

芸苔属植物自交不亲和性中的细胞识别

王艳红, 李玉花, 蓝兴国*

东北林业大学生命科学学院发育生物学科, 哈尔滨 150040

Cell Recognition for Self-Incompatibility in *Brassica*

WANG Yan-Hong, LI Yu-Hua, LAN Xing-Guo*

Department of Developmental Biology, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

摘要:从细胞识别的角度概述芸苔属植物自交不亲和信号的产生和转导机制的研究进展。

关键字:芸苔属; 自交不亲和性; SCR; SRK

花粉与雌蕊间的细胞识别是高等植物完成受精作用的前提和保障。植物自交不亲和性(self-incompatibility, SI)是指花粉与雌蕊之间进行自我识别,并通过信号级联反应导致自我的花粉不能够正常地萌发或生长,最终导致正常可育的雌雄同株植物得不到种子(Zhang等2009)。芸苔属植物SI是植物细胞识别研究的模式系统,近些年来研究取得了很大突破。本文就芸苔属植物SI花粉与柱头细胞的识别机制,主要在受体与配体的识别、受体的激活及其通过泛素/蛋白酶体途径调控的研究进展作一介绍。

1 受体与配体的识别

在芸苔属植物中,花粉与柱头乳突细胞间的识别引起SI反应。花粉与柱头乳突细胞间的识别主要体现为S单倍型特异性的受体-配体识别机制。编码S位点受体激酶(S-locus receptor kinase, SRK)和S位点富半胱氨酸蛋白(S-locus cysteine-rich protein, SCR)的基因紧密连锁在高度多态性的S基因座上。SRK与SCR特异性的相互作用引起SRK自磷酸化并触发SI信号级联反应,最终导致自我花粉的拒绝(Kachroo等2001; Takayama等2001)。

1.1 受体SRK识别功能域 SRK特异性表达在柱头乳突细胞,以S单倍型特异性的方式与花粉配体结合,是SI的雌蕊决定因子(Hatakeyama等2001; Takasaki等2000)。SRK是一个跨膜蛋白,由胞外域(extracellular domain, eSRK)、跨膜域(membrane-spanning domain)和具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞内域(cytoplasmic domain)组成(Goring和Rothstein1992; Stein等1991)。胞外域(eSRK)具有

高度的单倍型特异性,能够特异性地识别并结合SCR(Kachroo等2001)。根据序列的相似性,eSRK又进一步细分为3个亚区:类凝集素功能域、高变区和PAN-APPLE区(Naithani等2007)(图1)。类凝集素功能域位于N端,是甘露糖结合功能域,这说明SRK有可能与甘露糖或其类似物结合;C端是一个类似于PAN或APPLE的功能域,PAN-APPLE功能域由3个二硫键组成一个保守的核心区域,其主要功能是介导蛋白-蛋白或者蛋白-碳水化合物相互作用(Tordai等1999);中端的高变区是一个高度多态性区域,包括高变区I、高变区II和高变区III三个部分,在不同单倍型中存在显著差异(Nishio和Kusaba2000)。体外重组蛋白结合实验证明,配体结合主要发生在高变区II功能域内,也有少量与类凝集素功能域结合。多肽阵列方法寻找高变区内配体结合位点的结果显示,在高变区约含70个氨基酸的6~11个多肽范围内是主要的SCR结合区域,个区域对应于高变区II。因此认为,SRK与配体的特异性结合主要发生在eSRK高变区内的高变区II(Kemp和Doughty2007)。

1.2 配体SCR识别功能域 SCR是花粉中一种小的、富含半胱氨酸的分泌蛋白(Schopfer等1999)。鉴定SCR结果表明,氨基酸序列主要由一个信号肽区域和一个成熟肽区域组成。成熟肽区域一般由

