

拟南芥AtMSI1蛋白与组蛋白去乙酰化酶AtHDA6的相互作用分析

袁连玉¹, 梁国鲁², 杨松光³, 童华荣^{1,*}

¹西南大学食品科学学院, 重庆400715

²西南大学园艺园林学院, 重庆400715

³中国科学院华南植物园农业及资源植物研究中心, 广州510650

摘要: 表观遗传修饰是真核生物基因转录调控的重要方式, 在拟南芥生长发育过程中起着重要的作用。其中, PRC2 (Poly-comb Repressive Complex 2) 蛋白复合体和组蛋白脱乙酰化酶HDAC均为重要的表观遗传调控蛋白。本研究利用酵母双杂交系统证明了拟南芥PRC2蛋白复合体成员中的AtMSI1 (Multi-Copy Suppressor of IRA1) 蛋白和组蛋白脱乙酰化酶AtHDA6 (Histone Deacetylase 6) 蛋白间的相互作用, 且确定其作用位点为AtMSI1蛋白的N端(1~114 aa)和C端(404~424 aa)的非特异性位点与AtHDA6蛋白的HD保守结构域(27~332 aa)和N端非保守的结构域(1~26 aa)。本研究构建AtMSI1-YC和AtHDA6-YN融合蛋白表达载体, 共同转化拟南芥原生质体, 用双分子荧光互补(BiFC)技术验证了AtMSI1-YC和AtHDA6-YN蛋白间的相互作用, 并明确该相互作用的位点为细胞核。另外, pull-down试验再次证明了该相互作用的存在, 原核表达并纯化的AtMSI1-GST融合蛋白可以与AtHDA6-His重组蛋白发生体外结合。综上所述, 拟南芥AtMSI1与AtHDA6蛋白间存在相互作用, 且每个蛋白中均有2个特异性结合位点参与该相互作用。

关键词: 拟南芥; AtMSI1; AtHDA6; 相互作用蛋白

表观遗传修饰在植物基因组正确转录表达过程中起到重要的调控作用, 其修饰机制包括基因组DNA的甲基化、组蛋白修饰(包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化和糖基化等)、microRNA、基因组印记及其他染色质调控蛋白的修饰(如polycomb蛋白和核酸折叠蛋白等), 且这些修饰方式均在植物生长发育及逆境胁迫响应的过程中发挥重要的调控作用(Berr和Shen 2010; Ahmad等2010)。

组蛋白乙酰化修饰是植物体内重要的转录调控机制之一, 主要由组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶来调控完成。真核生物的组蛋白去乙酰化酶可分为3类: RPD3/HDA1 (reduced potassium dependency protein3)亚家族、SIR2 (silent information regulator protein2)亚家族和HD2 (Histone decetylase2)亚家族(Ma等2013; Hollender和Liu 2008)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 已经被鉴定的组蛋白去乙酰化酶HDACs共有18个, 12个RPD3/HDA1亚家族成员、4个HD2亚家族成员及2个SIR2亚家族成员(Hollender和Liu 2008; Alinsug等2009)。其中, 关于组蛋白去乙酰化酶AtHDA6的研究较多, 它属于拟南芥RPD3/HDA1亚家族, 该蛋白广泛参与拟南芥的开花、衰老和种子发育等生长发育及对冷、盐、ABA等逆境胁迫的响应过程的调控(To等2011b; Wu等2008; Kim等2012)。例如, AtHDA6蛋白可与

AtFLD蛋白相互作用, 共同调控植物的开花过程(Yu等2011); AtHDA6蛋白与AtHD2C蛋白共同调控拟南芥对ABA和NaCl等逆境胁迫的响应过程等(Luo等2012)。

PcG (Poly-comb group)蛋白是一类能通过染色质修饰调控靶基因的转录抑制子。从生化和功能上它可以分成2个主要的核心蛋白复合体PRC1 (polycomb repressive complex1)和PRC2 (polycomb repressive complex2)。其中, PRC2 (polycomb repressive complex2)蛋白复合体包含了4种核心蛋白: Zeste [E(z)]增强子、Zeste 12 (Suz12)抑制子、ESC (extra sex combs)蛋白和MSI1 (multi-copy suppressor of IRA1)蛋白。PRC2蛋白复合体具有H3K27me3甲基转移酶活性, 在植物的染色质甲基化修饰和基因沉默等多种生理过程中发挥重要的调控功能(Gleason和Kramer 2012; Linge等2017; De La Paz Sanchez等2015; Pien和Grossniklaus 2007)。MSI1蛋白是一类在真核生物中保守的组蛋白的结合蛋白, 包括面包酵母中的ScMSI1、果蝇中的p55、人

收稿 2017-07-14 修定 2017-12-29

资助 国家自然科学基金(31400583)和重庆市基础与前沿研究计划一般项目(cstc2014jcyjA80011)。

* 通讯作者(huart@swu.edu.cn)。

类的RbAp46/48、拟南芥AtMSI1-5和水稻(*Oryza sativa*) OsRBAP1-3等(Lee等2016; Berman和Enomoto 1997; Hennig等2003; Kenzior和Folk 1998)。这类蛋白均可直接或间接与组蛋白结合,例如在核小体组装前结合在H4组蛋白的螺旋,或结合于H3-H4二聚体或四聚体上,从而调控生物体分化和发育。其中,MSI1 (*multicopy suppressor of IRA1*)基因编码的蛋白都含有重复的色氨酸-天冬氨酸基序(WD基序)。拟南芥中含有与酵母和哺乳动物同源的MSI蛋白,共有5个成员AtMSI1~5,其中AtMSI1是一个WD-40蛋白,其C端含有5个连续的WD-40结构域,而N端则为1个CAF1C-H4结合结构域,介导其与组蛋白的结合,并参与染色质重建和核小体的组装。拟南芥*msi1*纯合突变体表现为种子发育障碍,其杂合体也仅有一半的种子正常发育;在AtMSI1基因功能被部分补偿的突变体中,虽然种子发育良好,但开花期明显延长,说明AtMSI1基因还与开花时间有关,*msi1*突变体和MSI1反义RNA植株都表现出开花时间延迟;反之,如果AtMSI1基因在拟南芥中超表达,则会使其开花时间提前(Kohle等2003)。而AtMSI4即FVE蛋白被认为是开花调控的自主途径中的一个关键成分;在*fve*突变中FLC染色质的乙酰化程度提高,植株开花被抑制(Kenzior和Folk 2015)。

