

DOI: 10.13376/j.cbls/2014094

文章编号: 1004-0374(2014)07-0675-04

· 发现的历程 ·



**编者按:**真核生物的CK1十分保守,从酵母和动物中的研究来看,CK1具有非常重要的功能,参与调控各个方面的生命活动。在植物中CK1家族大大倍增,如双子叶植物拟南芥有17个成员,单子叶植物水稻有15个成员,但是相关的功能报道比较少。中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所薛红卫研究组曾发现CK1在水稻中参与了油菜素内酯和赤霉素等激素信号响应过程。最近,他们以模式植物拟南芥为系统,采用遗传学和生物化学的手段,发现CK1的两个成员CK1.3和CK1.4可以以蓝光诱导的方式磷酸化蓝光受体CRY2,并促进其降解。这项工作不仅鉴定出CK1是蓝光信号途径的重要组分,并且阐明了隐花色素信号转导中一种信号消减机制,大大增进了对于植物中蓝光信号转导机制的理解和CK1功能的认识。

## 黑暗与光明: 植物I型酪蛋白激酶的功能探索

谭树堂

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

某些植物在春天开花,如油菜等,为长日照植物;而某些植物则在秋天开花,如菊花等,为短日照植物。光不仅能够作为一种能源,供植物进行光合作用,而且作为一种环境信号,影响到植物的生长发育。从达尔文时代起,人们便对光如何影响植物发育这个问题产生了浓厚的兴趣。但是直到分子生物学兴起后,在20世纪80年代到90年代间,科学家通过模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)进行大规模的正向遗传学筛选,克隆到光信号转导途径中的重要因子,才逐步阐明光调控植物生长发育的分子机制。

拟南芥是一种隶属于十字花科的双子叶植物,在黑暗中,其幼苗会经历暗形态建成(skotomorphogenesis),表现为下胚轴快速伸长,子叶不会舒展,茎顶端形成一个弯钩,叶绿素与花色素苷不会发生积累,即黄化(etiolation),如图1所示。黄化苗为异养,从子叶获取营养,其下胚轴快速伸长以尽快接触到阳光,而顶端弯钩的形成则可保护分生组织不受伤害。而在光照下,其下胚轴伸长受到抑制,子叶充分扩展,叶绿素和花色素苷开始积累,呈现为光形态建成(photomorphogenesis)。针对光下

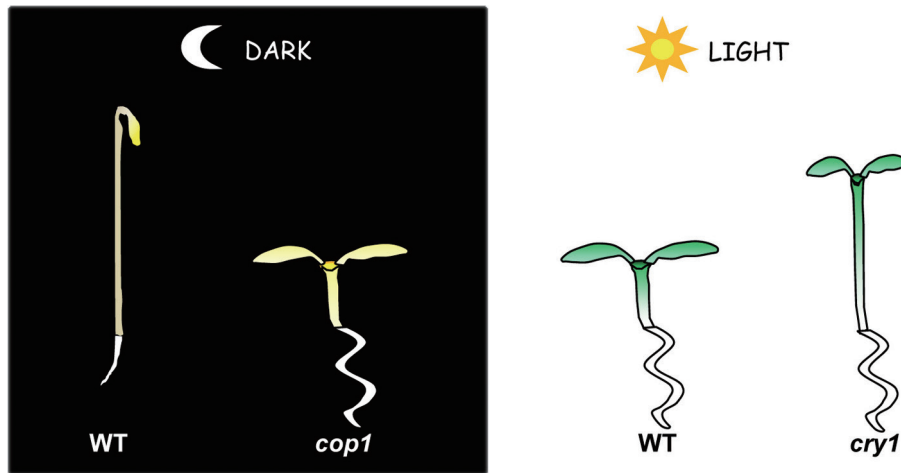
生长的幼苗与黄化苗的形态特征,研究人员采用正向遗传学策略,对拟南芥的突变群体进行分析,在光下筛选具有暗下形态特征或失去向光性的突变体,先后克隆到了编码红光/远红光受体光敏色素(phytochrome, PHY)<sup>[1]</sup>、蓝光受体隐花色素(cryptochrome, CRY)<sup>[2]</sup>、向光素(phototropin, PHOT)<sup>[3]</sup>和转录因子HY5 (LONG HYPOCOTYL5)<sup>[4]</sup>的基因;另一方面,在暗下筛选具有光下形态特征的突变体,克隆到了COPI (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1)的编码基因<sup>[5]</sup>。

