

bHLH 转录因子的磷酸化调控植物生理功能的研究进展

刘钺霞 孙宗艳 罗云波 朱鸿亮 曲桂芹

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: bHLH 转录因子是植物体内第二大类转录因子, 在植物生长发育和胁迫反应的转录调控网络中扮演着非常重要的角色。磷酸化作为蛋白质翻译后重要的调控方式, 影响转录因子的转录活性、定位、蛋白间互作、稳定性。为深入了解磷酸化对 bHLH 转录因子的影响, 本文对近年来 bHLH 家族成员的磷酸化研究进展进行综述, 包括 bHLH 转录因子的结构、分类、功能以及磷酸化位点上的突变对其生理及生化功能的改变, 为从磷酸化调控角度提升农作物的营养利用效率、品质和抗逆性等农艺性状提供理论依据。

关键词: 碱性螺旋-环-螺旋转录因子; 磷酸化; 生理功能

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-0775

Multifaceted Roles of bHLH Phosphorylation in Regulation of Plant Physiological Functions

LIU Cheng-xia SUN Zong-yan LUO Yun-bo ZHU Hong-liang QU Gui-qin

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: bHLH (basic Helix-Loop-Helix) is the second largest class of transcription factors in plants and plays an important role in the transcriptional regulatory network of plant growth and development and stress responses. Protein phosphorylation as a quick and flexible posttranslational modification affects the transcriptional activity, localization, protein interaction and stability of transcription factors. To understand the multifaceted roles of bHLH phosphorylation, here we review recent advances in the phosphorylation of bHLH family members, including the structure, classification, and function of the bHLH transcription factors, as well as the changing of their physiological and biochemical function caused by mutations at the phosphorylation sites, aiming to provide theoretical basis for improving agronomic traits such as nutrient use efficiency, quality and stress tolerance from the perspective of phosphorylation regulation.

Key words: transcription factor bHLH; phosphorylation; physiological function

转录因子是一类具有特殊序列、能够与其靶基因 5' 端上游特定序列特异性结合的蛋白质分子。它通过和基因启动子区域的顺式作用元件互作, 调控该基因的转录, 从而对目的基因的表达起到增强或者抑制的作用。

植物体内众多的转录因子调节植物多个层级的发育及抗性反应。近年来, 有关转录因子在植物

发育或者胁迫反应中的调控网络研究为我们提供了全面清晰的研究进展, 比如在呼吸跃变型果实成熟调控上, 存在 3 种转录反馈回路通过激活乙烯合成的相关基因促进成熟, 包括番茄果实中的 MADS-RIN 型反馈回路, 桃果实中的心皮衰老转录因子代替 MADS 的 NAC 型回路以及香蕉中 NAC 和 MADS 型双环回路^[1]。一些 bHLH 利用不同调节机制参

收稿日期: 2022-06-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31672207, 31972128)

作者简介: 刘钺霞, 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬采后生理与分子生物学; E-mail: 18817515889@163.com

通讯作者: 曲桂芹, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬采后生理与分子生物学; E-mail: qugq@cau.edu.cn

与植物盐胁迫反应,如怪柳(*Tamarix hispida*)中的ThbHLH1通过增加超氧化物歧化酶和过氧化物酶的活性增强对高盐的抗性^[2];拟南芥中的bHLH转录因子AtMYC2通过结合脯氨酸生物合成限速酶P5CS1的启动子调控脯氨酸的合成提高植物耐盐性^[3]。

随着研究的深入,转录因子的翻译后调控和表观调控受到越来越多的关注。磷酸化作为翻译后共价修饰的重要模式,在蛋白激酶/蛋白磷酸酶的可逆催化下,通过磷酸化/去磷酸化调节转录因子的亚细胞定位、稳定性、DNA结合活性以及转录活性,广泛参与植物的生长发育、胁迫应答以及信号传导等过程^[4-6]。蛋白激酶将ATP或者GTP上的 γ 位磷酸基团转移到目标蛋白中特定的氨基酸如丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)或者酪氨酸(Tyr, R)的羟基上。磷酸蛋白组学数据表明,丝氨酸是植物中最为常见的磷酸化残基,发生磷酸化概率为80%-85%;而苏氨酸和酪氨酸的磷酸化频率分别为10%-15%及0%-5%^[7]。其中,丝裂原活化蛋白激酶MAPK(mitogen-activated protein kinases)级联系统介导的转录因子的磷酸化/去磷酸化广泛参与植物激素合成、转运、植物免疫等过程,例如拟南芥的乙烯响应因子AtERF104(ethylene response factor 104)的活性受到AtMPK6磷酸化调控,稳定性变弱,使得AtMPK6-AtERF104复合物响应乙烯信号参与细菌鞭毛蛋白flg22解离,增强对细菌病原体的易感性^[8];此外,AtMPK3/6通过磷酸化转录因子AtWRKY33激活植保素生物合成基因的转录进而增强对坏死性真菌*Botrytis cinerea*的免疫能力^[9]。

bHLH转录因子是真核生物中广泛存在的一类重要转录因子,它通过与启动子上的特定基序结合调控靶基因的转录,从而调节植物的多种发育和代谢过程,如光形态建成、诱导开花、避荫和次生代谢产物的生物合成^[10]。植物体内不同种类的蛋白激酶可以磷酸化bHLH,通过影响bHLH的亚细胞定位、稳定性以及转录活性,进而调控植物的不同生理生化功能。

