

DOI: 10.13376/j.cblls/2018143

文章编号: 1004-0374(2018)11-1184-09



薛红卫, 博士, 中国科学院上海植物生理生态研究所研究员, 上海交通大学农业与生物学院院长。中科院“百人计划”入选者、国家杰出青年基金获得者、“国家自然科学基金委创新研究群体”负责人。主要从事植物激素作用及种子发育调控机制的研究。在蛋白酶体及蛋白质磷酸化作用及其机制、激素信号重要调控因子、激素间及激素与磷脂酰肌醇信号互作调控植物发育的分子机理、水稻种子发育的遗传和表观遗传调控机制等方面做出了系统性和原创性工作。在 *Nat Commun*、*Cell Res*、*EMBO J*、*Plant Cell*、*Curr Opin Plant Biol* 等发表论文 70 余篇。

植物1型酪蛋白激酶的研究进展及展望

陈虎辉¹, 薛红卫^{2*}

(1 中山大学生命科学学院国家生物防治重点实验室和广东省植物资源利用重点实验室, 广州 510275;

2 中国科学院上海植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 1型酪蛋白激酶(casein kinase 1, CK1)是一种在动植物和微生物中普遍存在的蛋白激酶。CK1通过对底物蛋白序列中的丝氨酸/苏氨酸进行磷酸化,从而调控底物蛋白的活性、稳定性等。在动物和微生物中的研究证明,CK1参与了生物体许多重要生理和信号过程的调控,包括生物节律、DNA损伤修复、细胞分裂与肿瘤发生、信号调控与形态建成等。相对而言,植物CK1的研究还较为初步。植物基因组中含有更多的CK1成员,且有一类植物特有的PS-CK1。现综述目前植物中CK1的研究进展,并初步探讨今后植物CK1的研究重点。

关键词: 1型酪蛋白激酶;蛋白质磷酸化;蛋白质降解;信号调控;拟南芥;水稻

中图分类号: Q555 **文献标志码:** A

Casein kinase 1 in plants

CHEN Hu-Hui¹, XUE Hong-Wei^{2*}

(1 National State Key Laboratory of Biocontrol and Guangdong Key Laboratory of Plant Resource, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2 National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese academy of Sciences, Shanghai 200032, China.)

Abstract: Casein kinase 1 (CK1) is conserved throughout the plants and animals. CK1 phosphorylates the substrate proteins at serine or threonine to regulate the enzyme activity and protein stability. Studies in animals and microbes have shown that CK1 plays crucial regulatory roles in multiple signal transduction pathways and many important physiological processes including biological rhythm, DNA damage repair, cell proliferation and tumorigenesis, signaling regulation and morphogenesis. However, the study of plant CK1 is relatively preliminary. Compared with

收稿日期: 2018-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31721001); 国家“万人计划”资助项目; 广东省自然科学基金项目(2017A0303-13197)

*通信作者: E-mail: hwxue@sibs.ac.cn

animals and microbes, plants genome encodes more CK1 members, especially several plant-specific CK1 (PS-CK1). Here, we summarized the research progresses of CK1 in plants, and the important prospects of plant CK1 research in the future were discussed.

Key words: casein kinase 1; protein phosphorylation; protein degradation; signaling regulation; Arabidopsis; rice

蛋白质的翻译后修饰(post-translational modification, PTM)参与生命活动各方面的调控,包括细胞周期、细胞发育、离子运输、新陈代谢和逆境响应等。蛋白质磷酸化(protein phosphorylation)作为一种重要的PTM,主要通过调节底物蛋白质的酶活性、稳定性以及亚细胞定位来发挥调控作用,在几乎所有的生理过程和信号转导过程中都发挥了重要的作用^[1]。蛋白质磷酸化指通过蛋白质激酶(protein kinase)的催化作用,对底物蛋白质的丝氨酸(serine)/苏氨酸(threonine)/酪氨酸(tyrosine)残基的羟基团添加磷酸基团的过程^[1]。根据对氨基酸残基的选择特异性,蛋白质激酶可以分为两大类:丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶与酪氨酸(Tyr)激酶。对丝氨酸/苏氨酸的磷酸化作用是植物蛋白质磷酸化修饰的主要形式。

模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组编码了上千个丝氨酸/苏氨酸激酶。其中,酪蛋白激酶(casein kinase, CK)是一类在真核生物中高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶。CK之名来源于最初用于纯化该酶的底物,即部分去磷酸化的酪蛋白,根据其理化特性及在DEAE-纤维素柱洗脱的顺序又分为1型和2型,即CK1和CK2^[2]。CK1是最先被纯化并研究的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶之一,研究表明其在众多的信号转导途径和生理过程中都起到至关重要的作用,包括细胞分化、核酸修复、生物节律、激素反应、开花时间调控和形态建成等^[3-8]。目前关于CK1的研究成果多来自于酵母和动物中的相关研究,尽管在植物中的研究还较少,但已有的研究结果已经让人们认识到CK1在植物生长发育中也具有不可或缺的作用。此外,植物中还存在一类特有的CK1,其生理功能和作用的分子机制也逐渐被了解。为了更好地认识植物CK1的重要性,帮助研究人员了解植物CK1的研究工作,本文综述了目前关于植物CK1的研究进展,并初步探讨了未来的可能研究方向。

