

## 油菜素甾醇信号转导的调控机制

王斐, 何伟, 闫海芳\*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

**摘要:** 油菜素甾醇是一类具有广泛调控功能的植物激素。本文对油菜素甾醇信号转导途径以及参与转导途径的调控的元件、转录因子等进行综述。

**关键词:** 油菜素甾醇; 信号转导; 受体; 磷酸化

## Regulation Mechanism of Brassinosteroids Signal Transduction

WANG Fei, HE Wei, YAN Hai-Fang\*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Brassinosteroids are a class of plant hormones with broad regulatory function. This review summarized the brassinosteroids signal pathway, transcription components and transcription factors.

**Key words:** brassinosteroids; signal transduction; receptor; phosphorylation

油菜素甾醇(brassinosteroids, BRs)参与调控一系列植物发育和生理应答, 例如植物形态建成、微管分化、雄性不育、开花、衰老、光形态建成和应答生物及非生物胁迫(Tang等2010)。在过去的十几年中, 与BRs信号通路相关的元件与转录因子被逐一鉴定出来。通过对BRs信号通路核心组件和下游转录因子的分析表明, BRs信号通路是一种类受体激酶信号通路。通过元件和转录因子的逐级交替的磷酸化与去磷酸化, 信号由细胞表面受体逐步转移到细胞核内, 进而调节植物的各个发育进程。本文对油菜素甾醇信号的接收及参与信号转导的调控元件、转录因子等进行综述。

### 1 BRs受体激酶(Brassinosteroid insensitive 1, BRI1)的结构

生物化学上对于BRs与BRI1相互作用的检测确认是基于一个生物素标记的光亲和性油菜素甾酮(biotin-tagged photoaffinity castasterone, BPCS)合成途径的研究, BPCS是一种具有生理活性的BRs类似物, 在紫外光的诱导下, 会装载碳烯的苯基双吡丙啶群(carbene-generating phenyldiazirine group)能与BRs-结合蛋白形成交叉连接。绿色荧光蛋白进行特异抗体免疫共沉淀反应, 或者提取BRI1::GFP转基因植株中的总微粒膜蛋白, 对其进行BPCS处理, 发现BPCS与BRI1::GFP发生特异性很高的交联。另外, 在*Escherichia coli*中表达的BRI1重组体蛋白也能检测

到与BRs相结合(Li 2005)。

BRs在植物细胞膜上的受体是一种类受体激酶(receptor-like kinases, RLKs)。BRI1是目前研究比较透彻的一种聚亮氨酸重复序列类受体激酶(leucine-rich repeat RLK, LRR-RLK) (Tang等2010)。先前的研究表明BRs结合在LRRs的羧基端侧面。2011年6月, 清华大学柴继杰研究组通过晶体采集和X射线衍射的方式, 鉴定出了BRI1的结构。研究表明, BRI1分胞外区和跨膜区, 胞外区含有25个LRR结构, 其中包含24个规则的LRR和一个不规则的LRR, 在20~21 LRR结构含有BL结合岛区域(island domain, ID)。跨膜区分为近膜区和丝氨酸/苏氨酸激酶区和一个C末端区。油菜素甾醇结合在BRI1的跨膜区和胞外区LRRs内表面之间的疏水区域(She等2011)。

BRI1的胞外区并不是像先前预测的马蹄型结构, 而是高度扭曲的右超螺旋, ID区域是位于超螺旋内部的一个回折, 与13~25的LRR关系十分密切。最近, Hothorn等(2011)的研究成果表明BRI1胞外区的LRR结构在空载与装载油菜素内酯(brassinolide, BL)时的结构变化, 对于阐明BRs对BRI1的激活是一个新思路。BRI1单体分子在质膜附近, BRs与BRI1相结

收稿 2013-08-05 修定 2013-10-21

资助 中央高校基本科研业务费专项资金(DL12CA10和DL-09BA09)和国家自然科学基金重点项目(30730078)。

\* 通讯作者(E-mail: icyhf@yahoo.com; Tel: 0451-82191783)。

合的同时也需要其他LRR构象的变化, LRR构象的改变使激素分子更接近质膜。存在BL时, LRR超螺旋的结构与BRI1胞外区低聚化并不相容, 暗示了BRI1的激活并不是配体介导的胞外区的同源二聚体化, 或者已经形成的二聚体构象的变化。BL诱导ID区构象的整合和固定。当BL存在时, BRI1的超螺旋会创造出结构蛋白之间的关联结构, 这个结论对于阐明BRs对于BRI1的激活是一个新的思路, 因此BRI1与其他蛋白形成的关联结构可能是BRI1激活及启动信号通路的真正机制(Hothorn等2011)。

## 2 油菜素甾醇对于BRI1受体激酶的激活

### 2.1 细胞质膜对于BRs的快速应答

BRs很重要的功能之一就是对于植株生长的调控。植株的生长主要归结于细胞伸长、分裂、以及两者的组合。例如, 根毛伸长主要受到BRs信号途径元件诱导器官发生的调控。BRs可能通过对细胞周期的启动和细胞分化时间的改变来控制分生组织细胞的数目(Gonzalez等2011; Hacham等2011)。在拟南芥中, BRs控制的细胞伸长要求BZR1与BES1的介导与水的吸收、离子的运输、细胞壁和细胞骨架修饰相关的几百个基因的调控(Kim和Wang 2010; Clouse 2011)。最近确定了一个受BRs诱导上调表达的基因——发育调控细胞膜多肽基因(developmentally regulated plasma membrane polypeptide, DREPP), 能同BRs介导细胞质膜(plasma membrane, PM)的细胞质内表面的伸长增长有关。尽管DREPP先前被认为与细胞骨架的重组, 但是DREPP伸长增长修饰的分子机制现在还不清楚(Sun等2010)。

