

· 专题论坛 ·

植物核糖体应激响应机制研究进展

王静文¹, 王兴军^{1, 2}, 马长乐¹, 李鹏呈^{1, 2*}

¹山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ²山东省农业科学院农作物种质资源研究所,
山东省作物遗传育种与生态生理重点实验室, 济南 250100

摘要 核仁是真核细胞中重要的核结构, 核糖体发生最初在核仁中进行, 该过程涉及一系列复杂的反应, 需要许多核仁相关因子参与。核糖体生物发生出现异常通常引起核仁结构紊乱, 并导致细胞周期阻滞、细胞衰老甚至凋亡。核糖体应激响应机制在哺乳动物细胞中研究得较为深入, 但在植物细胞中尚不明晰。尽管如此, 人们逐渐发现某些植物特有的NAC转录因子家族成员在植物细胞中可能参与包括核糖体应激在内的多种胞内应激响应过程。此外, 前期研究发现生长素系统与核糖体生物合成之间存在一种相互协调机制来调控植物发育。该文结合哺乳动物细胞中已知的核糖体应激响应通路, 探讨植物细胞潜在的核糖体应激机制。

关键词 核糖体, 核糖体应激, NAC转录因子, MIDASIN 1, 生长素

王静文, 王兴军, 马长乐, 李鹏呈 (2022). 植物核糖体应激响应机制研究进展. 植物学报 57, 80–89.

在真核细胞中, 核糖体发生的核心过程如rDNA的转录、rRNA前体(rRNA precursor, pre-rRNA)的加工以及核糖体组装最初都在核仁中进行。在这些过程中, 任一步骤受到干扰都会引发核糖体应激(亦称核仁应激)。在人体中, 核糖体蛋白(ribosomal proteins, RPs)突变或核糖体生物发生缺陷引起的核糖体应激会导致发生“核糖体疾病”(ribosomopathies) (Mills and Green, 2017)。在植物中, 核糖体应激会引起多种缺陷表型, 如叶片变尖变窄、根发育迟缓、对生长素不敏感以及胚胎发育延迟(Weis et al., 2015a)。因此, 核糖体应激响应与动植物生长发育密切相关。

在哺乳动物细胞中, 核糖体应激反应主要依赖p53介导的信号通路。p53是哺乳动物中重要的抗肿瘤转录调节因子, 其受应激源的刺激而激活, 通过调控下游靶基因来诱导细胞周期阻滞甚至细胞凋亡。在该通路中, 癌基因鼠双微体2 (murine double minute 2, MDM2)作为一个E3泛素连接酶, 能够靶向p53并通过泛素化降解途径调控其蛋白稳态(Kubbutat et al., 1997)。此外, 哺乳动物细胞中也存在其它不依赖p53的响应通路, 如由核糖体蛋白L3 (ribosomal

protein L3, RPL3)或核糖体蛋白L11参与的信号通路(James et al., 2014)。由于植物基因组中缺乏p53和MDM2的同源基因, 因此植物细胞中核糖体应激响应通路多年来一直未知。直到Iwai Ohbayashi等(2017)研究发现, 植物NAC家族成员ANAC082可能作为重要的转录激活因子介导植物核糖体应激下游相关事件, 表明植物中可能存在1条特殊的应激响应通路。此外, 本课题组最新研究表明, 核糖体发生与生长素系统之间存在相互协调机制, 暗示生长素信号可能在核糖体应激通路中发挥重要作用。

1 核糖体生物合成

1.1 核仁

核仁是真核细胞中的一种动态结构, 能够在光学显微镜下观察到。核仁是核糖体形成的工厂, 能够快速产生大小核糖体亚单位, 这一过程受到精细调节, 以实现适当的细胞生长增殖。通常情况下, 核仁在编码rRNA的染色体重复序列附近围绕rRNA的转录和成熟而聚集产生。人们依据核仁不同区域电子密度的不

收稿日期: 2021-07-23; 接受日期: 2021-10-12

基金项目: 国家自然科学基金(No.31500257)和山东省泰山学者项目(No.ts20190964)

* 通讯作者。E-mail: lpcsas@outlook.com

同将其分为3个主要部分, 分别为纤维中心(fibrillar center, FC)、致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC)和颗粒组分(granular component, GC) (Boisvert et al., 2007)。各个部分在核糖体发生过程中的分工不同, rDNA首先由位于FC区的RNA聚合酶I (RNA Pol I)在FC和DFC之间的边界区域介导其转录, 产生的pre-rRNA在DFC中初步加工组装成核糖体亚基, 核糖体大小亚基最后进入富含RNA和蛋白质的GC区进行进一步的组装和成熟(Holmberg Olausson et al., 2012)。越来越多的研究表明, 核仁参与细胞中的其它活动, 如核糖核蛋白(RNP)颗粒的成熟、组装和输出以及tRNAs前体(tRNA precursor, pre-tRNA)等的加工。此外, 核仁还参与调控细胞周期、细胞衰老以及应激反应等(Olson, 2004; Boisvert et al., 2007)。

1.2 核糖体发生

核糖体作为一种高度复杂且进化保守的细胞器, 在细胞内执行翻译功能, 在细胞的分裂及生长发育中均发挥重要作用。真核生物核糖体中包含4种类型的rRNAs (包括18S、5.8S和25S/28S rRNAs)以及79–81种RPs。其中, 18S rRNA与33个RPs组成1个小亚基, 即40S核糖体(Cech et al., 2000); 另3种rRNA (5S、5.8S和25S/28S rRNA)与46–48个蛋白组成1个大亚基, 称为60S核糖体(Yusupova and Yusupov, 2014)。这2个亚单位在mRNAs上结合在一起, 形成80S核糖体(Sáez-Vásquez and Delseny, 2019)。

