

## 拟南芥核糖体蛋白生物学功能研究进展

靳聪聪, 侯名语, 潘延云\*

河北农业大学生命科学学院, 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北保定071000

**摘要:** 核糖体由核糖体RNA和核糖体蛋白组成。植物核糖体的组成蛋白共81种, 每种都包含2~7个序列不同的成员。不同成员形成的组合使得核糖体具有了高度的组织特异性, 这是植物核糖体区别于其他真核生物的重要特征, 也被认为是植物适应固着生长和环境变化的方式之一。因此, 植物核糖体蛋白可能参与了植物特定时期的生长发育过程, 有些还可能演化出核糖体外的功能。本文综述了拟南芥核糖体蛋白参与的植物发育及响应胁迫应答的研究进展。

**关键词:** 核糖体; 核糖体蛋白; 拟南芥

核糖体(ribosome)是最古老的、精细复杂的细胞器, 其结构和组成从原核到真核保持着高度的保守性。真核细胞的核糖体是由4种核糖体RNA (rRNA)和79~81种核糖体蛋白(简称R蛋白)构成的。一般认为rRNA承担的肽基转移酶和mRNA解码功能对于核糖体是较为关键的作用, R蛋白起到维持RNA构型的作用。但越来越多的研究发现, 所有的R蛋白不仅参与了rRNA的加工、折叠、核糖体亚基组装和转运过程, 还在亚基结构的稳定性、核糖体与各种翻译因子的相互作用和新生肽的折叠与定位等过程中发挥作用, 甚至还可能承担着核糖体外的生物学功能(Barakat等2001; Komili等2007)。植物R蛋白更因其每种均由多基因编码的特征受到广泛关注。目前, 植物R蛋白的研究一方面是借助组学研究手段对总体R蛋白进行高通量分析, 另一方面是利用反向遗传学, 借助R蛋白基因突变体的表型分析, 研究特定R蛋白的生物学功能。本文以模式植物拟南芥中R蛋白的研究成果为主, 综述了R蛋白在植物体中的存在方式、承担的生理作用及其可能的作用机理。

### 1 拟南芥核糖体的蛋白质构成

目前动植物中R蛋白的命名可以区分大小亚基, 本文中核糖体蛋白小亚基(ribosomal protein small subunit)、大亚基(ribosomal protein large subunit)和核糖体磷酸化蛋白(ribosomal phosphoproteins)分别用Sn、Ln和Pn来表示。真核生物中, 酵母的R蛋白有79种, 根据进化程序被分成3类, Group I共35种, 与细菌/古细菌同源; Group II为32种, 与古细菌同源; Group III的12种为真核细胞特有(Wilson

和Cate 2012)。高等真核生物包括一个额外的大亚基核糖体蛋白L28e, 为80种; 植物核糖体更多1个R蛋白家族, 即核糖体颈区的酸性蛋白P3, 为81种(Barakat等2001; Komili等2007)。拟南芥R蛋白分子量在3.4 (L31)~44.7 (L4) kDa间。其中P0、P1、P2、P3和S12为酸性蛋白, 等电点(pI)为4.0~5.8; 其余都是碱性蛋白, pI在8.1 (S27)~12.8 (S30和L39)之间。在核糖体自组装过程中, R蛋白逐批与rRNA结合形成核糖体的大、小亚基, 按与rRNA结合的顺序分为“初级结合蛋白”、“次级结合蛋白”与“迟结合蛋白”等几组。不同种R蛋白之间的同源性在0~5%之间, 但不同物种的同种R蛋白, 同一性为96% (L41)~35% (L28), 平均为66%, 显示了R蛋白家族的高度保守性(Carroll 2013)。

利用小鼠的R蛋白序列检索拟南芥的表达序列标记(expressed sequence tag, EST)和DNA序列数据库(GenBank)中的同源cDNA序列, 推测可能的R蛋白编码基因有249个, 其中101个编码32个小亚基蛋白, 148个编码48个大亚基蛋白, 这意味着每种R蛋白的编码基因不止一个。事实上这是植物的R蛋白区别于其他真核生物的最显著特征, 即每种R蛋白均以家族的形式存在, 每个R蛋白家族的成员数目为2~7个, 多为3~4个。家族成员间的序列同一性为65%~100% (Carroll 2013; Hummel等2015)。

收稿 2017-08-01 修定 2017-12-05

资助 国家自然科学基金(30570993和31471168)、河北省自然科学基金(C2017204095)和河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2017039)。

\* 通讯作者(pyycell@163.com)。

R蛋白的主要功能就是与rRNA结合构成核糖体。对于任意一个核糖体,都只需要R蛋白每个家族中的一个成员,从耗能角度考虑,核糖体需要每一种R蛋白有相同的物质的量(Savada和Bonham-Smith 2014)。因此对于多基因家族的每种R蛋白,其表达的调控如何与核糖体的生物发生密切协调,一直以来就是被关注的重点。迄今人们利用了多种手段如梯度离心、双向电泳结合质谱分析等从组学水平研究了R蛋白家族的表达(Giavalisco等2005; Chang等2005; Carroll等2008; Piques等2009; Turkina等2011; Hummel等2012),最近一项利用液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS<sup>E</sup>)的研究鉴定出包括RACK1在内的165个蛋白,囊括了70个R蛋白基因家族(Hummel等2015)。

