



生物大分子相分离在植物中的研究进展

金星¹, 安黎哲^{1, 2}, 宋渊^{1*}

(1 兰州大学 生命科学学院, 细胞活动与逆境适应教育部重点实验室, 兰州 730000; 2 北京林业大学, 北京 100083)

摘要: 细胞中存在种类繁多的无膜细胞器, 在感知环境信号, 基因表达调控, RNA 加工等过程中发挥了重要的作用, 而生物大分子相分离被证明是无膜细胞器形成的主要方式。文章介绍了生物大分子相分离的概念与特征, 总结了有关相分离在植物对环境信号响应中的研究进展, 并对相分离在植物中的生物学功能进行了分类, 以期解析相分离在植物生长发育和逆境适应中的作用机理, 揭示植物无膜细胞器的本质与功能。

关键词: 生物大分子; 相分离; 植物; 无膜细胞器; 基因表达

中图分类号: Q946 **文献标志码:** A

Research Progress of Biomacromolecule Phase Separation in Plants

JIN Xing¹, AN Lizhe^{1, 2}, SONG Yuan^{1*}

(1 Ministry of Education Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2 Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: There are various types of membraneless organelles in cells, which play important roles in sensing environmental signals, regulating gene expression, RNA processing, etc.. Biomolecular phase separation has been proven to be the main way of forming membraneless organelles. This article introduces the concept and characteristics of biomolecular phase separation, summarizes research progress of phase separation in plants response to environmental signals, and categorizes the biological functions of phase separation in plants in order to analyze the mechanisms by which phase separation plays a role in plant growth and development and adaptation to adversity, thereby to understand the natures and functions of plant membraneless organelles.

Key words: biomacromolecules; phase separation; plants; membraneless organelles; gene expression

细胞是生命体结构和功能的基本单位, 细胞内的空间虽小, 却是生物学反应的主要场所, 如呼吸代谢、光合作用、蛋白质翻译和加工、DNA 复制、RNA 加工等重要生命过程都在细胞内进行。多种多样的生物学反应更是需要数量庞大、种类繁多的细胞内容物分子的参与, 如此庞杂的细胞内容物组分的活动却不是无序混乱的, 而是高度有序受控的。真核

生物中存在着复杂而精妙的机制控制细胞内生化的有序进行。最好的例子就是细胞器, 它们有磷脂膜包被, 能选择性富集细胞内分子, 从而控制生化反应在区室化的环境中有序进行, 如叶绿体组织光合作用、线粒体组织能量代谢、溶酶体组织细胞内消化等。除了这些有膜包被的细胞器外, 细胞中还存在大量的无膜包被细胞器, 也能控制细胞内生化的

收稿日期: 2022-12-24; 修改稿收到日期: 2023-05-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32271567, 31872682)

作者简介: 金星(1997—), 男, 博士, 主要从事植物表观遗传学研究。E-mail: 120220907101@lzu.edu.cn

* 通信作者: 宋渊, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物表观遗传学研究。E-mail: songyuan@lzu.edu.cn

应的有序进行。

19 世纪 30 年代,研究发现了最早的无膜细胞器——核仁(nucleolus)^[1-2],之后陆续在真核细胞的各个部位又发现了无膜细胞器的存在。比如,位于细胞核内的卡哈尔体(Cajal bodies)、切割小体(dicing bodies)和核斑点(nuclear speckles)等,位于细胞质中的 P 颗粒(P granules)、加工小体(processing bodies)^[3]、应激颗粒(stress granules, SGs)等,以及位于细胞膜上的受体簇(receptor cluster)^[4]。中国对无膜细胞器的研究历史也可以追溯到 20 世纪中叶,早期的相关研究主要是观察细胞分裂过程中各个细胞器的形态和运动规律,如吴素萱教授在研究植物细胞核穿壁运动时核仁的变化^[5]。随着电子显微镜的发明与应用,许多研究者对核仁的超微结构进行了详细的观察^[6-8],郑国锷、贾敬芬、郝秉中、尤瑞麟等几位教授的早期研究中也提及了细胞核仁的变化^[9-11],而核仁是细胞中最大的无膜细胞器,之后中国科学家在无膜细胞器的研究中不断探索,如研究了包含剪接组分 35(splicing component 35, SC35)的剪接小体(spliceosome)^[12];华益民教授发现了运动神经元生存蛋白(survival motor neuron, SMN)参与应激颗粒的形成^[13];孙建成教授发现了柯浩体蛋白(coilin)和活化 STAT 蛋白的蛋白抑制剂 Y(protein inhibitor of activated STAT Y, PIASy)蛋白质的互作介导了 Cajal 小体和早幼粒细胞性白血病(promyelocytic leukemia, PML)小体的关联^[14]。这一研究领域的推动和突破,都有中国生物学家的努力与贡献。

无膜细胞器广泛存在于动物、植物和酵母等真核生物细胞中;同时,在原核细胞中也有发现^[15]。不同无膜细胞器的成分、定位及功能具有很大差异,但在大小形态、凝集变化、组分动态等特征都有高度相似性。因此,无膜细胞器被认为是一种起源古老、进化保守、普遍分布的细胞内结构^[16],其种类繁多、组成成分复杂、功能多样,但是关于无膜细胞器的报道相对较少。

1 无膜细胞器的形成

Hyman 在 2009 年的研究发现,秀丽隐杆线虫细胞中的 P 颗粒(P granules)具有类似液体的性质,并证明 P 颗粒是一种通过液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)反应所形成的具有液相性质的无膜细胞器^[17],从而将相分离这一物理化学中的常用概念引入生物学领域中。近年来的研

究也证实,大多数的无膜细胞器都是由液-液相分离介导形成的液相凝集体,如核仁^[18]、DNA 损伤修复位点^[19]、应激颗粒等^[19]。

无膜细胞器通常是由蛋白质或 RNA 等生物大分子组成的超分子凝集体^[20],其中大分子具有正常的生物学活性,由于特异性的成分和拥挤的环境,能进行高效有序的化学反应,因此无膜细胞器也被称为生物大分子凝聚体^[21]。需要注意的是,细胞中还存在其他聚集体,呈现固体性质,包含不可逆变性蛋白的蛋白质聚集体^[22],又或是细菌包涵体等性质明显不同的颗粒,这些聚集体无法介导生化反应,它们并不属于我们所说的生物大分子凝聚体^[23]。

无膜细胞器或生物大分子凝集体,一个重要的特性就是液相性质,液相性质使其能快速完成组装、解聚、富集特定组分,提供一个拥挤、稳定、特异的环境,高效有序进行生化反应。定义液相性质的标准包括:由液体表面张力决定的球形外观、凝集体在接触后能产生融合现象、凝集体组分的动态特性(组分快速重分布)^[23]。生物大分子凝集体的液相特性是通过液-液相分离介导形成的。

2 相分离的简介

液-液相分离,最基本的概念可理解为:液体从原来混溶的状态,在一定条件下,两种液相相互分离形成有明显边界的液滴聚集状态。在细胞中,液-液相分离可以理解为:蛋白质或 RNA 等生物大分子,在一定浓度下,由于分子间或分子内的多价相互作用,形成了高分子液相凝集体,独立于周围液相环境,从而形成了液液相分离的状态。

这种生物大分子液液相分离的状态受多种环境因素的调节,如 pH、温度、盐浓度、氧化还原状态等^[24-25]。环境因素主要通过生物大分子间或分子内的多价相互作用驱动生物大分子相分离^[21],这些相互作用包括静电吸引、阳离子- π 、 π - π 、氢键、疏水相互作用^[26],使生物大分子的局部浓度达到一个临界阈值,即相分离临界浓度,才能发生相分离,而临界浓度受环境因素的影响^[27-28]。

生物大分子凝聚体的组分复杂多样,不同凝聚体的组分往往不同,同一种凝聚体的组分也会发生变化,而生物大分子凝集体组分调控的具体机制目前尚不明确^[29]。对生物大分子凝聚体内蛋白质的序列分析发现,凝集体内经常出现一些具有多价结合结构域以及低复杂序列结构域的蛋白质^[23, 30-31]。低复杂序列结构域(low complexity sequence do-

mains, LCDs), 是一类在氨基酸组成上, 对几种特异氨基酸具有偏好性的结构域, 比如, 富含芳香族氨基酸(或带电氨基酸), 导致其序列复杂度偏低^[31-32]。由于 LCDs 对带电荷或者极性氨基酸具有偏好性, 因此 LCDs 通常不会折叠成具有固定三维结构的蛋白质, 如此就会形成一种在三维结构上无序的区域, 即固有无序区(intrinsically disordered regions, IDRs)^[33-34], 所以 LCDs 有时也被称为 IDRs。细胞中还存在着一种与酵母朊病毒结构域具有类似氨基酸偏好性的低复杂度序列结构域, 被称为类朊病毒结构域(prion-like domains, PrLDs)^[35-36], 这些结构域则富含极性非带电氨基酸, 如谷氨酰胺、天冬酰胺、丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸。具有 PrLDs 的蛋白质通常都能发生相分离, 但具体的普适性分子机理还在研究当中^[37]。PrLDs 一般被认为是一种更特殊的 LCDs 或 IDRs, 在目前的文献中, 三者时常不作具体区分。

相分离凝集体可以通过 IDRs 介导的分子间或分子内多价相互作用来形成, 由于 IDRs 高级结构的灵活性, IDRs 更易于介导蛋白质与其他生物大分子的多价相互作用^[27-28]; 同时 IDRs 具有一定的广谱性^[33], 可以作为一种生物大分子相分离的普适性分子基础, 并且 IDRs 的空间结构容易受到蛋白质翻译后修饰的调节^[38], 从而影响细胞相分离的行为。IDRs 并不是生物大分子相分离形成的必要条件^[16], 多价相互作用才是生物大分子相分离的必要驱动力^[21]。但是 IDRs 仍然是生物大分子相分离领域的研究核心之一。

