

定量蛋白质组学方法揭示受体蛋白激酶EMS1调控拟南芥花药发育的下游信号网络

陆佳楠, 叶娟英, 许俊旭, 马红, 常芳*

复旦大学生命科学学院植物科学研究所, 上海200438

摘要: 被子植物的花药是产生雄配子的器官, 其正常发育对植物的有性生殖和正常繁衍至关重要。在花药发育的过程中, 受体激酶EMS1 (EXCESS MICROSPOROCTES 1)及其胞外配基TPD1 (TAPETUM DETERMINANT 1)通过调控花药绒毡层的发育而对雄性育性发挥重要作用。然而目前对于TPD1-EMS1的下游信号转导网络却知之甚少。随着质谱和同位素标记技术的发展, 定量蛋白质组学在植物研究中的应用越来越广泛, 在深入研究生物学过程的分子表型以及揭示蛋白调控网络方面发挥着越来越重要的作用。本文利用基于iTRAQ技术的定量蛋白质组学, 以野生型和*ems1*及*tpd1*突变体1~9期花药为材料, 通过蛋白质组数据及转录组数据的对比分析, 深入挖掘了TPD1-EMS1调控花药发育过程中下游信号网络, 找到了一大批受TPD1、EMS1共同或特异调控的已知和未知功能的蛋白, 为深入研究花药发育的调控网络提供了新的认识和重要的参考。

关键词: 花药发育; 绒毡层; TPD1; EMS1; 定量蛋白质组学; iTRAQ

雄蕊是植物的雄性生殖器官, 其正常发育是植物有性生殖的必要前提, 同时也是作物产量的基础。因此, 研究调控植物雄蕊发育过程的关键基因和信号传导网络将有助于揭示植物生殖发育的调节机制, 为通过遗传育种提高作物产量提供重要的理论依据。模式植物拟南芥共有6枚雄蕊, 每个雄蕊包括花丝和花药两部分。花药有4个药室, 每个药室都由5层细胞规则排布, 即由4层体细胞有序环绕在生殖细胞周围。四层体细胞从外到内依次是: 表皮层、内皮层、中间层和绒毡层。绒毡层是紧挨着生殖细胞的体细胞层, 在花粉发育中起至关重要的作用, 为生殖细胞发育成为成熟的花粉粒提供必要的营养物质和信号分子(Wang和Ma 2011)。绒毡层的形成和分化的异常, 通常都会导致花粉的败育。此外, 花药是由多种不同的细胞组成的器官, 胞间信号交流对于雄蕊的正常发育非常重要。在雄蕊的生长发育过程中, 体细胞与生殖细胞之间的信号交流对于细胞生长与协调发育发挥至关重要的作用。配基-受体介导的细胞间通讯机制, 可以由位于细胞膜上的特异受体接受, 进而通过转导产生胞内信号, 进一步调控植物的代谢活动及细胞学反应, 这是一种重要的细胞间信息传递和交流方式(Chang等2011)。

目前对受体蛋白激酶EXCESS MICROSPOROCTES1 (EMS1)/EXTRA SPOROGENOUS CELLS (EXS)与寡肽TAPETUM DETERMINANT1 (TPD1)的研究取得了一系列的进展。Zhao等

(2002)和Canales等(2002)同年分别发现了EMS1/EXS在调控绒毡层形成方面的功能; Yang等(2003)进一步发现*tpd1*突变体和*ems1*突变体表现出相似的花药发育异常的表型——花药无法形成绒毡层、没有可育花粉粒, 因而推测TPD1、EMS1/EXS两个基因在同一个遗传通路发挥功能; Jia等(2008)证明了TPD1和EMS1可以相互作用, 且EMS1的磷酸化依赖于TPD1, 从而为TPD1-EMS1作为配基-受体对共同调节花药发育过程提供了新的证据。此后, Huang等(2016)使用分子生物学、细胞生物学等手段, 清楚地展示了TPD1、EMS1分别定位在小孢子母细胞和绒毡层细胞中, 以及两者的相互作用会促进绒毡层的分化、抑制小孢子的形成。Li等(2017)通过BiFC、FRET、Co-IP等实验证明了SERK1和EMS1可以相互作用, SERK1能够磷酸化EMS1从而增强EMS1的活性。因此, 我们可以推测, 在调控花药发育的过程中, EMS1和SERK1作为受体复合物共同介导TPD1这一配基的信号, 并通过磷酸化反应将其转化胞内的信号, 而最终调控了绒毡层的正常发育。那么TPD1-EMS1所调控的下游信号通路是什么呢? 目前仅有的报道是 β -carbonic anhydrases (β CAs)能与EMS1相互作用

收稿 2017-05-27 修定 2017-06-05

资助 国家自然科学基金(31130006)。

致谢 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室质谱平台对课题提供设备和技术支持。

* 通讯作者(E-mail: fangchang@fudan.edu.cn)。

并受其磷酸化调控,进而作为EMS1的直接下游因子在绒毡层细胞分化过程中发挥重要的作用(Huang等2017)。然而,TPD1-EMS1信号通路中更多的下游蛋白以及信号传导网络并不清楚。

