



植物中相分离研究进展

王赞颖[†], 李昌轩[†], 李瑶曦^{*}, 方晓峰^{*}

清华大学生命科学学院, 北京 100084

[†] 同等贡献

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

收稿日期: 2023-06-12; 接受日期: 2023-07-26; 网络版发表日期: 2024-04-25

国家自然科学基金(批准号: 32222015, 32161133001)资助

摘要 过去十多年相分离在生物学中的发展为生物学研究提供了新的视角. 相分离是目前生物学领域最前沿的研究方向之一. 植物在生长发育过程中, 往往面对着外界环境条件, 如光照、温度、水分、机械刺激等的剧烈变化, 这要求植物细胞短期内发生快速基因表达调控以应对这些生存环境的变化. 近几年的研究发现, 植物细胞中生物大分子通过相分离形成的无膜细胞器通过区室化、浓缩生物大分子等方式影响诸多细胞生命活动, 在生长发育以及响应胁迫过程中起重要作用. 本文阐释了生物大分子液-液相分离发生的原理和行使的功能, 总结了近年来植物领域中的相关研究, 并讨论了液-液相分离未来在植物领域中的发展前景.

关键词 相分离, 无膜细胞器, 植物生长发育, 植物逆境

细胞内时刻在不同空间尺度上进行着复杂且高效的生化反应. 为了实现这些过程, 细胞进化出一系列具有磷脂双分子层包裹的细胞器, 如内质网、高尔基体、溶酶体等, 它们以物理分隔的形式将细胞内不同生物学功能进行区室化, 并通过特定的膜转运蛋白以及复合物机器进行细胞器间的物质交换和运输. 然而近几年人们通过研究发现, 细胞中存在着大量无膜细胞器, 即生物大分子通过相分离的方式聚集成纳米至微米尺度的凝聚体, 更动态、更精细地区室化不同生物学过程, 保证细胞内的反应高效有序地进行.

第一个无膜细胞器于1830年在神经元细胞中被发现并命名为核仁^[1]. 1903年Santiago Ramón y Cajal^[2]同样在神经元细胞中发现一类与核仁靠近的无膜细胞器, 即为人们所熟知的Cajal body. 此外, 细胞核和细胞

质基质中还存在多种无膜细胞器. 2009年, 德国马普研究所的科学家Clifford P. Brangwynne等人^[3]描述了线虫早期胚胎细胞中的一类无膜细胞器P颗粒的物理性质: 快速融合、浸润细胞核膜表面、与外界进行快速交换等, 同时也初步测定了P颗粒与水滴的区别: P颗粒具有更大的黏度, 类似于甘油; P颗粒的表面张力远小于水滴的表面张力, 可能更有利于P颗粒快速解聚和组装. 2012年, 美国西南医学中心的Rosen团队^[4]首次在体外通过蛋白质多价相互作用实现了液-液相分离. 至此, 科学家们逐渐意识到相分离可能是细胞内无膜细胞器形成的普遍机制. 近几年, 越来越多的无膜细胞器被证明具有液滴的性质, 例如, 细胞在受到胁迫后聚集40S核糖体亚基、翻译起始复合物、mRNA和RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)而形成的

引用格式: 王赞颖, 李昌轩, 李瑶曦, 等. 植物中相分离研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1144–1158

Wang Y Y, Li C X, Li Y X, et al. The role of phase separation in plant biology (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1144–1158, doi: [10.1360/SSV-2023-0112](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0112)

以暂停翻译的应激颗粒(stress granules, SG)^[5]、与RNA代谢息息相关的P小体(processing body, PB)^[6]、细胞核中参与多种生物学过程的PML小体(PML bodies)^[7]、DNA损伤响应蛋白在DNA双链断裂损伤修复位点形成的damage foci^[8]、参与microRNA(miRNA)合成和加工的切割小体(dicing-bodies, D-bodies)^[9]、光小体(photo bodies)^[10]等。这些无膜细胞器是由蛋白和核酸等生物大分子以液-液相分离的方式在空间上凝聚形成, 因而人们又称无膜细胞器为“生物大分子凝聚体”。

1 相分离的介绍

1.1 相分离的物理化学原理

溶质分子发生分离, 形成高浓度和低浓度的两个相对独立的相的过程即为相分离。从物理上讲, 在溶质分子间没有相互作用的溶液体系中, 溶质分子倾向于自由扩散以增加系统的混乱度(即熵), 从而达到系统能量最低的状态而稳定存在, 此时, 系统自由能与溶质分子浓度呈现单一变化关系(图1, 蓝色线)。但是当溶液中的溶质分子间有相互作用时, 在一定条件下, 需要将溶质分子分离成两个相才能将系统的自由能降到最低(图1, 红色线)。典型的例子是高分子化学中的液-液相分离。由单个单元经过多聚而形成的高聚物分子之间由于存在较多的相互作用, 容易在溶液中分离成两个相^[11]。

生物大分子(如蛋白质和核酸)与化学高聚物类似, 分子间存在很多相互作用, 容易在细胞质基质中发生分离形成高浓度的凝聚体和低浓度的弥散相。当然, 很多理化因素都会影响系统自由能, 从而影响相分离的过程。此外, 生物大分子在细胞质基质中的相分离还会受到“溶质”与“溶剂”分子间的相互作用的影响。

根据所形成凝聚体的性质, 可以将相分离分为液-液相分离和液-固相分离。液-液相分离形成的凝聚体结构往往具有更高的流动性和动态交换性, 可以与周围的分子进行快速交换。液-液相分离形成的液相也会发生老化形成固相, 如晶体或者淀粉样纤维^[12,13]。而有一些研究也发现了液-液与液-固相分离的中间态, 如胶状聚集集体以及液晶体^[14-17]。究其本质原因, 相的不同性质是由分子间相互作用的强弱决定的。细胞内凝聚体相分离状态的转化往往与其生物学功能紧密联系, 既

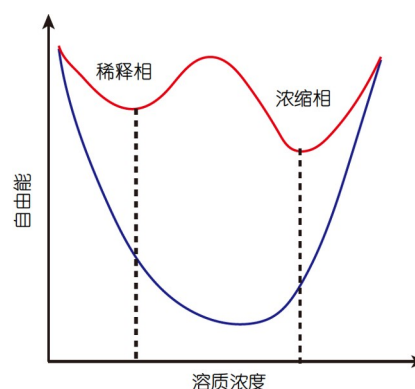


图 1 相分离过程的系统自由能变化。根据吉布斯自由能公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, 当分子间不存在相互作用的情况下(蓝色线)溶质分子浓度与系统自由能呈现单一变化关系: 生物大分子浓度低时, 随着浓度增加, 体系的熵 ΔS 增加, ΔG 减少; 当分子浓度高于某个阈值, 分子混乱度降低, 即熵 ΔS 减少, ΔG 增加。当生物大分子间或分子内存在相互作用(如结构域间的多价作用、 π - π 共轭、 π -阳离子共轭、正负电荷相互作用、偶极-偶极相互作用、氢键等弱的多价作用)时(红色线), 生物大分子以高浓度和低浓度两个相存在才能使得体系内自由能 ΔG 最低

Figure 1 Thermodynamic changes in phase separation. According to the Gibbs free energy equation ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), in a simple system of non-interacting molecules (shown in blue line), free energy as a function of solute concentration is unimodal: ΔS increases and ΔG decreases with increasing concentration; above a threshold, ΔS decreases and ΔG increases with increasing concentration. When solute molecules interact (shown in red line), the free energy of the system can be minimized by separating the solute molecules into two phases of different concentrations

受细胞内生理环境(如pH、离子强度、温度、渗透压等)改变的影响, 同时也会被蛋白翻译后修饰(post-translational modification, PTM)所影响, 如磷酸化^[18-20]、泛素化^[21]、SUMO化^[22]、甲基化^[23,24]、乙酰化^[25]等。

1.2 多价相互作用驱动相分离

封闭体系趋向于自由能最低的状态, 因而从热力学角度看, 相分离的发生降低了体系整体的自由能。体系的自由能包括焓与熵变化的贡献, 对于生物大分子存在的体系而言, 其焓变包含生物大分子与溶剂分子之间、生物大分子之间以及溶剂分子之间势能的变化^[26], 因此生物大分子之间的相互作用对于其相分离状态至关重要。研究表明, 生物大分子相分离的主要驱动力是多价相互作用^[4], 这种相互作用可以发生在蛋白与蛋白间、蛋白与核酸间及核酸与核酸间。如细胞骨架信号调控通路中, 多价蛋白肾素的磷酸化酪氨酸残基与Nck的SH3(Src homology 3)结构域及N-WASP(Neural Wiskott-Aldrich-syndrome protein)的脯

氨酸富集结构域通过分子间多价相互作用诱导体内和体外相分离的发生^[4]。另外, P小体组成成分mRNA脱帽酶亚基DCP2(decapping mRNA 2)、mRNA脱帽蛋白增强子EDC3(enhancer of mRNA decapping 3)和核仁蛋白核磷霉素NPM1(nucleophosmin 1)等都通过折叠结构域的多价互作驱动相分离^[27]。由重复折叠区域组成的人工合成蛋白通过多价相互作用亦可驱动相分离的形成, 如人工合成多聚SH3域蛋白与多聚PRM配体发生多价互作引发相分离^[4]。