收稿 2009-09-11 修定 2009-11-19

资助 国家自然科学基金(30371189)和国家高技术研究“863”计划(2006AA10Z129)。

* 通讯作者(E-mail: lanxingguo@126.com; Tel: 0451-82191783)。

50~59个氨基酸构成,不同*S*单倍型SCR在成熟肽区域具有高度的序列多态性(Mishima等2003; 蓝兴国等2004)。在三维结构方面,对*S*₈-SCR的研究中发现:SCR紧密折叠,α螺旋和β折叠形成类似三明治的结构,环状结构分布其侧。其中8个保守的半胱氨酸形成的二硫键维持三维结构稳定性。不同单倍型SCR的多态性体现在一级结构上,而其三级结构则相对保守(Mishima等2003)。Sato等(2003)根据保守的半胱氨酸残基的分布将SCR的成熟肽区分为六个区域: I、II、III、IV、V、VI,并且认为在识别特异性上III、V、VI区域较其它区域更为重要。在这些区域内,氨基酸序列具有较高的种内保守性,通过改变SCR₆第V区域内的5个氨基酸,将其中的4个用SCR₁₃相应的氨基酸进行替换,改变了SCR₆的特异性,促使其与SRK₁₃特异性结合(Chookajorn等2004)。通过改变SCR第III、V区域的氨基酸能够促使SCR单倍型特异性地发生变化。这说明第III、V区域是决定SCR特异性的的重要因素,是与受体产生*S*单倍型特异性相互

作用的主要区域(Sato等2004)。

2 受体的激活

2.1 受体二聚化 经典受体-配体理论模型认为,受体-配体的结合引起受体同源二聚化或寡聚化,从而有利于受体胞内域进行磷酸化作用并招募胞质中的下游元件(Schlessinger 2002)。但是现在的研究认为,在没有配体存在的情况下,一些受体也能够二聚化或寡聚化;而且受体的寡聚化可能在信号转导过程中起到更多作用(Naithani等2007)。

在芸苔属SI研究中发现,受体SRK能够在配体不存在的情况下发生自身二聚化,这可能有利于SI信号的产生、扩大与传递(Naithani等2007)。而且,SRK的二聚化主要也是由eSRK介导的,有利于高亲和性的结合配体(Shimosato等2007)。为了鉴定出eSRK内的二聚化位点,用酵母表面展示技术,在酵母中分别表达N端的甘露糖结合功能域或C端的PAN-APPLE功能域,发现PAN-APPLE域能够引起酵母沉淀的程度与eSRK全长相当,而N端的甘露糖结合功能域则无明显变化。这说明

