

CBL/CIPK 信号系统在植物细胞中的研究进展

邵付菊, 王伟, 刘全军, 李会云 (河南农业大学生命科学院, 河南郑州 450002)

摘要 从 CBL 蛋白家族, CBL 蛋白下游靶蛋白 CIPK 以及 CBL/CIPK 在逆境胁迫中的表达模式等多个方面, 介绍了 CBL/CIPK 信号系统在植物细胞中的一些研究进展。

关键词 Ca^{2+} 信号转导; CBL; CIPK

中图分类号 S312 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)32-13957-02

Research Progress of CBL/CIPK Single System in Plant Cell

TAI Fu-ju et al (College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract Research progress of CBL/CIPK single system in plant cell was introduced from several aspects, such as CBL protein family, downstream target protein CIPK of CBL, and the expression patterns of CBL/CIPK under stress.

Key words Ca^{2+} signal transduction; CBL; CIPK

一些非生物胁迫^[1-2]和生物胁迫^[3-4]所引起的生理生化反应都被研究证明与 Ca^{2+} 信号转导有关^[5]。另外植物许多固有的生长发育过程, 如根毛的生长, 花粉的发育, 花粉管的伸长等也都离不开 Ca^{2+} 信号转导^[6]。 Ca^{2+} 信号的产生离不开 Ca^{2+} 感受器, 它们在 Ca^{2+} 介导的各种细胞反应过程中起重要作用。感受器通常是能结合 Ca^{2+} 并因之而改变构象的蛋白质, 它可以监测 Ca^{2+} 浓度的瞬间变化并刺激信号传导途径的下游成员, 从而引发植物的各种生理效应^[7-9]。

在高等植物中已经鉴定出几种 Ca^{2+} 感受器, 主要可以分为 3 类, 其中, 第 3 类是钙调素 B 蛋白家族, 它是类似于酵母和动物体内的钙调磷酸酶 B 的一类蛋白, 简称 CBL (Calcineurin B-like Proteins), CBL 虽然能结合 Ca^{2+} , 但自身没有激酶域, 必须和其靶蛋白作用才能发挥其功能。该研究主要阐述第 3 类 Ca^{2+} 感受器——CBL/CIPK 信号系统的研究进展。

1 CBL 蛋白家族

CBL 蛋白是由多基因家族编码的, 已在拟南芥和水稻中发现 10 种 CBL^[10-11], 在其他植物中也有类似的蛋白质发现^[12-13], 但是到目前为止, 还没有在动物中发现 CBL 蛋白基因, 说明 CBL 蛋白基因可能在高等植物中参与特定的信号转导功能。它们除了在编码的结构与长度上有所变化外, 基本结构类似。这类蛋白的氨基酸序列同源性在 20%~90%, 它们大多数含有不同数量的 EF 手型结构, 如在 10 个拟南芥 CBLs 中, AtCBL6、AtCBL7、AtCBL8、AtCBL10 四者都只有 1 个典型的 EF 手形结构, AtCBL1、AtCBL9 含有 2 个标准的 EF 手形结构, 而 AtCBL2、AtCBL3、AtCBL4、AtCBL5 则没有标准的 EF 手形结构^[10]。研究表明, 一个 EF 手形结构通过 loop 环形结构结合一个 Ca^{2+} , EF 结构组成方式不同, 和钙离子的亲和力也就不同, 这样不同的 CBL 结合 Ca^{2+} 的能力和数量是不一样的。这就为 CBL 作为一种 Ca^{2+} 感受器感应多种刺激引起的信使 Ca^{2+} 的变化提供了基础, 也有助于解释为何有限的 CBLs 钙信号元件能对环境中众多刺激做出应答。此外, 在 CBL/CIPK 作用过程中很可能存在另外的钙调过程。因此, CBL 的结构多样性是 Ca^{2+} 信号转导多样性的基础。

2 CBL 蛋白下游靶蛋白 CIPK

CBL 自身没有激酶域, 只能通过与其他的靶蛋白作用才能发挥其作用。现有的研究表明, CBL 不像 CaM 蛋白可以结合多种靶蛋白, 它们只与单一的一个蛋白激酶家族发生相互作用, 而且这种作用需要微摩尔的 Ca^{2+} 水平^[14]。CIPKs (CBL Interacting Protein Kinase) 作为 CBL 的靶蛋白, 是植物中特有的一类含有属于 Ser-Thr 功能域的蛋白激酶, 它在 N 端有一特异的催化结构域和 C 端区域一个独特的 24 个氨基酸组成的调节域即 NAF 结构域, 这一调节域的序列在所有 CIPK 中高度保守, 也是 CBL-CIPK 相互作用所必不可少的^[15]。一个 CBL 蛋白可以和几个 CIPK 匹配而相互作用, 同样地, 一种 CIPK 也作用于一种或者更多的 CBL, 从而组成很多信号传递的支路^[16-18]。CBL-CIPK 的这种特异重复的作用机制表明这 2 种基因家族功能上的特异性和丰富性。

