

charide more rapid, convenient and accurate. Also it is now possible to understand more complete the structure-function relationship of the trace oligosaccharide, while a variety of powerful

tools are combined.

Key words oligosaccharide, isolation, structural analysis

脱水蛋白研究进展*

翟大勇 沈黎明

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 植物在干旱胁迫下会产生许多逆境响应蛋白, 其中最常见的是脱水蛋白 (dehydrin). 脱水蛋白具有高度保守的序列. 根据近年研究的进展对脱水蛋白的功能和基因表达调控规律作了简要的综述.

关键词 脱水蛋白, 干旱胁迫, 基因表达

学科分类号 Q51

1 脱水蛋白的存在与结构

人们对比正常和干旱条件下生长的植物, 发现干旱胁迫可以诱导植物产生许多新的 mRNA 及蛋白质, 其中脱水蛋白 (dehydrin) 是目前人们研究得较多的一类与干旱相关的蛋白质. 按 Dure^[1]对逆激蛋白的分类, 脱水蛋白属于 LEA D-11 族. LEA (late embryogenesis abundant) 蛋白最初发现于棉花胚成熟后期, 至 1993 年已发现 18 个不同的种类, 后来发现正常生长的植株在逆境条件下也会诱导类似的蛋白质表达. 多数 LEA 蛋白的性质和功能尚不清楚. 脱水蛋白在特殊生理条件或逆境条件下大量出现 (谷物成熟胚或干旱胁迫下的幼苗中, 脱水蛋白可达可溶性蛋白的 1%), 它的结构和功能已引起了人们的浓厚兴趣, 迄今已对脱水蛋白进行了至少 100 例以上的研究 (根据发表结果统计).

最早发表的对脱水蛋白的研究是 1988 年 Mundy^[2]报道的水稻中的 RAB21 (RAB: responsive to ABA). 脱水蛋白之间的分子质量差别很大, 从 9 ku 到 200 ku 不等, 并且这些蛋白质的氨基酸序列与已知的各种酶均无明显

的同源性. 迄今已鉴定的大多数脱水蛋白均来自被子植物, 免疫抗体杂交技术^[3]表明植物脱水蛋白的抗体可与裸子植物 (如松树、银杏、蕨类等) 蛋白质发生交叉反应. 目前认为在光合生物中广泛存在着诱导脱水蛋白形成的机制. 现在还没有证据表明动物及非光合微生物中存在着与植物中脱水蛋白保守序列同源的逆境蛋白.

免疫定位和亚细胞分级分离的研究表明, 脱水蛋白可在细胞核及细胞质中出现, 而在细胞核中出现的情况随细胞种类的不同而异. 在成熟的玉米籽粒中注入 0.1 mmol/L 脱落酸 (ABA), 通过免疫荧光显微镜技术发现玉米种子脱水蛋白主要定位于糊粉层细胞、盾片薄壁细胞、盾片表皮细胞、微管束原及胚芽的细胞质及细胞核中^[4]; 而在茎干及根中则仅存在于细胞质中. 这些结果与玉米胚中 RAB17^[5]及小麦脱水蛋白 WCS120^[6]的免疫显微定位得出的结果一致. 通过亚细胞定位研究, 在 ABA 处理的水稻叶片及冷处理的菠菜叶片分别鉴定出脱水蛋白 RAB21^[2]及 CAP85^[7], 它

* 国家自然科学基金资助.