1 植物CK1的发现

植物CK1是最早一批被鉴定和分离的蛋白质激酶,其最初发现的时间可以追溯到20世纪70年

代^[9-10]。早期研究主要集中在用不同方法从不同植物中分离出CK1蛋白,包括花椰菜(cauliflower)^[11-12]、大豆(soybean)^[13]、小麦(wheat)^[14]、烟草(tobacco)^[15]和芒果(mango)^[16]等。但关于植物CK1的生理功能则没有进一步的研究。在这些研究中,Klimczak和Cashmore^[12]报道了一项创新性的工作:通过采用交联CK1特异性抑制剂CKI-7的亲层析柱解决了纯化蛋白产量低的问题,他们从西兰花中得到高于粗提液含量约65 000倍的CK1单体,大小为34.2 kDa,非常接近常见的动物CK1的分子量。此外,Frylinck和Dubery^[16]从成熟的芒果果实中分离出催化活性受钙离子促进,但并不依赖于钙离子的蛋白激酶PK-I,性质类似于CK1,他们将其归入蛋白激酶中的“CMGC”一类。需要注意的是,PK-I的pI值为5.1,与常见CK1的高pI值差距很大,暗示不是所有的植物CK1成员的理化性质都类似于动物中的同工酶。

2 植物CK1的功能研究

2.1 动植物保守的CK1的功能研究

尽管很早就发现了CK1蛋白,但是其生物学功能及相应分子机制的解析却有较多滞后。直到20世纪90年代,从芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中克隆到两个CK1的cDNA序列(YCK1和YCK2^[10,17])后才对CK1的功能及其作用机理开始研究。研究表明,YCK1和YCK2对芽殖酵母细胞生长、酵母形态以及出芽过程中的细胞质分裂具有重要作用^[17-19]。目前至少有7个哺乳动物CK1同工酶(α 、 β 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 δ 、 ϵ)及对应的各类剪接体被克隆^[10,20-23]。哺乳动物CK1同工酶的相对分子质量为37~51 kDa,这些同工酶均由一个高度保守的激酶域和不保守的N端及C端非催化区域构成(图1)。研究表明,CK1在囊泡运输、生物节律性维持、细胞分裂、细胞凋亡等许多细胞学过程中都发挥重要作用^[3]。哺乳动物的CK1 ϵ 及CK1 δ 负责磷酸化哺乳动物时钟蛋白PER,促进PER的泛素化及降解^[24-26]。此外,越来越多的证据表明,CK1家族成员参与调控细胞程序性死亡。CK1能磷酸化肿瘤坏死因子受体p57,负调控p57介导的细

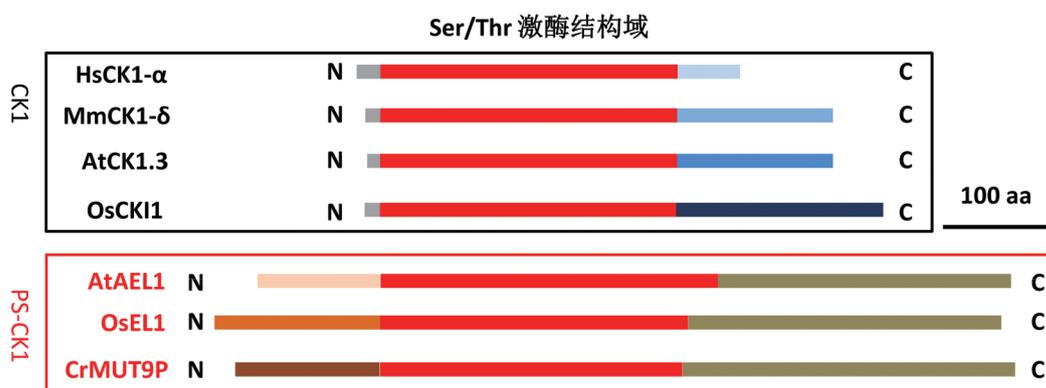
胞程序性死亡^[27]。一些CK1同工酶(CK1 α 、 δ 、 ϵ)可以磷酸化p53^[28-29],进而减弱后者与Mdm2的相互作用,从而稳定并激活p53的功能^[10,30]。

与动物和酵母中CK1的研究成果相比,目前对于植物CK1的功能及其作用机制则知之甚少。由于植物CK1家族成员较多,相互之间可能存在功能上的冗余,而且CK1本身的底物特异性不高,导致目前对植物CK1家族大部分成员的具体生理功能尚不明确,对其作用机制也缺乏深入了解。1995年,Klimczak等^[31]首次将植物CK1的研究从简单的蛋白质分离纯化推进到分子水平,他们利用动物和酵母CK1蛋白质序列中高度保守的激酶活性区域设计简并引物,从拟南芥中克隆到3个cDNA,即CKI1、CKI2和CKI3。其中,CKI1编码了一个约52 kDa的蛋白质,而CKI2和CKI3则缺失了5'末端的部分DNA序列。序列比对发现,3个CKIs均含有CK1高度保守的催化活性区域序列。进一步利用原核表达系统在体外表达AtCKI1,Klimczak等^[31]通过体外磷酸化实验证明AtCKI1能够磷酸化酪蛋白,且这种磷酸化可被CK1特异性抑制剂CKI-7所抑制。此后,直到2003年,Liu等^[32]发现水稻OsCKI1在水稻根发育过程中具有重要调控作用。利用经油菜素甾醇(brassinosteroid, BR)处理后的水稻幼苗基因微矩阵芯片,Liu等鉴定到一个1939 bp的全长cDNA,其编码了一个含有463个氨基酸的蛋白质,命名为OsCKI1。体外表达的OsCKI1蛋白能够磷酸化酪蛋白。OsCKI1基因在水稻多个组织中均表达,且表达水平受BR和脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导上调。相对于野生型,过表达OsCKI1的水稻的根发育异常,侧根

