

植物 Rab 蛋白的研究进展

高文^{1,2}, 谢从华^{1*}

(1 华中农业大学 园艺林学学院, 武汉 430070; 2 河南科技大学 林学院, 河南洛阳 471003)

摘要: Rab 蛋白是小 G 蛋白超级家族中的成员之一。通过 Rab 蛋白氨基酸序列的系统进化分析表明, 植物 Rab 家族又可分为 8 个亚家族, 分别为 RabA、RabB、RabC、RabD、RabE、RabF、RabG 和 RabH。Rab 蛋白一般位于胞内特异膜系统的胞质面, 它们是小泡运输的关键调节因子。Rab 蛋白有非常保守的结构域, 同时又具有功能多样性, 它们在细胞分化、顶端优势、花粉管发育、根瘤形成以及生物和非生物胁迫反应中均起着非常重要的作用。该文对近年来国内外有关植物 Rab 蛋白的结构特点及其多样性功能的研究进展进行综述。

关键词: 小 G 蛋白; Rab 蛋白; 结构分析; 功能多样性

中图分类号: Q946.1; Q789 **文献标志码:** A

Research Progress on Rab Proteins in Plants

GAO Wen^{1,2}, XIE Conghua^{1*}

(1 College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China; 2 College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, He'nan 471003, China)

Abstract: Rab proteins are one member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins. Phylogenetic analysis of amino acid sequence of Rab proteins indicate there are eight subfamilies in plants, such as RabA, RabB, RabC, RabD, RabE, RabF, RabG and RabH. The different Rab proteins are generally localized to the cytosolic face of specific intracellular membranes, where they act as key regulators of vesicular trafficking pathways. Rab proteins have highly conserved structural domains and greatly functional diversity. They have very important roles in cell proliferation, apical dominance, pollen tube growth, nodule development, and in response to both biotic and abiotic stresses. Therefore, this paper mainly summarized the structure characteristics and the function of Rab proteins in plants.

Key words: small GTP-binding proteins; Rab proteins; analysis of Rab structure; diversity of Rab function

GTP 结合蛋白(GTP-binding proteins)是指所有的可与鸟嘌呤核苷酸可逆性结合的蛋白质家族, 常称 G 蛋白, 也称鸟苷酸调节蛋白(guanine nucleotide regulatory protein)。在细胞信号传递中扮演重要角色的 G 蛋白主要有两类: 一类是与膜受体偶联的异三聚体 G 蛋白(heterotrimeric GTP binding proteins), 这类也是通常所讲的 G 蛋白。G 蛋白大

多数存在于细胞膜上, 由 α 、 β 、 γ 等 3 个亚基构成, 总分子量为 100 kD 左右, 其中 β 亚基在多数 G 蛋白中都非常相似, 分子量在 36 kD 左右, 而 γ 亚基分子量在 8~11 kD 之间。G 蛋白在信号传递过程中发挥着重要的作用。另一类是存在于不同的细胞部位, 常称为“小 G 蛋白”(small GTP-binding proteins), 因其分子质量较小(20~30 kD)而得名, 而

收稿日期: 2013-07-22; 修改稿收到日期: 2013-11-19

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系(CARS-10-P06)

作者简介: 高文(1973—), 男, 博士, 讲师, 主要从事生物技术与繁育研究。E-mail: lindong507@163.com

* 通信作者: 谢从华, 教授, 博士生导师, 主要从事作物育种与良种繁育研究。E-mail: xiech@mail.hzau.edu.cn

且它们都是单体。

在酵母、植物、人类等真核生物中,根据结构和功能,将小 G 蛋白分为 Ras、Rho、Rab、Ran 和 Arf 等 5 个家族^[1-3]。Rab 蛋白家族是小 G 蛋白超级家族中最大的一个成员,广泛分布于从酵母到人类的真核生物中。在拟南芥^[4]和水稻^[5]中分别有 57 个和 52 个不同的 Rab 蛋白,在人类^[6]中至少有 60 个成员,酵母^[7]中有 11 个成员,秀丽隐杆线虫^[8]有 29 个成员,果蝇^[8]中有 26 个成员。植物 Rab 蛋白家族由 8 个亚家族组成,命名为 RabA、RabB、RabC、RabD、RabE、RabF、RabG 和 RabH,分别对应于酵母和动物中相应的部分 Rab1、Rab2、Rab5、Rab6、Rab7、Rab8、Rab11 和 Rab18^[9]。Rab 蛋白的数量之大和分布之广,表明它们在真核生物细胞中发挥着重要作用。因此本文重点讨论植物 Rab 蛋白的独特结构,以及与这些结构相关的功能。这些内容对于研究植物 Rab 蛋白的功能机理及其在植物基因工程、植物育种中的应用有重要的意义。

1 Rab 蛋白结构

Rab 蛋白作为一个独立的家族,在结构上存在着独有的特点进而决定了其功能的特异性。通过 Rab 蛋白序列分析,识别出 Rab 蛋白特有的结构特征,由此可以从其它小 G 蛋白中鉴别出 Rab 蛋白。选取不同作物中 Rab 氨基酸序列作多序列比对分析,鉴别出 5 个 Rab 家族特异的基序(Rab family specific motifs, RabF),即 RabF1~RabF5(图 1, A),它们在 Rab 家族中是保守的,而在 Ras 或者 Rho 家族中则不保守。在进化上保守的 RabF 可能也是 Rab 与其效应子(与 Rab 蛋白有相互作用关系的蛋白质)相互作用的保守方式。RabF1 位于所谓的效应子区域,同时也是公认的开关 I 区,其保守序列为 IGVDF,且 IGVDF 中的 G 残基在开关 I 区的主链嵌入第二个 α 螺旋外表面的过程中起着重要作用,以促使其与开关 II 区的互动,开关区域的这种构象变化是 Rab 家族的特征。RabF2 的保守序列是 KLQIW,其中 W 残基不是 Rab 特有的,因为除了 Ras 外的其它小 G 蛋白均有此残基。RabF3 的保守序列是 RFRSIT,其疏水残基与相邻的疏水残基 T(相应于第 2 个 α 螺旋)加强了第 2 个 β 折叠的构象,使开关 I 和开关 II 交接处的构型更加稳固。RabF4 的保守序列为 YYRGA,紧接着是保守序列为 LVYDIT 的 RabF5。位于第 3 个 β 折叠和第 4 个 β 折叠之间的 RabF2~RabF5 区域,同时也是公

