

植物生长素通过ABP1促进细胞膜泡的外排运输

柳叶 王亚红 黄妤 陈宗星 赵燕 张学文*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要 为了研究植物生长素结合蛋白ABP1(auxin binding protein 1)对膜泡运输的调控, 将烟草生长素结合蛋白基因*ABP1* cDNA分别构建可诱导型表达的过表达和干扰表达载体, 并将绿色荧光蛋白GFP与烟草分泌载体膜蛋白SCAMP2(secretory carrier membrane protein 2)融合进行细胞的膜泡标记, 转化植物模式细胞BY-2后分别获得了转ABP1和antiABP1的两类膜泡标记转基因细胞系。以雌二醇诱导ABP1、antiABP1表达后, 结合生长素处理, 通过扫描激光共聚焦观察了细胞的膜泡运输变化。当诱导ABP1在细胞内过量表达后, 以吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)处理细胞, 在细胞核膜及周围内质网膜、细胞质膜以及其他细胞内膜系统都观察到强烈的荧光信号, 说明细胞内膜泡运输更为活跃; 当诱导antiABP1在细胞内干扰表达时, 在细胞核附近维持有较强烈的荧光信号, 而细胞质膜及两细胞间隔的荧光信号明显减弱, 表明抑制ABP1表达显著抑制了细胞膜泡的外排运输。在ABP1经诱导过表达后, 加入IAA处理细胞, 在0~6 min时间段内间隔性观察了细胞膜泡对生长素的时间响应, 在这段时间内细胞核周围及内膜系统的荧光信号明显增强, 细胞质膜的荧光强度没有明显的变化, 表明细胞核与内膜系统间存在活跃的膜泡运输, 内膜系统向细胞质膜间的外排膜泡运输也逐渐加强。因此, 可以证明ABP1参与生长素信号响应, 增强细胞膜泡的外排运输。

关键词 生长素; 生长素结合蛋白(ABP1); 膜泡运输

ABP1 Mediates Auxin Accelerating of Vesicular Exocytosis in Plant

Liu Ye, Wang Yahong, Huang Yu, Chen Zongxing, Zhao Yan, Zhang Xuewen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract In order to investigate the auxin regulation of vesicular transport in plant cell, we cloned the tobacco auxin binding protein 1 gene (*ABP1*) cDNA and recombined it into an inducible Ti vector pER16 in either sense or antisense direction. The vesicles labeled BY-2 were prepared by fusion secretory carrier membrane protein 2 (SCAMP2) with green fluorescent protein (GFP) and the cell line was further transformed by the two recombinants. The two membrane labeled transgenic BY-2 cell line were screened out and subjected to analysis of the ABP1 mediated auxin regulation of the vesicular transport. The expressions of transgene ABP1 and antiABP1 were first induced by estradiol and then treated with auxin. The vesicles transporting were observed under laser scan confocal microscope. The results showed that the fluorescence signal was significantly enhanced in the nucleus membrane, cytoplasmic membrane, and other endomembrane system when ABP1 was overexpressed. It indicates more active vesicular transportation in intracellular membranes after indole-3-acetic acid (IAA) treatment. The fluorescence signal was only maintained stronger around the nucleus but weak in the cytoplasmic membrane and other endomembrane systems if the ABP1 expression was antisense inhibited, because the vesicular transport was significantly reduced. The phenomena demonstrated that suppression of ABP1 significantly inhibited vesicular exocytosis. After the full

收稿日期: 2014-03-18 接受日期: 2014-05-23

湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 12C0156)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-84673602, E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

Received: March 18, 2014 Accepted: May 23, 2014

This work was supported by the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Bureau (Grant No.12C0156)

*Corresponding author. Tel: +86-731-84673602, E-mail: xwzhang@hunau.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-25 14:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0081.html>

estradiol induction of the ABP1 overexpression cell, we carried out a 0~6 min IAA treatment interval observation. The fluorescence signal was enhanced significantly around the nucleus membrane and then into endomembrane systems but with no obvious change in cytoplasmic membrane and two cells intervals. The Results indicated that within 6 min of IAA treatment exocytose vesicular transport was activated firstly between the nucleus and the endomembrane system, and then the exocytose transport between the endomembrane system to the plasma membrane. Thus we conclude that ABP1 is involved in auxin signal responded vesicular exocytosis in plant cell.

