

# CBL-CIPK 信号系统在植物应答逆境胁迫中的作用与机制<sup>\*</sup>

张俊文<sup>1,2</sup> 魏建华<sup>2</sup> 王宏芝<sup>2</sup> 王彦珍<sup>2</sup> 马荣才<sup>2\*\*</sup> 李瑞芬<sup>2\*\*</sup>

1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; 2. 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097

**摘要** 植物在长期适应中演化形成感知、传导和应答逆境胁迫的精细调控机制。CBL-CIPK 信号系统是近年来兴起、植物特有的依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  信号参与逆境胁迫调控的信号网络。CBLs 感知逆境  $\text{Ca}^{2+}$  信号, 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后与蛋白激酶 CIPKs 特异作用, 激活的 CBL-CIPK 复合体通过翻译后磷酸化下游靶蛋白, 或调节转录因子及胁迫应答基因, 实现不同细胞水平、组织部位抗逆性的调控。该系统具有特异性、多样性和复杂性, 同时存在不同信号途径的交叉作用。目前响应高盐、低  $\text{K}^+$  和高 pH CBL-CIPK 信号途径研究取得重要进展, 有望通过基因工程结合分子设计育种途径快速高效提高作物抗逆性。但仍有待于鉴定出更多的 CBL-CIPK 信号成分, 特别是鉴定特殊生境植物的信号成分, 并解析其在逆境胁迫响应中的功能。

**关键词** 钙信号 CBL CIPK 信号转导 逆境

土壤盐渍化、干旱、低温、高 pH 和低  $\text{K}^+$  等逆境是植物生长、发育的主要环境限制因素。植物无法逃避逆境, 只能应对。因此, 植物演化形成一套感知逆境胁迫、传导逆境信号, 并在分子、细胞和生理水平上响应的精细调控机制<sup>[1]</sup>。许多研究表明, 各种逆境胁迫作用于植物细胞, 首先引发细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的改变<sup>[2]</sup>。  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在时空上的变化, 代表了某种特定胁迫信息, 称为钙信号<sup>[3]</sup>。钙离子感受器可以随时监测钙信号, 并通过与其作用的蛋白传导信号, 调控下游早期响应基因的表达。在植物应答逆境胁迫过程中,  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  感受器—作用蛋白—靶基因是关键的调控途径, 控制着胁迫响应基因的开与关。其中,  $\text{Ca}^{2+}$  感受器可分为响应型感受器(sensor responders)和依赖型感受器(sensor relays)<sup>[2]</sup>。前者既能结合  $\text{Ca}^{2+}$ , 又具有蛋白激酶活性, 一旦结合  $\text{Ca}^{2+}$  即刻改变构象, 通过调控自身分子内作用, 就可实现其功能或作用。目前, 在植物

中研究得比较深入的响应型感受器有钙依赖型蛋白激酶(CDPK)家族<sup>[4]</sup>。而依赖型感受器本身不具有酶活性, 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后必须与其相互作用的蛋白激酶发生分子间作用, 才能实现其功能。植物中有两类, 一种是钙调素(CaM); 另一种是近年来发现为植物所特有的钙调磷酸酶 B 类似蛋白(CBL)<sup>[5,6]</sup>。CBL 感受器与其相互作用的蛋白激酶 CIPK 构成  $\text{Ca}^{2+}$ -CBL-CIPK 信号系统。本文将着重讨论该信号系统成分的结构特征、激活与时空表达特点及在逆境响应中的功能与调控机制。

## 1 CBL-CIPK 信号系统成分及其结构特征

### 1.1 CBL 钙感受器家族及其结构特征

CBL 型钙感受器是一类仅存在于植物中与动物钙调磷酸酶 B 亚基(CNB)及中枢神经钙感受器(NCS)极其相似的小分子蛋白, 即 CBL 或 CBL 钙感受器<sup>[5,6]</sup>。目前研究表明, 在双子叶模式植物拟

2008-01-09 收稿, 2008-01-25 收修改稿

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(批准号: 30370856)与北京自然科学基金(批准号: 5072013)资助项目

<sup>\*\*</sup> 通信作者, E-mail: liruifen@yahoo.com.cn; cmal@yahoo.com

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

南芥和单子叶模式植物水稻基因组中, *CBL* 基因家族均含有 10 个成员, 这 10 个 *CBL* 基因在编码区均含有 6 或 7 个内含子, 其中 4 个内含子在这 10 个基因编码区中的位置和排列顺序高度保守, 这些内含子是否对 *CBL* 基因表达有调控作用, 仍有待于进一步研究<sup>[7]</sup>. 就拟南芥 *CBLs* 而言, 其氨基酸序列相似性为 20%—90%. 序列相似性高的 *CBLs*, 可能有一定的功能冗余; 但大多数成员具有特定功能<sup>[8-9]</sup>.

*CBL* 作为钙感受器, 具有典型的结合  $\text{Ca}^{2+}$  结构域, 即 EF 手臂 (EF-hand). 一般地, 每个 *CBL* 含有 4 个变异程度不等的 EF-hands<sup>[10]</sup> (图 1(a)). 每个 EF-hand 由 12 个相对保守的氨基酸组成, 其

中 1, 3, 5, 7, 9 和 12 位置上的氨基酸较保守, 主要负责结合  $\text{Ca}^{2+}$  (图 1(c)). 通过分析 10 个 At*CBL* 氨基酸序列, 发现所有 At*CBL* 的第一个 EF-hand 在  $\text{Ca}^{2+}$  结合位置发生了氨基酸取代. 是否这样的取代有利于调控 *CBL* 与蛋白激酶的相互作用, 目前还不太清楚. 有些学者认为 *CBL* 含有 3 个典型的 EF-hands, 第一个不属于典型的 EF-hand<sup>[3-11]</sup>. Nagae 等研究 At*CBL2* 蛋白晶体结构表明, 两个  $\text{Ca}^{2+}$  同时与第 1 和第 4 EF-hand 结合, 而其他两个 EF-hand 仍保持开放构象<sup>[12]</sup> (图 1(a)). 而有些 *CBL* 与  $\text{Ca}^{2+}$  结合则不同. 究竟这些钙感受器 EF-hand 在植物体内如何与  $\text{Ca}^{2+}$  结合, 有待于获得更多的实验证据.

