

植物叶绿体蛋白质周转的研究进展及潜在应用

杨小龙, 李漾漾, 刘玉凤, 齐明芳, 李天来*

沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 北方园艺设施设计与应用技术国家地方联合工程研究中心(辽宁), 沈阳110866

摘要: 叶绿体的正常周转是维持胁迫条件下植物光合作用和代谢反应高效进行的必要条件。对叶绿体维持平衡的生理和分子机制的理解是控制植物叶绿体质量的基础, 这涉及两个重要的生理过程: 叶绿体蛋白质的导入和降解。叶绿体蛋白质的有序导入和受损伤叶绿体及其组分的及时降解在调节植物环境适应性中起着关键作用。本文首先综述了叶绿体蛋白质的导入机制, 随后介绍了叶绿体蛋白质的多种降解途径, 并对通过调控叶绿体质量提高作物环境适应性的策略进行了概述和展望。

关键词: 叶绿体蛋白质导入; 选择性自噬; 质体反向信号; 环境胁迫

植物在生长过程中不可避免地受到一系列不利环境的影响, 快速感知并适应周围环境是其生存所必需的能力。随着全球气候的变化, 预测2090年极端天气出现的频率将进一步提高, 这导致高温、干旱、盐碱及重金属污染等对植物生长发育的不利影响加重(Vermeulen等2012)。因此, 对植物如何响应不利环境这个基本生物学问题的探索有助于提高植物抗逆性, 而植物环境适应性的加强对农业和环境的可持续发展十分重要。植物在应对变化的环境的过程中, 胁迫信号首先在细胞表面或细胞膜上被感知, 随后传递到其他细胞器, 如为绿色细胞活动提供能量的叶绿体, 叶绿体通常被认为是植物绿色细胞的一个重要环境感受器。

在10~15亿年的进化过程中, 质体的部分基因整合到宿主核基因组中。结构上, 叶绿体是一个包含3层膜(外膜、内膜和类囊体膜)和3个主要区室(膜间隙、基质和类囊体腔)的复杂细胞器; 基因组水平上, 由叶绿体基因组编码的蛋白质不足100个, 大约95%的叶绿体蛋白质(约为3 000个)是由细胞核基因组编码的。核基因组编码叶绿体蛋白质在细胞质中翻译后通过跨膜转运蛋白复合体导入叶绿体的特定位置行使各种功能。叶绿体中的光合作用和代谢过程极易被环境胁迫诱导产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)所干扰, ROS的积累使叶绿体氧化还原状态失衡, 进一步损伤叶绿体组分甚至整个叶绿体。植物通过水解酶、泛素-蛋白酶体和自噬连续不断地降解受损成分, 这

对维持胁迫环境下叶绿体的正常功能十分必要(Izumi等2017; Nishimura等2017)。环境胁迫下叶绿体和细胞核之间的交流与叶绿体生物发生和降解过程紧密相关, 许多叶绿体功能被细胞核因子调节(正向信号), 而细胞核基因编码蛋白质的转录和合成过程也受叶绿体信号的影响(反向信号), 受到胁迫的叶绿体传递反向信号与细胞核交流以维持叶绿体平衡(de Souza等2017)。

叶绿体的周转对于维持胁迫条件下作物光合作用和代谢的高效运转十分重要。近些年, 该领域取得了许多突破性的进展, 阐明叶绿体在胁迫条件下维持平衡的生理和分子机制是提高植物抗性和作物改良的基础。本文集中阐述环境胁迫下植物叶绿体的蛋白导入和降解过程, 首先综述了揭示叶绿体蛋白质导入机制的最新研究, 随后总结了叶绿体蛋白质的水解、泛素化介导的降解、自噬和其他降解途径, 最后提出通过调控叶绿体质量提高作物环境适应性的策略并进行展望。

1 叶绿体蛋白质的导入

叶绿体蛋白质的导入受发育阶段和环境因素

收稿 2018-10-24 修定 2019-04-05

资助 国家自然科学基金(31772356)、国家现代农业产业体系建设专项(CARS-23-C01)、辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划项目(2015040)、国家重点研发计划支持项目(2016YFD0201004)和设施蔬菜辽宁省高等学校创新团队项目(LT2015025)。

* 通讯作者(tianlaili@126.com)。

的精确控制,多个蛋白质复合体介导的光合作用以及代谢反应依赖于光照和温度等环境因素,叶绿体蛋白质的有序导入在调节植物适应性中起着关键作用。叶绿体蛋白质的导入主要包括4个步骤:(1)前体蛋白质在细胞质中的特异性分选;(2)叶绿体外被膜受体的识别;(3)连续的跨膜转运过程;(4)导入后准确的加工与靶向定位(Sjuts等2017)。蛋白质在细胞质中合成、折叠或加工后正确的分选和跨膜转运是其发挥作用的前提。特异性导入叶绿体的前体蛋白质通常包含一段转运肽(chloroplast transit peptide, cTP),cTP是起着靶向信号作用的叶绿体前体蛋白中的一段氨基酸序列(Li和Teng 2013)。在靶向叶绿体的过程中,前体蛋白与许多胞质分子伴侣互作以保持未折叠状态,在被叶绿体外被膜招募后启动蛋白质的跨膜转运(Flores-Pérez和Jarvis 2013)。一些蛋白质必须克服叶绿体外被膜(outer envelope membrane, OEM)和内被膜(inner envelope membrane, IEM)甚至类囊体膜三个障碍,大量的研究表明叶绿体外膜易位子(translocon at the outer membrane of chloroplast, Toc)和内膜易位子(translocon at the inter membrane of chloroplast, Tic)蛋白复合体可加速导入过程。蛋白质的导入还存在其他途径,如一些靶向叶绿体外被膜的信号锚定性蛋白和尾锚定性蛋白以及 β -折叠蛋白,但是通常认为Toc-Tic复合体是叶绿体蛋白质导入的主要方式(Chen和Li 2017)。在导入过程中一些蛋白质插入叶绿体外被膜或内被膜,大部分蛋白质穿过叶绿体内被膜导入基质中,靶向叶绿体内膜或类囊体膜,也有部分蛋白质与基质分子伴侣结合进一步通过多种途径导入类囊体腔中行使功能(Lee等2017)。

