

文章编号: 1000-4025(2013)12-2567-08

## 植物膜联蛋白的结构及功能研究进展

何美敬, 穆国俊, 侯名语, 陈焕英, 崔顺立, 杨鑫雷, 刘立峰\*

(河北农业大学 农学院, 教育部华北作物种质资源实验室, 河北省作物种质资源重点实验室, 河北保定 071001)

**摘要:**膜联蛋白是一类同源的水溶性多功能蛋白,可以在依赖和不依赖  $\text{Ca}^{2+}$  的环境下与内膜和质膜结合或形成跨膜结构,存在于部分原核生物以及全部的真核生物中,在大多数高等生物中以多基因家族形式存在。植物膜联蛋白在结构上通常只有第1和第4个重复单元是保守的;在功能上可以与细胞骨架结合,具有过氧化物酶活性、核酸水解酶活性和离子通道功能,参与响应盐、干旱、高低温、重金属、损伤等非生物胁迫以及真菌、病虫害等生物胁迫。膜联蛋白基因在植物体的大部分器官及整个生育期均有表达,并且表达量随着植株发育和内外环境的改变而变化,在植物的抗逆性反应中起重要作用。该文对近年来国内外有关植物膜联蛋白的结构和功能,尤其是其在植物逆境生理方面的相关研究进行综述,以期对植物膜联蛋白的深入研究和植物抗逆研究提供思路。

**关键词:**膜联蛋白;钙离子结合蛋白;离子通道;逆境胁迫

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Advances in Structure and Function of Plant Annexins

HE Meijing, MU Guojun, HOU Mingyu, CHEN Huanying, CUI Shunli, YANG Xinlei, LIU Lifeng\*

(North China Laboratory of Crop Germplasm Resources of Education Ministry, Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei, College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** Annexins are homologous, soluble and multifunctional proteins capable of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent binding to or insert into the membranes. Annexins exist in some prokaryotes and all eukaryotic phyla and always represent in high organisms as multiple gene family. The structure of plant annexins has only 1 or 2 repeats which are highly conserved (usually the first and the fourth). Functionally, plant annexins have the abilities of binding to cytoskeleton, hydrolysing ATP and GTP, acting as peroxidases or cation channels in response to abiotic stresses such as salinity, drought, high and low temperature, metal stress and wounding and biotic stresses such as fungi and pests. Annexins are expressed in a majority of plant organs and throughout the whole life cycle and varied with the body growth, development and environment change and play an important role in resistance to stress. In this paper, the known structure and function of plant annexins, especially the relationship between annexins and plant stress response were systematically summarized so as to offer an oriented suggestion for researches in plant annexins and stress resistance.

**Key words:** annexins; calcium-binding protein; cation channels; stresses

膜联蛋白(Annexins)是一类同源的水溶性多功能蛋白,存在于部分原核生物以及全部的起源于同一绿藻的真核生物类群中,往往以多基因家族形

式存在<sup>[1]</sup>。尽管从番茄中发现膜联蛋白已经20多年<sup>[2]</sup>,但与动物中的相关研究相比,植物膜联蛋白的研究却相对滞后。研究证明,植物膜联蛋白参与膜

收稿日期: 2013-09-26; 修改稿收到日期: 2013-11-29

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20121302110002); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-14); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2010136); 河北省专家出国培训项目

作者简介: 何美敬(1985-), 女, 博士, 主要从事花生遗传育种研究。E-mail: hemeijing85@163.com

\* 通信作者: 刘立峰, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事花生基因组学与分子育种研究。E-mail: liulifeng@hebau.edu.cn

结构建成、细胞壁生成、生物非生物胁迫响应、膜泡运输、细胞信号转导以及果实成熟等生理过程,对细胞生长、分化、分泌以及损伤修复都是必要的<sup>[1,3-9]</sup>。膜联蛋白在植物体内分布广泛,在植物生长发育调控及环境适应方面扮演着重要的角色。虽然在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[3]</sup>、棉花 (*Gossypium* spp)<sup>[10]</sup>、玉米 (*Zea mays*)<sup>[11-12]</sup>、番茄 (*Solanum lycopersicum*)<sup>[13]</sup>、灯笼椒 (*Capsicum annuum*)<sup>[14]</sup> 及苜蓿属 (*Medicago* L.)<sup>[15]</sup> 等众多植物中已有研究报道,但迄今只有拟南芥<sup>[3,16]</sup>、芥菜 (*Brassica juncea*)<sup>[17]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[18]</sup>、番茄<sup>[13,19]</sup> 和玉米<sup>[20-21]</sup> 等少数几种植物的膜联蛋白基因家族被克隆(表 1)。除某些藻类和酵母外,生物体内的膜联蛋白基因通常以多基因家族形式存在。高等植物膜联蛋白基因的表达在整个生育期内是动态的,并且表达量随着植株内外环境的改变而改变<sup>[3,6,16,22-24]</sup>。膜联蛋白基因在植物各个组织器官均有表达,如胚胎<sup>[23]</sup>,根系<sup>[3,16,25-29]</sup>,茎秆<sup>[3,28]</sup>,叶片<sup>[3,14,28,30]</sup>,棉花纤维<sup>[31]</sup> 以及花序<sup>[12,15,19]</sup>、果实器官<sup>[4,14,19,32-33]</sup>。同一个膜联蛋白基因在不同发育时期以及环境刺激下在植物细胞内的定位也有所不同<sup>[34]</sup>。以下就植物膜联蛋白结构和功能方面的研究进展情况进行综述,并对其研究前景给予展望,为相关研究者提供信息和资料。