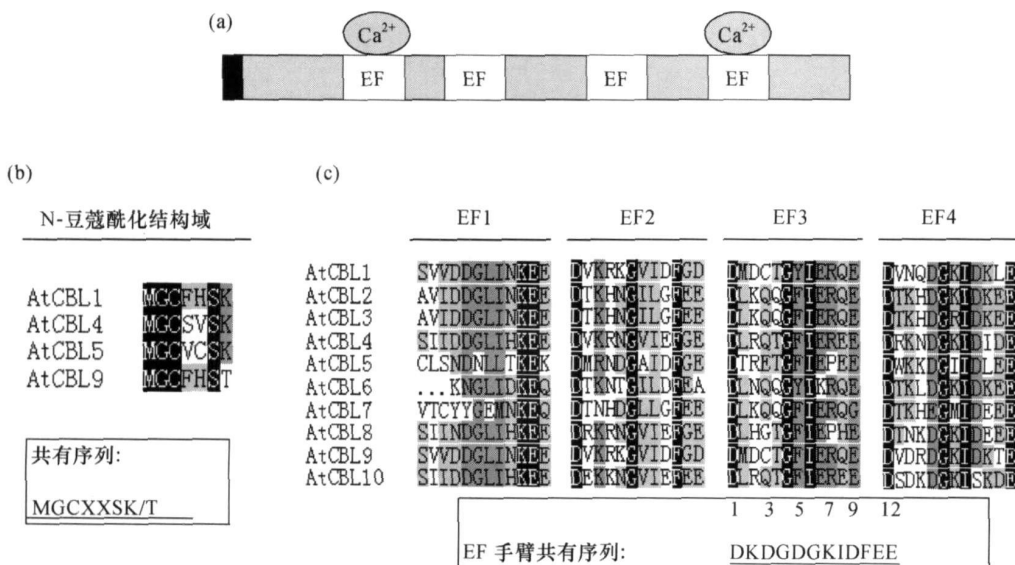


图 1 AtCBL 结构域及组成

(a) AtCBL 结构域示意图: 黑色方框表示 4 种 *CBL* 具有保守的 N 端 豆蔻酰化结构域; EF 方框表示 AtCBL 具有 4 个 EF 手臂, 其中第 1 和第 4 个结合  $\text{Ca}^{2+}$  (AtCBL2). (b) 4 个 AtCBL 的 N 端 豆蔻酰化结构域序列及共有序列. (c) 比对 10 个 AtCBL 的 EF-hand 序列并列出共有序列<sup>[7, 10]</sup>

*CBL* 作为 sensor relay, 具有较保守的 N-豆蔻酰化结构域 (N-myristoylation motif) (图 1(a), (b)). 豆蔻酰化是一种翻译后修饰作用, 对 *CBL* 功能实现具有重要意义. 主要在 *CBL* 蛋白 N 端共有序列 MGCXXSK/T 的第 2 个甘氨酸残基发生豆蔻酰化, 然而豆蔻酰化的 *CBL* 与细胞膜作用较弱. 为此, 在第 3 个半胱氨酸残基附上棕榈酰化 (palmitoyl) 结构, 加强了与细胞膜的结合<sup>[13]</sup>. 研究表明, 拟南芥 *CBL* 家族中有 4 个成员具有保守的 N-豆蔻

酰化结构域, 分别是 AtCBL1, AtCBL4, AtCBL5 和 AtCBL9 (图 1(b)). 在 SOS 信号系统中, 证明 CBL4/SOS3 的 N-豆蔻酰化结构域是实现其耐盐性所必需的. 但对于不具备 N-豆蔻酰化结构域的 AtCBL10, 在 N 端具有 21 个氨基酸组成的疏水结构域, 通过跨膜作用仍可结合在细胞膜上<sup>[14]</sup>. 可见, 不论 N-豆蔻酰化还是疏水结构域, 都有利于 *CBL* 结合在细胞膜上实现  $\text{Ca}^{2+}$  信号传导.

## 1.2 CIPK 蛋白激酶家族及其结构特征

CIPK 是植物特有、CBL 特定靶向的一类丝氨酸—苏氨酸蛋白激酶<sup>[15, 16]</sup>。目前鉴定出拟南芥 CIPK 家族有 25 个成员, 水稻有 30 个 CIPKs。分析这两个典型家族发现, CIPKs 可分为具有内含子和不具有内含子两大亚族<sup>[7]</sup>(图 2)。通过转录表达和功能分析表明, CIPK 基因是否含有内含子与其响应逆境胁迫没有明显关系<sup>[17]</sup>。

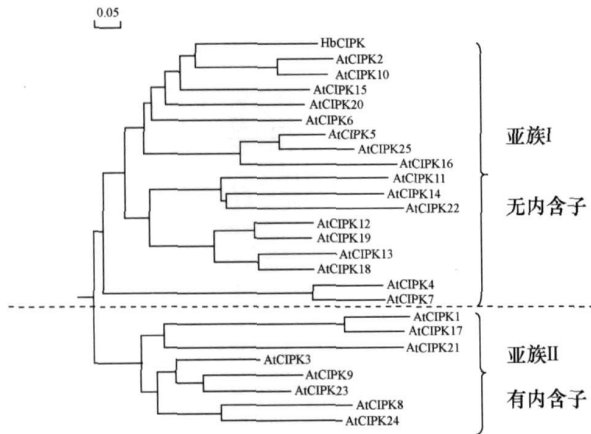


图 2 AtCIPKs 与 HbCIPK 比较进化树

AtCIPKs 序列根据文献 [7] 提供的序列登陆号在数据库查询而得, 基因 *HbCIPK* 由本实验室克隆(GenBank 登陆号: EF538762), 本进化树通过 DNAMAN 软件制作

该蛋白激酶家族在 N 端含有一个在结构上与酵母 SNF1 (sucrose non-fermenting)、动物 AMPK (AMP-activated protein kinase) 极其相似的激酶催化域, 该结构域高度保守。就拟南芥和水稻而言, 氨基酸序列相似性为 51%—90%; 而在 C 端含有一个高度变异(24%—58%)新的调控域<sup>[10]</sup>(图 3(a))。由于 CIPK 家族 N 端结构与其他激酶极其相似, CIPKs 被认为是植物 SNF1-类似激酶(SnRK)三大亚族之一, 即 SnRK3 亚族<sup>[18]</sup>。