认的开关 II 区。以上分析与 Dumas 等^[10]结果相一致。

进一步分析发现,Rab 还具有很高的 consistency,进而形成许多异形体,将这类 Rab 蛋白称为 Rab 亚家族(Rab subfamilies),而且有 4 个 Rab 亚家族特异基序(Rab subfamily-specific motifs, RabSF),即 RabSF1~RabSF4(图 1, A)。其中 RabSF4 位于所谓的多变区(由该区域的序列变化较大而得名),在 RabF 中多变区的序列一致性仅为 14.4%,在 RabSF 中多变区的序列一致性也只有 58.4%。在 Rab3a^[11]的晶体结构中,由 RabSF 形成 2 个特异表面,RabSF1、RabSF3 和 RabSF4 形成了第一个 Rab 亚家族特异表面,并且其参与了 Rab3a 和 Rabphilin 的特异性互作,而对面的 RabSF2 则形成了第 2 个 Rab 亚家族特异的表面,其介导了 Rab3a 和其它效应子的互作。这个结果说明不同的效应子可能与不同的 RabSF 区域结合。采用 Arnold 等^[12]方法对 Rab 蛋白进行同源建模分析,发现其有 5 个 α -螺旋和 6 个 β -折叠(图 1, B)。

Rab 蛋白作为小泡运输的分子开关,涉及小泡运输的各个方面,包括小泡的形成、转运、停靠、融合等。然而 Rab 蛋白的功能多样性是由其 C 末端的 CAAX 基序经修饰后在不同有膜细胞器中的特殊定位来完成的。胞液中无活性的 Rab 蛋白在 REP(Rab escort protein)的协助下经 GGT(geranylgeranyl transferase)修饰进而转运并定位在不同的膜上,在 GEP(Guanine nucleotide exchange protein)的作用下 GDP 被转换成 GTP,此时 Rab 蛋白被彻底激活并与下游效应子互作。然后 GAP(GTPase activating protein)催化 GTP 水解为 GDP,使 Rab 蛋白失活,即结束了与效应子的互作。这时 GDI(GDP dissociation inhibitor)从膜上抽出 Rab-GDP 并与其形成复合物,再次游离于细胞质中。因此,Rab 蛋白以这种方式调控着其与许多不同蛋白质的相互作用,而这些蛋白质则被称为 Rab 蛋白的效应子。这些效应子在细胞生长发育、极性运输、胁迫反应等过程中发挥着重要功能^[13]。

2 Rab 蛋白功能

2.1 Rab 蛋白参与光和激素反应

2.1.1 Rab 蛋白与光调节 豌豆中的 RabA3(*Pra2*)基因^[14]可被光负调节表达,并且在黄化的豌豆上胚轴中表达较高^[15],但其具体作用仍不清楚。Kang 等^[15]研究表明 RabA3 定位在内质网且其调

节黑暗诱导的 DWF 类似蛋白的活性, DWF 类似蛋白属于细胞色素 P450 家族, 其可催化油菜素内酯合成中的羟化反应。这说明 *RabA3* 参与了油菜素内酯的生物合成。因此, 其推测在豌豆苗黄化过程中, *RabA3* 可能参与了光调节和油菜素内酯的合成。

2.1.2 Rab 蛋白与激素 一个与 *Rab* 类似的水稻基因 *rgp1*^[16] 在经氮胞苷 (5-azacytidine) 处理的水稻幼苗中表达。而转化了反义 *rgp1* 基因^[17] 的烟草

表型发生了明显的改变, 主要表现为顶端优势减小、矮化、分蘖增加和异常的花器结构等。通过 Northern 杂交进一步分析发现, *rgp1* 只在表型异常的转基因烟草中表达, 而在正常表型中没有表达。同时 *rgp1* 在反义转基因株系中明显降低, 在正义转基因株系中没明显变化。此结果表明 *rgp1* 基因可能参与了植物激素代谢。而且在转基因烟草中内源细胞分裂素的水平比对照增加了 6 倍^[18]。另外, Nieva 等^[19] 和魏琛^[20] 研究表明, 在环境和胁迫刺激下 *Rab*

