

综述 Reviews

植物中19S调节复合体各亚基的研究进展

潘晓英¹, 唐晓艳^{1,2,*}¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州510631²深圳市作物分子设计育种研究院, 深圳518107

摘要: 泛素/26S蛋白酶体途径是一类普遍存在于真核生物中的蛋白降解途径, 兼具高效性和选择性。19S调节复合体作为26S蛋白酶体的必需组件, 在植物生长发育过程中具有关键作用。相对于动物而言, 植物中19S调节复合体亚基的研究严重滞后, 阻碍了人们对各亚基在植物中生物学功能的进一步认识和利用。本文综述了拟南芥以及其他高等植物发育过程中19S调节复合体各亚基行使的生物学功能及其在逆境胁迫中的调控作用, 并对进一步研究进行了展望, 将有助于理解19S调节复合体中各亚基在植物生长发育过程中的精细调控过程, 为揭示26S蛋白酶体亚基在不同植物中的功能提供参考。

关键词: 26S蛋白酶体; 19S调节复合体; 植物生长发育; 逆境胁迫

植物正常分化发育不但需要精确机制确保及时合成相关功能蛋白, 同时也需要一定机制及时清除已完成使命的蛋白。植物细胞内蛋白的降解有两条途径, 即非特异性降解途径和特异性降解途径。非特异性降解的主要场所是溶酶体或液泡, 大多数负责蛋白降解的酶作用时不消耗能量, 对蛋白的降解也没有选择性。蛋白特异性降解途径包括泛素依赖和非泛素依赖的蛋白酶体途径。前者是蛋白泛素化后经蛋白酶体降解的过程, 依赖于ATP的选择性过程。后者是蛋白不经泛素化直接被蛋白酶体选择性降解的过程。泛素/26S蛋白酶体途径(ubiquitin/26S proteasome pathway, UPP)介导植物中80%~85%的蛋白质降解, 几乎参与到植物生长发育的各个环节, 是植物体内蛋白高效专一降解最重要、最精细的调控机制之一。

真核细胞中26S蛋白酶体是一种依赖ATP降解泛素化底物的多亚基蛋白复合体, 由一个20S催化中心复合体和两个19S调节复合体构成。有关泛素/26S蛋白酶体途径及其在生物体内功能的研究属于热点和难点, 并不断有相关综述总结这方面的研究成果。但是, 植物中关于26S蛋白酶体复合体中19S调节复合体亚基的相关功能研究综述较少。本综述在前人研究基础上, 系统介绍19S调节复合体中各亚基参与植物生长发育过程的研究进展。

1 19S亚基复合体的结构组成和生化功能

26S蛋白酶体是一个2M Da的蛋白水解复合

体, 由30多个亚基组成, 分成两个部分: 20S圆桶状结构核心组分(CP)和19S调节复合体(RP)(图1-A)。其中CP是一种不依赖ATP和泛素的蛋白酶复合体, 是26S蛋白酶体的核心催化活性部分, 由4个环状结构($\alpha\beta\beta\alpha$)组成(图1-B)。CP的末端是RP, 具有调节20S蛋白酶体活性的作用。RP依赖于ATP, 由17个亚基组成, 又分成盖子(lid)和基部(base)两部分(图1-B和C)(Miller和Gordon 2005)。除此之外, 某些物种特异性和组织特异性的其他纯化蛋白也属于19S调节复合体亚基, 表明这些亚基在进化上是不保守的(Deveraux等1995; Fujimuro等1998)。

研究发现, 盖子由8个蛋白成员构成, 包括8个非ATP酶亚基(RPN3、RPN5、RPN6、RPN7、RPN8、RPN9、RPN11和RPN12), 主要功能是在蛋白底物降解前, 将泛素链从蛋白底物上剪切掉(去泛素化)以回收再次利用。其中RPN8~RPN11二元复合物是一种去泛素化酶(deubiquitinase, DUB), 是lid执行去泛素化的功能单位。RPN11本身具有去泛素化酶活性位点, RPN8作为RPN11的辅助蛋白发挥作用。RPN5、RPN6和RPN7是19S颗粒装配的必要亚基。此外, 其他RPN亚基可能作为脚手架角色发挥作用, 并可能具有与不同底物蛋白结合的位点, 使底物蛋白和26S蛋白酶体结合。

