

研究报告

Research Report

水稻 3- 磷脂酰肌醇激酶 FAB1/PIKfyve 基因家族的鉴定及功能分析

徐忆纯 梁婉琪 王灿华 余婧*

上海交通大学生命科学技术学院, 上海, 200240

* 通信作者, jingleyj@163.com

摘要 FAB1/PIKfyve 是催化 3- 磷酸磷脂酰肌醇(PtdIns3P)形成 3,5- 二磷酸磷脂酰肌醇(PtdIns (3,5) P₂)过程的关键酶,其产物 PtdIns (3,5) P₂ 在真核细胞发育中发挥重要功能。为探寻 PtdIns (3,5) P₂ 在水稻生殖发育过程中的功能,本研究结合生物信息学和遗传学方法,对水稻 *FAB1/PIKfyve* 基因进行鉴定,分析其理化性质、基因结构、保守结构域、系统进化、顺式作用元件和组织表达模式并利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得 *osfab1b* 突变体。生物信息学分析结果:在水稻基因组中共鉴定到 9 个 FAB1 基因家族成员;基因结构分析显示 FAB1 家族基因结构存在差异,外显子数量为 8~12 个;保守结构域分析表明仅 *OsFAB1A* 和 *OsFAB1B* 含有 N 端 FYVE 结构域,其余成员具有 Cpn60_TCP1 结构域和 PIPKc 激酶结构域;系统进化分析提示 FAB1 家族功能在单双子叶植物中具有高度保守性;*FAB1* 基因上游调控区域顺式元件预测发现多种生长发育相关、光响应以及激素和胁迫响应顺式元件;组织表达模式分析显示大多数 *FAB1* 基因为泛表达,其中 FAB1C 亚类基因在内外稃中的高表达提示其可能参与花器官发育。最后通过 CRISPR/Cas9 系统得到 *osfab1b* 突变体,经碘染观察花粉活力无明显异常,暗示 FAB1 家族在水稻生殖发育调控中存在功能冗余。本研究结果为单子叶模式植物水稻中磷脂酰肌醇调控网络及其生物学功能的研究提供了理论参考。

关键词 水稻(*Oryza sativa*), FAB1/PIKfyve 基因家族, 3,5- 二磷酸磷脂酰肌醇, CRISPR/Cas9

Identification and Functional Analysis of 3-Phosphatidylinositol Kinase FAB1/PIKfyve Gene Family in Rice (*Oryza sativa*)

Xu Yichun Liang Wanqi Wang Canhua Yu Jing*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240

* Corresponding author, jingleyj@163.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0035

Abstract FAB1/PIKfyve is a key enzyme that catalyzes phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) to form phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PtdIns (3,5) P₂). Its product PtdIns (3,5) P₂ plays an important role in the development of eukaryotic cells. In order to figure out the function of PtdIns (3,5) P₂ in rice reproductive development, this study combined bioinformatics and genetics methods to identify the rice *FAB1/PIKfyve* genes, analyzed the physical and chemical properties, gene structures, conserved domains, phylogenetic tree, cis-acting elements, tissue expression profiles and used CRISPR/Cas9 gene editing technology to obtain *osfab1b* mutants. Bioinformatics analysis results showed that nine FAB1 gene family members were identified from the whole genome of *Oryza Sativa*. Gene structure analysis indicated the differences existed in the gene structure of FAB1 family, the

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 8 月 31 日; 接受日期: 2020 年 9 月 4 日; 发表日期: 2020 年 9 月 4 日

引用格式: 徐忆纯, 梁婉琪, 王灿华, 余婧, 2020, 水稻 3- 磷脂酰肌醇激酶 *FAB1/PIKfyve* 基因家族的鉴定及功能分析, 分子植物育种(网络版), 18 (35): 1-11 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0035) (Xu Y.C., Liang W.Q., Wang C.H., and Yu J., 2020, Identification and functional analysis of 3-phosphatidylinositol kinase *FAB1/PIKfyve* gene family in rice (*Oryza sativa*), Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(35): 1-11 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0035))

number of exons are 8~12. Conserve domain analysis showed that *OsFAB1A* and *OsFAB1B* contained the N-terminal FYVE domain, and the remaining members contained the Cpn60_TCP1 domain and PIPKc kinase domain. Phylogenetic analysis indicated that the functions of FAB1 family were highly conserved in mono- and dicotyledonous plants. Prediction of cis-element in the upstream regulatory region of *FAB1* genes revealed a variety of growth-related, light-responsive, and hormone and stress-responsive cis-elements. Tissue expression profiles showed that most of *FAB1* genes were global-expressed, and the high expression of FAB1C sub-cluster genes in lemma and palea suggested that they might be involved in floral organ development. Finally, the *osfab1b* mutants were obtained through the CRISPR/Cas9 system, and the pollen vitality of the *osfab1b* mutants showed no significantly abnormality, implied that FAB1 family had functional redundancy in the reproductive development of rice. The present results provide a theoretical reference for biological function studies of the phosphatidylinositol regulatory network in rice.

Keywords Rice (*Oryza sativa*), FAB1/PIKfyve gene family, Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, CRISPR/ Cas9

磷脂酰肌醇(PIs)是生物膜甘油磷脂的成分之一,其D-肌醇环的3,4和5位羟基可发生多重磷酸化反应形成多样的衍生物,共同构成复杂的磷脂酰肌醇代谢网络(Balla, 2013)。其中,3,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PtdIns(3,5)P₂)是真核细胞内含量最低的磷脂酰肌醇衍生物,与之相反PtdIns(3,5)P₂在内膜运输、信号转导、细胞极性生长以及细胞骨架重组等多个细胞发育过程中具有关键调控功能(Michell et al., 2006; Takasuga and Sasaki, 2013)。FAB1 (Formation of aploid and binucleate cells 1)/PIKfyve (FYVE finger-containing phosphoinositide kinase) 激酶催化PtdIns3P是PtdIns(3,5)P₂合成的唯一途径(Takasuga and Sasaki, 2013)。酵母Fab1p、人类PIKfyve和小鼠P235等典型的FAB1/PIKfyve激酶均包含三个保守结构域,分别是N端FYVE (FAB1p, YOTB, Vac1p, EEA1)结构域,中间的Cpn60_TCP1 伴侣蛋白样结构域以及C端的PIPKc 激酶结构域,此外动物PIKfyve还含有一个DEP 结构域(Michell et al., 2006; Botelho et al., 2008; Takasuga and Sasaki, 2013)。生化研究表明FYVE 结构域可特异性地结合PtdIns3P,并且这种结合作用对于FAB1 激酶的内膜定位至关重要(Gaullier et al., 1998),Cpn60_TCP1 结构域与肌动蛋白和微管蛋白的有效折叠相关(Botelho et al., 2008),PIPKc 激酶结构域为催化PtdIns3P形成PtdIns(3,5)P₂的关键结构域。不同于酵母和人类中的*Fab1p/PIKfyve*为单拷贝基因,拟南芥基因组中有四个编码FAB1 激酶的基因*FA-B1A-D*,其中只有FAB1A/B呈经典的Fab1p/PIKfyve同源蛋白结构,FAB1C/D缺少N端的FYVE 结构域,同时FAB1A-D均未发现具有DEP 结构域(Mueller-Roeber and Pical, 2002; Whitley et al., 2009)。

