

高等植物的 *PIN* 基因家族

刘士平^{1,2}, 王璐¹, 王继荣¹, 薛艳红^{1,2}, 寿惠霞^{1,*}

¹浙江大学生命科学院植物生理学与生物化学国家重点实验室, 杭州 310058; ²三峡大学化学与生命科学学院, 湖北宜昌 443002

PIN Gene Family in Higher Plants

LIU Shi-Ping^{1,2}, WANG Lu¹, WANG Ji-Rong¹, XUE Yan-Hong^{1,2}, SHOU Hui-Xia^{1,*}

¹State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

摘要: *PIN* 是一类编码生长素极性运输载体元件的基因家族, 影响着高等植物生长素的外向运输和众多生长发育过程。近年来该基因家族的相关成员陆续在不同物种中得到克隆。本文就 *PIN* 蛋白家族的结构、功能和活性调控的研究进展作一介绍。

关键词: 生长素; *PIN* 基因家族; 极性运输; 生长发育; 高等植物

生长素是植物体内唯一具有极性运输(polar auxin transport, PAT)特点的激素, 它主要在植物的叶原基、幼叶以及根和发育的种子等部位合成(Muday等1995), 然后通过极性运输(主要是从茎顶端向根尖)到达靶细胞来调节一系列生理反应。生长素的极性运输影响着植物体的生长、发育、繁殖等许多生理过程: 参与植物的形态建成和向性反应, 调控组织的伸长生长及维管分化, 参与胚胎发育、光形态建成等(倪为民等2000; 夏石头和萧浪涛2003)。近年来随着一系列生长素极性运输相关的突变体的分离(Chen等1998; Marchant等1999; Abas等2006), 人们对生长素极性运输的认识获得了较大进展(李俊华和种康2006; 刘进平2007)。

IAA (indole-3-acetic acid, 吲哚乙酸)是植物体内主要的内源性生长素, 它在组织内是从上一个细胞到下一个细胞进行极性运输的(Morris 2000)。除了少部分生长素可直接通过自由扩散从细胞壁进入细胞质, 大部分生长素都必须依赖于输入载体(influx carrier)和输出载体(efflux carrier)的协助才能顺利进出细胞(Muday和DeLong 2001; Friml和Palme 2002)。这些运输载体都不对称地分布在细胞膜上的一端或一侧(极性分布), 从而控制着生长素的极性运输。AUX1蛋白是一类公认的输入载体, 影响着生长素向胞内的输送(Marchant等1999; Dharmasiri等2006)。此外, 细胞膜上的一些PGP蛋白(phosphoglycoprotein)既可以作为生长素输入载体, 又可以作为输出载体行使功能(Blakeslee等

2005; Teale等2006; Blakeslee等2007)。

PIN 蛋白家族是一种公认的生长素输出载体, 它们在细胞膜上也呈极性分布, 负责将生长素从胞内运输到胞外。但到目前为止, *PIN* 蛋白的生长素输出活性还没有生化方面的直接证据, 故一般将其描述为生长素输出载体的元件(element)、组分(component)或促进剂(facilitator)。人们从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)或其他物种中先后分离了 *PIN1*、*PIN2*、*PIN3*、*PIN4* 和 *PIN7* 等基因, 并证实这些基因参与植物器官的发生发育、根的向地性及其他向性反应、根的伸长生长以及早期的胚胎发育等过程。

1 *PIN* 蛋白的结构

高等植物的 *PIN* 蛋白家族成员之间有较高的同源性。序列比对结果显示, 水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)与拟南芥对应的 *PIN* 蛋白之间的同源性为 32%~85%, 表明 *PIN* 起源于同一个祖先(Paponov等2005)。*PIN* 蛋白都是由位于两端的两个疏水区和中间一个亲水区构成(图1), 其中每个疏水区均有 5~6 次跨膜折叠, 这种结构特点与其所行使的跨膜运输功能一致。根据 *PIN* 蛋白亲水结构的差异可将其分为两类: 一类 *PIN* 蛋白的亲水

收稿 2009-04-09 修定 2009-06-15

资助 国家重点基础研究发展计划(2005CB20900)和高等学校博士学科点专项科研基金(20070335081)。

* 通讯作者(E-mail: huixia@zju.edu.cn; Tel: 0571-88206146)。

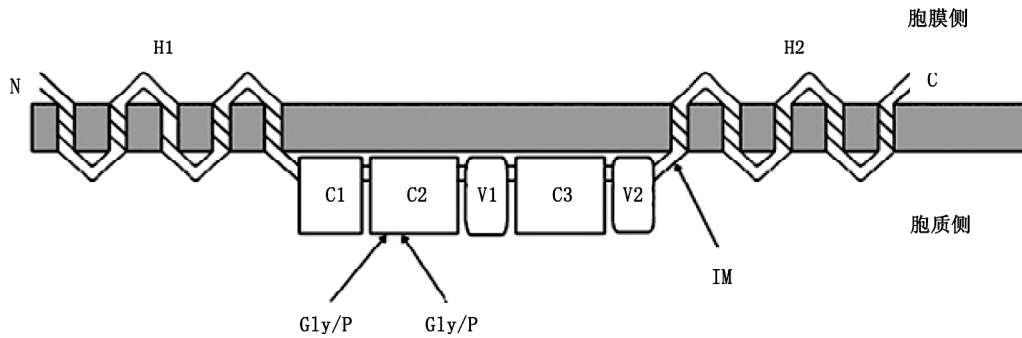


图1 PIN 蛋白结构预测(Zazimalova 等 2007)

