

评述与展望

Review and Progress

EAR型转录抑制子和嵌合抑制子沉默技术研究进展及应用

刘坤[✉], 李付广[✉], 张雪妍[✉], 刘传亮[✉], 张朝军[✉], 武芝霞[✉]

中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 安阳, 455000

✉ 通讯作者及电子邮件: lifug@cricaas.com.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2010年, 第8卷, 第12篇 DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0012

收稿日期: 2010年10月08日

接受日期: 2010年11月22日

发表日期: 2010年12月17日

这是一篇开放获取的论文, 其论文发布和传播接受《Creative Commons Attribution License》所有条款。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用、传播以及任何媒介的复制或再制作。

建议最佳引用格式:

刘坤等, 2010, EAR型转录抑制子和嵌合抑制子沉默技术研究进展及应用, 分子植物育种 Vol.8 No.12 (DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0012)

摘要 EAR基序富含亮氨酸, 具有双亲性, 是赋予转录因子抑制功能的一段保守序列。EAR型转录抑制子是含有EAR基序, 并为植物特有的一类转录抑制子, 它普遍存在于多种蛋白家族中, 参与生物和非生物逆境胁迫响应、编程性和过敏性死亡、胚胎发生、器官发育和老化等多个过程的调控。EAR型转录抑制子是一类主动转录抑制子, 可以通过染色质修饰、激活子调节等途径实现对下游基因的抑制, 进而实现生物学功能的正向调控或负向调控。这种抑制作用既可以发生在分子内, 也可以发生于分子间。EAR型转录抑制子对转录过程的抑制作用可通过泛素-核蛋白酶体途径特异性降解去除, 同时, 磷酸化作用可能是去除EAR型转录抑制子抑制作用重要的步骤。在EAR型转录抑制子结构和功能等方面研究的基础上, 已经发展出嵌合抑制子基因沉默技术。该技术运用基因工程手段在激活子C末端附加一段EAR基序, 融合形成嵌合蛋白, 可将其转变为一个高效的负调控子, 用于对目标基因的表达进行特异而高效地抑制, 在鉴定转录因子基因的功能、研究蛋白质之间的相互作用、改变植物性状等方面具有重要的潜在价值。目前, 对EAR型转录抑制子结构和功能的认识还不够全面、深入和系统, 嵌合抑制子基因沉默技术本身还有待于进一步发展和完善。

关键词 植物; 转录因子; 转录抑制子; EAR基序; 嵌合抑制子沉默技术

Progresses and Application of Researches on EAR-type Transcriptional Repressor and Chimeric Repressor Gene-Silencing Technology

Liu Kun[✉], Li Fuguang[✉], Zhang Xueyan[✉], Liu Chuanliang[✉], Zhang Chaojun[✉], Wu Zhixia[✉]

Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agriculture Sciences (CAAS), Anyang, Henan 455004, China

✉ Corresponding author, lifug@cricaas.com.cn; ✉ Authors

Abstract EAR-motif, which is of amphiphilic, is rich with leucine and endows the transcription factors with repression function, is a conservative sequence in transcription factors. EAR-type transcription repressors which are unique to plants, contain the EAR-motif, and exist rifully in various types of protein families of plant, taking part in the controlling processes of bio- and abiotic stress responses, programmed and hypersensitive cell death, embryogenesis, organ development and aging. EAR-type transcription repressors belong to the class of active transcription repressors and exert repression effect on downstream genes by means of the pathway of chromatin modification and/or activator-regulation, and then, implement the positive or negative control on biological function. These inhibition effects not only happen intramolecularly but also intermolecularly, and could be removed through the pathway of ubiquitin-nuclear proteasome. Phosphorylation may play a important role in removal of the suppressive effects. CREST (Chimeric Repressor Gene-Silencing Technology) has been established on the basis of studies about the structure and function of EAR-type transcription repressors. Constructing Chimeric proteins by linking the EAR-motifs to the C-end of transcription activators genetically may make them change into high efficient negative regulons, which can be used to repress the expression of interest genes specifically and efficiently. This technology possesses huge potential application value in many aspects, such as determination of transcription activators function, investigation of interaction between proteins, changing the treats of plants, and so on. The knowledge about the structure and function of EAR-type transcription repressors remain to be unilateral, superficial and non-systematic. The CREST itself needs to be developed

and improved further.