目前, 在拟南芥中已经发现有 25 种 CIPK, 水稻中有 30 种 CIPK^[10-11], 在其他植物中也有类似的蛋白质发现^[12]。Xiang 等研究了在不同逆境胁迫下, 水稻中 30 个 CIPK 基因 (*OsCIPK01*~*OsCIPK30*) 在转录水平上的变化, 研究发现其中 20 个 CIPK 基因可以被逆境胁迫诱导, 并且过量表达 *OsCIPK03*、*OsCIPK12*、*OsCIPK15* 基因可以明显提高转基因植株的抗逆性^[11]。过量表达 CIPK23 蛋白基因可使植物在低钾浓度下的钾吸收速率增强, 显著提高对低钾胁迫的耐受性^[18]。Kim 等的研究发现, CIPK3 基因是在拟南芥幼苗期表达量上调的一个基因。如果缺失 CIPK3 基因, 拟南芥突变体的表型在幼苗期的萌发过程中表现尤为明显, 并且这种组织特异性和特定发育时期表达模式是受环境中特定的刺激而引发的^[2]。

3 CBL/CIPK 信号系统与植物的抗逆性

CBL/CIPK 信号系统在植物的逆境信号转导中起着重要作用。Liu 等在对拟南芥的耐盐性相关基因的筛选过程中发现 CBL 家族中一类与盐害密切相关的基因——*AtSOS3* (即 *AtCBL4*), 该基因在应对盐胁迫方面发挥其重要的作用, 说明细胞内 Ca^{2+} 信号转导可以通过 CBL 蛋白家族进行介导^[19]。随后, Halfter 等利用酵母双杂交技术研究了能与 *AtCBL4* 相互作用的蛋白, 发现 *AtCIPK24* (*AtSOS2*) 能与之相互作用, 并且它们在植物细胞内维持 Na^+ 和 K^+ 的动态平衡,

基金项目 河南农业大学引进人才科研启动基金项目(30500247)。

作者简介 邵付菊(1978-), 女, 河南南阳人, 博士, 讲师, 从事植物分子生物学研究。

收稿日期 2008-09-08

从而在提高植物抗盐性方面发挥重要作用^[20]。进一步的研究发现了由它们共同调控的功能基因 *AtSOS1*, *AtSOS1* 的表达受 *AtSOS3* 和 *AtSOS2* 共同调节,而且 *AtSOS1* 编码的蛋白—— Na^+/H^+ 反转运蛋白有助于提高植物的耐盐性^[21-22]。而 Quan 等近来的研究发现, *AtCBL10* 与 *AtSOS3* (*AtCBLA*) 属同源基因,它们都可以与 *AtSOS2* (*AtCIPK24*) 结合,调控下游基因 *AtSOS1*,在盐胁迫响应中都发挥重要作用,而 *AtCBLA* 在根的盐胁迫响应中起主要作用,*AtCBL10* 则主要影响芽对于盐的胁迫反应^[23]。这些同源基因在植物不同组织中发挥不同的功能,可能预示着不同 CBL 基因表达模式是由不同植物组织的不同需要决定的。