随着二十多年来的遗传学与生物化学研究,植物隐花色素所介导的蓝光信号途径(如图2所示)已基本阐明。拟南芥基因组编码了三个CRY同源蛋白,CRY1与CRY2定位于细胞核中,主要调控植物的光形态建成和开花时间;CRY3定位于叶绿体和线粒体中,具体功能尚不清楚。隐花色素由两

收稿日期: 2014-05-18

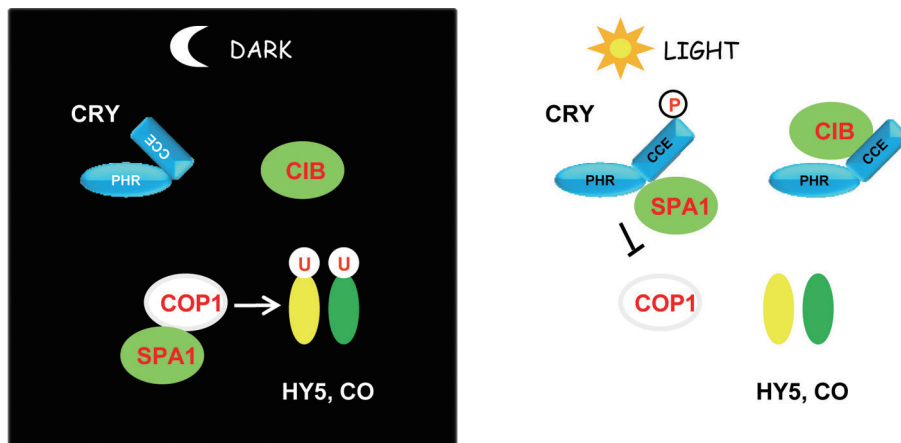
基金项目: 国家自然科学基金项目(91117009, 31130060)

通信作者: E-mail: sttan@sibs.ac.cn



黑暗下，植物启动暗形态建成模式，而 $cop1$ 突变体由于其不能降解下游的HY5/HYH，呈现为似光下幼苗的表型。光下，植物启动光形态建成模式，而受体CRY1突变后，便对光不敏感，像暗下幼苗那样“瘦高”。

图1 光影响拟南芥幼苗的形态建成



黑暗下，COP1与SPA1互作，呈活性状态，可以降解HY5、CO等重要转录因子，启动暗形态建成模式。在蓝光下，CRY被激活后，与SPA1互作，抑制COP1的活性，从而令HY5、CO积累，促进光形态建成与开花。在作用模式上，CRY1与CRY2有所不同，CRY1-SPA1互作抑制SPA1-COP1互作<sup>[6-7]</sup>，而CRY2-SPA1互作促进CRY2-COP1互作<sup>[8]</sup>，但总体效果都是抑制COP1的活性。此外，CRY2可以与CIB互作促进开花。

图2 植物CRY介导的蓝光信号途径

个结构域组成，N端是结合吸光基团FAD的PHR (photolyase-homologous region) 结构域，C端是结合下游组分的信号转导结构域CCE (cryptochrome C terminal extension)。在黑暗下，整个CRY蛋白呈折叠状态不能发挥功能，而COP1作为泛素连接酶，可以将下游转录因子HY5和CO (CONSTANS) 泛素化，随后由26S蛋白酶体所降解。接受蓝光后，其CCE结构域张开，CRY1与CRY2可与SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA 1) 以蓝光依赖的形式互作，从而抑制COP1的活性，保护HY5和CO等不

