

# 真细菌型的细胞分裂位点决定因子 *CrMinD* 基因在衣藻中从叶绿体到核的成功转移

刘维仲\* 胡勇\* 张润杰 周伟巍 朱佳瑛 刘祥林 何奕昆†

( 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; 山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004.

\* 同等贡献. † 联系人, E-mail: [yhe@mail.cnu.edu.cn](mailto:yhe@mail.cnu.edu.cn))

**摘要** MinD蛋白是一种普遍存在的ATP酶, 在真细菌、古细菌以及植物叶绿体的分裂过程中发挥着关键的作用. 在已研究过的 4 种绿藻(*Mesostigma viride*, *Nephroselmis olivacea*, *Chlorella vulgaris*, *Prototheca wickerhamii*)中, *MinD*基因均由叶绿体基因组编码. 但在拟南芥中, *MinD*基因由核基因组编码, 其蛋白定位于叶绿体并参与叶绿体分裂的调控, 说明在高等陆生植物中, *MinD*基因已经转移到核基因组. 然而, 对于在质体进化过程中*MinD*基因从叶绿体转移至核的机制还不清楚. 我们从单细胞绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, 衣藻)中鉴定了一个核编码的*MinD*同源物*CrMinD*, 其在野生型大肠杆菌(*E. coli*)中的过表达会抑制细胞的分裂并导致丝状细胞的形成, 表明植物MinD蛋白在进化上的保守性. *CrMinD-egfp*在烟草和拟南芥中的瞬时表达确认了*CrMinD*蛋白在调节叶绿体分裂中的作用. 在已公布的所有陆生植物质体基因组序列中, 没有发现*MinD*的同源物, 说明*MinD*基因从质体转移至核这一事件在进化出陆生植物以前就已经发生了.

**关键词** 衣藻 叶绿体分裂 *CrMinD* 进化 基因转移

依据内共生起源学说, 真核细胞的叶绿体起源于古老的原核生物——具有光合作用的蓝细菌. 在真核生物的进化过程中, 叶绿体基因组的部分基因丢失, 部分基因通过水平转移(lateral gene transfer, LGT)“逃逸”到核基因组成为编码叶绿体蛋白的核基因, 叶绿体(质体)逐渐丧失自主性而进化成为半自主性的细胞器 [1,2]. 现在认为, 所有的叶绿体(质体)更可能起源于一次早期的涉及蓝细菌捕获的内共生事件 [3-5].

MinD 是一个与细菌细胞分裂位点选择相关的蛋白, 在植物叶绿体分裂位点的决定中也起着极为重要的作用. 大肠杆菌(*E. coli*)的 *min* 操纵子系统——*minC*, *minD*, *minE*基因的协同表达是分裂环在杆状细胞中部正确定位所必需的 [2,6,7]. MinD蛋白是一种膜结合ATPase, 与MinC协同作用在细胞分裂位点形成分裂抑制子, 受MinE的拓扑调节 [8-10]. 在*E. coli*细胞中部和两极共存在 3 个潜在的分裂位点, 但在*min*基因的精细调控下仅中部的分裂位点得到利用, *min*基因的缺失或表达异常均影响细胞分裂位点的决定. *minD*的过表达导致MinCD复合体与细胞中所有潜在的分裂位点结合, 细胞分裂受阻, 产生不分裂的长丝

状体细胞 [11]. 在绿藻*Chlorella vulgaris*中, *MinD*基因的可读框仍存在于叶绿体基因组中 [12]. 而高等植物拟南芥(*A. thaliana*)定位于叶绿体的MinD蛋白由核编码 [13-15]. 这表明在植物的进化过程中, *MinD*基因已从叶绿体水平转移到核. 那么*MinD*基因在何时从叶绿体转移到细胞核呢?

为解析 *MinD* 基因从叶绿体转移至核的时间和机理, 我们对 *MinD* 基因的进化和功能进行了研究, 从单细胞绿藻 *C. reinhardtii* 中鉴定了一个编码叶绿体定位的 *MinD* 同源物的核基因——*CrMinD*. *CrMinD* 在 *E. coli* 中的过表达抑制细胞的分裂, 这充分说明 *CrMinD* 保持了类似于其祖先的功能, 即仍能识别细胞分裂位点并参与细胞分裂过程. 因此, *CrMinD* 是一个典型的 *MinD* 基因. 进化分析表明, *MinD* 基因在绿藻中已从叶绿体转移至细胞核, 而陆生植物起源于绿藻, 所以本研究结果有助于人们更深刻地了解叶绿体的进化以及叶绿体基因的命运.

