植物特有微丝结合蛋白研究进展

钱东, 向云*

兰州大学生命科学学院, 细胞活动与逆境适应教育部重点实验室, 兰州 730000

* 联系人, E-mail: xiangy@lzu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-17; 接受日期: 2017-05-25; 网络发表日期: 2017-08-11

国家自然科学基金(批准号: 31670180, 31470283)资助

摘要 微丝骨架存在于所有真核生物, 并且参与了诸多重要的细胞生物学过程和生理活动. 微丝骨架在不同的细胞类型和生物学过程中呈现出各自特异的结构和动态变化模式, 此过程由许多不同生化特性的微丝结合蛋白(ABPs)家族成员直接调控. 不同真核生物的肌动蛋白(actin)都具有较高的同源性和相似的调控过程, 但是由于动物和植物在某些特定的组织结构、生理特性等方面存在本质上的不同, 进而导致动植物的微丝动态调控机制存在一定差异. ABPs和actin存在共进化的关系, 由此许多动物和植物的ABPs也相应地产生了差异. 例如, 许多哺乳动物和酵母中保守的ABPs在植物基因组中不存在; 一系列植物特有的ABPs被相继发现; 部分哺乳动物中保守的ABPs成员或一些非ABPs在植物中也演化出了新的生化特性和微丝调控活性. 本文概述了目前已发现的植物特有ABPs及其生化特性和生理学功能, 归纳了植物中探究新ABPs的研究思路和方法, 并对未来植物微丝骨架的研究方向和可能的研究热点进行了展望.

关键词 微丝骨架, 微丝结合蛋白, 功能结构域, 植物特有, 调控机制

肌动蛋白(actin)在真核细胞中高度保守且普遍存在, 自1942年首次在脊椎动物的骨骼肌细胞中发现并命名肌动蛋白以来, 在其他物种中都发现了肌动蛋白的存在. 不同物种间肌动蛋白的氨基酸同源性高达70%左右, 并且有些细胞内actin的浓度甚至高达几百微摩尔^[1-3]. 微丝骨架参与了一系列重要的生物学过程, 如细胞分裂、细胞增殖、细胞极性建立、细胞运动、胞吞作用、囊泡运输等^[4,5].

细胞中的肌动蛋白以两种形式存在, 即单体肌动蛋白(global actin, G-actin)和丝状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin). G-actin是分子量约42 kD的球状蛋白质,

一般由374~377 aa组成^[1,6], F-actin是由单体肌动蛋白聚合形成的直径约7 nm的纤维状结构. 这两种形式的actin通过不断地聚合、解聚等过程可以发生相互转化, 使细胞中的微丝骨架处于一个高度动态的变化过程, 并且G-actin和F-actin之间的相互转换是微丝骨架行使功能的基础^[7]. 高等生物actin自发的聚合和解聚速度较慢, 细胞中微丝结构高度动态转化过程主要受许多不同功能类型的微丝结合蛋白(actin binding protein, ABP)家族成员调控, 它们通过封存、结合、成核、封端、剪切、解聚、成束、交联肌动蛋白或微丝等作用参与形成和维持不同形态的微丝骨架^[8]. 此外, 一

引用格式: 钱东, 向云. 植物特有微丝结合蛋白研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 829-838

Qian D, Xiang Y. Novel actin-binding-proteins in plants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 829-838, doi: [10.1360/N052017-00022](https://doi.org/10.1360/N052017-00022)

些ABPs的活性受许多上游信号的调控,如pH、钙离子、磷酸化等,它们可能作为信号分子的功能感受者和执行者,使得微丝骨架系统参与了许多非常重要的生理活动和信号转导过程^[9]。

虽然真核生物actin在各物种中高度保守,且具有较高的同源性和相似的调控过程,但是动物和植物在某些特化的组织结构、生理特性等方面存在本质上的不同,进而导致动植物的微丝动态调控机制存在差异。例如,植物细胞中的actin主要以G-actin的形式存在,F-actin的含量少于10%,而在动物与酵母细胞中,肌动蛋白大多以F-actin的形式存在,这可能是由于植物本身固着的特性,需要更有效地动态调控过程去适应环境变化^[2,3],由此植物基因组缺失了许多哺乳动物中具有微丝束化功能的ABPs^[4]。此外,动物细胞中存在着一类由微丝束为主要成分的独特组织结构和细胞类型:微绒毛、应力纤维、丝状伪足、神经细胞生长锥和血细胞等,微丝束或者微丝索等高级结构的微丝骨架在维持它们正常的细胞结构和生长发育过程中起着决定性的作用^[4,10],例如,微绒毛和应力纤维的微丝束可以增强细胞的机械强度^[11],果蝇(*Drosophila*)感应刚毛(sensory bristle)中的微丝通过至少两种微丝交联蛋白束化微丝,进一步促使短的微丝束头尾连接形成非常长的微丝束(最长可达几百微米而普通微丝束只有几个微米)^[12],在植物细胞中,不同类型细胞的微丝骨架基本上都是均匀分布的,不存在动物中的这些独特组织结构和细胞类型,进而哺乳动物中的这些束化微丝的ABPs也可能在植物细胞中丢失^[4]。此外,植物中也存在很多独特的组织结构和细胞器,如气孔、细胞壁、叶绿体和大液泡等,与此同时植物也进化出特化细胞所对应的ABPs,例如,参与调节气孔闭合的SCAB1^[13]和叶绿体运动的THRUMIN1都是植物所特有的^[14]。

