

## 专论与综述 Reviews

## 选择性剪接在植物逆境相关基因表达调控中的作用

曾纪晴 张明永\*

中国科学院华南植物园, 广州 510650

## The Role of Alternative Splicing in the Regulation of Plant Stress-associated Gene Expression

ZENG Ji-Qing, ZHANG Ming-Yong\*

South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

**提要** 文章介绍了选择性剪接在信号转导分子、转录因子、剪接因子和抗逆功能蛋白等4个层面对与植物逆境胁迫相关基因表达调控的影响, 以及植物逆境诱导的选择性剪接机制的研究进展。

**关键词** 选择性剪接; 逆境; 基因; 表达调控

真核生物的前体 mRNA (pre-mRNA) 往往要经过一个去除内含子并将外显子连接起来的剪接过程才能形成成熟 mRNA。pre-mRNA 的剪接有组成性剪接(constitutive splicing)和选择性剪接(alternative splicing, AS) 2种方式。选择性剪接是从同一个 pre-mRNA 选择性地不同的外显子连接起来产生多个不同的成熟 mRNA 的过程。因此, 从同一个基因经过转录后的选择性剪接就可以翻译形成许多结构和功能不同的蛋白质。可见, 选择性剪接是在转录后加工水平上进行基因表达调控的重要方式, 直接决定着蛋白质结构和功能的多样性。据估计, 约有 50% 的人类基因存在选择性剪接 (Carninci 等 2005), 其中约有 75% 都是编码与信号转导和基因调控相关的蛋白, 比如受体、信号转导和转录因子等 (Modrek 和 Lee 2002)。从选择性剪接涉及的基因系统分类来看, 选择性剪接多发生在免疫和神经等复杂系统, 这显然与脊椎动物需要适应复杂的外界环境有关。在拟南芥和水稻的基因组中有 10%~20% 的基因发生选择性剪接 (Iida 等 2004; Kikuchi 等 2003)。虽然高等植物基因组中选择性剪接发生的基因频率相对较低, 但绝大多数发生选择性剪接的拟南芥的基因编码的蛋白也都与调控功能有关 ([http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/altsplicing/splicing\\_variations.shtml](http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/altsplicing/splicing_variations.shtml))。自然界中生长的植物经常要遭受各种生物与非生物逆

境, 在长期的生命演化过程中逐渐进化形成了各种适应环境变化的能力。逆境条件下, 植物可以启动与逆境相关基因的表达调控网络而迅速对逆境做出反应。近年来, 越来越多的研究证实, 与植物抗逆相关的基因往往容易发生选择性剪接 (Kazan 2003; 表 1), 这显示植物可能通过与逆境胁迫相关基因的选择性剪接来调控抗逆基因的表达以适应逆境。研究表明, 许多与信号转导有关的蛋白激酶、转录因子和抗逆功能蛋白的基因都存在选择性剪接, 许多剪接因子如 SR 蛋白 (serine/arginine-rich protein) 自身也受选择性剪接的调控 (表 1)。因此, 选择性剪接至少可以在剪接因子、转录因子、信号转导分子和抗逆功能蛋白等 4 个层面调控植物抗逆基因的表达。

### 1 剪接因子的选择性剪接

pre-mRNA 的剪接是在剪接体中进行的。剪接体是由 4 个小分子核内糖体蛋白 (U1、U2、U4/U6、U5 snRNP) 和 50~100 种非 snRNP 剪接因子组成的大分子复合体。不同剪接因子之间的相互作用直接影响剪接体的组装, 从而调节选择性剪接