收稿 2018-06-14 修定 2018-07-10

资助 广东省自然科学基金(2017A030310500)、中国博士后科学基金(2017M612685)。

* 通讯作者(txy@frontier-ag.com)。

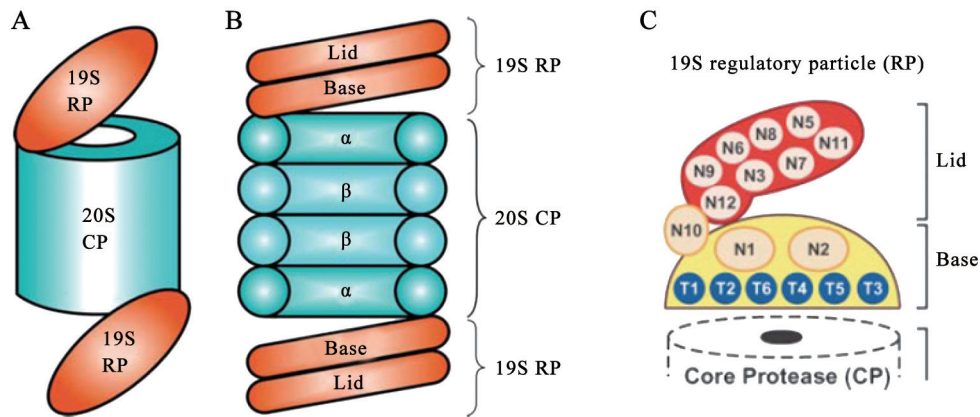


图1 26S蛋白酶体结构模式图

Fig.1 Model of the structure of 26S proteasome

本图引自Miller和Gordon (2005)一文。N: RPN; T: RPT。

基底在结构上由9个蛋白成员构成, 分别为RPN1、RPN2、RP10及RPT1、RPT2、RPT3、RPT4、RPT5和RPT6。主要功能是利用ATP水解提供能量, 对切掉泛素链的蛋白底物去折叠并转运至20S核心颗粒进行降解。其中RPT1~6为AAA⁺蛋白超家族成员(ATPases associated with various cellular activities superfamily), 它们在结构上形成一个六聚体功能单位, 与其他三个RPN亚基组成环状结构而行使功能。目前, 在酵母中研究已验证RPT2能控制底物进入和水解产物释放(Kohler等2001)。其中, RPN1能结合Ub-like序列, 辅助运送蛋白底物至26S蛋白酶体(Elsasser等2002)。RPN1和RPN2作为脚手架角色发挥作用, 结构上作为连接蛋白招募与蛋白水解复合物(Rossenzweig等2008)。RPN10则是作为泛素的受体发挥作用。RPN10与RPT5一起与泛素蛋白结合, 同时稳定盖子和基底之间的连接(Fu等2001)。

综上所述, 19S调节复合物颗粒可行使一系列生物化学功能: (1)它能识别多聚泛素底物; (2)它被预测可能会有异肽酶活性, 能够剪切多聚泛素链为泛素单体(去泛素化), 使泛素再次循环进入泛素/26S蛋白酶体途径。但泛素蛋白本身不会被蛋白酶体降解; (3) 19S蛋白酶体复合物能结合在20S复合物颗粒两末端, 从而打开20S蛋白酶体复合物核心颗粒的窄孔; (4)蛋白被去折叠后进入20S核心颗粒复合物(Ferrell等2000)。因此, 19S调节复合物颗粒被认为是“门卫”(a gate keeper), 具有可逆的分

子伴侣活性, 使底物变性并转运去折叠底物到20S核心颗粒进行降解。

2 19S调节复合体亚基参与植物生长发育过程的相关研究

模式植物拟南芥基因组中编码参与26S蛋白酶体途径的基因有1 600多个, 其蛋白约占整个拟南芥蛋白组的5%, 这个比例是酵母、果蝇、小鼠和人的2倍多, 其中一个可能原因是植物基因的功能存在冗余现象, 这些亚基大多数由双基因编码, 而酵母、果蝇、小鼠和人中大多数基因只有一个拷贝(Vierstra 2003, 2009)。目前已发现26S蛋白酶体途径广泛地参与植物各个生长发育过程, 其中19S调节复合体亚基参与植物生长发育过程的具体研究进展如下。

2.1 RPT (regulatory particle triple-A ATPase)亚基

19S调节复合物颗粒含6个RPT亚基, 大部分RPT亚基的详细研究报道是在酵母系统中(表1)。在酵母中, 每一个RPT基因都是生长所必需的, 无功能冗余(Rubin等1998; Beckwith等2013)。将拟南芥中RPT基因分别与对应的酵母突变体互补, RPT1及RPT3~6均能互补酵母突变体表型, 表明拟南芥中RPT亚基与酵母中RPT亚基在功能和结构上都很保守, 各RPT亚基也无功能冗余。其中植物中RPT2基因不能互补酵母突变体, 但具体原因尚未探明。氨基酸序列分析表明, 拟南芥中6个RPT亚基含保守组件Walker P loop/motif A (GXXXXGKS/T)以及部分疏水结构参与ATP水解(Fu等1999)。

表1 植物中RPT亚基已鉴定的基因及其功能

Table 1 Functions of representative members of RPT subunit in plants

蛋白名称	基因名称	功能	文献
RPT1	<i>RPT1a</i>	未知	
	<i>RPT1b</i>	未知	
RPT2	<i>RPT2a</i>	控制分生组织活动并参与配子体发育过程 控制叶器官发育 负向调控表皮毛发育 通过DNA甲基化在转录水平参与基因沉默 与uni-1D/NI互作, 调控植物形态发育与抗逆信号 参与响应低锌胁迫过程 参与糖信号过程 参与植物自身免疫反应	Ueda等2011; Lee等2011 Sonoda等2009 Sako等2010; Lee等2011 Sako等2012 Chung等2011 Sakamoto等2011 Sun等2012 Yao等2012
	<i>RPT2b</i>	在 <i>RPT2a</i> 基因存在的条件下, <i>RPT2b</i> 基因维持分生组织活性是非必需基因 与 <i>RPT2a</i> 共同参与配子体发育过程	Ueda等2004, 2011 Lee等2011
RPT3	<i>RPT3</i>	参与谷氨酸信号而介导光诱导胚轴伸长发育过程	Brenner等2009
RPT4	<i>RPT4a</i>	<i>RPT4a</i> 与RAA1 (根部发育的重要调控因子)结合在一起而启动泛素降解途径, 从而调节植株根构型 调控细胞质雄性育性发育过程 <i>RPT4a</i> 参与病毒侵染的防御反应途径	Han等2008 李刚等2011 Sahu等2016
	<i>RPT4b</i>	未知	
RPT5	<i>RPT5a</i>	参与配子体发育过程 参与响应低锌胁迫过程 参与ABA信号途径	Gallois等2009 Sakamoto等2011 Hayashi和Hirayama 2016
	<i>RPT5b</i>	参与配子体发育过程 参与葡萄糖信号途径	Gallois等2009 Cho等2006
RPT6	<i>RPT6a</i>	XopJ与RPT6互作, 能特异降解RPT6, 该生物学过程降低蛋白酶体活性, 进一步抑制NPR1 (non-expressor of PR1)活性而降低水杨酸(SA)相关免疫反应	Üstün和Börnke 2015
	<i>RPT6b</i>	未知	