## 1 材料与方法

( ) 植物材料和培养条件. 莱茵衣藻(*Chlamydo-*

2007-04-08 收稿, 2007-07-26 接受

国家自然科学基金(批准号: 30500288 和 30470879)和北京市自然科学基金(批准号: 5032003)资助项目

*monas reinhardtii* CC-124)来自*Chlamydomonas* culture collection (Duke University, Durham, NC, USA). 衣藻培养液为TAP (Tris-acetate-phosphate)液体培养基, 培养温度 22~26 °C, 12L/12D光暗培养, 光照强度约为  $52 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . TAP液体培养基的制备按照 Harris<sup>[16]</sup>的描述进行, 用TRIZMA-Base (Sigma, St. Louis)调整pH 6.6~6.8, 高压灭菌备用. 在指数生长中期( $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  细胞/mL)收集培养物( $2000 \times g$ 离心 5 min).

( ) *CrMinD*基因的克隆和序列分析. 衣藻(*C. reinhardtii* CC124)液体培养物总RNA的提取按照文献<sup>[17]</sup>的描述进行, RT-PCR采用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1 和基因特异的引物, 按照厂商提供的说明(TaKaRa Technologies, 大连)进行操作. 用TBLASTN algorithm<sup>[18]</sup>, 以*E. coli* MinD蛋白(DDJB登录号: BAA36022)的氨基酸序列作为探针在衣藻EST数据库 ([http://www.biology.duke.edu/chlamy\\_genome/blast](http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/blast))中进行TblastN检索, 得到一个高相似性的EST序列BI722655 (1031063D01), 然后以此序列为探针, 再次对衣藻EST库中的EST序列进行杂交, 最终得到BI722655, BI998667, BE453488, BE453489, BI722656, M002859, BI527249 和BE724999EST序列, 分属于 7 个不同的EST克隆. 利用BioEdit和Vector NTI Suite 6 生物学软件, 将所有得到的衣藻*MinD* EST序列组装成一个全长的cDNA序列. 为核实组装序列并克隆全长的*CrMinD*基因, 根据组装序列设计特异引物(正向, 5'-CGC TGC ATT GCT ATC CGT GAT-3'; 反向, 5'-TGA ACC GCC GGA ACT ATG TG-3')进行RT-PCR扩增(94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min). 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 用DNA Gel Extraction kit (上海生工公司)回收纯化后, 克隆至pMD18-T载体(TaKaRa Technologies, 大连)进行测序. 经测序并得到核实的基因命名为*CrMinD*, 已提交至GenBank, 登录号为AF529270. MinD家族蛋白的氨基酸序列从GeneBank/EMBL/DBJ数据库获得. 利用ClustalW程序完成序列间的pairwise比较<sup>[19]</sup>. 利用 TargetP<sup>[20]</sup>, ChloroP<sup>[21]</sup>和 Predotar (<http://www.inra.fr/predotar/>)程序对*CrMinD*蛋白氨基酸序列的N端延伸区进行分析, 并预测其N端延伸是否为叶绿体导入肽序列. MinD家族的进化关系(谱系分析)用近邻相连法(neighbor-joining method)进行分析<sup>[22]</sup>, 系统树的构建用PHYLP package version 3.6a2.2 (Felsen-

stein J, University of Washington, DC, USA)完成. Bootstrap值为对 100 个样本抽检的结果, 标注于对应的分支处.

( ) 载体的构建. (1) 质粒 pTrcEGFP 的构建. EGFP(增强的绿色荧光蛋白)基因从 pEGFP (Clontech, USA)中扩增得到. 所用引物 5'端分别设计有 *EcoR* / *Hind* 酶切位点(下画线所示). 正向引物: 5'-CA GAA TTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG-3'; 反向引物: 5'-TA AAG CTT CCG CTT TAC TTG TAC AGC-3'. EGFP 扩增产物的 *EcoR* / *Hind* 酶切片段克隆至同样经 *EcoR* / *Hind* 双酶切的 pTrcHisA 载体上. (2) 质粒 pTrcCrD 的构建. 将经 *Bam*H / *Hind* 双酶切的 *CrMinD* 扩增产物克隆至经 *Bam*HI/*Hind* 双酶切的 pTrcHisA 载体上. 扩增所用引物 5'端分别设计有 *Bam*H / *Hind* 和 *EcoR* 酶切位点(下画线所示). 正向引物 DB5s: 5'-GAC GGA TCC ATG CGC TCG ACC ATT CCT-3', 反向引物 DB3as: 5'-TCG AAG CTT TCA GAA TTC GTT CTG GAA CAT CTC GCC-3'. (3) 质粒 pTrcCrDG 的构建. 将 EGFP 的 *EcoR* / *Hind* 酶切片段克隆至质粒 pTrcCrD 载体的 *EcoR* / *Hind* 位点即可.