具有特定结构的结构域之间产生的多价相互作用强度通常较强。此外, 弱的多价相互作用也是相分离的重要驱动力。一些蛋白质所含有的固有无序区域(intrinsically disordered regions, IDRs)是提供弱的多价相互作用的重要元件。顾名思义, IDR是不能折叠成特定构象的氨基酸序列。其序列特征是具有较低的复杂性, 氨基酸类型往往以甘氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸和酪氨酸为主, 亦或是带电氨基酸如赖氨酸, 精氨酸, 谷氨酸和天冬氨酸^[28]。

正是由于IDR不具有固定折叠的构象, 氨基酸残基趋于暴露, 使这些氨基酸之间有机会产生多种弱的相互作用。芳香族氨基酸形成的分子间或者分子内的 π - π 、 π -阳离子等的共轭效应产生弱的多价相互作用。例如, DDX4(DEAD-box helicase 4)通过苯丙氨酸残基与精氨酸残基形成分子内的 π -阳离子效应与分子间的 π - π 效应互作^[29]。与之类似, BuGZ(GLEBS domain-containing mitotic protein)和肾素NICD区(nephrin intracellular domain)芳香族氨基酸的突变大大降低了蛋白相分离的能力^[30,31]。非极性或弱极性氨基酸残基的疏水作用对相分离很重要, 如谷氨酰胺或天冬酰胺更倾向于与自身相互作用, 而不是与水相互作用。富含疏水性氨基酸的基序更利于相分离的发生。氢键亦可驱动相分离, 如很多蛋白的RNA结合域都具有RGG/RG基序, 可通过氢键与RNA发生相互作用。带电氨基酸有利于分子内或者分子间正负电荷静电吸引, 帮助蛋白等大分子聚集。在细胞内, 翻译后修饰往往通过改变带电氨基酸的性质而改变大分子相分离的能力, 如甲基化修饰的精氨酸与酪氨酸的苯环的相互作用会减弱, 降低了FUS蛋白的相分离能力^[24,32,33]。

1.3 影响相分离的细胞内环境因素

生物大分子的相分离是一个多因素的动态过程,

不仅可在正常条件下自发发生, 而且还受到一系列环境因素的刺激, 包括温度、pH、ATP/能量、大分子浓度和离子强度的变化。这些特定的生理参数构成了相边界, 通过改变一个或多个参数, 如提高温度、剥夺营养物质、降低pH值或改变其他因素, 跨越这个边界, 可以引起相分离, 形成凝聚物, 这是细胞的适应性调控反应^[34]。

温度的变化可能影响蛋白质氨基酸残基的亲疏水程度以及氢键作用, 进而影响相分离的发生。根据该蛋白相分离的性质, 可将导致其相分离发生的临界温度分为最高临界溶解温度(upper critical solution temperatures, UCST)和最低临界溶解温度(lower critical solution temperatures, LCST)。UCST指的是低于临界温度发生相分离, 而LCST则与之相反。如体外纯化的酵母蛋白Pab1(polyadenylate-binding protein 1)随着温度的升高水合半径变大, 表现为类似LCST性质^[35]; 而溶菌酶^[36]、DDX4^[29]、节肢弹性蛋白^[37]均具有UCST性质。

pH变化可以通过改变组分的净电荷来影响分子内或分子间蛋白-蛋白/RNA的相互作用, 从而影响相分离的发生。例如在非胁迫条件下, G3BP1(Ras GTPase-activating protein-binding protein 1)其中心带负电的富含谷氨酸的IDR可以与其C端带正电的富含RG的区域相互作用, 使G3BP1折叠成闭合构象, 破坏其相分离状态。而在pH降低的条件下, 谷氨酸的质子化改变了酸性IDR的净电荷, 破坏了其与RG富集区域的稳定静电相互作用, 使G3BP1从其闭合的自抑制状态打开并释放RG富集区域, 进一步促进分子间蛋白-蛋白/RNA相互作用来驱动相分离^[38]。此外, 低pH可以诱导Pub1(PolyU-binding protein)组装成为凝聚体。酸性环境可能改变RRM(RNA recognition motifs)结构域内的电荷分布, 从而通过静电相互作用促进了Pub1凝聚体的组装^[38]。

亲水分子ATP具有抑制蛋白聚集体形成的功能。除了作为“能量货币”, 细胞内高浓度的ATP可能用于保持蛋白质可溶性。如ATP可明显抑制hnRNP(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)、FUS(fused in sarcoma)、TAF15(TATA-box binding protein associated factor 15)形成相分离, 溶解已形成的蛋白聚集体^[39], 这可能是由于ATP的亲水性降低了相分离蛋白的疏水作用。

1.4 PTM调控相分离

PTM是真核生物中广泛存在的一种调控蛋白活性的重要方式, 细胞中超过一半的蛋白会发生PTM. 上文中提到, PTM是调控相分离的重要因素, 其往往通过改变蛋白质结构、带电性质、疏水性以及其他性质影响相的分离和转变. PTM的位点经常发生于IDR中.

磷酸化修饰是最重要和常见的PTM之一, 往往发生在丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等残基上. 磷酸化引入了负电荷, 可能会改变蛋白电荷分布和静电相互作用, 从而正向或者负向调控相分离. 如磷酸化对Tau K18片段以及全长均有促进作用^[40], 而FUS-N端低复杂度结构域(low complexity domain, LCD)区的磷酸化则抑制了FUS的相分离能力^[41].

相比于磷酸化修饰, 精氨酸甲基化修饰相对稳定. 精氨酸甲基化由蛋白质精氨酸甲基转移酶PRMT(protein arginine methyltransferase)家族成员催化精氨酸的胍氮原子生成一个或两个甲基^[42]. 精氨酸是带正电荷的氨基酸, 通常介导阳离子- π 相互作用. 精氨酸的甲基化修饰并不会改变正电荷, 但是会通过降低氢键能力增加疏水性^[43]. 具有RGG/RG重复序列的RNA结合蛋白往往通过精氨酸-芳香族氨基酸的互作驱动其相分离^[44], 而RGG/RG区域精氨酸甲基化修饰往往降低相分离能力^[23,24]. 如DDX4的相分离可以被PRMT1体外催化形成的不对称双甲基化所抑制^[29].

除了组蛋白, 其他蛋白也可被乙酰化修饰. 由赖氨酸乙酰转移酶催化乙酰辅酶A提供的乙酰基与赖氨酸残基的 ϵ -氨基侧链连接^[45], 并可被赖氨酸去乙酰化酶逆转. 而N端乙酰转移酶可以催化乙酰基连接N端第一个氨基酸的 α -氨基位置的不可逆修饰反应^[46]. DDX3 (dead box RNA helicase 3)在K118位模拟乙酰化突变降低了DDX3-IDR相分离能力^[47], 这可能是由于乙酰化影响了赖氨酸与阴离子或者芳香族氨基酸之间的相互作用.

泛素是一种高度保守的蛋白, 含有76个氨基酸. 泛素C端甘氨酸的羧基可被酶催化与目的蛋白或其他泛素的赖氨酸残基 ϵ -氨基连接. 与之前提到的PTM不同, 多泛素化可与不同的基序形成多价相互作用^[48]. 如在经典的泛素-蛋白酶体蛋白降解途径中, 泛素化蛋白与底物穿梭因子RAD23B两个泛素相关的结构UBA(ubiquitin-associate)之间的多价相互作用驱动了相变的

过程^[49].

一些情况下蛋白会被不同类型的PTM修饰, 从而导致合作或者竞争效应^[50]. 如应激颗粒成核蛋白G3BP1的去甲基化和去磷酸化协同促进应激颗粒的组装和翻译抑制^[51].

除以上提到的PTM外, 精氨酸瓜氨酸化^[52]、SUMO化^[22]等亦有报道调控相分离能力.

1.5 相分离的功能

具有相分离能力的蛋白对外界刺激响应更迅速. 液-液相分离的形成原理使其在溶液条件仅发生微小改变的情况下即能做出快速和决定性的反应, 这样的生物物理反应远比细胞内转录和翻译事件的启动要快. 已有研究表明, 液-液相分离被生物体用于对热和pH应激响应^[35,38,53].

相分离也可起到缓冲生物大分子的浓度的作用^[54]. 细胞内蛋白质的浓度达到相分离阈值(critical concentration)时会诱发相分离, 更多的蛋白质分子储存于凝聚体中; 当胞内环境中蛋白质浓度下降后, 凝聚体中的分子会扩散进入弥散相, 由此可以保证弥散相中蛋白质的浓度, 维持相对稳定的状态.