收稿 2006-08-18 修定 2006-11-30

资助 国家自然科学基金(30670169)、广东省自然科学基金(06026070)和广东省科技计划项目(2006A20101004)。

\*通讯作者 (E-mail: zhangmy@scib.ac.cn, Tel: 020-37252891)。

表1 植物中与逆境胁迫有关的选择性剪接基因

逆境	基因	功能	植物	参考文献
生物逆境	<i>Bs4</i>	R 蛋白	番茄	Ballvora等2001
	<i>L6</i>	R 蛋白	亚麻	Ayliffe等1999
	<i>M</i>	R 蛋白	亚麻	Anderson 等1997
	<i>M1a</i>	R 蛋白	大麦	Halterman 等2003
	<i>N</i>	R 蛋白	烟草	Dinesh-Kumar 和 Baker 2000
	<i>RPS4</i>	R 蛋白	拟南芥	Gassmann 等1999
	<i>RPP5</i>	R 蛋白	拟南芥	Parker 等1997
	<i>JAltr</i>	R 蛋白	大豆	Ferrier-Cana等2005
	<i>OsMAPK5</i>	M A P K	水稻	Xiong 和 Yang 2003
	<i>ANP1</i>	M A P K	拟南芥	Nishihama 等1997
盐胁迫	<i>SOS4</i>	pyridoxal激酶	拟南芥	Shi 等2002
	<i>OsIM</i>	交替氧化酶	水稻	Kong 等2003
	ATPase 亚基 A 基因	液泡ATPase 亚基 A	拟南芥	Magnotta 和 Gogarten 2002
	<i>OsMAPK5</i>	M A P K	水稻	Xiong 和 Yang 2003
热胁迫	<i>HSP22</i>	热击蛋白	玉米	Lund 等2001
	Rubisco活化酶基因	Rubisco活化酶	菠菜、拟南芥	Werneke 等1989
	<i>HI-5</i>	类胰岛素蛋白酶	硅藻	Kinoshita等2001
	<i>AtB'γ</i>	丝 / 苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2A	拟南芥	Haynes 等1999
	<i>SR1</i>	剪接因子	拟南芥	Lazar 和 Goodman 2000
低温胁迫	<i>SR1</i>	剪接因子	拟南芥	Iida等2004
	转化酶基因	转化酶或蔗糖合成酶	马铃薯	Bournay 等1996
	ATPase 亚基 A 基因	液泡ATPase 亚基 A	拟南芥	Magnotta 和 Gogarten 2002
	<i>LeAOX</i>	交替氧化酶	番茄	Fung 等2006
	<i>CLT</i>	低温响应蛋白	柑橘	Jia等2004
水分胁迫	<i>HvDRF1</i>	脱水响应因子	大麦	Xue和Loveridge 2004
	<i>OsMAPK5</i>	M A P K	水稻	Xiong 和 Yang 2003
伤害胁迫	<i>Prosys</i>	多肽信号分子系统素	番茄	Li 和 Howe 2001
	<i>OsMAPK5</i>	M A P K	水稻	Xiong 和 Yang 2003
重金属胁迫	<i>Bronze2</i>	谷胱甘肽-S-转移酶	玉米	Marrst和Walbot 1997
	<i>AtCUTA</i>	叶绿体铜结合蛋白	拟南芥	Burkhead 等2003
氧化胁迫	<i>OsFe-SOD</i>	超氧化物歧化酶	水稻	Feng 等2006
	<i>LeAOX</i>	交替氧化酶	番茄	Fung 等2006
	<i>OsIM</i>	交替氧化酶	水稻	Kong 等2003
	<i>chlAPX</i>	叶绿体抗坏血酸过氧化物酶	菠菜、烟草	Yoshimura 等2002
	<i>APX</i>	抗坏血酸过氧化物酶	南瓜	Mano 等1997
	光裂合酶基因	DNA 修复蛋白	水稻	Hirouchi 等2003
光照	<i>HPR</i>	羟基丙酮酸还原酶	南瓜	Mano 等1999
	<i>ZGT</i>	生物钟蛋白	烟草	Xu 和 Johnson 2001
	<i>AtGRP7</i>	RNA 结合蛋白	拟南芥	Staiger等2003

本表根据 Kazan (2003) 修改补充。

的方式。目前已知两类剪接因子对于调节选择性剪接起着非常重要的作用,一种是SR蛋白家族,另一种是核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)家族。SR蛋白家族是一组富含丝氨酸/精氨酸的蛋白家族,在多细胞生物中高度保守,其基本结构特征为N末端含有1个或2个RNA识别模序(RNA recognition motif, RRM),C末端富含变化长度的丝氨酸/精氨酸二肽结构域(arginine/serine-rich domain, RS)。SR蛋白的RRM能特异性地识别和连结pre-mRNA上的外显子剪接增强子(ESE)或内含子剪接增强子(ISE),而其C末端RS结构域则介导蛋白和蛋白的相互作用。hnRNP是一组由多种RNA结合蛋白组成的具有多种功能的多肽家族。其成员带有多种不同形式的RNA结合基序(RRM或KH结构域)和富含甘氨酸结构域。富含甘氨酸结构域可能参与蛋白-蛋白相互作用。大多数hnRNP都参与RNA的剪接,其中hnRNP A/B、hnRNP I、hnRNP K是非常重要的选择性剪接调控因子。SR蛋白和hnRNP蛋白之间存在拮抗作用,因此剪接因子的相对浓度就成为影响选择性剪接方式的因素。在生物体内,SR蛋白和hnRNP A/B蛋白的相对含量对于组织特异性和发育调节的选择性剪接模式起调控作用。通过转基因改变相互拮抗的剪接因子在细胞间的水平上也能够影响体内选择性剪接的方式(Lopato等1999; Isshiki等2006)。

剪接因子对选择性剪接的调控作用除了剪接因子的活性和浓度之外,剪接因子自身也通过选择性剪接产生具有不同作用的剪接异构体来调控选择性剪接的方式。比如,hnRNP I (polypyrimidine tract binding protein,PTB)自身就可通过选择性剪接产生3个剪接异构体PTB1、2、4,各自在选择性剪接中有不同的作用(Wollerton等2001)。SR蛋白自身的选择性剪接也是一个非常普遍的现象,比如人类的SR蛋白ASF (Ge等1991)、线虫的SRp20和SRp30b (Morrison等1997)、拟南芥atSRp30 (Lopato等1999)和SR1 (Lazar和Goodman 2000)、玉米的zmRSp31A和zmRS31B (Gupta等2005)以及水稻的RSZ36和SRp33b (Isshiki等2006)等都已发现存在选择性剪接,可产生多种具有不同功能的选择性剪接转录本,调

节体内许多基因的选择性剪接。另外一个值得注意的现象是,许多SR蛋白的选择性剪接受到逆境的调控,比如拟南芥SR1蛋白的选择性剪接受到高温(Lazar和Goodman 2000)和低温(Iida等2004)的调控。这暗示逆境可能通过调控某些SR蛋白的选择性剪接而影响一些抗逆基因的选择性剪接,这或许是植物适应逆境的一种机制。事实上,表达拟南芥SR-like剪接蛋白的转基因植株提高了抗盐胁迫的能力(Forment等2002)。这表明通过SR蛋白的基因工程提高植物的抗逆性是值得注意的新途径。