Key words auxin; auxin binding protein 1; vesicular transport

高等植物的生长发育受激素调控, 其中生长素(auxin)的作用尤为突出。近年来, 生长素作用的具体途径得以逐步解开, 已认识到生长素的作用途径至少有两条: 其一是对多个基因的表达进行调控进而引导细胞生长、分裂和分化的反应。TIR1(transport inhibitor response 1)是介导这一信号途径的生长素受体, 通过对生长素响应的转录因子抑制因子的泛素化水解, 使具有生长素响应元件的基因表达受到生长素调节^[1]; 其二是更直接的不包括基因表达调控的快速响应途径, 生长素结合蛋白ABP1(auxin binding protein 1)被认为是这一信号途径最可能的受体蛋白。生长素可能通过ABP1使细胞产生过极化反应; 生长素还在与ABP1结合后影响网格蛋白(clathrin)形成内吞小泡从而抑制细胞膜的内在化(internalization)等^[2]; ABP1接收并传导生长素信号, 促使细胞快速膨大和伸长。在烟草细胞中, ABP1的过表达会增强其对生长素的敏感性^[3-4]。然而, 关于ABP1的具体功能仍不够清晰。

生长素的极性分布是生长素调节植物细胞分裂、分化的特征, 而生长素极性运输则通过细胞对其极性运输相关PIN(Pin-formed)蛋白在细胞膜上的分布来实现。生长素受体及运输蛋白在细胞膜上的定位和分布都与细胞膜泡运输相关。因此, 研究细胞膜泡运输的调控对于揭示生长素信号的具体过程, 尤其是生长素快速响应途径有关键的意义。

细胞的膜泡运输能够有序进行, 在于其有着庞大的蛋白质家族的参与, 近年来发现的参与植物膜泡运输的SCAMPs(secretory carrier membrane proteins)蛋白家族, 是一类分泌载体膜蛋白。在真核生物中, SCAMPs蛋白家族积极参与了从糙面内质网膜、高尔基体到细胞质膜的膜泡运输过程^[5]。SCAMP2是该家族中研究较多的成员之一, 目前SCAMP2蛋白在细胞内的定位已基本清晰, 由于其直接参与细胞内膜泡运输过程, 且广泛分布于细胞内膜系统中, 被

认为是一种合适的膜泡标记蛋白。

为了研究生长素、ABP1快速响应的膜泡运输, 运用简单的模式细胞系进行研究具有一定的优势。烟草悬浮细胞(tobacco BY-2 cell)是日本学者Nagata等以烟草栽培品种Bright Yellow的幼嫩外植体培养建立起来的一个植物细胞系, 已成为植物细胞生物学的模式细胞。我们先克隆了烟草分泌载体膜蛋白SCAMP2基因的cDNA, 将绿色荧光蛋白GFP和SCAMP2融合后, 获得了膜泡标记的BY-2细胞系。然后克隆了烟草生长素结合蛋白ABP1基因的cDNA, 利用诱导型表达载体pER16构建了ABP1诱导过表达和干扰表达载体, 并对荧光标记的BY-2细胞系进行二价转化, 分别获得了转ABP1和antiABP1的两株转基因BY-2细胞系。以雌二醇诱导ABP1、antiABP1表达后, 结合生长素处理, 观察了转基因细胞的膜泡运输调控, 结果证实生长素通过ABP1快速促进细胞的膜泡外排运输。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 野生型烟草悬浮细胞(BY-2细胞), 来源于RIKEN BRC研究中心。菌株和载体: 大肠杆菌InvαF⁻菌株、农杆菌LBA4404菌株及植物表达载体pEGAD由本实验室保存; pER16质粒来自于美国Nam-Hai Chua, Rockefeller University; 克隆载体pMD18-T购自TaKaRa公司。试剂: Trizol购自Invitrogen公司; 雌二醇和吲哚-3-乙酸购自Sigma公司; 各种限制性内切酶、DNA分子量标准、Taq酶、T4 DNA连接酶、反转录试剂盒等均购自Fermentas公司。仪器: 激光扫描共焦显微镜(Olympus IX81), 图片由湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室拍摄。培养基配方: MS1: MS盐+200 mg/L磷酸二氢钾+100 mg/L肌醇+1 mg/L盐酸硫胺素+2 mg/L甘氨酸+0.2 mg/L 2,4-D+30 g/L蔗糖, pH5.8; MS2: MS