2.1.1 RPT1

迄今为止, 植物中尚未见*RPT1*基因的相关功能研究报道。

2.1.2 RPT2

拟南芥*RPT2*基因含2个拷贝, 两拷贝间蛋白序列仅含3个氨基酸差异, 并且基因表达模式相似。其中*RPT2a*基因又称作*HLR (HALTED ROOT)*, 是维持根尖分生组织和顶端分生组织活性的必需基因。而*RPT2b*基因缺失, 植株没有明显的发育缺陷, 且*RPT2a*基因启动子驱动*RPT2b*基因表达能互补*rpt2a*突变体表型, 实验结果表明: 在*RPT2a*基因存在的条件下, *RPT2b*基因维持分生组织活性是非必需基因(Ueda等2004, 2011)。然而, *rpt2a*与*rpt2b*形成的双突变体出现配子体致死, 说明二者共同参与配子体发育过程(Ueda等2011; Lee等2011)。此外, *rpt2a*突变体叶片增大, 进一步实验证明

*RPT2a*通过介导“细胞增殖调控、DNA复制以及G2/M时期”相关基因的转录, 能有效调节叶器官发育。而*rpt2b*突变体叶片发育正常, 但*RPT2a*基因启动子驱动*RPT2b*基因表达不能恢复*rpt2a*突变体叶片表型, 表明二者在调控叶片发育过程中的功能截然不同(Sonoda等2009)。有趣的是, 也有研究发现*RPT2a*负向调控表皮毛发育过程(Sako等2010; Lee等2011)以及通过DNA甲基化在转录水平参与基因沉默(Sako等2012)。不仅如此, *RPT2*在植物抗逆胁迫过程中也具有重要作用。*uni-1D*基因编码CC-NBS-LRR型蛋白, 能抑制发病相关基因表达(PR-1)并识别病原菌及驱动防御反应。该基因缺失会导致植株在萌发后真叶形成早期的致死效应(Chung等2008; Igari等2008)。研究发现*RPT2a*和*RPT2b*与*uni-1D*间有相互作用。*uni-1d*与*rpt2a*杂交形成的双突变体中*uni-1D*表达水平降低会进而诱导PR-1

基因表达,并通过恢复*WUSCHEL*基因(保持分生组织活性)表达而抑制*uni-1D*基因的致死效应。以上结果表明,RPT2a而非RPT2b,作为*uni-1D/NI*的主要互作因子,它们之间的相互作用在植物形态发育和抗逆信号中具有关键作用(Chung等2011)。此外,拟南芥中RPT2a受到糖信号强烈诱导,*rpt2a*突变体叶片增大,对糖信号表现为超敏反应。值得注意的是,当添加6%的糖处理时,突变体中多聚泛素蛋白显著积累。进一步研究发现*gin2*(葡萄糖不敏感突变体)中RPT2a基因表达并未变化。以上结果表明,拟南芥中RPT2a参与的蛋白酶体途径与糖信号过程关系密切(Sun等2012)。

2.1.3 RPT3

拟南芥中RPT3是6个RPT基因中唯一单拷贝基因(Fu等1999)。 β -甲基-L-丙氨酸(β -methylamino L-alanine, BMAA)是苏铁科植物衍生物(谷氨酸受体激动剂),它能促进光照条件下生长的拟南芥子叶下胚轴伸长2到3倍。BAMM不敏感突变体*bim409*在光照条件下子叶下胚轴并未伸长,但在黑暗条件下与野生型并无差异。研究发现*bim409*突变体是由RPT3基因突变导致的表型。以上结果表明:拟南芥中RPT3参与谷氨酸信号而介导光诱导胚轴伸长发育过程(Brenner等2009)。

2.1.4 RPT4

尽管已经在拟南芥和水稻中鉴定到RPT4基因,但它在植物细胞内的功能并不十分清楚(Fu等1999; Shibahara等2004)。RAA1 (root architecture associated 1)是根部发育的重要调控因子。荧光共定位分析表明OsRAA1主要在细胞分裂期的纺锤体表达,若缺失会阻止细胞进入分裂后期,影响细胞分裂而限制根系发育。水稻中RPT4a与RAA1结合在一起而启动泛素降解途径,从而调节水稻根构型(Han等2008)。此外,红麻中RPT4参与小孢子的发育过程,可能调控细胞质雄性育性发育过程(李刚等2011)。通过VIGS系统构建马铃薯植株*Sl-RPT4*基因沉默株系,表型分析发现转基因株系的ToLCNDV (*tomato leaf curl new delhi virus*)诱发病状加剧;瞬时超表达*SIRPT4*诱导抗氧化酶系统及细胞程序性死亡(PCD),并且*SIRPT4*介导PCD过程的标记是ROS分子显著性增加。以上结果表明马铃薯中RPT4a参与病毒侵染的防御反应途径(Sahu等2016)。

2.1.5 RPT5

RPT5在拟南芥*Col-0*的有丝分裂过程中起作用,参与雌雄配子体发育过程,并且在这个过程中RPT5a和RPT5b功能表现出冗余现象。然而在拟南芥*Ws*背景中二者并未表现出功能冗余现象(Gallois等2009)。进一步研究发现,RPT5b^{Col-0}与RPT5b^{Ws}间的第7个内含子区域含一个SNP,RPT5b^{Ws}的内含子区域的SNP会形成一个新的剪接分支序列,这会诱导前体mRNA的部分错乱剪接,导致蛋白翻译提前终止。这些结果说明RPT5a和RPT5b之间在不同背景拟南芥品种中的不平衡冗余可能是可变剪接形成“复制基因”间的“进化漂流”(Guyon-Debast等2010)。有趣的是,研究发现拟南芥中RPT5b具有区别于RPT5a的特有功能,能与葡萄糖的蛋白感受器HXK1 (HEXOKINASE1)直接互作而参与葡萄糖信号途径(Cho等2006)。此外,研究发现RPT2a和RPT5a亚基在植物抗逆境过程中可能具有重要功能。RPT2a和RPT5a的T-DNA插入突变体对低锌胁迫更敏感,并检测到与低锌胁迫相关的一些标记基因上调表达,以及多聚泛素蛋白显著累积。以上结果表明:拟南芥中RPT2a和RPT5a亚基参与响应低锌胁迫过程(Sakamoto等2011)。拟南芥中RPT5a的等位突变基因*ahg12* (*ABA hypersensitive germination 12*)为ABA敏感突变体,表现为对ABA、乙烯以及光照敏感。图位克隆发现突变体*ahg12*是由RPT5a的L23 loop结构中的一个氨基酸缺失造成的,该结构是19S孔结构(pore structure)关键组成部分,所以推测该基因突变导致26S蛋白酶体作用底物偏好性发生变化(Hayashi和Hirayama 2016)。

