

一种新的水稻肌动蛋白基因 *Act* 的分子克隆 及特征分析^{*}

梁卫红 唐朝荣 吴乃虎^{**}

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080

摘要 以植物 Rho 家族成员 *osRACD* 为诱饵, 采用酵母双杂交体系从水稻幼穗中分离到肌动蛋白基因家族的一个新成员 *-Act*. 借助 5' RACE 技术克隆到该基因的 cDNA 全长, 其中含有一个 1134 bp 的读码框, 编码 377 个氨基酸和一个终止密码子. 同源性比较显示与其他已知的水稻肌动蛋白有 81.8%~96% 的相似性. 生物信息学方法分析了蛋白的修饰位点、基因的结构和进化关系. Southern 杂交显示 *Act* 是单拷贝基因, RT-PCR 显示该基因在多种组织有广泛的表达, 但在不同发育阶段表达量有明显变化. 还就 Rho 家族和肌动蛋白家族在进化和功能上的关系进行了讨论.

关键词 水稻幼穗 酵母双杂交 肌动蛋白 Rho 基因克隆

肌动蛋白细胞骨架是复杂的动态结构, 参与植物形态建成、发育等多种细胞事件. 在高等植物中, 许多细胞生理活动, 诸如胞质环流、延伸生长、细胞分裂都涉及到肌动蛋白^[1]. 肌动蛋白在体内以两种状态存在, 即丝状的多聚化形式(F-肌动蛋白)和接近球形的单体形式(G-肌动蛋白). 在生理条件下, G-肌动蛋白在胞质中与 ATP 以及一个二价阳离子紧密结合, 并可以通过多聚化迅速转变成 F-肌动蛋白形式. 多聚化发生在肌动蛋白微丝的末端, 并使之延伸, 但是机制仍然不清楚. 虽然已经确定了大量的肌动蛋白细胞骨架及其相关基因, 但是在植物中, 肌动蛋白微丝是如何被调控的, 肌动蛋白又是如何发挥其生理功能的, 人们迄今尚缺乏了解. 在水稻中, 虽然 10 年前就有 4 种肌动蛋白基因在 GenBank 上登录, 但对其功能和调控至今知之甚微.

我们实验室曾从水稻幼穗分离到一种属于 Rho 家族的小 GTP 结合蛋白基因, 命名为 *osRACD*^[2]. Rho GTPases 是属于 Ras 超家族(包括 Ras, Rho,

Rab, Ran 和 Arf 家族)的小 GTP 结合蛋白. 在动物细胞和真菌中的研究表明, 只有 Ras 和 Rho 是真正的信号分子. Rho 在形态建成、细胞周期的调控、基因转录和超氧阴离子的产生中起重要作用. 近年来才确定在植物中没有 Ras 蛋白, 担负信号转导“分子开关”的小 GTP 结合蛋白惟有 Rho GTPases. 因此植物 Rho 的研究引起了广泛的关注, 它的功能也日趋明朗^[3]. 目前研究得最清楚的功能是 Rho 可引起 F-肌动蛋白的重组和动态变化^[4]. 但是还不清楚在该通路中, Rho 通过哪一个效应物传递信号, 从而调控植物肌动蛋白结构和动态变化. 本实验室关于 *osRACD* 已有的研究结果显示, 它可能和光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换相关^[5]. 为进一步研究 *osRACD* 基因参与的光周期育性转换的光信号转导通路以及 *osRACD* 蛋白作用的下游分子, 我们采用酵母双杂交方法, 以 *osRACD* 为诱饵对水稻农垦 58N cDNA 文库进行了筛选, 分离到一些潜在的互作蛋白的基因. 本文报道了其中的一种新的水稻肌动蛋白基因的分子克隆、结构分析和表达特

2003-10-17 收稿, 2003-12-08 收修改稿

^{*} 国家重点基础研究发展规划(批准号: 2001CB1088), 国家“八六三”计划(批准号: 2002AA 224061)资助项目

^{**} 通讯作者, E-mail: nlwu@genetics.ac.cn

征的研究结果.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

植物材料为农垦 58N 水稻 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) 品种. 双杂交体系报告酵母菌株采用的是 YRG-2 (Stratagene), 大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 用于酵母质粒的转化, pGEM-T Easy 载体用于 PCR 产物的克隆. 各种限制性内切酶购自 MBI 公司, AMV 反转录酶和 RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司, Prime-a-Gene 随机引物标记试剂盒购自 Promega 公司, α -³²P dCTP 购自亚辉公司. 引物由博润公司合成.

1.2 cDNA 文库的构建

取处于雌雄蕊形成期 (第 IV 期) 的水稻农垦 58N 幼穗材料 0.5 g, 以 QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia) 提取 mRNA, Timesaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) 进行双链 cDNA 的合成, 添加 *Eco*RI 接头和 *Xho*I 消化后的 cDNA 与 Lambda HybriZAP2.1 载体臂 (Stratagene) 定向连接. 连接产物用 Packagene Lambda DNA system (Promega) 进行体外包装, 测定滴度, 分装备用.