为深入了解磷酸化对bHLH转录因子的影响,本文对近年来bHLH家族成员的磷酸化研究进展进行综述,包括bHLH转录因子的结构、分类、功能

以及磷酸化位点上的突变对其生理及生化功能的改变,为从磷酸化调控角度提升农作物的营养利用效率、品质和抗逆性等农艺性状提供理论依据。

1 bHLH 转录因子概述

碱性螺旋-环-螺旋bHLH(basic helix-loop-helix)转录因子是植物第二大类转录因子。bHLH蛋白具有DNA结合和二聚化的能力,属于一种常见的转录因子家族,它在植物种子萌发,心皮、花药、表皮细胞、气孔和果实的发育等生长发育过程^[11-12],黄酮、花青素等次级代谢产物的生成^[13]以及在干旱、盐、低温胁迫等抗逆反应中发挥着重要作用^[14]。

1.1 bHLH转录因子结构

bHLH结构域包含60个氨基酸,两个功能域即basic结构域和HLH结构域^[15]。basic结构域含有15个氨基酸,6个碱性残基,位于结构域的N端,能够识别并特异性结合下游靶基因启动子区的E-box(5'-CANNTG-3')或G-box(5'-CACGTG-3')元件^[16];C端的HLH区域含有2个两亲性的 α 螺旋,且由一个长度可变的环区隔开。该区域可以与其他bHLH转录因子形成同型或者异型二聚体,因此bHLH常以二聚体的形式行使功能^[17]。

1.2 bHLH转录因子分类及功能

动物的bHLH转录因子家族根据它们的进化关系、DNA结合基序以及一些功能上的特性被分成6个主要类群,而植物中bHLH家族的分类借鉴于动物的分类也日趋完善。系统发育分析表明,植物bHLH蛋白由26个亚族组成^[18],其中20个亚族存在于苔藓和维管植物的共同祖先中。

通过对拟南芥基因组序列的分析,可以将162个bHLH编码基因按照它们的亲缘关系分为12个亚族^[19]。通过正向和反向遗传学的方法,拟南芥中大多数bHLH蛋白的功能已经得到鉴定,包括调控果实开裂、花药和表皮细胞发育、激素信号传导以及应激反应^[20]。水稻和白菜基因组中分别鉴定出了167和230个bHLH转录因子,被分为22和24个亚族,主要功能包括参与胁迫反应与信号传导,花色苷代谢调节以及光形态发生^[21-22]。

相较于拟南芥,番茄中的bHLH基因功能的挖

掘还处于起始阶段。Sun 等^[23]对番茄中的 *bHLH* 基因进行了广泛分析,共鉴定出 159 个 *bHLH* 型转录因子,可分为 21 个亚族。现已有研究证明Ⅱ亚族的 SlbHLH22 能够增加果实对乙烯的敏感性且可诱导类胡萝卜素、番茄红素等的积累进而促进番茄果实成熟^[24];此外,Ⅱb(2)亚族的 SlbHLH68 可以通过与 FER 的相互作用参与番茄体内的铁稳态调节^[25]。

2 *bHLH* 磷酸化调控植物生长发育和胁迫反应

固着在地面上的植物会受到各种外界生物及非生物因素的胁迫,为维持正常的生长发育,植物体进化出了快速并且能够精准应对环境变化的机制。来自细胞外的各种刺激信号会被位于植物细胞壁上的受体样蛋白 RLPs (receptor-like proteins) 或者受体样蛋白激酶 RLKs (receptor-like protein kinases) 感知并识别到,由此引发植物体内一系列的信号传递反应,最终将刺激传递给细胞核中的转录因子,从而快速应对逆境以最大可能地减少损耗。这种机制在植物的生长发育及胁迫反应过程中发挥着举足轻重的作用。

2.1 *bHLH* 磷酸化调控植物生长发育

2.1.1 SPCH (*bHLH* Ia 亚族) 磷酸化影响气孔分化 气孔是植物特有的表皮结构,是植物进行光合作用、蒸腾作用所必需的结构。拟南芥气孔发育需要分泌肽配体如表皮生长因子 (EF1、EF2、CHALLAH、stomagen) 的参与,同时需要 TMM (too many mouths) 及 ERECTA 等受体接收相关信号^[26]。这些信号通过丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 包括 YDA (yoda)、MKK4/5/7/9、MPK3/6 等级联传导。如果传递中间环节功能丧失,气孔发育则会出现异常,表现为气孔数目增多、产生额外的不对称分裂。

SPCH (SPEECHLESS)、MUTE 和 FAMA 三个 *bHLH* 转录因子在气孔发育谱系起始、增殖及末端发育过程中非常重要^[27]。SPCH 属于转录因子 *bHLH* Ia 亚族,拟南芥中 MAPK 介导的磷酸化导致 SPCH 活性降低或者 SPCH 蛋白降解,进而抑制气孔发育;而缺少 MAPK 靶定结构域 (MPKTD) 的 SPCH 突变体则导致过量气孔产生^[28]。此外,SPCH 还受到细胞周期蛋白依赖性激酶 A; 1 (CDKA; 1) 的

磷酸化调控,SPCH 的 186 丝氨酸位点是其主要的磷酸化靶点,用丙氨酸取代该位置的丝氨酸不能弥补突变体的气孔缺陷,而在野生型背景下产生模拟磷酸化突变体 *SPCH*^{S186D},其中 186 丝氨酸被天冬氨酸取代,结果显示 40% 的 *35Spro: SPCH*^{S186D} 转基因株系气孔密度增加,可见 SPCH186 残基的磷酸化对气孔形成至关重要^[29]。

