

## 综述 Reviews

## 植物载脂蛋白家族结构与功能研究进展

吉凌霄<sup>1,2</sup>, 朱伯华<sup>3</sup>, 李佳佳<sup>1,2</sup>, 岳安琪<sup>1</sup>, 谢国生<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>华中农业大学植物科学技术学院, 武汉430070; <sup>2</sup>农业部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室, 武汉430070; <sup>3</sup>武汉市农业技术推广中心, 武汉430016

**摘要:** 植物载脂蛋白(lipocalins)是一类起源于绿藻、在低等植物和高等植物中广泛存在的蛋白家族, 分为载脂蛋白和类载脂蛋白两亚类。该蛋白定位于细胞膜和叶绿体, 暗示其参与植物的生长发育和抗逆响应过程。本文综述了近年来该家族蛋白的起源、蛋白结构、亚细胞定位, 以及在非生物逆境抗性和脱落酸(ABA)合成代谢中的生理功能与作用机制。该家族蛋白可能参与维持细胞膜的稳定性、脂类结合与转运、叶绿体中叶黄素循环、ABA合成和类胡萝卜素合成等过程。本文为深入研究该蛋白家族的生物学功能提供新方法和新思路。

**关键词:** 植物载脂蛋白家族; 起源; 功能鉴定; 叶黄素循环; 类胡萝卜素合成

载脂蛋白(lipocalins)是一个功能多样性的古老蛋白家族, 广泛存在于动物、植物和微生物中(杨翠翠等2013; Åkerstrom等2000)。一般来说, 植物载脂蛋白家族可分为载脂蛋白和类载脂蛋白两亚类, 第一亚类包括温度诱导的载脂蛋白(temperature induced lipocalins, TILs)和叶绿体载脂蛋白(chloroplastic lipocalins, CHLs), 第二亚类为黄质脱环氧化酶(violaxanthin de-epoxidases, VDEs)和玉米黄质环氧化酶(zeaxanthin epoxidases, ZEPs)。本文从该家族蛋白的起源、结构特征、亚细胞定位、基因功能和作用机制等方面进行综述。

### 1 载脂蛋白家族起源

通过比较藻类、低等植物和高等植物同源蛋白的氨基酸序列, 可以追溯植物载脂蛋白家族的起源。前人研究发现, TIL和CHL的同源序列在苔藓类、松柏类、买麻藤类和苏铁类低等植物中存在。在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和红藻(*Cyanidioschyzon merolae*)中没有发现编码TIL和CHL蛋白的同源基因(Charron等2005)。TIL基因的原始祖先可能来源于细菌。CHL、VDE和ZEP蛋白可能起源于蓝藻(Charron等2005; Sánchez等2003)。

为进一步研究不同植物载脂蛋白家族的进化关系, 我们搜索了水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、念珠藻(*Tortula ruralis*)、小粒碗藓(*Physcomitrella patens*)、莱茵衣藻、火炬松(*Pinus taeda*)等代表性物种载脂蛋白家族的氨基酸序列, 进行了蛋白

质的系统进化分析。图1结果表明, 载脂结合蛋白在藻类、裸子植物、单子叶植物、双子叶植物中广泛存在, 载脂蛋白家族可以分为TIL (I)、CHL (II)、VDE (III)和ZEP (IV) 4簇。念珠藻(Tr)、小粒碗藓(Pp)、火炬松(Pt)、水稻(Os)、玉米(Zm)、拟南芥(At)和大豆(Gm)等物种中均存在TIL蛋白, 暗示TIL蛋白是一种较原始的蛋白。在低等植物中没有发现CHL蛋白, 只有单子叶植物和双子叶植物中存在CHL, 这可能与该蛋白参与高等植物中类囊体的分化和光合作用有关。在8个供试物种中, 单细胞藻类莱茵衣藻(Cr)含有ZEP蛋白, 但不含有VDE蛋白。表明两个植物类载脂蛋白在高等植物中出现了功能分化, 产生了新的功能, 这为我们研究该蛋白家族的功能提供了新线索。

### 2 载脂蛋白家族结构

#### 2.1 载脂蛋白家族结构的共同特征

总的来说, 植物载脂蛋白家族的5个成员均具有两个典型的结构特点(图2)。其一, 具有3个高度保守的结构区域(structurally conserved region, SCR)(Ganfornina等2000), 其中, SCR3对应序列保守区域, 而不是结构保守区域。其二, 具有8个反向平行的 $\beta$ -折叠( $\beta$ -sheet)组成的 $\beta$ -折叠桶( $\beta$ -barrel), 环(loop)把8个反向平行的 $\beta$ -折叠连接起来, 第一个环(L<sub>1</sub>)是Omega环, 上面的4个环(L<sub>1</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>7</sub>)存