## 2 转录因子的选择性剪接

在植物对各种生物和非生物逆境响应中,逆境响应基因表达的转录调控是其中关键性的一部分。有研究表明,转录因子在逆境适应过程中调节逆境响应基因的表达具有重要的作用。在拟南芥中,已发现大量与植物逆境抗性相关的转录因子家族,依其不同的DNA结合区域可分为ERF/AP2类、bZIP/HD-ZIP类、Myb类、WRKY类以及一些锌指结构蛋白类。某些转录因子就像抗逆基因的“总开关”,其表达与激活可以诱导众多抗逆基因的表达(Vannini等2004)。转录因子的转基因研究表明,改变转录因子的基因表达,可以极大地影响植物对逆境的抗性。因此,转录因子本身的基因表达调控对植物逆境响应基因的表达起非常关键的作用。在人类和其他动物中的研究表明,为了更加有效地调节生长发育,转录因子常常受到选择性剪接的调控(Lopez 1995)。目前,已经发现许多植物的转录因子也存在选择性剪接(Magaraggia等1997; Xue和Loveridge 2004; Li等2006; Montag等1995)。植物中转录因子的选择性剪接可能具有多种作用,可以通过选择性剪接产生的错误剪接形式的mRNA对逆境诱导基因进行负调控(Xue和Loveridge 2004),也可以通过选择性剪接产生多个参与不同生理功能的剪接异构体(Magaraggia等1997; Li等2006)。

Xue和Loveridge (2004)发现,大麦的一个AP2/ERF超级家族,脱水响应因子1(HvDRF1)基因可以通过选择性剪接产生3个转录本,其中2个编码转录激活因子AP2蛋白,可以激活大麦中受ABA诱导的HVA1基因的启动子活性,而另1个

则是错误剪接异构体, 没有转录因子活性。这种选择性剪接模式在小麦的类似基因 *TaDRF1* 中也观察到。HvDRF1 激活 *HVA1* 在大麦叶片中表达的活性受 HvABI5 (一种 bZIP 转录因子)、ABA 或干旱诱导而显著增强。HvDRF1 在大麦的所有器官中都可以组成性表达, 但其 mRNA 绝大多数是没有活性的错误剪接形式。*TaDRF1* 基因在小麦中的表达很可能也与此种情形类似。这种错误剪接现象在其他植物转录因子中也观察到, 比如小麦的 *viviparous 1* (*TaVp1*) 基因 (McKibbin等2002) 和玉米的 *intensifier 1* (*ZmIn1*) 基因 (Burr等1996)。尽管 HvDRF1 错误剪接的生理学意义并不太清楚, 但它很可能提供了一个有效的机制来降低大麦在非逆境条件下 HvDRF1 在细胞中的活性。

Li 等 (2006) 发现, 拟南芥的 R2R3 类 MYB 基因——*AtMYB59* 和 *AtMYB48* 发生相似的选择性剪接。这 2 个基因都可通过选择性剪接产生 4 个不同的剪接转录本, 编码 MYB 相关蛋白或者 R2R3-MYB 蛋白。这 2 个基因在水稻中的同源基因也有类似的选择性剪接模式。半定量分析表明, *AtMYB59* 的一个剪接异构体的表达可受不同的植物激素和逆境调节。这些结果表明, 这种 R2R3 类 MYB 转录因子基因可能与多种生理功能有关, 并受转录水平上选择性剪接的调控。水稻 *Myb7* 基因也存在 2 个选择性剪接转录本, 一个是完全剪接形式, 而另一个则是未剪接形式 (Magaraggia 等 1997)。未剪接形式的转录本编码一个具有部分 Myb 结构域和一个亮氨酸拉链的 Mybleu 蛋白, 它没有标准的 DNA 结合区域、转录激活和核定位序列, 但它定位在细胞核里, 并能增强玉米亮氨酸拉链 Opaque2 的转录活性 (Locatelli 等 2000)。亮氨酸拉链可以介导某些种类的转录因子形成二聚体, 而 *myb* 因子又可与具有亮氨酸拉链的转录因子相互作用而激活转录。可见, *Myb7* 基因未剪接形式的转录本可能具有一种新的转录因子调控机制。

### 3 信号转导层面的选择性剪接

选择性剪接是通过激活不同类型和不同活性的剪接因子, 进而导致不同剪接方式的发生, 因此, 选择性剪接与信号转导密切相关 (van der Houven van Oordt 等 2000; Pelisch 等 2005)。植

物的逆境信号转导是一个非常复杂的过程, 涉及到许多蛋白激酶和其他信号分子之间的相互作用。近年来的研究发现, 与信号转导相关的许多蛋白激酶和其他信号分子都受到选择性剪接的调控。

**3.1 蛋白激酶** 蛋白激酶是一类可以使特定的蛋白质侧链中的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基磷酸化的酶, 蛋白质磷酸化可以控制酶的活性及其与其它分子的相互作用。在逆境条件下, 植物的某些蛋白激酶被激活, 经过磷酸化作用将逆境信号传递到细胞核, 进而调控抗逆基因的表达。为了更精确和更灵活地感受逆境信号并适应逆境, 植物的蛋白激酶可通过选择性剪接的机制产生多个异构体。