盐+200 mg/L磷酸二氢钾+100 mg/L肌醇+1 mg/L盐酸硫胺素+2 mg/L甘氨酸+30 g/L蔗糖, pH5.8。

1.2 引物

实验所用引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成(表1)。

1.3 方法

1.3.1 *ABP1*、*SCAMP2*基因的克隆 Trizol法提取烟草BY-2细胞总RNA, 按照反转录试剂盒说明进行反转录, 获得cDNA。根据DDBJ数据库上的烟草*SCAMP2*基因序列(登录号: AB295617)和GenBank中公布的烟草*ABP1*基因序列(登录号: X70902), 设计扩增*SCAMP2*基因和*ABP1*基因的引物, 并引入酶切位点(表1)。常规PCR反应扩增的PCR产物连接pMD18-T载体, 热击法转化大肠杆菌InvαF'感受态, 阳性克隆经菌落PCR检测和酶切检测后, 送华大基因公司测序。

1.3.2 表达载体的构建 用PCR的方法, 以测序结果正确的pMD18-T-*SCAMP2*和pMD18-T-*ABP1*克隆载体为模板, 分别扩增得到*SCAMP2*、*ABP1*和*antiABP1*基因片段, 对目的基因片段和载体分别进行双酶切和连接, 连接产物转化InvαF'感受态细胞, 阳性克隆经菌落PCR检测和酶切检测后, 获得pEGAD-EGFP-*SCAMP2*表达载体、pER16-*ABP1*过表达载体及pER16-*antiABP1*干扰载体。

1.3.3 pER16-*ABP1*重组载体中插入NOS终止子 根据GenBank中NOS终止子的序列设计引物(表1), 以pBI121质粒为模板, PCR扩增得到NOS序列, 与pER16-*ABP1*载体用*Asc* I和*Kpn* I分别进行双酶切后连接, 连接产物转化InvαF'感受态细胞, 涂布于壮观霉素(50 mg/L)筛选的LB培养基上, 阳性克隆进行菌

落PCR检测和酶切检测。

1.3.4 BY-2细胞的转化 将正确的重组载体质粒以冻融法分别转入农杆菌LBA4404中。以培养于MS1培养液并继代3次的野生型BY-2悬浮细胞系为转化受体, 分别对pER16-*ABP1*和pER16-*antiABP1*进行转化。转化方法参照文献[6], 筛选抗生素为卡那霉素(150 mg/L)。在转化平板上挑取突起的新生细胞团, 转入新鲜培养基(加入250 mg/L头孢霉素和150 mg/L卡那霉素)中, 进一步进行筛选。再次筛选后选取3~4个有新生细胞生长的细胞团, CTAB法提取转化细胞的总DNA, PCR检测, 获得已转基因的pER16-*ABP1*、pER16-*antiABP1*细胞系。

pEGAD-EGFP-*SCAMP2*对已转基因的pER16-*ABP1*、pER16-*antiABP1*细胞系分别进行二价转化, 筛选抗生素为卡那霉素(150 mg/L)、PPT(30 mg/L), 转化、筛选方法及转化后分子检测步骤同上。获得双价转化pEGAD-EGFP-*SCAMP2*和pER16-*ABP1*的BY-2细胞系(标记为S-A细胞系)、双价转化pEGAD-EGFP-*SCAMP2*和pER16-*antiABP1*的BY-2细胞系(标记为S-*anti*细胞系)。

1.3.5 转基因BY-2细胞系的显微观察 转基因S-A细胞系和S-*anti*细胞系在MS1培养液中悬浮培养并继代3次(以7 d为一个继代周期), 取第3次继代后培养4 d的悬浮细胞, 1 000 r/min离心10 min, 去上清后, 细胞沉淀全部转入MS2培养液中, 26 °C摇床暗培养约24 h, 摇床转速150 r/min。悬浮细胞经50目细胞筛过滤, 收集下清液, 1 000 r/min离心5 min后, 去上清, 称量细胞鲜重, 再加入新鲜MS2培养液, 悬浮细胞后分装到10 mL EP管中, 每管4 mL悬浮细胞。