1.1 前体蛋白质的特异性识别

新合成的蛋白质准确靶向叶绿体是导入的最初步步骤,位于肽链N端的cTP是该过程所必需的信号元件。cTP在氨基酸组成及长度等一级结构上变异较大,研究表明,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的cTP富含丝氨酸,水稻(*Oryza sativa*)的cTP富含丙氨酸,其长度在13~146个氨基酸之间(Li和Teng 2013)。cTP通常包含具有相似功能的结构域,这些功能包括与脂膜、叶绿体受体及基质加工肽酶

(stromal processing peptidase, SPP)等的相互作用,并且呈现未折叠的状态以招募叶绿体蛋白质导入相关的调控因子(Lee等2013)。cTP的N端一般富含非极性氨基酸残基,中间段富含羟基和带正电荷的氨基酸残基,C端可形成双极性的 β -折叠,而转运到类囊体腔中的前体蛋白cTP中含有与分泌蛋白质相似的疏水序列。cTP的特殊性既决定了不同质体类型、发育阶段及环境条件对前体蛋白的优先选择性,也决定了不同前体蛋白导入途径的优先选择性(Li和Teng 2013)。前体蛋白质在到达叶绿体外被膜与Toc复合体结合之前必须与一些胞质靶向因子互作形成引导复合物,如分子伴侣Hsp70、Hsp90和14-3-3蛋白,这与cTP的磷酸化密切相关(Flores-Pérez和Jarvis 2013; Lee等2013)。Hsp70是叶绿体蛋白质导入过程中最重要的一个分子伴侣,Hsp70能与cTP和前体蛋白的一部分直接相互作用。14-3-3蛋白优先与前体蛋白cTP中被磷酸化的位点结合,与Hsp70一起形成引导复合物,随后被叶绿体外被膜的受体蛋白Toc34和Toc159识别(Paila等2015);Hsp90也能单独与cTP和前体蛋白的部分区域结合并被叶绿体外被膜受体蛋白Toc64识别,此外,近期的研究发现胞质因子锚蛋白AKR2有助于SA蛋白靶向叶绿体外被膜(Kim等2014)。

1.2 跨叶绿体外膜和内膜转运

除了定位于叶绿体外被膜的蛋白之外,绝大部分被识别的前体蛋白通过Toc复合体进入叶绿体被膜间隙。目前证实的Toc蛋白包括Toc34、Toc159、Toc75和Toc64 (Andrès等2010)。Toc159和Toc34均为鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白,其C端均锚定在外被膜中,而将GTP结合结构域暴露在细胞质,分别与cTP的不同区域结合以识别前体蛋白,与Toc159和Toc34相连的是具有 β -桶状结构的蛋白Toc75,这三个蛋白质形成稳定的Toc核心复合体(Andrès等2010)。受GTP调节的Toc159和Toc34特异性识别前体蛋白,然后由通道蛋白Toc75完成转运,在导入过程中前体蛋白能结合到Toc159与GTPase二聚体的表面(Chang等2017)。此外,Toc64也被证实为跨叶绿体外被膜转运的一个重要成分,Toc64是Hsp90结合

前体蛋白的主要识别位点, 并且在识别后将这些前体蛋白传递至Toc34完成转运过程, Toc64蛋白的三个TPR (tetratricopeptide repeat)结构域介导与Hsp90互作的发生(Bionda等2016) (图1)。Zufferey等(2017)发现一个调节激酶KOC1 (kinase at the outer chloroplast membrane 1)与Toc复合体结合并磷酸化Toc159, 对蛋白导入效率至关重要。跨叶绿体外被膜转运完成后, 一些前体蛋白的cTP被定位于内被膜的Plsp1 (plastidic type I signal peptidase 1, 质体I型信号肽酶1)剪切并进一步靶向叶绿体外被膜, 而其他蛋白则通过Tic复合体完成跨叶绿体内被膜转运(Nakai 2015)。在叶绿体被膜间隙中Tic22起着分子伴侣的作用, Tic22与前体蛋白互作以保证由Toc复合体到Tic复合体转运过程中蛋白质的正确靶向(Rudolf等2013)。Tic110是最早证实的Tic成分, 与Toc75相似, 起着内被膜转运通道的作用。Tic110被认为是跨叶绿体内被膜转运的核心蛋白, Tic110先导入叶绿体基质中, 当cTP被切除后再插入叶绿体内被膜发挥作用。另一个与Tic110

