

细胞分裂素信号转导分子机制

齐莹, 施和平, 李玲

(华南师范大学 生命科学学院, 中国广东 广州 510631)

摘要: 细胞分裂素受体家族与细菌二元组分系统的感受器组氨酸激酶具有同源性, 证实下游事件与传统的磷酸转作用具有相似性. 借助于 AHP 蛋白的瞬间转作用, 细胞分裂素信号通过定位在细胞膜的一类组氨酸激酶受体传到细胞核内, AHP 蛋白使 B 型 ARR 活化, 随后 B 型 ARR 激活 A 型 ARR 或其它靶基因的转录, 逐步形成从质膜接受部位到激活核内基因表达的细胞分裂素信号转导模式.

关键词: 细胞分裂素; 信号转导; 机制

中图分类号: Q946.885; Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S1-0088-05

Studies on Molecular Mechanisms of Cytokinin Signaling

QI Ying, SHI He-ping, LI Ling

(College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China)

Abstract: A family of cytokinin receptors is homologous to bacterial two-component sensor kinases. Events downstream are similar to the classic phosphorely paradigm. The cytokinin signal appears to be transduced from the membrane-localized histidine kinase-like receptors into the nucleus via a transient translocation of the AHP proteins. The AHPs activate the type-B class of *Arabidopsis* response regulators. Then the type-A ARRs or other genes are activated. A model of cytokinin signaling from perception at the plasma membrane to activation of gene expression in the nucleus is beginning to emerge.

Key words: cytokinin; signal transduction; mechanisms

(Life Science Research, 2004, 8(4): 088 ~ 092)

细胞分裂素与植物生长发育的许多调控过程密切相关, 包括胚胎发育、芽的分化、根的生长、维管束的形成、开花以及叶片衰老等, 对植物体的可塑性和适应性以及恢复性和永久性都具有非同寻常的作用, 这使得植物能够对外界环境产生敏感而快速的反应^[1]. 细胞分裂素的信号转导一直以来都是人们十分关注的问题, 其受体的研究几乎从被发现时就开始了, 生物化学方法使许多细胞

分裂素结合蛋白得以分离, 但是没有一种蛋白能够被明确地确定为受体, 尤其对拟南芥和其基因组序列的研究获得了许多新信息. 研究表明细胞分裂素的信号转导涉及一个多级二元组分信号转导途径, 在植物体内可能很具有代表性的规范化细胞分裂素信号转导模型正在逐步形成. 本文将从对拟南芥的分子遗传学研究方面来探讨现在对细胞分裂素信号转导的理解.

收稿日期: 2004-05-08; 修回日期: 2004-10-19

作者简介: 齐莹 (1979-), 女, 河南开封人, 华南师范大学硕士研究生, 从事植物细胞工程及其应用研究, Tel: +86-020-85210204,

1 细胞分裂素受体是一种组氨酸蛋白激酶

2001年在拟南芥中最先鉴定了3个编码细胞分裂素受体的基因: *CRE1* (cytokinin receptor 1 gene, 也称 *AHK4* 或 *WOL*)、*AHK2* (*Arabidopsis* histidine kinase 2 gene) 和 *AHK3*^[2, 3]. *CRE1* 的功能是通过 *cre1* (*cytokinin response 1*) 和 *wol* (*wooden leg*) 突变体的分离以及直接的细胞分裂素结合实验被阐明的. *cre1* 和 *wol* 是等位突变, 使细胞分裂素诱导的愈伤组织芽再生缺陷, 根的生长表现出部分抗细胞分裂素作用^[2]. 许多实验提供了 *CRE1* 是细胞分裂素受体的证据: 酵母缺失突变体遗传互补实验证实了 *CRE1* 能与细胞分裂素直接结合; 能够表达 *CRE1* 的裂殖酵母细胞膜表现出极高的异戊基腺嘌呤亲和性^[2, 4]. 研究发现 *CRE1* 与真菌和细菌中存在的二元组分系统元件类似, 具有典型的组氨酸蛋白激酶结构. 其 N 末端激酶结构域含有一个保守的组氨酸残基, 可能定位在质膜内侧的两个 C 末端类接受结构域具有保守的天冬氨酸残基, 胞外区属于已在大范围原核和真核生物有机体中已鉴定的能与多种低分子量配体相结合的 CHASE 配体结合区家族^[5]. *CRE1* 磷酸化位点 His⁴⁵ 和 Asp⁹⁷³ 中任一位点的突变, 都会破坏其受体作用, 这表明组氨酸-天冬氨酸磷酸化作用是 *CRE1* 行使功能所必需的^[2]. CHASE 区一个氨基酸的替换会导致离体条件下结合细胞分裂素失败、活体条件下 CHASE 功能丧失和这种蛋白质对 *RcsC* 组氨酸激酶缺失大肠杆菌突变体补偿作用消失^[4, 6], 这说明 *CRE1* 的 CHASE 区是细胞分裂素的结合位点, 细胞分裂素是以配体形式与 *CRE1* 结合的.

