逆境胁迫下植物LEA蛋白的研究进展

杨天旭[1],汪耀富[1,2],宋世旭[1],蔡寒玉[1],高华军[1]
(1.河南农业大学农学院国家烟草栽培生理生化研究基地,河南 郑州 450002;
2.长沙卷烟厂博士后工作站,湖南 长沙 470014)

摘 要:在逆境胁迫条件下,植物体内会产生诱导蛋白,LEA蛋白(Late embryogenesis abundant protein)是其中最常见的一类。本文就逆境胁迫下植物体内LEA蛋白的产生、特性、生理作用和基因的表达调控等作一简要阐述,并对LEA蛋白今后的研究方向及运用前景进行了展望。

关键词:LEA蛋白;逆境胁迫;基因表达与调控
中图分类号:Q945.78 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-7601(2006)06-0120-05

温度、盐渍、干旱和重金属等逆境胁迫都会影响高等植物的生长发育,导致作物产量降低,品质下降。植物为适应各种胁变,在其长期的进化过程中,已发展了各种不同的生理生化机制,以抵抗、适应各种环境胁迫。例如,其中一些基因表达会发生改变,原来一些蛋白的合成受到抑制,同时又会新合成一些蛋白[1]。一些低分子量渗透调节物质的积累,如糖醇、脯氨酸、甘氨酰甜菜碱等被认为是增强植物对渗透胁迫适应和耐受能力的主要机制[2]。近年研究发现,环境胁迫还可引起植物营养组织中新蛋白的积累,称之逆境胁迫诱导蛋白,特别是植物干旱诱导蛋白的研究已受到普遍关注。提高植物抗旱性是一项复杂的工程,虽然人们目前尚未完全了解干旱对植物产生危害或植物耐干旱的机制,但是经过多年的研究,人们已经形成了一种共识,就是寻求抗旱诱导基因,了解引起这类基因产生的信号的传导途径和这类基因的功能,以期采用基因工程技术手段提高作物的耐旱能力[3]。其中LEA蛋白(Late-embryogenesis-abundant protein)是胚胎发生后期种子中大量积累的一系列蛋白质,它广泛存在于高等植物中,且受发育阶段、脱落酸(ABA)和脱水信号的调节,因此,成为当前逆境研究方面的热点。

1 LEA蛋白的产生和分布

1.1 LEA蛋白的产生

1981年,Dure等[4]在胚胎发育的棉花子叶中分离到一组丰富的mRNA,其翻译产物即为LEA蛋白(胚胎发育晚期丰富蛋白)。LEA蛋白是在正常种子发育后期,伴随脱水干燥过程形成的一类低分子量蛋白[5]。它广泛存在于高等植物的种子中,能够在水分亏缺时保护膜系统及其它生物大分子免受破坏。现在普遍采用免疫学方法和分子杂交技术来鉴别这类特异蛋白,已先后在小麦、大麦、番茄、大豆、胡萝卜等近二十种高等植物发育种子中检测到LEA蛋白[6]。LEA蛋白出现在胚发育的晚期,随种子的脱水程度而增加,在种子吸水萌动的几个小时后消失。此外,离体胚和许多营养组织在外源ABA、渗透或低温胁迫的诱导下也能产生特异的LEA mRNA和LEA蛋白[6]。表明LEA蛋白虽是阶段发育专一的,但可以被诱导,且无组织专一性。

1.2 LEA蛋白的分布

LEA蛋白存在于植物的不同器官中,Colmenero-Flores等[7]在单子叶和双子叶植物幼苗中也均检测到干燥种子胚中存在的PvLEA-18基因编码的分子量为14kD的蛋白,在水分胁迫下,豆类幼苗各组织均可产生此类蛋白。但一般认为,LEA蛋白不存在于蛋白体中,主要存在于细胞浆中,尤其在胚细胞的胞质中具有很高的浓度。最近也有发现定位于细胞核中的。Jose(1999)等研究水分胁迫和正常浇水的豆类幼苗中LEA蛋白PvLEA-18的积累,通过免疫学分析表明PvLEA定位在所有细胞核和细胞质区域,在柱形组织和导管中大量积累,特别是在水分胁迫下,初生木质部细胞和根分生组织中该基因具有较丰富的表达[8]。Covarrubias等[9]在受水分胁迫的菜豆中检测出的两种细胞壁糖蛋白P33和P36,就主要积累在幼苗下胚轴的延伸生长区。