## 2 拟南芥R蛋白家族的表达特征

首先, R蛋白在转录(组)水平受到调控。根据拟南芥EST数据的分析,至少77%的R蛋白基因以能够检测到的水平表达,7%的基因(22个)没有检测出EST,被认为是假基因(Zorca和Zorca 2011)。R蛋白基因的转录表达似乎受不同调节,因为无论是家族间还是家族内,各成员表达频率均有差异。用公共基因表达数据分析系统GENEVESTIGATOR (<https://genevestigator.com>)分析拟南芥的芯片数据,发现在不同的发育阶段,单个R蛋白转录水平彼此间有很大的差异,若以信号强度代表转录水平,最低的少于300,最高的可以达到90 000,彼此差300倍之多。与之相比较, R蛋白家族整体的转录水平彼此最大差异只有4.4倍,显示家族间比个体间有更多的和更严格的协调调控;此外,每个R蛋白家族内,成员间的表达水平也存在差异,分析者据此将R蛋白家族分为两类, type I家族的成员之间表达水平相似, type II家族的成员彼此间表达有较大差异,这种较大差异被认为可能是某些成员演化出了新的功能。环境刺激下R蛋白转录变化的检测结果也支持这个观点——植物受环境影响调节生长时,核糖体的生物合成需求发生变化,预测所有的R蛋白都应有相似的变化。但人们发现,在某些特定刺激下,当多数R蛋白保持转录水平的不变或轻微变化时,少数有显著的增加或下降,该现象暗

示这些R蛋白可能在特殊条件下具有核糖体外的功能(Savada和Bonham-Smith 2014)。

转录水平的协调调控仅仅保证了R蛋白家族之间转录的相似性,却不能确保每一个家族的表达彼此完全一致,因此R蛋白基因的转录后调节是必要的。不同的数据显示了R蛋白的mRNA在翻译成蛋白时有两种调节机制,一种是各种R蛋白的翻译可以共进退,如已发现丰度上有4~5倍差异的R蛋白mRNA有着相似的翻译速率,当胁迫信号如低氧、糖饥饿和脱水等导致植物生长缓慢时,会引起R蛋白mRNA的翻译共同降低,而除去这些信号则导致翻译抑制的协同逆转,表明R蛋白的mRNA翻译能被协同调节(Kawaguchi等2004; Branco-Price等2005; Nicolai等2006);另一种则相反,如在不同器官和组织的核糖体提取物中,酸性R蛋白P1、P2A和P2B蛋白的水平有差异,但该差异与其mRNA水平很不相关,显示不同的R蛋白可能存在着不同的翻译调控机制。该项研究还证实, P1、P2A和P3蛋白的磷酸化水平在缺氧的根尖内会下降(Szick-Miranda和Bailey-Serres 2001),显示翻译后的修饰对于R蛋白的功能也是很重要的。迄今的研究表明, R蛋白修饰对核糖体的组成和功能均有重要的意义, R蛋白的翻译后修饰具有多样性和保守性,包括起始甲硫氨酸的去除、N末端乙酰化、丝氨酸磷酸化、赖氨酸的单或三重甲基化以及N末端脯氨酸的二甲基化作用等,这些修饰涉及了29个家族的R蛋白(Carroll等2008; 2013)。一种定量的磷酸化修饰分析证实,磷酸化造成了拟南芥中胞质核糖体的异质性;此外个别R蛋白的修饰可能使其具有了其他的核糖体外的功能,如S6和L29蛋白的不同磷酸化形式在光周期中呈现不同的丰度,显示了其应答光信号的功能(Turkina等2011)。

R蛋白与rRNA是在核仁中装配成核糖体的,所以至少在核仁中不同R蛋白的组分应该是一致的。Savada和Bonham-Smith (2014)利用绿色荧光蛋白报告基因研究了5个二成员家族的所有R蛋白的亚细胞定位。他们发现R蛋白在细胞质和核仁中有显著不同的积累, R蛋白并没有以等量的形式定位或进入核仁。如L7a家族中的两个成员L7aA和L7aB都在细胞质中有显著的积累,而L15A/B在核仁内的荧光强度最高。除了胞质和核质, R蛋白

还可定位到细胞表面或被分泌到细胞外, 这些也暗示着R蛋白可能承担着核糖体外的功能。

### 3 R蛋白家族表达差异造成核糖体异质性

植物R蛋白的家族特征形成了植物核糖体区别于其他真核生物的一个重要特征, 就是核糖体的“异质性”。利用蔗糖密度梯度离心、双向电泳以及液相色谱和质谱技术等分析拟南芥核糖体, 发现不同的80S核糖体的R蛋白组成不尽相同, 有约25%的R蛋白在质量上和电荷上都是变化的(Chang等2005)。该结果直接显示了植物核糖体的异质性特征, 即在不同的器官和组织中的核糖体, 其R蛋白的组成并不完全一致。此外有大量组学和定性的分析数据, 明确了胞质核糖体蛋白在植物中呈现的高度异质性, 这种异质性甚至可以体现在细胞水平(Barakat等2001; Giavalisco等2005; Savada和Bonham-Smith 2014)。

造成核糖体高度异质性的原因无疑是R蛋白家族含有多个成员且不同成员存在不同层次的表达调控。如仅仅是R蛋白家族成员间一级序列的不同, 形成由不同成员组合的核糖体理论上达到 $10^{34}$ 个之多(Hummel等2012); 此外, 从转录到不同组织的定位, 从翻译到翻译后修饰, 这些调节的最终结果是否能够保持组成核糖体的每种R蛋白物质的量相同尚不能肯定, 但是, 可以肯定的是进一步强化了植物核糖体的异质性。植物核糖体的这一重要的特征, 可能是适应植物生长发育和进化的方式。随着植物生长, 核糖体的R蛋白成分在逐渐分化的细胞和组织中缓慢发生变化直到在不同器官间形成组成型差异, 这种不可思议的能力被认为是核糖体具有“密码”的功能, 即不同的细胞类型中、或者不同的环境条件下会有不同的mRNA结合到核糖体上, 对于特异的mRNA的翻译过程会有其最佳的核糖体(Komili等2007), 植物因此能够调节发育过程中或者特殊环境下的翻译机器的合成效率, 这被认为是固着的植物能够适应不断变化的环境的应对措施之一, 对生长有着重要的意义(Giavalisco等2005; Komili等2007; Hummel等2012)。