微丝骨架相关研究一直是细胞生物学领域的热点和重点之一,目前已有超过100种不同功能类型的微丝结合蛋白被不同程度地鉴定和报道,同时参与形成和维持微丝骨架精准结构和高度动态的微丝结合蛋白在动物和植物中存在较大的差异。尤其是近年来,一系列植物特有及新功能化的ABPs被相继发现。本综述按照发现的时间先后顺序阐述了近期植物特有ABPs的研究进展。

1 植物特有的微丝结合蛋白家族

1.1 SCAB1

气孔闭合相关微丝结合蛋白(stomatal closure-related actin binding protein 1, SCAB1)是新发现的一个植物特有微丝结合蛋白家族^[13]。Zhao等人^[13]在筛选拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)抗旱T-DNA插入突变体库的过程中发现,SCAB1功能缺失突变体(*scab1*)表现出较快的失水和较大的气孔开度表型。进一步研究表明,SCAB1在气孔保卫细胞特异表达,并且与气孔中的微丝共定位。体外生化实验证明,SCAB1可以直接结合、束化和稳定微丝,同时SCAB1在植物细胞中与微丝共定位并且具有稳定微丝的作用。在*scab1*植株气孔中,微丝和微丝束的含量均低于野生型,表明SCAB1主要通过调控微丝骨架重排介导气孔的关闭过程^[13]。随后,Zhang等人^[15]利用晶体学和生物化学方法发现SCAB1含有一个微丝结合结构域,两个CC(coiled-coil)卷曲螺旋结构域和一个Ig-PH(immunoglobulin-pleckstrin homology)融合结构域。SCAB1依赖其微丝结合结构域结合微丝。此外,SCAB1虽然只含有一个微丝结合结构域,但可以通过CC结构域形成二聚体,二聚体化的SCAB1同时结合两个actin,从而促使微丝成束^[15]。最近,同一实验室还发现了此家族的另外一个成员-SCAB3在体内外具有结合、束化和稳定微丝的功能;*scab3*缺失突变体在远红光条件下胚轴生长速率显著慢于野生型,SCAB3参与了调控该过程中的微丝重排^[16]。

1.2 NET家族

膜和微丝之间的相互连接是许多亚细胞器定位、胞间通讯及膜运动等生理活动所必需的。在动物细胞中,许多蛋白在特化的位点作为微丝和膜的衔接蛋白,但是它们的同源蛋白在植物中大多都不存在^[17]。Deeks等人^[18]在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)表皮细胞瞬时转染拟南芥cDNA表达文库,并以此系统筛选那些具有膜和微丝状亚细胞定位的基因,并成功发现了一类植物特有的微丝交联蛋白超家族——NET(networked superfamily of actin-binding proteins)。拟南芥基因组含有13个该家族成员,并分为4个不同的亚家族NET1~4。NET家族成员都含有一个植物特异的微丝结合结构

域——NAB(NET actin-binding domain), NET通过NAB结合微丝, 从而在体内表现为与微丝共定位. 同时, NET通过其C端结合到不同的细胞器膜上, 参与许多细胞生物学过程. 例如, NET1A定位于质膜和胞间连丝, NET2A定位于质膜, NET3A定位于内质网和核膜, NET4A定位于液泡膜. NET1A与NET1B共同调控根细胞的伸长, 双突变体表现根长增长^[18]. 同一实验室的Wang等人^[19]发现, NET3C定位于微丝上, 并连接质膜和内质网, NET3B和NET3C双突变造成配子体发育致死.

1.3 CROLIN1

本实验室利用生物信息学方法在拟南芥基因组中检索到了一个含有微丝交联结构域的功能未知蛋白家族, 该家族成员含有1~2个预测的微丝交联结构域(actin cross-linking domain, InterPro:IPR008999), 由此将该家族命名为CROLIN(actin cross-linking protein)^[20]. 此结构域为一个重复的 β -发夹结构和6个反向串联的 β -三叶草结构, 已报道的动物微丝交联蛋白Fascin和来源于*Dictyostelium discoideum*的Hisactophilin都含有与此类似的蛋白高级结构, 其中Fascin含有4个串联的 β -三叶草结构^[21], Hisactophilin含有一个 β -三叶草结构^[22]. 虽然Fascin和Hisactophilin的交联结构域与拟南芥CROLIN1的交联结构域的氨基酸同源性分别只有16.26%和16.08%, 但是它们之间的蛋白质结构相似度高达98%. Jia等人^[20]发现, 在所有植物基因组中都存在着不同数量、同源性很高的CROLIN家族成员, 但是动物和酵母基因组中未发现其同源基因, 表明CROLIN是一种新的、植物特异的微丝交联蛋白家族. 该家族成员CROLIN1在体外具有结合、交联和稳定微丝的能力; 通过结构域截短研究证明含有此 β -三叶草保守结构域的截短蛋白具有交联微丝的能力; 虽然CROLIN1只含有一个 β -三叶草结构域, 但其可以形成多聚体, 并且通过多聚化的方式成束和交联微丝. 此外, CROLIN1特异在成熟花粉中表达, 其功能缺失突变体表现花粉萌发和生长对微丝解聚药物LatB(latrunculin)不敏感, 表明CROLIN1主要通过调控高级形态的微丝结构形成参与花粉萌发和花粉管的极性生长^[20].