收稿 2017-08-01 修定 2017-09-24

资助 国家自然科学基金(31371550和31571583)。

\* 通讯作者(E-mail: xiegsh@mail.hzau.edu.cn)。

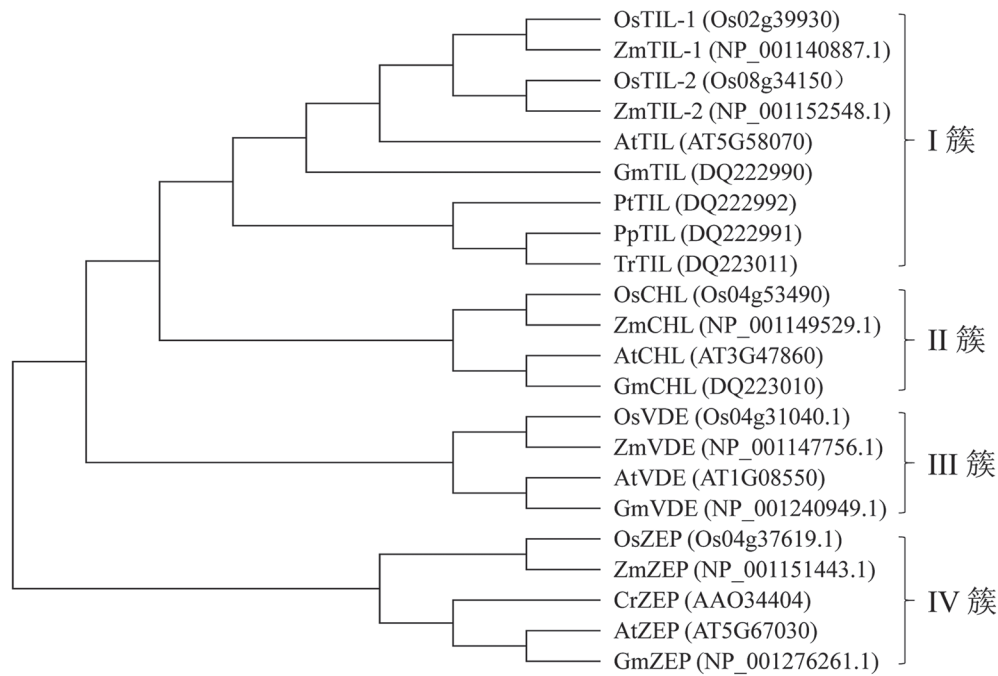


图1 八个物种载脂蛋白家族的系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of lipocalin family proteins in eight representative species  
At: 拟南芥; Cr: 莱茵衣藻; Gm: 大豆; Os: 水稻; Pp: 小粒碗藓; Pt: 火炬松; Tr: 念珠藻; Zm: 玉米。

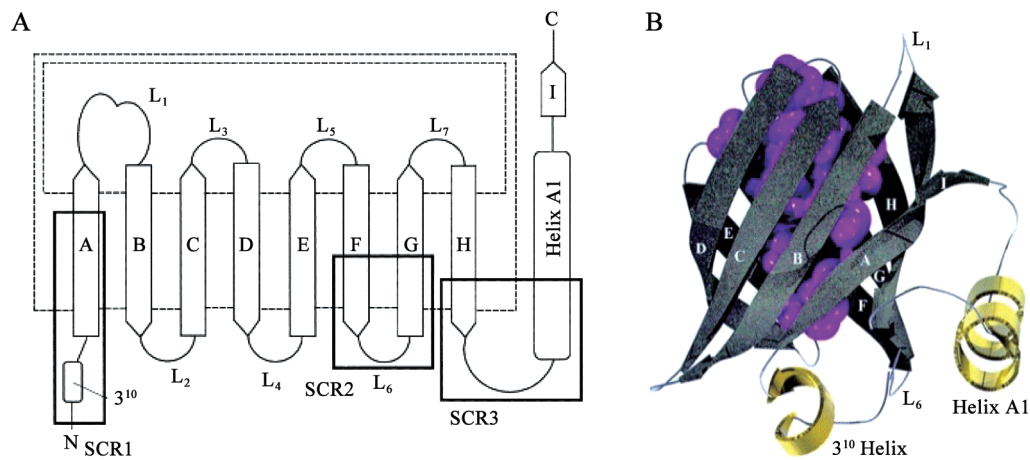


图2 载脂蛋白折叠结构特征

Fig.2 Structural characterization of a lipocalin fold

A: 折叠的载脂蛋白解开展视图; B: 载脂蛋白折叠的Aribbon软件作图。保守的结构区域: SCR1、SCR2、SCR3; 环: L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>6</sub>、L<sub>7</sub>;  $\beta$ -折叠: A、B、C、D、E、F、G、H、I。参考Flower等(2000)略作修改。

在开放的内部结合位点, 另一端有3个L-环(L<sub>2</sub>、L<sub>4</sub>、L<sub>6</sub>); N端有一个3<sup>10</sup>螺旋(含有氨基酸残基的10个原子组成的螺旋), C端有一个大螺旋Helix A1 (Flower等2000)。

## 2.2 载脂蛋白家族结构的特异性

除了上述共同结构特征外, 该家族蛋白成员

存在结构上的差异性。载脂蛋白TIL和CHL具有保守的SCR1、SCR2和SCR3结构域。类载脂蛋白VDE和ZEP的3个SCR结构域不完整, VDE蛋白含有SCR1和SCR2, ZEP蛋白只有SCR1 (Charron等2005)。

