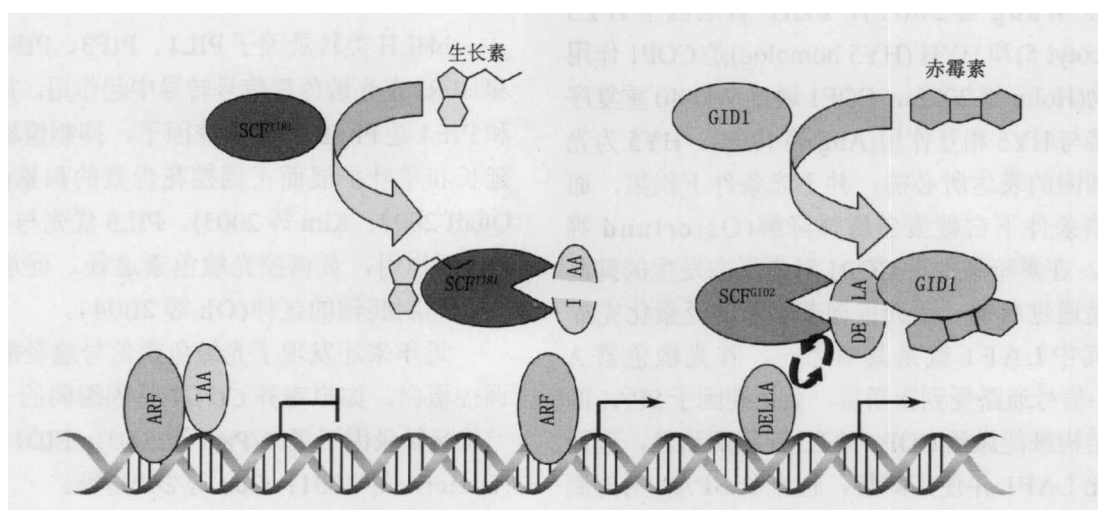


图1 生长素和赤霉素信号介导的负调控因子的降解
IAA和DELLA蛋白的断裂表示其降解。根据Huq(2006)改画。

ARF的结合因此减少, ARF以形成同源二聚体为主,能和生长素诱导基因 *ARE* 的启动子结合而启动转录(Gray等2001; Liscum和Reed 2002; Kepinski和Leyser 2003)(图1)。

2.4 负调控因子与乙烯信号途径 乙烯信号通路包括内质网定位的受体家族(ETR1、ETR2和EIN4)、Raf-like 激酶CTR1 (constitutive triple response 1)和EIN2 (ethylene insensitive 2)蛋白(Guo和Ecker 2004)。类似于Raf的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶CTR1氨基端与内质网上的乙烯受体ETR1羧基端互动,间接结合到内质网,形成ETR1/CTR1复合体,负调控乙烯反应(Huang等2003)。EIN2是CTR1下游的膜结合蛋白,而EIN3/EIL则位于EIN2下游,是乙烯诱导基因的转录激活因子(Klee 2004)。乙烯存在时,EIN2将信号传递给EIN3(Alonso等1999; Wang等2002);乙烯缺乏时,该信号途径的负调控因子EBF1和EBF2专一地募集EIN3,最终EIN3被SCF^{EBF1/2}泛素化降解(Guo和Ecker 2004)(图2)。

3 植物蛋白负调控因子与植物的生长发育和形态建成

3.1 负调控因子与植物光信号转导 光是植物生长发育中的一个重要环境信号,植物形成精密的光信号接收和转导系统,一些负调控因子在光信号转导中起作用。光敏色素信号途径中的各种复合物按功能可以分为正调节和负调节,负调控因子中COP1在光信号中的作用的研究较为透彻。黑暗中COP1能抑制光调控的植物发育(Hardtke等2000; Wang等2001),bZIP转录因子HY5(hypocotyl 5)和HYH(HY5 homolog)是COP1作用的底物(Holm等2002),COP1通过WD-40重复序列直接与HY5相互作用(Ang等1998)。HY5为光调控基因的表达所必需,并于光条件下积累,而在黑暗条件下它被蛋白酶体降解(Osterlund等2000)。在黑暗条件下COP1对光形态发生的抑制作用是通过启动一系列正调节因子的泛素化完成的,其中LAF1就是其中之一,在光敏色素A(phyA)信号通路受到激活后,负调控因子SPA1的螺旋结构域能激活COP1的E3连接酶活性,进而泛素化LAF1并使其降解,但全长SPA1则抑制COP1对HY5的泛素化(Seo等2003)。COP9复合体直接作用于SCF型E3蛋白连接酶,是E3蛋白