1.4 GhCFE

Lv等人^[23]利用酵母双杂交系统筛选棉花(*Gossyp-*

ium spp.)纤维表达蛋白-GhCFE1A的互作蛋白时发现, GhCFE1A可以与棉花的肌动蛋白-GhACTa, b, 2和4互作, 并且GhCFE1A与微丝和内质网共定位. 高速共沉淀实验证明, GhCFE1A与兔骨骼肌actin结合, 该家族蛋白的N端和C端含有两个保守的未知功能结构域(domains of unknown function, DUFs): DUF4408和DUF761; 结构域截断实验证明, 这两个结构域是GhCFE1A与actin发生结合所必需的. 过表达GhCFE1A导致转基因植株的棉纤维在快速生长阶段的微丝含量显著降低, 表明GhCFE1A可能在棉花纤维细胞的起始和延伸过程中起着非常重要的作用^[23]. 该实验室最新的研究还发现, 过表达该家族的另外一个成员——GhCFE5D显著抑制了下胚轴细胞和根细胞的生长, 且过表达植株细胞中的微丝束含量减少, 大部分变为较细的微丝结构. 此外, GhCFE5A和5D与拟南芥actin2和8互作, 在烟草细胞的瞬时转染显示GhCFE5A和5D可以与微丝骨架共定位^[24]. 上述研究表明, GhCFE是一个新的微丝结合蛋白家族, 在特定植物细胞的生长过程中起着重要的作用.

2 “老蛋白新功能”

2.1 AtADF9和AtADF5

微丝解聚因子(actin depolymerization factor, ADF)是一类在所有真核生物中都非常保守的微丝结合蛋白家族, 该家族成员的蛋白质分子量较小, 一般约13~19 kD, 含有一个保守的ADF-H(actin-depolymerization factor homology)功能结构域^[25], ADFs可以分别结合G-actin和F-actin, 并且优先结合ADP形式的G-actin, 典型的ADF主要通过剪切和解聚微丝增加微丝的动态变化速率, 在调控细胞内微丝骨架动态变化和信号转导过程中都起着非常重要的作用^[26]. 植物中已报道的多个ADF均具有该家族保守的生化特性, 其活性在高pH时更强^[27~29]. 有趣的是, Tholl等人^[29]发现拟南芥ADF9完全丧失了该家族保守的剪切和解聚微丝的功能, 反而表现出束化微丝的能力, 并且可以拮抗ADF1造成的微丝解聚. ADF9束化微丝的功能也受pH调控, 但与典型的ADF相反, 低pH促进ADF9束化微丝活性. 目前, 有关ADF9束化微丝的生理学意义还不清楚^[29].

ADF和actin共进化, 它们在低等植物中都只有一

个编码基因,但在高等生物中ADFs的数量随着actin数量增加而增多,并且发生了组织分化,不同植物的ADFs基本上都可以分为4个亚家族^[30]。拟南芥基因组编码11个ADF家族成员,本实验室最近系统研究了拟南芥和部分其他植物ADFs的生化特性,并发现隶属植物ADF第三亚家族的ADFs(拟南芥ADF5和9)都表现为成束微丝的功能,而其他ADFs具有该家族保守的功能。通过祖先基因重塑、祖先基因生化特性鉴定、关键功能位点突变等一系列实验,本实验室证明了植物ADF家族成员都演化自同一个具有该家族保守剪切和解聚微丝功能的祖先基因;在高等植物基因组加倍、基因复制等演化过程中,第三亚家族成员由于内含子滑动发生了N端延伸,同时特定氨基酸也发生突变。通过蛋白结构分析,拟南芥ADF5在其N端可能形成了一个新的F-actin结合域,同时在其C端也存在一个该家族非常保守的微丝结合结构域,这些氨基酸数量和性质的改变导致植物ADFs在生化特性上发生了新功能化^[30]。

2.2 VABs

液泡ATP酶(H^+ -V-ATPase)B亚基(VAB)是V-ATP酶V₁催化复合体的重要组成部分,在V-ATPase的V₁亚复合体组装过程中,3个拷贝的A亚基和B亚基交替排列成柱状的异源六聚体,构成一个催化中心(A₃B₃),B亚基由3个结构域组成: N-末端 β 折叠桶结构域、中心 α/β 结构域和C-末端结构域^[31,32]。研究表明,哺乳动物和酵母的V-ATP酶B亚基都能结合微丝^[33,34]。真核生物VABs的N-末端含有一个保守的Profilin元件,其特征序列为保守的G49, L51, V52, D55和F59^[33,35],这些位点也是其他微丝结合蛋白与actin发生相互作用的关键位点,如cofilins, twinfilins和fimbrin等^[36]。本实验室通过生物化学方法研究证明,拟南芥V-ATP酶B亚基-AtVABs不仅可以结合微丝,还可以束化和稳定微丝,这与哺乳动物和酵母的B亚基完全不同^[37]。上述结果表明,植物VABs成束和稳定微丝的功能可能是在适应进化中演化出来的新功能,有关其生理学意义仍不清楚。

2.3 THRUMIN1

THRUMIN1隶属谷氧还蛋白类似蛋白家族(glutaredoxin-like family),该家族蛋白在动物和植物中均广泛存在,含有C末端保守的glutaredoxin-like结

构域和假定的结合锌离子的富含半胱氨酸结构域^[38]。Whippo等人^[14]在研究微丝重排影响叶绿体运动过程中发现,拟南芥该家族成员中命名为THRUMIN1的一个蛋白具有质膜和光调控的微丝共定位特质。在哺乳动物中该家族蛋白有GRXCR1,参与调控耳蜗静纤毛的发育,影响耳朵听觉,当该基因被敲除后,表现为较短的耳蜗静纤毛和耳聋^[39,40]。在拟南芥中,THRUMIN1的功能缺失突变体表现出蓝光诱导的叶绿体运动减慢。进一步体外生化研究证明,THRUMIN1在体外可以直接结合和束化微丝,是一个植物中新的微丝结合和成束蛋白。然而,哺乳动物中还未见该家族成员与微丝直接结合的报道^[14]。

