

泛素化在植物抗病中的作用

胡婷丽^{1,2} 李魏^{1,2} 刘雄伦^{2,3} 戴良英^{1,2*}

- (1. 湖南农业大学 植物保护学院 湖南 长沙 410128)
(2. 作物基因工程湖南省重点实验室 湖南 长沙 410128)
(3. 湖南农业大学 农学院 湖南 长沙 410128)

摘 要: 泛素化作为植物体内一种广泛存在的调控细胞反应的机制, 参与调控植物抗病反应。本文综述了泛素化系统在植物抗病反应中的功能及作用机制, 重点介绍了 CRLs 型 E3 泛素连接酶和 RING/U-box 型 E3 泛素连接酶如何参与调控植物抗病信号途径, 以及病原物通过效应蛋白和毒性因子调控植物抗病性的分子机理, 为阐明植物抗病机理和植物病害防治方法提供参考。

关键词: 泛素化, 植物抗病, E3 泛素连接酶, CRLs, RING/U-box

The role of ubiquitination in plant disease resistance

HU Ting-Li^{1,2} LI Wei^{1,2} LIU Xiong-Lun^{2,3} DAI Liang-Ying^{1,2*}

- (1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)
(2. Key Laboratory of Crop Genetic Engineering of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)
(3. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Ubiquitination, as a regulating mechanism of cell reactions, exists extensively in plant and is involved in regulating plant disease resistance. This paper reviewed the function and mechanism of ubiquitination system in regulating plant disease resistance. Particularly, we mainly introduced how CRLs and RING/U-box type E3 ubiquitin ligases mediate plant disease resistance signaling and the molecular mechanism of regulation in plant disease resistance through effectors and virulent factors of pathogens. This paper provides reference for illustrating the mechanism of plant disease resistance and controlling the plant diseases.

Keywords: Ubiquitination, Disease resistance, E3 ubiquitin ligase, CRLs, RING/U-box

泛素化广泛地参与调控植物细胞反应, 如细胞周期、激素信号转导、衰老、细胞死亡、开花和抗病等一系列生理活动。其中泛素化在植物抗病反应

中的作用机制是目前泛素化功能研究的热点。近几年, 越来越多研究表明许多 E3 泛素连接酶参与调控植物的抗病性, 其泛素化靶标蛋白可介导抗病信

基金项目: 农业部公益性行业科研专项项目(No. 20130328-08); 转基因生物新品种培育重大专项课题(No. 2013ZX08001-002, 2012ZX08009001-004); 国家自然科学基金项目(No. 31300250, 31371246)

*通讯作者: ✉: daily@hunau.net

收稿日期: 2014-02-26; 接受日期: 2014-03-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-27

号途径的传导,甚至一些病原物效应蛋白也在其宿主细胞中起 E3 泛素连接酶的作用,并以此来干扰植物抗病反应。本文综述了泛素化系统参与植物抗病反应调控的研究进展,以期为进一步解析植物抗病机制提供新线索。

1 植物抗病系统

植物在与病原物的长期斗争进化过程中形成了两套防御机制——PTI (PAMP-triggered immunity) 和 ETI (Effector-triggered immunity)。植物细胞膜表面的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原物相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 后激活 MAPK 级联反应,从而引起一系列防卫反应,即 PTI^[1]。而病原物为了抑制 PTI 进化出毒性效应蛋白,其中一些效应蛋白能被植物抗性蛋白(R)特异性识别而成为无毒蛋白(Avr)并引发强烈的抗病反应,即 ETI^[1]。ETI 通常会促进植物局部产生抗病相关的反应,包括过敏反应(Hypersensitivity reaction, HR),产生活性氧爆发,并积累水杨酸(Salicylic acid, SA)和酚分子,引起植物系统获得性免疫(Systemic acquired resistance, SAR)。