2.1.6 RPT6

黄瘤孢属III型效应物XopJ (T3E XopJ)有蛋白酶活性,与拟南芥中RPT6间有相互作用,并依赖于RPT6的ATP结合活性,能特异降解RPT6,导致细胞质和核中蛋白酶体活性下降。该生物学过程降低蛋白酶体活性,进一步抑制NPR1 (Non-expressor of PR1)活性而降低水杨酸相关免疫反应(Üstün和Börnke 2015)。

2.2 RPN (regulatory particle non-ATPase)亚基

与RPT基因类似,拟南芥中大部分RPN亚基含2个拷贝,能够互补酵母同源突变体,表明RPN亚基功能在进化过程中非常保守(表2)。氨基酸序列比对发现,在植物、真菌和动物中最保守的亚基是

RPN8a/b与RPN11, 含MPN (Mov34 and Pad1 N-terminal domain)结构域; RPN3a/b、RPN5a/b、RPN6、RPN7和RPN9a/b含有PCI (proteasome/COP9/initiation factor 3 domain)结构域; RPN1a/b与RPN2a/b含PC-rep (proteasome/cyclosome repeats); RPN10含vWA (von Willebrand factor-A domain)和UIM (Ub-interacting motif)结构域。此外, 研究发现, 与酵母中类似, 酵母双杂实验筛选发现拟南芥中RPN5a/RPN9a与RPN11/RPN8a 2对亚基间有相互作用(Yang等2004)。

2.2.1 RPN1

拟南芥中RPN1基因有2个拷贝(*RPN1a*、*RPN1b*), 其中*RPN1a*表达量较高; 而*RPN1b*表达量较低, 但在各组织中均有表达(Yang等2004)。两拷贝间氨基酸序列相似度为91%, 在拟南芥胚发育过程中起

非常关键的作用, 并可能参与这个过程中某一类蛋白的降解过程。*rpn1a*突变体产生胚致死现象, 而*rpn1b*突变体表型与野生型相似。有趣的是, 双突变体表型与单突变体相差很大。但将*RPN1a*启动子与*RPN1b*编码区相连接能互补*rpn1a*突变体表型至野生型, 说明2个拷贝间有部分功能冗余。尽管2个基因在花器官及种子中表达模式一致, 但是, 二者在配子形成及胚发育过程中并没有完全功能冗余(Brukhn等2005)。也有研究结果显示*RPN1a*参与叶极性建成(Huang等2006)。也有报道发现拟南芥*rpn1a* T-DNA插入突变体主茎和莲座叶表皮毛和分枝表皮毛增加, 并检测到突变体中与表皮毛及表皮毛分枝相关的基因表达量显著上调, 且外源添加GA和CK显著抑制*RPN1a*表达。以上研究结果表明: 拟南芥中*RPN1a*可能通过植物激素

表2 植物中RPN亚基已鉴定的基因及其功能

Table 2 Functions of representative members of RPN subunit in plants

蛋白名称	基因名称	功能	文献
RPN1	<i>RPN1a</i>	配子形成及胚发育过程	Brukhn等2005
		叶极性建成	Huang等2006
		可能通过植物激素GA和CK途径参与负向调控表皮毛发育	Yu等2016
		增强植物在氧化胁迫中的耐受性	Wang等2009
		参与植物自身免疫反应	Yao等2012
RPN2	<i>RPN1b</i>	配子形成及胚发育过程	Brukhn等2005
	<i>RPN2a</i>	叶极性的正确建立	Huang等2006
RPN3	<i>RPN2b</i>	未知	
	<i>RPN3</i>	NtCDPK1与RPN3的相互作用可能参与细胞分裂、细胞分化与细胞死亡过程中的共同信号途径	Lee等2003
RPN5	<i>RPN5a</i>	小孢子发育, 配子体发育及19S复合体的组装过程	Book等2009
	<i>RPN5b</i>		
RPN6	<i>RPN6</i>	参与干旱胁迫响应过程	Cho等2015
RPN7	<i>RPN7</i>	叶片中的PCD过程	Lee等2006
RPN8	<i>RPN8a</i>	叶极性的正确建立	Huang等2006
		参与植物自身免疫反应	Yao等2012
	<i>RPN8b</i>	未知	
RPN9	<i>RPN9a</i>	RPN9可能部分参与生长素转运和油菜素内酯信号调节, 两个过程对维管系统的发育具有关键作用	Jin等2006
	<i>RPN9b</i>	未知	
RPN10	<i>RPN10</i>	参与生长素和细胞分裂素介导的生长发育过程	Girod等1999
		ABA信号反应途径	Smalle等2003
		参与抗氧化胁迫过程	Kurepa等2008
		作为双向受体蛋白介导蛋白酶体自噬过程	Marshall等2015; Wen和Klionsky 2016
RPN11	<i>RPN11</i>	未知	
RPN12	<i>RPN12a</i>	参与细胞分裂素合成过程	Smalle等2002; Ryu等2009
		参与干旱胁迫响应过程	Cho和Kim 2008
		参与抗氧化胁迫过程	Kurepa等2008
	<i>RPN12b</i>	未知	

GA和CK途径参与表皮毛发育(Yu等2016)。此外,研究发现*RPN1a*能增强植物在氧化胁迫中的耐受性(Wang等2009)。*RPN1a*参与拟南芥自身免疫反应,同时也发现*RPT2a*和*RPN8a*在这个过程中有响应(Yao等2012)。

