

植物受体激酶的结构与功能研究进展

韩志富[†], 肖裕[†], 宋文, 王继纵, 林光忠, 张晓晓, 柴继杰^{*}

清华大学生命科学学院, 北京 100084

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: chajj@tsinghua.edu.cn

2018-04-28 收稿, 2018-06-11 修回, 2018-06-12 接受, 2018-08-01 网络版发表

国家自然科学基金重点项目(31130063)和国家自然科学基金国际(地区)合作研究与交流项目(31420103906)资助

摘要 作为多细胞营固着生长的生命体, 植物需要对外界多变的环境及内部不同组织细胞之间协调发育的多样信号做出精确的反应. 与多细胞动物主要通过数量巨大的GPCR等受体蛋白参与细胞与环境及细胞之间的交流不同, 植物主要靠数目庞大的植物受体激酶来完成相应功能. 通过30多年的深入研究, 植物受体激酶的功能研究取得了极大的进展, 研究发现, 植物受体激酶参与植物多种多样的生理病理过程, 包括生长发育、气孔发育、分生组织发育、抗病、花粉管吸引和自交不亲和等. 这些受体激酶的结构生物学研究在近10年取得了一系列重要的成果, 使我们各种受体激酶的配体识别及活化机制有了系统的认识. 2017年国家自然科学奖二等奖授予“油菜素内酯等受体激酶的结构与功能研究”, 也是对这些成果的肯定. 本综述对参与不同过程的受体激酶结构进行总结描述, 随后对受体激酶的识别及活化规律进行总结, 最后对该领域尚未解决的问题及研究方向提出展望.

关键词 植物, 受体激酶, 配体识别, 受体活化, 结构生物学

1 植物受体激酶简介

与动物的生活习性不同, 植物突出的特点是拥有细胞壁营自养的固着生长生命体. 植物为整个地球上的生命系统提供基础, 其不仅为人类提供了食品、木材、药物和燃料, 还营造了美好的生活环境. 多细胞的动物与环境及不同细胞之间的交流主要是由细胞膜上的受体蛋白(GPCR, 酪氨酸受体激酶和TLR等)来执行. 经过长期努力地寻找, 人们在植物中并没有发现典型的动物类似受体蛋白. 多种植物基因组测序及遗传学研究揭示, 在植物基因中存在大量的受体激酶样受体(模式生物拟南芥中存在600多个, 重要粮食作物水稻中含有1000多个)承担着类似动物中受体的多种多样功能^[1]. 例如, BRI1 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1)通过识别植物重要小分子激素油菜素内酯来影响植物的生长与发育; 模

式识别受体CERK1, FLS2, EFR和PEPR1/2分别通过识别真菌模式分子几丁质、病原细菌的模式分子鞭毛蛋白、翻译延长因子和植物内源性的多肽信号PEP来启动植物的基本防御反应; 具有自交不亲和性的植物通过存在于柱头乳突细胞表面的SRK受体激酶选择性识别自己或非己来源花粉上存在的具有高度多态性的SCR小肽以达到异源受粉的目的; 豆科的NFR1和NFR5受体激酶通过识别根瘤菌的成瘤因子来启动根瘤器官的形成; 位于花粉管尖端的PRK6受体激酶通过识别雌性助细胞分泌的LURE小肽激素来引导花粉管尖端的生长方向以完成受精等. 植物受体激酶是含有单次跨膜结构域的膜蛋白. 植物受体激酶的基本结构包含3部分: 决定结合配体特异性的膜外结构域、单次跨膜螺旋结构域及胞内的信号传递激酶结构域. 内源性生长发育信号或外源性病原

引用格式: 韩志富, 肖裕, 宋文, 等. 植物受体激酶的结构与功能研究进展. 科学通报, 2018, 63: 2921–2931

Han Z F, Xiao Y, Song W, et al. Structural and functional studies of plant receptor kinases (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 2921–2931, doi: 10.1360/N972018-00412

微生物的危险信号与胞外的配体识别结构域结合后,诱导受体激酶形成同源或异源二聚体或寡聚体来激活胞内的激酶结构域,进而通过磷酸化及去磷酸化信号级联放大通路激活下游调控基因的表达,引起生长或抗病等各种不同表型。经过长期大量的遗传及生化研究,人们已对多种受体激酶参与的遗传通路取得了很大的进步,但是在一些关键性问题上进展缓慢,例如:不同的受体是如何识别化学性质完全不同的配体?受体激酶的活化是否有基本的规律?这些规律能否指导我们寻找新的未知功能的受体所对应的配体或未知功能的配体所对应的受体?等。10年来,多个典型受体激酶与配体或共受体复合物晶体结构得到了解析,这些结构不仅揭示了许多不同受体激酶识别配体的特异性及活化规律,而且在这些规律的指导下也发现了一些新的配体的未知受体或一些受体的未知配体。下面我们将结合这些解析的受体激酶结构来综述相关领域的进展。

2 植物受体激酶配体识别和活化的分子机制

2.1 植物小分子激素-油菜素内酯的受体识别及活化机制

尽管典型的小分子激素(包括生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸及乙烯等)在调控植物的各种生理及病理过程中发挥重要的作用已经被大家充分认识,但是对小分子——油菜素内酯作为重要的调控植物生长的激素的认识还是近30年的事情^[2]。油菜素内酯是植物体中的一类甾类激素,在化学结构上与动物类固醇激素类似。油菜素内酯调控很多生长发育的过程,包括植物茎和根的生长、维管发育、光形态建成和花粉管伸长等。许多遗传和生化的数据都证明含有亮氨酸重复基序(leucine-rich repeat, LRR)结构域的BRI1受体激酶是油菜素内酯BL (brassinolide)的主要受体^[3,4]。利用昆虫表达体系,本实验室与Chory实验室在2011年同时解析了拟南芥BRI1受体激酶胞外区单独或与激素BL复合的晶体结构^[5,6]。结构显示,BRI1胞外区包括25个亮氨酸重复基序及位于21与22基序之间的由70个氨基酸构成的岛状结构域。与动物中典型的含LRR基序蛋白TLR形成的平面马蹄型结构不同,植物BRI1受体激酶形成一个高度扭曲的螺旋管状结构。岛状结构域在没有配体结合

