

ROP 蛋白研究进展

杨景豪, 杨小亮, 徐碧玉, 金志强*

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101)

摘要: ROP(Rho-related GTPases from plants)蛋白作为高等植物体内广泛存在的一类 GTP 结合蛋白,是近些年植物信号转导方面研究的热点。它调控了肌动蛋白细胞骨架的形成、物质的膜泡运输、细胞极性的形成、胞内氧化态环境的形成、脱落酸的信号转导等诸多途径。为此,着重从分类、结构、转导途径及功能方面对其进行了阐述。

关键词: ROP 蛋白; 结构; 分类; 转导途径; 功能

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0012-05

G 蛋白是真核生物细胞内普遍存在的一类信号转导蛋白,根据其亚基的组成与分子量的大小可以分为异源三聚体蛋白、小 G 蛋白和其他几种特殊的 GTP 结合蛋白^[1]。小 G 蛋白因其分子量较小(20~30 kD)而得名。它与异源三聚体 G 蛋白的 α 亚基在功能上有更多的相似性,它们都具有 GTP 酶的活性。所有的小 G 蛋白都从属于 Ras 超家族。据初步研究,它们可能在细胞信号转导、细胞内膜的动态更新及物质运输等方面有着重要的作用。

在哺乳动物体内分布着许许多多的异源三聚体蛋白,它们拥有 20 个 $G\alpha$, 5 个 $G\beta$ 和 12 个 $G\gamma$ 亚基,调控了动物细胞内大约 30% 的信号通路^[2]。然而在拟南芥中仅仅发现了 1 个 α 亚基、1 个 β 亚基和 2 个 γ 亚基,特别是当基因敲除拟南芥中的 $G\alpha$ 时并没有出现像动物中那样广泛的影响^[1,3]。所有这些均表明,在植物体内可能还有其他的像动物体内的异源三聚体蛋白那样的信号转导蛋白。在异源三聚体 G 蛋白信号转导途径中负责感知外界信号的受体是 7 次跨膜的 G 蛋白伴侣受体和酪氨酸激酶受体,前者在植物体内很少而后者根本就没有发现。然而小 G 蛋白信号转导途径中与此相对应的丝氨酸/苏氨酸受体样激酶在植物体内较多。这一切证明了在植物体内小 G 蛋白可能是 G 蛋白中主要的信号转导蛋白^[4]。

小 G 蛋白家族又称为 Ras 超家族,根据其功能的不同,Ras 超家族又可以分为 Ras, Rho, Rab, Ran

和 Arf 5 个家族。其中, Rab, Ran 和 Arf 家族在所有真核细胞中都比较保守,它们直接参与调节了许多重要的细胞过程。Rab 与物质的膜泡运输有关,Arf 则与分泌系统芽泡的形成有关,而 Ran 则调控着 RNA 与蛋白质从核孔复合体的运输^[5]。由于它们参与的都是细胞生命活动的基本过程,故一般不认为它们是细胞内的信号转导蛋白。在动物和酵母中,Ras 和 Rho 被认为是真正将外界的信号或刺激传递到胞内的信号转导蛋白。

尽管 Ras 在动物以及其他一些低等真核生物体内的细胞信号转导方面有着重要的作用,但在拟南芥基因组中并没有发现其同源序列,也只是在低等植物中找到少数几种与动物 Ras 蛋白有较高同源性的 Ras 样蛋白^[6]。Rho 家族由保守的 Cdc42, Rac 和 Rho 3 个成员组成,其中,Cdc42 和 Rho 则普遍存在于酵母和大多数动物细胞中,而 Rac 是动物所特有的。然而植物中又发现一种似乎不同于动物及酵母中的且大量存在的一类 Rho 类蛋白——ROP^[4]。并且越来越多的证据显示,也只有 ROP 才可能是植物体内真正参与信号转导的小 G 蛋白^[4,5]。