在拟南芥中共发现了6个 *AHK* 基因, 其中 *AHK2* 和 *AHK3* 与完整的 *CRE1* 具有极高同源性 (分别为 52% 和 54%), 而且在异源系统中表达时其产物都能与细胞分裂素结合, 起到 *CRE1* 对酵母和大肠杆菌突变体的补偿作用, 并且都能激活细胞分裂素反应下游应答基因^[3]. 这些结果都说明 *AHK2* 和 *AHK3* 可能起到受体的作用, 所以不难理解当 *CRE1* 功能缺失时, 两者可能在一定程度上互补了 *CRE1* 的功能, 导致 *cre1* 突变体的非致死表型. 但两者在胞质中过量表达对细胞分裂素反应报道分子 *ARR6* 的表达几乎没有影响^[7], 功能丧失性突变体的研究也许能够进一步揭示它们的功能和其在细胞分裂素反应中的作用.

拟南芥组氨酸蛋白激酶 *CKI1* (cytokinin independent 1) 和 *CKI2* (也称 *AHK5*) 能够在缺乏外源细胞分裂素的情况下激活细胞分裂素反应, 在活性标记诱变中过量表达 *CKI1*, 能抵消愈伤组织生长和绿化过程对细胞分裂素的需要^[7], 推测 *CKI1* 可能是一种细胞分裂素受体, 尚无证据证明 *CKI1* 能与细胞分裂素结合, 其一级结构也与 *CRE1* 有明显差别. 建立在细胞分裂素诱导的 *ARR6-LUC* 报告基因活性基础上的定量转录分析表明, *CKI1* 和 *AHK* 是通过不同的细胞分裂素感受机制起作用的. *CKI1* 具有组成型活性, 其激活不依赖于外源细胞分裂素的存在, 而 *CRE1*、*AHK2* 和 *AHK3* 的激活则需要胞外细胞分裂素的作用. *CKI1* 的过量表达能激活细胞分裂素反应基因, 其本身的激活并不是对细胞分裂素的反应^[7]. *CKI1* 基因突变具有超等位基因的特征也对 *CKI1* 可能是一种细胞分裂素受体的推断产生置疑. 以上实验尚不能排除 *CKI1* 通过不同结构在体内与细胞分裂素结合的可能性, 特别是 *CKI1* 在体内应答于低浓度内源激素的可能性, 所以 *CKI1* 在细胞分裂素信号转导中的作用有待于进一步研究.

2 AHP 作为 CRE1 下游靶分子参与信号转导

在细菌和酵母的多级磷酸转运通路中, *HPt* (histidine phosphotransfer proteins) 是在组氨酸激酶下游起作用的, 调节从杂合激酶接受结构域到反应调节因子接受结构域的磷酸基团转移作用. 拟南芥中含有五种 *AHP* (*Arabidopsis* *HPts*) 蛋白, 它们都有一个保守的组氨酸残基^[8], 功能互补实验表明它们在酵母 *hpt* 缺失突变体中作为磷酸传递子起作用, 膜共培育实验进一步阐明 *AHP* 的磷酸转移位点就是组氨酸残基^[9]. 大肠杆菌共表达系统研究发现 *AHP* 能与大肠杆菌的内源 *HPt* 竞争 *CRE1* 保守组氨酸残基的磷酸化作用^[6]; *AHP* 绿色荧光蛋白标记实验则提供了第一个活体条件下 *AHP1* 和 *AHP2* 以依赖于细胞分裂素的模式向核移动再定位的直观证据^[7]; 酵母双杂交实验更全面地检测到了 *AHP* 与组氨酸激酶及其与 A 型和 B 型 *ARR* (*Arabidopsis* response regulators) 间的相互作用^[10], 表明 *AHP* 在定位于胞质膜的组氨酸激酶和定位于细胞核的反应调节因子间起到了重要的磷酸转运作用^[7]. *AHP2* 在拟南芥中过量表达时能够提高转基因幼苗对细胞分裂素的敏感性并

