

乙烯受体与信号转导成员的研究进展^①

刘元风^{1,2}, 李晓方¹, 李玲²

(1. 广东省农业科学院 水稻研究所, 中国广东 广州 510640; 2. 华南师范大学 生命科学院, 中国广东 广州 510631)

摘要: 综述了近几年有关乙烯受体和乙烯信号转导成员研究的最新进展, ETR1 与其多基因家族的结构及在信号转导过程中的作用机理. 乙烯与受体结合需要铜离子的协同作用. ETR1、CTR1、EIN2、EIN3、ERN1、ERF1 等组成乙烯信号转导.

关键词: 乙烯; 受体蛋白; 信号转导; 核定位; Cu^{2+}

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2003)S9-0070-05

Research Advances of Ethylene Receptors and Components of the Ethylene Signal Transduction Pathway

LIU Yuan-feng^{1,2}, LI Xiao-fang¹, LI Ling²

(1. Rice Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China;

2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China)

Abstract: The recent studies of ethylene receptors, ethylene signal transduction pathway, the role of ETR1 and its polygenic family in ethylene transduction are reviewed. Ethylene binding occurs at the N-terminal transmembrane domain of the receptors and a copper α -factor is required for the binding. The ethylene signal transduction pathway consists of ETR1, CTR1, EIN2, EIN3, ERN1, ERF1 and so on.

Key words: ethylene; ethylene receptor; ethylene signaling; nuclear localization; Cu^{2+}

(Life Science Research, 2003, 7(2): 70~74)

乙烯是调控植物生长发育、成熟衰老的重要激素, 从种子萌发、叶片衰老、根茎伸长到果实成熟与软化等无不为乙烯所调节. 随着植物体内乙烯生物合成途径的阐明和分子生物学的深入研究, 通过分子生物学途径调控植物内源乙烯的合成已取得了显著的成绩. 最近几年, 由于分子遗传研究取得了很大的进展, 特别是各种突变体的克隆和分离及 DD 技术的发展, 加速了乙烯信号转导途径的研究进展. 本文将介绍乙烯与受体结合机理、各个成员的结构研究进展.

1 乙烯反应突变体

黄化幼苗的“三重反应”是植物对乙烯的特殊反应, 这为鉴别乙烯反应突变体提供了有效的方法. 目前在拟南芥中已分离的突变体主要分为两类: 1) 乙烯不敏感突变体(如 ethylene insensitive, 简称 ein, ethylene resistant, 简称 etr)等; 2) 组成型突变体(constitutive triple response, ctr). 通过突变体分析, 在拟南芥中克隆了乙烯信号转导途径的 7 个基因, 分别为 $ETR1$ ^[1], $ETR2$ ^[2], $EIN4$ ^[3],

① 收稿日期: 2003-03-06; 修回日期: 2003-06-03

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(020384)

作者简介: 刘元风(1970), 女, 江西吉安人, 华南师范大学硕士研究生, E-mail: lfy10p58@sohu.com; 李晓方(1962), 女, 甘肃临洮人, 广东省农业科学院水稻研究所研究员, 通讯作者, 主要从事水稻生物技术研究, E-mail: lixiaofang@163.net

RAN1^[4], *CTR1*^[5], *EIN2*^[6], *EIN3*^[7], 突变体 *etr1*, *etr2*, *ein4*, *ein3*, *ein2* 属于乙烯不敏感型突变体, 而 *ctr1* 为组成型三重反应突变体. *ERS1* 和 *ERS2* 是与 *ETR1* 密切相关的基因, 属于不敏感突变, 经双突变体分析 *ERS* 在 *CTR1* 的上游起作用.