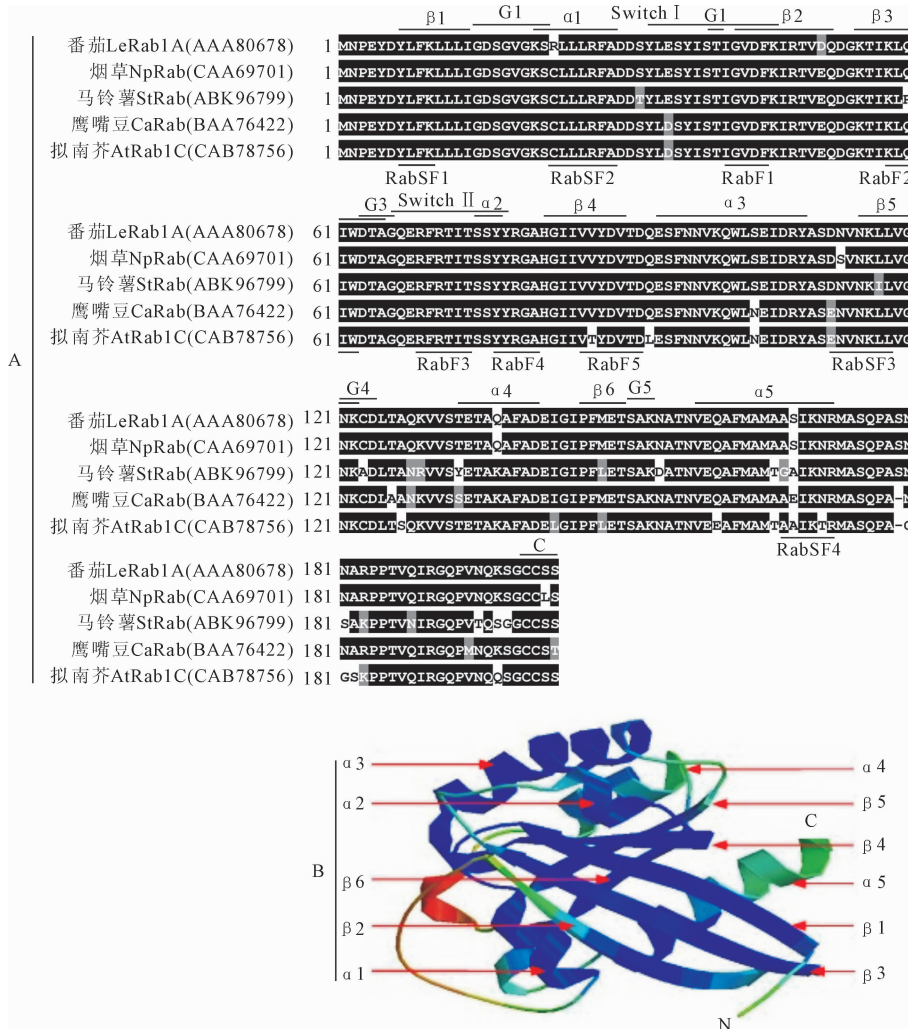


图 1 Rab 蛋白的保守结构分析及空间结构

A: G1~G5 是 GTP/GDP 结合区, 通过开关 I 区的 G 残基和开关 II 区的 T 残基与 GTP 的 γ 磷酸之间的互作可激活 Rab 蛋白的活性; C 表示异戊二烯化位点; RabF 表示 Rab 家族特异的基序; RabSF 表示 Rab 亚家族特异的基序;

B: Rab 蛋白空间结构。α, β 为 Rab 蛋白的二级结构, 即 α 为螺旋, β 为折叠

Fig. 1 Analysis of conservative domain/motif and spatial structure of Rab GTPases

A: G1~G5 indicate the GTP/GDP-binding domains, which is the active conformation of Rab, stabilized by interactions between the gamma phosphate of GTP and two critically conserved residues, Thr in switch I (33-46) and Gly in switch II (66-78); C indicates the prenylation site; RabF is Rab family specific motifs; RabSF is Rab subfamily specific motifs. All sequences used for this analysis is from the NCBI protein database, LeRab1A (AAA80678), NpRab (CAA69701), CaRab (BAA76422), AtRab1C (CAB78756).

B: Spatial structure of Rab GTPases. α and β are Rab protein secondary structure, α is helix, β is sheet

基因可被 ABA 诱导表达。

2.2 Rab 蛋白参与生长发育

2.2.1 Rab 蛋白与细胞分裂 经 Southern 和 Northern 杂交分析,水稻(*Oryza sativa*)的 *OsRab2* 基因^[21]是个单拷贝基因而且在整个细胞分裂和延伸阶段都有活跃的表达。来自甘蔗(*Saccharum officinarum*)的 *SoRab1A* 和 *SoRab2A* 基因^[22]与酵母中的 *ypt1* 基因类似,其参与从内质网向高尔基体的运输调节。这 2 个基因在甘蔗叶片中的表达是有差异的,在生长的叶片中 *SoRab2A* 从分化活跃的部分到老化的部分是由高到低表达的,而 *SoRab1A* 则是组成型表达的。这表明 *SoRab2A* 是细胞分裂和延伸所必需的,而 *SoRab1A* 在细胞的整个发育期都是必需的。当把这 2 个基因分别单独地转入温度敏感的酵母 *ypt1-A136D* 突变体中,在限定温度(restrictive temperatures)下,它们都不能使突变体恢复生长。但是,在非允许温度(non-permissive temperatures)下,*SoRab1A* 转化子有正常的表型且能正常生长,而 *SoRab2A* 转化子则死掉了。表明 *SoRab1A* 是细胞生长所必需的。当将这 2 个基因共同转入温度敏感的酵母 *ypt1-A136D* 突变体中,突变体则恢复了生长。表明它们的功能是互补的而且是细胞生长发育所必需的。

2.2.2 Rab 蛋白与胚胎发育 来自海岸松的 *PpRab1* 基因^[23],与拟南芥的 *AtRabE* 亚家族相近,该亚家族在从内质网到高尔基体的小泡运输中起作用。*PpRab1* 在根、子叶、胚轴中均有表达,而且在合子胚发育的早期阶段有较高的表达,随着胚的成熟表达降低。另外,随着种子的萌发,*PpRab1* 的表达也逐渐增强。因此,*PpRab1* 可能在胚胎发生中起作用。

2.2.3 Rab 蛋白与花粉管萌发 在植物中大多数细胞呈现均一生长,而花粉管的生长则为顶端生长,即生长部位只限于花粉管的顶端区域。顶端生长依赖于细胞壁及细胞质前体物质源源不断地向顶端运输,从而使花粉管得以伸长。因此在这个过程中,花粉管细胞壁的组成及构建是花粉管生长和伸长的重要前提^[24]。一般认为,分泌小泡从高尔基体向花粉管顶端的运动过程是以细胞骨架为轨道的,从而保证其运动方向的准确性并将小泡内新合成的细胞壁物质排到质膜外。而小泡运输是由多种蛋白因子参与调控的,如 SNAREs (soluble NSF attachment protein receptor) 和 Rabs^[25]。