3 驱动相分离的分子结构特征

分子间或分子内的多价相互作用驱动生物大分子相分离的形成, 而多价相互作用在细胞内是广泛存在的, 互作形式也是多样的(图 1)。

首先, 可以通过蛋白质的固有无序区域 IDRs 介导多价相互作用。由于 IDRs 缺乏固定的三维结构, 能介导更多价、更灵活多样的相互作用, 因此细胞中多数无膜小体形成的支架蛋白大都具有 IDRs。IDRs 具有氨基酸偏好性, 一般富含芳香族氨基酸, 如天冬酰胺和谷氨酰胺, 以及带电氨基酸, 如精氨酸和酪氨酸, 由这些氨基酸形成正负电荷相互作用、疏水相互作用、阳离子- π 相互作用、 π - π 相互作用等多价相互作用^[21]。

其次, 蛋白质可以利用多个重复结构域间的特异性相互作用, 产生多价性。如多个线性串联重复结构域(linear tandem repeat domain)^[39], 蛋白质上

多个位点的修饰, 蛋白质的寡聚化都能形成多价相互作用^[40]。

最后, 核酸分子, 特别是 RNA, 利用蛋白质上的核酸结合结构域, 也能产生多价相互作用。多价态的产生可以是由于核酸与蛋白质非序列特异的静电相互作用所产生, 可以是核酸分子上存在的多个重复蛋白质结合域所介导, 也可以是核酸分子上多个重复序列产生的碱基互补配对所介导的自身多价相互作用^[41]。

4 植物中的相分离

生物大分子相分离的研究大多集中在动物细胞与酵母中, 研究者解析了不同无膜细胞器调控生化反应的机制, 发现相分离与疾病形成、基因表达调控、应对环境胁迫等生物学过程密切相关。在植物细胞内研究生物大分子相分离的研究还比较少, 但已经取得了一些突破性的进展。

在植物中聚焦生物大分子凝集体的相分离行为及功能的研究并不多, 但有提及细胞内无膜小体的过往文献。虽然并不是直接研究相分离, 但文献中所描述的细胞内无膜小体的特性却十分符合相分离的性质。同时, 在动物细胞中所发现的大量生物大分子凝集体, 也很可能在植物中存在同源的类似结构。因此, 植物中存在许多潜在的相分离生物大分子凝集体, 有待进一步实验以确认相分离在其中的重要作用。

现有的植物生物大分子凝集体主要包括: 细胞核中的核仁(nucleolus)^[42]、卡哈尔体(Cajal bodies)^[43]、核斑点(nuclear speckles)^[44]、DNA 损伤位点(DNA damage foci)^[45]、切割小体(dicing bodies)^[46]、光小体(photobodies)^[47]等, 细胞质之中的 P 小体(processing bodies, P-bodies)^[48]、应激小体(stress granules)^[49]和 NPR1 聚集体(NPR1 condensates)^[50]等(表 1)。根据植物中相分离的表达, 可以归为以下几类。

4.1 植物相分离对环境信号的响应

4.1.1 ELF3 相分离作为温度感受器调控开花

剑桥大学 Philip Wigge 团队发现拟南芥早花因子 3 (early flowering 3, ELF3) 蛋白能通过类朊病毒样结构域 PrLDs 响应温度变化形成相分离凝集体^[51]。ELF3 是调控植物昼夜节律的夜间复合体的成员^[52]。染色质免疫共沉淀 ChIP-seq 实验证实了 ELF3 在开花基因上的富集受到温度的调节。在温度升高时, 解除 ELF3 对开花基因的抑制, 这个快速

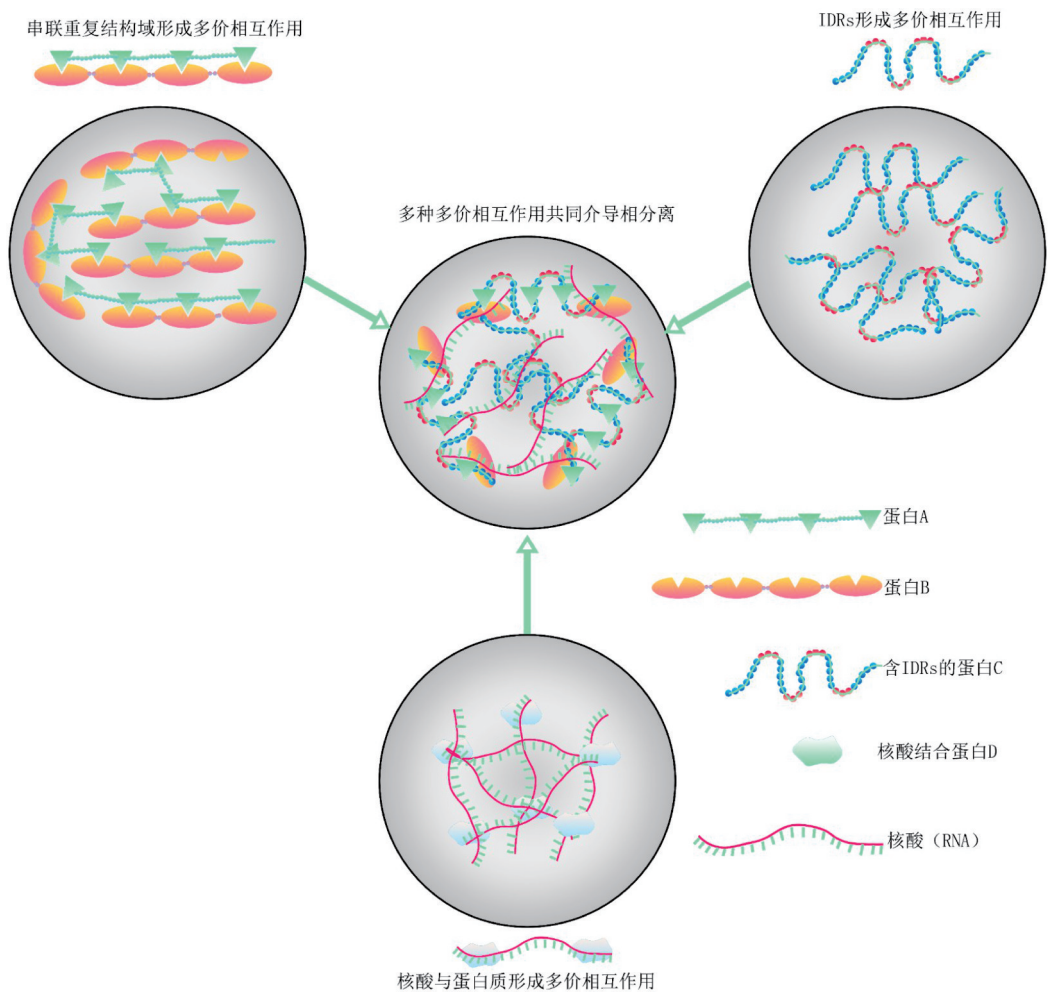


图 1 多价相互作用力介导相分离形成

The liquid-liquid separation of biomacromolecules is driven by multivalent interactions. Multivalent interactions can be established between IDRs, as shown in the figure, where protein C containing IDRs forms intermolecular interactions through IDRs, mediating the formation of phase separation. They can also be established between tandem repeat domains, as shown in the figure, where protein A and protein B containing multiple tandem repeat domains form intermolecular interactions through multiple specific binding domains. Additionally, multivalent interactions can be established between nucleic acids and proteins, as shown in the figure, where nucleic acid-binding protein D binds to multiple nucleic acids (RNA) molecules through its nucleic acid-binding domain. In complex cellular systems, multiple interactions may occur simultaneously, as illustrated in the figure, where proteins containing IDRs interact with proteins containing nucleic acid-binding domains, ultimately leading to phase-separated aggregates through the interplay of IDRs, tandem repeat domains, and nucleic acids/proteins interactions

Fig. 1 Multivalent interactions mediate phase separation formation

可逆的过程依赖 PrLDs 介导的相分离。相分离与开花表型之间的联系使 ELF3 成为了一个全新的植物热感受器,ELF3 能通过 PrLDs 介导的自身相分离感受环境温度的变化。有趣的是,该团队曾于 2016 年就发现光敏色素 B(phytochrome B, phyB) 是一个植物温度感受器^[53],而光敏色素在细胞内响

应环境信号也会形成无膜小体,符合相分离的性质^[47]。这些研究暗示生物大分子相分离可以作为一种快速响应环境变化的生物学过程,作为植物响应环境刺激的通用型分子感受器。而潜在的许多具有相分离能力的蛋白质,也可能是研究植物响应环境信号的突破点。