2.2.2 RPN2

拟南芥中*RPN2*含2个拷贝(*RPN2a*、*RPN2b*),*RPN2a*与*RPN8a*形成的双突变体表现出叶极性缺陷表型。26S蛋白酶体降解功能参与叶片近-远轴极性的建成,从而揭示这一蛋白翻译后水平的调节对于叶极性的正确建立的重要性(Huang等2006)。

2.2.3 RPN3

研究发现胡萝卜中的RPN3 (21D7)定位在细胞核中,能部分互补酵母系统中*rpn3*突变体的致死表型,并主要在快速分裂组织中表达(Smith等1997),但植物细胞内21D7蛋白参与调控细胞周期的内在机制尚不清楚。拟南芥中RPN3也在快速分裂组织中表达,包括根尖和茎尖分生组织。烟草中NtCDPK1在快速分裂组织中表达,与RPN3共定位在细胞核,核外围以及质膜周围。酵母双杂与免疫共沉淀实验证明烟草中RPN3与NtCDPK1互作。以Mg²⁺为辅助因子的依赖于Ca²⁺方式中,NtCDPK1能磷酸化RPN3。同时,烟草中利用VIGS系统构建RPN3和CDPK1沉默株系,表型分析发现新叶中细胞形态异常及细胞过早死亡。基于这些研究结果,暗示烟草中NtCDPK1与RPN3的相互作用可能参与细胞分裂、细胞分化与细胞死亡过程中的共同信号转导途径(Lee等2003)。

2.2.4 RPN5

拟南芥中*RPN5*基因有2个拷贝(*RPN5a*、*RPN5b*),两拷贝间氨基酸序列相似度为72%。在小孢子发育,配子体发育及19S复合体的组装过程中具有非常重要的作用。T-DNA插入突变体*rpn5a*表现出多种发育缺陷,例如胚胎发育异常、光下生长时植株严重矮化以及雄性不育,而*rpn5b*与野生型几乎无差别。运用35S启动子过表达*RPN5a*和*RPN5b*,2个基因自身启动子表达*RPN5a*和*RPN5b*,以及交换启动子表达*RPN5a*和*RPN5b*均能互补*rpn5a*突变体表型至野生型,结果说明两个蛋白间部分功能冗余。两基因超表达株系出现明显不同的表型,且GFP定位显示二者在胞内分布模式迥异,表明二者间存在特异蛋白功能。同时,研究发现缺

失RPN5a亚基的26S蛋白酶体复合物稳定性降低,说明RPN5对于26S蛋白酶体复合物的组装是必需的(Book等2009)。

2.2.5 RPN6

拟南芥中RPN6属于单拷贝基因。2008年,拟南芥中前期研究结果证实,PUB22和PUB23是U-box E3泛素连接酶的同源蛋白,在干旱条件下受到显著诱导,但对ABA处理不敏感。*pub22*和*pub23*突变体为功能获得型,表现出对干旱胁迫有较高的耐受性且双突变体耐受性更强。研究发现PUB22和PUB23通过泛素化细胞质中RPN12a参与干旱胁迫响应过程(Cho和Kim 2008)。进一步体外实验证明PUB22和PUB23能成功结合泛素蛋白(泛素蛋白酶体中RPN6)。此外,在PUB22超表达植株中,RPN6蛋白的半衰期更短,在*pub22/pub23*双突变植株中RPN6特别稳定。实验结果表明,在响应干旱胁迫过程中,PUB22和PUB23能改变26S蛋白酶体活性。说明PUB22和PUB23能直接泛素化RPN6,导致进一步降解。以上结果综合表明,PUB22和PUB23能通过泛素RPN6和RPN12a而改变26S蛋白酶体活性,进一步响应干旱胁迫(Cho等2015)。

2.2.6 RPN7

迄今,植物中仅发现在辣椒中有RPN7亚基功能的相关研究。运用洋葱瞬时表达实验,结果显示RPN7-GFP蛋白在细胞核表达。进一步通过瞬时超表达实验证明CaRPN7参与辣椒叶片中的PCD过程(Lee等2006)。

2.2.7 RPN8

拟南芥中*RPN8a*的突变造成叶极性缺陷,并且其它26S蛋白酶体亚基突变体与*rpn8a*突变体表型一致,只是在强度上有所不同,表明26S蛋白酶体上各亚基在调控叶极性发育方面功能的一致性(Huang等2006)。

2.2.8 RPN9

在烟草系统中,通过VIGS下调表达*RPN9*,会抑制病毒系统转运并改变植物维管系统发育。*RPN9*沉默后,烟草植株表现为“额外的叶脉”(extra leaf vein),并伴随木质部增加而韧皮部减少。对照条件下,下调表达RPN9会出现叶片早衰现象,但并未改变叶片形态。同时研究发现RPN9可能部分参与生长素转运和油菜素内酯信号调节,两个过程对维管系统的发育具有关键作用。因此,可以推