1.3 诱饵质粒的构建

采用 pBD-GAL4 Cam 噬菌粒 (Stratagene) 构建 BD GAL4 诱饵质粒. 筛选诱饵是 *osRACD*, 通过 PCR 方法 (PD1: 5'-ttgaatcatgagcgcgtctcgggttc-3'; PD2: 5'-ttgtcgaactacaagatggcaccatcc-3') 在其 cDNA 编码区的 5' 端和 3' 端分别添加 *Eco*RI 和 *Sal*I 位点, 亚克隆到 pBD-GAL4 Cam 噬菌粒相应的位点上, 构成重组质粒 pBD-D. 经上海博亚公司测序证实, *osRACD* 的 cDNA 序列正确并与 GAL4 的读框保持一致.

1.4 酵母双杂交的筛选

参照 Stratagene 酵母双杂交说明书进行文库的筛选. 首先将 pBD-D 转化到带有 *LacZ* 和 *HIS3* 报告基因的酵母菌株 YRG-2, 在 SD/-Trp 平板上筛选带有 BD 质粒的酵母转化子 D/YRG-2. 然后再将删除和扩增后提取的文库质粒大量转化到 D/YRG-2 中, 在 SD/Trp-Leu-His 的平板上筛选含有 AD 和

BD 质粒的转化子. 酵母转化采用的是 LiAc-PEG 法. 平板在 30℃ 培养 7~10d 后, 将 His⁺ 的克隆挑至新的 SD/-Trp-Leu-His 的平板, 用于 β -半乳糖苷酶的显色分析. 提取表型为 His⁺/LacZ⁺ 的酵母菌落的质粒, 转化到大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 中, 在 LB + Amp 平板上筛选带有 AD 质粒的转化子. 初步确定的阳性 AD 质粒重新转化到 D/YRG-2 中, 同时以 pLamin C/YRG-2 为阴性对照, 重复上述的显色分析. 然后将证实为阳性的克隆, 通过 *Eco*RI 和 *Xho*I 酶切分析和 PCR 扩增 (上游引物: 5'-agggatgtt-taatacctac-3', 下游引物: 5'-g cacagttagtgaaactgc-3') 对插入片段的大小进行分类, 挑选有意义的克隆测序.

1.5 5' RACE

用 QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia) 提取水稻幼穗 mRNA. 以 5' RACE Kit (Invitrogen) 用于 cDNA 末端的扩增. 第一链的合成采用基因的特异引物 GSP1 (5'-agggctggaagaggacctca-3'). 纯化后, 在 cDNA 的 3' 末端添加 TdT 尾, 从而产生锚定引物的结合位点. 后续的巢式 PCR 反应分别采用了锚定引物/基因特异引物 GSP2 (5'-agctcatagctcttctccaca-3') 以及 AUAP 引物/基因特异引物 GSP3 (5'-caagcttctcctgatgtccct-3'). PCR 参数为 94℃, 5 min; 94℃, 1 min, 55℃, 1 min, 72℃, 1 min, 进行 35 个循环; 72℃, 7 min. PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体 (Promega) 后, 测序.

1.6 cDNA 编码区的克隆

将 5' RACE 扩增得到的片段 (约 800 bp) 与筛库得到的片段 (730 bp) 拼接, 推测出编码基因的 cDNA 序列. 据此设计引物 (P1: 5'-atgtcgacatggctgacggcaggacatc-3', P2: 5'-atgcggcgcctcatcactctccctttgag-3'), 采用高保真 Taq 酶 (Taq plus), 以水稻 58N 雌雄蕊形成期 (第 IV 期) 幼穗 mRNA 为模板进行 RT-PCR 扩增 (循环参数同上). 将预期的大约 1.1 kb 的 DNA 回收后, 连入 pGEM-T Easy 载体, 测序.

1.7 序列分析和同源性检索

核苷酸序列和推测的氨基酸序列分别在 GenBank/EMBL/DBJ 数据库和水稻基因组序列数据库检索. 同源性分析采用的是 DNAMAN 和 Genetyx

软件. 蛋白修饰位点的预测采用了 Prosite 软件 (<http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSACN>).

1.8 Southern 杂交检测

CTAB 法提取水稻基因组 DNA, 用在基因组序列中无切点的酶 (*EcoRI*, *PstI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*) 消化和经 0.8% 琼脂糖电泳后, 毛细管法转移至 Hybond N+ 尼龙膜 (Amersham), 80 °C 烤 2 h 备用. 采用 Prime-a-Gene 随机引物标记试剂盒以 α -³²P dCTP 标记该基因 153 bp 的 3' 非翻译区, 制备杂交探针. 杂交和洗膜程序按 Sambrook 等的方法进行^[6].

1.9 RT-PCR 分析表达模式

水稻在温室内常规条件培养, 分别收集 5 日龄、10 日龄和 30 日龄的根和地上部分以及水稻幼穗和愈伤材料, 冻存在 -70 °C 备用. 异硫氰酸胍-酚法提取这些材料的总 RNA, 以引物 P1/P2 进行 RT-PCR, 条件同前. 同时根据组成型表达的水稻 *Act1* 序列设计引物 (Pa: 5'-catgctatcctcctcgtctcgacct-3'; Pb: 5'-cgcactcatgatggattgtat-3'), 以相应材料的总 RNA 为模板进行 RT-PCR 作为对照. 取 15 μ L 扩增产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

2 结果

2.1 酵母双杂交筛选 *osRACD* 互作蛋白的基因

为确定与 *osRACD* 作用的蛋白, 采用连续转化的方式将诱饵质粒 pBD-D 和文库质粒先后转化到酵母报告菌株 YRG-2 中. 如果与 GAL4 结合域融合蛋白 *osRACD* 能够与某个文库质粒产生的与 GAL4 激活域融合蛋白即靶蛋白发生作用, 就会启动两种报告基因 *LacZ* 和 *HIS3* 的转录, 从而表现出 β -半乳糖苷酶活性和组氨酸原养型. 采用水稻幼穗构建文库是由于本实验室研究表明 *osRACD* 在该组织中是特异性表达的 (待发表资料), 因此在该组织中可能存在与 *osRACD* 互作的、影响其下游信号转导通路的蛋白因子.

