

CDPKs在植物适应非生物胁迫过程中的调节作用

刘亚茹, 吕丽莎, 程瑾, 司婧娜, 赵瑞*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: CDPKs (calcium-dependent protein kinases, CDPKs)在植物适应非生物胁迫过程中发挥了重要作用, CDPK家族成员众多, 在植物种间分布广泛, 并且定位于不同的细胞器中。CDPKs是植物细胞钙信号转导的重要感受器, 通过作用于多种多样的互作底物, 参与植物对干旱胁迫、盐胁迫和低温胁迫的适应。在分子水平上, CDPKs通过磷酸化调节不同的底物蛋白的活性, 进而实现基因表达调控、离子平衡调控和活性氧平衡调控, 从而发挥各自的生物学功能。本文综述了CDPKs在植物逆境信号网络中的功能, 并对将来的研究方向进行论述。

关键词: 钙依赖型蛋白激酶(CDPK); 非生物胁迫; 信号转导

Mechanism of CDPKs in Plant Adaptation to Abiotic Stress

LIU Ya-Ru, LÜ Li-Sha, CHENG Jin, SI Jing-Na, ZHAO Rui*

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: CDPKs (calcium-dependent protein kinases) play important role in plant adaptation to abiotic stress, the CDPKs constitute a large gene family, and distribute in different plant species, the CDPK members localize to various sub-cellular spaces. CDPKs are important calcium sensors in plant cells, they interact with numbers of substrates, involve in plant adaptation to drought stress, salt stress and cold stress. The mechanism of CDPKs regulate plant stress tolerance are gene expression regulation, ion balance regulation and ROS balance regulation. Here, we review the recent advances on the functions of CDPKs in stress signaling networks, and discuss the potential research aspects in the future.

Key words: CDPK; abiotic stress; signal transduction

植物在生长发育过程中, 经常遭受生物胁迫和非生物胁迫。在长期的进化过程中, 植物形成了复杂而又精细的信号转导途径, 从而保护自身免受胁迫伤害。植物感知原初信号后(比如干旱胁迫和盐胁迫), 会把细胞外的刺激转变为细胞内的信号分子, 通过一系列信号转导过程, 最终引发细胞乃至植物整体的生理反应。在植物细胞的信号转导过程中, 钙离子(Ca^{2+})是最重要最保守的第二信使, 它在植物生长发育和感知环境刺激的过程中, 扮演了非常重要的角色(Sanders等2002; Hepler 2005)。环境胁迫信号会导致细胞质内 Ca^{2+} 浓度的升高, 从而激活细胞内 Ca^{2+} 的感知系统, 诱导产生 Ca^{2+} 信号转导过程, 最终在细胞水平、组织水平、器官水平、个体水平乃至群体水平产生可以观察到的生理效应。 Ca^{2+} 信号的转导开始于细胞内 Ca^{2+} 特异性结合蛋白对 Ca^{2+} 的感知, 本文将重点阐述植物体内一类重要的 Ca^{2+} 结合蛋白, 钙依赖型蛋白激酶(calcium dependent protein kinase, CDPK)进行 Ca^{2+} 信号转导的机制, 以及多种CDPKs参与植物响

应非生物胁迫过程中的生物学功能。

1 植物体内 Ca^{2+} 信号的感知与转导

植物体内有三类蛋白质能够与 Ca^{2+} 特异性结合, 并进行信号转导。它们分别是钙调素(calmodulin, CAM)、钙调神经磷酸酶B蛋白(calcineurin B-like protein, CBL)、钙依赖型蛋白激酶(calcium dependent protein kinase, CDPK) (Zielinski 1998; Cheng等2002; Luan等2002; Harper等2004; Bouche等2005)。CAM或CBL与 Ca^{2+} 结合后, 会进一步和下游蛋白互作进行信号传递, 与CAM或CBL不同的是, CDPK能够以一条肽链的形式, 完成 Ca^{2+} 的感知与转导。CDPK与 Ca^{2+} 结合后, 将直接把 Ca^{2+} 信号转换成磷酸化信号, 这一过程并不需要其他蛋

收稿 2015-05-26 修定 2015-08-21

资助 国家基础科学人才培养基金(J1103516)、中央高校基本科研业务费专项资金(TD2012-04)、国家自然科学基金(31200207)、长江学者和创新团队发展计划(IRT13047)和北京林业大学青年科技启动基金(BLX005)。

* 通讯作者(E-mail: ruizhao@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62338129)。