每一种生命运动形式,都是特定的蛋白质组在不同时间和空间下的表达,蛋白质是一切生命活动的直接载体。从蛋白质水平动态、整体地研究生命现象,即蛋白质组学,是功能基因组学的重要领域。在过去二十年里,以质谱技术为基础的蛋白质组学研究是一个非常强大的工具,借着大规模、高通量蛋白质分离分析技术以及定量技术的突破,蛋白质组学已经作为非常前沿的研究工具被应用到植物研究的各个领域(Jorin-Novo等2015; Pang等2016)。质谱定量方法主要基于稳定同位素标记,相对定量的策略包括化学标记、代谢标记和酶标记(Schmidt等2014)。iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation)体外化学标记技术,已经在植物蛋白质组学中运用非常普遍(Yang等2013),它是对基因组表达的全部蛋白质进行精确定量和鉴定,大规模、全方位地快速寻找差异表达蛋白,分析它们可能的生物学功能。基于iTRAQ的蛋白质组学定量实验,能够在单次液相-质谱(LC-MS)运行中定量4~8种不同的蛋白质,样品量可达0.4~0.8 mg。基于目前先进技术及设备, iTRAQ-MS/MS技术有着较为优越的灵敏性与精确性,可以高效地研究不同组织和细胞在不同状态下的蛋白质表达水平的差异(Wu等2006)。

为了进一步深入研究TPD1-EMS1信号通路的下游信号传导网络,本研究选取野生型(WT)及*tpd1*、*ems1*、*tpd1 ems1*突变体1~9期花苞为材料,利用基于iTRAQ技术的定量蛋白质组学分析,揭示了花药发育过程中受TPD1和EMS1功能缺失影响表达的蛋白以及代谢途径,明确了花药发育过程中EMS1影响的下游蛋白,并基于此描绘出EMS1介导花药发育过程的信号转导途径。

材料与方法

1 拟南芥的种植与取材

选用拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Landsberg erect (Ler)野生型作为对照,EMS1突变体*ems1*、TPD1突变体*tpd1-1*、杂合子*TPD1+/-EMS1+/-*的种

子点播在1/2MS培养基上(pH=5.8),4°C处理48 h后转入22°C光照培养箱中进行培养(昼:夜=16 h:8 h,光照强度120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。7 d后,将植物幼苗移栽到温室的培养土中继续生长(16 h长日照,22°C)。培养土由9:3:1比例的蛭石、黑土和珍珠岩充分混匀配成。

2 植株花药发育过程观察

分别取野生型和*tpd1*、*ems1*、*tpd1 ems1* 3种突变体的植株上的未开放花序,按照前人的实验方法(Chang等2014)立即包埋这4种植株的花序样品并烘烤至完全变硬;然后使用半薄切片机进行切片并烘干,厚度为1 μm ;最后使用1%甲苯胺蓝色液进行染色,并在显微镜下观察和拍照。

3 植物蛋白质的提取及浓度测定

植物抽薹约10个果荚时,开始取花苞(剔除外圈10个花苞)作为研究样本。收集时立即用液氮冷冻。提取蛋白前先取出冻存的植物组织材料,置于液氮中充分研磨后,加入蛋白提取液(6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素+2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲+100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵),并使粉末悬浮。然后进行超声破碎30 min (工作2 s,间歇5 s),将匀浆立即离心并提取上清液(转速20 000×g, 20 min, 4°C恒温)。最后用Bradford法(Zor和Selinger 1996)对所提取的样品进行蛋白定量。

4 蛋白还原烷基化以及酶解消化

参考Ye等(2015)对植物蛋白的处理方法,样品先进行还原,加入终浓度为10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT), 37°C恒温混匀反应45 min;再进行烷基化,终浓度为30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM), 25°C暗室孵育1 h。多余的IAM可以用10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT中和,反应5 min。最后将溶液中的8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素稀释至2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下后,用Trypsin (酶:蛋白=1:100)对蛋白进行消化(37°C反应12 h)。

5 iTRAQ标记和预混检测

各取100 μg 酶切产物并冷冻浓缩干燥。用100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的四乙基溴化铵(triethylamine borane, TEAB)重溶,再用iTRAQ试剂盒进行标记反应,2 h后用2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨水终止反应。114标记Ler, 115标记*tpd1*, 116标记*ems1*, 117标记*tpd1 ems1*。然后将样品进行等比例混合,冻干后用1%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)重新溶解并脱盐(样品:R3柱料=10:1)。最后用30%和60%的乙腈依次洗脱,收集

肽段并干燥, 使用质谱仪进行检测。根据预混检测的结果, 调整混合比例从而得到更加准确的定量结果。

6 纳升LC-ESI-MS/MS分析及数据搜库

使用LTQ-Orbitrap Elite (ThermoFisher Scientific, Germany)对样品进行质谱检测。液相的溶剂是: 0.1%甲酸水溶液(溶液A), 0.1%甲酸乙腈溶液(溶液B)。肽段的分离采用多步洗脱的方式: 2%~35%溶液B, 200 min; 35%~90%溶液B, 5 min; 90%溶液B, 13 min。然后采用高能碰撞解离模式(higher energy collision dissociation, HCD)检测肽段离子。

质谱中得到的初始数据, 用Proteome Discover (Version 1.4, ThermoFisher Scientific, Germany)进行分析。将肽段匹配拟南芥蛋白数据库TAIR10 (ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast_datasets/TAIR10_blastsets/), 通过Mascot (Version 2.3.02, Matrix Science, London, UK)进行打分。参数设置如下: 胰蛋白酶(trypsin)消化; 肽段的漏切位点至多2个; 固定修饰设carbamidomethyl-cysteine、iTRAQ 4plex (N-term)、iTRAQ 4plex (K); 可变修饰设N-acetylation、oxidized methionine, iTRAQ 4plex (Y)。

7 蛋白质组生物信息学分析

根据数据库搜索结果进行差异蛋白的筛选, 以114 (*Ler*)作为参照, 蛋白在各突变体中的相对定量结果是: 单突*tpd1*中115/114、单突*ems1*中116/114、双突*tpd1 ems1*中117/114。以相对定量信息作为Fold Change (FC)值, 然后根据 $\text{Log}_2\text{FC} \leq -\text{Log}_2 1.2$ 、 $\text{Log}_2\text{FC} \geq \text{Log}_2 1.2$ 分别作为阈值, 进行下调和上调的筛选。简单的数据统计利用Excel表格功能实现。其余数据分析通过生物信息学软件进行: heatmap图绘制使用R语言中pheatmap函数, 并进行简单的聚类分析; 柱状图绘制使用Graphpad prism软件; Gene Ontology富集分析使用DAVID在线分析(<https://david.ncifcrf.gov/>)。