BRs诱导的伸长生长早于质外体的酸化作用, 同时还伴随着PM的超极化以及细胞壁的松动扩大(Cosgrove 2005)。这些过程受到定位在PM上的P-型ATP酶(P-ATPase)的调控, 例如拟南芥中的AHA1。P-ATPase将质子从细胞质泵入质外体中(Speth等2010)。然而, 如何将BRI1的激活、P-ATPase活力的上调、内质网膜(endoplasmic membrane, EM)的超极化与细胞壁的松弛和扩张的进程联系起来, 目前为止还不清楚。最近, 科学家们用微光谱分析了转基因拟南芥活体植株的胚轴、根细胞和烟草瞬时表达叶片的细胞内和膜内的动态, 交互模式, 理化环境和BRI1-GFP的功能(Elgass

等2009; Caesar等2011)。他们发现, BL处理用BRI1-GFP标记的相邻细胞细胞膜几分钟后, 测量其动态距离和细胞壁的大小, 细胞壁会出现扩张。同时, 对BRI1-GFP的半衰期进行记录, BL应答影响了BRI1-GFP荧光半衰期的时间长度。通过施加P-ATP酶的激活剂或抑制剂, 对于BL诱导产生的内质网超极化和细胞壁的扩张进行可逆性的调节。对其他几个生理指标(pH和EM等几个其他未知的因素)进行定性的分析发现, 这些生理指标会协同调控细胞壁的扩张(Witthöft和Harter 2011)。

用BRs处理拟南芥几分钟后, P-ATPase基因家族成员的表达并没有受到其调控, 这个结果暗示了P-ATPase的转录后, BRI1才开始调控激活内质网的超极化和细胞壁的扩张(Caesar等2011)。P-ATPase活力的激活途径包括质子泵被磷酸化之后, BRs诱导BRI1与P-ATPase相结合。植物体中, 在BL诱导下, BRI1与AHA之间会产生相互作用(Caesar等2011)。此外, BL诱导的BRI1的荧光半衰期时间的改变和AHA诱导的内质网超极化都依赖于BRI1激酶的活性(Caesar等2011)。然而, P-ATPase的C末端含有一个自动抑制区域, 该区域含有一个保守的苏氨酸位点, 通常是需要P-ATPase的激活才能发挥作用。突变这个苏氨酸位点并没有导致突变的AHA与BRI1结合, 缺乏激活的BRI1时不能诱导内质网的超极化(Witthöft等2011)。因此, 对于了解BRI1如何激活P-ATPase的控制机制就十分必要。这些发现暗示了细胞膜上BL调控信号应答途径存在着一个捷径, 而这条捷径是独立于基因表达的。这条途径将BRI1与P-ATPase连接起来, 进而调控内质网的超极化和细胞壁的扩张。

非细胞自主信号也会参与到拟南芥的BRs信号通路中(Scacchi等2010; Hacham等2011)。绝大多数细胞是通过胞间连丝进行电信号配对的, 电信号产生应答的位置往往集中于内质网(Spanswick 1972)。尽管共质体之间有电阻, 但是BL诱导一个细胞内质网的改变会传递给邻近的其他细胞(Blatt和Armstrong 1993)。由于内质网为许多运输进程提供原动力, 因此可能对其他邻近的细胞产生生理影响。质外体pH值的变化也类似受非细胞自主的影响。BL诱导细胞壁松动和扩张过程中会

使细胞壁刚性产生变化或者让细胞收到压力, 这样的进程也同样会产生非细胞自主的效果(Braybrook和Kuhlemeier 2010)。

有趣的是, 虽然施加BL 15 min会引起内质网和细胞壁三维的变化(Elgass等2009; Caesar等2011), 但是细胞伸长的现象最早也要45 min后才能观察到(Clouse 2011)。另外, BL激活的内质网超极化也同样出现在烟草的表皮细胞中, 但是并没有拉长烟草表皮细胞。这也暗示了P-ATPase翻译后调控能力不足, 无法启动BRs激活细胞伸长。这可能需要在细胞伸长过程中需要合成细胞壁的材料, 因此还需要与其相关的基因表达。此外, 其他生长激素, 如生长素, 首先要通过相关生物合成基因表达量上调才能完成细胞质膜对生长素的应答。许多研究分析已经证明生长素在BRs的作用下会启动细胞伸长(Halliday 2004; Nemhauser等2004; Sánchez等2010)。而内质网超极化和细胞壁的扩张这两个生理指标已经能解释清楚BRs/BRI1-P-ATPase应答途径。BRs诱导的细胞质膜应答依赖于P-ATPase, 这种应答方式对于相关基因的表达量影响相对较小, 因而能够启动迅速应答(Witthöft 2011)。

## 2.2 BRI1与配体BAK1 (BRI1 associated receptor kinase 1)的相互作用

当BL结合在BRI1上时, 在质膜区会形成稳定的蛋白之间结构, 从而激活和启动信号通路, 其中与BRI1超螺旋结构结合铆钉最匹配的是受体复合体配体BAK1。

BRI1BAK1的结合依赖于 $Mg^{2+}$ , 体外实验发现, BRI1与BAK1结合依赖二价阳离子, 推测原因是BRI1、BAK1与 $Mg^{2+}$ 相结合会导致其中的一种或两种受体的构象发生变化, 进而启动BRI1与BAK1相结合(Oh等2011)。几乎所有蛋白激酶的激活位点都会结合二价阳离子(Adam 2001), 其中一个价电子与核苷酸相结合(例如Mg-ATP substrate), 另一个价电子独立结合, 亲和性也比较低, 这也暗示了细胞质中的 $Mg^{2+}$ 对BR信号通路具有关键作用。