我们筛选了大约 2×10^6 个酵母转化子, 得到 56 个 *LacZ*⁺/*His*⁺ 的克隆. 通过 PCR 和酶切分析对插入片段按照大小进行了分类, 并对部分克隆进行

了测序, 最终通过数据库检索确定克隆的性质. 其中一类是细胞骨架相关蛋白, 包括本文涉及的克隆 *Act*. *Act* 片段 (721 bp) 与谷子、大麦的肌动蛋白基因的同源性分别达到 91% 和 92%. 由于肌动蛋白是高度保守的, 根据水稻肌动蛋白基因家族已知成员编码区的长度推测, 我们筛库获得的 *Act* 片段的 5' 端可能缺少 600~700 bp.

2.2 *Act* 的克隆和序列分析

本实验分两步分离完整的 *Act* 基因的 cDNA 序列. 首先采用 RACE 技术获得了 5' 端约 800 bp 的片段 (图 1), 与双杂交筛选到的 3' 端片段拼接后得到长度为 1329 bp 的 cDNA 序列 (图 2). 进一步设计引物, 以水稻幼穗 cDNA 为模板, 扩增并克隆到了 1134 bp 的预期 *Act* 基因的 cDNA 编码区序列 (图 1). 测序结果表明我们所得到的 *Act* 序列包含了该基因完整的 3'-UTR 区, 5'-UTR 区的部分序列和完整的编码区, 编码 377 个氨基酸和 1 个终止密码子, 预期分子量约 42 ku. 该序列已在 GenBank 注册, 序列号为 AY212324.

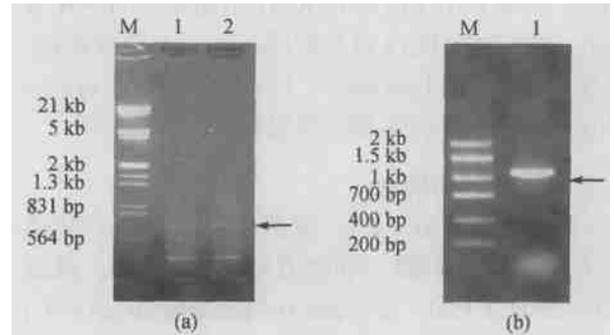


图 1 5' RACE 和 RT-PCR 方法克隆 *Act* 的全长

(a) 1% 琼脂糖凝胶分析 5' RACE 产物. 泳道 1, 2 为巢式 PCR 产物; M 为 Lambda DNA *EcoRI*+*HindIII* 分子量标准; 箭头所指的是回收和克隆的条带; (b) 1% 琼脂糖凝胶分析 RT-PCR 产物. 泳道 1 为 RT-PCR 产物; M 是 DNA 低分子量标准; 箭头所指的是扩增的 *Act* 编码区

将推演的 *Act* 编码的氨基酸序列在 GenBank 上进行 Blast 检索. 采用 ClustalX 程序用于多序列的相似性分析. 如图 3 所示, *Act* 与谷子、大麦肌动蛋白以及水稻 *Act1*, *Act2*, *Act3*, *Act7* 的同源性分别是 96%, 95%, 91.4%, 89.8%, 83.2%, 81.8%.

```

AAGGAAATCGCTGACGGCGAGGACATCCAGCCCCTTGTGTGTGACAATGGAAGTGGCATG      60
      M A D G E D I Q P L V C D N G T G M
GTCAAGGCTGGGTTTGCTGGGGACGATGCGCCCAGGGCTGTTTTCCCTAGTATCGTGGGG      120
      V K A G F A G D D A P R A V F P S I V G
CGCCCCGTCACACCGGTGTGATGGTTGGTATGGGGCAGAAGGATGCCTATGTTGGTGAT      180
      R P R H T G V M V G M G Q K D A Y V G D
GAGGCGCAGTCCAAGAGAGGTATCCTCACCTTGAAGTACCCGATCGAGCATGGTATTGTT      240
      E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G I V
AGCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTCCGTGTC      300
      S N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V
GCGCCCAGGAGCACCCGTGTGTTGCTGACTGAGGCCCGCTCAACCCCAAGGCTAACAGG      360
      A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R
GAGAAGATGACCCAGATCATGTTGAGACTTTCAATGTGCCAGCTATGTATGTCGCCATC      420
      E K M T Q I M F E T F N V P A M Y V A I
CAGGCCGTGCTCTCCCTGTATGCCAGTGGACGTACAACGGTATCGTGTGGACTCTGGT      480
      Q A V L S L Y A S G R T T G I V L D S G
GATGGTGTGACCCACACCGTGCCAATCTATGAAGGATATGCCCTTCCTCATGCCATCCTG      540
      D G V S H T V P I Y E G Y A L P H A I L
CGTCTGGACCTTGCTGGGCGTGACCTCACTGACAGCTTGATGAAGATTCTTACTGAGAGA      600
      R L D L A G R D L T D S L M K I L T E R
GGTTACTCCCTCACTACCCTGCTGAACGGGAAATTGTAAGGGACATCAAGGAGAAGCTT      660
      G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L
GCATATGTGGCCCTTGACTATGAGCAGGAGCTGGAGCTGCAAAGAGCAGCTCATCTGTG      720
      A Y V A L D Y E Q E L E A A K S S S S V
GAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGATGGACAGGTGATCACCATTGGGGCAGAGAGTTCCGA      780
      E K S Y E L P D G Q V I T I G A E R F R
TGCCCTGAGGTCCTCTCCAGCCCTCTTTCATCGGTATGGAAGCTCCTGGAATCCATGAG      840
      C P E V L F Q P S F I G M E A P G I H E
ACCCTTACAATCCATCATGAAGTGTGATGTGGATATCAGGAAGGACTTGATGGTAAC      900
      T T Y N S I M K C D V D I R K D L Y G N
ATTGTTCTCAGTGGTGGATCAACCATGTTCCCTGGTATTGCTGACCGTATGAGCAAGGAG      940
      I V L S G G S T M F P G I A D R M S K E
ATCACTGCCCTCGCACCAAGCAGCATGAAGATCAAGGTGGTGGCACCCTGAGAGGAAA      1020
      I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K
TACAGTGTCTGGATAGGAGGGTCCATCCTTGCCCTCCCTTAGCACCTTCCAACAGATGTGG      1080
      Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q M W
ATCTCAAAGGGAGAGTATGATGAGTCGGGTCCAGCAATTGTTACCCGGAAGTGCTTCTAA      1140
      I S K G E Y D E S G P A I V H R K C F *
GCTCTGGCTTTTTAATCGCTTATCTACAAGGCAGTTTCTTTTCAGTTTTCACAAGCCCTT      1200
      GTCATGTAAGCTACTCTGTTGGGATTGTTGGTGTCTATCAGAATGTTGTTGGATTTGT      1260
      TTCATGGCTGAATATTATGCACCTTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1320
      AAAAAAAAAA
    
```

