

综述 Reviews

叶绿体蛋白酶的生物学功能研究进展

吕金莲, 马娜娜*, 孟庆伟

山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 叶绿体是植物细胞特有的细胞器, 对植物至关重要。叶绿体中蛋白质的合成、降解、易位、组装等受复杂的细胞内网络调控, 其中就有叶绿体蛋白酶的参与。叶绿体蛋白酶对叶绿体及植物的发育和稳态起着非常重要的作用。根据其定位、结构、功能的不同可以被划分成不同的类型。本文主要阐述了各物种中定位于叶绿体的蛋白酶的生物学功能, 并对叶绿体中蛋白酶的研究趋势和重点要解决的问题进行了探讨。

关键词: 叶绿体蛋白酶; 逆境; 营养代谢; 生长发育

叶绿体是植物进行光合作用的场所。叶绿体中含有约3 000种不同的蛋白质, 其中包括大量的光合机构组分。叶绿体中蛋白质的加工、成熟与降解是植物正常生长发育的必要过程, 也是其应对环境变化时常见的调节机制。叶绿体蛋白酶在此过程中发挥着重要的作用, 能够维持叶绿体内蛋白系统的稳定, 保证植物体正常生命活动的有序进行(Nishimura等2016)。叶绿体中的蛋白酶分布广泛, 在被膜、基质以及类囊体膜和腔室中都有丰富的蛋白酶类, 其功能主要有: 加工成熟、删除异常蛋白, 蛋白质量控制, 衰老和质体类型转化(Nishimura等2016)。陆生植物叶绿体中的蛋白酶可分为3类, 第1类为金属蛋白酶, 如: 基质加工肽酶(stromal processing peptidase, SPP)、前序列蛋白酶(presequence protease, PreP)、丝状温度敏感H蛋白酶(filamentation temperature-sensitive H, FtsH); 第2类为丝氨酸蛋白酶, 如: 质体I型信号肽酶1(plastidic type I signal peptidase 1, Plsp1)、酪蛋白分解蛋白酶(caseinolytic protease, Clp)、基质降解酶(degradation of periplasmic, Deg)等; 第3类为天冬氨酸蛋白酶, 如: 叶绿体核仁DNA结合蛋白(chloroplast nucleoid DNA-binding protein, CND41)、NANA (Italian for dwarf) (图1)。

叶绿体是一种半自主细胞器, 其中大多数蛋白质由核基因编码。由核基因编码的蛋白质先在细胞质中合成带N端转运肽的前体, 之后由转运肽引导进入叶绿体, 在叶绿体中被相应的蛋白酶切除并释放出成熟肽链, 负责转运肽剪切的蛋白酶主要有SPP与内囊体加工肽酶(thyla-

koidal processing peptidase, TPP)。部分叶绿体蛋白需要进一步加工才具有生理功能, 例如光系统II (photosystem II, PSII)反应中心D1蛋白。蛋白酶C端加工酶(carboxyl-terminal processing enzyme, CTP)参与了成熟的D1蛋白的加工。为了维持叶绿体正常的生理活性, 体内损伤的蛋白质需要被及时降解和替换。因此, 叶绿体中还存在着大量降解损伤蛋白的蛋白酶, 如: Clp、Deg、FtsH等。总之, 叶绿体中所包含的各种类型的蛋白酶构成了一个复杂而精细的蛋白酶系统, 用于维持叶绿体的正常发育和功能(常伟东等2016)。

叶绿体中的蛋白酶不仅发挥水解酶和加工酶的作用, 还能间接地影响叶绿体的结构、光合作用、植物的形态以及植物的抗性。关于蛋白酶的类型和结构, 前人已经作了比较详细的报道(Nishimura等2016), 但未见有关叶绿体蛋白酶生物功能的系统论述。本文总结了迄今为止已经报道的叶绿体蛋白酶的编码方式(表1)及其主要生物学功能, 旨在为人们更好地了解和研究叶绿体蛋白酶提供参考。

1 叶绿体蛋白酶在逆境胁迫中的功能

1.1 高温与强光

高温胁迫(heat stress, HS)会对植物造成严重的伤害, 如细胞膜结构的损伤、蛋白质的失活、活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累以及体内

