

# 玉米 $\alpha$ 微管蛋白分子生物学研究进展<sup>①</sup>

许莉 郑文竹 左正宏 周涵韬 许玉德

(厦门大学生物系 厦门 361005)

**摘要** 自 1963 年在植物细胞中发现微管以来,其研究取得了较大进展。 $\alpha$ -微管蛋白是组成微管的基本单位之一。本文综述了玉米  $\alpha$ -微管蛋白基因及其表达调控的研究进展。

**关键词** 玉米,  $\alpha$ -微管蛋白基因, 表达调控

## Progress in Molecular Biological Studies of $\alpha$ -Tubulin in Maize (*Zea mays*)

XU Li ZHENG Wen Zhu ZUO Zheng Hong ZHOU Han Tao XU Yu De

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** The studies on microtubule have been made great progresses since microtubule was found in plant cells in 1963. Researches on the genes and the regulation of gene expression of  $\alpha$  tubulin in maize, a subunit of tubulin which is a major constituent of microtubule, are reviewed.

**Key words** Maize,  $\alpha$  tubulin gene, Regulation of gene expression

微管(microtubule)是真核细胞中普遍存在的蛋白结构,其与微丝(microfilament)及中间纤维(intermediate filament)共同组成细胞骨架(cytoskeleton)。微管在细胞形态、细胞分裂、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分化、细胞伸长及细胞极性的决定等方面起着重要的作用。自 1963 年 Ledbetter 和 Porter 在植物细胞中发现微管以来,其研究取得了很大进展。

### 1 微管的结构

微管是外形笔直、坚硬的中空圆柱体,直径为 20~25 nm,长度不一。组成微管的基本单位是异构的微管蛋白二聚体。此二聚体由  $\alpha$ -微管蛋白和  $\beta$ -微管蛋白以非共价键连结而成。微管是由微管组织中心(microtubule organizing centers, MTOC)形成的。MTOC 常与分裂细胞的着丝点、成膜体、中心粒、基体及纺锤体联结在一起。实验证明,着丝点和成膜体确实是微管聚合的起始部位,如用微束紫外线照射它们,就会破坏微管的形成。MTOC 存在有微管蛋白亚单位库,可以用作微管装配的原料。微管蛋白二聚体中的  $\alpha$ -及  $\beta$ -微管蛋白与溶液中的微管蛋白单体形成动态平衡,但由于微管蛋白二聚体的解聚常数非常低,溶液中的微管蛋白基本上以二聚体的形式存在(Sackett 等, 1991)。微管在体内的装配和去装配是时间和空间上高度调节的活动,有一些药物和物理因数如微管蛋白的浓度、非微管蛋白即微管结合蛋白(microtubule associated proteins, MAPs)、鸟嘌呤核苷酸水平、二价阳离子、

<sup>①</sup> 收稿日期: 1998-11-18 接受日期: 1999-01-26 责任编辑: 姜联合

环核苷酸及微管的巯基状态等均能改变细胞的调节活动的平衡状态。此外, 转译后的微管蛋白的酪氨酰化, 磷酸化和糖基化等对微管的装配也有一定的影响。加入抗微管药物和上述物理因素会破坏平衡作用, 可能使这些药物与亚单位结合, 而阻止了亚单位聚合成微管。

## 2 微管蛋白的保守性

根据氨基酸序列的同源性, 微管蛋白可以分为  $\alpha$  微管蛋白,  $\beta$  微管蛋白和  $\gamma$  微管蛋白。 $\gamma$  微管蛋白是新近发现的具有特殊功能的微管蛋白(Oakley 等, 1989)。所有的微管蛋白都是由 445 ~ 450 个氨基酸残基组成的酸性多肽, 分子量约 55 kD, 为球状蛋白。 $\alpha$ -及  $\beta$ -微管蛋白之间氨基酸同源性为 35 % ~ 40 %。微管蛋白的可变残基主要集中于 C 末端 15 ~ 20 个残基和 N 端 30 ~ 45 个残基区域(Cleveland 等, 1985)。

