

利用酵母双杂交系统筛选水稻类受体激酶 OsWAK50 胞内域相互作用蛋白*

孙丽静¹⁾ 张 芊²⁾ 路铁刚²⁾ 孙 颖^{1)**}

¹⁾ 河北师范大学分子细胞生物学研究所, 河北省分子细胞生物学重点实验室, 石家庄 050016;

²⁾ 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 细胞壁连接的类受体激酶(wall-associated kinase, WAK)是植物细胞中一类特有的类受体激酶基因亚家族, 因其胞外域与细胞壁紧密相连而得名。水稻中共有 125 个 *OsWAK* 基因, *OsWAK50* 编码的蛋白质具有胞外域、跨膜域和激酶域, 呈现典型的 WAK 样受体激酶特征。首先通过对 *OsWAK50*-GFP 融合蛋白的观察发现 *OsWAK50* 定位于细胞膜并且与细胞壁偶联。进而通过酵母双杂交系统筛选到了 20 个可能与 *OsWAK50* 胞内域相互作用的候选蛋白, 并通过一对一酵母转化验证了 *OsSK4*、*OsSWIB* 和 *OsSWI3C* 全长均可与 *OsWAK50* 胞内域相互作用。进一步分析显示, *OsSWIB* 能够直接与 *OsWAK50* 激酶域互作, 而 *OsSK4* 和 *OsSWI3C* 与 *OsWAK50* 胞内域的互作是依赖于 *OsWAK50* C 端的。研究还表明, *OsSK4* 和 *OsSWIB* 亦能与 *OsWAK50* 同源基因 *OsWAK53a* 结合, 而 *OsSWI3C* 则不能与 *OsWAK53a* 结合。双分子荧光互补实验证明, *OsSK4* 与 *OsWAK50* 和 *OsWAK53a* 能够在植物体内发生互作。以上结果为阐明 *OsWAK50* 发挥功能的分子机制提供了重要线索。

关键词 水稻, 细胞壁连接的类受体激酶(WAK), 酵母双杂交, 蛋白质相互作用

学科分类号 Q291, Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00357

细胞壁连接的类受体激酶(wall-associated kinase, WAK)家族是植物类受体激酶(receptor-like kinase, RLK)超家族的一个成员, 因其胞外域能够与细胞壁偶联而得名。1996 年, He 等^[1]在拟南芥中发现了第一个 WAK 基因 *WAK1*, 并用生物化学以及免疫细胞化学的方法证明了 *WAK1* 与细胞壁紧密连接。拟南芥中的 WAK 家族由 5 个基因组成^[2], *WAKL* (*WAK-like*)家族由 21 个基因组成^[3]。从结构上看, WAK 包括一个胞内丝苏氨酸激酶域、一个跨膜域和一个包含表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)重复序列的胞外域。WAK 的表达模式具有组织特异性, 主要在叶和茎中表达, 参与了抵御病原菌的防御反应^[4]、金属离子胁迫反应^[5]和细胞伸长的调控^[6-7]等。

对单子叶模式植物水稻的数据库进行反复搜索和人工注解, 发现了 125 个 *OsWAK* 基因^[8]。其中, *OsWAK1* 转录水平受真菌侵染、机械伤害、水杨酸和茉莉酸诱导表达, 过表达 *OsWAK1* 能够增加

水稻对病原菌侵染的抗性, 证明 *OsWAK1* 在抵御病原菌侵害方面能够起到正调节作用^[9]。目前对 WAK 的特性分析、组织定位、基因功能和信号转导途径的研究大都集中在双子叶模式植物拟南芥, 对单子叶模式植物水稻中 WAK 的研究还很少。而水稻中 WAK 基因数目为拟南芥的近 5 倍, 在水稻进化过程中产生了如此多的 WAK 基因, 暗示其对水稻的生命活动可能有着特殊的意义。

OsWAK50 编码一个具有胞外域、跨膜域和胞内激酶域的典型类受体激酶, 本课题组前期研究结果初步显示其可能参与了植株的形态建成及侧生器官的发育^[10]。本文首先观察了 *OsWAK50* 的亚细胞

* 国家转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08001-003)和国家自然科学基金资助项目(30800701)。

** 通讯联系人。

Tel: 0311-86267213, E-mail: yingsun@mail.hebtu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-27, 接受日期: 2011-11-30

定位, 发现其定位于细胞膜并且与细胞壁偶联. 进而通过酵母双杂交系统筛选了 OsWAK50 胞内相互作用蛋白 OsSK4、OsSWIB 和 OsSWI3C, 并对其互作位点及特异性进行了初步分析, 为阐明 OsWAK50 发挥功能的分子机制提供了重要线索.