核糖体的生物发生是一个高耗能过程, 研究表明, 核糖体的生物合成消耗细胞内约80%的能量(James et al., 2014)。在核糖体的发生过程中, 最核心的步骤是核仁内部rRNA的转录, 此外, 还有RPs的表达、pre-rRNA的加工和运输以及核糖体亚基的组装。该过程中任何一个环节受到干扰都会引起核糖体应激。在真核细胞中, 45S (植物)、47S (哺乳动物)和35S (酵母) rDNA在许多转录因子如TFIIB相关蛋白(TFIIB-related protein, pBrp) (Sáez-Vásquez and Delseny, 2019)的协助下被RNA Pol I转录形成pre-rRNA转录产物, 该产物经过核糖核蛋白(RNP)的处理, 形成成熟的18S、5.8S和25S/28S rRNAs。5S rDNA由RNA Pol III通过特异性转录因子TFIIIA、TFIIB和TFIIC单独转录(Armache et al., 2010; Ben-

Shem et al., 2011)。45S rDNA包含2个外部转录间隔区(external transcribed spacers, ETS) (5'ETS和3'ETS)、2个内部转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS) (ITS1和ITS2)、18S rRNA序列、5.8S rRNA序列以及25S/28S rRNA序列(Unfried et al., 1989; Unfried and Gruendler, 1990)。通常情况下, 小核仁RNA (small nucleolar RNAs, snoRNAs)、核酸内切酶和核酸外切酶以及碱基修饰酶和核糖修饰酶介导pre-rRNA的正确折叠、加工和修饰, 从而产生pre-40S和pre-60S亚基(Lafontaine, 2015)。在核糖体生物发生开始时, 35S、45S或47S pre-rRNA与许多核蛋白以及核糖体生物发生因子(ribosomal biogenetic factors, RBFs)形成1个大的pre-90S核糖体颗粒(Grandi et al., 2002), 之后90S被ITS1中A2位点的核酸内切酶剪切, 形成pre-60S和pre-40S颗粒, 大小亚基的合成途径由此分开(Kornprobst et al., 2016)。接下来pre-60S和pre-40S从核仁穿过核质, 经过核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)进入细胞质(Baßler and Hurt, 2019)。在该过程中, pre-60S和pre-40S的出核都需要核输出受体Crm1p和功能性Ran GTPase参与。其中, pre-60S的核输出还需要几种NPC组分, 如Nup1p、Nup49p、Nup120p以及Nup96p (Zemp and Kutay, 2007)。此外, 含有衔接蛋白Nmd3的核输出序列(nuclear export sequence, NES)将Crm1/XPO1输出受体招募到pre-60S处以促进核输出(Baßler and Hurt, 2019)。与pre-60S复杂的核输出过程相比, pre-40S穿过核质和NPC, 可快速转运到细胞质并整合核糖体蛋白RACK1和RPSS, 形成成熟的核糖体小亚基(Zemp and Kutay, 2007; Cerezo et al., 2019)。最终, 成熟的40S和60S核糖体亚单位结合形成具有翻译能力的核糖体(Cech, 2000)。

1.3 rRNA前体的加工

真核生物中成熟的rRNA通过不同的pre-rRNA加工途径产生(Eichler and Craig, 1994)。在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞中存在2条交替的pre-rRNA加工路径(Koš and Tollervey, 2010)。大多数35S rRNA在A0、A1和A2位点进行共转录切割, 产生20S和27S-A2 pre-rRNA。此外, 35S pre-rRNA还可以被整体转录后进行进一步加工。在哺乳动物中, 47S

pre-rRNA的切割也有2种不同途径,其既可以在5'ETS中的A0和1 (A1)位点开始,也可以在ITS1的位点2开始,这2条途径分别是5'ETS-frist途径和ITS1-frist途径(Henras et al., 2015)。

与哺乳动物不同,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中已发现了3种pre-rRNA剪切途径。首先,基于特定rRNA前体产物和中间体的积累,在拟南芥中发现了与哺乳动物中相同的2种替代途径(Weis et al., 2015a; Tomecki et al., 2017)。在5'ETS-first途径中,35S在P'、P2和A2位点断裂,然后在B2位点断裂;而在ITS1-first途径中,35S在A3位点断裂,产生包含5'ETS片段的P-A3和27S-A3中间体,然后在P'和P2位点断裂(Henras et al., 2015; Weis et al., 2015b; Tomecki et al., 2017)。有研究表明,ITS1-first途径中pre-rRNA的积累可能因环境刺激或压力条件而停止(Weis et al., 2015a)。近几年又有研究人员在拟南芥中发现了第3种植物特异性ITS2加工途径,该途径涉及在ITS2的C2位点首先切割35S pre-rRNA以及特异性pre-rRNA的积累(Palm et al., 2019)。

2 核糖体应激

正常生理状态下的核糖体在核仁中进行有序的组装,而在胁迫条件(如营养不足、缺氧、化学药物、RBF的遗传损伤或者缺少RPs)下,核糖体生物发生会受到干扰,进而引起细胞内稳态被破坏(Boulon et al., 2010)。核糖体应激一般有4个特点,分别为核仁体积变大、RNA Pol I介导的rRNA合成被抑制、相关蛋白核质转位以及细胞周期阻滞(Lu et al., 2018)。

2.1 动物及酵母细胞中的核糖体应激

在动植物细胞中,许多刺激导致的核糖体异常会激活细胞周期停滞甚至凋亡的信号通路,这被称为核糖体应激反应(James et al., 2014)。这一过程在动物细胞中研究得较为深入,其中最典型且最广泛的是p53依赖途径,在这一途径中p53及其不稳定因子MDM2起关键作用。p53是哺乳动物中重要的抗肿瘤转录因子,MDM2是一种E3泛素连接酶,与p53相互作用使其泛素化并降解(Olson, 2004)。因此,在正常生理状态下,MDM2能够抑制p53的活性,将其控制在很低的水平。而在核糖体应激条件下,RPs从核仁中释放,进入