### 4 拟南芥R蛋白突变体的研究

在拟南芥中, R蛋白突变体的研究结果显示出

核糖体和翻译过程在植物发育的很多方面起到作用。综合这些突变体的表型, 发现有些R蛋白缺陷的突变体表现出相似的发育表型, 如对胚胎或叶子的发育调控; 有些则表现出特异性表型, 如对紫外线及热、冷刺激的胁迫应答。针对这些表型人们对R蛋白作用机制的分析认为, 一是核糖体的高异质性造成单个的R蛋白缺失引起作用不平衡所致, 二是个别R蛋白衍生出了核糖体外的新功能(Byrne等2009)。仅根据突变体表型并不能完全区分R蛋白到底以哪种机制起作用, 却无疑都为R蛋白作为调节组分参与发育途径提供了有力证据。

#### 4.1 R蛋白参与胚胎发育

最早发现参与拟南芥胚胎发育的R蛋白是S16和S5A。S16 (最初命名为SSR16)基因被破坏的突变体是纯合致死, 其胚胎发育至球形胚向心形胚转换时发育终止(Tsugeki等1996)。S5基因家族在拟南芥中有2个成员, S5A在分裂的细胞中有高表达, S5B在分化的细胞中有更多的表达。拟南芥转移DNA (transfer DNA, T-DNA)插入S5A基因的突变体也是纯合致死, 而杂合体生长缓慢, 花和维管组织出现缺陷(Weijers等2001)。

利用拟南芥胚胎发育突变体进行高通量筛选, 发现其中7个是R蛋白基因, 他们是S6、S11、L2、L8、L23、L19和L40家族的成员, 这些导致胚胎致死的突变基因往往是家族中表达最高的成员。与S16的突变体表型相似, 这些突变体的胚胎发育都经历了早期的卵裂并形成胚柄和球形胚, 但球形胚后的发育出现更严重的缺陷, 暗示过了球形胚时期后, 胚胎发育可能需要组装新的核糖体。另一种解释是球形胚之前的发育时期可能只需要母体遗传的核糖体, 之后发生的胚胎缺陷是由单倍体中的核糖体剂量不足启动的(Tzafrir等2004; Meinke等2008)。

关于R蛋白参与雌配子发育的研究较为系统的是L27a家族的功能分析。L27a家族有3个成员, L27aA、L27aB和L27aC, 其中L27aA没有明显的转录本, 可能是一个假基因。L27aB和L27aC高度保守, 均为146个氨基酸组成, 只有2个氨基酸的不同。这两个基因均在胚胎和幼苗中表达, 但L27aC表达大约是L27aB的2倍。研究结果显示, 第一, 胚胎发育过程对L27a蛋白的量是敏感的。L27aC和

*L27aB*的突变都能引起发育缺陷,通过诱变获得的*L27aC*点突变的纯合体*pl27ac-1d*在很大程度上是雌性不育的,非致死的原因是突变蛋白还有部分功能,或者还有相近的基因*L27aB*作为功能冗余的基因在缺乏*L27aC*时能够使得植物存活;*pl27ac-1d/+*杂合体呈半显性,表型介于纯合体和野生型之间;而表达量相对较低的*L27aB*基因的突变也有显著的变化,但对雌蕊的影响不如*L27aC*的突变体。这些研究数据展示了*L27a*和雌性的育性间的剂量依赖关系,该蛋白的减少导致不育性的增加,二者呈正相关,研究还发现*L27a*的水平无论在孢子体还是在配子体都影响了雌性配子体发育,发育结果视*L27a*剂量而定。这些结果证明了*L27aC*和*L27aB*是功能冗余的,同时揭示了*L27a*于胚珠发育期间在孢子体和配子体间复杂的协调关系上发挥着重要的功能。第二,*L27a*的突变表型也与前述R蛋白引起的雌蕊发育缺陷表型相似,也是在球形胚到心形胚转换的时期发生障碍,当野生型已经发育至心形胚时期时,*rpl27ac-1d*雌配子体仅发育成一个较大的球形胚,并且其子叶原基和茎顶端分生组织的发育极为延迟,原位杂交结果显示,突变体异常的胚胎中,茎分生组织基因*STM*和*CUC2*异位表达,背轴基因*FIL*延迟表达,生长素运输因子*PINI*的表达也发生混乱,表明导致异常胚胎的产生可能是缘于这些基因的错误调节。此外突变体表型还显示了*L27a*与叶的形态建成过程的相关性(Szakonyi和Byrne 2011a, b; Zsögön等2014)。

最近发现*L18aB*是早期胚胎发生所必需的。*rpl18aB*突变体的早期胚胎细胞分裂方向不规则,并在球状期停留,并且胚胎中生长素的极性转运也受到干扰。此外*rpl18aB*突变体的成熟花粉可以正常发芽,但其竞争力显著降低(Yan等2016)。这些工作揭示了R蛋白在胚胎发育中的作用,也为早期胚胎发生的调控机制的阐述提供了新见解。

#### 4.2 R蛋白参与叶片的发育过程

叶子发育始自茎顶端分生组织的两侧,逐渐发育为有明显不同的背侧面(也称近轴)和腹侧面(远轴)的极性结构。典型的成熟单叶有3个不对称轴,近-远轴非对称发育是叶形态建成的核心。分布于两侧的特异基因彼此间的对立调节及相互作用决定了两侧细胞的分化命运并保持背腹侧极