收稿 2018-08-31 修定 2018-11-05

资助 国家自然科学基金(31371553)和山东省自然科学基金(ZR-2018QC001)。

* 通讯作者(mmama@sdau.edu.cn)。

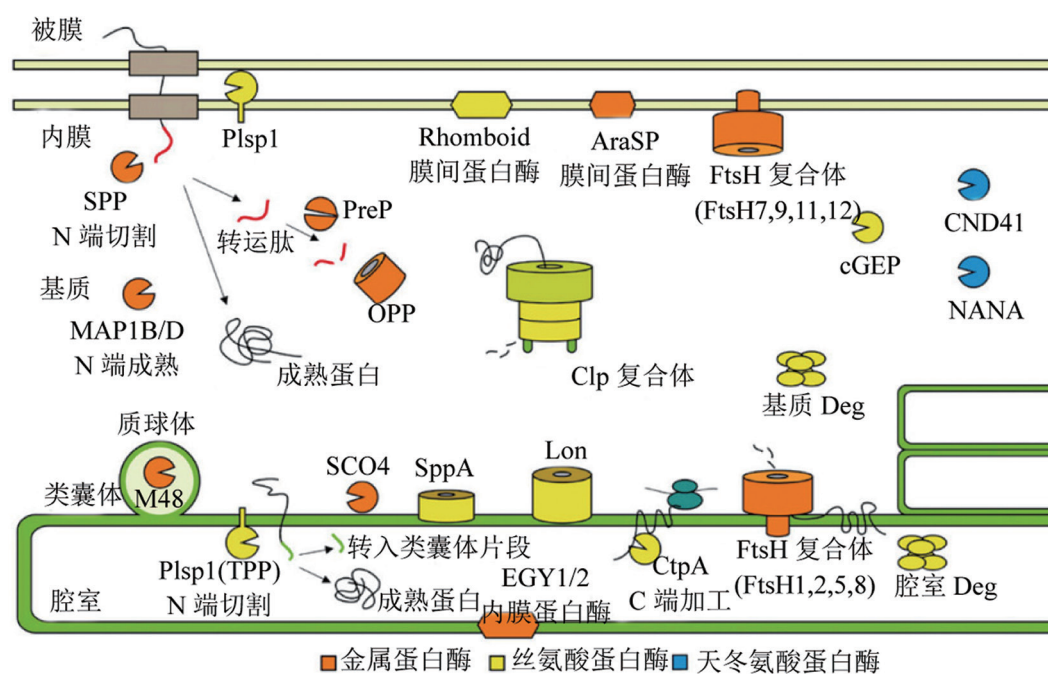


图1 叶绿体蛋白酶类型和定位

Fig.1 Types and localizations of chloroplast proteases

根据Nishimura等(2016)改画。

各种代谢的失衡等,严重阻碍了植物的生长发育甚至会导致植物死亡。研究发现,当环境温度在中等高温(30°C)时,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *ftsh11* 突变体PSII和光系统I (photosystem I, PSI)的电子传递速率明显下降,光合能力降低,非光化学淬灭增加,其他叶绿素荧光参数发生变化,而在正常温度下生长后经高光处理的*ftsh11*突变体和野生型(wide type, WT)之间叶绿素荧光参数无显著差异(Chen等2018),表明*AtFtsH11*在温度适度升高的环境中对光合作用发挥着至关重要的作用。番茄(*Solanum lycopersicum*)中的SlFtsH6被推测定位于叶绿体,受高温时能迅速响应热胁迫,凝胶阻滞迁移实验分析发现其启动子区含有热激元件(heat shock elements, HSEs),能特异性地结合热激转录因子2 (heat shock transcription factor 2, HsfA2; Sun等2006)。这些结果意味着叶绿体蛋白酶在高温胁迫下蛋白水平的调控中发挥重要功能。

强光对植物的伤害是直接且不可逆的,这一过程往往伴随着高温的存在,所以大多数研究是高温与强光胁迫一起进行的。Yoshioka-Nishimura等(2014)发现菠菜(*Spinacia oleracea*)中活性六聚体FtsH蛋白酶复合体能降解基粒中光损伤的D1蛋

白;在强光胁迫下,基粒中的FtsH蛋白会增多并加强了对光损伤的D1蛋白的降解。烟草(*Nicotiana tabacum*)被敲除*FtsH*的转基因株系对强光的敏感性增加。强光处理后,敲除株系的PSII最大光化学效率(F_v/F_m)的下降程度大于野生型,但D1蛋白降低的百分比小于野生型(Kato等2012)。在温州蜜柑(*Satsuma mandarin*)中,高温强光诱导 H_2O_2 的积累造成Deg1蛋白酶和光系统反应中心D1蛋白的降解, Deg1蛋白酶的减少进一步限制了D1蛋白的周转,进而使PSII反应中心遭到破坏(邱翠花等2011); Deg5在小麦(*Triticum aestivum*)‘矮抗58’中也发挥了类似的功能(郑静静等2014)。在强光下,拟南芥Deg2加快对损伤蛋白的降解(Ströher和Dietz 2008);然而,另一研究发现强光条件下拟南芥*deg2*敲除突变体的表型与野生型没有区别(Huesgen等2006; 陈娜等2011),并且其体内光损伤的D1蛋白仍然可以在DE loop区被剪切(Huesgen等2006),说明植物体内可能存在与Deg2功能重叠的其他蛋白。强光胁迫下, Deg5和Deg8之间可能存在协同作用, *deg5*或*deg8*单突变体表现出对强光高度敏感,但比*deg5/deg8*双突变体对强光的敏感性弱(Sun等2007)。强光下,拟南芥*deg5/deg8*双突变体中D1蛋白的降解

