



论文

小立碗藓 *PpCDC48II* 基因的定点敲除导致冷驯化后的冻害敏感

王慧^{†*}, 谨硕[†], 陈曦, 耿旭珂, 何奕骥

首都师范大学生命科学学院遗传与生物工程重点实验室, 北京 100037

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: huiwangl@sina.com

收稿日期: 2011-11-23; 接受日期: 2011-12-13

国家自然科学基金(批准号: 30700404)资助项目

摘要 CDC48 是真核生物 AAA 蛋白家族的一个重要成员, 进化上相当保守, 能与许多不同的协同因子相互作用, 形成各种蛋白复合体参与调节细胞内多种重要的生理活动. 本研究利用小立碗藓 EST 数据库信息克隆了小立碗藓 AAA 蛋白家族中 *PpCDC48II* 基因, 其含有 2 个典型的 ATPase 结构域与拟南芥 *AtCDC48A* 具有非常高的同源性. 0℃冷胁迫处理 48 和 72 h 后, *PpCDC48II* 在转录水平表现了诱导表达的特性. 为了进一步阐明这个基因的功能, 利用小立碗藓通过高效同源重组实现基因敲除的这一特点, 获得了 *PpCDC48II* 单基因敲除的突变体. 通过抗冻实验发现, 冷驯化后的 *Ppcdc48II* 抗冻的能力明显降低, 推测 *PpCDC48II* 在植物低温驯化诱导的抗冻过程中发挥了重要的作用.

关键词*PpCDC48II*

小立碗藓

基因敲除

冷驯化

抗冻性

小立碗藓(*Physcomitrella patens*)高效基因重组的打靶特点使其日益成为功能基因组学研究的模式植物^[1,2]. 此外, 其单倍体的配子体在其生活史中占主导地位, 配子体发育可分为两个阶段: 原丝体阶段和配子体阶段. 前者是一个由单细胞连接构成的丝状网络结构, 后者是一个类似于高等植物的三维结构, 具有复杂的器官分化, 可以从单细胞水平跟踪其发育过程, 这在发育生物学研究中具有优越性. 因此, 小立碗藓作为极具植物分子生物学研究前景的模式生物已日益受到人们的关注.

低温被认为是最重要的限制植物生长、发育和分布特征的环境因子. 一些温带植物通过调节体内的生理代谢来适应即将到来的低温天气, 从而提高其

在冬季的抗冻性. 这表明植物已进化出一套完善的机制来响应低温逆境. 实验证明, 低温诱导能够提高小立碗藓原丝体细胞的冷冻耐受能力^[3]. 低温处理不仅增强了小立碗藓的抗冻能力还提高了相关抗逆基因的表达因此, 阐明细胞内低温调控基因的功能对深入理解低温驯化机理至关重要.

在近期的研究中, 利用 cDNA 扩增片段多肽性(cDNA-AFLP)及扣除杂交(SSHcDNA)技术分离了小立碗藓配子体冷胁迫的双向文库. 在 SSHcDNA 文库的 768 个克隆中, 50.9%具有低温诱导特性, 从中随机挑选了 201 个上调和 190 个下调阳性克隆进行斑点杂交. 根据斑点杂交的信息, 分别对其进行单向测序, 共获得 420 条 EST 序列(表达序列标签).

英文版见: Wang H, Jin S, Chen X, et al. Target deletion of the AAA ATPase *PpCDC48II* in *Physcomitrella patens* results in freezing sensitivity after cold acclimation. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 150–157, doi: 10.1007/s11427-012-4277-z

EST 分析结果表明, 泛素系统介导的蛋白水解变性过程在冷驯化中起重要作用, 且细胞周期调控蛋白 *PpCDC48* EST 片段在冷胁迫后的转录表达量变化明显。

根据上述结果, 在小立碗藓中克隆了 *PpCDC48II* 基因, 其氨基酸序列含有 2 个典型的 ATPase 结构域与拟南芥 *AtCDC48A* 具有非常高的同源性。CDC48 是真核生物 AAA(ATPase associated with a variety of cellular activities, AAA)蛋白家族的一个重要成员。在石斑鱼(*Danio rerio*)细胞的冷驯化中发现, *CDC48* 基因的表达量明显上调, 而当在细胞中过量表达该基因后, 低温下的细胞繁殖能力大幅提高^[4]。在酵母菌中, *Cdc48p* 具有多种功能, 包括参与细胞周期的调控、膜融合以及作为分子伴侣参与将内质网(ER)错误折叠的蛋白运往蛋白酶体降解掉的过程^[5,6]。与其相对应的哺乳动物的同源物 *p97* 是研究最清楚的一个, *p97* 与核膜的重建^[7]、细胞器的生物起源^[8]、肌纤维的形成^[9]以及泛素/蛋白体的降解途径有着密切的联系^[10-12]。