2 植物泛素化系统

泛素(Ubiquitin, Ub)是广泛存在于生物体内的一种高度保守的小分子蛋白(含 76 个氨基酸),其广泛地参与细胞内的各种反应。在一系列酶的催化作用下,泛素共价结合靶蛋白对其进行泛素化修饰^[2]。泛素化修饰可改变靶蛋白的亚细胞定位、影响其蛋白活性或促使该靶蛋白被泛素/26S 蛋白酶体途径降解。泛素化过程由 E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶 3 种酶进行级联反应来共同完成。E1 利用 ATP 能与游离的泛素分子形成高能硫酯键,进而激活泛素并将其转移到 E2, E2 再通过 E3 将泛素分子转移到靶蛋白上进行标记。E3 泛素连接酶能特异性识别某个或某类靶蛋白,是目前泛素化研究中最热门和最重要的研究对象^[2]。根据 E3 泛素连接酶的结构域和亚基组成不

同,可分为单亚基类 HECT 型和 RING/U-box 型以及多亚基类 Cullin-RING 型(CRLs)和 APC/C 型^[3]。CRLs 型 E3 泛素连接酶由 Cullin、RBX1 (RING-box) 和靶蛋白识别元件组成,其数量庞大、种类繁多,包括 SCF 型(即 SKP1-CUL1/7-F-box 复合体)、CRL^{BTB} 型、CRL^{DDB} 型等^[3]。许多研究表明,一些 CRLs 型和 RING/U-box 型 E3 泛素连接酶在植物抗病中具有重要作用。但迄今为止,没有证据表明 HECT 型和 APC/C 型 E3 泛素连接酶参与调控植物抗病反应。

3 CRLs 型 E3 泛素连接酶介导抗病信号途径

3.1 CRLs 型 E3 泛素连接酶介导 SA 抗病信号途径

SA 是 SAR 的关键激素,是对活体营养型和半活体营养型病原物产生抗性的关键因素。NPR1 (Nonexpresser of PR genes 1)是 SA 介导的 SAR 途径主要功能调控元件。单体化的 NPR1 在细胞核中会被泛素/26S 蛋白酶体降解^[4]。用外源 SA 处理植株后 NPR1 更容易结合到基于 CRLs 类的 CUL3 (Cullin 3) E3 泛素连接酶上并被蛋白水解,但这个过程需要 SA 的所有 Marker 基因被激活且 NPR1 被磷酸化。同时, NPR1 包含一个 CRL^{BTB} 型 E3 泛素连接酶的 BTB 结构域,这表明 NPR1 很可能自身参与泛素化过程。SA 能增强 NPR1 和 CUL3A 的蛋白互作, NPR1 可能通过结合 CUL3A 来激活 NPR1 自身泛素化,从而调控自身活性。NPR1 还包含介导蛋白互作的锚蛋白重复结构,可与 TGA2、NIMIN1 等转录因子互作^[5]。TGA2 是 SA 信号途径中的 PR 基因抑制蛋白,也是茉莉酸(Jasmonic acid, JA)/乙烯(Ethylene, ET)途径的激活蛋白^[6]。SA 可以促进 E3 泛素连接酶 BTB^{NPR1} 介导 TGA2、NIMIN1 等转录抑制子的降解^[5]。另外, NPR1 的磷酸化可以增强它与底物的亲和性,从而将 BTB^{NPR1} 的自身泛素化活性转换成底物泛素化。NPR1 能够将 TGA2 和它的同源启动子分离,使其活性无效并且更易被蛋白酶解^[5]。

3.2 CRLs 型 E3 泛素连接酶介导 JA 抗病信号途径

CRLs 中的 SCF^{COI1} 型 E3 泛素连接酶亚基 F-box 蛋白 COI1 (Coronatine insensitive 1) 是第一个被证实具有植物抗病功能的泛素化系统元件^[7]。COI1 蛋白介导植物 JA 抗病信号传导, 对死体营养型病原物具有抗性。后来研究发现 JA 抑制蛋白 JAZ (Jasmonate ZIM domain protein) 是 SCF^{COI1} E3 泛素连接酶的直接靶蛋白且与 COI1 互作^[8]。JA 的活性形式 JA-Ile 能被 SCF^{COI1} 识别从而促进 JAZ 的降解, 并引起转录激活子 MYC2 的释放, 进而激活 JA 防御途径^[7]。SCF^{TIR1} 与 SCF^{COI1} 具有相似的机制。生长素能结合 COI1 的同源蛋白 TIR1, 引起 AUX/IAA 转录抑制子的降解^[9]。而生长素途径能增强植物对死体营养型病原物的抗性。