( ) *CrMinD*:EGFP融合蛋白的叶绿体定位. *CrMinD*全长cDNA扩增产物(所用引物 5'端分别设计有 *Xba* / *Sal* 酶切位点(下画线所示). DtrS: 5'-GAC TCT AGA ATG CGC TCG ACC ATT CCT-3'; DtrAS: 5'-TCG GTC GAC GTT CTG GAA CAT CTC GCC-3')经 *Xba* / *Sal* 双酶切后, 克隆至pLGZ2 载体<sup>[17]</sup>的 *Xba* / *Sal* 位点. 然后将*CrMinD-egfp*的*Xba* / *Sal* 双酶切片段克隆至双元载体pBI121的*Xba* / *Sal* 位点, 构成载体pBI121-D-EGFP. 粒子轰击法(基因枪法, Biolistic PDS-1000/He; Bio-Rad, Hercules, CA, USA))将该双元载体转入烟草(*Nicotiana tabacum* SRI)幼叶中, 28 °C 温育 2 d 后, 即用于EGFP表达的检测. *CrMinD*:EGFP融合蛋白在拟南芥叶肉细胞原生质体中的瞬时表达分析根据 Sheen 公布的实验步骤(A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>, 2002)进行操作.

( ) 激光共聚焦和显微观察. 将转化有融合表达质粒 pTrcEGFP, pTrcCrD, pTrcCrDG 和空载体 pTrcHisA 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  在选择培养基上(含 80  $\mu\text{g/mL}$  Amp<sup>r</sup>)培养后, 挑取单菌落于液体培养基中 37 °C 摇培过夜, 次日以 1/50 比例取过夜培养物分别接种

于含 50 μmol/L IPTG 的 LB 液体培养基(80 μg/mL Amp<sup>r</sup>), 37 °C 摇培 3 h. 然后将培养物与等体积预热的 1%低熔点琼脂糖混匀后滴于无荧光载片上, 采用蓝光激发和标准滤光片进行镜检. 利用微分干涉显微镜观察没有经 IPTG 诱导的转化有外源质粒的 DH5α 菌体形态.

取自 *CrMinD-egfp* 转基因烟草和野生型植株 (*Nicotiana tabacum* SRI)的叶片样本直接置于载玻片上, 同时加一滴纯水即可直接进行激光共聚焦显微观察. 观察 *CrMinD-egfp* 转化的拟南芥叶肉细胞原生质体时, 用移液器取一滴原生质体分离液置于载玻片上即可直接进行观察. 采用 Leica TCS 激光共聚焦显微镜对上述 GFP 来源的荧光定位进行实时观察, GFP 和叶绿素分子的激发光波长分别为 488 和 512 nm. 图像通过 Spot cold CCD Digital camera 采集, 并用 Leica TCS PowerScan 软件进行分析处理.

2 结果

2.1 序列分析

根据装配的*CrMinD*序列, 通过RT-PCR方法分离得到了衣藻(*C. reinhardtii*)的*MinD*基因. 在衣藻叶绿体基因组和线粒体基因组全序列 [23]中, 没有发现*MinD*的类似物, 表明*CrMinD*是一个核编码的基因. 而且, 用 *CrMinD* cDNA 序列作为查询序列, 在衣藻未注释 (non-annotation)的基因组序列(<http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>)中进行搜索, 只发现了一个显著匹配的序列, 说明 *CrMinD* 为单拷贝基因. *CrMinD*编码一个 351 个氨基酸的多肽, 含有 8 个内含子, 其长度分别为 75, 73, 191, 135, 235, 164, 177 和 216 bp.

将衣藻 *CrMinD* 蛋白与其他几种不同生物的 *MinD* 蛋白进行多序列对齐比较, 发现该蛋白在叶绿体的进化过程中非常保守. *CrMinD* 是 ATP 酶 ParA 超家族的一个成员, 表现出异化的 Walker 型 ATP 结合基序 (Walker-type ATP-binding motif) 特征 [10,24]. 与大肠杆菌 *MinD* 蛋白相比, 衣藻 *CrMinD* 具有一个 85 个氨基酸长的 N 端延伸. 叶绿体导 (转运) 肽预测软件

TargetP [20], ChloroP [21] 和 Predotar (<http://www.inra.fr/predotar/>) 的分析表明, 此 N 端延伸序列具有叶绿体导入肽的共同特征 (表 1), 故预测其 N 端延伸为叶绿体导入肽序列. 序列比对发现, *CrMinD* 的第 86 个氨基酸残基至末端的 266 个氨基酸序列 (即去除可能的叶绿体导入肽序列后的编码序列) 和 *C. vulgaris* 的 *MinD* 具 79.8% 的一致性和 93.0% 的相似性, 与拟南芥的 *AtMinD* 具 54.6% 的一致性 [13,14,25], 和几种光合蓝细菌具 53.5%~58.3% 的一致性, 和其他真细菌的 *MinD* 序列具 37.9%~40.5% 的相似性.