核质(Olson, 2004),释放的一些RPs (包括RPL5、RPL11、RPL23和RPS7)作为效应器直接与MDM2酸性结构域结合,从而降低其对p53的作用(图1) (Chen et al., 2007)。p53-MDM2途径是由RPs缺乏或核糖体生物发生受损引起的发育障碍和疾病的主要原因(Pelletier et al., 2018; Klinge and Woolford, 2019)。关于哺乳动物细胞中p53非依赖途径的研究也有一定进展,如RPL3和RPL11依赖途径(Maekawa et al., 2018)。研究发现,由5-氟尿嘧啶和奥沙利铂诱导的核糖体应激与RPL3的上调及其以游离核糖体形式的积累有关,RPL3不仅能通过控制p21的表达参与药物诱导的细胞周期阻滞、细胞凋亡以及DNA修复,还能以独立于p21的方式控制DNA修复(Esposito et al., 2014)。c-myc基因是myc基因家族的重要成员之一,其产物c-myc通过增强核糖体生物发生和翻译过程促进细胞生长,其与核糖体生物发生之间的良好协调对正常的细胞稳态至关重要。在RPL11依赖途径中,核糖体应激诱导RPL11释放到细胞质和细胞核中,并将microRNA诱导的沉默复合物(microRNA-induced silencing complex, miRISC)募集到c-myc mRNA,介导其衰减(Challagundla et al., 2011)。

酵母中不存在p53和MDM2同源基因,因此其核糖体应激响应机制与多细胞生物不同。酵母Whi5基因编码一种类似于动物细胞中视网膜母细胞瘤抑制因子的蛋白,在细胞周期G1/S转换过程中发挥重要作用(Costanzo et al., 2004)。研究表明,核糖体加工异常造成的G1/S阻滞与Whi5蛋白在核中滞留时间延长相关,且Whi5功能缺失可有效缓解酵母的细胞周期G1阻滞表型,说明Whi5是酵母细胞中重要的核糖体应激响应因子(Costanzo et al., 2004)。此外,与动物细胞类似,酵母核糖体蛋白L5和L11在核糖体胁迫发生时也与核糖体解离,进而以一种未知机制引起G1细胞周期阻滞(Gómez-Herreros et al., 2013)。

2.2 植物细胞中可能的核糖体应激途径

在植物(尤其是模式植物拟南芥)中,已经鉴定出许多RPs或RBFs的突变体,这些突变体存在许多显著且相似的表型。当突变对正常生长影响较小时,真叶常呈现窄而尖的形状,颜色较浅,有明显的凹痕及叶脉(Petricka and Nelson, 2007; Szakonyi and Byrne, 2011; Shinohara et al., 2014);在影响严重的情况

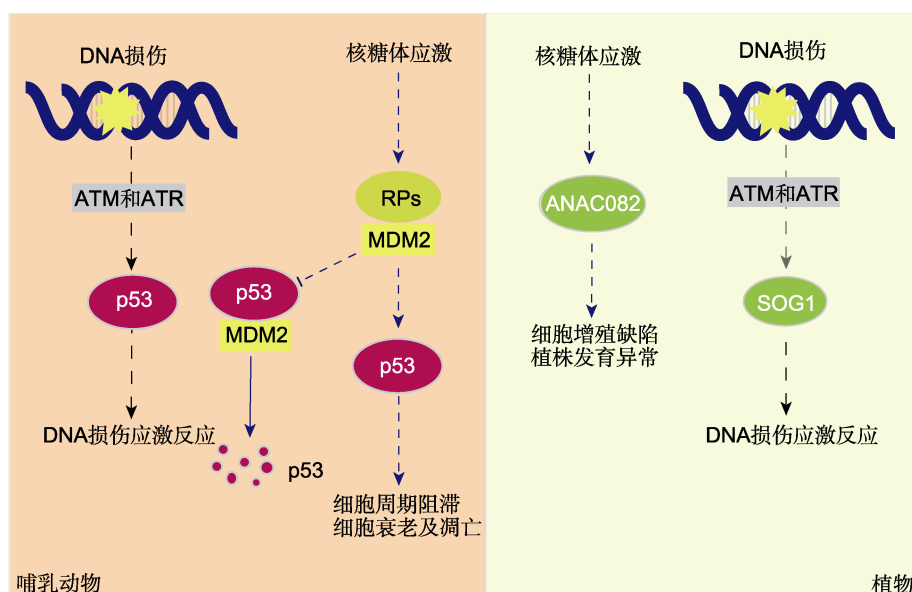


图1 哺乳动物与植物细胞核糖体应激及DNA损伤反应途径比较

核糖体蛋白突变或核糖体生物发生缺陷会导致核糖体应激。在哺乳动物细胞中,核糖体应激和DNA损伤反应均由p53响应。正常情况下,p53与E3泛素连接酶MDM2相互作用,通过泛素降解途径调控其蛋白稳态;当核糖体应激发生时,一部分RPs从核仁中释放出来,与MDM2的酸性结构域结合,降低其对p53的作用。p53作为转录因子介导下游细胞周期阻滞、细胞衰老及凋亡。在植物中,类p53转录因子SOG1被ATM和ATR激活并磷酸化,参与DNA损伤反应,但是目前尚无证据表明SOG1在核糖体应激响应中发挥作用。而另一个NAC家族转录因子ANAC082可能参与一定的核糖体应激反应。实线箭头表示正常状态,虚线箭头表示应激状态。

Figure 1 Comparison of ribosomal stress and DNA damage response pathways between mammalian and plant cells

Ribosomal stress can be resulted from mutations in genes encoding ribosomal proteins or defects in ribosome biogenesis. In mammalian cells, both ribosomal stress and DNA damage responses are mediated by p53. Under normal conditions, p53 interacts with E3 ubiquitin ligase MDM2, which regulates its protein homeostasis through ubiquitin degradation pathway; when ribosomal stress occurs, some RPs are released from the nucleolus and bind to the acidic domain of MDM2, leading to reduction of its effect on p53. p53 acts as a transcription factor to mediate downstream cell cycle arrest, cell aging and apoptosis. In plants, SOG1, a p53-like transcription factor that can be activated and phosphorylated by ATM and ATR, is involved in DNA damage response, but no evidence shows its involvement in ribosomal stress response. However, another NAC transcription factor, ANAC082, is reported to be involved in ribosomal stress response. Solid arrow indicates the normal state, the dotted arrows indicate stress state.

