

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.032

拟南芥蛋白质激酶 CARK7 与 ABA 受体 RCAR12 相互作用的研究

李晶祥, 李小意, 黄琪, 陈静波, 李旭锋, 刘志斌, 杨毅

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 脱落酸(ABA)受体 RCARs 在 ABA 信号传导过程中起关键作用, 研究 ABA 受体的相互作用蛋白质对进一步了解植物抗逆的分子机制有重要的意义. 本研究通过酵母双杂交发现 CARK7 与 ABA 受体 RCAR12 共转化酵母能在营养缺陷型平板 SD/-Trp-Leu-Ade 上生长. 将 CARK7 与 RCAR12 分别克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 和 pGEX-6p-1 中, 构建融合蛋白表达载体, 并进行原核表达和亲和纯化. 纯化所得蛋白进行 GST-pull down 实验, 结果表明 RCAR12 能够把 CARK7 蛋白拉下来. 上述结果说明 CARK7 与 RCAR12 在体外存在相互作用. 进一步通过双分子荧光互补实验发现 CARK7 与 RCAR12 在烟草叶片表皮细胞中能产生荧光信号, 说明两者在体内同样具有明显的相互作用.

关键词: 蛋白质激酶; 相互作用; CARK7; RCAR12

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)05-1077-06

The research on interaction between the protein kinase CARK7 and the ABA receptor RCAR12 in *Arabidopsis*

LI Jing-Xiang, LI Xiao-Yi, HUANG Qi, CHEN Jing-Bo, LI Xu-Feng, LIU Zhi-Bin, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment of Ministry of Education,

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The ABA receptor RCARs play a key role in ABA Signal transduction process, and research on the interaction proteins of RCARs has great significance in further understanding the molecular mechanism of plant stress resistance. The yeast two-hybrid assay showed that the yeast co-transformed of CARK7 and ABA receptor RCAR12 could grow on SD/-Trp-Leu-Ade medium. Then, CARK7 and RCAR12 were constructed into prokaryotic expression vectors pET-28a(+) and pGEX-6p-1, respectively. The fusion proteins were expressed in Rosetta(DE3) and purified by affinity purification. Purified proteins were used in downstream GST-pull down assay, the result demonstrated that RCAR12 could pull down CARK7 protein. These results indicated there is a significant interaction between CARK7 and RCAR12 in vitro. Furthermore, the biomolecular fluorescence complementation (BIFC) assay showed CARK7 was associated with RCAR12 to generate fluorescence in tobacco epidermal cells, indicating that CARK7 can also interact with RCAR12 in vivo.

Keywords: Protein kinase; Interaction; CARK7; RCAR12

收稿日期: 2017-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(31671455); 973 计划(2015CB755702)

作者简介: 李晶祥(1991-), 男, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: ljingxiang1991@163.com

通讯作者: 刘志斌. E-mail: liuzhibin@scu.edu.cn

1 引言

脱落酸(abscisic acid, ABA)作为五大类植物激素之一,在调控植物的生长发育和对生物及非生物胁迫的应答方面起着重要作用,因此研究 ABA 在植物体内的信号转导机制具有重要意义^[1,2]. 经过多年的努力,科学家已经描绘出了一条近似线性的 ABA 信号转导通路. 这条信号通路主要由几个核心的组件构成,包括最上游的 ABA 受体家族 PYL/PYR/RCRAs,负调控因子 PP2Cs,正调控因子 SnRK2s 以及下游的 bZIP 转录因子 ABI5, AREB/ABFs 等^[3-8]. 植物通过该信号转导通路来调控 ABA 应答基因的表达,从而适应多变的环境^[2,3].