图 2 *A α* 的核苷酸序列以及推演的氨基酸序列

起始密码 ATG 和终止密码 TAA 用方框标注；下划线部分为肌动蛋白和肌动蛋白相关蛋白的特征区域；阴影处标注（第 610 bp 处）之后的序列为 *A α* 的原始序列；箭头标注的是肌动蛋白基因高度保守的第一、二个外显子拼接位点

经 Prosite 软件分析显示, *A α* 序列上可能存在着诸如糖基化位点, 依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点; 蛋白激酶 C 磷酸化位点; 酪蛋白激

酶 II 磷酸化位点; 酪氨酸蛋白激酶磷酸化位点和 N-豆蔻酰化位点, 说明在蛋白水平上可能存在着复杂的修饰和调控作用。

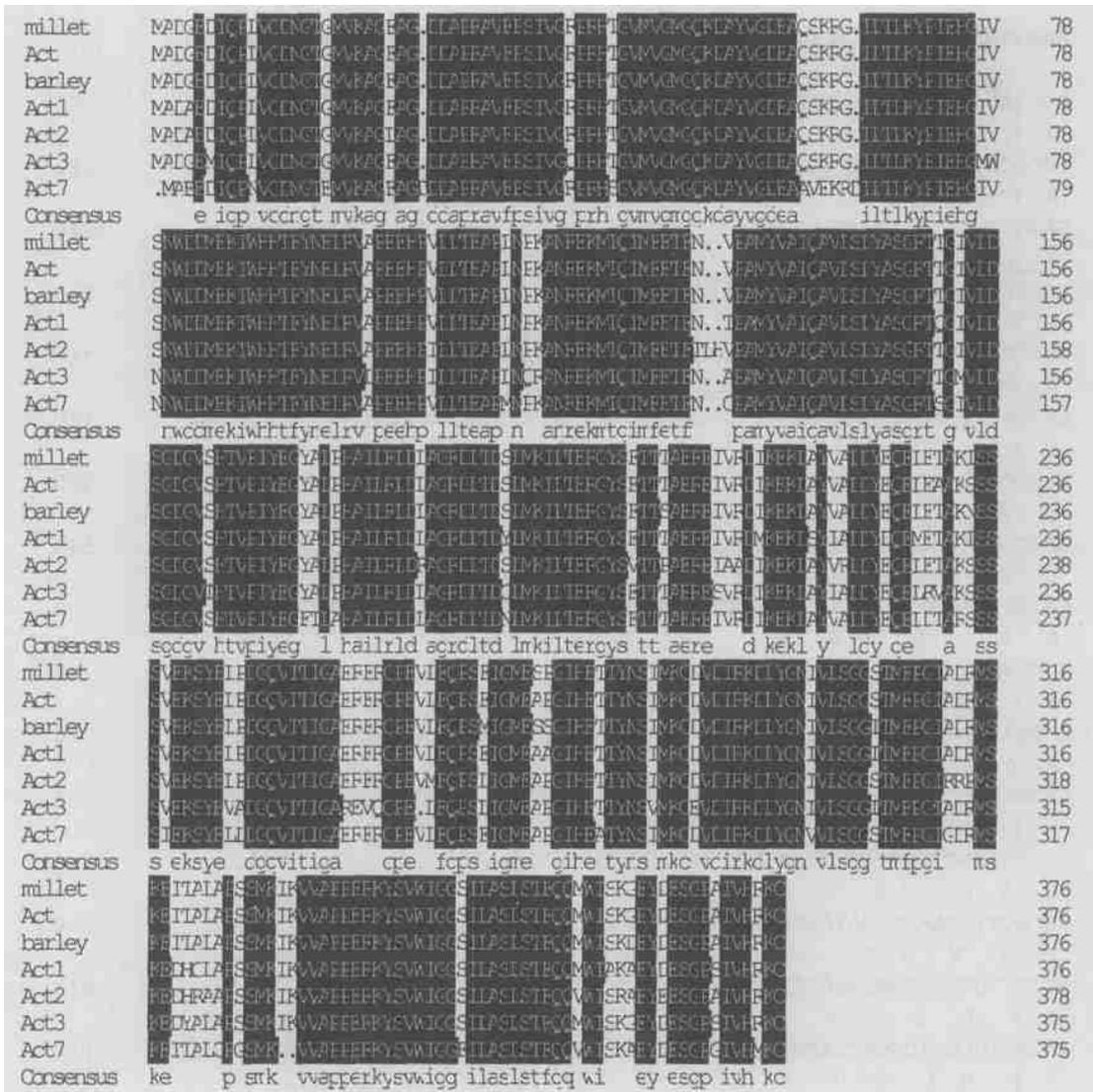


图 3 7 种植物肌动蛋白氨基酸序列的同源性比较

水稻 Act1(登录号 X15865), Act2(登录号 X15864), Act3(登录号 X15862), Act7(登录号 X15863), Act(登录号 AY212324), 大麦肌动蛋白(登录号 AY145451), 谷子肌动蛋白(AF288226)

2.3 Act 基因结构分析

以 Act cDNA 序列搜索水稻基因组序列数据库, 发现它可以与重叠群 Contig3840 中 1558 bp 的序列完全匹配. 借助 Genetyx 软件对预期的 Act 基因组序列进行分析, 推测出了 Act 的基因组序列以及外显子和内含子的拼接位点. 序列比对显示, 该基因的编码区有 1408 bp, 包括 3 个内含子和 4 个外显子(图 4). 绝大多数外显子与内含子拼接处具有 G:GT...AG:G 结构. 序列同源性分析显示目前已知的水稻肌动蛋白基因都由 4 个外显子和 3 个内含子

组成, 而且内含子位置非常保守. 尤其是第一个内含子的位置, 除了 Act7 的第一个外显子长 57 bp, 其他 4 种肌动蛋白则都是 60bp, 所有的水稻肌动蛋白的第一个外显子都是以 AGG(赖氨酸)结尾的, 第二个外显子以 GCT/C(丙氨酸)开始(图 2). 该结果显示我们分离的 Act 与其他植物包括大豆、玉米、拟南芥、土豆、番茄和胡萝卜在内的肌动蛋白基因的结构特征一致^[7~11], 即外显子和内含子的序列有相对高的差别, 但是内含子的位置却是保守的, 而动物肌动蛋白基因中没有该特征^[8, 12].