时松散地结合在螺旋管凹面,结合配体后,岛状结构域与LRR螺旋的连接处密度变得清晰起来,表明BL配体的结合呈现诱导契合的模型。晶体结构表明,岛状结构域与临近的LRR基序骨架共同构成一个可以容纳BL的小坑,BRI1蛋白与BL识别的作用力主要由疏水相互作用构成,同时形成了很好的形状与电荷互补,这也可以解释为什么BRI1受体可以结合许多结构类似但不完全相同的油菜素内酯类化合物。从结构上看,BRI1高度的螺旋状结构及配体结合在螺旋管的凹面表明,配体介导的BRI1受体激酶同源二聚化活化模型是不合理的,两个组都推测可能需要一个含有小的受体激酶来完成BRI1受体激酶的活化及下游信号转导。BRI1结构的解析是植物LRR型受体激酶的第一个结构,其不仅仅解释了BRI1是如何识别BL的,更重要的是突破了以前人们认为的动物甾类激素,如雄激素等,主要是由核内或胞浆的受体识别的模式,表明细胞膜表面也可以作为甾类激素发挥作用的部位,对人们长期以来苦苦寻找的哺乳动物甾类激素膜表面受体有重要启示意义^[7]。在结构的启示及遗传学信息的指导下,本实验室在2013年又解析了BRI1^{LRR}-BL-BAK1^{LRR}三元复合物晶体结构(图1(a)),明确了BRI1受体的异源二聚化活化模型^[8]。这也从结构上揭示BAK1确实直接参与配体BL的直接识别,是真正的共受体。这个复合物结构的解析也对许多重要的体内遗传突变等结果给出了合理的解释^[9,10]。另外一个出乎意料的发现是,BRI1-BAK1异源二聚体的形成不仅需要配体BL,而且还受到溶液pH的影响:酸性条件有利于促进BRI1-BAK1形成异源二聚体。这些实验结果提示,BAK1在这两种现象中扮演着整合的角色。这些结论也由另外一个实验室同时解析的BRI1^{LRR}-BL-SERK1^{LRR}复合物结构所验证^[11]。遗传及细胞证据也表明,BRL1~3也是植物体内BRI1的同源基因,它可以部分代替BRI1的生理功能。为了阐明它们在识别BL上的异同,本实验室也解析了BRI1同源基因BRL1与激素BL复合物的晶体结构,结构的比对结果揭示了同源受体间识别不同BL的结构差异基础^[12]。

2.2 模式识别受体CERK1或OsCEBiP识别真菌模式分子几丁质的分子机制

先天免疫是动植物免疫系统的第一道防线,使动植物仅仅利用很少的模式识别受体就可以识别微

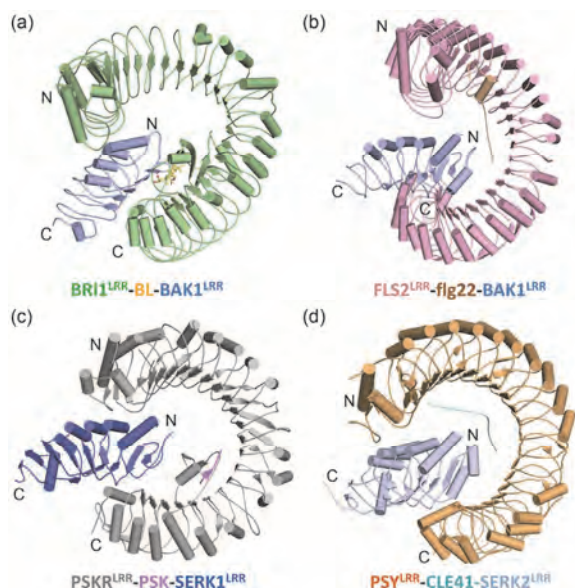


图1 (网络版彩色)植物受体激酶异源二聚化激活模式。(a) BRI1^{LRR}-BL-BAK1^{LRR}复合物结构;(b) FLS2^{LRR}-flg22-BAK1^{LRR}复合物结构;(c) PSKR^{LRR}-PSK-SERK1^{LRR}复合物结构;(d) PSY^{LRR}-CLE41-SERK2^{LRR}复合物结构。“N”和“C”代表蛋白质的N末端和C末端。LRR, 亮氨酸重复基序

Figure 1 (Color online) The hetero-dimerization activation model in plant receptor kinases. (a) Structure of BRI1^{LRR}-BL-BAK1^{LRR} complex; (b) structure of FLS2^{LRR}-flg22-BAK1^{LRR} complex; (c) structure of PSKR^{LRR}-PSK-SERK1^{LRR} complex; (d) structure of PSY^{LRR}-CLE41-SERK2^{LRR} complex. “N” and “C” represent N- and C-termini. LRR, leucine-rich repeat motif

生物体中保守的成分,以达到抵抗大量的不同微生物的作用。在植物的细胞膜上存在多种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),通过识别病原体上的一些共有的、保守的分子基序(也即病原相关分子模式, pathogen-associated molecular patterns, PAMP),引发先天免疫反应^[13]。几丁质是由 β -1,4连接的N-乙酰氨基葡萄糖多聚物,是真菌病原体细胞壁的主要组分,可以作为一种PAMP刺激植物产生免疫反应。遗传及生化数据表明,拟南芥的AtCERK1受体,胞外含有3个串联的LysM结构域,是几丁质的PRR^[14]。在水稻中,相关的PRR是胞外含LysM结构域的OsCEBiP受体蛋白^[15,16]。2012年,本实验室解析了AtCERK1的胞外区与几丁质五糖的复合物结构^[17],结构揭示,AtCERK1的胞外区确实由3个LysM结构域构成,但是在复合物中仅仅第2个LysM结构域参与了几丁质五糖的识别。结构及生化实验表明,几丁质上的N-乙酰基团对受体特异性的识别具有重要作用。多种体外生化和植物体内实验揭示了AtCERK1激活