H1、H2: 疏水结构; C1、C2、C3: 亲水结构的恒定区; V1、V2: 亲水结构可变区。Gly/P: 糖基化或磷酸化位点。N 与 C 分别表示蛋白的氨基端和羧基端。

区较短, 只有C1区(恒定区1)和V1区(可变区1); 另一类具有较长的亲水区, 包括C1、C2、C3 结构域和V1、V2 等结构域。有实验表明, PIN 蛋白的亲水区对于生长素的运输功能并不是必不可少的, 但它对转运体功能的调控和PIN蛋白的正确定位是至关重要的(Zazimalova 等 2007)。在疏水区C 端与V2 区之间有一NPXXY (IM, 图1)保守结构, 它调控着PIN蛋白的内吞作用, 介导着小泡分拣过程中膜蛋白与受体蛋白的互作。此外, 在PIN 蛋白的亲水区还有多个糖基化和磷酸化位点(图1), 这些位点与PIN 蛋白的功能调控密切相关(Blakeslee 等 2007)。

2 PIN 蛋白的功能

人们对PIN 蛋白功能的认识最先起源于一些突变体的研究。由于 *pin* 突变体常表现出生长素运输异常, 故推测PIN 蛋白可能与生长素的极性运输有某种关系(Galweile 等 1998; Chen 等 1998); 生物信息学也支持这一假说, 序列分析表明PIN 属于膜运输蛋白(Morris 2000; Kwiatkowska 2004)。一些生理生化实验进一步表明, PIN 蛋白是生长素极性运输的载体元件: PIN 蛋白的极性定位方式与生长素流的运输方式相同(Benkova 等 2003; Friml 等 2003); 其时空表达模式与生长素的运输高度一致(Okada 等 1991; Peer 等 2004); 侧根原基起始时离不开PIN 蛋白运输的生长素浓度梯度(Benkova 等 2003)。

拟南芥的 *pin1* 是分离到的第一个PIN 家族突变体。突变体的花芽不能正常发育, 形成裸露的针状花序, 并且侧生器官的数量、大小、形状、位

置均表现出异常(Okada 等 1991)。AtPIN1 蛋白预测有12个跨膜区, 与细菌和酵母的一些运输蛋白同源。细胞亚定位的结果显示, AtPIN1 位于维管组织中负责生长素极性运输的细胞的基部, 与化学渗透偶联学说假设的负责生长素向基式输出载体(basipetal efflux carrier)的定位一致(Galweiler 等 1998)。

AtPIN2 (又名 AGRI 或 EIR1)也是一种跨膜蛋白(Chen 等 1998)。当 AtPIN2 在酵母中表达时, 放射标记显示, IAA流出细胞的速度加快, 表明AtPIN2 调控着生长素的细胞输出。AtPIN2 在根中特异性表达, 参与根的向地性反应, 调节着生长素在根部分生组织中的不对称分布(Friml 等 2004; Blilou 等 2005)。此外, 在根毛细胞中超表达 AtPIN2 会阻碍根毛尖端的生长(Cho 等 2007), 进一步的研究表明这是由于AtPIN2 促使胞内生长素水平低于根毛生长的临界水平, 从而阻止根毛极性生长(Schlicht 等 2008)的缘故。

拟南芥的 *pin3* 突变体生长减弱, 向地性和向光性丧失。在根冠细胞中, AtPIN3 能够响应重力刺激迅速转位至侧面, 暗示AtPIN3 可以通过控制细胞中生长素的侧向分配而调控植物的向性生长(Friml 等 2002b)。

AtPIN4在细胞中也呈极性分布, 其突变体与萘基邻氨甲酰苯甲酸(1-naphthylphthalamic acid, NPA, 一种生长素极性运输的抑制剂)处理的野生型表型相似(Friml 等 2002a)。 *pin4* 的根尖生长素浓度提高(即其中的生长素无法流出), 无法建立并维持根中的生长素梯度, 静止中心和顶端根冠的起始细胞分

裂异常,表明AtPIN4参与根静止中心区的分生组织中生长素浓度梯度的建成(Smith等2006)。与AtPIN2一样,根毛细胞中超表达AtPIN4同样也会阻碍根毛尖端的生长(Cho等2007)。

AtPIN7维持着生长素的向基式运输,其突变体的胚胎极性发生异常(Friml等2003; Blilou等2005)。

AtPIN5、AtPIN6与AtPIN8的功能还不很清楚,但表达分析显示,AtPIN6在侧根原基形成时大量表达,其启动子::GUS的组织染色表明PIN6位于原分生组织中,从而暗示PIN6参与组织或器官的分化,但pin6突变体在并不发生明显的生长受阻现象(Benkova等2003),因此这些PIN家族成员功能的认识还有待进一步研究。