**3.1.1 剪接因子SR蛋白激酶** SR蛋白的磷酸化和去磷酸化循环在选择性剪接过程中扮演着关键性的角色 (Du 等 1998)。SR蛋白的磷酸化可影响它与其他蛋白相互作用的模式, 可以影响其进入细胞核内及在核内的分布, 还可以影响其募集到转录位点的过程, 因而SR蛋白的磷酸化对剪接体的装配、剪接位点的选择以及剪接效率可起调节作用。目前发现的SR蛋白激酶都具有 LAMMER 模体 (motif) 结构, 可以催化SR蛋白RS结构域的丝氨酸残基而使SR蛋白磷酸化 (Colwill 等 1996)。在动物中已经鉴定了SR蛋白激酶 (SR protein-specific kinase, SRPK) 和 Clk/Sty (Cdc-like dual specificity kinase) 2个SR蛋白激酶家族 (Colwill 等 1996)。此外, 在果蝇中也发现了 DOA (darkener of apricot) 激酶。有研究表明, 超表达 Clk/Sty 可以导致SR蛋白在亚细胞核的重新分布, 从而影响选择性剪接 (Colwill 等 1996), 可见 Clk/Sty 激酶可以直接调节SR剪接因子的活性和区位化作用。研究还发现, SR蛋白激酶也可以通过选择性剪接的机制产生多个异构体, 而每一个异构体都具有不同的专一性功能。一个最著名的例子是, 果蝇的 DOA 激酶能够通过选择性剪接产生不同的异构体, 从而决定果蝇的性别 (Du 等 1998)。可见, SR蛋白激酶不仅可以直接调节SR蛋白的活性和亚细胞核定位, 还可以通过自身的选择性剪接调控生长发育。目前, 植物中也发现了一些具有 LAMMER 模体的SR蛋白激酶, 比如拟南芥 Clk/Sty 类激酶

AFC2 (Bender和Fink 1994)和烟草PK12蛋白激酶(Sessa等1996)。由SR蛋白激酶的特性可知,它实际上成了信号转导与选择性剪接的界面:外界信号激活SR蛋白激酶,然后它通过磷酸化调节SR蛋白的活性和亚细胞核分布,进而改变选择性剪接模式。因此就不难理解,逆境可以诱导SR蛋白激酶基因的表达,激活SR蛋白激酶的活性,从而诱导抗逆基因的选择性剪接。

**3.1.2 促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)** 真核生物中的MAPK在将外源刺激信号转入胞内应答受体/感应器的下游的过程中起枢纽作用。在植物中,MAPK级联途径与不同的生物及非生物胁迫反应、激素反应、细胞分化和发育过程有关。MAPK级联信号途径由3个蛋白激酶家族组成:MAPK家族、MAPKK家族(磷酸化并活化MAPK)以及MAPKKK家族(磷酸化并活化MAPKK)。Nishihama等(1997)在拟南芥中发现一种类似烟草*NPK1*的基因*ANP1*,它是MAPKKK基因家族中的一员。*ANP1*基因可通过内含子的剪切和保留而产生2种不同的剪接异构体。对这2种选择性剪接异构体的cDNA(cANP1L和cANP1S)在酵母突变体细胞中进行超表达遗传分析的结果表明,cANP1S比cANP1L具有更强的MAPK活性。这显示*ANP1*基因的选择性剪接可能是产生活化状态的ANP1蛋白激酶的一种分子机制。此外,水稻中的一种逆境响应的MAPK基因*OsMAPK5*也有选择性剪接,此基因至少有2个选择性剪接异构体(Xiong和Yang 2003)。虽然其中一个剪接异构体没有自动磷酸化和MBP激酶的活性,但*OsMAPK5*基因的选择性剪接对该基因在逆境条件下的表达调控作用仍然不能忽视。

**3.1.3 钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)** CDPK在植物钙信号转导过程中有非常重要的作用。植物细胞在外界刺激下,细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度发生变化,变化的 $[Ca^{2+}]$ 激活CDPK,CDPK通过磷酸化作用将钙信号向下游转导和级联放大,从而调节植物的生长发育和对环境胁迫的响应。Nishiyama等(1999)从地钱中分离了一个与其他高等植物具有高度序列相似性的CDPK基因,他们发现该基因可以通过选择性剪接产生2个不同的转录本,其中一个转录本在雄性生殖器官中优

先积累,这显示地钱可能是通过选择性剪接产生2个CDPK异构体的比率来进行性别控制的。Snedden和Blumwald(2000)在番茄中分离和鉴定了二酰基甘油激酶(diacylglycerol kinase, DGK)的基因,该基因可以通过选择性剪接产生2个转录本(*LeCBDGK*和*LeDGK1*),*LeCBDGK*在3'端比*LeDGK1*多了一个编码钙调素(CaM)结合结构域的外显子。DGK可以催化二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)产生磷脂酸(phosphatidic acid, PA),PA是动物和植物中的信号分子(Munnik等1998; Topham和Prescott 1999),参与伤害、真菌激发子和激素诱导的响应。番茄的DGK基因通过选择性剪接可产生 $Ca^{2+}$ 敏感与 $Ca^{2+}$ 不敏感的2种DGK异构体形式,因而DGK基因遂具有了对 $Ca^{2+}$ 和磷酸化脂质信号响应的灵活性。另外,CaM结合的三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-trisphosphate,  $IP_3$ )受体也可以通过选择性剪接获得第2个CaM结合结构域(Lin等2000)。与番茄DGK类似,一种DAG结合蛋白dUNC13也可以通过选择性剪接产生协调 $Ca^{2+}$ 和脂质信号响应的剪接异构体,其中一个异构体含有CaM结合结构域(Xu等1998)。可见,由于CDPK在逆境响应中起作用,因此可以通过选择性剪接增加其在信号转导中的灵活性,这也可能是植物适应逆境的一个机制。