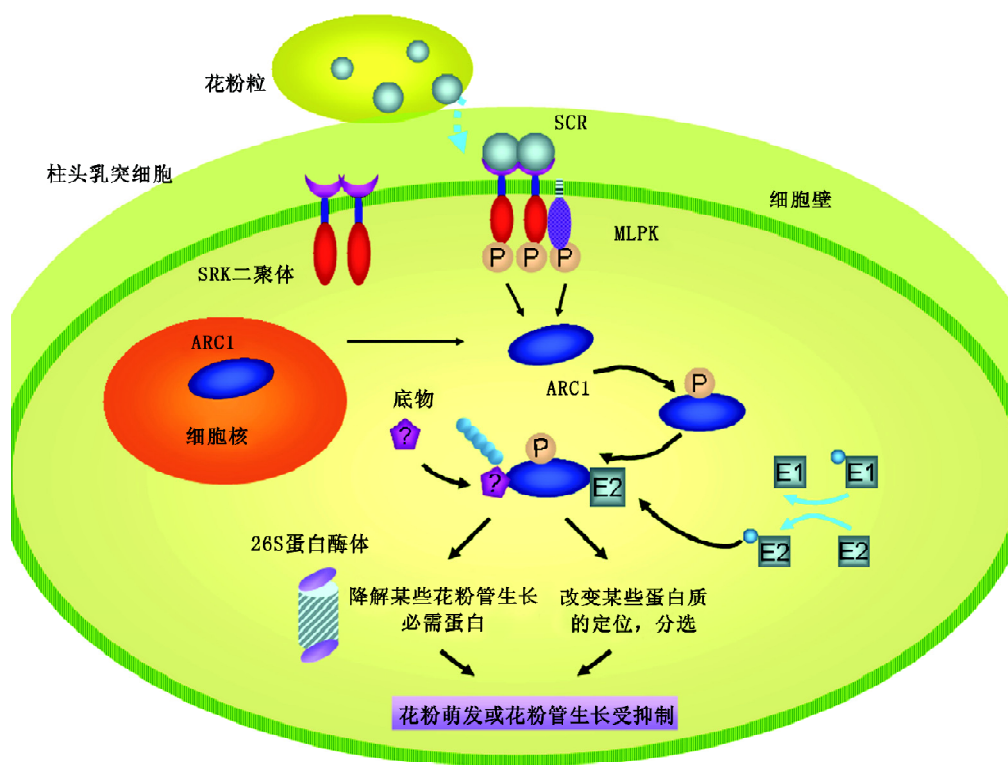


图1 自交不亲和信号转导模式图(Newbiggin和Vierstra 2003,有所修改)

柱头乳突中,SRK以受体二聚体的形式定位在细胞膜上。自花授粉后,SRK以*S*单倍型特异性的方式识别并结合SCR,并与MLPK相互作用形成受体复合物,进而激活下游元件ARC1。ARC1特异性识别底物蛋白并对其进行泛素化修饰,这些底物蛋白可能通过泛素/26S蛋白酶体途径被降解,或者是由于泛素化修饰而被重新定位或分选,最终导致花粉管生长受抑制。

PAN-APPLE 功能域是介导 SRK 二聚化的主要区域。在酵母双杂交实验中, PAN-APPLE 功能域介导较强的 SRK 自身的相互作用, 类 EGF (epidermis growth factor) 功能域也有轻微的相互作用。在其它生物体中, PAN-APPLE 和 EGF 功能域都有介导蛋白-蛋白相互作用的作用(Cheng等2003; Naithani等2007)。因此认为, 这2个功能域可能形成2个相互作用点共同促进 SRK 二聚体的形成。另外, 与异源二聚化相比, eSRK 的同源二聚化具有明显的优势, 这种易于形成同源二聚化的特点主要取决于 PAN-APPLE 功能域内一个短的高变区。因此认为, 高度多态性的 eSRK 不仅决定其对不同 SCR 的亲和力, 同时也决定 SRK 以 S 单倍型特异性的方式发生自身二聚化。

2.2 受体激活的两步反应 SRK 的激活分为2个步骤: 首先是配体不依赖于 S 单倍型的锚定作用; 接下来是 S 单倍型特异性的受体激活。在授粉过程中, 首先 SCR 低亲和性的锚定在 SRK 上, 主要通过基本的空间构型完成不稳定的初步结合; 随后由超变区介导的 S 单倍型特异性结合才能激活 SRK。但是, SRK 受体的激活需要2个必要条件: 第一, SRK 形成稳定的二聚体以利于受体-配体相互作用; 第二, SRK 二聚体锚定在细胞膜上(Naithani等2007)。

一般认为, 柱头中的 SRK 能形成自身二聚化并且锚定在细胞膜上。当花粉落在柱头表面时, 花粉中的配体 SCR 和柱头中的受体 SRK 互相接触。SCR 可以利用自身构象与 eSRK 发生较为松散的结合作用, 随后进入以 S 单倍型特异性方式的受体-配体相互作用, SCR 与 eSRK 超变区紧密结合, 于是 SRK 胞内激酶域得到激活, 从而引起柱头乳突细胞内的 SI 信号传递(图1)。