8 转录组测序和数据分析

分别收集1 000个野生型(*Ler*)和*ems1*突变体的1~7期花药, 迅速冻于液氮中。试剂盒ZR plant RNA Miniprep™ kit (Zymo Research, USA)提取总RNA。通过Illumina™ Hi-seq 2000系统(Illumina Ins., USA)进行测序, 所得数据按照Zhu等(2015)已报道的分析方法进行分析。

实验结果

1 突变体*tpd1*、*ems1*和*tpd1 ems1*的花药表型观察

根据前期研究, TPD1-EMS1作为配基-受体复合物调控花药绒毡层的发育过程。为了确保实验材料的准确可靠, 我们首先在DNA水平对*tpd1*、*ems1*和*tpd1 ems1*这三种突变体实验材料的基因型进行了确认, 又对不同基因型的花药进行半薄切片, 对其功能缺失所造成的花药异常表型进行了确认观察(图1): 在野生型的第5期花药中, 绒毡层细胞略呈方形, 并且有序排成环状围绕着生殖细胞; 随着发育的进行, 小孢子逐渐发育成成熟花粉, 绒毡层则逐渐降解。突变体*tpd1*、*ems1*的花药在第5期并未形成正常的绒毡层细胞, 并且最终无法形成可育花粉粒。*tpd1 ems1*双突变体花药和*tpd1*、*ems1*单突呈现相同的表型。

2 基于iTRAQ的蛋白质组学鉴定和定量分析

为了寻找花药发育过程中TPD1-EMS1遗传通路的下游蛋白, 我们收集了*Ler*野生型、单突变体*tpd1*、*ems1*、以及*tpd1 ems1*双突变体4种基因型植株的1~9期花序(图2-A) (Smyth等1990)。然后运用基于iTRAQ技术的定量蛋白质组学方法(图2-B), 寻找表达水平显著变化的蛋白。

运用定量蛋白质组学的分析技术, 对野生型*Ler*和3种突变体*tpd1*、*ems1*、*tpd1 ems1*进行iTRAQ标记并经过质谱检测, 3次技术重复总共鉴定到11 024条肽段, 对应2 190个蛋白。然后把3种突变体中蛋白表达量分别与野生型作比较, 通过聚类分析发现在*ems1*中蛋白表达水平与*tpd1 ems1*中的蛋白表达情况更为相近(图2-C)。然后进行差异表达蛋白的筛选, 所得结果如下(表1): 在*tpd1*单突中, 有112个蛋白的表达量发生了显著上调, 104个蛋白的表达水平显著下调; 在*ems1*单突中, 分别有120和191个蛋白表达水平发生了显著上调和显著下调; 在*tpd1 ems1*双突中, 则分别有286和222个蛋白的表达量被检测到显著上调和显著下调。从数量上看, *ems1*单突中表达发生变化的蛋白数目多于*tpd1*单突; *ems1*单突中下调的蛋白数目与*tpd1 ems1*双突相近, *tpd1*中下调蛋白数目相对较少。暗示了两者在调控生殖发育过程中, 除了相同的功能方面, 很有可能还存在一定程度的差异。

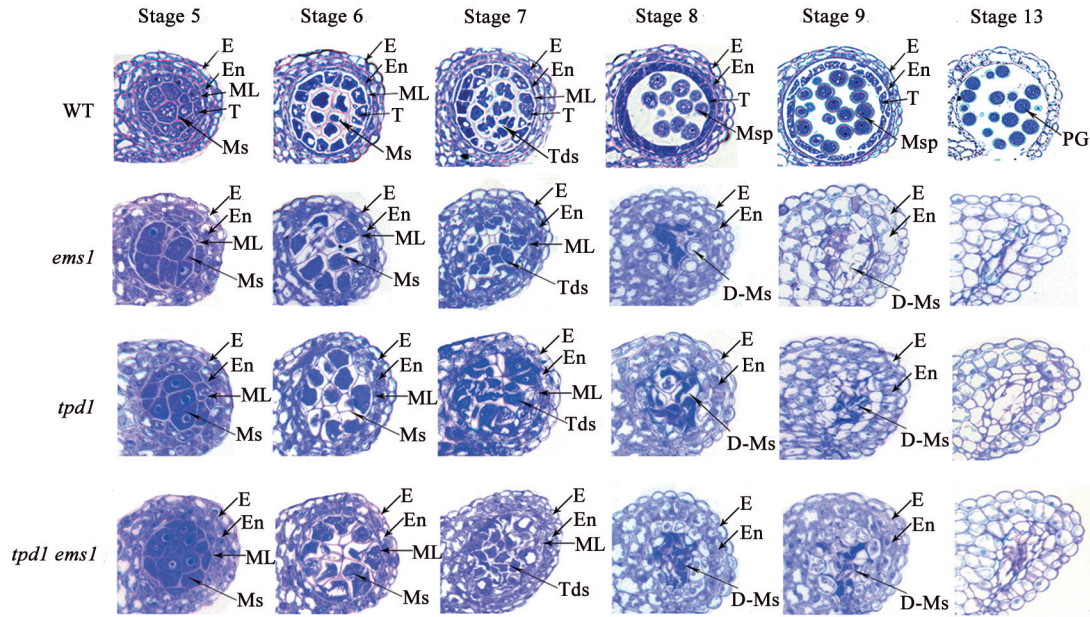


图1 WT及突变体 $tpd1$ 、 $ems1$ 和 $tpd1\ ems1$ 的花药半薄切片观察

Fig.1 Semi-thin section of anthers from WT and three mutants, $tpd1$, $ems1$ and $tpd1\ ems1$