此外, 植物TIL蛋白的大小介于19~23 kDa。

研究表明, 小麦(*Triticum aestivum*)的TaTIL蛋白和拟南芥的AtTIL蛋白没有N端信号肽(Charron等2002)。植物TIL蛋白含有保守的N端糖基化结合位点(Charron等2005)。TIL蛋白的第5和第6个 $\beta$ -折叠之间含有8个疏水氨基酸残基组成的高度保守的富含组氨酸(H)、脯氨酸(P)和精氨酸(R)残基的HPR模体(Hernández-Gras和Boronat 2015)。植物CHL蛋白的大小为36~39 kDa, 其N端具有叶绿体转运肽。CHL蛋白中8个保守的半胱氨酸(Cys)残基形成二硫键, 可以维持蛋白质构象的稳定(Charron等2005)。

植物VDE蛋白的大小为50~55 kDa。除了保守的N-糖基化结合位点外, VDE蛋白具有14个保守的Cys残基。其中, 11个Cys残基位于N端, C端含有谷氨酸(Glu)残基富集区域(Charron等2005)。VDE蛋白含有3个结构域: N端结构域、中心类载脂蛋白结合结构域和C端结构域。N端结构域是VDE蛋白最保守的区域, 缺失N端结构域时, 它不能催化紫黄质形成花青素和玉米黄质。因此, N端结构域可能存在VDE蛋白的活性位点。在生理pH内, N端结构域可以增加VDE的可溶性(Hallin等2016)。N端结构域中的二硫键对提高VDE的酶催化活性具有重要的作用(Hallin等2015)。中心类载脂蛋白结合结构域最具特点, 该结构域只含有一个Cys残基, 这个Cys残基存在于第一和第二个反向平行 $\beta$ -折叠之间的 $\beta$ -链( $\beta$ -strand)上, 提供酶活性必需的巯基(Hieber等2000)。中心类载脂蛋白结合结构域可以结合紫黄质和抗坏血酸(Arnoux等2009; Saga等2010)。在pH为5和无底物存在条件下, 类载脂蛋白结构域会结晶形成二聚体结构(Hieber等2002)。第三个结构域是C端结构域, 其中的27个Glu残基折叠形成一个长的 $\alpha$ -螺旋结构, 参与蛋白寡聚化(Lupas和Gruber 2005)。Glu残基促进VDE蛋白结合类囊体膜(Hieber等2002)。如果VDE没有C端结构域, 依然可以催化紫黄质形成花青素和玉米黄质。因此, Glu残基富集的C端结构域不具有活性位点(Hallin等2016)。

此外, ZEP蛋白的大小为68~73 kDa。ZEP蛋白的结构较复杂, 它含有保守的N端糖基化结合位点和两个保守的Cys残基, N端含有ADP结合位点, C端具有FAD结合位点(Charron等2005)。植物ZEP有4个保守的结构模体: 一个长的单加氧酶结构

域、两个保守的载脂蛋白模体、一个叉头相关结构域(forkhead-associated domain) (Zhang等2016)。

### 3 载脂蛋白家族亚细胞定位

拟南芥*AtTIL1*基因与绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)基因融合后在洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞中瞬时表达, 发现AtTIL1蛋白定位于细胞膜上(Charron等2005)。它可在低温下维持细胞膜的稳定性, 从而增强植物的抗冷性(Uemura等2006)。同样地, 野苜蓿(*Medicago falcata*)的MfTIL-GFP融合蛋白基因在洋葱表皮细胞中瞬时表达, 发现MfTIL定位于质膜上(He等2015)。但是, 拟南芥AtTIL-YFP融合蛋白基因在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)叶片表皮细胞中瞬间表达, 发现AtTIL蛋白定位在质膜、液泡膜、内质网、胞间连丝、过氧化物酶体、线粒体、高尔基体中(Hernández-Gras和Boronat 2015)。本实验室构建OsTIL1或OsTIL2蛋白与GFP的融合基因表达载体, 转染水稻原生质体, 发现OsTIL1和OsTIL2蛋白主要定位于细胞膜上(数据未发表)。这些结果表明, 植物TIL蛋白可能主要定位于细胞膜中。

生物信息学预测表明, 拟南芥的AtCHL蛋白含有叶绿体转运肽, 可能定位在叶绿体中(Charron等2005)。蛋白质免疫印迹(western blot)分析证明, AtCHL蛋白定位于叶绿体的类囊体腔中(Levesque-Tremblay等2009)。而且, 从毛竹(*Phyllostachys edulis*)叶子中分离叶绿体, 利用PeVDE的抗体进行western blot分析表明, PeVDE蛋白主要定位在叶绿体中(Gao等2013)。拟南芥AtZEP-YFP融合蛋白瞬时表达发现AtZEP蛋白定位在叶绿体中。叶绿体的免疫印迹分析发现AtZEP存在于类囊体膜和叶绿体基质(Schwarz等2015)。研究认为, VDE和ZEP分布在叶绿体类囊体膜的两侧。VDE在类囊体膜的类囊体腔侧, ZEP在类囊体膜的基质侧(Bugos等1998)。同样地, 本实验室利用GFP融合蛋白载体和水稻原生质体体系, 将OsCHL、OsVDE和OsZEP蛋白定位于叶绿体中(数据未发表)。