白质的参与(Cheng等2002; Ludwig等2004; Harper和Harmon 2005)。

2 CDPKs的结构和时空分布

CDPKs广泛存在于原生动物(纤毛虫)、绿藻和被子植物中(Harmon等2001),在酵母、线虫、果蝇、小鼠和人中没有发现CDPKs(Harmon等2000; Cheng等2002; Hrabak等2003)。其中,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有34个成员(Harmon等2000; Cheng等2002; Hrabak等2003),水稻(*Oryza sativa*)中有29个成员(Asano等2005),小麦(*Triticum aestivum*)中有20个成员(Li等2008),毛果杨(*Populus trichocarpa*)中有30个成员(Zuo等2013),黄瓜(*Cucumis sativus*)中有19个成员(Xu等2015)

CDPK家族各成员间的蛋白结构比较保守,均有4个结构域: N端可变域(N-terminal variable domain)、丝氨酸/苏氨酸激酶域(protein kinase domain)、自抑制域(auto-inhibitory domain)和类钙调素结合域(calmodulin-like domain)(Cheng等2002)。CDPK是由一个编码CaMK的基因与一个编码钙调素的基因在进化中融合而形成的(Harmon等2000)。CDPKs的激酶域是典型的丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶催化高度保守序列(Hanks和Hunter 1995)。自抑制域富含碱性氨基酸残基,它起到伪底物的作用,能与激酶域结合从而抑制自身的活性(Harmon等1994)。类钙调素结合域含有与Ca²⁺结合的EF手型结构,以此作为Ca²⁺的感受器。每个EF手型结合一个钙离子后,能够解除自抑制域对自身的抑制效应,从而使激酶具有催化活性(Zhang和Yuan 1998)。大多数CDPKs在N端具有一个豆蔻酰化位点(甘氨酸残基G)和棕榈酰化位点(半胱氨酸残基C),这两种翻译后修饰能引导CDPKs定位在细胞膜上(Terminator, <http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator2/index.html>)。

CDPKs不仅能够锚定在细胞膜上,在其他细胞空间也观察到了CDPKs的定位信号,比如: 细胞质、细胞核、内质网、液泡、线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等(Martin和Busconi 2000; Lu和Hrabak 2002; Dammann等2003; Chehab等2004; Raichaudhuri等2006; Kumar等2014)。与非生物胁迫紧密相关的CDPKs,定位在多种亚细胞空间中。拟南芥AtCPK10定位在细胞膜上(Zou等2010),而胡

杨PeCPK10在细胞质与细胞核中定位(Chen等2013)。AtCPK4和AtCPK11位于细胞质与细胞核中(Zhu等2007), AtCPK12同样具有细胞质与细胞核两种定位信号(Zhao等2011)。AtCPK32不仅定位于细胞核中,而且在细胞膜上也有分布(Choi等2005)。AtCPK21和AtCPK23都定位在细胞膜上(Geiger等2010; Franz等2011), AtCPK27同样是一个细胞膜定位的蛋白激酶(Zhao等2015)。AtCPK3和AtCPK6的空间定位比较广泛,它们在细胞膜、细胞质、液泡膜和细胞核中都有分布(Mehlmer等2010; Xu等2010)。AtCPK8位于细胞膜上(Zou等2015)。水稻的OsCPK4在细胞膜上定位(Campo等2014)。葡萄果实中ACP1位于细胞膜和叶绿体上(Yu等2007)。玉米ZmCPK4定位于细胞膜上(Jiang等2013),而ZmCPK11定位于细胞质与细胞核中(Ding等2013)。在转录水平上,CDPKs基因能够被一些胁迫信号或植物激素诱导表达,比如低温、高温、干旱、盐和脱落酸(abscisic acid, ABA)。在翻译后修饰水平上,ABA和低温诱导能够提高一些CDPKs的激酶活性,CDPKs激酶活性的升高主要依赖于其磷酸化水平的提高,比如,体外磷酸化实验证明,ABA能够提高葡萄果实ACP1、拟南芥AtCPK4和AtCPK11的自磷酸化水平,从而导致这三种CDPKs活性的增强,并且,ABA对ACP1、AtCPK4和AtCPK11的激活既有时间效应,又具有浓度效应(Yu等2007; Zhu等2007)。CDPKs磷酸化水平的提高,是由自磷酸化造成的,还是由其它蛋白激酶磷酸化引起的?这一问题还需要进一步的论证。CDPKs分布的广泛性和亚细胞定位的多样性,预示着CDPKs具有非常重要的生物学功能,并且具有多种多样的互作底物蛋白。