收稿日期:2005-12-07
资助项目:国家烟草专卖局资助项目(110200302009)
作者简介:杨天旭(1981-),男,河南南阳人,在读硕士研究生,主要从事烟草抗逆生理研究。E-mail:lnr119@163.com。
通讯作者:汪耀富(1964-),男,博士,副教授,主要从事烟草栽培生理方面的研究。E-mail:yaofuwang@163.com。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　LEA 蛋白的生理功能

LEA 蛋白的出现是植物对干旱胁迫的一种适应性的保护反应,但迄今为止,有关 LEA 蛋白的生理功能几乎无任何直接的研究证据,只能通过分析其与已知蛋白的同源性及一些生理现象来确定,现将其可能具有的功能简述如下。

2.1　增强植物耐脱水能力

在干旱脱水过程中,细胞液的离子浓度快速升高,而过高的离子浓度会造成细胞的不可逆伤害。许多 LEA 蛋白氨基酸序列的保守区域,可形成双亲性 α—螺旋结构,提供一个疏水区的亲水表面,螺旋的疏水面可形成同聚二聚体,处于亲水表面的带电基因可螯合细胞脱水过程中浓缩的离子;而组成 LEA 蛋白的氨基酸多为碱性、亲水性氨基酸,尤其富含甘氨酸、赖氨酸等亲水氨基酸,而疏水氨基酸含量很少,具有很高的亲水性和热稳定性,可以重新定向细胞内的水分子,束缚盐离子,以减轻脱水造成的不良影响[10]。试验发现,即使在煮沸条件下,LEA 蛋白也能保持水溶状态[11]。如 Em、D11、D113 和 D29 可能都是通过这种方式起作用[12,13]。属于 LEA 蛋白的棉花 LEA4、D113,它们的 N 端随机螺旋与西红柿、向日葵中的长度不同,表明有不同的功能。D113LEA 蛋白的长螺旋结构 N—无亲水性,但在无规则卷曲尾部有较强束水作用[14]。大麦 LEA B19 基因家族由 4 个成员组成,即 B19.1,B 19.6,B19.3 和 B19.4,其基元序列重复分别为 1、1、3 和 4。这些蛋白都具有高度亲水性及随机螺旋结构,表明该组蛋白具有较高的水合能力,可作为水分结合蛋白,防止细胞在干旱胁迫时水分流失[15]。

一般认为,伴随种子成熟过程而形成的 LEA 蛋白(主要为脱水素)的生理功能与种子耐脱水性形成有关,缺乏这类蛋白使种子对脱水敏感[16]。业已发现,从耐极度干燥的复苏植物(resurrenion plant)中得到的 pcC27—45 基因,能在脱水叶和根组织中高效表达;来自脱水大豆叶的 D95lea cDNA 克隆,可与大豆叶和根中受脱水诱导的 0.8kb 转录子杂交;拟南芥 aba/abi 双突变体在形成耐脱水能力的同时,也合成了一些只有野生型发育后期才累积的低分子量蛋白,其中包括 LEA 蛋白;在小麦幼苗中也发现 Group3LEA 蛋白与其耐脱水性密切相关。

2.2　参与渗透调节和水分运输

植物的渗透调节多以小分子渗透调节物质的合成和运输形式进行,小分子的水平又受其合成酶控制,而这些酶又可被水分胁迫诱导[17]。贺志理等[18]研究发现,PEG 处理的高粱根中出现的 66kD 新蛋白的合成与 K^+ 积累之间有密切关系,认为 66kD 新蛋白可能参与根对 K^+ 的主动运输。