对大量的不同物种来源的微管蛋白基因及氨基酸序列的比较分析结果证明, 微管蛋白是生物进化中最为保守的蛋白质之一。脊椎动物微管蛋白基因间有 99% 的同源性, 哺乳动物的微管蛋白与藻类、原生动物的微管蛋白具有 82 % ~ 96 % 的氨基酸序列同一性; 被子植物和脊椎动物的微管蛋白至少具有 80% 的氨基酸序列同源性(Silflow 等, 1987; Fosket, 1989)。植物微管蛋白象所有其它生物体的微管蛋白一样高度保守。将不同物种的微管蛋白引入植物细胞, 外源微管蛋白可以被组合进入植物微管阵列而不影响其功能(Zhang 等, 1990; Vantard 等, 1990)。

## 3 $\alpha$ 微管蛋白基因

在植物中,  $\alpha$ - $\beta$ -及  $\gamma$  微管蛋白基因都已被克隆并进行了序列分析。在所研究的植物种属中, 已知微管蛋白都是由多基因家族编码的。拟南芥基因组含有至少 6 个被表达的  $\alpha$  微管蛋白基因(Kopczak 等, 1992); 9 个被表达的  $\beta$  微管蛋白基因(Snustad 等, 1992)。玉米可能有 9 个  $\alpha$  微管蛋白基因及 16 个  $\beta$  微管蛋白基因, 其中, 有 6 个  $\alpha$  微管蛋白和 2 个  $\beta$ -微管蛋白基因被测序(Montoliu 等, 1989, 1990; Villemur 等, 1992, 1994)。另外, 在水稻(Breviario 等, 1995; Koga-Ban, 1995)、大豆(Guillinan 等, 1987)、豌豆(Liaud 等, 1992; Brierley 等, 1995)等植物中也发现了微管蛋白的多基因家族现象。

Villemur 等(1992)详细分析了玉米基因组中 81 个  $\alpha$  微管蛋白 cDNA 克隆, 发现至少有 6 个被表达的  $\alpha$  微管蛋白基因, 它们的核苷酸序列同源性为 80% ~ 96%, 氨基酸同源性达 88% ~ 99% 以上。

核苷酸序列及其推断的氨基酸序列比较分析表明, 这些微管蛋白基因可被分为三个亚组。tua1 和 tua2 两个基因串联排列, 相距 1.5 kb, 编码的蛋白仅有两个氨基酸的差异, 其 5' 和 3' 非编码区有 60 % 的同源性(Montoliu 等, 1989)。tua4 与 tua1, tua2 的非编码区同源性分别为 70 % 和 40 %。在最具变异的两个区域, tua4 与 tua1 编码相同的蛋白, tua1, tua2 与 tua4 在氨基酸序列 438 位均编码苯丙氨酸, 但在玉米的其他  $\alpha$  微管蛋白和拟南芥  $\alpha$  微管蛋白 C 末端的 30 个氨基酸中都没有编码苯丙氨酸。tua1, tua2 和 tua4 核苷酸序列上的极大相似性表明, 它们是紧密相关的, 共同划分为亚组 I。tua5 和 tua6 编码的蛋白仅存在两个氨基酸的差异, 为亚组 II。它们的非编码区同源性为 90 %。亚组 II 基因编

码的蛋白与亚组 I 蛋白的同源性为 92 %，差异较大。tua3 基因编码的蛋白与亚组 I 和亚组 II 的同源性为 93 % 和 88 %，划分为亚组 III。在一些玉米品系如 W64A 中，tua3 含有 652 个碱基的类转座因子插入序列(Villemur 等, 1992)。