3 CDPKs参与干旱胁迫和盐胁迫信号转导

ABA是一种重要的逆境激素,CDPKs参与了由ABA调节的植物对干旱和盐胁迫的响应过程。在拟南芥中,AtCPK10能够被干旱和高盐胁迫诱导表达(Urao等1994),AtCPK10的T-DNA插入突变体cpk10与野生型相比,对干旱胁迫非常敏感,而AtCPK10过表达株系的抗旱能力显著提高。AtCPK10能够和一个热激蛋白(heat shock protein)HSP1互作,HSP1的基因敲除突变体hsp1在干旱胁迫下具有与cpk10相似的表型(Zou等2010)。ABA和H₂O₂

两种信号分子以及干旱胁迫能够促进*AtCPK8*的表达, *AtCPK8*的突变体与野生型相比对于干旱胁迫更加敏感, 而过表达*AtCPK8*的转基因株系具有更强的干旱胁迫耐受能力(Zou等2015)。

*AtCPK4*和*AtCPK11*的单突变体在种子萌发、幼苗生长和气孔运动方面, 对ABA脱敏, 盐胁迫处理后, 它们的单突变体在种子萌发上对NaCl脱敏, 而在幼苗生长方面, 对NaCl超敏。它们的双突变体与单突变体相比, 对ABA和NaCl具有更加明显的表型。*AtCPK4*和*AtCPK11*的过表达株系提高了对ABA的敏感程度。*AtCPK4*和*AtCPK11*的T-DNA插入突变体对于干旱胁迫非常敏感, 而它们的过表达株系具有更高的保水能力。*AtCPK4*和*AtCPK11*能够磷酸化两个响应ABA的转录因子, ABF1和ABF4 (ABA responsive binding factor)。以上研究结果表明, 在ABA和干旱胁迫信号转导过程中, *AtCPK4*和*AtCPK11*是两个重要的正向调节因子(Zhu等2007)。*AtCPK12*是*AtCPK4/11*的同源近似物, *AtCPK12*的RNAi和过表达突变体在种子萌发和幼苗生长阶段对ABA超敏, *AtCPK12*能够分别磷酸化ABA信号通路中的正向调节因子和负向调节因子, 其中, 正向调节因子是ABF1和ABF4, 负向调控因子是ABI2 (ABA insensitive 2) (Zhao等2011a, b)。

*AtCPK32*能够被高盐胁迫诱导表达, *AtCPK32*的过表达株系在种子萌发过程中对ABA和NaCl敏感。它通过磷酸化ABF4来调节响应ABA的基因表达(Choi等2005)。*AtCPK23*的T-DNA插入突变体*cpk23*与野生型相比, 对于干旱和盐胁迫具有更强的耐受能力, 而过表达*CPK23*的植株对于干旱和盐胁迫很敏感。*cpk23*突变体中气孔开度变小, 而过表达植株气孔开度增加, 与野生型相比, *cpk23*突变体中K⁺含量在高盐条件下没有降低, 说明CPK23可能参与调控植物对K⁺的吸收(Ma和Wu 2007)。另外, CPK23和CPK21通过调控离子通道SLAC1 (slow anion channel-associated 1)参与ABA对气孔运动的控制过程。缺水条件下, 植物合成ABA并将其运送到保卫细胞中, ABA与胞质中PYR (pyrabactin resistance)/PYL (PYR-like)/RCAR (regulatory component of ABA receptor)型ABA受体结合后解除ABI1对OST1 (open stomata 1)、CPK23、CPK21的抑制, SLAC1被CPK21和CPK23磷酸化后激活,

SLAC1释放阴离子使膜电位去极化, 去极化激活了钾离子通道GORK, 从而使保卫细胞释放阴离子和K⁺, 保卫细胞水势升高, 发生失水, 这一过程最终使气孔关闭, 阻止了水分的散失(Geiger等2010; Franz等2011)。*AtCPK27*的表达受到NaCl的诱导, *AtCPK27*是一个质膜定位的蛋白激酶, *AtCPK27*的T-DNA插入突变体, *cpk27-1*与野生型Col相比, 在种子萌发和幼苗生长过程中对NaCl超敏感, *AtCPK27*有可能正向调节盐胁迫信号转导过程(Zhao等2015)。

盐胁迫处理能够提高*AtCPK3*的激酶活性, *AtCPK3*的T-DNA插入突变体, *cpk3-1*和*cpk3-2*在种子萌发上对NaCl超敏, 而另一个T-DNA插入突变体*cpk3-3*, 由于插入位点位于启动子区导致*AtCPK3*的表达量升高, 所以*cpk3-3*在NaCl培养基上的萌发率高于野生型(Mehlmer等2010)。干旱和盐胁迫能够诱导*AtCPK6*的表达, 在野生型拟南芥中过表达*AtCPK6*能够提高植物的抗旱和耐盐能力, 但是*AtCPK6*的T-DNA插入突变体在干旱和盐胁迫处理下和野生型没有显著差异, 这说明*AtCPK6*与其他CDPK成员存在功能冗余现象(Xu等2010)。