可被水分胁迫诱导的水孔蛋白(Aquaporins,AQP)是一类跨膜蛋白,分子量约为 26～29kD。根据序列同源性可以分为 3 类,即质膜内在蛋白(PIPs)、液泡膜内在蛋白(TIPs)和 NLM 蛋白(Nodulin 26 like MIPs,NLMs)[19]。水孔蛋白具有 MIP 家族结构的典型特征,序列亲水性分析表明,水孔蛋白具有由 5 个短环(Loop)相连的 6 个跨膜 α—螺旋及伸入细胞质的 N 端和 C 端组成。水孔蛋白的每半部分均包含一个由 3 个氨基酸组成的结构域,称之为 NPA 盒(Asppro—ala box)[20]。这类蛋白形成水分运输的特异性通道,它可以促进水分的长距离运输和细胞内外的跨膜水分运输,还具有调节细胞胀缩的功能[21]。

2.3　保护细胞结构

干旱胁迫可引起细胞壁理化性质的变化,在此种变化中涉及到 s—腺苷蛋氨酸合成酶的表达[22]。其表达的增加与细胞壁木质化相关联,可能是因为此酶催化合成的 s—腺苷蛋氨酸可作为木质素合成过程中的甲基供体。随着干旱胁迫时间的延长,细胞延伸生长停止,而后木质化过程开始[23]。细胞木质化后,不仅可限制水分和营养物质向外扩散,还可增强抗真菌的能力。

各种逆境对细胞的最大伤害就是破坏膜系统和大分子结构。在逆境条件下植物诱导合成了许多蛋白和一些还原性的糖类,用以维持细胞膜结构和功能的稳定性[24]。根据脱水素的结构,一些 LEA 蛋白在植物受到干旱失水危胁时,能够部分替代水分子,保持细胞液处于溶解状态、从而避免细胞结构的塌陷,尤具是膜结构。干旱胁迫可使还魂草编码叶绿体 dsp22 蛋白的 mRNA 水平增加。干旱时,在还魂草叶绿体形态变化过程中,dsp22 蛋白束缚色素或帮助维持组装光合作用的结构,这样可以恢复活化光合作用[25]。

2.4　分子伴侣的作用

水分胁迫可导致一些蛋白质变性,分子伴侣可以稳定蛋白质及膜的结构和功能,防止其进一步变性。从拟南芥中分离出了 2 个干旱诱导产物 Athsp70—1 及 Athsp70—2,它们的序列与热休克蛋白相类似[26]。这些蛋白可能是分子伴侣,它们通过与变性或异常的蛋白质结合防止它们凝聚,或使在水分胁迫时错误折叠的蛋白质恢复其天然构象,从而避免细胞膜结构损伤。其中某些 LEA 蛋白的作用

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可能起分子伴侣和亲水性溶质的作用，在水分胁迫时稳定和保护蛋白质的结构及功能[13]。

LEA蛋白除了在干旱胁迫中发挥作用之外，寒冷、盐胁迫也同样诱导LEA基因表达及LEA蛋白积累。除了以上功能外，某些LEA蛋白还有其他功能，如蛋白酶、核蛋白、蛋白抑制剂以及在信号传递过程中起作用的蛋白质激酶、RNA结合蛋白等。在缺水时识别蛋白质成分的转录因子也已被发现[27]。

3 LEA蛋白基因表达的调控

同其它逆境蛋白基因表达的调控一样，LEA基因表达的调节也有多种途径。大量研究证明激素ABA与这些胁迫诱导的基因调控有关，基于此，Shinozaki等[28]提出了一个不同信号途径激发干旱诱导基因表达模式，即干旱基因表达至少存在三种不同的诱导方式，ABA依赖型、ABA诱导型、非ABA应答型。(图1)

3.1 ABA依赖型的基因表达

在依赖ABA的途径中，水分胁迫诱导基因的表达必须依赖植物内源ABA积累或实验中使用的外源ABA，但不需特殊蛋白质的合成[29,30]。人们发现这些脱水诱导的基因在它们启动的区域含有ABA响应元件(ABA-reponsive elements. ABRES)。ABRE在结构上的特点是对ABA有专一的响应，由PyACCTCCC组成的保守核心序列称为G-box，它在ABA调节的基因表达中为顺式作用元件。ABRE和G-盒结合蛋白cDNA已经被分离，其在亮氨酸一拉链结构(Leu-zipper motif)的邻近都含有一个碱性区域，并且构成一个大的基因家族[31]。干旱信号通过ABA作用于响应元件，从而调节LEA基因的表达。如大麦的HVAl基因就是一个ABA响应基因，具有完整的编码序列，含400 bp5'上游序列该基因启动子，分别存在四个具ACGT核心序列的ABA应答元件，即ABRE1、ABRE2和ABRE3及C盒。采用接头分区引导和瞬时表达技术发现，C盒和ABRE1的突变对ABA诱导和转录水平的改变几乎没有影响，但ABRE2和ABRE3突变却使转录水平下降到只有野生型启动子的10%～20%，说明HVAl基因的高水平表达需要后两者参与。值得注意的是，尽管启动子的突变会使表达水平降低，但是突变后的启动子在ABA应答时仍能使诱导增加20倍。因此，在HVAl对ABA应答时，基因的绝对表达水平是由ABRE2和ABRE3一起组成的复合体控制的，而且这两个元件中的任何一个或者还可能存在的第三个元件，对ABA的诱导都具有调节作用[32]。

