

烟草重要基因篇：4. 烟草钙依赖蛋白激酶基因

刘贯山

(中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

蛋白激酶 (protein kinase) 又称蛋白质磷酸化酶 (protein phosphokinase), 是一类催化蛋白质磷酸化反应的酶; 它能把腺苷三磷酸 (ATP) 上的 γ -磷酸转移到蛋白质分子的氨基酸残基上。钙依赖蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinase, CDPK) 存在于植物、藻类及部分原生生物中, 特别是在植物体内分布广泛, 但在细菌、真菌、酵母、线虫和动物中尚未发现。CDPK 在植物钙信号转导过程中发挥着非常重要的作用。在植物体内, 除了参与碳氮代谢、离子及水分跨膜运输、细胞骨架调节、气孔运动调节、生长发育调节以外, CDPK 广泛地参与胁迫应答反应^[1]。

1 烟草钙依赖蛋白激酶基因家族

在植物中, CDPK 是一个多基因家族, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中有 34 个^[2], 在水稻 (*Oryza sativa*) 中有 31 个^[3], 在绒毛状烟草 (*Nicotiana tomentosiformis*) 中有 25 个^[4-5], 在玉米 (*Zea mays*) 中有 40 个^[6], 在棉花 (*Gossypium raimondii*) 中有 41 个^[7]。在普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中, 自从 Yoon 等 (1999)^[8]克隆了第一个 CDPK 基因 (*NtCDPK1*) 以来, 已经克隆分析了 10 个 CDPK 全长基因 (包括 *NtCDPK1*, *NtCDPK2* 与 *NtCDPK3*^[9], *NtCPK4*^[10], *NtCPK5*^[11], *NtCDPK5*、*NtCDPK6* 与 *NtCDPK7*^[12], *NtCDPK12*^[13]以及 *NtCDPK15*^[14-15])。同时, 中国农业科学院烟草研究所已经克隆并提交 GenBank 的还有 7 个全长 CDPK 基因, 分别是 *NtCDPK8* (HM989873)、*NtCDPK9* (HQ141792)、*NtCDPK10* (HM989874)、*NtCDPK11* (HQ158609)、*NtCDPK13* (JN662018)、*NtCDPK14* (JN662019) 及 *NtCDPK16* (JN662021)。因此, 目前在普通烟草中已经获得了 17 个全长 CDPK 基因。与普通烟草亲本之一绒毛状烟草中的 25 个 CDPK 基因相比, 推测在普通烟草中应该存在 50 个左右 CDPK 基因。另外, 在烟草属的其他种中也有 CDPK 基因克隆的报道; 其中, 本赛姆氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 1 个^[9], 渐窄叶烟草 (*Nicotiana attenuata*) 4 个^[16], 蓝茉莉叶烟草 (*Nicotiana plumbaginifolia*) 2 个 (AJ699160 和 AJ699161)。

2 烟草钙依赖蛋白激酶参与胁迫应答反应

2.1 非生物胁迫应答反应

在普通烟草中, *NtCDPK1*、*NtCDPK2*、*NtCDPK3*、*NtCPK4*、*NtCDPK12* 和 *NtCDPK15* 参与了不同非生物胁迫应答反应。在叶片中, 采用植物激素 (ABA、赤霉素和细胞分裂素)、茉莉酸甲酯、壳聚糖、NaCl 处理, *NtCDPK1* mRNA 积累增加^[8]。采用低渗胁迫处理烟草细胞, *NtCDPK2* 与 *NtCDPK3* 转录本增加^[9]。采用赤霉素和 NaCl 处理后, 普通烟草的 *NtCPK4* 表达量升高^[10]。通过实时定量 PCR 证明, 普通烟草 *NtCDPK12* 的表达受高盐和干旱诱导^[13]; *NtCDPK15* 的表达受盐胁迫及 ABA 胁迫诱导, 但受干旱胁迫抑制^[14-15]。