2.1.2 FIT (*bHLH* III a 亚族) 磷酸化影响植物对铁的获取 铁是一种非常重要的矿质元素,参与植物各种营养代谢途径,铁的摄取量与作物产量息息相关^[30]。但土壤中的铁大多不可溶,不能被生物利用。植物必须先将土壤中的铁转变为可利用的离子形式,然后方可通过根部吸收^[31]。植物对铁的获取有两种模式,一种是通过三价铁还原氧化酶 (FRO2) 将三价铁离子还原为二价铁离子,然后被铁调节转运蛋白 1 (IRT1) 吸收;另一种是通过植物体内的铁载体对三价铁离子进行螯合来介导对铁的吸收。*FRO2*、*IRT1* 及其他许多铁缺乏诱导的基因受到 *bHLH* III a 亚族 FIT (fer-like iron deficiency-induced transcription factor) 的转录调控^[32]。

钙调磷酸酶 B 样蛋白 CBL (calcineurin B-like protein) 相互作用激酶 11 (CIPK11) 能够磷酸化激活 FIT,丝氨酸 272 是拟南芥 FIT 的关键磷酸化位点,其磷酸化对 FIT 在细胞核中的定位、FIT 与 *bHLH039* 的相互作用以及激活 FIT 的靶标非常重要^[33]。为了进行功能性 FIT 磷突变体活性测试实验,Gratz 等^[34]对拟南芥 FIT 蛋白 221、272 位上的丝氨酸及 238、278 位上的酪氨酸进行磷酸化突变,产生了两种 FIT 磷酸化状态的突变体,一种将丝氨酸 S 突变为丙氨酸 A、酪氨酸 Y 突变成苯丙氨酸 F 得到磷酸化死亡突变体,另一种将丝氨酸 S 或者酪氨酸 Y 突变为谷氨酸 E 得到磷酸化模拟突变体。8 种磷酸化突变体 (*FIT*^{S221A}、*FIT*^{S221E}、*FIT*^{S221E+SS271AA}、*FIT*^{SS271/2AA}、*FIT*^{Y238F}、*FIT*^{Y238E}、*FIT*^{Y278F}、*FIT*^{Y278E}) 对 FIT 的调节特性及细胞活性产生影响的测试实验表明,丝氨酸和酪氨酸的磷突变体以相反的方式影响 FIT 转录因子活性,即 FIT 的 C 端中丝氨酸磷酸化激活 FIT,而酪氨酸的磷酸化减弱 FIT 的转录活性。

此外,FIT 的磷酸化还会影响其异源二聚化的能力^[33]。*bHLH039* 是Ⅱb亚族中铁缺乏反应的标记

基因,在高铁环境中,Ib 亚族 bHLH038/039/100/101 可与 FIT 形成异源二聚体,异二聚化增强了 FIT 的蛋白转录活性并能诱导下游靶基因如 *FRO2* 及 *IRT1* 的表达^[35],进而增强了上述第一种模式中 *FRO2* 及 *IRT1* 参与的植物对铁的获取能力。在上述突变体实验中,*Y278E* 突变导致 FIT-bHLH039 异二聚体减少,FIT 下游反应受到影响,因此 bHLH 的磷酸化状态改变了异源二聚化的能力,影响植物对环境中的铁的吸收。

2.1.3 PIF (bHLH VIIa 亚族) 的磷酸化状态影响植物光反应 植物通过光敏色素感知红光或者远红光,实时监测光信号的变化来及时调整植物的生长发育如种子萌发、开花及下胚轴伸长等。拟南芥中共有 5 种光敏色素 (phyA-E),其中 phyA 和 phyB 在介导光反应中的作用最为显著^[36]。PhyA 在暗生幼苗中含量丰富,在光下幼苗去黄化过程中发挥重要作用;phyB 在光下更稳定,能够抑制长期连续红光下的下胚轴伸长。暗生幼苗中新合成的光敏色素以非活性红光吸收型 Pr (phytochrome red light) 形式存在,主要存在于胞质中。而一旦暴露在光下,感光细胞中的光敏色素会被转化成活性远红光吸收型 Pfr (phytochrome far-red light) 形式并转移到细胞核中行使功能^[37]。光敏色素互作因子 PIFs (phytochrome interacting factors) 属于 bHLH VIIa 亚族成员,它通过抑制光形态建成和在黑暗中维持黄化幼苗的暗形态发生状态而作为光响应的负调节因子^[38]。不同的 PIF 能够与其他 PIFs 相互作用,共同调节种子萌发、光合作用以及整合光与生物钟信号。例如,PIF1 能够与 Groucho (Gro) /Tup1 转录共抑制子家族成员 LUH (LEUNIG-HOMOLOG)^[39] 及 bHLH 家族 VII (a+b) 亚族转录因子 HFR1 (long hypocotyl in far-red 1)^[40] 结合,通过调节脱落酸和赤霉素相关基因的表达来调节种子萌发;PIF3 与 HDA15 (histone deacetylase 15) 相互作用,通过减少组蛋白乙酰化和 RNA 聚合酶 II 相关转录抑制靶基因的表达,从而参与色素的生物合成^[41]。