表 1 植物中涉及相分离研究的蛋白质

Table 1 Plant proteins involved in phase separation

相分离蛋白 Phase separated protein	关联蛋白 Associated protein	亚细胞定位 Subcellular localization	刺激信号 Stimulus signal	相分离功能 Phase separation function	文献 Reference
ELF3	—	细胞核 Nucleus	热 Heat	作为高温信号感受器,调控开花 As a high-temperature signal receptor, regulates flowering	[51]
FRI	—	细胞核 Nucleus	冷 Cold	响应冷信号,抑制 <i>FLC</i> 表达 Responds to cold signals and inhibits <i>FLC</i> expression	[66]
RBGD2, RBGD4	—	细胞质 Cytoplasm	热 Heat	响应热胁迫,参与应激颗粒形成,提高热胁迫耐受性 Responds to heat stress, participates in the formation of stress granules, thereby improving heat stress tolerance	[67]
ALBA4, ALBA5, ALBA6	—	细胞质 Cytoplasm	热 Heat	响应热胁迫,招募并稳定 HSF mRNAs,提高耐热性 Responds to heat stress, recruits and stabilizes HSF mRNAs, thereby improving heat tolerance	[68]
FLOE1	—	细胞质 Cytoplasm	水 Water	响应水分信号以调控种子萌发 Responds to water signal to regulate seed germination	[60]
GBPL1, GBPL3	—	细胞核 Nucleus	免疫信号 Immune signal	响应免疫信号调控植物防御基因表达 Regulates plant defense gene expression in response to immune signals	[63]
NPR1	CUL3, WRKY70	细胞核/细胞质 Nucleus/Cytoplasm	水杨酸 Salicylic acid	响应水杨酸信号以抑制自身免疫 Responds to salicylic acid signals to suppress autoimmunity	[50]
SEU	—	细胞核 Nucleus	高渗胁迫 Hyperosmotic stress	响应渗透胁迫,促进渗透胁迫基因表达,增强抗逆性 Responds to osmotic stress, promotes the expression of osmotic stress genes, thereby enhancing stress resistance	[55]
phyB	—	细胞核 Nucleus	光,温 Light, Temperature	通过光控可逆构象转变与温控相分离,实现对光、温的共感知 Integrates light and temperature sensing through light controlled reversible conformational transformation and temperature controlled phase separation	[54]
CRY2	MTA	细胞核 Nucleus	光 Light	响应蓝光信号,招募 m6A writer 复合体,调节基因组甲基化 Respond to blue light signal, recruit m6A writer complex, and regulate genome methylation	[69]
TMF	—	细胞核 Nucleus	氧化应激 Oxidative stress	响应 ROS 信号调控成花转变 Responds to ROS signal to regulate flowering transition	[58]
FCA	FLL2	细胞核 Nucleus	—	提高多聚腺苷化酶活,招募加工因子,促进 RNA 3'末端加工 Enhances the activity of polyadenylase, recruits processing factors, and promotes RNA 3' terminal processing	[71]
CPSF30-L	—	细胞核 Nucleus	—	调控选择性多聚腺苷酸化,参与植物生长发育及环境应答 Regulates alternative polyadenylation, participates in plant growth and development and environmental response	[78]
SE	HYL1, DCL1	细胞核 Nucleus	—	驱动切割小体形成,参与 miRNA 加工 Drives the formation of dicing bodies and participates in miRNA processing	[75]
ATG8e	ATG3	细胞质 Cytoplasm	—	影响自噬小体形成 Affects autophagosome formation	[77]
ARF7 ARF19	—	细胞核/细胞质 Nucleus/Cytoplasm	—	介导蛋白质的核-质分配,从而调控生长素响应基因的表达 Mediates the nuclear-cytoplasmic distribution of proteins, thereby regulating the expression of auxin response genes	[79]
VRN1	—	细胞核 Nucleus	—	与 DNA 结合介导相分离,抑制 <i>FLC</i> 的表达,促进开花 Phase separated with DNA, inhibits the expression of <i>FLC</i> , thereby promoting flowering	[80]
HRLP	SR45	细胞核 Nucleus	—	抑制 <i>FLC</i> 的剪接和转录,促进开花 Inhibits the splicing and transcription of <i>FLC</i> , thereby promoting flowering	[89]
SGS3	RDR6	细胞质 Cytoplasm	—	介导转座子沉默 Mediates transposon silencing	[87]
EMB1579	—	细胞核 Nucleus	—	调控转录,mRNA 剪接和植物生长发育 Regulates transcription, mRNA splicing and plant growth and development	[88]
ADCP1	—	细胞核 Nucleus	—	调控异染色质形成 Regulates heterochromatin formation	[97]
Rubisco	EPYC1	叶绿体 Chloroplast	—	增强 Rubisco 酶活性 Enhances Rubisco enzyme activity	[92]
STT1, STT2	OE23	叶绿体 Chloroplast	—	介导叶绿体内蛋白质分选 Mediates intra-chloroplast cargo sorting	[90]

4.1.2 phyB 相分离实现对光温信号的共感知 光敏色素 B 是植物感知光和温度的一种受体,但 phyB 是如何区分光和温度信号的机制仍不清楚。钟上威课题组报道了 phyB 可以自发地发生相分离以形成液体状的光小体,其相分离由 C 端结构域的寡聚化所驱动,并受到 N 末端延伸结构域(N-terminal extension, NTE)的调控^[54]。phyB 利用从远红光吸收型到红光吸收型的构象变化,来感受光信号;而温度信号则由 NTE 直接感知,即通过调控 phyB 的相分离影响光小体形成,来实现对温度的感知。同时,相分离的形成招募了许多 phyB 信号通路分子,增强了信号传导能力,实现了对温度信号的快速感知与响应。研究提出了生物体通过同一蛋白对不同环境信号的感知与区分的模型。

4.1.3 SEU 相分离感知高渗透胁迫 渗透胁迫的感知机制是植物中的一个未解谜题,方晓峰课题组的研究发现 SEUSS(SEU)蛋白是拟南芥高渗透胁迫反应中的关键转录调节因子,而当细胞外渗透压增加时,SEU 能迅速在细胞核内凝聚形成液滴状聚集体^[55]。SEU 的固有无序区 1(intrinsically disordered region 1, IDR1)驱动其相分离的形成,IDR1 中存在 2 个 α -螺旋,通过其构象的改变,可以感知细胞内拥挤程度的变化,即感知渗透胁迫。研究提出了植物感知和应对渗透胁迫的模型:在高渗透胁迫下,SEU 蛋白 IDR1 上的 2 个 α -螺旋结构感知细胞内拥挤程度变化,触发 SEU 相分离,从而增强渗透胁迫基因的表达,提高植物抗逆性。

4.1.4 TMF 相分离响应 ROS 信号 植物茎尖分生组织的成熟是一个精准的程序化发育过程,影响成花转变的正常进行。而 Arabidopsis LSH1 和 Oryza G1 (ALOG) 转录因子家族成员 TERMINATING FLOWER(TMf)蛋白是控制番茄茎尖分生组织发育的关键蛋白^[56],可以抑制成花基因 ANANTHA(AN)表达^[56-57]。但是 TMF 蛋白是如何感知并传递环境信号以调控下游基因表达的机制尚不清楚。

许操课题组在番茄的研究中发现,TMF 蛋白可以响应活性氧(reactive oxygen species, ROS)信号,形成相分离凝集体,抑制 AN 基因表达,从而抑制茎尖分生组织成熟,调控植物成花转变过程^[58]。TMF 在细胞内可以形成具有相分离性质的无膜凝集体,相分离由其 IDRs 所驱动,且受到 TMF 分子内半胱氨酸残基形成的分子间二硫键的调控。环境的 ROS 信号促使 TMF 分子间二硫键的形成,促进

由 IDRs 驱动的 TMF 蛋白质相分离。而 TMF 相分离形成的凝集体可以特异结合 AN 基因启动子,起到隔绝启动子的作用,从而抑制 AN 基因表达。该研究第一次在经济作物中报道了蛋白质相分离具有的功能,利用相分离将细胞对活性氧信号的感知与干细胞命运决定联系起来。

课题组还对 TMF 的同源蛋白家族 TFAM 进行了分析^[59],其中 TFAM1、TFAM2、TFAM3 和 TFAM11 这 4 个蛋白和 TMF 一样,都含有高度保守的 ALOG 结构域,以及 N 端和 C 端的 IDRs,但 5 种蛋白的 IDRs 出现了大量序列差异,从而影响蛋白质相分离能力和转录调控能力。TFAM1/2/3/11 蛋白能和 TMF 在胞内形成异质性的相分离聚集体,共同调控 AN 基因的时空表达,从而调控番茄成花转变。这 5 种蛋白除了形成聚集体共同调控茎尖干细胞命运决定外,自身还能单独发挥功能,例如 TFAM1 会调控番茄花器官形态发生和脱落。

4.1.5 FLOE1 相分离响应水分信号 植物通过种子休眠来应对极端的环境胁迫,种子从休眠状态转为复苏的过程,需要复水来唤醒新陈代谢,从而激活种子萌发。而植物感知水信号以激活萌发的机制尚不清楚。最新研究发现,一种具有类朊病毒样蛋白 PrLDs 序列的拟南芥蛋白质 FLOE1,能在复水条件下发生相分离,从而介导植物胚胎感知水信号的过程^[60]。S. Y. Rhee 课题组首先分析了在种子中 14 种具有 PrLDs 的蛋白,其中只有 FLOE1 是没有报道功能研究的。FLOE1 在细胞质中会形成相分离凝集体,且相分离会响应水势变化调控种子发芽最佳时间。同时,分析发现 FLOE1 在植物不同谱系中都存在同源蛋白质,而拟南芥中的另外 2 个同源蛋白质(FLOE2、FLOE3)也能形成细胞内无膜凝集体。说明 FLOE1 在植物中存在保守功能,是植物响应水信号以激活种子萌发的保守性分子感受器^[60]。

4.1.6 NPR1 相分离响应水杨酸信号 植物应对外源蛋白的入侵会形成效应器触发免疫(effector-triggered immunity, ETI),造成感染细胞的程序性死亡。而在正常细胞中,需要抑制 ETI 的效应,其中一种机制是系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR),这需要水杨酸(salicylic acid, SA)和非表达病程相关蛋白(non-expresser of pathogenesis related 1, NPR1)的参与^[61-62]。

董欣年课题组的研究发现,在水杨酸诱导下, NPR1 能在细胞中形成相分离凝集体(SA-induced NPR1 condensates, SINC), NPR1 的相分离由其

IDRs 所驱动^[50]。SINC 富集了与细胞防御、应激相关的蛋白质,包括许多 ETI 的正调节因子,以及泛素化反应的组分。实验证实 NPR1 能与 Cullin-RING E3 连接酶(Cullin 3 RING E3 ligase,CRL3)在 SINC 中结合,泛素化标记并降解 ETI 正调节因子。因此,在 SA 诱导下,NPR1 形成相分离凝集体 SINC,招募 ETI 正调节因子,并与 CRL3 结合,泛素化标记并降解 ETI 正调节因子,从而抑制 ETI 引起的细胞程序性死亡,维持细胞正常生命活动。