受体激酶的自体磷酸化对于受体激酶的信号通路非常重要。在重组蛋白质中, BAK1表现出了在Tyr残基的自体磷酸化以及先前报道的一系列的

Ser/Thr残基的自体磷酸化。最近确定的BAK1羧基末端Tyr-610位点是自体磷酸化的主要位点。体内实验中, 该位点磷酸化对于BAK1的许多功能都至关重要。首先, 在BAK1 (Y610F)标签突变体中, 检测到BRs信号通路与BRI1一起作为共同受体的BAK1功能受到损伤(Oh等2010)。同时, 磷酸化Tyr-610位点对增强BRs信号通路有重要作用, Y610F植株对外源BL应答敏感程度下降, 下胚轴伸长, BES1的去磷酸化水平下降。在BAK1 (Y610F)突变体中mBRI1激酶进行转磷酸化的能力受到了严格的抑制(Wang等2008)。其次, 植株表达BAK1 (Y610F)标签会控制许多BL调控基因的表达, 其中包含一些与生长相关的基因。最后, BAK1 (Y610F)突变体强烈地抑制了未被激活的BRI1激酶的转磷酸化能力(Oh等2011)。

最近通过研究功能获得型突变体拟南芥***bak1<sup>els</sup>***的分子基础, 阐明了BL诱导BRI1与BAK1相结合, 从而形成激活状态受体的机制(Jaillais等2011)。***bak1<sup>els</sup>***蛋白在其胞外区介导天冬氨酸122向天冬酰胺的转变, 这个转变增强了BAK1与BRI1的亲和程度, 促进了BRI1/BAK1复合受体的形成。这个变换及BRI1/BAK1复合受体发挥全部功能不止需要两个受体胞外区的结合, 也需要两个受体激酶区的结合。BKI1位于BRI1与BAK1激酶区之间, 阻止BRI1与BAK1之间的转磷酸化, 进而阻止了复合受体启动, ***bak1<sup>els</sup>***蛋白并不能恢复过量表达的BKI1对BR信号转导途径的抑制。

因此, Jaillais等(2011)对于BRI1/BAK1异源二聚体和信号通路启动提出了“双线船闸”机制。当BRs缺乏时, BKI1结合在BRI1的C末端, 阻止BRI1与BAK1相结合, 于是BRI1处于非激活状态。BRI1可能形成一些独立配体的低聚物, 不和BAK1相结合。当BR结合在BRI1上时, BRI1内部的超螺旋可以形成一个用于容纳BR的区域, BRI1与BAK1的胞外区的亲和性增加, 使BKI1酪氨酸残基磷酸化。BRI1与BAK1相结合募集反应的同时, BKI1从细胞质膜上释放。BRI1与BAK1相结合导致BRI1与BAK1之间的转磷酸化(Jaillais等2011)。BRs诱导BRI1与BAK1相结合是通过最初的BRI1激酶活性的激活, 原因有三: 第一, 在突变体中, 失去激酶活性的BRI1在体内首先试验和体外实验中与

BAK1相结合都发生减弱(Nam和Li 2002; Li等2002);其次, BRs可以诱导激酶致死突变体中BAK1和野生型中的BRI1相结合,但是不能使野生型的BAK1与突变体中的BRI1相结合(Wang等2008);第三, BRs不能增加*bri1-1*突变体中BAK1的磷酸化程度,但是可以增加*bak1/bkk1*双突变体中BRI1的磷酸化程度,只是没有在野生型中磷酸化程度增加的高。更进一步的体外激酶活性实验表明, BRI1对于BAK1的磷酸化会增强自身底物肽的磷酸化。BRI1与BAK1相结合从而启动了细胞内的下游的BRs信号通路(Tang等2010)。

### 3 BRs下游的信号通路元件

BRs信号通路下游的元件主要包括GSK3/SHAGGY-like蛋白激酶BIN2、包含Kelch重复的磷酸酶BSU1、BRs应答蛋白激酶BSKs、转录因子BZR1和BZR2磷酸酶PP2A、受体细胞质激酶CDG1、BRI1激酶抑制因子1 BKI1、调控PP2A甲基化的SBI1等(图1)。下文将分别介绍各元件在信号通路中的功能。

### 3.1 BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2)与BSU1 (*bri1* SUPPRESSOR1 phosphatase)

糖原合成酶激酶3 (GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3)是一类具有高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶区域的激酶,参与一系列发育进程中的信号转导(Woodgett 2001)。油菜素内酯非敏感基因2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2, BIN2)就是一种GSK3类激酶。BIN2是BRs信号通路中的一个负调控因子。

通过特异的GSK3抑制剂氯化锂的检测,发现拟南芥中还有其他的GSK3参与BRs信号通路。在缺乏BRs的情况下, BIN2降低BES1和BZR1这两个高度相似的转录因子与DNA结合的能力,促进其向细胞质中转移,组成型激活BES1和BZR1的磷酸化,诱导BES1和BZR1结合14-3-3蛋白(He等2002; Yin等2002; Zhao等2002),使其最终受到蛋白质酶体的降解(He等2002; Yin等2002; Vert和Chory 2006; Bai等2007; Gampala等2007; Ryu等2007, 2010; Yan等2009)。BRs的存在会抑制BIN2的磷酸