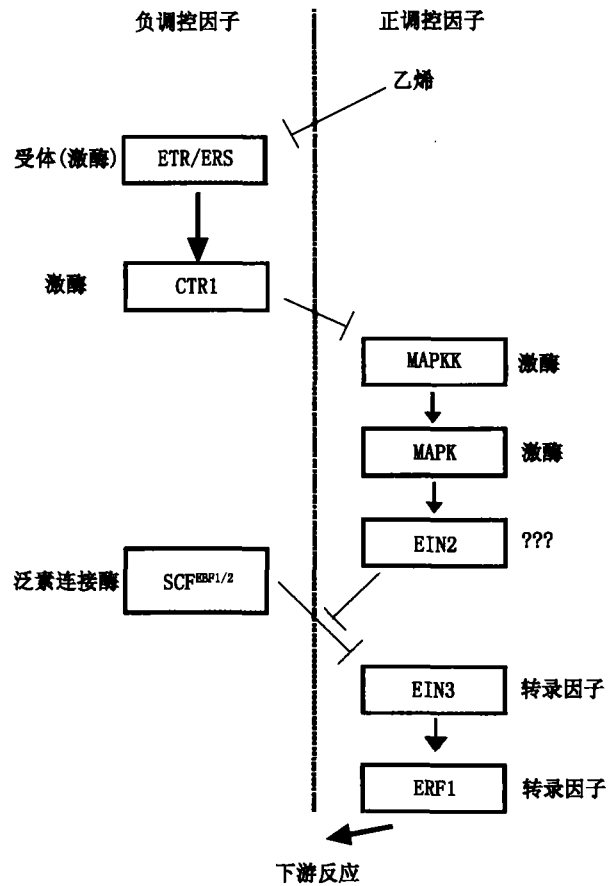


图2 乙烯信号基本途径
根据Kepinski和Leyser(2003)改画。

复合物活性的调节者(Wei和Deng 1998),COP10则编码类似于泛素蛋白连接酶E2,是核蛋白复合体的一部分,并能够直接作用于COP1和COP9,在调节蛋白泛素化降解中起作用(Suzuki等2002)(图3)。

bHLH类转录因子PIL1、PIF3、PIF4、PIL5和HFR1在光敏色素信号转导中起作用。其中PIF3和PIF4是PhyB的负调控因子,抑制植株胚轴的延长和子叶扩展而正调控花青素的积累(Huq和Quail 2002; Kim等2003)。PIL5优先与PhyA和PhyB作用,负调控光敏色素途径,促进种子萌发,抑制胚轴的延伸(Oh等2004)。

近年来还发现了光敏色素信号途径的其他负调控蛋白,如拟南芥COG1基因编码的一个Dof结构域转录因子蛋白(Park等2003)、EID1和SUB1(Dieterle等2001; Guo等2001)等。