在水稻中, *OsCPK13/OsCDPK7*能够被低温和盐胁迫诱导表达, 将*OsCPK13/OsCDPK7*在水稻中过表达, 能够增强水稻的抗旱耐盐能力(Saijo等2000, 2001)。ABA和高盐胁迫能够迅速诱导*OsCPK21*的表达, 在高盐环境中, 过表达*OsCPK21*的水稻存活率高于野生型, 过表达*OsCPK21*水稻的生长受到ABA的抑制程度更加强烈。*OsCPK21*是ABA和盐胁迫信号转导过程中的正向调节因子(Asano等2011)。ABA和盐胁迫在转录水平上, 没有显著诱导*OsCPK12*表达, *OsCPK12*的*Tos17*插入突变体和RNAi株系对NaCl更加敏感, 并且积累更多的H₂O₂; 而*OsCPK12*的过表达株系具有较强的耐盐性, 同时体内H₂O₂含量很低。*OsCPK12*的过表达株系对ABA超敏, 但是*OsCPK12*的*Tos17*插入突变体和RNAi株系经过ABA处理后, 它们的长势和野生型没有区别, 这可能是由于在ABA信号通路上, *OsCPK12*与水稻中其它CDPK存在功能冗余现象(Asano等2012)。*OsCPK9*的表达受到ABA、PEG6000和NaCl的诱导。过表达*OsCPK9*的转基因水稻在干旱胁迫下生长良好, *OsCPK9*的RNAi株

系在相同的处理条件下生长发育受阻。在水稻中过表达*OsCPK9*提高了植株对ABA的敏感程度,然而*OsCPK9*的RNAi突变体对ABA的表型并不敏感。*OsCPK9*可以通过促进气孔关闭而提高植物的抗旱性,它是植物耐受非生物胁迫过程中的正向调节因子(Wei等2014)。*OsCPK4*的表达受到高盐胁迫、干旱胁迫和ABA的诱导,过表达*OsCPK4*增强了水稻抵抗盐胁迫和干旱胁迫的能力(Campo等2014)。

葡萄果实中的ACPK1受到ABA的激活(Yu等2006),将ACPK1异源表达于拟南芥中,在种子萌发和幼苗生长阶段提高了转基因拟南芥对ABA的敏感程度,同时也提高了转基因拟南芥的抗旱保水能力(Yu等2007)。用ABA和NaCl处理玉米后,*ZmCPK4*的表达会受到下调,将*ZmCPK4*在拟南芥中表达后,在种子萌发和幼苗生长方面,提高了转基因拟南芥对ABA的敏感程度,同时也提高了植物的抗旱性(Jiang等2013)。ABA能够诱导*ZmCPK11*的表达,并且提高*ZmCPK11*的激酶活性,在玉米原生质体中,通过瞬时基因表达技术和瞬时RNAi技术发现,*ZmCPK11*参与了ABA诱导的抗氧化防御反应过程,*ZmCPK11*诱导了*SOD4*和*cAPX*的表达及其蛋白酶学活性的调节,并且,在ABA信号转导过程中,*ZmCPK11*位于*ZmMPK5*的上游(Ding等2013)。

4 CDPK参与植物对低温胁迫的适应过程

Ca²⁺介导了早期低温诱导的关键转录调节因子低温响应元件结合蛋白(cold-responsive element-binding factors, CBFs)的表达,一些与CaM互作的转录激活因子(CaM-interacting transcription activators, CAMTAs)能够和CBF2的启动子结合,*camta3*突变体无法诱导CBF1和CBF2的表达。*camta1*和*camta3*双突变体对低温敏感的表型说明CAMTAs在低温激活的Ca²⁺信号通路中具有重要调节功能(Doherty等2009)。水稻中的*OsCPK13/OsCDPK7*能够被低温胁迫诱导表达,将*OsCPK13/OsCDPK7*在水稻中过表达能够提高水稻的抗冷性,但是*OsCPK13/OsCDPK7*并没有影响到响应低温的下游基因的表达(Saijo等2000)。将*OsCPK7/OsCDPK13*过表后提高了水稻的抗冷能力,促进了伴侣蛋白钙网织蛋白的积累(Abbasi等2004; Komatsu等