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α , 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105、GV3101 为河北师范大学分子细胞生物学研究所保存; 酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 AH109、酵母双杂交试剂盒及酵母培养基各组分购自 Clontech 公司; 水稻(*Oryza sativa*)日本晴(*Japonica*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia 生态型和烟草(*Nicotiana benthamiana*)为河北师范大学分子细胞生

物学研究所保存; 质粒 pMDC83、BD (pGBKT7)、AD (pGADT7)为河北师范大学分子细胞生物学研究所保存; pSPYNE 和 pSPYCE 由中国科学院植物研究所种康研究员惠赠; 质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司; RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司; 限制性核酸内切酶、PCR 所用 Taq 酶、RNA 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 其他为国产分析纯试剂.

1.2 载体构建

根据 KOME 数据库公布的基因序列, 设计基因特异引物, 下划线是外加的酶切位点(表 1). 以水稻 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 与载体分别双酶切, 胶回收酶切产物, 连接并转化大肠杆菌, 重组子经菌体 PCR 和酶切鉴定正确后, 送上海生工公司测序.

Table 1 Summary of constructions and primers

Construction	Forward primer	Reverse primer
OsWAK50-GFP	GCTCTAGACCTTGTAAC TTGCAGCAGG	CGGGATCCCCCATGGGAGGTCCATTGATA
BD-OsWAK50ID	CGGAATTCCTTGCAAAGCAGAAACAACG	CGGGATCCGGAGATTCAAACACCACCTC
BD-OsWAK50KD	CGGAATTCCTTGCAAAGCAGAAACAACG	CGGGATCCCTAAAGTTCAATTGCTACTTCTAC
BD-OsWAK50CT	CGGAATTCGAAGCGCTCAGAAGGTTAAT	CGGGATCCGGAGATTCAAACACCACCTC
BD-OsWAK53a	GGCATATGAGAAAAC TTGCGAAGATAAGA	CGGGATCCAAGGGAAAACATTGTGCT
AD-OsSK4	CGGAATTCATGGCAATGGCAATGGCGGC	CGGGATCCTTAGAAGGGCTTCCCAGCAG
AD-OsSWIB	CGGAATTCATGA ACTATAACCCTGAGAAG	CGGGATCCATGGCACTACAGTAATACCAA
AD-OsSWI3C	CATATGATGCCGCGGAAGGCCTCGT	GGATCCCTGAGGAAGCTACACTGGTTGG
OsWAK50-YFP ^N	GCTCTAGACCTTGTAAC TTGCAGCAGG	CGGGATCCCCATGGGAGGTCCATTGATA
OsWAK53a-YFP ^N	CGGGATCCTCCAT TCTCCTCCATGATCC	GGGGTACCAGGCTCAAAC TCGGAGGATG
OsSK4-YFP ^C	GCTCTAGAGCGGTCGTGCGGATAACGAAC	CGGGATCCGAAGGGCTTCCCAGCAGCTTC

1.3 烟草瞬时表达检测 OsWAK50 亚细胞定位

将 OsWAK50 去掉终止子的 cDNA 片段克隆到 pMDC83 载体 (OsWAK50-GFP) 并转入农杆菌 GV3101, 浸花法转化拟南芥, 取阳性苗根部于激光共聚焦显微镜 (LSM 510; Carl Zeiss) 下观察荧光. 用 0.5 mol/L NaCl 处理根部使细胞质壁分离.

1.4 诱饵蛋白的转录激活活性检测

采用 LiAc 转化法将诱饵载体 BD-OsWAK50ID 与空 AD 共转化酵母 AH109, 同时将阳性对照 BD-53/AD-RecT 及阴性对照 BD-Lam/AD-RecT 分别共转化酵母 AH109, 涂布 SD/-Leu/-Trp 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 天. 待克隆长出后, 挑取 5~10 个克隆划线于 SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp 平板上, 5 天后观察

菌体生长情况并拍照; 另外挑取 5~10 个克隆进行 β -Gal 染色.

1.5 酵母双杂交文库筛选与 OsWAK50 胞内域相互作用的蛋白质

按 Clontech 公司酵母双杂交操作手册进行. 首先提取水稻 12 天小苗全植株 RNA, 构建 cDNA 文库, 之后将其转化到已含有 BD-OsWAK50ID 的酵母菌 AH109 中, 涂于 SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp 平板. 将生长的转化子进行 3 轮 SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp 平板筛选, 挑取生长良好的克隆进行酵母菌体 PCR, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 用 *Hae* III 酶切的方法排除相同片段. 之后用 T7 引物对胶回收产物进行测序, 利用 NCBI 的数据库资

源, 用 BLAST 进行序列分析.

1.6 酵母共转化验证相互作用

采用 LiAc 转化法将测序正确的 BD-OsWAK50ID、BD-OsWAK50KD、BD-OsWAK50CT、BD-OsWAK53a 和 BD 分别与 AD-OsSK4、AD-OsSWIB、AD-OsSWI3C 和 AD 进行一对一的酵母共转化, 涂于 SD/-Leu/-Trp 平板. 待克隆长出后, 挑取 5~10 个克隆用无菌水重悬并梯度稀释后分别滴于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp 平板上, 5 天后观察菌体生长情况并拍照.