在以前的研究中已经有大量的文献报道了蛋白质的磷酸化及去磷酸化作用在 ABA 信号转导的调控中起重要作用^[9]. PP2Cs 通过去磷酸化 SnRK2s 来抑制 SnRK2s 的激酶活性从而抑制 ABA 信号的传递,SnRK2s 通过自磷酸化来维持自身活性从而促进 ABA 信号的传递^[3,4,6]. 依赖于 ABA 的 AREB/ABFs 的活化则是通过 ABA 诱导的 SnRK2 的磷酸化作用来实现,活化的 SnRK2 磷酸化 AREB/ABFs 中多个保守的 SnRK2 识别位点 RXXS/T,从而使 AREB/ABFs 由非活性状态转变为活性状态,进而调控下游 ABA 应答基因的表达^[8,10,11]. 此外,PP2Cs 还可与 SnRK1 相互作用并使其去磷酸化而失活,进而抑制 SnRK1 在胁迫条件下的信号传递^[12]. SnRK2.6 通过磷酸化 PIP2;1 细胞质肽段的 121 位的丝氨酸残基,增强 PIP2;1 水转运能力,进而促进气孔的关闭^[13]. 同时,SnRK2.6 通过磷酸化 AKS1 的 bHLH 结构域附近的三个丝氨酸残基,抑制 AKS1 的转录活性从而抑制 AKS1 促进保卫细胞中钾离子通道表达的能力以达到关闭气孔的目的^[14]. SnRK2s 还可通过磷酸化 CHYR1 的 178 位苏氨酸残基来正调控 ABA 信号转导^[15].

此外,还有大量蛋白质磷酸酶及激酶参与到 ABA 信号转导的调控. 其中,拟南芥 SnRK3 型蛋白质激酶 PKS5 通过磷酸化 ABI5 调控 ABA 信号转导. PKS5 通过磷酸化 ABI5 的 42 位丝氨酸残基来调控 ABA 应答基因的表达及种子的萌发^[16]. BIN2 则通过磷酸化 SnRK2.2 和 SnRK2.3 来调控 ABA 信号转导^[17]. 本文所研究的拟南芥蛋白质激酶 CARK7 是一个丝氨酸苏氨酸蛋白质激酶,属于细胞质的类受体激酶. 通过酵母双杂交和 GST-

pull down 以及 BIFC 实验证实 CARK7 与 ABA 受体 RCAR12 在体外和体内均存在直接的相互作用,为进一步研究 ABA 信号转导的调控机制奠定了基础.

2 材料与方法

2.1 材料

大肠杆菌(*E. coli*)克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 Rosetta(DE3),原核表达载体 pET28a、pGEX-6P-1 及双分子荧光互补载体 pSPYCE、pSPYNE 由本实验室保存. AH109 酵母菌株及酵母双杂交载体购自 Clontech 公司. 引物合成及测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成.

2.2 方法

2.2.1 序列比对及进化树的构建 拟南芥 CARK7 蛋白质序列下载自 Arabidopsis Information Resource database (<http://www.arabidopsis.org/>),其他物种的 CARK7 同源基因的蛋白质序列下载自 UniProt (<http://www.uniprot.org/>). 不同物种中 CARK7 同源基因的蛋白质序列比对通过 DNAMAN 完成. 进化树的构建通过 MEGA5.1 的 NJ 算法完成.

2.2.2 目的基因的分离与载体的构建 以哥伦比亚型拟南芥的 cDNA 为模板,通过高保真 DNA 聚合酶及相应的引物进行克隆,从而得到全长的目的基因. 目的基因通过限制性内切酶酶切及 T4 DNA 连接酶连接构建得到相应的重组载体,包括原核表达载体(pET28a-CARK7, pGEX-6P-1-RCAR12),酵母双杂交载体(pGADT7-Rec-CARK7 Δ N, pGBKT7-RCAR12)以及双分子荧光互补实验载体(pSPYCE-RCAR12, pSPYNE-CARK7).

2.2.3 酵母双杂交实验 酵母双杂交实验参考 Clontech 公司的酵母双杂交使用手册,共转化 pGADT7-Rec-CARK7 Δ N, pGBKT7-RCAR12 的同时设置阳性对照 pGADT7-Rec-ABI1, pGBKT7-RCAR1 及阴性对照 pGADT7-Rec, pGBKT7 和 pGADT7-Rec, pGBKT7-RCAR12. 转化后的酵母接种于 SD/-Trp-Leu 液体培养基中,220r/min, 30 $^{\circ}$ C,震荡培养 48 h 至菌液 OD₆₀₀ 值约为 0.6,将菌液分别稀释 10 倍,100 倍,1000 倍. 最后吸取未稀释及稀释后的菌液各 5 μ L 分别滴于 SD/-Trp-Leu 及 SD/-Trp-Leu-Ade 平板上,30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3~5d,观察其生长情况并拍照记录.