PtdIns(3,5)P₂水平的平衡对于真核细胞的正常

发育至关重要。酵母和动物中均有研究表明,Fab1p/PIKfyve 功能缺陷影响液泡、内体及溶酶体形态以及渗透调节、液泡pH 调控等过程,并且与内膜稳态的维持密切相关(Gary et al., 1998; Ikonomov et al., 2001)。Whitley 等(2009)发现模式植物拟南芥中FAB1A/B 单基因的功能缺失仅造成叶片轻微卷曲,然而*fab1a/fab1b* 双突变体花粉在第一次有丝分裂后液泡不能正常裂解且致死。雌二醇诱导下的条件性*fab1a/fab1b* 双突变体表现出多效性发育异常,如植株矮化、根伸长受阻、根向重力性失调和对外源生长素处理不敏感等,同时过表达FAB1A/B 植株显示相似的发育缺陷并伴有花器官形态异常,暗示FAB1 家族功能存在冗余性和剂量效应(Hirano et al., 2011)。抑制PtdIns(3,5)P₂的合成或在*fab1b/fab1c* T-DNA 突变体中都可观察到脱落酸诱导下的气孔关闭延迟,并且在*fab1b/fab1c* 双突变体中的气孔关闭速度低于单突变体,验证了FAB1 家族功能的冗余性(Bak et al., 2013)。此外,PtdIns(3,5)P₂参与调控花粉管的极性生长,*fab1b*和*fab1d* 突变体中花粉管膜运输受到干扰并且伴随活性氧的产生减少(Serrazina et al., 2014)。上述研究均表明这些发育缺陷与内膜运输过程影响的液泡酸化有关,但目前FAB1 激酶的直接下游作用因子尚不明确,部分研究表明其可通过结合V-PPase (Vacuolar proton pyrophosphatase)影响液泡膜上的质子转运过程(Bak et al., 2013)。

植物磷脂酰肌醇代谢调控网络随着近年来的研究已逐步建立起来,但其分子作用机制及功能研究是亟待完善的,特别是在单子叶模式植物水稻中的研究较少。因此,在本研究中通过生物信息学方法鉴定到9个水稻FAB1 基因家族成员,对其理化性质、基因结构、保守结构域、系统进化关系及组织表达模

式进行分析, 并且利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得 *osfab1b* 突变体, 为研究 FAB1 家族及其产物 PtdIns (3,5)P₂ 在水稻生殖发育中的生物学功能提供理论基础及遗传材料。

1 结果与分析

1.1 水稻 FAB1 家族基因鉴定

拟南芥基因组中已知编码 FAB1 蛋白的基因共有 4 个, 分别是 *FAB1A* (*At4g33240*)、*FAB1B* (*At3g14270*)、*FAB1C* (*At1g71010*)、*FAB1D* (*At1g342260*) (Mueller-Roeber and Pical, 2002)。以这 4 个基因的全长蛋白序列为目的序列在 NCBI 和 Phytozome v12.1 数据库中进行 Blastp 比对, 初步获得候选基因。然后, 利用 CD-search 工具筛选同时具有 Cpn60_TCP1 和 C 端 PIPKc 激酶结构域的基因, 共鉴定到 9 个水稻 FAB1 基因家族成员(表 1)。根据这些基因和拟南芥 *FAB1A-D* 基因的同源性对其进行命名, 便于后续的描述。这些基因的核酸长度在 5 600~14 836 bp 间, CDS 长度范围为 4 146~5 496 bp, 最长的蛋白产物含有 1 831 个氨基酸残基, 最短的蛋白产物含有 1 381 个氨基酸残基。通过 ProtParam 工具对蛋白的理化性质进行分析, 其中分子量最大的蛋白是 *OsFAB1A* (LOC_Os03g28140), 为 203.39 kD, 分子量最小的蛋白是 *OsFAB1D-3* (LOC_Os04g59540), 为 155.72 kD, 等电点范围在 5.21~6.5 间。

1.2 水稻 FAB1 基因结构及染色体分布分析

除 *OsFAB1D-1* 具有两个转录本外, 水稻 FAB1 基因家族成员均只有一个转录本, 对其基因结构进行分析(图 1), 结果显示 *OsFAB1A* 和 *OsFAB1B* 具有高度相似的外显子和内含子排布模式, 其余基因的结构

存在一定的差异, 外显子数量为 8~12 个, 内含子数量为 7~11 个。此外, *OsFAB1D-1* 具有超过 4 kb 的上下游非编码区, *OsFAB1C-1* 和 *OsFAB1C-3* 缺少 5' 端非编码区, *OsFAB1A* 和 *OsFAB1D-2* 不具有非编码区。

通过 MG2C 软件对该家族基因的染色体位置分布进行分析(图 2), 发现这 9 个基因分布于水稻 6 条染色体上。其中在 8 号染色体上分布最多, 分别是 *OsFAB1B*、*OsFAB1C-2* 和 *OsFAB1D-4*, 9 号染色体上有 2 个基因的分布, *OsFAB1A*、*OsFAB1D-3*、*OsFAB1C-1* 和 *OsFAB1D-1* 分别分布于 3 号、4 号、6 号和 12 号染色体上。