下,胚胎发育异常,根生长迟缓,调控茎尖分生组织建立和维持的基因*CUC1/2* (*Cup-Shaped Cotyledon1/2*)以及*STM* (*Shoot Meristemless*)的表达不受控制(Law et al., 2001);在影响最严重的情况下,所有涉及细胞增殖的过程都会受到强烈阻碍,可能导致胚胎败育(Zemp and Kutay, 2007)。不同核糖体相关突变体普遍的表现特征暗示可能有共同的机制来调节植物生长和发育,以应对各种核糖体生物发生异常。

2.2.1 植物细胞核糖体缺陷表型

RPs相关突变体通常表现出发育迟缓、育性降低和叶片变窄等,这些性状在*rps18*、*rps13*和*rps5*突变体中均可观察到(Petricka and Nelson, 2007)。在RBFs存

在缺陷的植物中,通常可观察到叶片变成尖而窄的形状(Byrne, 2009)。例如,缺乏参与60S亚基成熟的BRX1使植株表现尖的莲座叶(Weis et al., 2015a)。APUM23是一种核仁Puf结构域蛋白,其作为RBFs参与拟南芥核糖体前体加工,其缺失突变体的莲座叶较小,叶片变尖,边缘呈锯齿状,子叶叶脉断裂(Abbasi et al., 2010)。一般而言,尖叶表型的产生可能是由于蛋白质合成不足导致无法进行有效的增殖性细胞分裂或缺乏专门翻译某些参与叶片形态建成基因的核糖体(Weis et al., 2015a)。此外,缺乏参与60S亚基成熟的LSG1-2 (Baßler et al., 2010)或NSN1 (Abbasi et al., 2010)的突变体叶片表现向上卷曲。这种表型可能是由于叶片极性相关基因表达改变,造成叶片极性

混乱所引起,也可能是缺少特殊的核糖体所致(Weis et al., 2015a)。

胚胎发育异常或胚胎致死也是不同核糖体突变体普遍表现出的表型。本课题组前期研究发现,拟南芥AtMDN1功能异常可引起胚胎发育迟缓、畸形甚至败育(Li et al., 2019)。此外,AtMDN1突变还使植株产生叶片变窄变尖、下胚轴花青素积累和根尖分生区细胞数目减少等表型(Li et al., 2019, 2021)。MDN1是一种分子量较大的动力蛋白,在不同物种中保守。其由6个串联的AAA原聚体和1条突出于核糖体前体的长尾组成,在尾部末端具有金属离子依赖的黏附位点(metal ion-dependent adhesion site, MIDAS)结构域(Baßler et al., 2010)。在酵母中, Nop7亚复合体包含Ytm1、Erb1和Nop7三种核糖体加工因子。其中, Ytm1是Mdn1的底物之一(Baßler et al., 2010)。在核仁中, Mdn1尾部的MIDAS结构域与Ytm1蛋白发生相互作用,使Nop7亚复合体与核糖体前体解离,从而使核糖体发生继续进行(Kressler et al., 2012)。本课题组前期研究发现,拟南芥中AtMDN1的MIDAS结构域可以识别并结合Ytm1的同源蛋白AtPES2 (PESCADILLO 2) N端类泛素(ubiquitin-like, UBL)结构域(图2)。在拟南芥野生型背景中, AtPES2蛋白定位于核仁中;而在mdn1-1突变体中, AtPES2部分蛋白游离至核浆,说明AtMDN1参与维持AtPES2的核仁定位。进一步研究发现, AtMDN1作为拟南芥中可能的RBF参与25S rRNA的成熟及60S核糖体的核输出(图2) (Li et al., 2019)。结合AtMDN1功能异常所引发的发育缺陷表型,暗示其功能紊乱可能会引发核糖体应激信号,进而影响植株的生长发育(Li et al., 2019)。

核糖体异常突变体大都表现出多种与生长素相关的异常表型。有研究表明,适当浓度的生长素能激活RPs和RBFs相关基因的表达,促进核糖体的合成(Rosado et al., 2010)。本课题组通过对mdn1-1突变体的研究,发现核糖体加工缺陷使绝大多数参与生长素生物合成、运输以及信号转导的基因表达发生改变。MDN1突变介导的核糖体加工缺陷还改变了参与生长素运输的关键蛋白PIN2 (PIN-FORMED 2)的翻译后调控过程,使其在根尖静止中心处过量积累。此外,研究还发现生长素可以通过多个生长素响应因子(auxin response factors, ARF)调节MDN1的表达(图2) (Li et al., 2021)。上述结果表明,生长素与核糖体