E: 表皮层; En: 内皮层; ML: 中间层; T: 绒毡层; Ms: 小孢子母细胞; Msp: 小孢子; D-Ms: 缺陷型小孢子; PG: 花粉粒; Tds: 四分体。

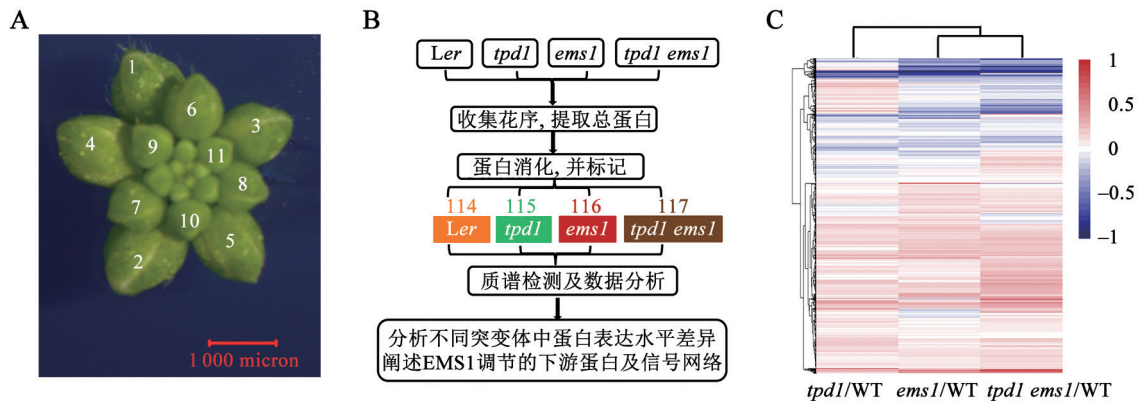


图2 受体蛋白激酶EMS1相关的定量蛋白质组学实验及分析

Fig.2 Quantitative proteomics experiment and analysis about the receptor protein kinase, EMS1

A: 花序取材, 选用去外部10朵花苞之后的小花序; B: 蛋白质组学实验流程图, 114、115、116、117分别标记 Ler 、 $tpd1$ 、 $ems1$ 、 $tpd1\ ems1$; C: 聚类分析3种突变体中的差异蛋白表达水平。

表1 三种突变体中各自与野生型相比差异蛋白数目汇总

Table 1 Numbers of differentially expressed proteins in mutants compared with that in the wild type

	$tpd1/WT$	$ems1/WT$	$tpd1\ ems1/WT$
上调	112	120	286
下调	104	191	222
合计	216	311	508

3 突变体 $tpd1$ 、 $ems1$ 影响的下游蛋白数目及代谢途径比较

为了更全面地了解TPD1、EMS1影响的下游基因在表达上的差异, 我们将 $tpd1/WT$ 中显著变化的216个蛋白、 $ems1/WT$ 中差异表达的311个蛋白进行了文氏图Venn分析, 结果如图3-A所示: 仅在单突 $tpd1$ 中差异表达的有97个蛋白(命名为A组);

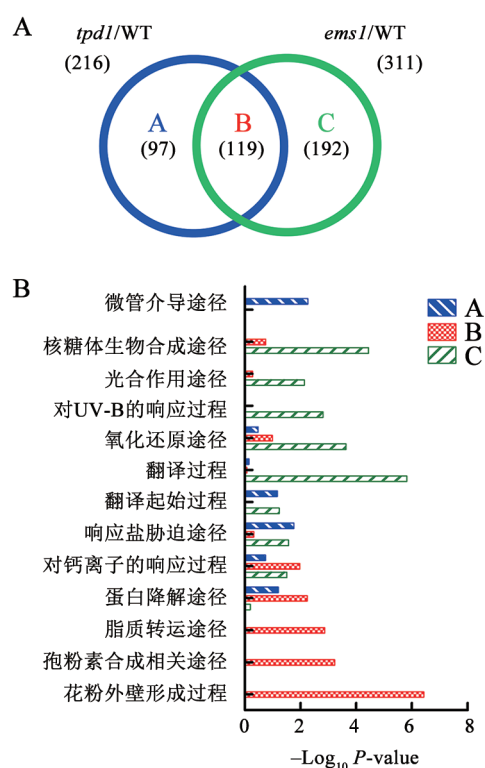


图3 突变体 $tpd1$ 、 $ems1$ 中差异表达蛋白与生物学过程富集比较

Fig.3 Comparison of differentially expressed proteins and enriched biological processes in $tpd1$ and $ems1$

A: $tpd1$ 、 $ems1$ 中差异表达蛋白Venn图比较; B: Venn图中三组蛋白生物学过程富集比较, 富集程度用 P -value表示, P -value ≤ 0.01 时表示在此生物学过程显著富集, 图4同此。

在两类突变体中共同发生显著变化的蛋白有119个(命名为B组); 仅在单突 $ems1$ 中发生显著变化的有192个(命名为C组)。

随后又通过DAVID网站对Venn图中的A组(97个)、B组(119个)、C组(192个)内的差异蛋白进行了在线分析, 了解这些差异蛋白各自所参与生物学过程的富集情况。结果显示(图3-B): B组蛋白在花粉外壁的形成、孢粉素的生物合成、脂质转运过程非常显著富集。以上生物学过程都和绒毡层的功能及小孢子发育密切相关, 进一步说明TPD1和EMS1在调控这些通路上的功能一致性。A组蛋白特异的在微管介导的生物学过程中非常显著地富集, 暗示了TPD1可能调控了微管相关的功能, 但并不通过EMS1这个受体。C组蛋白则显著富集在翻译、核糖体的生物合成、氧化还原途径、光合作用尤其是对UV-B的响应过程中, 暗示了EMS1在