2.2.4 蛋白质纯化及 GST-pull down 实验 蛋

白质的诱导表达参考 pET 系统操作手册,蛋白质的纯化参考 GenScript 公司 GST 树脂及 Thermo scientific 公司 Ni-NAT 树脂使用说明. GST-pull down 实验方法:取 20 μ L 50% 的 GST 树脂及 5 μ g 超滤的 GST-RCAR12 蛋白质(或 GST 蛋白质)和 5 μ g 纯化的 His-CARK7 蛋白质于 1.5mLEP 管中,并补加孵育 buffer 至终体积为 500 μ L,4 $^{\circ}$ C 轻轻混合 2h. 然后 500g,4 $^{\circ}$ C,离心 3min,弃上清. 加入 1mL 洗涤 buffer,4 $^{\circ}$ C 轻轻混合 10min,500g,4 $^{\circ}$ C,离心 3min,弃上清并重复此步骤 5 次. 最后进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 免疫检测.

2.2.5 双分子荧光互补实验 将相应的重组载体分别转入农杆菌 GV3101 中,挑取阳性克隆接种于 5mL LB 液体培养基(含 50mg/L Kan,25mg/L Rif),28 $^{\circ}$ C,220r/min 培养过夜. 取 1mL 菌液于 1.5mL EP 管中,室温,1000g,离心 10min,弃上清. 用浸染缓冲液悬浮菌体,调节 OD₆₀₀ 值至 0.6~0.8,室温静置 3h,取重悬液各 500 μ L,按 1:1 的比例混合均匀后注射烟草叶片,培养 2~3d 后剪取叶片检测荧光信号.

3 结果与分析

3.1 不同物种中 CARK7 同源基因比对分析

将拟南芥 CARK7 的氨基酸序列与亚麻荠(*Camelina sativa*),大豆(*Glycine max*),玉米(*Zea mays*)以及番茄(*Solanum lycopersicum*)中的同源基因氨基酸序列进行比对,发现这些物种中 CARK7 同源基因的氨基酸序列具有极高的相似度,特别是在蛋白质激酶催化结构域部位(aa 74~343). 其中拟南芥 CARK7 的氨基酸序列与亚麻荠的相似度最高,达到 96%,与玉米、大豆、番茄中的同源基因氨基酸序列的相似度分别达到 67%、81%及 67%(图 1-A). 将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),蓖麻(*Ricinus communis*),大豆(*Glycine max*),番茄(*Solanum lycopersicum*),欧洲油菜(*Brassica napus*),葡萄(*Vitis vinifera*),水稻(*Oryza sativa*),甜菜(*Beta vulgaris*),亚麻荠(*Camelina sativa*),毛果杨(*Populustrichocarpa*),玉米(*Zea mays*)中的同源基因进行进化树分析,发现拟南芥 CARK7 与大豆,欧洲油菜,葡萄,亚麻荠中的同源基因都比较相似(图 1-B).