Kudla 等^[24]和 Cheong 等^[25]发现 *AtCBL1* 基因缺失能大大提高植物对干旱和盐胁迫的敏感性,而且该基因的缺失能够影响一些与胁迫有关的转录因子 CBF/DREB 的表达,这也暗示了 *AtCBL1* 基因是影响逆境基因表达的一个上游调控因子,不仅本身受到胁迫的诱导,还可以调节其他相关基因的表达,在许多胁迫反应中作为一个限速因子而存在。此外, *AtCBL1* 基因还是感知许多逆境胁迫信号的交汇点,它与 CIPK1 的互作对干旱、渗透胁迫应答过程也有一定贡献。拟南芥 *AtCBL9* 基因的表达也受低温、干旱、盐害及 ABA 等多种胁迫的影响^[26]; Wang 等克隆分离了玉米中 *ZmCBLA* 基因,并将其转入拟南芥中,增强了转基因植株的抗盐性^[13]。Kim 等在水稻中克隆出了一个与 CIPK 家族非常类似的一个基因 *O_sCK1*,它编码的蛋白可以与 *AtCBL3* 蛋白相互作用,并且能够在低温及其他逆境条件下被强烈诱导^[27]。Mahajan 等对豆荚克隆得到一种 *PsCBL* 和 *PsCIPK* 基因,通过研究发现,其表达能够被盐、低温、伤害、钙及水杨酸(SA)诱导^[12]。Xu 等在研究 *AtCIPK23* 提高低钾胁迫的耐受性的功能时发现,该基因的上游受 2 种钙信号感受器 CBL1 和 CBL9 的正向调控,由此,研究人员提出了包括 CBL1/9、CIPK23 等因子的植物响应低钾胁迫的钾吸收分子调控理论模型^[18]。

4 展望

植物的信号转导过程大多与 Ca^{2+} 信号传递有关。同一信号刺激能引发不同的信号传递途径,各条信号途径之间又存在着复杂的交叉转导作用,因此,彻底弄清楚有关 Ca^{2+} 信号传递系统的作用机理对于揭示植物生长发育及对抗不良环境机制有重要的意义。在 Ca^{2+} 信号转导方面,关于 CaM 和 CDPK 功能的研究已经有许多报道,也取得了许多进展,但是 CBL/CIPK 作为一种重要的 Ca^{2+} 感受器,在 Ca^{2+} 信号转导中发挥重要作用,有关的报道却并不是很多。并且关于 CBL 和 CIPK 的研究也大都局限于拟南芥和水稻中,有关这些基因功能的研究也刚刚开始。已有的研究虽然没有完全弄清所有 CBLs、CIPKs 的功能,但是却揭示 CBLs 和 CIPKs 在植物对非生物逆境应答的钙信号系统中起了很重要的作用。它们先形成 CBL/CIPK 复合体,然后调节一系列的下游基因表达,最终对逆境胁迫作出应答。因此,可以说,为应对不良环境,CBLs 和 CIPKs 以各种相同或是特异的模式表达,以适应生长发育需要,而这些表达模式对整个信号系统也有着非常重要的作用。但是,为何不同的胁迫反应会引起不同的信号转导反应,会有不同的 CBL 与不同的或相同的 CIPK 蛋白

分子相互作用,而它们这种相互协调的机制为何最终又可以促使植物对于不同的逆境胁迫产生不同的响应,这都是研究人员需要进一步研究的问题。因此,在现有基础上弄清楚 CBL 与其靶蛋白 CIPKs 之间的相互关系,及它们对下游基因的调控作用,对于进一步揭示植物 Ca^{2+} 信号转导机制具有重要的意义。

而为更清楚了解 Ca^{2+} 信号转导通路,就必须进一步对 CBL 和 CIPK 蛋白在细胞内的分布,与 Ca^{2+} 结合的方式,CBL 和 CIPK 蛋白的生理功能,不同 CIPK 与不同 CBL 的作用模式以及下游作用的功能蛋白等进行深入研究。这是了解 Ca^{2+} 信号转导的基础,也有助于更深入地了解植物细胞内的信号转导机制。