3.3 CRLs 型 E3 泛素连接酶介导 ET 抗病信号途径

ET 途径与 JA 途径具有协同作用, 二者都可以诱导抗病基因 *PDF1.2* 的合成, 同时二者还可抑制 SA 的合成, 与 SA 途径具有拮抗作用^[10]。泛素化错综复杂地参与调控 ET 的识别、生物合成和信号传导。PAMP 诱导激活的 MPK6 能磷酸化 ET 合成前体 ACC 的合成酶 ACS2 和 ACS6, 从而保护它们不被蛋白酶体降解^[11]。而属于类型 II 的 ACSs 蛋白 ACS4、ACS5 和 ACS9 能被 CRLs 型 E3 泛素连接酶 BTB 亚基 ETO1、EOL1 和 EOL2 蛋白水解调控^[11]。ET 信号传导的关键因子 EIN3 (Ethylene insensitive 3) 被报道受 MAPK 级联反应调控, 且 EIN3 及其同源蛋白 EIL1 (Ethylene insensitive 3-like 1) 可以抑制 SA 合成所必需的 SID2 蛋白表达, 具有负调控植物抗病反应的作用^[12]。MPK6 磷酸化 EIN3 蛋白 Thr174 残基后使其易被 E3 泛素连接酶 SCF^{EBF1/EBF2} 降解; 而不依赖于 MPK6 的 Thr592 残基磷酸化使其稳定不被泛素化降解, 并且 ET 信号通路的负调控子 CTR1 可能也促进该磷酸化^[13]。这表明了泛素化系统在 ET 抗病信号途径中的重要调控作用。

4 RING/U-box 型 E3 泛素连接酶介导植物抗病反应

有研究表明, 部分 RING/U-box 型 E3 泛素连接酶也参与植物免疫反应。如编码 RING 型 E3 泛素连接酶的 *ATL* (*Arabidopsis toxicos para levadura*) 基因家族在植物免疫反应中发挥作用, 它的部分成员能被几丁质等 PAMPs 诱导, 如拟南芥中的 *ATL2* 和 *ATL6* 基因^[14]。拟南芥中的 *ATL9* 也被发现在免疫反应中调控植株对活体营养型病原物的抗性^[15]; 而番茄中的 *ATL* 相关基因 *RFP1* (RING-finger protein 1) 是抗半活体营养型病原物 *Phytophthora infestans* 所必需的^[16]; 其他 *ATL* 家族成员如水稻中 *EL5* 和番茄中的 *ACRE132* 也可以在激发子处理植物后迅速被诱导^[14]。水稻 *XA21* 结合蛋白 3 (*XA21-binding protein 3*, *XB3*) 是一个在体外能被 *XA21* 磷酸化的 RING 型 E3 泛素连接酶, 其转录水平的降低会导致植物对无毒菌株 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* 抗性减弱^[17]。

一些具有 E3 泛素连接酶活性的植物 U-box 蛋白 (Plant U-box protein, *PUB*) 已经被证明具有调控植物免疫反应的功能。例如, 烟草 U-box 型 E3 泛素连接酶 *ACRE74* (*CMPG1*) 和 *ACRE276* (*PUB17*) 蛋白是 *Avr9-Cf9* 介导的 HR 所必需的^[18-19]。此外, 拟南芥 U-box 型 E3 泛素连接酶 *PUB22*、*PUB23* 和 *PUB24* 负调控 *elf18* 和几丁质等 PAMP 引起的 PTI 反应, 以及抑制植物对活体营养型病原菌的抗性^[20]。与烟草 *ACRE74* 蛋白同源的拟南芥 E3 泛素连接酶 *PUB20* 和 *PUB21* 同样也被许多生物胁迫显著诱导并负调控 PTI^[18-21]。最近的研究表明, 具有 E3 泛素连接酶活性的水稻 U-box 蛋白 *OsSPL11* 及其在拟南芥中的同源蛋白 *PUB13* 都参与调控植物细胞死亡和抗病反应^[22]。*PUB13* 蛋白在长日照条件下具有负调控细胞死亡、 H_2O_2 和 SA 含量的作用, 并且 *PUB13* 在高湿条件下负调控植株对活体营养型病原物的抗性, 而对死体营养型病原物则具有正调控作用。根据 Lu 等的研究, *PUB13* 与 *PUB12*