Keywords Plant; Transcription factor; Transcriptional repressor; EAR-motif; Chimeric Repressor Gene-Silencing Technology

研究背景

转录因子(Transcription Factor)可分为转录激活子(Transcription Activator)和转录抑制子(Transcription Repressor)两大类(杜娟等, 2008)。转录抑制子是起负调控作用的反式作用因子, 具有防止激活子过度激活, 保证基因能够在最适的水平上表达, 避免过度表达对植物本身造成伤害或能量浪费的功能(Hanna-Rose et al., 1996)。EAR型转录抑制子(EAR-type Transcriptional Repressor)是指含有EAR基序(ERF-associated amphiphilic repression motif EAR-motif) (Ohta et al., 2001)或类EAR基序的一类植物特有的转录抑制子。研究发现它们普遍存在于植物体内多个蛋白家族中, 在植物生长、发育、抗逆和抗病等生理过程的调节及多种生理过程之间关系的协调(Hiratsu et al., 2002; Kazan et al., 2006; Ciftci-Yilmaz et al., 2007)等方面发挥着重要作用。

2003年, Hiratsu等运用基因工程手段在激活子C末端附加一段EAR基序, 融合形成嵌合蛋白, 将其转变为高效的负调控子, 从而提出了嵌合抑制子基因沉默技术(Chimeric Repressor Silencing Technology, CREST)。后来研究表明, 该技术在转录激活子功能的快速鉴定、研究蛋白质间的相互作用和农作物性状的改良等研究领域有着广阔的应用前景。为了促进对EAR型抑制子抑制作用机理的认识, 促进CREST技术的发展完善, 本文对有关EAR型转录抑制子概念、功能和调控机制, 以及CREST技术原理和应用进行综述。

1 EAR型转录抑制子的发现及概念

Fujimoto等(2000)克隆出了5个编码拟南芥(*Arabidopsis thaliana* At)ERF(Ethylene responsive factor)蛋白的cDNA序列, 分别命名为*AtERF1*、*AtERF2*、*AtERF3*、*AtERF4*和*AtERF5*。根据对它们所编码的蛋白氨基酸序列的比对分析结果, 把它们分为三大类: Class I (*AtERF1*、*AtERF2*), Class II (*AtERF3*、*AtERF4*), Class III (*AtERF5*)。其中*AtERF1*、*AtERF2*和*AtERF5*为转录激活子, 而*AtERF3*和*AtERF4*是转录抑制子。同年, Ohta等(2000)研究发

现烟草(*Nicotiana tabacum* Nt)中的NtERF3也是一种转录抑制子。

Ohta等(2001)对Class II类ERF和TFIII型ZFP(Zinc Finger Protein)转录抑制子的氨基酸序列比对分析发现在它们序列的C末端都含有一个保守基序(L/FDLN L/F(X)P), 进一步研究表明该序列是抑制作用所必需的, 并且富含亮氨酸, 具有双亲性, 研究者称之为EAR基序。Hiratsu等(2002)在ZFP家族的SUPERMAN蛋白中发现与ERF基序相似的保守序列(DLDLEL), 作者称之为类EAR基序(EAR-like motif)。后来, Tiwari等(2004)、Tsukagoshi等(2005)又分别在Aux/IAA(auxin/indoleacetic acid)及B3家族(B3 DNA-binding domain protein)的HIS (High-Sugar Induced)蛋白中发现与ERF基序相似的保守序列(LxLxL, I/LDLNS/FXP)。本文用EAR型转录抑制子一词表示这类含有EAR基序或类EAR基序的转录抑制子。

2 EAR型转录抑制子的特征

2.1 EAR型转录抑制子的分布特征

EAR型转录抑制子是一类普遍存在于植物界并为植物所特有的转录抑制子。在多种植物常见的转录因子如ERF、ZFP等家族中都发现了EAR型转录抑制子的存在(表1)。由表1可见, EAR型转录抑制子不仅存在于单子叶植物中, 还存在于双子叶植物中。目前, 在动物界还没有发现与EAR基序同源的抑制序列。

2.2 EAR型转录抑制子的序列特征

EAR基序是EAR型转录抑制子的共同特征。当缺失EAR基序时, 转录抑制子失去抑制功能, 表明EAR基序是该型抑制子的抑制作用所必需的(Ohta et al., 2001); EAR基序中氨基酸残基改变将导致抑制功能的降低或缺少(Ohta et al., 2001; Tiwari et al., 2001, 2004), 如*AtERF3*的EAR基序(LDLNLA P)中的D氨基酸残基被A取代, 将使转录抑制子失去抑制功能(Ohta et al., 2001); EAR基序富含亮氨

酸, 其中亮氨酸是十分保守的, 对已报道的该类保守序列对比分析发现, 亮氨酸占有较大的比例, 其中第二个亮氨酸是完全保守的(杜娟等, 2008)。实验表明, 亮氨酸具有非常重要的作用, Tiwari 等(2004)