测RPN9通过降解一系列蛋白而调节维管系统发育,例如经实验鉴定到的BZR1蛋白(Jin等2006)。

2.2.9 RPN10

众多RT相关功能研究中,RPN10的研究较为详细。对小立碗藓(*Physcomitrella patens*)中RPN10(MCB1)的体外实验表明,它与多聚泛素链具有亲和力,是泛素化底物的受体。PpMCB1与其他真核细胞生物中同源蛋白相似度为50%~75%。酵母中*mcb1*突变体能正常生长,与之不同的是,小立碗藓中*mcb1*突变体生长发育受到抑制,表现为轴丝体发育异常,没有芽和配子托。外源添加生长素和细胞分裂素能恢复芽形成及随后的部分配子托发育。以上结果说明RPN10参与的泛素/26S蛋白酶体途径在植物激素介导的生长发育过程中具有重要作用(Girod等1999)。研究者也发现拟南芥中RPN10参与ABA信号反应途径,调节植物发育过程。与野生型拟南芥相比,*rpn10*突变体种子萌发率低、生长缓慢,而且表现出明显生殖缺陷。这些性状是由于RPN10亚基的缺失,导致突变体中蛋白酶体无法正常发挥作用,选择性地稳定ABI5蛋白,而使ABA信号途径基因表达异常,突变体对ABA表现为超敏反应(Smale等2003)。RPN10相关研究表明,拟南芥*rpn10*突变体中“双冒(double-capped)”蛋白酶体减少,20S核心颗粒复合体增加,以及营养生长期和生殖生长期的多效性表型。令人惊讶的是,*rpn10*突变体表型能被“底物识别缺陷的”RPN10恢复表型,表明RPN10缺陷型蛋白酶体而非“底物识别功能”导致该突变体表型。以上结果表明,拟南芥中很可能存在冗余的“底物识别途径”去识别泛素化底物,最后降解蛋白,但他们在生物体内的特有功能需要进一步去验证(Lin等2011)。RPN10是RP中的一种非ATP酶,可以帮助RP识别即将被降解的底物蛋白。AtRPN10的N端包含一个vWA结构域,可以帮助AtRPN10结合在RP上(Fu等2001)。其C端包含3个泛素作用的结构域UIMs(Fu等1998),UIM1可以结合泛素,UIM3可以结合含UBL(ubiquitin-like)结构域的RAD23(Lin等2011)。进一步研究发现,UIM2则可以与自噬相关蛋白ATG8相互作用,这种结构使得AtRPN10可以作为一个ATG8/ubiquitin双向受体蛋白(Dual ATG8/ubiquitin receptor),初步证明RPN10在蛋白自噬降解过程中发挥作用(Marshall等2015)。在拟南芥野

生型植株中使用蛋白酶体活性抑制剂MG132处理后,蛋白酶体自噬过程被诱导发生;而*rpn10*突变体植株中,这种过程则被阻断,抑制剂导致失活的蛋白酶体含量增加,但其不能与ATG8结合并进入到自噬过程中,这些证据进一步说明RPN10能够作为一个双向受体蛋白介导蛋白酶体自噬过程(Wen和Klionsky 2016)。

2.2.10 RPN11

拟南芥中RPN11(regulatory particle non-ATPase 11)属于单拷贝基因,是去泛素化酶,属于亚家族JAMM(the JAB1/MPN/MOV34 proteases),该类去泛素化酶的活性依赖于金属离子锌,亦称金属蛋白酶(Komander等2009)。但植物中尚未见RPN11基因相关功能的报道。

2.2.11 RPN12

拟南芥中RPN12a参与细胞分裂素信号反应途径。RPN12a的T-DNA插入突变体及干扰突变体中2个细胞分裂素诱导基因CYCD3和NIA1表达显著上升,使植株对细胞分裂素敏感而影响根系伸长和叶片发育过程。蛋白酶体亚基RPN12的缺失会导致合成细胞分裂素含量降低,这意味着细胞分裂素响应可能依赖于一种或多种蛋白降解(Smale等2002; Ryu等2009)。此外,研究发现RPN10和RPN12a也参与抗氧化胁迫过程(Kurepa等2008)。

综上所述,通过对19S调节复合体中各亚基的功能进行系统调研与总结分析,发现各亚基显著影响植物的生长发育,对植物的分生组织活动、光形态建成、维管系统发育、叶器官发育与配子体发育、以及激素信号、免疫应激反应和非生物胁迫响应等过程具有重要的调控作用(图2)。

3 展望

19S调节复合体颗粒作为26S蛋白酶体系统中的重要组成部分,能够“识别泛素底物”,“切除泛素标签与去折叠”并“转运去折叠底物”到20S核心颗粒进行降解。至今,植物中鉴定到的19S复合体亚基中只有一部分的功能被研究清楚,而且相关研究集中在拟南芥中。但在其他作物中研究较少,比如水稻中仅发现RPT4亚基的相关功能报道。依据目前研究发现的结果,植物中19S调节复合体亚基并不在一个生理过程中起作用,它们可以在不同的生命活动中发挥重要作用,例如调控配子体