单一的pin突变体往往只表现出轻微的突变表型或没有表型,而双突变体或多突变体则会严重地阻碍植物的发育(Blilou等2005)。在pin1突变体内,PIN4蛋白会扩展到原本PIN1所处的位置,说明不同的PIN蛋白之间存在着功能冗余现象(Blilou等2005)。有实验证明,PIN成员的这种冗余现象是广泛存在的,而且成员之间还存在各种各样的交错调控和反馈调节(Blilou等2005)。

迄今为止,除了拟南芥以外,人们还在水稻、

小麦和玉米(*Zea mays*)等植物中克隆到许多PIN同源基因(Xu等2005; Paponov等2005; Carraro等2006)(图2),有实验表明,这些PIN蛋白有着类似的功能。水稻中OsPIN1与拟南芥中的AtPIN1相似,主要在维管组织或一些侧生器官中,如侧根和不定根的原基上表达。下调表达OsPIN1会显著影响水稻不定根和分蘖的数量(Xu等2005)。免疫荧光实验也显示,玉米的ZmPIN1a和ZmPIN1b极性分布在细胞的一端,在花序发育异常的突变体bif2(*barren inflorescence 2*)中ZmPIN1a和ZmPIN1b的极性分布也发生改变(Carraro等2006)。

3 PIN的表达特异性

高等植物中的所有PIN蛋白都极性分布在细胞的一侧或一端,与生长素的极性运输一致。此外,PIN蛋白还具有组织特异性或细胞特异性的特点(图3),不同的PIN家族成员表达的部位不尽相同(部分存在功能冗余的PIN除外)。这些PIN基因时空表达的特异性(图3)与生长素的极性运输高度相关(Okada等1991; Peer等2004),而且多个高度保守的PIN基因的存在,表明生长素在植物体内的运输存在多条路径,反映了生长素极性运输的复杂性(Vieten等2005),也从另一个侧面证实PIN家族调控着植物不同的生长发育过程。

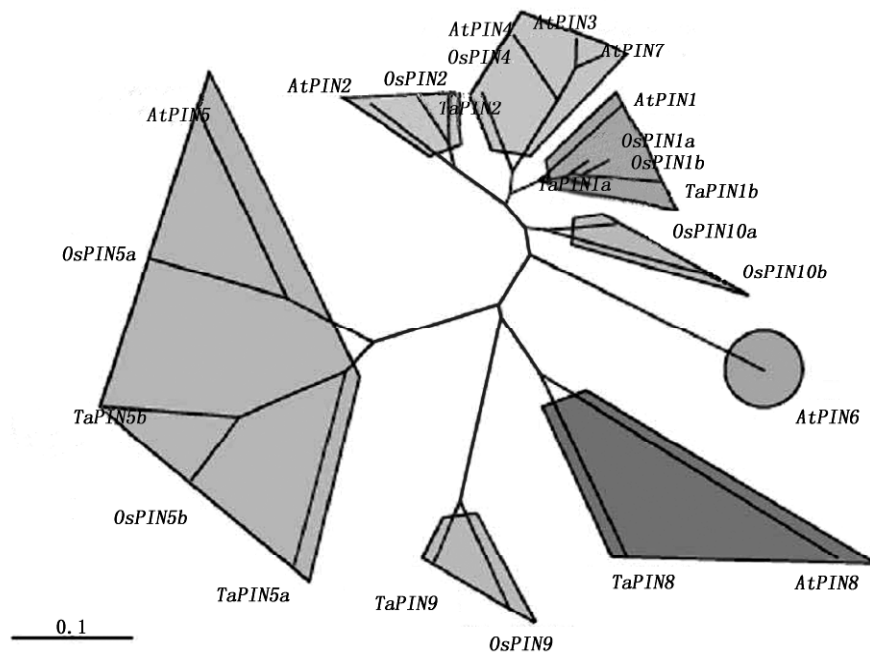


图2 PIN家族的亲缘关系(Paponov等2005)

At: 拟南芥; Os: 水稻; Ta: 小麦。

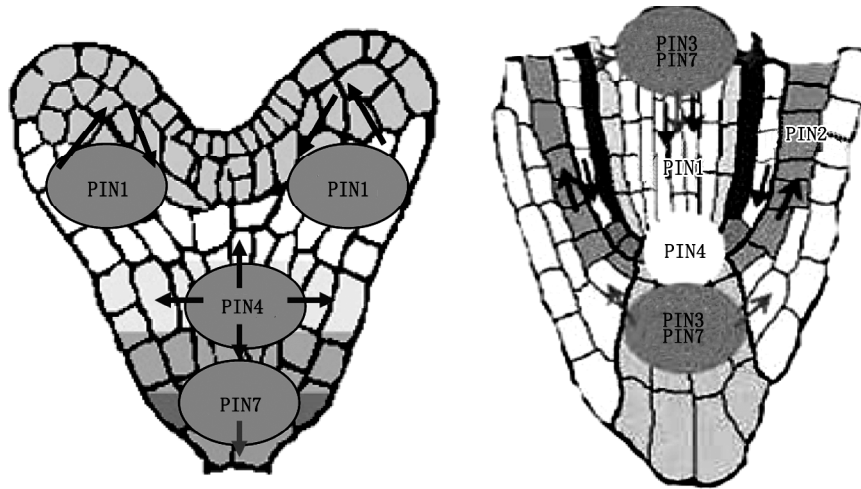


图3 胚胎(左)和根尖(右)中 AtPINs 蛋白成员的定位(Blilou 等 2005; Vieten 等 2005)