2.2 核编码的 *CrMinD* 具叶绿体导入肽并定位于叶绿体

为确定 *CrMinD* 的延伸 N 端确有导入肽的功能, 将全长的 *CrMinD* 和 *EGFP* (增强的绿色荧光蛋白) 的 N 端融合后, 置于 CaMV-35S 启动子的控制之下, 形成表达质粒载体 pBI121-D-EGFP, 并将其导入烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片细胞和拟南芥 (*Arabidopsis*) 叶肉细胞原生质体中. 结果发现, 在烟草和拟南芥中, 瞬时表达的嵌合 *GFP* 全部定位于叶绿体中 (图 1 和 2), 而未和 *CrMinD* 融合的 *GFP* 只在胞质和细胞核中观察到 (图 2). 这表明 *CrMinD* 的 N 端确实具有将此蛋白导入叶绿体的能力.

2.3 *CrMinD* 在 *E. coli* 中的过表达引起细胞分裂受阻和丝状细胞的形成

因为质体起源于早期具光合能力的原核生物与原始真核生物的内共生事件 [1,2], 所以细菌细胞的分裂被用作解析质体分裂机制的一个范例. 为确定真核生物参与质体分裂的 *MinD* 蛋白回到 *E. coli* 中后是否仍然具有调控细胞分裂的功能, 我们构建了几个表达载体, 将 *CrMinD* 和 *CrMinD-egfp* 置于 *lac* 启动子的控制之下, 并将其导入 *E. coli*. 显微分析表明, 在 *egfp* 过表达的 *E. coli* 细胞系中, 细胞分裂正常 (即 *EGFP* 蛋白对 *CrMinD* 的功能没有影响, 图 3(c) 和 (d), 箭头所示); 而 *CrMinD* 过表达的细胞系中, 表现出明显的分裂异常, 在邻近细胞两极处形成异常的缢缩环 (图 3(e), (g) 和 (h)) 或形成不分裂的长丝状细胞 (图 3(f) 和 (i)).

表 1 3 种软件对 *CrMinD* 叶绿体转运肽的预测结果

| <i>C. reinhardtii</i>       | ChloroP V1.1 | cTP 分数 | TargetP V1.0 <sup>b)</sup> |        |    |      | Predotar |        |            |
|-----------------------------|--------------|--------|----------------------------|--------|----|------|----------|--------|------------|
|                             |              |        | cTP 分数                     | mTP 分数 | RC | Loc. | cTP 分数   | mTP 分数 | Prediction |
| <i>CrMinD</i> <sup>a)</sup> | 0.581        | Y      | 0.929                      | 0.324  | 2  | C    | 0.823    | 0.048  | C          |

a) 黑体数字表示的是超过叶绿体转运肽(cTP)或线粒体转运肽(mTP)预测程序阈值的得分, 不同程序给出的得分不可相互比较, 但最大得分都为 1.0; b) TargetP 预测的 RC (Reliability class) 值在 1~5 之间, 值越小表示可信度越大

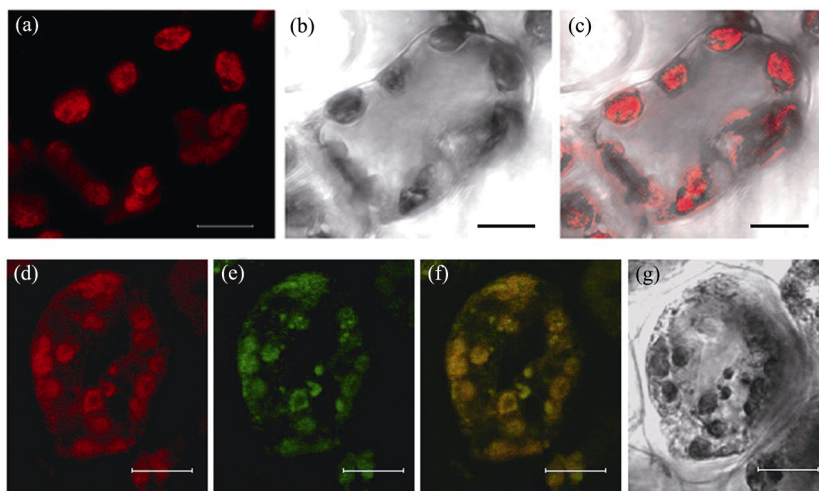


图1 CrMinD-EGFP 特异定位于烟草叶肉细胞的叶绿体中

融合蛋白在 CaMV 35S 启动子的驱动下在烟草叶肉细胞中瞬时表达, 用激光共聚焦显微镜观察 EGFP 信号和叶绿素的自发荧光. (a)和(d)为叶绿素的荧光图像; (b)和(e)为 EGFP 的荧光图像; (c)和(f)分别为(a)和(b), (d)和(e)的融合影像. (a)~(c)为野生型烟草的荧光图像; (d)~(f)为瞬时表达 *CrMinD-EGFP* 的烟草叶肉细胞的荧光图像; (g)为黑白影像, 示叶绿体形状, 可以看出绿色荧光只在叶绿体中出现. 标尺为 8  $\mu\text{m}$