## 1 膜联蛋白的结构

目前获得的植物膜联蛋白的结构比较浅显。系统进化树分析显示,植物膜联蛋白起源于绿藻并形成一个独立的分化枝<sup>[1]</sup>。植物膜联蛋白的分子量一般在 32~34 kD 之间,典型的结构一般由 4 个重复单元组成,每一个重复由大约 70 个氨基酸构成,含有一个 K-G-X-G-T-(38 个可变氨基酸残基)-D/E 的内联蛋白序列<sup>[35-36]</sup>。植物膜联蛋白通常只有第 1 个和第 4 个重复单元含有内联蛋白序列,位于第 2 和第 3 结构域上的钙离子结合位点选择性的缺失<sup>[24,35]</sup>。每个膜联蛋白结构域都可形成一个弯曲的圆盘。圆盘状结构的凸面含有的钙离子结合位

表 1 各植物膜联蛋白基因家族

Table 1 *Annexins* gene family of each plant

分类 Classification	物种 Species	膜联蛋白基因个数 The number of <i>Annexin</i>
双子叶植物 Dicotyledon	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	8 <sup>[3,16]</sup>
	芥菜 <i>B. juncea</i>	5 <sup>[6]</sup>
	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	9 <sup>[13,19]</sup>
单子叶植物 Monocotyledon	水稻 <i>O. sativa</i>	10 <sup>[18]</sup>
	玉米 <i>Z. mays</i>	4 <sup>[20-21]</sup>

点,当这个膜联蛋白与磷脂结合时,凸面与膜上的钙离子结合使其朝向细胞膜表面。凹面则是朝向细胞质基质一面,可使膜联蛋白与胞质中其他的蛋白以及其他的分子进行互作(图 1)<sup>[37]</sup>。

膜联蛋白 4 个重复单元在动物中至少有 3 个是高度保守的,而在植物中只有 1 或者 2 个(通常是第 1 个和第 4 个重复)是保守的<sup>[24,35]</sup>,大多数膜联蛋白结构上的差异存在于临近 N-末端的位置,在针对哺乳动物的研究中普遍认为 N-末端区域是不同膜联蛋白构造稳定性的调控区域,决定着膜联蛋白与其他蛋白之间的互作,因此对哺乳动物膜联蛋白功能多样性起着决定性作用<sup>[36]</sup>。与相对应的动物膜联蛋白相比,植物膜联蛋白的 N-末端往往要短 10 个氨基酸左右。如灯笼椒膜联蛋白(AnxCa32)的晶体结构显示植物膜联蛋白较短的 N-末端区域可以与其核心产生互作,说明植物膜联蛋白的 N-末端区域的一些调控功能是很保守的<sup>[14]</sup>。

## 2 膜联蛋白的功能

### 2.1 膜联蛋白能与质膜和肌动蛋白结合

动物膜联蛋白可以参与磷脂微结构的形成与信号传递,植物膜联蛋白也可能具有类似功能<sup>[38]</sup>。膜联蛋白与质膜结合有两种形式,一种是结合在质膜的表面,另一种是嵌入质膜的磷脂双分子层中形成跨膜结构<sup>[34]</sup>。膜联蛋白与钙离子的结合可以促进其与带负电荷的磷脂质的结合,包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸<sup>[39-40]</sup>。通过植物和动物膜联蛋白的比较研究发现,序列的严格保守性对于质膜结合的功能好像并不是必需的<sup>[39-40]</sup>。因此,虽然磷脂酰丝氨酸结合位点在植物中的保守性很低,但是很多植物膜联蛋白还是具有磷脂酰丝氨酸结合活性,例如,玉米、灯笼椒和棉花<sup>[10,14,39]</sup>。植物细胞中的疏水性互作同样与膜结合相关。如灯笼椒 AnxCa32 与质膜的结合涉及多种氨基酸残基与磷脂亲水基头及丙三醇骨架之间的氢键<sup>[10]</sup>。番茄膜联蛋白 Annexin35(AnxLe35)的定点突变表明其核心结构域的第 4 个重复对于脂类的结合是至关重要的<sup>[13]</sup>。膜联蛋白普遍的质膜结合功能为其离子通道功能提供了必要的前提。

另外,肌动蛋白对于维持细胞形态以及特定细胞类型的分化发育有着重要的作用,并且参与植物的信号转导过程<sup>[41]</sup>。植物膜联蛋白中存在一个保守的肌动蛋白结合结构(-IRI),一般认为这是促成植物膜联蛋白与 F-肌动蛋白结合的原因<sup>[37,42-43]</sup>。

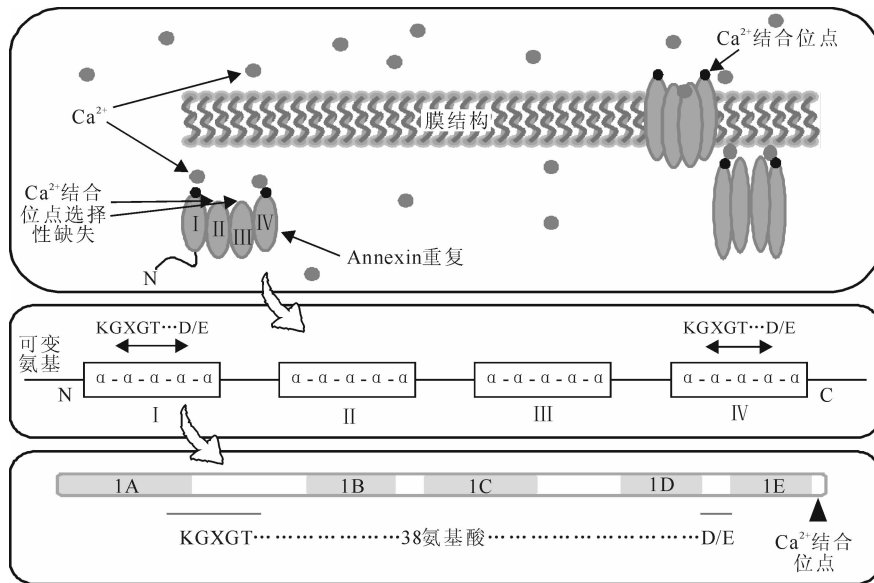


图1 膜联蛋白的结构模型

膜联蛋白可以依赖于钙离子与膜结合或形成跨膜结构。每个 annexin 由 4 个重复区域(I~IV)组成,每一个重复包括 70~80 个氨基酸,含有 5 个  $\alpha$  螺旋,每个螺旋之间由不同长短的环连接;重复 I 和重复 IV 含有内膜蛋白序列 (KGXGT.....38 氨基酸.....D/E),并含有  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点,重复 II 和重复 III 的  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点选择性缺失