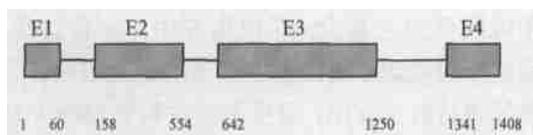


图 4 *Act* 基因结构的模式图
E1~E4 为 4 个外显子

以 *Act* 特异探针在高严谨条件下, 对经 *Eco*RI, *Pst*I, *Kpn*I, *Sma*I, *Bam*HI 等若干种核酸内切酶消化的水稻基因组进行 Southern blot 分析显示, 各种酶切图谱均只有一条阳性条带(图未示出), 这说明 *Act* 在 58N 水稻基因组中可能是以单拷贝形式存在的, 与拟南芥肌动蛋白基因拷贝数分析的结果相同^[13, 14].

2.4 *Act* 基因表达特性

以组成型表达的 *Act1* 为内标, 通过半定量 RT-PCR 检测了 *Act* 的表达模式. 如图 5 所示, 调整 PCR 扩增的循环数, 可以清楚地看到 *Act* 与 *Act1* 的表达特性不同. *Act* 尽管在根、地上部分、愈伤和幼穗等不同的器官组织中均有表达, 但是在水稻植株生长发育的不同阶段, 其表达活性存在明显差异, 例如在幼嫩的组织和迅速生长的器官中表达活性特别高, 但是在成体植株(三叶期)的根几乎检测不到, 而在叶仍有高水平的表达. 这可能与不同器官的生长状况有关, 成体的根生长已经减缓, 而成体的叶仍然处于生长旺盛时期. 肌动蛋白作为细胞骨架的重要成员, 参与细胞延伸生长、细胞分裂等重要事件, 可以确定的是 *Act* 与生长的关系尤其密切. 在迅速生长的器官、组织中, *Act* 保持高

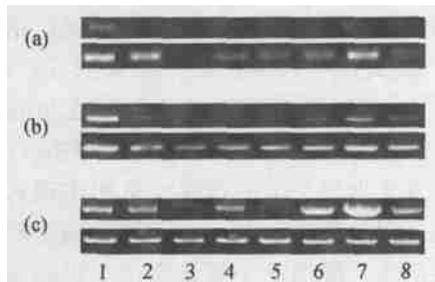


图 5 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
(a) PCR 扩增 25 个循环; (b) PCR 扩增 30 个循环; (c) PCR 扩增 35 个循环. 上排是 *Act* 的 RT-PCR 产物, 下排是 *Act1* 的 RT-PCR 产物. 1~3, 分别是 5, 10 和 30 d 根; 4~6, 分别是 5, 10 和 30 d 地上部分; 7, 幼穗; 8, 愈伤组织

水平表达, 与细胞分裂和生长需要大量的包括肌动蛋白在内的骨架蛋白是相应的. *Act* 的表达模式分析表明它不同于组成型表达的 *Act1* 和 *Act7*, 而是类似 *Act2* 和 *Act3*, 属于在不同发育阶段差异表达的肌动蛋白^[15].