组蛋白乙酰化修饰和其他染色质修饰调控之间并不是孤立存在的,是相互关联和影响的,本研究用在线软件预测AtMSI1蛋白与其它蛋白的相互作用关系时,发现AtMSI1蛋白和AtHDA6蛋白之间可能存在相互作用,但目前为止并没有具体的试验证据证明该相互作用关系的存在,所以本研究利用酵母双杂交、双分子荧光互补-BiFC和pull-down 3种试验方法探究拟南芥AtMSI1蛋白和AtHDA6蛋白间是否存在相互作用关系,并确定两种蛋白结构中参与相互作用的特异性结合位点。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)种子由中国科学院华南植物园植物表观遗传学实验室保存提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 、酵母菌AH109、*E. coli* BL21、pGADT7质粒、pGBKT7质粒、荧光互补表达载体pEarleyGate201-YN和pEarleyGate-201-YC

质粒、蛋白融合表达载体pGEX4T-3和pET25b质粒也均由中国科学院华南植物园植物表观遗传学实验室保存提供;PCR扩增所用Taq酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶均购于宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒及凝胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;X- α -gal、IPTG、YPD培养基、SD培养基、酵母提取物、蛋白胨和琼脂粉等购自Sigma公司;抗体购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组载体的构建

酵母双杂交试验用重组质粒的构建:设计酵母双杂交引物(表1)扩增拟南芥AtHDA6和AtMSI1基因全长及含不同结构域的基因片段,切胶回收PCR产物,并连接克隆载体pMD18-T,转化大肠杆菌DH5 α ,筛选获得阳性克隆。经测序确认后,提取重组质粒。将双酶切后的AtHDA6 (*EcoRI*和*XhoI*)和AtMSI1 (*BamHI*和*EcoRI*)基因及含不同结构域的基因片段分别连接到pGADT7-AD和pGBKT7-BD质粒中,构建含目的基因片段的重组载体,并用PCR和双酶切的方法进行鉴定。

双分子荧光互补(BiFC)试验和pull-down试验所需重组表达载体的构建:分别将PCR扩增并切胶回收后的AtHDA6和AtMSI1基因CDS全长序列与pEarleyGate201-YN、pEarleyGate201-YC、pGEX4T-3和pET25b载体进行(HDA6用*XhoI*和*SmaI*酶切,AtMSI1用*BamHI*和*SaI*酶切)双酶切,并将酶切后的目的基因和载体经T4 DNA连接酶于16 $^{\circ}$ C过夜连接,并转化*E. coli* DH5 α 。挑取阳性克隆,并摇菌提取质粒,分别进行PCR和酶切双重鉴定后送英潍捷基公司测序。测序正确的重组质粒用于BiFC双分子荧光互补试验和pull-down试验。

1.2.2 酵母双杂交系统验证蛋白间的互作

按照醋酸锂方法制备酵母AH109的感受态细胞,分别将4 μ g需要验证相互作用的2种重组质粒和3 μ L浓度为10 mg \cdot mL $^{-1}$ 的鲑鱼精DNA加入到2 mL的离心管中,混合后再加入200 μ L制备好的酵母感受态细胞,轻轻混匀;再加入1.2 mL PEG/LiAc,轻轻混匀,30 $^{\circ}$ C恒温水浴孵育30 min,诱导共转化酵母感受态细胞;30 $^{\circ}$ C恒温摇床震荡培养1 h后,将共转化后的酵母感受态细胞涂布于营养缺陷型固体平板培养基(SD/-Trp/-Leu)中,在30 $^{\circ}$ C恒温培养箱

表1 酵母双杂交所用引物列表

Table 1 List of primers used in the yeast two-hybrid experiment

引物名称	引物序列(5'→3')
AtMSI1-pBGKT7-L	CATGGAGGCCGAATTCATGGGGAAAAGACGAAGAGGAAATGC
AtMSI1-pBGKT7-R	GCAGGTCGACGGATCCCTAAGAAGCTTTTGATGGTTCTTCC
AtMSI1-pGADT7-L	ATGGAGGCCAGTGAATTCATGGGGAAAAGACGAAGAGGAAATGC
AtMSI1-pGADT7-R	GAGCTCGATGGATCCCCTAAGAAGCTTTTGATGGTTCTTCC
AtMSI1-1-L	GAATTCATGGGGAAAAGACGAAGAGGAA
AtMSI1-114-R	GGATCCCCTCCAGTTGCACAGCCAAAGC
AtMSI1-154-R	GGATCCCATCGAAAACATAGACCTCCG
AtMSI1-115-L	GAATTC AAGGTACAAATTATCCAGCAG
AtMSI1-403-R	GGATCCCCTGCCATATTTGGAGTATGT
AtMSI1-404-L	GAATTCATGGCTGAAAACATCTATCAT
AtMSI1-424-R	GGATCCCCTAAGAAGCTTTTGATGGT
AtHDA6-1-L	GAATTCATGGAGGCAGACGAAAGCGGC
AtHDA6-26-R	CTCGAGCCTCGTAGAAGTAACTGACTC
AtHDA6-27-L	GAATTCCTCGACGATCGGAGACTACTAC
AtHDA6-332-R	CTCGAGCAACAGCAACTGCAGTCTCATA
AtHDA6-333-L	GAATTCGGAGTAGAGCCGGACAACAAA
AtHDA6-471-R	CTCGAGCTTAAGACGATGGAGGATTCA