参考文献

- [1] KNIGHT H, KNIGHT M R. Abiotic stress signalling pathways: Specificity and cross-talk [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(6): 262-267.
- [2] KIM K N, CHEONG Y H, GRANT J J, et al. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2003, 15(2): 411-423.
- [3] CHUNG E, PARK J M, OH S K, et al. Molecular and biochemical characterization of the *Capsicum annuum* calcium-dependent protein kinase 3 (CaCDPK3) gene induced by abiotic and biotic stresses [J]. Planta, 2004, 220(2): 286-295.
- [4] LUDWIG A A, SAITOH H, FELIX G, et al. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(30): 10736-10741.
- [5] POOVAIAH B W, REDDY A S N. Calcium and signal transduction in plants [J]. CRC Crit Rev Plant Sci, 1993, 12(3): 185-211.
- [6] SAFADI F, REDDY V S, REDDY A S N. A pollen-specific novel calmodulin-binding protein with tetratricopeptide repeats [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(45): 35457-35470.
- [7] 李玉菊, 李小方. 植物中解密 Ca^{2+} 信号转导特异性的机制 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(4): 414-416.
- [8] BRAAM J, DAVIS R W. Rain, wind, and touch induced expression of calmodulin and calmodulin related genes [J]. Cell, 1990, 60(3): 357-364.
- [9] SANDERS D, BROWNLEE C, HARPER J F. Communicating with calcium [J]. Plant Cell, 1999, 11(4): 691-706.
- [10] KOLUKISA OGLU U, WEINL S, BLAZEVIC D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. Plant Physiol, 2004, 134(1): 43-58.
- [11] XIANG Y, HUANG Y M, XIONG L Z. Characterization of stress-responsive ciplk genes in rice for stress tolerance improvement [J]. Plant Physiology, 2007, 144(3): 1416-1428.
- [12] MAHAJAN S, SOPORY S K, TUTEJA N. Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*) [J]. FEBS Journal, 2006, 273(5): 907-925.
- [13] WANG M Y, GU D, LIU T S, et al. Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance [J]. Plant Mol Biol, 2007, 65(6): 733-746.
- [14] SHI J, KIM K N, RITZ O, et al. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1999, 11(12): 2393-2405.
- [15] NAGAE M, NOZAWA A, KOIZUMI N, et al. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem, 2003, 278(43): 42240-42246.
- [16] LUAN S, KUDLA J, RODRIGUEZ-CONCEPCION M, et al. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants [J]. The Plant Cell, 2002, 14(1): 389-400.
- [17] KIM K N, CHEONG Y H, GUPTA R, et al. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases [J]. Plant Physiol, 2000, 124(4): 1844-1853.
- [18] XU J, LI H D, CHEN L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2006, 125(7): 1347-1360.
- [19] LIU J P, ZHU J K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance [J]. Science, 1998, 280(19): 1943-1945.

据体现出来的酶反应情况,测定时宜取 1 min 内的平均反应速度来反映花生种子脂肪氧化酶的活力。

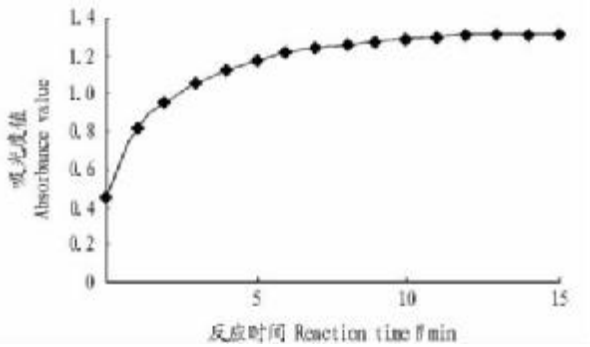


图 7 缓冲液浓度为 0.10 mol/L、pH 值为 5.8 时反应时间与酶反应速度关系

Fig.7 Relation between reaction rate and enzyme activity with 0.10 mol/L buffer concentration and pH 5.8

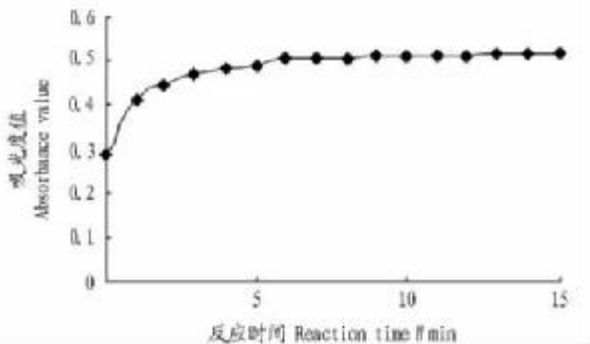


图 8 缓冲液浓度为 0.20 mol/L、pH 值为 8.0 时反应时间与酶反应速度关系

Fig.8 Relation between reaction rate and enzyme activity with 0.20 mol/L buffer concentration and pH 8.0

2.6 花生种子脂肪氧化酶酶液保存时间与酶活的关系 在 4 °C 的条件下,将提取的酶液分别保存 1、2、3、4、5、6 h,测得酶活力如图 9、图 10 所示。在 1 h 内,脂肪氧化酶活力基本不发生变化,保存到 2 h,pH 值 5.8(浓度 0.10 mol/L)时所测得的酶活下降到初始值的 55%;pH 值 8.0(浓度 0.20 mol/L)时所测得的酶活为初始值的 95%,此后,随着保存时间的增加,酶活力都出现不同程度的下降趋势。根据所得结果推测,pH 值 5.8(浓度 0.10 mol/L)和 pH 值 8.0(浓度 0.20 mol/L)的磷酸缓冲溶液测定的脂肪氧化酶应该属于不同种类,而且前者的酶活性较难保持,因此测定花生种子脂肪氧