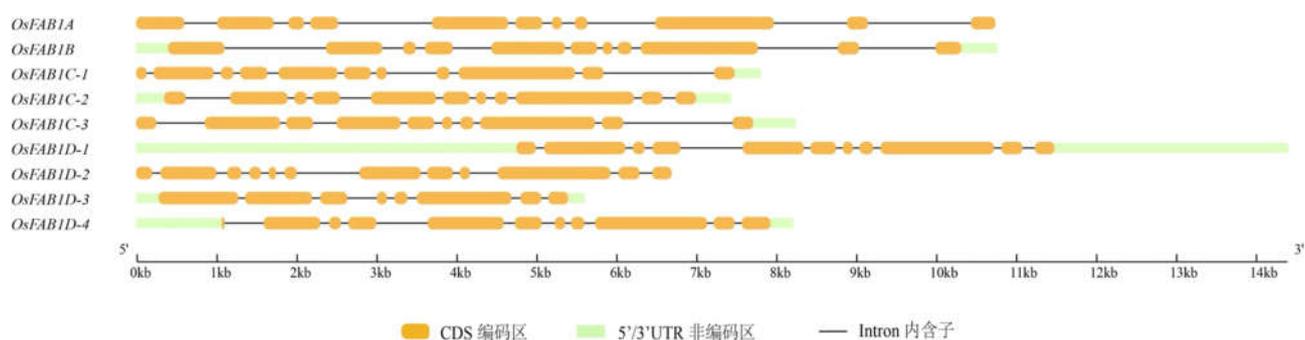
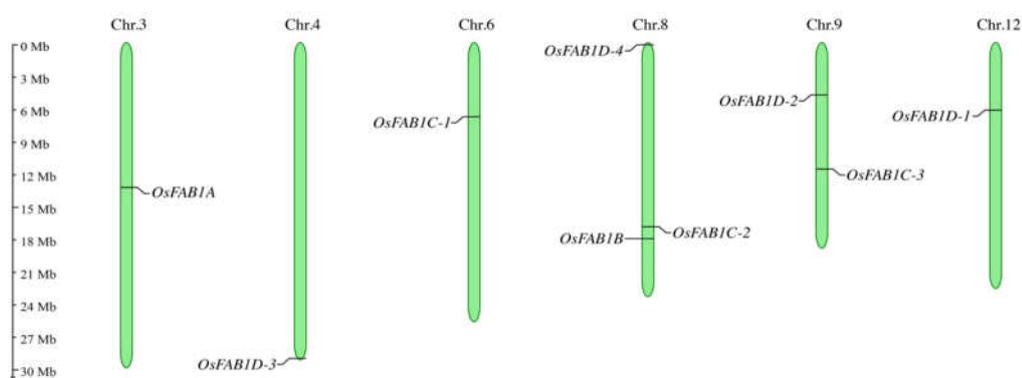
1.3 水稻 FAB1 蛋白保守结构域分析

传统的 Fab1p 及其同源蛋白结构由 N 端 FYVE 结构域, 中间的 Cpn60_TCP1 伴侣蛋白样结构域以及 C 端的 PIPKc 激酶结构域组成。前人研究表明拟南芥中仅 *FAB1A* 和 *FAB1B* 具有 N 端的 FYVE 结构域, *FAB1C* 和 *FAB1D* 为不含 FYVE 结构域的截短形式(Mueller-Roeber and Pical, 2002; Whitley et al., 2009)。通过 CD-search 工具对水稻 FAB1 蛋白的保守结构域进行预测, 结果显示仅有 *OsFAB1A* 和 *OsFAB1B* 包含 N 端 FYVE 结构域, 其余成员只含有 Cpn60_TCP1 和 PIPKc 激酶结构域(图 3A), 与拟南芥中的研究结果一致。值得注意的是, 水稻中无 FYVE 结构域的水稻 FAB1 蛋白截短形式(7 个)明显多于拟南芥(2 个), 表明在单子叶植物进化过程中 FAB1 蛋白结构更加多样, 可能具有不同于双子叶植物 FAB1 蛋白的新功能。PIPKc 激酶结构域由约 260 个氨基酸组成, 通过 DNAMAN 软件对水稻及拟南芥的 PIPKc 激酶结构域进行蛋白序列比对, 结果显示同源性达到 74.51%(图 3B), 提示其激酶功能在水稻

表 1 水稻 FAB1 家族成员信息及特性

Table 1 Information of FAB1 family members identified in japonica rice and characteristics

基因名称 Gene name	基因组登录号 Genome accession number	核酸长度 Nucleic acid length	CDS 长度 CDS length	氨基酸残基数 Amino acid residues	分子量(kD) Molecular weight (kD)	等电点 PI
<i>OsFAB1A</i>	LOC_Os03g28140	10 728	5 457	1 818	203.39	5.72
<i>OsFAB1B</i>	LOC_Os08g34950	10 755	5 496	1 831	202.56	5.83
<i>OsFAB1C-1</i>	LOC_Os06g14750	7 797	4 698	1 565	175.28	6.02
<i>OsFAB1C-2</i>	LOC_Os08g33200	7 433	4 893	1 630	182.21	6.50
<i>OsFAB1C-3</i>	LOC_Os09g23740	8 237	4 902	1 633	181.68	6.33
<i>OsFAB1D-1</i>	LOC_Os12g13440	14 386	5 034	1 677	187.51	5.32
<i>OsFAB1D-2</i>	LOC_Os09g10650	6 686	4 575	1 524	170.25	5.21
<i>OsFAB1D-3</i>	LOC_Os04g59540	5 600	4 146	1 381	155.72	5.72
<i>OsFAB1D-4</i>	LOC_Os08g01390	8 206	4 833	1 610	180.13	5.56

图1 水稻 *FAB1* 的基因结构Figure 1 Gene structure of *FAB1* in rice图2 水稻 *FAB1* 基因在染色体上的位置分布Figure 2 The chromosome location of *FAB1* genes in rice

和拟南芥中的高度保守性。

1.4 植物 *FAB1* 家族系统进化分析

为了进一步研究 *FAB1* 家族在单子叶植物和双子叶植物中的系统进化关系,利用水稻(9个)、大麦(8个)、高粱(8个)、拟南芥(4个)、大豆(7个)、毛果杨(6个)的 *FAB1* 蛋白序列构建系统进化树(图4)。结果显示,*FAB1* 家族可分为3个亚类,水稻 *FAB1A* 和 *FAB1B* 与其它植物 *FAB1A/B* 基因聚为第I类,3个水稻 *FAB1C* 基因与其它植物 *FAB1C* 基因聚为第II类,4个水稻 *FAB1D* 基因与其它植物 *FAB1D* 基因聚为第III类。在每个亚类中均有单子叶和双子叶植物 *FAB1* 成员的分布,表明这3个亚类的功能分化早于单、双子叶植物的分化。并且单、双子叶植物 *FAB1* 基因在各亚类中聚为不同的进化支,推测其功能在单、双子叶植物中已经发生分化。

1.5 水稻 *FAB1* 基因家族启动子顺式元件分析

为研究水稻 *FAB1* 基因家族在应答生物胁迫、非生物胁迫及激素信号中可能存在的机制,对其起始密码子上游2 kb 调控区域的顺式作用元件进行预测(表2)。结果显示,水稻 *FAB1* 基因的启动子区域富