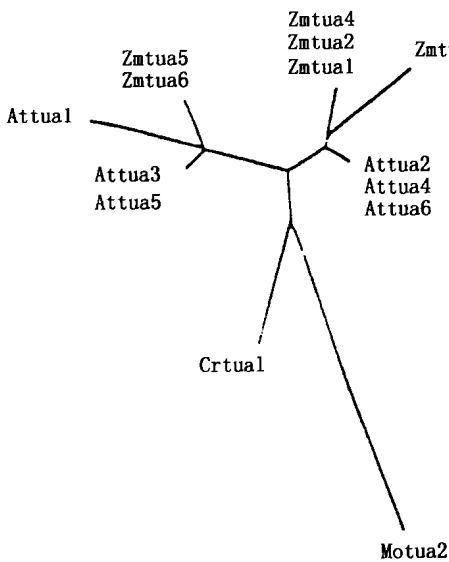


图 1 系统树

Zm: 玉米; At: 拟南芥; Cr: Chlamydomonas; Mo: 小鼠。

玉米蛋白 TUA3 与 TUA1 有 93 % 的同源性，与 TUA2 同源性为 92 %，与拟南芥  $\alpha$  微管蛋白的同源性也较高(与 TUA1 为 85 %，与 TUA3 为 88 %，Ludwig 等, 1987, 1988)，与藻类  $\alpha$  微管蛋白同源性为 89 % (Silflow 等, 1985)。tua3 的编码区(1350bp)与 tua1、tua2 的同源性为 85 %。在与 tua1、tua2 相同的位置，tua3 也有 3 个内含子，分别为 846bp, 87bp 和 98bp (Montoliu 等 1994)。有趣的是，第二个内含子与拟南芥  $\alpha$  微管蛋白基因相应内含子的位置相同(Silflow 等, 1987)。玉米 TUA1 和 TUA2 的 PI 值为 4.65，TUA3、TUA5 和 TUA6 分别为 4.87、4.72 和 4.68 (Joyce 等, 1992)。

为进一步研究  $\alpha$  微管蛋白的进化关系，对玉米和拟南芥的  $\alpha$  微管蛋白进行了一级结构的系统分析(Villemur 等, 1992)。根据每个位点发生置换的数目确定进化上的距离。这些基因可被分为两族，一族包括玉米亚组 I、III 和拟南芥 tua2/tua4/tua6，另一族包括玉米亚组 II、拟南芥 tua3/tua5 和 tua1 (图 1)。这些基因在族内的保守性比其物种内的保守程度更高，这显示  $\alpha$  微管蛋白基因两族的分离早在两亿年前单、双子叶植物分离之前就已经发生了。从图 1 可以看出，玉米 tua3 与拟南芥 tua1 基因在进化速度上快于其它的植物微管蛋白基因，而玉米 tua5 和 tua6 的亲源关系比 tua1 和 tua2 的亲源关系更为密切。

## 4 $\alpha$ 微管蛋白基因的表达调控

### 4.1 组织和发育特异性表达

许多实验证据表明，不同的异构体微管蛋白基因常常在特定的发育阶段或特定的组织细胞中表达，是受发育过程调控的(表 1)。例如，拟南芥  $\beta$  微管蛋白基因 tub1 在根中优势表达，tub5 主要在叶中表达(Oppeneimer 等, 1988)； $\alpha$  微管蛋白基因 tua1 主要在雄蕊和

双子叶植物拟南芥  $\alpha$  微管蛋白 tua2 与 tua4, tua3 与 tua5 编码相同的  $\alpha$  微管蛋白，tua6 与 tua2/tua4 编码的蛋白有两个氨基酸的差异，tua1 与 tua3/tua5 基因编码的蛋白比较接近，同源性为 92 %，与 tua2/tua4 编码的蛋白同源性为 88 % (Kopczak 等, 1992)。比较玉米与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)  $\alpha$  微管蛋白异构体及其基因核苷酸序列，发现玉米亚组 I 与拟南芥 tua2/tua4/tua6 的氨基酸序列高度同源(约 96 %)。这些蛋白在第 40 个位点都是赖氨酸。同样的，玉米亚组 II 与拟南芥 tua3/tua5 编码的蛋白同源性达 96 % ~ 97 %，而这些蛋白的第 40 个位点没有赖氨酸残基(Villemur 等, 1992)，在 450 位点由天门冬氨酸取代了高度保守的谷氨酸残基(Bulinski 等, 1991)。