在 PAMP flg22 的激活下泛素化降解细菌鞭毛蛋白的受体 FLS2, 即二者负调控 FLS2 介导的 PTI^[23]。

5 病原物效应蛋白及其毒性因子通过泛素化影响植物抗病反应

泛素化系统是病原物效应蛋白和毒性因子的重要作用目标。来自细菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 的效应蛋白 AvrPtoB 的 C 端在结构上和 RING/U-box 结构域同源, 具有 E3 泛素连接酶活性^[24]。在宿主番茄中, AvrPtoB 能泛素化抗病蛋白激酶 Fen 并介导其降解^[24]。AvrPtoB 也能泛素化来自拟南芥的 PRRs, 如 FLS2 和 CERK1^[25]。病原物也能够通过合成能被宿主识别的毒性分子来操纵泛素化系统, 例如激素或者激素类似物。细菌毒素冠菌素能结合 SCF^{COI1} E3 泛素连接酶亚基 COI1 从而激活对 JAZ 转录抑制子的降解^[8]。另外 *P. syringae* pv. *syringae* 产生的毒性因子 Syringolin A 能够抑制寄主体内的泛素/26S 蛋白酶体活性达到致病的作用^[26]。有研究表明, 病毒性病原物同样也可以通过作用于宿主泛素化系统来干扰其抗性。甜菜严重曲顶病毒 BSCTV 编码的 C2 蛋白能与宿主 SAMDC1 蛋白互作, 从而抑制 SAMDC1 被泛素/26S 蛋白酶体降解, 最终导致宿主体内甲基化调控的基因沉默引起的对该病毒的抗病性减弱^[27]。上述研究结果说明病原物分泌的效应蛋白和毒性因子可以通过作用于泛素化系统影响寄主植物的抗病性。另外, 也有研究证明泛素化系统不仅调控植物的寄主抗性还调控植物的非寄主抗性^[28]。水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Xoo*)侵染本氏烟能引起 HR, 属于非寄主抗性互作。赖亿玉等发现将本氏烟中的泛素融合降解蛋白(Ubiquitin fusion degradation protein 18-8, UFD 18-8)基因沉默后能减弱 *Xoo* 诱导的 HR, 但能增强对烟草野火病菌和油菜菌核病菌的抗性, 而沉默本氏烟中的泛素羧端水解酶(Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, UCH 18-5)基因能减弱 *Xoo* 诱导的 HR。这些结果表明泛素化系统中的

UFD 18-8 和 UCH 18-5 正调控烟草中的非寄主抗性, 且 UFD 18-8 负调控烟草的寄主抗性^[28]。

6 展望

泛素化作为一种细胞反应调控机制广泛存在于植物体内, 目前公认该机制的重要性可与另一种被研究透彻的蛋白修饰途径——磷酸化相媲美。从某种程度上说, 正是由于植物与病原物的不断斗争进化致使植物泛素化系统元件不断增加。一些植物的 E3 泛素连接酶可能已经进化成病原物的诱饵, 可识别病原物效应蛋白并且将它们泛素化降解。尽管已经有许多证据表明一些 E3 泛素连接酶具有调控植物抗病性的功能, 但其底物蛋白是哪些, E3 泛素连接酶能否单泛素化、多泛素化或多聚泛素化修饰这些底物, 这些问题还亟待研究。深入探究泛素化调控抗病反应的机制以及病原物操纵泛素化系统的毒性机制将为提高植物的抗病性提供新思路。