表1 叶绿体蛋白酶基因编码方式

Table 1 Coding patterns of chloroplast protease genes

物种名称	蛋白名称	基因编码方式
<i>Arabidopsis thaliana</i> (拟南芥)	FtsH11	核基因
	Deg2	
	Deg5	
	Deg8	
	Deg7	
	ASPG1	
	AMOS1/EGY1	
	FtsH7	
	FtsH9	
	FtsH12	
	FtsH1	
	FtsH2	
	FtsH5	
	Plsp1	
	VIN3	
	PreP1	
	PreP2	
	ClpP3	
	ClpP3	
	ClpP6	
	CtpA	
	Deg1	
	EGY2	
EGY1		
<i>Ananas comosus</i> (菠萝)	AP1	核基因
<i>Brassica juncea</i> (芥菜)	FtsH	不明确
<i>Zea mays</i> (玉米)	FtsH	不明确
<i>Medicago sativa</i> (苜蓿)	FtsH	叶绿体基因
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (冰叶日中花)	FtsH	不明确
<i>Nicotiana tabacum</i> (烟草)	FtsH	不明确
	DS9	
<i>Oryza sativa</i> (水稻)	SPP	核基因
<i>Pisum sativum</i> (豌豆)	SPP	核基因
	SPP	
<i>Satsuma mandarin</i> (温州蜜柑)	Deg1	不明确
<i>Solanum lycopersicum</i> (番茄)	FtsH6	核基因
	lutescent2	
<i>Spinacia oleracea</i> (菠菜)	FtsH	不明确
<i>Triticum aestivum</i> (小麦)	Deg5	不明确
<i>Citrullus lanatus</i> (野生西瓜)	FtsH-like	核基因
<i>Xerophyta viscosa</i>	FtsH	不明确

速率明显慢于野生型,且突变体植株对强光非常敏感,说明Deg5/Deg8通过促进光损伤的D1蛋白的降解维持光合作用的有效进行。研究显示,拟南芥Deg7在PSII修复中至关重要,参与了光损伤的D1、D2、CP47和CP43的初步切割。正常生长条件下,

双突变体*deg5/deg7*和*deg8/deg7*与野生型无表型差异,但在强光下双突变体的莲坐叶直径变得更小(Sun等2010a)。综上所述,叶绿体蛋白酶在植物响应强光胁迫中发挥重要作用,尤其是在植物受到胁迫后D1蛋白的周转及光系统的修复方面。

1.2 低温胁迫

低温和高温一样都会引起蛋白质的变性失活,因此,蛋白酶在植物的低温胁迫响应中也发挥重要作用。低温处理后苜蓿(*Medicago sativa*)叶片中FtsH的转录和蛋白水平都增加了(Ivashuta等2002)。Raimbault等(2013)对两种抗逆性差异较大的菠萝(*Ananas comosus*)果实冷处理后发现,天冬氨酸蛋白酶(aspartic acid protease, AcAPI)基因的表达呈现相反趋势;AcAPI前体基因在抗冷品种中表达上调,而在冷敏感品种中表达下调,这表明AcAPI参与了菠萝采摘后果实的耐冷性应答。拟南芥*fsh11*突变体在实验室条件下与野生型无表型差异,但当在外界低温环境下生长后却出现比野生型幼小、黄化、死亡率高并且种子产量少的表型(Wagner等2011)。这些结果说明不同的蛋白酶在低温胁迫下可能发挥作用,但对于这方面的研究甚少。

1.3 干旱胁迫

干旱胁迫严重影响植物生长发育,是制约作物生产的环境因素之一。过表达天冬氨酸蛋白酶1(aspartic protease inguard cell 1, ASPG1)的拟南芥转基因株系在干旱条件下增强了保卫细胞对脱落酸(abscisic acid, ABA)的敏感性,降低了失水率,表现出比野生型更高的存活率。干旱处理下,转基因拟南芥的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性水平更高,而H₂O₂含量更低,干旱抗性增强,并且ABA和/或干旱信号途径中的一些下游靶基因的表达发生了不同程度的变化,这表明AtASPG1参与了植物干旱胁迫响应的调控,且这种调控是依赖ABA信号通路的(Yao等2012)。拟南芥野生型和*deg5*、*deg8*单突变体以及*deg5/deg8*双突变体的离体叶片在干旱胁迫下F_v/F_m都有显著下降,但野生型较突变体稳定,单突变体较双突变体稳定,野生型的D1蛋白含量在胁迫处理过程中的减少速度明显快于突变体(张艳玲2008),说明DEG5和DEG8通过调节D1蛋白的周转起到抗旱作用。在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中,干旱处理后SoFtsH基因的表达量增加,且在叶中和根系中表达

量增加明显, 但抗旱品系和干旱敏感品系中*SoFtsH*基因表达模式不同, 说明该基因在马铃薯抗旱中发挥重要作用(范敏等2007)。另一些研究表明, 在耐脱水的*Xerophyta viscosa*、野生西瓜(*Citrullus lanatus*)、玉米(*Zea mays*)、芥菜(*Brassica juncea*)中, *FtsH*蛋白的表达量在干旱处理后增加, 但*FtsH*基因在这些植物中的抗旱机制尚不清楚(范敏等2007)。这些结果表明叶绿体蛋白酶在干旱胁迫中发挥着重要的作用, 但相关的分子机制还有待进一步探究。