玉米蛋白 TUA3 与 TUA1 有 93 % 的同源性

成熟花粉中大量表达, 并且在开花期其转录物的积累达到高峰, 而在成熟植株的根和叶中均不表达(Ludwig 等, 1988)。在玉米中,  $\alpha$ -微管蛋白基因 *tua1*, *tua2*(Montoliu 等, 1989)及  $\beta$ -微管蛋白基因 *tub1*(Hussey 等, 1990)在根中表达; 而 *tub4* 的转录在花发育早期很低, 之后在花药和花粉发育期显著提高(Villemur 等, 1994)。

表 1 玉米微管蛋白基因的组织 and 发育特异性表达

基因	组织和发育阶段	文献
<i>tub1</i>	根	Hussey 等, 1990
<i>tub4</i>	花粉	Villemur 等, 1994
<i>tua1</i>	根	Montoliu 等, 1989
	花粉	Joyce 等 1992
<i>tua2</i>	根	Montoliu 等, 1989
	未成熟棒子、胚、根尖	Joyce 等 1992
<i>tua3</i>	未成熟棒子、胚	Joyce 等 1992
<i>tua4</i>	花粉、根	Joyce 等 1992
总 $\alpha$ tubulin	根尖、花粉	Joyce 等 1992

Montoliu 等(1989, 1990b)研究发现, 玉米  $\alpha$ -微管蛋白 *tua1*、*tua2* 在根和分裂旺盛的组织中优势表达。 *tua3* 几乎呈组成型表达, 没有出现优势表达, 在分裂旺盛的组织细胞中其转录物达到最高的积累。 *tua1* 在 120 天植株的花药和花中表达(Montoliu 等, 1990a, 1994)。总体而言, *tua1* 的 mRNA 水平在各个组织中几乎是 *tua3* 的 10~100 倍。

Joyce 等(1992)用 2-D 凝胶法分析研究  $\alpha$ -微管蛋白异构体在不同组织中的积累。发现 *tua1*、*tua2*(或 *tua4*)和 *tua3* 编码的异构体在根尖积累较多, *tua5* 和 *tua6* 编码的蛋白出现量较小, 在花粉中未检测到 *tua3* 编码的蛋白的存在。研究各基因转录物在各组织的积累发现, *tua1* 和 *tua2* 的表达稍有不同。TUA1 蛋白在花粉中优势表达, 在根尖中的积累量也较大, 而 *tua2* 的转录物则在未成熟的玉米棒子和胚、根尖中占优势。 *tua4* 在花粉和根中优势表达。与 Montoliu (1990a)研究不同的是, *tua3* 在未成熟棒子、胚中出现优势表达。总而言之,  $\alpha$ -微管蛋白转录物在成熟组织如叶片和根皮质层中积累较少, 在胚等未成熟组织中积累较多, 而在根尖和花粉中更是占有明显优势(图 2)。

在微管蛋白基因转录水平很低或缺失的分化组织中可检测到反义 RNA 的存在(Dolfini 等, 1993), 反义 RNA 与正义 RNA 分子量相同。反义 RNA 可能参与了微管蛋白基因的表达调控。

目前并不清楚, 生物体为什么需要维持多拷贝基因来编码结构非常相近的蛋白, 这些由发育阶段所控制的, 以及组织特异性表达的基因所表达的微管蛋白异构体在功能上是否是特异的。对此问题有 3 种解释:

第一:“多微管蛋白(multitubulin)”假说(Fulton and Simpson, 1976), 该假说提出各种微管蛋白基因编码功能特异的多肽以实现特殊的功能, 特定组织、发育阶段或特定条件下,