含多种光响应元件(Sp1, Box4, G-box 等20种)、激素响应元件和胁迫响应元件。其中激素响应元件包括 TGA-element 生长素响应元件、ABRE 脱落酸响应元件, P-box 赤霉素响应元件, TCA-element 水杨酸响应元件, TGACG/ CGTCA -motif 茉莉酸甲酯响应元件;胁迫响应元件包括 LTR 低温响应元件,参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MBS 以及参与厌氧诱导 ARE 元件等。此外,启动子中还包含5种组织特异型顺式元件 (CAT-box, motif I, GCN4_motif, HD-Zip1, RY-element)。以上结果表明 *FAB1* 基因家族可能参与多个水稻生长发育过程,并且在多种激素响应和抵抗非生物胁迫中具有功能。

1.6 水稻 *FAB1* 家族组织表达分析

对水稻 *FAB1* 家族基因的时空表达模式进行研究,为进一步了解其参与的生物学过程提供线索。利用芯片数据进行组织表达模式的分析(图5),结果显示大部分水稻 *FAB1* 基因在各个组织中均有表达。*OsFAB1A*、*OsFAB1C-2*、*OsFAB1C-3* 在叶片中显著表达,*OsFAB1C-1*、*OsFAB1D-4* 主要在根中表达,*OsFAB1D-2* 主要在茎中表达,但是 *FAB1* 基因在花药中的表达相对较低。此外,*OsFAB1C-1*、*OsFAB1C-2* 在内

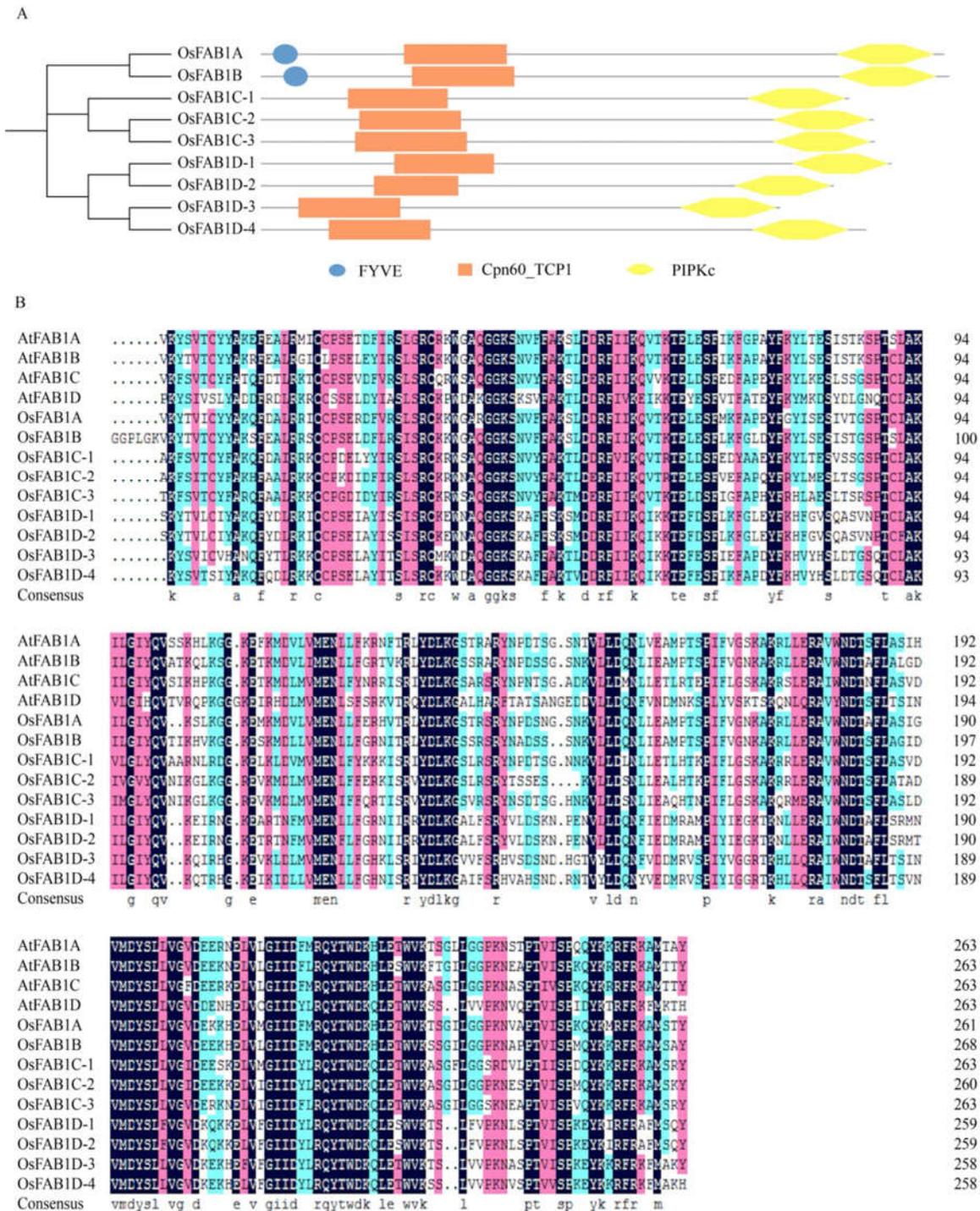


图 3 水稻 FAB1 蛋白的保守结构域分析

注: A: 水稻 FAB1 蛋白保守结构域; B: PIPKc 激酶结构域的氨基酸序列比对

Figure 3 Analysis of conserved domains of FAB1 proteins in rice

Note: A: Conserved domain of FAB1 proteins; B: Amino acid sequence alignment of PIPKc kinase domain

外稃中表达较高,表明 *FAB1C* 亚类基因可能在花器官发育过程中具有功能。*OsFAB1D-3* 在胚中显著表达,并且除 *OsFAB1D-3* 和 *OsFAB1D-4* 外,其余成员在胚乳中几乎不表达,表明 *OsFAB1D* 亚类基因可能参与调控种子发育过程。

1.7 *osfab1b* 突变体的获得及花粉育性评价

为验证水稻 FAB1 家族是否在水稻生殖发育过程中具有功能,利用 CRISPR/cas9 系统构建武运粳 7 号(9522)背景下的 *OsFAB1B* 敲除株系。靶点的选择要求基于 Xie 等(2015)的描述,分别于靠近 5' 端起