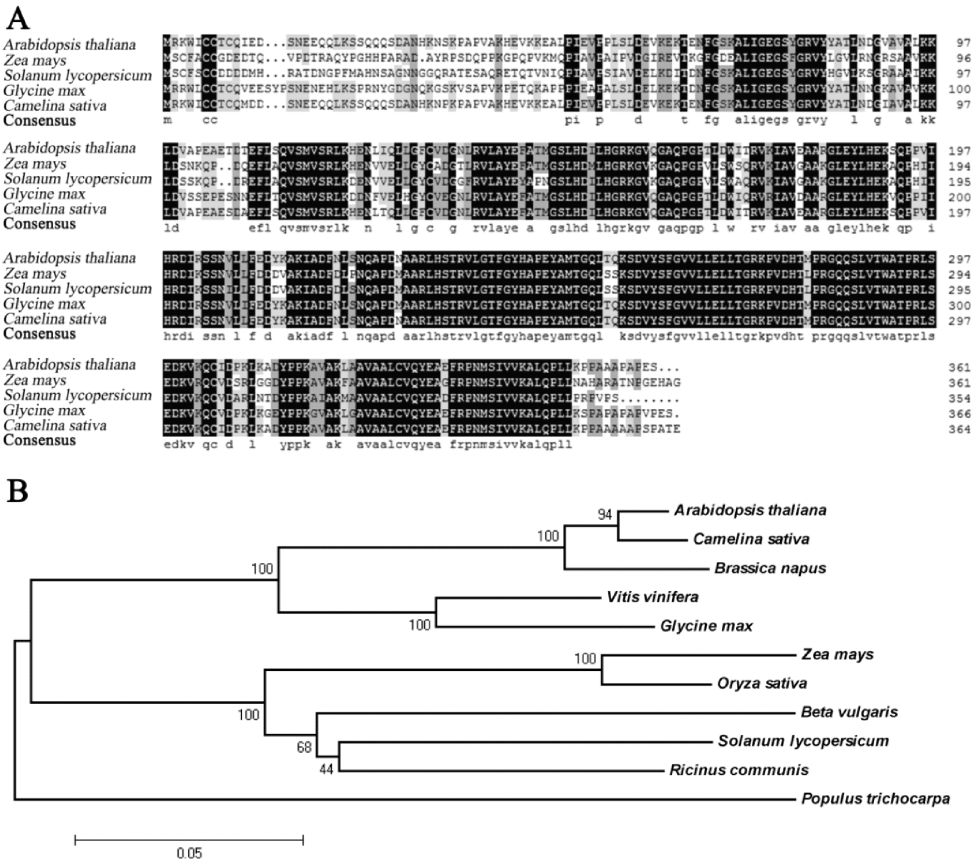


图 1 不同物种中 CARK7 同源基因氨基酸序列比对(A)和进化树分析(B)
Fig. 1 Sequence alignment of amino acid (A) and phylogenetic tree (B) of CARK7 in different species

3.2 融合蛋白质纯化

将通过相应亲和层析纯化后的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,从左至右各个泳道分别是蛋白质 Marker, His-CARK7, GST-RCAR12, GST. GST 标签蛋白大小为 26kD. GST-RCAR12 大小约为 52kD(GST 标签 26kD 加上 RCAR12 自身 25.4kD). His-CARK7 的大小约为 40kD(PET 载体编码序列约 6kD 加上 CARK7 本身),电泳结果说明所纯化蛋白大小均正确,且蛋白质纯度达到下一步实验要求,在 PAGE 胶上没有明显的杂带(图 2).

3.3 体外验证 CARK7 与 RCAR12 的相互作用

在酵母双杂交中,所有共转化的酵母均可以在氨基酸缺陷型平板 SD/-Trp-Leu 上长出白色光滑、丘状隆起状的菌落,这说明所有的酵母共转化均是成功的.在氨基酸缺陷型平板 SD/-Trp-Leu-Ade 上,阳性对照实验中,pGADT7-Rec-ABI1, pGBKT7-RCAR1 转化的酵母正常生长,而阴性对照实验中 pGADT7-Rec, pGBKT7 和 pGADT7-Rec, pGBKT7-RCAR12 分别转化的酵母均无法生

长,说明实验正确,结果可信.在 SD/-Trp-Leu-Ade 平板上,实验组 pGADT7-Rec-CARK7 Δ N, pGBKT7-RCAR12 转化的酵母和阳性对照中的一样也能正常生长,说明 CARK7 和 RCAR12 在酵母中具有相互作用(图 3-A).

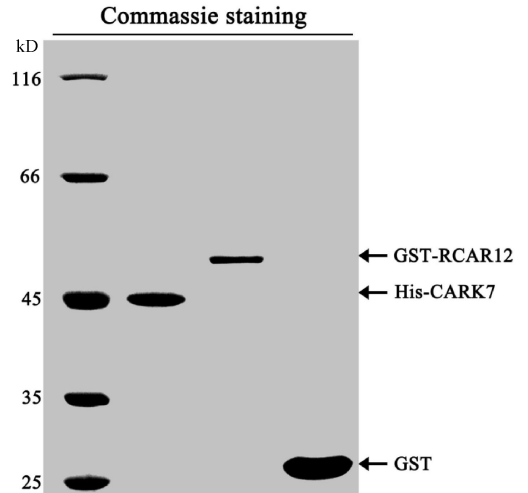


图2 蛋白质纯化 His-CARK7、GST-RCAR12、GST
Fig. 2 Protein purification of His-CARK7、GST-RCAR12、GST