收稿日期: 1996-12-17, 修回日期: 1997-05-12

们主要存在于细胞质中而 RAB17 及 TAS14^[8] 定位于细胞核中。

脱水蛋白区别于其他蛋白质最主要的特征在于其保守性。首先它有一个富含赖氨酸的片段, 即 EKKGIMDKIKEKLPG, 称之为 K 片段 (K segment), 由 K 片段可形成一个兼亲性的 (amphipathic) α 螺旋^[1]。不同的脱水蛋白具有 1 到 11 个 K 片段拷贝。其次, 许多脱水蛋白有一个丝氨酸束 (track), 称为 S 片段 (S segment)。在玉米 RAB17 及 TAS14 中, 丝氨酸残基可被磷酸化。有证据表明, 其丝氨酸磷酸化可能与核酸定位的信号肽的结合有关, 从而参与核酸的运输。最后脱水蛋白还有一个保守片段为 Y 片段, 即 (V/T) DEYGNP, 存在于大多数脱水蛋白氨基酸序列 C 端, Y 片段的氨基酸序列与植物及细菌的伴侣分子 (chaperones) 的核苷酸结合位点有相似之处, 但现在还未发现脱水蛋白存在核苷酸结合位点。人们常用 “YSK” 表示脱水蛋白并且据此分成五个亚类, 不同脱水蛋白的主要区别在于 K 片段之间及 N 端非保守区的氨基酸组成的差异, 在这些非保守区通常含有大量的甘氨酸残基及一些带电荷的极性氨基酸。

迄今为止 (至 1995 年 4 月) 共有 55 个完整的脱水蛋白序列已被测定^[9], 其保守的 K 片段如下:

E ₄₈ K ₅₅ K ₄₉ G ₅₄ I ₂₈ M ₃₅ D ₃₂ K ₅₅ I ₅₅ K ₅₅ E ₄₅ K ₅₄ L ₄₄ P ₅₁ G ₅₅	
H ₄ E ₆ S ₁ F ₁₁ L ₁₀ E ₂₂ D ₈ Q ₁ I ₁₀ H ₃	
Q ₂ M ₇ V ₅ G ₁ Q ₂ F ₁ T ₁	
K ₁ V ₆ A ₄	
L ₃ T ₁	

英文字母为氨基酸的简写代码, 右下标数字表示 55 种脱水蛋白中出现的次数。

2 脱水蛋白的功能

Close 等^[10]认为, 从代谢和进化角度来看, 脱水蛋白是植物对干旱胁迫的一种适应性的保护反应。首先脱水蛋白的产生需要 mRNA 的转译, 需要能量和氨基酸, 而不仅仅是某种蛋白质的降解残余产物; 其次脱水蛋白的合成

出现在大多数蛋白质降解的时期, 其合成的优先性表明它很可能起一种积极作用; 另外各种不同植物脱水蛋白氨基酸序列具有高度的保守性并有着类似的表达调控, 因此脱水蛋白很可能在植物干旱适应上起积极作用。

人们对玉米 G50 脱水蛋白 (Y_nSK₂ 型) 进行了大量的研究, 得出了一系列与脱水蛋白功能有关的结论。功能研究进展主要集中在两个方面: 一是 K 片段的研究 (K 片段存在于所有的脱水蛋白中), 二是总的氨基酸组成的倾向性, 即高含量的甘氨酸及其他带电荷的极性氨基酸。

迄今为止所有资料均表明, 脱水蛋白可通过 K 片段形成一个兼亲性 α 螺旋。利用 α 螺旋氨基酸序列的分析及兼亲性 α 螺旋的螺旋辐射状构象可推测脱水蛋白的特性。在中性条件下用圆二色谱技术分析发现玉米 G50 脱水蛋白仅含有 10% ~ 15% 的 α 螺旋, 这相当于仅仅是由两个 K 片段形成了短的 α 螺旋。尽管从氨基酸序列分析预测 G50 主要具有亲水性, 但实际上 G50 在体外亦具有疏水性。其疏水性可能是由 K 片段形成的兼亲性 α 螺旋造成的。如果仅考虑 K 片段的 10~12 个残基 (即 IMDKIKEKLPG 至 GIMDKIKEKLPG), 它们形成的构象属于兼亲性螺旋 A 类。通过 K 片段形成的兼亲性 α 螺旋, 为脱水蛋白的亲脂性提供了结构基础, 所以脱水蛋白 K 片段的一个功能也许在于可以与部分变性蛋白质及膜的疏水相互作用, 从而防止蛋白质和膜进一步变性^[9]。

大多数脱水蛋白富含甘氨酸及其他带电荷的极性氨基酸。用圆二色谱分析 G50 (17.8 ku) 得出其无序化部分占了 75%。这也许可以用来解释脱水蛋白的热稳定性和高溶解性, 因其内部缺少折叠区, 受热也就难使其凝聚, 这样脱水蛋白就可以利用其 K 片段兼亲性特性与其他的蛋白质结合进而保护其他蛋白质。