中培养3 d左右, 挑取酵母菌落于1 mL YPDA液体培养基中, 放于30°C的恒温摇床中, 待菌液摇菌到 $OD_{660}=0.8$ 后, 进行菌落PCR检测。PCR反应条件为94°C预变性5 min; 94°C变性30 s, 56°C退火45 s, 72°C延伸1 min, 35个循环; 72°C继续延伸10 min。吸取2 μ L阳性菌液及稀释10倍、100倍和1 000倍的菌液至营养缺陷型SD/-Trp/-Leu/-His固体平板中, 30°C恒温培养4 d左右后观察表型, 形成白色圆形菌落后进行x- α -gal染色。将滤纸铺于培养皿中, 取Z buffer/X-gal [1 mL Z缓冲液(16.1 g·L⁻¹ Na₂HPO₄、5.50 g·L⁻¹ NaH₂PO₄、0.246 g·L⁻¹ MgSO₄、0.75 g·L⁻¹ KCl)+2.7 μ L β -巯基乙醇+16.7 μ L X-gal]溶液将滤纸润湿, 用新滤纸影印菌落平板, 并投入液氮固定后迅速取出并铺于培养皿中的滤纸上, 有菌一面朝上, 铺时防止滤纸间产生气泡。盖上培养皿上盖, 置于30°C孵育5 h后观察出现蓝斑的情况。

1.2.3 双分子荧光互补(BiFc)验证蛋白的相互作用

原生质体的制备: 将拟南芥种子播种于土中(蛭石:泥炭土=1:2), 光照(光/暗周期为16 h/8 h)培养15 d左右。取1 g拟南芥叶片, 切成0.5 mm的细丝, 将切好的叶片移入含有10 mL酶解液的培养皿中, 23°C黑暗条件下震荡培养并酶解约3 h, 转速为50×g; 用100~200目筛子过滤酶解液并纯化, 得到高纯度且完整性好的拟南芥原生质体。原生质体的转

化采用PEG-Ca²⁺介导法, 将制备好的拟南芥原生质体加入200 μ L的MMG (4 mmol·L⁻¹ MES、0.4 mol·L⁻¹ 甘露醇、15 mmol·L⁻¹ MgCl₂)溶液至原生质体的终浓度约为2×10⁵个·mL⁻¹, 从中吸出100 μ L原生质体, 再分别加入10 μ g AtHDA6-YN和10 μ g AtMSI1-YC重组质粒, 轻轻混匀后加入110 μ L 30%的PEG-Ca²⁺ (1 g PEG4000、0.2 mmol·L⁻¹甘露醇和100 mmol·L⁻¹ CaCl₂)溶液混匀, 23°C弱光培养25 min后, 加入440 μ L的缓冲液W5 (2 mmol·L⁻¹ MES、125 mmol·L⁻¹ CaCl₂、5 mmol·L⁻¹ KCl、154 mmol·L⁻¹ NaCl和5 mmol·L⁻¹葡萄糖)终止反应, 100×g离心2 min, 吸取上清, 加入300 μ L缓冲液W5, 23°C过夜培养后在共聚焦显微镜下观察荧光结果。

1.2.4 重组蛋白纯化及pull-down试验

将构建的AtMSI1-pGEX4T-3和AtHDA6-pET25b重组质粒转化大肠杆菌BL21菌株, 挑取单个阳性克隆到5 mL新鲜LB培养液(含100 μ g·mL⁻¹ Amp)中, 于37°C恒温培养箱中过夜培养(转速300×g); 第2天按照1:100比例转接原始菌液到新LB液体培养基中, 振荡培养(37°C, 300×g)至 $OD_{600}=0.6\sim 0.8$, 加入1 mmol·L⁻¹ IPTG, 25°C诱导培养8 h, 离心10 min (4°C, 6 000×g), 弃上清, 收集菌体, 用预冷的PBS重悬菌体, 并于冰上超声波破碎(开9 s, 停9 s, 30 min)至裂解液变清, 11 000×g离心上清,

并用0.45 μm 过滤头将获得的上清进行过滤, 放于 -80°C 保存备用。 4°C 条件下, 将1 mL填料加入纯化柱, 并用5倍体积的 $1\times\text{PBS}$ 平衡柱子2次后, 将过滤后的蛋白样品上样, 样品过柱后, GST重组蛋白的纯化过程中用5 mL PBS洗3遍后, 用还原性谷胱甘肽洗脱GST特异性重组蛋白; His重组蛋白的纯化过程中用洗脱缓冲液($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ 和 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ imidazole}$)洗脱带有His标签的AtHDA6特异性重组蛋白。

分别取80 μL AtMSI1-GST和90 μL AtHDA6-His纯化后的融合蛋白于2 mL圆底EP管中, 加入1 mL结合缓冲液($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-Cl}$, pH 7.5, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$, 0.25% Triton-x100, $35\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\beta$ -巯基乙醇)混合, 将混合样品在 4°C 层析柜中旋转结合2 h后, 再加入20~30 μL GST-BindTM Resin再旋转结合2 h。将旋转结合后的样品离心2 min (4°C , $100\times g$), 弃上清; 加入1 mL结合缓冲液, 4°C 旋转混匀5~10 min; 离心2 min (4°C , $100\times g$), 弃上清; 用1 mL结合缓冲液清洗5~6次后加入适量蛋白上样缓冲液, 煮沸5~10 min, 离心5 min, SDS-PAGE电泳 (350 mA 恒流, 电转2 h左右)后转PVDF膜; 取出膜后用5%脱脂奶粉预杂交1 h, 一抗杂交1 h, 进行3次洗膜, 每次10 min; 再进行二抗杂交1 h, 进行3次洗膜, 每次10 min; 用1 mL发光液A+1 mL发光液B浸

润PVDF膜, 然后固定, 显影液显影1 min, 水洗, 定影1 min, 扫描杂交胶片结果。

2 实验结果

2.1 利用生物信息学方法预测AtMSI1与AtHDA6蛋白间的相互作用

利用在线软件及数据库分析并筛选与AtMSI1蛋白相互作用的蛋白(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl)。结果如图1所示, AtMSI1蛋白与组蛋白去乙酰化酶AtHDA6和AtHDA19蛋白均存在可能的相互作用关系。AtMSI1蛋白与AtHDA19蛋白间的相互作用已经被试验证实并报道(Mehdi等2016)。本研究将对AtMSI1蛋白与AtHDA6蛋白间的相互作用关系进行了验证。

2.2 酵母双杂交试验方法验证AtMSI1蛋白与AtHDA6蛋白间的相互作用

为了验证生物信息学分析获得的蛋白相互作用的结果, 本文首先采用酵母双杂交的方法验证AtMSI1与AtHDA6蛋白间的相互作用。我们将编码AtMSI1和AtHDA6蛋白的基因全长CDS序列分别连接到pGADT7和pGBKT7酵母表达质粒上, 获得重组质粒后转化酵母菌AH109菌株, 然后将阳性克隆转移到SD/-Leu/-Trp/-His培养基上进行筛选, 并进行了 β -Galactosidas活性检测分析。