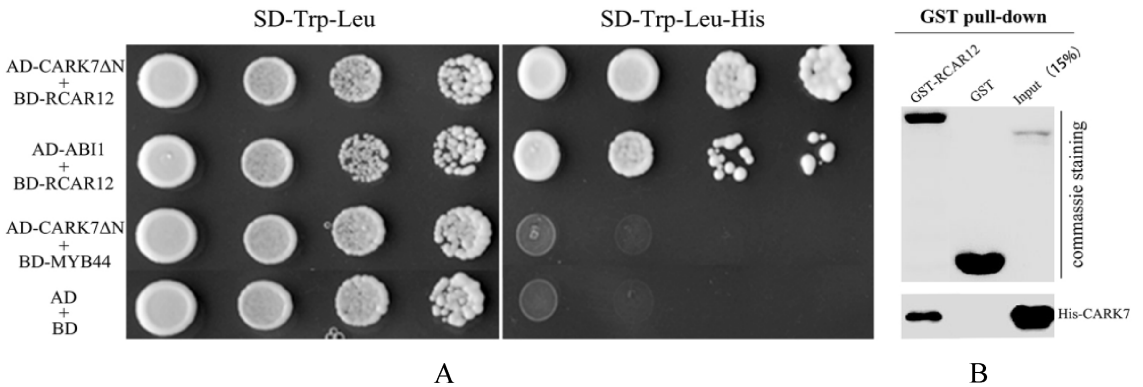


图3 酵母双杂交(A)及 GST-pull down(B)体外检测 CARK7 和 RCAR12 之间的相互作用
Fig. 3 Interaction of CARK7 with RCAR12 in yeast two-hybrid assay (A) and GST-pull down assay(B)

通过考马斯亮蓝染色可以看到明显的 GST 和 GST-RCAR12 条带以及微弱的 Input His-CARK7 条带,说明 GST-RCAR12 和 GST 均正常亲和吸附到 GST 树脂上. SDS-聚丙烯酰胺电泳后将蛋白转移到醋酸纤维素膜上,通过 His 标签特异性抗体进行 Western blot 检测.结果显示,在负对照中,即 GST 泳道中没有检测到 His-CARK7 的存在,说明 GST 标签蛋白并不会与 His-CARK7 发生相互作用.而在 GST-RCAR12 泳道中可以明显检测到 His-CARK7 的存在,说明 GST-RCAR12 和 His-CARK7 之间存在相互作用(图 3-B).以上结果证明 CARK7 与 RCAR12 在体外具有明显的相互作用.

3.4 体内验证 CARK7 与 RCAR12 的相互作用

将注射了菌液的烟草继续培养 2~3 天,剪取注射区域部分的叶片于激光共聚焦显微镜下观察.结果显示,在阳性对照组中,经由 pSPYCE-RCAR1 和 pSPYNE-ABI1 混合注射后的烟草叶片中可以看到明亮的细胞轮廓形状的荧光,而在阴性对照组中, pSPYCE-RCAR1 和 pSPYNE 及 pSPYCE 和 pSPYNE-ABI1 分别混合注射后的烟草叶片中都观察不到明显的荧光信号,说明实验正确,结果可信.在实验组注射的烟草叶片中也可以观察到细胞轮廓形状的荧光信号,说明 CARK7 与 RCAR12 在烟草叶片表皮细胞中具有相互作用(图 4).