4.1.7 GBPL3 相分离响应免疫信号 J. D. MacMicking 课题组的研究发现了一个植物鸟苷酸结合蛋白样 GTPase 超家族(guanylate-binding protein-like GTPases,GBPLs)蛋白质 GBPL3,是具有 IDRs 和 NLS 序列的蛋白质^[63]。在正常情况下,细胞核内无催化活性的伪 GTPase 家族蛋白 GBPL1 可以排斥 GBPL3,阻止它的转录结合。而在细胞受感染后,细胞免疫反应使 GBPL3 从细胞质中大量入核,形成相分离凝集体,解除了 GBPL1 的排阻作用,使 GBPL3 与防御基因的启动子区结合,并招募转录辅激活因子 Mediator 和 RNA 聚合酶 II 组分,来激活防御基因的表达。何胜洋课题组后续研究发现,高温导致 GBPL3 形成相分离凝聚体的数量降低,结合到 CBP60g 启动子的水平降低,影响了水杨酸合成^[64]。

4.1.8 FRI 相分离对冷信号的响应 拟南芥春化作用的本质是开花位点 C 基因(*FLOWERING LOCUS C, FLC*)的表达调控,*FLC* 的表达会受到 *FRIGIDA(FRI)* 蛋白形成的复合体的促进^[65]。Caroline Dean 课题组报道了 *FRI* 可以在环境低温信号的诱导下形成相分离聚集体,从而调控 *FLC* 表达的分子机制^[66]。研究发现,*FRI* 在冷信号诱导下形成的相分离聚集体,会使 *FRI* 从 *FLC* 基因上脱离,抑制两者相互作用;同时,*FRI* 聚集体的形成,会受到 *FLC* 反义 RNA *COOLAIR* 的促进,聚集体形成使得 *FRI* 蛋白质稳定性增加,形成 *FRI* 的储存单位,以快速响应环境温度的升高。

研究提出了 *FRI* 相分离响应环境温度以调控 *FLC* 基因表达的研究模型:在温暖环境下,*FRI* 与 *FLC* 结合,招募转录辅激活因子与组蛋白修饰因子,形成凝集体,促进 *FLC* 表达,以防止早花;同时 *FRI* 的不稳定性,可以快速响应温度变化,反转对 *FLC* 的调控;在寒冷环境下,*FRI* 发生相分离,稳定性增加,*FLC* 被隔离于 *FRI* 聚集体外,从而使 *FLC* 表达被抑制,而稳定的 *FRI*,可以作为响应环境温度升高的蛋白库。

4.1.9 RBGD2 相分离可以提高拟南芥热胁迫耐受性 应激颗粒是真核细胞响应各种胁迫的一种保守无膜细胞器,而 SGs 的形成是由液液相分离所介导的,但在植物中 LLPS 介导 SGs 响应逆境胁迫的机制并不清晰。RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins,RBPs)在 SGs 中高度富集并起着关键性的作用,同时 RBPs 也是 LLPS 形成的关键蛋白质,因此,张衡课题组搜索了响应逆境胁迫的 RBPs,发现了两种富含甘氨酸的 D 类 RNA 结合蛋白(RNA-binding glycine-rich group D,RBGD)蛋白质可以通过其酪氨酸阵列(tyrosine residue array,TRA)响应热胁迫发生液液相分离,参与应激颗粒形成,招募应激颗粒组分,从而提高植物热胁迫耐受性^[67]。

研究组首先发现,*RBGD2* 和 *RBGD4* 基因在热胁迫下表达量显著上升,而 *RBGD2/4* 突变体在热胁迫后的存活率显著下降,证明 *RBGD2/4* 在植物热胁迫适应中起着重要作用。对 *RBGD2/4* 蛋白质分析发现,它们在细胞内与细胞外都会响应热处理,产生液-液相分离。对相分离产生的机制进行深入剖析,发现 *RBGD2/4* 的 LCDs 中具有高含量的酪氨酸,并呈现出均匀分布的特性,研究称之为酪氨酸阵列。进一步研究发现,*RBGD2/4* 的 TRA 是驱动 *RBGD2/4* 液液相分离的关键。TRA 中的 1/2 或全部酪氨酸发生突变,会导致 *RBGD2/4* 的体内、体外相分离能力显著降低或缺失,从而导致植物热胁迫耐受性显著降低或缺失。研究组同时对 *RBGD2/4* 蛋白质相分离形成聚集体的组分进行分析,发现正常情况下,*RBGD2/4* 蛋白质就与很多应激颗粒组分,如多聚腺苷酸结合蛋白[poly(A) binding protein,PAB]PAB2、PAB4、PAB8,存在相互作用,而热处理则显著增加了 *RBGD2/4* 招募的蛋白质(如 TSN1、TSN2 等)及转录本的表达(如许多热响应基因 *HSFA2*、*HSF4*、*HSP18.2* 和 *HSP81.2* 等)。

4.1.10 ALBA 形成相分离小体响应热胁迫 热休克因子(heat stress transcription factors,HSFs)可以特异性结合基因启动子中的热应激元件,以激活热应激反应基因的表达。但关于 HSFs 的调控机制并没有清楚的研究。钱伟强课题组发现,当植物受到高温胁迫时,乙酰化降低结合亲和力(Acetylation lowers binding affinity,ALBA)家族蛋白质 ALBA4、ALBA5 和 ALBA6 会发生液液相分离,直接结合并招募特定的 mRNAs(如 HSF mRNAs)进入应激颗粒 SGs 和处理小体 PBs 之中,从而保护 HSF mRNAs 在热胁迫下不被外核糖核酸酶 4(Exoribo-

nuclease 4, XRN4) 介导的 mRNA 降解途径所降解,最终提高植物耐热性^[68]。

4.1.11 光诱导 CRY2 相分离 隐花色素(cryptochromes, CRYs)是调节植物昼夜节律的光感受器。王琴课题组的研究发现,CRYs 介导了拟南芥转录组中超过 10% 的 mRNA 的 m⁶A 修饰,特别是受昼夜节律调节的 mRNA。研究证明了隐花色素 2 (cryptochrome 2, CRY2)能与 mRNA 的 m⁶A 甲基转移酶复合体(m⁶A writer)的 3 个亚基互作,即 N⁶腺苷甲基转移酶 MT-A70 样蛋白(N⁶-adenosine-methyltransferase MT-A70-like, MTA)、N⁶腺苷甲基转移酶非催化亚基 MTB(N⁶-adenosine-methyltransferase non-catalytic subunit MTB, MTB)和 37 kDa 的 FKBP12 相互作用蛋白(FKBP12-interacting protein of 37 kDa, FIP37)。光刺激下,CRY2 在细胞内会发生液液相分离形成光小体,招募 m⁶A writer 蛋白,提高 m⁶A writer 复合体在光小体中的浓度,促进 RNA 甲基化,从而调控 mRNA 的稳态。研究证实光信号诱导的 CRY2 相分离,可以调节 m⁶A writer 活性、mRNA 甲基化以及昼夜节律^[69]。

同时,蓝光和环境温度通过 CRY2 剪接因子 1 (CRY2-SPLICING FACTOR 1, CIS1)和开花位点 M (FLOWERING LOCUS M, FLM)形成的信号通路调节开花时间^[70],而由于蓝光又可以刺激 CRY2 形成相分离^[69],因此 CRY2 相分离是否在 CRY2 响应光温信号,从而调控下游基因表达上起到关键作用,是值得深入研究的问题。

4.2 相分离介导植物组织细胞内反应

4.2.1 FLL2 促进 FCA 介导的多聚腺苷化复合体形成 Caroline Dean 课题组的研究发现控制拟南芥开花的关键蛋白质开花控制位点 A (FLOWERING CONTROL LOCUS A, FCA),在细胞核内能相分离形成具有液相性质的无膜小体^[71]。有趣的是,体外重组的 FCA-PrLD 单独表达能发生相分离凝集体,但全长 FCA 形成的凝集体却不具备相分离的液相性质,说明在细胞内还需要其他的因子来帮助 FCA 形成相分离。

通过正向遗传筛选,发现 FLX-like 2 (FLL2) 蛋白是 FCA 抑制 *FLC* 基因所必需的,而 FLL2 与 FCA 在细胞内共定位于无膜凝集体,且 FLL2 在体外可以发生相分离。同时 FLL2 突变体中 FCA 形成的凝集体的数量与体积明显下降,超表达 FLL2 则使 FCA 形成的凝集体的数量与体积明显上升,说明 FLL2 能在细胞内帮助 FCA 发生相分离,从而形

成核内凝集体。实验进一步使用免疫共沉淀与质谱联合分析法鉴定了与 FCA 的互作因子,发现多种参与多聚腺苷化和 RNA 3'末端加工的因子,其中许多因子都与 FCA 共定位。而在 FLL2 突变体中,由 FCA 调控的 RNA 3'末端加工过程出现了缺陷,说明 FLL2 对 FCA 介导的 RNA 3'末端加工的重要作用。综上所述,FCA 可以在 FLL2 的帮助下,形成核内相分离凝集体,招募 RNA 3'末端加工因子,凝集体的拥挤环境提高了多聚腺苷化的酶活,从而促进 RNA 3'末端加工反应。

4.2.2 SERRATE 相分离介导切割小体形成 植物微核糖核酸(microRNA, miRNA)由切割复合体 DICER-LIKE 1 (DCL1)-HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1)-SERRATE(SE)切割前体 pri-miRNA 产生^[72],复合体定位于无膜细胞器切割小体^[73-74]。戚益军课题组研究发现,切割小体是具有相分离性质的无膜凝集体,它的组装由其核心组分 SE 蛋白的相分离所驱动的^[75]。SE 蛋白质利用其 IDRs 产生的分子间多价相互作用形成相分离凝集体,招募 DCL1、HYL1 和 pri-miRNA,形成切割小体完成对 pri-miRNA 的加工。随着 pri-miRNA 的消耗,HYL1 与 SE 之间的相互作用被削弱,HYL1 被排斥至凝集体外;同时由于 HYL1 具有 miRNA 的结合能力,因此,HYL1 会结合 miRNA 共同转运出切割小体以完成 miRNA 加工过程。