被降解，进一步激活下游基因表达，分别促进光形态建成和开花<sup>[9]</sup>。此外，有研究表明，CRY2可以直接与CIB (CRY-interacting basic-helix-loop-helix 1) 结合调控开花基因 $FT$  ( $FLOWERING LOCUS T$ ) 的表达，促进开花<sup>[10]</sup>。在由黑暗转向光照的变化中，CRY吸收蓝光后被激活，同时会发生快速的磷酸化，有证据表明，蓝光依赖的磷酸化对于CRY的活性十分重要<sup>[11-12]</sup>，但又可以促进CRY2降解<sup>[11]</sup>。这是一个有趣的现象，那么到底是哪个蛋白激酶负责磷酸化CRY呢。这成为光信号转导领域一个悬而未

决的问题。

本课题组的研究方向一直集中在植物激素信号转导领域。早在2003年，为鉴定植物激素油菜素内酯的响应因子，Liu等<sup>[13]</sup>通过外源施加油菜素内酯处理水稻 (*Oryza sativa*) 幼苗后，通过cDNA微阵列分析发现，一个I型酪蛋白激酶 (casein kinase 1, CKI, CK1) 的成员 OsCK1I 的基因表达受到油菜素内酯的诱导；而通过过表达其反义序列降低其内源表达发现，OsCK1I 可以影响根的发育。在2010年的另一项研究中，Dai等<sup>[14]</sup>发现另外一个CK1家族的成员 OsEL1 (EARLY FLOWER 1) 可以磷酸化赤霉素信号途径的重要调控因子 DELLA 蛋白 SLR1 (SLENDER RICE1)，参与到开花途径中。CK1是真核生物中普遍存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其功能十分重要。从酵母和动物中的研究来看，CK1参与生长发育、生命节律、细胞周期、囊泡运输、胞间通讯等生命活动<sup>[15]</sup>，但是在植物中的功能报道比较少。CK1在酵母中有4个成员，在动物中有7个成员。本课题组通过对相关数据库的搜索、序列比对、聚类分析，发现CK1在水稻中有15个成员，而在拟南芥中有17个成员<sup>[16]</sup>。相比较动物和酵母而言，植物中的CK1成员要多很多。植物不像动物那样可以自由运动，陆生植物一旦在某个地方的土壤中萌发，就将在此终其一生——固着生活决定了植物进化出更为复杂的分子机制来适应变化多端的环境。考虑到CK1的保守性以及植物基因组中大量的基因倍增，本课题组推测CK1可能具有十分重要的功能，于是决定通过遗传学与生物化学的手段，系统地开展植物CK1的功能研究。

本课题组发现，CK1家族中两个有活性的成员CK1.3与CK1.4在多种组织器官中均有表达，而且非常有意思的是，它们的表达会受到蓝光的诱导。CK1.3与CK1.4的缺失突变体 (*ck1.3-1*、*ck1.3-2*与*ck1.4-1*) 及 *amiR-CK1.3/CK1.4* 转基因株系 (注：由于CK1.3与CK1.4这两个基因位于同一条染色体，且距离十分近，约2 kb，不能通过杂交获得双突变体，因此只能通过构建人工miRNA的方法同时降低二者的表达) 在光下幼苗的下胚轴均短于野生型，这是一种光形态建成增强的表型。通过不同的光质处理发现，CK1.3与CK1.4缺失令幼苗特异地对蓝光超敏感；而其过表达相反，对蓝光的敏感性下降。此外，很重要的一个发现是，CK1.3或CK1.4过表达植株特异地在长日照下晚花，这与*cry2*突变体的