当暴露在光下时,光敏色素通过快速磷酸化、泛素化和蛋白酶体介导的降解促进 PIFs 的更新,抑制 PIFs 诱导转录重编程的功能,导致光形态发育^[42]。研究表明,phyB 和 phyD 能够磷酸化 PIF3^[43]。Ni 等^[44]

把拟南芥 PIF3 中第 58、88、102、151 以及 152/153 位点上的丝氨酸 S 突变为天冬氨酸 D 得到磷酸化模拟突变体,发现在黑暗中 *PIF3-D6* 能够通过泛素/26S 蛋白酶体途径被降解,稳定性变弱。将突变体放置在黑暗条件下 4 d,其下胚轴长度和野生型相比没有差异,但连续红光条件下 *PIF3-D6* 的下胚轴长度高于野生型。同时发现光可以通过诱导其他磷酸化位点上更多丝氨酸的磷酸化来增加这种降解的速率,这些结果说明 PIF3 的磷酸化程度以及速率受到光的调控,而磷模拟突变体下胚轴更长的表型只有在光下才能表现出来。遮光能诱导 PIF7 的快速去磷酸化,导致其与生长素生物合成基因启动子中的 G-box 结合,引起生长素水平的增加以及幼苗的快速生长^[45]。

目前已研究几种作用于 PIF 的激酶,比如光敏色素本身、PPKs (photoregulatory protein kinases) 以及 SPA1 (suppressor of phyA-105 1),但尚不清楚它们是否以光依赖的方式催化 PIF 磷酸化^[41, 43]。目前,SPA1 可能是介导光诱导 PIF 磷酸化最有效的激酶。SPA1 与 PIF1 和 phyB 都相互作用,并且 SPA1-PIF1 的相互作用在体外被 Pfr 形式的 phyB 特异性地增强。更具说服力的是 SPA1 中的 *R517E* 突变降低了其在体外磷酸化 PIF1 的能力,也延迟了其响应红光促进该 PIF 在体内磷酸化和降解的能力^[46],至此证明 PIF 能够被激酶磷酸化而不是简单地依靠响应光敏色素来完成磷酸化,但是 SPA1 如何介导光诱导的 PIF 磷酸化以及这种双重响应机制是否对植物生长有影响还需要进一步的研究。

2.2 bHLH 磷酸化调节植物耐冷性

低温会影响植物的生长、发育、生产力和生态分布。冷刺激诱导 CBF (C-repeat binding factor) 的表达,进而激活下游抗冻性所需的 2 000 多个冷反应基因的表达^[47]。CBF 的表达受到 ICE1 (inducer of CBF expression 1) 的调控。在拟南芥整个 bHLH 家族中 ICE1 被编号为 bHLH116,属于 bHLH III b 亚族^[48]。ICE1 在冷胁迫条件下调节 CBFs 基因的表达,且其稳定性对 CBFs 的功能至关重要。冷激活的 MPK3/6 磷酸化 ICE1 蛋白以降低其稳定性和转录活性,从而负调节对冷的耐受性,而 MPK4 抑制 MPK3/6 的活性,正调控 ICE1 活性^[49-50]。ICE1 蛋

白的氨基酸序列中有 6 个潜在的 MAPK 磷酸化位点, 包括 S94、S203、T366、T382、T384 以及 S403, 将这 6 个位点上的氨基酸突变至丙氨酸后会影响 ICE1 在抗冻性中的功能。Li 等^[49]利用拟南芥的转基因株系来研究 ICE1 中不同磷酸化状态的抗冻性功能差异, 存活率统计结果发现野生型 ICE1 和磷酸化死亡突变体 *ICE1*^{6A}-GFP 能够提高抗冷性功能缺陷突变体 *ice1* 对冷冻的耐受性, 而磷酸化模拟突变体 *ICE1*^{6D}-GFP 不具备这种功能, 说明 MPK3/6 介导的 ICE1 磷酸化减弱了它在冷信号传导中的功能。而 ICE1 磷酸化状态影响水稻抗冷性的结果刚好相反, *OsMAPK3* 的过表达导致 bHLH002 磷酸化和耐冷性的增强。而用丙氨酸分别取代不同位置上的丝氨酸/苏氨酸得到磷酸化死亡突变体 (*bHLH002*^{T404A}、*bHLH002*^{T406A}、*bHLH002*^{S407A}、*bHLH002*^{T412A} 和 *bHLH002*^{S433A}), 此时突变体的耐冷性功能丧失, 说明 *OsMAPK3* 介导的 *OsbHLH002* 磷酸化增强了它在冷信号传导中的功能^[51]。除了 MAPK 外, ABA 信号通路中重要的丝/苏氨酸蛋白激酶 OST1 (open stomata 1) 也能被冷胁迫激活后磷酸化 ICE1, 抗冷性增强, 且突变体 *ICE1*^{S278D} 的稳定性和转录活性也显著增强^[52]。

3 茉莉酸信号通路中核心转录因子 MYC2 的磷酸化调控

目前, bHLH 转录因子家族中有 4 个亚族 (bHLH III e、bHLH III d、bHLH III f 及 bHLH III b 亚族) 和茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 信号转导有关^[53]。其中, bHLH III e 亚族正向调控茉莉酸反应, 而 bHLH III d 负向调控茉莉酸反应。MYC2 属于 bHLH III e 亚族, 它是茉莉酸信号的中央调控因子, 参与了大多数与茉莉酸相关的生物化学反应, 例如根系生长抑制、黄酮类化合物和硫代葡萄糖苷的产生以及对食草动物和病原体的防御等。