2.4 SYP73

SYP73属于植物SNARE家族中SYP7亚家族,该亚家族中含有3个成员SYP71, 72和73^[41]。最近, Cao等人^[41]在研究微丝骨架调控的内质网流动性时发现, SYP73在植物细胞内具有类似微丝的丝网状定位,并且与微丝骨架和内质网都可以共定位,从而使内质网锚定在微丝骨架上,继而维持内质网的完整性和流动性。体外高速共沉淀分析表明, SYP73胞内结构域可以直接结合微丝,是一种新的微丝结合蛋白。SYP73功能缺失突变及微丝解聚药物Lat B药理学研究表明, SYP73在内质网完整性和流动性维持与微丝骨架系统结合这一过程中非常重要^[41]。

3 结合微管和微丝的“双功能蛋白”

3.1 KCH

驱动蛋白-Kinesin是一种机械化学酶,可以通过偶联和水解ATP改变蛋白构象,进而能够提供动力。Kinesin超家族都含有一个保守的大约350 aa的催化核心,这个催化核心包括ATP以及微管结合位点^[42]。Kinesin是一个超家族,基于保守的马达结构域的不同被分为不同的亚家族。拟南芥驱动蛋白共有61个成员并根据马达结构域所在的位置不同可以分为三大类: N端马达类驱动蛋白、C端马达类驱动蛋白和中间马达类驱动蛋白。其中归属中间马达类的kinesin-14亚家族是一组单独的分支,在其N端含有一个调宁蛋白同源结构域——CH(calponin homology)domain,以示与其他kinesin区别,被单独命名为KCH(kinesin with calponin

homology domain)^[42].

KCH亚家族在动物和真菌中未有发现,只存在于植物中,是植物所特有的一类驱动蛋白^[42]. 调宁蛋白是一个典型的微丝结合蛋白,一般是含有串联CH的蛋白才可以结合微丝,如fimbrin^[43]. 但是也有特例,某些含有单个的CH domain的GhKCH1也可以在体外结合微丝^[44]. 目前已有研究证明,棉花GhKCH1^[44]和GhKCH2^[45],水稻(*Oryza sativa*)OsKCH1^[46]和烟草NtKCH1^[47]都能与微丝和微管结合,并参与调控细胞的扩张和分裂,例如,OsKCH1功能缺失突变体表现胚芽鞘变短,进一步研究发现胚芽鞘中的细胞伸长受到抑制但细胞发生更多的分裂^[46].

3.2 KCBP

KCBP(kinesin-like calmodulin-binding protein)也是一种植物所特有的驱动蛋白,隶属驱动蛋白14亚家族^[48]. Lazzaro等人^[49]在研究欧洲云杉(*Picea abies*)花粉管极性生长中发现驱动蛋白PaKCBP不仅可以与微管结合还可以结合微丝,并且微丝的紊乱会促进PaKCBP与微管结合进而增强微管骨架稳定性. 生理学实验表明,在云杉花粉管生长中,PaKCBP可能感受Ca²⁺,并影响花粉管中微丝和微管的组织结构,进而调控液泡的再定位和囊泡运输速率,最终控制花粉管生长^[49]. 最近, Tian等人^[50]发现, KCBP通过其N端的MyTH4结构域结合微管,并利用FERM结构域结合微丝. 在表皮毛细胞发育过程中, KCBP在表皮细胞中分布呈现一定的梯度,且定位于周质微管上,但在表皮毛顶端特异地富集在“微管缺失区域”,暗示了KCBP的顶端富集可能与表皮毛顶端“微丝帽子”的组装与维持有关. 此外, *kcbp*功能缺失突变体的表皮毛只有两个分支,其中一个分支呈现长、尖的正常形态,但另一分支呈现一个短、钝的头;表皮毛在叶片上呈有规律的平行列队,尖、细的一头朝向叶片近轴端(proximal end),而短、钝的那一支朝向叶片远轴端(distal end). 上述研究结果揭示了KCBP作为一个“双功能蛋白”,协调微管与微丝的时空动态组织,从而调控表皮毛的形态建成^[50].

3.3 RIC1

RIC(ROP-interactive CRIB motif containing protein)是植物Rho GTPases ROP(Rho-related GTPase

from plants)下游的效应因子,具有一个保守的CRIB(Cdc42/Rac-interactive binding)结构域,拟南芥基因组含有11个该家族成员^[51]. Zhou等人^[52]发现, RIC1具有Ca²⁺依赖切割微丝和微丝正端加帽的功能; RIC1功能缺失导致了较快的花粉管增长,而RIC1过表达则抑制了花粉管生长. 进一步研究证明, RIC1特异定位于花粉管顶端质膜, RIC1依赖于Ca²⁺行使微丝切割的功能并作用于花粉管顶端区域的微丝,从而调节花粉管的伸长. Lin等人^[53]发现, ROP6-RIC1参与稳定根细胞中的微丝骨架并影响PIN2的内吞过程,在植物根中生长素的信号转导过程中起着非常重要的作用. 此外, RIC1也是一微管结合蛋白,可以增强katanin对微管的切割活性,促进细胞内微管的重新组装^[54]. 上述研究结果表明, RIC1通过调控特定组织中微丝或微管的组织动态,参与调控了不同类型植物细胞的生长过程.