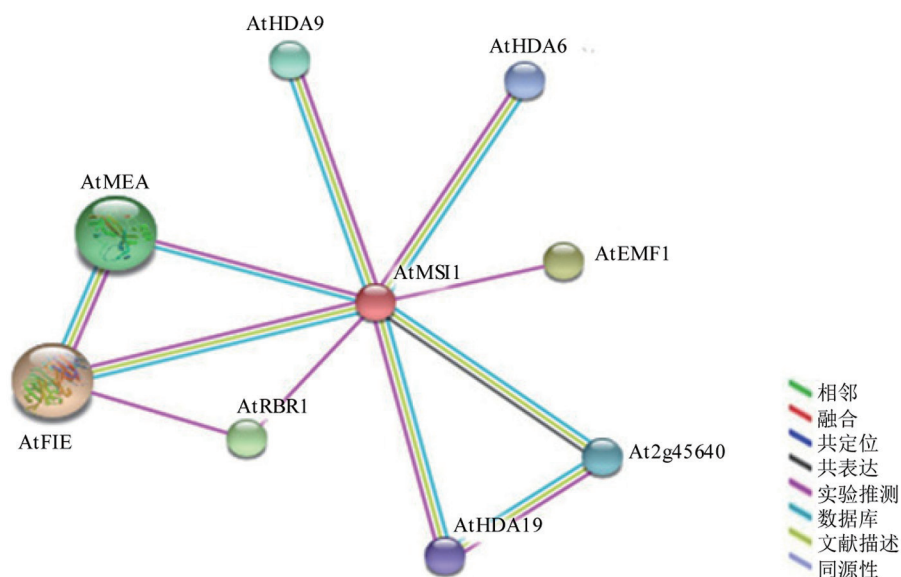


图1 AtMSI1相互作用的蛋白的预测

Fig.1 Predicted interacting proteins of AtMSI1 protein

如图2所示, 将转化并正确表达AtHDA6-AD (AtHDA6-pGADT7-AD)和AtMSI1-BD (AtMSI1-pGBKT7-BD)重组质粒与AtHDA6-BD (AtHDA6-pGBKT7-BD)和AtMSI1-AD (AtMSI1-pGADT7-AD)重组质粒的酵母菌AH109菌株在SD/-Leu/-Trp/-His培养基上培养, 可以正常生长, 并且X- α -gal染色后显示蓝色, 以上试验结果表明, 在酵母菌株中, AtMSI1蛋白能够与AtHDA6蛋白相互作用。

2.3 双分子荧光互补(BiFC)试验方法验证AtMSI1与AtHDA6蛋白间的相互作用

本文采用双分子荧光互补(BiFC)的方法验证酵母双杂交试验证实的AtHDA6与AtMSI1蛋白间相互作用的结果。分别将*AtHDA6*和*AtMSI1*基因的

的全长CDS通过Gateway技术分别重组到pEarleyGate201载体(该载体含有YFP的N端174个氨基酸-YN)和pEarleyGate202载体(该载体含有C端66个氨基酸-YC)上, 形成AtHDA6-YN和AtMSI1-YC重组质粒。同时将构建的两个重组质粒共同转化拟南芥原生质体, 利用激光共聚焦显微镜观测YFP荧光信号。如图3所示, 在拟南芥原生质体中, AtMSI1蛋白可与AtHDA6蛋白相互作用并发出黄色的荧光, 并且发出黄色荧光的位置与核定位信号mCherry显示的蓝色荧光是完全吻合的, 这说明AtMSI1蛋白与AtHDA6蛋白间是存在相互作用关系的, 且相互作用发生在拟南芥原生质体的细胞核内。

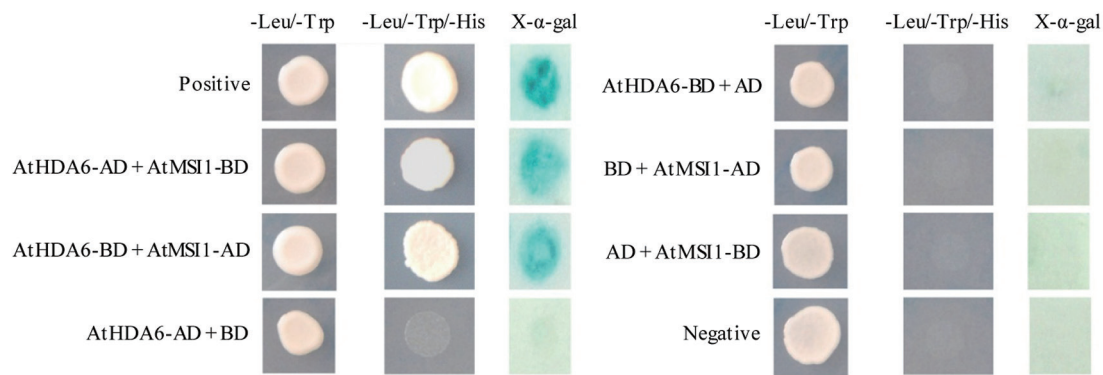


图2 AtHDA6蛋白与AtMSI1蛋白在酵母中的相互作用分析

Fig.2 Analysis of interaction between AtHDA6 and AtMSI1 in yeast cells

Positive: 正对照共转AtHDA6-AD和AtHD2C-BD重组质粒的酵母菌株AH109; Negative: 负对照共转pGADT7-AD和pGBKT7-BD空质粒的酵母菌株AH109。