1 ROP 蛋白的结构

ROP 蛋白是非常保守的一类信号转导蛋白,在现有的玉米中,它们在核苷酸水平上的同源性为 72%(ROP3 和 ROP4)~97%(ROP2 和 ROP9),而

收稿日期: 2007-09-11

作者简介: 杨景豪(1977-),男,河南平顶山人,硕士,主要从事植物分子生物学研究。

通讯作者: 金志强(1962-),男,陕西咸阳人,研究员,博士,主要从事热带水果采后成熟的分子机理研究。

在氨基酸水平上的同源性为 75 % (ROP2 和 ROP3) ~99.5 % (ROP2 和 ROP9)^[7]。它们的氨基酸序列上都存在着 1 个效应因子结合点、5 个 GTP 结合位点、1 个插入序列和 1 个 C 端多变区域。前面的两类保守结构域决定了其发挥的功能,而 C 端多变区域决定了在细胞内结合的位置,而插入序列的功能还不太清楚^[8~11]。

2 ROP 蛋白的分类

ROP 蛋白是近年来植物信号转导方面研究的热点,从各种植物中所分离到的 ROP 基因也越来越多。拟南芥中有 11 个 ROP 基因,棉花中有 7 个 ROP 基因,玉米中有 9 个 ROP 基因,水稻中有 7 个 ROP 基因等^[12]。随着分离出来的 ROP 数量的增多,对其分类显得比较重要。Zheng Z L, Hai Li 等^[4, 13] 根据 ROP 蛋白序列的相似性以及 C 端可变区域将拟南芥分为 4 类:第 1 类是 AtROP8,第 2 类

是 AtROP9—11,第 3 类是 AtROP7,第 4 类是 AtROP1—6。而 Per Winge 等^[12] 依据它们效应因子结合位点氨基酸序列、插入序列的保守性及氨基酸序列的 C 端有无保守的 CXXL 结构域等把它们分为两类,也即把 ROP9—11 分为一类,这一类 3' 端有外显子且只存在于维管植物体内,其余的作为另一类,并把它们命名为 Rac 类蛋白,但越来越多的研究表明,似乎第 1 种更有说服力。

3 ROP 蛋白的信号转导途径

ROP 蛋白的信号转导途径如图 1 所示。胞外信号首先激活细胞表面的受体样激酶,而活化的受体样激酶通过 ROP—GEF (鸟核苷酸转换因子)而使非活性的 ROP—GDP 形式转变为活性的 ROP—GTP 形式,从而介导胞外信号传递到胞内而产生胞内信息。而在细胞中还存在着一种 ROP—GAP (GT-Pase 激活蛋白),它可以通过其上的 CRIB 结构域与