Fig. 1 The structural model of annexin

Annexins are capable of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent binding to or insert into the membranes. Primary structure of a typical annexin protein with four tandem repeats (I~IV). Each repeat contain 70~80 amino acids and has five  $\alpha$  helices with loop regions of different length connecting each. Type I and type IV repeats has the endonexin sequence (KGXGT.....38 amino acids.....D/E), and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites are approximately shown in figure.  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites was lack of selectivity in type II and type III repeats

尽管绝大多数的植物膜联蛋白都含有 IRI 结构,但这些膜联蛋白并不是都能与 F-肌动蛋白结合。只有番茄、含羞草(*Bashfulgrass*)以及西葫芦(*Cucurbita pepo* L.)的膜联蛋白检测到了与肌动蛋白的结合,并且番茄和含羞草膜联蛋白与肌动蛋白的结合表现出钙离子依赖性<sup>[28,42-43]</sup>。而不论有无钙离子存在时,棉花、灯笼椒以及玉米的膜联蛋白一般没有与肌动蛋白结合的活性<sup>[14,39,44]</sup>。尽管膜联蛋白和肌动蛋白结合的功能意义尚不清楚,但现在已有假设提出其可能与细胞分泌和信号转导相关<sup>[45]</sup>。

## 2.2 膜联蛋白的离子通道活性

ATP、GTP、环磷酸腺苷<sup>[46-47]</sup>,以及电势<sup>[48-49]</sup>、过氧化氢<sup>[50]</sup>、酸性环境<sup>[51-53]</sup>、磷酸化作用和活性氧信号(ROS)<sup>[54]</sup>都可作为离子通道活性的调节因素。膜联蛋白是依赖于钙离子、pH、膜结构以及膜内外电势的一类膜相关蛋白,可以通过构成寡聚体以嵌入磷脂双分子层,使离子流从蛋白的孔隙通过<sup>[48,55]</sup>。另外,有研究指出膜联蛋白还可以调控与之相结合的膜上的离子转运蛋白的活性<sup>[35]</sup>。酸性环境下,拟南芥膜联蛋白 AnxAt1 会发生寡聚化,从而促进其在磷脂双分子层上形成钾离子通道<sup>[56]</sup>。

膜联蛋白能够在 ROS 信号条件下刺激氧化的膜中形成钙离子渗透转导途径<sup>[57]</sup>。Laohavisit 等<sup>[58]</sup>发现在根毛以及根系表皮细胞中,拟南芥膜联蛋白 AnxAt1 的确能够介导由胞外活性氧物质导致的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  的跨膜运输。灯笼椒膜联蛋白 AnxCa32 在膜结构上可以调节钙离子的被动运输<sup>[14]</sup>,这与我们通常理解下的离子通道的功能是相符的。最近有研究提出膜联蛋白有可能参与调控核质内钙离子信号的传递或者是作为核质内钙离子信号的受体<sup>[59-60]</sup>。虽然目前膜联蛋白作为离子通道的机制仍然不明朗,但膜联蛋白离子通道是目前已知唯一完整的膜相关蛋白。

## 2.3 膜联蛋白的过氧化物酶和核酸水解酶活性

### 2.3.1 过氧化物酶活性

过氧化物酶是由微生物或植物所产生的一类氧化还原酶,能以过氧化氢为电子受体催化底物氧化,在生物体内具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的作用。植物体内含有大量过氧化物酶,是活性较高的一种酶。它与呼吸作用、光合作用及内源激素分泌等都有关系。尤其在处于逆境胁迫环境时,植物体内活性氧大量累积,这时过氧化物酶的作用尤为重要。

普遍认为,拟南芥中膜联蛋白 AnxAt1 的过氧化物酶活性来自于其 N-末端区域的第一个膜联蛋白结构域(主要是一个保守的组氨酸残基 His40),这很类似于植物过氧化物酶(例如典型的辣根过氧化物酶)的约 30 个氨基酸的血红素结合结构<sup>[16,61]</sup>。然而,对于 AnxAt1 的 His40 突变体的重检测发现其仍然具有过氧化物酶活性<sup>[8]</sup>,说明 His40 对于膜联蛋白的过氧化物酶活性来说可能是重要的,但却不是必须的。另外,其他一些结构也可以解释至少是部分解释膜联蛋白的过氧化物酶活性。如棉花膜联蛋白 AnnGh1 的晶体结构显示其含有一个由两个半胱氨酸和与一个甲硫氨酸和一个酪氨酸结合形成的 S3 簇(MCCY 硫簇),有研究提出 S3 簇可以作为电子传递链的受体之一,从而参与细胞内的氧化还原反应<sup>[62]</sup>。