1.7 双分子荧光互补实验验证 OsWAK50 和 OsWAK53a 与 OsSK4 的相互作用

双分子荧光互补实验参考 Walter 等^[11]方法进行. 将 OsWAK50、OsWAK53a 和 OsSK4 去掉终止子的 cDNA 片段分别克隆到 pSPYNE 和 pSPYCE 载体. 分别将这些载体转入农杆菌 EHA105, 再侵染烟草叶片背面, 40~48 h 后取下表皮于激光共聚

焦显微镜(LSM 510; Carl Zeiss)下观察荧光.

2 结 果

2.1 OsWAK50 的亚细胞定位

细胞壁连接的类受体激酶 OsWAK50 (AK111730) 全长 760 个氨基酸, 生物信息学分析显示, 其编码的蛋白质从结构上可分为胞外域、跨膜域和胞内域(图 1a). 为了检测 OsWAK50 的亚细胞定位, 将去掉终止密码子的 OsWAK50 全长 cDNA 构建到 pMDC83 载体并测序验证 (OsWAK50-GFP), 通过农杆菌介导的遗传转化将其转入拟南芥. 对拟南芥根细胞观察结果显示, OsWAK50-GFP 定位于细胞表面; 质壁分离后, 除细胞膜上有荧光信号外, 细胞壁上也有少量信号存在(图 1b), 说明 OsWAK50 定位于细胞膜并且与细胞壁偶联.

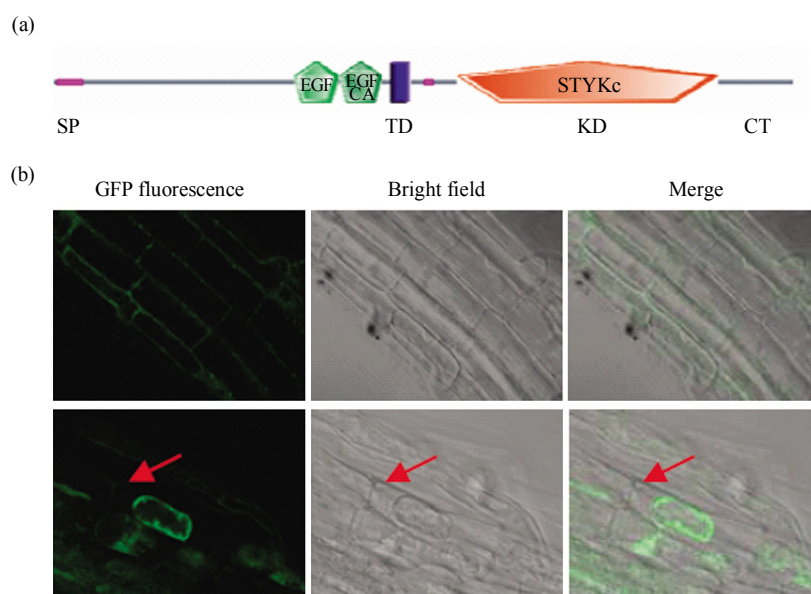


Fig. 1 Subcellular localization of OsWAK50

(a) Gene structure and domain composition of OsWAK50. SP: Signal peptide, TD: Transmembrane domain, KD: Kinase domain, CT: C terminal. (b) Subcellular localization of OsWAK50. Confocal images of *Arabidopsis* root cells constitutively expressing OsWAK50-GFP fusion protein before (up panel) and after (bottom panel) plasmolysis. Arrows indicate GFP fluorescence localized on the cell wall after plasmolysis.

2.2 诱饵载体 BD-OsWAK50ID 的构建及转录激活活性检测

为了筛选 OsWAK50 胞内域相互作用蛋白, 将其胞内域(372~760 个氨基酸)构建到 BD 载体并测序验证(BD-OsWAK50ID). 为检测 BD-OsWAK50ID 的转录激活活性, 将诱饵载体 BD-OsWAK50ID 与

空 AD 共转化酵母 AH109, 同时将阳性对照 BD-53/AD-RecT 及阴性对照 BD-Lam/AD-RecT 分别共转化酵母 AH109, 并划线于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上. 结果显示, 只有阳性对照生长, 而其他不生长, β -Gal 染色只有阳性对照变蓝而其他不变蓝(结果未展示), 说明 BD-OsWAK50ID 无转录

激活活性, 可以用于酵母双杂交文库筛选.

2.3 酵母双杂交筛选与 OsWAK50 胞内域相互作用的蛋白质

将诱饵载体 BD-OsWAK50ID 和水稻 12 天小苗全植株 cDNA 文库通过顺序共转的方法建立了酵母双杂交文库. 库容量为 2.2×10^6 , 共得到 174

个可能的阳性克隆, 大部分克隆在 3 次反复划线验证后仍然可在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上生长. 随后通过酵母菌体 PCR 和测序相结合的方法, 结合生物信息学分析, 共得到了 20 个非重复、正确融合的候选基因序列(表 2).