载体pER16在植物体内表达时, 其启动子是一

表1 基因克隆所用引物

Table 1 Primers used in genes cloning

基因 Genes	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
<i>ABP1</i>	ABP1-Up (<i>Xho</i> I)	CCG <u>CTC GAG</u> ATG GCT CGT CAT GTT TTA GTC GTA G
	ABP1-Down (<i>Asc</i> I)	TTG <u>GCG CGC CGA</u> TAA GTT CGT CTT TCC ATG ATG
<i>antiABP1</i>	ABP1-Up (<i>Asc</i> I)	TTG <u>GCG CGC</u> CAT GGC TCG TCA TGT TTT AGT C
	ABP1-Down (<i>Xho</i> I)	CCG <u>CTC GAG</u> GAT AAG TTC GTC TTT CCA TGA TGT GG
<i>SCAMP2</i>	SCAMP2-Up (<i>EcoR</i> I)	CGG <u>AAT TCA</u> TGA GTA GAG GAA ACG ATC CGA
	SCAMP2-Down (<i>BamH</i> I)	CGG <u>GAT CCT</u> TAC TTG TGC CCT CGA AAA
<i>NOS</i>	NOS-Up (<i>Asc</i> I)	TTG <u>GCG CGC CGA</u> TCG TTC AAA CAT TTG G
	NOS-Dwon (<i>Kpn</i> I)	GGG <u>GTA CCG</u> GCC CGA TCT AGT AAC ATA GAT GAC

下划线为酶切位点。

The underlined are restriction sites for recombination.

表2 细胞诱导和生长素处理设置
Table 2 The estradiol inducing and IAA treatment setting of the cell lines

细胞系 Cell line	雌二醇 Estradiol	吲哚-3-乙酸 IAA
S-A	-	-
S-A	+	-
S-A	-	+
S-A	+	+
S-anti	-	-
S-anti	+	-
S-anti	-	+
S-anti	+	+

“+”为加入该物质处理,“-”为未加入该物质处理。

“+” means with the substance treatment,“-” means without the substance treatment.

个甾醇类物质诱导的表达启动子,用雌二醇作为诱导物,诱导浓度为40 nmol/L,诱导时间10 h。

当细胞诱导表达时间充足后,可以进行显微观察。在观察前,对细胞进行生长素吲哚-3-乙酸(IAA,终浓度为5 mg/L)处理,设置了8组观察对象(表2)。

雌二醇诱导充分后,在激光扫描共焦显微镜下,选取同一S-A细胞,设置0, 2, 4, 6 min为IAA处理时间梯度,观察单个细胞内不同时间的荧光分布变化情况,以了解膜泡运输与生长素快速响应的关系。

2 结果

2.1 基因的克隆与检测

菌落PCR结果和酶切检测结果表明,确定扩增和酶切均检测到了目的大小的分子条带。测序结果与数据库中登录基因相似度为100%,表明克隆结果正确。

2.2 表达载体构建与检测

BY-2细胞的转化包括对其膜泡的标记,构建了pEGAD-EGFP-SCAMP2载体,以GFP与SCAMP2

融合;以pER16雌激素诱导表达载体分别构建了ABP1过表达和反义表达载体pER16-ABP1和pER16-antiABP1(载体T-DNA区的结构如图1)。

菌落PCR鉴定和质粒双酶切检测结果表明,已成功构建了pEGAD-EGFP-SCAMP2表达载体、pER16-ABP1(插入了NOS终止子)过表达载体及pER16-antiABP1干扰载体。

2.3 BY-2细胞的转化

参照An^[6]的方法,对BY-2细胞通过根癌农杆菌共培养进行遗传转化,经过抗生素筛选并进行分子检测后获得了需要的双价转基因细胞(图2)。

农杆菌侵染法转化野生型BY-2细胞15 d后,野生型对照平板和转化平板的部分细胞生长受到抑制,开始失水黄化,不分裂生长。转化平板有少数突起的新生细胞团,细胞饱满,表面湿润(图2)。等长到直径约5 mm的细胞团大小,将细胞团小心移出平板,放至新的筛选培养基继续筛选,时间为7 d,可看到有些转移出来的细胞团生长迅速,可形成直径约1 cm大小的细胞团,初步确定为转基因的抗性BY-2细胞团,另外还有些细胞团生长明显受到抑制,维持原有大小或失水黄化。经分子检测,获得了转pER16-ABP1、pER16-antiABP1的BY-2细胞系。

表达载体pEGAD-EGFP-SCAMP2转化农杆菌LBA4404后,分别以转pER16-ABP1、pER16-antiABP1的BY-2细胞系为受体细胞进行转化,经2次筛选后,转基因BY-2细胞团进行分子检测(图3),最终得到双价转化pEGAD-EGFP-SCAMP2和pER16-ABP1的BY-2细胞系(标记为S-A细胞系)和双价转化pEGAD-EGFP-SCAMP2和pER16-antiABP1的BY-2细胞系(标记为S-anti细胞系)。荧光观察表明细胞已进行了有效膜泡标记。