1.4 盐胁迫

土壤盐害已成为影响种子萌发、作物生长和产量的主要非生物胁迫之一。盐胁迫可导致植物体内超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基的积累, 大量积累的活性氧会引起脂质、蛋白质和核酸氧化进而造成细胞损伤, 植物则通过提高抗氧化系统酶活性减轻盐胁迫的伤害。*FtsH*在冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)的盐胁迫响应中发挥作用(Kore-eda等2004)。郑春花等(2017)利用花生耐盐突变体(S2)和对照(S4)构建盐胁迫处理前后各时间段的表达谱文库, 并进行*FtsH*基因盐胁迫表达分析, 发现9个*FtsH*基因受盐胁迫诱导表达, 绝大多数*FtsH*基因在耐盐突变体和对照中表现出不同的表达模式。拟南芥*deg5*、*deg8*单突变体及*deg5/deg8*双突变体和野生型的离体叶片盐胁迫处理后的表型与干旱胁迫相同(详见第1.3节)(张艳玲2008)。这些研究表明叶绿体蛋白酶可以在盐胁迫中发挥作用, 但很多研究并不深入。

1.5 植物抗病

有关叶绿体蛋白酶在植物抗病方面的研究和报道还很少, 机制尚不明确。Seo等(2000)研究发现, 烟草健康叶片中含有大量的DS9蛋白(叶绿体*FtsH*蛋白同系物), 而染病叶片中DS9蛋白的含量在病变出现之前减少; 烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)诱导实验表明, 野生型的坏死斑比抑制DS9表达的转基因烟草的坏死斑大, 而比超表达DS9的转基因烟草的坏死斑小, 说明TMV感染会引起DS9蛋白水平降低, 随后导致叶绿体功能的丧失, 加速了超敏反应, 这意味着DS9与植物抗病性有一定关系。

2 叶绿体蛋白酶在营养代谢方面的功能

2.1 氮代谢

植物吸收和同化氮(N)元素的主要过程为: 植

物体内吸收的硝态氮在硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)的作用下被还原为亚硝酸盐, 然后亚硝酸盐在亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)的作用下进一步被催化形成铵(NH₄⁺)态氮, 而后被植物利用。铵对于大多数生物来说是重要的氮代谢的中间产物, 也是首选的氮素来源。然而, 许多植物对铵敏感, 铵盐毒害广泛存在。植物受到铵盐毒害后会产生一系列的变化, 如: 根发育不良、叶片萎黄、质子外排增加、阳离子缺失、碳缺乏、叶绿体超微结构受损、光合磷酸化解偶联等。乙烯依赖的向地性缺失黄绿基因1(ethylene-dependent gravitropism-deficient and yellow-green1, AMOS1/EGY1)编码一个锌金属蛋白酶, 拟南芥*amos1/egy1*的突变体对于铵盐十分敏感, 幼苗叶片会出现明显的萎黄, 而外施ABA可改善这一敏感表型, 即对*amos1/egy1*突变体进行铵处理后, 再外源施加ABA, 可以使叶片的叶绿素含量增加, 说明AMOS1/EGY1能够通过ABA信号来响应植物的铵盐胁迫(Li等2012)。

2.2 磷代谢

磷(P)对于所有的生物来说都是必不可少的, 可以参与有机物的合成、能量的生成及细胞信号转导等。Yu (2016)等发现, 与在正常培养基上生长的野生型拟南芥相比, 在无磷培养基上生长的野生型拟南芥的根和幼叶的生长均受到抑制, 但是*amos1*突变体在两种培养基上的生长状况基本一致(而在无氮、钾培养基上生长变差), 表明在有磷的情况下, *amos1*突变体比野生型更具有抗性且独特的。进一步研究发现, 在*amos1*突变体的细胞壁内, ABA能够拮抗磷循环中的乙烯信号, 即磷缺失会抑制ABA的合成, 而ABA通过*ABI4*抑制乙烯的合成。因此, 在磷缺乏的情况下乙烯含量增加, 从而增加细胞壁中果胶的形成来促进磷从细胞壁中释放到胞质中, 使*amos1*突变体在磷缺失的情况下维持磷的内稳态(Yu等2016)。

3 叶绿体蛋白酶在生长发育中的功能

3.1 叶绿体的发育和光系统建成

前质体在植物的发育过程中, 根据其所处的位置以及接受光的程度, 分别转化为叶绿体、白色体、淀粉体和有色体等功能各异的质体; 光是叶绿体发育的必要条件, 可被一系列能够感受特定波长的受体所感知, 这些受体通过构象变化与