和不定根减少、主根变短;种子萌发过程中对ABA和BR不敏感,这与该基因表达响应ABA和BR处理一致。此外,OsCKI1也可能参与生长素代谢,外源施加吲哚乙酸(IAA)可以恢复OsCKI1过表达材料和CK1特异抑制剂CKI-7处理后的根发育异常,暗示OsCKI1可能参与多种激素信号通路的调控。

在OsCKI1的功能报道之后,后续研究陆续报道了CK1家族成员在烟草、拟南芥中的生理功能。Lee等^[33]从烟草中分离到一个胞间连丝相关的蛋白激酶PAPK(plasmodesmal-associated protein kinase),其表现出非钙依赖性的激酶活性,并对磷酸化的底物具有一定的识别特异性,可以识别病毒和内源性非细胞自主(non-cell-autonomous)蛋白。此外,Lee等^[33]还鉴定到拟南芥PAPK的一个同源蛋白AtCKL6(Arabidopsis casein kinase I-like 6),发现PAPK和AtCKL6均能与烟草花叶病毒运动蛋白(tobacco mosaic virus movement protein, MP)共定位,并通过对MP的磷酸化来调节细胞间的通讯。进一步的研究表明,AtCKL6结合到微管的C末端,能够磷酸化可溶微管蛋白以及微管聚合物,并在微管蛋白 β 3的C末端鉴定到两个AtCKL6的主要磷酸化位点:Ser-413和Ser-420^[34]。AtCKL6介导的微管蛋白磷酸化调节了植物细胞皮层微管的结构,可能在调节细胞间期微管动力学中发挥作用(图2)。

哺乳动物中,CK1 δ 和CK1 ϵ 通过磷酸化周期蛋白(PERIOD, PER)和蓝光受体蛋白隐花色素(cryptochrome, CRY)调节昼夜节律周期^[35-38]。在拟南芥中,Tan等^[4]发现两个序列高度保守的同源蛋白AtCK1.3和AtCK1.4能够以蓝光依赖性的方式磷酸化蓝光受体蛋白隐花色素2(cryptochrome2, CRY2)



不同物种中的CK1在Ser/Thr激酶结构域部分(红色区域)有较高的保守性,但C端序列具有多样性(以不同颜色表示)。PS-CK1之间从激酶结构域至C端均具有高度保守性,只在蛋白N端序列具有多样性(以不同颜色表示)。

图1 不同物种中CK1蛋白的结构示意图

(图1, 表1), CK1.3 和 CK1.4 对 CRY2 的磷酸化促进了 CRY2 的蛋白降解。蓝光下生长的 AtCK1.3 和 AtCK1.4 的功能缺失型突变体 (*ck1.3-1*、*ck1.3-2*、*ck1.4-1*) 的下胚轴相对野生型显著变短, 表明 AtCK1.3 和 AtCK1.4 的功能缺失导致对蓝光超敏感。进一步在 *ck1.4-1* 突变体中将 AtCK1.3 的表达量同时降低后, 得到的遗传材料 *aMIR-CK1.3/CK1.4* 对蓝光的敏感度较单突变体有明显增强。相一致的是, AtCK1.3 和 AtCK1.4 过表达转基因植株表现出对蓝光不敏感, 包括在蓝光处理条件下较野生型拟南芥有更长的下胚轴、开花时间明显延迟等。进一步通过生化分析, 在 CRY2 的 C 末端鉴定到两个 AtCK1.3 和 AtCK1.4 的磷酸化位点 (Ser-597 和 Thr-603)。此外, Tan 等^[5] 还报道了拟南芥中另一个 CK1 成员 AtCK1.8 的功能及作用机理。AtCK1.8 的功能缺失型突变体 (*ck1.8-1*) 过量积累乙烯, 表现出持续性的乙烯反应: 暗下黄化幼苗下胚轴长度明显变短。体外磷酸化实验证明, 乙烯合成途径中的关键酶 ACS5 的第 463 个苏氨酸残基 (Thr-463) 是 AtCK1.8 的一个重要磷酸化位点。模拟 Thr-463 磷酸化状态的 ACS5^{T463E} 比自然状态的 ACS5 具有更强的 ETO1 (ethylene overproduction 1, 一个 E3 泛素链接酶, 通过和 ACS5 互作促进其降解) 结合能力; 反之, 模拟 Thr-463 不能磷酸化状态的 ACS5^{T463A} 与 ETO1 的结合能力较自然状态的 ACS5 减弱。ACS5 与

ETO1 的结合能力和 ACS5 的蛋白稳定性直接相关: 在无细胞降解体系 (cell-free system) 中, ACS5^{T463E} 更容易被降解, 而 ACS5^{T463A} 则更加稳定。这表明 AtCK1.8 通过磷酸化 ACS5, 促进其与 ETO1 结合, 从而调控 ACS5 的蛋白降解, 最终调控植物中的乙烯合成^[5](图2)。该结果不但有助于阐明乙烯的生物合成调控, 也为 ACS5 蛋白的稳定性调控机制提供了线索。由于乙烯在作物成熟、保鲜中的重要作用, 也为通过生物技术进行作物改良提供了可行性技术。