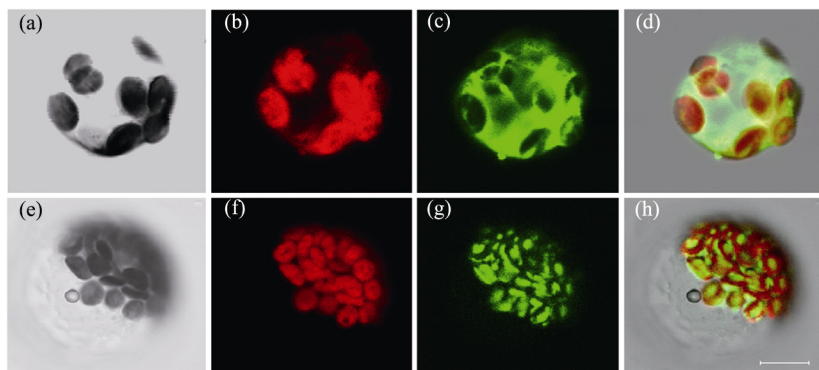


图2 CrMinD-EGFP 特异定位于拟南芥叶肉细胞原生质体的叶绿体中

融合蛋白在 CaMV 35S 启动子的驱动下在拟南芥叶肉细胞原生质体中瞬时表达, 用激光共聚焦显微镜观察 EGFP 信号和叶绿素的自发荧光. (a)和(e)示细胞形状; (b)和(f)为叶绿素的荧光图像; (c)和(g)为 EGFP 的荧光图像; (d)和(h)分别为(b)和(c), (f)和(g)的融合影像. (a)~(d)为非融合 EGFP 瞬时表达的荧光图像, 可以看出绿色荧光分布在整個细胞中; (e)~(h)为瞬时表达 *CrMinD-EGFP* 的荧光图像, 可以看出只在叶绿体中有绿色荧光出现. 标尺为 10  $\mu\text{m}$

这些表型和 *minD* 表达改变的细菌突变体 [11] 相似, 因此可以认为, 当真细菌 *minD* 的同源物——*CrMinD* 在 *E. coli* 中表达时, 仍然具有决定细胞分裂位点的功能.

和过表达 *CrMinD* 的细胞相似, 过表达 *CrMinD-EGFP* 融合蛋白的 *E. coli* 细胞也表现出分裂受阻的丝状细胞表型. EGFP 产生的荧光表现出规则的亮带或环状结构, 进一步表明 *CrMinD* 仍能识别并结合到细胞分裂位点. 荧光图像显示 *CrMinD* 形成可见的极区 (图 4(a)和(d)), 类似于内源 *MinD* 蛋白在 *E. coli* 细胞中的定位, 3 个 *MinD* 环结合至 3 个潜在的分裂位点

(图 4(c)), 所以没有一个细胞分裂位点可被使用; 尽管细胞分裂被抑制, 但细胞仍然延伸形成了新的分裂位点 (图 4(b), (e)和(f)), 冗余的 *MinD* 蛋白在这些新的分裂位点形成环状复合物.

总的来说, 这些结果表明 *CrMinD-egfp* 的过表达导致 *CrMinD* 在绝大多数甚至所有潜在的分裂位点装配成 *MinD* 带, 使细胞分裂受阻. 另外, 随着 *CrMinD* 的过表达和 *E. coli* 细胞的延伸, *E. coli* 细胞的直径也似乎有所增加 (图 3 和 4). 特别是在图 4(f)中, 丝状细胞的直径比短细胞的大些. 但 *MinD* 影响细胞直径的原因还不清楚.