CIPKs 结构域分布及特点是其功能的基础。所有 CIPK 的 N-激酶催化域含有一个典型的激活环(activation loop), 该环位于保守的 DEF 和 APE 序列之间(图 3(b))。在环中有 3 个高度保守的氨基酸残基, 即丝氨酸(S), 苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)(图 3(b))。突变分析表明, 将其中任何一个残基改变为天门冬氨酸(D), 都将组成型离体激活 CIPKs<sup>[19, 20]</sup>。这表明激活环的多个磷酸化位点对(某些)CIPK 活性的激活起

重要作用。是否这 3 个残基也是 CIPK 活体激活的靶位点, 有待于进一步证明。但这种依赖于磷酸化激活 CIPKs 活性的机制, 表明存在其他 CIPK-磷酸化激酶, 而且有可能与其他信号途径, 如 CDPKs 或 MAPKs 形成交叉<sup>[7]</sup>。

所有 CIPK 的 C-调节域含有一个高度保守的 FISL motif<sup>[19, 21]</sup>, 也称为 NAF motif<sup>[10]</sup>, 由 21 个氨基酸组成, 其中 A, F 和 L 残基在 25 个 AtCIPKs 中完全保守, FISL 或 NAF motif 由此而得名(图 3(c))。FISL motif 主要用于结合 CBLs。FISL motif 序列变异较大, 这可能决定了不同 CIPK 与 CBL 作用的特异性, 但同时其附近的序列也可能对二者特异性结合起一定作用<sup>[22]</sup>。另外, FISL motif 与 CIPK 催化域分子内结合, 对 CIPKs 活性具有自我抑制作用。CBLs 与 FISL motif 结合, 可解除这种自我活性的抑制<sup>[19]</sup>。

紧邻 FISL motif 是相对保守的 PPI (protein phosphatase interaction) motif, 主要负责 CIPKs 与 2C 型蛋白磷酸酶之间的相互作用<sup>[24]</sup>(图 3(a))。该 motif 由 37 个氨基酸组成, 其序列的变异性在一定程度上决定了与 2C 型蛋白磷酸酶 ABI1 (ABA-insensitive 1) 或 ABI2 (ABA-insensitive 2) 作用。同时, 与 PPI 相互作用的 ABI 互补功能域变异程度也决定了与 CIPKs 作用的特异性。结合于 CIPK 的蛋白磷酸酶 ABI 是否对 CIPK 具有去磷酸化作用, 并需要其他蛋白激酶或磷酸酶进行反磷酸化以实现其功能, 目前还不清楚。总之, 结合 CBL、CIPK 活性的激活及结合蛋白磷酸酶是 CBL-CIPK 复合体传递  $Ca^{2+}$  信号、作用靶蛋白的基础, 也是该信号系统的重要特点。

## 2 CBL-CIPK 信号通路的激活与表达特点

### 2.1 CBL-CIPK 信号通路的激活

CBL-CIPK 信号通路的开与关不仅在于两个信号成分的相互作用, 而且关键在于 CIPK 是如何被激活的。在没有 CBLs 的情况下, 离体 CIPKs 几乎没有任何活性。将 activation loop 高度保守的 Thr(T) 残基(在 SOS2 为 T<sup>168</sup>) 通过点突变为 Asp(D), 该激酶表现为组成型激活状态; 另外, 通过突变将自我抑制 CIPK 活性的 FISL motif 去除后, 该激酶也表现出独立于 CBL 的组成型激活活性; 当同时将 FISL motif 突变去除、且残基 T 突变为 D 时, 该激酶表现出超活性<sup>[19, 20]</sup>。在植物体内 CIPK 实际上是如何被激活

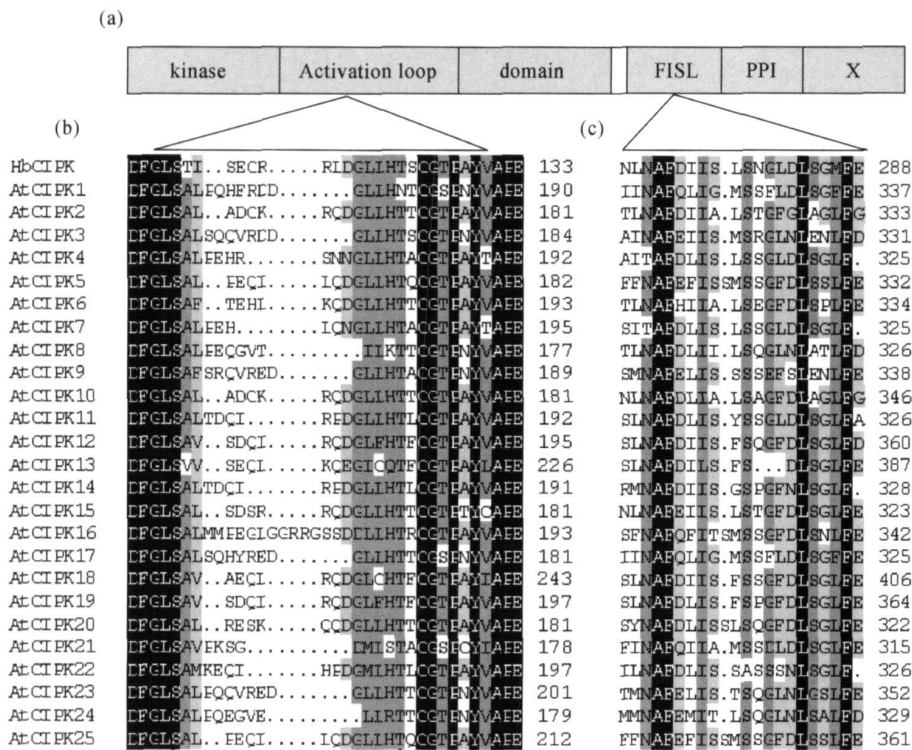


图 3 AtCIPK 结构域与组成

(a) AtCIPK 结构域示意图: AtCIPK 蛋白在 N 端含有一个保守的激酶催化域 而在 C 端含有一个调节域, 二者之间用白色框示意的是连接域; 在 N 端催化域有一个典型的功能激活环, 在 C 端调节域含有 FISL 或 NAF 结构(用于与 AtCBLs 作用)、PPI 结构(用于与 2C 型磷酸蛋白酶作用)和一个位于 C 末端功能未知的结构(用 X 表示). (b) 所有 AtCIPK 蛋白激活环序列与 HbCIPK 蛋白相应序列的比较, 在此 3 个高度保守的氨基酸残基 (S, T 和 Y)用星号标注. (c) 所有 AtCIPK 蛋白 FISL 序列<sup>[8, 11, 23]</sup>与 HbCIPK 蛋白相应序列的比较