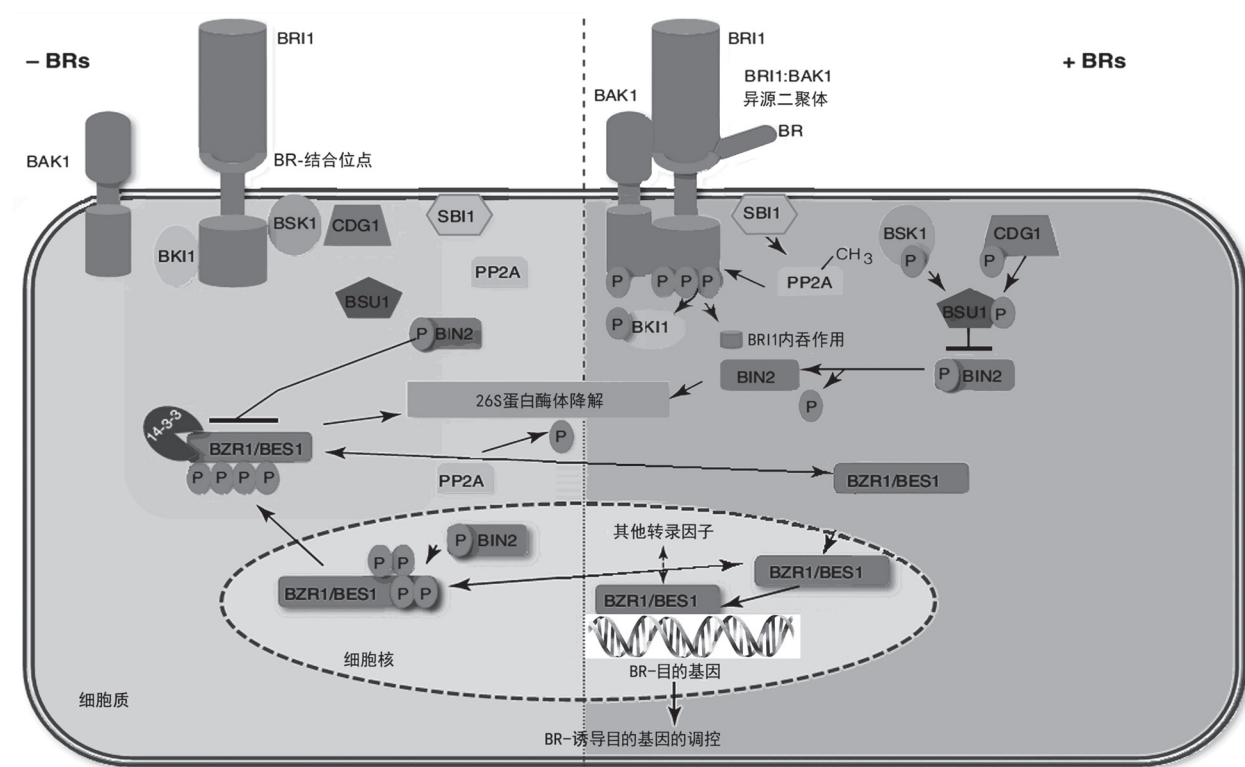


图1 BRs信号转导途径(参考Choudhary等2012)

Fig.1 BRs signal transduction pathway (Choudhary et al 2012)

化,引起这个反应的关键因子是BSU1。

真核生物中普遍存在着丝氨酸/苏氨酸特定位点的磷酸化蛋白质磷酸酶(phosphoprotein phosphatases, PPPs)。拟南芥的基因组编码26个PPP,主要起催化作用的亚单位包括type1型、type2A型和一些具有特殊的磷酸酶,其中有4个N末端包含Kelch重复区域(Farkas等2007)。BSU1是这样一种包含Kelch重复的磷酸酶。类似于PP1,BSU1只能被冈田软海绵酸抑制,但是对于PP1的抑制蛋白I-2并不敏感。BSU1定位在细胞核上。最初是从*bsul-1D*突变体中筛选得到(Mora等2004)。过量表达BSU1可以部分抑制*bin2*突变体的矮小表型。BRI1接受BRs可引起下游元件的去磷酸化以及转录因子BES1和BZR1的积累,这些元件都是BRs信号通路的正调控元件。BIN2位于BRI1的下游,通过磷酸化触发BES1的泛素化和蛋白酶体介导的降解。在*bsul-1D*突变体中,去磷酸化的BES1更加丰富。磷酸化的BIN2和BES1在体外实验中可以被BSU1去磷酸化。因此,BSU1通过对BES1的去磷酸化和激活来抑制BIN2的作用(Belkhadir和Chory 2006)。

### 3.2 BSKs (BR-signaling kinases)

BR信号通路激酶(BR-signaling kinases, BSKs)是BRI1激酶转导信号下游的元件。BSKs最初是通过膜蛋白进行蛋白质组学分析确定的。蛋白质组学鉴定了3个同源的BSK——BSK1、BSK2和BSK3 (Tang等2008)。体外实验中BSKs可以被BRI1磷酸化,在体内实验中能和BRI1相结合,基因组学和蛋白质组学证明,BSKs家族是BRI1下游激活BRs信号通路的一个小型激酶家族。

BSK1和BSK2的氨基酸有60%一致性,属于类受体细胞质激酶亚家族(receptor-like cytoplasmic kinase subfamily, RLCK-XII)。RLCK-XII亚家族在拟南芥中有12个蛋白,这类蛋白含有一个N末端的激酶结构域和C末端的4个三羧氨酸重复(tetra-tricopeptide repeat domains, TPR)结构域。TPR结构域的作用是介导蛋白质与蛋白质之间的互作,另外,TPR结构域在动物的脂类受体复合物中也是十分重要的元件。BSK1和BSK2不含有先前预测的跨膜结构域,但在N末端有肉豆蔻酰基位点(甘氨酸2, Gly2),这个位点介导了他们的膜定位。