McElroy 等^[13]的研究和本文的实验结果显示, 目前已知的 5 种水稻肌动蛋白基因在各个组织和器官中都有表达, 但是表达特性各不相同. 以 3 种发育阶段差异表达的肌动蛋白基因为例, *Act3* 只在萌发后 2~4d 的地上部分中有高水平表达, 随后表达水平急速下降, 到 35 d(成株)时, 表达量只有 2d 植株的 1/5. *Act2* 类似 *Act3*, 但其表达水平在发育早期的变化不大. 相比之下, *Act* 则在成株地上部分仍然维持高表达水平. 表达特性的差异, 表明功能上存在着差别. 多种肌动蛋白基因在同一组织中的共同表达的现象说明, 肌动蛋白家族的成员虽然高度相似, 但在功能上不同成员之间也许并不能彼此相互替代. 因为突变体研究显示, 拟南芥的肌动蛋白 *act7* 突变体会影响愈伤组织的形成, 但是在同样的条件下, 肌动蛋白 *act2* 突变体的发育则与野生型愈伤组织没有差别, 提示每个肌动蛋白在植物发育过程中具有不同的功能^[16]. 多种肌动蛋白的并存, 有利于细胞对环境变化做出灵活和动态的应答^[17].

3 结论

多种不同植物肌动蛋白的研究结果显示, 它们是由复杂的基因家族编码的, 该家族中的一些古老和高度保守的基因类群, 也许可以追溯到维管植物的起源^[12, 17]. 但是植物肌动蛋白基因的保守性和进化的选择压力还是未知的. 植物的肌动蛋白基因家族各成员具有高度保守的氨基酸组成, 这是与肌动蛋白作为细胞骨架的保守功能是相应的. 将目前 GenBank 上登录的 5 种水稻肌动蛋白基因核苷酸序列的比较显示, 其相似性为 81.6%~84.6%, 氨基酸序列的相似性为 81.8%~91.4%. 在基因结构上, 它们都含有 3 个内含子和 4 个外显子, 且内含子的位置相对保守, 表明在进化上它们可能起源于单一的共同祖先基因. 借助 Genetyx 软件分析水稻肌动蛋白基因的进化关系如图 6 所示, 我们分离到的 *Act* 与 *Act1* 的亲缘关系最近, 而与 *Act2* 的关系最远. 由于植物肌动蛋白家族成员的表达模式存在

着差别,因而在不同的细胞类型中就有不同种类的肌动蛋白执行不同的功能,这可能是多个肌动蛋白基因并存的功能基础^[18].也就是说植物肌动蛋白种类的多样性与植物肌动蛋白功能的多样性是相对应的.

在植物中,惟一能代表 Ras 小 GTPase 超家族 Rho 亚类的是分布广泛、数量可观的被称为 Rac 或 Rops 的小 GTPases^[19~22],它们是小 GTP 结合蛋白中真正的信号分子.有趣的是, *Rac* 基因的多样化以及在进化上的特点与肌动蛋白基因家族有许多相似之处.在拟南芥中,它们都是多基因家族,在进化上几乎同时分成了两个截然不同的类群,编码的蛋白在营养组织和繁殖器官中具有独特的时空表达模式.4 种肌动蛋白基因, *AtACT3*, *AtACT4*, *AtACT12* 和 T6D20.1 (一种类似肌动蛋白的基因),在染色体上的定位接近 *AtRAC* 基因^[20].在 NCBI 数据库检索的结果表明, *osRACD* 和水稻 *Act7* 都定位在 1 号染色体上.虽然其他 5 种水稻肌动蛋白基因和其他的水稻 *Rac* 的染色体定位还有待研究,但是可以推测的是这两个基因家族存在共进化的关系.

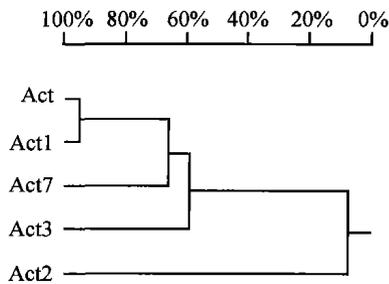


图 6 5 种水稻肌动蛋白的进化关系

花粉管由于具有独特的细胞形态、迅速生长的特点以及富含肌动蛋白及相关蛋白的特征,一直是作为研究顶端生长和肌动蛋白细胞骨架的模式体系^[23~25].一般认为肌动蛋白细胞骨架在花粉管的生长中起重要作用,因为用破坏肌动蛋白的 Latrunculin B (LatB) 和细胞松弛素的处理可以有效的阻断顶端生长^[26].但是由于缺乏更为灵敏的方法观察高度动态变化的 F-肌动蛋白,以及针对不同 F-肌动蛋白类型的特异的抑制剂^[27],虽然在花粉管中对肌动蛋白细胞骨架进行了深入的研究,但对肌动蛋白的