生物发生之间存在一种相互协调的机制,以协同调控植物的生长发育(Li et al., 2021)。

2.2.2 植物细胞应激反应中的p53功能对应物

为了感知和应对细胞压力,动物进化出一套相关信号系统, p53在其中作为中枢调节因子。上文提到在动物细胞中, p53是核仁应激反应的主要调控因子(图1),此外, p53还参与其它细胞应激反应,如DNA损伤和氧化应激(Horn and Vousden, 2007; Hu et al., 2012)。在DNA损伤应激反应中,首先由2种PI3K相关蛋白激酶ATM和ATR感知DNA的各类损伤,使p53特定定位点发生磷酸化从而将其激活(Shiloh, 2001; Sancar et al., 2004)。在活性氧(ROS)引起的氧化应激中,先由DNA的氧化损伤或氧化直接激活ATM触发DNA损伤应激反应,再进一步激活p53 (Barzilai and Yamamoto, 2004)。相比之下,植物也进化出了胁迫信号系统,由不同的转录因子来应对不同胁迫。在植物中, DNA损伤应激反应受SOG1 (suppressor of gamma response 1)/ANAC008调控(图1) (Yoshiyama et al., 2009)。当DNA双链损伤胁迫发生时, ATM使SOG1发生超磷酸化,将其激活来调控下游基因的表达。此外, SOG1还介导ATR依赖的DNA复制损伤信号。因此, SOG1的功能及信号响应机制类似于动物细胞p53 (Yoshiyama et al., 2013)。然而,目前尚无证据表明SOG1在核糖体应激信号中发挥作用。此外,在植物中由于几个NAC家族转录因子ATAF1/ANAC002和ANAC092的作用,氧化应激能够独立于DNA损伤促进叶片衰老(Balazadeh et al., 2010; Garapati et al., 2015)。

综上所述,在细胞应激反应中,动物细胞利用p53来调节对核糖体、DNA损伤和氧化应激的反应,而植物细胞可能利用多种NAC转录因子来发挥类似p53的功能。

2.2.3 ANAC082, 一个潜在的植物细胞核糖体应激响应因子

拟南芥rid2 (root initiation defective 2)是温度敏感突变体,由1个编码类RNA甲基转移酶蛋白基因突变引起。在高温胁迫条件下, rid2植株细胞中核糖体加工受到严重影响(Ohbayashi et al., 2017)。通过对rid2进行人工诱变及筛选,发现一株能够缓解rid2高温发

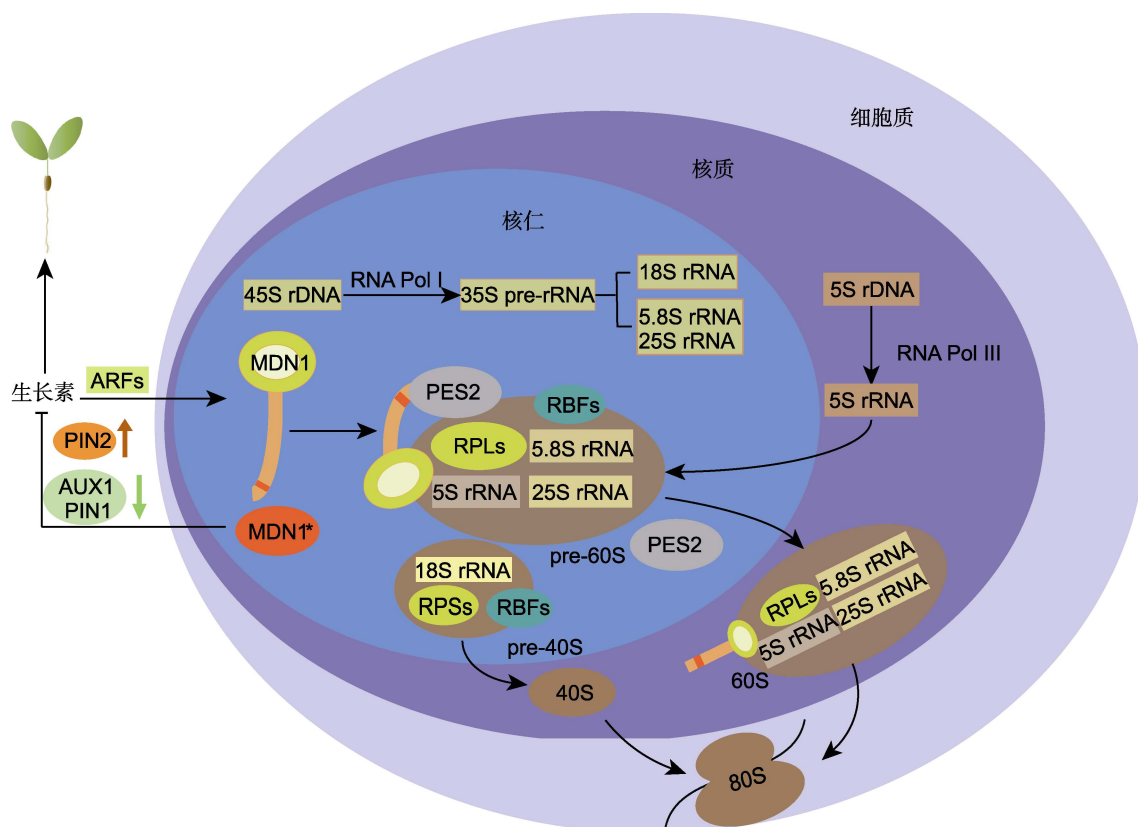


图2 核糖体发生及MDN1相关功能

RNA Pol I: RNA聚合酶I; RPSs/RPLs: 核糖体小/大亚基蛋白; ARFs: 生长素响应因子; RBFs: 核糖体组装因子。在核糖体合成过程中, MDN1与PES2作为60S RBFs参与60S亚基的组装。MDN1的MIDAS结构域能够与PES2的UBL结构域相互作用, 在60S核糖体前体即将进入核质时, MDN1通过“机械力”使PES2从60S前体中解离; 当60S亚基出核进入胞质时, MDN1也从中解离。生长素与核糖体生物发生之间存在相互协调机制, 正常情况下, 生长素能通过ARF激活MDN1的表达; 当MDN1功能发生异常时(用红色MDN1*表示), 会造成PIN2蛋白积累量增加, AUX1和PIN1积累量降低, 进而改变生长素在植株中的稳态和分布。因此, 生长素系统可能通过参与核糖体应激响应来调控植物的生长发育。