3.2 负调控因子与花器官的形成 开花抑制发生在几个水平上,信号可以是内在的或外在的开花信

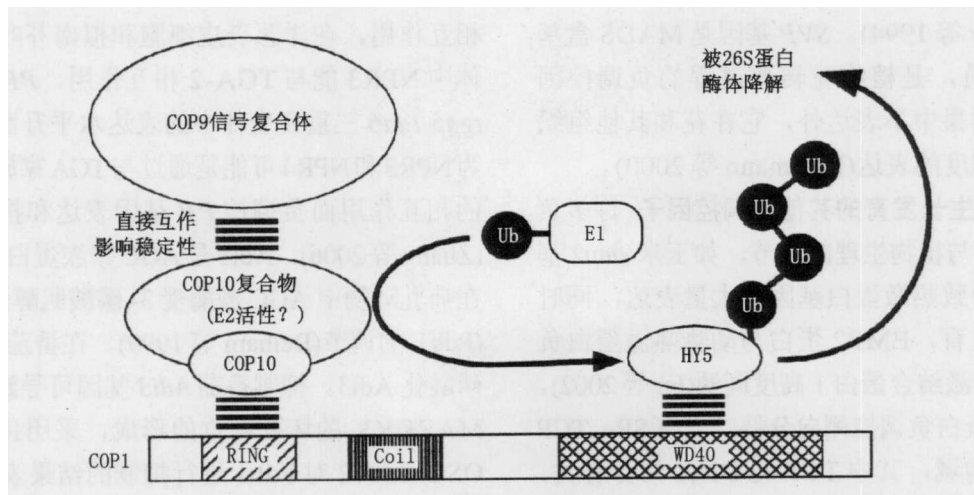


图3 COP1、COP9 信号体和 COP10 信号复合物在蛋白泛素化和蛋白酶体介导的蛋白降解中的可能功能关系
重叠的横线表示蛋白-蛋白直接互作; Ub: 泛素; RING: RING-指型基序; Coil: Coil-Coil 结构域; WD40: WD40-重复结构域。根据 Suzuki 等(2002)改画。

号, ESD4、EFS、ELF3 和 EFL4 抑制开花控制中的自主途径(或光感知)和生理节奏周期途径。FLC (FLOWERING LOCUS C)是促进春化途径的媒介, 它抑制开花促进因子 FT (FLOWERING LOCUS T)、LFY (LEAFY)和SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1); EBS (EARLY BOLTING IN SHORT DAYS)、TFL1 (TERMINAL FLOWER 1)和 TFL2 抑制 FT; SYD (SPLOYED)、FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM)和 TFL1 抑制 LFY。另外一个抑制开花的机制是通过EMF (EMBRYONIC FLOWER, EMF1 和 EMF2)、CLF (CURLY LEAF)和 FIE 直接或间接抑制花器官特异基因。花器官基因的正常表达可能不通过 FT、LFY 和 SOC1 充当媒介。FIE 和 EMF1 也调节种子特异基因的表达(Sung 等2003) (图4)。另外, 拟南芥负调控基因 SUPERMAN (SUP)是花器官的定域基因, 能抑制 B 功能基因的表达, 突变时 B 功能基因 PI 和 AP3 的表达范围得到延伸, 造成第四轮花器官中因有 B 功能基因异位表达而发育为雄蕊(Yun 等 2002)。SUP 本身又受花分生组织促进基因 LFY 的控制, LFY 通过 AP3/PI 依赖型和非依赖型途径激活 SUP 基因(Sakai 等 2000)。目前对开花基因(如 CONSTANS, CO)和开花位点 T (FT)上游信号途径中的蛋白分子之间相互作用的了解很少。拟南芥的红光和远红光非敏感因子 2 (RFI2)能够抑制 CO 基因的表达, 而昼夜节律控制基因 GI 可能是通过正调节作用来维持

