

研究通讯 Research Letter

TIR1 终于被确证为生长素受体

白华举^{1,2,3} 陈军营² 刘林³ 陈新建^{2,*}¹ 山东师范大学生命科学学院, 济南 250004; ² 河南农业大学农学院, 郑州 450002; ³ 临沂师范学院生命科学系, 山东临沂 276005

TIR1 Was Confirmed as an Auxin Receptor Finally

BAI Hua-Ju^{1,2,3}, CHEN Jun-Ying², LIU Lin³, CHEN Xin-Jian^{2,*}¹ College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250004, China; ² College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ³ Department of Life Sciences, Linyi Normal College, Linyi, Shandong 276005, China

提要 生长素受体——TIR1 近期被确定, 解决了生长素研究中长期令人困惑的一大难题。生长素首先和 TIR1 结合并且促进 TIR1 和 Aux/IAA 蛋白质的相互作用。TIR1 和其他至少 3 种 F-box 蛋白质一起发挥作用, 激活了泛素化的蛋白质降解过程, 启动了基因转录, 从而导致了植物生长发育过程中的生长素反应。

关键词 生长素受体; TIR1; Aux/IAA 类蛋白质; 生长素响应因子(ARF)

植物生长素的研究已有 100 多年, 但是生长素受体为何物一直是悬而未决的问题。2005 年的《Nature》上连续有两篇论文(Dharmasiri 等 2005a; Kepinski 和 Leyser 2005) 给出了明确的答案 认为 TIR1 就是人们长期寻找而又未果的植物生长素受体, 从而引起了科学界的高度关注与巨大轰动(Napier 2005; Parry 和 Estelle 2006; Laskowski 2006)。

生长素受体是研究生长素信号传导链的最重要环节, 几十年来人们对它的研究始终未曾放松过, 但却经历了曲折而漫长的探索过程。在这个探索过程中, 大体上有两条线路。第一条路线是 ABP 的研究。ABP1 (auxin binding protein 1) 是最早进入人们视线的并认为是最可能的生长素受体候选者(Batt 等 1976)。经过了几十年来的无数实验证明, 取得了令人瞩目的成就, 尤其是近年来经过现代生物化学、分子生物学、反向遗传学技术的证明, 确证 ABP1 参与了生长素诱导的细胞伸长和细胞分裂等过程(Jones 和 Venis 1989; Chen 等 2001)。但仅就目前的证据将 ABP1 称为生长素的受体, 还为时尚早。第二条路线是蛋白质降解途径的研究。上世纪末期, 随着对生物体内泛素-蛋白酶体参与的蛋白质降解途径的深入了解, 人们发现生长素可以引起某些蛋白质降解从而激活有关基因的表达。但在 Dharmasiri (2005a)、Kepinski

和 Leyser (2005) 在《Nature》中的两篇文章发表之前对生长素如何启动有关蛋白降解的知之甚少。因此, 生长素受体 TIR1 的发现, 将整个生长素信号传递途径的大概脉络勾勒了出来, 人们终于走出了迷宫, 因此这一研究具有划时代的意义! 本文就生长素受体 TIR1 的发现与确证以及相关的信号传递过程作简要介绍。

1 生长素受体 TIR1

1997 年, Ruegger 等筛选到一种拟南芥突变体, 此种突变体具有抑制生长素运输的能力。从此种突变体中分离到 TIR1 基因, 其产物称之为运输抑制剂响应蛋白 1 (transport inhibitor response protein 1, TIR1)。但后来的研究发现它在生长素的转运中并不起作用(Ruegger 等 1998)。TIR1 是一个含有 F-box 的蛋白质, 已知 F-box 是一个蛋白质与另一个蛋白质结合的特征性结构域, 因此认为 TIR1 的作用可能是生长素信号转导中的一个成员。Gray 等(2001)发现 TIR1 可以直接和 Aux/IAA 蛋白结合并启动它的降解。在这之前, 人们早就注意到 Aux/IAA 蛋白是参与生长素诱导的生理反应

收稿 2006-04-04 修定 2006-06-05

资助 国家转基因植物研究与产业化专项基金(JY03-B-19-2) 和河南省杰出人才创新基金(022100090)。

*通讯作者(E-mail: xinjian@371.net, Tel: 0371-63554960)。

中特异的蛋白成分(Dharmasiri等2005a; Kepinski和Leyser 2005)。

2005年, Estelle和Leyser两个研究小组用了几乎同样的方法分别证明TIR1就是人们长期寻找而又一直未果的生长素受体(Dharmasiri等2005a; Kepinski和Leyser 2005)。