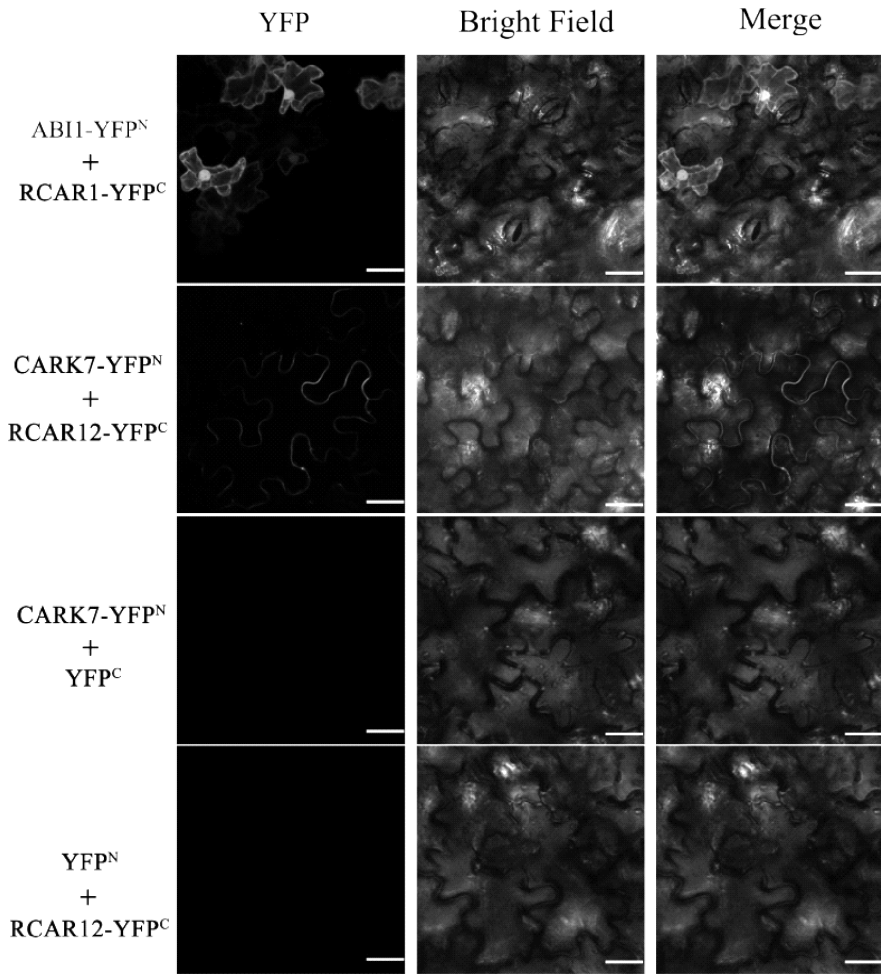


图 4 BIFC 实验分析 CARK7 和 RCAR12 的体内相互作用
Fig. 4 Interaction of CARK7 with RCAR12 in BIFC assay

4 讨 论

陆生植物通过激素信号分子 ABA 来控制植物的水势并调控植物的发育进程. 在复杂的胁迫环境条件下, 包括干旱、高盐等, ABA 能够调控植物胚的发育, 种子的休眠与萌发, 植物根的生长与发育, 营养生长与生殖生长的调控以及气孔的运动^[2, 18]. ABA 受体 PYR/PYLs/RCARs 蛋白家族的发现, 是 ABA 信号通路研究中的一个里程碑^[4, 5].

自 2009 年以来关于 ABA 受体结构及分子功能方面的研究已经取得了显著的成就, 揭示出 PYR/PYLs/RCAR 作为 PYL-PP2C-SnRK2 调控模型的核心组件及信号感知元件^[3, 19]. 但是对于 PYR/PYLs/RCAR 的分子功能的调控我们仍然知之甚少, 这无疑会局限我们对于 ABA 信号的转导以及植物对胁迫环境适应机制的理解.

为了探究上述问题, 前期本实验室以拟南芥

ABA 受体为诱饵蛋白, 通过酵母双杂交筛选到了一个与 ABA 受体有潜在相互作用的蛋白, 通过同源分析发现该基因为番茄中 PTII 基因的同源基因, 在拟南芥中共有 11 个同源基因, 包括已经报道过的 PTII-1 (CARK7), PTII-2, PTII-3 以及 PTII-4, 其中 PTII-1 和 PTII-4 参与植物氧化胁迫的信号过程^[20, 21]. 本研究通过酵母双杂交、GST-pull down 和双分子荧光互补实验证明 CARK7 与 RCAR12 在体外和体内均具有明显的相互作用. CARK7 作为蛋白质激酶具有磷酸化蛋白质的能力, 同时可以和 ABA 受体 RCAR12 相互作用, 因此我们猜测 CARK7 可能通过磷酸化 RCAR12 的方式在 ABA 信号转导过程中起调控作用. 虽然已经证明 CARK7 与 RCAR12 的相互作用, 但 CARK7 是否磷酸化 ABA 受体 RCAR12, 以及磷酸化作用通过何种方式来调控 RCAR12 对 ABA 的应答还需要进一步研究.