体外激酶实验表明,是BRI1而非BAK1磷酸化了BSK1。通过质谱分析发现,BRI1磷酸化BSK1的丝氨酸230位点(Ser<sup>230</sup>),体内实验中也得到了同样的结果(Niittylä等2007)。然而,删除C末端的TPR结构域并不影响BRI1磷酸化BSK1, Ser<sup>230</sup>→Ala<sup>230</sup>突变体(S230A)降低了82%的磷酸化程度,这也证明了Ser<sup>230</sup>是BRI1磷酸化的主要位点。Ser<sup>230</sup>的磷酸化也会增加BSK1与BSU1的结合(Kim等2009; Tang等2008)。

BSKs和BAK1均为BRI1激酶的底物,但是与之不同的是BR诱导BAK1与BRI1结合,而降低BSK1、BSK3与BRI1的结合(Wang等2005)。过量表达BSK3可以抑制*bri1-116*无效等位突变,而过量表达BAK1只能抑制弱等位突变*bri1-5*和BRs生物合成突变*det2-1* (Li等2002)。这个结果表明,BSK3在BRI1下游发挥功能,而BAK1在BR下游的应答激活需要具有完整功能的BRI1,BAK1与其同源的BKK1有额外的特异信号通路,BAK1还是FLS2(一种鞭毛蛋白的受体)受体激酶的核受体,这些也暗示了BAK1不是BR信号通路中的特异元件(He等2007; Kemmerlin等2007; Chinchilla等2007)。相比于作为BR信号通路下游的特异元件,BAK1的作用更重要的是对于BRI1的激活。与之相反的是,BSK1直接介导从BRI1到下游BR应答的信号转导(Tang等2011)。

### 3.3 CDG1 (constitutive differential growth 1)

CDG1全名为组成型差异生长基因1(constitutive differential growth 1),属于RLCK VIIc家族。RLCK与跨膜的RLK结构同源,但是不含有胞外区和跨膜区(Shiu等2004)。

受体细胞质激酶CDG1是调节BRI1与BSU1间信号传导的重要元件。BRI1磷酸化CDG1,CDG1再继续磷酸化BSU1,从而调节信号传递。另外通过转基因的实验证明了CDG1与其同源基因CDL1都能积极地调控BRs信号转导途径和植物生长(Kim等2011)。

过表达*CDG1*基因(*CDG1-ox*)可以抑制BRs缺陷型突变体*det-2*的表型,*CDG1-ox*植株会降低对BRs合成抑制剂BRZ的敏感程度,降低BRs抑制的BZR1靶基因*DWF4*的表达,提高BRs诱导的BZR1靶基因*SAUR-AC1*的表达,使去磷酸化的BZR1蛋

白积累, 这些结果都可以表明CDG1正向调控BR信号通路。

CDG的激活依赖于BRI1的磷酸化。酵母双杂交实验表明, CDG1与BRI1的激酶结构域相结合, 但是BRI1的激酶结构域不与BSU1或BSL1结合。体外激酶实验表明, CDG1可被BRI1的激酶结构域强烈磷酸化, 但是不能被BAK1磷酸化, 质谱分析鉴定出了N末端的结构域中含有2个丝氨酸残基(S44和S47), 在激活环结构域鉴定出了1个丝氨酸残基(S234), 这些丝氨酸残基都是BRI1磷酸化CDG1的位点。这些残基在同源基因CDL1中同样保守, BRI1通过S230位点磷酸化BSK1, CDG的S234位点被该位点磷酸化。突变这三个位点都会显著地降低BRI1对于CDG1的转磷酸化, 因此可以证明BRI1磷酸化CDG1的这三个位点。

CDG1在体内和体外的实验中都可以和BSU1相结合, 免疫杂交实验中, GST-CDG1可以检测到MBP-BSU1的杂交, 酵母双杂交实验中, CDG1可以与BSU1和弱等位基因蛋白BSL1强烈地结合。通过BiFC分析发现, CDG1或CDL1与BSU1或BSL1结合, 但是不与BIN2相结合。免疫共沉淀的实验也同样证明了CDG1与BSU1结合。在转基因植株的实验中, BRs处理可以直接提高BSU1与CDG1的免疫共沉淀反应, 因此, BRs信号通路可以提高BSU1与CDG1的相结合(Kim等2011)。

CDG通过磷酸化BSU1的S764残基以激活BSU1。质谱分析免疫共沉淀蛋白确定BSU1的3个磷酸化位点(S395、S444和S764), S444和S764残基在BSU1的同系物中也得到了确认(Benschop等2007; Sugiyama等2008)。如果将S764位点替换成丙氨酸, 会强烈地降低CDG1和CDL1对于BSU1的磷酸化; 相反, 突变S395和S444的效果却不明显, 因此, 可以确定, CDG1和CDL1特异磷酸化S764残基。CDG1磷酸化BSU1的S764来启动BSU1对BIN2的去磷酸化, 去磷酸的BIN2停止对于BZR1的磷酸化(Kim等2011)。

### 3.4 BKI1 (BRI1 kinase inhibitor 1)

BRI1激酶抑制因子1 (BRI1 kinase inhibitor 1, BKI1)是BRs信号通路中的一个抑制因子, 氨基酸序列分析表明BKI1最保守的区域在C末端结构域, C末端结构域约占32%, 包含253~337的氨基酸残