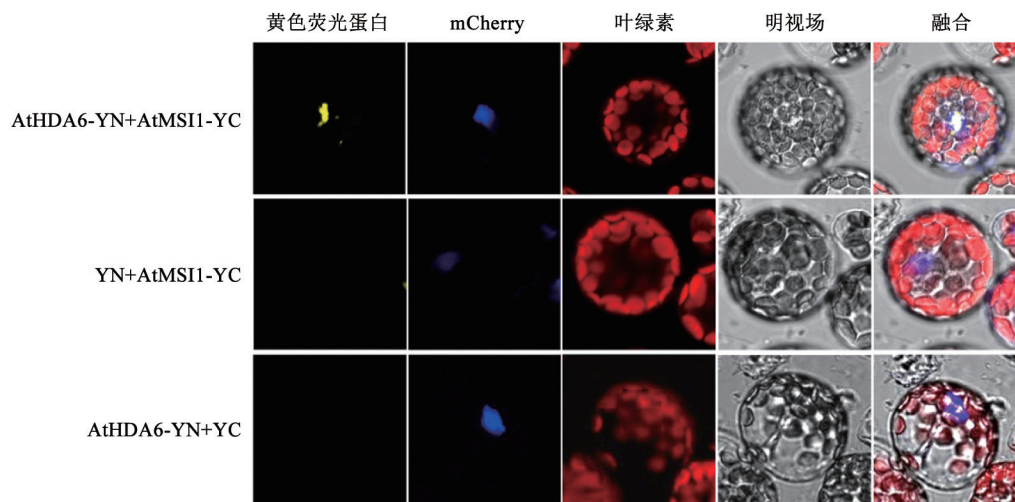


图3 AtHDA6蛋白和AtMSI1蛋白在拟南芥原生质体中的相互作用分析

Fig.3 Analysis of interaction between AtHDA6 and AtMSI1 in *A. thaliana* protoplasts

2.4 Pull-down试验方法验证AtMSI1与AtHDA6蛋白间的相互作用

为了进一步验证AtMSI1与AtHDA6这两种蛋白间的相互作用, 本研究还通过构建用于蛋白体外表达的AtMSI1-pGEX4T-3 (MSI1-GST)和AtHDA6-pET25b (HDA6-His)重组载体, 并将其转入大肠杆菌BL21菌株, 诱导并纯化2种融合蛋白。将纯化后的AtHDA6-His融合蛋白和AtMSI1-GST融合蛋白共同孵育后, 通过GST蛋白特异性吸附的磁珠吸附蛋白复合体, 然后用His蛋白特异性结合抗体做western杂交检测。结果如图4所示, AtHDA6-His融合表达蛋白可以被AtMSI1-GST融合蛋白结合, 并在western杂交检测结果中呈现出正确大小的蛋白质条带。此结果进一步表明, 在体外, 拟南芥AtMSI1蛋白是可以直接与AtHDA6蛋白发生相互作用的。

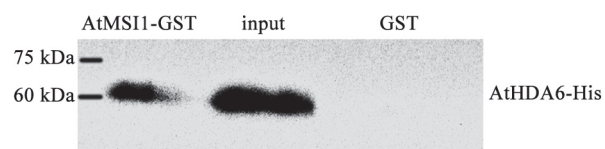


图4 GST-Pull-down试验验证AtHDA6蛋白和AtMSI1蛋白的相互作用

Fig.4 GST-Pull-down verifies the interaction between AtHDA6 and AtMSI1

AtMSI1-GST: AtMSI1-GST蛋白与AtHDA6-His蛋白结合后的杂交条带; input: 纯化后的AtHDA6-His蛋白直接杂交条带; GST: 空载体表达的GST蛋白与AtHDA6-His蛋白结合后的杂交条带; AtHDA6-His: 所用抗体是杂交His标签的抗体。

2.5 蛋白相互作用的特异性位点的确定

为了进一步明确AtMSI1蛋白与AtHDA6蛋白相互作用的机制, 本文利用在线分析软件(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl)对AtMSI1蛋白的氨基酸序列及其特异性结构进行分析。如图5所示, AtMSI1蛋白中包含6个保守性WD基序的重复结构域(115~403 aa)及N端(1~114 aa)和C端(404~424 aa)的非保守性结构域。

分别构建不含WD基序的N端(AtMSI1-1-114-aa-pGBKT7)、含有一个WD基序的N端(AtMSI1-1-154-aa-pGBKT7)、只含有6个重复WD基序的(AtMSI1-115-403-aa-pGBKT7)结构域及非保守性结构域的C端(AtMSI1-404-424-aa-pGBKT7)的4个重组质粒, 并将它们分别于与AtHDA6-pGADT7重组质粒共同转化酵母菌株。结果如图6所示, 与预测结果不同, AtMSI1蛋白中保守性的WD重复基序并不是与AtHDA6蛋白相互作用的位点, 而不含有WD结构域的非保守性的N端(AtMSI1-1-114-aa)特异性结构域和C端(AtMSI1-404-424-aa)非保守性的尾巴区域存在与AtHDA6蛋白相互作用的特异性位点。

同样, 本研究对AtHDA6蛋白也进行了不同功能结构域分析。如图7所示, AtHDA6蛋白中含有HD保守性结构域, 该结构域是拟南芥组蛋白脱乙酰化酶RPD3亚家族成员均具有的去乙酰化酶活性功能区域。另外AtHDA6蛋白还含有N端和C端非保守性的特异序列。分别克隆不同结构域的基因序列, 将其与pGADT7质粒连接, 并分别将获得的