这些过程中的作用。这三部分蛋白还都涉及了蛋白降解过程、对钙离子的响应途径, 但只有B部分蛋白在此显著富集; 而对盐胁迫响应、翻译起始过程, 这些蛋白并没有出现显著富集。

4 EMS1相关转录组与蛋白质组的比较分析

EMS1是位于细胞膜上的受体蛋白激酶, 在精确调控花药发育的过程中, 它所介导的激酶信号传导途径扮演着重要角色(Zhao等2002)。为了探讨EMS1对下游多种生物学过程的调控, 我们利用定量蛋白质组学结合转录组学的综合分析方法, 从mRNA和蛋白表达两个层面, 在转录调控和翻译调控这两个水平, 全方位地分析在花发育过程中EMS1可能参与调控的重要生物学途径。

为了深入揭示EMS1在花药发育过程中的调控网络以及 $ems1$ 突变体的分子表型, 我们收取了WT和 $ems1$ 4~7期的花药进行了转录组分析。结果显示(图4-A): 突变体 $ems1$ 与野生型相比, 有1 984个基因的表达水平显著上调($\log_2FC \geq \log_2 2$), 983个基因的表达水平显著下调($\log_2FC \leq -\log_2 2$)。对照定量蛋白质组学的结果: 突变体 $ems1$ 中有120个蛋白的表达水平显著上调($\log_2FC \geq \log_2 1.2$), 191个蛋白的表达水平出现显著下调($\log_2FC \leq -\log_2 1.2$) (表1)。蛋白组数据与转录组数据进行比较分析后, 发现有20个基因在转录水平和蛋白表达水平都显著上调, 有19个基因在两个水平下都显著下调; 15个基因在转录水平上调、但蛋白表达水平下调; 2 913个基因仅在转录水平有显著变化(其中1 949个基因表达上调、964个表达下调), 而在蛋白表达水平没有改变; 257个基因仅在蛋白水平变化(157个表达上调、100个表达下调), 这些基因在转录水平没有表达上的显著变化(图4-B)。

通过DAVID分析这些基因所参与的生物学过程(图4-C), 结果显示: 在转录组和蛋白组中表达水平都呈现上调的20个基因, 主要富集在氧化还原途径和CO₂固定过程; 在转录组和蛋白组中表达水平都下调的19个基因, 显著富集地在花粉外壁形成、脂质转运以及孢粉素物质的合成过程, 进一步表明EMS1在调控这些通路的过程中发挥重要的激活因子的作用。转录水平上调、蛋白表达水平显著下调的15个基因, 显著富集在翻译过程; 在转录水平没有变化、蛋白表达水平显著下调的157