相分离还可局部浓缩招募大分子, 激活信号传导, 加速生化反应. 例如, miRISC复合物(miRNA-induced silencing complex)在相分离时增强了去帽酶活性^[55], 以及通过相分离形成的T细胞受体簇促进了下游信号传导^[19]. 同样, 中心体成分PCM(pericentriolar material)通过相分离聚集微管蛋白以促进微管的成核和生长^[56]. 越来越多的证据表明, 核仁的液体状态可能对核糖体的组装很重要^[57,58].

相分离形成的液滴具有黏弹性的特征使其可与质膜和细胞器膜相互作用, 即液滴对膜的润湿作用. 在不完全润湿过程中, 液滴、膜和周围溶液表现出相当强度的相互作用, 这导致液滴和膜之间动态而持久的接触, 以及它们之间的相互重塑. 相反, 完全润湿状态的表现是液滴与膜的相互作用超过了液滴对周围溶液的亲和力. 在这种情况下, 液滴完全包裹在膜上, 内化成囊泡状结构, 或者被隔离在膜双分子层之间. 有研究报道, 液滴的润湿作用参与储存液泡的形成、囊泡聚集和自噬过程^[59].

此外, 相分离还可以隔离大分子以阻止其与其他底物反应, 或者使大分子失活. 相分离也可导致物理

化学和机械过滤, 如在核孔穿梭中起到过滤作用^[60].

1.6 细胞中具有相分离能力的生物大分子

高分子化学中, 高聚物是由单一单元构成, 对其进行相分离研究相对容易. 生物大分子由于具有复杂的构成(20种氨基酸以及各种修饰或者4种核糖核酸以及各种修饰), 其相分离研究的难度更大. 捕捉和鉴定细胞内具有相分离潜力的生物大分子是非常有挑战的. 2012年, Steven L. McKnight教授实验室^[61]发现, 生物素化异恶唑(biotinylated isoxazole, b-isox)形成的微小晶体能够富集细胞裂解液中的数百种RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs), 这些RBPs与已知的无膜细胞器RNA颗粒(RNA granule)中的组分高度重合. 进一步研究表明, 这些RBPs多数都具有IDR, b-isox的微晶体有利于具有相分离能力的蛋白在其表面发生凝聚, 因而可用于特异性地富集这些蛋白.

相对于哺乳动物和酵母中的研究, 人们对于植物中具有相分离能力的生物大分子知之甚少. 本课题组^[62]基于b-isox建立了鉴定具有相分离潜力蛋白的体系, 从拟南芥幼苗和花组织的细胞裂解液中鉴定到985个具有相分离潜力的蛋白, 命名为ProX(proteins enriched by b-isox). ProX列表囊括了大部分目前植物中已被报道可以发生相分离的蛋白, 进一步的实验也验证了这些蛋白的确具有很强的形成凝聚体的能力. 本课题组进一步鉴定了其他7个代表性植物物种的潜在相分离蛋白, 为植物细胞中生物大分子相分离的功能研究提供了资源.

除了蛋白质外, RNA也是细胞中相分离的重要参与者, 这是因为RNA本身就是多价的生物大分子. 此外, 具有IDR的蛋白通常还具有RNA识别基序(RNA recognition motif, RRM), RNA与对应的RBPs通过多价相互作用一同或单独进行相分离. 已知的众多无膜细胞器都含有RNA, 即所谓的“RNA颗粒”, 可见RNA对于蛋白质的相分离非常重要^[63].

2 相分离与植物生长发育

基因的表达是生命活动的核心步骤, 受到一系列蛋白和非编码元件的精细调控. 动物中的研究已发现, 相分离广泛参与到转录和转录后水平的基因表达调控过程中^[64], 近年来植物中也有诸多研究报道相分离参

与基因的表达和调控, 主要涉及转录起始阶段染色质结构的变化和转录因子与DNA的结合、转录后mRNA的剪接和3'末端加工, 以及小RNA的调控等方面(图2).

DNA缠绕于组蛋白上, 二者共同组成核小体, 调控染色质紧密程度, 进而影响基因的转录. 研究发现, 拟南芥的组蛋白变体H2B.8通过相分离介导了精子染色质和核的浓缩, 有利于精子核中染色质的异质化, 但不降低转录水平, 证明H2B.8介导的精子染色质压实对植物的生育能力是重要的^[65]. 除了组蛋白自身能够发生相分离, 研究者还发现一类植物特有的新型组蛋白甲基化阅读器ADCP1(agenet domain-containing protein 1)也具有相分离能力, 并以H3K9甲基化依赖的方式介导多聚核小体串发生相分离, 促使异染色质形成^[66].

转录因子能够直接参与相关基因的表达调控. 植物激素生长素在植物生长发育中起着重要的作用, 而生长素应答因子ARF(auxin response factor)作为转录因子调节生长素响应基因的表达. 研究发现, ARF7和ARF19会在细胞质中发生聚集, 从而被滞留在细胞质中. ARF7和ARF19聚集的基础是其PB结构域头尾相接的多聚化. 当多聚状态被破坏时, ARF7/19的定位会发生改变, 进入到细胞核中, 调控靶基因的表达^[67]. 此外, 在动物中发现多种转录因子可以同转录中介体复合物Mediator发生相分离, 从而激活基因表达. 最近, 研究发现, 植物中MED8^[68]和MED19a^[69]通过相分离参与到相关基因的转录调控过程中. 实验表明, MED8及组蛋白乙酰化转移酶HAC1(histone acetyltransferase 1)能够在体外发生相分离并在体内共定位, MED8凝聚体的形成对于其与RNA聚合酶II的互作是必需的^[68]. 拟南芥的MED19a蛋白具有正负电荷混合排布的C端IDR区域, 该区域对于其相分离及与效应蛋白互作是必需的. 缺氮胁迫诱导MED19a发生相分离形成凝聚体, 从而调控植物胁迫应答.

mRNA的剪接和3'末端加工是基因表达的重要步骤. 拟南芥的HRLP(hnRNP R-like protein)蛋白通过相分离在细胞核中形成凝聚体, 招募剪接因子, 进而抑制FLC(*flowering locus C*)剪切和转录, 并抑制FLC的表达, 促进拟南芥由营养生长进入到生殖生长时期^[70]. 研究者还发现, 调节拟南芥开花的关键蛋白FCA(*flowering control locus A*)同样通过相分离在细胞核中形成凝

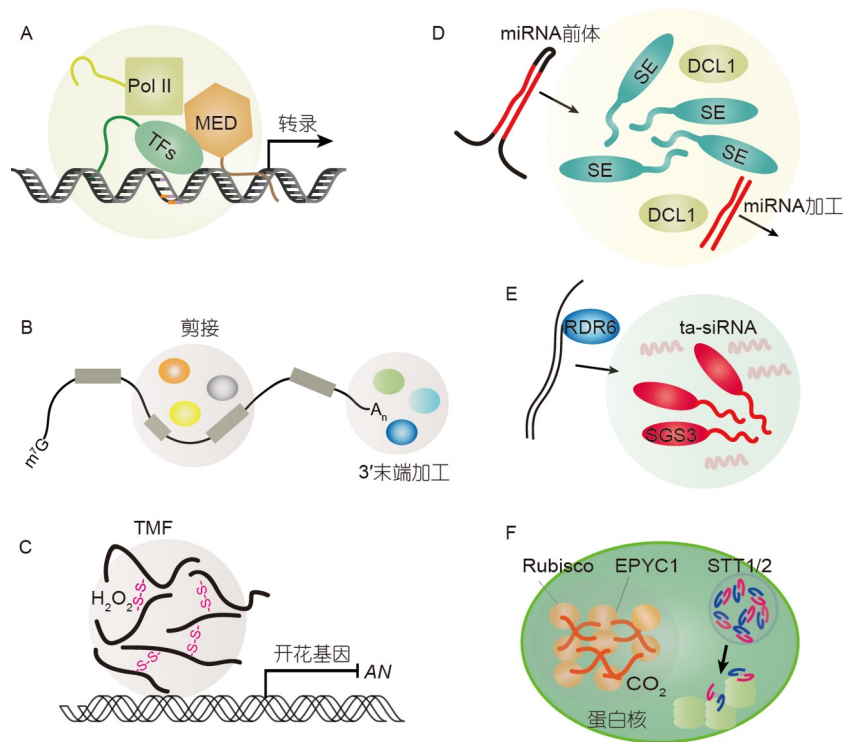


图 2 相分离调控植物生长发育. A: 转录复合物中Mediator通过相分离参与基因表达调控; B: 相分离参与mRNA的剪接和3'末端加工; C: 活性氧通过氧化TMF蛋白的半胱氨酸, 形成分子间和分子内的二硫键, 促进TMF转录凝聚体形成调控植物开花; D: SE相分离驱动切割小体的形成和miRNA的产生; E: SGS3相分离驱动siRNA小体形成, 介导ta-siRNA产生; F: 藻类叶绿体的蛋白核是由Rubisco与EPYC1通过相分离形成的无膜结构, 浓缩CO₂提高光合作用效率; STT1/2通过相分离状态的转化驱动叶绿体内蛋白分选