2.2 植物特异CK1的功能研究

上述的植物 CK1 与动物的 CK1 具有很高的保守性。这些 CK1 含有 300~500 个氨基酸, 形成了一个高度保守的激酶域和不保守的 C 端非催化区域 (图2)。除此之外, 一些研究报道了一类植物特有的 CK1 (本文暂时命名为 PS-CK1, plant-specific CK1) 的生理功能及其作用的分子机制。PS-CK1 由大约 700 个氨基酸组成, 其激酶域和 C 端非催化区域均高度保守 (图1)。序列分析发现, PS-CK1 蛋白的 N 端和 C 端较其他的 CK1 含有更多的氨基酸, 且其丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶的 11 个保守结构域之间间隔的氨基酸数目也更多。通过蛋白序列比对发现, 多个 PS-CK1 之间的同源性达到 ~60%, 而与其 Liu 等^[32] 报道的 OsCKI1 的蛋白同源性则低于 20%。系统进化和序列分析发现该类 CK1 蛋白是植物特

表1 已报道的植物CK1的功能和磷酸化底物

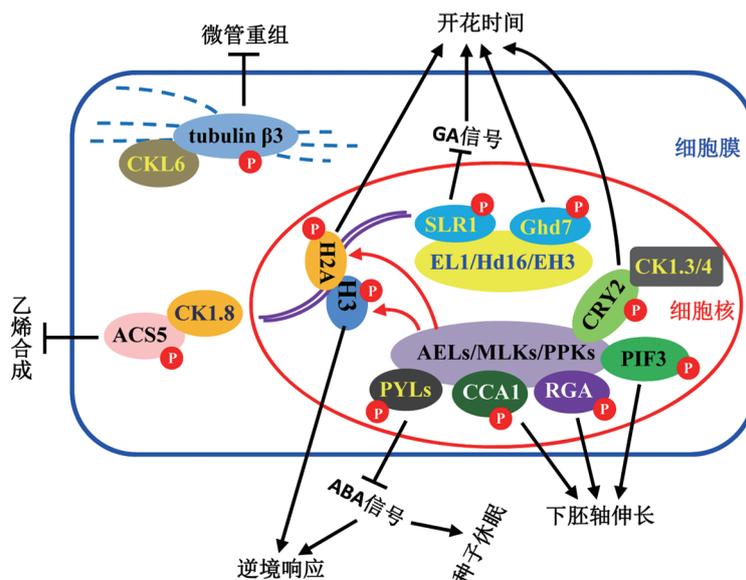
编码基因	物种	功能	底物	参考文献	
CKL3/ CK1.3	At4g28880	<i>Arabidopsis thaliana</i>	开花时间调控	CRY2	[4]
CKL4/ CK1.4	At4g28860	<i>Arabidopsis thaliana</i>	开花时间调控	CRY2	[4]
CKL6	At4g28540	<i>Arabidopsis thaliana</i>	微管结构调控	tubulin β 3	[34]
CKL8/CK1.8	At5g43320	<i>Arabidopsis thaliana</i>	乙烯合成调控	ACS5	[5]
MLK3/AEL1/ PPK4	At2g25760	<i>Arabidopsis thaliana</i>			
MLK4/AEL2/ PPK1	At3g13670	<i>Arabidopsis thaliana</i>	抗逆、开花时间调控、下胚轴伸长调控、植物发育调控、ABA信号	PYR/PYL、PIF3、CRY2、CCA1、H3、H2A、RGA	[8,44-46,48-49]
MLK2/AEL3/ PPK3	At3g03940	<i>Arabidopsis thaliana</i>			
MLK1/AEL4/ PPK2	At5g18190	<i>Arabidopsis thaliana</i>			
OsCKI1/LTG1/ LTRPK1/hbd2	Os02g40860	<i>Oryza sativa</i>	根发育调控	底物未知	[32,51-54]
EL1/Hd16/ EH3	Os03g57940	<i>Oryza sativa</i>	开花时间调控	SLR1、Ghd7	[7,41-43,45,56]
MUT9	AF443205	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	外来基因表达调控	H2A、H3	[40]
SeCK1	GQ444335	<i>Sesamum indicum</i>	饱和脂肪酸合成	bHLH	[39]

有的,且广泛存在于多种植物中^[8,39]。第一个被报道的PS-CK1是绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中的MUT9p^[40]。MUT9p能够磷酸化组蛋白H3和H2A,从而调控多个基因的表达。MUT9p的功能缺失突变体材料*mut9*在转基因和转座子的遗传抑制方面存在缺陷。2010年,本课题组从水稻中克隆到一个PS-CK1——EL1(early flowering 1),发现其能够磷酸化赤霉素(gibberellin, GA)信号转导途径中的重要负调控蛋白SLR1(slender rice 1),从而通过负调控GA信号来调节水稻开花时间^[7]。相较于野生型水稻,EL1的功能缺失突变体*ell*表现出GA信号增强的表型,包括高度增加、短日照条件下的开花时间和抽穗期均提前。EL1主要对SLR1的两个丝氨酸位点(Ser-196和Ser-510)进行磷酸化。这些位点的磷酸化缺失导致SLR1的酶活性降低且蛋白不稳定(更容易被降解),从而导致*ell*材料中GA信号增强。此外,SLR1在野生型水稻中的过表达导致矮化表型,而在*ell*突变体中该表型被显著抑制,表明SLR1对GA信号转导的负调控作用需要EL1的参与。随后,来自另外几个研究组的研究通过对早花突变体进行图位克隆得到EL1,分别将

其命名为Hd16(heading date 16)^[41]、EH3(early heading 3)^[42],并发现EL1能够磷酸化开花时间调控蛋白Ghd7,从而调控开花时间^[41,43]。