3.1 MYC2 在茉莉酸信号通路中的调控作用

MYC2 是一种调节茉莉酸反应不同方面的碱性螺旋-环-螺旋 bHLH III e 家族的转录因子^[54]。作为茉莉酸信号转导过程中的核心转录因子, 它能够整合环境信号调节茉莉酸防御和植物生长, 因此 MYC2 的活性受到不同层面的调控。在茉莉酸介导的信号转导过程中, E3 泛素连接酶的 F-box 蛋白受

体 COI1 (coronatine-insensitive 1) 识别并感知到茉莉酸的活性形式——茉莉酸与异亮氨酸 (isoleucine, Ile) 结合体 JA-Ile^[55]。JA-Ile 能够刺激 COI1 和 JAZ (jasmonate zim domain) 蛋白之间的相互作用, 使得 JAZs 降解, 减轻对 MYC2 的抑制作用。MYC2 介导的 JA 依赖性转录激活需要募集转录共激活因子 MED25 亚基^[56], 其能在 MYC2 靶基因的启动子上与 MYC2 相互作用, 并在激素诱导的 MYC2 激活途径中发挥多重作用, 例如在激素诱导后, MED25 与表观遗传调控子 HAC1 (histone acetyltransferase of the CBP family 1) 相互作用, 选择性调节 MYC2 靶启动子的 H3K9 乙酰化^[57]。ChIP-seq 分析表明茉莉酸处理后, MYC2 可以通过靶向茉莉酸生物合成基因 *LOX2*、*LOX3*、*LOX4*、*LOX6* 和 *AOS* 直接调节茉莉酸的生物合成, 或通过与 AP2-ERF (apetala 2/ethylene responsive factor) 家族中转录因子 ORA47 (octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain transcription factor 47) 的结合间接调节茉莉酸生物合成。此外, MYCs 能够靶向各种负调节因子, 使 MYCs 能够有效抑制茉莉酸反应模式, 防止茉莉酸信号的过度激活^[58]。例如, 番茄中的 SIMYC2 可以通过激活 bHLH III d 亚族成员 SIMTB1 (SIMYC2-targeted bHLH1), 破坏 MYC2-MED25 复合物的形成, 从而终止 JA 信号, 抑制茉莉酸过度反应^[59]。

3.2 MYC2 磷酸化调控的分子机制

MYC2 作为茉莉酸信号通路中的下游核心调控因子, 近年来其在茉莉酸信号传递和植物防御方面的磷酸化研究进展得到较多关注。

3.2.1 MYC2 磷酸化影响蛋白稳定性 MYC2 的转录活性除了受到茉莉酸信号通路上游抑制因子 JAZs 的调控, 还会受到其他因素的影响^[60]。其中, MYC2 蛋白的稳定性是影响其活性的重要因素之一。MYC2 蛋白的稳定性受到光质、生物钟^[61]以及磷酸化^[62]的调节。

Zhai 等^[63]研究发现 MYC2 蛋白在茉莉酸处理后呈现动态变化, 结合遗传学、分子生物学上的分析技术, 发现 MYC2 的磷酸化导致其稳定性下降, 导致其下游茉莉酸响应基因转录的改变, 进而影响茉莉酸介导的生理反应。为了找出 T328、S330、

S334 和 T336 这 4 个磷酸化位点对植物生理功能的影响, 将位点上的丝氨酸或苏氨酸突变成丙氨酸得到磷酸化缺陷植株。茉莉酸诱导的根生长抑制实验表明, 在外源施加 20 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸后, 野生型根的生长明显受到抑制, 而 *MYC2*^{T328A}-4*myc-23* 突变体表现出茉莉酸不敏感, 证明 T328 确实是 MYC2 中有功能的磷酸化位点。用茉莉酸甲酯处理 MYC2 过表达植株和 *MYC2*^{T328A} 的幼苗后检测蛋白表达发现, *MYC2*^{T328A} 植株中处理前后 MYC2 的蛋白水平高于过表达植株; 进而利用蛋白质合成抑制剂环己亚胺 CHX (cycloheximide) 处理 (CHX 能够抑制新积累的蛋白质合成), 发现 MYC2 过表达植株中的 MYC2 蛋白积累减少, 而 *MYC2*^{T328A}-4*myc-23* 幼苗中蛋白质积累未减少, 这些现象证明了 *MYC2*^{T328A} 突变使得融合蛋白更加稳定, 即 T328 的磷酸化促进了 MYC2 蛋白的水解。研究者通过检测 MYC2 下游靶基因 *LOX2* 的表达水平发现, 茉莉酸甲酯诱导的 MYC2 过表达幼苗中 *LOX2* 的表达水平比野生型幼苗显著增加, 而 *MYC2*^{T328A} 突变体幼苗中 *LOX2* 与功能缺陷植株 *myc2* 幼苗中的表达水平相当, 由此可见 T328 位点上的磷酸化确实促进了 MYC2 蛋白功能的行使, 进而促进茉莉酸响应相关基因的转录。

3.2.2 磷酸化 MYC2 激酶的研究进展 MYC2 的活性及其功能的行使依托磷酸化位点上氨基酸的磷酸化, 但具体哪些激酶能够调控 MYC2 的磷酸化, 研究者一直希望能找到答案。

