

# 干旱、高盐及低温诱导的植物蛋白激酶基因

刘强<sup>①②</sup> 张勇<sup>①</sup> 陈受宜<sup>③</sup>

(①清华大学生物科学与技术系, 北京 100084; ②清华大学生物科学与技术系生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084; ③中国科学院遗传研究所, 北京 100101. Email: liuq@mail.tsinghua.edu.cn)

**摘要** 干旱、高盐和低温是严重影响作物生长发育及产量的 3 种不同形式的环境胁迫因子, 它们都影响细胞的水分状态, 使植物缺水遭受危害. 最近从模式植物拟南芥中克隆了一些同时受干旱、高盐及低温诱导的蛋白激酶编码基因, 分别编码受体蛋白激酶、促分裂原活化蛋白激酶、核糖体蛋白激酶以及转录调控蛋白激酶. 着重介绍这些环境胁迫诱导基因的表达特性以及它们的编码产物在植物对上述环境胁迫反应和信号传递中的调控作用.

**关键词** 环境胁迫 蛋白激酶 信号传递 基因表达

近年来, 在植物对逆境胁迫的分子反应和信号传递机理研究方面取得了可喜的进展<sup>[1,2]</sup>. 近期的研究相继报道了一系列在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中与干旱、高盐及低温抗性相关的蛋白激酶基因, 它们编码的调节因子分别在信号转导的不同过程起作用(表 1). 对这些基因的表达特性及其调控机理的研究, 是阐明植物对干旱、高盐及低温环境胁迫的分子反应的重要内容, 也是有效的通过转基因方式来改良植物性状所必须做的基础工作.

表 1 受干旱、高盐及低温胁迫诱导的拟南芥蛋白激酶基因

基因	cDNA /bp	蛋白分子量/ku	同源基因	诱导条件	推测功能
<i>RPK1</i>	1 623	59.7	<i>ER</i> , <i>TMK1</i> (拟南芥)	干旱, 高盐, 低温, ABA	感受并传递环境胁迫信号
<i>ATMPK3</i>	1 370	42.7	<i>MsERK1</i> (苜蓿), <i>PsMAP</i> (豌豆)	干旱, 高盐, 低温, 触伤	参与 MAP 激酶级联反应, 在信号传递中起作用
<i>ATMEKK1</i>	2 386	66	<i>NPK1</i> (烟草), <i>Bck1</i> (酵母), <i>MEKK</i> (白鼠)	干旱, 高盐, 低温, 触伤	参与 MAP 激酶级联反应, 接收并传递信号
<i>ATPK19</i>	1 413	53.1	<i>P70<sup>S6K</sup></i> (人), <i>PP90<sup>sk</sup></i> (非洲爪蟾)	干旱, 高盐, 低温, 触伤, 2, 4-D	增加蛋白合成能力
<i>ATPK6</i>	1 395	52.6	<i>P70<sup>S6K</sup></i> (人), <i>PP90<sup>sk</sup></i> (非洲爪蟾)	干旱, 高盐, 低温, 触伤, 2, 4-D, ABA	增加蛋白合成能力
<i>At-dbf2</i>	1 846	60.2	<i>Dbf2</i> (酵母)	干旱, 高盐, 低温, 高温	调控抗性相关基因的表达

干旱和高盐都会导致植物失水而引发渗透势的变化, 同样, 低温也会造成根系对叶片的水分供应减少而使叶片膨压下降, 引起渗透胁迫<sup>[3]</sup>. 植物感受干旱、高盐及低温后, 这些胁迫信号经历一系列传递过程, 最后诱导特定功能基因的表达, 在生理生化上作出调节反应. 各种研究表明, 蛋白激酶在信号传递中起着重要作用<sup>[4]</sup>. 近年来所分离和鉴定的与上述 3 种胁迫均相关的基因分别编码不同类型的蛋白激酶, 它们在植物对水分胁迫信号的接受、传导及抗性基因表达调控等不同过程起作用. 深入研究这些蛋白激酶基因的表达特性, 对揭示植物

对水分胁迫反应的分子机理十分重要. 根据最近的研究进展, 介绍及分析与植物干旱、高盐及低温分子应答有关的几类植物蛋白激酶基因及它们的编码产物在信号传递中的可能作用.