在酵母与哺乳动物细胞中, 对 *CDC48* 蛋白家族成员的功能研究已相对成熟, 但在高等植物中对该基因的研究仍处于初级阶段。拟南芥基因组编码 3 个 *CDC48* 的同源基因: *AtCDC48A*(At3g09840), *AtCDC48B*(At3g53230)和 *AtCDC48C*(At5g03340)^[13]。它们与 *AtCDC48A* 的同源性分别为 91%(*AtCDC48B*)和 95%(*AtCDC48C*)^[14]。*AtCDC48* 在芽、根、花的伸长细胞以及生长点细胞中均高度表达^[15-17], 免疫荧光标记显示, *AtCDC48* 主要定位于核区, 在胞质分裂过程中则定位于成膜体部位, 即新的细胞壁形成部位^[14,15]。功能缺失及显性失活突变体的研究表明, *AtCDC48* 在细胞分裂、生长及发育方面发挥着重要功能^[18]。烟草的 *CDC48* 同源基因 *NgCDC48* 定位于内质网, 利用反义 RNA 干扰技术, 突变体(35S: *anti-NgCDC48*)表现出营养器官及生殖器官发育迟缓的表型, 并直接导致了叶和芽的生长停滞及花的不育现象。这些结果证实, 定位于内质网的 *NgCDC48* 所介导的蛋白酶体降解功能对维系烟草叶片细胞的生长及分化至关重要^[19]。

利用小立碗藓高效同源重组的这一特点, 获得了 *PpCDC48II* 的单基因敲除突变体。通过抗冻实验发现, 低温驯化后的 *Ppcdc48II* 突变体抗冷冻能力较野生型明显降低, 推测低温诱导表达的 *PpCDC48II* 基因在植

物冷驯化诱导的抗冻过程中发挥了重要的作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料及培养条件

培养方法参照文献[20]。采用的小立碗藓培养基为 PPNH_4 (pH 7.0)。培养条件: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期 16 h 光照, 光密度 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。小立碗藓原丝体培养: 将生长 2 周的幼嫩小立碗藓用研钵轻磨 10~15 s, 加适量水混合成浆液状, 吸取 1.5~2.0 mL 到铺有玻璃纸的 PPNH_4 培养皿(最好用封透气膜的结晶皿)上。黑暗过夜, 第 2 天在常规条件下培养 6~8 天生长出较均匀的原丝体, 用于原生质体转化和再生, 提取 DNA, RNA。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 TE3D 抽提的方法提取生长 2 周的小立碗藓总 RNA。使用 Qiagen Oligotex mRNA(Qiagen)试剂盒分离 Poly(A)RNA。RNA PCR(TaKaRa, Japan)试剂盒用于 RT-PCR 的分析。

1.3 DNA 重组技术

DNA 测序由 ABI PRISM 3100 DNA 测序仪完成(Applied Biosystems)。根据 GenBank 和 *PhycoBase* 中 *CDC48* 基因的保守序列, 利用生物软件(BioEdit)设计合成特异性引物 RTII-f(5'-ATTCTAGAATG-GCGACTCCCGCAG-3'(forward))和 RTII-r(5'-GCCG-TCGACGCTATACAAATCATCA-3'(reverse))。利用 RT-PCR 方法, 使用 cDNA Synthesis System 试剂盒(TaKaRa, Japan)克隆 *PpCDC48II* 基因的 cDNA 片段。合成的 PCR 片段克隆到 pGM-T(TaKaRa)载体上。

1.4 半定量 RT-PCR

1 μg 总 RNA 用 DNase I (Sigma-Aldrich, USA)常温消化 15 min 后用于 cDNA 的合成。使用 cDNA Synthesis System 试剂盒(TaKaRa, Japan)进行反转录。取 1 μL cDNA 用于 *PpCDC48II* 低温诱导的半定量 RT-PCR 分析。PCR 的反应条件如下: 30(*PpCDC48II*)或 26(*Ppactin3*)个循环, 95°C 30 s, 59°C (*PpCDC48II*)或 55°C (*Ppactin3*)30 s, 72°C 15 s。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离。半定量 RT-PCR 反应所用引物为: 5'-ATGGCGACTCCCGCAGCTGAA-3'及 5'-AAACG-

GAAGAACATGAATTC-3'.

1.5 *Ppcdc48II* 突变体的构建

为构建 *PpCDC48II* 基因的敲除载体, 以小立碗藓基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 1565 bp 的片段, 所用引物为 5'-GCTTATCTAAACTCGGAAC-3'(forward)和 5'-CAAATCATCATCATCAGCTGCA-3'(reverse). 然后将 DNA 片段克隆到 pGMT-T(TaKaRa)载体. 用 *HindIII*/*BssHII* 双切质粒 pTN182(日本国立自然科学研究所 Mitsuyasu Hasebe 教授惠赠), 以获得筛选标记基因 *NptII*, 然后将其与用相同酶切后的含有 *PpCDC48II* 基因组片段的载体连接, 最终生成 *PpCDC48II* 基因的敲除载体. PCR 扩增生成 30 μ g 用于转化的 DNA 片段, PEG 介导转化小立碗藓的原生质体. 通过两轮筛选得到稳定的突变株, G418(Sigma-Aldrich Chemie, <http://www.sigmaaldrich.com>)的筛选浓度为 30 μ g/mL.