**3.2 其他信号转导分子的选择性剪接**除了上述蛋白激酶之外,还有许多其他的信号转导因子,多肽信号分子系统素(systemin)就是其中之一。系统素是第1个在植物中发现的多肽信号分子,它是一种胞间信号分子,由200个氨基酸的系统素前体(系统素原,prosystemin)加工而成的。有研究表明,系统素可放大茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号,而JA是关键的伤害诱导信号分子。系统素可在非常低的浓度下对植物产生作用,诱导植物防卫基因的表达。系统素和它的前体——系统素原被认为在植物系统性伤害响应信号途径中起作用。Li和Howe(2001)发现番茄中的2个系统素原转录本——*prosysA*和*prosysB*是由同一个基因经选择性剪接产生的。定量RT-PCR实验发现,在所有组织中的*prosysB*转录本大约都是*prosysA*的2倍,不受伤害或茉莉酸甲酯(MeJA)的影响,说明该系统素原基因的选择性剪接是组成性的。对这2

个系统素原 cDNA 进行超表达, 发现该系统素原的 2 个异构体在伤害响应信号途径中都有活性。尽管番茄系统素原基因发生选择性剪接的作用尚待进一步了解, 但可以设想, 作为伤害诱导信号转导途径中的信号分子, 系统素原基因的选择性剪接对于植物伤害诱导的防卫基因表达调控可能有作用。

#### 4 抗逆基因的选择性剪接

除了与抗逆基因表达有关的信号转导和调控分子存在选择性剪接之外, 某些抗逆基因本身也存在选择性剪接。值得注意的是, 这些抗逆基因的选择性剪接几乎都是在逆境条件下发生的, 或者说逆境诱导了抗逆基因的选择性剪接。

**4.1 植物抗病基因的选择性剪接** 植物的抗病基因 (*R* 基因) 编码植物抗病蛋白 (*R* 蛋白), 该蛋白可以识别病原菌无毒基因 (*avr*) 编码的激发子 (elicitor) 而引起过敏反应 (hypersensitive response, HR), 限制病原菌的扩散, 从而起到抗病的作用。植物体内由 *R* 基因介导的抗病机制称为植物天然免疫系统 (innate immune system)。植物 *R* 蛋白跟动物天然免疫系统的 TLR (Toll-like receptor) 具有类似的结构, 由 2 个结构功能域组成: 在 C 端存在一个 LRR (leucine-rich repeat) 结构域; 在 N 端存在一个核苷酸结合位点 (nucleotide-binding site, NBS)。在 NBS-LRR 这类 *R* 蛋白基本结构的 N 端还存在 2 类不同的结构域, 一类是与果蝇 Toll 和哺乳动物 interleukin-1 受体蛋白类似的结构域 TIR (Toll/interleukin-1 receptor), 另一类是 CC (coiled coil) 结构域。对 200 多万个已经克隆的人类 mRNA 进行分析的结果表明, TLR 的选择性剪接特别普遍 (Modrek 等 2001), 这表明选择性剪接异构体在复杂的动物免疫系统中很重要。近年来, 在植物中也发现了许多编码 Toll-like 植物 *R* 蛋白的抗病基因发生选择性剪接。比如, 烟草的 *N* 基因 (Dinesh-Kumar 和 Baker 2000)、拟南芥 *RPS4* 基因 (Gassmann 等 1999) 和 *RPP5* 基因 (Parker 等 1997)、亚麻的 *L6* 基因 (Ayliffe 等 1999) 和 *M* 基因 (Anderson 等 1997)、番茄 *Bs4* 基因 (Ballvora 等 2001) 都已发现存在选择性剪接。*N* 基因和 *RPS4* 基因研究的结果表明, 去除内含子的全长 cDNA 基因虽然在转基因植株中可以产生完整的包含 TIR-NBS-LRR 结

构的 *R* 蛋白, 但却没有抗病活性, 这说明 *R* 基因的选择性剪接是抗病基因的表达调控所必需的 (Jordan 等 2002)。有研究还表明, 某些 *R* 基因如 *N* 基因和 *Mla* 基因的选择性剪接是在病毒或细菌侵染之后才出现 (Dinesh-Kumar 和 Baker 2000; Halterman 等 2003)。可见, *R* 基因的选择性剪接并不是组成性的, 而是受病原菌侵染的诱导。最近, CC-NBS-LRR 类 *R* 基因如大麦 *Mla* 基因 (Halterman 等 2003) 和大豆的 *JAItr* 基因 (Ferrier-Cana 等 2005) 的选择性剪接也已发现。虽然 *R* 基因的选择性剪接异构体的功能还没有完全弄清楚, 但是可以设想, *R* 基因不同的选择性剪接异构体在植物的抗病性反应中可能起着不同的作用, 其对病原菌的识别和抗病信号转导也可能肩负着不可或缺的作用。