下游信号分子相互作用,从而完成植物的光形态建成(李保珠等2014)。关于叶绿体蛋白酶在植物叶绿体发育和光形态建成的研究较多,我们整理如下。

3.1.1 膜间蛋白酶在叶绿体发育和光系统建成中的功能

膜间蛋白酶包括叶绿体内膜和类囊体膜上的蛋白酶。位于拟南芥叶绿体被膜上的AtFtsH7与AtFtsH9、AtFtsH12与AtFtsHi形成异源六聚体后对植物的类囊体形成和胚胎发育非常重要,敲除*AtFtsH12*将会导致胚胎死亡(Sokolenko等2002; Wagner等2012)。在烟草中敲除*NtFtsH*的株系会产生叶斑,有异常的质体和栅栏层,以及片段化的类囊体膜,从而影响叶绿体的发育(Kato等2012)。拟南芥AtFtsH1不仅参与D1蛋白光氧化损伤产物23 kDa肽段的降解(Lindhahl等2000),还直接或间接地影响PSI复合物的组装(Järvi等2016)。然而,前人报道FtsH2与FtsH5在叶绿体内起主要的功能。在拟南芥中敲除*AtFtsH2*或*AtFtsH5*都会导致植物叶片出现杂斑化,其白色叶片组织中的原质体不能发育成叶绿体,说明*AtFtsH2*与*AtFtsH5*都能够影响拟南芥类囊体的形成(常伟东等2016),并且Sakamoto等(2003)研究发现AtFtsH5 (VAR1)和AtFtsH2 (VAR2)参与光保护和类囊体发育过程,这说明FtsH蛋白酶对于叶绿体的发育和胚胎形成至关重要。

敲除*AtPls1*会导致拟南芥幼苗致死,突变体的细胞中积累了大量带有部分转运肽的未成熟的PsbO、PsbP、质蓝素(plastocyanin, PC)和叶绿体外膜易位子蛋白75 (translocon at the outer-envelope-membrane of chloroplasts 75, TOC75)的中间体蛋白(常伟东等2016)。拟南芥中新发现的位于叶绿体类囊体膜上的金属蛋白酶virescent 3 (VIN3)可能是类囊体膜中单体或小复合体的一部分,影响了早期的叶绿体发育(Qi等2015)。

Chen等(2005)通过透射电镜发现,拟南芥*egy1*突变体内的基质类囊体、基粒、淀粉粒的数量明显变少,质体小球数量增多。进一步研究发现,突变体叶绿素及叶绿素*a/b*结合蛋白(chlorophyll *a/b* binding protein, CAB)含量降低,同时叶片发育不完全,说明AtEGY1金属蛋白酶在维持叶绿体的正常发育方面具有重要的作用,番茄*lutescent 2 (SIL2)*编码一个锌金属蛋白酶,与AtEGY1同源性较高。*l2*突变体叶片表现出失绿的表型, F_v/F_m 低于野生型,

类囊体膜受损,从而影响了叶绿体的发育(Barry等2012)。

3.1.2 基质蛋白酶在叶绿体发育和光系统建成中的功能

在拟南芥中反义抑制两个豌豆(*Pisum sativum*) *SPP*基因,转基因拟南芥的细胞质中积累叶绿体前体蛋白,很多植株在幼苗期死亡,存活下来的植株表现为生长缓慢、叶片畸形、叶绿体数量下降、类囊体发育不完整和淀粉粒积累(Zhong等2003)。此外,水稻(*Oryza sativa*) *OsSPP*突变植株因为其SPP肽链中缺少了一个高度保守的Glu945而丧失活性,表现为生长矮小、叶绿体发育不完全、根生长速度缓慢(Yue等2010)。

Cederholm等(2009)发现单独敲除*AtPreP1*或同时敲除*AtPreP1*、*AtPreP2*会严重影响拟南芥的早期发育,突变体的叶绿体和线粒体形态结构异常,生物量积累降低。

植物体内*Clp*表达水平的下降会导致植物胚胎发育异常或植株生长异常,如在拟南芥中缺失*AtClpP3*会导致胚胎发育延迟和幼苗致死,且突变体光合能力下降,但可通过在生长培养基中添加糖来恢复(Kim等2013);拟南芥*AtClpP6*叶片失绿早于野生型,光合能力下降,叶绿体变小,但类囊体结构与野生型无异(Sjögren等2006)。在烟草中缺失*NtClp*蛋白不同亚基时,观察到色素缺乏,叶片发育改变,叶片杂色和光合作用受损,揭示了Clp蛋白酶在生理和植物发育中的重要性(Moreno等2017)。

3.1.3 类囊体腔室蛋白酶在叶绿体发育和光系统建成中的功能

敲除拟南芥*AtCtpA*基因的植株致死, *AtCtpA*突变植株对光极度敏感,正常生长条件下无法发育成熟,在添加碳源的培养基上和低光条件下,也只能进行有限的营养生长(Che等2013);而敲除*AtCtpB*对植物的生长发育没有影响(Yin等2008)。这说明AtCtpA在叶绿体发育和光形态建成中的功能更为重要。