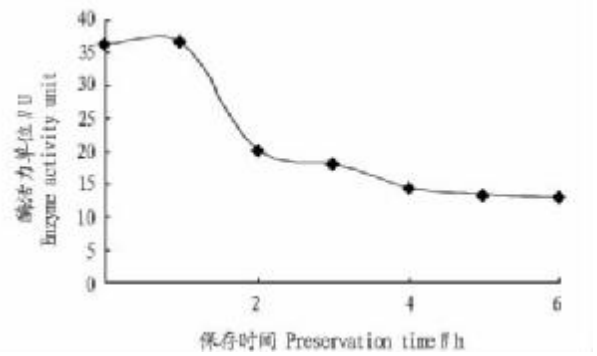


图 9 缓冲液浓度为 0.10 mol/L、pH 值为 5.8 时保存时间与酶活关系

Fig.9 Relation between preservation time and enzyme activity with 0.10 mol/L buffer concentration and pH 5.8

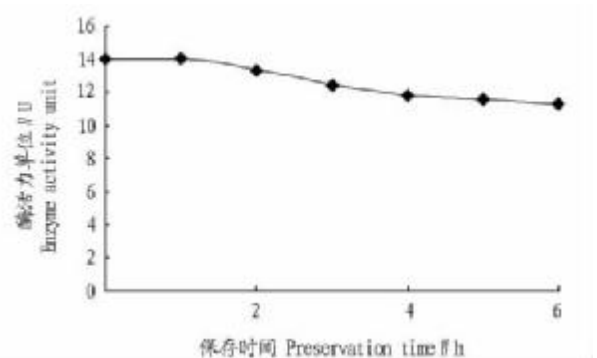


图 10 缓冲液浓度为 0.20 mol/L、pH 值为 8.0 时保存时间与酶活关系

Fig.10 Relation between preservation time and enzyme activity with 0.20 mol/L buffer concentration and pH 8.0

化酶酶活要保持在 1 h 以内。

参考文献

[1] HAMOMAND E G. Rapid screening techniques for lipoxygenase in soybean seeds [J]. Crop Sci, 1992, 32: 830.
 [2] AL-OBAIDY H M, SIDDII Q M. Properties of broad bean lipoxygenase [J]. Food Sci, 1981, 46: 622-629.
 [3] GALLIARD T, PHILLIPS D R. Lipoxygenase from potato tubers [J]. J Biochem, 1971, 124: 431-438.
 [4] SUZUKI Y K, HIGO K, HAGIWARA K, et al. Production and use of monoclonal antibodies against rice embryo lipoxygenase-3 [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56: 678-679.
 [5] 钟芳, 王璋, 许时婴. 3 种脂肪氧合酶活性测定方法 [J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(1): 77-79.
 [6] DROILLARD M J, ROUET-MAYER M A, BUREAU J M, et al. Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoform in tomato pericarp [J]. Plant Physiol, 1993, 103: 1211-1219.
 [24] KUDLA J, XU Q, HARTER K, et al. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals [J]. PNAS, 1999, 96(8): 4718-4723.
 [25] CHEONG Y H, KIM K N, PANDEY G K, et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2003, 15(8): 1833-1845.
 [26] PANDEY G K, CHEONG Y H, KIM K N, et al. The calcium sensor calcineurin b-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16(7): 1912-1924.
 [27] KIM K N, LEE J S, HAN H, et al. Isolation and characterization of a novel rice Ca²⁺-regulated protein kinase gene involved in response to diverse signals including cold, light, cytokins, sugars and salts [J]. Plant Mol Biol, 2003, 52(6): 1191-1202.

(上接第 13958 页)

[20] HALFTER U, ISHITANI M, ZHU J K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3 [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(7): 3735-3740.
 [21] SHI H, WU S J, ZHU J K. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter improves salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(3): 81-85.
 [22] SANCHEZ-BARRENA M J, MARTINEZ-RIPOLL M, ZHU J K, et al. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS2: molecular mechanism of sensing calcium or salt stress response [J]. J Mol Biol, 2005, 345: 1253-1264.
 [23] QUAN R D, LIN H X, MENDOZA I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress [J]. The Plant Cell, 2007, 19(4): 1415-1431.