2 多个乙烯受体蛋白

目前确定拟南芥中至少存在 5 个乙烯受体蛋白: *ETR1*、*ETR2*、*ERS1*、*ERS2*、*EIN4*, 这些受体蛋白结构和细菌双组分系统的组氨酸激酶同源. 细菌的双组分系统含有典型的蛋白, 通常称为传感器(包括一个细胞外输入端和一个细胞质组氨酸激酶结构域)和反应调节器(包括一个接受器结构域和一个输出结构域). 传感蛋白定位在细胞膜上, 直接感受外界环境的刺激, 使组氨酸残基发生自我磷酸化, 然后这个磷酸基团转移到反应调节器的天门冬氨酸残基上, 活化下游元件. 在这 5 个乙烯受体中, *ETR1* 和 *ERS1* 含有 3 个跨膜区和一个组氨酸激酶区, 通过同源二聚体的形式产生自我磷酸化起作用, 但 *ERS1* 没有接受器结构域. 只有 *ETR1*、*ETR2* 和 *EIN4* 的 G 端含有接受器结构域.

不考虑乙烯受体蛋白接受器结构域的存在, 根据乙烯受体传感蛋白结构的相似性, 受体蛋白可以进一步分为两个亚家族: *ETR1* 亚家族和 *ETR2* 亚家族^[8], 前者包括 *ETR1* 和 *ERS1*, 其 N 端含有 3 个跨膜区, 对配体乙烯结合起响应作用, 其 G 端含有一个高度保守的组氨酸激酶区. 后者包括 *ETR2*、*EIN4* 和 *ERS2*, 其 N 端含有 4 个疏水区和一个不完整的组氨酸激酶区(缺少一个或多个催化激酶活化的必要元件), 这些受体发挥不同的作用, Fankhauser 发现光敏色素有一个与双组分系统相关的组氨酸激酶区, 但表现出丝氨酸/苏氨酸激酶的活性, 因而认为 *ETR2* 这类受体不是通过组氨酸激酶的磷酸化起作用, 有可能通过丝氨酸/苏

氨酸激酶磷酸化起作用^[9].

最近在番茄中也分别克隆了与拟南芥乙烯受体基因 *ETR1*、*ERS*、*ETR2* 同源的 *LeETR1*、*LeETR2*、*NR (Le-ETR3)*、*LeETR4*、*LeETR5* 等 5 个乙烯受体基因. *Le-ETR1* 和 *Le-ETR2* 的 cDNA 与拟南芥的 *ETR1* 序列高度同源, 氨基酸同源性达 80%; *Le-ETR4* 和 *Le-ETR5* 与 *ETR1* 的蛋白序列分别只有 42% 和 40% 相同, 但两者与 *ETR2* 相似性达到 78% 和 76%, 同源性分别为 60% 和 54%; *NR (Le-ETR3)* 与拟南芥的 *ERS* 蛋白同源性最高. 5 个受体基因在酵母中表达后均有乙烯结合活性^[10]. 表明目前得到的番茄所有受体基因均编码有功能的受体蛋白^[11].

2.1 *ETR1* 蛋白

ETR1 蛋白为跨膜蛋白, N 端位于膜外侧, G 端定位于膜内侧, 与细菌双组分系统相似. *ETR1* 蛋白可以分成 4 个不同的作用域(图 1)^[12], 第 1 作用域是 N 端 1~313 个氨基酸残基组成的序列, 编码的蛋白类似细菌中的传感器, 对乙烯结合起响应作用. 此区域有 3 个疏水跨膜区, 该区域高度保守, 已知的所有引起乙烯不敏感的受体突变(*etr1-1*、*etr1-2*、*etr1-3*、*etr1-4*、*etr2-1*、*etr4-1* 等)均发生在这一区域^[1]; 其 N 端 165~400 个氨基酸是 GAF 区(与 cGMP 结合和光调节有关)但在 *ETR1* 中的功能还不清楚^[14]. 第 3 区域存在于细胞质中, 含有典型的组氨酸激酶区, 以同源二聚体形式产生自我磷酸化作用, 每个同源二聚体都含有一个乙烯的结合位点, 当乙烯与受体结合时, 需要一个 Cu^{2+} 协同作用^[15]. 乙烯与受体结合后, 受体的组氨酸激酶活化, 组氨酸残基自身磷酸化, 该磷酸基团可以传递给第 4 区域的受体效应调节器的 Asp 残基或下游组分 *CTR1*, 从而活化了信号传导途径.