AtPIN1 定位于根或地上部分的维管组织及胚胎中, 参与根系和分蘖等多种器官的发育调控 (Galweiler 等 1998)(图 3)。AtPIN2 仅在根中表达, 其转录定位于根部因重力刺激发生弯曲的区域, 在根毛的发生区域也观测到 AtPIN2 的大量表达 (Friml 等 2004; Blilou 等 2005)。AtPIN3 的分布较广, 在根分生组织的中柱鞘细胞(pericycle)、根冠柱(columella)以及幼芽的内皮层(endodermis)细胞中都可以观测到其表达 (Friml 等 2002b)。AtPIN4 在根静止中心(quiescent center)区域表达, 对维持分生组织中生长素的浓度梯度至关重要; 此外, 它还在胚胎的极性建成时大量表达 (Smith 等 2006)。同样 AtPIN7 在根冠和胚胎中表达, 它在维持生长素的向基式浓度梯度时起作用 (Friml 等 2003; Blilou 等 2005)。

这些 PIN 家族成员表达的时空特异性并不是一成不变的。如前面已经述及的, 由于功能冗余性的广泛存在, 当一个 PIN 发生突变时, 其他家族成员可能会改变表达模式以抵消因突变对植物体所造成的不良影响 (Blilou 等 2005)。再有, PIN 蛋白的亚细胞定位(即分布在细胞的一端或一侧)还将具有动态变化特点, 这种极性分布的改变既受植物自身生长发育的制约, 又受外界环境变化的影响(下文详述), 因此认为 PIN 蛋白极性位置的变化会影响 PIN 蛋白的功能。

4 PIN 蛋白活性的调控

PIN 蛋白的活性影响着植物体的生长发育, 近年来的研究表明, PIN 蛋白的活性调控可归纳为 4

种形式: 极性定位的调控; 基因表达的调控; 生长素运输抑制剂的调控和磷酸化调控。

4.1 极性定位的调控 PIN 蛋白一经合成后即进入囊泡运输系统, 在此过程中 PIN 蛋白的极性分布能够迅速响应内部生长发育信号和外界环境的变化 (Okada 等 1991)。免疫化学定位研究表明, 含有 AtPIN1 的内吞囊泡在胞膜和胞内细胞器(主要是内体, endosome)间循环运输, 可以实现 PIN 蛋白的极性分布。一旦内体返回细胞膜的能力受到抑制后, PIN 蛋白的分布就会发生改变。PIN 蛋白的极性变化有两种可能: 一是 PIN 蛋白的膜定位功能丧失或下降, 转而在胞质或胞内区室中分布; 二是原本分布在细胞的一端或一侧的 PIN 蛋白却分布在相反的方向。

真菌毒素布雷菲尔德菌素 A (brefeldin A, BFA) 是一种公认的囊泡运输抑制剂。以 BFA 处理细胞后, AtPIN1 在膜上正常的极性分布即发生改变, 大多数 PIN 蛋白聚集在胞内细胞器中(有人将这一结构称为 BFA 腔室)。除去 BFA 后, AtPIN1 即迅速恢复到正常的极性定位 (Geldner 等 2001), 这表明 AtPIN1 依赖囊泡的靶向运输是一个动态过程。

如果拟南芥的 *GNOM* 基因发生突变即会改变细胞的囊泡运输, 从而影响 PIN1 的极性定位。GNOM 蛋白是一种大型的 ARF-GEF, 即 ADP 核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 的鸟苷酸交换因子 (guanine-nucleotide exchange factor, GEF), 是小 G 蛋白 ARF 的分子开关, 而 ARF 在蛋白质的小泡运输中起作用 (Mouratou 等 2005)。最早报道

的是 *gnom* 突变体发育存在严重缺陷, 胚胎畸形, 下胚轴缺失, 根系发育异常, 侧根显著减少和根的向地性出现部分缺失, 一般在幼苗早期便会死亡 (Mayer 等 1991; Shevell 等 1994; Friml 等 2003)。后来的研究认为 GNOM 位于内体中, 介导着生长素输出载体元件 PIN1 向胞膜的运输。在 *gnom* 突变体中, 不管是在胚胎还是在根部, 生长素输出载体元件 PIN1 的细胞极性定位均丧失 (Steinmann 等 1999)。我们实验室的研究结果表明, 水稻 *gnom1* 突变体不定根缺失, OsPIN1 蛋白的极性分布也发生变化 (未发表资料)。

GNOM 与 BFA 都通过影响囊泡运输而影响 PIN 蛋白的分布, 这两者到底是什么关系呢? 现在越来越多的证据证实, BFA 是通过 GNOM 的作用而调控 PIN 蛋白的极性定位。有研究指出, 将 GNOM 催化区域的第 696 位的甲硫氨酸人工改造成亮氨酸后, 本来对 BFA 敏感的 GNOM 即转变成抗性的 (Muday 等 2003), 此时细胞内的 PIN1 蛋白即不会随着 BFA 的添加而发生改变。