以 IAA17 为代表, 通过原生质体转染实验, 发现亮氨酸的突变将导致抑制功能的弱化或缺失, 其中第二个 L 的突变影响最大。

表 1 EAR 型转录抑制子的来源和类型

Table 1 The origins and types of EAR-type transcription repressors

来源 origins	转录抑制子 Transcription repressors	所属类别 Categories
拟南芥 Arabidopsis	ZAT1、ZAT5、ZAT11 (Ohta et al., 2001); ZAT7(Ciftci-Yilmaz et al., 2007); ZAT10(Ohta et al., 2001, Mittler et al., 2006); AZF1-3、STZ(Sakamoto et al., 2000, 2004); SUPERMAN(Hiratsu et al., 2002) <i>AtERF3</i> 、 <i>AtERF4</i> 、 <i>AtERF10</i> 、 <i>AtERF11</i> 、 <i>AtERF12</i> (Ohta et al., 2001); <i>AtERF7</i> (Song et al., 2005); DEAR1(Tsutsui et al., 2009) HSI2、HSI2-L1、HSI2-L2(Tsukagoshi et al., 2005,2007) IAA12/BDL(Szemenyei et al., 2008); IAA17 NIMIN1、NIMIN2、NIMIN3 (Chern et al., 2005) ZPT2-2、ZPT2-5、ZPT2-7、ZPT2-9、ZPT2-13、ZPT3-3、ZPT4-4 (Ohta et al., 2001); ZPT2-3(Sugano et al., 2003)	ZFP ERF B3 AUX/IAA NDBDP ZFP
矮牵牛 Petunia	ZFT1(Uehara et al., 2005)	ZFP
烟草 Tobacco	NtERF3(Ohta et al., 2001); NbCD1(Nasir et al., 2005) G8-1(Chern et al., 2005)	ERF NDBDP
长春花 Periwinkle	ZCT1-3(Pauw et al., 2003)	ZFP
小麦 Wheat	WZF1(Ohta et al., 2001); TaZFPs(Kam et al., 2008) wNRR(Chern et al., 2005)	ZFP NDBDP
大豆 Soybean	GmERF4(Zhang et al., 2010)	ERF
陆地棉 Upland cotton	GhERF4(Jin et al., 2008)	ERF
水稻 Rice	OsERF3(Ohta et al., 2001) OsHSI2(Du et al., 2008) NRR(Chern et al., 2005)	ERF B3 NDBDP

注: ZFP, 锌指蛋白; ERF, 乙烯反应因子; B3, B3 结构域蛋白; AUX/IAA, 生长素/吲哚乙酸蛋白; NDBDP, 无 DNA 结合域蛋白
 Note: ZFP, Zinc finger protein; ERF, Ethylene responsive factor; B3, B3 domain protein; AUX/IAA, Auxin/indoleacetic acid proteins; NDBD: Non DNA Binding Domain protein

除 EAR 基序外, 不同家族的 EAR 型转录抑制子还具有不同的 DNA 结合域, 如 ERF 类含有 AP2/ERF 域、ZFP 类含有锌指结构域、B3 类含有 B3

结构域(Hao et al., 1998; Takatsuji, 1998; Tsukagoshi et al., 2005; Suzuki et al., 2007; Lewis et al., 2007)等。另外, 也有个别 EAR 型转录抑制子无 DNA 结合域

(Weigel et al., 2005; Chern et al., 2005), 但是它们必须和具有 DNA 结合域的特定的蛋白因子结合后才具有抑制作用。如拟南芥中的 NIMIN2 和水稻中的 NRR(Chern et al., 2005)。

3 EAR 型转录抑制子的生物学功能

EAR 型转录抑制子表现出多方面的生物学功能。

3.1 参与非生物胁迫响应过程的调控

在生命周期中, 植物体常常面临许多非生物逆境的胁迫, EAR 型转录抑制子参与非生物胁迫响应过程的调控。例如, ZAT7 基因超表达的转基因拟南芥植株, 对盐的抗性提高, 而 ZAT7 中 EAR 基序缺失或突变转化实验中, 转基因植株对盐的抗性消失, (Ciftci-Yilmaz et al., 2007)。Song 等(2005)报道, *AtERF7* 的超表达降低保卫细胞对 ABA 的敏感性, 水分损失增加, 植株抗耐旱能力降低。Kam 等(2008)发现 TaZFPs 家族中的一些 EAR 型转录抑制子也与抗干旱相关。大豆 GmERF4 基因超表达载体转化烟草, 转基因植株抗盐和干旱胁迫能力大大增强(Zhang et al., 2010)。另外, DEAR1 能够抑制低温反应基因的低温诱导表达, 降低植株抗低温能力(Tsutsui et al., 2009)。

3.2 参与生物胁迫响应过程的调控

Nasir 等(2005)用病毒诱导基因沉默研究发现, *NbCD1* 基因是本土烟草(*N.benthamiana*)对病原假单胞菌(*Pseudomonas cichorii*)产生非寄主抗性(non-host resistance)所必需的, 通过下调其它防卫基因的表达, *NbCD1* 促使植物体产生非寄主抗性。DEAR1 超表达转基因植株对病原菌抗性增加(Tsutsui et al., 2009)。GmERF4 超表达的转基因植株中, 下游基因(*PR1*, *PR2*, *PR4*, *Osmotin* 和 *SAR8.2*)表达水平明显降低, 植株失去对病原细菌的抗性(Zhang et al., 2010)。实验表明, EAR 型转录抑制子也与生物胁迫反应过程密切相关。