Deg1是类囊体膜内腔侧的丝氨酸蛋白酶,拟南芥中AtDeg1水平降低的植株比野生型植株小,早花,对光抑制更敏感,积累更多的D1蛋白(Kapri-Pardes等2007); *deg1*突变体主要光合蛋白复合物不同亚基处在正常的水平,但PSII二聚体和超配体的水平降低。实验表明,虽然叶绿体蛋白的合

成速率未受影响,但是新合成的蛋白质组装进PSII二聚体和超复合体受损,这表明Deg1有助于PSII复合物的组装,而后者进行的蛋白叠加测定证明了Deg1与D2之间存在相互作用(Sun等2010b)。

综上所述,叶绿体蛋白酶对于植物叶绿体发育和光形态建成至关重要,多种蛋白酶可以通过影响光合蛋白的组装、类囊体的结构、质体形态而影响叶色、胚胎发育甚至是植物的存活,深入的分子机制及某些未知的蛋白酶在这方面的作用值得我们继续挖掘。

3.2 下胚轴伸长

蛋白酶对于植物生长发育的影响是多方面的,这其中也包括下胚轴的伸长。拟南芥*egy2*突变体幼苗的下胚轴比野生型短,但是当成苗后,突变体的下胚轴与野生型的下胚轴却几乎没有差异。进一步研究发现*egy2*突变体幼苗的脂肪酸含量较野生型低,作者猜测低的脂肪酸含量可能是导致*egy2*突变体幼苗下胚轴变短的原因之一,但可能不是唯一的原因(Chen等2012),具体的机理还有待进一步探讨。

3.3 果实发育

番茄*l2* (位于10号染色体长臂上,编码定位于叶绿体的锌金属蛋白酶,与拟南芥EGY1同源)突变体果实的发育与M82 (野生型)的果实不同,*l2*突变体的果实在早期较M82发育缓慢,颜色偏白,果实的成熟期比M82晚1周左右;*l2*突变体乙烯含量较M82低,单株番茄的生物量也比M82低,说明该基因影响果实的发育,推迟果实的成熟(Barry等2012)。

3.4 叶片衰老

叶片衰老是叶片发育的最后阶段,在植物生存和/或死亡中起着关键作用。在叶片衰老期间,植物细胞在结构、代谢和基因表达方面经历有序改变。研究发现,拟南芥*egy1*突变体的叶片与野生型的叶片相比呈现失绿症状(与番茄同源基因*l2*缺失突变体表型一致)(Barry等2012),且突变体内与衰老相关的基因的表达水平比野生型高,而互补株系则会恢复至野生型的表型,说明*AtEGY1*会抑制衰老;而外源施加2%葡萄糖后,突变体的黄绿表型、叶绿素及离子渗透率得到部分恢复,表明缺失EGY1可能引起了葡萄糖含量的降低,从而导致植株的衰老(Chen等2016)。

4 展望

叶绿体稳态对于植物正常生长发育是必需的,其中叶绿体蛋白酶在质体形态转化以及叶绿体稳态的维持中发挥着非常重要的作用。因此,了解植物叶绿体蛋白酶的生物学功能及其作用机制,有助于我们更好地理解叶绿体的发育和光合作用的光保护机制。在过去几年中,植物叶绿体蛋白酶的研究取得了很大的进展,一些重要的叶绿体蛋白酶在光合作用、植物发育和胁迫响应等许多方面的功能被报道,如FtsH、Deg、Clp、Plsp、EGY、Ctp等,然而,这些研究主要集中在模式植物拟南芥中,在其他物种中的研究却很少。虽然人们在光合蛋白的组装、类囊体的结构、质体形态、叶片颜色、胚胎发育等许多方面对叶绿体蛋白酶进行了很多的功能研究,但是有关叶绿体蛋白酶在植物抵抗非生物胁迫中的研究还很少。综上所述,我们提出了以下有关叶绿体蛋白酶亟待解决的问题:(1)叶绿体蛋白酶在植物非生物胁迫响应中的功能及其作用机制仍有待进一步深入探讨;(2)迄今为止,大多数报道的叶绿体蛋白酶的作用底物都是未知的,叶绿体蛋白酶作为水解酶或者加工酶发挥作用时,其发挥作用的底物和剪切位点是什么?(3)植物是如何协调叶绿体中的蛋白酶使它们在特定的条件下发挥功能的?(4)叶绿体蛋白酶在发挥作用时受到哪些上游组分的调控?相信随着植物分子生物学的发展与应用,这些问题的答案在不久的将来都将被揭示。有关叶绿体蛋白酶的研究也将更加深入、更加系统、更加细致。

参考文献(References)