性。近年来鉴定了很多相关基因,包括转录因子、小RNA(miRNA)、26S蛋白酶体、转录后基因沉默修饰的组分和染色体重塑相关基因等,组成了复杂的调控网络。目前已知具有拟南芥III类同源结构域亮氨酸拉链(*Arabidopsis* class III homeodomain-leucine zipper, HD-Zip III)结构的转录因子PHB、PHV、REV等,在近轴表达并且是近轴发育所必需,这些基因部分受控于miR165和miR166从而在该区域受到限制;*KANADI*基因在远轴表达,对远轴的形成是必需且足够的。这两类转录因子通过彼此的抑制被间接地保持在各自的表达区域(Emery等2003; Prigge等2005; Tsukaya 2013)。

Van Lijsebettens等(1994)发现了一株拟南芥尖叶表型(point first leaves 1, *pfl1*)突变体,用T-DNA标签克隆该基因,发现是*S18*。*S18*家族有3个成员,*pfl1*中*S18A*转录活性被限制。*S18A*在心形胚的分生组织中高表达,但*pfl1*胚胎发育并没有明显受损,意味着该突变体中有另外*S18*家族的成员被激活。该研究还发现*S18*在拟南芥受到伤害后表达增强,暗示了该基因参与了对刺激的应答反应(Van Lijsebettens等1994)。Ito等(2000)获得了一株转座介导的*S13*基因突变体,与*pfl1*的表型非常一致,因此命名为*plf2*。他们发现该突变体有多重表型,包括异常的叶片和表皮毛、短根以及晚花。显微镜分析显示他的第一个叶片少了很多栅栏细胞,显示突变体表型是由于细胞分裂减少所致,但生殖生长没有受到明显的影响(Ito等2000)。*S13*家族有2个成员,在核糖体中位于结合转运RNA(tRNA)的部位(Wang等2013)。*plf2*的表型与一种转录因子SPL的低水平表达突变体相似。*SPL*基因家族是miR156的靶目标。人们发现在*pfl2*突变体中*SPL3*可能受到影响,即*S13*可能通过miRNA途径调节SPL的剂量来参与发育过程(Ito等2000)。

AS1 (asymmetric leaves1)是含有Myb结构域的转录因子,是叶腹-背轴建立的调控网络的组分之一。在拟南芥中,*as1*突变体叶子的极性只有很微弱的缺陷,进一步诱变*as1*获得表型加剧的三株双突变体,在叶片的近轴面出现了小的叶片副产物。新突变基因分别命名为*PGY1* (piggyback1)、*PGY2* 和*PGY3*,图位克隆后发现这三个基因分别为*L10a*、*L9*和*L5*基因。这三个R蛋白基因的单

突变体与前述*S18*的突变表型极为相似, 即早期莲座叶顶端稍尖, 叶边缘锯齿稍严重。*AS1/AS2*可抑制miR165/166生成, 从而稳定PHB、PHV、REV等转录因子, 而*as1*和*pgy*双突变体异常叶的近轴面REV表达增强, 在远轴面的*KANADI*基因被抑制, 显示L10a、L9和L5通过与HD-Zip III-KANADI途径的相互作用来影响叶子的发育(Pinon等2008)。*ae5* (asymmetric leaves1/2 enhancer5)和*ae6*两个突变体都有异常叶的表型, 如生长缓慢、颜色较浅, 切片发现是由近轴的栅栏细胞区域有大量的空泡形成类似远轴面的海绵组织所致, 即叶的近-远轴发育被破坏, 第一对完全展开的莲座叶叶脉发育也出现异常。图位克隆结果显示*AE5*和*AE6*分别编码L28A和L5A, 而与他们同一家族的*L24B*和*L5B*的功能缺失突变体也表现出相似的缺陷表型。*L28A*也是通过调控*REV*、*KANADI*以及生长素响应因子*ARF3/4*等基因的表达来调控叶的发育的(Yao等2008)。研究还发现*L28A*和*L5A*在所有的组织中都表达, 突变体表型也显示这两个基因参与了多重的植物发育过程, 如花序较早终止, 补偿性地产生第二花序等(Yao等2008)。另外, *stv* (*L24*缺失的突变体)和*l4d*与*l5a*突变体也有尖叶、叶脉紊乱等叶发育缺陷表型, 该突变体的研究结果显示*L24*和*ARF3*在同一个遗传途径中, 在*stv*中*ARF3/5*两个基因的翻译效率都降低了(Nishimura等2005)。

R蛋白调控叶发育的研究中对R蛋白作用机制进行了分析。首先, 某些R蛋白可能通过miRNA途径调节叶的发育, 如前文已述的*S13*可能调节miR156靶标SPL的剂量参与子叶的发育(Ito等2000)。最近的一项研究提供了更有力的证据, 该研究利用pri-miR172b做为报告基因, 证实了STV1(即L24)部分定位在细胞核, 结合在miRNA初始转录物(primary miRNA transcripts, pri-miRNAs) 5'臂两侧的茎环, 通过促进pri-miRNAs与再加工的复合物结合启动了miRNA的生物合成(Li等2017)。

其次, 某些R蛋白组成的核糖体在叶子的腹背侧模式的建立中起到关键的翻译水平的调节。如一些R蛋白突变的突变体能引起特殊的生长素相关的缺陷而不是非特异的翻译的缺陷, 暗示核糖体的一些R蛋白组分做为翻译调节机制在放大生长素信号中是必需的(Rosado等2012)。将两者联