3.3 参与编程性和过敏性死亡过程的调控

细胞编程性和过敏性死亡是生物体内重要的生理过程, 研究表明 EAR 型转录抑制子参与此过程的调控。单态氧(singlet oxygen)和超氧自由基(super-oxide radicals)两种活性氧(reactive oxygen species)

能启动编程性死亡过程。对不同类型细胞编程性死亡共有阶段的研究发现, 一系列新的基因被高调表达, 其中包括 *Zat11*, 并发现 ZAT11 是被单态氧和超氧自由基调节最明显的转录因子。暗示 ZAT11 这种 C₂H₂ 型锌指蛋白在活性氧介导的编程性死亡过程中发挥着重要作用(Gechev et al., 2005)。而马铃薯晚疫病病菌分泌的主要激发子 INF1(the major secreted elicitor of *Phytophthora infestans*)和非寄主病原菌 *P.cichorii* 可以诱导细胞过敏性死亡, *NbCD1* 的抑制作用是这个过程所必须的(Nasir et al., 2005)。DEAR1 的超表达可引起转基因植株中叶片、茎等器官中组织细胞的死亡(Tsutsui et al., 2009)。

3.4 参与胚胎发生、器官发育和老化过程的调控

胚胎发生、器官发育和个体老化是植物体的基本生命过程, EAR 型转录抑制子是这些过程不可或缺的调控因子, 没有 EAR 型转录抑制子功能的正常发挥, 这些过程将不能正常进行。例如, SUPERMAN 是一种与花器官发育相关的转录因子, 该转录因子的 C 末端含有一个 EAR 基序, 是一种 EAR 型转录抑制子。缺少 EAR 基序的 SUPERMAN 基因的异位表达导致类似于 *spuerman* 基因突变子的表型, 表明 SUPERMAN 基因的抑制活性是花器官的正常发育所必不可少的(Hiratsu et al., 2002)。Szemenyei 等(2008)研究发现 EAR 型转录抑制子 IAA12/BDL 能促进拟南芥胚胎发育中根和维管系统的发育, Kam 等(2008)报道 TaZFPs 类 EAR 型转录抑制子与叶片发育和老化有关。

4 EAR 型转录抑制子的调控机制

4.1 EAR 型转录抑制子是主动转录抑制子

真核生物中转录抑制子分为主动转录抑制子(Active Transcription Repressor)和被动转录抑制子(Passive Transcription Repressor)两大类。被动转录抑制子不含有任何特异的抑制域, 它们通过与具有相同 DNA 结合位点的转录激活子竞争而实现它们的抑制功能(Cowell et al., 1994; Hanna-Rose et al., 1996)。相反, 主动转录抑制子除 DNA 结合域外, 还包含一个内在而必要的抑制功能域(Cowell et al., 1994; Hanna-Rose et al., 1996), 通过染色体结构修饰(如组蛋白的去乙酰化)或者与激活子互作等机制行使抑制功

能(Thiel et al., 2004; Kazan et al., 2006)。EAR 型转录抑制子属于主动转录抑制子(Ohta et al., 2001)。

4.2 EAR 型转录抑制子具有双向的调控功能

ZAT10 基因编码 *ZAT10* 蛋白是 ZFP 家族的一种 EAR 型转录抑制子, Mittler 等(2006)发现 *ZAT10* 超表达时, 活性氧防卫转录本(reactive oxygen-defense transcripts)积累增加, 植物对盐、热和渗透胁迫的抗性提高。同时发现敲除 *ZAT10* 基因或该基因的 RNAi 干涉突变体, 也对盐和渗透胁迫具有较高的抗性。暗示 *ZAT10* 对植物防卫反应具有正负双向调控功能。

4.3 EAR 型转录抑制子的抑制作用既可以发生在分子内又可以发生在分子间

EAR 基序赋予转录抑制子对下游基因的抑制活性, 当该基序与转录激活子共价结合成嵌合蛋白分子时也可使后者转变为转录抑制子, 表现出分子内抑制作用。在瞬时表达测验中, 当把含有激活子表达盒质粒与含有抑制子表达盒的质粒进行共转化时, 报道子的表达水平比用含有激活子表达盒的质粒单独转化要低的多。实验结果说明, EAR 型转录抑制子的抑制作用还可以发生在分子间(Fujimoto et al., 2000; Ohta et al., 2001)。

4.4 EAR 型转录抑制子抑制活性可以通过不同的途径实现

EAR 型转录抑制子可以通过修饰染色质的结构, 阻止转录激活子和其靶标顺式元件的结合, 抑制转录起始过程(Pazin et al., 1997)。如 *AtERF7* 与保守的启动子元件 GCC box 结合后, 征募 AtSin3 和 HDA19 两种蛋白因子参与到转录单位中, 其中 AtSin3 是一个辅助抑制因子, 而 HDA19 是组蛋白脱乙酰酶。*AtERF7* 可能是通过组氨酸脱乙酰化修饰改变染色质实现对基因表达的抑制作用。