Figure 2 Ribosome biogenesis and the related function of MDN1

RNA Pol I: RNA polymerase I; RPSs/RPLs: Ribosomal proteins of the small/large subunit; ARFs: Auxin response factors; RBFs: Ribosomes biogenetic factors. In the process of ribosome biogenesis, both MDN1 and PES2 participate in the assembly of 60S subunits as RBFs. The MIDAS domain of MDN1 can interact with the UBL domain of PES2. When the 60S ribosome precursor is about to enter the nucleoplasm, MDN1 uses 'mechanical force' to dissociate PES2 from the 60S precursor; at the nuclear export checkpoint, MDN1 is also dissociated from the 60S ribosomal particle. There is a coordination mechanism between auxin and ribosome biogenesis. Under normal conditions, auxin activates the expression of MDN1 through ARFs. When MDN1 is dysfunction (indicated by the red MDN1*), the accumulation of PIN2 protein increases while that of AUX1 and PIN1 decreases, probably leading to changes in both homeostasis and distribution of auxin in plants. Therefore, the auxin system may participate in the ribosomal stress response to regulate plant growth and development.

育缺陷的突变体*sriw1*。利用图位克隆技术明确*sriw1*的突变基因是位于5号染色体的At5g09330, 其编码1个NAC转录因子ANAC082 (Ohbayashi et al., 2017)。进一步的遗传学分析发现, *sriw1*还能缓解其它核糖体加工异常且对温度敏感的突变体(如*rid3*和*rh10*)的表型, 但对与核糖体加工不相关的温度敏感突变体

(如*root primordium defective 1*和*root growth defective 3*)的表型无显著影响。上述结果表明, ANAC082可能专一地响应核糖体加工异常。

在*sriw1**rid2*双突变体中, 28°C条件下所有*rid2*特有的可见缺陷都显著减弱, 包括主根生长和叶片发育得到改善, 不定根和愈伤组织形成的抑制解除, 下胚

轴中柱细胞恢复有效分裂以及核仁异常增大得到缓解等(Ohbayashi et al., 2017)。Ohbayashi等(2017)对ANAC082的表达模式进行分析,发现其分布于核糖体相关突变的表型效应明显区域,如茎尖和根尖分生组织及叶原基,且高温胁迫能显著提高其启动子活性。这表明ANAC082在核糖体生物发生紊乱的下游起作用,并可能介导一系列导致发育改变和细胞增殖缺陷的应激反应(图1)。

最近,Wang等(2020)揭示响应核糖体缺陷的根表皮细胞命运转换的分子机制,这一过程有ANAC082参与。拟南芥根表皮包含根毛细胞和非毛细胞,2种细胞命运的不同依赖于其分布位置。在该位置依赖的模式中,仅邻近1个下皮层细胞(N位)的表皮细胞采用非毛细胞命运,邻近2个下皮层细胞(H位)的表皮细胞采用根毛细胞命运(Cloues, 2000)。这种模式的产生依赖于转录因子调控网络,该网络包括WER (werewolf)、GL3/EGL3 (glabra3/enhancer of glabra 3)以及TTG1 (transparent testa glabra 1)等转录因子(Lee and Schiefelbein, 1999; Wang et al., 2020)。在apum23-4突变体中,根毛细胞采用非毛细胞命运,通常来说这种细胞命运的转变依赖于MYB23 (由WER靶基因编码的MYB蛋白),其控制毛状体形成并与转录因子网络中的WER相互作用(Wang et al., 2020)。然而,apum23-4突变体中MYB23的异位表达并不依赖WER,而是需要ANAC082的参与(Wang et al., 2020)。进一步研究发现,单独的ANAC082不足以激活MYB23的表达,因此ANAC082并非该过程唯一的调节因子,其可能通过控制一些中间调节因子间接上调MYB23的表达,或者需要辅助因子与MYB23启动子结合(Wang et al., 2020)。

植物中的组织再生和种子萌发都涉及大量细胞增殖和细胞生长,这严重依赖于核糖体的活性。因此,ANAC082介导的这些响应过程可能是一种与核糖体缺陷抗争的程序性反应(Wang et al., 2020)。目前,关于ANAC082在核糖体应激中的具体作用途径有2种可能,一种是由于核糖体生物发生或核糖体功能的扰动刺激ANAC082的表达,ANAC082可能与一种未知的NAC转录因子形成异源二聚体(Ernst et al., 2004),该二聚体作为转录激活因子激活相关基因的转录,进而调节细胞增殖以及植物生长发育(Ohbayashi et al., 2017)。另一种可能的机制是,ANAC082 mRNA在5'

UTR处存在1个保守的上游开放阅读框(upstream open reading frame, uORF) (Takahashi et al., 2012)。迄今为止,已知的大多数调节性uORF会导致核糖体在其终止密码子处停滞,阻碍核糖体进入主要的ORF (Cao and Geballe, 1996)。这种uORF依赖性控制可能受到核糖体缺陷的影响,其可能的机制是,在核仁胁迫下,功能核糖体缺乏、核糖体亚基失衡或其它核糖体异常抑制了uORF的表达,从而使ANAC082的表达量增加(Ohbayashi et al., 2017)。因此,ANAC082的uORF可能作为核糖体应激的候选位点(Ohbayashi et al., 2017)。未来关于ANAC082的研究有望揭示植物核糖体胁迫反应的分子机制和生理意义。