**4.2 非生物逆境相关基因的选择性剪接** 许多非生物逆境如盐胁迫、温度胁迫、水分胁迫、重金属和伤害等都可以诱导植物逆境相关基因的表达。目前已经发现, 许多与逆境相关的基因在逆境条件下, 通常可发生选择性剪接 (表 1)。比如, 与盐胁迫相关的拟南芥 *SOS4* (*salt overly sensitive 4*) 基因 (Shi 等 2002) 以及水稻 *OsIM* 基因 (Kong 等 2003) 编码的产物分别与调节  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  的动态平衡和清除活性氧有关, 它们都可发生选择性剪接产生 2 个转录本, 2 个转录本之间的含量比值受盐胁迫的调控。玉米线粒体 *HSP22* 基因 (Lund 等 2001)、菠菜和拟南芥的 Rubisco 活化酶基因 (Werneke 等 1989)、硅藻 *HI-5* 基因 (Kinoshita 等 2001) 以及拟南芥 *AtB'γ* 基因 (Haynes 等 1999) 在高温胁迫下都可以改变其选择性剪接模式。与低温响应有关的基因如柑橘 *CLT* 基因 (Jia 等 2004)、番茄 *LeAOX* 基因 (Fung 等 2006)、拟南芥 ATPase 亚基 A 基因 (Magnotta 和 Gogarten 2002) 和马铃薯转化酶基因 (Bournay 等 1996) 也都发现存在选择性剪接。某些与逆境信号转导有关的蛋白激酶 (水稻 *OsMAPK5* 基因, Xiong 和 Yang 2003)、抗逆相关基因的转录因子 (水稻 *Myb7* 基因, Magaraggia 等 1997; Locatelli 等 2000) 以及与逆境诱导的氧化胁迫有关的抗氧化酶 (水稻 *OsIM* 基因, Kong 等 2003; 番茄 *LeAOX* 基因, Fung 等 2006; 水稻 *OsFe-SOD* 基因, Feng 等 2006; 菠菜、烟草 *chlAPX* 基因,

Yoshimura 等2002; 南瓜 *APX* 基因, Mano 等1997; 玉米 *Bronze2* 基因, Marrs 和 Walbot 1997) 等基因可在多种不同逆境下发生选择性剪接。此外, 某些植物基因的选择性剪接还受光的调控 (Mano 等1999; Xu 和 Johnson 2001; Staiger 等2003)。

## 5 结语

植物不像动物那样可以移动以规避各种逆境的伤害, 它们通过长期的进化形成了各种灵活的适应复杂环境的机制, 选择性剪接就是植物适应逆境的此种机制之一。选择性剪接可以在信号转导分子、转录因子、剪接因子和抗逆功能蛋白等4个层面调控植物抗逆基因的表达。发生选择性剪接的4个层面并不是相互独立的, 相反, 它们是相互作用、相互影响的。当植物受到逆境胁迫时, 信号转导分子可以感受逆境信号, 继而激活

或影响转录因子与/或剪接因子, 与抗逆有关的转录因子被激活之后诱导抗逆基因的表达, 而剪接因子被激活或被影响之后则调控信号转导分子、转录因子、抗逆基因以及剪接因子自身的选择性剪接方式, 最后植物进入一种抵抗逆境的生理状态 (图1)。有研究表明, 逆境可以诱导许多基因发生选择性剪接 (表1)。逆境诱导选择性剪接的机制可能是逆境能够影响剪接因子的活性、剪接因子的浓度、剪接因子的亚细胞核定位, 从而影响剪接活性和剪接位点的改变。此外, 逆境能够影响RNA的转录以及mRNA的稳定性, 从而导致选择性剪接的发生。在逆境条件下, 选择性剪接既是逆境诱导的结果, 也是植物适应逆境的一种方式。迄今为止, 已发现许多与植物逆境相关的基因存在选择性剪接异构体, 但这些选择性剪接异构体的生理功能还不清楚, 有待进一步研究。

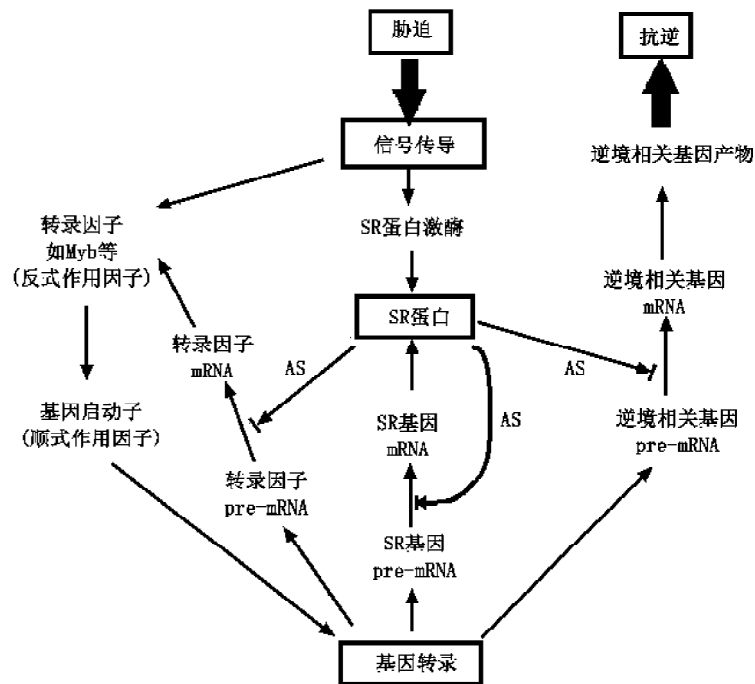


图1 逆境诱导的选择性剪接与逆境相关基因的表达调控网络

## 参考文献

Anderson PA, Lawrence GJ, Morrish BC, Ayliffe MA, Finnegan EJ, Ellis JG (1997). Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell*, 9 (4): 641~651  
Ayliffe MA, Frost DV, Finnegan EJ, Lawrence GJ, Anderson PA,

Ellis JG (1999). Analysis of alternative transcripts of the flax *L6* rust resistance gene. *Plant J*, 17 (3): 287~292  
Ballvora A, Pierre M, van den Ackerveken G, Schornack S, Rossier O, Ganai M, Lahaye T, Bonas U (2001). Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs1* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol Plant Microbe Interact*, 14 (5): 629~638