2.4 转基因BY-2细胞系的处理和观察

2.4.1 ABP1诱导过表达和干扰表达后荧光分布的结

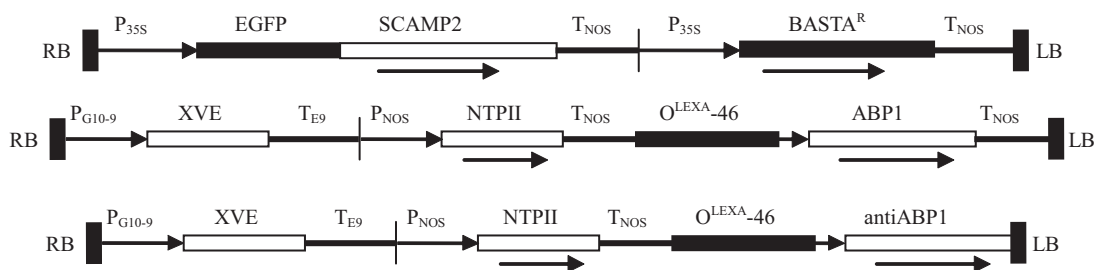


图1 构建的三种转化载体T-DNA区段图

Fig.1 The diagram of T-DNA region of the three recombinant vectors for BY-2 transformation

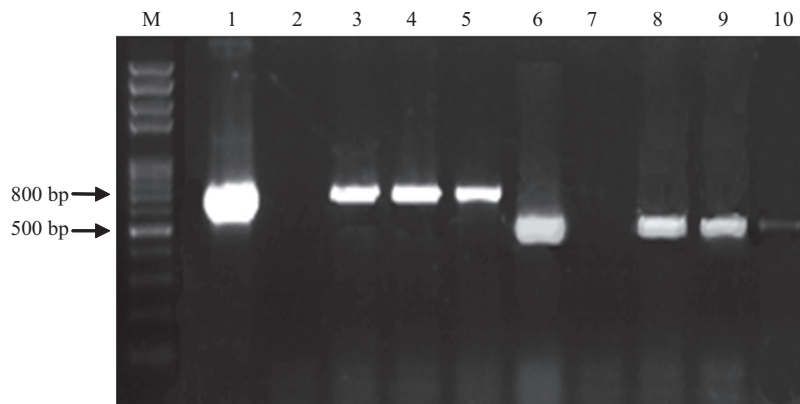


左: 野生型对照; 右: 筛选转化后的BY-2细胞。

Left: WT; Right: antibiotic of transformed tobacco BY-2 cells.

图2 培养基中抗性筛选的转化BY-2细胞

Fig.2 Antibiotic screen of the transformed tobacco BY-2 cells on media

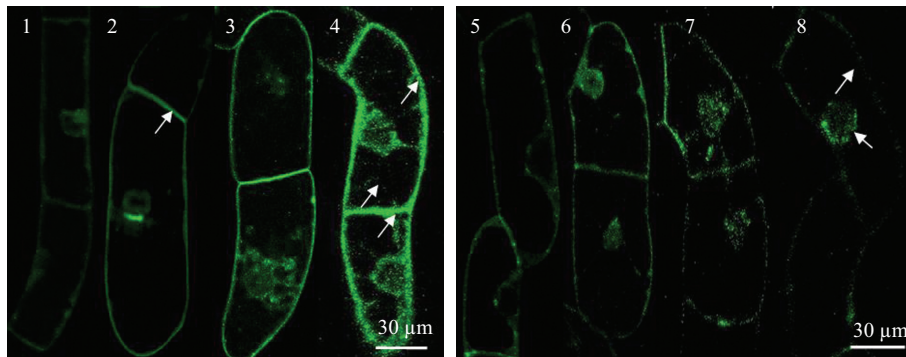


M: 5 000 bp DNA分子量标准; 1: 以pEGAD-EGFP-SCAMP2质粒DNA为模板的阳性对照; 2、7: 以野生型BY-2细胞DNA为模板的阴性对照; 3~5: *SCAMP2*扩增结果; 6: 以pER16-ABP1质粒DNA为模板的阳性对照; 8~10: *ABP1*扩增结果。

M: DL 5 000 marker; 1: positive control of pEGAD-EGFP-SCAMP2 plasmid as template; 2,7: negative control of wide-type BY-2 as template; 3~5: amplification result of *SCAMP2*; 6: positive control of pER16-ABP1 plasmid as template; 8~10: amplification result of *ABP1*.