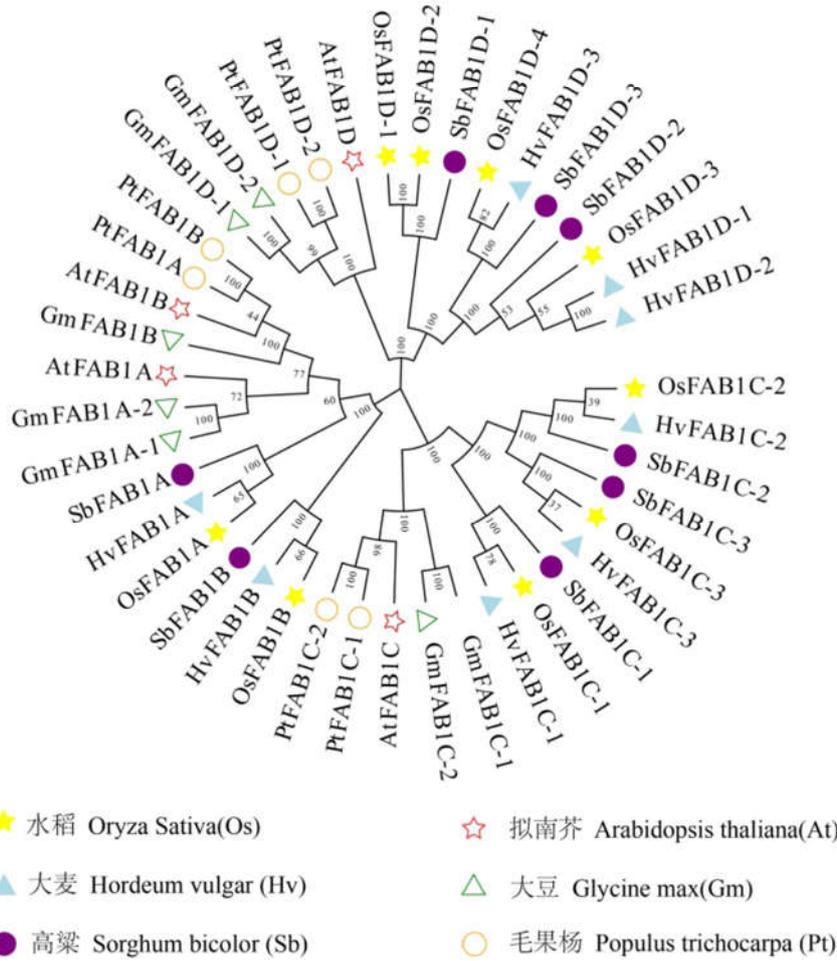


图 4 单、双子叶植物 FAB1 家族的系统进化分析
 Figure 4 Phylogenetic analysis of FAB1 family in mono- and dicotyledonous plants

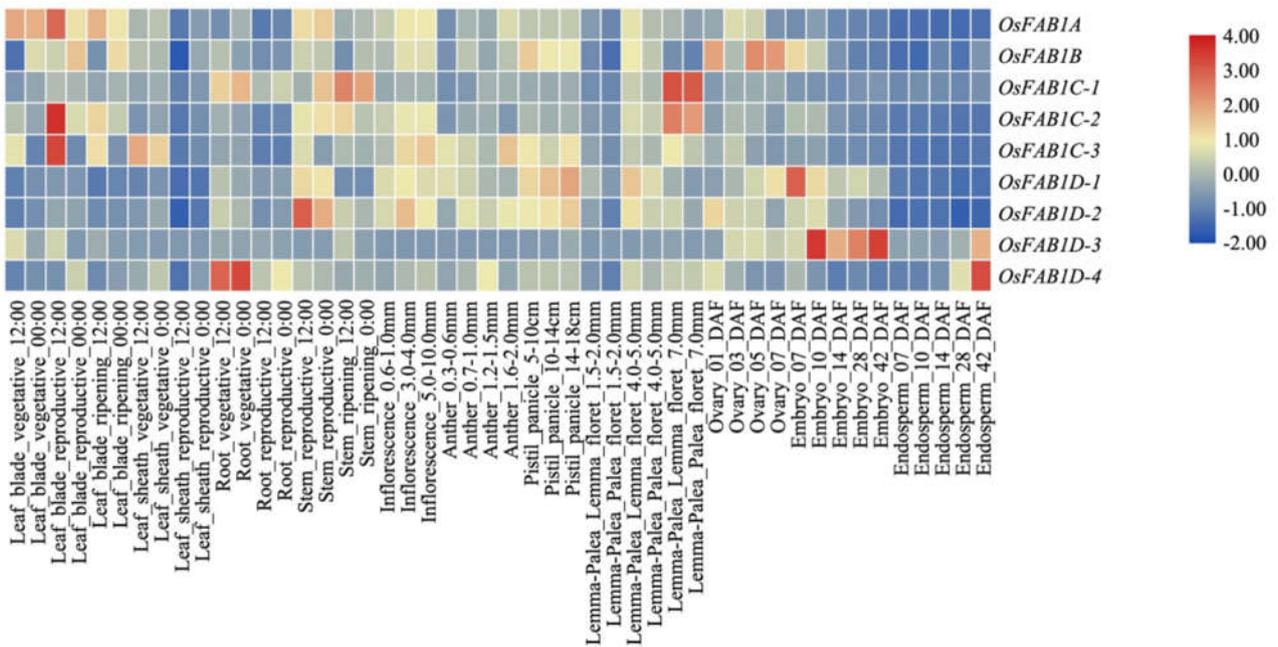


图 5 水稻 FAB1 基因在不同组织中的表达模式
 Figure 5 FAB1 gene expression profiles in different tissues

表 2 水稻 FAB1 基因家族启动子区的顺式作用元件

Table2 Cis-elements in the promoters of FAB1 gene family

顺式元件 Cis element	典型序列 Typical sequence	功能 Function	基因 Gene								
			a	b	c	d	e	f	g	h	i
TGA 元件 TGA element	AACGAC	生长素响应 Auxin- responsiveness	-	1	-	1	2	1	1	1	-
ABRE 元件 ABRE element	CGCACGTGTC, ACGTG, AACCCGG	脱落酸响应 Abscisic acid responsiveness	2	1	3	2	2	3	2	3	1
P 盒 P box	CCTTTTG	赤霉素响应 Gibberellin-responsive	1	-	1	1	-	1	-	1	-
TCA 元件 TCA element	CCATCTTTTT	水杨酸响应 Salicylic acid responsiveness	1	1	-	-	-	-	-	1	-
TGACG 基序 TGACG motif	TGACG	MeJA 响应 MeJA-responsiveness	-	-	3	5	4	3	3	-	3
CGTCA 基序 CGTCA motif	CGTCA	MeJA 响应 MeJA-responsiveness	-	-	3	5	4	3	3	-	3
Sp1 元件 Sp1 element	GGGCGG	光响应 Light responsiveness	3	1	-	-	3	1	-	-	1
盒 4 Box 4	ATTAAT	光响应 Light responsiveness	4	1	-	3	3	-	1	4	9
LTR 元件 LTR element	CCGAAA	低温胁迫响应 Low-temperature responsiveness	-	-	2	2	-	1	2	1	-
MBS 位点 MBS site	CAACTG	干旱诱导 Drought-inducibility	1	3	-	-	-	1	-	1	-
ARE 元件 ARE element	AAACCA	厌氧诱导 Anaerobic induction	2	4	3	3	3	3	5	1	-