突变体 PCR 的鉴定方法如下: 首先要检测敲除片段是否已经整合到基因组上, 所用引物为: P_{1f}: 5'-GCTTATCTAAACTCGGAAC-3'和 P_{1r}: 5'-CAAA-TCATCATCATCAGCTGCA-3'; 第 2 个 PCR 反应要检测突变体的基因组中是否有选择性标记基因 (*NptII*), 所用引物为: Nfwd: 5'-CACTATCCTTCG-CAAGACCCTTCCTC-3'和 Nrev: 5'-ATCCTTCCTTG-TCTTCCTCCTTCCTTCCGT-3'; 最后检测整合进入的外源 DNA 片段是否定点打靶到该基因特定的位点, 所以引物一个来源于 *NptII* 基因序列, 另一个来源于敲除载体上该基因同源序列的延伸序列, 所用引物为: P_{2f}: 5'-TATGTTTTGGTTTTGACGTG-3', P_{2r}: 5'-TGAGGAGCCACCTTCCTTTTC-3', P_{3f}: 5'-TTTT-GTTCCCTTTAGTGAGGGT-3'和 P_{3r}: 5'-AAGCAGC-TCAATTCATTACAG-3'. 扩增片段的长度与预期结果一致. 提取小立碗藓突变株 *Ppcdc48II* 的总 RNA, 反转录 cDNA, 利用 RT-PCR 检测 *PpCDC48II* 基因在突变株中是否转录.

1.6 冷冻处理实验

选取 *PpCDC48 II* 基因敲除的小立碗藓(*Ppcdc48 II*)作为研究材料, 将生长 2 周的小立碗藓野生型(WT)和 *Ppcdc48 II* 茎叶体(0℃)胁迫处理 0, 12, 24, 48 和 72 h 后转移到低温培养箱(-6℃)冷冻 90 min, 4℃培养箱过夜, 第 2 天移栽到室温培养基上常规条件培养 2 天, 观察结果. 移栽培养 10 天后统计其成活率.

1.7 抗冻性测定

生长 2 周的小立碗藓野生型和 *Ppcdc48II* 茎叶体经上述处理后分别测定其相对电导率^[21]. 取各种胁迫条件处理后的小立碗藓 0.1 g, 滤纸吸干, 放入试管中, 加入 2 mL 蒸馏水; 真空抽气 10 min, 反复 3 次, 室温轻摇 2 h 后测电导率; 经沸水浴 15 min 杀死细胞, 室温轻摇 2 h 后测其绝对电导率. 相对电解质渗出率: 电解质渗出率(%)=浸泡液电导率值/煮沸后电导率值×100.

1.8 叶绿素含量测定

测定上述实验恢复 2 天的 WT 和 *Ppcdc48II* 茎叶体叶绿素的含量. 取 0.15 g 左右小立碗藓加 0.6 mL 水置于研钵中充分研磨, 将匀浆倒入一个 10 mL Ep 管, 再加入 2.4 mL 纯丙酮进行叶绿素抽提, 即用 3 mL 80%丙酮抽提叶绿素. 静置 10 min, 1000×g 离心 5 min, 取上清用分光光度计在 645 和 663 nm 处测吸光值, 以 80%丙酮作空白对照. 叶绿素含量: Chla+Chlb=17.67A_{646.8}+7.12A_{663.8}. 具体步骤详见文献[22].

2 结果

2.1 小立碗藓中 *CDC48* 同源基因的分离及特性分析

利用拟南芥 AtCDC48A 蛋白作为探针, 在小立碗藓的 EST 数据库^[23]及基因组数据库(http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html)做同源检索, 结果显示至少有 6 个 CDC48 的同源蛋白, 它们都含有高度保守的 ATPase 结构域. 克隆了其中与低温胁迫密切相关的一个基因, 并将其命名为 *PpCDC48 II*. 该基因全长 2448 bp, 编码 816 个氨基酸, 蛋白分子量为 90.4 kD, 与酵母菌(92.0 kD)、人(89.3 kD)及拟南芥(89.4~90.4 kD)CDC48s 蛋白成员极其相似(图 1A). *PpCDC48 II* 蛋白序列含有 2 个经典的 ATPase 结构域, 并且所在的氨基酸区域完全一致(aa: 216~421; 489~698), 其中每个 ATPase 结构域各含有一个 Walker A 基序(GPPGCGKT)与 Walker B 基序(DELD), 这与已知的其他物种 CDC48 结构特点相同, 是 AAA 超家族蛋白的共同特点. 将小立碗藓 *PpCDC48II* 与其他几个不同物种的 CDC48s 进行多序列比较发现该蛋白非常保守(图 1), 其序列相似度分别为拟南芥(88%)、

水稻(89%)、烟草(89%)、酵母菌(67%)和人(78%)。由 DNAMAN 软件构建的几个物种 CDC48 的系统发育树可见(图 1B), 双子叶植物烟草与拟南芥的相似性最高, 小立碗藓 *PpCDC48 II* 蛋白与高等种子植物的相似性稍低, 进化地位略低。它们与人和酵母菌的相似性最低, 系统发育树基本上代表了它在经典分类中的地位。

2.2 突变体的 PCR 验证

为了证实 *PpCDC48II* 的功能, 通过同源重组技术将该基因定点敲除并获得了突变体(图 2A)。经过两轮 G418 抗性培养基筛选后从中选取两株突变体, 通过 PCR 验证其为单基因敲除的转基因植株(图 2B)。此外, 通过 RT-PCR 进一步确证了突变体中已经不能够检测到该基因的转录(图 2C)。