图3 转基因BY-2细胞的分子检测

Fig.3 Molecular detection of bivalent transgenic BY-2 cells



1: 未处理的S-A细胞; 2: IAA处理的S-A细胞; 3: 雌二醇处理的S-A细胞; 4: IAA和雌二醇处理的S-A细胞; 5: 未处理的S-anti细胞; 6: IAA处理的S-anti细胞; 7: 雌二醇处理的S-anti细胞; 8: 雌二醇和IAA处理的S-anti细胞。

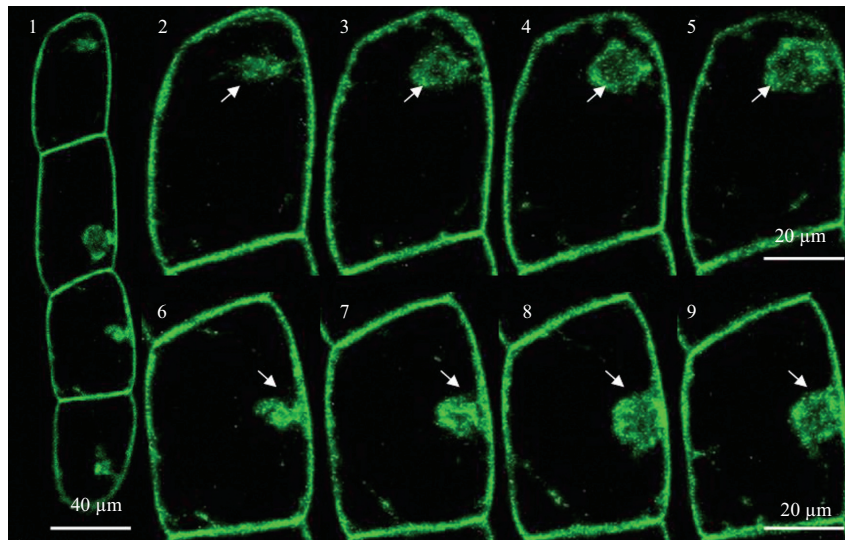
1: untreated S-A cells; 2: S-A cells with IAA treatment; 3: S-A cells with estradiol treatment; 4: S-A cells with IAA and estradiol treatment; 5: untreated S-anti cells; 6: S-anti cells with IAA treatment; 7: S-anti cells with estradiol treatment; 8: S-anti cells with IAA and estradiol treatment.

图4 ABP1的过表达与反义抑制表达诱导后结合生长素处理的共聚焦观察

Fig.4 Confocal microscope observation with IAA treatment of the over-expression and antisense inhibition of ABP1 in transformed BY-2 cells

果分析 取在MS1培养基中同步悬浮培养并继代3次的转基因S-A细胞和S-anti细胞, 转入MS2培养基生长素饥饿培养24 h, 以去除培养基中2,4-D对生长素处理的影响。雌二醇诱导处理和生长素处理后进行荧光观察(图4)。

两种转基因细胞分别使用雌二醇或IAA处理后, 膜泡运输小泡在细胞内的分布有明显变化。首先, 在细胞处理前, 两组转基因细胞的绿色荧光信号均匀地分布在细胞核周围、细胞质膜及细胞板(cell plate)上, 且两组细胞没明显差别; 只经IAA处理时, 对比未处理细胞, 发现两组细胞荧光明显地在细胞板上富集; 只经雌二醇诱导时, 对比处理前的细胞, 在ABP1过量表达的细胞中, 发现细胞质中和细胞核周围的荧



1: 未经生长素处理的S-A细胞; 2~5: 生长素分别处理0, 2, 4, 6 min后第一个细胞内荧光分布放大图; 6~9: 生长素分别处理0, 2, 4, 6 min后第三个细胞内荧光分布放大图。

1: untreated S-A cells; 2~5: the first cell's interval fluorescence distribution with 0, 2, 4, 6 min IAA treatment; 6~9: the third cell's interval fluorescence distribution with 0, 2, 4, 6 min IAA treatment.