目前已有大量的研究证明膜联蛋白在细胞内具有过氧化物酶活性。重组的辣椒(*Capsicum annuum*)膜联蛋白 AnnCa24 和芥菜膜联蛋白 AnnBj1 都表现出过氧化物酶活性<sup>[22]</sup>。玉米地方品种的膜联蛋白在 pH 7.4 且没有钙离子的环境中表现出了过氧化物酶活性<sup>[11,63]</sup>。拟南芥膜联蛋白 AnxAtx 在氧化敏感的大肠杆菌突变株中的差异表达可使得菌体免受氧化伤害<sup>[64-65]</sup>,分离提取的 AnxAt1 蛋白在体外被证明具有过氧化物酶活性<sup>[61]</sup>。也有很多的例子证明表达或者过表达膜联蛋白基因能够使得细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平和脂质过氧化水平降低<sup>[7-8,21,66-68]</sup>。

**2.3.2 核酸水解酶活性** 玉米、棉花以及番茄中的研究均已证明,植物膜联蛋白在结合核苷酸的同时也具有水解核苷酸的功能<sup>[1,31,42,69]</sup>。玉米和番茄的膜联蛋白可以水解 ATP 和 GTP,并且反应速率相近,但两者对于 GTP 的亲合性则明显低于棉花膜联蛋白 AnxGh1。在 AnxGh1 的第 4 重复上找到 Walker A 结构(GXXXXGKT/S)和 GTPase 超家族典型的 GTP 结合结构(DXXG)的相关序列,两者都是植物膜联蛋白结合与水解核苷酸的功能结构,并且 C-末端缺失以及第 4 重复序列的丢失会使蛋白失去 GTPase 的活性<sup>[31]</sup>。番茄膜联蛋白与肌动蛋白结合后仍然具有 GTPase 活性<sup>[42]</sup>。棉花膜联蛋白 AnxAt2 和玉米的膜联蛋白 AnxZm33/35 的初级序列平面图显示,GTP 结合的基序与第 4 内联蛋白结构域上的钙离子结合的部位是重叠的<sup>[31,69]</sup>,这说明在与膜联蛋白结合时,钙离子和 GTP 可能存在竞争,即钙离子可以抑制膜联蛋白的 GTPase 活性。膜联蛋白的磷酸二酯酶活性被认为与胞外分

泌有关。棉花膜联蛋白研究说明其核苷酸水解酶活性与高尔基体介导的膜泡分泌相关,最终参与棉纤维伸长过程<sup>[31]</sup>。玉米根冠分生组织的胞外分泌可以由膜联蛋白激活,但这激活过程可以通过添加未水解的 GTP 或 GDP 类似物来终止<sup>[20]</sup>。近来也有研究提出,膜联蛋白的核苷酸水解酶活性可能参与胞外基质内游离 ATP 水平的调节。胞外基质中的 ATP 可作为细胞发育能力、植株生长以及胁迫响应过程中的调节因子<sup>[70]</sup>,具有 ATP 水解活性的胞外膜联蛋白可以控制胞外的局部 ATP 浓度以调节细胞的响应过程。

## 2.4 膜联蛋白基因在植物逆境胁迫中的作用

对植物膜联蛋白基因结构和生理生化功能研究的同时,人们也对膜联蛋白基因在植物逆境胁迫中的功能表现进行探索,以期能为植物抗逆研究提供优良候选基因。在一些植物中已经发现了某些响应生物和非生物胁迫的膜联蛋白基因。它们在植物体内通常表现为发育相关和组织特异性表达<sup>[3,17-19,21]</sup>,在各种生物以及非生物逆境下的表达模式也很复杂。早在 1998 年 Kovacs 就报道苜蓿膜联蛋白基因在逆境胁迫下上调表达,能对渗透胁迫、ABA 和干旱做出响应<sup>[15]</sup>。Breton 等在耐寒型小麦(*Triticum aestivum*)中发现 2 种响应低温胁迫且不依赖 Ca<sup>2+</sup> 的膜联蛋白基因<sup>[71]</sup>。Chandran 等在苜蓿中发现响应铝胁迫的膜联蛋白基因<sup>[72]</sup>;白杨(*Populus tomentosa*)叶片中,低温胁迫可诱导膜联蛋白基因的上调表达<sup>[71,73]</sup>;在泻根属(*Bryonia*)植物中膜联蛋白基因可受机械损伤诱导表达<sup>[74]</sup>;在野生大豆(*Glycine max*)叶中 GsANN 的表达水平受干旱和盐胁迫的诱导,表明 GsANN 参与叶片对干旱和盐胁迫的反应<sup>[75]</sup>。荷花中 NnANN1 在高温处理下表达明显增加<sup>[68]</sup>。对水稻、芥菜等植物的研究也都表明膜联蛋白基因在干旱胁迫下表达上调<sup>[17,76]</sup>。

基于植物基因组序列的明确以及功能分析预测技术的成熟,多个植物的膜联蛋白基因家族成员得到了鉴定和功能分析。拟南芥中的膜联蛋白基因家族 8 个成员(AnxAt1-AnxAt8)在多种胁迫处理下表现出了不同的表达模式,大部分基因受盐、干旱、ABA 以及高低温条件的诱导<sup>[3,6]</sup>。Jami 等通过半定量分析发现,芥菜 AnnBjs 表达模式受多种胁迫条件的调节,如信号分子、高盐、氧胁迫和伤害<sup>[17]</sup>等;同时,对 3 种基因的启动子进行了分析,发现存在响应不同胁迫环境的元件,即 AnnBjs 可能在植物响应变化的胁迫环境中起着作用。Jami 等克隆

了水稻膜联蛋白基因家族的 10 个基因<sup>[18]</sup>,其表达模式分析发现,水稻苗期各膜联蛋白基因受盐分、干旱、高温和冷害等各种非生物因素的调控;此外,对预测的上游序列分析发现存在胁迫响应顺式作用元件。这些都为组织和发育水平及非生物胁迫响应的膜联蛋白基因的功能鉴定提供了基础。