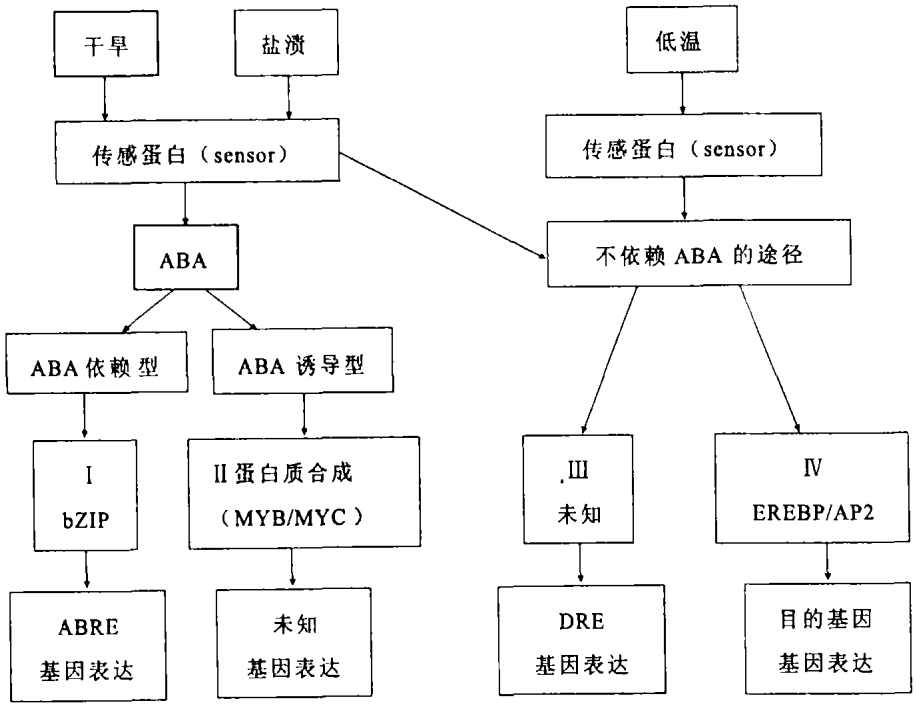

图1 LEA蛋白基因表达的调控途径(Shinozaki et al, 1998, 略有改动)

Fig.1 Regulation of gene expression of plant LEA proteins(Shinozaki et al, 1998)

3.2 ABA诱导型基因表达与调控

干旱能导致植物体内一些内源激素的变化，继而产生激素反应基因，多数干旱诱导基因是由ABA诱导的。Colmenero Flores等通过水分胁迫和ABA

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

处理云扁豆(Phasesolus vulgaris),诱导出 6 种 cDNA,其中有两种 LEA 基因[7]。在中度胁迫下(PSIW=0.35MPa)16 或 24 h 这些基因表达最大,尔后表达水平衰退;复水后这些基因在瞬间内重新表达或者保持缺水后期的水平。这些现象表明短期快速干旱处理,这些基因并无变化,复水几小时后(4 h)才能降到较低水平。

Iuchi 等[33]在对高耐旱黎豆进行干旱胁迫研究时,诱导出 10 种 cDNA。Northen 杂交分析表明,其中 9 种 cPRD(脱水敏感的黎豆克隆)用高盐胁迫能诱导 cPRD8、cPRDD14 和 cPRD22 基因的表达,而冷或热胁迫则不能。在一定范围内施加外源 ABA,能诱导 cPRD8 和 cPRD22 基因,而不能诱导 cPRDl4 基因,说明黎豆水分胁迫和 cPRD 基因表达之间至少有 2 个信号转导通道。