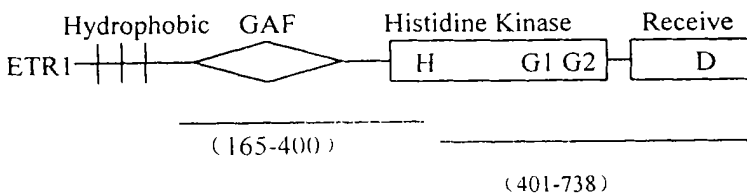


图 1 *ETR1* 的结构^[12]

Fig. 1 Structure of *ETR1* (The hydrophobic ethylene-sensing domain, the GAF domain, the His kinase domain, and the receive domain).

H: His-353; D: Asp-659; G1, G2 box indicate the kinase domain

2.2 铜离子作用

气体分子可与蛋白受体通过过渡金属直接作用,且结合可逆,如感受 O_2 的 FixL 蛋白和感受 NO 的受体^[19]. 乙烯若是直接作用需要酶促反应形成共价键,反应不太可能可逆;而乙烯与金属离子协同作用,金属-烯烃的作用很微弱,便于乙烯与受体的解离. 能够协同金属的氨基酸残基有 His、Cys、Met 以及可能的酸性残基. 为了进一步了解乙烯在受体蛋白 N-端疏水区结合的机理,发现 Cu^{2+} 是受体感受乙烯信号的协同因子. 在突变体 *etr-1* 中, Cys65 定点突变成 Tyr, 受体蛋白不再结合乙烯, 而且铜离子的共纯化特征也消失, 推测 Cys65 高度保守, 可能是金属配体, 协调 Cu^{2+} 介导乙烯与受体的结合. 最近发现响应抑制剂基因 *ran1* (responsivetoanti-angonist1) 推导的 RAN1 蛋白与负责 Cu^{2+} 转运的 P 型 ATP 酶相似. 遗传上位性分析, RAN1 在乙烯受体基因上游作用^[4, 18]. RAN1 突变体产生 Cu^{2+} 亏缺, 导致 ETR1 和其它受体的乙烯结合域专一性降低, 而在培养介质中加入 $CuSO_4$ 时, *ran1* 突变对拮抗剂引起的乙烯响应降低. 说明铜离子转运也是调节乙烯受体活性和乙烯敏感性的的重要途径, 但对于 Cu^{2+} 怎样引起受体构型的变化、改变受体活性和(或)受体转录还需进一步的研究.

3 信号转导元件

3.1 CTR1 蛋白

CTR1 蛋白是乙烯信号转导途径的一个下游元件, 是一个中心组分, 充当一个负调节物, 在乙烯信号转导途径中起磷酸化级联反应^[5]. CTR1 蛋白的羧基端与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的 Raf (retroviral protein, v-raf) 家族具有显著的相似性. CTR1 具有所有 Raf 蛋白的三区结构, 在氨基酸组成上具有相似性, 其羧基端与 Raf 1 激酶区的保守序列具有高度的相似性, 其结构与致丝列素活化的蛋白激酶(MAPKKK)相似. CTR1 的 N-端含有 Raf 蛋白的高度保守的胱氨酸结构和富含丝/苏氨酸的区域, 可能起调节 G 端激酶区的作用. *ctr1* 基因的两点突变使激酶区的固定残基发生变化, 引起下游靶蛋白磷酸化, 从而抑制了乙烯的作用.

3.2 EIN2 蛋白

乙烯反应突变体的遗传上位分析表明 EIN2 在 CTR1 的下游和 EIN3 的上游起作用. *EIN2* 中的无效突变会导致植物的整个发育过程完全丧失对

乙烯的反应, 表明在乙烯的信号转导途径中起正调节作用. *EIN2* 编码一个新的膜整合蛋白^[6], 其 N-端的疏水区和 NRAMP 家族具有相似性. NRAMP 家族包括金属离子转运器如酵母中的 Smf1P、果蝇和哺乳类的 DCT1 蛋白. G 端具有典型的蛋白与蛋白之间相互作用的基元, 但其亲水区不具有与任何已知蛋白的同源性. *ein2* 突变体仍然具有对百草枯和水杨酸的反应, 但不能恢复对乙烯的反应, 推测 *EIN2* 的 N-端为感受上游元件传来的乙烯信号所必需, G 端为传递信号到下游元件所必需.