EAR 型转录抑制子也可以通过和转录激活子直接或间接的结合, 调节后者功能状态, 实现对后者功能的抑制作用。Weigel et al 报道(2005), 拟南芥中 NIMIN1 本身不含有任何 DNA 结合位点, 通过 NIM1/NPR1 和 TGA 家族转录激活子间接结合实现对下游基因(PR1)的抑制。NIM1 或称为 NPR1 是一种对

PR1 表达具有正调控作用的锚蛋白。水稻的 NRR 通过和拟南芥中 NIMIN 相似的机制实现 PR1 基因表达的负调控(McGrath et al., 2005; Chern M et al., 2005)。

4.5 EAR 型转录抑制子活性的去除

细胞内 EAR 型转录抑制子活性如何去除也是研究者关注的问题, 研究发现泛素-蛋白酶体途径是植物组织细胞去除抑制子活性的重要机制。核蛋白酶体(nuclear proteasome)是蛋白质降解的场所, 在生物和非生物胁迫刺激作用下内源激素浓度发生改变, 可以启动泛素-核蛋白酶体途径特异性降解 EAR 型转录抑制子, 去除对转录的抑制作用。如当外源生长素处理或内源生长素浓度增加时, 可看到依赖生长素的 AUX/IAA 蛋白被转移到核蛋白酶体中, 最终 AUX/IAAs 蛋白失活, 导致生长素响应基因转录活化(Tao et al., 2005)。再如, 当乙烯浓度增大时, *AtERF4* 反应性降解, 释放出激活子(如 ERF1 或 *AtERF2*), 去除对激活子的抑制, 从而使后者发挥激活功能, 促使 PDF1.2(Plant defensin)基因的表达(McGrath et al., 2005), 这时在核蛋白酶体中看到 *AtERF4* 存在(Yang Z et al., 2005)。另外, Koyama 等(2003)报道, 烟草中 ERF3 可以和泛素连接酶发生相互作用。Song 等(2005)报道, 在互作蛋白 PKS3 作用下, *AtERF7* 发生磷酸化作用而降解, 或同 DNA 结合能力降低, 抑制作用去除。说明磷酸化作用可能是去除 EAR 型转录抑制子抑制作用重要的步骤。

5 嵌合抑制子沉默技术的概念及应用

对于 EAR 型转录抑制子结构和功能等方面的研究已经发展出一种新的抑制技术, 即嵌合抑制子基因沉默技术(Chimeric Repressor Gene-Silencing Technology CREST)。在激活子 C 末端附加一段来自于 EAR 型转录抑制子的 EAR 基序, 融合形成嵌合蛋白, 可将其转变为一个高效的负调控子, 再将它们通过转基因手段转入植物中, 用于对目标基因进行特异而高效的表达抑制, 被称为嵌合抑制子沉默技术。该技术可用于鉴定转录激活子功能、研究蛋白质相互作用、改良作物性状, 是继反义 RNA 和 RNAi 技术之后, 进行基因沉默的又一项新技术, 具有理论是实践的重大意义(Hiratsu et al., 2003; Mitsuda et al., 2005, 2006; Kam et al., 2008)。

5.1 鉴定转录因子基因的功能

CREST 的最大优点是可以克服基因冗余性的影响, 可用于鉴定转录因子的功能。同家族的多个转录因子成员之间同源性很高, 表现出基因冗余性, 而具有冗余性基因的缺失没有突变表型, 至今没看到 ERF 类转录因子的任何功能缺失突变体的报道(Yang et al., 2005)。所以, 当采用基因敲除、反义技术、RNA 干扰技术对这些基因的生物学功能进行鉴定分析时, 经常会因为同源基因的功能补偿作用而失败。Hiratsu 等(2003)用 EAR 基序和多种不同的转录因子氨基酸序列融合, 即使转录因子存在冗余性的情况下, 也会出现显性缺失表型。生长素合成的调控过程对植物正常生长和发育是十分重要的, 阻断拟南芥生长素的合成过程将导致严重畸形。SHORT-INTERNODES/STYLISH(SHI/STY)家族 STY1 因子诱导下, 拟南芥幼苗中生长素合成和积累速率加快, 促进生长发育, 并且 SHI/STY 家族成员的功能具有冗余性。用携带 *STY1+SRDX*(修饰过的 EAR 基序)融合载体转化拟南芥, 转基因幼苗不能分化出顶端分生组织, 有力证实了 STY1 等 SHI/STY 家族成员具有顶端分生组织的形成和维持的重要作用(Eklund, et al., 2010)。