上述结果表明, TIL蛋白主要定位于细胞膜, 是一种脂质结合的膜蛋白, 在内质网等细胞器中也可能存在。CHL、VDE和ZEP蛋白含有叶绿体转运肽, 均定位于叶绿体中。而且, CHL蛋白存在于类囊体腔内, VDE存在于类囊体腔的一侧, ZEP蛋白存在于类囊体膜的基质侧。

#### 4 植物载脂蛋白基因功能鉴定

如前所述,植物载脂蛋白的结构特征和亚细胞定位的多样性暗示了载脂蛋白家族的功能可能与植物生长发育和逆境适应性相关。前人利用逆转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)和western blot技术,检测了这些基因的时空表达和在非生物逆境下的诱导表达,证明它们在植物生长发育和非生物逆境响应中发挥了重要作用。

2002年,首次报道了拟南芥和小麦中温度诱导的载脂蛋白TIL (Charron等2002),该蛋白的功能可能与膜脂的稳定有关。在冷害条件下,5个小麦载脂蛋白家族基因均在叶子中诱导表达。热激和低温诱导*TaTIL1*基因的转录,淹水和盐害不诱导*TaTIL1*基因转录。*TaTIL2*是唯一一个在根中表达的小麦载脂蛋白(Charron等2005)。低温胁迫下,拟南芥*AtTIL*蛋白的表达上升(Charron等2008),野苜蓿*MfTIL1*基因在高温和低温条件下诱导表达,但不响应盐害和脱水逆境。5°C低温处理野苜蓿4 h后,*MfTIL1*蛋白开始积累,96 h时积累量达最大。蒺藜苜蓿(*M. truncatula*)*MtTIL1*基因在5°C处理48 h后诱导表达,96 h转录水平降低;96 h后,*MtTIL2*的转录水平增加。低温处理提高了异源超表达*MfTIL1*基因烟草(*N. tabacum*)植株中*NtDREB3*、*NtDREB4*等冷响应基因的转录(He等2015)。花生(*Arachis hypogaea*)*AhTIL1*基因在根、茎、叶、花、果针、种子中均有表达,在花中表达量最高。实时定量PCR结果证明,高温和低温诱导3、6、12、24 h后该基因上调表达,48 h后表达下降(钟瑞春等2016)。因此,*AhTIL*基因也可以响应低温和冷胁迫。最近,本实验室利用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测了水稻幼苗分别在4°C、12°C以及12°C处理24 h后再进行4°C低温处理(12°C/24 h~4°C)不同时间后*OsTIL1*的表达变化,结果表明,在4°C处理3 h时*OsTIL1*基因开始诱导表达,6 h表达量最高,随后急剧降低,24 h达最低;12°C处理诱导表达不明显;12°C/24 h~4°C处理条件下,该基因在处理6 h后表达水平达最高,且在24 h内维持较高水平。同时,本实验室从水稻幼苗低温胁迫24 h膜蛋白组分析中筛选出差异表达蛋白*OsTIL1*,该蛋白在4°C、12°C、12°C/24 h~4°C处理下的表达量分别为对照的

0.88、1.39和1.10倍,表明该基因参与水稻低温胁迫的响应途径。目前,我们已获得了该家族5个基因的超表达和基因编辑(CRISPR-Cas9)转基因水稻株系,正在进行水稻耐冷性的鉴定和耐非生物胁迫的作用机制研究(数据未发表)。

在正常生长条件下,拟南芥*AtCHL*的mRNA和蛋白水平较低,脱水条件下增加了*AtCHL*的mRNA和蛋白表达水平。除草剂、高光强处理提高了*AtCHL*的表达,热激和盐害处理不影响*AtCHL*的表达。低温只影响*AtCHL*的mRNA水平,但不影响*AtCHL*的蛋白表达(Levesque-Tremblay等2009)。同样地,冷害处理诱导了小麦*TaCHL*的转录,但不增加*TaCHL*蛋白的积累(Charron等2005)。

一般而言,*VDE*基因在所有绿色组织中表达,在叶子中表达量最高。竹子和拟南芥的*VDE*基因在根中不表达。枸杞(*Lycium chinense*)*LcVDE*基因在根中表达量最低(Gao等2013; Guan等2015; North等2005)。RT-PCR表明,强光照(1 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )处理竹子2 h时,*PeVDE*基因表达达最大,8 h达稳定水平。处理8 h后,拟南芥*AtVDE*的表达一直增加(Woitsch和Römer 2003)。在4°C、40°C、高光、盐害和脱落酸(abscisic acid, ABA)处理条件下,花生*AhVDE*基因的表达上升(Yang等2015)。

Western blot分析表明,*AtZEP*蛋白在叶子中表达量最高,根中表达量为叶片中的10%,花中无表达。干旱条件下,拟南芥叶子中*AtZEP*表达增加,根中表达降低(Schwarz等2015)。在干旱、冷害、热激和ABA处理下,苜蓿(*M. sativa*)*MsZEP*在嫩枝中表达下降。根瘤产生可上调*MsZEP*基因在根和嫩枝中的表达。*MsZEP*上调*DREB*和*P5CS*基因的表达(Zhang等2016)。而且,*ZEP*蛋白的表达还受昼夜节律的调节。在黑暗条件下,小麦*TaZEP*转录积累最少。在光照条件下,该基因的转录积累达到黑暗下的15倍(Charron等2005)。