3.4 MAP18

MAP18(microtubule-associated protein 18)是一个DREPP家族的微管结合蛋白,可以使微管去稳定,调控拟南芥细胞的各向异性生长^[55]. 最近, Zhu等人^[56]发现, MAP18在体外具有Ca²⁺依赖的微丝切割活性,是一个新的植物微丝结合蛋白,并且MAP18的前两个V-E-E-K-K基序对于其切割活性十分重要. MAP18功能缺失突变体具有较宽的花粉管和异常的花粉管生长方向,并且由于花粉管生长方向异常导致不能正常进入胚珠受精,最终致使结实率降低. 进一步通过MAP18过表达点突变蛋白证明, MAP18通过其Ca²⁺依赖的微丝切割活性来调控花粉管顶端及亚顶端微丝的动态,进而控制花粉管的生长方向^[56].

3.5 MDP25

拟南芥微管去稳定蛋白25(microtubule-destabilizing protein 25, MDP25)也被称为质膜阳离子结合蛋白1(plasma membrane-associated cation binding protein 1, PCaP1),能够结合Ca²⁺, Mg²⁺等金属阳离子^[57]. MDP25与MAP18一样,同属于DREPP家族的微管结合蛋白,并且通过Ca²⁺依赖的去稳定微管调控下胚轴生长^[58]. 近来, Qin等人^[59]研究发现, MDP25具有Ca²⁺依赖的微丝结合和剪切活性,功能缺失促进花粉管生长. 亚细胞定位分析表明, MDP25的亚细胞定位受到Ca²⁺调控,即低浓度的Ca²⁺时, MDP25定位于花粉管顶端质膜上,

高浓度 Ca^{2+} 促使MDP25从质膜上解离到胞质中。此外,当MDP25 N端第5位的Asn突变为Ala时,显著降低了MDP25的微丝切割活性,表明Asn对于MDP25的微丝切割活性十分重要^[59]。

4 鉴定植物特有ABPs的方法

4.1 基于保守的微丝结合功能域和结构预测

肌动蛋白在真核生物中非常保守,这也决定了大多数ABPs的微丝结合结构域也非常保守。因此,学者们在拟南芥、百合(*Lilium brownii*)花粉和烟草等植物中鉴定了一系列哺乳动物中保守的微丝结合蛋白,如Villin^[60],formin^[61],LIM^[62]和Fimbrin^[63]等。随后,通过改进的结构比对方法,学者们又发现了一些通过简单的结构域比对不能发现的ABPs。例如,哺乳动物中许多含有coiled-coil domain(双螺旋结构域)的蛋白都是细胞骨架结合蛋白,包括中间纤维结合蛋白、微丝结合蛋白和微管结合蛋白^[64]。免疫学证据表明,许多细胞骨架结合蛋白,如lamins,keratins和tropomyosins可能在拟南芥中存在。Gardiner等人^[65]利用改进的PROSEARCH algorithm方法在拟南芥中预测了许多微丝结合蛋白。尽管这些预测的微丝结合蛋白还需要实验进一步验证,但是这也为研究者在植物中探索新的ABPs提供了新思路。

4.2 基于具有微丝类结构的亚细胞定位

一般来讲,那些结合和形成高级结构的微丝结合蛋白在活体细胞内可能会呈现出丝束状的亚细胞定位。基于此特性,一些学者们在哺乳动物细胞或者植物表皮细胞中筛选和观察了拟南芥cDNA表达文库的表达结果。例如,Abu-Abied等人^[66]将黄色荧光蛋白融合的拟南芥cDNA表达文库转染大鼠(*Rattus norvegicus*)成纤维细胞,利用高通量的荧光显微镜筛选具有细胞骨架类似结构的克隆,随后进一步分离和验证这些目的基因。Abu-Abied等人^[66]通过该方法发现脱水蛋白家族成员ERD10定位于大鼠成纤维细胞中的肌动蛋白应力丝,进一步利用一系列生化方法在体外证明ERD10可以直接与微丝结合,并且ERD10在体内可以保护微丝免受微丝解聚药物latrunculin B的解聚,起到稳定微丝的作用。最近,Deeks等人^[18]通过在烟草中筛选拟南芥

cDNA-GFP表达文库(*Arabidopsis thaliana* cDNA green fluorescent protein(GFP)-fusion expression library),获得一个新的、植物所特有的微丝结合蛋白家族-NET家族^[18]。由于此方法是在植物活体细胞内筛选,假阳性较低,并且可以筛选得到许多植物所特有的微丝结合蛋白。此类研究可以在植物体内高通量鉴定那些具有微丝状亚细胞定位的新ABPs。

4.3 基于酵母双杂交筛选

酵母双杂交是研究和鉴定蛋白质相互作用的一个非常有效的方法,同样也可以被用于筛选那些可以结合actin的ABPs。例如,Lv等人^[23]利用缺失N端信号肽的棉花GhCFE1A进行酵母双杂交筛选时发现,GhCFE1A可以与棉花的actin——GhACTa, b, 2和4互作,并进一步通过高速共沉淀和共定位分析证明,GhCFE1A是一个新的微丝结合蛋白。该研究结果为鉴定植物特有ABPs提供了一种新的方法。

4.4 基于亲和层析

肌动蛋白的subdomain I能够特异地结合DNase I,而这个结合位点并不影响其与ABPs相互结合。基于此生化特性,学者们制备了DNase I -Sepharose亲和层析柱,尝试从不同组织的植物总蛋白中纯化ABPs,并且成功纯化到了多个植物ABPs。例如,利用该方法在百合花粉中分别发现了ABP-115^[60],ABP-135^[67],ABP80^[68],LdABP41^[69]和LIABP29^[70]等。上述研究为在植物中通过生物化学方法鉴定新的ABPs提供了有效的途径。