Kim等^[39]发现芝麻中一个PS-CK1——SeCK1在种子中高表达,其表达能够被脱落酸(ABA)诱导。SeCK1通过磷酸化一个bHLH转录因子,进而调控种子中微粒体油酸去饱和酶(SeFAD2)的表达,影响芝麻种子中的脂肪酸代谢。

最近,几个不同的研究组先后报道了拟南芥中PS-CK1的不同功能及其作用的分子机理^[8,44-49]。拟南芥基因组中有4个高度保守的同源PS-CK1蛋白,Wang等^[44]将其分别命名为MLK1~MLK4(MUT9-LIKE KINASE,表1)。为了研究MLKs的功能,研究者分别筛选到MLK的功能缺失型单突变体(*mlk1*~*4*),并通过杂交获得了不同组合的双突变体。尽管4个*mlk1*~*4*单突变体没有明显的表型,*mlk1 mlk2*双突变体材料表现出多种表型,包括植株矮小、生殖器官缺陷和对渗透/盐胁迫的超敏感。进一步研究发现,MLK1和MLK2通过对组蛋白H3的第3个苏氨酸(Thr3)磷酸化(H3T3ph),在表观遗传水平调控了大量基因的H3K4me1和H3K4me3的水



CKL6定位在微管上,通过磷酸化微管组成蛋白tubulin $\beta 3$ 从而负调控微管重组。CK1.8磷酸化ACS5并促进其蛋白降解,从而抑制乙烯合成。在细胞核中,CK1.3和CK1.4能够与CRY2互作并对其磷酸化,调控蓝光信号途径,促进植物开花。SeCK1通过磷酸化bHLH转录因子调控脂肪酸代谢。水稻EL1/Hd16/EH3通过磷酸化SLR1和Ghd7调控GA信号和开花时间。AELs通过磷酸化不同的底物蛋白,参与了多个信号途径和生理过程的调控。AELs磷酸化PYR/PYLs并促进其降解,负调控ABA信号传导,影响种子休眠和逆境响应;磷酸化CRY2并促进其蛋白降解,调控蓝光信号传导和植物开花;磷酸化RGA、PIF3和CCA1并促进其蛋白降解,调控下胚轴伸长。AELs还能够磷酸化H3和H2A,通过表观调控来影响下游基因表达,促进植物开花和逆境响应。

图2 已报道的CK1定位与功能示意图

平, 从而调控了基因表达。在转录活跃的基因中, H3T3ph 的分布似乎与 H3K4me3 的分布相反, 表明 H3T3ph 可能具有抑制功能, 并且这种抑制性表观遗传标记对于维持适当的异染色质组织以及染色体功能可能是重要的。有趣的是, *mlk1 mlk2* 中与蛋白编码基因相关的 H3T3ph 的模式和相对水平并没有受到影响, 表明在转录活跃的蛋白编码基因中的 H3T3ph 不依赖于 MLK1 和 MLK2 基因。尽管该研究揭示了 MLK1 和 MLK2 在磷酸化 H3T3 方面的作用, 但对 *mlk1 mlk2* 表型的分子机制尚不完全了解。最近, 有两个课题组分别报道了 MLKs 对下胚轴伸长的不同调控机制^[46,48]。类似于水稻 EL1 的研究结果, MLK1 和 MLK2 也能够与一个 DELLA 蛋白 RGA (REPRESSOR OF *gal-3*) 相互作用, 同时 MLK1/2 和 RGA 均能直接与植物中昼夜节律调控蛋白 CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1) 相互作用^[48]。CCA1 通过调控其下游基因 DWARF4 来控制细胞扩张, 从而调节下胚轴的伸长。MLK1/2 能够对抗 RGA 对于 CCA1 的调控, 从而调节下胚轴的伸长, 因此, *mlk1 mlk2* 双突变体表现出下胚轴变短以及 GA 敏感的表型^[47-48], 也表明 MLK1/2 在拟南芥中通过协调 GA 信号和昼夜节律来调节植物的生长发育 (图 2)。

同时, Ni 等^[46]的研究结果表明, 拟南芥 PPKs (photoregulatory protein kinases) 通过调控转录因子 PIF3 和光敏色素 phyB 蛋白的降解来调节下胚轴的伸长。其中, PPKs 即为 MLKs (两者的对应关系详见表 1)。黑暗条件下 PPKs 与 PIF3 并无相互作用, 而光下两者间能够受光诱导而相互作用。PPKs 与 PIF3 互作后能够直接对其磷酸化, 从而促进 PIF3 蛋白的降解。光下 *ppk123* 和 *ppk124* 两个三突变体中 phyB 蛋白的降解速率较野生型拟南芥明显降低, 表明 PPKs 对 phyB 蛋白的稳定性维持也有重要作用, 并通过调控光信号途径来调控植物下胚轴的伸长。PPKs 对光信号调控的另一条途径是, 通过蓝光受体光敏色素 CRY2 调控长日照条件下的植物开花时间^[45]。*ppk1/mlk4* 单突变体在长日照条件下开花时的莲座叶数目约为 17 片, 对应的野生型则约在 12 片^[45,49], 而 *ppk123* 和 *ppk124* 两个三突变体的开花时莲座叶数目则达到约 20 片^[45,49], 表明其开花时间严重延迟。PPKs/MLKs 一方面磷酸化 CRY2 促进其降解, 从而促进开花关键基因 FT 的表达来促进植物开花^[45]; 另一方面, PPKs/MLKs 能够磷酸化组蛋白 H2A 的第 95 位丝氨酸 (Ser-95),