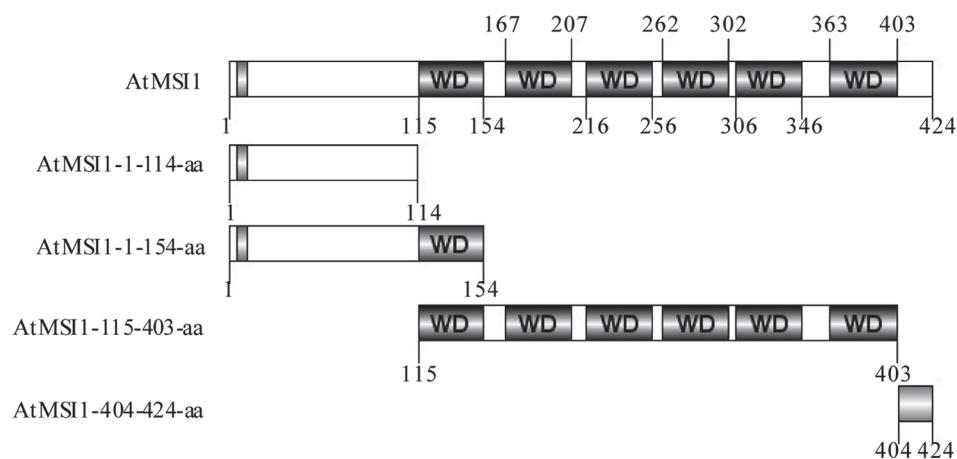


图5 AtMSI1蛋白结构域和重复序列等特征序列分析

Fig.5 Predicted domains, repeats, motifs and features of the AtMSI1 protein

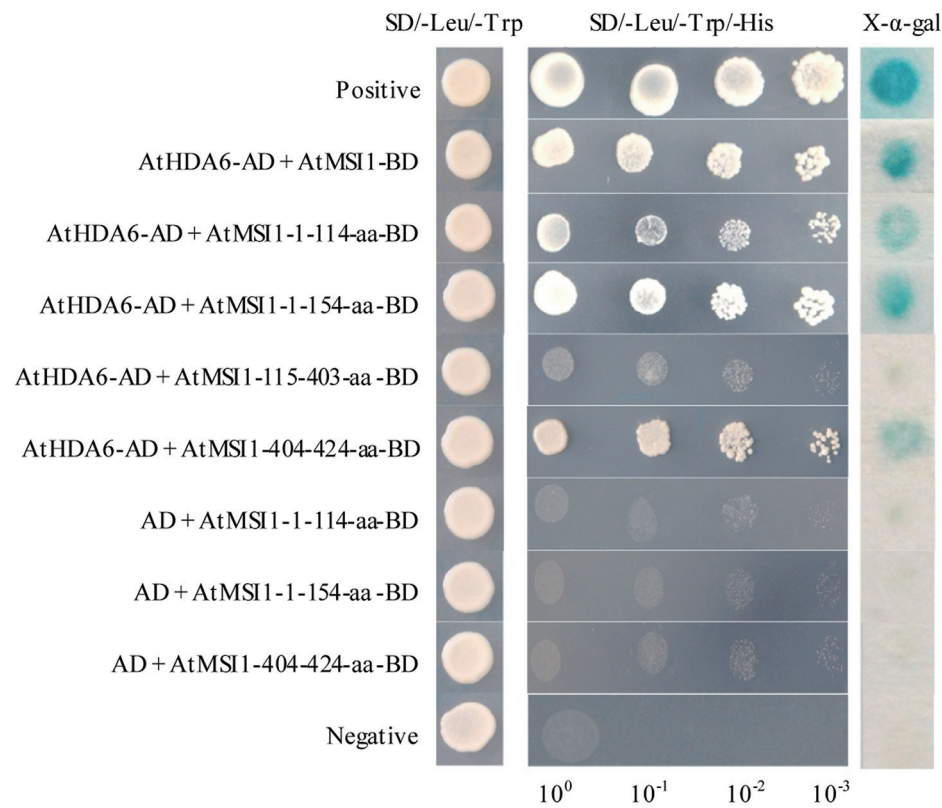


图6 AtMSI1蛋白不同功能结构域与AtHDA6蛋白的相互作用分析
Fig.6 Analysis of the functional domains of AtMSI1 interact with AtHDA6

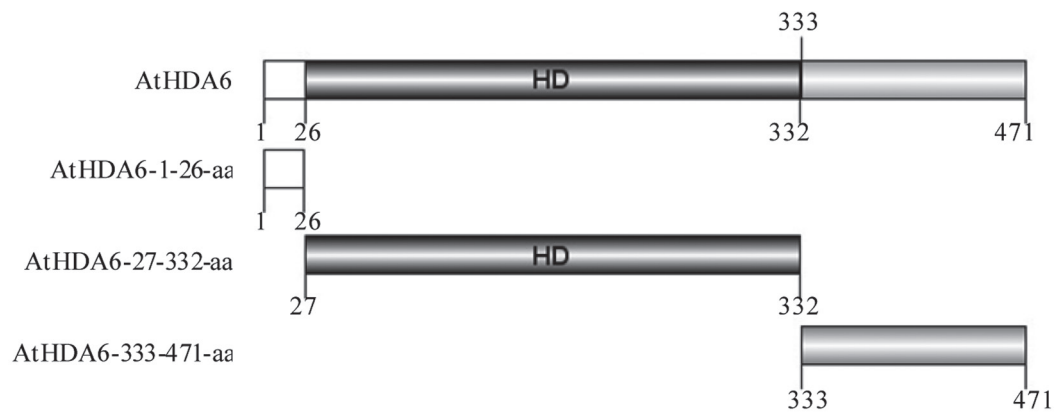


图7 AtHDA6蛋白的功能结构域分析
Fig.7 The analysis of functional domains of AtHDA6 protein

阳性重组质粒与AtMSI1-pGBKT7重组质粒共同转化酵母AH109菌株。如图8所示, 含AtHDA6蛋白HD结构域的重组质粒与AtMSI1蛋白重组质粒共转的酵母菌能够在SD/-Leu/-Trp/-His培养基上正常生长, 且阳性菌落X-α-gal染色显示为蓝色。另外, AtHDA6-1-26-aa结构域也能够与AtMSI1蛋白相互