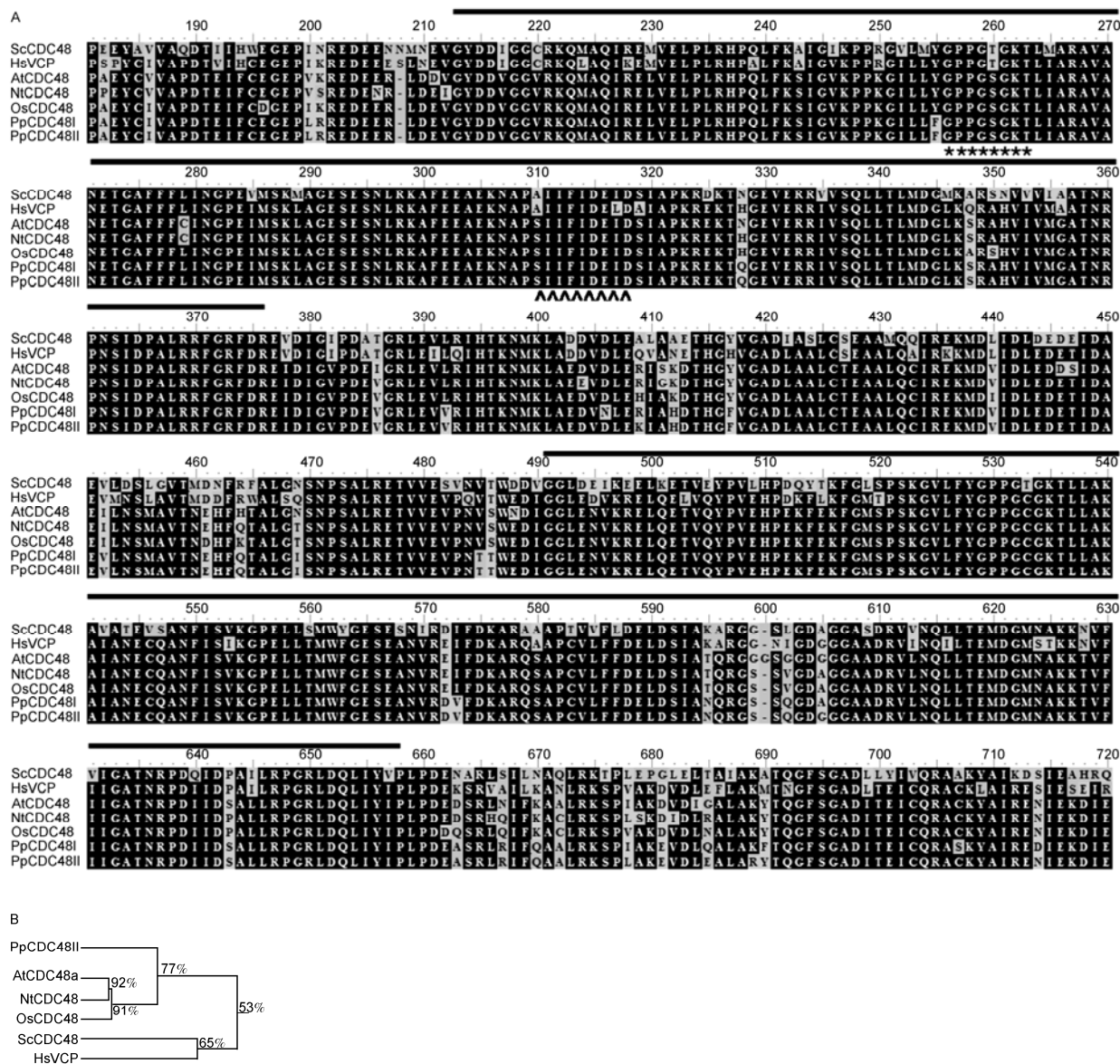


图 1 小立碗藓 *PpCDC48II* 的序列分析

A: 小立碗藓 *PpCDC48II* 与其他物种的 CDC48 同源蛋白的氨基酸序列比对。拟南芥(*AtCDC48a*)、水稻(*OsCDC48*)、酵母菌(*ScCDC48*)、烟草(*NicDC48*)及人(*HsVCP*)。实线代表 2 个高度保守的 ATPase 结构域; Walker A 和 Walker B 基序分别用星号及箭头表示; B: CDC48 蛋白家族系统进化分析。由 DNAMAN 软件生成树状图