从而促进另一个开花基因 GIGANTEA (*GI*) 的表达水平来促进开花^[49]。在植物细胞中, CCA1 直接结合到 *GI* 的启动子区域促进其表达, 还能与 YAF9a (一个 SWR1 和 NuA4 复合体的共同亚基) 互作, 促进组蛋白 H4 的乙酰化和 H2A.Z 在染色质上的沉积。MLK4 通过与 CCA1 直接互作, 从而结合到 *GI* 基因的启动子区域, 一方面保证对该区域的 H2AS95 进行磷酸化, 促进 *GI* 基因的表达; 另一方面则促进 CCA1 与 YAF9a 的结合来增加 *GI* 基因启动子区域的组蛋白 H4 的乙酰化和 H2A.Z 水平, 从而促进 *GI* 基因。上述两个研究从光信号途径^[45]和表观遗传调控^[49]方面阐述了 PPKs/MLKs 调控植物开花的机制, 但是均没有报道能够回补 *ppks/mlks* 多突变体晚开花表型的遗传材料。由于 CK1 底物的多样性, 预计仍有调控植物开花时间的关键蛋白能够被 PPKs/MLKs 磷酸化。

最近, 在早期 EL1 工作的基础上^[7], 我们发现拟南芥中的 EL1-Like (Arabidopsis EL1-Like, AEL) 通过磷酸化 ABA 受体 PYR/PYLs, 从而调控 ABA 信号转导, 控制种子休眠与萌发等^[8] (表 1, 图 2)。我们发现, 三个 AEL 功能缺失的三突变体 (*aell23*、*aell24*、*aell34*) 在种子萌发过程中对 ABA 和 NaCl 处理超敏感, 萌发之后的幼苗发育也受到严重抑制。蛋白质谱和生化分析发现, AELs 能够对 PYR/PYLs 的两个保守的磷酸化位点 (在 PYL1 中为 Ser-136 和 Ser-182) 进行磷酸化。模拟磷酸化形式的 PYL1 (PYL1^{S136DS182D}) 能够加速其在野生型中的蛋白降解速率, 而非磷酸化形式的 PYL1 (PYL1^{S136AS182A}) 的降解速率则受到抑制, 说明 AELs 对 PYL1 的磷酸化促进了后者的蛋白降解。进一步的研究证明, AELs 对 PYL1 的磷酸化能够增强其多泛素化水平, 导致其加速降解。遗传分析表明, 含有非磷酸化形式 PYL1 (PYL1^{S136AS182A}) 的转基因种子在萌发过程中较正常形式 PYL1 的转基因种子对 ABA 更加敏感, 说明 AELs 对 PYL1 的磷酸化具有生理意义, 这与 *aell23*、*aell24*、*aell34* 对 ABA 的超敏感表型一致。

3 植物CK1未来研究展望

虽然植物 CK1 的研究已经取得了一定的结果, 但仍有许多未知领域有待深入研究。今后对植物 CK1 的研究仍具有挑战性, 我们认为可以在以下方面着重进行研究。

3.1 植物CK1的功能研究

迄今为止, 已有的报道显示, 植物 CK1 的功

能涉及到植物生长和发育的多个方面,包括激素合成^[5]与信号转导^[4,7-8,32,45,47]、逆境响应^[8,32,44]、开花时间调控^[4,7,41-42,45,48,56]以及饱和脂肪酸合成调控^[39]等。然而,与动物和微生物不同,植物基因组中含有多个CK1基因(拟南芥17个,水稻15个),目前功能已了解的植物CK1仍在少数(表1,图2),表明植物CK1的生理功能研究尚需要进一步的工作。今后,CK1其他生理功能的发现以及相关作用机制的解析将是一个研究重点。从植物中含有较多CK1且与动物和微生物的保守性来看,植物CK1可能具有像动物中CK1一样重要的功能,如调节生理节律、细胞分裂等,也可能参与逆境响应等重要过程。进一步的遗传学、分子生物学研究将有助于植物CK1功能的阐明。

鉴定底物蛋白的磷酸化位点对于激酶功能的分子机制研究非常重要。目前,植物CK1磷酸化位点的生物信息学预测主要依赖于动物和微生物CK1的研究结果,随着植物CK1的底物鉴定及相关识别序列信息的了解,将为后续解析植物CK1的作用机制提供更多的线索。此外,随着蛋白质分析技术的发展,利用磷酸化蛋白质组学对CK1底物进行综合分析将为鉴定特定CK1的磷酸化位点提供更加全面和准确的信息。

3.2 植物CK1的调控研究

虽然CK1在多个生物学过程中发挥关键调控作用,但其激酶活性调节机制的研究目前仍较少,对CK1功能的调控研究将是未来一个重要的研究领域,包括CK1蛋白的活性调节、CK1蛋白的稳定性、CK1基因的转录调控等。这些方面的研究即使在动物中也是刚刚起步。2013年,Cruciat等^[57]在非洲蟾蜍(*Xenopus*)中发现了一个含有DEAD盒子的RNA旋转酶DDX3能够调控CK1 ϵ 的活性。DDX3直接与CK1 ϵ 相互作用并激活其激酶活性,从而促进CK1 ϵ 对支架蛋白的磷酸化,最终调节哺乳动物细胞Wnt- β -catenin^[57-58]。在CK1的蛋白稳定性方面,研究表明后期促进复合物/细胞体(APC/C^{Cdh1})泛素系统能够通过泛素连接酶Cdh1对CK1 δ 直接进行多泛素化,使CK1 δ 进入蛋白酶体降解途径^[6]。在小鼠小脑颗粒细胞(cerebellar granule cell progenitors, GCPs)中,APC/C^{Cdh1}通过这种方式调控CK1 δ 蛋白的降解以平衡中枢神经系统发育过程中的细胞增殖和细胞周期退出。在水稻中,一个含有同源框(homeobox)的转录因子HOX1a能直接结合到EL1基因的启动子区域并抑制EL1的表达,