直接结合的蛋白质为Tic40, Tic40包含一个单跨膜螺旋, 使其锚定在内被膜中, 而其较大的结构域朝向基质, 使其能够与Tic110和基质分子伴侣Hsp70/93互作辅助完成转运过程(Bédard等2017)。另外发现一个独立于Tic110的跨膜通道蛋白Tic20, 其与Tic56/Tic100/Tic214形成IMD的蛋白复合体, 在前体蛋白的跨叶绿体内被膜转运过程中发挥重要作用(Köhler等2015) (图1)。

1.3 前体蛋白质的基质加工

前体蛋白质进入叶绿体基质后, cTP即被基质加工肽酶SPP剪切, 并折叠形成有活性的结构。这些蛋白存在4种可能的去向: 基质、内被膜、类囊体膜和类囊体腔。叶绿体蛋白质导入的多个步骤均需要GTP以及腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)提供能量, 目前已经确定多个分子伴侣涉及基质中前体蛋白的加工和折叠, 主要有Hsp70、Hsp90、Hsp93和Cpn60 (Sjuts等2017)。目前, 分子伴侣在基质前体蛋白的加工和折叠中存在两个不同的作用: (1) Hsp93通过降解错误靶向或折叠的蛋白质, 在质量控制途径起着重要作用, 在这个过程中ATP提供的能量主要被Hsp70消耗而非Hsp93; (2) Hsp93能够与导入蛋白的cTP直接结合, 而Hsp70结合到蛋白的成熟区域, 在加工过程中Hsp93与Hsp70起着平行的作用(Lee等2017)。基质中导入前体蛋白的cTP被剪切后, 不同的分子伴侣如Hsp70与Cpn60使蛋白折叠成有活性的结构并进一步靶向类囊体膜。此外LTD (light-harvesting chlorophyll-binding protein translocation defect, 捕光叶绿素结合蛋白易位缺陷)蛋白对捕光色素结合蛋白的导入及分选到信号识别颗粒依赖途径(signal recognition particle, SRP)十分重要(Jeong等2017)。

1.4 跨类囊体膜转运

叶绿体前体蛋白靶向或穿过类囊体膜的过程十分复杂, 目前已经证实主要有4条不同的靶向途径(图2)。其中有两条途径将基质中的蛋白靶向类囊体膜: SRP和一个不依赖任何目前已知靶向机构的途径。另外两条途径将基质中的蛋白跨类囊体膜转运至类囊体腔中: Sec (secretion, 分泌)途径和Tat (twin-arginine translocation, 双精氨酸转运)途径(Albinlak等2012)。Sec途径主要通过SecA使ATP

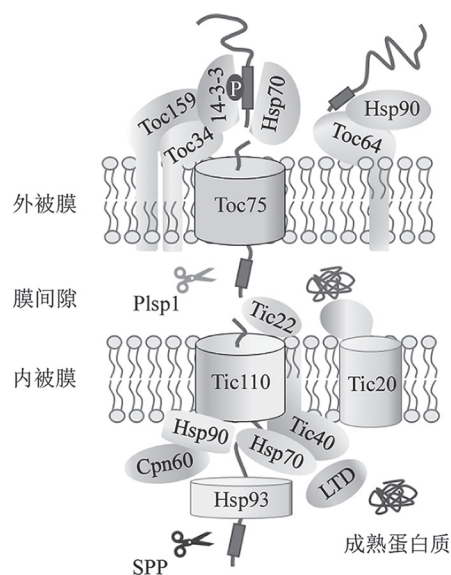


图1 Toc-Tic复合体转运机制

Fig.1 Translocation mechanism of Toc-Tic complex

前体蛋白被引导复合物识别, 通过Toc复合体(Toc34、Toc64、Toc75和Toc159)进入膜间隙, 进一步被Tic复合体(Tic20、Tic22、Tic40和Tic110)转运至叶绿体基质中。Cpn60: 伴侣蛋白60; Hsp70、Hsp90和Hsp93: 热休克蛋白; LTD: 捕光叶绿素结合蛋白易位缺陷; Plsp1: 质体I型信号肽酶1; SPP: 基质加工肽酶。

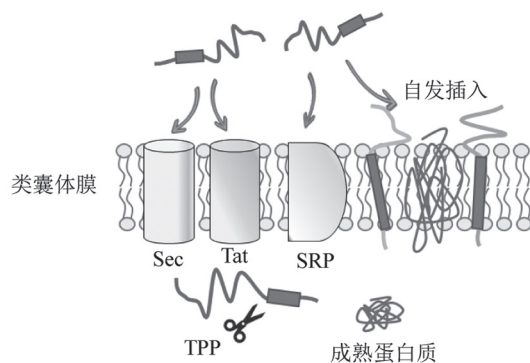


图2 类囊体膜插入和转运途径

Fig.2 Insert and translocation pathway of thylakoid membrane

基质前体蛋白质通过SRP (信号识别颗粒依赖途径)或自发插入靶向类囊体膜,通过Sec (分泌)、Tat (双精氨酸转运)途径跨类囊体膜转运。TPP: 类囊体加工肽酶。

水解驱动前体蛋白以未折叠的形式跨膜转运, Tat途径利用跨类囊体膜质子动力势驱动底物蛋白以折叠状态转运, 这种特殊性使Tat途径从发现起就备受关注(de Jesus等2017)。靶向类囊体腔的前体蛋白在细胞质中合成时N端包含两个转运肽信号, 在到达基质中第一段转运肽信号被SPP剪切, 暴露出类囊体信号肽, 在转运至类囊体腔后被类囊体加工肽酶(thylakoid processing peptidase, TPP)剪切(Lee等2017)。