5.2 研究蛋白质之间的相互作用

EAR 基序可以通过蛋白质和蛋白质相互作用介导分子间的转录抑制作用, 把一个转录复合物转化成转录抑制复合体, 因此根据 EAR 基序介导的反式转录抑制活性的有无, 来确认蛋白质和蛋白质之间是否发生相互作用, 对于研究蛋白质和蛋白质之间互作和确定转录蛋白复合体的组成成分是十分有用的。构建预期蛋白与 EAR 基序融合蛋白载体, 和转录激活子基因载体共转化, 通过观察转录激活子的激活作用是否被抑制来判断激活子和预期蛋白间是否发生相互作用。WD40 蛋白是一类含有 WD40 基序的调节蛋白, WD40 基序是指以甘氨酸-组氨酸开始, 色氨酸(W)-天冬氨酸(D)结尾的 40 个氨基酸残基长的保守序列, WD40 蛋白是具有多种调节功能的蛋白因子(Yang et al., 2008), 调节作用通过蛋白质-蛋白质互作方式进行。Matsui 等(2010)用此种方法确认了拟南芥中 WD40 蛋白 AtPWP2 (periodic tryp-

tophan protein2)和转录因子 AtTBP1 (TATA binding protein 1)可以发生相互作用。

5.3 改变植物性状

利用 CREST 可以抑制控制不良性状的基因表达或抑制优良性状抑制基因的激活, 从而可以改变植物的性状, 因此对农作物性状的改良具有很大的潜在价值。如高含量棉酚的存在是棉花植株防御病虫害危害的重要途径。但是, 棉酚的存在使棉籽油和棉籽蛋白不能用于人畜食用。培育棉株中棉酚含量高, 而种子中棉酚含量低或无棉酚(即“一高一低”)的棉花新品种是棉花育种科学家们的目标之一(朱美霞等, 2004)。棉酚产生过程中催化杜松烯羟基化形成 8-羟基-杜松烯是一种 P450 酶。该种 P450 酶在有腺体棉中是高度表达的, 而在无腺体棉中, 不表达或低水平表达, 且该 P450 酶的表达受转录水平的调节。因此, 可以设想利用 CREST 把调控该 p450 酶表达的转录激活子和 EAR 基序融合成嵌合蛋白体, 并让其只在种子中特异表达, 这样就有望实现“一高一低”的育种目标。

6 展望

综上所述 EAR 型转录抑制子是一类普遍存在于植物界并为植物所特有的转录抑制子, 是参与调节植物多种生命活动的重要因子, 有关 EAR 型转录抑制子的研究丰富了我们有关植物生命活动的知识, 深化了对生命活动调节规律的理解。但是, 对其结构和功能的认识还不够全面和深入, 对其作用机制的理解仍有很多逻辑空白, CREST 技术体系本身还有待于进一步发展、成熟和完善, 存在诸多亟待解决的问题。

为了描述的方便, 我们把多种与 EAR 基序相似的抑制序列归属在 EAR 基序的范畴之内, 并在此基础上使用 EAR 型转录抑制子这一概念。这些 EAR 基序虽然具有相同的特点(抑制功能所必需、富含亮氨酸、具有双亲性), 但在序列上仍然是多有变化。另据 Matsui 等(2008)报道, R3-MYB 蛋白家族成员 AtMYBL2 也是转录抑制子, 序列分析发现它的 C 末端也存在一个必要的富含亮氨酸的抑制序列(TLLLFR), 作者认为这一抑制序列是不同于 EAR

基序的一种新的抑制序列, 原因是该序列不具有典型的双亲性。由此看来双亲性并不是抑制作用先决条件, 那么决定抑制子抑制功能的本质特征是什么? 探究抑制基序的本质特征有利于进一步弄清楚其抑制机理。

CREST 技术可以克服基因冗余性, EAR 基序对冗余基因家族不同成员间的抑制作用表现为较低的特异性。另据报道, CONSTANS(CO)因子通过诱导 *FLOWERING LOCUS T(FT)*和 *SUPPRESSOR OF OVER-EXPRESSION OF CO1(SOCl)*基因的表达促进开花。为了验证其功能, Takase 等(2007)构建 *35S:CO-EAR-motif(CO-Rep)*嵌合蛋白超表达载体, 转化拟南芥, 形态正常的转基因植株在长日照诱导情况下, FT 基因表达明显下调, 而内源 CO 和 SOCl 基因的表达水平并没明显变化, 抽苔和开花时间比对照长两倍还多。揭示了转录激活子 CONSTANS (CO)在光周期途径中有促进抽苔和开花的功能。但是, FT 基因表达水平下调而 SOCl 基因表达水平不变的现象说明 EAR 基序的这种抑制作用对不同家族基因来说, 表现出较高水平的特异性。这种抑制作用特异性的水平和机制还不清楚, 而弄清楚这点将是完善和优化 CREST 技术的必要前提, 因此应该是该领域研究的方向之一。

总之, 随着对上述问题深入研究, CREST 技术将进一步完善, 这必将深化植物分子生物学理论认识, 并为在农作物的品种改良工作中应用该技术提供扎实的理论和技术支持。

作者贡献

刘坤、李付广参与题目选定、总体思路和文章结构的确定、文献资料收集和梳理分析、初稿撰写与修改润色; 张雪妍、刘传亮、张朝军和武芝霞参与文章结构修改、文字润色。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家 863 项目(2006AA100105)资助。作者感谢同行专家的评审及其给予的很好的建议。