参考文献

- [1] Jones JD, Dangl JL. The plant immune system[J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- [2] Shirsekar G, Dai L, Hu Y, et al. Role of ubiquitination in plant innate immunity and pathogen virulence[J]. *Journal of Plant Biology*, 2010, 53(1): 10-18.
- [3] Vierstra RD. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(6): 385-397.
- [4] Spoel SH, Mou Z, Tada Y, et al. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity[J]. *Cell*, 2009, 137(5): 860-872.
- [5] Boyle P, Le Su E, Rochon A, et al. The BTB/POZ domain of the *Arabidopsis* disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function[J]. *The Plant Cell Online*, 2009, 21(11): 3700-3713.
- [6] Zander M, La Camera S, Lamotte O, et al. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses[J]. *The Plant Journal*, 2009, 61(2): 200-210.
- [7] Thines B, Katsir L, Melotto M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling[J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 661-665.
- [8] Chini A, Fonseca S, Fernandez G, et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling[J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 666-671.
- [9] Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging

- trends in plant hormone signalling[J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1071-1078.
- [10] 骆琰妍, 李魏, 戴良英. 不同激素信号途径在植物抗病中的相互作用研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(18): 153-157.
- [11] Christians MJ, Gingerich DJ, Hansen M, et al. The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by controlling type-2 ACC synthase levels[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(2): 332-345.
- [12] Chen H, Xue L, Chintamanani S, et al. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2009, 21(8): 2527-2540.
- [13] Yoo SD, Cho YH, Tena G, et al. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C_2H_4 signalling[J]. *Nature*, 2008, 451(7180): 789-795.
- [14] Zeng LR, Vega-Sánchez ME, Zhu T, et al. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions[J]. *Cell Research*, 2006, 16(5): 413-426.
- [15] Berrocal-Lobo M, Stone S, Yang X, et al. ATL9, a RING zinc finger protein with E3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin- and NADPH oxidase-mediated defense responses[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14426.
- [16] Ni X, Tian Z, Liu J, et al. Cloning and molecular characterization of the potato RING finger protein gene *StRFP1* and its function in potato broad-spectrum resistance against *Phytophthora infestans*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(6): 488-496.
- [17] Wang YS, Pi LY, Chen X, et al. Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance[J]. *The Plant Cell Online*, 2006, 18(12): 3635-3646.
- [18] González-Lamothe R, Tsitsigiannis DI, Ludwig AA, et al. The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato[J]. *The Plant Cell Online*, 2006, 18(4): 1067-1083.
- [19] Yang CW, Gonzalez-Lamothe R, Ewan RA, et al. The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense[J]. *The Plant Cell Online*, 2006, 18(4): 1084-1098.
- [20] Trujillo M, Ichimura K, Casais C, et al. Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2008, 18(18): 1396-1401.
- [21] Kobayashi S, Tsugama D, Liu S, et al. A U-Box E3 ubiquitin ligase, PUB20, interacts with the arabidopsis G-protein β subunit, AGB1[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49207.
- [22] Li W, Ahn IP, Ning Y, et al. The U-box/ARM E3 ligase PUB13 regulates cell death, defense and flowering time in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(1): 239-250.
- [23] Lu D, Lin W, Gao X, et al. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity[J]. *Science*, 2011, 332(6036): 1439-1442.
- [24] Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, et al. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase[J]. *Science*, 2006, 311(5758): 222-226.
- [25] Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Ntoukakis V, et al. AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants[J]. *Current Biology*, 2009, 19(5): 423-429.
- [26] Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, et al. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism[J]. *Nature*, 2008, 452(7188): 755-758.
- [27] Zhang Z, Chen H, Huang X, et al. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2011, 23(1): 273-288.
- [28] 赖亿玉. 泛素-26S蛋白酶体途径对寄主和非寄主抗性的调控功能分析[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2011.