Figure 2 Phase separation regulates plant growth and development. A: Phase separation of Mediator regulates transcription; B: phase separation is involved in mRNA splicing and 3' end processing; C: TMF forms inter- and intra-molecular disulfide bonds upon sensing ROS, triggering its phase separation that regulates plant flowering; D: phase separation of SE drives the formation of dicing body and miRNA production; E: phase separation of SGS3 leads to the formation of siRNA body, which mediates ta-siRNA production; F: the CO₂-concentrating organelle pyrenoid in algae is formed via the phase separation of EPYC1 and Rubisco subunits. Phase separation of STT1/2 drives the cargo sorting in chloroplast

聚体. 正向遗传筛选发现, 一个coiled coil蛋白FLL2是FCA发挥功能所必需的, 而FLL2能够在体内促进FCA发生相分离. 进一步研究表明, FCA凝聚体能够富集3'末端加工因子, 促进特定mRNA的3'末端加工^[71]. 最近的研究则发现, P-body的组分DCP5(decapping 5)能够与FCA的同源蛋白SSF(sister of FCA)互作, 两者通过液-液相分离形成凝聚体共同调控*FLC*的表达, 从而影响开花时间^[72]. 此外, 参与到mRNA 3'末端加工的蛋白CPSF30-L(cleavage and polyadenylation specificity factor 30)也能够发生相分离, 通过识别m⁶A修饰的FUE元件来精密控制poly(A)位点的选择, 影响植物的开花时间和对ABA的响应^[73]. 另外, 拟南芥EMB1579(embryo defective 1579)蛋白则通过相分离调控基因转录和pre-mRNA剪切, 从而调控植物生长^[74].

除了参与基础的转录调控过程的蛋白, 植物在自身生长发育过程中产生的信号物质(如过氧化氢等)也能通过相分离影响转录过程, 从而调节植物生长发育. 研究者发现, 番茄中TMF(terminating flower)蛋白的半胱氨酸被积累于茎尖分生组织的过氧化氢氧化, 形成分子间和分子内的二硫键, 与TMF的IDR共同驱动蛋白发生相分离形成转录凝聚体, 并招募花原基分化基因*AN*(*ANATHA*), 精准调控茎尖分生组织的成熟和开花^[75]. 在后续的研究中, 研究者还发现, TMF同家族的其他蛋白TFAM(TMf family member)在IDR区域发生大量变异, 导致其相分离能力不同, 从而形成异质的聚集体以共同精细调控*AN*的时空表达^[76].

小非编码miRNA是一类重要的基因表达调控元件. miRNA前体由Dicer切割成为成熟的miRNA, 与

ARGONAUTE蛋白结合为RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 对靶标mRNA进行切割或者翻译抑制^[77]. 研究者发现, 对植物miRNA的产生至关重要的D-body是由其核心组分SE(SERRATE)蛋白通过液-液相分离驱动组装形成的, miRNA在D-body中加工完毕后, 即被释放至小体外发挥功能^[78]. 此外, RNA解旋酶家族蛋白RH6, RH8和RH12还可通过相分离与D-body核心组分SE互作, 促进SE蛋白的相分离以增加miRNA的积累, 而病毒侵染会影响RNA解旋酶的定位, 从而影响D-body的聚集^[79]. 另一类小非编码RNA, siRNA, 也在转录后水平调控基因表达^[80]. 研究者发现SGS3(suppressor of gene silencing 3)能够通过其PrLD区域发生相分离, 并介导siRNA小体形成, 该过程对于siRNA的产生和基因沉默是至关重要的^[81-83]. 转座元件(transposable elements, TEs)的跳跃可能会引起致命突变. 研究发现, TEs RNA被靶向定位至由SGS3相分离形成的小体中, 它们的活性因而被抑制^[82]. 在正常的生长发育之外, 植物还需要进行一系列新陈代谢活动维持细胞稳态, 其中自噬(autophagy)过程将异常的细胞器或者生物大分子运至液泡或溶酶体进行降解, 以促进生物体的营养物质循环, 在生长发育调控中发挥重要作用. 研究发现, 自噬的核心蛋白ATG8e(autophagy-related 8e)可以通过相分离调控细胞自噬, 而ATG3(autophagy-related 3)通过增强ATG8e的相分离能力来促进自噬过程^[84].

植物通过光合作用为自体提供营养物质, 该过程吸收和固定了大量CO₂, 在调节气候和缓解全球变暖过程中起到了重要作用. 全球CO₂消耗量的近一半均为藻类的贡献, 但水中较低含量的CO₂如何被藻类进行浓缩, 其机制仍不清楚. 近年来, 研究人员发现莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中进行CO₂浓缩的蛋白核(pyrenoid)实质上是液态的, 因为蛋白核中的Rubisco酶被EPYC1(essential pyrenoid component 1)所“连接”, 使得蛋白核具有“液滴”的性质, 并且实现了Rubisco酶的高度浓缩, 促进了其对低浓度CO₂的高效利用^[85]. 在后续的研究中, 研究者将衣藻的EPYC1和Rubisco酶转入高等植物拟南芥, 重构了衣藻中pyrenoid的液滴状性质, 且未降低光合作用的效率^[86]. 高等植物中, 叶绿体作为一种半自主细胞器, 核基因编码的叶绿体蛋白从叶绿体基质进入到类囊体膜的机制一直是研究的热点. 最近研究者发现, 拟南芥的STT1/2蛋白

能够在叶绿体基质中通过相分离特异性地结合某些特定蛋白, 进入类囊体膜后, 其相分离状态发生逆转从而释放结合蛋白, 实现了底物跨类囊体膜的转运^[87].

在种子形成过程中, 贮藏蛋白正确分选和转运至蛋白储存小泡(protein storage vacuoles, PSV)的过程对于种子发育至关重要. 最近的研究发现, 相分离液滴的细胞内润湿作用对于PSV的体内形态发生起着重要的作用. PSV具有液滴的性质, 润湿性的膜表面条件有利于液滴诱导膜出芽, 最终形成多个PSV^[88].

细胞壁不仅对植物细胞起着支撑和保护的作用, 还需要适应细胞的生长做出形态的变化或者扩张. 研究表明, 植物细胞壁具有半固态的性质, 相分离不仅在细胞壁的形态建成和缓冲应力过程中起重要作用, 而且是细胞壁扩张的重要驱动力. 其中, 果胶作为植物细胞壁的主要成分, 其修饰对于驱动细胞壁的相分离至关重要^[89].

3 相分离与植物胁迫响应

植物生长在复杂多变的环境中, 需面对各种逆境胁迫, 例如高温、高光照强度、干旱、机械压力等. 为了快速高效地适应自然环境的变化, 植物进化出了一系列复杂精细的机制^[90]. 前文中提到, 相分离本身对于理化条件的变化尤为敏感, 因而生物大分子的相分离可能是植物迅速地感知和响应外界环境变化的重要机制. 近年来的研究的确发现, 植物中诸多蛋白通过其相分离响应外界环境变化(图3).

除了为植物光合作用提供能量外, 光还可以通过调控细胞的分化、结构和功能的改变影响植物组织和器官的建成, 该过程被称为光形态建成(photomorphogenesis)^[91]. 早期研究发现光, 能够诱导植物细胞中光小体的形成^[10]. 光小体是一种无膜细胞器, 其形成机制以及作用机理一直未明确. 光敏色素phyB(phytochrome B)是光小体的核心组成蛋白, 最近的研究发现, phyB受红光诱导发生液-液相分离, 且温度会影响phyB相分离的能力, 当温度升高到正常生长温度以上时, phyB所在的光小体会解聚, 从而影响下游通路的信号传导, 使得植物通过phyB响应外界生长温度变化^[92]. 与phyB类似, CRY2(cryptochrome 2)能够受蓝光激活进入细胞核, 通过相分离形成CRY2光小体, 进而招募m⁶A“编码器(writer)”复合体, 促进mRNA的m⁶A甲