注: a: OsFAB1A; b: OsFAB1B; c: OsFAB1C-1; d: OsFAB1C-2; e: OsFAB1C-3; f: OsFAB1D-1; g: OsFAB1D-2; h: OsFAB1D-3; i: OsFAB1D-4

Note: a: OsFAB1A; b: OsFAB1B; c: OsFAB1C-1; d: OsFAB1C-2; e: OsFAB1C-3; f: OsFAB1D-1; g: OsFAB1D-2; h: OsFAB1D-3; i: OsFAB1D-4

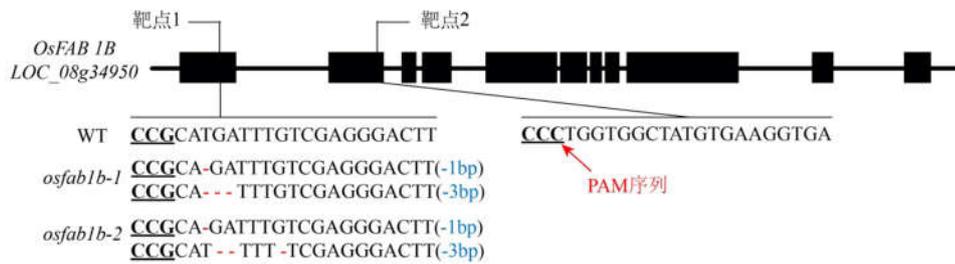
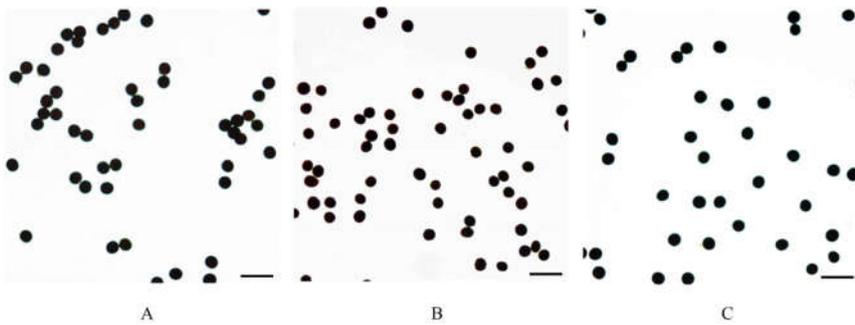
始密码子及 Cpn60_TCP1 保守结构域上设计两个靶点。对获得的转基因苗进行基因型鉴定,结果显示得到 2 种突变类型的 *osfab1b* 突变体(图 6)。*osfab1b-1* 和 *osfab1b-2* 为双等位突变体,其中 *osfab1b-1* 在+162 位置缺失一碱基 T,另一等位+162 位置连续缺失 3 bp; *osfab1b-2* 在+162 位置缺失一碱基 T,另一等位+163 位置缺失 2 bp,+168 位置缺失一碱基 G。上述突变类型均造成翻译在靶点 2 前终止或发生移码,故未对靶点 2 的突变类型进行分析。并且导致 Cpn60_TCP1 及 PIPKc 结构域的缺失,进而导致基因功能的完全丧失,为后续水稻 FAB1 家族的功能研究提供重要的遗传材料。

对 T0 代 CRISPR 转基因植株进行花粉育性评价,碘染结果显示 *osfab1b-1* 和 *osfab1b-2* 突变体的

花粉活力与野生型相比均无明显差异,表明水稻 FAB1 家族在花粉发育过程中可能存在功能冗余,单一基因的敲除无法导致生殖发育缺陷(图 7)。

2 讨论

PtdIns (3,5)P₂ 作为一类存在极微量的磷脂酰肌醇衍生物,其在真核细胞发育过程中具有的重要调控功能值得关注。FAB1/PIKfyve 激酶通过募集效应蛋白至液泡膜共同维持细胞内 PtdIns (3,5)P₂ 水平,并且参与调控多样的细胞发育过程(Balla, 2013)。然而单子叶模式植物水稻中 PtdIns (3,5)P₂ 的功能及 FAB1 激酶的作用机制尚待阐明。本研究从水稻基因组中鉴定出 9 个 FAB1 家族成员,其核酸长度、分子量、等电点等理化性质均存在一定差异。同时,OsFAB1A 和

图6 *osfab1b* CRISPR 靶点及突变类型分析Figure 6 *osfab1b* CRISPR targets and mutation type analysis图7 *osfab1b* 突变体花粉活力检测注: A: 野生型; B: *osfab1b-1*; C: *osfab1b-2*; 比例尺=100 μm Figure 7 Pollen vitality analysis of *osfab1b*Note: A: WT; B: *osfab1b-1*; C: *osfab1b-2*; Bars=100 μm

OsFAB1B 具有相似的基因结构,其余成员的外显子内含子排布模式差异较大。通过保守结构域分析发现,除*OsFAB1A* 和 *OsFAB1B* 与传统 FAB1/PIKfyve 家族蛋白相似具有 N 端 FYVE 结构域外,其余成员仅具有 Cpn60_TCP1 和 PIPKc 激酶结构域,这与 Mueller-Roeber 和 Pical (2002)对拟南芥 FAB1 蛋白的描述一致。此外,水稻中无 FYVE 结构域的 FAB1 蛋白截短形式数量明显多于双子叶植物拟南芥,表明在单子叶植物进化过程中 FAB1 蛋白形式更加多样化。

为进一步研究 FAB1 家族在单子叶和双子叶植物中的进化关系,本研究构建了包含水稻、大麦、高粱、拟南芥、大豆、毛果杨 6 个物种中 FAB1 家族基因的系统进化树。结果显示 FAB1 家族基因分别聚为 FAB1A/B、FAB1C 和 FAB1D 三个亚类,每个亚类中均有单子叶和双子叶植物成员分布,提示 FAB1 家族功能的保守性并且功能分化早于单、双子叶植物的分化。前人研究表明在进化上无 FYVE 结构域的 FAB1 蛋白截短形式为植物中特有(Whitley et al., 2009)。尽管 FYVE 结构域对于 FAB1 激酶识别并靶向结合其底物 PtdIns3P 至关重要,酵母中研究表明 FYVE 结构域并非 PtdIns (3,5)P₂ 合成所必需的(Botelho et al., 2008),因此推测这种截短形式可能参与不同于传统 FAB1 激酶的植物发育过程。