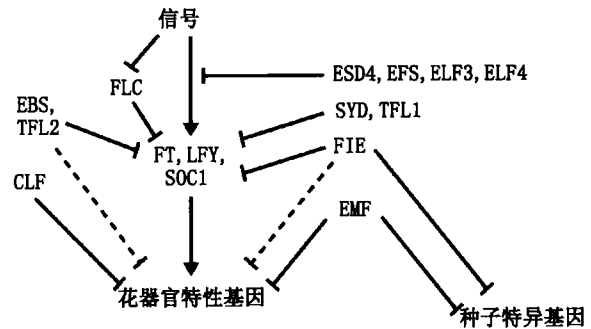


图4 开花抑制机制
根据 Sung 等(2003)改画。

RFI2 表达所必需的(Chen 和 Ni 2006)。拟南芥 ULTRAPETALA1 (ULT1)基因编码一个包含 B-box 基序和 SAND 结构域的蛋白, 该基因和拟南芥 ULT2 被认为是植物界的新基因家族, 它们能够通过各自独立的途径抑制分生组织促进基因 WUS 和 STM 的表达。ULT2 的超量表达能够补偿 ULT1 基因突变的遗传效应, 因此认为 ULT1 和 ULT2 在植物生长过程中可能会控制公共的靶位点(Carles 等 2004, 2005)。最近在拟南芥中鉴定的花器官发育中的负调控基因 TAENIATA 的突变体, 其花序在早期产生介于花和叶之间的可育花, 在真叶上异位产生分生组织和莲座叶, 且突变体表型程度依赖于温度和光周期, 与野生型相比, 突变体中同源异型盒基因 KNAT2 和 STM 可表达, 且 KNAT1 和 KNAT6 的表达水平明显提高(Lebedeva 等 2005)。拟南芥花的同源异型基因 BELL 通过负调控心皮决定同源基因 AGAMOUS 的表达而控制胚

珠的发生(Ray等1994)。SVP基因是MADS盒基因家族的成员,是植物花转变过程的负调控因子,除在长角果中不表达外,它在花和其他组织中均有不同程度的表达(Hartmann等2000)。

3.3 控制植物生长发育的其他负调控因子 许多负调控蛋白也参与植物生理的调节,如玉米*emp2*基因的突变可导致热激蛋白基因的大量表达,同时还延缓胚胎发育,EMP2蛋白与动物热激蛋白负调控因子的热激结合蛋白1高度同源(Fu等2002)。水稻OsTB1蛋白负调控侧向分枝,含有SP、TCP和R 3个结构域,其中TCP与DNA结合有关,而富碱性残基的R结构域和富苏氨酸和脯氨酸的SP结构域的功能尚不清楚(Takeda等2003)。植物在所谓的边界区域形成茎分生组织,这是地上部形态发生所必需的,迄今对植物分生组织形成的分子调节机制还不十分了解。TCP类转录因子通过负调控分界特异基因的表达,它在控制茎分生组织的形成中起作用(Koyama等2007)。拟南芥WAG1和WAG2蛋白激酶负调控根的转动(root waving)(Santner和Watson2006)。在营养缺乏的条件下,拟南芥中的生长激素反应因子8(ARF8)以蛋白抑制因子的形式阻碍心皮的发生(Goetz等2006)。拟南芥种子发育后期阶段会促使心皮瓣从胎座框上分离出来,以散播种子,这需要SHATTERPROOF MADS-盒基因的作用,它们可促进心皮瓣/胎座框分界面上离层的发育。而FRUITFULL负调控SHATTERPROOF的表达,组成型表达FRUITFULL则能阻止离层的形成(Ferrandiz等2000)。

4 植物蛋白负调控因子与植物抗性

4.1 负调控因子与植物抗病信号途径 拟南芥ERA抑制子NIMIN1(NIM1 INTERACTING1)不含DNA结合域,超量表达后植株表现感病性。NIMIN1能够抑制防卫基因*PR-1*的表达,这种抑制是通过与胁迫相关的负调控因子NIM1(NONINDUCIBLE IMMUNITY1,也称NPR1)与许多TGA元件结合蛋白(TGA-element binding protein, TGA)家族转录因子相互作用实现的(Weigel等2005)。*npr3*单基因突变能显著提高*PR-1*的表达水平,*npr3 npr4*双基因突变体中*PR-1*的表达比单基因的提高更显著,抗病性也显著提高。酵母双杂交表明,NPR3和NPR4能与TGA2、TGA3、TGA5和TGA6