2 叶绿体蛋白质的多种降解途径

叶绿体在进行能量生产时连续不断地产生氧化损伤, 为了不影响叶绿体的生理活性, 受损伤的叶绿体及其组分需要被及时降解替换。叶片中超过80%的氮位于叶绿体中, 除了维持叶绿体平衡和管理胁迫诱导的损伤成分外, 叶绿体降解还能使养分循环再利用, 是植物应对环境变化时的一种重要调节机制。叶绿体蛋白质的降解有多种途径(图3), 包括叶绿体内蛋白酶的水解作用、泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-26S proteasome system, UPS)、叶绿体选择性自噬、衰老相关的液泡降解途径等。

2.1 叶绿体蛋白质水解

在近二十年中, 利用生物化学、遗传学、生物信息学、蛋白质组学等技术, 在叶绿体中证实

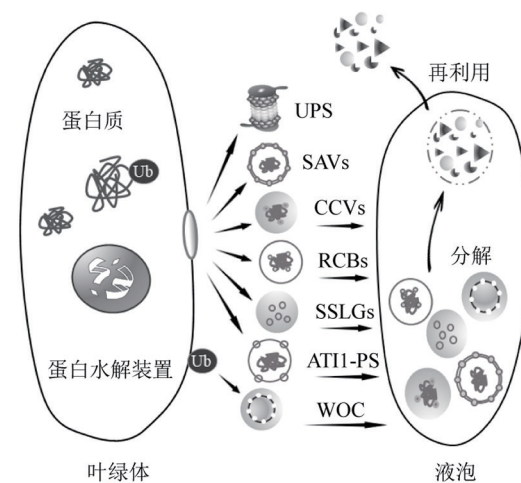


图3 植物叶绿体蛋白质降解的多种途径

Fig.3 Multiple degradation pathway of chloroplast protein

叶绿体蛋白质通过叶绿体内蛋白的水解、UPS (泛素-蛋白酶体系统)途径降解、SAVs (衰老相关的液泡)途径降解、CCVs (包含叶绿体囊泡化蛋白的囊泡)途径转运至液泡或通过形成ATI1-PS (ATG8-interacting protein 1 plastid bodies)、RCBs (RuBisCO-containing bodies)、SSLGs (small starch-like granule bodies)、WOC (整个叶绿体的自噬)等自噬体进入液泡中降解, 这些成分被降解后可在细胞内循环再利用。Ub: 泛素。

了超过20个蛋白质水解酶。目前研究包括: Clp (caseinolytic protease)、Deg (degradation of periplasmic)、FtsH (filamentation temperature-sensitive H)、PreP (presequence peptidase)以及Cnd41 (chloroplast nucleoid DNA-binding protein 41)等(Nishimura等2017)。叶绿体Clp复合体主要由3部分构成: 蛋白水解核心ClpPRT、依赖ATP的分子伴侣ClpC和ClpD, 以及接头蛋白ClpS1。利用反义核酸技术下调植物中Clp亚基的表达水平能影响质体发育和质体蛋白质组的稳态, 使植物胚胎发育或植株生长异常(Kim等2015)。拟南芥中共有16个Deg蛋白, 其中Deg1、Deg5和Deg8在类囊体腔中起作用, Deg2和Deg7定位于叶绿体基质, 它们在不同的场所参与降解受损的D1蛋白, 加速D1蛋白的周转, 从而提高PSII (光系统II)的运转效率。FtsH蛋白是一种依赖ATP的金属蛋白酶, 拟南芥叶绿体中包含9个FtsH蛋白, 其中4个锚定在类囊体膜上并与分子伴侣等形成复合体水解叶绿体蛋白, 最终将10~20个氨基酸长度的多肽释放到基质中。FtsH7/9/11/12定位于叶绿体被膜中, 其中FtsH11起着抗热性但

与小热激蛋白作用方式不同,对连续光照下叶绿体的结构和功能起着重要作用(Wagner等2016)。PreP主要降解叶绿体基质中游离转运肽和一些无序短肽, *AtPreP1*或*AtPreP1 AtPreP2*双突变体拟南芥植株在早期发育中叶绿体和线粒体的形态结构异常,植株的生物量积累降低(Cederholm等2009)。Cnd41最初被认为是一个叶绿体DNA结合蛋白,在叶绿体膜和基质中均有发现,且只在膜上与DNA结合。其蛋白水解活性被DNA抑制,暗示只在基质中起着蛋白水解的作用,后来的研究发现其只能识别和降解衰老或其他因素诱导的受损的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)水解(Kato等2004)。

2.2 叶绿体的泛素-蛋白酶体降解系统

在蛋白质被选择性降解的过程中泛素化是一个关键信号,许多蛋白的降解都依赖泛素-蛋白酶体系统(Marshall等2015; Hua和Vierstra 2016; 游全远和何祖华2016)。UPS能通过E3连接酶选择性识别并降解特异的泛素化蛋白底物。叶绿体和UPS之间的关系是通过对一个SP1 (suppressor of *ppi1* locus 1) E3连接酶的研究揭示的,SP1能引导UPS介导叶绿体外被膜Toc成分的降解,从而调节叶绿体蛋白质水平、功能和发育(Ling等2012)。进一步研究发现SP1在抗非生物胁迫中也起着重要作用,在盐胁迫、渗透胁迫或氧化胁迫下, *SP1*缺失突变体对胁迫更敏感,而*SP1*过表达加强了抗逆性;在胁迫条件下SP1被激活以清除Toc成分: *SP1*过表达植株降低了叶绿体蛋白新成分的导入、光合机构成分的稳态水平和ROS含量,而*SP1*缺失突变体表现出相反的结果(Ling和Jarvis 2015)。近期一项研究首次揭示了泛素化蛋白修饰在调节单个叶绿体响应胁迫环境的新作用:一个在特定条件下能致死的拟南芥突变体*fc2* (ferrochelatase 2)在叶绿体中能积累过量的原卟啉IX和单线态氧,随后受损的叶绿体被泛素化,从而加速了整个受损叶绿体的选择性降解,遗传筛选证实在这个过程中PUB4 (plant U-box 4) E3连接酶是必需的,而*Pub4-6*突变体植株不具备胁迫适应性并表现出更早死亡(Woodson等2015)。中度胁迫下定位于叶绿体的SP1 E3连接酶