4.2.3 ATG3 促进 ATG8e 的相分离 相分离已被发现在动物细胞自噬中的重要作用,如 P 颗粒组分 PGL 的相分离会调控细胞自噬^[76]。薛红卫课题组研究发现了拟南芥自噬相关蛋白 8e (Autophagy-related protein 8e, ATG8e)会发生相分离,且相分离受自噬相关蛋白 3 (Autophagy-related protein 3, ATG3)促进^[77]。ATG8e 是自噬途径中的一个关键蛋白质,参与了自噬体膜的形成、货物选择和自噬体与溶酶体的融合过程。研究证实 ATG8e 会在体外与细胞内形成相分离聚集体,且 ATG3 会促进 ATG8e 在体外与细胞内的相分离。ATG8e 的 IDRs 缺失以及 1,6-己二醇,都会抑制 ATG8e 蛋白质的相分离,同时会影响自噬小体形成,说明 ATG8e 的相分离可能会影响细胞自噬活性。

4.2.4 CPSF30-L 相分离调控反应 贾桂芳课题组发现,切割和聚腺苷酸化特异性因子 30 (cleavage and polyadenylation specificity factor 30, CPSF30-L)蛋白与 m⁶A 修饰位点的识别可以增强其相分离,并通过识别 poly(A)位点上 m⁶A 修饰的远上游

元件(far-upstream element, FUE), 调控 mRNA 选择性多聚腺苷酸化, 进而影响植物开花时间和对 ABA 的响应, 证实 CPSF30-L 作为 m⁶A 修饰的识别蛋白, 通过相分离调控选择性多聚腺苷酸化, 参与植物生长发育及环境应答的重要功能^[78]。

4.3 蛋白质复合体相分离调控基因表达

4.3.1 ARF 蛋白相分离调控生长素反应 生长素响应因子(auxin response factor, ARF)家族是调控生长素响应基因表达的转录因子, L. C. Strader 课题组研究发现 ARF7、ARF19 蛋白在生长素响应受抑制的根成熟区细胞中, 定位于细胞质中, 并形成具有相分离性质的液相凝集体^[79]。而在生长素响应活跃的根分生区细胞, ARF7 和 ARF19 主要定位于细胞核中, 细胞质中分布明显减少。实验对 ARF19 相分离的分子机制进行了深入研究, 发现 ARF19 的相分离由 IDRs 和 phox and bem1p(PB1)结构域所驱动, PB1 结构域介导了 ARF-Aux/IAA 和 ARF-ARF 的分子间互作, ARF19 的 PB1 上 K62A 点突变(62 位的赖氨酸突变为丙氨酸)即可消除 ARF19 的相分离, 使 ARF19 在突变体根成熟区细胞中也处于核定位。研究进一步证实 ARF7 和 ARF19 相分离介导的核质分配可以调控生长素响应基因的表达。

4.3.2 VRN1 与 DNA 结合介导的相分离 春化蛋白 1(vernalization 1, VRN1)是植物响应春化作用的重要蛋白^[80-81], 能抑制 *FLC* 表达, 促进植物开花, 但 VRN1 抑制 *FLC* 表达的机理尚不清楚。来鲁华课题组研究发现, 体外表达纯化的 VRN1 蛋白能与 FLC55(*FLC* 上游 55 bp DNA)形成相分离液相凝集体^[82]。深入研究 VRN1 相分离的分子机理发现, VRN1 相分离由 IDRs 所驱动, IDRs 上的正负电荷分布对相分离至关重要; 同时 VRN1 的 DNA 结合结构域对于相分离也不可或缺。细胞内实验同样表明 VRN1 与 DNA 在细胞核内结合形成相分离凝集体。VRN1 相分离调控开花基因表达的行为, 并不像 ELF3 一样能够响应温度变化, 而只是春化作用调控开花通路中的一种形式。

来鲁华课题组同时以 VRN1-DNA 相分离的体系, 系统研究了 IDRs 长度与电荷分布对相分离的影响^[83], 从而解释了蛋白质在进化上如何维持相分离的保守性。VRN1 结构包含两端的 2 个 B3 DNA 结合结构域和中间的 IDR, 植物中包含许多类似 VRN1 结构的 B3 蛋白家族, 它们具有不同长度的 IDRs, 同时有相当一部分具有与 VRN1 类似的 IDR 电荷分离性质。通过构建不同 IDRs 突变体蛋白, 发

现 IDR 的正负电荷分离特性是决定 VRN1 相分离的关键, 只要电荷分离的性质不发生改变, IDRs 其他变化并不会显著影响相分离。同时 IDRs 长度与蛋白的空间压缩程度也会影响相分离。研究提供了一种蛋白质在进化上维持相分离功能保守性的方式, 即进化会引起蛋白质氨基酸组成变化, 但 IDRs 电荷分离的保守性会维持蛋白的相分离。

4.3.3 SGS3 相分离介导转座子沉默 植物中存在 RNA 聚合酶 IV、V 参与 RNA 引导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM), 作用在甲基化修饰的转座子, 以增强转座子沉默^[84]。同时还存在由 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 VI (RNA-dependent RNA polymerase 6, RDR6)介导转座子产生 21~22 nt 小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs), 从而触发 RNAi 和从头甲基化, 以介导转座子沉默的机制, 称为 RDR6-RdDM^[85-86]。而 RDR6 如何特异性识别转座子 RNA 并选择性加工 siRNA 的机制未知。

Jungnam Cho 课题组的研究表明, 转座子 RNA 由于含有非最优密码子, 导致翻译过程中出现经常性的核糖体停滞, 随后诱发 RNA 截断并定位至细胞质中的 siRNA 小体中^[87]。而 siRNA 小体是由其核心组分基因沉默抑制因子 3 (suppressor of gene silencing 3, SGS3)相分离所形成的无膜凝集体。实验同时表明, siRNA 小体常与应激颗粒共定位, SGs 则是由寡尿苷酸结合蛋白 1b (oligouridy-late-binding protein 1 b, UBP1b)相分离介导形成的凝集体。而在转座子高度活跃的 *ddm1* 突变体中, 对富集的 RNA 颗粒 (siRNA 颗粒与 SGs) 的组分使用 RNA-seq 分析发现, RNA 颗粒的 RNA 中转座子的比例明显升高。因此, 转座子 RNA 更容易定位于细胞质中的 RNA 颗粒中, 从而被 RDR6-RdDM 途径特异性识别并修饰。

4.3.4 EMB1579 相分离控制转录和 mRNA 剪接

基因转录和 pre-mRNA 剪接的精确调控对于植物生长发育至关重要。黄善金课题组研究发现, 拟南芥胚胎缺陷因子 1579 (EMBRYO DEFECTIVE 1579, EMB1579)可以在体内与体外形成相分离聚集体, 调控基因转录、mRNA 剪接和植物发育^[88]。研究表明许多与基因转录和 pre-mRNA 剪接调控相关的蛋白质能够和液滴状 EMB1579 蛋白相分离小体在细胞核内共定位, EMB1579 基因的功能缺失引起了诸多基因转录和 pre-mRNA 剪接活动发生变化。EMB1579 可以与 *FLC* 开花通路中的 mul-

tiple suppressor of ira 4(MSI4)、cullin 4(CUL4)、DNA damage binding protein 1(DDB1)蛋白互作,并招募 MSI4、DDB1 进入相分离聚集体。EMB1579 相分离形成细胞核内聚集小体,招募 CUL4-DDB1^{MSI4} 复合体,促进其与 CURLY LEAF(CLF)-polycomb repressive complex 2(PRC2)复合体的互作,从而促使 CLF-PRC2 复合体在 *FLC* 基因位点上形成并维持 H3K27me3,以调控植物开花。

4.3.5 HRLP 相分离调控拟南芥开花时间 转录后调控在真核生物控制基因表达中不可或缺,新生的 pre-mRNA 需要经过一系列严格的加工过程,包括加帽、多聚腺苷酸化、剪接和修饰等,才能形成成熟的 mRNA,而 RNA 结合蛋白在其中发挥重要作用。俞皓课题组的研究揭示了拟南芥不均一核糖核蛋白 R 样蛋白(hnRNP R-like protein, HRLP)的相分离调控植物开花时间的分子机理^[89]。

研究组首先发现 *HRLP* 基因敲除突变体表现出明显的晚花表型,并发现开花抑制基因 *FLC* 是 *HRLP* 蛋白调控开花的主要下游基因,*HRLP* 蛋白能通过抑制 *FLC* 的共转录剪接,从而降低 *FLC* 的转录水平。深入研究发现 *HRLP* 与富含精氨酸/丝氨酸 45(arginine/serine-rich 45, SR45)剪接因子会被同时招募到新生 *FLC* RNA 内含子 I 附近的区域,通过形成相分离聚集体来抑制 *FLC* 剪接过程;同时,剪接过程会增强 R 环形成,并阻碍 RNA 聚合酶 II 被招募至内含子 I 周围,从而抑制 *FLC* 转录。*FLC* 剪接和转录过程的抑制,确保拟南芥从植物营养生长阶段正确过渡到生殖生长阶段。

4.4 细胞结构内的相分离

4.4.1 STT1/2 相分离介导叶绿体内蛋白质分选

张立新课题组研究发现,两种具有重复锚蛋白结构域的叶绿体蛋白 STT1 和 STT2 可形成异源二聚体,选择性结合底物蛋白并形成相分离凝集体,通过双精氨酸易位(chloroplast twin arginine translocation, cpTat)途径介导叶绿体内蛋白质的分选^[90]。研究者通过筛选与 cpTat 途径的底物 23 KDA 放氧复合亚基(oxygen evolving complex subunit 23 KDA, OE23)互作的蛋白,筛选到了 STT1 和 STT2。STT1 和 STT2 依赖 C 端重复锚蛋白结构域形成异源二聚体结构,同时 STT1 和 STT2 在 N 端具有 IDRs,与底物蛋白结合促使 STT1/2 复合体进一步组装,形成相分离凝集体。STT1/2 突变体在降低体外相分离能力的同时,也降低了 cpTat 途径的转运能力。研究还发现了一种与 STT1/2 互作