- Barry CS, Aldridge GM, Herzog G, et al (2012). Altered chloroplast development and delayed fruit ripening caused by mutations in a zinc metalloprotease at the *lutescent2* locus of tomato. *Plant Physiol*, 159 (3): 1086–1098
- Cederholm SN, Bäckman HG, Pesaresi P, et al (2009). Deletion of an organellar peptidosome PreP affects early development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 71 (4–5): 497–508
- Chang W, Hui L, Xu M, et al (2016). Research progress of the plant chloroplast protease. *Genom Appl Biol*, 35 (3): 728–739 (in Chinese with English abstract) [常伟东, 惠亮亮, 徐敏等(2016). 植物叶绿体蛋白酶研究进展. *基因组学与应用生物学*, 35 (3): 728–739]
- Che Y, Fu A, Hou X, et al (2013). C-terminal processing of

- reaction center protein D1 is essential for the function and assembly of photosystem II in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (40): 16247–16252
- Chen C, Wang J, Zhao X (2016). Leaf senescence induced by EGY1 defection was partially restored by glucose in *Arabidopsis thaliana*. *Bot Stud*, 57: 5
- Chen G, Bi YR, Li N, et al (2005). EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *Plant J*, 41 (3): 364–375
- Chen G, Law K, Ho P, et al (2012). EGY2, a chloroplast membrane metalloprotease, plays a role in hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep*, 39: 2147–2155
- Chen J, Burke JJ, Velten J, et al (2006). FtsH11 protease plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant J*, 48: 73–84
- Chen J, Burke JJ, Xin Z (2018). Chlorophyll fluorescence analysis revealed essential roles of FtsH11 protease in regulation of the adaptive responses of photosynthetic systems to high temperature. *BMC Plant Biol*, 18: 11
- Chen N, Wen Z, Hu J, et al (2011). Functional analysis of photodamaged D1 protein degradation and photoprotection of chloroplast Deg2 protease in *Arabidopsis*. *Genom Appl Biol*, 30 (6): 682–686 (in Chinese with English abstract) [陈娜, 温泽文, 胡建成等(2011). Deg2蛋白酶在拟南芥光损伤D1降解及光保护中的作用. *基因组学与应用生物学*, 30 (6): 682–686]
- Fan M, Jin LP, Huang SW, et al (2007). Cloning and expression of a full-length cDNA of *SoFtsH* gene in potato under drought stress. *Acta Agron Sin*, 33 (11): 1748–1754 (in Chinese with English abstract) [范敏, 金黎平, 黄三文等(2007). 马铃薯*SoFtsH*基因全长cDNA克隆与在干旱条件下表达研究. *作物学报*, 33 (11): 1748–1754]
- Huesgen PF, Schuhmann H, Adamska I (2006). Photodamaged D1 protein is degraded in *Arabidopsis* mutants lacking the Deg2 protease. *FEBS Lett*, 580 (30): 6929–6932
- Ivashuta S, Imai R, Uchiyama K, et al (2002). Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa*). *J Plant Physiol*, 159: 85–90
- Järvi S, Suorsa M, Tadini L, et al (2016). Thylakoid-bound FtsH proteins facilitate proper biosynthesis of photosystem I. *Plant Physiol*, 171: 1333–1343
- Kapri-Pardes E, Naveh L, Adam Z (2007). The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 1039–1047
- Kato Y, Kouso T, Sakamoto W (2012). Variegated tobacco leaves generated by chloroplast FtsH suppression: implication of FtsH function in the maintenance of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol*, 53 (2): 391–404
- Kim J, Olinares PD, Oh SH, et al (2013). Modified Clp protease complex in the ClpP3 null mutant and consequences for chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 162: 7–79
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, et al (2004). Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene*, 341: 83–92
- Li B, Li Q, Xiong L, et al (2012). *Arabidopsis* plastid AMOS1/EGY1 integrates abscisic acid signaling to regulate global gene expression response to ammonium stress. *Plant Physiol*, 160: 2040–2051
- Li B, Zhao X, Peng L (2014). Research advances in the development and regulation of plant chloroplasts. *Chin Bull Bot*, 49 (3): 337–345 (in Chinese with English abstract) [李保珠, 赵孝亮, 彭雷(2014). 植物叶绿体发育及调控研究进展. *植物学报*, 49 (3): 337–345]
- Lindahl M, Spetea C, Hundal T, et al (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*, 12: 419–431
- Moreno JC, Tiller N, Diez M, et al (2017). Generation and characterization of a collection of knock-down lines for the chloroplast Clp protease complex in tobacco. *J Exp Bot*, 68 (9): 2199–2218
- Nishimura K, Kato Y, Sakamoto W (2016). Chloroplast proteases: updates on Proteolysis within and across suborganellar compartments. *Plant Physiol*, 171: 2 280–2 293
- Qi Y, Liu X, Liang S, et al (2015). A putative chloroplast thylakoid metalloprotease VIRESCENT3 regulates chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 291 (7): 3319–3332
- Qiu C, Ji W, Guo Y (2011). Effects of high temperature and strong light on chlorophyll fluorescence, the D1 protein, and Deg1 protease in *Satsuma mandarin*, and the protective role of salicylic acid. *Acta Ecol Sin*, 31 (13): 3802–3810 (in Chinese with English abstract) [邱翠花, 计玮玮, 郭延平(2011). 高温强光对温州蜜柑叶绿素荧光、D1蛋白和Deg1蛋白酶的影响及SA效应. *生态学报*, 31 (13): 3802–3810]
- Raimbault AK, Zuily-Fodil Y, Soler A, et al (2013). A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus*): cloning, characterization and relation to post-harvest chilling stress resistance. *J Plant Physiol*, 170: 1536–1540
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, et al (2003). Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIEGATED1 and YELLOW VARIEGATED2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell*, 15: 2843–2855
- Seo S, Okamoto M, Iwai T, et al (2000). Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. *Plant Cell*, 12: 917–932