的, 又如何激活该信号通路? 根据离体试验, Gong 等初步建立了活体激活模型(图 4):  $Ca^{2+}$ -CBL 复合体与 CIPK 的 FISL motif 结合, 可解除 CIPK 自我抑制, 是 CIPK 激活机制之一, 但二者作用必须依赖于  $Ca^{2+}$ ; 而且激活环中 Thr 等残基被其他蛋白激酶磷酸化, 也是 CIPK 激活机制之一, 但这种激活独立于 CBL 的结合; 更多研究者认为, 可能两种机制同时发生或作用, 构成  $Ca^{2+}$ -CBL-CIPK 信号通路<sup>[11]</sup>.

### 2.2 CBL-CIPK 信号成分的表达特点

CBL-CIPK 信号成分参与多种信号途径. 了解 CBL/CIPK 基因表达和蛋白亚细胞定位的多样化和特殊性, 对明确信号成分功能的多样性、特异性、CBL-CIPK 信号途径的复杂性及不同信号途径的交叉具有重要作用. CBL/CIPK 基因表达和蛋白亚细胞定位受生物、非生物逆境(如高盐、低温、干旱、高

pH 等)和植物激素等多种因素调控. 同时部分基因具有组织和发育阶段表达特异性.

CBL/CIPK 基因家族的不同成员具有不同的基因表达特点和蛋白亚细胞定位情况. 比如, 氨基酸序列相似性达到 90% 的 AtCBL1 和 AtCBL9 在大部分组织都表达, 但在根部局限于根尖生长区; 二者无明显的发育阶段表达特异性<sup>[9, 25]</sup>. 干旱、高盐、低温和外源 ABA 胁迫都可诱导 CBL1 基因表达<sup>[6]</sup>, CBL1 基因突变后对逆境胁迫更加敏感, 而对外源 ABA 处理没有反应<sup>[26]</sup>; 相反, CBL9 不仅被外源 ABA 强烈诱导表达, 而且突变体对外源 ABA 敏感程度也增加<sup>[9]</sup>. 二者蛋白均具有 N-豆蔻酰化, 即磷脂修饰结构, 蛋白亚细胞定位于细胞膜<sup>[27]</sup>. 而且它们都具有相同的 CIPK1<sup>[28]</sup>, CIPK23<sup>[29]</sup> 靶蛋白. 表明 AtCBL1 和 AtCBL9 在功能上有一定冗余, 但也

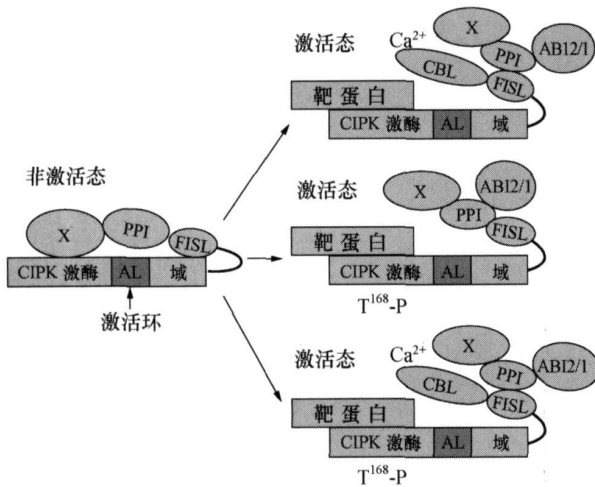


图 4 CIPK 蛋白活体激活模型

CIPKs 功能域组成如图 3 所示。该激酶因催化域和调控域分子内作用处于失活状态(左)。在植物体内,当  $\text{Ca}^{2+}$ -CBL 复合体与 FISL 结合后,该激酶被激活(右上);当激活环中第 168 位(SOS2)保守残基 T 被磷酸化,该激酶也表现出独立于 CBL 的组成型激活状态(右中);或者当二者同时存在时,该激酶处于激活状态(右下)<sup>[11]</sup>

存在一定功能特异性。作为它们的作用激酶之一的 CIPK1/CIPK23, 通过基因表达分析发现二者基因组织表达特异性与 *CBL1/CBL9* 类似, 主要在根部生长区和维管组织, 特别是 CIPK23 在低  $\text{K}^+$  胁迫时被强烈诱导表达; 蛋白亚细胞定位分析表明, CIPK1/CIPK23 分布于细胞质, 这与其不具有细胞膜定位结构一致<sup>[27, 28]</sup>。当蛋白激酶与  $\text{Ca}^{2+}$  感受器 CBL1/CBL9 作用时, 一部分被结合于细胞膜上, 一部分滞留于细胞质。

同样, 氨基酸序列相似性为 92% 的 *CBL2* 和 *CBL3* 对逆境胁迫都没有响应, 但对光有响应<sup>[30]</sup>; 且二者作用于相同的 CIPK11 靶蛋白<sup>[31, 32]</sup>。尽管二者都不具有豆蔻酰化磷脂修饰结构, 但 CBL2/CIPK11 复合体可调控细胞膜  $\text{H}^+$ -ATPase 活性<sup>[31]</sup>。关于 CBL2 在细胞膜的定位机制, 目前还不清楚。CIPK11 基因表达具有明显的组织特异性, 主要在根部及维管组织表达, 这与其及时调控根部酸碱平衡作用有关。CIPK11 基因转录水平在干旱、高盐、ABA 和糖胁迫下明显增加, 但对持续低温没有反应; 相反, 在持续高 pH 胁迫下表达水平降低<sup>[31]</sup>。这表明 CIPK11 可能负调控植物细胞内酸碱平衡。

对于氨基酸序列相似性低于 60% 的 *CBL4/SOS3* 和 *CBL10* 具有明显不同的组织表达特异性。*CBL4* 主要在根(特别是根尖)表达, 其他部位不表达; 相反, *CBL10* 仅在茎叶表达, 在根部不表达。二者都参与盐敏感 SOS 信号途径, 但分别调控植株不同部位的  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  离子平衡<sup>[14]</sup>。二者作用的蛋白激酶是 SOS2/CIPK24, 该基因在根和茎叶都表达, 进一步说明 CBL-CIPK 信号成分的基因表达特点与其功能相关。