且在黑暗中抑制根与下胚轴的伸长^[8], 证明 AHP 确实参与了细胞分裂素的信号转导。

3 两种 ARR 的作用

目前所知, AHP 的下游靶分子是 ARR, 拟南芥基因组中其是由包括 22 个成员的基因家族编码, 以表达模式及产物的氨基酸序列分析为依据被分为 A 型和 B 型两大类^[11]。A 型基因的表达被细胞分裂素诱导, 转录水平受细胞分裂素的正向调节^[12], B 型基因的表达则不受外源激素影响。两种类型的 ARR 都具有接受磷酸基团的保守信号接受结构域。B 型还有一个与转录因子相似的长 C 末端输出结构域, 该结构域含有一个保守 GARP 区, 具有识别和结合特异 DNA 序列的潜在核定位作用。已经观察到 ARR1、ARR2 和 ARR10 的 GARP 区优先结合到 DNA 的 5'-AGATT-3' 核心序列上, ARR11 偏向于结合到 5'-GGATT-3' 上^[13, 14]。多个 5'-(A/G) GATT-3' 序列在 ARR6 和其它 A 型 ARR 基因启动子内的出现表明 B 型 ARR 可以直接调节 A 型 ARR 基因的转录。B 型 ARR 的 C 末端也富含 Pro 和 Glu, 暗示了 C 末端输出结构域的转录激活作用。酵母和烟草细胞中融入 GAL4 的 DNA 结合结构域后, ARR1、ARR2 和 ARR11 的 C 末端输出结构域确实能够从 GAL4 驱动的启动子处激活转录作用^[14]。这些结果说明 B 型 ARR 具有转录因子的作用。

在苗再生实验中发现 ARR1 功能丧失性突变会导致细胞分裂素敏感性降低, ARR6 的转录水平也降低, 反之当 ARR1 过量表达时植物体对细胞分裂素具有较高的敏感性, ARR6 的转录水平增高, 不管外源细胞分裂素是否存在都能得到这样的结果^[15]。与此相似, ARR2 在拟南芥原生质体中过量表达时, 也能提高 ARR6 的本底水平和细胞分裂素诱导水平, 即使在缺乏外源细胞分裂素的情况下其它 B 型基因 (ARR1、ARR10 和 ARR11) 的过量表达也都能不同程度地提高 ARR6 的表达水平^[7]。以上结果可以说明, B 型 ARR 参与了细胞分裂素的信号转导, 并能诱导 A 型 ARR 的表达。

细胞分裂素通过激活转录作用对 A 型 ARR 的表达进行正调节, 并没有重新合成蛋白质, 说明 A 型 ARR 基因是细胞分裂素的初级应答基因^[16]。研究发现, ARR4、ARR5、ARR6 和 ARR7 的瞬时过量表达会抑制 ARR6 的转录。稳定过量表达

ARR8 的转基因植物细胞分裂素反应消失, 而稳定过量表达 ARR4 的转基因植物表现出强烈的细胞分裂素反应^[7, 17], 推测 A 型 ARR 可以正负调节细胞分裂素反应。2003 年 Kiba, T 等证明 ARR15 在细胞分裂素和 CRE1 诱导的 His-Asp 磷酸转移过程中作为抑制剂起负反馈调节作用^[18]。在瞬时和稳定表达系统中都证明了 A 型 ARR 的表达受到自身的负反馈调控, B 型 ARR 的活性也受到 A 型 ARR 的负反馈调控^[15]。