相互作用,在洋葱表皮细胞和拟南芥叶肉原生质体中NPR3能与TGA-2相互作用。*PR-1*在*tga2 tga5 tga6*三重突变体中的表达水平升高,有人认为NPR3和NPR4可能是通过与TGA家族转录因子的相互作用而负调控*PR*基因表达和抗病能力的(Zhang等2006)。Adi3是AGC家族蛋白激酶成员,在哺乳动物中AGC激酶受3-磷酸肌醇蛋白激酶1(Pdk1)的调节(Belham等1999),在番茄中Pdk1可磷酸化Adi3。抑制番茄Adi3基因可导致植株依赖MAPKKK的坏死部位的形成,采用化学抑制剂OSU-03012对Pdk1进行抑制的结果表明,Pdk1和Adi3可协同作用调节植物细胞死亡,Adi3表现的功能与哺乳动物AGC类似。据此推测Adi3的负调控功能可能在抗病基因编码蛋白Pto与病原细菌的AvrPto蛋白相互作用过程中失活,进而导致寄主细胞在病原菌侵染下调亡(Devarenne等2006)(图5)。BON1是特定的SNC1(NPR1的抑制蛋白)的抑制因子(Yang和Hua2004),在原生动物、植物、线虫和哺乳动物中进化是保守的(Creutz等1998),BAP1和BON1可以形成复合物负调控植物R基因所介导的防卫反应。BAP1基因突变与BON1基因突变相似,都可以赋予植物以抗病原

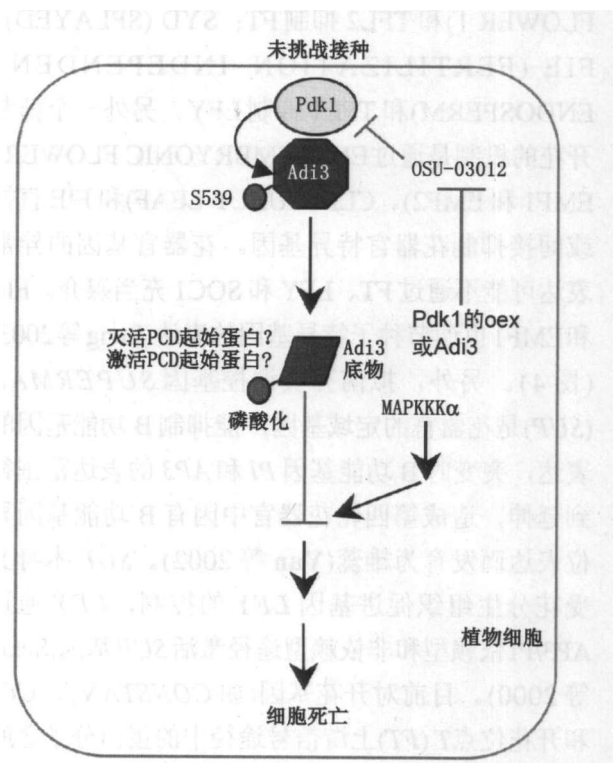


图5 Pdk1/Adi3细胞凋亡调节的模型

根据Devarenne等(2006)改画。

体的能力(Yang等2006)。

某些负调控因子可与基因的启动子结合。WRKY (tryptophan-arginine-lysine-tyrosine)类型蛋白是病原体诱导的防卫反应中的调节蛋白, 拟南芥WRKY11能够结合在受体激酶基因FRK1/SIRK启动子的W-盒上。在接种番茄叶斑病菌番茄丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)的拟南芥中, WRKY11、WRKY17可削弱病原体诱导系列基因的表达, *wrky7*突变体表现出对细菌的抗性。有趣的是, II亚族WRKY蛋白有自身调节和交互调节两种方式, 如WRKY6可负调节自身和相关基因WRKY42的表达, WRKY11和WRKY17则可负调节WRKY70和WRKY54的表达, WRKY转录因子以形成高度联系的调控网络调节WRKY基因表达, 进而调节植物的防卫反应(Robatzek和Somssich 2002; Journot-Catalino等2006)。

SPL11具有E3泛素连接酶活性, 水稻SPL11基因的突变表现出自发性细胞死亡和对细菌/真菌的抗性增强(Zeng等2004)。拟南芥LSD1能抑制由于病原体诱导引起的细胞程序性死亡, *lsd1*突变体植株表现出对细胞凋亡激发子的超敏感, 有人据此推测LSD1是细胞程序性死亡机制中的负调控因子, 它通过控制病斑的扩散和降低细胞程序性死亡过程中的诱导物水平来阻断细胞程序性死亡。水稻*spl11*突变体也表现出与拟南芥*lsd1*突变体类似的特征(Dietrich等1997)。拟南芥BAP1基因编码一个C2结构域蛋白, 可以依赖钙离子的方式结合在磷脂上, 并与脂膜相连接, 负调控防卫反应和细胞死亡。BAP1功能的缺失会导致植株对致病细菌和霉菌的抗性增强, 这是由水杨酸和抗病基因SNCI介导的。BAP1可能与进化上保守的C2结构域蛋白BON1/CPN1共同作用, 负调控植物的防卫反应(Yang等2006)。