拟南芥的 *AtRab2* 基因^[26]在幼苗和花粉粒中表

达。在转化了 *AtRab2-gus* 融合基因的拟南芥植株中,*AtRab2-gus* 也优先在幼苗和花粉粒中表达,而且在花粉粒有丝分裂期检测到 GUS 活性,而且 GUS 活性较强。说明 *AtRab2* 可能与幼苗和花粉粒的发育有关。烟草的 *NtRab2* 基因^[27]在花粉粒中也有显著表达,同时在根、伸长的胚轴、子叶、真叶、生长和分化比较活跃的组织中均有表达。成熟的雌蕊分泌细胞基质为花粉粒萌发和花粉管伸长做准备。GFP-*NtRab2* 融合蛋白^[28]定位于延伸花粉管的高尔基体中。抑制 *NtRab2* 表达后,妨碍了花粉粒蛋白向分泌途径的运输,同时抑制了花粉管的延伸。因此,在花粉粒的发育中 *NtRab2* 参与了从内质网向高尔基体的运输。烟草的另外 1 个基因 *NtRab11*^[29]与 *gfp* 融合表达后定位于花粉管顶端的倒锥形区,该区是运输小泡的专有区域,即只有运输小泡能到达此区域。*NtRab11* 无论是组成型表达还是抑制表达均使花粉管生长异常,如降低花粉管的生长速率、使花粉管变曲折、降低了雄性生育力等,同时还抑制了胞吐过程和运输小泡向花粉管顶端倒锥形区的运输、妨碍了分泌物和细胞壁蛋白向胞外的运输。所以,这些结果表明 *NtRab11* 影响了花粉管顶端生长和花粉管的膜运输。拟南芥的 *AtRabA4d*^[30]定位于花粉管的顶端,该基因发生突变后使花粉管发育出现异常,如花粉管生长速度降低、花粉管生长发育所需的成分积累、改变了花粉管的生长方向。而该基因与黄色荧光蛋白(EYFP)融合后则恢复了花粉管的正常发育。表明该基因对于花粉管的生长发育至关重要。

2.2.4 Rab 蛋白与果实成熟 芒果中的 *MiRab11*^[31]和番茄中的 *LeRab11a* 基因^[32]在成熟的果实中均有较强的表达,而且 *LeRab11a* 基因在叶和花中也有表达,但在根中没表达。在抑制 *LeRab11a* 基因表达后,番茄成熟果实的颜色正常,但是果实没有变软。同时,伴随着细胞壁水解酶(hydrolase)、多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturanase, PG)和果胶酯酶(pectinesterase, PE)含量降低。而 PG 和 PE 通常是导致成熟果实变软的两种酶,一般从内质网经内膜系统运输到质外体。但在转基因果实中这两种酶的活性比对照低可能是果实不软的原因。这些事实说明 *Rab11* 参与了细胞壁修饰酶向质外体的运输过程。

2.2.5 Rab 蛋白与根毛发育 一般认为根毛细胞生长发育所必需的化学成分是由小泡运输来完成的,因此对小泡运输的时间和空间控制是影响根毛

细胞生长发育的关键。为了研究小泡运输与根毛细胞发育之间的关系,Preuss 等^[33]在拟南芥中验证了 *AtRabA4b* 基因的功能。将拟南芥的 *AtRabA4b* 与增强型黄色荧光蛋白(EYFP)融合后发现其定位于正在生长的根毛细胞顶端,而在停止生长的成熟根毛细胞中则没有发现 EYFP-*AtRabA4b* 或者抑制根毛细胞生长后 EYFP-*AtRabA4b* 则不能定位在根毛细胞顶端。相反地,解除抑制后在根毛细胞顶端位置重新发现了 EYFP-*AtRabA4b*,根毛细胞也恢复了正常生长。在根毛形态异常的突变体中, EYFP-*AtRabA4b* 则不能正常定位。表明 *AtRabA4b* 影响了根毛细胞生长所必需的化学成分的小泡运输过程,进而调控根毛细胞的发育。为了更好地理解 *AtRabA4b* 是如何在货物运输中起作用的, Preuss 等^[34]采用酵母双杂交的方式获得了与拟南芥 *AtRabA4b* 蛋白特异互作的蛋白质,磷脂酰肌醇-4 激酶(phosphatidylinositol 4-OH kinase, PI-4K β 1),它们共同定位在正在增长的根毛的顶端。PI-4K β 1 是以其特有的 NH 同源区域(Ⅲ型 β PI-4Ks)与 *AtRabA4b* 互作的,而 PI-4K β 1 进一步以其 NH₂ 末端区域与拟南芥的钙调磷酸酶 B 类似蛋白(calcineurin B-like protein, AtCBL1)互作, AtCBL1 是一种 Ca²⁺ 感应蛋白。最终导致根毛细胞中 Ca²⁺ 浓度梯度发生了改变,进而影响了 *AtRabA4b* 在根尖的定位。而且在 PI-4K β 1 和它的相近体 PI-4K β 2 均失活的 T-DNA 插入突变体中,根毛都有异常表现。以上结果表明 *AtRabA4b* 蛋白及其互作蛋白 PI-4K β 1 都参与了根毛细胞的极性生长。