蛋白质的囊泡运输离不开肌动蛋白提供的能量, 因此肌动蛋白的活性和状态也是影响 PIN 蛋白极性分布的因素。有报告显示, AtPIN1 和 AtPIN3 在膜上的极性分布 (Friml 等 2003; Geldner 等 2003) 对肌动蛋白很敏感。细胞松弛素是肌动蛋白聚合的抑制剂, 细胞以松弛素处理后, AtPIN1 的极性分布即发生变化, 生长素的极性运输下降。但是细胞松弛素与 BFA 的作用机制并不相同: 若用这 2 种物质同时处理细胞, AtPIN1 在细胞内部的积累反而减少, 表明细胞松弛素可以阻止由于 BFA 处理造成细胞内部 AtPIN1 的积累; 而且除去 BFA 后, AtPIN1 也不能马上返回到细胞膜上 (Muday 和 DeLong 2001), 从而证实肌动蛋白对 PIN 蛋白是极性定位的调控。

不同 PIN 蛋白的胞间运输采用的机制可能不同, 因而决定它们极性分布的因素可能各不相同。除了通过 GNOM 途径进行调控以外, AtPIN1 的正常极性分布还需要 SFC (SCARFACE) 的参与。SFC 编码 ADP 核糖化因子 GTP 酶激活蛋白 (6-GAP), 对囊泡运输起调节作用。sfc 突变体的叶脉不连续, 其根对外源生长素响应增强后, 生长素运输亦增强, 以 BFA 处理后的细胞区室中, AtPIN1 比野生型有更多的积累 (Sieburth 等 2006)。而在侧根形成和胚胎

发育过程中, AtPIN2 的极性分布则需要 SNX1 (SORTING NEXIN1) 和 VPS29 (VACUOLAR PROTEIN SORTING 29) 内体相关蛋白的参与 (Jaillais 等 2006, 2007)。此外, 作用于内吞系统的 TIR3 (transport inhibitor response 3, 生长素受体) 影响着细胞膜上 PIN 蛋白复合物的建立, 其突变体对 NPA 不敏感, 因此生长素极性运输下降 (Ruegger 等 1997; Gil 等 2001)。

除了受细胞的囊泡转运系统调控之外, PIN 蛋白的极性定位还受蛋白激酶 PID (PINOID) 的调控 (Friml 等 2004)。PID 超表达的水稻植株表现出向地性缺失, 下胚轴发育异常, 不定根缺失或者减少 (Morita 和 Kyojuka 2007)。拟南芥中的研究显示 PID 超表达后, AtPIN1、AtPIN2 和 AtPIN4 的极性分布发生变化 (Christensen 等 2000; Benjamins 等 2001; Lee 和 Cho 2006)。有人认为, PID 起双元开关的作用, 当生长素浓度低于阈值时, PIN 蛋白即向细胞基部集中; 当生长素浓度超过阈值时, PIN 蛋白则向相反方向集中 (Benjamins 等 2003)。

PIN 蛋白的极性分布还受发育的调节, 胚胎发育不同时期的 PIN1 其极性分布不相同 (Peer 等 2004; Blilou 等 2005)。当外界环境发生变化时, PIN 蛋白通过快速的囊泡循环运动而重新分布 (Dhonukshe 等 2007; Kleine-Vehn 等 2008)。在光或重力等因素的促使下, PIN2 的极性分布迅速发生变化 (Friml 和 Palme 2002)。如暗条件下培养的拟南芥, 其 AtPIN2 的极性定位发生变化, 原本定位于胞膜中的 PIN2 显著减少, 而在液泡区室可以检出大量的 PIN2, 故推测光调控根系发育的部分原因是由于光环境下细胞中的 PIN 蛋白分布发生变化所致 (Laxmi 等 2008)。

影响 PIN 蛋白极性定位的因素可能远不止上述几种。在玉米的突变体 *bif2* 中, 其腋生分生组织 (axillary meristems) 发育异常, 花序不能正常分支 (McSteen 和 Hake 2001; Carraro 等 2006)。进一步研究表明, 生长素极性运输载体 ZmPIN1a 和 ZmPIN1b 在 *bif2* 花器官中的极性定位也发生改变。故推测 BIF2 也影响 PIN 蛋白的极性定位。另外, 一些 PGP 蛋白与 NPA 有较高的亲和能力, *pgp1* 突变体中的 PIN 蛋白的极性定位也发生变化 (Blakeslee 等 2007)。

4.2 生长素对 PIN 基因表达的调控 除了 PIN 蛋白的极性定位可以发生变化以外, PIN 蛋白的表达量受许多因素的影响,特别是受生长素的反馈调节:一方面 PIN 蛋白作为生长素运输的载体,其表达量或极性定位的变化都会影响生长素的运输;另一方面,生长素本身的分布以及生长素代谢途径中的一些蛋白如 TIR、Aux/IAA 和 ARF (auxin response factor, 生长素反应因子)等都可影响 PIN 基因的表达,即生长素自身的分布和生长素信号共同调控 PIN 蛋白的表达(Aida 等 2004; Peer 等 2004; Blakeslee 等 2005)。