4.5 基于微丝解聚药物筛选

微丝解聚药物LatB是一个非常有效的微丝解聚药物,其以1:1的摩尔比结合单体actin,进而阻碍微丝聚合,扰乱微丝骨架动态。Sparks等人^[71]基于根长通过正向遗传学筛选得到一系列对LatB不同敏感的突变体,其中鉴定得到一突变体对LatB超敏感并且表现出根短表型-*hbl1*(hypersensitive to latrunculin b1)。体内研究发现,HLB1蛋白沿微丝排布,并且*hbl1*突变体中微丝对LatB更敏感。以上结果表明,HLB1可能是一个新的植物微丝结合蛋白^[71]。该研究为在植物中通过微丝药理学结合遗传学的方法鉴定新ABPs开创了全新的研究思路。

5 展望

近年来, 植物微丝骨架的研究取得长足进展, 一系列植物特有的微丝结合蛋白被相继发现(表1). 并且, 随着显微成像技术的日新月异, 学者们对于ABPs调控微丝骨架的动态有了更深入的认识, 如全内反射显微镜和旋转盘共聚焦显微镜的应用, 可以更加直观地在体内和体外观察微丝的动态变化, 测定并定量分析其动态变化参数^[72,73]. 另一方面, 微丝结合蛋白如何响应植物生长信号及环境信号还知之甚少. 可喜的是, 已有一些研究发现揭示微丝结合蛋白如何响应上游信号. 例如, Zhao等人^[74]最近发现, 拟南芥

ADF4通过调控保卫细胞内微丝的动态来介导气孔的运动, 并且ADF4受到上游响应ABA信号的一个酪蛋白激酶-CKL2(casein kinase 1-like protein 2)磷酸化调控. 另一方面微丝结合蛋白调控的微丝骨架动态如何影响植物的生长发育, 例如, Wu等人^[75]发现, 水稻的OsVLN2调控微丝的动态, 进而影响生长素的分布, 最终调控的植物的形态结构发育. 为了更深入认知微丝骨架调控植物生长发育和环境响应, 未来结合高分辨率活细胞动态成像技术并综合生物化学、细胞生物学、遗传学和分子生物学等学科的方法, 有针对性地解决上述两个方面的科学问题也许将是植物微丝骨架领域的研究热点.

表1 植物特有微丝结合蛋白概述(按首字母顺序排列)

名称	来源	家族成员数	结合微丝	结合微管	调节因子	功能域	参考文献
AtADF5/9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	11	是	未知	pH	ADF-H和F-loop	[29,30]
CROLIN1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6	是	未知	未知	N33-165AA	[20]
GhCFE	<i>Gossypium hirsutum</i>	8	是	未知	未知	DUF4408和DUF761	[23,24]
KCBP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	是	是	Ca ²⁺	MyTH4-FERM domain	[50]
MAP18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	是	是	Ca ²⁺	VEEKK motifs	[53]
MDP25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	是	是	Ca ²⁺ PIP3	N1-23	[56]
NET	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13	是	否	未知	NAB	[18,19]
OsKCH1	<i>Oryza sativa</i>	7	是	是	未知	CH domain	[46]
RIC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	11	是	是	Ca ²⁺	ND	[49]
SCAB1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3	是	否	Ca ²⁺	NT5(54-148AA)	[13]
SYP73	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3	是	未知	未知	未知	[41]
THRU-MIN1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15	是	未知	未知	未知	[14]
VABs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3	是	未知	未知	profilin-like motif	[31]

参考文献

- 1 Lees-Miller J P, Henry G, Helfman D M. Identification of act2, an essential gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that encodes a protein related to actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 80–83
- 2 Gibbon B C, Kovar D R, Staiger C J. Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell*, 1999, 11: 2349–2364
- 3 Snowman B N, Kovar D R, Shevchenko G, et al. Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell*, 2002, 14: 2613–2626
- 4 Thomas C, Tholl S, Moes D, et al. Actin bundling in plants. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009, 66: 940–957
- 5 Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, et al. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, 2014, 94: 235–263