菜豆(*Phaseolus vulgaris*) *PvRabA2* 基因^[35]在根中,尤其是在根毛中,可被百脉根根瘤菌诱导表达。该基因既与根瘤的形成有关,又与根毛的发育相关。在该基因被抑制表达的植株中,根毛的长度和数量都急剧减小。而且抑制表达的植株接种百脉根根瘤菌后,根瘤菌根本不能侵染且根毛也没有形状改变;同时,也没有检测到根瘤形成早期基因的表达,如 *Ern1*、*Enod40*、*Hap5*。此结果表明 *PvRabA2* 不仅与根毛生长有关,而且影响了根毛的生长方向。

2.2.6 Rab 蛋白与根瘤形成 Rab 蛋白在细胞分化和豆科植物根瘤形成中发挥了重要作用。豆科根瘤的形成首先涉及根瘤菌科细菌与寄主之间的相互识别和信息交换,然后在细菌周围形成一个类菌体周膜(Peribacteroid membrane, PBM),被类菌体周膜包含的细菌以内吞的方式转入细胞质,由最初的根瘤产生成熟的根瘤并以内共生的方式存在^[36]。

大豆的 *srab1* 和豇豆的 *vrab7* 基因在成熟的根瘤中均有很高的表达,表明它们在根瘤菌被内吞的膜增殖中起作用,这与它们在内吞途径晚期的作用一致。抑制 *srab1* 表达后,在根瘤发育的早期阶段妨碍了生长并且降低了固氮作用。而 *vrab7* 抑制表达后则影响了 PBM 的成熟,结果在感染的细胞中产生了很少的 PBM 和很少的晚期内体的积累。组成型表达的 *vrab7* 与对照一致,对 PBM 没有影响。而且 *vrab7* 在根瘤、叶和根中的表达均高于 *srab1*,表明 *vrab7* 参与了根瘤中 PBM 的形成。根据以上结论, Cheon 等^[36]推测 *Rab7* 可能在新形成的 PBM 发育为成熟的内共生体的过程中发挥着重要作用。而且 Borg 等^[37]在百脉根(*Lotus japonicus*)根瘤中发现了 *Rab1*、*Rab2*、*Rab5*、*Rab7* 的表达,进一步表明 Rab 蛋白在根瘤形成中的重要性。

2.3 Rab 蛋白参与胁迫反应

2.3.1 Rab 蛋白调控的胞吞作用 植物很容易受到环境变化的影响及病原的攻击。然而植物在进化的过程中形成了一种非凡的能力来处理这种高度可变的环境变化,即通过生化、生理或者形态上的变化来调节自己适应各种胁迫反应。在分子水平上理解这些调节过程有利于胁迫忍耐的工程利用。植物对胁迫的适应主要是通过内膜系统(在生化上有明显区别的有膜细胞器,如内质网、高尔基体、液泡、溶酶体、线粒体、叶绿体等)将存在于不同细胞区室的分子(蛋白质、多糖、脂类等)用新合成的蛋白质、多糖和脂类等循环替换。另外,内膜系统在细胞壁、细胞膜和液泡中的作用也有助于植物对胁迫的感知和对胁迫发展的控制^[38]。运输小泡在此过程中起着重要作用,运输小泡是在货物分子比较集中且有外被蛋白存在的情况下以出芽的方式形成的。而运输小泡与胁迫信号转导途径的关系仍不明确。然而,除了基本的看家功能(胞吞)外,运输小泡还参与了对胁迫反应的调节,如 GDI : Rab5 复合体^[39]是在胞质因子 p38 MAPK 的刺激下形成的, p38 MAPK 通过调节 GDI 的活性来控制 Rab5 在细胞膜与细胞质之间的循环,进而调节胞吞作用。因此,由 GDI : Rab5 复合体调节的胞吞作用与 p38 MAPK 依赖的胁迫反应之间的这种调节关系可能使细胞的生理变化更适应于环境变化。

2.3.2 Rab 蛋白与伤害胁迫 *rgp1*^[16]水稻中的一个 *Rab* 类似基因。转 *rgp1* 基因的烟草植株对伤害的反应明显不同于对照,主要表现为顶端优势减小、分蘖增加了。这些特征的出现主要是由于细胞分裂

素本底水平增加造成的。通过分析影响细胞分裂素水平的基因表达情况发现,在转基因植株受到伤害时,水杨酸、水杨酸- β 葡萄糖苷等酸性致病相关蛋白的诱导因子增加了,同时导致酸性致病相关蛋白的基因表达水平也增加了。通常情况下,在非转基因植株中的蛋白酶抑制子 II 可被伤害诱导表达,但在转基因植株中由于水杨酸的增加使得蛋白酶抑制子 II 的表达受到了抑制。水杨酸和致病相关蛋白的变化使转基因烟草增强了对烟草花叶病毒的抗性。一般认为,在正常植株中病原和伤害诱导的信号转导途径是独立发挥功能的。然而在烟草中过量表达 *rgp1* 基因后,由于伤害诱导水杨酸的增加可能影响了细胞分裂素的合成,从而导致病原和伤害诱导的信号转导途径的部分重叠。

2.3.3 Rab 蛋白与干旱胁迫 *Rab* 基因可以被各种环境胁迫有差别地调节。来自复原草 (*Sporobolus stapfianus*) 的 *Rab2* 基因^[40],在水分含量降低的早期就有表达,而且在早死的叶片中仍有很高的含量。缺水 and 复水都可以使该基因的转录物在复原草的根中和 *Sporobolus pyramidalis* 的叶中积累,该基因转录物的积累可能与缺水和复水造成的膜损伤的修复有关。而 Quartacci 等^[41] 的研究表明,与膜合成有关的两个关键的脂类物质磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine) 和磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine) 在缺水和复水胁迫中增加了。进一步证明了 *Rab2* 基因与膜损伤的修复有关。*Rab7* 基因^[42] 来自于干旱诱导的珍珠粟 (*Pennisetum glaucum*) 差减文库。该基因可被不同的环境胁迫 (如:低温、干旱、NaCl,甚至包括植物激素 IAA) 有差别地上调表达,而且过量表达 *Rab7* 基因的烟草增强了对 NaCl 和甘露醇胁迫的忍耐。因此 *Rab7* 基因可能与耐盐和耐旱有关。