关键的位点。AtCERK1的结构不仅是第一个解析的植物PRR结构,也是第一个解析的植物LysM结构域蛋白结构,为研究类似蛋白提供了线索。在2016年,本实验室又解析了来源于水稻的PRR蛋白OsCEBiP结构,不同于结构预测的OsCEBiP仅仅具有2个串联的LysM结构域,结构显示OsCEBiP也具有3个串联的LysM结构域,并且C末端包含1个未知功能的CRD结构域,同AtCERK1一样,在复合物中仅仅第2个LysM结构域参与了几丁质五糖的识别^[18]。这些结构表明,植物PRR识别几丁质具有保守的模式。同时,不同类型的PRR也提示不同植物可能具有不同的活化模式,这些受体激酶及蛋白的活化机制需要将来更多的研究来揭示。由于LysM结构域蛋白也参与豆科植物与根瘤菌的共生过程,上述结构研究也将为研究其分子机理提供线索^[19,20]。

2.3 植物模式识别受体FLS2识别配体及活化的分子机理

不同于识别真菌的几丁质模式分子,植物对致病细菌的识别主要是通过LRR型植物受体激酶FLS2识别鞭毛蛋白(flagellin)来完成,flagellin是对细菌运动性极为重要的一种蛋白^[21,22]。鞭毛蛋白在动植物致病菌中都是一种典型的PAMP^[13]。在动物中,鞭毛蛋白位于细胞膜上的PRR是TLR5,而细胞质中的PRR是NAIP5/6。鞭毛蛋白通过诱导TLR5同源二聚化来活化下游免疫通路^[23]。2013年本实验室解析了FLS2胞外区和BAK1胞外区与植物致病菌丁香假单胞菌鞭毛蛋白保守基序flg22三元复合物的晶体结构(图1(b))^[24]。结构显示,线性化的flg22伸展地结合在FLS2胞外区螺旋管状凹面的连续B片层上,共受体BAK1通过N端帽子的一个小凹槽接触flg22线性表位的C末端,同时结构也揭示,FLS2的C末端LRR基序与共受体BAK1的C末端LRR基序形成广泛的直接相互作用,提示受体与共受体可以在没有病原菌存在时可能先形成预复合物,以利于对病原菌的侵入做出快速及时反应。同时体外生化和植物体内实验也验证了flg22激活FLS2的机理:当植物感受到致病细菌感染时,细菌鞭毛蛋白flg22通过诱导细胞膜上的FLS2和BAK1形成稳定的异源二聚化,完成配体感应并激活下游防卫反应信号通路。这也是除BRI1-BAK1形成异源二聚体外体细胞胚胎发育受体激酶(somatic embryogenesis receptor kinase, SERK)家族成

员参与形成异源二聚化复合物的第二个结构,提示SERK家族可能是作为许多植物LRR型受体激酶的共受体发挥功能,其在生长及免疫等拮抗生物学过程中可能具有整合的角色。

2.4 植物受体激酶PEPR1/2识别内源性危险信号PEP的分子机制

为了更有效地启动免疫反应,植物不仅具有可以感受来自于外源病原微生物入侵信号(如细菌的鞭毛蛋白、真菌的几丁质等)的模式识别受体,同时植物也进化了能感受各种外源伤害后由宿主继发释放的各种内源危险信号(如PEP, ATP, NAD, 细胞壁降解多糖等)的受体^[13]。这一类生化及遗传研究较清楚的是由LRR类受体激酶PEPR1/2识别的PEP信号通路^[25]。2015年,本实验室成功解析了PEPR1受体激酶与内源性PEP1小肽复合物的晶体结构^[26]。结构揭示,PEP1呈伸展状态结合在超螺旋状的LRR凹面,这一结合模式与flg22结合FLS2具有明显的相似性,揭示LRR受体激酶的螺旋状凹面是与配体相互作用的部位,结构的细致分析也揭示PEP信号肽的C末端最后两个氨基酸及游离羧基与受体间形成广泛的相互作用。由于PEPR1^{LRR}-PEP和FLS2^{LRR}-flg22结构的相似性及FLS2^{LRR}-flg22-BAK1^{LRR}活化复合物结构的启示,我们推测,BAK1也参与PEPR1-PEP的信号活化通路。体外生化及结构模拟表明,内源性伤害信号肽PEP1可以诱导PEPR1胞外区与BAK1胞外区形成稳定的异源复合物^[26]。同时,茄科植物的系统素是植物中第一个发现的肽类激素,其具有与PEP类似的生物学功能,并且它们都不具备经典的分泌信号。最近通过遗传学手段发现,系统素受体SYR1也是LRR型受体,我们推测,它们可能具有相似的配体识别及活化机理^[27]。

2.5 植物磺化肽激素PSK的受体识别及活化机制

植物除了利用大量小分子激素调控植物的生长发育外,植物也进化出由许多小肽激素来调控特定的植物生长过程。其中重要及研究较早的一种是1996年发现的植物磺化肽激素(phytosulfokine, PSK),其是从植物细胞培养上清中分离出来的一种含2个酪氨酸磺化修饰的五肽激素,在植物的生长发育、抗逆和先天免疫等方面具有广泛调控作用^[28]。研究表明,PSK发挥活性的位点是在植物细胞膜上,随后的生