3 小结与展望

在植物进化过程中,NAC转录因子高度多样化,大量研究表明,不同的NAC因子参与植物不同的应激反应,并且有的对应于p53在动物细胞应激反应中的作用。目前,对NAC家族成员ANAC082在植物核糖体应激过程中的作用解析可能是解答植物核糖体应激响应机制的一个关键点。在对ANAC082的相关研究中提出了2种可能的模型:(1)在核糖体应激条件下,uORF处核糖体阻滞对ANAC082表达的约束被解除,导致ANAC082被激活;(2)在核糖体应激发生时,ANAC082与其它NAC转录因子相互作用形成二聚体从而被激活。这2条可能的途径还需要在后续的研究中进一步证实。此外,在mdn1-1中生长素调控网络发生改变,这可能是其表现生长素缺陷表型的重要原因。然而,生长素系统如何感知核糖体缺陷仍属未知,ANAC082能否通过调节生长素系统响应核糖体应激将是下一步的研究重点。

参考文献

- Abbasi N, Kim HB, Park NI, Kim HS, Kim YK, Park YI, Choi SB (2010). APUM23, a nucleolar Puf domain protein, is involved in pre-ribosomal RNA processing and normal growth patterning in *Arabidopsis*. *Plant J* **64**, 960–976.
- Armache JP, Jarasch A, Anger AM, Villa E, Becker T, Bhushan S, Jossinet F, Habeck M, Dindar G, Frankenberg S, Marquez V, Mielke T, Thomm M, Berninghausen O, Beatrix B, Söding J, Westhof E, Wilson DN,

- Beckmann R** (2010). Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 19748–19753.
- Balazadeh S, Wu AH, Mueller-Roeber B** (2010). Salt-triggered expression of the ANAC092-dependent senescence regulon in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **5**, 733–735.
- Barzilai A, Yamamoto KI** (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* **3**, 1109–1115.
- Baßler J, Hurt E** (2019). Eukaryotic ribosome assembly. *Annu Rev Biochem* **88**, 281–306.
- Baßler J, Kallas M, Pertschy B, Ulbrich C, Thoms M, Hurt E** (2010). The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. *Mol Cell* **38**, 712–721.
- Ben-Shem A, de Loubresse NG, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M** (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524–1529.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI** (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 574–585.
- Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI** (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell* **40**, 216–227.
- Byrne ME** (2009). A role for the ribosome in development. *Trends Plant Sci* **14**, 512–519.
- Cao J, Geballe AP** (1996). Coding sequence-dependent ribosomal arrest at termination of translation. *Mol Cell Biol* **16**, 603–608.
- Cech TT** (2000). The ribosome is a ribozyme. *Science* **289**, 878–879.
- Cerezo E, Plisson-Chastang C, Henras AK, Lebaron S, Gleizes PE, O'Donohue MF, Romeo Y, Henry Y** (2019). Maturation of pre-40S particles in yeast and humans. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **10**, e1516.
- Challagundla KB, Sun XX, Zhang X, DeVine T, Zhang Q, Sears RC, Dai MS** (2011). Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress. *Mol Cell Biol* **31**, 4007–4021.
- Chen D, Zhang Z, Li M, Wang W, Li Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R** (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* **26**, 5029–5037.
- Clowes FAL** (2000). Pattern in root meristem development in angiosperms. *New Phytol* **146**, 83–94.
- Costanzo M, Nishikawa JL, Tang XJ, Millman JS, Schub O, Breitkreuz K, Dewar D, Rupes I, Andrews B, Tyers M** (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* **117**, 899–913.
- Eichler DC, Craig N** (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**, 197–239.
- Ernst HA, Olsen AN, Skriver K, Larsen S, Lo Leggio L** (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* **5**, 297–303.
- Esposito D, Crescenzi E, Sagar V, Loreni F, Russo A, Russo G** (2014). Human rpl3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and L-OHP. *Oncotarget* **5**, 11737–11751.
- Garapati P, Xue GP, Munné-Bosch S, Balazadeh S** (2015). Transcription factor ATAF1 in *Arabidopsis* promotes senescence by direct regulation of key chloroplast maintenance and senescence transcriptional cascades. *Plant Physiol* **168**, 1122–1139.
- Gómez-Herreros F, Rodríguez-Galán O, Morillo-Huesca M, Maya D, Arista-Romero M, de la Cruz J, Chávez S, Muñoz-Centeno MC** (2013). Balanced production of ribosome components is required for proper G₁/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **288**, 31689–31700.
- Grandi P, Rybin V, Baßler J, Petfalski E, Strauß D, Marzioch M, Schäfer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervey D, Gavin AC, Hurt E** (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* **10**, 105–115.
- Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE** (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**, 225–242.
- Holmberg Olausson K, Nistér M, Lindström MS** (2012). p53-dependent and -independent nucleolar stress responses. *Cells* **1**, 774–798.
- Horn HF, Vousden KH** (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* **26**, 1306–1316.
- Hu WW, Feng ZH, Levine AJ** (2012). The regulation of multiple p53 stress responses is mediated through MDM2. *Genes Cancer* **3**, 199–208.
- James A, Wang YB, Raje H, Rosby R, DiMario P** (2014). Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* **5**, 402–426.
- Klinge S, Woolford JL Jr** (2019). Ribosome assembly