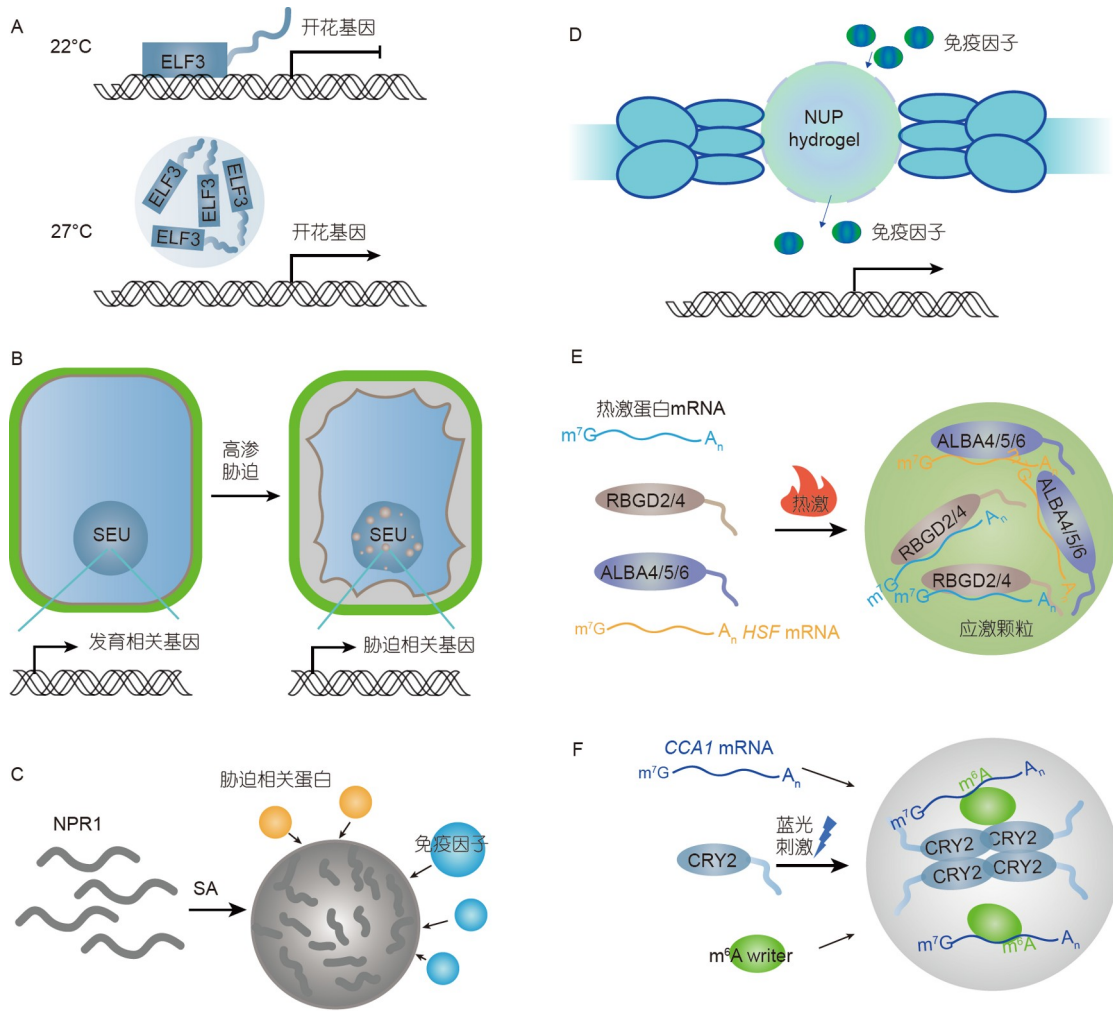


图 3 相分离调控植物响应胁迫. A: 转录抑制因子ELF3在27°C下通过自身PrLD介导相分离, 抑制其与开花基因结合, 从而促进热胁迫下开花基因表达; B: 正常生长条件下, SEU调控发育相关基因表达, 而高渗胁迫下细胞体积变小, 细胞内拥挤程度增加, SEU通过其IDR中的两个 α 螺旋构象改变感受到拥挤程度的变化, 促使SEU分子间距离靠近, 触发相分离, 从而调控胁迫相关基因表达; C: NPR1结合高浓度的水杨酸SA诱导其相分离, 促进免疫抑制因子的泛素化降解并招募胁迫响应蛋白促进细胞存活; D: 核孔复合物NUP62通过相分离形成水凝胶状相, 选择性介导免疫调节因子(如MPK3)进入细胞核, 激活细胞对灰霉菌的抗性; E: RNA结合蛋白RBGD2和RBGD4通过相分离与应激颗粒蛋白组分以及热响应mRNA结合, 提高植物耐热性; ALBA4/5/6招募热胁迫转录因子HSFs的转录本进入应激颗粒, 以提高它们的稳定性, 进而提高植物抗热性; F: 蓝光受体隐花素CRY2通过相分离招募m⁶A甲基化酶, 增强mRNA甲基化以及生物钟相关因子CCA1稳定性, 从而调控植物生物节律

Figure 3 Phase separation regulates stress response. A: The transcriptional repressor ELF3 undergoes phase separation through its PrLD at 27°C, which sequesters itself thereby promotes the expression of flowering genes; B: under normal growth condition, the transcriptional corepressor SEU regulates growth-related genes. Upon hyperosmotic stress, intracellular macromolecular crowding increases as a result of reduced cell volume. SEU senses crowding via the conformational changes of two α helices and undergoes phase separation, thereby promotes the expression of stress-responsive genes; C: high level of SA induces the phase separation of NPR1, which promotes cell survival through degrading negative immune regulators; D: the nuclear pore component NUP62 forms hydrogel via phase separation, allowing selective nuclear transport to regulate plant defense against pathogen; E: phase separation of RNA-binding proteins RBGD2/4 or ALBA4/5/6 protects the mRNA of heat shock factors from degradation, which promotes heat tolerance; F: CRY2 condensates regulate circadian clock via recruiting m⁶A methyltransferase to strengthen mRNA methylation and to stabilize CCA1 mRNA

基化, 并且其中生物钟核心组分的mRNA降解速率会因此发生改变, 从而实现蓝光对于生物钟的调节^[93].

植物的正常生长发育需要在适宜的温度范围内进

行, 环境温度的变化会影响植物生理生化和代谢等过程. 研究发现, 温度变化会引起蛋白相分离状态的改变, 从而使得植物感知温度变化并主动调节基因表达.

拟南芥夜晚复合体(evening complex)中的组分ELF3 (early flowering 3)蛋白通过其PrLD区域(prion-like domain)介导的相分离来感受环境温度变化: 在22℃时, ELF3与DNA结合抑制靶基因的转录; 在27℃时, ELF3发生相分离形成凝聚体, 从而失去抑制靶基因转录的活性, 促使植物进入生殖生长期^[94]. 与之相反, 低温能够诱导植物特有的蛋白FRIGIDA发生聚集, 从而抑制*FLC*, 而较为温暖的环境则可以扭转这一过程, 缓冲*FLC*的关闭从而防止过早开花, 植物由此得以有效地监测温度波动和季节性温度变化^[95].

高盐或干旱会造成植物细胞内外的渗透压失衡, 导致细胞失水, 扰乱细胞内正常生命活动, 抑制植物生长发育. 高渗条件下细胞内理化环境的变化主要包括离子浓度升高和拥挤程度增加. 本课题组^[96]发现, 拟南芥转录调节蛋白SEUSS(SEU)能够感受渗透胁迫而发生相分离. 当植物细胞受到高渗胁迫时, SEU蛋白N端IDR通过其 α 螺旋构象的改变而感知到细胞内分子拥挤程度的增加, 这一变化使得SEU分子间距离靠近, 局部浓度升高, 从而触发其相分离. 缺失SEU的突变体对渗透胁迫敏感. 值得注意的是, 相分离能力缺失的SEU突变体能够回补*seu*突变体在正常生长条件下的生长发育表型, 但不能回补其在渗透胁迫下的敏感表型, 说明SEU形成凝聚体对于植物的胁迫耐受是至关重要的. 进一步研究证明, SEU凝聚体通过促进渗透胁迫相关基因的表达而增强了植物的耐受性^[96], 但是其分子机理尚不清楚.

水分的吸收是植物种子萌发的重要条件, 种子需要感受到环境水分变化, 在条件适宜的情况下启动萌发过程. 拟南芥的FLOE1蛋白通过依赖于水合(hydration)的相分离来抑制种子在水分不利条件下的萌发, 从而提高种子萌发的成活率. 研究者进一步探究了影响FLOE1相分离的内在因素, 发现其IDR中DS和QPS区域通过拮抗作用调控FLOE1的相分离. 有趣的是, FLOE1基因的剪接在自然界的物种间存在变异, 并影响其相分离的能力, 这表明FLOE1的相分离可能被自然选择以调控不同遗传背景和生存环境中种子的萌发^[97].

绿色植物以CO₂为底物进行光合作用, 环境中的CO₂浓度会影响植物光合作用效率^[98]和气孔开闭^[99]情况. 研究发现, 植物中存在一类PP2C家族磷酸酶, 其成员均含有IDR, 这些IDR能够特异性地响应高浓度CO₂气体分子的诱导, 从而介导PP2C发生相分离, 激发其

磷酸酶活性, 进而调控一系列下游通路^[100].