近十年来,利用超表达、RNA干涉(RNA interference, RNAi)抑制表达、反义基因抑制表达等转基因和转移DNA(transfer DNA, T-DNA)插入突变体等反向遗传学方法,鉴定了该家族基因在植物生长发育和非生物胁迫耐性中的功能和作用机制。表1总结了该家族基因功能鉴定方面的主要

表1 植物载脂蛋白家族基因功能的反向遗传学鉴定

Table 1 Functional identification of plant lipocalin family genes via reverse genetics

| 物种  | 基因           | 功能鉴定  | 参考文献                   |
|-----|--------------|---|------------------------|
| 拟南芥 | <i>AtTIL</i> | 盐害条件下, <i>Attil1-1</i> 和 <i>Attil1-2</i> T-DNA株系较野生型积累更多的Na <sup>+</sup> 和Cl <sup>-</sup> , 受到更严重伤害和更严重叶绿体 <b>b</b> 降解。 | Abo-Ogiala等2014        |
|     |              | <i>AtTIL1</i> T-DNA株系对低温和除草剂胁迫更敏感, 该基因超表达株系对冻害、除草剂、高光逆境抵抗能力增强。  | Charron等2008           |
|     |              | <i>AtTIL1</i> T-DNA株系耐热性降低, 超表达株系耐热性不增加。  | Chi等2009               |
|     | <i>AtCHL</i> | <i>AtCHL</i> 和 <i>AtTIL</i> 双敲除突变体株系对高温、干旱和高光强更敏感, 脂质过氧化更强。   | Boca等2014              |
|     |              | <i>AtCHL</i> T-DNA突变体株系更易受干旱、高光强和百草枯等诱导的光氧化胁迫伤害。  | Levesque-Tremblay等2009 |
| 野苜蓿 | <i>MfTIL</i> | 异源超表达 <i>MfTIL</i> 基因烟草转基因株系增强了冻害、冷害、甲基紫精、高光强等诱导的氧化胁迫抗性。  | He等2015                |
| 苜蓿  | <i>MsZEP</i> | 苜蓿 <i>MsZEP</i> 基因在烟草中异源表达增强了对干旱和盐害的抗性。   | Zhang等2016             |
| 枸杞  | <i>LcVDE</i> | 异源超表达枸杞 <i>LcVDE</i> 基因拟南芥转基因株系增强了对干旱胁迫的抵抗能力。   | Guan等2015              |
| 花生  | <i>AhVDE</i> | <i>NtVDE</i> RNAi转基因烟草株系对高温和高光强诱导的氧化胁迫更敏感, 花生 <i>AhVDE</i> 超表达株系对高温和高光强诱导的氧化胁迫抗性增强。                                     | Yang等2015              |
| 番茄  | <i>LeZEP</i> | <i>LeZEP</i> 反义转基因株系对盐害胁迫诱导的光抑制和光氧化耐性增强, D1蛋白下降减少。  | Zhang等2012             |

进展。这些结果表明, 该家族基因在耐非生物逆境中起正调控作用。这为进一步利用该家族基因的作用机制提供了新途径。

### 5 载脂结合蛋白在耐逆性中的作用机制

前人研究表明, 脂质运载蛋白家族具有多种生物学功能, 例如, 它们参与运输小的亲脂性分子, 调节免疫和生长发育, 调节生理代谢、信号转导和响应逆境等生物学过程(Flower等2000; Åkerstrom等2000; Bishop 2000; Grzyb等2006; 杨翠翠等2013)。

#### 5.1 TIL和CHL蛋白在植物非逆境耐性中的调节机制

TIL可以与膜脂结合, 但不含有转运肽(Charron等2005)。该蛋白的HPR模体与质膜互作, 其中, 4个保守脯氨酸(Pro)残基与TIL靶向细胞膜和不同细胞器有关。在逆境下, 它可以维持细胞膜的稳定性(Hernández-Gras和Boronat 2015)。*TIL*基因响应低温、高温、盐害、脱水、除草剂和氧化等胁迫, 其响应不同逆境的作用机制可能不同。例如, 在拟南芥中异源超表达野苜蓿*MfTIL*, 转基因植株的耐冷性增强。其作用机理可能是低温处理上调冷响应基因*CBF*和*COR15a*的表达, 促进H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除, 抵御低温诱导的氧化胁迫(He等2015)。在冻害条件下, *AtTIL1*蛋白可以维持质膜的稳定性(Uemura等2006)。而在热激条件下, *AtTIL*蛋白可能不直接参与调节细胞膜的流动性和稳定性, 可能通过清除热激条件下产生的有毒物质而维持植物的