化及遗传实验确定,细胞膜上的受体激酶-植物磺化肽激素受体(PSK receptor, PSKR)是PSK发挥作用的膜上受体^[29]。2015年本实验室首先解析了受体PSKR单独的胞外区(PSKR^{LRR})及其与PSK复合的晶体结构,单独的PSKR胞外区上的一段30个氨基酸的岛区在没有配体结合时是无序的,结合配体后,这一岛区被结合在螺旋管凹面的PSK小肽诱导形成一对短的反向 β 片层折叠,PSK的2个磺酸根通过与受体PSKR的相互作用来加强PSKR对PSK的特异识别^[30]。晶体结构及体外生化分析发现,PSKR结合PSK后并没有诱导PSKR受体形成同源二聚化,同时与BRI1^{LRR}-BL-BAK1^{LRR}三元复合物晶体结构的比对也发现,BRI1与PSKR1受体具有相似的岛区位置,即倒数第4个LRR基序处。结合SERK基因以前功能的研究结果,本实验室推测,SERK家族成员可能作为共受体参与PSKR的受体激活。随后的体外生化实验证明,SERK家族成员确实与PSKR1-PSK形成稳定的复合物,相应的遗传学和体内生化方法证实SERK家族成员确实参与了PSK介导的生理功能。这也是在没有明确的遗传学证据下,首次利用结构生物学信息指导所发现的特定激素信号转导通路中新成分的成功案例。这一原则也指导本实验室在随后的研究过程中多次发现SERK家族成员确实参与了广泛的生物学过程,丰富深化了我们对SERK家族成员功能的认识。本实验室进一步解析PSK^{LRR}-PSKR-SERK1^{LRR}三元复合物晶体结构(图1(c))。结构分析揭示,区别于解析的BRI1和鞭毛蛋白受体FLS2活化的“分子胶”模式,PSK并未直接参与SERK的互作,其是通过诱导PSKR岛区产生与共受体SERK结合的有序新界面从而激活受体PSKR的新机制-别构活化模式。

2.6 植物CLE家族小肽的识别与受体激活机理

随着基因组测序及生物信息学技术的发展,现在人们普遍预测在模式生物拟南芥中至少存在1000多种肽类激素^[31]。而含12个氨基酸的CLE (CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION)小肽家族是植物多肽激素中最大的一个家族,在拟南芥中至少包含32个成员,这些小肽激素的功能主要参与植物的各种干细胞的增殖分化的过程,例如:CLV3和CLE1-7主要分布在植物茎尖分生组织;CLE8-40主要分布在植物根尖分生组织;CLE41/CLE44及其同源基因主要局限在维管束组织的韧皮

部细胞^[32]。最新研究也发现, CLE25参与植物激素ABA的抗旱过程^[33]。目前研究发现, 这一类小肽激素的受体都是LRR-XI家族受体激酶。本实验室2015年解析了导管分子分化抑制因子TDIF/CLE44/CLE41与富亮氨酸重复类受体激酶PXY^{LRR}复合物的晶体结构^[34], 发现12个氨基酸的小肽激素呈 Ω 结合在PXY螺旋管的凹面, 尤其值得注意的是, 小肽的C末端的游离羧基与受体上的RxR保守基序之间有保守的互作。通过与PEPR1^{LRR}-PEP复合物结构比对发现, 这一基序在二者中保守, 进一步对LRR受体激酶XI家族的所有序列比对也发现, 这一基序在不同蛋白中高度保守, 提示它们可能的配体都是需要有游离的C末端羧基或者需要通过蛋白酶对小肽激素前体进行切割后才能被相应的受体识别^[35]。相关的结果也被另外两个实验室解析出的PXY-CLE41所验证^[36,37]。这一结构不仅为其他功能众多的CLE与受体的相互作用提供了模式, 也为寻找新的CLE家族小肽的受体提供了结构生物学基础和新的研究思路。的确, 利用下一部分描述的方法, 本实验室发现, CLE42的受体是PXL2受体激酶^[38]。同时, 依据受体激酶的异源二聚化活化模式及CLE41结合PXY没有诱导受体同源二聚化, 他们随后通过体外生化鉴定出了SERK蛋白是TDIF-PXY信号通路的共受体。相应体内遗传及PXY^{LRR}-TDIF-SERK2^{LRR}三元复合物晶体结构(图1(d))也揭示, TDIF小肽通过充当类似“分子胶水”(molecular glue)的功能来介导受体PXY与共受体SERKs之间的相互作用, 从而激活下游的信号途径以调控拟南芥的维管束发育^[39]。另外, 尽管控制花脱落的IDA小肽激素以前不认为属于CLE家族小肽家族成员, 但是HAESA^{LRR}-IDA的结构表明, 它与TDIF-PXY复合物的肽识别结构非常相似, 推测IDA的激素活化形式可能也是12个氨基酸的NH结尾的小肽, 其受体的活化也需要SERK家族的参与^[40]。

2.7 植物根干细胞生长因子RGF的受体和共受体发现及其活化机制

植物的发育主要是由各种分生组织的活性控制的。根据对植物各种小肽规律的认识, 人们从基因组中预测出一类含有磺酸化修饰的13个氨基酸的小肽激素RGF, 功能研究表明, 其通过调节转录因子PLT的浓度梯度来维持根干细胞中心的稳定^[41]。由于小肽激素都是在细胞外空间发挥生理活性, 合理地推

测其识别的受体应该也是存在于细胞膜上。根据TDIF^{LRR}-PXY和PEPR1^{LRR}-PEP结构比对发现“精氨酸-精氨酸”RxR保守基序识别小肽C末端的游离羧基, 本实验室推测, RGF的受体可能就存在与LRR-XI家族受体激酶中。为了寻找RGF的受体, 研究人员系统地表达了全部LRR-XI家族受体激酶的蛋白, 同时通过设计了“分子筛-质谱”联用的创新实验方法, 体外成功鉴定出了2个RGF的受体RGFR1和RGFR2, 通过解析RGFR1^{LRR}-RGF复合物晶体结构, 发现13个氨基酸的小肽激素RGF同样结合在RGFR1螺旋状结构的凹面, 结构也提示小肽的第二位磺化修饰的特异识别与受体上的另一个基序“RxGG”有关; 相应的序列分析发现, 有5个受体激酶具有这一保守基序, 可能都是RGF的体内受体, 相应的体外生化及体内遗传实验也表明, 这5个RGFRs确实作为RGF的受体来调控根干细胞维持^[42]。类似的结果也同时由另外两个实验室从遗传学及生物化学等手段得到^[43,44]。依据受体激酶的异源二聚化活化模式及RGF结合RGFR没有诱导受体同源二聚化, 本实验室也验证了SERK作为共受体来参与传递RGF的信号。