首先, 他们用常规的研究受体和配体的方法——放射性标记的方法证明 $[^3\text{H}]$ IAA结合于SCF^{TIR1}复合体(泛素连接酶3)上, 即生长素受体存在于SCF^{TIR1}复合体上, 并且还计算出其表观解离常数在 $20\sim 80\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间。在SCF^{TIR1}复合体与 $[^3\text{H}]$ IAA结合的同时他们又分别用IAA、1-NAA和2, 4-D与之竞争结合, 发现其 IC_{50} (抑制一半时所需的浓度)分别为 1.2×10^{-7} 、 1.3×10^{-6} 和 $1.4\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明此种复合物对内源的生长素IAA比人工合成的生长素的结合能力要高出一个数量级以上。

泛素连接酶3有很多, 主要分为两大类, 促进细胞后期分裂复合体(anaphase-promoting complex, APC)和SCF (Skp1-Cdc53/Cul1-F-box protein)。植物中的SCF^{TIR1}复合体包括CUL1、ASK1、RBX1和TIR1, 由于前3种蛋白质是SCF复合体所共有的, 且在植物和动物中都相当保守, 所以认为生长素可能直接和TIR1结合。为了证实此推测, 他们将源于拟南芥的TIR1基因在昆虫和非洲爪蟾胚胎中进行表达, 所获得的TIR1可以和 $[^3\text{H}]$ IAA反应, 其结合曲线符合受体与配体的结合特征。用pull down assay技术来证明TIR1和Aux/IAA蛋白的结合与生长素是否存在有关。pull-down assay是研究蛋白质互作的方法之一, 其基本方法是将诱饵蛋白(bait protein)基因对接上一个容易被纯化的特异蛋白质的基因, 如谷胱甘肽转移酶(GST), 融合蛋白可以用谷胱甘肽化的树脂纯化; 将猎物蛋白(preym protein)的基因对接上一个特异抗原的基因, 如Myc (鸟髓细胞瘤病毒, myelocytomatosis)基因, 其融合蛋白可以用抗Myc的抗体进行检测。这是一种集基因的融合与表达、亲和层析、免疫检测等多技术于一体的综合技术。IAA与TIR1结合后可以促进TIR1和Aux/IAA蛋白的结合, 并且在一定的IAA浓度范围内TIR1和Aux/IAA蛋白结合能力随着IAA浓度的提高而加大, 表明TIR1和Aux/IAA蛋白结合对生长

素是依赖的。二者的结合在加入生长素5 min后就发生, 20 min后二者的结合达到饱和(Yang 2004)。这种结合在 $4\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$ 范围内不发生变化。可见二者结合不随温度的变化而变化。由此可以猜测, 在这个结合过程中不涉及TIR1或Aux/IAA额外的酶介导的修饰。这种结合需要有生长素的持续存在。并且IAA7 (Aux/IAA的一种)提前用生长素处理与否均不影响它和TIR1之间的结合, 说明生长素是和TIR1结合而不是和Aux/IAA蛋白结合的, 即生长素的受体是TIR1而非Aux/IAA蛋白。N-末端缺失6~84个氨基酸残基后, TIR1就不能和生长素结合, 说明生长素的结合位点位于TIR1的N-末端。

虽然已经确定TIR1是生长素受体, 且又是F-box蛋白质家族中的一个成员, 那么F-box蛋白质家族中的其他成员是否也具有生长素受体的作用呢? 2005年Estelle小组的研究结果对此给出了确切的答案: 除了TIR1外, 另外3个蛋白——AFB1、AFB2和AFB3也具有受体的作用, 它们结合生长素后都可以和SCF结合成复合物, 从而导致Aux/IAA与之结合。这4个F-box蛋白质家族成员共同参与生长素调节的反应(Dharmasiri等2005b)。这一发现揭示了为什么突变体*tir1*对生长素反应和表型变化不大的原因。

从生长素到与生长素反应相关基因的表达的信号传导链随着生长素受体的发现而清晰地勾画出来(图1)。人们对这个信号传导链中的其他成员的认识早于对受体的认识, 所以人们在揭示这一信号途径的过程中不得不采用了“倒叙”的手法。而随着“主角”——受体的“粉墨登场”, 整个剧情就变得清楚起来。下面就这个信号转导链中所涉及的其他成员作一介绍。