生长素的浓度调节着 PIN 基因的表达。有研究表明,在高浓度生长素条件下, PIN 基因的表达量即增加(Vieten 等 2005),但这种诱导同时受胞内生长素浓度的反馈调控,即胞内生长素的浓度过高会下调 PIN 蛋白的组织特异表达(Vieten 等 2005),即组织特异的生长素分布调节着 PIN 基因的表达。

生长素对 PIN 基因表达的调节可能与 PLT1 (PLETHORA1)和 PLT2 有关。PLT 蛋白是一类具有 AP2 结构域的转录因子,它可以维持植物体内干细胞的活性。*plt1* 或 *plt2* 的拟南芥突变体的干细胞缺失后,细胞分裂即发生故障,根系发育异常。添加外源生长素后根中 PLT1 和 PLT2 表达增加(Aida 等 2004),从而导致 PIN 基因的表达增强。在 *pin1pin4pin7* 的三突变体中 PLT1 的表达也发生改变,这说明在根系发育过程中存在一种生长素的反馈途径(Blilou 等 2005)。

PLT 的表达还依赖于生长素反应因子 ARF 的激活(Heisler 等 2005),也就是说,ARF 直接或间接地影响着 PIN 蛋白的活性。相应的生长素信号途径的其他蛋白如 F-box 蛋白 (AFBs) 和 Aux/IAA 蛋白也控制着 PIN 基因的表达(Vieten 等 2005)。与 ARF 促进 PIN 蛋白的表达相反,这种与泛素降解途径相联系的蛋白质一般可以抑制 PIN 基因的表达。例如 AXR1 可以促进 Aux/IAA 蛋白的泛素降解途径,同时它又抑制 *AtPIN2* 的转录(Sieberer 等 2000; Abas 等 2006)。

PIN 蛋白的活性除了在转录水平上调控以外,还存在转录后水平上的调控。拟南芥的 *mop2* (*modulator of pin2*) 和 *mop3* 突变体有明显的生长素运输缺陷:主根变短,向地性部分缺失,叶片、叶脉及花序的形态发生变异,对生长素运输的抑制

剂反应更敏感,双突变体则表型加剧(Malenica 等 2007)。进一步的研究表明,在 *mop2* 和 *mop3* 突变体中,生长素的分布和 PIN 的蛋白表达均发生变化,但是 PIN 基因的转录水平则没有变化,说明 MOP 在转录后水平上调控着 PIN 的表达。若在 *mop2* 和 *mop3* 突变体的遗传背景下将 *PIN1* 超表达,上述的突变表型即得以部分恢复(Malenica 等 2007),从而进一步证实 MOP 对 PIN 蛋白表达有调控作用。

4.3 生长素运输抑制剂对 PIN 活性的调控 与生长素类似,生长素极性运输的化学抑制剂也影响着 PIN 基因的表达(Delbarre 等 1996; Petrasek 等 2003)。这些抑制剂分为两类,一类是人工合成化合物如三碘苯甲酸(2,3,5-triiodobenzoic acid, TIBA),一类是天然化合物如 NPA。当添加外源的这类物质后,野生型的拟南芥与 *pin* 突变体有相似的表型,表明这些抑制剂可能是通过调节 PIN 蛋白的活性而抑制生长素的外向运输的。

NPA 对 PIN 蛋白活性影响的方式很复杂。首先它可以直接诱导 PIN 蛋白家族中不同成员的表达水平(Malenica 等 2007)。其次 NPA 还可以通过肌动蛋白影响 PIN 蛋白的囊泡运输和极性定位,越来越多的人认为,这是 NPA 起作用的主要机制(Paponov 等 2005)。NPA 可以抑制生长素的极性运输和依赖生长素的生理反应,但生长素并不与这些抑制剂竞争结合位点,表明生长素的输出是由 2 个或多个蛋白组成的复合体所介导的,这从另一个侧面说明 PIN 蛋白只是载体元件之一,包括独立的生长素输出载体和调控组分。这种调控元件极有可能就是 NPA 结合蛋白(NPA binding proteins, NBP)。它是一种位于胞质外周的蛋白,具有单一的与 NPA 高亲和力的位点。NBP 可以与肌动蛋白相互作用,即 NBP 可能在 PIN 蛋白和肌动蛋白间起桥梁作用,调控着 PIN 蛋白的囊泡运输(Muday 和 Murphy 2002)。

某些黄酮类物质可在西葫芦(*Cucurbita pepo* L.) 的下胚轴组织中取代已结合的 NPA,表明这些物质可能是生长素运输的内源调控因子(Jacobs 和 Rubery 1988)。近年来的研究表明,黄酮类化合物不仅在植物中普遍存在,而且它还可以经过不同的化学修饰产生不同的功能,与生长素运输的时空变化一致。而且, D'orenone (一种酮类化合物)可提高 *AtPIN2* 的蛋白丰度,改变其向基式运输,从而

提高生毛细胞(trichoblast)中生长素的输出,导致生长素水平低于根毛生长的临界水平,因此根毛生长受阻(Schlich等2008)。而在 *pin2* 突变体中, D'orenone 不影响根毛的生长,表明 *PIN2* 是 D'orenone 专一性的靶(Schlicht等2008)。