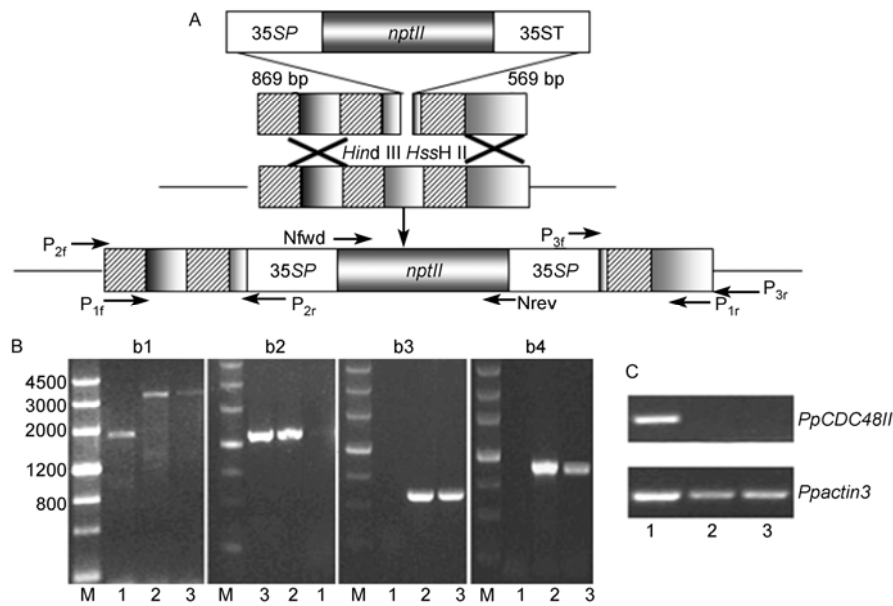


图 2 *PpCDC48II* 基因的敲除及突变体的分子鉴定

A: 用于 *PpCDC48II* 基因打靶的敲除片段的构建; B: 转化植株 PCR 检测. 引物 P_{1f} 和 P_{1r} 用于敲除片段的检测(b1); 引物 Nfwd 和 Nrev 用于突变株中 *NptII* 基因检测(b2); 引物 P_{2f} 和 P_{2r} 用于打靶位点 5' 的检测(b4); 引物 P_{3f} 和 P_{3r} 用于打靶位点 3' 的检测(b3); C: 突变体 RT-PCR 检测; 1: WT; 2 和 3: *Ppcdc48II* 突变体

2.3 *PpCDC48II* 在低温胁迫下的表达分析

CDC48 蛋白家族成员参与细胞内多种重要的生理活动. 结果发现, 低温 (0 °C) 能够诱导小立碗藓 *PpCDC48II* 基因的表达 (图 3A). 低温处理 24 h 后 *PpCDC48II* 的表达量开始上调, 36 h 后表达量变化明显, 72 h 达到最高点.

2.4 *PpCDC48II* 基因的定点敲除导致突变体冷驯化后抗冻性降低

为了阐明冷驯化能够提高小立碗藓的抗冻性, 首先对野生型和突变体的抗冻敏感性进行了验证, -6 °C 对其进行抗冻实验分析, 通过测定冷冻处理后茎叶体的电导率来反应其抗冻能力 (图 3B). 结果表明, 90 min 处于相对电导率的拐点位置, 突变体和野生型茎叶体由于未经冷驯化而发生较大的电解质泄漏. 然后对冷驯化后二者的抗冻性进行分析. 将生长 2 周的小立碗藓野生型和突变体茎叶体 (0 °C) 胁迫处理 0, 12, 24, 48 和 72 h 后, 转移到低温培养箱 (-6 °C) 冷冻 90 min, 4 °C 培养箱过夜, 第 2 天移栽到室温培养基上常规条件培养 2 天, 结果如图 3C 所示. 0 °C 驯化处理 0, 12 和 24 h 3 个时间点的 WT 和 *Ppcdc48II* 茎叶体在

经过 -6 °C 冷冻后, 基本上都被冻死, 呈黄色; 0 °C 处理 48 和 72 h 时间点的野生型 (WT) 和 *Ppcdc48II* 茎叶体在经过 -6 °C 冷冻后, WT 有大量存活下来, 呈绿色, 而 *Ppcdc48II* 茎叶体仍然无法恢复, 大量被冻死, 呈黄色.

测定上述实验恢复 2 天的 WT 和 *Ppcdc48II* 茎叶体的叶绿素含量 (图 3D), 48 和 72 h 2 个时间点 WT 中叶绿素含量明显高于 *Ppcdc48II* 中的含量, 进一步说明 *Ppcdc48II* 茎叶体的 *CDC48II* 基因被敲除后对低温的抗性明显低于 WT 茎叶体. 两种植株经过相同时间的冷驯化后, 野生型从驯化 24 h 后就获得了对 -6 °C 低温的抗性, 逐渐恢复存活下来, 而突变体则无法形成对 -6 °C 的抗性, 基本上没有存活. 电导率的测定结果也进一步证实, 低温驯化能够提高野生型茎叶体的抗冻性 (图 3E), 而突变体则由于 *PpCDC48II* 基因的缺失而丧失了这一抗逆性. 72 h, 0 °C 冷驯化后小立碗藓茎叶体抗冻性统计结果 (图 3F 和表 1) 显示, 在 -10 °C, WT 和 *Ppcdc48II* 的茎叶体都无法存活; 而在 -6 °C, 70% 的野生型茎叶体经驯化后能够存活, 而突变体的存活率仅为 10%. 这些实验结果说明, *PpCDC48II* 参与了小立碗藓冷驯化诱导的抗冻性途径.

3 讨论

基因打靶技术及 RNA 干扰技术的不断完善,加之小立碗藓基因组测序工作的完成,使小立碗藓有望成为植物功能基因组学研究的模式系统。众所周知,低温能够导致植物细胞在生理及生化方面发生反应,包括基因转录水平的调控、抗逆相关蛋白的积累、抗氧化物的增加以及代谢酶的活性调节等^[24-27]。

大量实验表明,低温诱导表达的亲水性蛋白,如 LEA 蛋白,在小立碗藓冷驯化诱导的抗冻过程中发挥了重要的功能^[28],这一特性与已报道的高等植物十分类似^[29,30]。因此,对受低温调控基因功能的研究将有利于更加全面深入的理解冷驯化机制。