在细菌中, 反应调节因子的去磷酸化作用会导致其活性的丧失^[19], 大多数情况下是特定磷酸酶作用的结果, 但有些例子则是一个相反的磷酸转运过程, 如根瘤菌的反应调节因子 CheY2 的脱磷酸化作用就是通过借助于 HPr 将磷酸基团转运到次级反应调节因子 CheY1 上来完成^[20]。A 型 ARR 也能促进去磷酸化作用, 使 B 型 ARR 失活, 从而抑制 A 型 ARR 自身的转录。A 型和 B 型 ARR 都是核定位蛋白^[12], 所以反向磷酸转运作用可能是借助于 AHP 来完成, 磷酸基团将从 B 型 ARR 转移到 AHP 上, 随后转给 A 型 ARR。另一种观点认为 A 型 ARR 可能会与 B 型 ARR 竞争 AHP 的磷酸转移作用。AHP 与 A 型 ARR 的相互作用已有报道, 在离体条件下已证实从 AHP 到 A 型 ARR 的磷酸转移作用^[10]。

4 交叉反应

红光受体 PhyB 类组氨酸激酶结构域的证实使 Sweere 等 (2001) 研究了 PhyB 与 ARR 的相互作用, 他们在酵母细胞和拟南芥中发现了 ARR4 和 PhyB 的 N 末端非组氨酸激酶结构域的直接相互作用。ARR4 稳定 PhyB 的活性 Pfr 形式, 过量表达 ARR4 的转基因拟南芥对红光表现出超敏感性^[21]。有关植物发育和基因表达过程中光与细胞分裂素相互作用的报道已有不少^[22], 所以推测 ARR4 可能作为一个信号分子介导了细胞分裂素和红光信号转导途径。

ARR4 的表达调控是复杂的, 该蛋白的积累既要受细胞分裂素的转录调控又要受光的蛋白质积累调控。拟南芥原生质体中 ARR4 过量表达会降低细胞分裂素诱导的 A 型 ARR 基因表达^[7], 但 ARR4 是否在细胞分裂素信号转导的反馈调节和光信号转导中都起作用还不清楚。

已经知道 ARR2 参与好几个拟南芥线粒体呼吸链复合体组分编码基因的表达调控, 仍不清楚

这些基因的表达是否与细胞分裂素的信号转导有关^[23]。除了 A 型 ARR 基因外, 还没有发现其它任何基因的表达是受 B 型 ARR 和细胞分裂素调控的。分离鉴定未知的 ARR 靶位基因是进一步了解细胞分裂素复杂信号转导网络的关键。

逐步形成的细胞分裂素信号转导途径模式图如下: (图 1) 细胞分裂素结合到受体的 CHASE 区上激活受体, 使其发生反式自磷酸化作用。活化受体进一步磷酸化 AHP 亚家族, AHP 从细胞质

向细胞核发生定向移动。有活性的 AHP 与细胞核内束缚态 ARR 相互作用, 将磷酸基团转运到后者的接受结构域, 具有转录因子作用的 B 型 ARR 从细胞核里假定抑制剂中释放出来, 去磷酸化的 AHP 则重新返回细胞质, 可被再次磷酸化。B 型 ARR 与靶基因启动子的多个顺式作用元件结合, 激活 A 型 ARR 的表达, 其产物与其它效应器相互作用使细胞发生相应的变化。A 型 ARR 的激活提供了一种负反馈调节机制。