3 受体复合物

MLPK (*M* locus protein kinase) 是 *M* 位点蛋白激酶, 属于受体样蛋白激酶(receptor-like cytoplasmic kinase, RLCK) 家族。这类家族蛋白激酶的特点是与受体激酶相似但没有明显的信号肽或跨膜域(Murase等2004; Shiu等2001)。*M* 位点与 *S* 位点(*S* 位点包含紧密连锁的 SCR 和 SRK) 彼此独立存在, 而且 *M* 位点对 *S* 位点来说是上位性的(Hinata等1983)。*mlpk/mlpk* 突变体是完全自交亲和的, 表明 MLPK 参与 SI 信号转导的初级阶段。目前已经鉴定出 MLPK 两个转录本: *MLPKf1* 和 *MLPKf2* (Kakita

等2007)。*MLPKf2* 主要在柱头中表达; 而 *MLPKf1* 在柱头、叶片和茎中均有所分布。其次, 二者定位在细胞膜的方式截然不同。*MLPKf1* 利用其 N 端的肉豆蔻酰基序定位在质膜上, 而 *MLPKf2* 则是通过 N 端的疏水功能域锚定在膜上。在 *mlpk/mlpk* 突变体中瞬时表达二者均可以使使突变体恢复 SI, 然而缺失膜定位功能域的 MLPK 则不能促使突变体恢复 SI。这些研究证明, MLPK 参与 SI 信号转导, 并且 MLPK 必须定位在膜上才能发挥作用。

用双分子荧光互补分析技术结果显示: *MLPKf1* 和 *MLPKf2* 均能够与 SRK 直接作用, 形成受体复合物参与 SI 的信号转导(Kakita等2007b)。在哺乳动物中也存在类似的受体复合物, 如 Src 家族激酶能够通过自身肉豆蔻酰基序锚定在细胞膜上, 并与活化的受体激酶通过酪氨酸激酶域相互作用, 加强信号的传递作用(Thomas和Brugge1997); 又如, 在生长因子 β 信号转导中, 2种不同类型(I类和II类)的受体形成受体复合物共同介导信号的传递, II类受体激酶能够自身二聚化识别配体分子, 随后又激活 I 类受体激酶, 形成一个异源受体复合物激活下游元件(Giranton等2000)。MLPK 与 SRK 很有可能也是以这样的方式形成一个异源受体复合物, SRK 自身形成二聚体后以 S 单倍型特异性的方式结合配体分子, 并与定位在细胞膜上的 MLPK 相互作用形成受体复合物, 将信号传递给下游元件(Giranton等2000; Kakita等2007a)。

4 SI 信号的传递

用酵母双杂交方法鉴定与 SRK 激酶域相互作用的蛋白质, 来分离 SRK 信号途径中的下游成分, 得到 THL1、THL2、ARC1 (Bower等1996; Gu等1998) 等蛋白。THL1、THL2 是 *h*- 硫氧还蛋白家族中的成员, 能够抑制未与相应配体结合的 SRK 受体激活。一旦 SRK 与 SCR 结合, THL1、THL2 对 SRK 的抑制作用会减弱, 于是使 SRK 的激酶域得到激活(Cabrillac等2001)。

Stone等(2003)分析油菜 ARC1 的结构发现, 该蛋白质主要由以下3个部分组成: 位于 N 端的亮氨酸拉链结构域(leucine zipper domain)和卷曲螺旋结构域(coiled-coil domain); 中间的 U-box 结构域和 C 端的 arm repeat 结构域; 另外还包含 1 个核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和 2 个核输出信号(nuclear export signal, NES) (Stone等2003)。

ARC1 特异性在柱头中表达, 并且其表达水平与 SI 反应的发生相关。抑制 *ARC1* 的表达, 能够部分打破 SI, 这表明 *ARC1* 是 SI 的正向调控因子(Stone 等 1999)。

