

植物胞间连丝相关蛋白研究进展*

吴晓东 杨世杰¹⁾

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 概要综述近几年来植物胞间连丝相关蛋白(PAPs)与动物间隙连接蛋白(connexins)的同源性、PAPs的定位、PAPs的磷酸化、以及PAPs的分子生物学的最新研究进展,并展望该领域的研究前景。

关键词 胞间连丝相关蛋白, 间隙连接蛋白, 交叉反应, 磷酸化

胞间连丝(plasmodesmata)是植物细胞间物质运输和信息传递的通道。它是贯穿细胞壁的质膜围绕的管状结构,内质网贯穿其中,处于胞间连丝内的这段内质网通常呈压缩的圆柱体,称为压缩内质网(apressed ER, 曾被称为连丝微管 desmotubule),压缩内质网外侧与质膜内侧均有蛋白质颗粒,使质膜与内质网之间的胞质套筒(cytoplasmic sleeve)内仅有直径约2.5nm的微小的通道。胞间连丝两端常紧缩为颈区(neck region)。细胞内外因子变化可使颈区收缩或扩张,从而调控细胞之间的物质运输。

近年来,在胞间连丝的结构、通透性及调节,以及病毒与胞间连丝的相互作用等方面的研究进展均较快。胞间连丝埋于细胞壁内,分离十分困难,因而至今对胞间连丝的分子组成不甚清楚。胞间连丝相关蛋白(plasmodesma-associated proteins, PAPs)的揭示,使胞间连丝的研究已经深入到分子水平。本文综述国内外胞间连丝相关蛋白的最新研究进展。

1 PAPs 与 Connexins 的同源性

间隙连接(gap junction)是动物细胞间的通道。对间隙连接的功能特性、生化组成及拓扑学有较清楚的了解。

Meiners^[1]注意到植物胞间连丝与动物间隙连接之间有许多相似性,包括影响通透分子大小极限(size exclusion limit, SEL)的电学

特性,以及对蛋白激酶C效应物的负调节(down-regulation)等。因而认为,胞间连丝相关蛋白与间隙连接蛋白(connexins)之间存在着生化同源性。

免疫学研究表明,双子叶植物中的肽与哺乳动物间隙连接蛋白 connexin32^[1~5]以及 connexin26^[2,6,7]具有免疫相关性。这些起交叉反应的蛋白质^[2,5~7]与胞间连丝相关。

Yahalom等^[8]用玉米(*zea mays*)进行免疫细胞化学研究,提供了植物中存在与 connexins 同源的蛋白的明确证据。使用亲和纯化的抗 connexin32 和 connexin 43 的抗体,间接免疫金定位表明,玉米中胚轴胞间连丝含有两种与 connexins 抗体发生交叉反应的蛋白质。与 connexin32 抗血清起交叉反应的 27 ku 胞间连丝相关蛋白称为 PAP27,与 connexin43 抗血清起交叉反应的 26 ku 蛋白称为 PAP26^[8,9]。

Monzer^[9]利用龙葵(*solanum nigrum*)茎尖检测与细胞壁组分相关的蛋白质,将从各种细胞组分中抽提的蛋白质与细胞壁相关蛋白相比较,发现分子质量为 28 和 43 ku 的两种蛋白质在壁组分中高度富集。

Epel等^[10]制备了抗 17、26、32、41、51 和 64 ku 的壁相关多肽的多克隆抗体,用蛋白质印迹分析不同的细胞组分,发现 17、26、

*国家自然科学基金资助项目。 ¹⁾通讯联系人。

收稿日期: 1995-12-18, 修回日期: 1996-03-21

32 和 51 ku 蛋白质只在壁组分中才能检测到, 表明这些蛋白质很可能是胞间连丝特异的。

Hunte 等^[11]使用抗小鼠肝 connexin26 的抗体, 免疫金定位研究表明, 蚕豆 (*vicia faba*) 细胞壁中有与 connexin26 抗体发生交叉反应的 21 ku 蛋白质。