2007)。在低温胁迫下,AtCPK1调节了植物细胞的磷酸化状态(Bohmer和Romeis 2007)。低温胁迫处理18~24 h后,定位于水稻膜系统上的一个CDPK被激活,说明CDPK也参与到植物对低温胁迫的长期适应过程(Martin和Busconi 2001)。低温能够诱导胡杨*PeCPK10*的表达,将*PeCPK10*在拟南芥中异源表达,能够提高转基因拟南芥抵御低温的能力(Chen等2013)。低温胁迫下,玉米*ZmCPK1*的表达受到上调,而*ZmCPK25*受到下调,具有活性的*ZmCPK1*能够抑制冷胁迫诱导的*Zmerf3*的表达,所以,*ZmCPK1*可能是冷胁迫信号途径中的负向调节因子(Weckwerth等2015)。以上研究结果清楚的证明CDPK参与了植物对低温胁迫的适应,但是它们在低温胁迫中的生物学功能和作用机制还有待于进一步研究。

5 CDPKs调节植物响应非生物胁迫的分子机制

5.1 基因表达调控

CDPKs通过磷酸化激活转录因子,受到激活的转录因子调节响应逆境的基因表达。拟南芥AtCPK4/11能够磷酸化ABF1和ABF4来调节植物抗旱过程(Zhu等2007)。AtDi19也是AtCPK4/10/11/16的作用底物,它是转录激活因子,参与调节植物盐胁迫、干旱胁迫和ABA信号转导过程(Milla等2006; Curran等2011)。AtCPK32通过磷酸化激活ABF4参与ABA信号转导,ABF4第110位丝氨酸残基是AtCPK32的磷酸化靶位点(Choi等2005)。在拟南芥CDPK基因的突变体中,很多基因的表达都受到了影响,在*cpk4-1*和*cpk11-2*的单突变和双突变体中,ABF1、ABF2、ABF4、ABI4、ABI5、RAB18、KIN1、KIN2和ERD10的表达都被调低了,而在AtCPK4和AtCPK11的过表达突变体中,这些基因的表达又被调高了,所以,AtCPK4和AtCPK11可能通过促进这些基因的表达而参与植物对逆境胁迫的响应过程(Zhu等2007)。在AtCPK12 RNAi突变体中,ABA响应基因ABI5、ABF1、ABF2、DREB1A、ERD10、KIN1、KIN2和RD29A的表达量升高,从而使AtCPK12 RNAi突变体表现出对ABA超敏感,推测AtCPK12通过抑制这些基因的表达参与ABA信号转导过程(Zhao等2011a, b)。

5.2 离子平衡调节和渗透调节

植物遭受盐胁迫伤害时,在细胞水平上,会通

过限制Na⁺的内流、促进Na⁺的外排,将Na⁺区隔化至液泡以及促进K⁺的内流来调节K⁺/Na⁺平衡(Zhu 2003; Adams和Shin 2014; Polle和Chen 2014)。当植物感知干旱胁迫时,通过调节叶肉细胞和保卫细胞中渗透调节物质的含量来改变细胞水势,从而提高叶肉细胞的保水能力,促进气孔关闭(Zhu 2002)。

ABA和Ca²⁺能够抑制内向型K⁺通道KAT1和KAT2的活性,AtCPK10可以通过调节内向型K⁺通道的活性,参与气孔的运动过程,直接的试验结果证明,在拟南芥*cpk10*突变体中,ABA和Ca²⁺处理都无法抑制K⁺的内流(Zou等2010)。AtCPK13通过独立于ABA的信号途径来调节气孔运动过程,AtCPK13通过磷酸化抑制KAT1或KAT2的活性,减少K⁺的内流(Ronzier等2014),从而促进气孔关闭。AtCPK21和AtCPK23能够磷酸化激活位于保卫细胞膜上的阴离子通道蛋白SLAC1,受到激活的SLAC1将Cl⁻从细胞内转运至胞外,保卫细胞水势升高,保卫细胞失水使气孔关闭(Geiger等2010; Franz等2011)。