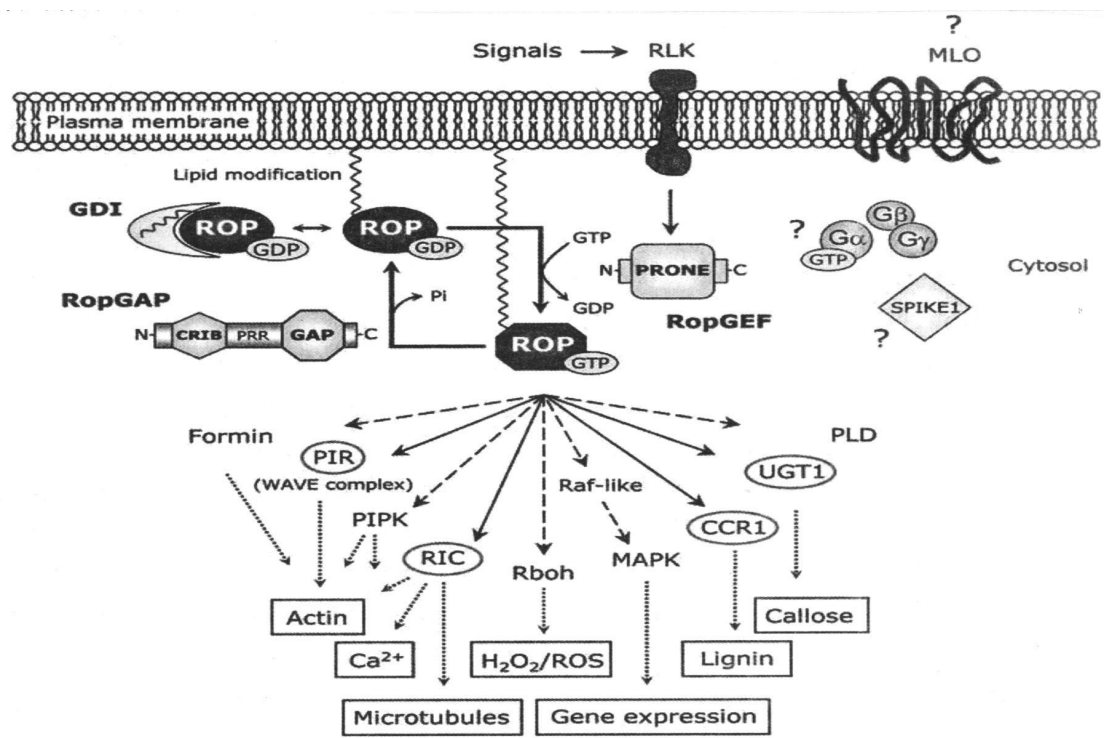


图 1 植物中 ROP 蛋白的信号转导途径^[2]

ROP 蛋白结合而使 ROP—GTP 形式转换为 ROP—GDP 形式从而维持细胞内的两种形式的 ROP 的平衡和保证了胞外的刺激源源不断地转换为胞内的信息。在细胞质中还存在着—类 GDI 的蛋白,它通过与 ROP—GDP 的结合而抑制 GDP 与 ROP 的分离从而使 ROP 游弋在细胞质中而不能传递信号^[8]。据此可以说明, GDI 可能在时空上调控着 ROP 蛋

白的活性,对于研究 ROP 的作用有着较为重要的意义。

4 ROP 蛋白的功能

4.1 ROP 蛋白调控着肌动蛋白细胞骨架、膜泡运输和细胞极性

很多试验已经证实, ROP 在花粉管以及根毛细

胞顶端生长中起着重要的作用。ROP 对细胞极性生长的影响是通过多种途径发挥的,而这种作用也可通过抑制 ROP 的 GTP 酶的活性而得到抑制。ROP 可以影响胞质中的 Ca^{2+} 浓度,而 Ca^{2+} 浓度则是肌动蛋白细胞骨架一种重要的调节因子,顶端的 Ca^{2+} 梯度对细胞的极性生长极为重要。然而 ROP 参与细胞骨架肌动蛋白调控的证据还十分有限,其中最具有说服力的例子可能是 Nobes 等^[14] 在 1999 年进行的 AtROP7 的转基因试验。他们在试验中观察到,AtROP7 的组成型表达使烟草花粉管顶端出现螺旋状的畸态肌动蛋白束(正常的是出现平行于花粉管的生长方向的肌动蛋白束)。

在烟草花粉管顶端的细胞膜上发现了一个磷酸肌醇磷脂激酶及其产物磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸,这可能为 Ca^{2+} 通过调节肌动蛋白细胞骨架而为细胞极性生长提供一些帮助。而现在大多数人则认为,在调控花粉管的顶端生长的过程中,ROP 是和一个磷酸肌醇磷脂激酶相互协调控制的,其产物磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸可通过调控 Ca^{2+} 的梯度以及肌动蛋白的结合蛋白如凝溶胶蛋白、绒毛蛋白抑制蛋白来调节肌动蛋白,引起细胞骨架调整,从而调控顶端生长^[15~17]。