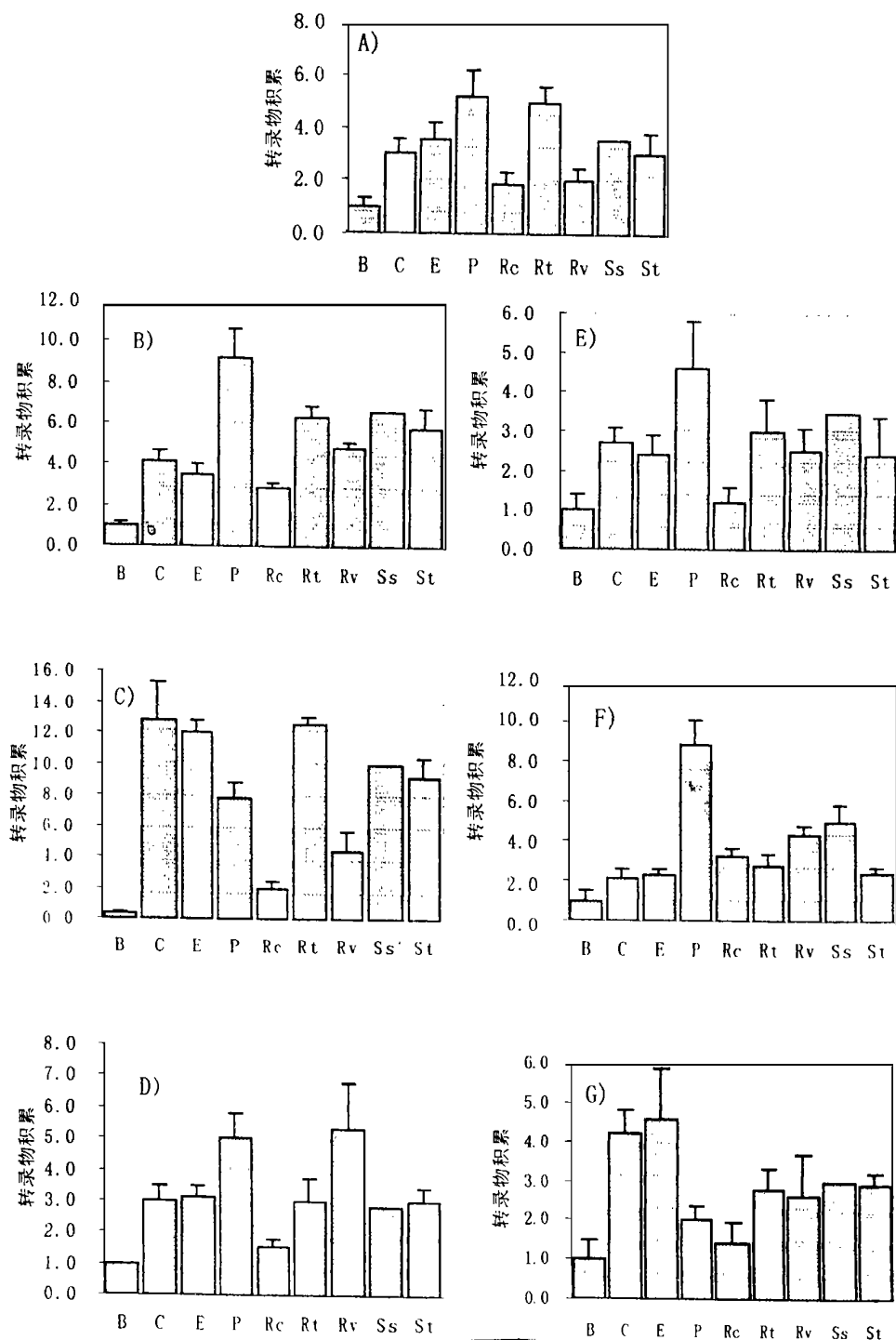


图2 玉米各组织中 $\alpha$ -微管蛋白转录物的积累

B: 叶片; C: 未成熟棒子; E: 未成熟胚; P: 花粉; Rc: 6日苗根皮质; Rt: 6日苗根尖; Rv: 6日苗维管柱; Ss: 6日苗茎; St: 30日伸长茎干。图A), B), C), D), E), F), G)依次为总 $\alpha$ -微管蛋白,  $\alpha$ -tubulin 1,  $\alpha$ -tubulin 2,  $\alpha$ -tubulin 4,  $\alpha$ -tubulin 5,  $\alpha$ -tubulin 6,  $\alpha$ -tubulin 3转录物的积累。