### 3 CBL-CIPK 信号系统在植物应答逆境胁迫中的功能

理论上, 拟南芥基因组中 10 种 CBL 与 25 种 CIPK 可以组合成 250 种信号通路, 为充分应对各种环境胁迫、病虫害、机械损伤、植物激素刺激及生长发育需求, 提供了全方位解密  $\text{Ca}^{2+}$  信号、激活下游目标基因以满足植株生长的 CBL-CIPK 信号系统。因此, CBL-CIPK 信号途径具有复杂多样的功能, 构成各种信号交叉传导的信号网络或系统。但部分 CBL-CIPK 信号途径不乏具有某种特异性功能。目前, 已鉴定出部分 CBL-CIPK 信号系统成分, 并解析了该信号系统在植物应答逆境胁迫中的功能(图 5)。

#### 3.1 SOS 信号途径

SOS 信号途径主要是植物应答高盐胁迫的一种 CBL-CIPK 信号途径<sup>[32]</sup>。最初, 通过正向遗传学筛选和图位克隆获得其中的两个信号成分, 即  $\text{Ca}^{2+}$  感受器 SOS3/CBL4 和作用激酶 SOS2/CIPK24<sup>[5, 16]</sup>。功能分析表明, 盐胁迫引发细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度改变, 定位于细胞膜的 SOS3 结合  $\text{Ca}^{2+}$  后作用于 SOS2, 被激活的 SOS3-SOS2 复合体磷酸化细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  逆转载体 SOS1, 最终 SOS1 将细胞内多余的  $\text{Na}^+$  排到体外以维持细胞内  $\text{Na}^+$  平衡<sup>[33]</sup>。由于 SOS3/CBL4 局限于根部表达, SOS3-SOS2-SOS1 信号途径可能主要在根部起作用<sup>[19]</sup>。SOS 途径是首例依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  信号的植物应答逆境胁迫 CBL-CIPK 信号途径<sup>[21]</sup>。

最近研究表明, SOS3-SOS2 复合体还调控液泡膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  逆转载体, 将细胞内多余的  $\text{Na}^+$  区隔化到液泡中, 再次实现细胞内  $\text{Na}^+$  平衡<sup>[34]</sup>。其次,

SOS2/CIPK24 可调控细胞膜  $H^+ - Ca^{2+}$  逆转载体 CAX1, 以维持细胞内  $Ca^{2+}$  平衡, 但研究表明 CAX1 的调控独立于 SOS3/CBL4<sup>[35]</sup>, 很可能是 SOS2/CIPK24 通过与其他 CBL 感受器作用来实现此功能的. 此外, SOS 耐盐信号途径还通过 SOS1 与 RCD1 蛋白作用, 应答由盐害引起的氧化胁迫<sup>[36]</sup>. 表明 SOS1 是盐信号通路中  $Na^+$  与氧化胁迫信号传导的交叉节, SOS 途径不仅可实现离子平衡, 还具有去氧化作用.

除 CBL4/SOS3 外, CBL10 还可激活 SOS2/CIPK24, 作用于相同的下游目标蛋白 SOS1, 但二者调控不同组织内  $Na^+$  平衡. 功能分析表明, CBL10-CIPK24-SOS1 主要调控茎叶内  $Na^+$  平衡, 而 CBL4-CIPK24-SOS1 调控根部<sup>[14]</sup>; 也有研究表明, CBL10-CIPK24 复合体主要与  $Na^+$  区域化有关<sup>[37]</sup>. 另外, CBL1 可与 CIPK24 作用, 参与  $Na^+$  调控<sup>[7]</sup> (图 5).

应答高盐胁迫的 CBL-CIPK 信号系统具有复杂性和多样性. 不同的  $Ca^{2+}$  感受器作用于相同的激酶蛋白、相同的 CBL-CIPK 复合体磷酸化不同的下游蛋白, 通过这种多样化的组合方式解密了来自盐胁迫(包括离子、氧化及渗透胁迫)的不同  $Ca^{2+}$  信号.

### 3.2 应答低 $K^+$ 胁迫的信号途径

最近, 武维华实验室和 Luan 实验室同时鉴定出一个类似于 SOS, 对低  $K^+$  胁迫响应的 CBL-CIPK 信号系统<sup>[27, 29]</sup>. 低  $K^+$  胁迫下根部转录水平显著增加的蛋白激酶 CIPK23 与上游两个  $Ca^{2+}$  感受器 CBL1 和 CBL9 同时作用, 翻译后激活下游目标蛋白, 即细胞膜  $K^+$  通道蛋白 AKT1, 形成  $Ca^{2+}$ -CBL1/CBL9-CIPK23-AKT1 信号通路(图 5). 除通过体外酵母双杂交、活体生物分子荧光互补实验验证这些蛋白分子间的相互作用, 还通过爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞 Voltage-clamp 和拟南芥根原生质体 Patch-clamp 记录, 进一步证明该信号通路具有活体生物学功能. 只有 CBL1 和 CBL9 同时功能缺失的表型, 才与 CIPK23 突变体表型相似, 说明二者功能确实存在冗余. 但 CBL9 涉及依赖于 ABA-信号传导途径<sup>[9]</sup>, 而 CBL1 独立于 ABA-信号传导途径<sup>[29]</sup>. 因此, 推测 CBL9-CIPK23 复合体通过依赖于 ABA 的  $Ca^{2+}$  信号调控 AKT1, 而 CBL1-

CIPK23 复合体解密不依赖于 ABA 的  $Ca^{2+}$  信号, 从而精细调控细胞内  $K^+$  平衡<sup>[38]</sup>. 另外, 该信号途径与 SOS3-SOS2-SOS1 途径相似, 主要调控根部  $K^+$  吸收及运输<sup>[39]</sup>; 而且 CBL1/CBL9-CIPK23 复合体通过磷酸化和去磷酸化 AKT1 控制  $K^+$  通道的开与关<sup>[40]</sup>. Li 等解释了 CBL-CIPK 信号系统在应答低  $K^+$  胁迫中的工作模型, 即低  $K^+$  条件可引发细胞内活性氧物质增加, ROS 进一步引发  $Ca^{2+}$  浓度改变, 然后被 CBL-CIPK 解密并传导, 通过翻译后磷酸化细胞膜 AKT1 以调控细胞内  $K^+$  平衡<sup>[29]</sup>. 由此表明, 低  $K^+$  胁迫与氧化胁迫信号途径可能存在交叉.