对拟南芥的 ROP11 的研究表明,ROP 与细胞的内膜运输有关,因为过量表达和组成型表达都抑制了细胞的内吞作用、内膜的回收以及改变了它对生长素的响应^[18]。这可能是生长素能快速激活 ROP 从而影响细胞的内吞作用,而物质运输与生长素、ROP 之间的直接关联的证据还较少。此外,细胞的极性生长也可能为内膜的物质运输提供一些证据。

4.2 ROP 与细胞内氧化态环境之间的关系

许多研究结果都证实了 ROP 可以调节细胞内的氧化态环境。特别是对水稻中的 OsRAC1 研究比较深入,OsRAC1 介导的防御反应表明,它是 NADPH 氧化酶的正调控因子,短时间内激起了 ROS(活性氧)的产生,对稻瘟病、枯萎病的抗病能力有所增强,同时植保素的生成以及抗性相关基因的表达也有很大的变化;并且用蛋白磷酸酶抑制剂花萼海绵诱瘤素 A 处理后无细胞程序死亡^[19,20]。同时,组成型活性 OsRAC1 诱导活性氧的生成可被 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 所抑制。相似的结果在过量表达棉花 *GhRad3* 或人 *Rac1* 的拟南芥或蚕豆悬浮培养体系也存在。DPI 可抑制依赖 Rac 的

H_2O_2 的生成,说明 Rac 蛋白具有类似于人 *Rac1* 激活 NADPH 氧化酶的活性。另外将苜蓿的 *MsRac1* 基因的反义载体转入烟草后,烟草在激化子的诱导下并不产生相应的抗原反应^[21]。因此,人们普遍认为,Rac 基因是植物抗病途径中的一员。结合在膜上的 Rac 蛋白首先活化磷酸酯酶,其后在胞内蛋白激酶被活化以及胞外 Ca^{2+} 进入胞内的条件下,增加 NADPH 氧化酶的活性,使质膜释放 H_2O_2 等活性氧。活性氧一方面能直接攻击病原物,高浓度活性氧可以使细胞死亡,引发植物的过敏反应;另一方面 H_2O_2 作为植物抗逆反应的二级信使将引起植物产生一系列抗逆反应^[9]。

在棉花中, *Rac13* 在初生壁向次生壁的形成过程中高度表达,而此时正是细胞骨架重组的过程^[22]。同时蚕豆悬浮细胞转入人的 *Rad* 以及将玉米中的 *ROP* 转入动物细胞都产生了活性氧^[23]。而吴乃虎实验室也把他们克隆的一个水稻的 *ROP* 基因转入到了烟草中,结果表现为有较高的抗盐能力。所有这些都证明了植物 *ROP* 基因可诱导活性氧的生成,从而引起次生壁的生成以及细胞骨架运动,其中次生壁的生成也是植物抗逆反应的一部分,也就是说植物 *ROP* 基因各功能之间存在着联系,而非孤立的存在。

4.3 ROP 调控了泛素/26s 蛋白小体介导的蛋白水解

在研究 ROP 介导的生长素时发现 ROP 还调控了泛素介导的蛋白水解的过程,这是 ROP 蛋白研究的一个新发现^[24]。AUX/IAA 蛋白是一类由 AUX 诱导的转录抑制因子^[25],生长素可以迅速的激活 ROP 蛋白,而 ROP 蛋白可以介导 AUX/IAA 蛋白与泛素类物质等组成核内有降解蛋白功能的蛋白复合体-26s 的蛋白小体,从而使 AUX/IAA 蛋白开始降解及生长素响应基因开始表达^[25]。在生长素的信号转导过程中 MAPK 途径已经研究得较为透彻,但其是否参与了蛋白水解的过程还缺少证据。