基, 这是重要的特异结合BRI1的区域。

RNAi干涉的实验表明, 被干涉BKI1植株的下胚轴比对照组的长, 而BRs可以诱导下胚轴的伸长, 这个结果表明, BRI1负调控BRI信号通路。过量表达BKI1, 然后检测BRs应答相关基因的表达, 包括BRs信号通路中下调表达的两个基因*CPD*和*DWF4*和上调表达的*Saur-AC1*, 在缺乏BL时, 过量表达BKI1导致*CPD*和*DWF4*表达量上调, *Saur-AC1*表达量下调, 这表明了BKI1是BRs信号通路中的负调控因子。通过BKI1-YFP融合蛋白实验, 发现BKI1定位在细胞膜和细胞质中。施加BRs抑制剂BRZ220时, 荧光信号增强; 当施加BRs时, 细胞膜上的荧光信号减弱, 这也暗示了BRs能够调控BKI1在细胞膜上的定位(细胞膜上的荧光低除了蛋白定位的变化外, 也可能是蛋白降解导致蛋白总量减少造成的)(Sekimata等2002)。BRI1对于BKI1在细胞膜上的定位是不必要的, 但是对BKI1在细胞膜上的脱离很重要。因为BL能够诱导激活BRI1磷酸化BKI1, 磷酸化的BKI1对于调节其亚细胞定位以及与BRI1的联系是必要的。此外, 酵母双杂交的实验证明, BKI1与未经激酶激活的BRI1结合要比与激酶激活的BRI1结合力强。且细胞质膜上的BKI1与BRI1直接结合, 能抑制BRs信号通路。当缺乏油菜素甾醇化合物时, BKI1定位在细胞质膜上, 与BRI1的跨膜结构域形成异源二聚体, 可以使BRI1不与BAK1相结合。在缺乏BRs的情况下, BKI1与BRI1之间维持着较低的结合力, 而这个基本的结合力对下游的信号产生了抑制, 当BRs与BRI1的胞外结构域相结合时, 能够诱导受体的磷酸化和激活, 同时, BRI1与BKI1相互分离, 进而启动下游的信号转导(Wang和Chory 2006; He等2005; Tanaka等2005)。

### 3.5 PP2A (protein phosphatase 2A)和SBI1 (the suppressor of bri1-5)

BRs水平比较低时, 类GSK3激酶BIN2可以磷酸化BZR1转录因子, 这个磷酸化过程抑制BZR1活力, 从而抑制植物的生长。蛋白质磷酸酶2A (PP2A)是一种BZR1结合蛋白, 在BRs信号通路中主要作用是对BZR1进行去磷酸化作用, 去磷酸化激活的BZR1协助完成BRs信号通路核心组件的装配, 信号由细胞表面的受体激酶进入细胞核中启

动对基因的调控。

用质谱对PP2A的肽段进行分析, PP2A包括PP2A-A亚基、PP2A-B亚基(PP2A-B' $\alpha$ 、PP2A-B' $\beta$ 和PP2A-B' $\theta$ )、PP2A-C亚基等。PP2A是一种异源三聚体丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 包括起催化作用C亚基、一个scaffolding A亚基和一个决定底物特异性和PP2A亚细胞定位起调控作用的B亚基。C亚基的活性位点可以募集相邻的底物, B亚基为这个过程提供了一个凹面。重组的PP2A-B' $\alpha$ 结合磷酸化BZR1的能力比非磷酸化的BZR1强得多, BZR2与PP2A的A和C亚基也可以结合。BZR1与B'亚基的相结合启动了BZR1与PP2A的全酶相结合, 包括A、B'、C亚基。

过量表达PP2A可以增加BZR1的活性, 同时可以抑制BRs非敏感突变体的表型。BZR1的去磷酸化和植物的生长都依赖于PP2A的活力。PP2A与BZR1的结合需要BZR1的PEST结构域, 这个结构域对于BRs体内诱导BZR1的去磷酸化十分必要。PP2A对BZR1的去磷酸化可以阻止BZR1与14-3-3蛋白相结合, 进而不能被26S蛋白酶体降解(Tang等2011)。

细胞表面受体向胞内转移, 返回细胞膜被降解, 对于受体的动态平衡和信号的传递是非常重要的。PP2A可以对BRI1去磷酸化, 增加BRI1的积累。BRs可以诱导*SB11* (*bri1-5*突变体抑制基因, the suppressor of *bri1-5*) mRNA的转录和翻译。

*SB11*编码一个亮氨酸羧基甲基转移酶(LCMT)。LCMT可以甲基化PP2A, 控制PP2A膜结合的亚细胞定位。BRs增加*SB11*的产量, 甲基化PP2A, 促进PP2A与激活的BRI1结合, 导致BRI1的去磷酸化的降解进而终止BRs信号通路。*bri1-5*抑制性突变体验证了*SB11*是BRI1降解的正调控因子, 是BRs信号通路的负调控因子。*SB11*调控BRs信号通路的激活, 调控激酶激活的BRI1的丰度, 但是不直接钝化BRI1。

PP2A的C亚基是已知的唯一LCMTs的底物, PP2A-C亚基的可逆性甲基化是PP2A功能保守的调控机制。PP2A-C亚基的C末端亮氨酸甲基化会增加PP2A-A亚基, PP2A-C亚基等组成PP2A合酶关键元件对于其他组件的亲合力。PP2A的甲基化调控其亚细胞定位和其底物的特异性。PP2A可以

对BRI1去磷酸化, 降低BRI1的丰度(Wu等2011)。

因此, PP2A是BRs信号通路中作为“开关”, 保持动态平衡的关键因子。PP2A对下游的BZR1, BES1去磷酸化, 可以使BZR1和BES1进入细胞核内, 调节植物生长发育。同时PP2A还对BRI1进行去磷酸化调节激活的BRI1钝化和BRI1的降解, PP2A在BRs信号通路的上游起负调控的作用, 而在下游起正调控的作用, 使BRs信号通路保持动态平衡。

### 3.6 BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1)和BES1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1)