CIPK 家族中的另一个成员 CIPK9 不仅对盐、低温和渗透胁迫有响应, 在  $K^+$  胁迫下转录水平也显著增加. 与 CIPK23 不同的是, 在根部和茎叶都增加. T-DNA 插入的敲除系在低  $K^+$  条件下生长不正常, 但根和茎叶中的  $K^+$  含量与野生型相同<sup>[38]</sup>, 说明 CIPK9 与上游某一未知 CBL 作用, 有可能通过翻译后激活液泡膜  $K^+$  通道蛋白, 调控茎叶和根中的  $K^+$  平衡<sup>[41]</sup>. 可见, 低  $K^+$  胁迫引发的  $Ca^{2+}$  信号可被多种 CBL 感知, 并与 CIPK 形成不同复合体, 调控下游  $K^+$  通道的开与关, 最终实现不同组织部位  $K^+$  平衡(图 5).

### 3.3 应答高 pH 胁迫的信号途径

Zhu 实验室首次鉴定出植物应答高 pH 胁迫的  $Ca^{2+}$ -CBL2-CIPK11-PM  $H^+$ -ATPase 信号通路<sup>[31]</sup> (图 5). 该信号通路与以上两种通路相比, 在 3 方面值得注意: (i) CBL2-CIPK11 复合体负调控细胞膜氢泵-ATPase, 而以上两种通路正调控细胞膜靶蛋白. PM  $H^+$ -ATPase 有两个磷酸化靶位点, 其中位点 Thr947 被未知激酶磷酸化后结合于蛋白 14-3-3, 并被激活; 而位点 Ser931 是 CBL2-CIPK11 复合体磷酸化靶位点. 但该位点磷酸化可阻止 PM  $H^+$ -ATPase 与蛋白 14-3-3 作用, 使得 PM  $K^+$ -ATPase 处于失活状态. (ii) CBL2-CIPK11 复合体在细胞膜磷酸化 PM  $H^+$ -ATPase. 与 CBL4、CBL1 和 CBL9 不同, CBL2 不具有 N-豆蔻酰化磷脂修饰结构, 但仍可能把 CIPK11 招募到细胞膜, 就近磷酸化 PM  $H^+$ -ATPase 蛋白. 该感受器可能具有与 CBL10 相似的疏水跨膜结构, 有利于结合于细胞

膜。(iii) CIPK11 是植物响应逆境胁迫信号系统中典型的不具有内含子的信号成分, 而其他信号通路中编码作用激酶的 CIPK 基因都具有内含子, 表明

CIPK 基因是否具有内含子与其对逆境胁迫响应功能无关。

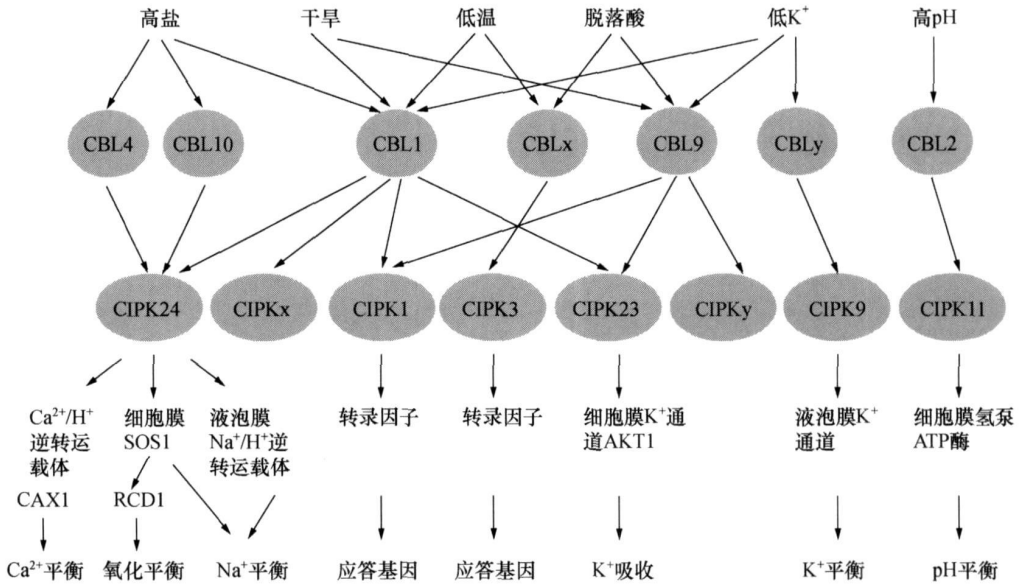


图 5 植物应答逆境的 CBL-CIPK 信号途径

### 3.4 应答其他逆境的信号途径

目前研究表明, 干旱引发的  $Ca^{2+}$  信号可被 CBL1 和 CBL9 感知, 与它们感知低  $K^+$  信号不同的是, 二者特异结合 CIPK1 以传导  $Ca^{2+}$  信号. CIPK1 正向调控不依赖于 ABA 的 CBF 家族成员, 负向调控依赖于 ABA 的 CBF 家族成员, CBF 转录因子进一步调控下游应答基因表达以实现渗透平衡. CIPK1 被认为是依赖于 ABA 和不依赖于 ABA 信号途径的交叉节点<sup>[27]</sup> (图 5). 由于 CBL1 参与不依赖于 ABA 的  $Ca^{2+}$  信号途径<sup>[25, 26]</sup>, 由干旱、盐害、低  $K^+$  和低温引发的不依赖于 ABA 的  $Ca^{2+}$  信号均可被 CBL1 感知. 而 CBL9 参与依赖于 ABA 的  $Ca^{2+}$  信号途径<sup>[9]</sup>, 干旱、低  $K^+$  与外源 ABA 胁迫均可引发依赖于 ABA 的  $Ca^{2+}$  信号, 该信号被 CBL9 感知, 通过作用于不同的 CIPK 将信号传递下去. 可见, CBL1 和 CBL9 是具有多样化功能的  $Ca^{2+}$  感受器; 同时, 二者又是多种逆境胁迫信号途径的限速因子.