Table 2 Summary of yeast two-hybrid screen of OsWAK50 intracellular interacting protein

Gene ID	Number of clone	Protein length of matching (aa)	Definition
AK064812	35	210 (Full length)	Shikimate kinase family protein (<i>OsSK4</i>)
AK108218	1	88	SWIB complex BAF60b domain-containing protein (<i>OsSWIB</i>)
AK066941	1	240	SWIRM domain-containing protein (<i>OsSWI3C</i>)
AK072521	1	92	Two-component phosphorelay mediator 3
Os12g0207600	2	27	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor
AK066062	1	151 (Full length)	Late embryogenesis abundant protein
AK103344	1	117	L-ascorbate peroxidase
AK073969	3	99	Sulfite reductase/ferredoxin (SIR)
AK105030	1	52	Elongation factor 1-alpha/EF-1-alpha
AK066495	1	22	Calcium-dependent protein kinase, putative/CDPK
AK103260	1	129 (Full length)	Triticum aestivum succinate dehydrogenase subunit 3
AK108395	1	105	Ribosomal protein L13 family protein
AK060711	1	88	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4A)
AK104255	1	67	Nodulin MtN3 family protein
AK100123	1	75	Expressed protein
AK104169	1	104	Methionine sulfoxide reductase domain-containing protein
AK098950	1	52	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
AK106182	1	46	Remorin family protein
EAZ12913	1	53	Lipase (class 3)
AK104899	1	150	Fructose-bisphosphate aldolase

酵母双杂交文库中, 有 35 个克隆均编码 OsSK4(AK064812), 为莽草酸激酶(shikimate kinase)家族的一个成员, 另外, 本实验中还筛选到了 2 个染色体重塑复合体蛋白, OsSWIB (AK108218)和 OsSWI3C (AK066941), 将上述 3 个基因做为互作的候选基因.

2.4 酵母双杂交验证候选基因与 OsWAK50 胞内域相互作用

为了验证 OsSK4、OsSWIB 以及 OsSWI3C 与 OsWAK50 胞内域的相互作用, 设计引物分别扩增以上 3 个基因的全长 cDNA, 并将其构建到 AD 载体上, 将酶切鉴定及测序正确的载体依次命名为 AD-OsSK4、AD-OsSWIB 和 AD-OsSWI3C.

将 AD-OsSK4、AD-OsSWIB 和 AD-OsSWI3C 分别与空 BD 或 BD-OsWAK50ID 共转化酵母 AH109, 将共转成功的酵母分别滴于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上(图 2). 所有的菌在 SD/-Leu/-Trp 平板上均能够正常生长. 而从 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板的生长情况上看, AD-OsSK4、AD-OsSWIB 及 AD-OsSWI3C 与空 BD 共转化的酵母均不能生长, 说明 AD-OsSK4、AD-OsSWIB 及 AD-OsSWI3C 均不能单独激活报告基因, 而 AD-OsSK4、AD-OsSWIB 及 AD-OsSWI3C 与 BD-OsWAK50ID 共转化的酵母均可生长, 再次证明 OsSK4、OsSWIB 及 OsSWI3C 均能与 OsWAK50 胞内域相互作用.

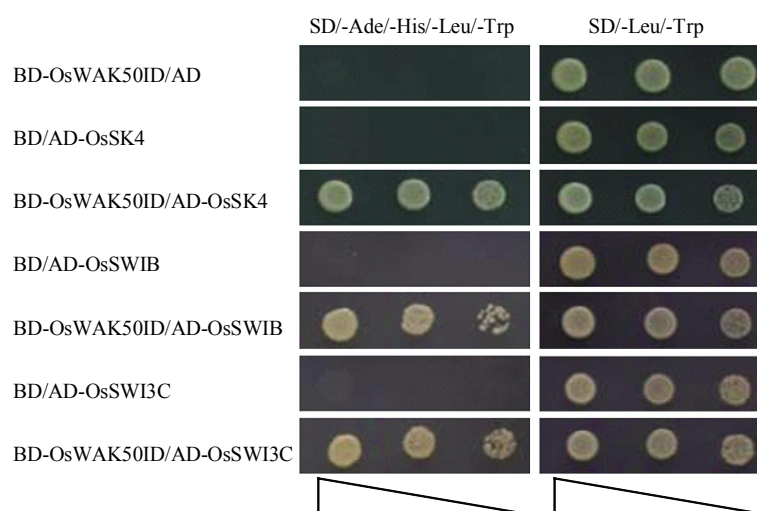


Fig. 2 OsWAK50 intracellular domain interacts with OsSK4, OsSWIB and OsSWI3C in the yeast two-hybrid assay

The indicated combinations of plasmids were co-transformed into the yeast strain AH109. Yeast was shown after 5 days inoculation on limited medium SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp.