从而增强GA信号^[55]。在MUT9p的研究中发现,将其激酶催化区域的第14位赖氨酸(K-14)置换成精氨酸(R-14)后将导致其激酶活性丧失^[40]。

植物CK1在激酶活性和蛋白稳定性的调控方面目前还未见报道。在拟南芥AELs的体外磷酸化实验中,我们发现AELs能够自身磷酸化^[8],表明AELs蛋白可能经历了翻译后修饰(很可能是磷酸化),但翻译后修饰对AELs激酶活性或者蛋白稳定性是否有调节作用仍未知。此外,除了自身磷酸化外,AELs是否还被其他激酶磷酸化从而参与不同过程的调控。这些都有待于今后的深入研究。随着CK1功能研究的不断深入,其活性和功能调控的机制将越来越为重要。

利用CK1相关突变体材料进行诱变筛选,将是寻找调控CK1活性蛋白的一个有效手段。此外,由于CK1底物的不确定性,其亚细胞定位对于CK1功能实现也具有重要作用。Lee等^[33]利用原生质体对拟南芥中13个CK1的亚细胞定位的研究表明,其定位可以分为细胞质、细胞核、细胞膜,表明CK1的亚细胞定位与其功能有密切关系。PS-CK1s均定位于细胞核^[7-8],且将其拆分成N端和C端后,这两部分仍然定位于细胞核中,说明其细胞核定位可能对其功能非常重要。

[参 考 文 献]

- [1] Luan S. Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 63-92
- [2] Tuazon PT, Traugh JA. Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1991, 23: 123-64
- [3] Knippschild U, Gocht A, Wolff S, et al. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, 2005, 17: 675-89
- [4] Tan ST, Dai C, Liu HT, et al. *Arabidopsis* casein kinase 1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling. *Plant Cell*, 2013, 25: 2618-32
- [5] Tan ST, Xue HW. Casein kinase 1 regulates ethylene synthesis by phosphorylating and promoting the turnover of ACS5. *Cell Rep*, 2014, 9: 1692-702
- [6] Penas C, Govek EE, Fang Y, et al. Casein kinase 1 δ is an APC/C(Cdh1) substrate that regulates cerebellar granule cell neurogenesis. *Cell Rep*, 2015, 11: 249-60
- [7] Dai C, Xue HW. Rice early flowering1, a CK1, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J*, 2010, 29: 1916-27
- [8] Chen HH, Qu L, Xu ZH, et al. EL1-like casein kinases suppress ABA signaling and responses by phosphorylating

- and destabilizing the ABA receptors PYR/PYLs in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2018, 11: 706-19
- [9] Chew LF, Mackinlay AG. Histone and casein kinases of lactating bovine mammary gland. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 359: 73-82
- [10] Gross SD, Anderson RA. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal*, 1998, 10: 699-711
- [11] Murray MG, Guilfoyle TJ, Key JL. Isolation and preliminary characterization of a casein kinase from cauliflower nuclei. *Plant Physiol*, 1978, 62: 434-7
- [12] Klimczak LJ, Cashmore AR. Purification and characterization of casein kinase I from broccoli. *Biochem J*, 1993, 293: 283-8
- [13] Murray MG, Guilfoyle TJ, Key JL. Isolation and characterization of a chromatin-associated protein kinase from soybean. *Plant Physiol*, 1978, 61: 1023-30
- [14] Rychlik W, Zagorski W. Purification and characterisation of adenosine-3',5'-phosphate-independent protein kinase from wheat germ. *Eur J Biochem*, 1980, 106: 653-9
- [15] Erdmann H, Bocher M, Wagner KG. Two protein kinases from nuclei of cultured tobacco cells with properties similar to the cyclic nucleotide-independent enzymes (NI and NII) from animal tissue. *FEBS Lett*, 1982, 137: 245-8
- [16] Frylinck L, Dubery IA. Protein kinase activities in ripening mango, *Mangifera indica* L., fruit tissue. III. Purification and characterisation of a calcium-regulated protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387: 342-54
- [17] Robinson LC, Hubbard EJ, Graves PR, et al. Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 28-32
- [18] Wang X, Hoekstra MF, DeMaggio AJ, et al. Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 5375-85
- [19] Paquin N, Menade M, Poirier G, et al. Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell*, 2007, 26: 795-809
- [20] Flotow H, Graves PR, Wang AQ, et al. Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase-I action. *J Biol Chem*, 1990, 265: 14264-9
- [21] Zhai L, Graves PR, Robinson LC, et al. Casein kinase I γ subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae* YCK genes. *J Biol Chem*, 1995, 270: 12717-24
- [22] Zhang J, Gross SD, Schroeder MD, et al. Casein kinase I α and α L: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry*, 1996, 35: 16319-27
- [23] Schitteck B, Sinnberg T. Biological functions of casein kinase I isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer*, 2014, 13: 231
- [24] Casagolda D, Del Valle-Perez B, Valls G, et al. A p120-catenin-CK1 ϵ complex regulates Wnt signaling. *J Cell Sci*, 2010, 123: 2621-31
- [25] Etchegaray JP, Yu EA, Indic P, et al. Casein kinase 1 δ (CK1 δ) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. *PLoS One*, 2010, 5: e10303
- [26] Sinnberg T, Menzel M, Kaesler S, et al. Suppression of casein kinase 1 α in melanoma cells induces a switch in β -catenin signaling to promote metastasis. *Cancer Res*, 2010, 70: 6999-7009
- [27] Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Gene Dev*, 2006, 20: 399-410
- [28] Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, et al. Casein kinase I regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*, 2010, 123: 2976-86
- [29] Meng QJ, Maywood ES, Bechtold DA, et al. Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase I (CKI) enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15240-5
- [30] Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, et al. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, 2000, 275: 9278-83
- [31] Klimczak LJ, Farini D, Lin C, et al. Multiple isoforms of *Arabidopsis* casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions. *Plant Physiol*, 1995, 109: 687-96
- [32] Liu W, Xu ZH, Luo D, et al. Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J*, 2003, 36: 189-202
- [33] Lee JY, Taoka K, Yoo BC, et al. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*, 2005, 17: 2817-31
- [34] Ben-Nissan G, Cui W, Kim DJ, et al. *Arabidopsis* casein kinase I-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. *Plant Physiol*, 2008, 148: 1897-907
- [35] Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell*, 2008, 134: 728-42
- [36] Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, et al. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ . *J Biol Chem*, 2002, 277: 17248-54.
- [37] Vielhaber E, Eide E, Rivers A, et al. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I ϵ . *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 4888-99
- [38] Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, et al. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in cultured cells. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 1693-703
- [39] Kim MJ, Go YS, Lee SB, et al. Seed-expressed casein kinase I acts as a positive regulator of the SeFAD2 promoter via phosphorylation of the SebHLH transcription factor. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 425-37
- [40] Casas-Mollano JA, Jeong BR, Xu J, et al. The MUT9p kinase phosphorylates histone H3 threonine 3 and is