低温引发的  $Ca^{2+}$  信号不仅被 CBL1 感知, 还被其他 CBL 感知 (图 5). 因为根据 CIPK3 基因表达和功能敲除分析表明, CIPK3 正向调控 ABA 和低

温诱导的胁迫基因的表达, CIPK3 也是依赖于 ABA 和不依赖于 ABA 信号途径的交叉节点, 主要通过调控不同转录因子以实现不同功能<sup>[42]</sup>.

总之, CBL-CIPK 信号系统在植物应答逆境胁迫中的机制, 实质上是通过  $Ca^{2+}$  感受器 CBLs 和作用激酶 CIPKs 组合解析逆境  $Ca^{2+}$  信号的过程. 其功能本质上是, 将逆境  $Ca^{2+}$  信号传递到终端, 调控下游胁迫响应基因的表达, 最终达到某种胁迫平衡或适应. 由于不同逆境本身之间存在信号交叉, 而且某一逆境可能产生多种  $Ca^{2+}$  信号, 加之不同感受器可能存在功能上的冗余, 及不同作用激酶有可能结合同一感受器, 使得整个 CBL-CIPK 信号系统变得复杂化、多样化. 但同时, 由于植物体内具有多种供解密  $Ca^{2+}$  信号的 CBL-CIPK 组合, 且 CBL 与 CIPK 作用具有特异性. 因此, 依赖于  $Ca^{2+}$  的 CBL-CIPK 信号系统也相当精细且特异. 另外, 在植物体内还存在其他  $Ca^{2+}$  信号途径 (如 CDPK 或 MAPK), 相信不仅不同 CBL-CIPK 信号途径存在交叉, 而且 CBL-CIPK 信号系统与其他  $Ca^{2+}$  信号途径也存在交叉. 概括地说, CBL-CIPK 信号系统具有特异性、多样性、复杂性和交叉性.

## 4 CBL-CIPK 信号系统在植物抗逆改良中的应用与展望

CBL-CIPK 信号成分的挖掘和功能鉴定, 不仅有助于解析植物在应答逆境胁迫中的分子机制, 同时为通过基因工程快速高效改良作物抗逆性提供了可能性。

### 4.1 CBL-CIPK 信号系统的应用

随着拟南芥 CBL-CIPK 信号系统研究逐渐深入, 非模式植物 CBL-CIPK 信号成分的鉴定和功能分析也逐渐展开。

目前鉴定出水稻基因组中含有 10 个 CBLs 和 30 个 CIPKs, 理论上比拟南芥具有更多的 CBL-CIPK 组合, 有可能解析更复杂的  $Ca^{2+}$  信号。Xiang 等调查了水稻中 30 个 CIPKs 对逆境胁迫的响应, 其中 20 个至少响应干旱、高盐、低温和 ABA 等胁迫中的一种, 响应干旱和高盐的 OsCIPKs 对 ABA 胁迫也有响应, 但对低温没有响应。通过转化水稻过量表达分析, 3 个 OsCIPKs 分别具有提高抗寒性、抗旱性和耐盐性的作用<sup>[17]</sup>。研究发现, 一些 CBL-CIPK 信号途径在不同物种间具有一定的保守性, 如水稻中已鉴定出较保守的 SOS 信号途径<sup>[43]</sup>; 从盐生胡杨 (*Populus euphratica*) 中克隆到的 *Pe-SOS1* 基因与拟南芥 *AtSOS1* 功能相同<sup>[44]</sup>; 从玉米中克隆到的与拟南芥 *AtCBL4* 同源基因具有耐盐性<sup>[45]</sup>。

尽管通过生物信息学根据模式植物已知的信号成分可初步分析同源基因, 但同源基因对逆境响应和生物学功能还视物种具体表现而定。如烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中与拟南芥 *AtCIPK23* 同源基因在氧化胁迫下转录水平显著增加<sup>[46]</sup>。与 *AtCIPK12* 相似的小麦和玉米同源基因对不同逆境的响应不同<sup>[47]</sup>。从豌豆 (*Pisum sativum*) 中克隆鉴定出的 *PsCBL* 与 *AtCBL3* 同源性较高, 对高盐和低温有响应, 但对干旱和 ABA 胁迫没有响应<sup>[48]</sup>。这进一步说明同源性较高的 CBL-CIPK 信号成分在不同物种可能具有不同的功能。

目前, 改良作物抗逆性的一般途径是转化与抗逆性有关的单个基因, 尚缺少调控植物抗逆性的关键基因, 有时这有可能成为改良作物抗逆性的瓶

颈。然而, 利用 CBL-CIPK 信号成分提高植物抗逆性有以下几方面优点: (i) CBL-CIPK 信号系统是植物逆境胁迫响应的关键途径, CBL-CIPK 信号成分是关键调控基因; (ii) CBL-CIPK 信号成分可能参与并调控多种逆境胁迫响应, 转化后可调控多种抗逆性; (iii) CBL-CIPK-靶基因形成完整的信号通路, 不仅单个信号成分过量表达可提高植物抗逆性, 而且多个信号成分同时过量表达可显著提高植物抗逆性<sup>[33]</sup>。因此, CBL-CIPK 信号成分有可能是通过基因工程快速高效改良作物抗逆性的重要基因源, 并有望结合分子设计育种定向高效聚合多种抗逆性。

### 4.2 展望

尽管对高盐、低  $K^+$  和高 pH 响应的 CBL-CIPK 信号系统研究取得重要进展, 但仍有待于通过突变体或功能敲除鉴定出更多的信号成分, 并解析其在逆境胁迫响应中的功能。同时需要进一步分析不同逆境  $Ca^{2+}$  信号之间的交叉作用, 包括不同 CBL-CIPK 信号途径之间的交叉、CBL-CIPK 信号系统与 CDPK、MAPK 信号系统之间的交叉作用。其次, 除拟南芥外, 其他非模式植物的  $Ca^{2+}$ -CBL-CIPK 信号途径仍然不清楚, 尽管有可能这些信号成分和信号途径在不同物种间有一定的保守性, 但一些特殊生境植物可能具有解密逆境  $Ca^{2+}$  信号的特殊途径。挖掘克隆特殊生境植物信号成分, 解析其在逆境胁迫中的作用, 对有效利用基因资源改良作物抗逆性具有重要意义。