系在一起的是一些ARFs的mRNA 5'引导序列上存在的上游开放阅读框(upstream open reading frame, uORF), 突变的R蛋白通过uORF翻译调节机制改变了ARFs正常的表达量, 从而改变了叶子的腹背发育模式(Yao等2008; Rosado等2012); 此外, R蛋白的修饰也与选择性翻译相关。参与叶腹背发育的还有*S6*家族, *c105*为*S6*反义的降低表达的转基因植株, 该株系削弱了顶端优势, 叶与花都出现异常, 研究者认为*S6*的磷酸化调节是细胞增殖中一个关键步骤, 该异常表型不能简单用仅仅是核糖体生物合成的下调来解释, 更可能是*S6*的磷酸化引发了选择性翻译mRNAs (Morimoto等2002), 且最近一项研究证实了*S6*的C末端区域中保守的Ser240残基的磷酸化是受TOR激酶调控的(Dobrenel等2016)。

叶的大小是由细胞增殖和细胞生长协调调控, 但分子机制尚不清楚。拟南芥叶中, 一个正向调节细胞增殖因素的突变往往触发过分的细胞增殖, 这种现象称为补偿综合症。如AN3是个转录共激活子, 其功能缺失突变体*an3*中就发生了补偿综合征。Fujikura等(2009)发现了3株没有这种补偿的突变体*oli2*、*oli5*和*oli7*, 其细胞数量的减少是稳定的。然而, 两个*oli*的双突中, 细胞数量进一步减少, 补偿即被诱发。相似地, AN3的弱表达突变体与*an3 null*突变体比较, 细胞数量虽适度地减少但是没有诱发补偿。进一步, *olis*与*an3*的双突表现出明显的加强补偿, 显示补偿会以临界依赖的方式被触发。*OLI2*编码一个Nop2同源序列参与核糖体生物合成, *OLI5*与*OLI7*分别编码L5家族的两个基因L5A和L5B, 说明参与诱发补偿的因子可能受AN3和核糖体相关过程的双重调控(Fujikura等2009)。

#### 4.3 R蛋白参与根的发

R蛋白缺失突变引起的生理缺陷往往不是单一的。如前文所述的*S13*突变体*pfl2*, 除了叶子的异常表型外, 根的生长也受到抑制。L10家族有3个成员, 分别是L10A、L10B和L10C。用免疫提纯的方法获得不同组织的核糖体, 发现L10s的3个成员在细胞、组织和器官水平有不同的表达, 而所有成员都在叶保卫细胞中、根的皮质分生区、内皮和维管组织中有较高水平的转录, 暗示他们在这些组织中发挥着作用。表型观察发现, *L10B*缺

失的突变体初生根的生长速率较野生型明显减缓(Ferreira等2010);此外*L23a4*的缺失或者沉默也会导致根的生长缓慢,同时还有根毛短、侧根畸形等表型(Degenhardt和Bonham-Smith 2008)。

侧根原基发育的早期可积累R蛋白的mRNA。原位杂交显示,*L16*的mRNA在快速增殖的组织中积累,包括茎尖和根尖的分生组织以及侧根原基。生长素短暂处理可诱导拟南芥侧根的形成。*GUS*报告基因显示,*L16A*在根的中柱和花药中表达,当用生长素处理后,*GUS*很快在侧根中积累。*L16B*与分裂的细胞相关,而*L16A*的转录有细胞特异性,这两个基因在早期的侧根中和发育的花粉中表达可能是服务于这些组织快速生长时R蛋白需要的(Williams和Sussex 1995)。

#### 4.4 R蛋白与胁迫应答

*L10*家族除了参与拟南芥的根发育过程,还有较为详实的证据证明他们参与了抗病反应和紫外胁迫的应答反应。*L10*结合于大亚基,是连接40S和60S亚基的关键因子,也为连接氨酰基tRNA提供了位点,起始了翻译过程。在酵母中,*L10*是细胞生存所必须的,而3个拟南芥*L10*成员均能完成互补酵母*L10*突变体。除了其在翻译中的角色,还有核糖体外的细胞功能,例如人类的*L10*最初被鉴定为一种肿瘤的抑制子。

拟南芥中*L10*的核糖体外的功能体现在其抗病反应中的作用(Carvalho等2008)。与双生病毒核穿梭蛋白(nuclear shuttle protein, NSP)相互作用的激酶(NSP-interacting kinase, NIK)是一种受体激酶,也是NSP的侵染目标。以NIK为钓饵,利用酵母双杂交的方法筛出了一种与之相互作用的肿瘤抑制子样蛋白,即*L10A*; *L10A*功能缺失突变体与*nik1*表型相似,均对双生病毒的感染更加敏感。双生病毒感染的反防御措施是直接干扰了NIK1介导的*L10*的核重新定位,*nik1*中*L10*不能重新运输到细胞核。因此可以肯定,*L10A*是被NIK1磷酸化后重新转移回细胞核发挥应答病毒感染功能的(Carvalho等2008; Rocha等2008)。抗枯萎棉花(*Gossypium arboreum*)的核糖体蛋白L18 (GaRPL18)也参与了抗病作用,在棉花中GaRPL18的表达沉默使得抗性棉花品种比对照植物对大丽花大黄杆菌更容易感染,而拟南芥超表达该基因的转基因植株比野