纯化的玉米脱水蛋白在体外对萝卜乳酸脱氢酶的冻融测试上表现出很强的保护活性, 特

别是与已知的可溶性小分子溶质如蔗糖、脯氨酸、甜菜碱等联合作用时其保护作用更明显. 1985 年 Arakawa 和 Timasheff 提出排斥理论 (exclusion theory) 来解释小分子溶质对蛋白质的保护作用. 该理论的核心是水溶液中一些溶质与蛋白质特定结构域之间具强烈的排斥作用, 于是远离这些蛋白质结构域的水溶液中含有较多的溶质而其附近溶质浓度较低, 这代表了一种特定的较稳定的有序状态. 假如在溶质存在的情况下, 蛋白质变性, 其折叠区打开, 暴露出更多的表面积, 这就使得溶质-水-蛋白质系统转变为一种更加有序的状态, 这在热力学上是不稳定的. 按照这种理论, 可溶性小分子溶质可以抑制蛋白质的变性. 脱水蛋白对蛋白质的保护作用, 特别是脱水蛋白与小分子溶质之间的增效作用 (synergism), 也可以用排斥理论来解释. 脱水蛋白在防止蛋白质变性方面可能比一般的溶质 (如蔗糖等) 具有更大的优势, 因为它既可以通过丰富的亲水残基与水结合成水合分子, 与普通溶质一样通过排斥作用促使变性蛋白质复性, 同时又可以通过疏水的 K 片段与部分变性的蛋白质及膜结合, 形成新的物理界面, 加强了蛋白质特定结构域与小分子溶质的排斥作用, 可防止蛋白质及膜的进一步变性. 这样看来, 脱水蛋白实际上起着蛋白质分子伴侣的作用^[9].

3 基因表达与调控

在脱水蛋白基因定位方面迄今研究得最清楚的是大麦. 1989 年之前对大麦 *dhn1* ~ *dhn4* 基因进行了研究, 它们均属于 Y_nSK_2 型, 其后又发现了 *dhn5* (K_9) 和 *dhn6* (YSK_3). 这几个基因分布在大麦 7 条染色体中的三条染色体上, 其中 *dhn1*, *dhn2*, *dhn4a* 在第七条染色体上, *dhn6* 在第四条染色体上, *dhn4b*, *dhn5*, *dhn3* 在第六条染色体上^[11]. 通过比较不同的表现型的物种和品种的脱水蛋白在染色体上定位的数量, 可以了解脱水蛋白在胁迫条件下所起的作用.

对于脱水蛋白基因表达的调控是人们关注

的焦点之一. Rouse 等^[12]对拟南芥脱水蛋白基因 Xero21lti30 进行了启动部位及表达规律的研究. 他们把不同的启动区段接到报告基因 GUS 上, 再转到根尖悬浮细胞中, 发现 GUS 基因可在干旱、外源 ABA、冷等多种胁迫下表达, 另外利用启动子基因缺失技术发现该基因具有多顺式调控元件, 这些研究均说明该基因可能受多种外界信号调节.

Godoy 等^[8]的研究表明菠菜 TAS14 基因在等摩尔的甘露醇和 NaCl 处理时均大量表达, 说明 TAS14 的表达很可能是受渗透调节控制的. 外源 ABA 同样诱导 TAS14 的大量表达. TAS14 与 RAB17 及 COR47 同源性很高, 而后两者在 ABA 突变株中均不能被诱导表达, 除非加入外源的 ABA. TAS14 在茎秆及叶中大量表达, 而在根中仅有痕量或瞬时表达, 在豌豆中发现的一个 23 ku 的脱水蛋白也有与 TAS14 类似的表达特性. 大麦中一种脱水蛋白 HVA1^[13], 在苗龄三天的干旱胁迫幼苗所有组织中均大量表达, 而到第七天时叶中的 HVA1 的表达则急剧下降. 所有这些结果均表明, 脱水蛋白的表达除了受环境诱导外, 还进一步受发育阶段及组织特异性的调控.