2.5 OsWAK50 激酶域与候选基因的互作检测

OsWAK50 胞内域由两个结构域组成：激酶域和 C 端。为了进一步研究 3 个候选基因与 OsWAK50 胞内域不同结构域之间的相互作用，分别将 OsWAK50 激酶域(372~683 个氨基酸)和 C 端(684~760 个氨基酸)构建到 BD 载体上，将酶切鉴定及测序正确的载体分别命名为 BD-OsWAK50KD (Kinase Domain)和 BD-OsWAK50CT (C Terminal)。

首先进行 BD-OsWAK50KD 和 BD-OsWAK50CT

的转录激活活性检测，将 BD-OsWAK50KD 和 BD-OsWAK50CT 分别与空 AD 共转化酵母 AH109，发现共转成功的酵母在 SD/-Leu/-Trp 平板上均能正常生长，而在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上，BD-OsWAK50KD 与空 AD 共转化的酵母不生长，但 BD-OsWAK50CT 与空 AD 共转化的酵母能够生长，说明 BD-OsWAK50KD 无转录激活活性而 BD-OsWAK50CT 有转录激活活性(图 3)。进一步将 BD-OsWAK50KD 分别与 AD-OsSK4、

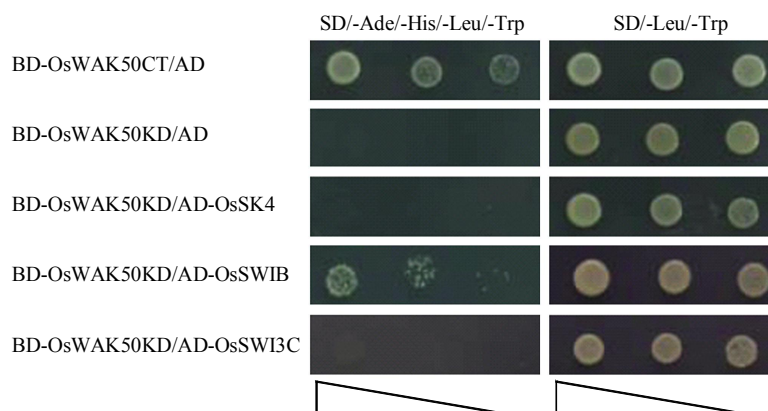


Fig. 3 OsWAK50 kinase domain alone interacts with OsSWIB but not with OsSK4 or OsSWI3C in the yeast two-hybrid assay

The indicated combinations of plasmids were co-transformed into the yeast strain AH109. Yeast was shown after 5 days inoculation on limited medium SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp.

AD-OsSWIB 和 AD-OsSWI3C 共转化酵母 AH109, 发现 BD-OsWAK50KD 和 AD-OsSWIB 共转化的酵母能够在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上生长, 说明 OsSWIB 可以与 OsWAK50 胞内激酶域互作, 但较弱. 除此以外, BD-OsWAK50KD 与 AD-OsSK4 或 AD-OsSWI3C 共转化的酵母均不能够在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上生长, 说明 OsSK4 和 OsSWI3C 不能与 OsWAK50 激酶域互作, 二者与 OsWAK50 胞内域的互作很可能是依赖于 OsWAK50 的 C 端.

2.6 OsWAK53a 与候选基因的互作检测

OsWAK53a (AK111508) 是水稻中与 OsWAK50 相似性最高的基因, 二者蛋白质水平的相似性为 55.18%, 我们同样检测了 OsWAK53a 与 3 个候选基因在酵母中的相互作用.

将 OsWAK53a 胞内域全长(360~712 个氨基酸)

构建到 BD 载体并测序验证(BD-OsWAK53a). 将 BD-OsWAK53a 分别与空 AD、AD-OsSK4、AD-OsSWIB 和 AD-OsSWI3C 共转化酵母 AH109. 发现共转成功的酵母在 SD/-Leu/-Trp 平板上均能正常生长(图 4). 而从 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上的生长情况看: BD-OsWAK53a 与空 AD 共转化的酵母不生长, 说明 BD-OsWAK53a 无转录激活活性; BD-OsWAK53a 与 AD-OsSK4, 以及 OsWAK53a 与 AD-OsSWIB 共转化的酵母可以生长, 说明 OsSK4 和 OsSWIB 也能与 OsWAK53a 胞内域相互作用; 相反, BD-OsWAK53a 与 AD-OsSWI3C 共转化的酵母不能够在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上生长, 说明在酵母双杂交系统中, OsSWI3C 不能与 OsWAK53a 相互作用, 从而证明该基因与 OsWAK50 的相互作用是特异的.