生型植物更能抵抗病菌的感染。该研究还提供数据显示GaRPL18在抗病中的作用主要受SA相关信号通路机制调控(Gong等2017)。

*L10*家族不同成员受到紫外(UV-B)辐射刺激后有不同的表达模式,其中*L10A*不受UV-B的调节,*L10B*在高强度UV-B下被下调,而*L10C*被诱导上调。利用*L10*的抗体进行的免疫共沉淀结果显示,未被辐射和辐射过的组织中均有一些蛋白被结合,其中包括核蛋白,二者结合的蛋白是不同的。已知*L10*蛋白是没有核定位序列的,那么它向核内移动应该是与其他蛋白结合到一起完成的,这与前述关于*L10*的研究结果相吻合。利用*GFP*报告基因检测*L10*三个成员的定位,发现3个*L10*主要都积累在细胞质中而不是在细胞核中,而当细胞受到UV-B照射后,仅*L10B*在核内有积累,*L10A*和*L10C*均没有变化,说明*L10*家族中的A和B都可以在应激反应中移动到核内,但入核的方式可能不同。该研究组还分析了*L10*家族成员对发育的影响,利用T-DNA插入基因的功能缺失突变体的分析显示,*rpl10A*纯合突变体是致死的,说明*L10A*对植物的可育性是必须的,*rpl10A*杂合体在UV-B条件下翻译是不足的,*rpl10B*纯合体表现出不正常生长,但不致死。*L10C*基因,无论是缺失表达还是降低表达达到突变体,其纯合植株都没有可见的表型差异。还有一点值得注意的是,在所有的突变体中,*L10*未突变的成员表达量都没有变化,说明*L10*家族中,成员之间没有补偿作用(Ferreira等2010)。

*L10*与*L4*以及核糖体结合蛋白RACK1等还共同参与了热精胺代谢途径对木质部结构发育的过程。*ACL5*是一种热精胺合成酶,热精胺是木质部分化的负调控因子,阻止发育中的木质维管细胞过早发生木质化死亡。*acl5*表现出过多的木质部结构,并且严重矮化。热精胺可以恢复*acl5*的表型。该研究借助突变体克隆了一系列参与该途径的基因,分别是*SAC51*、*SAC52*、*SAC56*和*SAC53*。除了*SAC51*编码一种转录因子外,其余3个分别编码*L10A*、*L4*和RACK1。*GUS*报告基因检测显示,*GUS*活性在*acl5*中减少,说明转录因子*SAC51*参与了热精胺代谢途径;在*sac52-d*、*sac53-d*和*sac56-d*中被恢复,显示了*L10A*、*L4*和RACK1对*SAC51*翻译的调控,并且可能是通过*SAC51* mRNA上的

uORF调节的翻译抑制来实现的(Kakehi等2015)。

紫外胁迫会造成DNA的损伤,对DNA损伤有响应的还有S27家族。甲基甲烷硫酸盐(methyl methane sulfate, MMS)是一种DNA毒素,一定浓度下会严重抑制植物生长甚至导致死亡。S27家族有3个成员,其中T-DNA插入S27A基因的功能缺失突变体*ars27A*的幼苗生长表型与野生型一致。当施加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MMS时,野生型拟南芥没有变化,但*ars27A*的生长受到严重的抑制,同时根部还出现瘤状物,类似辅根。这个表型是*ars27A*对MMS的特有反应,因为野生型的幼苗即使在MMS致死的剂量中也从不表现出这种表型,*ars27A*在缺乏MMS的环境中或者是在其他的胁迫条件下都没有该表型。*ars27A*另外一个重要的特征是它不能在UV处理后迅速地降解转录产物。野生型拟南芥受UV照射后,*S6*和*actin*的转录水平分别减少到原来的40%和10%~20%,而突变体中分别是74%和40%。这些结果表明S27A在正常条件下可能不是蛋白合成所必需的,但是在UV处理后对去除可能伤害的mRNA是必须的。S27A引起的在胁迫条件下转录不稳定的机制还不清楚,其他R蛋白突变体是否有此表现也不清楚。S27A有一个转录因子特有的锌指结构,因此,该蛋白或许有一个不依赖于核糖体的功能(Revenkova等1999)。

P3蛋白是酸性核糖体蛋白之一。Kang等(2016)从加热处理的拟南芥悬浮培养物中筛选热稳定高分子量(high molecular weight, HMW)复合物时,发现AtP3B在热休克后稳定地保留在HMW复合物中。AtP3B mRNA的水平在高温或低温胁迫下都会增加。通过RNA干涉降低*AtP3B*表达产物的水平,植物对高温胁迫和低温胁迫都敏感,而*AtP3B*的过表达增加了植物对两种温度胁迫的耐受性。细菌表达的重组AtP3B蛋白表现出蛋白分子伴侣和RNA伴侣活性。该结果显示,AtP3B可以保护细胞免受高温和低温胁迫(Kang等2016)。

## 5 R蛋白作用机理的分析

尽管核糖体的翻译过程是生物最基本的持家功能,但R蛋白突变体既有共同的也有特异的突变表型。那些针对特定刺激做出应答的专一表型被认为是R蛋白演化出的核糖体外作用所致,这也是

植物R蛋白基因多副本现象的诠释之一,即进化过程中保存的基因副本可能会“新功能化(neofunctionalization)”(Horiguchi等2012)。拟南芥中R蛋白具有这种功能的实验数据并不多,最明确的当属L10A参与的抗双生病毒的生理功能(Carvalho等2008; Rocha等2008)和P3B的分子伴侣功能(Kang等2016),以及L24参与启动miRNAs形成的功能(Li等2017)。因此,新功能似乎不是拟南芥核糖体蛋白基因保留几个拷贝的主要驱动力;而对那些不同的R蛋白突变导致的共同表型,如生长及胚胎、叶、根的发育缺陷等,显然是发育过程中翻译的失调导致的,这些R蛋白仍是以核糖体的组成部分来发挥调控作用的。造成这种状态可能是多基因副本的“亚功能化(subfunctionalization)”或“基因平衡(gene balance hypothesis)失调”所致(Horiguchi等2012)。亚功能化是指基因家族中多样的副本获得了多种表达模式,这与核糖体的“异质化”本质上是相同的,即R蛋白基因家族的不同成员因组进不同组织细胞的核糖体中而分担了各自的生物学功能。如S5的两个成员中,虽然表达有交叉重叠的地方,但是一个在茎、根顶端的分生组织中表达高,而另一个在分化和延伸的细胞中表达高(Weijers等2001);两个*L11*基因一个在子叶、茎和根的分生组织中以及在维管组织中有高表达,而另一个在根的中柱中、发育的花药和花粉中表达受限制。L23a家族包含两个成员,也呈现功能上的差异,*L23aA*基因的RNA干扰(RNA interference, RNAi)植株显示出严重的发育缺陷,而*L23aB*减少后就没有明显的表型变化等(Degenhardt和Bonham-Smith 2008);基因平衡假说从另一个层面解释了R蛋白副本存在的优势,该假说主张基因副本之所以保留至少是因为一旦他们剂量的减少将会影响健康,即那些基因剂量的减少会影响到与其相互作用的伙伴或者复合体的平衡,从而会降低其作用。如前文已述的参与叶发育的S6家族的2个成员*S6A*与*S6B*,*S6*低表达突变体*rps6a*、*rps6b*和双突变体*RP-S6A/rps6a*、*RPS6B/rps6b*都表现出生长缓慢且叶子腹背模式发生变化的表型,且两个S6基因的功能是冗余的、可互相替换的。他们的结果支持植物R蛋白基因的“平衡假说”,即S6家族中的一个成员是进化出的副本,是维持必要的表达水平支持