正常生长(Chi等2009)。在盐害条件下, 胡杨(*Populus euphratica*) *PeTIL*基因的T-DNA插入突变体幼苗叶绿体中积累Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>, 光合作用受到干扰, 造成叶绿素**b**降解(Abo-Ogiala等2014)。在氧化胁迫下, TIL蛋白结合并清除过氧化脂质, 并帮助恢复膜的完整性, 保护细胞膜的稳定性(Charron等2008)。所以, TIL蛋白通过维持盐害条件下的离子平衡、阻止叶绿体中过量的Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>积累而保护叶绿体。而且, 还可以通过调控下游基因表达、清除逆境条件下产生的过氧化物和有毒物质等机制, 保护细胞膜等细胞器的稳定性。

与TIL蛋白不同的是, 在正常条件下, CHL蛋白不调节光系统的光合活性, 不影响植物正常的生长发育。但是, 它可以转运和清除在逆境下的脂质过氧化物, 从而维持类囊体膜的稳定性(Levesque-Tremblay等2009)。

在拟南芥种子中, TIL和CHL协同作用可以影响膜脂的稳定性和种子的寿命(Hernández-Gras和Boronat 2015)。在小麦中, 酵母双杂交鉴定了TaCHL(CK159974)与脂质转运蛋白LTP3 (AY226580)相互作用, LTP家族蛋白可能参与了跨膜的磷脂转运。双分子荧光互补实验证明TaTIL蛋白与LTP3在细胞质中存在互作(Tardif等2007)。因此, TIL和CHL与LTP3蛋白的互作值得进一步的研究。

#### 5.2 VDE和ZEP蛋白参与叶黄素循环

高等植物和绿藻中存在叶绿体, 它是叶黄素



等2009)。从图3还可看出, 在高光条件下, VDE催化紫黄质产生玉米黄质, 降低了ABA的生物合成; 在低光条件下, ZEP催化玉米黄质成为紫黄质会增加ABA的生物合成。在干旱条件下, VDE和ABA的量都升高, 这可能是干旱条件下VDE的活性升高使Z合成量相应增加。因此, 促进了ABA的生物合成。ABA的生物合成是否由VDE活性上升直接引起的尚不清楚。在逆境条件下, 紫黄质、花药黄质、玉米黄质的含量和ABA生物合成与VDE、ZEP基因表达之间的关系还需进一步研究。

#### 5.4 VDE和ZEP蛋白参与类胡萝卜素合成代谢

VDE和ZEP还参与了类胡萝卜素的生物合成。类胡萝卜素是天线系统和反应中心的叶绿素结合蛋白的重要组分, 在ABA的生物合成、光能捕捉、抑制自由基产生和脂质过氧化等过程中具有重要作用(韩利军等2002; 吴长艾等2001)。图3勾画了类胡萝卜素的生物合成过程, 其在质体中通过甲基赤藓醇-4-磷酸途径(methylerythritol 4-phosphate, MEP)合成。研究表明, 拟南芥种子成熟过程中, *AtZEP*基因的转录水平升高, 该蛋白催化玉米黄质的环氧化合成类胡萝卜素。该过程影响类胡萝卜素的组成和含量, 决定拟南芥种子的V/A比值。类胡萝卜素双解酶(carotenoid cleavage dioxygenase, CCD)参与了类胡萝卜素的降解反应(Gonzalez-Jorge等2016)。

## 6 展望

综上所述, 植物载脂蛋白家族蛋白结构的特异性与亚细胞定位的多样性决定了该家族成员功能的多样性和复杂性, 这为我们今后深入研究该家族蛋白的功能和作用机制提供了思路。本领域今后需要进一步深入研究的课题有: (1) 在低温、高温、盐害和干旱等逆境条件下, TIL蛋白可能参与减轻细胞膜脂过氧化和保持其完整性。TIL蛋白糖基化是否参与这一过程? TIL是否通过与LTP3互作参与过氧化磷脂的转运有关? (2) CHL、VDE和ZEP可能参与了叶绿体和类囊体膜的稳定性调节, 但是, 其中的作用机制可能存在差异。CHL和VDE中富含的Cys残基在叶绿体中是否具有氧化还原调控作用? 植物是否普遍存在通过CHL与LTP3的互作或协同调节清除叶绿体中的过氧化磷脂? (3) VDE和ZEP两种酶可能直接影响叶

黄素、类胡萝卜和ABA的生物合成, 但是, ZEP蛋白含有ADP结合位点与FAD结合位点, 它们的酶促动力学作用机制如何? 等等。

总之, 植物载脂蛋白家族保护细胞膜和叶绿体稳定性的作用机制还不透彻, 该家族基因在植物对非生物逆境响应中的功能和作用机制还不清楚, 需要新的生物信息学分析与生物化学、分子生物学技术手段相结合, 才能深入研究植物载脂蛋白的功能与调控机制。