植物防卫反应中蛋白酶体的可诱导β1亚基通过NtrbohD负调控, 进而调节活性氧(active oxygen species, AOS)的积累。NtrbohD与哺乳动物的NADPH氧化酶gp91phox相似, 当用真菌处理烟草细胞时, *NtrbohD*的表达能够引起核因子AOS的积累(Lequeu等2005)。

4.2 负调控因子与植物抗逆信号 拟南芥C端重复结合因子/脱水反应元件结合因子1(CBF/DREB1)为转录激活因子, CBF2/DREB1C能负调控CBF1

DREB1基因(CBF1/DREB1B和CBF3/DREB1A)的表达, 阻断他们对寒冷诱导基因的激活, *cbf2*突变体比野生型可表现出更强的抗寒冷、干旱和高盐胁迫适应能力, 但具体调控机制尚需进一步研究(Novillo等2004)。拟南芥转录调控因子FRY2可抑制携带DRE/CRT元件的基因, 同时还能抑制胁迫所诱导的CBF/DREB转录因子基因的表达(Xiong等2002)。

拟南芥渗透反应基因HOS1编码一个E3连接酶, 其N端与动物的RING指状结构域负调控蛋白相似。HOS1介导拟南芥抗寒转录因子ICE1和其他调节蛋白的泛素化降解, 从而削弱拟南芥抗寒冷的能力(Dong等2006), *hos1*突变体中抗寒转录因子CBF和其调节的下游寒冷调节基因如RD29A、COR47、COR15A和KINI等的表达上调。此外, HOS1还是开花基因FLC的调节子(Sung和Amasino 2004; Henderson和Dean 2004), *hos1*突变体中FLC的表达减少, 并表现出早花(Lee等2001)。氨基酸在植物的胁迫适应中也起作用, 如众多植物种类在干旱和盐胁迫反应中可观察到脯氨酸的积累, 磷脂酶D能负调节脯氨酸的生物合成(Thiery等2004)。另外, 拟南芥AtCaMBP25蛋白可负调控植物抗非生物胁迫的能力(Perruc等2004)。

5 结语

迄今, 虽然已经鉴定了许多植物蛋白负调控因子, 但大多数蛋白所行使的功能机制还不清楚, 尤其是许多与之作用的蛋白也未得到鉴定, 而目前大多数已经鉴定的蛋白与负调控蛋白之间的相互作用机制以及上下游关系也不清楚。相信, 随着研究的深入, 许多负调控蛋白和相关蛋白会相继得到鉴定, 它们的功能机制和复杂的生物学效应将会逐渐阐明。

参考文献

- 胡晓丽, 李德全(2007). 植物蛋白磷酸酶2C (PP2C)及其在信号转导中的作用. 植物生理学通讯, 43 (3): 407~412
- 蒋素梅, 陶均, 李玲(2005). 早期生长素响应蛋白在生长素信号转导中的作用. 植物生理学通讯, 41 (1): 125~130
- 王荣, 张根发(2007). 赤霉素信号转导的中间组分研究. 生物学杂志, 24 (2): 5~8
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. Science, 284: 2148~2152
- Ang LH, Chattopadhyay S, Wei N, Oyama T, Okada K, Batschauer