2018 年, Guo 等^[64]发现 MYC2 在体内可以被 FERONIA 受体样激酶 (FER) 磷酸化, 并且在突变体 *fer* 中 MYC2 的磷酸化程度比在野生型中弱。将 MYC2 第 12 位上的丝氨酸突变为丙氨酸, 发现该位点突变使得 MYC2 蛋白更加稳定, 表现为 *MYC2*^{S12A} 突变在体内的磷酸化程度降低, 且 *MYC2*^{S12A}-FLAG 在 Phos-tag 胶上的移位非常小。为了进一步检验 *MYC2*^{S12A} 突变对其功能上的实现是否造成影响, 比较了 50 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸处理的 *MYC2*^{S12A} 转基因株系中的根长, 发现与野生型相比, *MYC2*^{S12A} 表现出了对茉莉酸更高的敏感性, 即磷酸化死亡突变体的根部在 JA 处理后能够变得更短, 排除了突变会导致 MYC2 功能障碍的可能性。以上结果证明 FER 对 MYC2 的磷酸化至少是 MYC2 不稳定的部分原因。

MYC2 作为 JA 信号中重要的 bHLH 家族转录因子成员, 翻译后的调控是其行使功能的重要方式。除 FER 激酶之外, 是否还有其他激酶对 MYC2 具有磷酸化作用, 或者 MYC2 是否还受到乙酰化、泛素化的调控, 值得后续研究。

4 展望

近年来 bHLH 磷酸化的研究, 展示了其在植物生长发育和胁迫反应中精细而复杂的调控机制。bHLH 大家族中除了上述几种研究较为深入的转录因子之外, 其他亚族的 bHLH 成员也受到磷酸化的调控, 比如拟南芥 XV 亚族 bHLH 蛋白 PRE1 (paclobutrazol-resistance1) S67 位点突变为谷氨酸显著降低了 PRE1 对细胞伸长的促进作用, 减弱了诱导后续细胞伸长相关基因表达的能力^[65]。bHLH 其他成员是否以及如何受到磷酸化调控、磷酸化之后功能如何改变仍需进一步详细且深入地探究。因此, 拓展 bHLH 家族成员磷酸化后参与的植物生理过程, 深入解析 bHLH 家族的调控网络以及与其他信号的串扰仍然是该领域重要的研究方向。

磷酸化作为蛋白质重要的翻译后调控方式, 影响转录因子的转录活性、定位、蛋白间互作及稳定性。磷酸化在泛素化降解信号通路中作用重大, 很多泛素化底物先要被磷酸化才会被 E3 泛素连接酶识别, 从而诱导蛋白质降解, 但是 bHLH 的磷酸化和泛素化之间的影响机制尚未完全明晰。目前对于泛素连接酶调节 bHLH 稳定性^[66-68]的研究较多, 对 bHLH 磷酸化如何激活泛素连接酶的研究比较少。其中, 如下几个方面: (1) bHLH 磷酸化会调节哪些泛素连接酶的活性? (2) bHLH 磷酸化是通过影响泛素化单位对磷酸化底物的识别, 还是改变酶与底物的结合能力来影响泛素化? 其泛素化是单泛素化还是多聚泛素化? (3) 泛素化修饰后的 bHLH 靶蛋白是被降解还是定位抑或功能发生变化? 泛素化反过来是否会影响 bHLH 的磷酸化? 在生化作用机制上仍需不断探索。

bHLH 家族成员在茉莉酸介导的植物抗性、发育调控方面作用显著, 其转录活性直接影响上下游茉莉酸途径中的信号传递。激酶/磷酸酶作为磷酸化/脱磷酸化的功能执行者, 筛选并验证上游茉莉