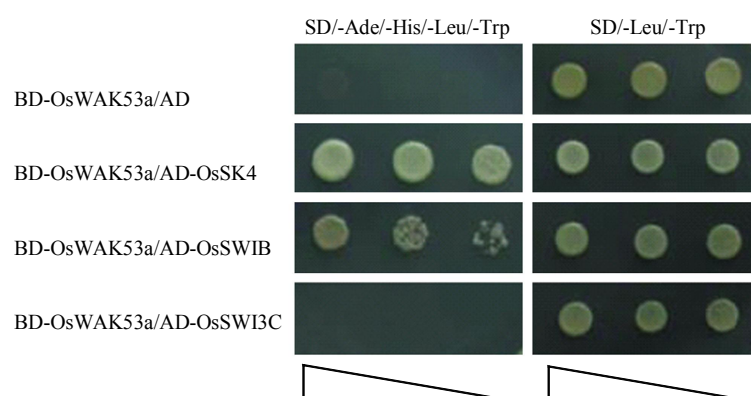


Fig. 4 OsWAK53a intracellular domain interacts with OsSK4 and OsSWIB, but not with OsSWI3C in the yeast two-hybrid assay

The indicated combinations of plasmids were co-transformed into the yeast strain AH109. Yeast was shown after 5 days inoculation on limited medium SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp.

2.7 OsWAK50、OsWAK53a 与 OsSK4 在植物体内的互作检测

为了进一步在植物体内验证 OsWAK50、OsWAK53a 与 OsSK4 的相互作用, 我们采用了双分子荧光互补技术 (bimolecular fluorescence complementation system, BiFC). 将去掉终止密码子的 OsWAK50 和 OsWAK53a 全长 cDNA 分别与 YFP 的 N 端相连, 将去掉终止密码子的 OsSK4 与 YFP 的 C 端相连, 制成植物表达载体, 经酶切鉴定及测序正确后依次命名为 OsWAK50-YFP^N, OsWAK53a-YFP^N 和 OsSK4-YFP^C. 之后通过农杆菌介导的转化进行烟草叶片共注射, 使其在烟草叶

片表皮细胞中表达.

在 OsWAK50-YFP^N 和 OsSK4-YFP^C, 以及 OsWAK53a-YFP^N 和 OsSK4-YFP^C 共注射的烟草叶片表皮细胞中, 均可观察到细胞膜附近有很强的 YFP 荧光(图 5), 说明发生了双分子荧光互补, 从而在植物体内证明了 OsWAK50 全长和 OsWAK53a 全长均可与 OsSK4 发生相互作用. 与此同时, 作为阴性对照的 OsWAK50-YFP^N 和未连入基因的 YFP^C、OsWAK53a-YFP^N 和 YFP^C 共注射的烟草中均未观察到 YFP 荧光, 说明实验组的相互作用是特异可信的.

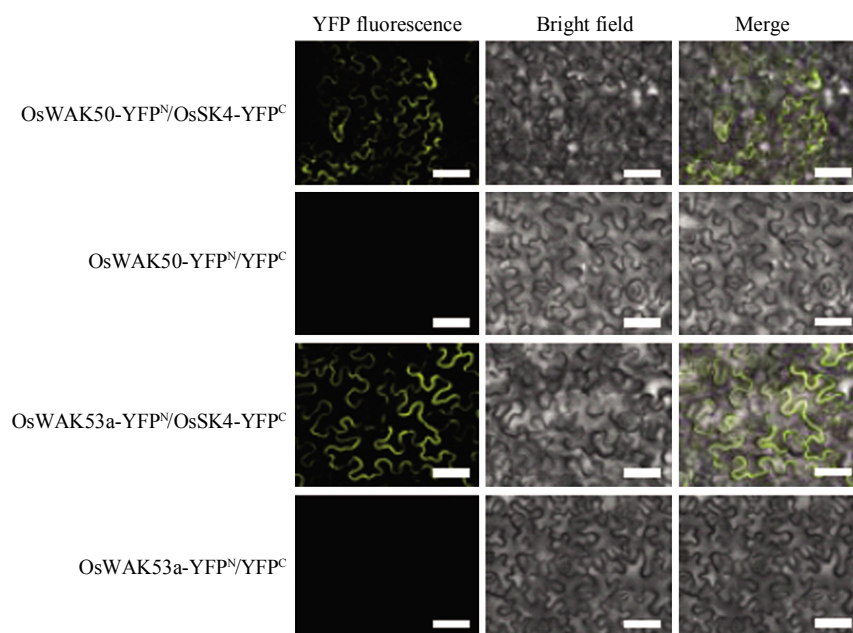


Fig. 5 OsWAK50 and OsWAK53a interact with OsSK4 in BiFC assay

Leaf epidermal cells of *N. benthamiana* were co-transformed with plasmid pairs OsWAK50-YFP^N and OsSK4-YFP^C, OsWAK53a-YFP^N and OsSK4-YFP^C, negative control OsWAK50-YFP^N and YFP^C, OsWAK53a-YFP^N and YFP^C. Confocal images show BiFC on the cell membrane by merge of YFP fluorescence and bright field. Bar=50 μm.