需要特异的微管蛋白形成特殊的微管取向。在果蝇中, 睾丸特异性的  $\beta 2$  被  $\beta 3$  取代后导致了几种微管介导的过程(包括有丝分裂和核发育)的阻断, 引起雄性不育(Hoyle 等, 1990), 但在植物中尚没有证据表明存在功能特异的微管蛋白。

第二: 调控学说。Raff(1984)认为, 特异性成分的优先表达是特定组织或生长发育条件下最佳调控的结果, 任何微管蛋白在功能上都是可以相互替代的, 优先表达是由合适的调控元件控制的。拟南芥 TUA1 在花粉中优先表达, 且其启动子区可导向 GUS 在花粉中的表达, 该结果符合调控学说。

第三: 微管蛋白与特异的微管相关蛋白的共进化学说。Cowan 等(1988)认为微管相关蛋白是不同的组织和发育阶段中特殊微管形成的主要因素, 微管蛋白在进化过程中, 各自演化成与特殊的微管相关蛋白相适应的同工型, 其表达随着对应的微管相关蛋白而显示出差异性。

以上假说均有一定的实验证据支持, 但目前有限的微管蛋白基因表达的研究还不足以对微管蛋白多种同工型的共存提出统一的解释。

#### 4.2 抗微管药物对微管蛋白的影响

微管蛋白肽链上有很多药物结合位点, 这些位点被药物占据后, 微管的解聚或聚合便受到影响, 因而不能执行正常的生理功能。秋水仙碱是一种来源于 *Colchicum autumnale* 的植物碱, 它可以抑制细胞的有丝分裂。其作用机理在于它可以结合微管蛋白而抑制微管的生长, 促进微管解聚, 破坏细胞的微管系统(Morejohn 等, 1987)。但植物微管蛋白与秋水仙碱的亲合性很低, 通常需要大于毫摩尔浓度的秋水仙碱才能抑制细胞的有丝分裂。二硝基苯胺类除草剂 trifluralin 和 oryzalin 可以与植物微管蛋白二聚体结合, 并抑制微管蛋白二聚体向处于解聚-聚合动态平衡中的微管组织的填充, 最终引起微管的解聚。它们对皮周排列微管的破坏, 使植物细胞的不均等生长消失, 出现了等径细胞; 它们对纺锤体微管的解聚作用导致有丝分裂在前中期停止, 因而形成大而不规则的核; 它们引起的成膜体微管的缺失导致了多核细胞的形成(Hoffman 等, 1994)。这些细胞水平上的变化, 在形态学上则表现出初生根的伸长及发育受到抑制, 根变短, 根尖肿大(Baskin 等, 1994; Upadhyaya 等, 1977)。低于  $0.1 \mu\text{mol/L}$  浓度的 trifluralin 和 oryzalin 即可引起植物微管的解聚。

#### 4.3 微管蛋白在分子生物学上的开发利用

微管蛋白既有组成型表达, 也有发育的某一时期或组织特异的表达, 因此有可能从微管蛋白基因中分离出我们所需的启动子, 同时, 它也是除草剂等药物作用的靶位点, 将其编码基因在药物结合位点定点突变, 将需要的启动子与修饰过的微管蛋白基因重新组合并返回植物体, 可培育出具抗除草剂的优良品种。虽然除草剂与植物微管蛋白的结合位点仍不明确, 但在衣藻中已经发现  $\beta 2$  微管蛋白肽链上第 350 位点赖氨酸的缺失可导致衣藻对 oryzalin 的抗性(Schibler 等, 1991)。在花粉特异表达的微管蛋白基因, 如拟南芥 tua1, 玉米 tua 和 tub4, 将其启动子与反义微管蛋白基因构成嵌合基因, 或其他控制育性的基因连接, 转入植物后有可能干扰花粉发育, 获得雄性不育植株。