表型十分相似。这些证据提示CK1.3与CK1.4是蓝光介导的光形态建成与开花光周期途径中的负调控因子。

通过对遗传材料的分析，本课题组推测CK1.3与CK1.4可能参与CRY2介导的蓝光信号途径。通过构建*ck1.3-1 cry2*与*ck1.4-1 cry2*两个双突变体，发现双突变体的表型与*cry2*相同，说明CRY2对CK1.3与CK1.4均呈现上位效应，或者说CK1.3与CK1.4发挥功能依赖于CRY2。在之前的研究中，科学家们发现CRY2在由黑暗转蓝光照时会发生快速的磷酸化，在蛋白质印记时有一个滞后条带，而且随着蓝光处理时间的延长会发生降解。而本课题组发现，在突变体中CRY2的磷酸化与降解被大大的延迟。另一方面，用CK1的特异性抑制剂IC261处理拟南芥的幼苗，同样可以抑制CRY2的降解。进一步的生化分析表明，CK1.3与CK1.4以蓝光诱导的方式磷酸化蓝光受体CRY2的S587与T603位点。本课题组将这两个位点分别突变为不能被磷酸化的丙氨酸和模拟组成型磷酸化的天冬氨酸，在35S启动子驱动下转入野生型中，获得了表达水平相当的转基因株系。生理实验表明，突变为丙氨酸的效果与野生型CRY2过表达的效果类似，而突变为天冬氨酸的效果被大大减弱。经生化检测突变为天冬氨酸的CRY2<sup>S587D/T603D</sup>稳定性下降。

在这项研究中，本课题组发现CK1.3与CK1.4是蓝光信号途径的重要负调控组分，且它们可以直接磷酸化蓝光受体CRY2的S587与T603，影响其稳定性与功能，以此参与到光形态建成与开花过程中。这项工作的意义在于：(1)发现了植物CK1的一个功能为参与蓝光信号转导；(2)验证了之前发表的隐花色素可以被磷酸化修饰的工作<sup>[8]</sup>，并找到了负责其磷酸化的重要的蛋白激酶；(3)是磷酸化修饰参与蛋白质降解的一个有力证据。CK1是真核生物中十分保守的一类蛋白激酶，但是其通过磷酸化不同的底物参与到动物、植物不同的生命过程中。相信随着研究的深入，人们将慢慢揭开其神秘的面纱，理解大自然中造化的神奇。我们将继续在漫漫科研路上上下下求索，就像顾城那句诗一样，“黑夜给了我黑色的眼睛，我却用它来寻找光明”。

**致谢：**感谢薛红卫研究员对本工作的悉心指导及对本文的修改，感谢刘宏涛研究员、张鹏研究员对本工作提供的支持，同时特别感谢我的合作者戴成博

士在 CK1 研究上的早期成果为我的深入探索打下良好的基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, et al. The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell*, 1991, 3(12): 1263-74
- [2] Ahmad M, Cashmore AR. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 1993, 366(6451): 162-6
- [3] Christie JM, Reymond P, Powell GK, et al. *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, 1998, 282(5394): 1698-701
- [4] Oyama T, Shimura Y, Okada K. The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev*, 1997, 11(22): 2983-95
- [5] Deng XW, Matsui M, Wei N, et al. *COP1*, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G<sub>β</sub> homologous domain. *Cell*, 1992, 71(5): 791-801
- [6] Lian HL, He SB, Zhang YC, et al. Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev*, 2011, 25(10): 1023-8
- [7] Liu B, Zuo Z, Liu H, et al. *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev*, 2011, 25(10): 1029-34
- [8] Zuo Z, Liu H, Liu B, et al. *Arabidopsis* cryptochrome 2 undergoes blue light-dependent interaction with the SPA1-COP1 complex to regulate floral initiation in plants. *Curr Biol*, 2011, 21(10): 841-7
- [9] Liu H, Liu B, Zhao C, et al. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(12): 684-91
- [10] Liu H, Yu X, Li K, et al. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science*, 2008, 322(5907): 1535-9
- [11] Shalitin D, Yang H, Mockler TC, et al. Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, 2002, 417(6890): 763-7
- [12] Shalitin D, Yu X, Maymon M, et al. Blue light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *Plant Cell*, 2003, 15(10): 2421-9
- [13] Liu W, Xu ZH, Luo D, et al. Roles of OsCK11, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J*, 2003, 36(2): 189-202
- [14] Dai C, Xue HW. Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1916-27
- [15] Knippschild U, Gocht A, Wolff S, et al. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, 2005, 17(6): 675-89
- [16] Tan ST, Dai C, Liu HT, et al. *Arabidopsis* casein kinase1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling. *Plant Cell*, 2013, 25(7): 2618-32