细胞翻译需要的产物(Creff等2010)。目前更多的全基因组统计学分析支持和倾向用该假说来解释拟南芥R蛋白基因的生理功能。

## 6 结语与展望

核糖体是最古老的细胞器之一,但人们对它的认识还远不够深入。基因的表达调控分为多个水平,包括DNA和染色体水平、转录水平、转录后水平、翻译水平和翻译后水平以及mRNA降解的调控等。其中翻译在很大程度上决定了植物中蛋白组组成,但目前对翻译调节的了解远低于其他的调节过程。迄今已经有20多种R蛋白功能缺陷突变体提供了遗传学证据暗示了R蛋白在翻译调节上的作用,但作用机理有待澄清;此外,突变体的研究还显示有些R蛋白是以翻译调控之外的功能参与植物生长发育的,作用的分子机制也有待深入的研究(Hummel等2015)。研究R蛋白是解析核糖体的结构与功能的前提,而对这个复杂机器的解读对于理论和实践均具有重大的意义,如设计活性物质或修饰来改变核糖体的功能,从而改善植物的生长表型等。相信不久的将来核糖体工程会广泛地应用到生物学领域。

### 参考文献(References)

- Barakat A, Szick-Miranda K, Chang IF, et al (2001). The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol*, 127 (2): 398–415
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira RB, et al (2005). Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann Bot*, 96 (4): 647–660
- Byrne ME (2009). A role for the ribosome in development. *Trends Plant Sci*, 14 (9): 512–519
- Carroll AJ (2013). The *Arabidopsis* cytosolic ribosomal proteome: from form to function. *Front Plant Sci*, 4: 32
- Carroll AJ, Heazlewood JL, Ito J, et al (2008). Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol Cell Proteomics*, 7 (2): 347–369
- Carvalho CM, Santos AA, Pires SR, et al (2008). Regulated nuclear trafficking of rPL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathog*, 4: e1000247
- Chang IF, Szick-Miranda K, Pan S, et al (2005). Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes. *Plant Physiol*, 137 (3): 848–862
- Creff A, Sormani R, Desnos T (2010). The two *Arabidopsis* *RPS6* genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Mol Biol*, 73 (4–5): 533–546
- Degenhardt RF, Bonham-Smith PC (2008). *Arabidopsis* ribosomal proteins RPL23aA and RPL23aB are differentially targeted to the nucleolus and are disparately required for normal development. *Plant Physiol*, 147 (1): 128–142
- Dobrenel T, Mancera-Martínez E, Forzani C, et al (2016). The *Arabidopsis* TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Front Plant Sci*, 7: 1611
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, et al (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol*, 13 (20): 1768–1774
- Ferreira MLF, Pezza A, Biarc J, et al (2010). Plant L10 ribosomal proteins have different roles during development and translation under ultraviolet-B stress. *Plant Physiol*, 153 (4): 1878–1894
- Fujikura U, Horiguchi G, Ponce MR, et al (2009). Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 59 (3): 499–508
- Giavalisco P, Wilson D, Kreitler T, et al (2005). High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. *Plant Mol Biol*, 57 (4): 577–591
- Gong Q, Yang Z, Wang X, et al (2017). Salicylic acid-related cotton (*Gossypium arboreum*) ribosomal protein GaR-PL18 contributes to resistance to *Verticillium dahliae*. *BMC Plant Biol*, 17: 59
- Horiguchi G, Van Lijsebettens M, Candela H, et al (2012). Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant Sci*, 191–192: 24–34
- Hummel M, Cordewener JHG, de Groot JCM, et al (2012). Dynamic protein composition of *Arabidopsis thaliana* cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MS<sup>E</sup> proteomics. *Proteomics*, 12 (7): 1024–1038
- Hummel M, Dobrenel T, Cordewener J, et al (2015). Proteomic LC-Msanalysis of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes: identification of ribosomal protein paralogs and re-annotation of the ribosomal protein genes. *J Proteomics*, 128: 436–449
- Ito T, Kim GT, Shinozaki K (2000). Disruption of an *Arabidopsis* cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. *Plant J*, 22 (3): 257–264
- Takehi JI, Kawano E, Yoshimoto K, et al (2015). Mutations in ribosomal proteins, RPL4 and RACK1, suppress the phenotype of a thermospermine-deficient mutant of *Ara-*