### 1 受体蛋白激酶(receptor protein kinase, RPK)基因

蛋白激酶是真核细胞信号转导的重要组分, 它们的共同点是催化区(一般含 250~300 个氨基酸)都含 11 个保守的亚区, 根据其底物蛋白被磷酸化的氨基酸残基种类, 将蛋白激酶分成丝氨酸/苏氨酸类和酪氨酸类两大类<sup>[5]</sup>. 位于细胞膜上的 RPK 受体蛋白激酶感应干旱、高盐、低温、脱落酸以及生长发育等信号, 并将信号向胞内传递, 引发一系列信号转导过程. RPK 蛋白的共同特点是由胞外配体结合区(extracellular ligand-binding domain)、跨膜区(transmembrane domain)和胞质激酶区(cytosolic kinase domain)3 个结构域组成, 通过配体结合区感受外界信号, 经跨膜区传递给胞质激酶区, 再由胞质激酶区通过磷酸化作用将信号传递给下一级信号传递体. 近年来相继在多种高等植物中分离出一系列受体蛋白激酶基因<sup>[6~9]</sup>, 它们在各种信号感受及传递中起作用.

干旱、高盐及低温诱导的受体蛋白激酶基因 *RPK1* 是从模式植物拟南芥中克隆到的<sup>[10]</sup>. 序列分析表明, *RPK1* 基因编码的氨基酸序列包含蛋白激酶中的 11 个保守亚区, 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类型, 具备胞外配体结合区、跨膜区和胞质激酶区等全部受体蛋白激酶的特征区. 此外, *RPK1* 激酶的胞外部分含有富亮氨酸重复序列(LRR leucine-rich repeat sequence), 该序列参与蛋白质-蛋白质间的相互作用, 与感受发育和环境胁迫信号有关<sup>[11]</sup>. 表达特性分析表明, *RPK1* 在植物的根、茎、叶和花中都能够表达. 干旱或高盐(250 mmol/L NaCl)胁迫处理条件下, 1 h 内, *RPK1* 的表达显著增强, 6 h 后达到峰值并至少在此后的 18 h 内保持稳定的高表达. 此外, 低温处理(4℃)也能快速诱导该基因的表达. 由于 *RPK1* 基因可被干旱、高盐及低温 3 种胁迫所诱导, 可以认为 *RPK1* 激酶在干旱、高盐及低温引起的水分胁迫的感受和信号传递中起作用. 如图 1 所示, 芽殖酵母中渗透势变化的感应器是位于膜上的蛋白 Sln1 和 Sho1, 其中 Sln1 由“感受器”和“反应调节器”两部分组成, 接受信号后激活有 MAP 激酶级联反应参与的信号传递途径. 虽然 Sln1 是一个完整的“双组分系统”(two-component

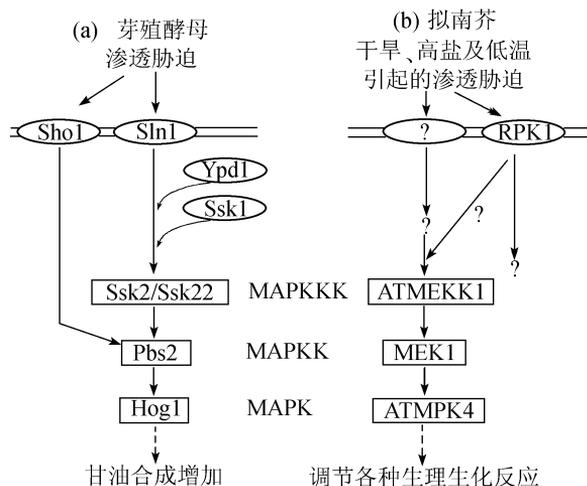


图 1 芽殖酵母与拟南芥中一条渗透胁迫信号传递的 MAP 途径

system)激酶,但信号转导离不开另外两个蛋白激酶 Ypd1 和 Ssk1 的参与. 与 Sln1 不同, RPK1 激酶独立完成信号接受、转换以及对信号传递系统的激活. 关于 RPK1 是引起有 MAP 激酶级联反应参与的信号传递途径, 还是像 Sho1 一样直接作用于信号传递途径的下游传递体, 尚待进一步实验确定. ABA 处理 1 h 虽然引起 *RPK1* 表达明显增加, 但对 ABA 不敏感的拟南芥突变型的研究表明, 在各种胁迫处理条件下突变型植株 *RPK1* 基因的表达与野生型相同, 说明该基因的水分胁迫诱导表达不依赖于 ABA 的作用. *RPK1* 基因的表达特性与拟南芥 *rd29a* 基因<sup>[3]</sup>的表达特性有些相似.