参考文献:

- [1] Raghavendra A S, Gonugunta V K, Christmann A, *et al.* ABA perception and signaling [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15: 395.
- [2] Lee S C, Luan S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses [J]. Plant Cell Environ, 2012, 35: 53.
- [3] Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues V, *et al.* In vitro reconstitution of an abscisic acid signaling pathway [J]. Nature, 2009, 462: 660.
- [4] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, *et al.* Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors [J]. Science, 2009, 324: 1064.
- [5] Park S Y, Fung P, Nishimura N, *et al.* Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins [J]. Science, 2009, 324: 1068.
- [6] Umezawaa T, Sugiyamab N, Mizoguchia M, *et al.* Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 16: 17588.
- [7] Sheen J. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 975.
- [8] Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, *et al.* Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 1988.
- [9] Yang W Q, Zhang W, Wang X X. Post-translational control of ABA signaling: the roles of protein phosphorylation and ubiquitination [J]. Plant Biotechnol J, 2017: 15: 4.
- [10] Uno Y, Furihata T, Abe H, *et al.* *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 11632.
- [11] Fujii H, Verslues P E, Zhu J K. Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19: 485.
- [12] Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, *et al.* ABI1 and PP2CA Phosphatases Are Negative Regulators of Snf1-Related Protein Kinase1 Signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2013, 25: 3871.
- [13] Grondin A, Rodrigues O, Verdoucq L, *et al.* Aquaporins Contribute to ABA-Triggered Stomatal Closure through OST1-Mediated Phosphorylation [J]. Plant Cell, 2015, 27: 1945.
- [14] Takahashi Y, Kinoshita T, Matsumo M, *et al.* Inhibition of the *Arabidopsis* bHLH transcription factor by monomerization through abscisic acid-induced phosphorylation [J]. Plant J, 2016, 87: 559.
- [15] Ding S C, Zhang B, Qin F. *Arabidopsis* RZFP34/CHYR1, a Ubiquitin E3 Ligase, Regulates Stomatal Movement and Drought Tolerance via SnRK2.6-Mediated Phosphorylation [J]. Plant Cell, 2015, 27: 3228.
- [16] Zhou X N, Hao H M, Zhang Y G, *et al.* SOS2-LIKE PROTEIN KINASE5, an SNF1-RELATED PROTEIN KINASE3-Type Protein Kinase, Is Important for Abscisic Acid Responses in *Arabidopsis* through Phosphorylation of ABSCISIC ACID-INSENSITIVE5 [J]. Plant Physiol, 2015, 168: 659.
- [17] Cai Z Y, Liu J J, Wang H J, *et al.* GSK3-like kinases positively modulate abscisic acid signaling through phosphorylating subgroup III SnRK2s in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111: 9651.
- [18] 何晓倩,王健美,刘志斌,李旭锋. 拟南芥 At5g66070 基因在 ABA 处理下的初步研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2017, 54: 635.
- [19] Wang Z J, Ji H T, Yuan B J, *et al.* ABA signalling is fine-tuned by antagonistic HAB1 variants [J]. Nat Commun, 2015, 6: 8318.
- [20] Forzanil C, Carreri A, Lecourieux D, *et al.* The *Arabidopsis* protein kinase Pto-interacting 1-4 is a common target of the oxidative signal-inducible 1 and mitogen-activated protein kinases [J]. FEBS J, 2011, 278: 1126.
- [21] Cai Z Y, Liu J J, Wang H J, *et al.* The *Arabidopsis* Protein Kinase PTII-2 Is Activated by Convergent Phosphatidic Acid and Oxidative Stress Signaling Pathways Downstream of PDK1 and OXII [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 37536.