作用。以上结果表明: AtHDA6蛋白的HD结构域和N端非保守性结构域(AtHDA6-1-26-aa)均含有能够与AtMSI1蛋白结合的关键位点。

3 讨论

表观遗传现象是指基因表达发生改变但不涉

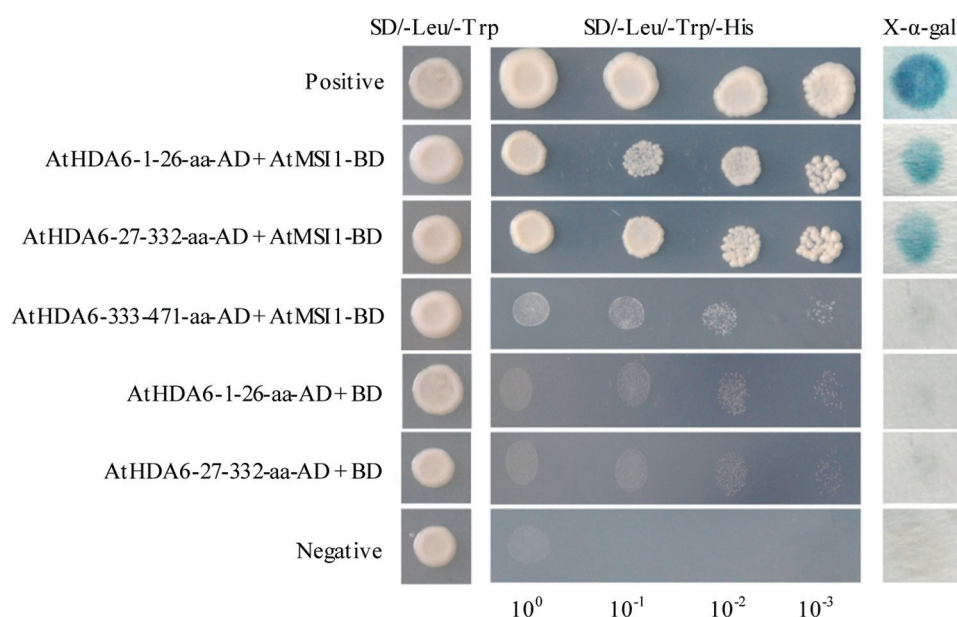


图8 AtHDA6不同功能结构域与AtMSI1蛋白的相互作用分析

Fig.8 Analysis of the functional domains of AtHDA6 protein interact with AtMSI1 protein

及DNA序列的变化, 并可在生物生长发育和细胞增殖过程中稳定传递的遗传现象, 主要包括DNA甲基化、组蛋白共价修饰、染色质重塑、基因沉默和RNA编辑等调控机制(Ahmad等2010)。其中, 组蛋白去乙酰化修饰和染色质修饰因子均为其中非常重要的表观遗传修饰方式, 且在组蛋白修饰过程中有着紧密的协助关系。

组蛋白乙酰化修饰主要由组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶来修饰调控, 且组蛋白乙酰化修饰调控与其它染色质修饰调控途径相互关联, 协同参与对植物生长发育过程的精确调控, 拟南芥中各种组蛋白修饰酶之间也存在复杂的相互作用关系。其中, 拟南芥组蛋白去乙酰化酶AtHDA6可与多种转录后修饰蛋白相互作用, 如AtHDA6蛋白可通过与组蛋白去乙酰化酶AtHD2C相互作用来改变目标基因的乙酰化修饰水平, 进而影响拟南芥对非生物逆境胁迫响应相关基因的表达(Luo等2012); AtHDA6蛋白也可与组蛋白去甲基化酶AtFLD蛋白相互作用, 共同参与调控拟南芥的开花过程(Yu等2011)。AtHDA6蛋白还可直接与DNA甲基转移酶AtMET1相互作用来改变组蛋白的乙酰化和DNA甲基化修饰水平, 进而调节转录因子的沉默表达(To等2011a)。在哺乳动物细胞中, HDAC-Rb-hSWI/SNF和Rb-hSWI/SNF蛋白复合体

可以调控细胞周期从G1期到S期的转变; 拟南芥中SNF2蛋白BRM可与AtSWI3C蛋白相互作用共同调控拟南芥对ABA逆境胁迫的响应过程(Zhang等2000; Han等2012)。Mad-Max通过调节Sin3-HDAC共抑制蛋白复合体来改变染色质状态从而抑制基因的转录表达(Laherty等1997; Probst等2004; Zhang等1999)。以上结果均表明, 组蛋白乙酰化修饰和其他染色质修饰方式之间存在相互协助的网状关系。

在酵母中, MSI1蛋白是组蛋白去乙酰化酶RPD3蛋白发挥转录抑制功能的必要伴侣分子(Kennedy等2001)。在拟南芥中也存在类似现象, 例如AtMSI4和AtMSI5分别可以与AtHDA5和AtHDA6相互作用, 共同调控FLC蛋白的乙酰化水平, 影响其基因的表达水平(Ausin等2004; Luo等2015); AtMSI1蛋白可与组蛋白去乙酰化酶AtHDA19相互作用, 共同参与拟南芥对ABA等逆境胁迫的响应调控过程(Mehdi等2016)。本研究发现AtMSI1蛋白还可与组蛋白去乙酰化酶家族中的其他成员-AtHDA6蛋白相互作用, 且该蛋白相互作用的特异性结合位点不止一个, AtMSI1蛋白中不含有WD重复结构域的N端(AtMSI1-1-114-aa)和C端(AtMSI1-404-424-aa)非保守性的尾巴区域均为参与与AtHDA6蛋白相互作用的结合位点; AtHDA6

蛋白中的HD保守结构域和N端非保守结构域 (AtHDA6-1-26-aa和AtHDA6-27-322-aa)是与AtMSI1蛋白相互作用的特异性位点。

表观遗传修饰参与植物的多种生长发育过程的调控,其中也包括植物开花和逆境响应过程,且不同表观遗传修饰方式内部的关联调控网络也是错综复杂的。目前的研究结果表明,表观遗传修饰过程及方式贯穿于植物开花各个通路中,影响开花基因的表达,调控植物的花期。例如,胞嘧啶类似物(5-azaC)使DNA甲基化水平降低从而进一步改变非编码RNA的表达,用5-azaC处理茄属植物使其基因组甲基化水平降低的同时,miR172的表达量上调,可导致FLC基因的表达量降低,进而促进开花(Marfil等2012)。PcG蛋白家族的作用广泛复杂,可以与乙酰化修饰酶、泛素化修饰酶和甲基化修饰酶等多种组蛋白修饰酶相互作用,形成一个复杂的基因调控网络结构(Mozgova和Hennig 2015)。其中,AtMSI1作为PRC2蛋白复合体的核心蛋白之一,可参与开花途径中的关键基因*SOCI*和*FLC*的甲基化修饰及表达水平的调控。AtHDA6蛋白同样也可以通过调控*FLD*等开花相关基因的表达来参与拟南芥的开花过程的调控,所以结合目前已经发表的研究结果,本文推测AtMSI1蛋白与AtHDA6的蛋白相互作用,在细胞核内形成蛋白复合体会共同影响*FLD*和*SOCI*等开花相关基因的表达,通过改变拟南芥花发育及花期相关基因的甲基化和乙酰化等表观遗传修饰水平来调控拟南芥的开花等重要的生长发育过程。

探明拟南芥不同表观遗传修饰之间的相互作用及调控机理,深入了解植物表观遗传变异的可遗传调控机制对于有效地改良农作物的品质及产量具有重要的应用价值,有助于发现更多新的、有效的作物育种方法。