## 2 促分裂原活化蛋白激酶(MAP kinases)基因

促分裂原活化蛋白激酶家族的成员在多种信号传递系统中起着重要作用, 它们均为保守的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶, 分子量约为 38~55 ku, 都具有 11 个保守的蛋白激酶亚区. 这类蛋白激酶包括促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK), 促分裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK), 促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK) 3 种类型. 在真核细胞内, 这 3 种类型的蛋白激酶组成 MAP 激酶级联途径(MAP kinase cascade), 通过 MAPKKK→MAPKK→MAPK 逐级磷酸化, 级联反应地将信号不断放大并传递下去. 已知 MAP 激酶级联信号传导途径在介导生长因子、激素反应、细胞增殖和分化以及在介导胞外环境胁迫信号和调节胞内胁迫反应中起重要作用<sup>[12]</sup>. 近年来, 人们已相继从拟南芥、苜蓿(*Medicago sativa*)、烟草(*Nicotina tabacum*)等高等植物中分离出一系列促分裂原活化蛋白激酶家族的成员, 它们分别在植物信号传递的不同过程中起作用<sup>[13]</sup>. 目前已经发现, MAP 激酶级联途径与植物对干旱、高盐、低温、激素(乙烯、脱落酸、赤霉素、生长素)、创伤、病原反应以及细胞周期调节等多种反应的信号传递有关<sup>[14~22]</sup>. 但是, 各条 MAP 激酶级联途径的组成成员以及与其他信号传递途径的相互关系尚待进一步详细确定.

从拟南芥中分离到的被干旱、高盐及低温胁迫诱导的 MAP 蛋白激酶基因有 *ATMPK3*<sup>[23]</sup>(编码 MAPK 激酶)和 *ATMEKK1*<sup>[24]</sup>(编码 MAPKKK 激酶)两种. 对它们的研究表明, MAP 激酶级联系统不仅在蛋白质水平上受到磷酸化和去磷酸化的调控, 在转录水平也受环境胁迫信号的诱导调控. 在干旱、高盐或低温胁迫处理条件下, 5 min 内 *ATMPK3* 和 *ATMEKK1* 就被诱导表达, 1 h 内显著增强, 随后表达持续增加, 24 h 后达高峰值<sup>[24]</sup>. 最近 Mizoguchi 等人<sup>[25]</sup>利用酵母 Two-Hybrid System 方法证明, *ATMEKK1* 参与了拟南芥植物中传递干旱、高盐、低温以及触伤胁迫信号的 MAP 激酶级联途径. 该级联途径由 *ATMEKK1*(MAPKKK 激酶)→*MEK1*(MAPKK 激酶)→*ATMPK4*(MAPK 激酶)组成(图 1). 此发现证明了植物与动物、酵母等真核生物一样, 细胞中确实存在 MAP 激酶级联途径并在感受外界胁迫和信号传递中起作用. 在拟南芥等植物中还发现有许多 MAP 激酶的成员, 因此肯定还存在其他的 MAP 激酶级联途径. 大量分离植物中的 MAP 激酶, 阐明植物的各种 MAP 激酶级联传递途径具有重要意义, 必将极大地促进植物细胞信号传导分子机理的研究.

我们克隆了 *ATMPK3* 基因的启动子区域约 1.1 kb 的序列并对其进行了解析, 发现有大量 MYB 和 MYC 元件, 仅在 TATA 盒上游-10~-6 碱基处有 1 个与干旱、高盐及低温应答有关

的 DRE (dehydration responsive element) 顺式作用元件的核心序列(CCGAC)<sup>[26]</sup>. 由于 *ATMPK3* 基因不受 ABA 的诱导, 因此, 其表达不会受依赖 ABA 作用的 MYB 或 MYC 转录因子的调控. 而 DRE 核心序列元件距离 TATA 盒太近, 也不太可能发挥作用. 关于 *ATMPK3* 在信号传递途径中的位置及与其他信号传递体的相互作用还在进一步研究.