### 5 总结

在高等植物、原生动物和低等植物中已进行了广泛的微管蛋白分子生物学的研究, 获

得了许多基因结构和表达的丰富资料,提出了微管结构和功能的许多理论问题。而在高等植物中,微管蛋白的分子生物学研究起步较晚,只是在近十年内,对一些典型的植物才开始了一些基础性的研究工作,对微管蛋白基因有了基本的了解,在表达的时间及空间的特异性方面也有了初步的认识。但关于微管蛋白的许多重要问题仍有待了解,特别是调节微管蛋白基因表达的分子途径的阐明是将来研究中主要回答的问题。

### 参 考 文 献

- 许智宏,刘春明编著,1998.《植物发育的分子机理》,北京:科学出版社,第193~214页
- Baskin T I, Wilson J E, Cork A et al. 1994. *Plant Cell Physiol*, **35**:935~942
- Breviarío D, Gianni S, Meoni C. 1995. *Plant Physiol*, **108**:823~824
- Briedley H L, Webster P, Long S E. 1995. *Plant Mol Biol*, **27**:715~727
- Bulinski J C, Gundlesen G G. 1991. *BioEssays*, **13**:285~293
- Cleveland D W, Sullivan K F. 1985. *Annu Rev Biochem*, **54**:331~365
- Cowan N J, Lewis S A, Gu W et al. 1988. *Protoplasma*, **154**:151~156
- Dolfini S, Consonni G, Mereghetti M et al. 1993. *Mol Gen Genet*, **241**:161~169
- Fosket D E. 1989. *The Biochemistry of Plants*, **15**:393~454
- Fulton C, Simpson P A. 1976. Cold Spring Harbor, NY. pp 987~1005
- Guiltinan M J, Ma D, Barker R F et al. 1987. *Plant Mol Biol*, **10**:171~184
- Hoffman J C, Vaughn K C. 1994. *Protoplasma*, **179**:16~25
- Hoyle H D, Raff E C. 1990. *J Cell Biol*, **111**:1009~1026
- Hussey P J, Haas N, Hunsperger J., et al. 1990. *Plant Mol Biol*, **15**:957~972
- Joyce C M, Villemur R, Snustad D P et al. 1992. *J Mol Biol*, **227**:97~107
- Koga-Ban Y, Niki T, Nagamura Y et al. 1995. *DNA Res*, **2**:21~26
- Kopczak S D, Haas N A, Hussey P J et al. 1992. *Plant Cell*, **4**:539~547
- Liang M F, Brinkmann H, Cefff R. 1992. *Plant Mol Biol*, **18**:639~651
- Ludwig S R, Oppenheimer D G, Silflow C D et al. 1988. *Plant Mol Biol*, **10**:311~321
- Montolin L, Puigdomenech P, Rigau J. 1990a. *Gene*, **94**:201~207
- Montolin L, Puigdomenech P, Rigau J. 1990b. *FEBS letters*, **277**:29~32
- Montolin L, Rigau J, Puigdomenech P. 1989. *Plant Mol Biol*, **14**:1~15
- Morejohn L C, Bureau T E, Mole-Bajer J et al. 1987. *Planta*, **172**:16~25
- Oakley C E, Oakley B R. 1989. *Nature*, **338**:662~664
- Oppenheimer D G, Haas N, Silflow C D et al. 1988. *Gene*, **63**:87~102
- Raff E C. 1984. *J Cell Biol*, **99**:1~10
- Sackett D L, Lippoldt R E. 1991. **30**:3511~3517
- Schibler M J, Huang B. 1991. *J Cell Biol*, **113**:605~614
- Silflow C D, Oppenheimer D G, Kopczak S D et al. 1987. *Develop Gen*, **8**:435~460
- Snustad D P, Haas N A, Kopczak S D et al. 1992. *Plant Cell*, **4**:549~556
- Upadhyaya M K, Nooden L D. 1977. *Plant Cell Physiol*, **18**:1313~1330
- Vantard M. 1990. *Pro Natl Acad Sci USA*, **87**:8825~8829
- Villemur R, Haas N A, Joyce C M et al. 1994. *Plant Mol Biol*, **24**:295~315
- Villemur R, Joyce C M, Haas N A et al. 1992. *J Mol Biol*, **227**:81~96
- Zhang D. 1990. *Pro Natl Acad Sci USA*, **87**:8820~8824