植物除了需要应对各种非生物胁迫, 还要面对诸多生物胁迫^[101]. 最近的研究发现, 相分离在生物胁迫的应答过程中也起到重要作用. 在转录层面, 拟南芥的GBPL3(guanylate-binding protein(GBP)-like GTPases 3)蛋白在植物遭受病原菌入侵时, 会通过相分离发生聚集, 并结合到免疫相关基因的启动子区, 招募RNA聚合酶II和特定的转录共激活蛋白来调控防卫基因的表达^[102]. 有趣的是, 当植物在同时遭受病原菌入侵和高温侵袭时, GBPL3聚集体的数目会明显减少, 导致植物免疫能力下降^[26], 这暗示气候变暖会影响植物抗病能力. 在翻译层面, HEM1蛋白是一个翻译调控因子, 其中含有蛋白LCD, 该区域可以与其他翻译因子相互作用, 同时可以介导HEM1发生相分离形成凝聚体, 通过将翻译因子区室化来抑制免疫基因的过度翻译, 使得植物能够平衡生长发育和免疫应答^[103]. 研究还发现, SGS3的相分离能调节vsiRNA(virus derived small interfering RNAs)的产生, 促进植物防御病毒侵染; 而磷酸化可以调节SGS3的相分离能力, 从而调控植物的免疫响应和育性^[104]. 此外, 水杨酸(salicylic acid, SA)介导系统获得性抗性, 是植物对抗病原菌入侵的重要信号分子. 研究者发现, 水杨酸的受体NPR1(nonexpressor of pathogenesis-related genes 1)可以由SA触发其在细胞质中的聚集, 从而招募一系列应激响应蛋白, 可能通过隔离和/或降解关键免疫调节因子和其他应激蛋白, 控制蛋白稳态并抑制未受感染细胞的程序性死亡, 从而促进健康细胞在广泛刺激下的存活^[105]. 植物感受到病原菌入侵后, 会激活免疫调控因子进入细胞核, 位于核孔中央的亚复合体选择性地调控物质由细胞质进入细胞核, 但其调控机制尚未明确. 近期研究表明, 核孔中央亚复合体的组分NUP62(nucleoporin 62)等蛋白能够通过相分离形成水凝胶状的相, 选择性介导与植物免疫应答相关的蛋白激酶MPK3(mitogen-activated protein kinase 3)进入细胞核, 从而激活植物对于灰霉病菌的抗性反应. NUP62相分离能力的缺失会使得拟南芥对灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、细菌和甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)等多种生物胁迫的抗性反应降低, 说明核孔中央亚复合体通过相分离介导了植物对于多种生物胁迫的广谱抗性^[106].

遇到热胁迫, 植物细胞会做出一系列应激反

应^[107]. 应激颗粒SG是真核生物细胞响应外界刺激而形成的无膜细胞器, 研究表明, 液-液相分离是驱动SG形成的主要动力^[108,109]. SG组分的缺失会导致植物对于多种逆境胁迫不耐受, 说明SG在植物胁迫响应中起到了重要的作用^[110]. 近期研究表明, 植物SG中多种组分的相分离特性对于其胁迫响应至关重要. 拟南芥中RBGD2/4(RNA-binding glycine-rich group D 2/4)与哺乳动物中典型的RNA结合蛋白hnRNPA1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)同源, hnRNPA1的液-固相转化与肌萎缩侧索硬化症的发生密切相关^[111]. 热胁迫条件下, RBGD2/4在细胞质内发生相分离形成凝聚体, 并定位到应激颗粒中. 相分离能够促进RBGD2/4与热响应的转录本的结合能力, *rbgd2/4*双突变体表现出热敏感表型, 说明RBGD2/4的相分离是调节植物耐热的重要机制^[112]. ALBA(acetylation lowers binding affinity)蛋白具有DNA/RNA结合活性, 广泛存在于真核生物中. 拟南芥的ALBA4/5/6具有相分离的能力, 在热胁迫下能够将众多热激转录因子HSFs(Heat stress transcription factors)的mRNA招募进入应激颗粒并维持其稳定性, 提高了植物的耐热性^[113]. TSN1/2(tudor staphylococcal nuclease 1/2)在应激颗粒组装过程中起着重要作用, 最近的研究表明, 热胁迫下TSN1/2能够通过其N端的IDR招募SnRK1 α (SNF1-related protein kinase 1 α)进入应激颗粒, 激活其激酶活性, 从而影响下游信号通路, 调控胁迫响应^[114].

外界刺激容易造成细胞内DNA损伤, 影响植物基因组的稳定性. 植物通过染色质重塑与DNA损伤应答(DNA-damage response, DDR)协调促进DNA修复, 但该过程如何准确和高效地识别DNA损伤位点, 其分子机制尚不清楚. 近期在苜蓿(*Medicago truncatula*)中的研究表明, 当DNA双链断裂(DNA double strand breaks, DSBs)发生时, 组蛋白甲基转移酶MtSUVR2(suppressor of variegation 3-9-related protein 2)会驱动同源重组修复途径的关键重组酶MtRAD51(RAD51 recombinase)发生液-液相分离, 由此组装成DNA修复小体(DNA repair body), 并提高MtRAD51的稳定性, 以确保DSBs精确而高效地被修复^[115].

4 讨论与展望

对相分离这种机制的认知使得人们能够从新的角

度理解细胞内的生命活动. 细胞内的环境具有非常多的噪声, 时刻都有无数个事件在随机地(stochastically)发生, 但并未对细胞产生明显影响, 而是构成了背景噪声. 大部分生物学过程并非信号通路所描绘的如线性般简单, 某个反应的发生只是由于它所需组分的即时相互作用强于随机碰撞而使得这些组分在一起停留的时间略长于背景噪声. 生物大分子之间的相互作用可以被理解成一个从弱到强的连续体(continuum), 过去研究者更关注该连续体中处于强的一端的相互作用, 因为它们更容易被捕捉到. 事实上, 细胞内处于连续体弱的一端的相互作用对于细胞内的生物学反应非常重要, 它们就如同被掩藏于一个“黑匣子”中, 亟待挖掘. 相分离往往是由于分子间的弱多价相互作用引起的, 挖掘具有相分离能力的蛋白质对于弥补对弱相互作用之理解的空缺至关重要. Zhang等人^[62]基于蛋白质组学技术, 建立了鉴定具有相分离潜力蛋白质的方法. 作者对包括莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、白菜(*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)在内的8个物种进行了分析. 该方法对于未来挖掘更多物种或者特定组织和细胞类型中的潜在相分离蛋白有很好的应用潜力.

动物中的研究发现, 一些疾病中的突变会引起蛋白质的异常相分离和相变, 并能产生一些有毒性的聚集体, 这可能是引起疾病的重要原因^[116]. 植物中引起蛋白质异常相分离的有害突变大多数可能已被自然选择淘汰. 与保守的有固定结构的结构域相比, IDR在同源蛋白间保守性很低^[62], 意味着IDR能够承受更多的突变, 可能在植物进化过程中起着重要作用. 可以预见探究相分离在自然群体中的差异与植物性状之间的关系将是一个重要的方向.

植物由于不能自主移动, 在与环境相互作用的过程中演化出更为快速和复杂的机制以感知和应对环境变化. 植物细胞感知外界信号分子的方式包括“配体-受体”和离子通道等, 但是一些物理信号, 如温度、机械压力是如何被感知的尚有待揭示. 细胞内生物大分子的相分离具有对周围理化环境敏感的特征. 植物面对环境胁迫时, 细胞内的理化环境会发生变化, 从而引起生物大分子相分离状态的变化. 因此, 相分离可

能是植物感受和应对环境变化的一种重要机制。基于相分离的研究不仅有助于深入理解植物应对胁迫的分子机制,还能够为未来农作物的抗逆改造提供新策略,有助于保障粮食安全。

参考文献

- 1 Pederson T. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: a000638
- 2 Cajal S R y. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)*, 1903, 2: 129–221
- 3 Brangwynne C P, Eckmann C R, Courson D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*, 2009, 324: 1729–1732
- 4 Li P, Banjade S, Cheng H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, 483: 336–340
- 5 Hamada T, Yako M, Minegishi M, et al. Stress granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in *Arabidopsis*. *J Cell Sci*, 2018, 131: jcs216051
- 6 Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. Stress granules and processing bodies in translational control. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11: a032813
- 7 Lallemant-Breitenbach V, de Thé H. PML nuclear bodies: from architecture to function. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 52: 154–161
- 8 Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, et al. DNA damage foci: meaning and significance. *Environ Mol Mutagen*, 2015, 56: 491–504
- 9 Liu Q, Shi L, Fang Y. Dicing bodies. *Plant Physiol*, 2012, 158: 61–66
- 10 Van Buskirk E K, Decker P V, Chen M. Photobodies in light signaling. *Plant Physiol*, 2012, 158: 52–60
- 11 Flory P J. Principles of Polymer Chemistry. Ithaca: Cornell University Press, 1953. 50
- 12 Alberti S, Hyman A A. Are aberrant phase transitions a driver of cellular aging? *Bioessays*, 2016, 38: 959–968
- 13 Zhang H, Wang Z. Effect and regulation of the NLRP3 inflammasome during renal fibrosis. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 7: 379
- 14 Patel A, Lee H O, Jawerth L, et al. A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell*, 2015, 162: 1066–1077
- 15 Rog O, Köhler S, Dernburg A F. The synaptonemal complex has liquid crystalline properties and spatially regulates meiotic recombination factors. *eLife*, 2017, 6: e21455
- 16 Zhang L, Yao W, Gao Y, et al. Polysiloxane-based side chain liquid crystal polymers: from synthesis to structure–phase transition behavior relationships. *Polymers*, 2018, 10: 794
- 17 Wu H, Fuxreiter M. The structure and dynamics of higher-order assemblies: amyloids, signalosomes, and granules. *Cell*, 2016, 165: 1055–1066
- 18 Banjade S, Rosen M K. Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors. *eLife*, 2014, 3: e04123
- 19 Su X, Ditlev J A, Hui E, et al. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science*, 2016, 352: 595–599
- 20 Zhang G, Wang Z, Du Z, et al. mTOR regulates phase separation of PGL granules to modulate their autophagic degradation. *Cell*, 2018, 174: 1492–1506.e22
- 21 Sun D, Wu R, Zheng J, et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Res*, 2018, 28: 405–415
- 22 Banani S F, Rice A M, Peeples W B, et al. Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell*, 2016, 166: 651–663
- 23 Hofweber M, Hutten S, Bourgeois B, et al. Phase separation of FUS is suppressed by its nuclear import receptor and arginine methylation. *Cell*, 2018, 173: 706–719.e13
- 24 Qamar S, Wang G Z, Randle S J, et al. FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- π interactions. *Cell*, 2018, 173: 720–734.e15
- 25 Gibson B A, Doolittle L K, Schneider M W G, et al. Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation. *Cell*, 2019, 179: 470–484.e21
- 26 Kim J H, Castroverde C D M, Huang S, et al. Increasing the resilience of plant immunity to a warming climate. *Nature*, 2022, 607: 339–344
- 27 Fromm S A, Kamenz J, Nöldeke E R, et al. *In vitro* reconstitution of a cellular phase-transition process that involves the mRNA decapping