## 参考文献

- Abo-Ogiala A, Carsjens C, Diekmann H, Fayyaz P, Herrfurth C, Feussner I, Polle A (2014). Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. *J Plant Physiol*, 171 (3–4): 250–259
- Åkerstrom B, Flower DR, Salier JP (2000). Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1–2): 1–8
- Arnoux P, Morosinotto T, Saga G, Bassi R, Pignol D (2009). A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21 (7): 2036–2044
- Baroli I, Do AD, Yamane T, Niyogi KK (2003). Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell*, 15 (4): 992–1008
- Bishop RE (2000). The bacterial lipocalins. *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1–2): 73–83
- Boca S, Koestler F, Ksas B, Chevalier A, Leymarie J, Fekete A, Mueller MJ, Havaux M (2014). *Arabidopsis* lipocalins AtCHL and AtTIL have distinct but overlapping functions essential for lipid protection and seed longevity. *Plant Cell Environ*, 37 (2): 368–381
- Bugos RC, Hieber AD, Yamamoto HY (1998). Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J Biol Chem*, 273 (25): 15321–15324
- Charron JB, Ouellet F, Pelletier M, Danyluk J, Chauve C, Sarhan F (2005). Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiol*, 139 (4): 2017–2028
- Charron JBF, Breton G, Badawi M, Sarhan F (2002). Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 517 (1–3): 129–132
- Charron JBF, Ouellet F, Houde M, Sarhan F (2008). The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biol*, 8: 86
- Chi WT, Fung RW, Liu HC, Hsu CC, Charng YY (2009). Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 32 (7): 917–927
- Flower DR, North ACT, Sansom CE (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1–2): 9–24
- Ganfornina MD, Gutiérrez G, Bastiani M, Sánchez D (2000). A phy-

- logenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol Biol Evol*, 17 (1): 114–126
- Gao Z, Liu Q, Zheng B, Chen Y (2013). Molecular characterization and primary functional analysis of *PeVDE*, a violaxanthin de-epoxidase gene from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant Cell Rep*, 32 (9): 1381–1391
- Gonzalez-Jorge S, Mehrshahi P, Magallanes-Lundback M, Lipka AE, Angelovici R, Gore MA, DellaPenna D (2016). *ZEAXANTHIN EPOXIDASE* activity potentiates carotenoid degradation in maturing seed. *Plant Physiol*, 171 (3): 1837–1851
- Grzyb J, Latowski D, Strzalka K (2006). Lipocalins – a family portrait. *Plant Physiol*, 163 (9): 895–915
- Guan C, Ji J, Zhang X, Li X, Jin C, Guan W, Wang G (2015). Positive feedback regulation of a *Lycium chinense*-derived VDE gene by drought-induced endogenous ABA, and over-expression of this VDE gene improve drought-induced photo-damage in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 175: 26–36
- Hallin EI, Guo K, Åkerlund HE (2015). Violaxanthin de-epoxidase disulphides and their role in activity and thermal stability. *Photosynth Res*, 124 (2): 191–198
- Hallin EI, Guo K, Åkerlund HE (2016). Functional and structural characterization of domain truncated violaxanthin de-epoxidase. *Physiol Plant*, 157 (4): 414–421
- Han LJ, Yang CW, Ou ZY (2002). Progress in biosynthetic pathway and its biological functions of plant carotenoid. *J Biol*, 19 (6): 1–3 (in Chinese with English abstract) [韩利军, 阳成伟, 欧志英 (2002). 类胡萝卜素的生物合成途径及生物学功能研究进展. *生物学杂志*, 19 (6): 1–3]
- Havaux M, Dall'Osto L, Cuiñé S, Giuliano G, Bassi R (2004). The effect of zeaxanthin as the only xanthophyll on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 279 (14): 13878–13888
- He X, Sambe MAN, Zhuo C, Tu Q, Guo Z (2015). A temperature induced lipocalin gene from *Medicago falcata* (*MfTIL1*) confers tolerance to cold and oxidative stress. *Plant Mol Biol*, 87 (6): 645–654
- Hernández-Gras F, Boronat A (2015). A hydrophobic proline-rich motif is involved in the intracellular targeting of temperature-induced lipocalin. *Plant Mol Biol*, 88 (3): 301–311
- Hieber AD, Bugos RC, Verhoeven AS, Yamamoto HY (2002). Over-expression of violaxanthin de-epoxidase: properties of C-terminal deletions on activity and pH-dependent lipid binding. *Planta*, 214 (3): 476–483
- Hieber AD, Bugos RC, Yamamoto HY (2000). Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1–2): 84–91
- Horton P, Wentworth M, Ruban A (2005). Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHClI-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett*, 579 (20): 4201–4206
- Jahns P, Holzwarth AR (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1817 (1): 182–193
- Kalituho L, Beran KC, Jahns P (2007). The transiently generated nonphotochemical quenching of excitation energy in *Arabidopsis* leaves is modulated by zeaxanthin. *Plant Physiol*, 143 (4): 1861–1870
- Levesque-Tremblay G, Havaux M, Ouellet F (2009). The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *Plant J*, 60 (4): 691–702
- Lupas AN, Gruber M (2005). The structure of  $\alpha$ -helical coiled coils. *Adv Protein Chem*, 70: 37–78
- North HM, Frey A, Boutin JP, Sotta B, Marion-Poll A (2005). Analysis of xanthophyll cycle gene expression during the adaptation of *Arabidopsis* to excess light and drought stress: changes in RNA steady-state levels do not contribute to short-term responses. *Plant Sci*, 169 (1): 115–124
- Saga G, Giorgetti A, Fufezan C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2010). Mutation analysis of violaxanthin de-epoxidase identifies substrate-binding sites and residues involved in catalysis. *J Biol Chem*, 285 (31): 23763–23770
- Sánchez D, Ganformina MD, Gutiérrez G, Marín A (2003). Exon-intron structure and evolution of the lipocalin gene family. *molecular biology and evolution*. 20 (5): 775–783
- Schwarz N, Armbruster U, Iven T, Bruckle L, Melzer M, Feussner I, Jahns P (2015). Tissue-specific accumulation and regulation of zeaxanthin epoxidase in *Arabidopsis* reflect the multiple functions of the enzyme in plastids. *Plant Cell Physiol*, 56 (2): 346–357
- Seo M, Koshiba T (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*, 7 (1): 41–48
- Tardif G, Kane NA, Adam H, Labrie L, Major G, Gulick P, Sarhan F, Laliberté JF (2007). Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat. *Plant Mol Biol*, 63 (5): 703–718
- Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A, Kawamura Y (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiol Plant*, 126 (1): 81–89
- Woitsch S, Römer S (2003). Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol*, 132 (3): 1508–1517
- Wu CA, Meng QW, Zhou Q (2001). The xanthophyll cycle and its regulation. *Plant Physiol Commun*, 37 (1): 1–5 (in Chinese) [吴长艾, 孟庆伟, 邹琦(2001). 叶黄素循环及其调控. *植物生理学通讯*, 37 (1): 1–5]
- Xu SC, Ding HD, Lu R, Shi B, Ma FF (2008). Study on effects of ABA in antioxidant defense of plant cells. *J China Agr Univ*, 13 (2): 11–19 (in Chinese with English abstract) [许树成, 丁海东, 鲁锐, 石桦, 马芳芳(2008). ABA在植物细胞抗氧化防护过程中的作用. *中国农业大学学报*, 13 (2): 11–19]
- Yang CC, Wang FD, Qiu NW, Gao JW (2013). Research progress of plant lipocalins. *Plant Physiol J*, 49 (11): 1138–1142 (in Chinese with English abstract) [杨翠翠, 王凤德, 邱念伟, 高建伟(2013). 植物载脂蛋白研究进展. *植物生理学报*, 49 (11): 1138–1142]
- Yang S, Meng DY, Hou LL, Li Y, Guo F, Meng JJ, Wan SB, Li XG (2015). Peanut violaxanthin de-epoxidase alleviates the sensitivity of PSII photoinhibition to heat and high irradiance stress in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 34 (8): 1417–1428