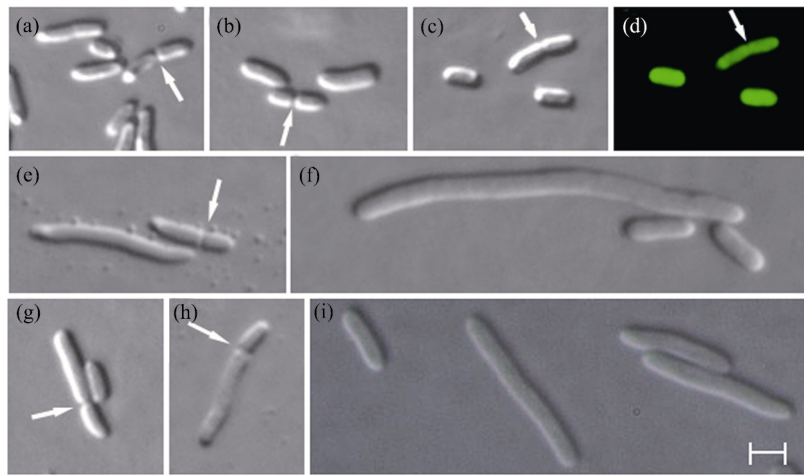


图 3 *CrMinD* 的过表达抑制 *E. coli* 细胞的分裂

(a) 野生型 *E. coli* 细胞, 箭头所指为位于细胞中部正确的分裂位点; (b) 50  $\mu\text{mol/L}$  IPTG 诱导下生长在 LB 培养基上的仅含有空质粒载体 pTrcHisA 的 *E. coli* 细胞, 箭头所指为位于细胞中部正确的分裂位点; (c) 和 (d) 含有质粒 pTrcEGFP ( $P_{\text{lac}}\text{-}egfp$ ) 的 *E. coli* 细胞, (d) 为 (c) 的荧光图像, 可以看出荧光充斥于整个细胞中, 箭头指向位于细胞中部正确的分裂位点; (e)~(i) 含有质粒 pTrcCrD ( $P_{\text{lac}}\text{-}CrMinD$ ) 的 *E. coli* 细胞, 即 *CrMinD* 过表达的 *E. coli* 细胞, 箭头所指为邻近细胞两极的异常的分隔事件. 标尺为 2  $\mu\text{m}$

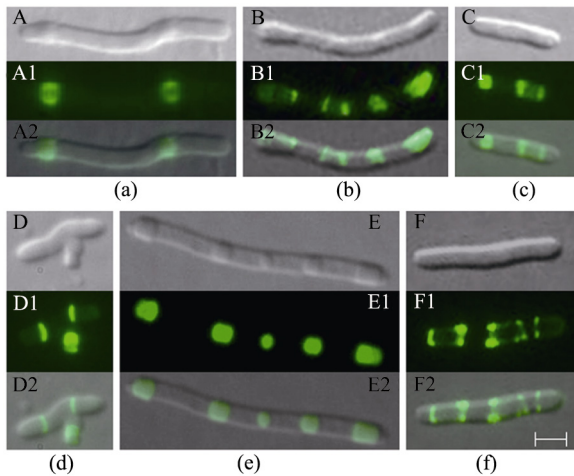


图 4 *CrMinD*-EGFP 在 *E. coli* 细胞中的胞内定位

在 *CrMinD:egfp* 过表达的 *E. coli* 细胞(含有质粒 pTrcCrDG ( $P_{\text{lac}}\text{-}CrMinD:egfp$ ))中, EGFP 产生的绿色荧光表示 *CrMinD* 的定位, 表现为规则的亮带或环. A~F 为 DIC(微分干涉相衬)显微图像; A1~F1 为荧光图像; A2~F2 分别为 A~F 和 A1~F1 相应图的融合影像. 标尺为 2  $\mu\text{m}$

## 2.4 *MinD* 基因的侧向转移何时发生

利用 12 个绿色植物、2 个红藻/褐藻、6 个光合细菌、3 个真细菌、6 个古细菌的 *MinD* 蛋白, 采用 N-J 方法构建了 *MinD* 蛋白分子进化树(图 5). 由于植物数据相对较全, 因而与前人结果<sup>[13]</sup>相比较我们所构建的进化树更符合植物由水生到陆生的进化规律. 此进化树揭示了 *CrMinD* 和陆生植物 *MinD* 蛋白之间的近缘关系, 也表明了核编码的 *CrMinD* 起源于光合细菌. 结合表 1 的数据, 说明 *CrMinD* 基因已成功地从叶

绿体转移至核, 因此认为 *MinD* 从质体转移至核的事件在进化出陆生植物以前就发生了.