介导特异的Toc成分通过26S蛋白酶体降解,降低光合机构成分的水平从而降低光合效率,避免过多ROS的产生和叶绿体损伤;而严重胁迫下, PUB4 E3连接酶能泛素化叶绿体外膜蛋白,进一步促发整个受损叶绿体的液泡降解(Ling和Jarvis 2015)。

2.3 叶绿体选择性自噬

自噬是真核生物细胞内普遍存在的大分子降解过程,在自噬相关基因(autophagy-related genes, ATGs)的调控下形成自噬体并将一些多余或受损的胞内物质送入液泡中降解,降解的物质能够循环再利用,这有利于维持细胞内稳态。在养分饥饿、衰老或光损伤等能加速叶绿体周转的条件下自噬被加强,衰老的拟南芥叶片中,许多叶绿体成分被降解,而在光损伤条件下,28%的叶绿体被运送到液泡中降解(Evans等2010)。叶绿体的选择性自噬降解主要有两种方式:通过RCBs (RuBisCO-containing bodies)、ATI1-PS (ATG8-interacting protein 1 plastid bodies)和SSLGs (small starch-like granule bodies)介导的叶绿体组分的自噬以及整个叶绿体的自噬(whole-organellar chlorophagy, WOC) (Ishida和Yoshimoto 2008)。RCBs能够与ATG8互作进而被自噬体包裹转运至液泡中降解。在衰老或黑暗处理下RCBs被上调,表明该途径对能量限制条件下的养分重塑十分重要(Izumi等2010)。在拟南芥中,RCBs的形成和运输依赖于细胞内碳营养的状态并且可以被光照或在基质中添加糖所抑制,表明碳饥饿引起RCBs的自噬降解可以对来自于基质蛋白和RuBisCO小亚基的能量和碳进行再利用(Lee等2013)。与野生型相比,在拟南芥*atg5*突变体的液泡内RCBs没有积累(Ishida和Yoshimoto 2008)。最近的研究发现ATI1能与叶绿体蛋白质和自噬结构的核心蛋白ATG8互作介导特异质体蛋白的选择性自噬,碳饥饿诱导的ATI1定位于内质网并最终转运至液泡中降解,并且ATI1的形成与拟南芥抗盐性有关(Michaeli等2014)。此外,整个叶绿体也能通过自噬被运送到液泡中降解,黑暗处理可以加速植株衰老进程,降低叶片中叶绿体数量和大小,而*atg4a4b-1*突变抑制了这种降低效应。在自噬缺失突变体植株的液泡中并未观察到靶向基质的红色荧光标记基因信号、叶绿素荧光

和RCBs, 这为叶绿体转运到液泡提供了直接的证据(Wada等2009)。Izumi等(2017)利用荧光蛋白标记自噬膜进一步观察到自噬体能够介导整个叶绿体转运至中央液泡, 并且碳饥饿诱导的自噬主要通过RCBs途径将基质中的一部分成分转运至液泡, 光氧化损伤诱导的自噬则是将整个叶绿体转运至液泡。

2.4 衰老相关的液泡降解途径

人工或自然条件诱导的衰老过程中, 拟南芥和烟草(*Nicotiana tabacum*)包含叶绿体的细胞中形成衰老相关的液泡(senescence-associated vacuoles, SAVs), SAVs具有较强的蛋白水解活性, 且与中央大液泡显著不同: SAVs酸性更强, 且膜上缺少水通道蛋白(Otegui等2005)。SAVs展现出较强的半胱氨酸蛋白酶活性, 一个定位于SAVs的半胱氨酸蛋白酶SAG12 (senescence associated 12)可能起着重要作用, *sag12*突变体中的SAVs同样具有蛋白酶活性, 这表明SAVs不仅包含SAG12这一种蛋白酶(Otegui等2005)。黑暗条件下乙烯处理离体的烟草叶片加速了叶绿体的降解, 同时每个细胞中SAVs的数量提高了2倍, 分离的SAVs包含靶向叶绿体的绿色荧光蛋白、叶绿体基质蛋白RuBisCO和谷氨酰胺合成酶II, 但不含类囊体膜蛋白D1和捕光色素复合物II。SAVs还表现出降低了RuBisCO的含量, 但该效应被添加蛋白酶抑制剂所消除, 这些结果证实了SAVs参与叶绿体蛋白质的降解(Carrión等2013)。与自噬体不同的是, SAVs自身能够降解叶绿体成分, 但SAVs的形成和叶绿体成分转运至SAVs降解的机制仍然未知。