潘照明等^[12]使用抗动物 connexin 32 的抗体, 检测到纯化后的玉米胚轴组分中 50 ku 的肽, 能与该抗体发生交叉反应。

对胞间连丝相关蛋白与动物间隙连接蛋白的同源性的研究, 打开了研究胞间连丝分子组成的突破口。然而, 对于 PAPs 是否真正与 connexins 同源, 以及是否在少数抗原表面显示非常有限的同源性, 尚待深入研究。

2 PAPs 的定位

PAPs 在植物细胞中的定位大多应用免疫细胞化学方法来研究。

Yahalom 等^[8]和 Kotlizky 等^[13]的研究表明, PAP27 免疫定位在胞间连丝的外围部分, 是一种外周膜蛋白, 而 PAP26 沿着整个胞间连丝分布, 包括在胞间连丝孔 (orifice) 附近的质膜部位。经组织匀浆与梯度离心, 发现 PAP27 不仅与细胞壁组分相关, 还与另一些膜组分及可溶性组分相关。

Epel 等^[14]在光镜下用银增强 (silver-enhanced) 免疫金标研究显示, 41 ku 蛋白质与中柱及皮层细胞的壁均相关。用免疫金电镜定位研究显示, 41 ku 蛋白定位在胞间连丝上, 在胞间连丝的所有部位都能观察到金颗粒, 表明蛋白质散布于整个胞间连丝。免疫金电镜定位研究还显示, 41 ku 蛋白还定位在高尔基器膜上, 表明该蛋白很可能通过高尔基器运输到胞间连丝。Hepler^[15]认为, 在初生壁形成时, 成膜体附近的高尔基器融合, 结果形成了部分初生胞间连丝。

众所周知, 植物的分生组织区域有较多的初生胞间连丝。Turner^[16]在玉米幼苗 2 mm 的根尖段中检测到与细胞壁相关的蛋白质。Turner^[16]还发现了分子质量 100、70 和 40 ku

三种主要壁相关蛋白, 这些蛋白能用 Triton X-100 或 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-丙磺酸 (CHAPS) 抽提。

胞间连丝是一种高度特化的细胞质跨壁通道, 欲明确地确认以上细胞壁相关蛋白是否是 PAPs 尚须将每一种蛋白质在胞间连丝上精确定位。

近几年提出的胞间连丝模型, 都认为胞间连丝质膜内侧及压缩内质网外侧均有蛋白质颗粒分布。遗憾的是, 迄今为止, 免疫金定位尚不能更精确地进行 PAPs 的定位研究。

3 PAPs 的磷酸化

大量证据表明, 动物细胞中通过间隙连接的运输受磷酸化机制的调节。已发现几种 connexins 的磷酸化是在蛋白激酶 C、依赖钙调蛋白的蛋白激酶以及依赖 cAMP 蛋白激酶作用下完成的。研究表明, 间隙连接蛋白的磷酸化与间隙连接门控 (gating) 之间具有相互伴随的关系。

胞间连丝通透性的门控, 也是通过尚未鉴定的调节因子的磷酸化与去磷酸化实现的^[17~20]。用分离的纯净壁组分与分离的胞间连丝进行的体外磷酸化的研究支持上述假说^[21]。在标记的 ATP 存在情况下, 包括 PAP41 和假设的胞间连丝相关蛋白 17 (pPAP17) 在内的几种蛋白, 被一种或几种内源性依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶磷酸化。在硝酸纤维素纸上进行原位磷酸化显示, 至少存在两种分子质量为 51~56 ku 的多肽进行的自动磷酸化 (autophosphorylation)。细胞壁相关蛋白激酶或 PAPs 激酶被 Ca^{2+} 活化, 但不被磷脂和钙调蛋白活化。使用 3 mol/L NaCl, 2% Triton X-100 或 100 mmol/L Na_2CO_3 (pH 11), 进行过夜抽提, 才能使蛋白质磷酸化, 表明这些激酶很可能与细胞壁或胞间连丝组分紧密结合。当 LiCl 的浓度达到 4 mol/L 时, 则增强磷酸化。在 8 mol/L LiCl 中过夜抽提, 可使内源的激酶从细胞壁或胞间连丝释放, 并使磷酸化完全中止。