本实验室在研究小立碗藓抗低温胁迫的基因筛选中发现, *PpCDC48* 的 EST 片段的转录水平变化很明显(未发表资料)。因此克隆了相关基因并命名为

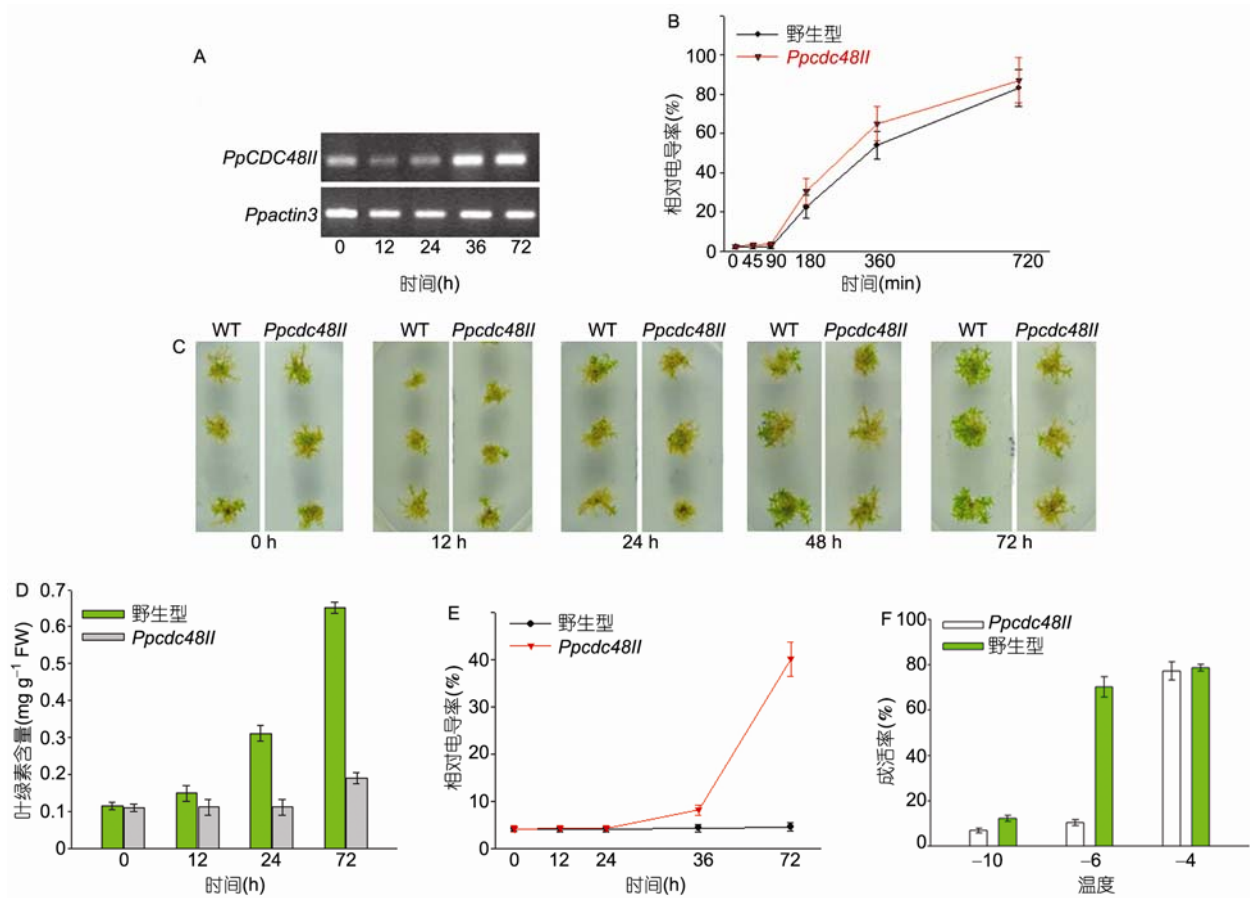


图 3 *Ppcdc48II* 突变体冷驯化后的冻害敏感表型

A: *PpCDC48II* 低温诱导表达特性。0℃处理 0, 12, 24, 48 和 72 h 后, 做 *PpCDC48II* 基因的半定量 RT-PCR, 以 *Ppactin3* 为对照; B: 小立碗藓 WT 和 *Ppcdc48II* 突变体-6℃处理后相对电导率的测定; C: 小立碗藓低温驯化后的冷冻抗性实验; D: 小立碗藓冷冻抗性实验后叶绿素含量测定; E: 低温驯化后, 小立碗藓 WT 和 *Ppcdc48II* 突变体-6℃处理后相对电导率的测定; F: 成活率统计。数据参照表 1, 统计数: 50 株

表 1 小立碗藓低温驯化后的冷冻抗性统计^{a)}

	<i>Ppcdc48II</i> 突变体		野生型	
	存活率(%) [#]	SD	存活率(%) [#]	SD
-4℃	77.30	0.042	78.60	0.014
-6℃	10.32	0.015	70.27	0.045
-10℃	6.91	0.011	12.31	0.013

a) SD: 标准方差; #: 实验重复次数为 3

PpCDC48II, 对其蛋白序列分析, 发现与其他物种的 CDC48p 有着很高的相似性, 具有 AAA 蛋白家族的保守序列特点(图 1A). *PpCDC48II* 的氨基酸序列与拟南芥、酵母菌和其他哺乳动物的 CDC48 同源物相比也非常保守, 尤其在蛋白质的核心部位(aa: 204~697)更加保守, 因此是 AAA 蛋白家族中的成员, 具有 AAA 蛋白的共有特点. 它含有依赖 Mg^{2+} 的 ATPase 结构域和 SRH 区. ATPase 的结果域具有 Walker A 和 Walker B 基序, 在结合 ATP 和水解 ATP 时具有重要作用. 一个 SRH 结构域则包含一个修饰的“sAT”基序和一个基本氨基酸标签基序(IIGATN...RPGRL), 这是在 DNA/RNA 解旋酶中常见的结构. 这些保守基序之间的序列, 也与众多依赖 DNA 的 ATPase 的 ABC 结构域相同, 再次说明它们在进化上都属于同一蛋白家族.