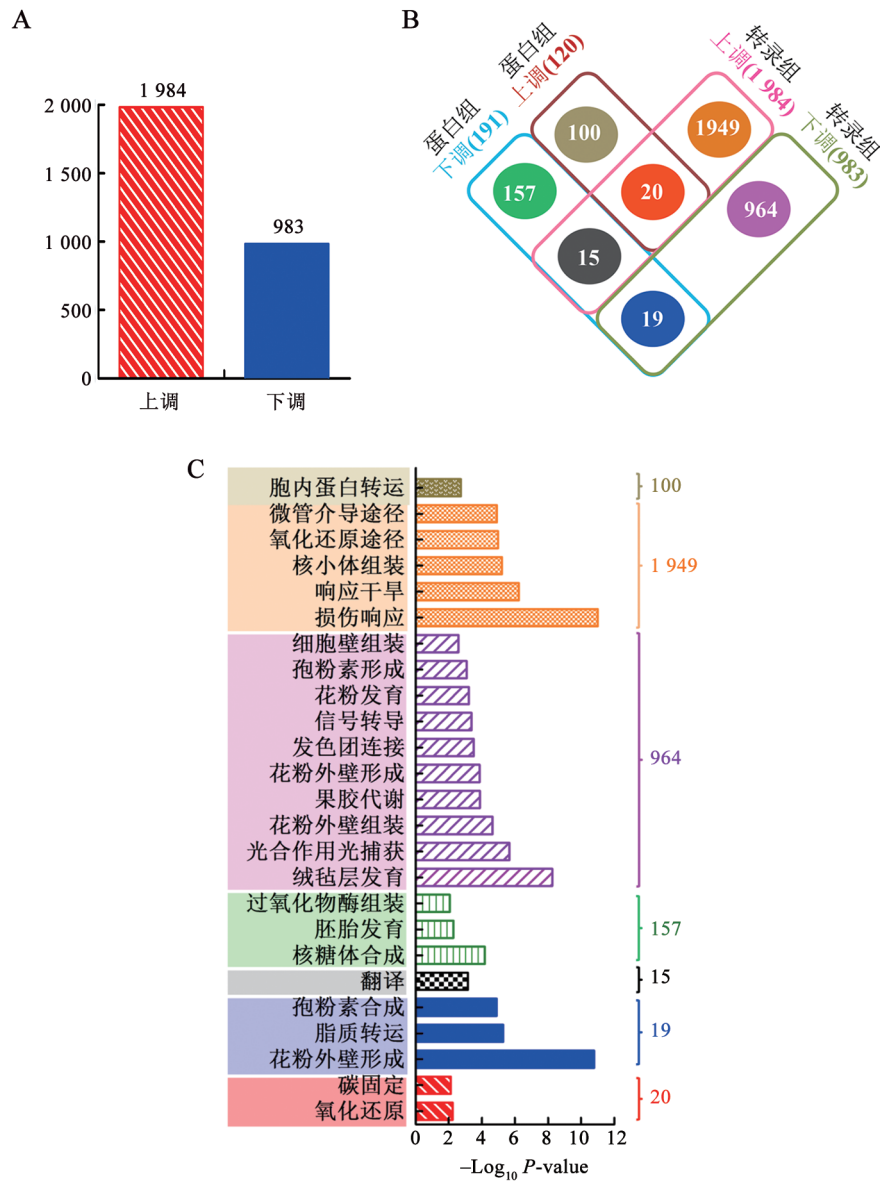


图4 *ems1*转录组和蛋白质组学对比分析以及各类别蛋白的功能聚类分析

Fig.4 Comparison of the *ems1*-related transcriptome and proteome data and the biological processes enrichments of the differentially expressed genes/proteins

A: *ems1*转录组数据中的差异基因数目; B: 转录水平和蛋白水平中受EMS1调控基因的蛋白质组和转录组对比分析; C: 蛋白质组和转录组数据对比分析后的每一组基因的功能聚类分析。

个基因, 则是富集在核糖体合成、胚胎发育、过氧化物酶组装以及翻译过程。仅在转录水平发生显著变化、蛋白表达水平并没有显著变化的基因中, 转录水平下调的964个基因主要富集在绒毡层的发育、光合作用、花粉外壁形成、果胶分解代谢以及其他信号转导过程; 转录水平上调的1949个基因在对外界刺激的响应、核小体的组装、氧

化还原途径、微管介导的运动等诸多生物学过程。转录水平没有变化、蛋白表达水平显著变化的100个基因, 显著地在胞内蛋白运输过程富集。

5 EMS1调控花粉外壁发育相关蛋白的表达

在花药发育的过程中, 花粉壁形成所需的孢粉素的前体物质是在绒毡层内形成的, 之后分泌至药室内供小孢子发育使用。前期报道表明受体

蛋白激酶EMS1调控了绒毡层的发育。所以,我们重点关注了与绒毡层发育过程、减数分裂、脂质转运、以及花粉外壁形成等过程相关蛋白的差异表达情况(图5)。比较分析突变体*ems1*与野生型转录组和定量蛋白质组数据后发现:

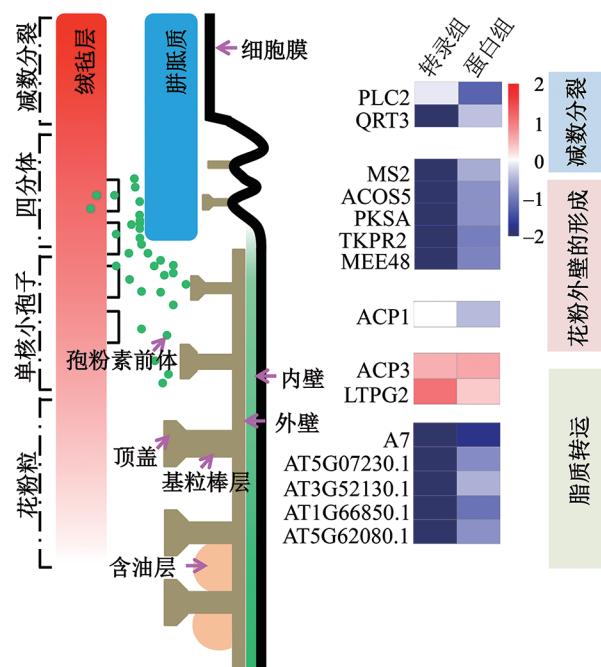


图5 EMS1调控的转录组和蛋白质组数据中与减数分裂及花粉外壁发育相关基因和蛋白的表达水平变化

Fig.5 The change of expression level of meiosis and pollen exine development-related genes/proteins those detected in *ems1* transcriptome and quantitative proteome

图中左侧展示了花粉外壁的形成过程; 右侧展示了受EMS1调控而与此生物学过程相关的蛋白及其表达水平和基因转录水平。

与减数分裂相关的PLC2、QRT3这2个蛋白的转录水平和蛋白表达水平在*ems1*都发生了显著的下调,说明EMS1通过正向调控PLC2、QRT3基因而在减数分裂过程中发挥功能。与花粉外壁形成相关的蛋白TKPR2、ACOS5、PKSA、MEE48和MS2的蛋白表达水平下降、对应基因的转录水平也下降,表明这5个基因在*ems1*突变体中不能正常转录形成mRNA,更不能翻译形成相应蛋白去执行功能。即说明上述5个基因的转录水平和蛋白表达水平受到EMS1的正向调控。在与花粉外壁形成相关的蛋白中,酰基载体蛋白ACP1的转录水平没有变化、蛋白表达水平显著降低,暗示EMS1可

能并不参与ACP1基因的转录调控过程,但有可能在ACP1蛋白的翻译及调控ACP1蛋白的稳定性方面发挥正向调控的作用。与ACP1同属一个家族的ACP3和脂质转移蛋白家族的LTPG2的转录水平和蛋白表达水平在*ems1*中都呈现出显著上升的趋势,表明基因ACP3和LTPG2在转录调控、翻译调控这两个层次上都受到蛋白激酶EMS1负向调节。

与脂质转运相关5个蛋白的mRNA和蛋白表达水平在*ems1*都呈现显著下降的趋势,暗示了EMS1通过正向激活其表达而在脂质转运的过程中发挥重要作用,进而促进花粉外壁的形成过程。在这5个蛋白中,只有A7的功能被前人研究过外,其余4个蛋白(AT5G07230.1、AT3G52130.1、AT1G66850.1、AT5G62080.1)在花药发育过程中的功能尚待进一步深入研究。