Lu 等通过生物信息学分析显示,9 个番茄膜联蛋白基因的上游启动子区域含有胁迫和激素响应相关的重要元件。这些基因的表达模式受发育进程和环境刺激的调节。一些膜联蛋白基因受植物激素 ABA(*AnnSl3*、*AnnSl6*、*AnnSl8* 和 *AnnSl9*)和赤霉素 GA(*AnnSl1.1*、*AnnSl1.2*、*AnnSl4* 和 *AnnSl7*)诱导<sup>[19]</sup>。大部分膜联蛋白基因受盐、干旱、伤害、冷热胁迫的诱导。Zhou 等基于玉米基因组序列的信息,鉴定了玉米 12 个膜联蛋白基因的表达,分析表明 12 个基因响应重金属(Ni、Zn 和 Cd)胁迫,同时也受瘤黑粉病病菌、茉莉酸的诱导,对预测的上游序列分析发现存在胁迫响应顺式作用元件,如 ABRE、W box、GCC-box 和 G-box<sup>[21]</sup>。此外也有研究发现玉米膜联蛋白基因可受干旱、土壤腐殖质的诱导而表达上调<sup>[11,77]</sup>。

此外,膜联蛋白同样可以响应根瘤菌入侵,并在根瘤形成初期起着重要作用,蒺藜苜蓿中分离克隆的 *MtAnn1* 编码一个膜联蛋白,在根系内被根瘤菌结瘤转录激活<sup>[78-79]</sup>。同时也有研究发现 *MtAnn1* 也受苜蓿根瘤菌和菌根真菌的特异诱导<sup>[9]</sup>。拟南芥 *AnxAt4* 和 *AnxAt1* 的表达及番茄 *AnxLe34* 在真菌侵染下均表达上调<sup>[80-81]</sup>。

膜联蛋白在植物的抗性反应中起着重要的作用。研究表明,转膜联蛋白基因、膜联蛋白基因过表达以及膜联蛋白基因成员之间的协同作用都有可能提高植物的抗性。异位表达芥菜 *AnnBj1* 烟草植株、棉花植株在 NaCl、CdCl<sub>2</sub>、甘露醇、PEG、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、卵菌病原体黑胫病病原等逆境下都表现出了比野生植株强的抗性<sup>[7,66]</sup>。Konopka-Postupolska 等发现,在大部分的胁迫处理下的拟南芥中 *AnnAt1* 的 mRNA 水平在叶中表达上调<sup>[8]</sup>。植物过表达 *AnnAt1* 表现更高的耐旱性,而敲除膜联蛋白基因使得植株抗旱性降低。同时发现过氧化氢积累减少。有意思的是,Hu 等研究发现,在长日照条件下,拟南芥 *AnnAt1* 和 *AnnAt4* 的单一突变体对于干旱和盐表现出抗性<sup>[43]</sup>。而双突变体(*AnnAt1/AnnAt4*)拟南芥植株的抗性得到很大的提高,而过表达 *AnnAt4* 植株却表现出对胁迫处理敏感。Huh 等也指出膜联

蛋白基因家族的 *AnnAt1* 和 *AnnAt4* 是协同作用来完成对干旱及盐胁迫的响应,并且还会影响植物的光周期<sup>[82]</sup>。王希等通过超量表达 *GsANN* 发现转基因拟南芥植株对盐胁迫和干旱胁迫的敏感性提高,揭示了该基因与植物抗性间的关系<sup>[75]</sup>。通过异位表达 *NnANN1* 获得的转基因拟南芥种子的耐热性和过氧化氢活性提高,脂质过氧化和活性氧释放水平减少<sup>[68]</sup>。重组 *GhAnx1* 的表达保护大肠杆菌免受叔丁基过氧化氢的胁迫,*GhAnx1* 蛋白可能有抗氧化的作用<sup>[21]</sup>。

干旱、重金属胁迫、盐胁迫以及病虫害等都可导致植物体内过氧化物的积累,使得植物体受到伤害,甚至造成组织细胞的大量死亡。前文已提到,膜联蛋白在维持膜结构稳定性以及细胞分泌过程中都起着重要作用,同时本身已被证明具有过氧化物酶活性,此外钙离子与膜联蛋白基因的转录调控,尤其是在生物、非生物胁迫响应过程中的调控密切相关<sup>[59-60]</sup>,表明膜联蛋白与逆境响应有着密切关系。

### 3 研究前景

膜联蛋白在维持钙稳态,尤其是膜域中钙离子的稳定上有重要作用。植物与动物关于钙离子的一系列调节机制有许多相似之处。例如,钙调蛋白、肌醇三磷酸途径、小 G 蛋白、蛋白质磷酸化级联反应等<sup>[83-84]</sup>,这意味着膜联蛋白在动物和植物中可能执行着相似的功能,即动物上的研究可以为植物膜联蛋白的研究提供一定的借鉴。

已经确定的是动物膜联蛋白参与细胞的内吞和外吐作用,以及特定蛋白与膜结合位点的识别<sup>[35,37]</sup>。植物膜联蛋白最早被证实的功能也是与高尔基体介导的细胞分泌相关,现在已经有更充分的证据来证明这一点<sup>[38,45]</sup>。然而,其在细胞其他内膜系统之间的物质运输中是否同样起着重要作用有待去解答。植物膜联蛋白是否也像动物膜联蛋白一样作为特定蛋白与膜结合位点的识别,即作为某些化学物质或信号分子的受体,如果能够的话,体内的钙离子运输活性对于其行使受体的功能是否重要,也有待于我们去探索。