2 Aux/IAA类蛋白质

1982年, Waker和Key在大豆胚轴中发现Aux/IAA蛋白质的mRNA (即*Aux28*和*Aux22*两个基因的mRNA)。Aux/IAA蛋白是高等植物中普遍存在的一类蛋白, 其分子量一般在 $20\sim 30\text{ kDa}$, 在拟南芥中有29个编码Aux/IAA蛋白质的基因(Liscum等2002)。Aux/IAA属于早期的生长素反应基因, 大部分基因的转录受生长素的上调。它们所编码的蛋白质半衰期一般很短, 如拟南芥的AXR2/

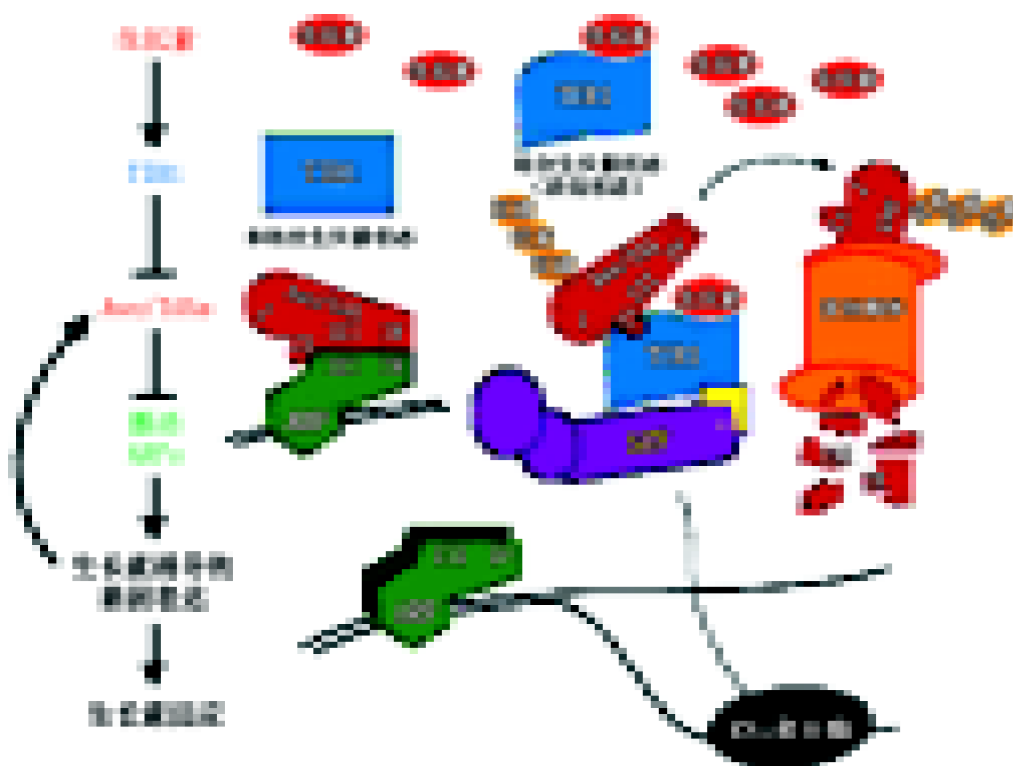


图1 TIR1介导的生长素信号传递途径
根据 Woodward 和 Bartel (2005) 结果重绘。

IAA7为6~8 min, 而AXR3/IAA17为80 min (Dreher 等 2006)。这类蛋白质含有4个保守的结构域, 即结构域 I~IV (Abel 等 1995)。其中结构域 II 是与 TIR1 结合的区域 (Gray 等 2001), 其核心模块是 GWPPV, 其点突变后, 受生长素活化的 TIR1 就不能与之结合 (图1和图2)。这和前期的工作相吻合, 过去已经证明此区域是决定该蛋白不稳定性的 (Ramos 等 2001)。结构域 III 和 IV 是与生长素响应因子 (auxin response factor, ARF) 相结合的部位。在没有生长素时 Aux/IAA 蛋白就通过这 2 个

部位与 ARF 结合, 使之处于受阻状态。当生长素信号在核中出现后, SCF^{TIR1} 复合体中的受体 TIR1 即与生长素结合而被活化, 从而和结合 ARF (染色体上) 的 Aux/IAA 蛋白结合, 使之从染色体上脱落下来, 形成 SCF^{TIR1}-Aux/IAA 复合体, 接下来复合体上的 Aux/IAA 蛋白被泛素化, 然后为蛋白酶体 (proteasome) 降解。脱离阻碍蛋白 Aux/IAA 的 ARF 成为活化的转录因子, 与之结合的基因即开始转录。