3.3 EIN3 蛋白

乙烯反应最终要导致核基因表达的变化. *EIN3* 编码一个新的核定位蛋白(6 个成员的多基因家族). 这个家族中的 3 个成员 *EIN3*、*EIL1* 和 *EIL2* 可以恢复突变体 *ein3* 的表型, 所以 *ein3* 的无效突变只能导致部分乙烯的不敏感. 在 *ein2* 的无效突变下, *EIN3* 过表达(类似 *EIN2* G 末端的过表达)会导致乙烯反应组成型活化, 证明 *EIN3* 在 *EIN2* 的下游起作用, 突变体分析, 乙烯信号转导下游元件 *EIN3* 对乙烯反应基因起转录调节作用, 即 *EIN3* 基因的表达不是通过乙烯直接诱导, 而是通过乙烯在蛋白质水平上进行调节^[8]. 最近在其他植物中也克隆了类似 *EIN3* 的转录因子(如烟草中的 *TEIL*, 番茄中的 *LeEIL1*、*LeEIL2*、*LeEIL2*) 基因起转录调节作用^[19].

3.4 ERF1 蛋白

ERF1 是植物特定的转录因子, 是 EREBPS (ethylene-response element binding proteins) 大家族中的一个成员, 在胁迫反应过程中特异结合到与乙烯、病理反应相关基因启动子的 GCC 框上(a DNA motif associated with ethylene and pathogen-induced gene expression)^[8]. 首先是在烟草中发现的 ERF1 特定结合到 GCC 框上^[20, 21], 有高度保守 58-59 氨基酸组成称为 ERF 区域, 由一个 β 折叠和一个 α 螺旋组成, 以单体的形式和靶基因的 DNA 结^[22].

3.5 ERN1 蛋白

Stefan 最近发现 *ERT2* 在进行乙烯处理时, mRNA 丰度下降, 分离这个 cDNA, 并进行全长 cDNA 克隆, 发现它是在 *etr1* 突变体中特异表达一个由乙烯调节的新的核定位蛋白(ethylene-regulated nuclear protein), 重新命名为 ERN1. ERN1 是乙烯信号转导途径中的一个下游元件, 是一个

负调节因子,和 EIN3 一起构成一个转录调节因子,两者都是乙烯反应表达所必需^[23]。ERN1 是单拷贝基因,没有内含子。ERN1 蛋白没有跨膜区,具有疏水性,在氨基端有富含脯氨酸和甘氨酸重复簇区域 PEN, C 端有 2 个富含谷氨酸的酸性区和 1 个富含赖氨酸的碱性区,以及一些推定的磷酸化位点,磷酸化位点可能调节 ERN1 蛋白的活性,酸性区和脯氨酸区为转录调节因子的活化区,证明 ERN1 只是一个编码核蛋白基因,这一研究结果