3 讨 论

下游信号组分的鉴定是研究受体激酶介导的信号途径常用方法之一。Anderson 等^[12]通过细菌表达文库的筛选鉴定到了拟南芥 WAK1 胞内域互作蛋白 KAPP。Yang 等^[13]通过双向电泳和质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)相结合的方法, 筛选到了拟南芥 WAK1 胞内域互作蛋白 OEE2。Li 等^[9]通过酵母双杂交的方法筛选到了水稻 OsWAK1 胞内域互作蛋白 OsRFP1。

在本研究中, 我们成功地利用酵母双杂交系统筛选到了 20 个可能的 OsWAK50 胞内相互作用蛋白质, 并发现 OsSWIB 与 OsWAK50 胞内域的互作是不依赖于 C 端的, 而 OsSK4 和 OsSWI3C 与 OsWAK50 胞内域的互作是依赖于 C 端的。因此推测, 正常情况下 OsWAK50 C 端可能具有招募部分下游相互作用蛋白质的作用。OsWAK50 C 端连在 BD 载体上有转录激活活性, 推测 OsWAK50 可能与果蝇中的核转移受体 Notch^[14]类似, 在配基与受体结合后, C 端可能被切下并转移到细胞核中, 与

转录因子等结合, 形成转录复合体, 调节基因转录活性。值得注意的是, WAK50 胞内域全长虽然也含有 C 端, 但却没有转录激活活性, 推测可能是由于激酶域的构象形成了一定的空间位阻, 阻碍了 C 端与某些蛋白质的结合, 从而影响了其转录激活活性。另外, 我们通过酵母双杂交的方法还发现水稻中与 OsWAK50 相似性最高的 OsWAK53a 能够与 OsSK4 和 OsSWIB 相互作用, 而与 OsSWI3C 之间没有相互作用。因此推测, 作为相似性很高的 OsWAK50 和 OsWAK53a 可能介导了某些相同的信号转导途径, 同时也各自特异地启动另一些信号转导途径。

OsSWIB 和 OsSWI3C 是两个含有 SWIRM 结构域的蛋白质, 是染色体重塑复合体中的两个成员。染色体重塑复合体介导了 ATP 依赖的 DNA 与组蛋白之间的结合, 参与了对许多基因的转录、复制和修复的调节^[15-16]。该复合体中的成员缺失拟南芥突变体往往引起多效性表型, 如生长缓慢、矮化、顶端优势减少或丧失、育性降低等^[17-19]。本文只是初步通过酵母双杂交的方法提供了 OsSWIB、OsSWI3C 与 OsWAK50 胞内域互作的证据, 二者

与 OsWAK50 在植物体内能否发生互作, 以及它们在水稻中是否也参与了染色体重塑复合体的组成, 仍然需要更加深入的研究。

NCBI 核酸序列同源性比对分析显示, OsSK4 属于莽草酸途径的一个关键酶莽草酸激酶家族成员。莽草酸途径主要负责合成包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸在内的芳香族氨基酸^[20-21]。此外, 莽草酸途径还能够合成一些次级代谢物的前体, 如生长素 IAA^[22]、木质素^[23]和生物碱^[24]等。其中, 莽草酸激酶的作用在于将莽草酸磷酸化为莽草酸-3-磷酸。水稻中有 3 个基因编码莽草酸激酶, 分别是 OsSK1、OsSK2 和 OsSK3^[25]。目前已知的莽草酸激

酶均包括以下 4 个保守的功能结构域: Walker A 结构域、Walker B 结构域、莽草酸结合结构域以及 LID 结构域。然而, 虽然 NCBI 核酸序列同源性比对分析显示 OsSK4 属于莽草酸激酶家族, 但氨基酸序列比对显示 OsSK4 与已知的 OsSK1、OsSK2 和 OsSK3 的相似性只有 21%~22%, 且 OsSK4 并不具备以上 4 个保守的结构域(图 6)。因此, OsSK4 很可能是一个功能未知的新基因。BiFC 实验表明其在细胞膜附近与 OsWAK50 互作, 其生物学功能及如何参与 OsWAK50 介导的信号途径还有待于进一步研究。



Fig. 6 Amino acid sequence alignment of SKs from rice

Sequence alignment was done using DNAMAN program. The putative Walker A and B motifs were indicated with box, and the putative shikimate binding domain and LID domain were indicated with two-headed arrows.