油菜素唑耐受因子1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1, BZR1)和BRI EMS抑制因子1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1, BES1)是BRs信号转导的关键因子。BZR1和BES1受到BIN2的调控(Choe等2002; Nam和Li 2002), BES1和BZR1的磷酸化状态的转化控制BRs信号的激活。通过核转运, 蛋白质稳定, 超磷酸化到去磷酸化的迁移可以推断出BRs信号可以诱导PP2A对BZR1和BES1的去磷酸化, 使BZR1和BES1在细胞核内积累(He等2002; Wang等2002; Yin等2002)。

BZR1是一种核蛋白, 其亚细胞分布与BIN2的活力相关。当共表达BIN2时, BZR1定位于细胞质。当施加BRs和共表达BRI1时, BZR1定位于细胞核, BZR1的定位也同它的磷酸化状态有关。丝氨酸-173 (Ser-173)位点和苏氨酸-177 (Thr-177)对于核输出的BZR1结合14-3-3蛋白是十分重要的(Ryu等2007)。

BES1与BZR1在BRs信号通路中的作用相类似。BES1含有12个预测的磷酸化位点, 其中的两个位点丝氨酸-171 (Ser-171)位点和苏氨酸-175 (Thr-175)是结合14-3-3蛋白的重要位点。BES1的N末端结构域上也含有潜在的磷酸化位点, 这个磷酸化位点是BIN2调节核输出BES1必要的。BES1在细胞核中的积累可以增强BRs的应答(Ryu等2010)。

### 4 BRs信号转导途径

当BRs缺乏时, BKI1、BSK1与BRI1相结合, *SB11*定位在细胞质膜上, 磷酸化的BIN2在细胞核内磷酸化BZR1和BES1, 磷酸化的BZR1和BES1向细胞质内输出, 结合14-3-3蛋白, 进而被26S蛋白酶

体降解(图1)。

当BRs与BRI1相结合时, BKI1、BSK1磷酸化后与BRI1脱离, BAK1与BRI1结合, BRI1自体磷酸化后与BAK1相互磷酸化, 进而BSK1、CDG1磷酸化BSU1, 激活的BSU1对BIN2进行去磷酸化使其钝化。同时SB1甲基化PP2A, 钝化的BIN2不能磷酸化BZR1和BES1, 而PP2A对BZR1和BES1去磷酸化, 使激活的BZR1和BES1在细胞核内积累, 调控核内基因和植物的生长发育。同时PP2A可以使BRI1去磷酸化和降解, 使整个BRs信号通路形成一个动态的平衡, PP2A在这个信号通路中起到了开关的作用(图1)。

BRs信号通路是一个连续的磷酸化的过程, 磷酸化修饰是蛋白质活性的重要的修饰, 在信号传递中起到了决定性的作用。

## 5 展望

BRs信号转到途径是现今研究的比较透彻的植物信号通路。受体接收脂类信号通过逐级磷酸化将信号由细胞质膜上的受体传递到细胞核中, 信号通路中的转录因子控制核内信号转导, 启动下游的应答和生长发育进程。BRs信号转到途径是植物信号转到途径中的代表模型, 通过研究BRs信号转到途径, 可以作为研究其他植物信号转到途径的重要借鉴。BRs信号转到途径中的磷酸化是受体的重要修饰方式。BRs信号通路中还有若干转录因子未发现, 而BRs信号控制植物生长发育的机制到现在还没有完全研究透彻, 对于BRs信号转导因子, 信号传递机制, 对植物生长调控机制还有待进一步研究。

## 参考文献

- Adams JA (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev*, 101: 2271~2290
- Bai MY, Zhang LY, Gampala SS, Zhu SW, Song WY, Chong K, Wang ZY (2007). Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (34): 13839~13844
- Belkhadir Y, Chory J (2006). Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science*, 314 (5804), 1410~1411
- Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke FL (2007). Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*, 6: 1198~1214
- Blatt MR, Armstrong F (1993).  $K^+$  channels of stomatal guard cells: abscisic-acid-evoked control of out-ward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta*, 191: 330~341
- Braybrook SA, Kuhlemeier C (2010). How a plant builds leaves. *Plant Cell*, 22: 1006~1018
- Caesar K, Elgass K, Chen Z, Huppenberger P, Witthöft J, Schleifenbaum F, Blatt MR, Oecking C, Harter K (2011). A fast brassinolide regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 66: 528~540
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Boller T (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448 (7152): 497~500
- Choe S, Schmitz RJ, Fujiok S, Takatsuto S, Lee MO, Yoshida, S, Feldmann, KA, Tax FE (2002). *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive *dwarf12* mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -like kinase. *Plant Physiol*, 130: 1506~1515
- Choudhary SP, Yu JQ, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012). Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trend Plant Sci*, 17 (10): 594~605
- Clouse SD (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell*, 23: 1219~1230
- Cosgrove DJ (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 850~861
- Elgass K, Caesar K, Schleifenbaum F, Stierhof YD, Meixner AJ, Harter K (2009). Novel application of fluorescence lifetime and fluorescence microscopy enables quantitative access to subcellular dynamics in plant cells. *PLoS ONE*, 4: e5716. doi:10.1371/journal.pone.0005716
- Farkas I, Dombradi V, Miskei M, Szabados L, Koncz C (2007). *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci*, 12 (4): 169~176
- Gampala SS, Kim TW, He JX, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Wang ZY (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 13 (2): 177~189
- Gonzalez Garcia MP, Vilarrasa Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora Garcia S, Russinova E, Cano Delgado AI (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development*, 138: 849~859
- Hacham Y, Holland N, Butterfield C, Ubeda Tomas S, Bennett MJ, Chory J, Savaldi GS (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development*, 138: 839~848
- Halliday KJ (2004). Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr Biol*, 14 (23): R1008~R1010
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Sci Signal*, 307 (5715): 1634~1638
- He JX, Gendron JM, Yang YL, Li JM, Wang ZY (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a posi-