## 3 讨论

在细菌中, *MinD* 和 *MinC* 协同作用形成复合物, 抑制除细胞中部外的所有细胞分裂位点 Z-环的形成, 抑制细胞分裂, 形成不分裂的长丝状细胞<sup>[6,26]</sup>. *MinD* 缺失的 *E. coli* 突变体在所有潜在的分裂位点都有 Z-环的形成, 导致无染色体的小细胞(minicell)形成<sup>[27]</sup>. 最近已证明, *MinD* 也介导植物叶绿体分裂装置的正确定位<sup>[13,14,25]</sup>, 拟南芥中 *MinD* 的过表达导致叶绿体分裂异常, 使叶肉细胞中叶绿体的数目减少, 体积变大<sup>[25]</sup>. 在从细菌到陆生植物等分布广泛的生物种类中都发现了 *MinD* 的同源物(图 5). 在非绿藻(*Guillardia theta*)<sup>[28]</sup>和绿藻(*Chlorella vulgaris*)<sup>[12]</sup>以及迄今为止发现的分歧最早(earliest-diverging)的两种绿色植物 *Nephroselmis olivacea*<sup>[29]</sup>和 *Mesostigma viride*<sup>[30]</sup>中, *MinD* 的同源物由叶绿体基因组编码. 但在高等植物的叶绿体基因组中, 没有发现 *MinD* 基因的存在<sup>[31,32]</sup>. 对所有已研究过的陆生植物(14 种被子植物, 2 种裸子植物, 1 种蕨类植物, 3 种苔藓)的叶绿体基因组全序列进行搜索, 没有发现 *MinD* 同源物的存在. 这些都表明, 在高等陆生植物中, *MinD* 基因已成功地从叶绿体转移至核. 那么在绿色植物的进化过程中, *MinD* 基因何时从叶绿体转移到细胞核呢? 在本研究中, 我们鉴定了单细胞绿藻——衣藻的 *CrMinD* 基因, 序

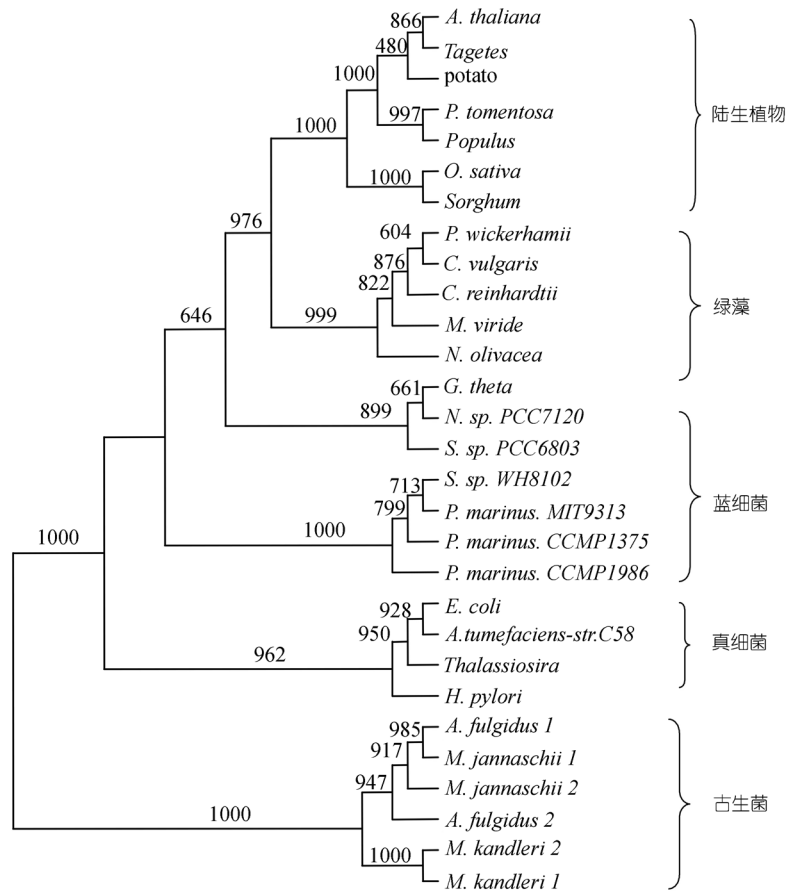


图5 MinD 蛋白分子进化树

分子进化树的构建采用 N-J 方法, Bootstrap 值为对 100 个样本抽检的结果, 标注于对应的分支处

列和进化分析(表 1, 图 5)表明衣藻的 CrMinD 蛋白是一个核编码的真细菌型 MinD 同源物。CrMinD-egfp 在烟草和拟南芥中的瞬时表达(图 1 和 2)证明 CrMinD 蛋白定位于叶绿体。CrMinD-egfp 在 *E. coli* 中的过表达(图 3 和 4)表明衣藻的 CrMinD 仍具有调控细胞分裂的功能。所以, 我们认为 CrMinD 是一个由核编码、定位于叶绿体、典型的真细菌型 MinD 的同源物, 在叶绿体分裂过程中行使调节功能。此外, MinD 基因从质体到核的转移事件发生于绿藻的分化过程中, 并且该事件的发生早于陆生植物的出现, 为细胞器基因成功地转移到核并转变为功能性的核基因提供了证据。但对植物 MinD 基因如何转移到核的机制还不清楚, 正在进一步探索中。

一般认为, 这些由核编码但定位于叶绿体(在叶绿体中行使功能)的蛋白最初是由其祖先的叶绿体基因组编码, 在内共生的整合过程中, 这些基因转移到宿主的核基因组中, 进而获得适当的表达和叶绿体