- A, Deng XW (1998). Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell*, 1: 213~222
- Belham C, Wu S, Avruch J (1999). Intracellular signalling: PDK1 — a kinase at the hub of things. *Curr Biol*, 9: R93~R96
- Carles CC, Choffnes-Inada D, Reville K, Lertpiriyapong K, Fletcher JC (2005). *ULTRAPETALA1* encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*, 132: 897~911
- Carles CC, Lertpiriyapong K, Reville K, Fletcher JC (2004). The *ULTRAPETALA1* gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through *WUSCHEL* to regulate floral determinacy. *Genetics*, 167: 1893~1903
- Chen M, Ni M (2006). RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates *CONSTANS* expression and photoperiodic flowering. *Plant J*, 46: 823~833
- Creutz CE, Tomsig JL, Snyder SL, Gautier MC, Skouri F, Beisson J, Cohen J (1998). The copines, a novel class of C2 domain-containing, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins conserved from *Paramecium* to humans. *J Biol Chem*, 273: 1393~1402
- Devarenne TP, Ekengren SK, Pedley KF, Martin GB (2006). Adi3 is a Pdk1-interacting AGC kinase that negatively regulates plant cell death. *EMBO J*, 25: 255~265
- Dieterle M, Zhou YC, Schäfer E, Funk M, Kretsch T (2001). EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. *Genes Dev*, 15: 939~944
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangel JL (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 88: 685~694
- Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu JK (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 8281~8286
- Ferrandiz C, Liljegren SJ, Yanofsky MF (2000). Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development. *Science*, 289: 436~438
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12: 599~609
- Fu S, Meeley R, Scanlon MJ (2002). *Empty pericarp2* encodes a negative regulator of the heat shock response and is required for maize embryogenesis. *Plant Cell*, 14: 3119~3132
- Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP (2004). The *Arabidopsis* mutant sleepy1^{gar2-1} protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*, 16: 1406~1418
- Gaston K, Jayaraman PS (2003). Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 60: 721~741
- Giraudat J, Hauge B, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman H (1992). Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell*, 4: 1251~1261
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 1873~1886
- Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J*, 37: 626~634
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 11: 1897~1909
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001). Auxin regulates SCF^{TR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414: 271~276
- Guo H, Ecker JR (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 40~49
- Guo H, Mockler T, Duong H, Lin C (2001). SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science*, 291: 487~490
- Hardtke CS, Deng X-W (2000). The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol*, 124: 1548~1557
- Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K, Deng XW (2000). HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J*, 19: 4997~5006
- Hartmann U, Hohmann S, Nettekheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 21: 351~360
- Henderson IR, Dean C (2004). Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development*, 131: 3829~3838
- Herschbach BM, Johnson AD (1993). Transcriptional repression in eukaryotes. *Annu Rev Cell Biol*, 9: 479~509
- Holm M, Ma L-G, Qu L-J, Deng X-W (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 16: 1247~1259
- Huang M-D, Wu W-L (2007). Overexpression of *TMAC2*, a novel negative regulator of abscisic acid and salinity responses, has pleiotropic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 63: 557~569
- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 33: 221~233
- Huq E (2006). Degradation of negative regulators: a common theme in hormone and light signaling networks? *Trends Plant Sci*, 11: 4~7
- Huq E, Quail PH (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 21: 2441~2450
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006). The

- transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 18: 3289~3302
- Kariola T, Brader G, Helenius E, Li J, Heino P, Palva ET (2006). *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15*, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 142: 1559~1573
- Kepinski S, Leyser O (2003). SCF-mediated proteolysis and negative regulation in ethylene signaling. *Cell*, 115: 647~653
- Kim J, Yi H, Choi G, Shin B, Song PS, Choi G (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, 15: 2399~2407
- Klee HJ (2004). Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135: 660~667
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, Ohme-Takagi M (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 473~484
- Lebedeva OV, Ezhova TA, Melzer S (2005). Gene *TAENIATA* is a novel negative regulator of the *Arabidopsis thaliana* homeobox genes *KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6*, and *STM*. *Genetika*, 41: 1068~1074
- Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK (2001). The *Arabidopsis HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev*, 15: 912~924
- Lequeu J, Simon-Plas F, Fromentin J, Etienne P, Petitot AS, Blein JP, Suty L (2005). Proteasome comprising a $\beta 1$ inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Lett*, 579: 4879~4886
- Leung J, Giraudat J (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 199~222
- Liscum E, Reed JW (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol*, 49: 387~400
- Liu L, White MJ, MacRae TH (1999). Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem*, 262: 247~257
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH (2003). AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev*, 17: 410~418
- Lovegrove A, Hooley R (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci*, 5: 102~110
- Meskiene I, Baudouin E, Schweighofer A, Liwosz A, Jonak C, Rodriguez PL, Jelinek H, Hirt H (2003). Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 278: 18945~18952
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J (2004). *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3985~3990
- Oh E, Kim J, Park E, Kim J-I, Kang Ch, Choi G (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16: 3045~3058
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405: 462~466
- Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG (2003). The *Arabidopsis COG1* gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J*, 34: 161~171
- Pernas M, García-Casado G, Rojo E, Solano R, Sánchez-Serrano JJ (2007). A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J*, 51: 763~778
- Perruc E, Charpentreau M, Ramirez BC, Jauneau A, Galaud JP, Ranjeva R, Ranty B (2004). A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J*, 38: 410~420
- Ray A, Robinson-Beers K, Ray S, Baker SC, Lang JD, Preuss D, Milligan SB, Gasser CS (1994). *Arabidopsis* floral homeotic gene *BELL (BEL1)* controls ovule development through negative regulation of *AGAMOUS* gene (*AG*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5761~5765
- Robatzek S, Somssich IE (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev*, 16: 1139~1149
- Robertson M (2004). Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone. *Plant Physiol*, 136: 2747~2761
- Sakai H, Krizek BA, Jacobsen SE, Meyerowitz EM (2000). Regulation of *SUP* expression identifies multiple regulators involved in *Arabidopsis* floral meristem development. *Plant Cell*, 12: 1607~1618
- Santner AA, Watson JC (2006). The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant J*, 45: 752~764
- Schwechheimer C, Bevan M (1998). The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends Plant Sci*, 3: 378~383
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*, 9: 236~243
- Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML, Chua NH (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, 423: 995~999
- Shen Q, Ho THD (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell*, 7: 295~307
- Sun T-P (2000). Gibberellin signal transduction. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 374~380
- Sung S, Amasino RM (2004). Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 4~10
- Sung ZR, Chen L, Moon YH, Lertpiriyapong K (2003). Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 29~35
- Suzuki G, Yanagawa Y, Kwok SF, Matsui M, Deng XW (2002).

- Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev*, 16: 554~559
- Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi C (2003). The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J*, 33: 513~520
- Thierry L, Leprince AS, Lefebvre D, Ghars MA, Debarbieux E, Savoure A (2004). Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 279: 14812~14818
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T-Y, Hsing Y-I, Kitano H, Yamaguchi I, et al (2005). *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437: 693~698
- von Arnim AG, Deng XW (1993). Ring finger motif of *Arabidopsis thaliana* COP1 defines a new class of zinc-binding domain. *J Biol Chem*, 268: 19626~19631
- Wang HY, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW (2001). Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, 294: 154~158
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14: S131~S151
- Wei N, Deng XW (1998). Characterization and purification of the mammalian COP9 complex, a conserved nuclear regulator initially identified as a repressor of photomorphogenesis in higher plants. *Photochem Photobiol*, 68: 237~241
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 1279~1291
- Wen C-K, Chang C (2002). *Arabidopsis* *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14: 87~100
- Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK (2001). *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 15: 1971~1984
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Tanaka Y, Stevenson B, Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM, Zhu JK (2002). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10899~10904
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251~264
- Yang H, Li Y, Hua J (2006). The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J*, 48: 238~248
- Yang S, Hua J (2004). A haplotype-specific resistance gene regulated by *BONZAI1* mediates temperature-dependent growth control in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 1060~1071
- Yun JY, Weigel D, Lee I (2002). Ectopic expression of *SUPERMAN* suppresses development of petals and stamens. *Plant Cell Physiol*, 43: 52~57
- Zeng LR, Qu S, Bordeos A, Yang C, Baraoidan M, Yan H, Xie Q, Nahm BH, Leung H, Wang GL (2004). Spotted *leaf11*, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell*, 16: 2795~2808
- Zhang X, Garretton V, Chua H-H (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev*, 19: 1532~1543
- Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *Plant J*, 48: 647~656
- Zheng Z-L, Nafisi M, Tam A, Li H, Crowell DN, Chary SN, Schroeder JI, Shen J, Yang Z (2002). Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 2787~2797