2.5 叶绿体囊泡化降解途径

近年来发现另外一个被称为叶绿体囊泡化(chloroplast vesiculation, CV)的质体外降解途径, 又称包含叶绿体囊泡化蛋白的囊泡(chloroplast vesiculation-containing vesicles, CCVs)途径(Wang和Blumwald 2014)。CV是一个能使叶绿体囊泡化的蛋白质, 在所有已测序的植物中均存在CV的同源基因。在拟南芥中, CV靶向叶绿体并与类囊体、基质或被膜蛋白互作。黑暗和非生物胁迫能够诱导拟南芥CV的表达从而激活CV途径, 在靶向叶绿体后, CV打破叶绿体平衡并诱导囊泡的形成, 随后

CCVs将基质蛋白、被膜蛋白和类囊体膜蛋白转运至液泡中水解。过表达CV导致叶绿体降解和叶片提前衰老, 而沉默CV能延迟非生物胁迫诱导的叶绿体周转和衰老过程并表现出加强抗旱性、抗盐性和抗氧化胁迫能力。免疫沉淀和双分子荧光互补试验表明CV通过在植物中高度保守的C端基序与PSII亚基PsbO1互作(Wang和Blumwald 2014)。CV在胁迫诱导的叶绿体降解中起着重要作用, 从生物技术的角度看, 沉默CV基因为获得抗非生物胁迫的转基因作物提供了一个合理的策略。在水分亏缺条件下, 水稻CV表达量被上调, *OsCV*沉默植株表现出加强碳和氮的固定效率, 提高对水分亏缺的抗性, 并且*OsCV*能与叶绿体谷氨酰胺合成酶互作从而影响胁迫下植物源-库平衡, 加强植物环境适应性(Sade等2017)。

3 通过调控叶绿体蛋白质周转提高作物环境适应性

叶绿体中进行的光合作用和代谢反应直接影响植株的生产能力, 相关蛋白质极易受波动环境的干扰, 该过程中多种信号途径包括光信号的反馈调节和质体反向信号以及一些转录因子参与叶绿体稳态的维持。叶绿体蛋白质的导入和降解与植物发育过程和胁迫响应密切相关, 通过调节叶绿体蛋白质的导入和降解靶向控制叶绿体质量是提高作物环境适应性的一种重要策略。被称为环境感受器的叶绿体能与细胞核之间通过快速的物质交换和信息交流协同调控光合作用相关叶绿体和核编码基因的表达, 进而发挥一系列重要生理功能(de Souza等2017; Wang等2017)。捕光色素复合物能够捕获光能用于光合作用, 近期的研究表明光受体信号可以使捕光色素复合物从捕光模式切换到能量耗散模式, 从而降低胁迫损伤, 维持叶绿体的正常功能(Petroutsos等2016)。蓝光受体介导的蓝光信号能够与光合信号整合反馈调节光合作用(Petroutsos等2016); 质体反向信号是叶绿体与细胞核交流的主要语言, 质体平衡被干扰后通过激活一个或多个反向信号改变转录水平并反馈调节质体功能(徐秀美等2016)。一类与光合作用相关的转录因子特异执行叶绿体发育相关的基因表达调

控。光受体感知不同光信号后主要通过转录因子的作用改变通路下游的基因表达(Kong和Okajima 2016)。在拟南芥中至少有41个转录因子与光受体有关,一些转录因子只响应一个光受体,另一些则能响应多个光受体(Wang等2017)。一些激素相关的转录因子能够促进光合基因表达并促进质体发育(Zhao等2017; Vercruyssen等2015)。

叶绿体蛋白质导入与降解是叶绿体质量控制的“门控开关”,可以被多种途径在多个水平所调控,包括氧化还原状态、磷酸化、泛素化以及细胞质和叶绿体基质中的分子伴侣等。叶绿体中的光合电子传递是一个动态的氧化还原过程,作物在逆境条件下积累大量的活性氧,氧化还原状态的失衡影响Toc和Tic复合物等转运机构从而调节导入活性,并且研究表明氧化还原状态只起调节作用而不作为导入开关(Sjuts等2017)。膜受体的异源二聚化以及与受体结合活性受磷酸化的直接调节,在一些环境胁迫下,蛋白质翻译修饰机制使一些Toc受体蛋白磷酸化从而改变Toc复合物的稳定性(Zufferey等2017)。此外,磷酸化还能通过加强环境胁迫下外被膜泛素E3连接酶降解Toc成分,从而间接地调控蛋白导入,同时泛素化也是促发叶绿体降解的关键信号。自噬和囊泡是降解叶绿体及其成分的最后步骤,而最初步骤仍然不清楚。一项新的研究表明,靶向叶绿体的13-脂氧合酶(13-lipoxygenase, 13-LOX)在程序化损伤叶绿体中起着重要作用,13-LOX能催化叶绿体被膜的不饱和脂肪酸脱氧化从而形成叶绿体及其成分的输出通道,使大量的基质蛋白能够跨膜释放(Springer等2016)。

4 研究展望

叶绿体蛋白质的选择性导入和降解与植物发育过程密切相关,并且对环境胁迫下叶绿体稳态和正常功能的维持至关重要。叶绿体蛋白质导入和降解过程是调控叶绿体质量的关键,通过质-核信息交流、相关转录因子和叶绿体质量的“门控开关”靶向控制叶绿体质量是维持胁迫条件下作物环境适应性的一种重要途径。关于叶绿体蛋白质导入的分子机制和相关调控已有大量的报道,叶绿体及其组分的多种降解途径也逐渐被揭示,然而