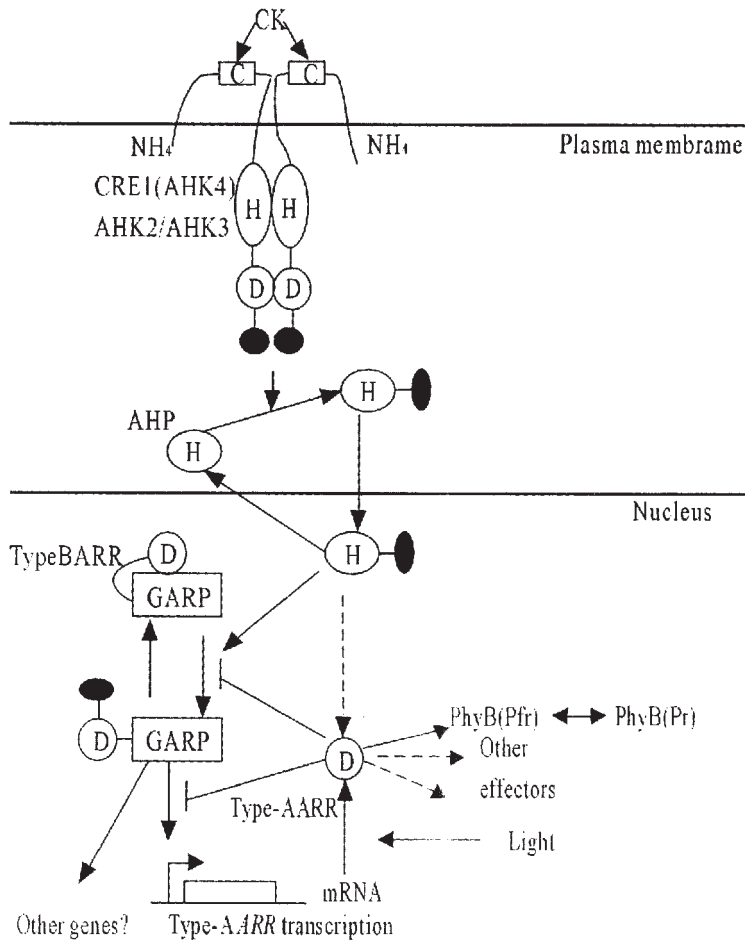


图 1 拟南芥的细胞分裂素信号转导途径模式图

C: 受体的 CHASE 区; H: 组氨酸激酶结构域; D: 接受结构域; GARP: 识别和结合 DNA 的结构域; ●: 磷酸基团。

Fig. 1 Mode diagram of the cytokinin signal transduction pathway in Arabidopsis

C: The CHASE domain of receptors; H: The histidine kinase domain; D: Receiver domain; GARP: The domain of recognizing and binding DNA; ●: Phosphoryl group.

5 结束语

在拟南芥细胞分裂素信号转导途径中, AHP 通过在细胞质和细胞核间的穿梭作用介导了 AHK 和 ARR 之间的相互作用。这与原核生物中

普遍存在的二元组分信号转导系统是相似的, 但研究发现 AHK、ARR 及其相关蛋白的数量要比 AHP 多^[24], 这说明磷酸转移过程是一个复杂的网络, 它的每一组分都属于多基因家族, AHP 在信号转导过程中可能是共用的^[7]。现在还不清楚每一个

多基因家族的功能范围有多大,各基因家族成员的功能特异性问题将是我们以后的研究重点。AHK、AHP 和 ARR 表达模式及其细胞再定位的阐明将有助于更好的理解它们在细胞分裂素反应和二元组分信号转导系统中的独特作用和作用的重叠性。

未知细胞分裂素是否通过已建立的组氨酸蛋白激酶和 MAPK 级联放大途径转导信号,其信号通路是否也存在类似的偶联其受体与下游组分 MAPK 级联反应还需要进一步研究。

二元组分系统的元件可能也受细胞分裂素以外其它信号的潜在调节,ARR4的积累需要光并且其能与 PhyB 相互作用调节光信号的转导^[21]。所以,二元组分系统的元件可能在复杂的植物信号转导网络中起到分子链的作用,能灵敏地将重要的生长信号如:激素、糖、光、和其它环境因素整合在一起。拟南芥基因组测序工作的完成揭示出有54个基因编码假定的 AHK、AHP、ARR 及相关蛋白^[25],但与其他途径的活跃交叉反应的具体细节还不完全清楚。目前在长春花属植物中也分离到了两个可能的细胞分裂素信号转导途径成员编码基因 *CrCKR1*和 *CrHP1*^[26],通过突变体筛选、基因微阵列分析、与已知组分相互反应蛋白或基因的分鉴定以及寻找新的特异性遗传筛选方法,细胞分裂素信号转导的研究将会取得进一步的突破。