- bidopsis thaliana*. PLoS ONE, 10: e0117309
- Kang CH, Lee YM, Park JH, et al (2016). Ribosomal P3 protein AtP3B of *Arabidopsis* acts as both protein and RNA chaperone to increase tolerance of heat and cold stresses. *Plant Cell Environ*, 39 (7): 1631–1642
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, et al (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 38 (5): 823–839
- Komili S, Farny NG, Roth FP, et al (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*, 131 (3): 557–571
- Li S, Liu K, Zhang S, et al (2017). STV1, a ribosomal protein, binds primary microRNA transcripts to promote their interaction with the processing complex in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (6): 1424–1429
- Meinke D, Muralla R, Sweeney C, et al (2008). Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci*, 13 (9): 483–491
- Morimoto T, Suzuki Y, Yamaguchi I (2002). Effects of partial suppression of ribosomal protein S6 on organ formation in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66 (11): 2437–2443
- Nicolai M, Roncato MA, Canoy AS, et al (2006). Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in *Arabidopsis* cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiol*, 141 (2): 663–673
- Nishimura T, Wada T, Yamamoto KT, et al (2005). The *Arabidopsis* STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *Plant Cell*, 17 (11): 2940–2953
- Pinon V, Etchells JP, Rossignol P, et al (2008). Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development*, 135 (7): 1315–1324
- Piques M, Schulze WX, Höhne M, et al (2009). Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in *Arabidopsis*. *Mol Syst Biol*, 5: 314
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, et al (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 17 (1): 61–76
- Revenkova E, Masson J, Koncz C, et al (1999). Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *EMBO J*, 18 (2): 490–499
- Rocha CS, Santos AA, Machado JPB, et al (2008). The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology*, 380 (2): 165–169
- Rosado A, Li R, van de Ven W, et al (2012). *Arabidopsis* ribosomal proteins control developmental programs through translational regulation of auxin response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (48): 19537–19544
- Savada RP, Bonham-Smith PC (2014). Differential transcript accumulation and subcellular localization of *Arabidopsis* ribosomal proteins. *Plant Sci*, 223: 134–145
- Szakonyi D, Byrne ME (2011a). Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 65 (2): 269–281
- Szakonyi D, Byrne ME (2011b). Involvement of ribosomal protein RPL27a in meristem activity and organ development. *Plant Signal Behav*, 6 (5): 712–714
- Szick-Miranda K, Bailey-Serres J (2001). Regulated heterogeneity in 12-kDa P-protein phosphorylation and composition of ribosomes in maize (*Zea mays* L.). *J Biol Chem*, 276 (14): 10921–10928
- Tsugeki R, Kochieva EZ, Fedoroff NV (1996). A transposon insertion in the *Arabidopsis SSR16* gene causes an embryo-defective lethal mutation. *Plant J*, 10 (3): 479–489
- Tsakaya H (2013). Leaf Development. *Arabidopsis Book*, 11: e0163
- Turkina MV, Årstrand HK, Vener AV (2011). Differential phosphorylation of ribosomal proteins in *Arabidopsis thaliana* plants during day and night. *PLoS ONE*, 6 (12): e29307
- Tzafirir I, Pena-Muralla R, Dickerman A, et al (2004). Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135 (3): 1206–1220
- Van Lijsebettens M, Vanderhaeghen R, De Block M, et al (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis PFL* locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J*, 13 (14): 3378–3388
- Wang J, Lan P, Gao H, et al (2013). Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient *Arabidopsis* roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. *BMC Genomics*, 14: 783
- Weijers D, Franke-van Dijk M, Vencken RJ, et al (2001). An *Arabidopsis* minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a *RIBOSOMAL PROTEIN S5* gene. *Development*, 128 (21): 4289–4299
- Williams ME, Sussex IM (1995). Developmental regulation of ribosomal protein L16 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 8 (1): 65–76
- Wilson DN, Cate JHD (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (5): a011536
- Yan H, Chen D, Wang Y, et al (2016). Ribosomal protein L18aB is required for both male gametophyte function and embryo development in *Arabidopsis*. *Sci Rep*, 6: 31195
- Yao Y, Ling Q, Wang H, et al (2008). Ribosomal proteins promote leaf adaxial identity. *Development*, 135 (7):

1325–1334  
Zorca SM, Zorca CE (2011). The legacy of a founding father of modern cell biology: George Emil Palade (1912–2008). *Yale J Biol Med*, 84 (2): 113–116

Zsögön A, Szakonyi D, Shi X, et al (2014). Ribosomal protein RPL27a promotes female gametophyte development in a dose-dependent manner. *Plant Physiol*, 165 (3): 1133–1143

## Research progress of ribosomal protein function in *Arabidopsis thaliana*

JIN Cong-Cong, HOU Ming-Yu, PAN Yan-Yun\*

*College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei; Hebei Key Laboratory of Physiological and Molecular Plant Pathology, Baoding, Hebei 071001, China*

**Abstract:** *Arabidopsis thaliana* genome encodes 81 different types of ribosomal proteins. Each ribosomal protein is encoded by two to seven expressed genes paralogs, forming a family, which could contribute to ribosome high heterogeneity in plant. The heterogeneity of plant ribosome is an important characteristic of plant ribosome distinguished from other eukaryotes, and regarded as attributable to the sessile nature of plants and adaptable under changing environments. Ribosomal proteins are involved in plant growth and developmental process, and some of the paralogs might evolve extraribosomal functions. This paper summarizes the research progress of ribosomal protein function of involving development and response to stress in *A. thaliana*.

**Key words:** ribosome; ribosomal proteins; *Arabidopsis thaliana*

---

Received 2017-08-01 Accepted 2017-12-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30570993 and 31471168), Natural Science Foundation of Hebei Province (C2017204095), and College Science Technology Research Project of Hebei Province (ZD2017039).

\*Corresponding author (pypcell@163.com).