2.8 十字花科植物受体激酶SRK参与植物自交不亲和反应的分子机制

由于植物营固着生长方式, 不同植物个体的雌雄受精主要依靠外力风或昆虫等来完成, 而大部分雌雄同花植物其雄蕊和雌蕊在空间上非常地接近, 这些因素导致植物的自花授粉发生概率远远大于异花授粉之间的概率。由于自花授粉从长远来说明显不利于维持后代个体的基因组多样性, 容易导致隐性有害基因在后代发生纯合而引发植株的功能退化或性状消失。为了避免这些可能的不良后果, 不同属的高等植物分别进化出了多种多样的自交不亲和机制来防止自交所导致的物种的退化^[45]。遗传及生化机理研究较清晰的是十字花科植物, 其雌雄蕊分别表达高度连锁的成对基因蛋白雌蕊乳突细胞上表达的受体激酶SRK和花粉粒上表达的配体SCR。如果来源于同一连锁对的花粉粒上表达的配体SCR蛋白被同一基因型的雌蕊乳突细胞上表达植物受体激酶SRK识别后, 会引起雌蕊乳突细胞发生一系列的变化, 使相应花粉不能萌发或生长, 而来源于不同基因型的受体配体对产物由于不能互作而使花粉能正常地萌发或生长^[46]。2016年本实验室通过生化实验

发现来源于油菜的SCR9可以诱导SRK9形成同源二聚体. SRK9^{ECD}(ectodomain, ECD)与SCR9复合物晶体结构显示其形成2:2的四元复合物. 结构模拟、生物化学、生物信息学等手段揭示了不同SRK与SCR之间精确配对的分子机制. 这些结果为利用杂交优势对作物进行分子育种提供了分子基础^[47]. SRK9^{ECD}₂-SCR9₂复合物结构是第一个解析的植物半胱氨酸丰富小肽与G-type LECTIN型受体激酶复合物结构,也是结构上第一次明确地表明植物受体激酶的同源二聚化活化模型(图2).

2.9 植物花粉管受体激酶PRK6参与花粉管吸引的分子机制

不同于动物的精子细胞及低等植物的精子细胞可以通过主动的运动达到受精的目的,高等开花植物的精子细胞不具有运动功能,通过同样属于特化的雄性生殖细胞-花粉管来输送而完成高等植物的双受精. 这一过程受到了复杂且精细地调控^[48]. 2001年Higashiyama等人^[49]首次通过激光细胞定点消除技术发现植物特化的雌性细胞-助细胞释放特定的化学信号来引导花粉管的定向生长. Higashiyama等人^[50]又在2009年借助助细胞的全转录组分析发现助细胞分泌产生的LURE小肽在花粉管的珠孔吸引中起到了关键作用. 随后在2016年两个研究组同时报道发现了体内识别LURE的不同受体激酶^[51,52]. 由于LURE是半胱氨酸丰富小肽,本实验室首先通过昆虫表达体系解决了LURE小肽的“黏性”问题,同时通过大量生

化筛选发现, LURE小肽在体外仅仅能特异性地与PRK6蛋白胞外域互作. 随后本实验室又解析了PRK6^{LRR}与LURE小肽复合物的晶体结构,不同于以前解析的其他植物LRR受体激酶结构,所有识别的配体都是结合在LRR受体激酶的螺旋管凹面, PRK6^{LRR}-LURE复合物结构显示LURE小肽结合在PRK6受体激酶的C末端^[53]. 这一结合方式在体外生化及半体内功能验证实验都得到了很好的验证. PRK6-LURE复合物独特的结构也提示, PRK6可能在体内还有另外的配体,这些配体通过结合PRK6的凹面来诱导形成异源二聚化活化花粉管的促生长功能,而LURE的独特结合模式可能提示其是通过抑制正常配体的促生长功能使花粉管的两侧不均等生长来达到定向吸引的功能.

2.10 受体激酶在植物气孔发育中的特异性调控机制

陆地植物主要通过表皮上微小的气孔来控制植物与环境的气体交换及水的平衡,同时许多植物致病微生物也通过气孔来入侵植物. 这些重要的功能提示气孔的数目、排布模式等需要受到严格精细地调控. 目前发现4类蛋白参与气孔发育的早期调控过程:富含LRR的受体激酶ERECTA(ER)家族(包括ERECTA, ERL1, ERL2)和富含LRR的受体蛋白TMM,半胱氨酸丰富小肽激素表皮模式因子EPF (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR)家族及分泌的丝氨酸蛋白酶家族SDD等来协同调控气孔发育和模式形成^[54]. 尽管经过大量的遗传及生化研究,人们对这些蛋白的特异功能及分子机制仍然不清楚. 通过大量具体而细致的工作,柴继杰实验室解析了ERL1^{LRR}-TMM^{LRR}, ERL1^{LRR}-TMM^{LRR}-EPF1, ERL1^{LRR}-TMM^{LRR}-EPF2, EPFL4-ERL2^{LRR}四种复合物的晶体结构,结合大量的生化分析及遗传学证据表明, ER家族不同成员都可以与TMM形成组成型的复合物. 只有这种预组成型的复合物才能识别体内EPF1, EPF2, EPFL9小肽信号从而启动气孔发育调控. 与此恰恰相反, ER家族单独成员就可以识别结构类似的半胱氨酸丰富小肽激素EPFL4/6来调控花序伸长等过程,而ERL1^{LRR}-TMM^{LRR}预复合物中, TMM形成的空间位阻可以排斥EPFL4/6的结合. 这些研究表明, ER-EPF通路中, TMM的存在与否决定了ER家族成员可以结合的配体类型并进而调控不同的生物学过程-