- machinery. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 7354–7359
- 28 Zhang H, Ji X, Li P, et al. Liquid-liquid phase separation in biology: mechanisms, physiological functions and human diseases. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 953–985
- 29 Nott T J, Petsalaki E, Farber P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Mol Cell*, 2015, 57: 936–947
- 30 Jiang H, Wang S, Huang Y, et al. Phase transition of spindle-associated protein regulate spindle apparatus assembly. *Cell*, 2015, 163: 108–122
- 31 Pak C W, Kosno M, Holehouse A S, et al. Sequence determinants of intracellular phase separation by complex coacervation of a disordered protein. *Mol Cell*, 2016, 63: 72–85
- 32 Scaramuzzino C, Casci I, Parodi S, et al. Protein arginine methyltransferase 6 enhances polyglutamine-expanded androgen receptor function and toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron*, 2015, 85: 88–100
- 33 Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska M G, et al. Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell*, 2013, 152: 791–805
- 34 Ruff K M, Roberts S, Chilkoti A, et al. Advances in understanding stimulus-responsive phase behavior of intrinsically disordered protein polymers. *J Mol Biol*, 2018, 430: 4619–4635
- 35 Riback J A, Katanski C D, Kear-Scott J L, et al. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell*, 2017, 168: 1028–1040.e19
- 36 Möller J, Grobelny S, Schulze J, et al. Reentrant liquid-liquid phase separation in protein solutions at elevated hydrostatic pressures. *Phys Rev Lett*, 2014, 112: 028101
- 37 Balu R, Dutta N K, Choudhury N R, et al. An16-resilin: an advanced multi-stimuli-responsive resilin-mimetic protein polymer. *Acta Biomater*, 2014, 10: 4768–4777
- 38 Kroschwald S, Munder M C, Maharana S, et al. Different material states of Pub1 condensates define distinct modes of stress adaptation and recovery. *Cell Rep*, 2018, 23: 3327–3339
- 39 Patel A, Malinowska L, Saha S, et al. ATP as a biological hydrotrope. *Science*, 2017, 356: 753–756
- 40 Kim T H, Tsang B, Vernon R M, et al. Phospho-dependent phase separation of FMRP and CAPRIN1 recapitulates regulation of translation and deadenylation. *Science*, 2019, 365: 825–829
- 41 Murray D T, Kato M, Lin Y, et al. Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains. *Cell*, 2017, 171: 615–627.e16
- 42 Bedford M T, Richard S. Arginine methylation: an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, 2005, 18: 263–272
- 43 Guccione E, Richard S. The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 642–657
- 44 Wang J, Choi J M, Holehouse A S, et al. A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins. *Cell*, 2018, 174: 688–699.e16
- 45 Drazic A, Myklebust L M, Ree R, et al. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1864: 1372–1401
- 46 Narita T, Weinert B T, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 156–174
- 47 Saito M, Hess D, Eglinger J, et al. Acetylation of intrinsically disordered regions regulates phase separation. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 51–61
- 48 Markin C J, Xiao W, Spyropoulos L. Mechanism for recognition of polyubiquitin chains: balancing affinity through interplay between multivalent binding and dynamics. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 11247–11258
- 49 Yasuda S, Tsuchiya H, Kaiho A, et al. Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. *Nature*, 2020, 578: 296–300
- 50 Hofweber M, Dormann D. Friend or foe—Post-translational modifications as regulators of phase separation and RNP granule dynamics. *J Biol Chem*, 2019, 294: 7137–7150
- 51 Tsai W C, Gayatri S, Reineke L C, et al. Arginine demethylation of G3BP1 promotes stress granule assembly. *J Biol Chem*, 2016, 291: 22671–22685
- 52 Tanikawa C, Ueda K, Suzuki A, et al. Citrullination of RGG motifs in FET proteins by PAD4 regulates protein aggregation and ALS susceptibility. *Cell Rep*, 2018, 22: 1473–1483
- 53 Franzmann T M, Jahnel M, Pozniakovsky A, et al. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science*, 2018, 359: eaao5654
- 54 Klosin A, Oltch F, Harmon T, et al. Phase separation provides a mechanism to reduce noise in cells. *Science*, 2020, 367: 464–468

- 55 Sheu-Gruttadauria J, MacRae I J. Phase transitions in the assembly and function of human miRISC. *Cell*, 2018, 173: 946–957.e16
- 56 Woodruff J B, Ferreira Gomes B, Widlund P O, et al. The centrosome is a selective condensate that nucleates microtubules by concentrating tubulin. *Cell*, 2017, 169: 1066–1077.e10
- 57 Feric M, Vaidya N, Harmon T S, et al. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell*, 2016, 165: 1686–1697
- 58 Mitrea D M, Cika J A, Guy C S, et al. Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA. *eLife*, 2016, 5: e13571
- 59 Kusumaatmaja H, May A I, Knorr R L. Intracellular wetting mediates contacts between liquid compartments and membrane-bound organelles. *J Cell Biol*, 2021, 220: e202103175
- 60 Schmidt H B, Görlich D. Transport selectivity of nuclear pores, phase separation, and membraneless organelles. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 46–61
- 61 Kato M, Han T W, Xie S, et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, 2012, 149: 753–767
- 62 Zhang H, Peng F, He C, et al. Large-scale identification of potential phase-separation proteins from plants using a cell-free system. *Mol Plant*, 2023, 16: 310–313
- 63 Lin Y, Fang X. Phase separation in RNA biology. *J Genet Genomics*, 2021, 48: 872–880
- 64 Hnisz D, Shrinivas K, Young R A, et al. A phase separation model for transcriptional control. *Cell*, 2017, 169: 13–23
- 65 Buttress T, He S, Wang L, et al. Histone H2B.8 compacts flowering plant sperm through chromatin phase separation. *Nature*, 2022, 611: 614–622
- 66 Zhao S, Cheng L, Gao Y, et al. Plant HP1 protein ADCP1 links multivalent H3K9 methylation readout to heterochromatin formation. *Cell Res*, 2019, 29: 54–66
- 67 Powers S K, Holehouse A S, Korasick D A, et al. Nucleo-cytoplasmic partitioning of ARF proteins controls auxin responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell*, 2019, 76: 177–190.e5
- 68 Guo J, Wei L, Chen S S, et al. The CBP/p300 histone acetyltransferases function as plant-specific MEDIATOR subunits in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 755–771
- 69 Cheng S L H, Wu H W, Xu H, et al. Nutrient status regulates MED19a phase separation for ORESARA1-dependent senescence. *New Phytol*, 2022, 236: 1779–1795
- 70 Zhang Y, Fan S, Hua C, et al. Phase separation of HRLP regulates flowering time in *Arabidopsis*. *Sci Adv*, 2022, 8: eabn5488
- 71 Fang X, Wang L, Ishikawa R, et al. *Arabidopsis* FLL2 promotes liquid-liquid phase separation of polyadenylation complexes. *Nature*, 2019, 569: 265–269
- 72 Wang W, Wang C, Wang Y, et al. The P-body component DECAPPING5 and the floral repressor SISTER OF FCA regulate *FLOWERING LOCUS C* transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2023, doi: 10.1093/plcell/koad151
- 73 Song P, Yang J, Wang C, et al. *Arabidopsis* N⁶-methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies. *Mol Plant*, 2021, 14: 571–587
- 74 Zhang , Li Z, Chen N, et al. Phase separation of *Arabidopsis* EMB1579 controls transcription, mRNA splicing, and development. *PLoS Biol*, 2020, 18: e3000782
- 75 Huang X, Chen S, Li W, et al. ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 549–557
- 76 Huang X, Xiao N, Zou Y, et al. Heterotypic transcriptional condensates formed by prion-like paralogous proteins canalize flowering transition in tomato. *Genome Biol*, 2022, 23: 78
- 77 Song X, Li Y, Cao X, et al. MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 489–525
- 78 Xie D, Chen M, Niu J, et al. Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 32–39
- 79 Li Q, Liu N, Liu Q, et al. DEAD-box helicases modulate dicing body formation in *Arabidopsis*. *Sci Adv*, 2021, 7: eabc6266
- 80 Zhang X, Zhu Y, Wu H, et al. Post-transcriptional gene silencing in plants: a double-edged sword. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 271–276
- 81 Iwakawa H, Lam A Y W, Mine A, et al. Ribosome stalling caused by the Argonaute-microRNA-SGS3 complex regulates the production of secondary siRNAs in plants. *Cell Rep*, 2021, 35: 109300