参考文献(References)

- Ahmad A, Zhang Y, Cao XF (2010). Decoding the epigenetic language of plant development. *Mol Plant*, 3: 719–728
- Alinsug MV, Yu CW, Wu KQ (2009). Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants. *BMC Plant Biol*, 9: 37
- Ausin I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, et al (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet*, 36: 162–166
- Berman J, Enomoto S (1998). Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance but not the establishment of silencing at the silent mating loci. *Genes Dev*, 12 (2): 219–232
- Berr A, Shen WH (2010). Molecular mechanisms in epigenetic regulation of plant growth and development. In: Pua EC, Davey MR (eds). *Plant Developmental Biology, Biotechnological Perspectives*. 17th ed. New York: Springer Press, 355–359
- De La Paz Sanchez M, Aceves-Garcia P, Petrone E, et al (2015). The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytol*, 208: 684–694
- Gleason EJ, Kramer EM (2012). Characterization of *Aquilegia* Polycomb Repressive Complex 2 homologs reveals absence of imprinting. *Gene*, 507: 54–60
- Han SK, Sang Y, Rodrigues A, et al (2012). The SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA represses abscisic acid responses in the absence of the stress stimulus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 4892–4906
- Hennig L, Taranto P, Walser M, et al (2003). *Arabidopsis* MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development*, 130: 2555–2565
- Hollender C, Liu Z (2008). Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *J Integr Plant Biol*, 50: 875–885
- Kennedy BK, Liu OW, Dick FA, et al (2001). Histone deacetylase-dependent transcriptional repression by PRB in yeast occurs independently of interaction through the LXCXE binding cleft. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 8720–8725
- Kenzior A, Folk WR (2015). *Arabidopsis thaliana* MS14/FVE associates with members of a novel family of plant specific PWWP/RRM domain proteins. *Plant Mol Biol*, 87: 329–339
- Kenzior AL, Folk WR (1998). AtMS14 and RbAp48 WD-40 repeat proteins bind metal ions. *FEBS Lett*, 440: 425–429
- Kim JM, To TK, Seki M (2012). An epigenetic integrator: new insights into genome regulation, environmental stress responses and developmental controls by histone deacetylase 6. *Plant Cell Physiol*, 53: 794–800
- Kohler C, Hennig L, Bouveret R, et al (2003). *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb Group Complex and required for seed development. *EMBO J*, 22: 4804–4814
- Laherty CD, Yang WM, Sun JM, et al (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell*, 89: 349–356
- Lee BC H, Lin ZY, Yuen KWY (2016). RbAp46/48 (LIN-53) is required for holocentromere assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Rep*, 14: 1819–1828
- Lingel A, Sendzik M, Huang Y, et al (2017). Structure-guided

- design of EED binders allosterically inhibiting the epigenetic Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) methyltransferase. *J Med Chem*, 60: 415–427
- Luo M, Tai R, Yu CW, et al (2015). Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in *Arabidopsis*. *Plant J*, 82: 925–936
- Luo M, Wang YY, Liu XC, et al (2012). HD2C interacts with HDA6 and is involved in ABA and salt stress response in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 63: 3297–3306
- Ma X, Lv S, Zhang C, et al (2013). Histone deacetylases and their functions in plants. *Plant Cell Rep*, 32: 465–478
- Marfil CF, Asurmendi S, Masuelli RW (2012). Changes in microRNA expression in a wild tuber-bearing *Solanum* species induced by 5-Azacytidine treatment. *Plant Cell Rep*, 31: 1449–1461
- Mehdi S, Derkacheva M, Ramstrom M, et al (2016). The WD40 domain protein MS11 functions in a histone deacetylase complex to fine-tune abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 28: 42–54
- Mozgova I, Hennig L (2015). The Polycomb group protein regulatory network. In: Mozgova I, Hennig L (eds). *Annual Review of Plant Biology*. 66th ed. Palo Alto: Annual Reviews Press, 269–296
- Pien S, Grossniklaus U (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta*, 1769: 375–382
- Probst AV, Fagard M, Proux F, et al (2004). *Arabidopsis* Histone Deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell*, 16: 1021–1034
- To TK, Kim JM, Matsui A, et al (2011a). *Arabidopsis* HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genet*, 7: e1002055
- To TK, Nakaminami K, Kim JM, et al (2011b). *Arabidopsis* HDA6 is required for freezing tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 406: 414–419
- Wu K, Zhang L, Zhou C, et al (2008). HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 59: 225–234
- Yu CW, Liu X C, Luo M, et al (2011). Histone deacetylase6 interacts with flowering locus D and regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 156: 173–184
- Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, et al (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*, 101: 79–89
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, et al (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, 13: 1924–1935

Analysis of the interaction between AtMSI1 and AtHDA6 in *Arabidopsis thaliana*

YUAN Lian-Yu¹, LIANG Guo-Lu², YANG Song-Guang³, TONG Hua-Rong^{1,*}

¹College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

²College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

³Research Group of Plant Epigenetics, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Abstract: Chromatin modification is an effective way of transcriptional regulation in eukaryotes. Histone deacetylases and subunits of PRC2 (Poly-comb Repressive Complex 2) complexes are all essential for chromatin modification, and they play important roles in growth and development regulation in *Arabidopsis thaliana*. The yeast two-hybrid assay indicated that AtMSI1 could interact with AtHDA6, and the interaction was further confirmed using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) method and pull-down technology, which happened in the nucleus. Furthermore, the specific binding sites of these two proteins interaction were confirmed, which were the N terminal (1–114 aa) and C (404–424 aa) tail of AtMSI1 protein and the HD conserved domain (27–332 aa) and N-terminal (1–26 aa) specific domain of AtHDA6 protein respectively. Taken together, our results indicated that the AtMSI1 protein could directly interact with the histone deacetylase AtHDA6, and there were two specific sites in each protein involved in the binding process of this interaction in *A. thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; AtMSI1; AtHDA6; interacting protein

Received 2017-07-14 Accepted 2017-12-29

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31400583) and the Basic and Frontier Research Program of Chongqing (cstc2014jcyjA80011).

*Corresponding author (huart@swu.edu.cn).