3.3　非 ABA 应答型的基因调控

在 aba(ABA 缺乏)或 abi(ABA 不敏感)的拟南芥突变体中,一些基因受干旱、盐和冷诱导,因此认为这些基因在冷或干旱条件下的表达不需要 ABA。在这些基因中,干旱诱导基因 rd29A、lti78、cor78 已得到普遍分析。在干旱和冷胁迫中,至少有两个独立的调节系统对基因表达起作用,一个是不依赖 ABA 的途径,另一个是依赖 ABA 的途径。即脱水、低温或高盐能够诱导含有 DRE 顺式作用元件的基因,但是,对 rd29A 诱导的像 ABA 响应元件则没有作用。

4　展　望

LEA 蛋白的研究虽已取得了一些进展,但迄今为止,对多数 LEA 蛋白的功能及表达机理仍不太清楚。从现有的研究结果看,LEA 蛋白不仅与种子的脱水耐受性有关,也与干旱胁迫、ABA 诱导有密切联系。LEA 蛋白是一大类与逆境相关的蛋白,是由多基因调控的,至少有 4 条信号转导途径,干旱诱导时常常会出现几种信号传导途径,并有交叉现象,其具体机制仍不清楚。植物耐旱性可能是一种数量性状,当植物的含水量下降到一定程度时即开始积累渗透调节物质,以维持植物的正常代谢,但干旱程度与 LEA 基因表达的阀值尚不清楚,弄清楚不同植物的这种阀值,对节水灌溉会有很大的参考价值。因此对 LEA 蛋白的深入研究不仅可以从分子水平上去揭示植物的抗逆机制,也可为利用基因工程技术改良作物奠定基础。为此,在今后的研究中应对以下四个方面的问题进入深入的探讨:一是加大对 LEA 蛋白结构的研究及其基因的分离;二是从生理生化途径详细研究在干旱胁迫诱导下 LEA 蛋白在细胞中作用机理;三是进一步深入了解渗透胁迫下 LEA 蛋白基因表达调控的信号传导途径及基因的开关调控过程;四是利用植物基因工程的手段将 LEA 基因转入植物体中,为培育抗逆作物品种提供有效基因资源。随着对 LEA 的功能及其表达调控的深入研究,人们将会在揭示植物抗旱生理生化机制和培育抗逆性强作物品种方面取得突破性进展。

参 考 文 献:

[1] 山　仑,陈培元.旱地农业生理生态基础[M].北京:北京科学出版社,1998.16－17.

[2] Yancey P H. Living with water stress[J]. Science,1982,217:1214－1222.

[3] 苏　金,朱汝才.渗透胁迫调节的转基因表达对植物抗旱耐盐性的影响[J].植物学通报,2001,18(2):129－136.

[4] Dure Ⅲ L, Chlan C A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. XⅡ. Purufication and properties of principle storage protein[J]. Plant physiol,1981,68:180－186.

[5] Dure Ⅲ L, Crouch M, Harada J, et al. Common amino acid sequence demains among the LEA proteins of highter plants[J]. Plant Molecular Biology,1989,12:475－486.

[6] 俞嘉宁,山　仑. LEA 蛋白与植物的抗旱性[J].生物工程进展,2002,22(2):10－14.

[7] Colmenero-Flores J M, Moreno L P, Smith C E, et al. Pvlea－18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the gounilng region of well－irrigated bean seedlings[J]. Plant Physiol,1999,120(1):93－104.

[8] 孙立平,李德全.LEA 蛋白的分子生物学研究进展[J].生物技术通报,2003,(6):5－9.

[9] Covarrubias A A, Ayala J W, Reyes J L, et al. Cell-well proteins induced by water defieit in bean (Phasedas vulgaris L.)seedling[J]. Plant Physiol,1995,107:1119－1128.

[10] Caray Arroyo A, Colmenero Flores J M, Caroiarrubio A, et al. Highly hydrophilic proteins in prokaryates and eukaryates are common during conditions of water deficit[J]. J. Biolchem,2000,275(8):5668－5674.