- tive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 10185~10190
- He K, Gou X, Yuan T, Lin H, Asami T, Yoshida S, Li J (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. Curr Biol, 17 (13): 1109~1115
- Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, Dabi T, Noel JP, Wilson IA, Chory J (2011). Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. Nature, 474: 467~471
- Jaillais Y, Belkhadir Y, Balsemao-Pires E, Dangl JL, Chory J (2011). Extracellular leucine-rich repeats as a platform for receptor/coreceptor complex formation. Proc Natl Acad Sci USA, 108: 8503~8507
- Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Qamar SA, Nürnberg T (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. Curr Biol, 17 (13): 1116~1122
- Kim TW, Guan S, Burlingame AL, Wang ZY (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. Mol Cell, 43 (4): 561~571
- Kim TW, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, Shang JX, Wang ZY (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. Nat Cell Biol, 11 (10): 1254~1260
- Kim TW, Wang, ZY (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. Annu Rev Plant Biol, 61: 681~704
- Li J (2005). Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors. Curr Opin Plant Biol, 8: 526~531
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. Cell, 110 (2): 213~222
- Mora GS, Vert G, Yin Y, Caño DA, Cheong H, Chory J (2004). Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. Genes Dev, 18 (4): 448~460
- Nam KH, Li J (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. Cell, 110 (2): 203~212
- Nemhauser JL, Mockler TC, Chory J (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. PLoS Biol, 2 (9): 1460~1471
- Niittylä T, Fuglsang AT, Palmgren MG., Frommer WB, Schulze WX (2007). Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of *Arabidopsis*. Mol Cell Prot, 6 (10): 1711~1726
- Oh MH, Wang X, Wu X, Zhao Y, Clouse SD, Huber SC (2010). Auto-phosphorylation of Tyr-610 in the receptor kinase BAK1 plays a role in brassinosteroid signaling and basal defense gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 107: 17827~17832
- Oh MH, Wu X, Clouse SD, Huber SC (2011). Functional importance of BAK1 tyrosine phosphorylation *in vivo*. Plant Signal Behav, 6 (3): 400~405
- Ryu H, Cho H, Kim K, Hwang I (2010). Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. Mol Cells, 29 (3): 283~290
- Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. Plant Cell, 19 (9): 2749~2762
- Sánchez RC, Rubio SI, Sibout R, Persson S (2010). Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. Trends Plant Sci, 15 (5): 291~301
- Scacchi E, Salinas P, Gujas B, Santuari L, Krogan N, Ragni L, Berleth T, Hardtke C (2010). Spatio-temporal sequence of cross-regulatory events in root meristem growth. Proc Natl Acad Sci USA, 107: 22734~22739
- Sekimata K, Uzawa J, Han, SY, Yoneyama K, Takeuchi Y, Yoshida S, Asami T (2002). Brz220 a novel brassinosteroid biosynthesis inhibitor: stereochemical structure-activity relationship. Tetrahedron: Asymmetry, 13 (17): 1875~1878
- She J, Han Z, Kim TW, Wang J, Cheng W, Chang J, Chai J (2011). Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. Nature, 474 (7352): 472~476
- Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Mayer KF, Li WH (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. Plant Cell, 16: 1220~1234
- Spanswick RM (1972). Electrical coupling between cells of higher plants: a direct demonstration of intercellular communication. Planta, 102: 215~227
- Speth C, Jaspert N, Marcon C, Oecking C (2010). Regulation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by its C-terminal domain: what do we know for sure? Eur J Cell Biol, 89: 145~151
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. Mol Sys Biol, 4 (1): 1~7
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu S, Oh E et al (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. Dev Cell, 19: 765~777
- Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2005). Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. Plant Physiol, 138 (2): 1117~1125
- Tang W, Deng Z, Wang ZY (2010). Proteomics shed light on the brassinosteroid signaling mechanisms. Curr Opin Plant Biol. 13 (1): 27~33
- Tang W, Kim TW, Osés-Prieto JA, Sun Y, Deng Z, Zhu S, Wang ZY (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. Sci Signal, 321 (5888): 557~560
- Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Osés-Prieto JA, Wang ZY (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. Nature Cell Biol, 13 (2): 124~131
- Vert G, Chory J (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. Nature, 441 (7089): 96~100

- Wang X, Chory J (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Sci Signal*, 313 (5790): 1118~1122
- Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Clouse SD (2005). Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell*, 17 (6): 1685~1703
- Wang X, Kota U, He K, Blackburn K, Li J, Goshe MB, Huber SC, Clouse SD (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell*, 15: 220~235
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*, 2: 505~513
- Witthöft J, Caesar K, Elgass K, Huppenberger P, Kilian J, Schleifenbaum F, Oecking C, Harter K (2011). The activation of the *Arabidopsis* P-ATPase 1 by the brassinosteroid receptor BRI1 is independent of threonine 948 phosphorylation. *Plant Signal Behav*, 6: 1063~1066
- Witthöft J, Harter K (2011). Latest news on *Arabidopsis* brassinosteroid perception and signaling. *Frontier Plant Sci*, 2: 1~4
- Woodgett JR (2001). Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci Signal*, (100): 1~11
- Wu G, Wang X, Li X, Kamiya Y, Otegui MS, Chory J (2011). Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. *Sci Signal*, 4 (172): 1~11
- Yan Z, Zhao J, Peng P, Chihara RK, Li J (2009). BIN2 functions redundantly with other *Arabidopsis* GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*, 150 (2): 710~721
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109 (2): 181~191
- Zhao J, Peng P, Schmitz RJ, Decker AD, Tax FE, Li J (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*, 130 (3): 1221~1229