- 82 Kim E Y, Wang L, Lei Z, et al. Ribosome stalling and SGS3 phase separation prime the epigenetic silencing of transposons. *Nat Plants*, 2021, 7: 303–309
- 83 Tan H, Luo W, Yan W, et al. Phase separation of SGS3 drives siRNA body formation and promotes endogenous gene silencing. *Cell Rep*, 2023, 42: 111985
- 84 Guan B, Xue H W. *Arabidopsis* AUTOPHAGY-RELATED3 (ATG3) facilitates the liquid-liquid phase separation of ATG8e to promote autophagy. *Sci Bull*, 2022, 67: 350–354
- 85 Freeman Rosenzweig E S, Xu B, Kuhn Cuellar L, et al. The eukaryotic CO₂-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization. *Cell*, 2017, 171: 148–162.e19
- 86 Atkinson N, Mao Y, Chan K X, et al. Condensation of Rubisco into a proto-pyrenoid in higher plant chloroplasts. *Nat Commun*, 2020, 11: 6303
- 87 Ouyang M, Li X, Zhang J, et al. Liquid-liquid phase transition drives intra-chloroplast cargo sorting. *Cell*, 2020, 180: 1144–1159.e20
- 88 Kusumaatmaja H, May A I, Feeney M, et al. Wetting of phase-separated droplets on plant vacuole membranes leads to a competition between tonoplast budding and nanotube formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2024109118
- 89 Haas K T, Wightman R, Peaucelle A, et al. The role of pectin phase separation in plant cell wall assembly and growth. *Cell Surf*, 2021, 7: 100054
- 90 Yang S H, Gong Z Z, Guo Y, et al. Studies on plant responses to environmental change in China: the past and the future (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 1457–1478 [杨淑华, 巩志忠, 郭岩, 等. 中国植物应答环境变化研究的过去与未来. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1457–1478]
- 91 Cheng M C, Kathare P K, Paik I, et al. Phytochrome signaling networks. *Annu Rev Plant Biol*, 2021, 72: 217–244
- 92 Chen D, Lyu M, Kou X, et al. Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B. *Mol Cell*, 2022, 82: 3015–3029.e6
- 93 Wang X, Jiang B, Gu L, et al. A photoregulatory mechanism of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2021, 7: 1397–1408
- 94 Jung J H, Barbosa A D, Hutin S, et al. A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in *Arabidopsis*. *Nature*, 2020, 585: 256–260
- 95 Zhu P, Lister C, Dean C. Cold-induced *Arabidopsis* FRIGIDA nuclear condensates for FLC repression. *Nature*, 2021, 599: 657–661
- 96 Wang B, Zhang H, Huai J, et al. Condensation of SEUSS promotes hyperosmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 1361–1369
- 97 Dorone Y, Boeynaems S, Flores E, et al. A prion-like protein regulator of seed germination undergoes hydration-dependent phase separation. *Cell*, 2021, 184: 4284–4298.e27
- 98 Wang S, Zhang Y, Ju W, et al. Recent global decline of CO₂ fertilization effects on vegetation photosynthesis. *Science*, 2020, 370: 1295–1300
- 99 Lawson T, Matthews J. Guard cell metabolism and stomatal function. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 273–302
- 100 Zhang M, Zhu C, Duan Y, et al. The intrinsically disordered region from PP2C phosphatases functions as a conserved CO₂ sensor. *Nat Cell Biol*, 2022, 24: 1029–1037
- 101 Zhang J, Dong S M, Wang W, et al. Plant immunity and sustainable control of pests in China: advances, opportunities and challenges (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 1479–1507 [张杰, 董莎萌, 王伟, 等. 植物免疫研究与抗病虫绿色防控: 进展、机遇与挑战. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1479–1507]
- 102 Huang S, Zhu S, Kumar P, et al. A phase-separated nuclear GBPL circuit controls immunity in plants. *Nature*, 2021, 594: 424–429
- 103 Zhou Y, Niu R, Tang Z, et al. Plant HEM1 specifies a condensation domain to control immune gene translation. *Nat Plants*, 2023, 9: 289–301
- 104 Han Y, Zhang X, Du R, et al. The phase separation of SGS3 regulates antiviral immunity and fertility in *Arabidopsis*. *Sci China Life Sci*, 2023, 66: 1938–1941
- 105 Zavaliev R, Mohan R, Chen T, et al. Formation of NPR1 condensates promotes cell survival during the plant immune response. *Cell*, 2020, 182: 1093–1108.e18
- 106 Wang J, Pei G, Wang Y, et al. Phase separation of the nuclear pore complex facilitates selective nuclear transport to regulate plant defense against pathogen and pest invasion. *Mol Plant*, 2023, 16: 1016–1130
- 107 Chen S T, Guo F Q. Heat stress tolerance and signaling in plants (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2013, 43: 1072–1081 [陈思婷, 郭房庆. 植物耐热性及热激信号转导机制研究进展. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 1072–1081]
- 108 Anderson P, Kedersha N. Stress granules. *Curr Biol*, 2009, 19: R397–R398
- 109 Riggs C L, Kedersha N, Ivanov P, et al. Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *J Cell Sci*, 2020, 133: jcs242487

- 110 Maruri-López I, Figueroa N E, Hernández-Sánchez I E, et al. Plant stress granules: trends and beyond. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 722643
- 111 Kim H J, Kim N C, Wang Y D, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNP A2B1 and hnRNP A1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 2013, 495: 467–473
- 112 Zhu S, Gu J, Yao J, et al. Liquid-liquid phase separation of RBGD2/4 is required for heat stress resistance in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2022, 57: 583–597.e6
- 113 Tong J, Ren Z, Sun L, et al. ALBA proteins confer thermotolerance through stabilizing HSF messenger RNAs in cytoplasmic granules. *Nat Plants*, 2022, 8: 778–791
- 114 Gutiérrez-Beltrán E, Bozhkov P V, Moschou P N. Tudor Staphylococcal Nuclease plays two antagonistic roles in RNA metabolism under stress. *Plant Signal Behav*, 2015, 10: e1071005
- 115 Liu Q, Liu P, Ji T, et al. The histone methyltransferase SUV2 promotes DSB repair via chromatin remodeling and liquid-liquid phase separation. *Mol Plant*, 2022, 15: 1157–1175
- 116 Alberti S, Hyman A A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 196–213

The role of phase separation in plant biology

WANG YunYing, LI ChangXuan, LI YaoXi & FANG XiaoFeng

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

Over the past decade, the study of phase separation in biology has opened up a new perspective for research. Phase separation is currently one of the most cutting-edge research fields in biology. Plants face dramatic changes in external environmental conditions, such as light, temperature, moisture, and mechanical stimuli during their growth and development. In order to survive and thrive in these conditions, plant cells must be able to quickly regulate gene expression in response to their changing surroundings. Recent research has revealed that the biomolecules within plant cells can form membraneless organelles through phase separation. These organelles play critical roles in compartmentalizing cellular activities, as a result regulate growth, development, and stress response in plants. This review describes the principles and functions of biomacromolecule phase separation, summarizes recent progress of phase separation in plant biology, and discusses the future directions for this fascinating area of study.

phase separation, membraneless organelle, plant growth and development, plant stress response

doi: [10.1360/SSV-2023-0112](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0112)



方晓峰, 清华大学生命科学学院副教授、博士生导师。2009年于西北农林科技大学获得理学学士学位, 2015年于北京生命科学研究所&北京协和医学院获得博士学位, 2015和2017年分别于清华大学和英国John Innes Centre从事博士后研究工作。2020年加入清华大学生命科学学院。2021年获得北京市自然科学基金委“杰出青年科学基金”; 2022年获得国家自然科学基金委“优秀青年科学基金”和国家农业农村部“神农英才计划”资助。实验室综合利用遗传学、生物化学、生物信息学、细胞生物学等手段研究相分离在植物生长发育和应对胁迫过程中的作用及机制。以通讯或第一作者身份在*Nature*, *Nature Chemical Biology*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *Nature Plants*, *Developmental Cell*, *Plant Cell*, *Molecular Plant*等国际期刊发表多篇具有影响力的学术论文。