- Bender J, Fink GR (1994). AFC1, a LAMMER kinase from *Arabidopsis thaliana*, activates STE12-dependent processes in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 (25): 12105~12109
- Bournay AS, Hedley PE, Maddison A, Waugh R, Machray GC (1996). Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Res*, 24 (12): 2347~2351
- Burkhead JL, Abdel-Ghany SE, Morrill JM, Pilon-Smits EA, Pilon M (2003). The *Arabidopsis thaliana* CUTA gene encodes an evolutionarily conserved copper binding chloroplast protein. *Plant J*, 34 (6): 856~867
- Burr FA, Burr B, Scheffler BE, Blewitt M, Wienand U, Matz EC (1996). The maize repressor-like gene *intensifier1* shares homology with the *rl/bl* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell*, 8 (8): 1249~1259
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C et al (194 co-authors) (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309: 1559~1563
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI (1996). The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J*, 15 (2): 265~275
- Dinesh-Kumar SP, Baker BJ (2000). Alternatively spliced *N*resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (4): 1908~1913
- Du C, McGuffin ME, Dauwalder B, Rabinow L, Mattox W (1998). Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*. *Mol Cell*, 2 (6): 741~750
- Feng W, Hongbin W, Bing L, Jinfa W (2006). Cloning and characterization of a novel splicing isoform of the iron-superoxide dismutase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 24 (12): 734~742
- Ferrier-Cana E, Macadré C, Sévignac M, David P, Langin T, Geffroy V (2005). Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene *JAItr* of *Phaseolus vulgaris*. *Theor Appl Genet*, 110 (5): 895~905
- Forment J, Naranjo MA, Roldan M, Serrano R, Vicente O (2002). Expression of *Arabidopsis* SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J*, 30 (5): 511~519
- Fung RW, Wang CY, Smith DL, Gross KC, Tao Y, Tian M (2006). Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J Plant Physiol*, 163 (10): 1049~1060
- García-Sacristan A, Fernández-Nestosa MJ, Hernández P, Schwartzman JB, Krimer DB (2005). Protein kinase clk/STY is differentially regulated during erythroleukemia cell differentiation: a bias toward the skipped splice variant characterizes postcommitment stages. *Cell Res*, 15 (7): 495~503
- Gassmann W, Hinsch ME, Staskawicz BJ (1999). The *Arabidopsis* *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J*, 20 (3): 265~277
- Ge H, Zuo P, Manley JL (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell*, 66 (2): 373~382
- Gupta S, Wang BB, Stryker GA, Zanetti ME, Lal SK (2005). Two novel arginine/serine (SR) proteins in maize are differentially spliced and utilize non-canonical splice sites. *Biochim Biophys Acta*, 1728 (3): 105~114
- Halterman DA, Wei F, Wise RP (2003). Powdery mildew-induced *Mla* mRNAs are alternatively spliced and contain multiple upstream open reading frames. *Plant Physiol*, 131 (2): 558~567
- Haynes JG, Hartung AJ, Hendershot JD III, Passingham RS, Rundle SJ (1999). Molecular characterization of the B' regulatory subunit gene family of *Arabidopsis* protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem*, 260 (1): 127~136
- Hirouchi T, Nakajima S, Najrana T, Tanaka M, Matsunaga T, Hidema J, Teranishi M, Fujino T, Kumagai T, Yamamoto K (2003). A gene for a Class II DNA photolyase from *Oryza sativa*: cloning of the cDNA by dilution-amplification. *Mol Genet Genomics*, 269 (4): 508~516
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K (2004). Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 32: 5096~5103
- Isshiki M, Tsumoto A, Shimamoto K (2006). The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *Plant Cell*, 18 (1): 146~158
- Jia Y, del Rio HS, Robbins AL, Louzada ES (2004). Cloning and sequence analysis of a low temperature-induced gene from trifoliolate orange with unusual pre-mRNA processing. *Plant Cell Rep*, 23 (3): 159~166
- Jordan T, Schornack S, Lahaye T (2002). Alternative splicing of transcripts encoding Toll-like plant resistance proteins—what's the functional relevance to innate immunity? *Trends Plant Sci*, 7 (9): 392~398
- Kazan K (2003). Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci*, 8 (10): 468~471
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Kishimoto N, Yazaki J, Ishikawa M, Yamada H, Ooka H et al (2003).