PpCDC48II 在 N 末端也有两个和拟南芥相同的核定位信号(KKDFSTAILERKK 和 KGKKRKD), 这对 CDC48 蛋白进入细胞核至关重要^[15]. 并且与 *AtCDC48p* 相同, 是可溶性蛋白, 无跨膜区域, 推测很可能与 *ScCDC48* 和 *VCP* 一样存在于核质和细胞质中. 此外, *PpCDC48II* 在核定位信号附近有一个与拟南芥类似的经过修饰的 cdk 磷酸化位点, 在 ATPase 结构域 II 的 Walker A 上游也有一个完全相同的 cdk 磷酸化位点[(S/T)PSK]. 以上特性暗示, *PpCDC48II* 很可能通过这些结构在特定的时间进入细胞核, 如 *AtCDC48* 及 *ScCDC48p*^[31,32], 参与细胞周期中调控蛋白质的功能.

CDC48p 是真核生物中普遍存在的一个细胞周期蛋白, 参与多种细胞内的生命活动, 如蛋白质降解、膜融合、细胞有丝分裂等活动. 自 1981 年 Moir 等人^[33]分离到对低温敏感的芽殖酵母菌 *cdc48* 突变体以来, 该蛋白便成为分子生物学的热点课题. 但对 CDC48 的研究主要集中在酵母菌细胞和动物中, 植物中的信息非常有限. 在拟南芥中, *AtCDC48* 在芽、根、花的伸长细胞以及生长点细胞中均高度表达, 免疫荧光标记显示 *AtCDC48* 主要定位在核区, 在胞质分裂过程中则定位在成膜体部位, 即新的细胞壁形成部位. 该基因缺失后, 突变体 *Atcdc48A* 表现为花粉管萌发和胚的发育缺陷^[18]. 最近有报道, 烟草的 *NgCDC48* 定位于内质网上并可能参与了泛素蛋白酶体介导的蛋白水解过程^[19].

为了证实 *PpCDC48II* 的功能, 通过同源重组技术将该基因定点敲除并获得了突变体(图 2). 将正常

培养 2 周的小立碗藓茎叶体经 -6°C 冷冻 90 min 后, 死亡细胞达 90%. 该结果说明, 未经低温驯化的小立碗藓为冻害敏感型植物(图 3B). 0°C 处理 48 和 72 h 时间点的野生型(WT)和 *Ppcdc48II* 茎叶体在经过 -6°C 冷冻后, WT 有大量存活下来, 呈绿色, 而 *Ppcdc48II* 茎叶体仍无法恢复正常生长, 大量被冻死, 呈黄色. 因此说明, 低温(0°C)处理能够显著提高小立碗藓的冻害抵御能力. 而突变体由于 *PpCDC48II* 基因的缺失, 使其失去对低温的抗性, 同时在冷处理的小立碗藓中, *PpCDC48II* 呈现出诱导表达的特性(图 3A), 表型和生理实验都进一步说明, *PpCDC48II* 在小立碗藓低温诱导的抗寒过程中发挥重要作用. 据报道, 石斑鱼中的 CDC48 也具有相同的特点, 可能在冷驯化下被转录因子调控参与细胞增殖和细胞周期^[4]. 研究表明, CDC48 的功能集中在各种生物的细胞周期中, 如酵母菌、拟南芥、小鼠和人^[15,31,34,35]. 根据冷敏感酵母菌突变体的研究, 发现酵母菌 *cdc48* 突变株细胞分裂停滞在出芽阶段, 细胞核在母细胞和子细胞之间拉伸连接着, 没有正常分裂开, 微管由未复制或未分离的纺锤极体发出, 异常地分布于细胞质中^[31]. 因此, 在低温下酵母菌的 CDC48 在 M 期发挥了重要的作用. 而且这些突变体的表型与核膜和内质网膜的膜融合缺陷突变体的表型一致.

此外, 大量文献报道 CDC48 与细胞凋亡的调控密切相关^[35-38]. CDC48 作为分子伴侣^[39], 参与将 ER 错误折叠的蛋白运往蛋白酶体降解掉的过程, 它能够在没有协同因子的作用下, 发挥分子伴侣的功能, 区分开自身蛋白和外源蛋白^[39]. 一些研究已经发现, *p97/Cdc48* 与泛素/蛋白体的蛋白降解途径有着密切的联系^[12]. 近年来, 在植物中也发现定位于内质网的烟草 *NgCDC48* 可能参与了泛素介导的蛋白水解过程^[19]. 本实验室构建了小立碗藓配子体冷胁迫的 SSHcDNA 双向文库, 并利用 cDNA-AFLP 方法从经过 0°C 冷驯化处理的小立碗藓中筛选到大量差异表达基因片段. 结果表明, 泛素系统在冷驯化过程中起重要作用. 且细胞周期调控蛋白 *PpCDC48* EST 片段在冷胁迫后的转录表达量变化明显. 因此推测, 冷处理后, 小立碗藓的 CDC48 上调, 其蛋白伴侣的功能活性增强, 也许可以识别在冷胁迫下产生的那些对植物体有害的错误折叠的异常蛋白, 从而在其他因子的协同下, 将异常的蛋白降解掉, 防止细胞在冷胁迫下过早凋亡. 敲除掉 *PpCDC48II* 的突变体植株, 正常条件下,