4.4 可逆蛋白磷酸化的调控 *PIN* 蛋白的序列分析显示,其在亲水区存在磷酸化位点,暗示磷酸化可能是 *PIN* 蛋白的一种调控方式。此外丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 *PID* 可调控 *PIN* 的极性定位,而 *PID* 是受激酶 *PDK1* 的磷酸化调控的,这表明磷酸化调节影响着 *PIN* 蛋白极性定位,它在生长素极性运输中是一种普遍存在的调节机制。

RCN1 (ROOTS CURL IN NPA) 基因编码蛋白磷酸酶 *PP2A (protein phosphatase 2A)* 的调节亚基,其突变体表现出生长素极性运输紊乱(Deruere等1999),同时 *pp2a* 功能缺失突变体的根和胚发育出现故障,与蛋白激酶 *PID* 超表达后的表型类似(Benamins等2001; Friml等2004)。Muday等(2006)和 Michniewicz等(2007)进一步研究表明, *PP2A* 与 *PID* 以反协同作用调控着 *PIN* 蛋白的极性定位和生长素的极性运输。*pp2a* 突变体和 *PID* 超表达植株一致,胚胎和根部的 *PIN* 蛋白的极性定位发生倒转,原本定位于基部的 *PIN1* 却出现在细胞的上部,其他的 *PIN* 成员的极性分布也部分受阻。而且 *PP2A*、*PID* 和 *PIN* 蛋白在胞膜中呈部分共定位分布,体外实验直接证实,在 *PIN* 蛋白中的亲水区,蛋白磷酸酶 *PP2A* 与蛋白激酶 *PID* 以相反的方式调节着 *PIN* 蛋白的去磷酸化和磷酸化,从而影响 *PIN* 蛋白的极性分布(Michniewicz等2007)。

BUD1 (Bushy and Dwarf 1) 编码一种 *MKK7 (MAP kinase kinase 7)* 激酶,可作为负调控因子控制生长素的极性运输,其突变体 *bud1* 根系的发育和向地性反应均发生异常,故推测 *BUD1* 可能通过调节 *PIN* 蛋白的磷酸化而影响 *PIN* 蛋白的极性定位及生长素的极性运输(Dai等2006)。

5 结语

生长素的极性运输是一个错综复杂的过程,它影响着植物体的生长和发育,是当今发育生物学领域中的研究热点之一。由于现代分子生物学和遗传学的发展,生长素及其极性运输的机理在分子和细胞水平上都取得了进展。这些生长素相关基因的克隆为采用基因工程调控植物生长素的极性运输

提供了基础。但在 *PIN* 蛋白家族的功能和生长素的极性运输的研究领域中,还有许多工作要做,如:不同物种中 *PIN* 家族的功能; *PIN* 基因间的互作网络和冗余机制; *PIN* 与生长素的反馈调节网络; 它们的活性和表达的调控机制; 从生化角度研究这些运输载体的底物和功能特点,以及它们之间相互作用的大分子的鉴定等。

参考文献

- 李俊华, 种康(2006). 植物生长素极性运输调控机理的研究进展. 植物学通报, 23 (5): 466~477
- 刘进平(2007). 生长素运输机制研究进展. 中国农业学报, 23 (5): 432~443
- 倪为民, 陈晓亚, 许智宏, 薛红卫(2000). 生长素极性运输研究进展. 植物学报, 42 (3): 221~228
- 夏石头, 萧浪涛(2003). 生长素极性运输的调控及其机制. 植物生理学通讯, 39 (3): 255~261
- Abas L, Benamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator *PIN2* are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol*, 8 (3): 249~256
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119 (1): 109~120
- Benamins R, Ampudia CS, Hooikaas PJ, Offringa R (2003). PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol*, 132 (3): 1623~1630
- Benamins R, Quint A, Weijers D, Hooikaas P, Offringa R (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development*, 128 (20): 4057~4067
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115 (5): 591~602
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J et al (2007). Interactions among *PIN-FORMED* and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (1): 131~147
- Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS (2005). Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (5): 494~500
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005). The *PIN* auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433 (7021): 39~44
- Carraro N, Forestan C, Canova S, Traas J, Varotto S (2006). *ZmPIN1a* and *ZmPIN1b* encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. *Plant Physiol*, 142 (1): 254~264
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH

- (1998). The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (25): 15112~15117
- Cho M, Lee SH, Cho HT (2007). P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*, 19 (12): 3930~3943
- Christensen SK, Dagenais N, Chory J, Weigel D (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell*, 100 (4): 469~478
- Dai Y, Wang H, Li B, Huang J, Liu X, Zhou Y, Mou Z, Li J (2006). Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (2): 308~320
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta*, 198 (4): 532~541
- Deruere J, Jackson K, Garbers C, Soll D, Delong A (1999). The RCN1-encoded a subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity *in vivo*. *Plant J*, 20 (4): 389~399
- Dharmasiri S, Swarup R, Mockaitis K, Dharmasiri N, Singh SK, Kowalchuk M, Marchant A, Mills S, Sandberg G, Bennett MJ et al (2006). AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science*, 312 (5777): 1218~1220
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 17 (6): 520~527
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G et al (2002a). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 108 (5): 661~673
- Friml J, Palme K (2002). Polar auxin transport — old questions and new concepts? *Plant Mol Biol*, 49 (3-4): 273~284
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426 (6963): 147~153
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415 (6873): 806~809
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PB, Ljung K, Sandberg G et al (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*, 306 (5697): 862~865
- Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282 (5397): 2226~2230
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112 (2): 219~230
- Geldner N, Friml J, Stierhof Y, Jurgens G, Palme K (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413 (6854): 425~428
- Gil P, Dewey E, Friml J, Zhao Y, Snowden KC, Putterill J, Palme K, Estelle M, Chory J (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 15 (15): 1985~1997
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol*, 15 (21): 1899~1911
- Jacobs M, Rubery PH (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*, 241 (4863): 346~349
- Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miede C, Rollin C, Gaude T (2006). AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature*, 443 (7107): 106~109
- Jaillais Y, Santambrogio M, Rozier F, Fobis-Loisy I, Miede C, Gaude T (2007). The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell*, 130 (6): 1057~1070
- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer PB, Wisniewska J, Paciorek T, Benkova E, Friml J (2008). ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 18 (7): 526~531
- Kwiatkowska D (2004). Surface growth at the reproductive shoot apex of *Arabidopsis thaliana pin-formed 1* and wild type. *J Exp Bot*, 55 (399): 1021~1032
- Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R (2008). Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 3 (1): e1510
- Lee SH, Cho HT (2006). PINOID positively regulates auxin efflux in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*, 18 (7): 1604~1616
- Malenica N, Abas L, Benjamins R, Kitakura S, Sigmund HF, Jun KS, Hauser MT, Friml J, Luschnig C (2007). MODULATOR OF PIN genes control steady-state levels of *Arabidopsis* PIN proteins. *Plant J*, 51 (4): 537~550
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J*, 18 (8): 2066~2073
- Mayer U, Torres Ruiz RA, Berleth T, Misera S, Jurgens G (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 353: 402~407
- McSteen P, Hake S (2001). *barren inflorescence2* regulates axillary meristem development in the maize inflorescence. *Development*, 128 (15): 2881~2291
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F et al (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130 (6): 1044~1056
- Morita Y, Kyoizuka J (2007). Characterization of OsPID, the rice ortholog of PINOID, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant Cell Physiol*, 48 (3):

- 540~549
- Morris DA (2000). Transmembrane auxin carrier systems—dynamic regulators of polar auxin transport. *Plant Growth Regul*, 32 (2-3): 161~172
- Mouratou B, Biou V, Joubert A, Cohen J, Shields DJ, Geldner N, Jurgens G, Melancon P, Cherfils J (2005). The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf. *BMC Genomics*, 6 (1): 20
- Muday GK, Brady SR, Argueso C, Deruere J, Kieber JJ, DeLong A (2006). RCN1-regulated phosphatase activity and EIN2 modulate hypocotyl gravitropism by a mechanism that does not require ethylene signaling. *Plant Physiol*, 141 (4): 1617~1629
- Muday GK, DeLong A (2001). Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Sci*, 6 (11): 535~542
- Muday GK, Lomax TL, Rayle DL (1995). Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, *diageotropica*. *Planta*, 195 (4): 548~553
- Muday GK, Murphy AS (2002). An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, 14 (2): 293~299
- Muday GK, Peer WA, Murphy AS (2003). Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity. *Trends Plant Sci*, 8 (7): 301~304
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*, 3 (7): 677~684
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I, Palme K (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci*, 10 (4): 170~177
- Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson PH, Murphy AS (2004). Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (7): 1898~1911
- Petrasek J, Cerna A, Schwarzerova K, Elckner M, Morris DA, Zazimalova E (2003). Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiol*, 131 (1): 254~263
- Ruegger M, Dewey E, Hobbie L, Brown D, Bernasconi P, Turner J, Muday G, Estelle M (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell*, 9 (5): 745~757
- Schlicht M, Samajova O, Schachtschabel D, Mancuso S, Menzel D, Boland W, Baluska F (2008). D'orenone blocks polarized tip growth of root hairs by interfering with the PIN2-mediated auxin transport network in the root apex. *Plant J*, 55 (4): 709~717
- Shevell DE, Leu WM, Gillmor CS, Xia G, Feldmann KA, Chua NH (1994). EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell*, 77 (7): 1051~1062
- Sieberer T, Seifert GJ, Hauser MT, Grisafi P, Fink GR, Luschnig C (2000). Post-transcriptional control of the *Arabidopsis* auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Curr Biol*, 10 (24): 1595~1598
- Sieburth LE, Muday GK, King EJ, Benton G, Kim S, Metcalf, KE, Meyers L, Seamen E, Van Norman JM (2006). SCARFACE encodes ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (6): 1396~1411
- Smith RS, Guyomarch S, Mandel T, Reinhardt D, Kuhlemeier C, Prusinkiewicz P (2006). A plausible model of phyllotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (5): 1301~1306
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Galweiler L, Palme K, Jurgens G (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, 286 (5438): 316~318
- Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (11): 847~859
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132 (20): 4521~4531
- Xu M, Zhu L, Shou H, Wu P (2005). A *PIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell Physiol*, 46 (10): 1674~1681
- Zazimalova E, Krecek P, Skupa P, Hoyerova K, Petrasek J (2007). Polar transport of the plant hormone auxin — the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell Mol Life Sci*, 64 (13): 1621~1637