作用机制仍知之甚少.在拟南芥中,来自遗传学、基因组学和烟草瞬时表达体系的研究表明,在花粉特异表达的 *Rop1 At* 通过调控花粉管顶端 F-肌动蛋白的动态变化,控制着花粉管的极性生长^[27~29]. *Rop1 At* 的过表达或者组成型激活 (CA-rop1At) 突变体中,极性花粉管生长转变成为异常的生长,转化植株的花粉管顶端呈现出勺状或泡状的形态.在延伸的顶端区域,肌动蛋白细胞骨架更加浓密且高度无序.而在显性失活 (DN-rop1At) 突变体中,花粉管延伸受到抑制^[27,29].在采用转基因方法鉴定本实验室分离的 *osRACD* 的功能时发现,在转基因拟南芥中, *osRACD* 反义基因可有效地阻断与之高度同源的内源 *Rac* 基因的功能,使花粉管无法正常延伸,植株不能正常结实^[30].在转基因水稻中,导入的 *osRACD* 反义基因降低了内源的 *osRACD* 的表达水平,最终使原本正常可育的 58N 水稻育性显著下降;而过表达 *osRACD* 基因则使原本长日照处理后的高度不育的 58S 水稻育性得到一定程度的恢复^[5].上述的结果说明 *osRACD* 的功能与 *Rop1 At* 类似,在调节花粉管延伸生长中起重要作用.由于 *osRACD* 主要在水稻幼穗中表达, *Act* 在幼穗中的丰度也较高.一个大胆的假设是 *osRACD* 有可能通过调控幼穗中包括 *Act* 在内的肌动蛋白的组织,达到调节花粉管延伸生长的作用,从而影响到水稻的育性.虽然具体的机制还不清楚,但这些结果证实了在功能上 Rho 和肌动蛋白之间确实存在着紧密的联系.该体系为研究 *osRACD*、肌动蛋白以及相关的信号通路提供了一个良好的模型.生化和细胞学的研究揭示,一些成分在迅速生长的顶端的过量存在对于植物的顶端生长是必须的,其中就包括肌动蛋白、Rac 相关蛋白、激酶、高浓度的 Ca^{2+} 等等^[21,31~37].该结果暗示着这些分子在功能上存在必然联系.目前的研究结果认为, Rac/Rop GTPases 可能调控着至少两个下游通路,从而实现花粉管延伸生长过程的影响,即一方面通过调节肌动蛋白结合蛋白活性,激活一个直接作用于肌动蛋白细胞骨架的信号通路^[38,39];另一方面引起对花粉管生长至关重要的 Ca^{2+} 向花粉管顶端的流动^[28,40].因此, Rho 和肌动蛋白不仅在进化上而且在功能上都存在某种微妙的关系.有关 Rho 信号通路仍然有许多未知的内容,如外部和内部的信号是什么,信号与

Rho 的关系, Rho 的效应物分子的确切功能. Rho 信号网络的阐明将有助于理解授粉过程和控制细胞极性和细胞生长的分子机理^[27].

本文采用酵母双杂交和 5' RACE 技术, 克隆了一种与 osRACD 互作的新的水稻肌动蛋白的基因, 并对其结构和功能进行了一系列的分析. 本研究不仅为水稻肌动蛋白基因家族增添了一个新成员, 而且将有助于理解小 GTP 结合蛋白和肌动蛋白在进化和功能上的关系. 据我们所知, 到目前为止, 还没有来自其他方面的证据说明小 GTP 结合蛋白和肌动蛋白之间有直接的相互作用. 研究已证明, osRACD 基因在光敏核不育农垦 58S 光周期育性转换中发挥着重要作用^[2, 5, 30], 所以有关 Act 在水稻发育过程中的功能和调控的进一步研究, 特别是 osRACD 和 Act 在调控水稻发育的信号转导中的互动研究, 对于深入揭示农垦 58S 光周期育性转换的分子机理有重要意义. 此外, 进一步分离 Act 的启动子, 用于植物表达载体的构建, 对于外源基因在转基因植株中高效、特异的表达将具有重要的实践意义.

参 考 文 献

- 1 Staiger C J, et al. Actin localization and function in higher plants. *Protoplasm*, 1987, 141: 1
- 2 Mi Z Y, et al. Isolation of osRACD gene encoding a small GTP-binding protein from rice. *Chin Sci Bull*, 2002, 20: 1673
- 3 Aline H V, et al. Plant GTPases: The Rhos in bloom. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10: 141
- 4 Kuhn T B, et al. Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *Journal of Neurobiology*, 2000, 44: 126
- 5 叶建荣, 等. osRACD 基因表达与光敏核不育水稻光周期育性转换的相关性. *自然科学进展*, 2004, 14(2): 166
- 6 Sambrook J, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Shah D M, et al. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 1022
- 8 Shah D M, et al. Genes encoding actin in higher plants: Intron positions are highly conserved but the coding sequences are not. *J Mol Appl Genet*, 1983, 2: 111
- 9 Naim C J, et al. Nucleotide sequence of an actin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 1988, 65: 247
- 10 Drouin G, et al. A plant processed pseudogene. *Nature* 1987, 328: 557
- 11 Bematsky R, et al. Genetics of actin-related sequences in tomato.