的蛋白质,高叶绿素荧光 106(high chlorophyll fluorescence 106, Hcf106),能与底物蛋白 OE23 竞争性结合 STT1/2,抑制 STT1/2 与底物相分离凝集体的形成,促进底物蛋白质的释放,完成底物蛋白质的靶向运输。

4.4.2 花粉多糖层相分离介导花粉表面模式形成

花粉具有种类繁多的表面模式,但花粉表面模式在同种植物中往往保持一致,不同植物间形态各异。A. M. Sweeney 课题组研究发现,花粉表面模式是由附着在初生外壁内的多糖层相分离所介导形成^[91]。以西番花为模式植物,研究了花粉在各个时期的形态,发现在花粉初生外壁完全发育前,初生外壁与细胞膜之前会产生明显间隙,其内的多糖层会经历相分离过程。当多糖层相分离最终达到稳态时,会使花粉表面模式达到一致状态,这种情况花粉出现在 10% 的植物中;而当多糖层相分离最终并未达到稳态时,花粉表面模式将出现差异化,这种情况花粉出现在 90% 的植物中,多样化的花粉表面模式更符合自然选择规律。研究最终建立了多糖层相分离介导花粉表面模式形成的生物学模型。

4.4.3 Rubisco 相分离 Manajit Hayer-Hartl 课题组对 Rubisco-CcmM 复合物结构进行了解析,通过生理实验验证了 Rubisco 在 β -羧酶体生物发生过程中由 CcmM 介导的相变过程的分子机制^[92],证明了相分离过程能影响 Rubisco 酶活性,同时深入剖析了 Rubisco 相分离的分子机制,发现 Rubisco 相分离是由 Rubisco 和 small subunit-like(SSUL)结构域产生多价相互作用介导的。而 Oliver Mueller-Cajar 课题组之前报道了在真核藻类的淀粉核内,Rubisco 通过与基本核蛋白成分 1(essential pyrenoid component 1, EPYC1)蛋白相互作用,也能形成液滴状聚集体^[93]。

4.4.4 ADCP1 调控异染色质形成 动物异染色质蛋白 1(heterochromatin protein 1, HP1)是组蛋白 H3K9 甲基化的阅读蛋白^[94-95],介导异染色质的形成^[96],但在植物中并没有找到与 HP1 蛋白质同源的 H3K9 甲基化阅读蛋白。李海涛课题组研究发现了植物中一种与 H3K9me2 结合的蛋白 agenet domain (AGD)-containing P1(ADCP1)^[97]。解析了 ADCP1 识别 H3K9me2 的结构基础,ADCP1 的 N、C 末端与 Agent 结构域之间的脯氨酸 loop 形成稳定的疏水中心,使多肽易于进入并识别。研究使用免疫荧光标记、ChIP-seq 证实了 ADCP1 与 H3K9me2 的共定位,ADCP1 缺失会造成染色中心的解聚,该

过程依赖于 ADCP1 对 H3K9me2 的识别。动物 HP1 蛋白质已被证实具有相分离性质,且 HP1 的相分离介导了异染色质的形成。实验进一步对 ADCP1 蛋白质的相分离性质进行验证,发现 ADCP1 与体外重构的 H3K9me3 修饰的核小体共同产生相分离现象,相分离行为依赖于 ADCP1 对 H3K9 甲基化的识别,这说明 ADCP1 也可能同动物 HP1 蛋白质一样,能通过相分离介导异染色质形成。

5 相分离的规律与鉴定

生物大分子相分离的形成,主要由蛋白质固有无序区介导的多价相互作用所驱动,而无序区内氨基酸残基序列决定了蛋白质相分离的能力。无序区一般富含甘氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸和酪氨酸等,因此可以通过分析蛋白质的氨基酸序列,来预测蛋白质是否具有无序区,常用的预测网站有 IUPred3、MobiDb 和 PLAAC 等,常用的相分离数据库有 PhaSepDB、LLPSDB、PhaSePro、DrLLPS 和 PrionScan 等。

现有研究并没有提出一个统一而普适性的规律,将无序区内氨基酸残基序列与蛋白质相分离能力准确地联系起来。但也有许多研究提出了特定氨基酸在某些蛋白质相分离中所产生的作用。例如,研究最多的 FUS 蛋白质,其相分离能力是由酪氨酸与精氨酸的含量决定的,而甘氨酸会维持聚集体的液相化,谷氨酰胺和丝氨酸则促进固相化^[98]。RB-GD2/4 无序区中酪氨酸残基组成的 TRA,介导了其响应热胁迫而形成的相分离现象^[67]。VRN1 中无序区的正负电荷分离的性质,是维持相分离保守型的决定因素^[83],同时蛋白质中化学键的改变也会影响相分离现象。如 TMF 蛋白质相分离,会受到 TMF 分子内半胱氨酸残基形成的分子间二硫键的调控,环境的 ROS 信号促使 TMF 分子间二硫键的形成,促进由 IDR 驱动的 TMF 蛋白质相分离,使得 TMF 蛋白质成为一种 ROS 感受器^[58]。

蛋白质内的氢键对相分离形成也十分重要,Steven McKnight 课题组以 TAR DNA 结合蛋白 43(TAR DNA-binding protein 43, TDP-43)为对象,研究了 LCDs 形成相分离的分子机理^[99]。研究表明 TDP-43 LCDs 上有一段相分离核心区域,这段区域内每个氨基酸位点处形成的肽主链间氢键作用对于相分离功能至关重要,这些氨基酸位点处单个肽主链间氢键作用的缺失就能显著削弱 TDP-43 LCDs 的相分离能力。同时研究表明,LCDs 可利用

脯氨酸不能形成肽主链间氢键的性质,调整脯氨酸分布,平衡 LCDs 之间动态相互作用,从而调节形成相分离的能力。

通过对蛋白质序列的分析,可以预测出蛋白质相分离的潜在能力,之后需要对蛋白质相分离进行验证。现阶段鉴定生物大分子液液相分离的实验标准主要包括:(1)凝集体形状尺寸,显微镜下凝集体是否呈圆形,直径是否接近微米级;(2)凝集体形成的动态性,活细胞内或体外重构体系中,凝集体是否会发生融合或分离现象;(3)凝集体内分子的运动性,使用荧光漂白恢复实验鉴定凝集体内分子是否具有动态性;(4)体外重构相分离相图,使用体外表达纯化的蛋白质在重构的体系中,构建随蛋白质浓度和盐浓度变化而变化的相分离形成图谱。

6 植物中相分离研究展望

生物大分子相分离的研究无疑对解开细胞生命活动之谜具有重要的意义,目前的研究中存在许多争议,例如相分离与基因表达调控是否存在直接关系;相分离与经典蛋白质相互作用产生的功能的区别;相分离蛋白质鉴定的标准,如荧光漂白恢复实验能否作为相分离的鉴定标准仍存在争议;体内体外实验的区别,如外源与内源蛋白质浓度、环境因素、互作因子的影响;荧光蛋白等标签对相分离的影响;IDRs 是否具有可替换性;相分离液滴对组分是否具有严格的控制;相分离是否具有广谱性与进化保守性等等。

细胞内生物大分子相分离具备多样的生物学功能,而具备相分离性质的潜在蛋白质也不在少数。有研究对 7 种植物(拟南芥、小立碗藓、玉米、小麦、番茄、大豆和无油樟)、酿酒酵母以及人体蛋白质组进行分析^[16],通过预测 IDRs,鉴定潜在的相分离蛋白质。在拟南芥中发现了 2 668 种具有 IDRs 的蛋白质,在人体蛋白质组中发现了 2 599 种含 IDRs 的蛋白质。对所鉴定的蛋白质进行功能分析,发现其中大多数为核酸结合蛋白质,还包括一些蛋白质修饰酶、转录调节因子和染色质结合蛋白^[16]。

同时,最新的研究使用生物素化异恶唑(biotinylated isoxazole, b-isox)沉淀法结合质谱分析,鉴定了植物细胞内的一些具有潜在相分离能力的蛋白质^[100]。小分子化合物生物素化异恶唑可在低温下形成微晶体,其表面能特异结合 LCDs 蛋白,从而能富集潜在的相分离蛋白质。研究从拟南芥幼苗中鉴定出 729 个具有潜在相分离能力的蛋白,从花絮中

鉴定出 641 个潜在蛋白,拟南芥中总共鉴定出 985 个具有潜在相分离能力的蛋白质。通过酵母异源表达系统,验证了其中的 70 个蛋白质,发现有 67% 的蛋白能形成凝集体,而其余蛋白也能在热激处理后形成凝集体。研究也对另外不同的植物物种潜在相分离蛋白进行鉴定,包括莱茵衣藻、小立碗藓、水稻、玉米、小麦、大白菜和番茄,为相关植物的相分离研究奠定了基础。

后续研究仍需要通过分子生物学、生理生化等实验手段对潜在的相分离蛋白进行分析,鉴定它们在体内体外的相分离现象,揭示相分离与具体的生物学功能的关系。

生物大分子相分离的研究也需要多种科技手段支持,例如解析分子结构需要 X 射线晶体学成像、核磁共振、冷冻电镜等技术,分析相分离功能的 ChIP、IP-MS、各种互作实验以及测序技术等,观察相分离凝集体的激光共聚焦显微镜和透射电镜等显微成像技术,鉴定相分离凝集体组分的离心、标记、分选及大规模基因筛选、液滴共沉淀和水凝胶捕获等技术^[101],以及细胞内操控相分离变化的光控液滴技术^[102]。越来越先进的研究理念和技术,将促使我们深入解析相分离凝集体复杂的分子组成与动态变化,实现在细胞内外对复合体相分离进行操纵。

相分离所形成的生物大分子间的相互作用,有

许多是微弱的、瞬时的相互作用,因此常规的 IP-MS 技术很难寻找到与目的分子产生微弱的、瞬时的相互作用的潜在分子,从而造成鉴定相分离小体组分的困难。邻近标记技术(proximity labeling, PL)是一类检测细胞内蛋白质互作关系及亚细胞结构内蛋白质组或核酸组成的新技术^[103],作为 IP-MS 的一种补充技术,极大提高了寻找互作分子的效率,对于鉴定相分离小体的组分作用巨大。在植物中,通过定向进化得到一种理想的生物素连接酶 TurboID,在 25 ℃ 下,TurboID 以生物素为底物,10 min 内即可在活细胞中快速完成邻近蛋白的生物素化标记,十分适合对植物细胞的研究^[104]。TurboID 技术能特异标记距离目的蛋白质 10 nm 范围内的蛋白质,与传统的免疫共沉淀等技术相比,可以直接在活细胞内对互作蛋白质进行特异性标记,鉴定互作蛋白质的效率达到 10 倍以上,对于瞬时发生的、微弱的蛋白质互作,以及互作蛋白质丰度较低的研究十分有效。

生物大分子相分离领域不断有新进展,目前的研究推进了我们对相分离分子机理的深入理解。相分离在动物细胞中的功能,提示着植物中相分离可能具有类似作用。而植物细胞中特有的相分离现象,更是我们研究植物生命活动的全新突破口。

参考文献:

[1] WAGNER R. Einige bemerkungen und fragen über das keimbläschen (vesicular germinativa)[J]. *Müller's Archiv Anat Physiol Wissenschaft Med*, 1835, **268**(1 835): 373-377.