除了与钙离子和质膜结合的活性,植物膜联蛋白还有其他许多活性,很难去分配单一蛋白的特殊功能,这就留下大量的有待研究的问题。目前的研究发现,单一膜联蛋白基因的敲除似乎没有引起致死性或者在正常生长条件下检测到的表型变化,这说明膜联蛋白可能更多的作为信号途径和膜稳定的

调节物质起作用,或者有高水平的功能冗余性<sup>[18]</sup>。

目前对于植物膜联蛋白基因的观点普遍认为它们是与多种生理进程相关的多基因家族。对于植物膜联蛋白的功能模式的研究主要是强调其位置及活性。尽管获得了很多的植物膜联蛋白的信息,但是关于其具体作用机制的证据仍然很少。甚至关于它们主要的生理生化特征,以及与钙离子和膜的相互作用上仍有许多需要研究的地方。不同信号途径中植物膜联蛋白的动态变化在响应调节中所起的作用

以及不同有机体中膜联蛋白对环境的适应性的差异也都是当前研究中面临的重要问题。此外,对植物膜联蛋白基因启动子区域内调控元件的预测,miRNAs研究等对于解析其在逆境胁迫下的表达模式有重要的作用。

植物膜联蛋白领域的研究进展迅速,随着研究的不断深入,将有更多的植物膜联蛋白基因家族的结构和功能被揭示,而这些发现将进一步阐述整个膜联蛋白基因家族的进化、结构和功能成为可能。

#### 参考文献:

- [1] CLARK G B, MORGAN R O, FERNANDEZ M P, *et al.* Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles[J]. *New Phytologist*, 2012, **196**(3): 695–712.
- [2] BOUSTEAD C M, SMALLWOOD M, SMALL H, *et al.* Identification of calcium-dependent phospholipid-binding proteins in higher plant cells[J]. *FEBS Letters*, 1989, **244**(2): 456–460.
- [3] CANTERO A, BARTHAKUR S, BUSHART T J, *et al.* Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, **44**(1): 13–24.
- [4] PROUST J, HOULN G, SCHANTZ M L, *et al.* Regulation of biosynthesis and cellular localization of Sp32 annexins in tobacco BY2 cells[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, **39**(2): 361–372.
- [5] SEALS D F, RANDALL S K. A vacuole-associated annexin protein, VCaB42, correlates with the expansion of tobacco cells[J]. *Plant Physiology*, 1997, **115**(2): 753–761.
- [6] LEE S, LEE E J, YANG E J, *et al.* Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2004, **16**(6): 1 378–1 391.
- [7] JAMI S K, CLARK G B, TURLAPATI S A, *et al.* Ectopic expression of an annexin from *Brassica juncea* confers tolerance to abiotic and biotic stress treatments in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, **46**(12): 1 019–1 030.
- [8] KONOPKA-POSTUPOLSKA D, CLARK G, GOCH G, *et al.* The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2009, **150**(3): 1 394–1 410.
- [9] TALUKDAR T, GORECKA K M, DE CARVALHO-NIEBEL F, *et al.* Annexins-calcium-and membrane-binding proteins in the plant kingdom[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2009, **56**(2): 199–210.
- [10] DABITZ N, HU N J, YUSOF A M, *et al.* Structural determinants for plant annexin-membrane interactions[J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(49): 16 292–16 300.
- [11] LAOHAVISIT A, DAVIES J M. Multifunctional annexins[J]. *Plant Science*, 2009, **177**(6): 532–539.
- [12] BLACKBOURN H D, BARKER P J, HUSKISSON N S, *et al.* Properties and partial protein sequence of plant annexins[J]. *Plant Physiology*, 1992, **99**(3): 864–871.
- [13] LIM E K, ROBERTS M R, BOWLES D J. Biochemical characterization of tomato annexin P35 independence of calcium binding and phosphatase activities[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(52): 34 920–34 925.
- [14] HOFMANN A, PROUST J, DOROWSKI A, *et al.* Annexin 24 from *Capsicum annuum* X-ray structure and biochemical characterization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(11): 8 072–8 082.
- [15] KOV CS I, AYAYDIN F, OBERSCHALL A, *et al.* Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa[J]. *The Plant Journal*, 1998, **15**(2): 185–197.
- [16] CLARK G B, SESSIONS A, EASTBURN D J, *et al.* Differential expression of members of the annexin multigene family in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, **126**(3): 1 072–1 084.
- [17] JAMI S K, DALAL A, DIVYA K, *et al.* Molecular cloning and characterization of five annexin genes from Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, **47**(11): 977–990.
- [18] JAMI S K, CLARK G B, AYELE B T, *et al.* Identification and characterization of annexin gene family in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, **31**(5): 813–825.
- [19] LU Y, OUYANG B, ZHANG J, *et al.* Genomic organization, phylogenetic comparison and expression profiles of annexin gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Gene*, 2012, **499**(1): 14–24.
- [20] CARROLL A D, MOYEN C, VAN KESTEREN P, *et al.* Ca<sup>2+</sup>, annexins, and GTP modulate exocytosis from maize root cap protoplasts[J]. *The Plant Cell Online*, 1998, **10**(8): 1 267–1 276.
- [21] ZHOU M L, YANG X B, ZHANG Q, *et al.* Induction of annexin by heavy metals and jasmonic acid in *Zea mays*[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2013, **13**(2): 241–251.
- [22] MORTIMER J C. Plant annexins: calcium-binding peroxidases[D]. Cambridge: University of Cambridge, 2007.
- [23] YU H J, HOGAN P, SUNDARESAN V. Analysis of the female gametophyte transcriptome of *Arabidopsis* by comparative expression