从特殊生境(如盐生、旱生或酸碱性土壤)植物克隆逆境条件下显著差异表达的编码 CBL-CIPK 信号成分基因, 有可能获得具有某种特定功能的 CBL-CIPK 信号成分。本实验室通过 cDNA-AFLP 从盐生牧草-野大麦 (*Hordeum brevisubulatum*) 中鉴定出一个与逆境应答有关的 *HbCIPK* 基因 (GenBank No. EF538762), 其推导氨基酸序列表明, 该蛋白具有与 AtCIPKs 相似的激活环、FISL 和 PPI motif (图 3), 与 AtCIPK2、AtCIPK10 同源性较高 (图 2)。该基因不具有内含子, 在根、茎叶都表达, 在高盐和干旱等逆境胁迫下转录水平明显增加, 而对低温胁迫则没有响应, 预测 *HbCIPK* 可能参与依赖于 ABA 的应答逆境  $Ca^{2+}$  信号途径 (待发表)。



同时, 我们实验室拟克隆盐胁迫下差异表达的  $\text{Ca}^{2+}$  离子感受器和细胞膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  逆转运载体, 并研究这些蛋白之间的相互作用, 试图探索分析野大麦应答盐胁迫 CBL-CIPK 信号途径。

因此, 全面分析鉴定植物 CBL-CIPK 信号成分, 解析植物应答逆境胁迫的信号途径, 特别是挖掘特殊生境植物 CBL-CIPK 信号成分, 为通过基因工程结合分子设计育种途径快速高效改良植物抗逆性提供重要途径。

### 参 考 文 献

- Xiong LM, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14: 165—183
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, et al. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 2002, 14: 401—417
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, et al. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: 389—400
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF. CDPKs: A kinase for every  $\text{Ca}^{2+}$  signal? *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 317—319
- Liu J, Zhu JK. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 1998, 280: 1943—1945
- Kudla J, Xu Q, Harfter K, et al. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4718—4723
- Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol*, 2004, 134: 43—58
- Batistic O, Kudla J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*, 2004, 219: 915—924
- Pandey GK, Cheong YH, Kim KN, et al. The calcium sensor calcineurin B-Like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16: 1912—1924
- Albrecht V, Ritz O, Linder S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated kinases. *EMBO J*, 2001, 20: 1051—1063
- Gong D, Guo Y, Schumaker KS, et al. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 134: 919—926
- Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, et al. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2003, 278: 42240—42246
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 2000, 12: 1667—1677
- Quan RD, Lin HX, Mendez J, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell*, 2007, 19: 1415—1431
- Shi JR, Kim KN, Ritz O, et al. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11: 2393—2405
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3730—3734
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L. Characterization of stress responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1416—1428
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, et al. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 2003, 132: 666—680
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, et al. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 2001, 13: 1383—1399
- Gong D, Guo Y, Jagendorf A, et al. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol*, 2002, 130: 256—264
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3735—3740
- Kim KN, Cheong YH, Gupta R, et al. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1844—1853
- Gong D, Gong Z, Guo Y, et al. Expression, activation, and biochemical properties of a novel *Arabidopsis* protein kinase. *Plant Physiol*, 2002, 129: 225—234
- Ohta M, Guo Y, Halfter U, et al. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11771—11776
- Cheong YH, Kim KN, Pandey GK, et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15: 1833—1845
- Albrecht V, Weinl S, Blazevic D, et al. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant J*, 2003, 36: 457—470
- Xu J, Li HD, Chen LQ, et al. A protein kinase interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates  $\text{K}^+$  transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 2006, 125: 1347—1360
- D'Angelo C, Weinl S, Batistic O, et al. Alternative complex formation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Ar-*

- bidopsis. *Plant J*, 2006, 48 (6): 857—872
- 29 Li L, Kim BG, Cheong Y H, et al. A  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway regulates a K channel for low- $\text{K}^+$  response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (33): 12625—12630
- 30 Nozawa A, Koizumi N, Sano H. An Arabidopsis SNF1-related protein kinase AtSRK1 interacts with a calcium binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light. *Plant Cell Physiology*, 2001, 42: 976—981
- 31 Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, et al. Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane  $\text{K}^+$ -ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell*, 2007, 19: 1617—1634
- 32 Jeong HJ, Jwa NS, Kim KN. Identification and characterization of protein kinases that interact with the CBL3 calcium sensor in Arabidopsis. *Plant Sci*, 2005, 169: 1125—1135
- 33 Qiu QS, Guo Y, Dietrich M, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8436—8441
- 34 Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, et al. Regulation of vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279: 207—215
- 35 Cheng NH, Pittman JK, Zhu JK, et al. The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J Biol Chem*, 2004, 279: 2922—2926
- 36 Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Kim K, et al. The plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18816—18821
- 37 Kim BG, Waadt R, Cheong YH, et al. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *Plant J*, 2007, 52 (3): 473—484
- 38 Hedrich R, Kudla J. Calcium signaling networks channel plant  $\text{K}^+$  uptake. *Cell*, 2006, 125: 1221—1223
- 39 Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, et al. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *Plant J*, 2007, 52(2): 223—239
- 40 Lee SC, Lan WZ, Kim BG, et al. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(40): 15959—15964
- 41 Amtmann A, Armengaud P. The role of calcium sensor-interacting protein kinases in plant adaptation to potassium-deficiency: New answers to old questions. *Cell Res*, 2007, 17: 483—485
- 42 Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, et al. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2003, 15: 411—423
- 43 Marfnez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, et al. Conservation of the SOS salt tolerance pathway. *Plant Physiology*, 2007, 143 (2): 1001—1012
- 44 Wu Y, Ding N, Zhao X, et al. Molecular characterization of *PeSOS1*: The putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 1—11
- 45 Wang M, Gu D, Liu T, et al. Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in Arabidopsis confers salt tolerance. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(6): 733—746
- 46 Vranova E, Atichartpongkul S, Villarreal R, et al. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10870—10875
- 47 Ohba H, Steward N, Kawasaki S, et al. Diverse response of rice and maize genes encoding homologs of WPK4, an SNF1-related protein kinase from wheat, to light, nutrients, low temperature and cytokinins. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 359—366
- 48 Mahajan S, Sopory S K, Tuteja N. Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS Journal*, 2006, 273 (5): 907—925