定位信号, 使其编码的蛋白能被合成并借助于转运肽(定位信号)的作用重新回到细胞器中行使功能<sup>[33-35]</sup>。实验研究已证明基因从叶绿体转入核的事件以惊人的高频率发生<sup>[36,37]</sup>。对于这些转移至核的基因, 功能的获得涉及到在核中转录所必需的启动子和终止子序列以及合成的蛋白定向转运回到细胞器中行使功能所必需的定位信号序列的获得。最近, Stegemann 和 Bock<sup>[38]</sup>在烟草中重建了功能基因从质体基因组转移到核的过程, 证明当在核基因组中发生适当的基因重排后, DNA 介导的基因转移能产生功能性的核基因。在此实验系统中, 基因功能的获得与对上游核基因启动子的捕获和利用质体基因下游 AT 丰富的非编码序列作为 RNA 切割和多聚腺苷酸化位点联系在一起。似乎转运肽序列的获得也可以通过相似的机制“捕获”得到。那么 CrMinD 基因转移至核中后是如何获得功能的? 我们推测在 CrMinD 基因从质体转移到核的进化过程中可能存在相似的机理。

# 参 考 文 献

- Gray M W. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol*, 1992, 141: 233—357
- McFadden G I. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2: 513—519[DOI]
- Palmer J D. A single birth of all plastids? *Nature*, 2000, 405: 32—33[DOI]
- Palmer J D. The symbiotic birth and spread of plastids: How many times and whodunit? *J Phycol*, 2003, 39: 4—11[DOI]
- Moreira D, Le Guyader H, Philippe H. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature*, 2000, 405: 69—72[DOI]
- Rothfield L, Justice S, Garcia-Lara J. Bacterial cell division. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 423—448[DOI]
- Rothfield L I, Shih Y L, King G. Polar explorers: Membrane proteins that determine division site placement. *Cell*, 2001, 106: 13—16[DOI]
- Hu Z, Lutkenhaus J. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Mol Microbiol*, 1999, 34: 82—90[DOI]
- Huang J, Cao C, Lutkenhaus J. Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. *J Bacteriol*, 1996, 178: 5080—5085
- de Boer P A, Crossley R E, Hand A R, et al. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *Embo J*, 1991, 10: 4371—4380
- de Boer P A, Crossley R E, Rothfield L I. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell*, 1989, 56: 641—649[DOI]
- Wakasugi T, Nagai T, Kapoor M, et al. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5967—5972[DOI]
- Kanamaru K, Fujiwara M, Kim M, et al. Chloroplast targeting, distribution and transcriptional fluctuation of AtMinD1, a Eubacteria-type factor critical for chloroplast division. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 1119—1128[DOI]
- Colletti K S, Tattersall E A, Pyke K A, et al. A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. *Curr Biol*, 2000, 10: 507—516[DOI]
- Fujiwara M T, Nakamura A, Itoh R, et al. Chloroplast division site placement requires dimerization of the ARC11/AtMinD1 protein in *Arabidopsis*. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2399—2410[DOI]
- Harris E H. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: Academic Press, 1989
- Hu Y, Kong D D, Wang D, et al. Cloning and expression in *E. coli* of *Chlamydomonas reinhardtii* CrFtsZ3 gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35: 998—1004
- Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 215: 403—410
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876—4882[DOI]
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, 300: 1005—1016[DOI]
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*, 1999, 8: 978—984
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406—425
- Maul J E, Lilly J W, Cui L, et al. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: Islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*, 2002, 14: 2659—2679[DOI]
- Suefuji K, Valluzzi R, Raychaudhuri D. Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16776—16781[DOI]
- Dinkins R, Reddy M S, Leng M, et al. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinD1 gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants. *Planta*, 2001, 214: 180—188
- Rothfield L I, Justice S S. Bacterial cell division: The cycle of the ring. *Cell*, 1997, 88: 581—584[DOI]
- Raskin D M, de Boer P A. MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, 181: 6419—6424
- Douglas S E, Penny S L. The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: Complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol*, 1999, 48: 236—244[DOI]
- Turmel M, Otis C, Lemieux C. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10248—10253[DOI]
- Lemieux C, Otis C, Turmel M. Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature*, 2000, 403: 649—652[DOI]
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J*, 1986, 5: 2043—2049
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*, 1999, 6: 283—290[DOI]
- Martin W, Herrmann R G. Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and Why? *Plant Physiol*, 1998, 118: 9—17[DOI]
- Martin W, Rujan T, Richly E, et al. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12246—12251[DOI]
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, et al. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*, 1998, 393: 162—165[DOI]
- Timmis J N, Ayliffe M A, Huang C Y, et al. Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 123—135[DOI]
- Stegemann S, Hartmann S, Ruf S, et al. High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8828—8833[DOI]
- Stegemann S, Bock R. Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. *Plant Cell*, 2006, 18: 2869—2878[DOI]