2.2 生物胁迫应答反应

普通烟草的 *NtCDPK1*、*NtCDPK2* 和 *NtCDPK3* 以及渐窄叶烟草的 *NaCDPK4* 和 *NaCDPK5* 参与了不同

的生物胁迫应答反应。在叶片中,采用伤害(针刺)与真菌激发子处理, *NtCDPK1* mRNA 积累增加^[8]。采用生理小种特异的激发子(Avr9)处理烟草细胞, *NtCDPK2* 与 *NtCDPK3* 转录本增加^[9]。在渐窄叶烟草 *NaCDPK4* 和 *NaCDPK5* 沉默植株中,当伤害或模拟动物取食处理后,茉莉酸积累水平特别高;这表明, *NaCDPK4* 和 *NaCDPK5* 可能在茉莉酸生物合成早期起作用^[17]。

3 烟草钙依赖蛋白激酶催化其底物蛋白质磷酸化

CDPK 通过催化其底物蛋白质磷酸化而参与不同的钙依赖信号转导途径。在普通烟草中, *NtCDPK1* 可能催化不同的底物。通过酵母双杂交系统和免疫共沉淀技术证明, *NtCDPK1* 的催化底物之一是 26S 蛋白酶体的一个调节亚基 *NtRpn3*, 因此 *NtCDPK1* 可能参与调节烟草细胞分裂、分化和死亡^[18], 特别在调节烟草根系发育的信号转导途径中起作用^[19]。 *NtCDPK1* 的另一个催化底物是转录因子 REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG), 通过磷酸化 RSG 的丝氨酸-114, *NtCDPK1* 可以促进 14-3-3 信号蛋白与 RSG 结合, 从而调节赤霉素生物合成酶^[20-21]。实验证明, *NtCDPK2* 是通过磷酸化烟草突触融合蛋白(syntaxin)而响应生理小种特异的 Avr9 的^[22]。另外, 在响应生物或非生物胁迫应答反应中, *NtCDPK2* 和 *NtCDPK3* 也可以被其上游蛋白激酶磷酸化, 这些胁迫诱导的磷酸化位点位于 CDPK 的 N 末端可变区^[23]。利用酵母细胞融合杂交的方法将含有诱饵载体 pGBKT7-*NtCDPK12q* 的 Y2H Gold 酵母细胞与含有 cDNA 文库的 Y187 酵母细胞进行融合杂交, 获得 *NtCDPK12* 的催化底物为一种 RNase H 家族蛋白(*NtPS1*)^[5]。

4 烟草钙依赖蛋白激酶的催化特异性

CDPK 单肽链从 N 端到 C 端可分为 4 个功能区(结构域), 依次为可变区、催化区、连接区和调控区^[1]; 同一植物的不同 CDPK 同系物(isoform)的一级结构非常相似。催化区的同源性很高, 在拟南芥 CDPK 同系物之间, 催化活性位点区域几乎具有 100% 的一致性; 连接区最为保守; 调控区虽然保守性差, 但它是调控钙离子结合的区域; 因此, 不同同系物催化不同底物的特异性应该来自于很少有同源性的 N 端可变区。在 *NtCDPK1* 的 N 端可变区的一个氨基酸突变(R10A, 即第 10 位的精氨酸突变为丙氨酸)降低了 *NtCDPK1* 与 RSG 的结合及 RSG 的磷酸化, 虽然激酶活性完好无损, 但 *NtCDPK1* 的功能受到抑制^[24]。进一步研究表明, 除了特异地磷酸化 RSG 外, *NtCDPK1* 在 RSG 磷酸化后还可以转移 14-3-3 蛋白到 RSG 上, 然后 RSG 与 14-3-3 蛋白的复合物脱离 *NtCDPK1*^[25]。因此, *NtCDPK1* 具有“脚手架激酶”功能, 通过对同一蛋白的催化与脚手架支撑, 提高了信号转导的特异性与有效性。

5 问题与展望

虽然对烟草的部分 CDPK 基因及蛋白同系物进行了分析, 特别是对 *NtCDPK1* 进行了深入研究, 但是烟草(尤其是普通烟草)的很多 CDPK 还没有得到分离与鉴定。未来的主要挑战是描绘出烟草 CDPK 家族成员在钙信号转导途径中发挥各自作用以及相互协调的一幅完整图谱。

参考文献

- [1] 刘贯山, 陈珈. 钙依赖蛋白激酶(CDPKs)在植物钙信号转导中的作用[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 160-167.
- [2] Cheng S H, Willmann M R, Chen H C, et al. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family[J]. Plant Physiol, 2002, 129: 469-485.
- [3] Asano T, Tanaka N, Yang G, et al. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene family: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice[J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46: 356-366.
- [4] 张丽, 张磊, 康乐, 等. 绒毛状烟草钙依赖蛋白激酶基因家族分析[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(3): 56-62.