3 生长素响应因子 (ARF)

生长素响应因子是 Ulmasov 等 (1997) 发现的, 是指能与生长素早期反应基因启动子中的生长素应答元件 (AuxRE) TGTCTC 序列特异结合, 它可调节生长素反应基因表达的转录激活或抑制因子 (Guilfoyle 和 Hagen 2001)。Aux/IAA 蛋白和 ARF 结合后可抑制 ARF 诱导的基因转录。

目前, 已在拟南芥中发现了 23 个编码 ARF 的基因 (Liscum 和 Reed 2002), 其中 ARF23 可能是一个假基因, 在其 DNA 结合区有一个终止密码子, 因此它缺少 DNA 结合区的羧基端序列, 到目

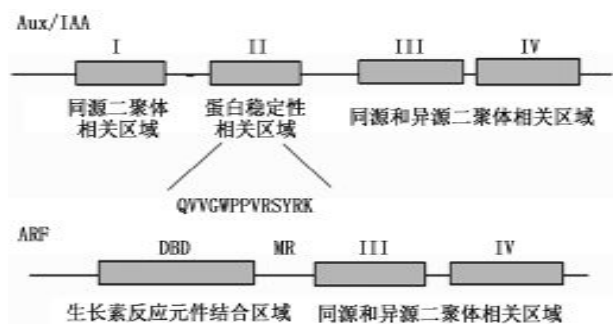


图2 Aux/IAA 和 ARF 的蛋白质结构

前为止还没有证据证明 *ARF23* 可以表达。

ARF 是一类新的转录因子, 其分子量在 70~130 kDa 之间, 有转录因子的典型结构(Tian等 2004): N-端有 DNA 结合区(DBD)、中间的转录激活区或称中央区(middle region, MR)和 C-末端的寡聚化区(图 2), 核定位信号(NLS)常位于 MR 内。在 DBD 区内, 它可与生长素响应基因启动子中的 TGTCTC 序列特异性结合。C-端的寡聚化区含有结构域 III 和 IV (因其与 Aux/IAA 蛋白中的结构域 III 和 IV 同源而得名), 可使 ARF 形成同源二聚体, 也可使 ARF 和 Aux/IAA 形成异源二聚体。在 DBD 与结构域 III 之间存在一个不同长度的非保守的 MR, 具有转录激活或抑制功能, 转录激活或抑制则取决于 MR 区域中的氨基酸组成: 富含谷氨酰胺时(如 ARF5、ARF6、ARF7 和 ARF8) (Ulmasov 等 1999) 起转录激活作用, 而富含其它氨基酸如脯氨酸和丝氨酸时, 就起转录抑制作用(Ulmasov 等 1997; Deshaies 1999), 生长素如何通过受体作用于这些起抑制作用的 ARF 尚未见报道。

4 泛素化后 Aux/IAA 蛋白受蛋白酶体的分解

人们早就注意到, 生长素诱导下 Aux/IAA 蛋白的泛素化(ubiquitination)和为蛋白酶体降解(图 1)。1993 年, Leyser 等在筛选对生长素反应不敏感的拟南芥突变体时克隆到了 AXR1 (AUXIN RESISTANT 1) 的基因。研究发现, 该基因所编码的不是生长素受体, 而是与泛素化的活化酶有关的蛋白质, 这一发现首次将生长素诱导的反应与泛素化的蛋白降解途径联系起来。

近年来, 对泛素化依赖的蛋白质降解途径(ubiquitin-dependent proteolytic pathway)已经成为生命科学研究中的热点, 2004 年的诺贝尔化学奖就是授予研究泛素化蛋白质降解途径的美国和以色列科学家的。生长素受体是泛素化酶 3 的一个成分, 它的发现就是泛素化蛋白质降解途径在代谢调节中起作用另一个范例。有关泛素化蛋白质降解途径已有不少综述, 因此本文中不再赘述。

