过氧化氢抑制蓝光诱导的 14-3-3 蛋白与向光素的结合

张 晓 岛崎研一郎

(河南大学生命科学学院, 植物逆境生物学重点实验室, 开封 475001; 九州大学理学院, 分子及细胞生物学实验室, 福岡 810-8560, 日本. E-mail: xzhang@371.net)

向光素(phototropins)是继光敏色素(phytochromes)^[1,2]、隐花色素(cryptochromes)^[3,4]之后发现的一种蓝光受体. 该受体蛋白含有 2 个重要的功能区: () 具有能与 FMN 结合的位于 N 端的 2 个 LOV(light, oxygen, voltage), 即 LOV1 和 LOV2, 该功能区与对光照、氧气及电压差敏感的一大类蛋白在序列上相似^[5]; () 位于 C 末端的 Ser/Thr 蛋白激酶区域^[6]. 目前, 愈来愈多的研究表明, 向光素在植物气孔开放^[7]、向光性反应^[6,8]、叶绿体移动反应^[9,10]和弱光下植物生长^[11]等过程中起重要的调节作用. 向光素作为一个自身磷酸化的 Ser/Thr 蛋白激酶受体, 可被蓝光诱导磷酸化, 继而和 14-3-3 蛋白结合, 启动一系列蓝光介导的信号转导过程^[12]. 但其具体的信号转导细节及调节机制还很不清楚.

过氧化氢(H_2O_2)作为信号分子介导了植物细胞多种生理代谢过程^[13-15]. 事实上, H_2O_2 等逆境信号常常是植物在多种胁迫条件下产生的, 而这些胁迫的发生又通常是在白天进行的. 因此, 综合研究 H_2O_2 和蓝光信号转导之间的交联可能给人们深入了解植物的逆境适应特性提供更多的信息. 我们初步的研究已表明, H_2O_2 可使保卫细胞蓝光激活的质膜 H^+ -ATPase 脱磷酸化, 降低其与 14-3-3 蛋白的结合能力, 从而抑制蓝光信号转导途径^[16]. 但到目前为止, H_2O_2 抑制蓝光信号转导的机制及其作用位点的研究还未见报道. 本文以蚕豆保卫细胞和黄化幼苗为材料, 利用 Far-western blot 和 Western blot 等方法对上述未知的问题进行了研究.

用 $600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的红光为背景处理蚕豆保卫细胞原生质体悬浮液 40 min, 然后用 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的蓝光处理该悬浮液 30 s, H_2O_2 在蓝光处理前 30 min 加入, 蓝光开始处理后 1 min 用细胞破碎缓冲液立即终止其反应, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移到硝酸纤维素薄膜(PVDF)上, 分别用 GST-14-3-3 融合蛋白和向光素的多克隆抗体进行 Far-western blot 和 Western blot 分析, 具体方法见文献^[12]. 结果显示, 1 mmol/L 的 H_2O_2 可降低蓝光诱导的

14-3-3 蛋白和向光素的结合水平(图 1(a)和(c)), 但对向光素的含量并没有影响(图 1(b)). Western blot 分析还显示蓝光可诱导向光素蛋白条带向上偏移, 表明 14-3-3 蛋白的结合可能依赖于向光素的磷酸化^[12,17]. 结合以前的工作^[16], 我们认为, H_2O_2 抑制保卫细胞蓝光诱导的 H^+ 泵可能是由于 H_2O_2 抑制向光素的磷酸化, 进而降低 14-3-3 蛋白与向光素的结合.

图1 H_2O_2 抑制蚕豆保卫细胞中蓝光诱导的 14-3-3 蛋白与向光素的结合

(a) GST-14-3-3 融合蛋白为探针的 Far-western blot 结果; (b) 向光素多克隆抗体的 Western blot 结果; (c) 蓝光依赖的 14-3-3 蛋白与向光素的相对结合量(平均值 $\pm$ 标准误差, $n=3$). 黑色箭头所示为向光素蛋白条带位置, RL 示红光, BL 示蓝光, 下同

为了证实上述的结论是否适用于蓝光介导的其他反应, 我们利用蚕豆黄化幼苗为材料分别在体内和体外研究了 H_2O_2 对蓝光诱导的 14-3-3 蛋白和向光素结合的影响. 在体内分析中, 将黄化幼苗切成小切段置入含有或不含 H_2O_2 的培养液(1/2 MS, pH 5.7)中

处理 30 min, 用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的蓝光处理 30 s, 迅速将蓝光处理过的黄化幼苗小切段转移到匀浆缓冲液中研磨, 具体微囊体蛋白的制备见文献[18](整个操作过程在暗中进行), 然后按上述方法进行蛋白分析. 与保卫细胞原生质体实验结果(图 1)类似, 5 mmol/L 的 H_2O_2 可明显抑制蓝光诱导的 14-3-3 蛋白与向光素的结合(图 2(a)和(c)), 但向光素的含量并没变化, 且发生了蓝光诱导的蛋白条带的偏移现象(图 2(b)).