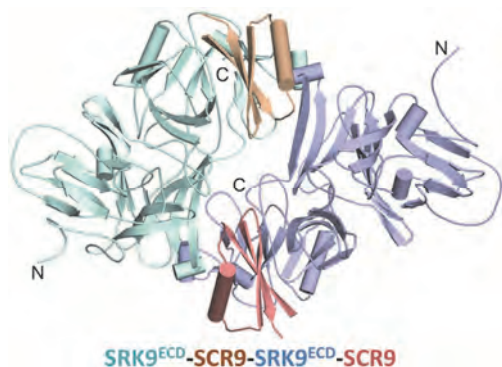


图2 (网络版彩色)植物受体激酶同源二聚化激活模式. SRK9^{ECD}-SCR9-SRK9^{ECD}-SCR9复合物结构. “N”和“C”代表蛋白质的N末端和C末端. ECD, 胞外结构域

Figure 2 (Color online) The homo-dimerization activation model in plant receptor kinases. Structure of SRK9^{ECD}-SCR9-SRK9^{ECD}-SCR9 complex. “N” and “C” represent N- and C-termini. ECD, ectodomain

气孔发育还是花序伸长等^[55]。这些结构也是第一次在植物中表明一个通路的受体ER家族-配体EPF-共受体TMM等协同来决定特定通路的特异性机制。

2.11 同源或异源二聚化是受体激酶的最小活化单位

受体激酶作为具有单次跨膜结构域的蛋白,其感应胞外各种化学信号后至少需要通过形成同源或异源二聚化才能完成信号的跨膜传递。BRI1^{LRR}-BL-BAK1^{LRR}, FLS2^{LRR}-flg22-BAK1^{LRR}等多个晶体结构都提示植物LRR型受体激酶需要形成异源二聚化来完成信号的跨膜转导。这一要求也符合植物LRR型主受体的胞外结构域形成高度扭曲的超螺旋结构有关,配体结合在超螺旋结构的凹面必然需要一个空间上小的共受体来传递信号^[56]。依据这一规律柴继杰实验室确定了多个信号通路的共受体成分,包括PEPR1-PEP, PSKR-PSK, PXY-CLE41, RGFR- RGF等^[57]。一方面这些数据极大地深化了我们对于SERK家族参与如此众多的信号通路的理解,也提示对于SERK家族的真正功能仍然需要去探索。SRK9^{ECD}-SCR9复合物的结构表明同源二聚化也是植物受体激酶的基本活化形式,由于目前仅仅只有一个同源二聚化的结构,关于这一模式的普遍意义及范围还需要深入研究。同时,同源或异源二聚化是受体激酶的最小活化单位这一基本模式并不排除更多的其他组分对于基本的活化通路的调控,例如受体蛋白TMM对于ER的配体结合特异性的调控,这些模式的普遍意义及范围也需要进一步研究。

2.12 植物受体激酶BIR1通过调控共受体BAK1的功能来参与植物免疫负调控

大量遗传学证据表明, SERK家族成员参与多种多样的信号转导过程,拟南芥中SERK家族共包括5个成员,功能研究较多的是SERK1-4。目前解析的许多复合物结构表明, SERK家族成员主要作为共受体参与植物受体激酶的活化。BAK1作为共受体参与FLS2及PEPR1等免疫信号通路对于植物的免疫反应具有非常重要的意义,但是持续性的免疫反应对于植物来说又是非常不利的。植物在长期的进化过程中发展出了相适应的负调控机制,从而更全面地协调植物的生长与免疫过程。其中目前发现的一种重要而经济的方案就是通过BIR1受体激酶对BAK1的活性进行调控。柴

继杰实验室通过解析BAK1^{LRR}-BIR1^{LRR}复合物的晶体结构及结合体外生化分析及植物体内遗传等多种方法揭示, BIR1和BAK1两个受体激酶可以形成直接稳定的复合物,这一复合物也受到胞外pH的调控。BAK1^{LRR}-BIR1^{LRR}与FLS2^{LRR}-BAK1^{LRR}复合物结构比对表明,其相互作用界面也参与BAK1与FLS2之间的相互作用面,表明BIR1和这些FLS2之间可能竞争性的与BAK1相互作用。这些结果暗示,在没有外来病原菌感染发生时, BIR1通过与BAK1相互作用从而抑制BAK1与其他免疫受体蛋白之间的相互作用,进而进行免疫负调控^[58]。这也是目前解析的第一个不依赖配体就形成异源二聚化的植物受体激酶结构。

2.13 其他解析的植物受体激酶结构

由于植物受体激酶的巨大数目及承担着非常不同的生理功能,本实验室也解析了一些具有独特结构特征的植物受体激酶,如胞外形成两个超螺旋结构的参与植物生长素感应的TMK1受体激酶^[59]、包含有一个不同于BRI1的独特岛区的参与植物种子萌发的GRACE受体激酶^[60]、胞外LRR结构域上包含3个岛区的参与植物分生组织发育的RPK2等^[61],这些独特的结构特征一方面暗示这些受体激酶的配体类型及活化机制的多样化,一方面也提示着深入揭示植物受体激酶的配体识别及活化特征还需要对更多的植物受体激酶进行大量研究。

3 研究展望

到目前为止已经有十几个植物受体激酶或复合物晶体结构得到了解析,这些结构不仅揭示了不同植物受体激酶的配体识别特征,它们所揭示的植物受体激酶识别线性小肽的基本规律可以指引相关领域研究者在没有遗传学或细胞学数据的情况下快速寻找未知功能的植物受体激酶的配体或反之寻找未知功能的配体的受体。同时总结出植物受体激酶活化的同源或异源二聚化最小活化模式,也可以指引相关领域研究者快速发现新的信号通路的新组分,这些成果必将极大地加快植物受体激酶领域的研究步伐。同时,也需要清醒地看到,这些解析的结构大部分集中于LRR型植物受体激酶,其他类型的植物受体激酶数目相对来说较少,这些特征一方面暗示LRR型植物受体激酶在植物中扮演着独特的重要角色,另一方面也表明LRR这种独特的结构基序适应

了植物的基本功能, 导致其进化上大量扩增. 为了深入认识植物受体激酶总的配体识别及活化模式, 将来还需要对更多类型的植物受体激酶进行结构或功能研究. 另外植物受体激酶领域将来也需要更加关注植物受体激酶信号通路的调控, 包括大量的植物

受体蛋白及GPI蛋白的功能, 蛋白酶在植物信号肽的成熟中的作用等. 同时更应了解, 不同的信号通路在植物体内是如何整合作为一个整体发挥作用的, 例如SERK家族成员作为多个不同受体激酶通路的共受体具有较大的启示意义.