### 3 核糖体蛋白激酶(ribosomal-protein kinase)基因

*ATPK6* 和 *ATPK19* 是从拟南芥中分离的另一类蛋白激酶基因<sup>[27]</sup>, 两者的核苷酸序列有 82.0% 的同源性. 基因表达特性研究表明, 它们均被干旱、高盐及低温诱导, 仅在诱导的表达时间上略有差异. 其区别主要表现在 *ATPK19* 被诱导和到达表达高峰的时间较短. 低温处理 1 h, *ATPK19* 的表达量就有明显增加, 2 h 达到峰值(8.8 倍), 而 *ATPK6* 的表达量是在低温处理 2 h 后才有明显增加, 10 h 后达到高峰(6.8 倍), 然后逐渐下降. 用高盐(250 mmol/L NaCl) 处理时, 1 h 内, *ATPK19* 的表达量开始增加, 10 h 后达到峰值(6.3 倍), *ATPK6* 在 2 h 内表达量开始增加, 10 h 后达到峰值(4.8 倍), 两者表达量的升高均持续 24 h. 此外, 施加 2,4-D 亦可引起 *ATPK19* 表达少量增加, 但该基因不被 ABA 诱导, 而 *ATPK6* 却可同时被 2,4-D 和 ABA 所诱导.

*ATPK6* 和 *ATPK19* 所编码的氨基酸序列与动物核糖体蛋白 S6 激酶 P70<sup>S6K</sup> 和 PP90<sup>rsk</sup> 的同源性很高. 目前尚未发现 P70<sup>S6K</sup> 的直接上游激活物质, 但 P70<sup>S6K</sup> 在动物中能通过磷酸化 40S 核糖体蛋白 S6 而激活蛋白质的合成<sup>[28]</sup>, 因此 *ATPK6* 和 *ATPK19* 可能通过增加某些特定蛋白的合成使植物对外界胁迫作出反应. 研究表明, MAP 激酶所催化的磷酸化能够激活 PP90<sup>rsk</sup>, 且 *ATPK19* 的表达方式与编码 MAP 激酶的 *ATMPK3* 和 *ATMEKK1* 存在相似之处<sup>[23]</sup>, 如: (1) 在干旱、高盐或低温诱导下, 3 种基因的表达在 5 min 内即开始增加; (2) 它们都不被外源 ABA 诱导. 可以认为 *ATPK19* 可能在由渗透胁迫引起的不依赖于 ABA 的信号传递中起作用. 从目前的研究进展分析, *ATPK6* 和 *ATPK19* 在信号传导途径中位于 MAPK 的下游, 在干旱、高盐或低温诱导下激活核糖体蛋白 S6, 增加细胞内与这些胁迫耐性相关的蛋白质的合成, 或作为细胞在逆境胁迫下的应激反应, 促进所有蛋白质的合成.

### 4 转录调控蛋白激酶(transcription-regulation protein kinase)基因

转录调控蛋白激酶基因是最近从拟南芥果实中分离鉴定出的一种新的蛋白激酶基因. 序列分析表明, 它编码的氨基酸序列与酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)*dbf2* 基因编码的氨基酸序列具有很高的同源性, 且该基因能补偿酵母 *dbf2* 突变体的功能缺陷, 因此定名为 *At-dbf2*<sup>[29]</sup>. 拟南芥 *At-DBF2* 激酶亦属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类, 同样包含有 11 个蛋白激酶的保守亚区. 高盐、低温及脱水均能很快诱导 *At-dbf2* 基因的表达, 但该基因不受过氧化物诱导. 转化实验也显示出同样的结果, *At-dbf2* 超表达的酵母 DY 株系抗高盐、低温及脱水能力均比对照有所提高, 但抗氧化能力却无明显变化. 分别将 *At-dbf2* 及其反义 RNA 转入烟草 BY2 细胞系, 使它们在烟草细胞中过量表达, 经高盐、干旱、低温或高温处理 2 周后发现, 稳定表达 *At-dbf2* 基因的烟草细胞系抗胁迫能力明显强于转入反义 RNA 的细胞系.

*At-DBF2* 激酶在拟南芥信号传递中的功能目前尚不了解. *At-DBF2* 的同源物酵母 *DBF2* 蛋白激酶是酵母 CCR4 转录复合物的重要组分, 该转录复合物参与酵母生长、细胞周期、染

色体正常结构维持、氨基酸合成等多种生命活动相关基因的表达,同时还影响一系列转录因子如:TFIIB, RPB1, SRB2, SRB4等的活性.另一方面, DBF2是CCR4转录复合物中唯一的蛋白激酶,很可能是其活性的限制因子<sup>[30]</sup>.目前还没有发现At-DBF2激酶的直接激活物质或它的作用底物,而且CCR4转录复合体在真核生物中较为保守,因此At-DBF2的作用可能与DBF2激酶相类似,位于信号传递的下游,作为拟南芥中转录复合物的重要组成部分在转录水平上调节多种基因的表达,使细胞产生相应的生理生化调节.基因组杂交显示*dbf2*基因在烟草、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等植物中存在且相对保守,*dbf2*基因可能与MAP激酶基因一样,普遍存在于各种真核生物中.