- profiling[J]. *Plant Physiology*, 2005, **139**(4): 1 853–1 869.
- [24] HOFMANN A. Annexins in the plant kingdom: perspectives and potentials[J]. *Annexins*, 2004, **1**(1): 51–61.
- [25] CLARK G B, LEE D, DAUWALDER M, *et al.* Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development[J]. *Planta*, 2005a, **220**(4): 621–631.
- [26] CLARK G, CANTERO-GARCIA A, BUTTERFIELD T, *et al.* Secretion as a key component of gravitropic growth: implications for annexin involvement in differential growth[J]. *Gravit. Space Biol. Bull.*, 2005b, **18**: 113–114.
- [27] BASSANI M, NEUMANN P M, GEPSTEIN S. Differential expression profiles of growth-related genes in the elongation zone of maize primary roots[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, **56**(3): 367–380.
- [28] HOSHINO D, HAYASHI A, TEMMEI Y, *et al.* Biochemical and immunohistochemical characterization of Mimosa annexin[J]. *Planta*, 2004, **219**(5): 867–875.
- [29] BAUW G, NIELSEN H V, EMMERSEN J, *et al.* Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras[J]. *FEBS Journal*, 2006, **273**(15): 3 569–3 584.
- [30] SEIGNEURIN-BERNY D, ROLLAND N, DORNE A J, *et al.* Sulfolipid is a potential candidate for annexin binding to the outer surface of chloroplast[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **272**(2): 519–524.
- [31] SHIN H, BROWN R M. GTPase activity and biochemical characterization of a recombinant cotton fiber annexin[J]. *Plant Physiology*, 1999, **119**(3): 925–934.
- [32] WILKINSON J Q, LANAHAN M B, CONNER T W, *et al.* Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, **27**(6): 1 097–1 108.
- [33] WANG G L(王关林), YANG H Y(杨怀义), XIA R(夏然), *et al.* Cloning and sequencing the full-length cDNA of annexin from strawberry fruit[J]. *Acta Bot. Sin.* (植物学报), 2001, **43**: 874–876.
- [34] LAOHAVISIT A, MORTIMER J C, DEMIDCHIK V, *et al.* *Zea mays* annexins modulate cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and generate a Ca<sup>2+</sup>-permeable conductance[J]. *The Plant Cell Online*, 2009, **21**(2): 479–493.
- [35] GERKE V, CREUTZ C E, MOSS S E. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, **6**(6): 449–461.
- [36] MONASTYRSKAYA K, BABIYCHUK E B, DRAEGER A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, **66**(16): 2 623–2 642.
- [37] GERKE V, MOSS S E. Annexins: from structure to function[J]. *Physiological Reviews*, 2002, **82**(2): 331–371.
- [38] KONOPKA-POSTUPOLSKA D, CLARK G, HOFMANN A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update [J]. *Plant Science*, 2011, **181**(3): 230–241.
- [39] BLACKBOURN H D, WALKER J H, *et al.* Calcium-dependent phospholipid-binding proteins in plants[J]. *Planta*, 1991, **184**(1): 67–73.
- [40] BALASUBRAMANIAN K, BEVERS E M, WILLEMS G M, *et al.* Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation[J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(30): 8 672–8 676.
- [41] DRBAK B K, FRANKLIN-TONG V E, *et al.* The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling[J]. *New Phytologist*, 2004, **163**(1): 13–30.
- [42] CALVERT C M, GANT S J, BOWLES D J. Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding[J]. *The Plant Cell Online*, 1996, **8**(2): 333–342.
- [43] HU S, BRADY S R, KOVAR D R, *et al.* Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography[J]. *The Plant Journal*, 2000, **24**(1): 127–137.
- [44] DELMER D P, POTIKHA T S. Structures and functions of annexins in plants[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1997, **53**(6): 546–553.
- [45] KONOPKA-POSTUPOLSKA D. Annexins: putative linkers in dynamic membrane-cytoskeleton interactions in plant cells[J]. *Protoplasma*, 2007, **230**(3–4): 203–215.
- [46] BANDOROWICZ-PIKULA J, KIRILENKO A, VAN DEURSEN R, *et al.* A putative consensus sequence for the nucleotide-binding site of annexin A6[J]. *Biochemistry*, 2003, **42**(30): 9 137–9 146.
- [47] KIRILENKO A, PIKULA S, BANDOROWICZ-PIKULA J. Effects of mutagenesis of W343 in human annexin A6 isoform 1 on its interaction with GTP: nucleotide-induced oligomer formation and ion channel activity[J]. *Biochemistry*, 2006, **45**(15): 4 965–4 973.
- [48] KOURIE J I, WOOD H B. Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2000, **73**(2): 91–134.
- [49] LIEMANN S, BENZ J, BURGER A, *et al.* Structural and functional characterisation of the voltage sensor in the ion channel human annexin V[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, **258**(4): 555–561.
- [50] KUBISTA H, HAWKINS T E, PATEL D R, *et al.* Annexin 5 mediates a peroxide-induced Ca<sup>2+</sup> influx in B cells[J]. *Current Biology*, 1999, **9**(23): 1 403–1 408.
- [51] LANGEN R, ISAS J M, HUBBELL W L, *et al.* A transmembrane form of annexin VIII detected by site-directed spin labeling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, **95**(24): 14 060–14 065.
- [52] HEGDE B G, ISAS J M, ZAMPIGHI G, *et al.* A novel calcium-independent peripheral membrane-bound form of annexin B12[J]. *Biochemistry*, 2006, **45**(3): 934–942.
- [53] ROSENGARTH A, WINTERGALEN A, GALLA H J, *et al.* Ca<sup>2+</sup>-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers [J]. *FEBS Letters*, 1998, **438**(3): 279–284.
- [54] WARD J M, M? SER P, SCHROEDER J I. Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses[J]. *Annual*

*Review of Physiology*, 2009, 71: 59–82.