2.3.4 Rab 蛋白与盐胁迫 来自冰花 (*Mesembryanthemum crystallinum*) 的 *McRab5b* 基因可强烈地被盐诱导表达而且表达较早。该基因参与从内质网经高尔基体再到细胞膜的小泡运输的调控。因此, Bolte 等^[43] 推测 *McRab5b* 可能与盐胁迫中的小泡运输有关。类似地,在盐和干旱胁迫下 ABA-依赖的 *Rab18*^[44] 在拟南芥中表达较早且表达量较高。同样地,在分析经盐胁迫的毒麦 (*Lolium temulentum*) 抑制差减表达文库时, *LtRab2* 基因^[45] 在根和叶片组织中有强烈的上调表达。另外 1 个 *Rab* 基因来自菜菔牧豆树 (*Prosopis juliflora*) 的 *PjRab7* 基因^[46],在盐胁迫下也是上调表达,而转该基因的

烟草在 150 mmol/L NaCl 胁迫下仍能正常生长。表明该基因对盐胁迫有很好的抗性。以上结果表明, *Rab* 蛋白与盐胁迫有密切的关系。

2.3.5 Rab 蛋白与病原胁迫 植物在适应胁迫的过程中,小泡运输起着非常重要的作用。比如, *AtRabG3e*^[47] 是来自拟南芥的一个小泡运输调节基因。该基因可被过氧化物、水杨酸、腐生病原菌诱导表达。在过量表达该基因的拟南芥植株中根、叶片和原生质体中的内吞作用加速了,在液泡和幼芽中积累了大量的 NaCl,而且转基因植株还增强了对盐和渗透胁迫的忍耐同时降低了盐胁迫产生的活性氧的积累。这些结果表明参与小泡运输调节的 *AtRabG3e* 在调控植物适应胁迫反应中起着重要作用,同时小泡运输也已经超跃了其看家功能,进而参与到胁迫反应中来。另外一个拟南芥基因 *AtRabG3b*^[48],转化该基因的拟南芥植株明显不同于非转基因对照。过量表达该基因的拟南芥植株对一种真菌毒素 (Fumonisin B1) 和一种病原真菌 (*Alternaria brassicicola*) 均表现出过敏性细胞死亡,而抑制该基因表达的植株与野生型植株则没有差异;另外,与抑制该基因表达的植株和野生型对照植株相比,过量表达该基因的拟南芥植株加速了叶片的衰老。表明 *AtRabG3b* 参与了植物对病原反应和衰老过程中的细胞凋亡的调节。

在动物和酵母细胞中, *RabE* 蛋白是从高尔基体向细胞膜运输的调节因子。而在拟南芥中,将 *RabE1d* 基因^[49] 与增强型 *gfp* 融合并置于 35S 启动子下表达,在拟南芥叶片细胞的高尔基体和细胞膜中均发现 *RabE1d* 蛋白。表明 *RabE1d* 基因可能参与了从高尔基体向细胞膜的运输。虽然该基因被病原菌诱导的表达并不是很明显,但是该基因抑制表达后,植株表型发生明显的变化,如矮化、叶片畸形;而过量表达后则增强了对病原细菌 (*Pseudomonas syringae*) 的抗性。小麦在叶锈病菌侵染过程中, *Rab2* 基因^[50] 在侵染早期快速表达,随后逐渐下降。接种非亲和叶锈病菌可诱导 *Rab2* 基因上调表达,而接种亲和叶锈病菌则抑制了该基因的表达。所以 *Rab2* 基因可能与寄主和病原物的亲和程度有着直接的关系。来自马铃薯的 *StRab*^[51] 可被晚疫病病菌诱导表达,且超量表达 *StRab* 的马铃薯转基因株系增强了其对晚疫病病菌的抗性。

3 展望

综上所述,在植物的不同组织或者器官中均存在着不同种类的 *Rab* 蛋白。 *Rab* 蛋白的数量之大、

分布之广表明其在植物细胞中具有重要的作用。Rab 蛋白除了传统的看家功能(小泡运输)外,还参与细胞分裂、生长发育、胁迫适应等过程。另外, Nieva 等^[19]和魏琛^[20]研究表明,在环境和胁迫刺激下 Rab 基因可被 ABA 诱导表达。一般认为 ABA 是植物信号分子,而 Rab 是位于 ABA 下游的广泛存在的信号分子,二者是通过 ABA 受体联系在一起的。有趣的是许多植物激素受体在其它生物中也是很保守的,如细胞分裂素受体作为双组份调节者广泛存在于原核生物中^[52]。这表明 ABA 与 Rab 之间是有联系的,但是 ABA 是如何通过 Rab 来调节发育和生理过程的还需深入研究。关于 Rab 蛋白是如何参与胁迫反应的目前仍是一个新领域。可能存在 2 种方式:首先,通过调节运输小泡的间接方式,即在植物受到胁迫时,受植物激素(ABA、生长素)调节的磷脂酰肌醇激酶途径启动并调控小泡运输,通过小泡的往来运输,把新合成的物质送到受损部位进行修复,同时把废弃物带回胞质。因此,Levine^[53]认为小泡运输参与了植物对胁迫的适应调整,而调控小泡运输又是 Rab 蛋白的基本功能。而