酸信号通路中的关键激酶/磷酸酶,对于完善 bHLH 上游调控网络至关重要。此外,随着对 bHLH 转录因子的功能和调节机制研究的深入,将磷酸化位点作为优良性状指标的研究靶点,通过基因编辑或者杂交方式获得具有应用前景的育种材料或者推广品系,能够为提升农作物品质及抗性提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Lv PT, Yu S, Zhu N, et al. Genome encode analyses reveal the basis of convergent evolution of fleshy fruit ripening [J]. *Nat Plants*, 2018, 4 (10): 784-791.
- [2] Ji XY, Nie XG, Liu YJ, et al. A bHLH gene from *Tamarix hispida* improves abiotic stress tolerance by enhancing osmotic potential and decreasing reactive oxygen species accumulation [J]. *Tree Physiol*, 2016, 36 (2): 193-207.
- [3] Verma D, Jalmi SK, Bhagat PK, et al. A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *FEBS J*, 2020, 287 (12): 2560-2576.
- [4] Wang PC, Zhao Y, Li ZP, et al. Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response [J]. *Mol Cell*, 2018, 69 (1): 100-112.e6.
- [5] Yin XJ, Wang X, Komatsu S. Phosphoproteomics: protein phosphorylation in regulation of seed germination and plant growth [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19 (4): 401-412.
- [6] Zhang X, Cui YN, Yu M, et al. Phosphorylation-mediated dynamics of nitrate transceptor NRT1.1 regulate auxin flux and nitrate signaling in lateral root growth [J]. *Plant Physiol*, 2019, 181 (2): 480-498.
- [7] van Wijk KJ, Friso G, Walther D, et al. Meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* phospho-proteomics data reveals compartmentalization of phosphorylation motifs [J]. *Plant Cell*, 2014, 26 (6): 2367-2389.
- [8] Bethke G, Unthan T, Uhrig JF, et al. Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (19): 8067-8072.
- [9] Tsuda K, Somssich IE. Transcriptional networks in plant immunity [J]. *New Phytol*, 2015, 206 (3): 932-947.
- [10] Guo JR, Sun BX, He HR, et al. Current understanding of bHLH transcription factors in plant abiotic stress tolerance [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (9): 4921.
- [11] Wang HL, Guo SY, Qiao X, et al. BZU2/ZmMUTE controls symmetrical division of guard mother cell and specifies neighbor cell fate in maize [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15 (8): e1008377.
- [12] Buti S, Hayes S, Pierik R. The bHLH network underlying plant shade-avoidance [J]. *Physiol Plant*, 2020, 169 (3): 312-324.
- [13] Li PH, Chen BB, Zhang GY, et al. Regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis by *Medicago truncatula* bHLH transcription factor MtTT8 [J]. *New Phytol*, 2016, 210 (3): 905-921.
- [14] Qian YC, Zhang TY, Yu Y, et al. Regulatory mechanisms of bHLH transcription factors in plant adaptive responses to various abiotic stresses [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 677611.
- [15] Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins [J]. *Genome Biol*, 2004, 5 (6): 226.
- [16] Atchley WR, Terhalle W, Dress A. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain [J]. *J Mol Evol*, 1999, 48 (5): 501-516.
- [17] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, et al. The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques [J]. *Plant Cell*, 2000, 12 (10): 1863-1878.
- [18] Feller A, Machemer K, Braun EL, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. *Plant J*, 2011, 66 (1): 94-116.
- [19] Hao YQ, Zong XM, Ren P, et al. Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors regulate a wide range of functions in *Arabidopsis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (13): 7152.
- [20] Groszmann M, Bylstra Y, Lampugnani ER, et al. Regulation of tissue-specific expression of *SPATULA*, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61 (5): 1495-1508.
- [21] Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153 (3): 1398-1412.
- [22] Song XM, Huang ZN, Duan WK, et al. Genome-wide analysis of the bHLH transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. *Mol Genet Genom*, 2014, 289 (1):

- 77-91.
- [23] Sun H, Fan HJ, Ling HQ. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato [J]. BMC Genom, 2015, 16: 9.
- [24] Waseem M, Li N, Su DD, et al. Overexpression of a basic helix-loop-helix transcription factor gene, *SlbHLH22*, promotes early flowering and accelerates fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Planta, 2019, 250 (1) : 173-185.
- [25] Du J, Huang ZA, Wang B, et al. SlbHLH068 interacts with FER to regulate the iron-deficiency response in tomato [J]. Ann Bot, 2015, 116 (1) : 23-34.
- [26] Lau OS, Bergmann DC. Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication [J]. Development, 2012, 139 (20) : 3683-3692.
- [27] Lopez-Anido CB, Vatén A, Smoot NK, et al. Single-cell resolution of lineage trajectories in the *Arabidopsis* stomatal lineage and developing leaf [J]. Dev Cell, 2021, 56 (7) : 1043-1055.e4.
- [28] Lampard GR, MacAlister CA, Bergmann DC. *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS [J]. Science, 2008, 322 (5904) : 1113-1116.
- [29] Yang KZ, Jiang M, Wang M, et al. Phosphorylation of serine 186 of bHLH transcription factor SPEECHLESS promotes stomatal development in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2015, 8 (5) : 783-795.
- [30] 周晓今, 陈茹梅, 范云六. 植物对铁元素吸收、运输和储存的分子机制 [J]. 作物研究, 2012, 26 (5) : 605-610.
- Zhou XJ, Chen RM, Fan YL. Molecular mechanism of iron uptake, translocation and storage in plants [J]. Crop Res, 2012, 26 (5) : 605-610.
- [31] Connorton JM, Balk J, Rodríguez-Celma J. Iron homeostasis in plants - a brief overview [J]. Metallomics, 2017, 9 (7) : 813-823.
- [32] Mai HJ, Pateyron S, Bauer P. Iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*: transcriptomic analyses reveal novel FIT-regulated genes, iron deficiency marker genes and functional gene networks [J]. BMC Plant Biol, 2016, 16 (1) : 211.
- [33] Gratz R, Manishankar P, Ivanov R, et al. CIPK11-dependent phosphorylation modulates FIT activity to promote *Arabidopsis* iron acquisition in response to calcium signaling [J]. Dev Cell, 2019, 48 (5) : 726-740.e10.
- [34] Gratz R, Brumbarova T, Ivanov R, et al. Phospho-mutant activity assays provide evidence for alternative phospho-regulation pathways of the transcription factor *Fer*-like iron deficiency-induced transcription factor [J]. New Phytol, 2020, 225 (1) : 250-267.
- [35] Naranjo-Arcos MA, Maurer F, Meiser J, et al. Dissection of iron signaling and iron accumulation by overexpression of subgroup Ib bHLH039 protein [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1) : 10911.
- [36] Legris M, Ince YÇ, Fankhauser C. Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants [J]. Nat Commun, 2019, 10 (1) : 5219.
- [37] Chen M, Chory J. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development [J]. Trends Cell Biol, 2011, 21 (11) : 664-671.
- [38] Leivar P, Monte E. PIFs: systems integrators in plant development [J]. Plant Cell, 2014, 26 (1) : 56-78.
- [39] Lee N, Park J, Kim K, et al. The transcriptional coregulator LEUNIG_HOMOLOG inhibits light-dependent seed germination in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2015, 27 (8) : 2301-2313.
- [40] Shi H, Zhong SW, Mo XR, et al. HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2013, 25 (10) : 3770-3784.
- [41] Pham VN, Kathare PK, Huq E. Phytochromes and phytochrome interacting factors [J]. Plant Physiol, 2018, 176 (2) : 1025-1038.
- [42] Xu XS, Paik I, Zhu L, et al. Illuminating progress in phytochrome-mediated light signaling pathways [J]. Trends Plant Sci, 2015, 20 (10) : 641-650.
- [43] Paik I, Chen FL, Ngoc Pham V, et al. A phyB-PIF1-SPA1 kinase regulatory complex promotes photomorphogenesis in *Arabidopsis* [J]. Nat Commun, 2019, 10 (1) : 4216.
- [44] Ni WM, Xu SL, Chalkley RJ, et al. Multisite light-induced phosphorylation of the transcription factor PIF3 is necessary for both its rapid degradation and concomitant negative feedback modulation of photoreceptor phyB levels in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2013, 25 (7) : 2679-2698.
- [45] Li L, Ljung K, Breton G, et al. Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture [J]. Genes Dev, 2012, 26 (8) : 785-790.