越来越多的证据表明 PtdIns (3,5)P₂ 可作为响应激素和胁迫的信号分子。当酵母细胞处于高渗透休克时, PtdIns (3,5) P₂ 水平即时升高 20 倍(Duex et al., 2006)。在盐胁迫条件下,烟草花粉管细胞体积减小,同时伴随着 PtdIns (3,5)P₂ 水平平均升高两倍(Zonia and Munnik, 2004)。PtdIns (3,5) P₂ 水平失调还影响脱落酸诱导的气孔关闭,暗示其在干旱胁迫中具有功能(Bak et al., 2013)。本研究对水稻 FAB1 家族基因的上游调控区域进行分析发现具有多种光响应元件、生长发育相关元件以及激素和胁迫响应顺式元件。值得注意的是,全部水稻 FAB1 家族基因的启动子区域都包含脱落酸响应元件 ABRE,推测水稻中也存在类似响应脱落酸的气孔关闭调控机制。

动态的液泡变化是水稻花粉发育过程中的一个重要特征。使用抑制剂(YM201636)降低 PtdIns (3,5)P₂ 水平会导致晚期内体和液泡形态维持异常(Hirano et al., 2017)。拟南芥 *fab1a/fab1b* 和 *vac14* 等 PtdIns (3,5)P₂ 代谢途径相关突变体中均发现花粉在第一次有丝分裂后液泡无法正常裂解,导致花粉败育。这种花粉败育被认为与 PtdIns (3,5)P₂ 水平降低导致的液泡膜表面极性运输及液泡酸化缺陷有关(Whitley et al., 2009; Zhang et al., 2018)。本研究中利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得 *osfab1b* 突变体,发现与野生型相比

osfab1b 突变体的花粉活力无明显缺陷。依据拟南芥中的研究, FAB1A/B 在花粉发育中存在功能冗余 (Whitley et al., 2009), 并且条件性同时敲除 FAB1A 和 FAB1B 时才会引发多种单突变体中未观察到的营养生长缺陷(Hirano et al., 2011)。由此推测单子叶植物中 FAB1A/B 的功能存在冗余, 需构建多突变体用于后续研究以明确 FAB1 家族在水稻生殖发育中是否具有功能。

3 材料与方 法

3.1 植物材料

野生型水稻(*Oryza sativa*)为武运粳 7 号(9522)品种, 2019 年 5 月 ~10 月种植于上海交通大学转基因试验基地。

3.2 主要试剂

KOD FX 高保真聚合酶购于东洋纺(上海)生物科技有限公司, *Taq* master mix 购于南京诺唯赞生物科技有限公司, *Fok* I 和 *Bsa* I 限制性内切酶购于 NEB 公司, T7 连接酶购于宝日医生物技术(北京)有限公司; 大肠杆菌感受态 DH5 α 为本实验室自制, 农杆菌感受态 EHA105 购于天根生物技术(北京)有限公司。载体 pRGEB32 和 pGTR 由 Xie 等(2015)提供。DNA 测序服务由上海派森诺基因公司提供。引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司提供。

3.3 水稻 FAB1 家族成员鉴定

在拟南芥 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)数据库获取 FAB1A-D 全长蛋白序列作为 query 序列, 分别于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)等公共数据库中进行 Blastp 比对, 获得水稻候选基因。在 Rice Genome Annotation Project (RGAP)数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)中下载水稻候选基因的蛋白序列, 并通过 CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对保守结构域进行预测(陈旭等, 2017), 确保候选基因中的蛋白序列同时具有 Cpn60_TCP1 及 PIPKc 激酶结构域。蛋白质分子量(kD)及等电点(pI)等理化性质使用 ProtParam 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测。

3.4 水稻 FAB1 家族的生物信息学分析

在 RGAP 数据库获取水稻 *FAB1* 基因的全长基因组序列和 CDS 序列, 使用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)工具绘制基因结构示意图。在 RGAP 数据库获取基因在染色体上的位置分布及水稻染色体长度等数据, 使用 MG2C (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)绘制染色体分布图。使用 CD-search 获取水稻 FAB1 蛋白保守结构域位置后通过 iTOL (<https://itol.embl.de/>)在线工具绘图。拟南芥和水稻 FAB1 蛋白多序列比对使用 DNAMAN 软件完成。从 Phytozome v12.1 数据库获取高粱、大麦、大豆、毛果杨的 FAB1 同源蛋白序列, 使用 MEGA7.0 邻接法(参数设置为 Possion model, Bootstrap 1000)完成系统进化树的构建, 并使用 EvolView (<https://www.evolgenius.info/evolview/>)在线工具进行编辑和注释。在 RGAP 数据库获取水稻 *FAB1* 基因 ATG 上游 2 kb 序列, 使用 Plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测顺式作用元件。

edu.cn/)工具绘制基因结构示意图。在 RGAP 数据库获取基因在染色体上的位置分布及水稻染色体长度等数据, 使用 MG2C (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)绘制染色体分布图。使用 CD-search 获取水稻 FAB1 蛋白保守结构域位置后通过 iTOL (<https://itol.embl.de/>)在线工具绘图。拟南芥和水稻 FAB1 蛋白多序列比对使用 DNAMAN 软件完成。从 Phytozome v12.1 数据库获取高粱、大麦、大豆、毛果杨的 FAB1 同源蛋白序列, 使用 MEGA7.0 邻接法(参数设置为 Possion model, Bootstrap 1000)完成系统进化树的构建, 并使用 EvolView (<https://www.evolgenius.info/evolview/>)在线工具进行编辑和注释。在 RGAP 数据库获取水稻 *FAB1* 基因 ATG 上游 2 kb 序列, 使用 Plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测顺式作用元件。

3.5 水稻 FAB1 家族的表达分析

水稻 *FAB1* 基因在不同组织中的表达数据来自 Rice X pro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>)数据库, 使用 TBtools 软件(Chen et al., 2020)完成热图的绘制。