且, Moshkov 等^[54]也认为 Rab 蛋白是小泡运输和植物适应胁迫的关键调节因子。其次,通过蛋白互作的直接方式,高文等^[55]采用酵母双杂交的方法获得了 StRab 蛋白的互作蛋白,包括支架蛋白、多聚泛素、ERF 转录因子、蛋白酶抑制子、蛋白激酶等。如支架蛋白 Ste5^[56],其可增加 MAPK 途径中不同 MAP kinases 之间互作的特异性,同时保证了信息传递的高效性;涉及植物生长发育方方面面的泛素蛋白酶体途径,其也参与许多植物寄主防御信号(病原菌、SA、ET、JA)的调节^[57]。通过这些互作蛋白进一步激活下游防卫基因表达以适应胁迫。对 Rab 蛋白功能机理的研究仍然是热点问题,关于这方面的研究主要集中在 Rab 蛋白的互作网络上,以亲和层析、酵母双杂交、双分子荧光互补的方式分离和鉴定更多 Rab 蛋白的互作蛋白的基础上,结合网络数据库的分析,希望 Rab 蛋白在内膜系统上的特异性以及其功能的多样性得到进一步的解释。随着基因组学、分子生物学的发展和一些分析方法的改进,相信在这方面的研究将有新的进展。

参考文献:

- [1] KAHN R A, DER C J, BOKOCH G M. The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature[J]. *FASEB J.*, 1992, **6**(8): 2 512—2 513.
- [2] JIANG S Y, RAMACHANDRAN S. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes[J]. *Physiol. Genomics*, 2006, **24**(3): 235—251.
- [3] ZHANG ZH W(张之为), ZHAO J(赵 君), FAN M SH(樊明寿), et al. Current progress on the small GTPase in plants[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(3): 622—628(in Chinese).
- [4] VERNOUD V, HORTON A C, YANG Z B, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2003, **131**(3): 1 191—1 208.
- [5] ZHANG J, HILL D R, SYLVESTER A W. Diversification of the RAB guanosine triphosphatase family in dicots and monocots[J]. *J. Integr. Plant Biol.*, 2007, **49**(8): 1 129—1 141.
- [6] PEREIRA-LEAL J B, SEABRA M C. Evolution of the Rab Family of Small GTP-binding Proteins[J]. *J. Mol. Biol.*, 2001, **313**(4): 889—901.
- [7] TAKAI Y, SASAKI T, MATOZAKI T. Small GTP-binding proteins[J]. *Physiol. Rev.*, 2001, **81**(1): 153—208.
- [8] BOCK J B, MATERN H T, PEDEN A A, et al. A genomic perspective on membrane compartment organization[J]. *Nature*, 2001, **409**(6 822): 839—841.
- [9] RUTHERFORD S, MOORE I. The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2002, **5**(6): 518—528.
- [10] DUMAS J J, ZHU Z, CONNOLLY J L, et al. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins[J]. *Structure*, 1999, **7**(4): 413—423.
- [11] OSTERMEIER C, BRUNGER A T. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A[J]. *Cell*, 1999, **96**(3): 363—374.
- [12] AMOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology

- modeling[J]. *Bioinformatics*, 2006, **22**(2):195–201.
- [13] STENMARK H, OLKKONEN V M. The Rab GTPase family[J]. *Genome Biol.*, 2001, **2**(5):3007. 1–3007. 7.
- [14] INABA T, NAGANO Y, SAKAKABARA T, *et al.* Identification of a *cis*-regulatory element involved in phytochrome down-regulated expression of the pea small GTPase gene *pra2*[J]. *Plant Physiol.*, 1999, **120**(2):491–500.
- [15] KANG J G, YUN J, KIM D H, *et al.* Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth[J]. *Cell*, 2001, **105**(5):625–636.
- [16] SANO H, YOUSSEFIAN S. A novel Ras-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice[J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, **228**(1–2):227–232.
- [17] KAMADA I, YAMAUCHI S, YOUSSEFIAN S, *et al.* Transgenic tobacco plants expressing *rgp1*, a gene encoding ras-related GTP-binding protein from rice, show distinct morphological characterization[J]. *Plant J.*, 1992, **2**(5):799–807.
- [18] SANO H, SEO S, ORUDGEV E, *et al.* Expression of the gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels, abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to tobacco mosaic virus infection[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**:10 556–10 560.
- [19] NIEVA C, BUSK P K, DOMÍNGUEZ-PUIGJANER E, *et al.* Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene *rab28*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2005, **58**(6):899–914.
- [20] 魏 琛. 拟南芥小 G 蛋白 RabD2b 的功能研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2006.
- [21] KIM H Y, SEO H S, JEONG J Y, *et al.* Molecular characterization of a rab-related small GTP binding protein cDNA from rice (*Oryza sativa* L. IR-36)[J]. *Mol. Cells*, 1997, **7**(2):226–230.
- [22] ZHANG J M, SYLVESTER A W, LI D Q, *et al.* Complementation and expression analysis of *SoRab1A* and *SoRab2A* in sugarcane demonstrates their functional diversification[J]. *J. Integr. Plant Biol.*, 2006, **48**(12):1 450–1 457.
- [23] GONCALVES S, CAIRNEY J, RODRIGUEZ M P, *et al.* *PpRab1*, a Rab GTPase from maritime pine is differentially expressed during embryogenesis[J]. *Mol. Genet. Genomics*, 2007, **278**(3):273–282.
- [24] WANG X H(王晓华), HAO H Q(郝怀庆), WANG Q L(王钦丽), *et al.* Structure of the pollen tube and the mechanism of tip growth [J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2007, **24**(3):340–354(in Chinese).
- [25] MOSSESSOVA E, BICKFORD L C, GOLDBERG J. SNARE selectivity of the COPII coat[J]. *Cell*, 2003, **114**(4):483–495.
- [26] MOORE I, DIFENTHAL T, ZARSKY V, *et al.* A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in *Arabidopsis* and is expressed predominantly in pollen grains and seedlings[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**(2):762–767.
- [27] CHEUNG A Y. Pollen tube interactions during pollen tube growth[J]. *Trends Plant Sci.*, 1996, **1**(2):45–51.
- [28] CHEUNG A Y, CHEN C Y, GLAVEN R H, *et al.* Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth[J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(4):945–962.
- [29] DEGRAAF B H, CHEUNG A Y, ANDREYEYA T, *et al.* Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco[J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(9):2 564–2 579.
- [30] SZUMLANSKI A L, NIELSEN E. The Rab GTPase RabA4d regulates pollen tube tip growth in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(2):526–544.
- [31] ZAINAL Z, TUCKER G A, LYCETT G W. A Rab11-like gene is developmentally regulated in ripening mango (*Mangifera indica* L) fruit[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1 314**(3):187–190.
- [32] LU C, ZAINAL Z, TUCKER G A, *et al.* Developmental abnormalities and reduce fruit softening in tomato plants expressing an antisense *Rab11* GTPase gene[J]. *Plant Cell*, 2001, **13**(8):1 819–1 833.
- [33] PREUSS M L, SERNA J, FALBEL T G, *et al.* The *Arabidopsis* Rab GTPase RabA4b localizes to the tips of growing root hair cells[J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(6):1 589–1 603.
- [34] PREUSS M L, SCHMITZ A J, THOLE J M, *et al.* A role for the RabA4b effector protein PI-4Kbeta1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J. Cell Biol.*, 2006, **172**(7):991–998.
- [35] BLANCO F A, MESCHINI E P, ZANETTI M E, *et al.* A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-symbiotic association[J]. *Plant Cell*, 2009, **21**(9):2 797–2 810.
- [36] CHEON C I, LEE N G, SIDDIQUE A B, *et al.* Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis[J]. *EMBO J.*, 1993, **12**(11):4 125–4 135.
- [37] BORG S, BRANDSTRUP B, JENSEN T J Z A, *et al.* Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding protein encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules[J]. *Plant J.*, 1997, **11**(2):