- Zhang QY, Wang LY, Kong FY, Deng YS, Li B, Meng QW (2012). Constitutive accumulation of zeaxanthin in tomato alleviates salt stress-induced photoinhibition and photooxidation. *Physiol Plant*, 146 (3): 363–373
- Zhang Z, Wang Y, Chang L, Zhang T, An J, Liu Y, Cao Y, Zhao X, Sha X, Hu T, et al (2016). *MsZEP*, a novel zeaxanthin epoxidase gene from alfalfa (*Medicago sativa*), confers drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 35 (2): 439–453
- Zhong RC, Li TT, Tang RH, Wang XJ, Li C, Hou L, Zhao CZ (2016). Cloning and expression analysis of temperature induced lipocalin gene AhTIL1 of peanut. *Biotechnol Bull*, 32 (4): 102–109 (in Chinese with English abstract) [钟瑞春, 李婷婷, 唐荣华, 王兴军, 李翠, 侯蕾, 赵传志(2016). 花生温度诱导载脂蛋白基因 AhTIL1的克隆和表达研究. *生物技术通报*, 32 (4): 102–109]

## Advances in structure and function of lipocalin protein family in plants

Ji Ling-Xiao<sup>1,2</sup>, ZHU Bo-Hua<sup>3</sup>, LI Jia-Jia<sup>1,2</sup>, YUE An-Qi<sup>1</sup>, XIE Guo-Sheng<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup>MOA Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River, Wuhan 430070, China; <sup>3</sup>Agricultural Technology Extension Center of Wuhan City, Wuhan 430016, China

**Abstract:** Plant lipocalin protein family originated from green algae are widely distributed in lower and higher plants, which consists of lipocalin protein subfamily and lipocalin-like protein subfamily. These proteins from this family are localized on plasma membrane and chloroplast organelles, implying their involvements in the plant development and responses to abiotic and biotic stresses. In this paper, the authors reviewed and summarized many advances in protein origin, structure characteristics, subcellular localization, functions in the abiotic stress tolerance, and underlying metabolic regulation mechanism of abscisic acid (ABA) biosynthesis process in the recent years. Many lines of evidences demonstrate that this family proteins are involved in cell membrane stability, lipid binding and transport, lutein cycle in the chloroplast, ABA biosynthesis and carotenoid biosynthesis. All these results above would provide new methods and clues to deep understanding of this family genes in the future.

**Key words:** plant lipocalin protein family; origin; functional identification; lutein cycle; carotenoid biosynthesis

Received 2017-08-01 Accepted 2017-09-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31371550 and 31571583).

\*Corresponding author (E-mail: xiegsh@mail.hzau.edu.cn).