讨论

生命个体的遗传信息,从DNA转录为mRNA,再翻译成各种结构蛋白和功能蛋白,去直接执行生命的功能。从基因到其功能的实现,需要经过转录调控、翻译调控以及翻译后修饰调控等过程。作为功能基因组学的重要领域——蛋白质组学,可以弥补转录组学无法反映翻译水平调控的缺陷,两者相互补充、相辅相成,有利于全方位地描述植物雄蕊发育过程。本篇研究工作借助基于iTRAQ标记技术的定量蛋白质组学优势,在单次质谱检测中就能同时对不同突变体和野生型之间的蛋白表达水平进行相对定量,然后筛选差异蛋白并进行生物学过程富集分析,全面、动态地描述EMS1在调控花药发育过程中的分子机制。

在花药发育早期,与生长素信号转导途径相关的PLC2基因,它的突变体中雌雄配子体均无法正常形成(Li等2015),并且Di Fino等(2016)认为PLC2蛋白很可能通过调节细胞分裂平面的形成进而影响生殖发育); QRT3是个多聚半乳糖醛酸酶,在四分体的形成过程中扮演重要角色(Rhee等2003)。随着花药的不断发育,绒毡层作为高度分化的内皮细胞层,它会合成并分泌胞粉素类物质,促进花粉壁的形成,为花粉的发育提供养分。在本研究中蛋白表达水平发生显著变化的ACOS5、

PKSA、TKPR2、MS2被研究证实定位在绒毡层(Lallemant等2013),这与受体蛋白激酶EMS1特异地定位在绒毡层中的情况相一致。这4个蛋白与脂肪酸的合成途径息息相关,位于质体中的MS2是一类脂肪酰基-载体蛋白还原酶,可以产生脂肪醇;位于内质网上的ACOS5激活产生脂肪酰辅酶A酯(CoA esters),聚酮化合物PKSA将CoA esters缩合形成丙二酰辅酶A(malonyl-CoA),然后将四烷基酯产物通过四烷基还原酶TKPR2进行还原。在此过程中,酰基载体蛋白ACP1负责在聚酮化合物活性位点与脂肪酸合成酶活性位点之间搬运小蛋白(Beld等2014),而ACP1还原酶会负向调控拟南芥细胞的程序性死亡过程(Wu等2015)。与脂质转运相关的蛋白LTPG2定位在质膜上,可以促进蜡质的积累并转运至细胞外(Kim等2012)。另外,III型脂质转运蛋白家族的A7、AT1G66850.1、AT5G07-230.1、AT3G52130.1以及AT5G62080.1,特异地分布在绒毡层中,并且能够分泌至胞外的小孢子表面,成为花粉外壁的一部分(Huang等2013)。

基于以上的分析结果,我们推测在花药发育过程中:EMS1一方面会影响*PLC2*、*QRT3*基因的表达;另一方面在绒毡层孢粉素合成过程中,与脂类物质的合成和修饰相关的MS2、ACOS5、PKSA、TKPR2、ACP1及其家族成员,它们的蛋白表达水平也很可能受到EMS1的调控,同时还可能激活包括A7在内的III型脂质转运蛋白家族成员的表达、抑制脂质转运相关蛋白LTPG2的表达,这些蛋白很可能就是受到EMS1的正向调控。

本文推测了EMS1对一系列已知功能的基因的调控作用,包括:MS2、ACOS5,前者相关突变体*ms2*减数分裂过程正常,但是当小孢子从四分体中释放出来时,绒毡层的空泡化非常显著,而且小孢子的形态也出现异常,没有花粉外壁形成、晚期的花药呈现空室状态(Aar等1997);ACOS5的相关突变体在第8期时小孢子外壁缺乏正常的网格状结构,最终致使小孢子降解,花药不育(Souza等2009)。除了这些已知功能的基因,我们还挖掘了一大批受TPD1-EMS1调控的蛋白,比如AT5G-07230.1、AT3G52130.1、AT1G66850.1、AT5G-62080.1等,为后续选择候选基因深入研究其在花药发育过程中的功能以及作用机制提供了参考。

转录组数据和蛋白质组数据的综合分析发现的EMS1对不同基因的不同表达水平的调控也为深入研究各层次的修饰及功能调控提供了可能的候选基因。相信后续结合遗传学、细胞学及生化学实验方法和手段的验证,定能进一步深入解开花药发育过程中EMS1介导的信号传导机制,有利于推动植物雄性生殖发育领域的研究工作,为农作物育种的改良提供重要理论依据。

参考文献

- Aarts MG, Hodge R, Kalantidis K, Florack D, Wilson ZA, Mulligan BJ, Stiekema WJ, Scott R, Pereira A (1997). The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J*, 12 (3): 615–623
- Beld J, Finzel K, Burkart MD (2014). Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases. *Chem Biol*, 21 (10): 1293–1299
- Canales C, Bhatt AM, Scott R, Dickinson H (2002). EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in Arabidopsis. *Curr Biol*, 12 (20): 1718–1727
- Chang F, Wang Y, Wang S, Ma H (2011). Molecular control of microsporogenesis in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol*, 14 (1): 66–73
- de Azevedo Souza C, Kim SS, Koch S, Kienow L, Schneider K, McKim SM, Haughn GW, Kombrink E, Douglas CJ (2009). A novel fatty Acyl-CoA synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21 (2): 507–525
- Di Fino LM, D'Ambrosio JM, Tejos R, van Wijk R, Lamattina L, Munnik T, Pagnussat GC, Laxalt AM (2016). Arabidopsis phosphatidylinositol-phospholipase C2 (PLC2) is required for female gametogenesis and embryo development. *Planta*, 245 (4): 717–728
- Huang J, Li Z, Biener G, Xiong E, Malik S, Eaton N, Zhao CZ, Raicu V, Kong H, Zhao DD (2017). Carbonic anhydrases function in anther cell differentiation downstream of the receptor-like kinase EMS1. *Plant Cell*, doi: 10.1105/tpc.16.00484
- Huang J, Zhang T, Linstroth L, Tillman Z, Otegui MS, Owen HA, Zhao D (2016). Control of anther cell differentiation by the small protein ligand TPD1 and its receptor EMS1 in Arabidopsis. *PLoS Genet*, 12 (8): e1006147
- Huang MD, Chen TL, Huang AH (2013). Abundant type III lipid transfer proteins in Arabidopsis tapetum are secreted to the lumen and become a constituent of the pollen exine. *Plant Physiol*, 163 (3): 1218–1229
- Jia G, Liu X, Owen HA, Zhao D (2008). Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (6): 2220–2225
- Jorin-Novo JV, Pascual J, Sanchez-Lucas R, Romero-Rodriguez MC, Rodriguez-Ortega MJ, Lenz C, Villedor L (2015). Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: moving from