[2] VALENTIN G. Repertorium für anatomie und physiologie[M]. 1837.

[3] DECKER C J, PARKER R. P-bodies and stress granules: Possible roles in the control of translation and mRNA degradation[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, **4**(9): a012286.

[4] BANJADE S, ROSEN M K. Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors[J]. *eLife*, 2014, **3**: e04123.

[5] 吴素萱. 细胞核的更新现象[J]. *植物学报*, 1956(1): 1-14.

[6] 史少颐. 细胞的超微结构(上)[J]. *中国畜牧兽医*, 1962(1): 26-27.

[7] 丛 斌, 杨茂成, 赵建华, 等. 小麦根尖细胞分化过程中超微结构变化的研究[J]. *西北植物学报*, 1996, **16**(1): 8-12.

[8] CONG B, YANG M C, ZHAO J H, *et al*. Studies on ultrastructure changes during root tip celldifferentiation of *Triticum aestivum* L. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1996, **16**(1): 8-12.

[9] 杨亨利. 细胞的亚显微结构[J]. *生物学通报*, 1964(5): 25-32.

[10] YANG H L. Submicrostructure of cells[J]. *Bulletin of Biology*, 1964(5): 25-32.

[11] 贾敬芬, 谷祝平, 郑国锴. 百合花丝组织培养及其细胞学观察[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1981(1): 17-21.

[12] JIA J F, GU Z P, ZHENG G C. Tissue culture of lily filament and its cytological observations [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1981(1): 17-21.

[13] 吴继林, 谭海燕, 郝秉中. 巴西橡胶树种子超微结构的研究[J]. *热带作物学报*, 1996, **17**(2): 11-18.

[14] WU J L, TAN H Y, HAO B Z. Ultrastrudure of seeds of *Hevea brasiliensis*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 1996, **17**(2): 11-18.

[15] 李 灵, 吉成均, 尤瑞麟. 小麦大孢子发生过程中的超微结构研究[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2001, **37**(4): 444-453.

[16] LI L, JI C J, YOU R L. Ultrastructural studies on megasporogenesis in *Triticum aestivum* L.[J]. *Acta Scicentiarum Naturalum Universitis Pekinesis*, 2001, **37**(4): 444-453.

- [12] 王华春, 邢 苗, 张传善. 微核仁是富含剪接因子 SC35 的核内小体[J]. 植物学报, 1999, **41**(4): 102-104.
WANG H C, XING M, ZHANG C S. Mininucleolus: An intranuclear body enriched with the splicing factor SC35[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1999, **41**(4): 102-104.
- [13] HUA Y M, ZHOU J H. Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules[J]. *FEBS Letters*, 2004, **572**(1/3): 69-74.
- [14] SUN J, XU H Z, SUBRAMONY S H, *et al.* Interactions between Coilin and PIAS_γ partially link Cajal bodies to PML bodies[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, **118**(21): 4 995-5 003.
- [15] LADOUCEUR A M, PARMAR B S, BIEDZINSKI S, *et al.* Clusters of bacterial RNA polymerase are biomolecular condensates that assemble through liquid-liquid phase separation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, **117**(31): 18 540-18 549.
- [16] EMENECKER R J, HOLEHOUSE A S, STRADER L C. Emerging roles for phase separation in plants[J]. *Developmental Cell*, 2020, **55**(1): 69-83.
- [17] BRANGWYNNE C P, ECKMANN C R, COURSON D S, *et al.* Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation[J]. *Science*, 2009, **324**(5 935): 1 729-1 732.
- [18] BRANGWYNNE C P, MITCHISON T J, HYMAN A A. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(11): 4 334-4 339.
- [19] PATEL A, LEE H O, JAWERTH L, *et al.* A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation[J]. *Cell*, 2015, **162**(5): 1 066-1 077.
- [20] BOEYNAEMS S, ALBERTI S, FAWZI N L, *et al.* Protein phase separation: A new phase in cell biology[J]. *Trends in Cell Biology*, 2018, **28**(6): 420-435.
- [21] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, *et al.* Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, **18**(5): 285-298.
- [22] KAGANOVICH D, KOPITO R, FRYDMAN J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments[J]. *Nature*, 2008, **454**(7 208): 1 088-1 095.
- [23] CUEVAS-VELAZQUEZ C L, DINNENY J R. Organization out of disorder: Liquid-liquid phase separation in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, **45**: 68-74.
- [24] YOO H, TRIANDAFILLOU C, DRUMMOND D A. Cellular sensing by phase separation: Using the process, not just the products[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, **294**(18): 7 151-7 159.
- [25] KIM J, LEE H, LEE H G, *et al.* Get closer and make hotspots: Liquid-liquid phase separation in plants[J]. *EMBO Reports*, 2021, **22**(5): e51656.
- [26] DIGNON G L, ZHENG W W, KIM Y C, *et al.* Temperature-controlled liquid-liquid phase separation of disordered proteins[J]. *ACS Central Science*, 2019, **5**(5): 821-830.
- [27] MITREA D M, KRIWACKI R W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2016, **14**(1): 1.
- [28] CHONG P A, FORMAN-KAY J D. Liquid-liquid phase separation in cellular signaling systems[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, **41**: 180-186.
- [29] BANANI S F, RICE A M, PEEPLES W B, *et al.* Compositional control of phase-separated cellular bodies[J]. *Cell*, 2016, **166**(3): 651-663.
- [30] MOLLIEUX A, TEMIROV J, LEE J H, *et al.* Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization[J]. *Cell*, 2015, **163**(1): 123-133.
- [31] KATO M, HAN T W, XIE S H, *et al.* Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels[J]. *Cell*, 2012, **149**(4): 753-767.
- [32] FRANZMANN T M, ALBERTI S. Prion-like low-complexity sequences: Key regulators of protein solubility and phase behavior[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, **294**(18): 7 128-7 136.
- [33] OLDFIELD C J, DUNKER A K. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2014, **83**: 553-584.
- [34] TOMPA P, SCHAD E, TANTOS A, *et al.* Intrinsically disordered proteins: Emerging interaction specialists [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, **35**: 49-59.
- [35] KING O D, GITLER A D, SHORTER J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease[J]. *Brain Research*, 2012, **1462**: 61-80.
- [36] HENNIG S, KONG G, MANNEN T, *et al.* Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2015, **210**(4): 529-539.
- [37] GOMES E, SHORTER J. The molecular language of membraneless organelles[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, **294**(18): 7 115-7 127.
- [38] OWEN I, SHEWMAKER F. The role of post-translational modifications in the phase transitions of intrinsically disordered proteins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(21): 5 501.
- [39] LI P L, BANJADE S, CHENG H C, *et al.* Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins[J]. *Nature*, 2012, **483**(7 389): 336-340.
- [40] WILSON M I, GILL D J, PERISIC O, *et al.* PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62[J]. *Molecular Cell*, 2003, **12**(1): 39-50.
- [41] JAIN A, VALE R D. RNA phase transitions in repeat expansion disorders[J]. *Nature*, 2017, **546**(7657): 243-247.
- [42] KALININA N O, MAKAROVA S, MAKHOTENKO A, *et al.* The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 132.
- [43] COLLIER S, PENDLE A, BOUDONCK K, *et al.* A distant