生长发育状况与野生型一致, 说明该基因对小立碗藓细胞分裂及发育不是必要条件. 但由于缺少了 CDC48 的作用, 从表型上看, 抗冻性明显没有野生型好; 叶绿素含量测定结果同样显示, 相同冷冻条件处理后的突变体的叶绿素含量明显低于野生型, 说明其活性的大幅度丧失. 生理指标相对电导率测定

结果也与其完全一致. 这些实验结果再次说明, 小立碗藓 *PpCDC48 II* 在冷驯化诱导的抗冻机制中发挥着重要作用. 推测突变体由于不能够及时降解冷冻环境下产生的错误蛋白, 导致错误折叠的蛋白稳定存在于内质网腔中而不被水解, 从而破坏小立碗藓的抗冷冻机制及代谢机理, 引起细胞凋亡.

参考文献

- 1 Reski R. *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 209–210
- 2 Schaefer D G. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 143–150
- 3 Anzu M, Manabu N, Keita A, et al. Absciscic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J Plant Physiol*, 2003, 160: 475–483
- 4 Shintaro I, Nobuhiko O, Michiaki Y. Cold-inducible expression of the cell division cycle gene *CDC48* and its promotion of cell proliferation during cold acclimation in zebrafish cells. *FEBS Lett*, 2003, 549: 14–20
- 5 Hirsch C, Gauss R, Horn S C, et al. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*, 2009, 458: 453–460
- 6 Vembar S S, Brodsky J L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 944–957
- 7 Ramadan K, Bruderer R, Spiga F M, et al. Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature*, 2007, 450: 1258–1262
- 8 Halawani D, Latterich M. p97: The cell's molecular purgatory? *Mol Cell*, 2006, 22: 713–717
- 9 Janiesch P C, Kim J, Mouysset J, et al. The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97 links myosin assembly to human myopathy. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 379–390
- 10 Alexandru G, Graumann J, Smith G T, et al. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell*, 2008, 134: 804–816
- 11 De Bose-Boyd R A. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res*, 2008, 18: 609–621
- 12 Ye Y. Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J Struct Biol*, 2006, 156: 29–40
- 13 Sookhee P, David M R, Sebastian Y B. In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol*, 2008, 148: 246–258
- 14 Rancour D M, Dickey C E, Park S, et al. Characterization of AtCDC48. Evidence for multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1241–1253
- 15 Feiler H S, Desprez T, Santoni V, et al. The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO J*, 1995, 14: 5626–5637
- 16 Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, et al. GENEVESTIGATOR: *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2621–2632
- 17 Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W. Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 407–409
- 18 Sookhee P, David M R, Sebastian Y B. In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol*, 2008, 148: 246–258
- 19 Hansol B, Soo M C, Seong W Y, et al. Suppression of the ER-localized AAA ATPase NgCDC48 inhibits tobacco growth and development. *Mol Cells*, 2009, 28: 57–65
- 20 Ashton N W, Cove D J, Featherstone D R. The isolation and physiological analysis of mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*, 1979, 144: 437–442
- 21 Minami A, Nagao M, Arakawa K, et al. Absciscic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J Plant Physiol*, 2003, 160: 475–483
- 22 Porra R J, Thompson W A, Kriedemann P E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA-Bioenergetics*, 1989, 975: 384–394

- 23 Nishiyama T, Fujita T, Shin I T, et al. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophyte transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8007–8012
- 24 Pearce R S. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul*, 1999, 29: 47–76
- 25 Thomashow M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 571–599
- 26 Xin Z, Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ*, 2000, 23: 893–902
- 27 Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 2001, 13: 61–72
- 28 Anzu M, Manabu N, Keiichi I, et al. Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta*, 2005, 220: 414–423
- 29 NDong C, Danyluk J, Wilson K E, et al. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1368–1381
- 30 Hara M, Terashima S, Fukaya T, et al. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dihedron in transgenic tobacco. *Planta*, 2003, 217: 290–298
- 31 Fröhlich K U, Fries H W, Rudiger M, et al. Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol*, 1991, 114: 443–453
- 32 Petek B, Aysun P, Fadime A K. Different p97/VCP complexes function in retrotranslocation step of mammalian Er-associated degradation (ERAD). *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43: 613–622
- 33 Moir D, Stewart S E, Osmond B C, et al. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Cell*, 1982, 100: 547–563
- 34 Shirogane T, Fukada T, Muller J M, et al. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity*, 1999, 11: 709–719
- 35 Müller J M, Deinhardt K, Rosewell L, et al. Targeted deletion of p97 (VCP/CDC48) in mouse results in early embryonic lethality. *BBRC*, 2007, 354: 459–465
- 36 Wu D, Chen P J, Chen S, et al. *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development*, 1999, 126: 2021–2031
- 37 Ralf J B, Hans Z. Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death—from yeast apoptosis to human disease. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783: 1418–1435
- 38 Rati V, Robert O, Ruihua F, et al. Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA pol II. *Molecular Cell*, 2010, 41: 82–92
- 39 Yeung H O, Kloppsteck P, Niwa H, et al. Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36: 62–72