- 6 Elzinga M, Collins J H, Kuehl W M, et al. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 2687–2691
- 7 Dominguez R. Actin-binding proteins—a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29: 572–578
- 8 Staiger C J. Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 257–288
- 9 Li J, Blanchoin L, Staiger C J. Signaling to actin stochastic dynamics. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66: 415–440
- 10 Bartles J R. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 72–78
- 11 Tseng Y, Kole T P, Lee J S, et al. How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 33: 183–192
- 12 Tilney L G, Connelly P, Smith S, et al. F-actin bundles in *Drosophila bristles* are assembled from modules composed of short filaments. *J Cell Biol*, 1996, 135: 1291–1308
- 13 Zhao Y, Zhao S, Mao T, et al. The plant-specific actin binding protein SCAB1 stabilizes actin filaments and regulates stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 2314–2330
- 14 Whippo C W, Khurana P, Davis P A, et al. THRUMIN1 is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Curr Biol*, 2011, 21: 59–64
- 15 Zhang W, Zhao Y, Guo Y, et al. Plant actin-binding protein SCAB1 is dimeric actin cross-linker with atypical pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*, 2012, 287: 11981–11990
- 16 Wang C, Zheng Y, Zhao Y, et al. SCAB3 is required for reorganization of actin filaments during light quality changes. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 161–168
- 17 Hussey P J, Ketelaar T, Deeks M J. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 109–125
- 18 Deeks M J, Calcutt J R, Ingle E K S, et al. A superfamily of actin-binding proteins at the actin-membrane nexus of higher plants. *Curr Biol*, 2012, 22: 1595–1600
- 19 Wang P, Hawkins T J, Richardson C, et al. The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Curr Biol*, 2014, 24: 1397–1405
- 20 Jia H, Li J, Zhu J, et al. *Arabidopsis* CROLIN1, a novel plant actin-binding protein, functions in cross-linking and stabilizing actin filaments. *J Biol Chem*, 2013, 288: 32277–32288
- 21 Jawhari A U, Buda A, Jenkins M, et al. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation *in vitro*. *Am J Pathol*, 2003, 162: 69–80
- 22 Liu C, Gaspar J A, Wong H J, et al. Conserved and nonconserved features of the folding pathway of hisactophilin, a β -trefoil protein. *Protein Sci*, 2002, 11: 669–679
- 23 Lv F, Wang H, Wang X, et al. GhCFE1A, a dynamic linker between the ER network and actin cytoskeleton, plays an important role in cotton fibre cell initiation and elongation. *J Exp Bot*, 2015, 66: 1877–1889
- 24 Lv F, Li P, Zhang R, et al. Functional divergence of GhCFE5 homoeologs revealed in cotton fiber and *Arabidopsis* root cell development. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 867–881
- 25 Andrianantoandro E, Pollard T D. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Plant*, 2006, 24: 13–23
- 26 Bamberg J R, Bernstein B W. ADF/cofilin. *Curr Biol*, 2008, 18: R273–R275
- 27 Gungabissoon R A, Jiang C J, Drøbak B K, et al. Interaction of maize actin-depolymerising factor with actin and phosphoinositides and its inhibition of plant phospholipase C. *Plant J*, 1998, 16: 689–696
- 28 Allwood E G, Anthony R G, Smertenko A P, et al. Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LIADF1. *Plant Cell*, 2002, 14: 2915–2927
- 29 Tholl S, Moreau F, Hoffmann C, et al. *Arabidopsis* actin-depolymerizing factors (ADFs) 1 and 9 display antagonist activities. *FEBS Lett*, 2011, 585: 1821–1827
- 30 Nan Q, Qian D, Niu Y, et al. Plant actin-depolymerizing factors possess opposing biochemical properties arising from key amino acid changes throughout evolution. *Plant Cell*, 2017, 29: 395–408
- 31 Maher M J, Akimoto S, Iwata M, et al. Crystal structure of A3B3 complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J*, 2009, 28: 3771–3779
- 32 Ma B, Xiang Y, An L. Structural bases of physiological functions and roles of the vacuolar H^+ -ATPase. *Cell Signal*, 2011, 23: 1244–1256
- 33 Holliday L S, Lu M, Lee B S, et al. The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H^+ -ATPase contains a filamentous actin binding site. *J Biol Chem*, 2000, 275: 32331–32337

- 34 Holliday L S, Bubb M R, Jiang J, et al. Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J Bioenerg Biomembr*, 2005, 37: 419–423
- 35 Chen S H, Bubb M R, Yarmola E G, et al. Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments. *J Biol Chem*, 2004, 279: 7988–7998
- 36 Vitavska O, Merzendorfer H, Wiczorek H. The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *J Biol Chem*, 2005, 280: 1070–1076
- 37 Ma B, Qian D, Nan Q, et al. *Arabidopsis* vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) B subunits are involved in actin cytoskeleton remodeling via binding to, bundling, and stabilizing F-actin. *J Biol Chem*, 2012, 287: 19008–19017
- 38 Navrot N, Gelhaye E, Jacquot J P, et al. Identification of a new family of plant proteins loosely related to glutaredoxins with four CxxC motives. *Photosynth Res*, 2006, 89: 71–79
- 39 Odeh H, Hunker K L, Belyantseva I A, et al. Mutations in Grxcr1 are the basis for inner ear dysfunction in the pirouette mouse. *Am J Hum Genet*, 2010, 86: 148–160
- 40 Beyer L A, Odeh H, Probst F J, et al. Hair cells in the inner ear of the pirouette and shaker 2 mutant mice. *J Neurocytol*, 2000, 29: 227–240
- 41 Cao P F, Renna L, Stefano G, et al. SYP73 Anchors the ER to the actin cytoskeleton for maintenance of ER integrity and streaming in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2016, 23: 3245–3254
- 42 Richardson D N, Simmons M P, Reddy A S N. Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics*, 2006, 7: 18
- 43 Gimona M, Djinić-Carugo K, Kranewitter W J, et al. Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett*, 2002, 513: 98–106
- 44 Preuss M L, Kovar D R, Lee Y R J, et al. A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiol*, 2004, 136: 3945–3955
- 45 Xu T, Qu Z, Yang X, et al. A cotton kinesin GhKCH2 interacts with both microtubules and microfilaments. *Biochem J*, 2009, 421: 171–180
- 46 Frey N, Klotz J, Nick P. Dynamic bridges—a calponin-domain kinesin from rice links actin filaments and microtubules in both cycling and non-cycling cells. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 1493–1506
- 47 Klotz J, Nick P. A novel actin-microtubule cross-linking kinesin, NtKCH, functions in cell expansion and division. *New Phytol*, 2012, 193: 576–589
- 48 Preuss M L, Delmer D P, Liu B. The cotton kinesin-like calmodulin-binding protein associates with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiol*, 2003, 132: 154–160
- 49 Lazzaro M D, Marom E Y, Reddy A S N. Polarized cell growth, organelle motility, and cytoskeletal organization in conifer pollen tube tips are regulated by KCBP, the calmodulin-binding kinesin. *Planta*, 2013, 238: 587–597
- 50 Tian J, Han L, Feng Z, et al. Orchestration of microtubules and the actin cytoskeleton in trichome cell shape determination by a plant-unique kinesin. *eLife*, 2015, 4: e09351
- 51 Wu G, Gu Y, Li S, et al. A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell*, 2001, 13: 2841–2856
- 52 Zhou Z, Shi H, Chen B, et al. *Arabidopsis* RIC1 severs actin filaments at the apex to regulate pollen tube growth. *Plant Cell*, 2015, 27: 1140–1161
- 53 Lin D, Nagawa S, Chen J, et al. A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in *Arabidopsis* roots. *Curr Biol*, 2012, 22: 1319–1325
- 54 Lin D, Cao L, Zhou Z, et al. Rho GTPase signaling activates microtubule severing to promote microtubule ordering in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2013, 23: 290–297
- 55 Wang X, Zhu L, Liu B, et al. *Arabidopsis* MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell*, 2007, 19: 877–889
- 56 Zhu L, Zhang Y, Kang E, et al. MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in *Arabidopsis* by modulating F-actin organization. *Plant Cell*, 2013, 25: 851–867
- 57 Ide Y, Nagasaki N, Tomioka R, et al. Molecular properties of a novel, hydrophilic cation-binding protein associated with the plasma membrane. *J Exp Bot*, 2007, 58: 1173–1183
- 58 Li J, Wang X, Qin T, et al. MDP25, a novel calcium regulatory protein, mediates hypocotyl cell elongation by destabilizing cortical microtubules in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 4411–4427
- 59 Qin T, Liu X, Li J, et al. *Arabidopsis* microtubule-destabilizing protein 25 functions in pollen tube growth by severing actin filaments. *Plant Cell*, 2014, 26: 325–339
- 60 Nakayasu T, Yokota E, Shimmen T. Purification of an actin-binding protein composed of 115-kDa polypeptide from pollen tubes of lily. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249: 61–65