4.4 ROP 蛋白参与脱落酸反应的负调控

脱落酸(ABA)是植物体内一种重要的内源激素,具有促进种子休眠、气孔关闭、器官脱落和果实成熟等生理功能。在对 ROP 蛋白信号转导研究中发现,就是它参与了脱落酸的负调控。拟南芥 *ROP2* 的显性负突变体和组成型活性突变体可加强或减弱由 ABA 诱导的种子的萌发^[26]。然而这些可能并不能直接说明 ROP 是 ABA 信号传导途径中

的负调控因子或正调控了对 ABA 负调控的一些因子。在拟南芥中,组成型活性的 ROP6 的表达可抑制在野生型植株中由 ABA 诱导的气孔关闭;而 *At-ROP6* 的显性负突变体表达可导致野生植株和 *abi-1* 突变体在缺乏外源 ABA 的情况下的气孔关闭。这可能是由于 ABA 可以导致一个或几个 ROPs 的失活,而后者作用于 ABI1 蛋白磷酸化酶的下游,从而破坏保卫细胞肌动蛋白的组装导致气孔关闭^[27]。由于 *AtROP6* 和 *AtROP2* 均具有 C—末端法呢基化基序,可能其中 1 个或 2 个作用于蛋白法呢基转移酶 β 亚基 ERA1,后者参与保卫细胞运动和种子休眠中 ABA 反应的负调控^[28, 29]。其他的如 *AtROP10*,它可以抑制由 ABA 引起的一些反应,包括保卫细胞肌动蛋白的重组、气孔的关闭、种子的萌发、根的伸长以及基因的表达等。据此,Zheng Z L 等^[4]则提出 ROP10 是一个膜结合的并特异地负调控 ABA 的信号转导蛋白。

此外,ROP 还参与了光、激素调控下的细胞生长分化以及植物形态建成等发育过程,它还与植物的育性发育有关^[9]。

5 展望

目前,通过构建功能缺失突变体,以及过量表达的突变体等手段,揭示了 ROP 在细胞信号转导过程中的一些作用,但可能还缺乏一些直接的证据。如受体样激酶是如何通过 GEF 将信号传递到胞内、GEF 是如何促进核苷酸与 ROP 分离的以及信号分子是如何通过 GDI 对 ROP 传导的信号进行调控的等等。总的来说,ROP 蛋白作为细胞内信号转导途径中重要的分子开关,对它的研究还处在比较初级的阶段,它所参与调节的信号途径可能并不止目前这些,相信随着研究的不断深入会有更多的作用在更为广泛的途径中被揭示。

参考文献:

- [1] Assmann S M. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 355—373.
- [2] Ying Gu, Zonghua Wang, Zhenbiao Yang. ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7: 527—536.
- [3] Ullah H, Chen J G, Temple B *et al.* The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-

induced cell division and affects multiple developmental processes[J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 393—409.

- [4] Zheng Z L, Yang Z. The ROP GTPase: an emerging signaling switch in plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44: 1—9.
- [5] Yang Z. Small GTPase: versatile signaling switches in plants[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 375—388.
- [6] 罗敏, 吴乃虎. 高等植物 Rac 家族的结构与功能[J]. *自然科学进展*, 2003, 13(9): 901—909.
- [7] Todd M, Christensen, Zuzana Vejlupekova, *et al.* Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133: 1791—1808.
- [8] A Berken. ROP in the spotlight of plant signal transduction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2446—2459.
- [9] Eun-Mi Eom, Jun-Kyong Cho, Seoung-Ok Lim, *et al.* Molecular cloning and expression of a small GTP-binding protein of the ROP family from mung bean[J]. *Plant Science*, 2006, 171: 41—51.
- [10] Kieffer F, Elmayan T, Rubier S, *et al.* Cloning of Rac and Rho-GDI from tobacco using an heterologous two-hybrid screen[J]. *Biochimie*, 2000, 82: 1099—1105.
- [11] Johanne Morel, Jerome Fromentin, Jean Pierre Blein, *et al.* Rac regulation of *Ntrbothd*, the oxidase responsible for the oxidative burst in elicited tobacco cell[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37: 282—293.
- [12] Per Wingö, Tore Brembu, Ralf Kristensen, *et al.* Genetic structure and evolution of RAC—GTPases in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genetics*, 2000, 156: 1959—1971.
- [13] Hai Li, Guang Wu, Doreen Ware, *et al.* *Arabidopsis* Rho-related GTPases: Differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 407—417.
- [14] Nobes C D, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion and adhesion during cell movement[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 144: 1235—1244.
- [15] Ying Fu, Guang Wu, Zhenbiao Yang. Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 152: 1019—1032.
- [16] Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, *et al.* Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5

—bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth[J] . The Journal of Cell Biology, 1999, 147(2): 317—330.

[17] Y Lin Z Yang. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth[J] . Plant Cell, 1997, 9: 1647—1659.

[18] Bloch D, Lavy M, Efrat Y, *et al.* Ectopic expression of an activated RAC in *Arabidopsis* disrupts membrane cycling[J] . Mol Biol Cell, 2005, 16: 1913—1927.

[19] Eiichi Ono, Hann Ling Wong, Tsutomu Kawasaki, *et al.* Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(2): 759—764.

[20] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, *et al.* The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(19): 10922—10926.

[21] Schiene K, Pühler A, Niehaus K. Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a Medicago sativa cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration[J] . Mol Gen Genet, 2000, 253: 761—770.

[22] Deborah P D, Julie R P, Andrawis A, *et al.* Genes encoding small GTP-binding analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers[J] . Mol Gen Genet, 1995, 248: 43.

[23] Jumok Park, Hyun-Jung Choi, Sumin Lee, *et al.* Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells[J] . Plant Physiology, 2000, 124: 725—732.

[24] Lizhen Tao, Alice Y Cheung, Candida Nibau, *et al.* Rac-GTPases mediate auxin-induced formation of Aux/IAA-containing proteolytically active nuclear protein bodies[J] . Plant Cell, 2005, 17: 2369—2383.

[25] Hellmann H, Estelle M. Plant development: regulation by protein degradation[J] . Science, 2002, 297: 793—797.

[26] Hai Li, JunJiang Shen, ZhiLiang Zheng, *et al.* The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*[J] . Plant Physiology, 2001, 125: 670—684.

[27] Lemichez E, Wu Y, Sanchez J P, *et al.* Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure[J] . Genes Dev, 2001, 15: 1808—1816.

[28] Sean Cutler, Majid Ghassemian, Dario Bonetta, *et al.* A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*[J] . Science, 1996, 273: 1239—1241.

[29] Zhen-Ming Pei, Majid Ghassemian, Christine M Kwak, *et al.* Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss[J] . Science, 1998, 282: 287—290.

本刊常用单位符号及换算

依据国家标准, 本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位, 为便于读者阅读, 现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km= 公里、千米 m= 米, cm= 厘米, mm= 毫米; 换算: 1 km= 1 000m, 1 m= 100cm= 3 尺, 1 cm= 10 mm
- 2 重量单位: t= 吨或 1000 kg, kg= 公斤、千克 g= 克, mg= 毫克; 换算: 1 t= 1 000kg, 1 kg= 1000 g, 1 g= 1 000mg, 500g= 1 市斤, 50g= 1 两
- 3 面积单位: m²= 平方米, hm²= 公顷, cm²= 平方厘米; 换算: 1 hm²= 10 000 m²= 15 亩, 1 亩= 667 m²
- 4 浓度单位: 1mg/ kg, mg/ L 或 mg ° kg⁻¹, mg ° L⁻¹, $\mu\text{l} \circ \text{L}^{-1}=1 \times 10^{-6}=1 \text{ ppm}$, 即百万分之一, 不用 ppm 和 1×10^{-6} 表示
- 5 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d, h, min, s”表示

(本刊编辑部)