图5 单个S-A细胞IAA处理的定时激光扫描共焦显微镜观察

Fig.5 Laser scanning confocal microscopy observation of single S-A BY-2 cell in time intervals

光信号有显著加强, 细胞质膜和细胞板的荧光信号有增强的趋势, 膜泡外排运输趋于活跃, 而在ABP1干扰表达的细胞中, 观察到细胞质荧光信号没有明显增强, 细胞核周围有荧光富集的现象, 细胞质膜及细胞板上荧光信号略有加强; 经雌二醇诱导表达再用IAA处理时, 对比处理前的细胞, 在ABP1过量表达的细胞中, 无论是细胞核周围, 还是细胞质膜、细胞板以及细胞质内, 其荧光信号强烈, 细胞内膜泡运输活跃, 而在ABP1干扰表达的细胞中, 在整个细胞内的荧光信号都较微弱, 荧光主要还是集中在细胞核附近和细胞板上, 膜泡外排运输受到抑制。

2.4.2 生长素快速响应的膜泡运输观察 雌二醇诱导充分后, 在激光扫描共焦显微镜下, 选取同一S-A细胞, 设置0, 2, 4, 6 min为生长素处理时间梯度, 观察单个细胞内不同时间的荧光分布变化情况(图5)。

在0~6 min内, 随着时间的递增, 细胞核周围及内膜系统的荧光信号有明显增强, 细胞质膜和细胞板的荧光强度没有很明显的变化, 表明在IAA处理的6 min内, 细胞核与内膜系统间存在活跃的膜泡运输, 内膜系统向细胞质膜间的外排膜泡运输也逐渐加强。

3 讨论

在植物细胞内具有特定而复杂的内膜系统和膜泡运输机制, 用以完成细胞内和细胞之间的物质交换

与交流, 其过程主要包括囊泡的出芽、沿细胞骨架的定向移动、细胞内栓留和膜融合4个环节^[7-8]。参与膜泡运输的蛋白质家族在进化上高度保守, 主要包括被膜蛋白复合体、SNARE蛋白家族、Arf蛋白家族、RAB蛋白家族和Sec1蛋白家族^[9]。对于植物细胞而言, 这些蛋白家族参与的膜泡运输不只是内膜系统内的蛋白质运输, 膜泡运输受阻可能影响植物发育和信号转导^[10]。对网格蛋白(clathrin)的研究证明, 网格蛋白的功能被破坏后会损害PIN蛋白的内吞作用, 引起生长素聚集形式的变化, 增强生长素的运输^[11]。

ABP1是生长素的受体蛋白之一, 生长素通过与ABP1的结合来实现对植物细胞生命活动的调控作用, 已被许多实验所验证。Robert等^[2]指出, 生长素通过ABP1抑制网格蛋白的集聚, 抑制膜的内在化, 从而促进PIN朝向生长素浓度高的细胞方向进行定向运输。关于生长素调节植物细胞的膜泡运输过程的研究已经证明, 在细胞内极性运输的内膜分泌系统中, PIN1和PIN3蛋白在质膜和内吞小泡之间反复活动, 这种内在化过程能够迅速地使PIN蛋白重新定位, 而ABP1与生长素结合后, 对网格蛋白参与的PIN的细胞吞噬作用被抑制, 所以细胞的内吞也可能是受生长素与ABP1结合的共同调节作用。

本实验结果显示, 在诱导后, ABP1干扰表达的转基因BY-2细胞受到生长素IAA刺激, 运输小泡在细胞

内活动基本停滞, 直接参与运输的标记蛋白一直处于运输途径的起点, 有理由相信这是细胞分泌作用受到阻碍的结果。而诱导后, ABP1过表达的转基因BY-2细胞在生长素处理前后与未诱导表达的细胞对比, 处理后的细胞内膜泡运输异常活跃, 运输小泡在内膜系统上的活动加强, 标记蛋白在细胞质膜及细胞板上大量富集, 这表明ABP1与生长素的结合, 对植物细胞的分泌活动具有强促进作用, 从而进一步验证了生长素通过与ABP1作用调控膜泡运输。