5.3 活性氧平衡

干旱胁迫和盐胁迫会引发植物体内的活性氧爆发,造成氧化胁迫(Mittler 2002; Miller等2010)。CDPKs能够通过调节细胞内活性氧平衡来提高植物的抗性。当遭受高盐胁迫后,*oscpk12*和*OsCPK12* RNAi突变体中H₂O₂水平高于野生型水稻,而在*OsCPK12*的过表达株系中,H₂O₂的含量低于野生型水稻和*OsCPK12* RNAi突变体,*OsCPK12*可能会通过调节抗坏血酸过氧化物酶*OsAPx2*和*OsAPx8*的转录水平,或者NADPH氧化酶*Osrboh1*的转录水平来提高植物的耐盐能力(Asano等2012)。盐胁迫下,拟南芥*cpk27-1*突变体中的H₂O₂含量同样高于野生型(Zhao等2015)。反之,在拟南芥*cpk5 cpk6, cpk5 cpk6 cpk11, cpk5 cpk6 cpk11 cpk4*突变体中,H₂O₂的含量低于野生型(Boudsocq等2010)。AtCPK8与CATALASE3 (CAT3)互作,并且通过磷酸化CAT3第261位丝氨酸残基来调节CAT3的活性,AtCPK8与CAT3的互作不仅参与了ABA调节的气孔运动过程,而且还调节了植物体内的活性氧平衡(Zou等2015)。以上结果说明,不同的CDPK在氧化电子传递过程中,扮演了不同的角色。*OsCPK12*、

AtCPK27和AtCPK8可能参与了H₂O₂的清除,而AtCPK4、AtCPK5、AtCPK6和AtCPK11参与了H₂O₂的产生。

5.4 CDPKs的作用底物

作为蛋白激酶,CDPKs响应非生物胁迫的分子机制,是通过与底物互作并磷酸化底物来发挥调节作用的。CDPKs分布广泛,并且具有多种亚细胞定位模式,它们的互作底物是多种多样的。(1)转录因子,比如AtDi19是AtCPK4、AtCPK10、AtCPK11和AtCPK16的共同底物(Rodriguez Milla等2006; Curran等2011)。ABF4是AtCPK32、AtCPK4、AtCPK11和AtCPK12的互作蛋白(Choi等2005; Zhu等2007; Zhao等2011a)。(2)蛋白磷酸酶,比如PP2C蛋白磷酸酶ABI2是AtCPK12的作用底物(Zhao等2011a)。(3)热激蛋白,HSP1与AtCPK10能够互作(Zou等2010)。(4)离子通道蛋白,AtCPK21和AtCPK23具有共同的下游作用底物阴离子通道蛋白SLAC1 (Geiger等2010; Franz等2011)。(5)抗氧化防御系统成员,拟南芥过氧化氢酶CAT3是AtCPK8的直接作用底物(Zou等2015)。

6 总结与展望

拟南芥、水稻和杨树中的一些CDPKs,已经被证明参与调节植物抵抗非生物胁迫的过程,这些CDPKs通过各种信号通路调节植物的抗逆反应。随着研究的范围不断拓展、研究的层次不断加深,需要综合分子生物学、细胞生物学、遗传学、植物生理学、基因组学与磷酸化蛋白质组学深入阐明CDPKs的功能和作用机制。

CDPKs不同的亚细胞定位和时空表达形式,说明它们的作用底物非常广泛,会通过各种信号转导途径参与调节植物的生长发育过程,以及植物对逆境胁迫的适应性,所以要对每个CDPK成员的功能进行分析。由于CDPKs同源蛋白之间存在功能冗余现象,需要对高度同源的CDPKs成员进行多重突变,并借助于过表达(over expression)来确定同源CDPKs成员之间的功能相似性。

CDPKs参与的信号调节网络是异常复杂的,通过CDPKs来解析信号通路之间的互作机制也是一个研究重点。CDPKs通过磷酸化来激活或者抑制下游蛋白的活性,通过这种快速动作打开或者关闭信号,而蛋白磷酸酶通过去磷酸化参与调节靶蛋

白的活性, 所以, 要明确CDPKs和蛋白磷酸酶的相互关系以及植物细胞对两者的协调平衡机制。

植物把胞外环境刺激转化为胞内信号, 通过对蛋白质活性以及基因转录的调节, 最终做出对环境变化的生理响应。CDPKs作为重要的信号转导组分, 其自身的基因表达同样受到精确的调控, 很有必要对CDPKs基因的转录表达调控机制进行深入分析, 寻找调节CDPKs基因表达的转录调节因子。

在蛋白质水平上, 作为分子开关, 大部分CDPKs的活性都依赖于Ca²⁺, 而细胞内和细胞外Ca²⁺浓度处于动态变化过程, 应当使用改进的体内和体外磷酸化技术研究CDPKs活性随着Ca²⁺变化的规律, 使用单分子荧光成像技术精准分析CDPKs单体的分子行为。

CDPKs通过与靶蛋白互作进行信息传递, CDPKs成员众多, 它们的靶蛋白应该是多种多样的, 鉴定CDPKs的互作蛋白对于阐明CDPKs的作用机制具有重要意义。