4 展 望

虽然人们对脱水蛋白的存在、结构和基因表达规律有了许多了解, 但仍需深入探讨两个关键问题, 即脱水蛋白基因表达的信号转导与基因的开关调控和脱水蛋白的功能. 从目前研究结果分析, 脱水蛋白是由多基因调控的, 在植物体内表达时常常不只出现一种, 具体机理仍需进一步探讨. 至于脱水蛋白的功能, 普遍认为它可能在保护蛋白和膜变性以及核酸转移运输方面起作用. 其保护作用可能与脱水蛋白的保守序列有关. 至于核酸的转移运输的功能仅仅是从丝氨酸残基的可磷酸化及核定位得出的一种推论, 尚缺乏直接证据. 可以预见, 进一步深入开展对脱水蛋白功能及其表达调控规律的研究, 更全面地了解植物抗旱反应的生理生化机制, 必定会为人们更好地利用和开发新

的抗旱品种提供理论基础.

参 考 文 献

- 1 Dure L. Response of plants to cellular dehydration during environmental stress. Rockville: American Society Physiologists, 1993. 91~ 103
- 2 Mundy J, Chua N H. Absciscic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. EMBO J, 1988, 7 (8): 2279~ 2286
- 3 Close T J, Fenton R D, Moonan R. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. Plant Mol Biol, 1993, 23 (1): 279~ 286
- 4 Asghar R, Fenton R D, DeMason D A *et al.* Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. Protoplasma, 1994, 177 (1): 87~ 94
- 5 Goday A, Jensen A B, Culianez-Macia F A *et al.* The maize abscisic acid responsive protein Rabr 17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. Plant Cell, 1994, 6 (3): 351~ 360
- 6 Houde M, Daniel K J, Volk O H *et al.* Immunolocalization of freezing-tolerance associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. Plant J, 1995, 8 (3): 583~ 593
- 7 Neven L G, Haskell F W, Hofig A *et al.* Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. Plant Mol Bio, 1993, 21 (2): 291~ 305
- 8 Godoy J, Lunar R, Torres-Schumann S *et al.* Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. Plant Mol Biol, 1994, 26 (6): 1921~ 1934
- 9 Close T J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Physio Plant, 1996, 97 (4): 795~ 803
- 10 Close T J, Chandler P M. Cereal dehydrins: serology, gene

mapping and potential functional roles. Aust J Plant Physiol, 1990, 17 (3): 333~ 344

- 11 Pan A, Hayes P M, Chen F *et al.* Genetic analysis of the components of winterhardness in barley. Theor Apple Genet, 1994, 89 (7~ 8): 900~ 910
- 12 Rouse D T, Marotta R, Parish R W. Promoter and expression studies on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. FEBS Lett, 1996, 381 (1): 252~ 256
- 13 Marttila S, Tenhola T, Mikkonen A. A barley (*Hordeum vulgare* L.) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles. Planta, 1996, 199 (4): 602~ 611

Progress in Dehydrin Research. ZHAI Da-yong, SHEN Li-ming (College of Biological Science, Agricultural University of China, Beijing 100094, China).

Abstract A number of stress-induced proteins are produced in plants in response to drought stress, among which dehydrin is the most common one. Concerns on the highly conserved sequence and the large quantity expression of dehydrin have led to numerous significant findings about the biological role and the regulation of gene expression of the stress-responsive proteins. Recent progress of the dehydrin research is described.

Key words dehydrin, drought-stress, gene expression

成纤维细胞生长因子的双受体系统

郑 莉 柳 川 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 成纤维细胞生长因子 (FGFs) 对于细胞代谢的刺激作用是通过双受体系统 (dual receptor system) 介导的. 该系统包括一个酪氨酸激酶受体家族 (FGFRs) 及肝素硫酸蛋白多糖 (HSPG). 目前已知有 4 种 FGFRs 基因, 其转录过程表现出剪切多样性. FGFs 与 FGFRs 的结合表现出交叉特异性. HSPG 可促进 FGFs 与 FGFRs 的结合和受体二聚体的形成, 并增强 FGFs 对细胞调控的精度. FGFRs 通过激活不同下游信号分子影响细胞有丝分裂、神经细胞轴突生长、胚胎发育等.

关键词 成纤维细胞生长因子受体, 肝素硫酸蛋白多糖, 双受体系统

学科分类号 Q78