叶绿体维持平衡的分子机理仍然需要进一步探索,特别是植物自身如何协同调控蛋白质导入和降解以适应胁迫的环境。蛋白质的跨膜导入和输出通道是叶绿体质量控制的关键位点,通过对该“门控开关”的理解靶向控制叶绿体质量是调控叶绿体内光合作用和代谢反应的关键,也是提高植物环境适应性的一种新途径,这将成为未来研究的热点方向。随着生物技术的发展,利用基因组编辑技术精确地探索参与叶绿体质量控制的蛋白质功能将是未来一段时期内研究的重点。质体反向信号的主要功能是调控细胞核编码叶绿体相关基因表达、维持叶绿体平衡和光合作用的正常运转,因此,在环境胁迫下管理质体反向信号途径是靶向控制叶绿体质量的一个重要策略,质体信号在叶绿体蛋白质导入与降解过程中的作用机制也值得研究者进行深入的探究。叶绿体中进行的光合作用反应对环境十分敏感,且响应机制十分复杂,维持叶绿体平衡相关的转录调控网络、蛋白相互作用以及细胞器之间的信息交流和物质交换仍然需要进一步阐明。靶向调控叶绿体蛋白周转对植物环境适应性和在主要农作物和园艺作物产量和品质形成的潜在作用仍有待进一步评估。

参考文献(References)

- Albinlak AM, Baglieri J, Robinson C (2012). Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane. *J Exp Bot*, 63 (4): 1689–1698
- Andr s C, Agne B, Kessler F (2010). The TOC complex: pre-protein gateway to the chloroplast. *BBA-Mol Cell Res*, 1803 (6): 715–723
- Bédard J, Tr sch R, Wu F, et al (2017). Suppressors of the chloroplast protein import mutant *tic40* reveal a genetic link between protein import and thylakoid biogenesis. *Plant Cell*, 29 (7): 1726–1747
- Bionda T, Gross LE, Becker T, et al (2016). Eukaryotic Hsp70 chaperones in the intermembrane space of chloroplasts. *Planta*, 243 (3): 733–747
- Carrión CA, Costa ML, Martínez DE, et al (2013). *In vivo* inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of ‘senescence-associated vacuoles’ in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *J Exp Bot*, 64 (16): 4967–4980
- Cederholm SN, B ckman HG, Pesaresi P, et al (2009). Deletion of an organellar peptidosome PreP affects early development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 71:

- 497–508
- Chang JS, Chen LJ, Yeh YH, et al (2017). Chloroplast preproteins bind to the dimer interface of the Toc159 receptor during import. *Plant Physiol*, 173 (4): 2148–2162
- Chen LJ, Li HM (2017). Stable megadalton TOC–TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. *Plant J*, 92 (2): 178–188
- de Jesus MPRH, Nielsen AZ, Mellor SB, et al (2017). Tat proteins as novel thylakoid membrane anchors organize a biosynthetic pathway in chloroplasts and increase product yield 5-fold. *Metab Eng*, 44: 108–116
- de Souza A, Wang JZ, Dehesh K (2017). Retrograde signals: integrators of interorganellar communication and orchestrators of plant development. *Annu Rev Plant Biol*, 68: 85–108
- Evans IM, Rus AM, Belanger EM, et al (2010). Dismantling of *Arabidopsis thaliana* mesophyll cell chloroplasts during natural leaf senescence. *Plant Biol*, 12 (1): 1–12
- Flores-Pérez Ú, Jarvis P (2013). Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *BBA-Mol Cell Res*, 1833 (2): 332–340
- Ishida H, Yoshimoto K (2008). Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy*, 4 (7): 961–962
- Izumi M, Ishida H, Nakamura S, et al (2017). Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *Plant Cell*, 29 (2): 377–394
- Izumi M, Wada S, Makino A, et al (2010). The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 154 (3): 1196–1209
- Jeong J, Baek K, Yu J, et al (2017). Deletion of the chloroplast LTD protein impedes LHCI import and PSI–LHCI assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot*, 69 (5): 1147–1158
- Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, et al (2004). The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, 220 (1): 97–104
- Kim DH, Park MJ, Gwon GH, et al (2014). An ankyrin repeat domain of AKR2 drives chloroplast targeting through coincident binding of two chloroplast lipids. *Dev Cell*, 30 (5): 598–609
- Kim J, Kimber MS, Nishimura K, et al (2015). Structures, functions, and interactions of ClpT1 and ClpT2 in the Clp protease system of *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*, 27 (5): 1477–1496
- Köhler D, Montandon C, Hause G, et al (2015). Characterization of chloroplast protein import without Tic56, a component of the 1-MDa TIC translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant Physiol*, 167 (3): 972–990
- Kong SG, Okajima K (2016). Diverse photoreceptors and light responses in plants. *J Plant Res*, 129 (2): 111–114
- Lee DW, Jung C, Hwang I (2013). Cytosolic events involved in chloroplast protein targeting. *BBA-Mol Cell Res*, 1833 (2): 245–252
- Lee DW, Lee J, Hwang I (2017). Sorting of nuclear-encoded chloroplast membrane proteins. *Curr Opin Plant Biol*, 40: 1–7
- Li HM, Teng YS (2013). Transit peptide design and plastid import regulation. *Trends Plant Sci*, 18 (7): 360–366
- Ling Q, Huang W, Baldwin A, et al (2012). Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science*, 338 (6107): 655–659
- Ling Q, Jarvis P (2015). Regulation of chloroplast protein import by the ubiquitin E3 ligase SP1 is important for stress tolerance in plants. *Curr Biol*, 25 (19): 2527–2534
- Michaeli S, Honig A, Levanony H, et al (2014). *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell*, 26 (10): 4084–4101
- Nakai M (2015). The TIC complex uncovered: the alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *BBA-Bioenergetics*, 1847 (9): 957–967
- Nishimura K, Kato Y, Sakamoto W (2017). Essentials of proteolytic machineries in chloroplasts. *Mol Plant*, 10 (1): 4–19
- Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, et al (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J*, 41 (6): 831–844
- Paila YD, Richardson LGL, Schnell DJ (2015). New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *J Mol Biol*, 427 (5): 1038–1060
- Petroutsos D, Tokutsu R, Maruyama S, et al (2016). A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis. *Nature*, 537 (7621): 563–566
- Rudolf M, Machettira AB, Groß LE, et al (2013). *In vivo* function of Tic22, a protein import component of the intermembrane space of chloroplasts. *Mol Plant*, 6 (3): 817–829
- Sade N, Umnajkitikorn K, Wilhelmi MMR, et al (2017). Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. *J Exp Bot*, 69 (4): 867–878
- Sjuts I, Soll J, Bölder B (2017). Import of soluble proteins into chloroplasts and potential regulatory mechanisms. *Front*