总之, 通过使用现代生物学的技术与手段, 要精准分析每一名CDPK成员的功能, 鉴定各自的互作蛋白, 揭示它们的作用机制, 构建由CDPKs参与的复杂的信号调节网络。

参考文献

- Abbasi F, Onodera H, Toki S, Tanaka H, Komatsu S (2004). OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol*, 55: 541~552
- Adams E, Shin R (2014). Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *J Integr Plant Biol*, 56: 231~249
- Asano T, Tanaka N, Yang G, Hayashi N, Komatsu S (2005). Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. *Plant Cell Physiol*, 46: 356~366
- Asano T, Hakata M, Nakamura H, Aoki N, Komatsu S, Ichikawa H, Hirochika H, Ohsugi R (2011). Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 75: 179~191
- Asano T, Hayashi N, Kobayashi M, Aoki N, Miyao A, Mitsuhara I, Ichikawa H, Komatsu S, Hirochika H, Kikuchi S et al (2012). A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. *Plant J*, 69: 26~36
- Bohmer M, Romeis T (2007). A chemical-genetic approach to elucidate protein kinase function *in planta*. *Plant Mol Biol*, 65: 817~827
- Bouche N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 435~466
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*, 464: 418~422
- Campo S, Baldrich P, Messeguer J, Lalanne E, Coca M, San Segundo B (2014). Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation. *Plant Physiol*, 165: 688~704
- Chehab EW, Patharkar OR, Hegeman AD, Taybi T, Cushman JC (2004). Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. *Plant Physiol*, 135: 1430~1446
- Chen J, Xue B, Xia X, Yin W (2013). A novel calcium-dependent protein kinase gene from *Populus euphratica*, confers both drought and cold stress tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 441: 630~636
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*, 129: 469~485
- Choi HI, Park HJ, Park JH, Kim S, Im MY, Seo HH, Kim YW, Hwang I, Kim SY (2005). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol*, 139: 1750~1761
- Curran A, Chang IF, Chang CL, Garg S, Miguel RM, Barron YD, Li Y, Romanowsky S, Cushman JC, Gribskov M et al (2011). Calcium-dependent protein kinases from *Arabidopsis* show substrate specificity differences in an analysis of 103 substrates. *Front Plant Sci*, 2: 36
- Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG, Harper JF (2003). Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 132: 1840~1848
- Ding Y, Cao J, Ni L, Zhu Y, Zhang A, Tan M, Jiang M (2013). ZmCPK11 is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and functions upstream of ZmMPK5 in abscisic acid signalling in maize. *J Exp Bot*, 64: 871~884
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF (2009). Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21: 972~984
- Franz S, Ehlert B, Liese A, Kurth J, Cazale AC, Romeis T (2011). Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 4: 83~96
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellman C, Al-Rasheid KA, Grill E et al (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 8023~8028
- Hanks SK, Hunter T (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 9: 576~596
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF (2000). CDPKs—a kinase for ev-