- [46] Holtkotte X, Dieterle S, Kokkelink L, et al. Mutations in the N-terminal kinase-like domain of the repressor of photomorphogenesis SPA1 severely impair SPA1 function but not light responsiveness in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2016, 88 (2) : 205-218.
- [47] Zhu JK. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. *Cell*, 2016, 167 (2) : 313-324.
- [48] Bailey PC, Martin C, Toledo-Ortiz G, et al. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (11) : 2497-2502.
- [49] Li H, Ding YL, Shi YT, et al. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2017, 43 (5) : 630-642. e4.
- [50] Zhao CZ, Wang PC, Si T, et al. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability [J]. *Dev Cell*, 2017, 43 (5) : 618-629. e5.
- [51] Zhang ZY, Li JH, Li F, et al. OsMAPK3 phosphorylates OsbHLH002/OsICE1 and inhibits its ubiquitination to activate OsTTP1 and enhances rice chilling tolerance [J]. *Dev Cell*, 2017, 43 (6) : 731-743. e5.
- [52] Ding YL, Li H, Zhang XY, et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2015, 32 (3) : 278-289.
- [53] Goossens J, Mertens J, Goossens A. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68 (6) : 1333-1347.
- [54] Chen Q, Sun JQ, Zhai QZ, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (9) : 3335-3352.
- [55] Sheard LB, Tan X, Mao HB, et al. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor [J]. *Nature*, 2010, 468 (7322) : 400-405.
- [56] An CP, Li L, Zhai QZ, et al. Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114 (42) : E8930-E8939.
- [57] Wang H, Li SY, Li YA, et al. MED25 connects enhancer-promoter looping and MYC2-dependent activation of jasmonate signalling [J]. *Nat Plants*, 2019, 5 (6) : 616-625.
- [58] Zander M, Lewsey MG, Clark NM, et al. Integrated multi-omics framework of the plant response to jasmonic acid [J]. *Nat Plants*, 2020, 6 (3) : 290-302.
- [59] Liu YY, Du MM, Deng L, et al. MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop [J]. *Plant Cell*, 2019, 31 (1) : 106-127.
- [60] Song C, Cao YP, Dai J, et al. The multifaceted roles of MYC2 in plants: toward transcriptional reprogramming and stress tolerance by jasmonate signaling [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 868874.
- [61] Shin J, Heidrich K, Sanchez-Villalreal A, et al. TIME FOR COFFEE represses accumulation of the MYC2 transcription factor to provide time-of-day regulation of jasmonate signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (6) : 2470-2482.
- [62] Chico JM, Fernández-Barbero G, Chini A, et al. Repression of jasmonate-dependent defenses by shade involves differential regulation of protein stability of MYC transcription factors and their JAZ repressors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, 26 (5) : 1967-1980.
- [63] Zhai QZ, Yan LH, Tan D, et al. Phosphorylation-coupled proteolysis of the transcription factor MYC2 is important for jasmonate-signaled plant immunity [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9 (4) : e1003422.
- [64] Guo HQ, Nolan TM, Song GY, et al. *FERONIA* receptor kinase contributes to plant immunity by suppressing jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Biol*, 2018, 28 (20) : 3316-3324. e6.
- [65] Wang MM, Tian YC, Han C, et al. Phospho-mutant activity assays provide evidence for the negative regulation of transcriptional regulator PRE1 by phosphorylation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (23) : 9183.
- [66] Zhu L, Bu QY, Xu XS, et al. CUL4 forms an E3 ligase with COP1 and SPA to promote light-induced degradation of PIF1 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7245.
- [67] Jeong JS, Jung C, Seo JS, et al. The deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 positively regulate MYC2 levels in jasmonate responses [J]. *Plant Cell*, 2017, 29 (6) : 1406-1424.
- [68] An JP, Zhang XW, Bi SQ, et al. *MdbHLH93*, an apple activator regulating leaf senescence, is regulated by ABA and MdbT2 in antagonistic ways [J]. *New Phytol*, 2019, 222 (2) : 735-751.