5 结语

TIR1 作为生长素受体的发现和确证有里程碑性的意义, 但这并不意味着生长素的研究都已非常清楚, 以下几个问题可能是今后值得进一步探讨的。

(1) 生长素和 Aux/IAA 蛋白的关系问题。生长素一方面促进大部分的 Aux/IAA 基因的转录, 另一方面又直接结合并活化受体 TIR1, 从而导致 Aux/IAA 蛋白在泛素-蛋白酶体降解途径中的降解。这一矛盾现象如何解释, 是否由于生长素在分解 Aux/IAA 蛋白和活化 ARF, 从而导致生长素反应基因在表达的同时已经合成了备用的 Aux/IAA 蛋白, 以便在生长素降低后立即结合并钝化 ARF、关闭已经表达的基因呢? 如果是这样的话, 即可以用来解释受生长素诱导的反应需有生长素持续存在的原因。在同一个细胞中 Aux/IAA 蛋白的分解和 Aux/IAA 基因的表达并翻译这两个矛盾过程是如何得到巧妙统一的? 是通过时间、空间、运输和修饰将这两个过程隔离开, 还是另有是什么原因? 这些问题需进一步研究。

(2) F-box 类蛋白是否为植物细胞中仅有的生长素受体? 有些生长素反应非常快, 不可能在转录水平上实现, 这些反应主要是跨膜离子转运的变化, 可能由膜结合蛋白质行使这一功能。这种受体是否为 ABP1, 需要进一步探讨。

(3) F-box 蛋白作为生长素激素受体, 其发现也和其他发现一样, 引发了一系列问题。其中最重要的是生长素是怎样促进 TIR1-Aux/IAA 相互作用的。这里有两个可能, 一个可能是生长素与 TIR1 结合后引起有利于底物结合的构象变化; 另一可能则是生长素稳定 TIR1 和其底物之间的相互作用, 因此它可能是结合在 TIR1-Aux/IAA 界面上的。据此, 可以认为受体和效应物结合的分子机制可能将是今后这一问题研究中的热点问题。

(4) 在动植物中有许多 F-box 蛋白质。作为生长素受体, 这是首次发现 F-box 蛋白质可以受小分子配体调节。但到底有多少 F-box 蛋白质家族的成员可受小分子配体调节? F-box 与配体如何结合? 结合配体得到活化的受体在完成使命后又是如何和配体脱离而回到起始状态? 这些过程的分子机制也是值得深入研究的课题。

总之, F-box 蛋白作为生长素受体的发现和确证, 是植物学研究领域的一大盛事! 这一成果将对近期或将来的研究起不可估量的推动作用。

参考文献

Abel S, Nguyen MD, Theologis A (1995). The *PS-IAA4/5*-like

- family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol*, 251: 533~549
- Batt S, Wilkens MB, Venis MA (1976). Auxin binding to corn coleoptile membranes: kinetics and specificity. *Planta*, 130: 7~13
- Chen JG, Ullah H, Young JC, Sussman MR, Jones AM (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev*, 15: 902~911
- Deshaies RJ (1999). SCF and cullin/RING-H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 435~467
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 441~445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell*, 9: 109~119
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J (2006). The *Arabidopsis* Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell*, 18: 699~714
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001). Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414: 271~276
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2001). Auxin response factors. *J Plant Growth Regul*, 10: 281~291
- Jones AM, Venis MA (1989). Photoaffinity labeling of indole-3-acetic acid-binding proteins in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6153~6156
- Kepinski S, Leyser O (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 446~451
- Laskowski M (2006). Model of the TIR1 pathway for auxin-mediated gene expression. *Sci STKE*, 14: 1
- Leyser HM, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M (1993). *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, 364: 161~164
- Liscum E, Reed JW (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol*, 49: 387~400
- Napier RM (2005). TIRs of joy: new receptors for auxin. *BioEssays*, 27: 1213~1217
- Parry G, Estelle M (2006). Auxin receptors: a new role for F-box protein. *Cell Biol*, 18: 1~5
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O, Callis J (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell*, 13: 2349~2360
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev*, 12: 198~207
- Ruegger M, Dewey E, Hobbie L, Brown D, Bernasconi P, Turner J, Muday G, Estelle M (1997). Reduced NPA-binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell*, 9: 745~757
- Tian CE, Muto H, Higuchi K, Matamura T, Tatematsu K, Koshiba T, Yamamoto KT (2004). Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affects hypocotyls elongation and root growth habit, indicating that its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J*, 40: 333~343
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276: 1865~1868
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5844~5849
- Walker JC, Key JL (1982). Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly (A)⁺ RNAs of elongating soybean hypocotyl. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7185~7189
- Woodward AW, Bartel B (2005). A receptor for auxin. *Plant Cell*, 17: 2425~2429
- Yang X (2004). The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF^{TIR1}. *Plant J*, 40: 772~782