237—250.

- [38] SURPIN M, RAIKHEL N. Traffic jams affect plant development and signal transduction[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, **5**(2):100—109.
- [39] CAVALLI V, VILBOIS F, CORTI M, *et al.* The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex[J]. *Mol. Cell*, 2001, **7**(2):421—432.
- [40] O'MAHONY P J, OLIVER M J. Characterization of a desiccation-responsive small GTP binding protein (Rab2) from the desiccation-tolerant grass *Sporobolus stapfianus*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1999, **39**(4):809—821.
- [41] QUARTACCI M F, FORLI M, RASCIO N, *et al.* Desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus*: lipid composition and cellular ultrastructure during dehydration and rehydration[J]. *J. Exp. Bot.*, 1997, **48**(311):1 269—1 279.
- [42] AGARWAL P K, AGARWAL P, JAIN P, *et al.* Constitutive over-expression of a stress inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell Rep.*, 2008, **27**(1):105—115.
- [43] BOLTE S, SCHIENE K, DIETZ K J. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2000, **42**(2):923—936.
- [44] JAKAB G, TON J, FLORS V, *et al.* Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses[J]. *Plant Physiol.*, 2005, **139**(1):267—274.
- [45] DOMBROWSKI J E, BALDWIN J C, MARTIN R C. Cloning and characterization of a salt stress-inducible small GTPase gene from the model grass species *Lolium temulentum*[J]. *J. Plant Physiol.*, 2008, **165**(6):651—661.
- [46] GEORGE S, PARIDA A. Over-expression of a Rab family GTPase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confers tolerance to salt stress on transgenic tobacco[J]. *Mol. Biol. Rep.*, 2011, **38**(3):1 669—1 674.
- [47] MAZEL A, LESHEM Y, TIWARI B S, *et al.* Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e)[J]. *Plant Physiol.*, 2004, **134**(1):118—128.
- [48] KWON S II, CHO H J, BAE K, *et al.* Role of an *Arabidopsis* Rab GTPase RabG3b in pathogen response and leaf senescence[J]. *J. Plant Biol.*, 2009, **52**(2):79—87.
- [49] SPETH E B, IMBODEN L, HAUCH P, *et al.* Subcellular localization and functional analysis of the *Arabidopsis* GTPase RabE[J]. *Plant Physiol.*, 2009, **149**(4):1 824—1 837.
- [50] YANG J J(杨静静), LI X(李星), LI Y N(李亚宁), *et al.* Involvement of small GTP-binding protein gene *Rab2* in resistance response of wheat to its leaf rust disease[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*(华北农学报), 2010, **25**(4):1—5(in Chinese).
- [51] GAO W, TIAN Z D, LIU J, *et al.* Isolation, characterization and functional analysis of StRab, a cDNA clone from potato encoding a small GTP-binding protein[J]. *Sci. Hortic.*, 2012, **135**(24):80—86.
- [52] DING Y, MA Q H. Biosynthesis, signal transduction and molecular regulation of cytokinins[J]. *Curr. Pharmaceut Anal.*, 2006, **2**(2):169—182.
- [53] LEVINE A. Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2002, **40**(6—8):531—535.
- [54] MOSHKOV I E, NOVIKOVA G V. Superfamily of plant monomeric GTP-Binding proteins; 2. Rab proteins are the regulators of vesicles trafficking and plant responses to stresses[J]. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2008, **55**(1):119—129.
- [55] 高文. 马铃薯晚疫病水平抗性相关的小G蛋白基因克隆与功能分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2012.
- [56] LEVIN D E, ERREDE B. The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast[J]. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995, **7**(2):197—202.
- [57] SHIRSKAR G, DAI L Y, HU Y J, *et al.* Role of ubiquitination in plant innate immunity and pathogen virulence[J]. *J. Plant Biol.*, 2010, **53**(1):10—18.