有待进一步研究。已知依赖核孔复合体进入细胞核的蛋白质,都具有富含精氨酸和赖氨酸的信号肽,这段强碱性的多肽被认为是核定位信号^[13]。

4 乙烯信号转导模型

从拟南芥中分离了一系列对乙烯有不同反应的突变体,表明存在着一条与这些反应相联系的乙烯信号转导途径。通过双突变体分析确定了乙烯信号转导基因作用顺序(图 2)。

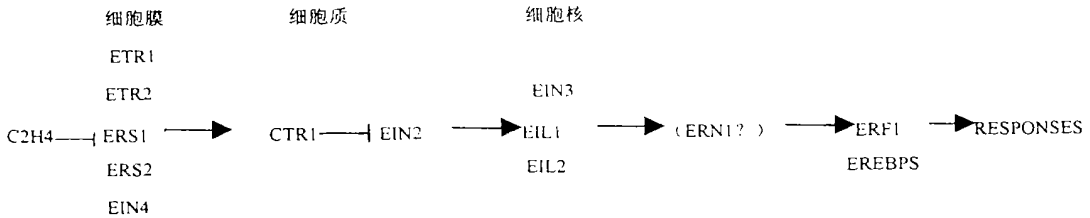


图 2 乙烯信号转导途径

Fig. 2 Ethylene signaling transduction pathway

5 种受体 ETR1、ETR2、EIN4、ERS1、ERS2 都是跨膜蛋白,膜外侧 N-端氨基酸是乙烯结合的主要条件。乙烯与受体结合时需要细胞质中的 Cu^{2+} 转运器 RAN1 携带 Cu^{2+} 到受体上,协助乙烯与受体的结合。ERS 和 EIN4 是 ETR1 基因产物的同系物,可能编码乙烯受体的同工型。CTR1 蛋白位于细胞质中,是乙烯信号转导途径的一个中心组分,在下游充当负调节元件,在乙烯信号转导途径中起着磷酸化级联反应。无论乙烯是受体组氨酸激酶的正调节物还是负调节物,被活化的激酶或者被抑制的激酶直接或间接地发生作用,降低了 CTR1 的活性,最后引起 EIN2 活性上升,导致定位在细胞核中的转录因子 EIN3、ERF1、ERN1 快速地诱导乙烯调节的反应^[23],但 ERN1 的功能有待进一步研究。EIN3 与 ERF1 的启动子相结合,活化 ERF1 的转录。转录因子 ERF1 和其他的 EREBPS 在靶基因启动子的 GCC 框相互作用,活化乙烯反应的下游元件,最终使生物体作出相应的乙烯反应,如种子萌发、叶片衰老、根茎伸长、果实成熟与软化、植株抗病等。

Kende 解释 ETR1 基因家族发生突变后导致对乙烯不敏感的原因^[17]: 如果 ETR 蛋白家族形成一个多聚体,其中一个发生变化就会使整个复合物失活;或者 *etr1* 这样的突变体可能会获得一种新功能。Kende 认为缺乏乙烯时,乙烯受体被激

活;存在乙烯时,受体则失活。这种解释与 RebeKah 提出的乙烯受体野生型 ETR1 与其突变体的信号转导模型相一致^[12]。

多种乙烯受体的存在是乙烯反应顺利进行所必需,即使其中的一个受体功能丧失了或者发生了突变,乙烯反应也不受影响,而且这些同工型受体的特征都有微小的差异。例如这些受体对乙烯具有不同的亲和力,这样就可以扩大乙烯作用的活力范围^[13]。

总之,植物体内乙烯的感受和传导系统是极其复杂的,各种乙烯受体在植物发育过程中表达特性不同,可能起着完全不同的作用。深入了解每个受体的生理功能;乙烯敏感性相关的铜离子的转运机制,乙烯生物合成和乙烯感受之间的关系等问题,结合生理、生化和分子手段研究乙烯受体的表达,利用乙烯受体调节果实、蔬菜和切花成熟衰老的基因工程前景非常广阔。

参考文献(References):

- [1] CHANG C, KWOK S F, BLEECKER A B, *et al.*, *Arabidopsis* ethylene response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators[J]. *Science*, 1993, 262: 539-544.
- [2] SAKAI H, HUA J, CHEN Q G, *et al.* *ETR2* is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. *Proc Acad Sci USA*, 1998, 95: 5812-5817.
- [3] HUA J, SAKAI H, NOURIZADEH S, *et al.* *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in

- Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1321-1322.
- [4] HIRAYAMA T, KIEBER J J, HIRAYAMA N, *et al.* Responsive to antagonist, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1999, 97: 383-393.
- [5] KIEBER J J, ROTHENBERG M, ROAMN G, *et al.* *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the *raf* family of protein kinases [J]. *Cell*, 1993, 72: 427-441.
- [6] ALONSO J M, HIRAYAMA T, RONAN G, *et al.* EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 284: 2148-2152.
- [7] CHAO Q, ROTHENBERG M, SOLANO R, *et al.* Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ethylene-insensitive3 and related proteins [J]. *Cell*, 1997, 89: 1133-1144.
- [8] KEVIN L, WANG C, HAI Li, *et al.* Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks [J]. *Plant cell*, 2002, Supplement, 131-151.
- [9] FRANKHAUSER C, YEH K C, LAGARIAS J C, *et al.* PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulate light signaling in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 284: 1539-1541.
- [10] TIMAN D M, TAYLOR M G, CIARDI J A, *et al.* The tomato ethylene receptors *NR* and *Le-ETR4* are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation with a multigene family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5663-5668.
- [11] CATHERINE A, WHITELAW, NICHOLAS N, *et al.* Delayed abscission and shorter internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor *LeETR1* transcript in transgenic tomato [J]. *Plant Physiology*, 2002, 128: 978-987.
- [12] REBEKAH L GAMBLE, XIANG Qu, SCHALLER G Eric. Mutational analysis of the ethylene receptor *ETR1* role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity [J]. *Plant Physiology*, 2002, 128: 1428-1438.
- [13] BOULIKAS T. Nuclear localization signals (NLS) [J]. *Crit Rev Eucaryotic Gene Expr*, 1993, 3: 193-227.
- [14] ARAVIND L, PONTIN C P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 458-459.
- [15] RODRIGUEZ F I, ESCH J J, HALL A E, *et al.* A copper cofactor for the ethylene receptor *ETR1 Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 283: 996-998.
- [16] BLEECKER A B, ESCH J J, HALL A E, *et al.* The ethylene receptor family from *Arabidopsis* structure and function [A]. *Molecular basis of signal transduction plant [C]*. London: Biological Sciences, 1998. 353: 1405-1412.
- [17] HANS KENDE. Hormone response mutants. A plethora of surprises [J]. *Plant Physiology*. 2001, 125: 81-84.
- [18] WOESTE K E, YE C, KIEBER J J. Two *Arabidopsis* mutants that over produce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of L-aminocyclopropane L-carboxylic acid synthase [J]. *Plant Physiol*, 1999, 52: 530.
- [19] KOSUGI S, OHASHI Y. Cloning and DNA-binding properties of a tobacco ethylene insensitive 3 (*EIN3*) homolog [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 960-967.
- [20] OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Ethylene inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene responsive element [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 173-182.
- [21] SUZUKI K, SUZUKI N, OHME-TAKAGI M, *et al.* Immediate early induction of mRNAs for ethylene responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting [J]. *Plant J*, 1998, 15: 657-665.
- [22] HAO D, OHME-TAKAGI M, SARAI A. Unique mode of GCG-box recognition by the DNA binding domain of ethylene responsive element-binding factor (ERF domain) in plant [J]. *Biol Chem*, 1998, 273: 26857-26861.
- [23] STEFAN M, TRETSMANN. ERN1, a novel ethylene-regulated nuclear protein of *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 44: 11-25.

(上接第 37 页)

- [9] ERIOH H, GABRIELE N, YOSHIHIRO K K, *et al.* A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids [J]. *PNAS*, 2000, 97: 6108-6113.
- [10] DANIEL S B, KARSTEN T, WALTER F, *et al.* Reconstitution of Marek's disease. Virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of glycoprotein B-negative MDV-1 mutant [J]. *J virol*, 2000, 74: 11098-11099.
- [11] SANJAY M R, BLANCA L, ISABEL M G, *et al.* Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: Use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function [J]. *PNAS*, 2002, 99: 7054-7059.
- [12] PATEL G, NASMYTH K, JONES N. A new method for the isolation of recombinant baculovirus [J]. *Nucleic Acid Res*, 1992, 20: 97-104.
- [13] LUCROW V A, LEE S C, BARRY G F, *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* [J]. *J virol*, 1993, 67: 4566-4579.
- [14] WOYCHIK R P, KLEBIG M L, JUSTICE M J, *et al.* Functional genomics in the post-genome era [J]. *Mut Res*, 1998, 400: 3-4.