- [5] 张丽. 烟草钙依赖蛋白激酶基因分析与作用底物筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [6] Xianpei K, Wei L, Shanshan J, et al. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 433.
- [7] Wei L, Wei L, Qiuling H, et al. Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in *Gossypium raimondii*[J]. PLoS ONE, 2014, 9: e98189.
- [8] Yoon G M, Cho H S, Ha H J, et al. Characterization of *NtCDPK1*, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein[J]. Plant Mol Biol, 1999, 39: 991-1001.
- [9] Romeis T, Ludwig A A, Martin R, et al. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defense response[J]. EMBO J, 2001, 20: 5556-5567.
- [10] Zhang M, Liang S, Lu Y T. Cloning and functional characterization of *NtCPK4*, a new tobacco calcium-dependent protein kinase[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1729: 174-185.
- [11] Wang Y, Zhang M, Ke K, et al. Cellular localization and biochemical characterization of a novel calcium dependent protein kinase from tobacco[J]. Cell Res, 2005, 15: 604-612.
- [12] 太帅帅, 刘贯山, 孙玉合, 等. 普通烟草 CDPK 基因家族的克隆及表达分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3600-3608.
- [13] Chen Shuai, Liu Guan-shan, Wang Yuan-ying, et al. Cloning of a calcium-dependent protein kinase gene *NtCDPK12*, and its induced expression by high-salt and drought in *Nicotiana tabacum*[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10: 1851-1860.
- [14] 康乐, 张丽, 张磊, 等. 普通烟草钙依赖蛋白激酶 *NtCDPK15* 的基因克隆及表达分析[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(3): 48-54.
- [15] 康乐. 烟草钙依赖蛋白激酶基因克隆与分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [16] Wang J Q, Hettenhausen C, Meldau S, et al. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*[J]. Plant Cell, 2007, 19: 1096-1122.
- [17] Hettenhausen C, Yang D H, Baldwin I T, et al. Calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in *Nicotiana attenuate*[J]. Plant Signal Behav, 2013, 8: e22784.
- [18] Lee S S, Cho H S, Yoon G M, et al. Interaction of *NtCDPK1* calcium-dependent protein kinase with *NtRpn3* regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum*[J]. Plant J, 2003, 33: 825-840.
- [19] Lee S S, Yoon G M, Rho E J, et al. Functional characterization of *NtCDPK1* in tobacco[J]. Mol Cells, 2006, 21: 141-146.
- [20] Ishida S, Yuasa T, Nakata M, et al. A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins[J]. Plant Cell, 2008, 20: 3273-3288.
- [21] Nakata M, Yuasa T, Takahashi Y, et al. CDPK1, a calcium-dependent protein kinase, regulates transcriptional activator RSG in response to gibberellins[J]. Plant Signal Behav, 2009, 4: 372-374.
- [22] Heese A, Ludwig A A, Jones J D G. Rapid phosphorylation of a syntaxin during the *Avr9/Cf-9*-race-specific signaling pathway[J]. Plant Physiol, 2005, 138: 2406-2416.
- [23] Witte C P, Keinath N, Dubiella U, et al. Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated in vivo as part of a kinase cascade that regulates stress response[J]. J Biol Chem, 2010, 285: 9740-9748.
- [24] Ito T, Nakata M, Fukazawa J, et al. Alteration of substrate specificity: the variable N-terminal domain of tobacco Ca^{2+} -dependent protein kinase is important for substrate recognition[J]. Plant Cell, 2010, 22: 1592-1604.
- [25] Ito T, Nakata M, Fukazawa J, et al. Scaffold function of Ca^{2+} -dependent protein kinase: *NtCDPK1* transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation[J]. Plant Physiol, 2014, 165: 1737-1750.