参考文献 (References):

- [1] HUTCHISON C E, KIEBER J J. Cytokinin signaling in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2002, Supplement: 47-59.
- [2] INOUE T, HIGUCHI M, HASHIMOTO Y, *et al.* Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*[J]. Nature, 2001, 409: 1060-1063.
- [3] UEGUCHI C, KOIZUMI H, SUZUKI T, *et al.* Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42: 231-236.
- [4] HABERER G, KIEBER J J. Cytokinins: New insight into a class phytohormone[J]. Plant Physiol, 2002, 128: 359-362.
- [5] ANANTHARAMAN V, ARAVIND L. The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26: 579-582.
- [6] SUZUKI T, MIWA K, ISHIKAWA K, *et al.* The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinin[J]. Plant Cell Physiol, 2001b, 42: 107-113.
- [7] HWANG I, SHEEN J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* signal transduction[J]. Nature, 2001, 413: 383-389.
- [8] SUZUKI T, ISHIKAWA K, MIZUNO T. An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal transduction: Overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitivity to cytokinin[J]. Plant Cell Physiol, 2001a, 43: 107-113.
- [9] SUZUKI T, IMAMURA A, UEGUCHI C, *et al.* containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis* Plant[J]. Cell Physiol, 1998, 39: 1258-1268.
- [10] DERUERE J, KIEBER J J. Molecular mechanisms of cytokinin signaling[J]. Plant Growth Regul, 2002, 21: 3-39.
- [11] SCHALLER G E, MATHEWS D E, GRIBSKOV M, *et al.* Two-component signaling elements and histidyl-to-aspartyl phosphorelays[C]. American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book [M]. Rockville: Md, 2002.
- [12] KIBA T, YAMADA H, MIZUNO T. Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43: 1059-1066.
- [13] HOSODA K, IMAMURA A, KATOH E, *et al.* Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators[J]. Plant Cell, 2002, 14: 2015-2029.
- [14] IMAMURA A, KIBA T, TAJIMA Y, *et al.* In vivo and in vitro characterization of the ARR 11 response regulator implicated in the His-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Phys, 2003, 44: 122-131.
- [15] SAKAI H, HONMA T, AOYAMA T, *et al.* ARR1, a Transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins[J]. Science, 2001, 294: 1519-1521.
- [16] D'AGOSTINO I, DERUERE J, KIEBER J J. Characterization of the response regulators of *Arabidopsis* ARR gene family to cytokinin[J]. Plant Physiol, 2000, 124: 1706-1717.
- [17] OSAKABE Y, MIYATA S, URAO T, *et al.* Overexpression of Arabidopsis response regulators ARR4/ATRR1/IBC7 and ARR8/ATRR3, alters cytokinin response differentially in the shoot and in callus formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293: 806-815.
- [18] KIBA T, YAMADA H, SATO S, *et al.* The type-A regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44(8): 868-874.
- [19] WEST A H, STOCK A M. Histidine kinase and response regulator proteins in two-component signaling systems[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26: 369-379.
- [20] SOURJIK V, SCHMITT R. Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*[J]. Biochemistry, 1998, 37: 2327-2335.
- [21] SWEERE U, EICHENBERG K, LOHRMANN J, *et al.* Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling[J]. Science, 2001, 294: 1108-1111.
- [22] THOMAS T H. Phytochrome and cytokinin responses[J]. Plant Growth Regul, 1997, 23: 105-122.
- [23] LOHRMANN J, SWEERE U, ZABALETA E, *et al.* The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear-encoded mitochondrial complex I genes[J]. Mol Genet Genomics, 2001, 256: 2-13.
- [24] HWANG I, CHEN H C, SHEEN J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2002, 129: 500-515.
- [25] LOHRMANN J, HARTEK K. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators[J]. Plant Physiol, 2002, 128: 363-369.
- [26] PAPON N, CLASTRE M, GANTET P, *et al.* Inhibition of the plant cytokinin transduction pathway by bacterial histidine kinase inhibitors in *Catharanthus roseus* cell cultures[J]. FEBS Letters, 2003, 537: 101-105.