5 SI 与泛素 / 蛋白酶体途径

在植物的生命周期中, 很多生物过程均是通过激活泛素降解途径来完成蛋白质的降解, 从而有效的调控细胞内各种蛋白的活性(Moon 等 2004; Vierstra 2009)。蛋白质被泛素分子标记的过程称为泛素化, 主要由 3 种酶来完成: 泛素激活酶 E1 (ubiquitin-activating enzyme)、泛素结合酶 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) 和泛素连接酶 E3 (ubiquitin ligase)。其中, 泛素连接酶 E3 是决定底物特异性的主要因素, 因而数量最丰, 种类最多。多聚泛素化修饰是降解蛋白质的一个必要条件, 一般标记靶蛋白的泛素链不少于 4 个泛素分子才能将蛋白运送到 26S 蛋白酶体中降解; 而少于 4 个或是单泛素化修饰可能与膜转运、转录调控等有关(Hicke 2001; Vierstra 2009)。

SI 信号转导最终导致花粉管水合、萌发作用受到抑制, 而这种抑制很可能是由于某些必需蛋白质被降解造成的。*ARC1* 作为 SRK 的下游元件具有依赖 U-box 功能域的 E3 泛素连接酶活性。*ARC1* 可以在胞质溶胶、细胞核以及蛋白酶体之间穿梭。并且 *ARC1* 的定位受严格的调控, 只有在 SRK 活化的情况下 *ARC1* 才会定位到蛋白酶体(于晓敏等 2006)。授粉后的雌蕊进行蛋白质泛素化水平研究显示, 不亲和授粉能够特异性的引起蛋白质泛素化水平提高, 而在 *ARC1* 反义表达的雌蕊中蛋白泛素化水平则没有明显变化。因此认为, *ARC1* 促进雌蕊中花粉萌发亲和因子的降解, 从而导致不亲和花粉的拒绝反应(Stone 等 2003)。不仅如此, 分析经过蛋白酶体抑制剂 MG-132 和 MG-115 处理的雌蕊的授粉反应, 结果表明不亲和花粉的花粉管萌发率大大提高。这些结果说明泛素 / 蛋白酶体途径参与了 SI 反应(Myung 等 2001; Sheng 等 2006)。但是, 对于泛素化的底物和泛素化的类型的分子机制还不清楚。

6 结束语

植物的 SI 现象一直是一个令人感兴趣而又未能真正揭示的自然界之谜。芸苔属植物 SI 更是作为研究植物细胞识别的模式系统, 对人们了解植物

体很多重要的信号通路具有很大的意义。近年来, 人们对雌蕊-花粉之间的细胞识别以及 SI 信号的产生等上游事件的认识已较为深化, 但仍有一些关键问题有待阐明。如 *ARC1* 的下游底物, 类受体激酶 MLPK 在整个通路中的作用机制以及信号通路中各组间的作用机制等均不清楚。在探究 SI 分子机制的同时, 受体激酶与 U-box/Arm repeat E3 泛素连接酶之间的相互作用受到人们越来越多的关注。这些相互作用的蛋白可能参与植物体许多生物途径, 如植物防御反应和激素调节等。同时, 类受体激酶与受体激酶形成受体复合物共同完成信号的接收和传递也是一个新的热点问题。

参考文献

- 蓝兴国, 解莉楠, 李玉花(2004). 芸苔属自交不亲和细胞信号转导的研究进展. 植物学通报, 21: 461~470
- 于晓敏, 蓝兴国, 李玉花(2006). 泛素 / 26S 蛋白酶体途径与显花植物自交不亲和反应. 植物学通报, 23: 197~206
- Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ, Goring DR (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica S* locus receptor kinase. Plant Cell, 8 (9): 1641~1650
- Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T (2001). The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. Nature, 410 (6825): 220~223
- Cheng Q, Sun MF, Kravtsov DV, Aktimur A, Gailani D (2003). Factor XI apple domains and protein dimerization. J Thromb Haemost, 1 (11): 2340~2347
- Chookajorn T, Kachroo A, Ripoll DR, Clark AG, Nasrallah JB (2004). Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. Proc Natl Acad Sci USA, 101 (4): 911~917
- Giranton JL, Dumas C, Cock JM, Gaude T (2000). The integral membrane *S*-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. Proc Natl Acad Sci USA, 97 (7): 3759~3764
- Goring DR, Rothstein SJ (1992). The *S*-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. Plant Cell, 4 (10): 1273~1281
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 95 (1): 382~387
- Hatakeyama K, Takasaki T, Suzuki G, Nishio T, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (2001). The *S* receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in *Brassica*. Plant J, 26 (1): 69~76
- Hicke L (2001). Protein regulation by monoubiquitin. Nat Rev Mol Cell Biol, 2 (3): 195~201