参考文献

Chern M., Canlas P.E., Fitzgerald H.A., and Ronald P.C., 2005, Rice NRR, a negative regulator of disease resistance,

interacts with Arabidopsis NPR1 and rice NH1, *The Plant Journal*, 43: 623-635

Ciftci-Yilmaz S., Morsy M.R., Song L.H., Coutu A., Krizek B.A., Lewis M.W., Warren D., Cushman J., Connolly E.L., and Mittler R., 2007, The EAR-motif of the Cys2/His2-type Zinc Finger Protein Zat7 Plays a Key Role in the Defense Response of Arabidopsis to Salinity Stress, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 282: 9260-9268

Cowell I.G., 1994, Repression versus activation in the control of gene transcription, *Trends Biochem Sci.*, 19(1): 38-42

Du J., and Chai Y.R., 2008, Structural features and action mechanisms of plant transcriptional repressors, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 25(3): 344-353 (杜娟, 柴友荣, 2008, 植物转录抑制子的结构特征及其作用机理, *植物学通报*, 25(3): 344-353)

Eklund D.M., Ståldal V., Valsecchi I., Cierlik I., Eriksson C.K., Ohme-Takagi M., Sundström J.F., Thelander M., Ezcurra I., and Sundberg E., 2010, The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis, *Plant Cell*, 22: 349-363

Fujimoto S.Y., Ohta M., Usui A., Shinshi H., and Ohme-Takagi M., 2000, Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression, *The Plant Cell*, 12: 393-404

Gechev T.S., Minkov I.N., and Hille J., 2005, Hydrogen peroxide-induced cell death in Arabidopsis: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process, *IUBMB Life*, 57: 181-188

Hanna-Rose W., Hansen U., 1996, Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *TIG*, 12: 229-234

Hao D.Y., Ohme-Takagi M., Sarai A., 1998, Unique Mode of GCC Box Recognition by the DNA-BINDING Domain of Ethylene-responsive Element-binding Factor (ERF Domain) in Plant, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 273: 26857-26861

Hiratsu K., Kyoko M., Koyama T., and Ohme-Takagi M., 2003, Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis, *The Plant Journal*, 34(5): 733-739

Hiratsu K., Ohta M., Matsui K., and Ohme-Takagi M., 2002, The SUPERMAN protein is an active repressor whose

- carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers, *FEBS Lett*, 514(2): 351-354
- Jin LG, and Liu JY., 2008, Molecular cloning, expression profile and promoter analysis of a novel ethylene responsive transcription factor gene GhERF4 from cotton (*Gossypium hirsutum*), *Plant Physiol Biochem*, 46: 46-53
- Kam J., Gresshoff P. M., Shorter R., and Xue GP., 2008, The Q-type C2H2 zinc finger subfamily of transcription factors in *Triticum aestivum* is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress, *Plant Mol Biol*, 67(3): 305-322
- Kazan K., 2006, Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors, *TRENDS in Plant Science*, 11(3): 109-112
- Koyama T., Okada T., Kitajima S., Ohme-Takagi M., Shinshi H., and Sato F., 2003, Isolation of tobacco ubiquitin-conjugating enzyme cDNA in a yeast two-hybrid system with tobacco ERF3 as bait and its characterization of specific interaction, *J. Exp. Bot.*, 54(385): 1175-1181
- Matsui K., and Ohme-Takagi M., 2010, Detection of protein-protein interactions in plants using the repressive activity of the EAR motif repression domain, *The Plant Journal*, 61: 570-578
- Matsui K, Umemura Y, and Ohme-Takagi M., 2008, AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 55: 954-967
- McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J. M., Schenk P. M., Edgar C. I., Maclean D. J., Scheible W.R., Udvardi M.K., and Kazan K., 2005, Repressor and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression, *Plant Physiol*, 139: 949-959
- Mittler R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., and Zhu J.K., 2006, Gain- and loss-of-function mutations in *ZAT10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress, *FEBS Lett*, 580: 6537-6542
- Mitsuda N., Seki M., Shinozaki K., and Ohme-Takagi M., 2005, The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence, *Plant Cell*, 17: 2993-3006
- Mitsuda N., Todaka D., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., and Ohme-Takagi M., 2006, Efficient production of male and female sterile plants by expression of a chimeric repressor in *Arabidopsis* and rice. *Plant Biotechnol J.*, 4: 325-332
- Nasir K.H., Takahashi Y., Ito A., Saitoh H., Matsumura H., Kanzaki H., Shimizu T., Ito M., Fujisawa S., Sharma P.C., Ohme-Takagi M., Kamoun S., and Terauchi R., 2005, High-throughput in planta expression screening identifies a class II ethylene-responsive element binding factor-like protein that regulates plant cell death and non-host resistance, *The Plant Journal*, 43: 491-505
- Ohta M., Matsui K., Shinshi H., and Ohme-Takagi M., 2001, Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression, *Plant Cell*, 13: 1959-1968
- Ohta M., Ohme-Takagi M., and Shinshi H., 2000, Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions, *Plant J.*, 22: 29-38
- Pauw B., Hilliou F.A., Martin V.S., Chatel G., de Wolf C.J., Champion A., Pré M., van Duijn B., Kijne J.W., van der Fits L., and Memelink J., 2004, Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*, *J Biol Chem.*, 279(51): 52940-52948
- Pazin M.J., and Kadonaga J.T., 1997, SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell*, 88(6): 737-740
- Sakamoto H, Araki T, Meshi T, and Iwabuchi M., 2000, Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys(2)/His(2)-type zinc-finger protein gene family under water stress, *Gene*, 248(1-2): 23-32
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K., 2004, *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions, *Plant Physiol.*, 136(1): 2734-2746
- Song C.P., Agarwal M., Ohta M., Guo Y., Halfter U., Wang P.C., and Zhu J.K., 2005, Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-Type Transcriptional Repressor in Abscisic Acid and Drought Stress Responses, *The Plant Cell*, 17: 2384-2396
- Suzuki M., Wang H.H.Y., and McCarty D.R., 2007, Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 Regulatory Network in Plant Embryo Development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 Genes, *Plant Physiol*, 143:

- 902-911
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, and Takatsuji H., 2003, Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia., *Plant J.*, 36: 830-841
- Szemenyei H., Hannon M., and Long J. A., 2008, TOPLESS Mediates Auxin-Dependent Transcriptional Repression During Arabidopsis Embryogenesis, *SICENCE*, 319: 1384-1386
- Takatsuji H., 1998, Zinc-finger transcription factors in plants, *Cell Mol Life Sci.*, 54: 582-596
- Tao L.Z., Cheung A.Y., Nibau C., and Wu H.M., 2005, RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins, *Plant Cell*, 17: 2369-2383
- Takase T., Yasuhara M., Geekiyana S., Ogura Y., and Kiyosue T., 2007, Overexpression of the chimeric gene of the floral regulator CONSTANS and the EAR motif repressor causes late flowering in Arabidopsis, *Plant Cell Rep.*, 26: 815-821
- Thiel G, Lietz M., and Hohl M., 2004, How mammalian transcriptional repressor work. *Eur. J. Biochem.*, 271: 2855-2862
- Tiwari S.B., Hagen G, and Guilfoyle T.J., 2004, Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain, *Plant Cell*, 16: 533-543
- Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G and Guilfoyle T.J., 2001, Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin, *Plant Cell*, 13: 2809-2822
- Tsukagoshi H., Morikami A., and Nakamura K., 2007, Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 2543-2547
- Tsukagoshi H., Saijo T., Shibata D., Morikami A., and Nakamura K., 2005, Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor, *Plant Physiology*, 138: 675-685
- Tsutsui T., Kato W., Asada Y., Sako K., Sato T., Sonoda Y., Kidokoro S., Yamaguchi-Shinozaki K., Tamaoki M., Arakawa K., Ichikawa T., Nakazawa M., Seki M., Shinozaki K., Matsui M., Ikeda A., and Yamaguchi J., 2009, DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in Arabidopsis, *J. Plant Res.*, 122: 633-643
- Uehara Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Takahashi H, Matsui K, Ohme-Takagi M, Saitoh H, Terauchi R, and Kusano T., 2005, Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a Cys2/His2 type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway, *Plant Mol Biol.*, 59: 435-448
- Weigel R., Pfitzner U.M., and Gatz C., 2005, Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis, *Plant Cell*, 17: 1279-1291
- Yang H.Y., and Zhang X.Q., 2008, WD40 Proteins in Arabidopsis, *Zhiwu Shengli Yu Fenzi Shengwuxue (Plant Physiology and Molecular Biology)*, 44:1025-1033(杨红玉, 张学琴, 2008, 拟南芥 WD40 蛋白, 植物生理与分子生物学, 44: 1025-1033)
- Yang Z.H., Tian L.N, Latoszek-Green M., Brown D., and Wu K.Q., 2005, Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses, *Plant Molecular Biology*, 58: 585-596
- Zhang G, Chen M., Chen X., Xu Z., Li L., Guo J., and Ma Y., 2010, Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene GmERF4 from soybean (*Glycine max L.*). *Mol. Biol. Rep.*, 37: 809-818
- Zhu M.X., Li Y.Q., and Dai X.F., 2004, Gossypol Gland and Gossypol Biosynthesis and Molecular Breeding of Low Gossypol Cotton, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 2(3): 307-312(朱美霞, 李永起, 戴小枫, 2004, 棉酚腺体与棉酚生物合成及低酚棉分子育种, 分子植物育种, 2: 307-312)



《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志, 也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于2003年创刊, 创刊伊始即被美国化学文摘(CA), 中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库, 中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库, 中国核心期刊(遴选)数据库, 中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。



在线投稿: <http://mpb.chinese.sophiapublisher.com>