3.6 *osfab1b* 突变体的获得和基因型鉴定

在 CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.cn/CRISPR2>)网站输入 *OsFAB1B* 的基因序列, 寻找合适的靶标。分别于靠近 5' 端起始密码子 ATG 及 Cpn60_TCP1 保守结构域附近选择脱靶概率较低的两个靶点。靶点序列为 PAM (Protospacer adjacent motif)序列及上游 20 个碱基(何先畅等, 2017)。根据 Xie 等(2015)中描述的方法, 在靶点序列两端分别加上接头。构建完成 CRISPR/Cas9 质粒后, 进行农杆菌转化及野生型水稻愈伤组织的侵染。提取转基因植株 DNA 作为模板, 对靶点 DNA 片段进行 PCR 扩增并测序, 测序结果通过在线工具 DSDecodeM (<http://dsdecode.scgene.com/home/>)进行解码分析, 完成基因型的鉴定。靶点及鉴定引物序列(表 3)。

3.7 *osfab1b* 突变体的花粉育性评价

将野生型和突变体的花药分别置于 I₂-KI 溶液(0.2%碘和 2%碘化钾)中, 使用医用镊子将其夹碎使花粉均匀释放, 在显微镜(Leica DM2500)下拍摄图片用于花粉育性的评价。

作者贡献

徐忆纯是本研究的实验设计和实验研究的执行

表 3 CRISPR 构建及鉴定引物

Table 3 CRISPR construction and genotyping primers

引物名称	正向引物	反向引物
Primer name	Forward primer	Reverse primer
OsFAB1B_Cri_T1	TAGGTCTCCCGACAAATCATG GTTTTAGAGCTAGAA	CGGGTCTCAGTCGAGGGACTT TGCACCAGCCGGG
OsFAB1B_Cri_T2	TAGGTCTCCACATAGCCACCA GTTTTAGAGCTAGAA	CGGGTCTCAATGTGAAGGTGA TGCACCAGCCGGG
OsFAB1B_GT	TGCCATCTGTGGTGATCTGA	TCGAACTGGACTTGTCGCTC

人；徐忆纯完成数据分析和论文初稿的写作；梁婉琪、王灿华和余婧是项目构思者及负责人，指导实验设计，数据分析和论文的写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家重点研发项目(2016YFD0100902)和国家自然科学基金(31700276)共同资助。

参考文献

- Bak G., Lee E.J., Lee Y., Kato M., Segami S., Sze H., Maeshima M., Hwang J.U., and Lee Y., 2013, Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, *Plant Cell*, 25(6): 2202-2216
- Balla T., 2013, Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation, *Physiol. Rev.*, 93(3): 1019-1137
- Botelho R.J., Efe J.A., Teis D., and Emr S.D., 2008, Assembly of a Fab1 phosphoinositide kinase signaling complex requires the Fig4 phosphoinositide phosphatase, *Mol. Biol. Cell*, 19(10): 4273-4286
- Chen C.J., Chen H., Zhang Y., Thomas H.R., Frank M.H., He Y. H., and Xia R., 2020, TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data, *Mol. Plant*, 13(8): 1194-1202
- Chen X., Shi L., Zhu L., Shi J.X., and Xu J., 2017, Molecular evolution characteristics and expression pattern analysis of the heat shock protein 70 (*HSP70*) gene superfamily in plant, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 36(10): 4282-4294 (陈旭, 石垒, 朱璐, 石建新, 许杰, 2017, 植物 HSP70 蛋白家族分子进化特征及其表达模式分析, *基因组学与应用生物学*, 36(10): 4282-4294)
- Duex J.E., Nau J.J., Kauffman E.J., and Weisman L.S., 2006, Phosphoinositide 5-phosphatase Fig 4p is required for both acute rise and subsequent fall in stress-induced phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate levels, *Eukaryot. Cell*, 5(4): 723-731
- Gary J.D., Wurmser A.E., Bonangelino C.J., Weisman L.S., and Emr S.D., 1998, Fab1p is essential for PtdIns (3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis, *J. Cell. Biol.*, 143(1): 65-79
- Gaullier J.M., Simonsen A., D'Arrigo A., Bremnes B., Stenmark H., and Aasland R., 1998, FYVE fingers bind PtdIns (3)P, *Nature*, 394(6692): 432-433
- He X.C., Huang G.Q., Wang D.Y., Chang S.W., and Zhang D.B., 2017, Generation of the mutations for *OsYUCCA1* in rice using CRISPR/Cas9 approach, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 36(11): 4778-4784 (何先畅, 黄国强, 王道洋, 常淑伟, 张大兵, 2017, 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术获得水稻 *OsYUCCA1* 基因突变体, *基因组学与应用生物学*, 36(11): 4778-4784)
- Hirano T., Munnik T., and Sato M.H., 2017, Inhibition of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate production has pleiotropic effects on various membrane trafficking routes in Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, 58(1): 120-129
- Hirano T., Matsuzawa T., Takegawa K., and Sato M.H., 2011, Loss-of-function and gain-of-function mutations in FAB1A/B impair endomembrane homeostasis, conferring pleiotropic developmental abnormalities in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 155(2): 797-807
- Ikonomov O.C., Sbrissa D., and Shisheva A., 2001, Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-Kinase PIKfyve, *Journal of Biological Chemistry*, 276(28): 26141-26147
- Michell R.H., Heath V.L., Lemmon M.A., and Dove S.K., 2006, Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions, *Trends Biochem. Sci.*, 31(1): 52-63
- Mueller-Roeber B., and Pical C., 2002, Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C, *Plant Physiol.*, 130(1): 22-46
- Serrazina S., Dias F.V., and Malhó R., 2014, Characterization of FAB1 phosphatidylinositol kinases in Arabidopsis pollen tube growth and fertilization, *New Phytologist*, 203(3): 784-793

- Takasuga, S., and Sasaki, T., 2013, Phosphatidylinositol-3,5-bis-phosphate: metabolism and physiological functions, *J. Biochem.*, 154(3): 211-218
- Whitley P., Hinz S., and Doughty J., 2009, Arabidopsis FAB1/PIKfyve proteins are essential for development of viable pollen, *Plant Physiol.*, 151(4): 1812-1822
- Xie K., Minkenberg B., and Yang Y., 2015, Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(11): 3570-3575
- Zhang W.T., Li E., Guo Y.K., Yu S.X., Wan Z.Y., Ma T., Li S., Hirano T., Sato M.H., and Zhang Y., 2018, Arabidopsis VAC14 is critical for pollen development through mediating vacuolar organization, *Plant Physiol.*, 177(4): 1529-1538
- Zonia L., and Munnik T., 2004, Osmotically induced cell swelling versus cell shrinking elicits specific changes in phospholipid signals in tobacco pollen tubes, *Plant Physiol.*, 134(2): 813-823