- 61 Cvrckova F. Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biol*, 2000, 1: 1–7
- 62 Weiskirchen R, Günther K. The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting. *Bioessays*, 2003, 25: 152–162
- 63 McCurdy D W, Kim M. Molecular cloning of a novel fimbrin-like cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 23–31
- 64 Rose A, Schraegle S J, Stahlberg E A, et al. Coiled-coil protein composition of 22 proteomes—differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evol Biol*, 2005, 5: 66
- 65 Gardiner J, Overall R, Marc J. Putative *Arabidopsis* homologues of metazoan coiled-coil cytoskeletal proteins. *Cell Biol Int*, 2011, 35: 767–774
- 66 Abu-Abied M, Golomb L, Belausov E, et al. Identification of plant cytoskeleton-interacting proteins by screening for actin stress fiber association in mammalian fibroblasts. *Plant J*, 2006, 48: 367–379
- 67 Yokota E, Shimmen T. The 135-kDa actin-bundling protein from lily pollen tubes arranges F-actin into bundles with uniform polarity. *Planta*, 1999, 209: 264–266
- 68 Huang S, Blanchoin L, Chaudhry F, et al. A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *J Biol Chem*, 2004, 279: 23364–23375
- 69 Fan X, Hou J, Chen X, et al. Identification and characterization of a Ca^{2+} -dependent actin filament-severing protein from lily pollen. *Plant Physiol*, 2004, 136: 3979–3989
- 70 Xiang Y, Huang X, Wang T, et al. Actin binding protein29 from *Lilium* pollen plays an important role in dynamic actin remodeling. *Plant Cell*, 2007, 19: 1930–1946
- 71 Sparks J A, Kwon T, Renna L, et al. HLB1 is a tetratricopeptide repeat domain-containing protein that operates at the intersection of the exocytic and endocytic pathways at the TGN/EE in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2016, 28: 746–769
- 72 Zheng Y, Xie Y, Jiang Y, et al. *Arabidopsis* ACTIN-DEPOLYMERIZING FACTOR7 severs actin filaments and regulates actin cable turnover to promote normal pollen tube growth. *Plant Cell*, 2013, 25: 3405–3423
- 73 Zhang S, Liu C, Wang J, et al. A processive *Arabidopsis* formin modulates actin filament dynamics in association with profilin. *Mol Plant*, 2016, 9: 900–910
- 74 Zhao S, Jiang Y, Zhao Y, et al. CASEIN KINASE1-LIKE PROTEIN2 regulates actin filament stability and stomatal closure via phosphorylation of actin depolymerizing factor. *Plant Cell*, 2016, 28: 1422–1439
- 75 Wu S, Xie Y, Zhang J, et al. VLN2 regulates plant architecture by affecting microfilament dynamics and polar auxin transport in rice. *Plant Cell*, 2015, 27: 2829–2845

Novel actin-binding-proteins in plants

QIAN Dong & XIANG Yun

MOE Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

The actin cytoskeleton participates in numerous intracellular and physiological processes, and is present in all eukaryote. Tight regulation of actin cytoskeleton organization and dynamics is regulated by a plethora of actin-binding proteins (ABPs), which is the foundation of cellular processes. Although actin is highly conserved and the mechanisms underlying the regulation of actin dynamics are similar in eukaryotic cells, there are some differences between animal and plant cells owing to the diversity of cell type and living habits. ABPs coevolved with actin leading to the diverse biochemical functions of ABPs in eukaryote, such as several ABPs disappearing but conserved in animal and yeast, novel plants ABPs arising, typical ABPs and non-ABPs evolving into new actin-regulating function and activity. This review summarizes the latest progress in the function of novel plants ABPs and the methods for searching new ABPs in plants. Finally, we discuss the future studies and potential research hotspots in plant actin cytoskeleton.

actin cytoskeleton, actin-binding proteins (ABPs), functional domain, novel, regulating mechanism

doi: [10.1360/N052017-00022](https://doi.org/10.1360/N052017-00022)