- Plant Sci, 8: 168
- Springer A, Kang CH, Rustgi S, et al (2016). Programmed chloroplast destruction during leaf senescence involves 13-lipoxygenase (13-LOX). *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (12): 3383–3388
- Vercruyssen L, Tognetti VB, Gonzalez N, et al (2015). GROWTH REGULATING FACTOR5 stimulates *Arabidopsis* chloroplast division, photosynthesis, and leaf longevity. *Plant Physiol*, 167 (3): 817–832
- Vermeulen SJ, Campbell BM, Ingram JSI (2012). Climate change and food systems. *Annu Rev Env Resour*, 37: 195–222
- Wada S, Ishida H, Izumi M, et al (2009). Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol*, 149 (2): 885–893
- Wagner R, von Sydow L, Aigner H, et al (2016). Deletion of FtsH11 protease has impact on chloroplast structure and function in *Arabidopsis thaliana* when grown under continuous light. *Plant Cell Environ*, 39 (11): 2530–2544
- Wang P, Hendron RW, Kelly S (2017). Transcriptional control of photosynthetic capacity: conservation and divergence from *Arabidopsis* to rice. *New Phytol*, 216 (1): 32–45
- Wang S, Blumwald E (2014). Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell*, 26 (12): 4875–4888
- Woodson JD, Joens MS, Sinson AB, et al (2015). Ubiquitin facilitates a quality-control pathway that removes damaged chloroplasts. *Science*, 350 (6259): 450–454
- Xu XM, Chi W, Zhang LX (2016). Recent advances in plastid retrograde signaling. *Plant Physiol J*, 52 (11): 1618–1626 (in Chinese with English abstract) [徐秀美, 迟伟, 张立新(2016). 质体反向信号研究进展. *植物生理学报*, 52 (11): 1618–1626]
- You QY, He ZH (2016). Research advances on ubiquitin-26S proteasome-mediated plant immunity. *Plant Physiol J*, 52 (6): 771–781 (in Chinese with English abstract) [游全远, 何祖华(2016). 泛素-26S蛋白酶体系统参与调控植物免疫研究进展. *植物生理学报*, 52 (6): 771–781]
- Zhao P, Cui R, Xu P, et al (2017). ATHB17 enhances stress tolerance by coordinating photosynthesis associated nuclear gene and *AT5G5* expression in response to abiotic stress. *Sci Rep*, 7: 45492
- Zufferey M, Montandon C, Douet V, et al (2017). The novel chloroplast outer membrane kinase KOC1 is a required component of the plastid protein import machinery. *J Biol Chem*, 292 (17): 6952–6964

Recent advances in chloroplast protein turnover and potential applications

YANG Xiao-Long, LI Yang-Yang, LIU Yu-Feng, QI Ming-Fang, LI Tian-Lai*

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Protected Horticulture of Education Ministry and Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Northern Horticultural Facilities Design & Application Technology (Liaoning), Shenyang 110866, China

Abstract: The normal chloroplast turnover is necessary for keeping efficient operation of photosynthesis and metabolic reactions under stress condition. The understanding of the physiological and molecular mechanisms of the maintenance of chloroplasts homeostasis is the basis for controlling chloroplast quality in plants, which involves two important physiological processes: the import and degradation of chloroplast proteins. The orderly import of chloroplast proteins and the timely degradation of damaged chloroplast and its components play a key role in the regulation of plant environmental acclimation. This paper firstly reviews the mechanism of chloroplast proteins import, then, multiple degradation pathways of chloroplast proteins were introduced and, finally, the strategies for improving environmental adaptability of crops through chloroplast quality control were summarized and prospected.

Key words: chloroplast protein import; selective autophagy; plastid retrograde signaling; environmental stresses

Received 2018-10-24 Accepted 2019-04-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31772356), the China Agriculture Research System (CARS-23-C01), Liaoning Province Youth Science and Technology Innovation Talents Training Program (2015040), National Key Research and Development Program Support Project (2016YFD0201004), and Liaoning Province Higher Education Innovation Team of Facilities and Vegetables (LT2015025).

*Corresponding author (tianlaili@126.com).