必须指出, 目前尚缺少有关在体内使 PAPs 磷酸化的蛋白激酶功能的直接证据, 这些激酶在胞间连丝通透性的调节上起作用的假说也尚待证实。

4 PAPs 的分子生物学

PAPs 的分子生物学研究尚处于起步阶段。

Epel 等^[14]根据实验结果分析, 胞间连丝与间隙连接相似, 也由不同的分子亚单位组成, 并随植物的不同组织与器官而异。用蛋白质印迹分析显示, PAP26、PAP41 和 pPAP17 在不同器官中有不同的表达水平: PAP26 存在于叶与中胚轴, 但基本不存在于根; pPAP17 存在于根与中胚轴, 但在叶中检测不到; PAP41 则发现于所有被检测的器官中。尽管三种蛋白在中胚轴的皮层中的特异性浓度高于中柱中的, 但仍呈现相似的表达水平。结果还显示, 在皮层与中柱之间表达水平的差异而言, pPAP17 和 PAP26 比 PAP41 更加明显。这种 PAPs 在植物器官与组织中表达的差异, 暗示可能存在胞间连丝的器官与组织特异性。

Meiners 等^[4]从编码与 connexin 32 的抗体有交叉反应的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 表达文库中, 分离并测序了一个 cDNA 克隆, 称为 CX32。他们将推断的氨基酸序列与大鼠 connexins 的氨基酸序列进行比较得出了拟南芥 CX32 蛋白与动物 connexins 的序列具有较多同源的结论。

Mushegian 和 Koonin^[22]使用一个在统计学上更严密的比较程序, 重新对以上序列进行了比较分析, 认为拟南芥 CX32 蛋白与动物 connexins 并无联系, 但与一种蛋白激酶类似的蛋白质 (protein kinase-like protein) 有更密切的联系。

5 展 望

长期以来, 胞间连丝的生化与分子组成一直未被阐明, 至使对胞间连丝的物质运输和信息传递机制还不清楚。90 年代前后, 开始有对胞间连丝生物化学的研究。由于胞间连丝极

纤细, 又贯穿与包埋于细胞壁中, 给直接分离带来了很大困难。潘照明和娄成后经研究认为, 植物体中有类似动物间隙连接蛋白的物质存在^[12], 进而将间隙连接蛋白类似物定位在蚕豆叶肉细胞原生质体表面的某些区域^[23]。

目前国际上胞间连丝的生化与分子组成研究尚处于鉴定与定性 PAPs, 以及研究其调节的阶段。在胞间连丝的组成与调节研究方面, 还必须注重对器官与组织特异性差别的研究。迄今为止, 有关 PAPs 的研究大多使用玉米为实验材料, 必须拓展供试材料的范围。

一旦彻底弄清了 PAPs 在胞间连丝上的定位、特性及基因结构, 就能利用这些分子作为工具, 来探索植物细胞间与组织间业已存在的精确协调的相互关系。

参 考 文 献

- 1 Meiners S, Schindler M. J Biol Chem, 1987; **262**: 951
- 2 Hunte C, Schnabl H, Traub O *et al.* Bot Acta, 1992; **105**: 104
- 3 Meiners S, Baron-Epel O, Schindler M. Plant Physiol, 1988; **88**: 791
- 4 Meiners S, Xu A, Schindler M. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 4119
- 5 Xu A, Meiners S, Schindler M. In: Robards A W eds. Parallels in cell to cell junctions in plants and animals, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 171
- 6 Hunte C, Janssen M, Schulz M *et al.* Bot Acta, 1993; **106**: 207
- 7 Schulz M, Traub O, Knop M *et al.* Bot Acta, 1992; **105**: 111
- 8 Yahalom A, Warmbrodt R D, Laird D W *et al.* Plant Cell, 1991; **3**: 407
- 9 Monzer J, Kloth S. Bot Acta, 1991; **104**: 82
- 10 Epel B L. Plant Mol Biol, 1994; **26**: 1343
- 11 Hunte C, Schnabl H, Traub O *et al.* Bot Acta, 1992; **105**: 104
- 12 潘照明, 娄成后. 科学通报, 1995; **40**: 270
- 13 Kotlizky G, Shurtz S, Yahalom A *et al.* Plant J, 1992; **2**: 623
- 14 Epel B, Yahalom A, Katz A *et al.* Biol Plant, 1994; **36**: 5239
- 15 Hepler P K. Protoplasma, 1982; **111**: 12
- 16 Turner A, Wells B, Roberts K J. Cell Sci, 1994; **107**:

3351

- 17 Baron-Epel O, Hernandez D, Jiang L W *et al.* J Cell Biol, 1988; **106**: 715
- 18 Cleland R E, Fujiwara T, Lucas W J. Protoplasma, 1994; **178**: 81
- 19 Tucker E B. Planta, 1988; **174**: 358
- 20 Tucker E B. Protoplasma, 1993; **174**: 45
- 21 Epel B L, Kuchuck B, Kotlizky G *et al.* In: Galbraith D W eds. Methods in cell biology: plant cell biology. New York: Academic Press. 1995: 438~459
- 22 Mushegian A R, Koonin E V. Plant Cell, 1993; **5**: 998
- 23 潘照明, 姜成后. 科学通报, 1996; **41**: 353

Progress of the Study on Plasmodesma-Associated Proteins in Plants. Wu Xiaodong, Yang

Shijie (*College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China*).

Abstract The recent advance of the plasmodesma-associated proteins (PAPs) in plants was reviewed. The homologies between plasmodesma-associated proteins and animal gap junction connexins, the localization of PAPs, the phosphorylation of PAPs and the molecular biology of PAPs were included. The research prospects of PAPs were forecasted as well.

Key words plasmodesma-associated proteins, connexins, cross-reaction, phosphorylation

胶质细胞源神经营养因子研究进展

陈 燕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 叙述了新近纯化的胶质细胞源神经营养因子 (GDNF) 的生物功能及其在鼠胚中的分布. 着重介绍了该因子对损伤的多巴胺能神经元及运动神经元促进存活、修复损伤及再生的活性.

关键词 胶质细胞源神经营养因子, 多巴胺能神经元, 运动神经元, 神经再生与修复, 帕金森氏症

胶质细胞源神经营养因子 (GDNF) 是近来发现并已克隆其基因的一个蛋白因子. 它首先是从培养的鼠胶质细胞株 B49 中分离纯化出来, 它能激活体外培养的鼠胚中脑腹侧多巴胺 (DA) 能神经元摄取多巴胺, 促进神经元的存活^[1]. 该因子是由两个单体通过二硫键连接形成的二聚体, 单体是由 134 个氨基酸构成的糖基化肽链. 从结构上看它属于转化生长因子 β 家族 (TGF- β) 的远亲. 研究表明, 受运动神经元支配的肌肉组织在胚胎发育期表达较高的 GDNF mRNA. 用 I^{125} -GDNF 注入鼠后脚脚垫, 它通过与神经末梢受体结合进入神经纤维, 经轴突的逆向传输进入胞体. 可以在胞体中检测到 I^{125} -GDNF 的存在^[2]. 同样, 在中脑黑质 DA 能神经元靶部位纹状体注入 I^{125} -

GDNF 亦能在黑质 DA 神经元胞体中检测到标记的 GDNF^[3].

1 GDNF mRNA 的分布

人们用组织切片、分子原位杂交、RNase 保护分析及 RT-PCR 方法对鼠胚发育期间 GDNF mRNA 的分布作了较为全面的检测. 与 GDNF 对各种神经元功能研究相一致, 发现许多接受 GDNF 营养作用的神经元的靶组织一般都表达 GDNF mRNA. 鼠胚纹状体胚胎期表达 GDNF mRNA 是中枢神经系统中最高的, 直至出生后仍有较高表达^[4,5]. 运动及感觉神经元的靶组织肌肉、皮肤在鼠胚胎期都有较高