- necessary for heritable epigenetic silencing in *Chlamydomonas*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 6486-91
- [41] Hori K, Ogiso-Tanaka E, Matsubara K, et al. *Hd16*, a gene for casein kinase I, is involved in the control of rice flowering time by modulating the day-length response. Plant J, 2013, 76: 36-46
- [42] Kwon CT, Yoo SC, Koo BH, et al. Natural variation in *Early flowering1* contributes to early flowering in japonica rice under long days. Plant Cell Environ, 2014, 37: 101-12
- [43] Nemoto Y, Hori K, Izawa T. Fine-tuning of the setting of critical day length by two casein kinases in rice photoperiodic flowering. J Exp Bot, 2018, 69: 553-65
- [44] Wang Z, Casas-Mollano JA, Xu J, et al. Osmotic stress induces phosphorylation of histone H3 at threonine 3 in pericentromeric regions of *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 8487-92
- [45] Liu Q, Wang Q, Deng W, et al. Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. Nat Commun, 2017, 8: 15234
- [46] Ni W, Xu SL, Gonzalez-Grandio E, et al. PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3. Nat Commun, 2017, 8: 15236
- [47] Zheng H, Ding Y. MLK1 and MLK2 integrate gibberellins and circadian clock signaling to modulate plant growth. Plant Signal Behav, 2018, 13: e1439654
- [48] Zheng H, Zhang F, Wang S, et al. MLK1 and MLK2 coordinate RGA and CCA1 activity to regulate hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2018, 30: 67-82
- [49] Su Y, Wang S, Zhang F, et al. Phosphorylation of histone H2A at serine 95: a plant-specific mark involved in flowering time regulation and H2A.Z deposition. Plant Cell, 2017, 29: 2197-213
- [50] Knippschild U, Kruger M, Richter J, et al. The CK1 family: contribution to cellular stress response and its role in carcinogenesis. Front Oncol, 2014, 4: 96
- [51] Liu W, Ji S, Fang X, et al. Protein kinase LTRPK1 influences cold adaptation and microtubule stability in rice. J Plant Growth Regul, 2013, 32: 483-90
- [52] Lu G, Wu FQ, Wu W, et al. Rice LTG1 is involved in adaptive growth and fitness under low ambient temperature. Plant J, 2014, 78: 468-80
- [53] Matsubara K, Ando T, Mizubayashi T, et al. Identification and linkage mapping of complementary recessive genes causing hybrid breakdown in an intraspecific rice cross. Theor Applied Genet, 2007, 115: 179-86
- [54] Yamamoto E, Takashi T, Morinaka Y, et al. Interaction of two recessive genes, *hbd2* and *hbd3*, induces hybrid breakdown in rice. Theor Applied Genet, 2007, 115: 187-94
- [55] Wen BQ, Xing MQ, Zhang H, et al. Rice homeobox transcription factor HOX1a positively regulates gibberellin responses by directly suppressing EL1. J Integr Plant Biol, 2011, 53: 869-78
- [56] Kwon CT, Kim SH, Kim D, et al. The rice floral repressor *Early flowering1* affects spikelet fertility by modulating gibberellin signaling. Rice (N Y), 2015, 8: 58
- [57] Cruciat CM, Dolde C, de Groot RE, et al. RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase I in Wnt- β -catenin signaling. Science, 2013, 339: 1436-41
- [58] Dolde C, Bischof J, Gruter S, et al. A CK1 FRET biosensor reveals that DDX3X is an essential activator of CK1 ϵ . J Cell Sci, 2018, 131: jcs207316