植物蛋白激酶通过多重复杂的信号传递途径对干旱、高盐及低温胁迫作出反应,不同传递途径之间存在交叉转导作用(cross-talk).上述几种基因编码的蛋白激酶,分别在感受外界刺激、参与信号传递、增加蛋白质合成及调控转录等不同方面起重要作用.由此可见,分离与植物干旱、高盐及低温耐性相关的蛋白激酶基因以及深入研究它们之间的相互作用,对确定植物对外界环境胁迫的分子反应和信号传递的一些关键环节具有重要意义.有待于今后进一步地研究分离鉴定各种环境胁迫信号传递途径的新成员和这些信号传递体间的相互作用.通过确定与植物抗逆性有关的信号传导中起关键作用的调控因子,从这些关键的调控因子着手,就有可能通过转基因方法有效地综合提高作物抗逆性.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39770167)和国家重点基础研究发展规划(批准号:G1999011703)资助项目.

## 参 考 文 献

- 1 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7: 161~167
- 2 刘 强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. *科学通报*, 2000, 45(1): 11~16
- 3 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation- responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 1993, 236: 331~340
- 4 Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, 1995, 108: 451~457
- 5 Schenk P W, Snaar-Jagalska B E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1449: 1~24
- 6 Torii K U, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine rich repeats. *Plant Cell*, 1996, 8: 735~746
- 7 Clark S E, Williams R W, Meyerowitz E M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 1997, 89: 575~585
- 8 Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 1997, 90: 929~938
- 9 Feuillet C, Reuzeau C, Kjellbom P, et al. Molecular characterization of a new type of receptor-like kinase (wlrk) gene family in wheat. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37(6): 943~953
- 10 Hong S W, Jon J -H, Kwak J M, et al. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1203~1212
- 11 Walker J C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26:

1599~1609

- 12 Mizoguchi T, Lchimura K, Shinozaki K. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinase. *TIBTECH*, 1997, 15(1): 15~19
- 13 Machida Y, Nishihama R, Kitakura S. Progress in studies of plant homologs of mitogen-activated protein (MAP) kinase and potential upstream components in kinase cascades. *Critical Review in Plant Science*, 1997, 16(6): 481~496
- 14 Bogre L, Ligterink W, Heberle-Bors E, et al. Mechanosensors in plants. *Nature*, 1996, 383: 489 ~ 490
- 15 Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, et al. Stress signalling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11274~11279
- 16 McGrath R B, Ecker J R. Ethylene signaling in *Arabidopsis*: events from the membrane to the nucleus. *Plant Physiol Biochem*, 1998, 36(1-2): 103~113
- 17 Knetsch M L W, Wang M, Snaar-Jagalaka B E, et al. Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell*, 1996, 8: 1061~1067
- 18 Huttly A K, Philips A L. Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 1043~1052
- 19 Kovtun Y, Chui W L, Zeng W, et al. Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature*, 1998, 395: 716~720
- 20 Bogre L, Ligterink W, Meskiene I, et al. Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell*, 1997, 9: 75~83
- 21 Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, et al. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *The Plant Journal*, 1998, 15(6): 773~781
- 22 Bogre L, Calderini O, Binarova P, et al. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell*, 1999, 11: 101~113
- 23 Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 1993, 336: 440~444
- 24 Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, et al. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 765~769
- 25 Mizoguchi T, Ichimura K, Irie K, et al. Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Letters*, 1998, 437: 56~60
- 26 Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391~1406
- 27 Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 1995, 358: 199~204
- 28 Jefferies H B J, Reinhard C, Kozma S C, et al. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4441~4445
- 29 Lee J H, Montagu M V, Verbruggen N. A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5873~5877
- 30 Liu H Y, Toyn J H, Chiang Y C, et al. DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *EMBO J*, 1997, 16(17): 5289~5298

(1999-10-10 收稿, 1999-12-21 收修改稿)