图 2 H_2O_2 抑制蚕豆黄化幼苗中蓝光诱导的 14-3-3 蛋白与向光素的结合

(a) GST-14-3-3 融合蛋白为探针的 Far-western blot 结果; (b) 向光素多克隆抗体的 Western blot 结果; (c) 蓝光依赖的 14-3-3 蛋白与向光素的相对结合量(平均值 $\pm$ 标准误差, $n = 3$); DK, 黑暗

为进一步确定 H_2O_2 的这种抑制作用, 我们从黄化幼苗中提取微囊体蛋白进行体外分析实验. 将微囊体蛋白置于含有不同浓度的 H_2O_2 的磷酸化缓冲液 (37.5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 5.3 mmol/L MgSO_4 , 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 $\mu\text{mol/L}$ Leupeptin, 2% Triton X-100, 50 $\mu\text{mol/L}$ ATP) 中处理, 在所示的时间点用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的蓝光处理 30 s, 立即向样品中加入 SDS 溶化剂终止其反应. 与体内分析相比较, 尽管体外分析所显示的蓝光依赖的 14-3-3 蛋白与向光素的结合水平较低, 但 H_2O_2 仍能明显地抑制这种结合, 且这种抑制作用随 H_2O_2 处理时间延长(图 3, H_2O_2 浓度为 1 mmol/L) 或浓度增加(图 4, 处理时间均为 30

图 3 H_2O_2 抑制蓝光诱导的 14-3-3 蛋白与向光素结合的时间进程

(a) GST-14-3-3 融合蛋白为探针的 Far-western blot 结果; (b) 向光素多克隆抗体的 Western blot 结果; (c) 蓝光依赖的 14-3-3 蛋白与向光素的相对结合量(平均值 $\pm$ 标准误差, $n = 3$)

图 4 不同浓度的 H_2O_2 对蓝光诱导的 14-3-3 蛋白与向光素结合的影响

(a) GST-14-3-3 融合蛋白为探针的 Far-western blot 结果; (b) 向光素多克隆抗体的 Western blot 结果; (c) 蓝光依赖的 14-3-3 蛋白与向光素的相对结合量(平均值 $\pm$ 标准误差, $n = 3$)

min)而增强。

14-3-3 蛋白作为一种与磷酸丝氨酸结合的分子伴侣在植物生长发育和胁迫反应中起重要的作用^[19], 但其对蓝光受体向光素的调节研究才刚刚起步。我们研究结果表明, 逆境信号 H_2O_2 可降低 14-3-3 蛋白与向光素的结合水平, 从而抑制其下游的蓝光信号转导过程。这不仅使人们对 14-3-3 蛋白的调节功能有了新的了解, 而且也加深人们对诸如干旱、强光等逆境条件下植物自身调节机制的认识。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30270689)、河南省杰出青年基金(批准号: 0312001600)和日本文部省科学基金(批准号: 13139202)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Quail P H, Boylan M T, Parks B M, et al. Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science*, 1995, 268: 675~680
- 2 Nagy F, Schafer E. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 329~355[DOI]
- 3 Cashmore A R, Jarillo J A, Wu Y J, et al. Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science*, 1999, 284: 760~765[DOI]
- 4 Lin C, Shalitin D. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 469~496[DOI]
- 5 Taylor B L, Zhulin I B. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63: 479~506
- 6 Huala E, Oeller P W, Liscum E, et al. *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 1997, 278: 2120~2123[DOI]
- 7 Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, et al. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 2001, 414: 656~660[DOI]
- 8 Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, et al. *Arabidopsis* nph1 and nph11: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6969~6974[DOI]
- 9 Jarillo J A, Gabrys H, Capel J, et al. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature*, 2001, 410: 952~954[DOI]
- 10 Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, et al. *Arabidopsis* NPL1: A phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science*, 2001, 291: 2138~2141[DOI]
- 11 Takemiya A, Inoue S, Doi M, et al. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell*, 2005, 17(4): 1120~1127[DOI]
- 12 Kinoshita T, Emi T, Tominaga M, et al. Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1453~1463[DOI]
- 13 Pei Z M, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 2000, 406: 731~734[DOI]
- 14 Zhang X, Zhang L, Dong F C, et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1438~1448[DOI]
- 15 Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 388~395[DOI]
- 16 Zhang X, Wang H B, Takemiya A, et al. Inhibition of blue light-dependent H^+ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4150~4158[DOI]
- 17 Knieb E, Salomon M, Rudiger W. Tissue-specific and subcellular localization of phototropin determined by immuno-blotting. *Planta*, 2004, 218: 843~851[DOI]
- 18 Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki K. Cytosolic concentration of Ca^{2+} regulates the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell*, 1995, 7: 1333~1342[DOI]
- 19 Roberts M R. 14-3-3 proteins find new partner in plant cell signaling. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 218~223[DOI]

(2004-12-27 收稿, 2005-03-31 收修改)