- model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics*, 15 (5): 1089–1112
- Kim H, Lee SB, Kim HJ, Min MK, Hwang I, Suh MC (2012). Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 53 (8): 1391–1403
- Lallemand B, Erhardt M, Heitz T, Legrand M (2013). Sporopollenin biosynthetic enzymes interact and constitute a metabolon localized to the endoplasmic reticulum of tapetum cells. *Plant Physiol*, 162 (2): 616–625
- Li L, He Y, Wang Y, Zhao S, Chen X, Ye T, Wu Y, Wu Y (2015). *Arabidopsis* PLC2 is involved in auxin-modulated reproductive development. *Plant J*, 84 (3): 504–515
- Li Z, Wang Y, Huang J, Ahsan N, Biener G, Paprocki J, Thelen JJ, Raticu V, Zhao D (2017). Two SERK receptor-like kinases interact with EMS1 to control anther cell fate determination. *Plant Physiol*, 173 (1): 326–337
- Pang Z, Srivastava V, Liu X, Bulone V (2016). Quantitative proteomics links metabolic pathways to specific developmental stages of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora capsici*. *Mol Plant Pathol*, 18 (3): 378–390
- Rhee SY, Osborne E, Poindexter PD, Somerville CR (2003). Microspore separation in the quartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation. *Plant Physiol*, 133 (3): 1170–1180
- Schmidt C, Grønborg M, Deckert J, Bessonov S, Conrad T, Lührmann R, Urlaub H (2014). Mass spectrometry-based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count. *RNA*, 20 (3): 406–420
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2 (8): 755–767
- Wang Y, Ma H (2011). Development: a pathway to plant female germ cells. *Curr Biol*, 21 (12): 476–478
- Wu J, Sun Y, Zhao Y, Zhang J, Luo L, Li M, Wang J, Yu H, Liu G, Yang L, et al (2015). Deficient plastidic fatty acid synthesis triggers cell death by modulating mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Res*, 25 (5): 621–633
- Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, ICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res*, 5 (3): 651–658
- Yang F, Melo-Braga MN, Larsen MR, Jørgensen HJ, Palmisano G (2013). Battle through signaling between wheat and the fungal pathogen *Septoria tritici* revealed by proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*, 12 (9): 2497–2508
- Yang SL, Xie LF, Mao HZ, Puah CS, Yang WC, Jiang L, Sundaresan V, Ye D (2003). Tapetum determinant1 is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *Plant Cell*, 15 (12): 2792–2804
- Ye J, Zhang Z, Long H, Zhang Z, Hong Y, Zhang X, You C, Liang W, Ma H, Lu P (2015). Proteomic and phosphoproteomic analyses reveal extensive phosphorylation of regulatory proteins in developing rice anthers. *Plant J*, 84 (3): 527–544
- Zhao DZ, Wang GF, Speal B, Ma H (2002). The excess microspocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 16 (15): 2021–2031
- Zhu E, You C, Wang S, Cui J, Niu B, Wang Y, Qi J, Ma H, Chang F (2015). The DYT1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome. *Plant J*, 83 (6): 976–990
- Zor T, Selinger Z (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 236 (2): 302–308

Quantitative proteomics analysis reveals the signaling networks downstream of EMS1 in the regulation of anther development in *Arabidopsis*

LU Jia-Nan, YE Juan-Ying, XU Jun-Xu, MA Hong, CHANG Fang*

Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Abstract: The anthers of angiosperms are organs that produce male gametes, and their normal development is essential for sexual reproduction and plant multiply. The receptor-like kinase EMS1 (EXCESS MICROSPOROCTES 1) and its extracellular ligand TPD1 (TAPETUM DETERMINANT 1) play important roles in the male fertility by regulating the development of anther tapetum during anther development. However, little is known about the signal transduction network downstream of TPD1–EMS1. With the development of mass spectrometry and isotope labeling technologies, quantitative proteomics has been widely used in plant research and has played an increasingly important role in further studying the molecular phenotype of biological processes and revealing protein regulatory networks. In this paper, iTRAQ-based proteomics analysis was used to compare the proteomic data and transcriptome data of stage 1–9 floral buds from the wild type, *ems1* and *tpd1* mutants. The results uncovered components of signaling networks, including a large number of proteins with known or unknown functions that they are regulated by TPD1 and EMS1, and provide a new understanding and important reference for further study of the regulation network of anther development.

Key words: anther development; tapetum; TPD1; EMS1; quantitative proteomics; iTRAQ

Received 2017-05-27 Accepted 2017-06-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31130006).

*Corresponding author (E-mail: fangchang@fudan.edu.cn).