- Sjögren LLE, Stanne TM, Zheng B, et al (2006). Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 2635–2649
- Sokolenko A, Pojidaeva E, Zinchenko V, et al (2002). The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Curr Genet*, 41 (5): 291–310
- Ströher E, Dietz KJ (2008). The dynamic thiol-disulphide redox proteome of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiol Plant*, 133 (3): 566–583
- Sun AQ, Yi SY, Yang JY, et al (2006). Identification and characterization of a heat-inducible *ftsH* gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Sci*, 170 (3): 551–562
- Sun X, Fu T, Chen N, et al (2010a). The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 152: 1263–1273
- Sun X, Ouyang M, Guo J, et al (2010b). The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 62: 240–249
- Sun X, Peng L, Guo J, et al (2007). Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (4): 1347–1361
- Wagner R, Aigner H, Funk C (2012). FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiol Plant*, 145: 203–214
- Wagner R, Aigner H, Pružinská A, et al (2011). Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytol*, 191: 449–458
- Yao X, Xiong W, Ye T, et al (2012). Overexpression of the aspartic protease *ASPG1* gene confers drought avoidance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 63 (7): 2579–2593
- Yin SM, Sun XW, Zhang LX (2008). An *Arabidopsis ctpA* homologue is involved in the repair of photosystem II under high light. *Chin Sci Bull*, 53 (7): 1021–1026
- Yoshioka-Nishimura M, Nanba D, Takaki T, et al (2014). Quality control of photosystem II: direct imaging of the changes in the thylakoid structure and distribution of FtsH proteases in spinach chloroplasts under light stress. *Plant Cell Physiol*, 55 (7): 1255–1265
- Yu FW, Zhu XF, Li GJ, et al (2016). The chloroplast protease AMOS1/EGY1 affects phosphate homeostasis under phosphate stress. *Plant Physiol*, 172: 1200–1208
- Yue R, Wang X, Chen J, et al (2010). A rice stromal processing peptidase regulates chloroplast and root development. *Plant Cell Physiol*, 51 (3): 475–485
- Zhang Y (2008). Molecular mechanism of DEG protease in stress in *Arabidopsis thaliana*. (dissertation). Lanzhou: Lanzhou University (in Chinese with English abstract) [张艳玲(2008). 拟南芥DEG蛋白酶的胁迫响应分子机理研究(学位论文). 兰州: 兰州大学]
- Zheng C, Kong X, Sui J, et al (2016). Identification, classification and salt stress expression analysis of peanut metalloproteinase family gene *FtsH*. *Jiangsu Agr Sci*, 44 (12): 74–77 (in Chinese with English abstract) [郑春花, 孔祥远, 隋炯明等(2016). 花生金属蛋白酶家族基因*FtsH*的鉴定、分类和盐胁迫表达分析. *江苏农业科学*, 44 (12): 74–77]
- Zheng J, Yang L, Su X, et al (2014). Regulatory effects of salicylic acid on protease Deg5 and PSII function of wheat chloroplasts under heat and high light stress. *Acta Ecol Sin*, 34 (24): 7350–7355 (in Chinese with English abstract) [郑静静, 杨丽, 苏小雨等(2014). 水杨酸对高温强光下小麦叶绿体蛋白酶Deg5和PSII功能的调节作用. *生态学报*, 34 (24): 7350–7355]
- Zhong R, Wan J, Jin R, et al (2003). A pea antisense gene for the chloroplast stromal processing peptidase yields seedling lethals in *Arabidopsis*: survivors show defective GFP import *in vivo*. *Plant J*, 34 (6): 802–812

Research progress of biological function of chloroplast proteases

LÜ Jin-Lian, MA Na-Na*, MENG Qing-Wei

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: Chloroplasts are organelles unique to plant cells, and functional chloroplasts are essential for plants. The synthesis, degradation, translocation and assembly of proteins in chloroplasts are regulated by complex intracellular networks, among which chloroplast proteases are involved. Chloroplast proteases play key roles in the development and homeostasis of chloroplasts and plant. They can be divided into various categories based on locations, structures, and functions. In this review, we mainly describe the biological functions of chloroplast proteases in various species, and discuss the research trends of proteases in chloroplasts and the key problems to be solved.

Key words: chloroplast proteases; stress; nutrient metabolism; growth and development

Received 2018-08-31 Accepted 2018-11-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31371553), and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018QC001).

*Corresponding author (nnma@sdau.edu.cn).