参考文献

- 1 Shiu S H, Karlowski W M, Pan R, et al. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 2004, 16: 1220–1234
- 2 Clouse S D. A history of brassinosteroid research from 1970 through 2005: Thirty-five years of phytochemistry, physiology, genes, and mutants. *J Plant Growth Regul*, 2015, 34: 828–844
- 3 Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 1997, 90: 929–938
- 4 Jiang J, Zhang C, Wang X. Ligand perception, activation, and early signaling of plant steroid receptor brassinosteroid insensitive 1. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 1198–1211
- 5 Hothorn M, Belkadir Y, Dreux M, et al. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature*, 2011, 474: 467–471
- 6 She J, Han Z, Kim T W, et al. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature*, 2011, 474: 472–476
- 7 Pietras R J, Nemere I, Szego C M. Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine*, 2001, 14: 417–427
- 8 Sun Y, Han Z, Tang J, et al. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell Res*, 2013, 23: 1326–1329
- 9 Li J, Wen J, Lease K A, et al. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 2002, 110: 213–222
- 10 Nam K H, Li J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 2002, 110: 203–212
- 11 Santiago J, Henzler C, Hothorn M. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science*, 2013, 341: 889–892
- 12 She J, Han Z, Zhou B, et al. Structural basis for differential recognition of brassinolide by its receptors. *Protein Cell*, 2013, 4: 475–482
- 13 Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 379–406
- 14 Miya A, Albert P, Shinya T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19613–19618
- 15 Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11086–11091
- 16 Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, et al. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J*, 2010, 64: 204–214
- 17 Liu T, Liu Z, Song C, et al. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science*, 2012, 336: 1160–1164
- 18 Liu S, Wang J, Han Z, et al. Molecular mechanism for fungal cell wall recognition by rice chitin receptor OsCEBiP. *Structure*, 2016, 24: 1192–1200
- 19 Madsen E B, Madsen L H, Radutoiu S, et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 2003, 425: 637–640
- 20 Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen M W, et al. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, 2015, 523: 308–312
- 21 Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 2007, 448: 497–500
- 22 Gomez-Gomez L, Boller T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 2000, 5: 1003–1011
- 23 Yoon S I, Kurnasov O, Natarajan V, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*, 2012, 335: 859–864
- 24 Sun Y, Li L, Macho A P, et al. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex. *Science*, 2013, 342: 624–628

- 25 Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, et al. Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J Biol Chem*, 2010, 285: 13471–13479
- 26 Tang J, Han Z, Sun Y, et al. Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Res*, 2015, 25: 110–120
- 27 Wang L, Einig E, Almeida-Trapp M, et al. The systemin receptor SYR1 enhances resistance of tomato against herbivorous insects. *Nat Plant*, 2018, 4: 152–156
- 28 Matsubayashi Y, Sakagami Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 7623–7627
- 29 Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A, et al. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science*, 2002, 296: 1470–1472
- 30 Wang J, Li H, Han Z, et al. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature*, 2015, 525: 265–268
- 31 Murphy E, Smith S, De Smet I. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: How cells communicate over a short distance. *Plant Cell*, 2012, 24: 3198–3217
- 32 Fiers M, Ku K L, Liu C M. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 39–43
- 33 Takahashi F, Suzuki T, Osakabe Y, et al. A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*, 2018, 556: 235–238
- 34 Zhang H, Lin X, Han Z, et al. Crystal structure of PXY-TDIF complex reveals a conserved recognition mechanism among CLE peptide-receptor pairs. *Cell Res*, 2016, 26: 543–555
- 35 Zhang H, Han Z, Song W, et al. Structural Insight into recognition of plant peptide hormones by receptors. *Mol Plant*, 2016, 9: 1454–1463
- 36 Morita J, Kato K, Nakane T, et al. Crystal structure of the plant receptor-like kinase TDR in complex with the TDIF peptide. *Nat Commun*, 2016, 7: 12383
- 37 Li Z, Chakraborty S, Xu G. Differential CLE peptide perception by plant receptors implicated from structural and functional analyses of TDIF-TDR interactions. *PLoS One*, 2017, 12: e0175317
- 38 Mou S, Zhang X, Han Z, et al. CLE42 binding induces PXL2 interaction with SERK2. *Protein Cell*, 2017, 8: 612–617
- 39 Zhang H, Lin X, Han Z, et al. SERK family receptor-like kinases function as co-receptors with PXY for plant vascular development. *Mol Plant*, 2016, 9: 1406–1414
- 40 Santiago J, Brandt B, Wildhagen M, et al. Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. *Elife*, 2016, 5: e15075
- 41 Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, et al. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science*, 2010, 329: 1065–1067
- 42 Song W, Liu L, Wang J, et al. Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth. *Cell Res*, 2016, 26: 674–685
- 43 Shinohara H, Mori A, Yasue N, et al. Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 3897–3902
- 44 Ou Y, Lu X, Zi Q, et al. RGF1 INSENSITIVE 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res*, 2016, 26: 686–698
- 45 Takayama S, Isogai A. Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 467–489
- 46 Kitashiba H, Nasrallah J B. Self-incompatibility in Brassicaceae crops: Lessons for interspecific incompatibility. *Breed Sci*, 2014, 64: 23–37
- 47 Ma R, Han Z, Hu Z, et al. Structural basis for specific self-incompatibility response in Brassica. *Cell Res*, 2016, 26: 1320–1329
- 48 Higashiyama T, Takeuchi H. The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66: 393–413
- 49 Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science*, 2001, 293: 1480–1483
- 50 Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, et al. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*, 2009, 458: 357–361
- 51 Takeuchi H, Higashiyama T. Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 2016, 531: 245–248
- 52 Wang T, Liang L, Xue Y, et al. A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature*, 2016, 531: 241–244
- 53 Zhang X, Liu W, Nagae T T, et al. Structural basis for receptor recognition of pollen tube attraction peptides. *Nat Commun*, 2017, 8: 1331