- Collection, mapping, and annotation of over 28 000 cDNA clones from japonica rice. *Science*, 303: 376~379
- Kinoshita S, Kaneko G, Lee JH, Kikuchi K, Yamada H, Hara T, Itoh Y, Watabe S (2001). A novel heat stress-responsive gene in the marine diatom *Chaetoceros compressum* encoding two types of transcripts, a trypsin-like protease and its related protein, by alternative RNA splicing. *Eur J Biochem*, 268 (17): 4599~4609
- Kong J, Gong JM, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY (2003). A new AOX homologous gene *OsIMI* from rice (*Oryza sativa* L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress. *Theor Appl Genet*, 107 (2): 326~331
- Lazar G, Goodman HM (2000). The *Arabidopsis* splicing factor SRI is regulated by alternative splicing. *Plant Mol Biol*, 42 (4): 571~581
- Li J, Li X, Guo L, Lu F, Feng X, He K, Wei L, Chen Z, Qu LJ, Gu H (2006). A subgroup of *MYB* transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in *Arabidopsis* and rice. *J Exp Bot*, 57 (6): 1263~1273
- Li L, Howe GA (2001). Alternative splicing of prosystemin pre-mRNA produces two isoforms that are active as signals in the wound response pathway. *Plant Mol Biol*, 46 (4): 409~419
- Lin C, Widjaja J, Joseph SK (2000). The interaction of calmodulin with alternatively spliced isoforms of the type-I inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 275 (4): 2305~2311
- Locatelli F, Bracale M, Magaraggia F, Faoro F, Manzocchi LA, Coraggio I (2000). The product of the rice *myb7* unspliced mRNA dimerizes with the maize leucine zipper Opaque2 and stimulates its activity in a transient expression assay. *J Biol Chem*, 275 (23): 17619~17625
- Lopato S, Kalyna M, Dorner S, Kobayashi R, Krainer AR, Barta A (1999). atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev*, 13 (8): 987~1001
- Lopez AJ (1995). Developmental role of transcription factor isoforms generated by alternative splicing. *Dev Biol*, 172 (2): 396~411
- Lund AA, Rhoads DM, Lund AL, Cerny RL, Elthon TE (2001). *In vivo* modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J Biol Chem*, 276 (32): 29924~29929
- Magaraggia F, Solinas G, Valle G, Giovanazzo G, Coraggio I (1997). Maturation and translation mechanisms involved in the expression of a *myb* gene of rice. *Plant Mol Biol*, 35 (6): 1003~1008
- Magnotta SM, Gogarten JP (2002). Multi site polyadenylation and transcriptional response to stress of a vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase subunit A gene in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2: 3
- Mano S, Hayashi M, Nishimura M (1999). Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *Plant J*, 17 (3): 309~320
- Mano S, Yamaguchi K, Hayashi M, Nishimura M (1997). Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Lett*, 413 (1): 21~26
- Marrs KA, Walbot V (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutathione *S*-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol*, 113 (1): 93~102
- McKibbin RS, Wilkinson MD, Bailey PC, Flintham JE, Andrew LM, Lazzeri PA, Gale MD, Lenton JR, Holdsworth MJ (2002). Transcripts of *Vp-1* homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (15): 10203~10208
- Modrek B, Lee C (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet*, 30: 13~19
- Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C (2001). Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*, 29 (13): 2850~2859
- Montag K, Salamini F, Thompson RD (1995). *ZEMa*, a member of a novel group of MADS box genes, is alternatively spliced in maize endosperm. *Nucleic Acids Res*, 23 (12): 2168~2177
- Morrison M, Harris KS, Roth MB (1997). *smg* mutants affect the expression of alternatively spliced SR protein mRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (18): 9782~9785
- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998). Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1389: 222~272
- Nishihama R, Banno H, Kawahara E, Irie K, Machida Y (1997). Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J*, 12: 39~48
- Nishiyama R, Mizuno H, Okada S, Yamaguchi T, Takenaka M, Fukuzawa H, Ohyama K (1999). Two mRNA species encoding calcium-dependent protein kinases are differentially expressed in sexual organs of *Marchantia polymorpha* through alternative splicing. *Plant Cell Physiol*, 40 (2): 205~212
- Parker JE, Coleman MJ, Szabo V, Frost LN, Schmidt R, van der Biezen EA, Moores T, Dean C, Daniels MJ, Jones JD (1997). The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with *Nand L6*. *Plant Cell*, 9 (6): 879~894
- Pelisch F, Blaustein M, Kornbliht AR, Srebrow A (2005). Crosstalk between signaling pathways regulates alternative splicing: a novel role for JNK. *J Biol Chem*, 280 (27): 25461~25469
- Sessa G, Raz V, Savaldi S, Fluhr R (1996). PK12, a plant dual-specificity protein kinase of the LAMMER family, is regulated by the hormone ethylene. *Plant Cell*, 8 (12): 2223~2234
- Shi H, Xiong L, Stevenson B, Lu T, Zhu JK (2002). The *Arabidopsis*

- salt overly sensitive 4* mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. *Plant Cell*, 14 (3): 575~588
- Snedden WA, Blumwald E (2000). Alternative splicing of a novel diacylglycerol kinase in tomato leads to a calmodulin-binding isoform. *Plant J*, 24 (3): 317~326
- Staiger D, Zecca L, Kirk DAW, Apel K, Eckstein L (2003). The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J*, 33 (2): 361~371
- Topham MK, Prescott SM (1999). Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem*, 274 (17): 11447~11450
- van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, Cáceres JF (2000). The MKK<sub>3/6</sub>-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol*, 149 (2): 307~316
- Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I (2004). Overexpression of the rice *Osmby4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 37 (1): 115~127
- Werneke JM, Chatfield JM, Ogren WL (1989). Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1 (8): 815~825
- Wollerton MC, Gooding C, Robinson F, Brown EC, Jackson RJ, Smith CW (2001). Differential alternative splicing activity of isoforms of polypyrimidine tract binding protein (PTB). *RNA*, 7 (6): 819~832
- Xiong L, Yang Y (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 15 (3): 745~759
- Xu J, Johnson CH (2001). A clock- and light-regulated gene that links the circadian oscillator to *LHCb* gene expression. *Plant Cell*, 13: 1411~1425
- Xu XZ, Wes PD, Chen H, Li HS, Yu M, Morgan S, Liu Y, Montell C (1998). Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission. *J Biol Chem*, 273 (47): 31297~31307
- Xue GP, Loveridge CW (2004). HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant J*, 37 (3): 326~339
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2002). Identification of a *cis* element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *J Biol Chem*, 277 (43): 40623~40632