- ery Ca^{2+} signal? Trends Plant Sci, 5: 154~159
- Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. New Phytol, 151: 175~183
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C (1994). Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochemistry, 33: 7278~7287
- Harper JF, Breton G, Harmon A (2004). Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases. Annu Rev Plant Biol, 55: 263~288
- Harper JF, Harmon A (2005). Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 555~566
- Hepler PK (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. Plant Cell, 17: 2142~2155
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR et al (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiol, 132: 666~680
- Jiang S, Zhang D, Wang L, Pan J, Liu Y, Kong X, Zhou Y, Li D (2013). A maize calcium-dependent protein kinase gene, ZmCPK4, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Plant Physiol Biochem, 71: 112~120
- Komatsu S, Yang G, Khan M, Onodera H, Toki S, Yamaguchi M (2007). Over-expression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants. Mol Genet Genomics, 277: 713~723
- Kumar P, Tripathi A, Ranjan R, Halbert J, Gilberger T, Doerig C, Sharma P (2014). Regulation of plasmodium falciparum development by calcium-dependent protein kinase 7 (PfCDPK7). J Biol Chem, 289: 20386~20395
- Li AL, Zhu YF, Tan XM, Wang X, Wei B, Guo HZ, Zhang ZL, Chen XB, Zhao GY, Kong XY et al (2008). Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Mol Biol, 66: 429~443
- Lu SX, Hrabak EM (2002). An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. Plant Physiol, 128: 1008~1021
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. Plant Cell, 14 Suppl: S389~400
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD (2004). CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. J Exp Bot, 55: 181~188
- Ma SY, Wu WH (2007). AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. Plant Mol Biol, 65: 511~518
- Martin ML, Busconi L (2000). Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. Plant J, 24: 429~435
- Martin ML, Busconi L (2001). A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. Plant Physiol, 125: 1442~1449
- Mehlmer N, Wurzing B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R, Teige M (2010). The Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. Plant J, 63: 484~498
- Milla RMA, Uno Y, Chang IF, Townsend J, Maher EA, Quilici D, Cushman JC (2006). A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. FEBS Lett, 580: 904~911
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ, 33: 453~467
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci, 7: 405~410
- Polle A, Chen S (2014). On the salty side of life: molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats. Plant Cell Environ, doi: 10.1111/pce.12440
- Raichaudhuri A, Bhattacharyya R, Chaudhuri S, Chakrabarti P, Dasgupta M (2006). Domain analysis of a groundnut calcium-dependent protein kinase: nuclear localization sequence in the junction domain is coupled with nonconsensus calcium binding domains. J Biol Chem, 281: 10399~10409
- Ronzier E, Corratge-Faillie C, Sanchez F, Prado K, Briere C, Leonhardt N, Thibaud JB, Xiong TC (2014). CPK13, a noncanonical Ca^{2+} -dependent protein kinase, specifically inhibits KAT2 and KAT1 shaker K^+ channels and reduces stomatal opening. Plant Physiol, 166: 314~326
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K (2000). Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. Plant J, 23: 319~327
- Saijo Y, Kinoshita N, Ishiyama K, Hata S, Kyojuka J, Hayakawa T, Nakamura T, Shimamoto K, Yamaya T, Izui K (2001). A Ca^{2+} -dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles. Plant Cell Physiol, 42: 1228~1233
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002). Calcium at the crossroads of signaling. Plant Cell, 14 Suppl: S401~S417
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K (1994). Two genes that encode Ca^{2+} -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet, 244: 331~340
- Weckwerth P, Ehlert B, Romeis T (2015). ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the Zea mays CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling. Plant Cell Environ, 38: 544~558
- Wei S, Hu W, Deng X, Zhang Y, Liu X, Zhao X, Luo Q, Jin Z, Li Y, Zhou S et al (2014). A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. BMC Plant Biol, 14: 133
- Xu J, Tian YS, Peng RH, Xiong AS, Zhu B, Jin XF, Gao F, Fu XY, Hou XL, Yao QH (2010). AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. Planta, 231: 1251~1260
- Xu X, Liu M, Lu L, He M, Qu W, Xu Q, Qi X, Chen X (2015). Genome-wide analysis and expression of the calcium-dependent protein kinase gene family in cucumber. Mol Genet Genomics, doi:10.1007/s00438-015-1002-1

- Yu XC, Li MJ, Gao GF, Feng HZ, Geng XQ, Peng CC, Zhu SY, Wang XJ, Shen YY, Zhang DP (2006). Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. *Plant Physiol*, 140: 558~579
- Yu XC, Zhu SY, Gao GF, Wang XJ, Zhao R, Zou KQ, Wang XF, Zhang XY, Wu FQ, Peng CC et al (2007). Expression of a grape calcium-dependent protein kinase ACPK1 in *Arabidopsis thaliana* promotes plant growth and confers abscisic acid-hypersensitivity in germination, postgermination growth, and stomatal movement. *Plant Mol Biol*, 64: 531~538
- Zhang M, Yuan T (1998). Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility. *Biochem Cell Biol*, 76: 313~323
- Zhao R, Sun HL, Mei C, Wang XJ, Yan L, Liu R, Zhang XF, Wang XF, Zhang DP (2011a). The *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytol*, 192: 61~73
- Zhao R, Wang XF, Zhang DP (2011b). CPK12: a Ca²⁺-dependent protein kinase balancer in abscisic acid signaling. *Plant Signal Behav*, 6: 1687~1690
- Zhao R, Sun H, Zhao N, Jing X, Shen X, Chen S (2015). The *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent protein kinase CPK27 is required for plant response to salt-stress. *Gene*, 563: 203~214
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247~273
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 441~445
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ et al (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 3019~3036
- Zielinski RE (1998). Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 697~725
- Zou JJ, Wei FJ, Wang C, Wu JJ, Ratnasekera D, Liu WX, Wu WH (2010). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol*, 154: 1232~1243
- Zou JJ, Li XD, Ratnasekera D, Wang C, Liu WX, Song LF, Zhang WZ, Wu WH (2015). *Arabidopsis* CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *Plant Cell*, 27: 1445~1460
- Zuo R, Hu R, Chai G, Xu M, Qi G, Kong Y, Zhou G (2013). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*). *Mole Biol Rep*, 40: 2645~2662