- [55] HAWKINS T E, MERRIFIELD C J, MOSS S E. Calcium signaling and annexins[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2000, **33**(3): 275–296.
- [56] GORECKA K M, THOUVEREY C, BUCHET R, *et al.* Potential role of annexin AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana* in pH-mediated cellular response to environmental stimuli[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, **48**(6): 792–803.
- [57] LAOHAVISIT A, BROWN A T, CICUTA P, *et al.* Annexins: components of the calcium and reactive oxygen signaling network[J]. *Plant Physiology*, 2010, **152**(4): 1 824–1 829.
- [58] LAOHAVISIT A, SHANG Z, RUBIO L, *et al.* *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-permeable conductance in root cells[J]. *The Plant Cell Online*, 2012, **24**(4): 1 522–1 533.
- [59] GALON Y, FINKLER A, FROMM H. Calcium-regulated transcription in plants[J]. *Molecular Plant*, 2010, **3**(4): 653–669.
- [60] MAZARS C, THULEAU P, LAMOTTE O, *et al.* Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities[J]. *Molecular Plant*, 2010, **3**(4): 706–718.
- [61] GORECKA K M, KONOPKA-POSTUPOLSKA D, HENNIG J, *et al.* Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **336**(3): 868–875.
- [62] HOFMANN A, DELMER D P, WLODAWER A. The crystal structure of annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* reveals an unusual S3 cluster[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, **270**(12): 2 557–2 564.
- [63] MORTIMER J C, COXON K M, LAOHAVISIT A, *et al.* Heme-independent soluble and membrane-associated peroxidase activity of a *Zea mays* annexin preparation[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, **4**(5): 428–430.
- [64] GIDROL X, SABELLI P A, FERN Y S, *et al.* Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues delta oxyR mutant of *Escherichia coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, **93**(20): 11 268–11 273.
- [65] KUSH A, SABAPATHY K. Oxy5, a novel protein from *Arabidopsis thaliana*, protects mammalian cells from oxidative stress[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, **33**(6): 591–602.
- [66] DIVYA K, JAMI S K, KIRTI P B. Constitutive expression of mustard annexin, *AnnBj1* enhances abiotic stress tolerance and fiber quality in cotton under stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, **73**(3): 293–308.
- [67] ZHANG Y, WANG Q, ZHANG X, *et al.* Cloning and characterization of an annexin gene from *Cynanchum komarovii* that enhances tolerance to drought and *Fusarium oxysporum* in transgenic cotton[J]. *Journal of Plant Biology*, 2011, **54**(5): 303–313.
- [68] CHU P, CHEN H, ZHOU Y, *et al.* Proteomic and functional analyses of *Nelumbo nucifera* annexins involved in seed thermotolerance and germination vigor[J]. *Planta*, 2012, **235**(6): 1 271–1 288.
- [69] MCCLUNG A D, CARROLL A D, BATTEY N H. Identification and characterization of ATPase activity associated with maize (*Zea mays*) annexins[J]. *Biochemical Journal*, 1994, **303**(Pt 3): 709.
- [70] CLARK G, ROUX S J. Extracellular nucleotides: ancient signaling molecules[J]. *Plant Science*, 2009, **177**(4): 239–244.
- [71] BRETON G, VAZQUEZ-TELLO A, DANYLUK J, *et al.* Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2000, **41**(2): 177–184.
- [72] CHANDRAN D, SHAROPOVA N, IVASHUTA S, *et al.* Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*[J]. *Planta*, 2008, **228**(1): 151–166.
- [73] RENAUT J, HAUSMAN J F, WISNIEWSKI M E. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism[J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, **126**(1): 97–109.
- [74] THONAT C, MATHIEU C, CREVECOEUR M, *et al.* Effects of a mechanical stimulation on localization of annexin-like proteins in *Bryonia dioica* internodes[J]. *Plant Physiology*, 1997, **114**(3): 981–988.
- [75] WANG X(王希), LI Y(李勇), ZHU Y M(朱廷明), *et al.* Cloning and tolerance analysis of *GsANN* gene related to response on stress in *Glycine soja*[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2010, **36**(10): 1 666–1 673(in Chinese).
- [76] GORANTLA M, BABU P R, REDDY LACHAGARI V B, *et al.* Functional genomics of drought stress response in rice: transcript mapping of annotated unigenes of an indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Nagina 22)[J]. *Current Science*, 2005, **89**(3): 496–514.
- [77] CANELLAS L P, OLIVARES F L, OKOROKOVA-FA ANHA A L, *et al.* Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots[J]. *Plant Physiology*, 2002, **130**(4): 1 951–1 957.
- [78] DE CARVALHO NIEBEL F, LESCURE N, *et al.* The *Medicago truncatula* *MtAnn1* gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, **11**(6): 504–513.
- [79] CARVALHO-NIEBEL D, TIMMERS A C J, CHABAUD M, *et al.* The Nod factor-elicited annexin *MtAnn1* is preferentially localised at the nuclear periphery in symbiotically activated root tissues of *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Journal*, 2002, **32**(3): 343–352.
- [80] TRUMAN W, BENNETT M H, KUBIGSTELTIG I, *et al.* *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**(3): 1 075–1 080.
- [81] VANDEPUTTE O, LOWE Y O, BURSSSENS S, *et al.* The tobacco *Ntann12* gene, encoding an annexin, is induced upon *Rhodococcus fascians* infection and during leafy gall development[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, **8**(2): 185–194.
- [82] HUH S M, NOH E K, KIM H G, *et al.* *Arabidopsis* annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, **51**(9): 1 499–1 514.
- [83] SUSSMAN M R, DEWITT N D, HARPER J F. 39 calcium, protons, and potassium as inorganic second messengers in the cytoplasm of plant cells[J]. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 1994, 27: 1 085–1 117.
- [84] BUSH D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1995, **46**(1): 95–122.