- coilin homologue is required for the formation of Cajal bodies in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, **17**(7): 2 942-2 951.
- [44] REDDY A S N, DAY I S, GÖHRING J, *et al.* Localization and dynamics of nuclear speckles in plants[J]. *Plant Physiology*, 2012, **158**(1): 67-77.
- [45] ROTHKAMM K, BARNARD S, MOQUET J, *et al.* DNA damage foci: Meaning and significance[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2015, **56**(6): 491-504.
- [46] LIU Q, SHI L L, FANG Y D. Dicing bodies[J]. *Plant Physiology*, 2012, **158**(1): 61-66.
- [47] VAN BUSKIRK E K, DECKER P V, CHEN M. Photobodies in light signaling[J]. *Plant Physiology*, 2012, **158**(1): 52-60.
- [48] MALDONADO-BONILLA L D. Composition and function of P bodies in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 201.
- [49] HAMADA T, YAKO M, MINEGISHI M, *et al.* Stress Granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Cell Science*, 2018, **131**(16).
- [50] ZAVALIEV R, MOHAN R, CHEN T Y, *et al.* Formation of NPR1 condensates promotes cell survival during the plant immune response[J]. *Cell*, 2020, **182**(5): 1 093-1 108.
- [51] JUNG J H, BARBOSA A D, HUTIN S, *et al.* A prion-like domain in ELF₃ functions as a thermosensor in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2020, **585**(7 824): 256-260.
- [52] 魏 华, 王 岩, 刘宝辉, 等. 植物生物钟及其调控生长发育的研究进展[J]. 植物学报, 2018, **53**(4): 456-467.
- WEI H, WANG Y, LIU B H, *et al.* Deciphering the underlying mechanism of the plant circadian system and its regulation on plant growth and development[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, **53**(4): 456-467.
- [53] JUNG J H, DOMIJAN M, KLOSE C, *et al.* Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2016, **354**(6 314): 886-889.
- [54] CHEN D, LYU M H, KOU X X, *et al.* Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B[J]. *Molecular Cell*, 2022, **82**(16): 3 015-3 029.
- [55] WANG B Y, ZHANG H H, HUAI J L, *et al.* Condensation of SEUSS promotes hyperosmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, **18**(12): 1 361-1 369.
- [56] MACALISTER C A, PARK S J, JIANG K, *et al.* Synchronization of the flowering transition by the tomato *TERMINATING FLOWER* gene[J]. *Nature Genetics*, 2012, **44**(12): 1 393-1 398.
- [57] LIPPMAN Z B, COHEN O, ALVAREZ J P, *et al.* The making of a compound inflorescence in tomato and related nightshades[J]. *PLoS Biology*, 2008, **6**(11): e288.
- [58] HUANG X Z, CHEN S D, LI W P, *et al.* ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, **17**(5): 549-557.
- [59] HUANG X Z, XIAO N, ZOU Y P, *et al.* Heterotypic transcriptional condensates formed by prion-like paralogous proteins canalize flowering transition in tomato[J]. *Genome Biology*, 2022, **23**(1): 78.
- [60] DORONE Y, BOEYNAEMS S, FLORES E, *et al.* A prion-like protein regulator of seed germination undergoes hydration-dependent phase separation[J]. *Cell*, 2021, **184**(16): 4 284-4 298.
- [61] FU Z Q, DONG X N. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, **64**: 839-863.
- [62] 郭晓雨, 刘 俊, 汪 天. 植物核质运输与其先天免疫研究进展[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(7): 1 488-1 496.
- GUO X Y, LIU J, WANG T. Plant nucleocytoplasmic transport and innate immunity[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(7): 1 488-1 496.
- [64] KIM J H, CASTROVERDE C D M, HUANG S, *et al.* Increasing the resilience of plant immunity to a warming climate [J]. *Nature*, 2022, **607**(7918): 339-344.
- [65] 徐 雷, 贾飞飞, 王利琳. 拟南芥开花诱导途径分子机制研究进展[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(5): 1 057-1 065.
- XU L, JIA F F, WANG L L. Progresses on molecular mechanisms of flowering transition in *Arabidopsis* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, **31**(5): 1 057-1 065.
- [66] ZHU P, LISTER C, DEAN C. Cold-induced *Arabidopsis* FRIGIDA nuclear condensates for FLC repression[J]. *Nature*, 2021, **599**(7 886): 657-661.
- [67] ZHU S B, GU J G, YAO J J, *et al.* Liquid-liquid phase separation of RBGD2/4 is required for heat stress resistance in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2022, **57**(5): 583-597.
- [68] TONG J J, REN Z T, SUN L H, *et al.* ALBA proteins confer thermotolerance through stabilizing HSF messenger RNAs in cytoplasmic granules[J]. *Nature Plants*, 2022, **8**(7): 778-791.
- [69] WANG X, JIANG B C, GU L F, *et al.* A photoregulatory mechanism of the circadian clock in *Arabidopsis* [J]. *Nature Plants*, 2021, **7**(10): 1 397-1 408.
- [70] ZHAO Z W, DENT C, LIANG H F, *et al.* CRY2 interacts with CIS₁ to regulate thermosensory flowering via FLM alternative splicing[J]. *Nature Communications*, 2022, **13**: 7 045.
- [71] FANG X F, WANG L, ISHIKAWA R, *et al.* *Arabidopsis* FLL2 promotes liquid-liquid phase separation of polyadenylation complexes[J]. *Nature*, 2019, **569**(7 755): 265-269.
- [72] 郭 韬, 李广林, 魏 强, 等. 植物 MicroRNA 功能的研究进展[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(11): 2 347-2 354.
- GUO T, LI G L, WEI Q, *et al.* The function of plant microRNA [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, **31**(11): 2 347-2 354.
- [73] FANG Y D, SPECTOR D L. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants[J]. *Current Biology*, 2007, **17**(9): 818-823.
- [74] SONG X W, LI Y, CAO X F, *et al.* microRNAs and their

- regulatory roles in plant-environment interactions[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, **70**: 489-525.
- [75] XIE D Q, CHEN M, NIU J R, *et al.* Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in *Arabidopsis* [J]. *Nature Cell Biology*, 2021, **23**(1): 32-39.
- [76] ZHANG G M, WANG Z, DU Z, *et al.* mTOR regulates phase separation of PGL granules to modulate their autophagic degradation[J]. *Cell*, 2018, **174**(6): 1 492-1 506.
- [77] GUAN B, XUE H W. *Arabidopsis* AUTOPHAGY-RELATED3 (ATG3) facilitates the liquid-liquid phase separation of ATG8e to promote autophagy[J]. *Science Bulletin*, 2022, **67**(4): 350-354.
- [78] SONG P, YANG J, WANG C, *et al.* *Arabidopsis* N(6)-methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies [J]. *Molecular Plant*, 2021, **14**(4): 571-587.
- [79] POWERS S K, HOLEHOUSE A S, KORASICK D A, *et al.* Nucleo-cytoplasmic partitioning of ARF proteins controls auxin responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Cell*, 2019, **76**(1): 177-190.
- [80] BASTOW R, MYLNE J S, LISTER C, *et al.* Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation [J]. *Nature*, 2004, **427**(6 970): 164-167.
- [81] MYLNE J S, BARRETT L, TESSADORI F, *et al.* LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(13): 5 012-5 017.
- [82] ZHOU H B, SONG Z H, ZHONG S, *et al.* Mechanism of DNA-induced phase separation for transcriptional repressor VRN₁ [J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2019, **58**(15): 4 858-4 862.
- [83] WANG Y Y, ZHOU H B, SUN X Y, *et al.* Charge segregation in the intrinsically disordered region governs VRN₁ and DNA liquid-like phase separation robustness[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, **433**(22): 167 269.
- [84] BORGES F, MARTIENSSEN R A. The expanding world of small RNAs in plants[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, **16**(12): 727-741.
- [85] FULTZ D, CHOUDURY S G, SLOTKIN R K. Silencing of active transposable elements in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, **27**: 67-76.
- [86] CHO J. Transposon-derived non-coding RNAs and their function in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 600.
- [87] KIM E Y, WANG L, LEI Z, *et al.* Ribosome stalling and SGS3 phase separation prime the epigenetic silencing of transposons[J]. *Nature Plants*, 2021, **7**(3): 303-309.
- [88] ZHANG Y L, LI Z K, CHEN N Z, *et al.* Phase separation of *Arabidopsis* EMB1579 controls transcription, mRNA splicing, and development [J]. *PLoS Biology*, 2020, **18**(7): e3000782.
- [89] ZHANG Y, FAN S, HUA C M, *et al.* Phase separation of HRLP regulates flowering time in *Arabidopsis* [J]. *Science Advances*, 2022, **8**(25).
- [90] OUYANG M, LI X Y, ZHANG J, *et al.* Liquid-liquid phase transition drives intra-chloroplast cargo sorting [J]. *Cell*, 2020, **180**(6): 1 144-1 159.
- [91] RADJA A, HORSLEY E M, LAVRETOVICH M O, *et al.* Pollen cell wall patterns form from modulated phases[J]. *Cell*, 2019, **176**(4): 856-868.
- [92] FREEMAN ROSENZWEIG E S, XU B, KUHN CUELLAR L, *et al.* The eukaryotic CO₂-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization[J]. *Cell*, 2017, **171**(1): 148-162.
- [93] WUNDER T, LE HUNG CHENG S, LAI S K, *et al.* The phase separation underlying the pyrenoid-based microalgal Rubisco supercharger[J]. *Nature Communications*, 2018, **9**: 5 076.
- [94] LACHNER M, OCARROLL D, REA S, *et al.* Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins [J]. *Nature*, 2001, **410**(6 824): 116-120.
- [95] BANNISTER A J, ZEGERMAN P, PARTRIDGE J F, *et al.* Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain[J]. *Nature*, 2001, **410**(6 824): 120-124.
- [96] MAISON C, ALMOUZNI G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, **5**(4): 296-305.
- [97] ZHAO S, CHENG L L, GAO Y F, *et al.* Plant HP1 protein ADCP1 links multivalent H3K9 methylation readout to heterochromatin formation[J]. *Cell Research*, 2019, **29**(1): 54-66.
- [98] WANG J, CHOI J M, HOLEHOUSE A S, *et al.* A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins[J]. *Cell*, 2018, **174**(3): 688-699.
- [99] ZHOU X M, SUMROW L, TASHIRO K, *et al.* Mutations linked to neurological disease enhance self-association of low-complexity protein sequences[J]. *Science*, 2022, **377**(6 601).
- [100] ZHANG H H, PENG F Y, HE C, *et al.* Large-scale identification of potential phase-separation proteins from plants using a cell-free system[J]. *Molecular Plant*, 2023, **16**(2): 310-313.
- [101] GAO Y F, LI X, LI P L, *et al.* A brief guideline for studies of phase-separated biomolecular condensates [J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, **18**(12): 1 307-1 318.
- [102] SHIN Y, BERRY J, PANNUCCI N, *et al.* Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optoDroplets[J]. *Cell*, 2017, **168**(1/2): 159-171.
- [103] YANG X X, WEN Z Y, ZHANG D L, *et al.* Proximity labeling: An emerging tool for probing in planta molecular interactions[J]. *Plant Communications*, 2020, **2**(2): 100 137.
- [104] ZHANG Y L, SONG G Y, LAL N K, *et al.* TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity[J]. *Nature Communications*, 2019, **10**: 3 252.