- coming into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 116–131.
- Kornprobst M, Turk M, Kellner N, Cheng JD, Flemming D, Koš-Braun I, Koš M, Thoms M, Berninghausen O, Beckmann R, Hurt E** (2016). Architecture of the 90S pre-ribosome: a structural view on the birth of the eukaryotic ribosome. *Cell* **166**, 380–393.
- Koš M, Tollervey D** (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell* **37**, 809–820.
- Kressler D, Hurt E, Bergler H, Baßler J** (2012). The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation-molecular machines that strip pre-ribosomal particles. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 92–100.
- Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH** (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299–303.
- Lafontaine DLJ** (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 11–19.
- Law GL, Raney A, Heusner C, Morris DR** (2001). Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* **276**, 38036–38043.
- Lee MM, Schiefelbein J** (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473–483.
- Li K, Zhou XM, Sun XP, Li GH, Hou L, Zhao SZ, Zhao CZ, Ma CL, Li PC, Wang XJ** (2021). Coordination between MIDASIN 1-mediated ribosome biogenesis and auxin modulates plant development. *J Exp Bot* **72**, 2501–2513.
- Li PC, Li K, Wang J, Zhao CZ, Zhao SZ, Hou L, Xia H, Ma CL, Wang XJ** (2019). The AAA-ATPase MIDASIN 1 functions in ribosome biogenesis and is essential for embryo and root development. *Plant Physiol* **180**, 289–304.
- Lu L, Yi HM, Chen C, Yan SC, Yao H, He GC, Li GF, Jiang YQ, Deng T, Deng XY** (2018). Nucleolar stress: is there a reverse version? *J Cancer* **9**, 3723–3727.
- Maekawa S, Ishida T, Yanagisawa S** (2018). Reduced expression of *APUM24*, encoding a novel rRNA processing factor, induces sugar-dependent nucleolar stress and altered sugar responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **30**, 209–227.
- Mills EW, Green R** (2017). Ribosomopathies: there's strength in numbers. *Science* **358**, eaan2755.
- Ohbayashi I, Lin CY, Shinohara N, Matsumura Y, Machida Y, Horiguchi G, Tsukaya H, Sugiyama M** (2017). Evidence for a role of ANAC082 as a ribosomal stress response mediator leading to growth defects and developmental alterations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **29**, 2644–2660.
- Olson MOJ** (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* **224**, pe10.
- Palm D, Streit D, Shanmugam T, Weis BL, Ruprecht M, Simm S, Schleiff E** (2019). Plant-specific ribosome biogenesis factors in *Arabidopsis thaliana* with essential function in rRNA processing. *Nucleic Acids Res* **47**, 1880–1895.
- Pelletier J, Thomas G, Volarević S** (2018). Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* **18**, 51–63.
- Petricka JJ, Nelson TM** (2007). *Arabidopsis* nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol* **144**, 173–186.
- Rosado A, Sohn EJ, Drakakaki G, Pan SQ, Swidergal A, Xiong YQ, Kang BH, Bressan RA, Raikhel NV** (2010). Auxin-mediated ribosomal biogenesis regulates vacuolar trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 143–158.
- Sáez-Vásquez J, Delseny M** (2019). Ribosome biogenesis in plants: from functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell* **31**, 1945–1967.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S** (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39–85.
- Shiloh Y** (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 71–77.
- Shinohara N, Ohbayashi I, Sugiyama M** (2014). Involvement of rRNA biosynthesis in the regulation of *CUC1* gene expression and pre-meristematic cell mound formation during shoot regeneration. *Front Plant Sci* **5**, 159.
- Szakonyi D, Byrne ME** (2011). Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **65**, 269–281.
- Takahashi H, Takahashi A, Naito S, Onouchi H** (2012). BAIUCAS: a novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences and its application to the *Arabidopsis thaliana* genome. *Bioinformatics* **28**, 2231–2241.
- Tomecki R, Sikorski PJ, Zakrzewska-Placzek M** (2017). Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells—focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Lett* **591**, 1801–1850.
- Unfried I, Gruendler P** (1990). Nucleotide sequence of the

- 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **18**, 4011.
- Unfried I, Stocker U, Gruendler P (1989). Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. *Nucleic Acids Res* **17**, 7513.
- Wang WJ, Ryu KH, Bruex A, Barron C, Schiefelbein J (2020). Molecular basis for a cell fate switch in response to impaired ribosome biogenesis in the *Arabidopsis* root epidermis. *Plant Cell* **32**, 2402–2423.
- Weis BL, Kovacevic J, Missbach S, Schleiff E (2015a). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends Plant Sci* **20**, 729–740.
- Weis BL, Palm D, Missbach S, Bohnsack MT, Schleiff E (2015b). atBRX1-1 and atBRX1-2 are involved in an alternative rRNA processing pathway in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **21**, 415–425.
- Yoshiyama K, Conklin PA, Huefner ND, Britt AB (2009). *Suppressor of gamma response 1 (SOG1)* encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12843–12848.
- Yoshiyama KO, Kobayashi J, Ogita N, Ueda M, Kimura S, Maki H, Umeda M (2013). ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep* **14**, 817–822.
- Yusupova G, Yusupov M (2014). High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annu Rev Biochem* **83**, 467–486.
- Zemp I, Kutay U (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett* **581**, 2783–2793.

A Review on the Mechanism of Ribosome Stress Response in Plants

Jingwen Wang¹, Xingjun Wang^{1,2}, Changle Ma¹, Pengcheng Li^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; ²Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Institute of Crop Germplasm Resources, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

Abstract The nucleolus is a key structure in the nucleus of eukaryotic cells. Ribosome biogenesis initially takes place in the nucleolus, which involves a series of complex reactions and requires the participation of many nucleolus-associated factors. Abnormal ribosome biogenesis usually leads to disordered nucleolus structure, cell cycle arrest, cell senescence, and even cell death. The mechanism of ribosomal stress response has been studied well in mammals, while it remains largely unknown in plant cells. Nevertheless, it has been found that members of the plant-specific NAC transcription factor family are involved in various intracellular stress responses, including ribosomal stress, in plant cells. In addition, we previously reported a coordination mechanism between auxin system and ribosome biogenesis for modulating plant development. In this review, we discussed potential mechanisms of ribosome stress response in plant cells through combining the knowledge of ribosomal stress response pathways in mammals.

Key words ribosome, ribosomal stress, NAC transcription factor, MIDASIN 1, auxin

Wang JW, Wang XJ, Ma CL, Li PC (2022). A review on the mechanism of ribosome stress response in plants. *Chin Bull Bot* **57**, 80–89.

* Author for correspondence. E-mail: lpcsas@outlook.com