- 54 Torii K U. Mix-and-match: Ligand-receptor pairs in stomatal development and beyond. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 711–719
- 55 Lin G, Zhang L, Han Z, et al. A receptor-like protein acts as a specificity switch for the regulation of stomatal development. *Genes Dev*, 2017, 31: 927–938
- 56 Han Z, Sun Y, Chai J. Structural insight into the activation of plant receptor kinases. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 20: 55–63
- 57 Song W, Han Z, Wang J, et al. Structural insights into ligand recognition and activation of plant receptor kinases. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 43: 18–27
- 58 Ma C, Liu Y, Bai B, et al. Structural basis for BIR1-mediated negative regulation of plant immunity. *Cell Res*, 2017, 27: 1521–1524
- 59 Liu P, Hu Z, Zhou B, et al. Crystal structure of an LRR protein with two solenoids. *Cell Res*, 2013, 23: 303–305
- 60 Wu Z, Liang S, Song W, et al. Functional and structural characterization of a receptor-like kinase involved in germination and cell expansion in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1999
- 61 Song W, Han Z, Sun Y, et al. Crystal structure of a plant leucine rich repeat protein with two island domains. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 137–144

Summary for “植物受体激酶的结构与功能研究进展”

Structural and functional studies of plant receptor kinases

Zhifu Han[†], Yu Xiao[†], Wen Song, Jizong Wang, Guangzhong Lin, Xiaoxiao Zhang & Jijie Chai^{*}

School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

[†] Contributed equally to this work

^{*} Corresponding author, E-mail: chajij@tsinghua.edu.cn

Receptor kinases (RKs) in plants play important roles in sensing intracellular and external cues to mediate cell-cell communication. RKs have a conserved tripartite structural organization, consisting of a non-conserved extracellular domain (ECD), a single membrane-spanning segment to anchor the protein within the membrane, and a conserved intracellular kinase domain. The model plant *Arabidopsis* encodes approximately 600 RKs, representing nearly 2.5% of the coding sequences within its entire genome. Ligand perception by the ECDs of RKs, in a direct or indirect manner, generally results in phosphorylation of their KDs, thus initiating downstream signaling. During the past decades, great progress has been made toward understanding the molecular mechanisms of how RKs are involved in multiple biological processes, such as meristem development, stomatal development, pollen tube navigation, immune response and self-incompatibility. More recently, numerous crystal structures of ECDs in free, ligand-bound and coreceptor-bound forms have been solved. These structural data, coupled with others, have provided significant insights into how RKs recognize their cognate ligands and consequently become activated at an atomic level.

Most of the RK structures solved thus far belong to LRR-RKs. Structural studies showed that small peptides (with ~10–20 residues in length) from plants or pathogens bind to their LRR-RK receptors in a remarkably conserved manner, with the peptides adopting an elongated conformation to interact with the inner surfaces of LRRs. Specific recognition of a peptide is dictated by the exposed residues of its LRR receptor. As a matter of fact, the mechanism is so conserved that it has been successfully used to identify LRR-RK receptors of known small peptides. In contrast with small peptides, larger peptides with a well-defined structure are recognized by their LRR-RK receptors through varied mechanisms. An extreme example of this is EPF recognition by the LRR-RKs ERFs, in which the receptor-like protein TMM is required to perform a complex with ERFs for the recognition. Several structures of non-LRR-RKs with ligands bound were also reported. Understandably, these RKs vary significantly in their mechanisms of ligand recognition due to their non-conserved structures. But with more structures solved, ligand recognition mechanisms within the same RK subfamily may be generalized and consequently used for matching ligand-receptor pairs.

A general model defined by the structural studies is that ligand-induced dimerization is required for the activation of RKs. The more common mode of dimerization is ligand-induced heterodimerization of two different RKs, with one acting as the primary receptor and other as the co-receptor. Typical examples for this include BL- and flg22-induced heterodimeric BRI1-BAK1 and FLS2-BAK1 complexes, respectively. While less frequently used, ligand-induced homodimerization of RKs has also been demonstrated for their activation, as exemplified by chitin-induced CERK1 and SCR9-induced SRK9 activation. Despite the conserved dimerization mode for activation, the mechanisms involved are diversified among RKs. Several structures revealed that heterodimerization of ligand-glued two RKs is important for their activation. In this mechanism, assembly of a signaling RK complex is sequential, in which a ligand first recognized by the primary receptor is directly involved in recruitment of a co-receptor. Most of the small plant peptides (~5–20 residues length) bound by receptors have been shown to follow this mechanism to induce RK heterodimerization. The small peptide hormone PSK, however, employs an allosteric strategy to induce heterodimerization of its receptor PSKR with coreceptor BAK1. Cross-linking of two CERK1 molecules by a chitin is required for the activation of this RK. In contrast, homodimerization of SRK9 induced by SCR9 is both ligand- and receptor mediated, resulting in formation of a 2:2 complex. Given the large number of RKs in plants, it can be anticipated that more diversity in the mechanisms of RK activation will be revealed.

plant, receptor kinase, ligand perception, receptor activation, structural biology

doi: 10.1360/N972018-00412