- Hinata K, Okazaki K, Nishio T (1983). Gene analysis of self-compatibility in *Brassica campestris* var. Yellow Sarson (a case of recessive epistatic modifier). Proceedings of the 6th International Rapeseed Conference. Paris: GCIRC, 354~359
- Kachroo A, Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB (2001). Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science*, 293 (5536): 1824~1826
- Kakita M, Murase K, Iwano M, Matsumoto T, Watanabe M, Shiba H, Isogai A, Takayama S (2007a). Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 19 (12): 3961~3973
- Kakita M, Shimosato H, Murase K, Isogai A, Takayama S (2007b). Direct interaction between *S*-locus receptor kinase and *M*-locus protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Plant Biotechnol*, 24: 185~190
- Kemp B, Doughty J (2007). S cysteine-rich (SCR) binding domain analysis of the *Brassica* self-incompatibility *S*-locus receptor kinase. *New Phytol*, 175 (4): 619~629
- Mishima M, Takayama S, Sasaki K, Jee JG, Kojima C, Isogai A, Shirakawa M (2003). Structure of the male determinant factor for *Brassica* self-incompatibility. *J Biol Chem*, 278 (38): 36389~36395
- Moon J, Parry G, Estelle M (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*, 16 (12): 3181~3195
- Murase K, Shiba H, Iwano M, Che FS, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 303 (5663): 1516~1519
- Myung J, Kim KB, Crews CM (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev*, 21 (4): 245~273
- Naithani S, Chookajorn T, Ripoll DR, Nasrallah JB (2007). Structural modules for receptor dimerization in the *S*-locus receptor kinase extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (29): 12211~12216
- Newbiggin E, Vierstra RD (2003). Plant reproduction: Sex and self-denial. *Nature*, 423 (6937): 229~230
- Nishio T, Kusaba M (2000). Sequence diversity of *SLG* and *SRK* in *Brassica oleracea* L. *Ann Bo*, 85 (Supplement A): 141~146
- Sato Y, Fujimoto R, Toriyama K, Nishio T (2003). Commonality of self-recognition specificity of *S* haplotypes between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant Mol Bio*, 52: 617~626
- Sato Y, Okamoto S, Nishio T (2004). Diversification and alteration of recognition specificity of the pollen ligand SP11/SCR in self-incompatibility of *Brassica* and *Raphanus*. *Plant Cell*, 16 (12): 3230~3241
- Schlessinger J (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, 1106: 669~672
- Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286 (5445): 1697~1700
- Sheng X, Hu Z, Lu H, Wang X, Baluska F, Samaj J, Lin J (2006). Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components. *Plant Physiol*, 141 (4): 1578~1590
- Shimosato H, Yokota N, Shiba H, Iwano M, Entani T, Che FS, Watanabe M, Isogai A, Shiu SH, Bleecker AB (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (19): 10763~10768
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (19): 8816~8820
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, 15 (4): 885~898
- Stone SL, Arnoldo M, Goring DR (1999). A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science*, 286 (5445): 1729~1731
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (2000). The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403 (6772): 913~916
- Takayama S, Shimosato H, Shiba H, Funato M, Che FS, Watanabe M, Iwano M, Isogai A (2001). Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 413 (6855): 534~538
- Thomas SM, Brugge JS (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 513~609
- Tordai H, Banyai L, Patthy L (1999). The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Lett*, 461 (1-2): 63~67
- Vierstra RD (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 385~397
- Zhang Y, Zhao Z, Xue Y (2009). Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 21~42