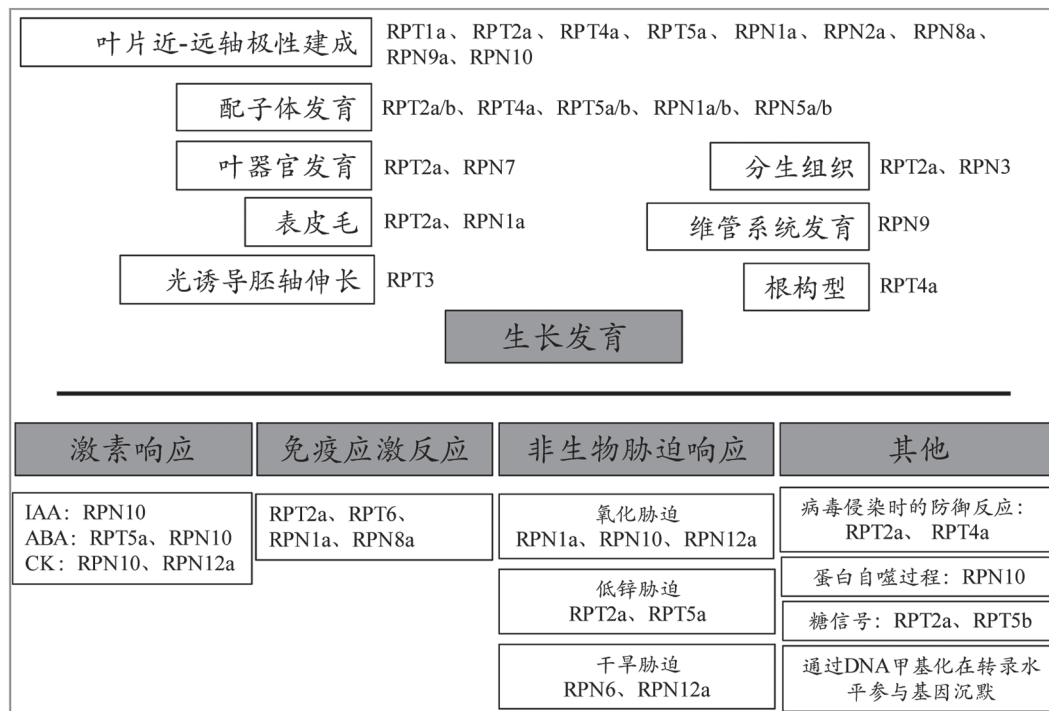


图2 植物中19S复合体亚基RP的生理功能

Fig.2 Physiological function of RP subunit with 19S regulator in plants

发育,控制分生组织活动等。由此可见,19S调节复合体亚基具有复杂调控的生物学功能,因此很难将某个亚基的作用限定于某一特定的生理生化过程。

在今后的研究中对于已鉴定的亚基应选择合适的突变体进行深入研究,挖掘其潜在的生物学和生理学功能。此外,19S调节复合体亚基的生理底物繁多,但是目前发现与植物19S亚基能够直接相互作用的蛋白数量还很少,与这些亚基有关的相互作用网络值得进一步深入和系统地研究。相信随着定量蛋白质组学和生物信息学等新实验技术的发展,将来对植物中19S调节复合体亚基的复杂调控功能会有更深刻的认识。对这些问题的深入研究将有助于进一步揭示泛素/26S蛋白酶体途径介导的蛋白降解调控植物生长发育的奥秘。

参考文献(References)

- Beckwith R, Estrin E, Worden EJ, et al (2013). Reconstitution of the 26S proteasome reveals functional asymmetries in its AAA⁺ unfoldase. *Nat Struct Mol Biol*, 20: 1164–1172
- Book AJ, Smalle J, Lee KH, et al (2009). The RPN5 subunit of the 26S proteasome is essential for gametogenesis, sporophyte development, and complex assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 460–478
- Brenner ED, Feinberg P, Runko S, et al (2009). A mutation in the regulatory particle aaaatpase-3 *Arabidopsis* impairs the light-specific hypocotyl elongation response elicited by a glutamate receptor agonist, bmaa. *Plant Mol Biol*, 70: 523–533
- Brukhin V, Gheyselinck J, Gagliardini V, et al (2005). The RPN1 subunit of the 26S proteasome in *Arabidopsis* is essential for embryogenesis. *Plant Cell*, 17: 2723–2737
- Cho SK, Bae H, Ryu MY, et al (2015). Pub22 and pub23 U-Box E3 ligases directly ubiquitinate rpn6, a 26S proteasome lid subunit, for subsequent degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 464: 994–999
- Cho SK, Kim WT (2008). *Arabidopsis* pub22 and pub23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatorial roles in response to drought stress. *Plant Cell*, 20: 1899–1914
- Cho YH, Yoo SD, Sheen J (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127: 579–589
- Chung KM, Igari K, Uchida N, et al (2008). New perspectives on plant defense responses through modulation of developmental pathways. *Mol Cells*, 26: 107–112
- Chung KM, Tasaka M (2011). Rpt2a, a 26S proteasome AAA-ATPase, is directly involved in *Arabidopsis* CC-NBS-LRR protein uni-1d-induced signaling pathways. *Plant Cell Physiol*, 52: 1657–1664

- Deveraux Q, Jensen C, Rechsteiner M (1995). Molecular cloning and expression of a 26S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J Biol Chem*, 270: 23726–23729
- Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, et al (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol*, 4: 725–730
- Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, et al (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci*, 25: 83–88
- Fu H, Doelling JH, Rubin DM, et al (1999). Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple - A ATPase subunits from the *Arabidopsis* 26S proteasome. *Plant J*, 18: 529–539
- Fu H, Reis N, Lee Y, et al (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J*, 20: 7096–7107
- Fu H, Sadis S, Rubin DM, et al (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26S proteasome subunit MCB1. *J Biol Chem*, 273: 1970–1981
- Fujimuro M, Tanaka K, Yokosawa H, et al (1998). Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 423: 149–154
- Gallois JL, Guyon-Debast A, Lecureuil A, et al (2009). The *Arabidopsis* proteasome RPT5 subunits are essential for gametophyte development and show accession dependent redundancy. *Plant Cell*, 21: 442–459
- Girod PA, Fu H, Zryd JP, et al (1999). Multiubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 11: 1457–1471
- Guyon-Debast A, Bonhomme S, Guerche P, et al (2010). A SNP associated with alternative splicing of rpt5b causes unequal redundancy between rpt5a and rpt5b among *Arabidopsis thaliana* natural variation. *BMC Plant Biol*, 10: 158
- Han Y, Cao H, Jiang J, et al (2008) Rice root architecture associated 1 binds the proteasome subunit rpt4 and is degraded in a D-box and proteasome-dependent manner. *Plant Physiol*, 148: 843–855
- Hayashi S, Hirayama T (2016). *ahg12* is a dominant proteasome mutant that affects multiple regulatory systems for germination of *Arabidopsis*. *Sci Rep-UK*, 6: 25351
- Huang W, Pi L, Liang W, et al (2006). The proteolytic function of the *Arabidopsis* 26S proteasome is required for specifying leaf adaxial identity. *Plant Cell*, 18: 2479–2492
- Igari K, Endo S, Hibara K, et al (2008). Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 55: 14–27
- Jin H, Li S, Villegas A (2006). Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. *Plant Physiol*, 142: 651–661
- Kohler A, Cascio P, Leggett DS, et al (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*, 7: 1143–1152
- Komander D, Clague MJ, Urbe S (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 550–563
- Kurepa J, Toh EA, Smalle JA (2008). 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *Plant J*, 53: 102–114
- Lee BJ, Kwon SJ, Kim SK, et al (2006). Functional study of hot pepper 26S proteasome subunit RPN7 induced by tobacco mosaic virus from nuclear proteome analysis. *Biochem Bioph Res Co*, 351: 405–411
- Lee KH, Minami A, Marshall RS, et al (2011). The RPT2 subunit of the 26S proteasome directs complex assembly, histone dynamics, and gametophyte and sporophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 4298–4317
- Lee SS, Cho HS, Yoon GM, et al (2003). Interaction of NtCDPK1 calcium-dependent protein kinase with NtRpn3 regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum*. *Plant J*, 33: 825–840
- Li G, Guan HX, Niu Y, et al (2010). Full-length cloning and expression analysis of RPT anther of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Sci Agric Sin*, 44: 1323–1330 (Chinese with English abstract)[李刚, 关和新, 牛英等(2010). 红麻RPT4全长cDNA的克隆及其在红麻花药中的表达. *中国农业科学*, 44: 1323–1330]
- Lin YL, Sung SC, Tsai HL, et al (2011). The defective proteasome but not substrate recognition function is responsible for the null phenotypes of the *Arabidopsis* proteasome subunit RPN10. *Plant Cell*, 23: 2754–2773
- Marshall RS, Li F, Gemperline DC, et al (2015). Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 58: 1053–1066
- Miller J, Gordon C (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett*, 579: 3224–3230
- Rosenzweig R, Osmulski PA, Gaczynska M, et al (2008). The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat Struct Mol Biol*, 15: 573–580
- Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, et al (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J*, 17: 4909–4919
- Ryu MY, Cho SK, Kim WT (2009). RNAi suppression of RPN12a decreases the expression of type-A ARRs, negative regulators of cytokinin signaling pathway in *Arabidopsis*. *Mol Cells*, 28: 375–382
- Sakamoto T, Kamiya T, Sako K, et al (2011). *Arabidopsis*