前人的研究表明, 当网格蛋白聚集在一起, 向细胞质膜运输时, ABP1具有促进细胞内吞的作用; 而当生长素与ABP1结合后, 能够干扰ABP1的活动, 使网格蛋白介导的细胞内吞受到抑制^[11]。而我们的结果则表明, 生长素作用于ABP1也具有促进膜泡从内质网向高尔基体并向细胞膜的运输过程, 即细胞的外排作用。在对酵母的外排活动研究中发现, exocyst复合体中的EXO70亚基与Rho GTPase的互作是外排的空间调控的关键^[12]。Li等^[13]证明, 拟南芥中EXO70A1在管状细胞的囊泡转运中起作用, 从而调控次生细胞壁增厚。Cross^[14]提出的ABP1细胞膜循环假说认为, 在ABP1分泌过程中, 如果细胞壁的前体物质与它相互作用, 就可能对细胞壁的合成进行调控。ABP1在促进外排过程中也许与exocyst复合体的角色类似。这个推测能较好地解释ABP1在细胞不同部位的分布, 而且并不排斥其他的信号转导机制, 特别是基因调控机制。

当然, 生长素作为细胞外信号结合ABP1后促进细胞内膜泡的外排必然要通过第三方信号传递分子, 这种信号传递者有可能是小分子G蛋白ROP2(Rho-related GTPases from plants)。Li等^[15]发现, 35S:CA-rop2(constitutively active ROP2)转基因植株的表型与生长素超表达植株的表型相似, 而DN-rop2(dominant negative ROP2)植株的表型也与缺失生长素的突变体相似。Xu等^[16]在研究拟南芥叶表皮细胞形态的拼图模型时发现, ROP2介导的生长素运输途径与表皮铺板细胞(pavement cells)嵌合凸起有关, 进而提出生长素信号通过ABP1受体传递到ROP2, 作用于RIC4(ROP-interactive CRIB motif-containing protein 4), 从而传递到F-actin, 引起细胞形态变化的模型。然而, 这个信号传递过程的具体分子机制还未明确, 有待进一步研究。

随着对ABP1功能及其对膜泡运输调控研究的深入, 必定会有助于进一步阐明植物细胞中膜泡运输的分子机制及功能。

参考文献 (References)

- 1 吕剑, 喻景权. 植物生长素的作用机制. 植物生理学通讯(Lü Jian, Yu Jingquan. Mechanism of auxin action. Plant Physiology Communications) 2004; 40(5): 624-8.
- 2 Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, et al. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. Cell 2010; 143(1): 111-21.
- 3 Steffens B, Feckler C, Palme K, Christian M, Böttger M, Lüthen H. The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. Plant J 2001; 27(6): 591-9.
- 4 Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, Lee JS, Nam KH, Bae YS. Auxin induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. FEBS Lett 2005; 579(5): 1243-8.
- 5 Paoluzi S, Castagnoli L, Lauro I, Salcini AE, Coda L, Fre' S, et al. Recognition specificity of individual EH domains of mammals and yeast. EMBO J 1998; 17(22): 6541-50.
- 6 An G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. Plant Physiol 1985; 79(2): 568-70.
- 7 Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, Tethers, Rabs and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. Dev Cell 2007; 12(5): 671-82.
- 8 Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell 2004; 116(2): 153-66.
- 9 柳忠玉, 黄亚东, 庄楚雄. 参与植物膜泡运输的蛋白质家族及功能研究进展. 细胞生物学杂志(Liu Zhongyu, Huang Yadong, Zhuang Chuxiong. Current progress on the protein families involved in plant vesicular traffic. Chinese Journal of Cell Biology) 2006; 28(3): 447-52.
- 10 Surpin M, Raikhel N. Traffic jams affect plant development and signal transduction. Nature Rev Mol Cell Biol 2004; 5(2): 100-9.
- 11 Kitakura S, Vanneste S, Robert S, Löffke C, Teichmann T, Tanaka H, et al. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. Plant Cell 2011; 23(5): 1920-31.
- 12 Wu H, Turner C, Gardner J, Temple B, Brenwald P. The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. Mol Biol Cell 2010; 21(3): 430-42.
- 13 Li S, Chen M, Yu D, Ren S, Sun S, Liu L, et al. EXO70A1-mediated vesicle trafficking is critical for tracheary element development in *Arabidopsis*. Plant Cell 2013; 25(5): 1774-86.
- 14 Cross JW. Cycling of auxin-binding protein through the plant cell: Pathway in auxin signal transduction. New Biol 1991; 3(8): 813-9.
- 15 Li H, Shen J, Zheng Z, Lin Y, Yang Z. The Pop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. Plant Physiol 2001; 126(2): 670-84.
- 16 Xu T, Nagawa S, Yang Z. Uniform auxin triggers the Rho GTPase-dependent formation of interdigitation patterns in pavement cells. Small GTPases 2011; 2(4): 227-32.