致谢 中国科学院植物研究所康研究员惠赠的 pSPYNE 和 pSPYCE 载体。

参 考 文 献

[1] He Z H, Fujiki M, Kohorn B D. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. J Biol Chem, 1996, 271(33): 19789-19793

[2] He Z H, Cheeseman I, He D, et al. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. Plant Mol Biol, 1999, 39 (6): 1189-1196

[3] Verica J A, He Z H. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. Plant Physiol, 2002, 129 (2): 455-459

[4] He Z H, He D, Kohorn B D. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. Plant J, 1998, 14(1): 55-63

[5] Sivaguru M, Ezaki B, He Z H, et al. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. Plant Physiol, 2003, 132(4): 2256-2266

[6] Wagner T A, Kohorn B D. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. Plant Cell, 2001, 13(2): 303-318

[7] Lally D, Ingmire P, Tong H Y, et al. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. Plant Cell, 2001, 13(6): 1317-1331

[8] Zhang S, Chen C, Li L, et al. Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. Plant Physiol, 2005, 139(3): 1107-1124

[9] Li H, Zhou S Y, Zhao W S, et al. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, OsWAK1, plays important roles in rice blast disease resistance. Plant Mol Biol, 2009, 69(3): 337-346

- [10] 张 芊. 水稻细胞壁连受体激酶 OsWAK1 功能研究[D]. 石家庄: 河北师范大学生命科学学院, 2008
- Zhang Q. The function of rice wall-associated receptor kinase 1 in rice development and stress response[D]. Shijiazhuang: College of Life Science, Hebei Normal University, 2008
- [11] Harter K, Walter M, Chaban C, *et al.* Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, 2004, **40**(3): 428–438
- [12] Anderson C M, Wagner T A, Perret M, *et al.* WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol Biol*, 2001, **47**(1–2): 197–206
- [13] Yang E J, Oh Y A, Lee E S, *et al.* Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **305**(4): 862–868
- [14] Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* *Molecular Biology of The Cell* (Fourth edition). New York: Garland Science, 2002: 893–895
- [15] Klochendler-Yeivin A, Muchardt C, Yaniv M. SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Gene Dev*, 2002, **12**(1): 73–79
- [16] Martens J A, Winston F. Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Gene Dev*, 2003, **13**(2): 136–142
- [17] Wagner D, Meyerowitz E M. SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2002, **12**(2): 85–94
- [18] Farrona S, Hurtado L, Bowman J L, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development*, 2004, **131**(20): 4965–4975
- [19] Brzeski J, Podstolski W, Olczak K, *et al.* Identification and analysis of the *Arabidopsis thaliana* BSH gene, a member of the SNF5 gene family. *Nucl Acid Res*, 1999, **27**(11): 2393–2399
- [20] Roberts F, Roberts C W, Johnson J J, *et al.* Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature*, 1998, **393**(6687):801–805.
- [21] Herrmann K M, Weaver L M. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 473–503
- [22] Ljung K, Hull A K, Kowalczyk M, *et al.* Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2002, **49**(3–4): 249–272
- [23] Ehlting J, Mattheus N, Aeschliman D S, *et al.* Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J*, 2005, **42**(5): 618–640
- [24] van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 2000, **289**(5477): 295–297
- [25] Kasai K, Kanno T, Akita M, *et al.* Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins. *Planta*, 2005, **222**(3): 438–447

Screen of Receptor-like Kinase OsWAK50 Intracellular Interacting Proteins by Yeast Two-hybrid System*

SUN Li-Jing¹⁾, ZHANG Qian²⁾, LU Tie-Gang²⁾, SUN Ying^{1)**}

¹⁾ Institute of Molecular Cell Biology, Hebei Key Laboratory of Molecular Cell Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

²⁾ Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract The wall-associated kinases (WAKs) belong to a unique subfamily of the receptor-like kinases (RLKs) in plants, named for its tight association with the cell wall. There are 125 *OsWAK* genes in rice (*Oryza sativa*), of which OsWAK50 is a typical RLK with an extracellular domain, a transmembrane domain and an intracellular kinase domain. OsWAK50-GFP fusion protein is localized on the cell surface and associated with the cell wall. By the yeast two-hybrid screen, we identified 20 possible OsWAK50 intracellular interacting proteins. Further one to one reverse hybridization indicates that OsSK4, OsSWIB and OsSWI3C interact with OsWAK50 intracellular domain. OsSWIB interacts directly with the kinase domain of OsWAK50, while OsSK4 and OsSWI3C interact with OsWAK50 intracellular domain in a C terminal dependent manner. OsSK4 and OsSWIB can also interact with OsWAK53a, the closest homolog of OsWAK50 in rice, whereas OsSWI3C can not interact with OsWAK53a. The interaction between OsWAK50 and OsSK4, OsWAK53a and OsSK4 was further confirmed by *in vivo* BiFC assay. These results provide important clues for elucidating the molecular mechanisms of OsWAK50 function in rice.

Key words rice, wall-associated kinases, yeast two-hybrid, protein interaction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00357

*This work was supported by grants from National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (2008ZX08001-003) and The National Natural Science Foundation of China (30800701).

**Corresponding author.

Tel: 86-311-86267213, E-mail: yingsun@mail.hebtu.edu.cn

Received: September 27, 2011 Accepted: November 30, 2011