- thaliana* 26S proteasome subunits RPT2a and RPT5a are crucial for zinc deficiency-tolerance. *Biosci Biotech Bioch*, 75: 561–567
- Sako K, Maki Y, Imai KK, et al (2010). Control of endoreduplication of trichome by RPT2a, a subunit of the 19S proteasome in *Arabidopsis*. *J Plant Res*, 123: 701–706
- Sako K, Maki Y, Kanai T, et al (2012). *Arabidopsis* RPT2a, 19S proteasome subunit, regulates gene silencing via DNA methylation. *PLoS One*, 7: e37086
- Sahu PP, Sharma N, Puranik S, et al (2016). Tomato 26S Proteasome subunit RPT4a regulates ToLCNDV transcription and activates hypersensitive response in tomato. *SCIREP-UK*, 6: 27078
- Shibahara T, Kawasaki H, Hirano H (2004). Mass spectrometric analysis of expression of ATPase subunits encoded by duplicated genes in the 19S regulatory particle of rice 26S proteasome. *Arch Biochem Biophys*, 421: 34–41
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, et al (2002). Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12a. *Plant Cell*, 14: 17–32
- Smalle J, Kurepa J, Yang P, et al (2003). The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis thaliana* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 965–980
- Smith MW, Ito M, Miyawaki M, et al (1997). Plant 21D7 protein, a nuclear antigen associated with cell division, is a component of the 26S proteasome. *Plant Physiol*, 113: 281–291
- Sonoda Y, Sako K, Maki Y, et al (2009). Regulation of leaf organ size by the *Arabidopsis* RPT2a 19S proteasome subunit. *Plant J*, 60: 68–78
- Sun H, Sako K, Suzuki Y, et al (2012). Sugar-inducible RPT2a, a subunit of 26S proteasome, participates in sugar response in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol*, 29: 279–284
- Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, et al (2004). The HALTED ROOT gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development*, 131: 2101–2111
- Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, et al (2011). *Arabidopsis* Rpt2a encoding the 26S proteasome subunit is required for various aspects of root meristem maintenance, and regulates gametogenesis redundantly with its homolog, rpt2b. *Plant Cell Physiol*, 52: 1628–1640
- Üstün S, Börnke F (2015). The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ proteolytically degrades proteasome subunit RPT6. *Plant Physiol*, 168: 107–119
- Vierstra RD (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci*, 8: 135–142
- Vierstra RD (2009). The ubiquitin/26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 385–397
- Wang S, Kurepa J, Smalle JA (2009). The *Arabidopsis* 26S proteasome subunit RPN1a is required for optimal plant growth and stress responses. *Plant Cell Physiol*, 50: 1721–1725
- Wen X, Klionsky DJ (2016). The proteasome subunit RPN10 functions as a specific receptor for degradation of the 26S proteasome by macroautophagy in *Arabidopsis*. *Autophagy*, 12: 905–906
- Yang P, Fu H, Walker J, et al (2004). Purification of the *Arabidopsis* 26S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J Biol Chem*, 279: 6401–6413
- Yao C, Wu Y, Nie H, et al (2012). RPN1a, a 26S proteasome subunit, is required for innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant J*, 71: 1015–1128
- Yu D, Yu F, Du C, et al (2016). RPN1a, a subunit of the 26S proteasome, controls trichome development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Bioch*, 88: 82–88

Research advances on 19S proteasome regulatory subunits in plants

PAN Xiao-Ying¹, TANG Xiao-Yan^{1,2,*}

¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

²Shenzhen Institute of Molecular Crop Design, Shenzhen 518107, China

Abstract: The ubiquitin/26S proteasome pathway is a specific and high-efficient route for protein degradation in eukaryote. 19S regulator is the essential subcomplexes of the 26S proteasome and is critical for plant growth and development. Most reports on the 19S regulator were from animals, while its function remains largely unknown in plant species, which prohibits further understanding and utilization of the function of 19S particle. Here, we summarize the biological function of 19S particle in *Arabidopsis* and other plants, and the role in response to abiotic stress. Moreover, we prospect the further study on this project. This review will not only advance our understanding how 19S particle function in plant growth and development, but also lay theoretic foundation for clarification the function of 26S proteasome in different plant species.

Key words: 26S proteasome; 19S regulator; plant development; adverse environment

Received 2018-06-14 Accepted 2018-07-10

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030310500) and the China Postdoctoral Science Foundation (2017M612685).

*Corresponding author (txy@frontier-ag.com).