- Theor Appl Genet*, 1986, 72: 314
- 12 Hightower R C, et al. The molecular evolution of actin. *Genetics* 1986, 114: 315
- 13 Huang S, et al. The *Arabidopsis thaliana* ACT4/ACT12 actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development. *Plant J*, 1996, 10: 189
- 14 Huang S, et al. The *Arabidopsis* ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence pollen and developing ovules. *Plant Mol Biol*, 1997, 33: 125
- 15 McElroy D, et al. Characterization of the rice (*Oryza Sativa*) actin gene family. *Plant Mol Biol* 1990, 15: 257
- 16 Ringli C, et al. ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1464
- 17 Meagher R B. Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *Int Rev Cytol*, 1991, 125: 139
- 18 Kandasamy M K, et al. One plant actin isovariant, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation. *Plant Cell*, 2001, 13: 1541
- 19 Winge P, et al. Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 483
- 20 Winge P, et al. Genetic structure and evolution of RAC GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2000, 156: 1959
- 21 Kost B, et al. Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol*, 1999, 145: 317
- 22 Yang Z B. Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: 375
- 23 Ren H, et al. Actin purified from maize pollen function in living plant cells. *Plant Cell*, 1997, 9: 1445
- 24 Taylor L P, et al. Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 461
- 25 Yang Z B. Signalling tip growth in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1: 525
- 26 Gibbon B C, et al. Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell*, 1999, 11: 2349
- 27 Gu Y, et al. Rop GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54: 93
- 28 Li H, et al. Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell*, 1999, 11: 1731
- 29 Fu Y, et al. Rop GTPase dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol*, 2001, 152: 1019
- 30 叶建荣, 等. 转基因 osRACD 反义基因拟南芥植株的育性分析. *自然科学进展*. 2003, 13 (3): 313
- 31 Bibikova T N, et al. Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta*, 1997, 203:

- 495
- 32 Bibikova T N, et al. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1999, 17: 657
- 33 Braun M, et al. Redistribution of actin, profiling and phosphatidylinositol-4' 5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta* 1999, 209: 435
- 34 Miller D D, et al. The role of actin in root hair morphogenesis; Studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J*, 1999, 17: 141
- 35 Emons A, et al. Actin; A target of signal transduction in root hairs. In: *Actin; A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Dordrecht; Kluwer Academic Publishers, 2000. 373 ~ 391
- 36 Esseling J, et al. The root hair actin cytoskeleton as backbone highway, morphogenetic instrument and target for signaling. In: *Root Hairs: Cell and Molecular Biology*. Tokyo; Springer-Verlag, 2000. 29 ~ 53
- 37 Bao Y Q, et al. Reduced expression of α -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J*, 2001, 28: 145
- 38 Bambang J R. Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulation of actin dynamics. *Annu Rev Cell Biol* 1999, 15: 185
- 39 Lawler S. Regulation of actin dynamics; The LIM kinase connection. *Curr Biol* 1999, 9: 800
- 40 Hepler P K, et al. Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, 17: 159

国家自然科学奖一等奖

——“澄江动物群和寒武纪大爆发”

2003 年度国家自然科学奖揭晓：中国科学院南京地质古生物研究所陈均远教授，西北大学舒德干教授和云南大学侯先光教授共同完成的“澄江动物群和寒武纪大爆发”获得一等奖，由于三位获奖者从不同方面做出了各自的贡献，并列第一，这在我国自然科学奖评奖史上尚属首次。

当代自然科学十大难题之一：“寒武纪生命大爆发”是探索早期生命起源中的重大疑难的科学问题。澄江动物群是充分展示“寒武纪大爆发”的最佳窗口，含有极丰富的有关地球早期生命演化和“寒武纪大爆发”奥秘的科学信息和重要线索，被国际学术界称为“20 世纪最惊人的发现之一”。

澄江化石群研究过程中，国家自然科学基金委给予了极大的关注，并给予了连续资助，三位获奖者共获得面上项目 8 项，重点项目两项，国家自然科学基金委和科技部联合资助的攀登专项二级课题各一项。研究者经过十几年艰难的探索和勤奋的研究，在澄江动物化石群和寒武纪大爆发方面取得了突破性的重大成果，主要体现在：揭示出寒武纪大爆发主幕的全貌轮廓，诠释并回答了寒武纪大爆发这一重大疑难科学问题；探索了脊椎动物、真节肢、螯肢和甲壳等动物的起源；证实了现生动物门和亚门以及复杂生态体系起源于早寒武世；挑战了自下而上倒锥形进化理论模型，为自上而下的爆发式理论模型提供了化石证据。提出了神经脊动物的概念；创建了无脊椎动物向脊椎动物演化“五步走”的假说。

该研究组在国内外刊物上共发表论文 90 余篇，其中在《Nature》和《Science》发表论文 14 篇，出版专著 6 部；《Nature》和《Science》发表专评 9 篇。纽约时报两次专题评论该项目成果，美国《Science News》周刊两次发表该项目有关成果的封面专评，《National Geographical》，《Discovery》和德国《明镜周刊》发表题为“东方的神秘”，“挑战达尔文”和“脊索动物起源”，对澄江动物群进行专题介绍和评论。该成果还分别荣获 1996，1999，2001 年“中国十大科技进展”，和 1999，2001 年“中国基础研究十大新闻”，该成果获得国际学术界广泛的关注。

该成果的获奖，是对我国古生物研究工作者，在探索早期生命起源所做出的实质性科学贡献和科学精神的充分肯定和褒奖。

(刘 羽 姚玉鹏 蒋复初 王广才 张进江)