[11] 赖钟雄,张妙霞,李冬梅,等.植物 LEA 蛋白与 LEA 基因表达[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(4):463－466.

[12] Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K. Molecular response to drought and cold stress[J]. Curr Opin Plant Biotech,1996,7:161－167.

[13] 翟大勇,沈黎明.逆境胁迫诱导基因的结构、功能与表达调控[J].生物化学与生物物理进展,1998,25(3):216－221.

[14] Swire Clark GA, Marcotle WR Jr. The wheat LEA protein Emfuctions as an osmoprotective molecule in sacharomyees cerevisiae[J]. Plant Molecular Biology,1999,39(1):117－128.

[15] Close T J. Dehydrins:emergence of a family of plant dehydration

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

proteins[J]. Plant J, 1992, 2(2): 241—252.

[16] Almonguera C, Jordanano J. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNA[J]. Plant Mol Biol, 1992, 23: 781—792.

[17] 汤章城. 植物对渗透和淹水胁迫的适应机理. 于叔文主编, 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 404—416.

[18] 贺志理, 汤章城. PEG 胁迫下高粱根中 66KD 多肽的产生及 K^+ 累积刺激增加的关系[R]. 中国植物生理学会第六次全国会议论文汇编, 1993. 328.

[19] Santoni V, Gerbeau P, Javot H, et al. The high diversity of aquqporins reveals novel facets of plant membrane functions[J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3(6): 476—481.

[20] 于秋菊, 吴 钊奇, 林忠平, 等. 植物水孔蛋白研究进展[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2002, 38(6): 855—866.

[21] Maurel C. Aquaporins and water Permeability of plant membranes[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 399—429.

[22] Espartero J, Pintor-Toro J A. Differential accumulation of s-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 217—227.

[23] Nonami H, Boyer JS. Wall extensibility and cell hydraulic conductility decrease in enlarging stem tissues at low water potentials [J]. Plant Physiol, 1990, 93: 1610—1619.

[24] 任晓米, 朱 诚, 曾广文. 与种子耐脱水性有关的基础物质研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 183—189.

[25] Bartels D, Hanke C, Schneider K, et al. A desiccation-related Elip-like gene from the resurrection plant Craterostigma plantagineun is regulated by light and ABA[J]. EMBO J, 1992, 11(8): 2771—2778.

[26] Kiyosue T, Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K. Cloning of cDNA for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in Arabiodopsis thaliana L: identification of three ERDs as HSP cognate genes[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 791—798.

[27] 万东石, 李洪玉, 等. 植物体内干旱信号的传递与基因表达[J]. 西北植物学报, 2003, 23(1): 151—157.

[28] Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 327—334.

[29] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 377—403.

[30] Bray E A. Molecular responses to water deficit[J]. Plant Physiol, 1993, 103: 1035—1040.

[31] Menkes A E, Schindler U, Cashmore A R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in Plants bound by GBF family of bZIP proteins[J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 506—510.

[32] Straub P F, Shen Q X, Ho T H D. Structure and promoter analysis of an ABA and stress—regulated barley gene, HVAL[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 619—630.

[33] Iuchi S, Yamagchi-shinozaki, Urao T, et al. Novel drought-inducible genes in the hight drought-tolerant Cowpea: Cloning of cDNA and analysis of the expression of corresponding genes[J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37(8): 1073—1082.

A review of plant LEA proteins in adversity stress

YANG Tian-xu[1], WANG Yao-fu[1,2], SONG Shi-xu[1], CAI Han-yu[1], GAO Hua-jun[1]

(1. *Agronomy College of Henan agricultural University, Zhengzhou, He'nan* 450002, *China*;
2. *Postdoctoral Workstation of Changsha Cigarette Factory, Changsha, Hu'nan* 470014, *China*)

Abstract: In adversity stress, some induced proteins were produced in plants, among which LEA proteins (Late embryogenesis abundant protein) was the one to be most studied. In this paper, the production, characteristic, physiological effects and regulation of gene expression of plant LEA proteins in adversity stress were reviewed. And the research outlook and application prospect of plant LEA protein were also discussed.

Keywords: LEA proteins; adversity stress; regulation of gene expression

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net