

· 专题介绍 ·

种子的贮油细胞器——油体及其蛋白

程红焱¹ 宋松泉^{2*}

(1 中国科学院植物研究所 北京 100093) (2 中国科学院西双版纳热带植物园 勐腊 666303)

摘要 生物柴油作为一种可再生的替代能源,因其良好的环境效应而倍受关注。植物油是生产生物柴油的主要原料。植物油作为最经济、最有利于种子传播和萌发生长的能量和碳源物质,贮存和积累于植物种子的贮油细胞器——油体之中。本文综述了植物种子油体的亚细胞结构、化学组成及其功能、生物合成与降解等的研究进展。

关键词 种子,生物柴油,油体,油素蛋白,钙结合油素蛋白

Seed Lipid Storage Organelles: Oil Bodys and Their Proteins

Hongyan Cheng¹, Songquan Song^{2*}

(1 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

(2 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303)

Abstract Biodiesel, with the most hopeasa reproducible substitute for fossil energy, is getting more and more global attention because of its good environment-protective effects. Plant oil, the main resources of biodiesel, is stored and accumulated in seed oil bodies, which are the plant oil storage organelles, as the most economic and effective food reserves for seed dispersal, seed germination and seedling growth. This paper discusses the advancements in ultrastructure, composition and functions, and biosynthesis and degradation of seed oil bodies.

Key words seed, biodiesel, oil body, oleosin, caleosin

面临石油能源资源的枯竭以及由于开采和利用所造成频繁发生的地质灾害、温室效应等严重的环境问题,世界各国一直在寻求新能源的开发和利用。近年来,生物柴油(biodiesel)作为一种可再生的替代能源,以其良好的环境效应而举世关注。生物柴油不含硫、芳香烃等物质,可有效地减少燃烧后机动车尾气中的CO、SO₂以及总颗粒物等等的排放;燃烧后所排放的温室气体CO₂能够被植物光合作用循环利用;燃烧性能和热值与目前广泛使用的石化柴油极

为接近。目前欧洲各国及美国、日本、泰国等国家已进行生物柴油的规模化生产,开发和利用生物柴油的国家正在迅速增加,生物柴油的发展潜力巨大。

生产生物柴油的主要原料是植物油(plant oil),而植物油本身是作为营养贮存物质积累于植物种子中。蛋白质、脂肪和碳水化合物是种子中的主要贮存物质,而脂类是种子中的一种重要的能量贮存形式;与蛋白质和碳水化合物相比还原性更强,所以产能的潜力更高。油料

收稿日期: 2005-10-31; 接受日期: 2006-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(30470183)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-117)、中国科学院“百人计划”项目、云南省自然科学基金(2003C0068M)和科技部国家科技基础条件平台工作项目(2004DKA30430)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: sqsong@xtbg.org.cn

种子萌发时所需要的碳骨架和能量通常以三酰甘油(triacylglycerol, TAG)的形式贮存。三酰甘油高度疏水且存在于无水环境中; 而碳水化合物和蛋白质却是亲水的。相同质量的三酰甘油异化为 CO_2 和 H_2O 所释放的ATP大约是碳水化合物的2倍。因此, 种子作为植物繁衍和散布的器官, 以脂类作为能量贮存物质比碳水化合物更经济, 更有利于种子的散布及其他过程。在自然界中, 三酰甘油作为能量和碳源的贮藏形式, 主要存在于种子和花粉中; 由于其非极性的特性而视为中性脂, 不溶于细胞内水相, 不会由于大量累积而破坏正常的细胞渗透势; 因而, 对于花粉和种子这些需要经历脱水的器官, 三酰甘油作为其贮藏物质具有重要的生物学意义。

在种子发育过程中, 脂肪累积于子叶、胚乳或盾片等贮藏组织中(Huang, 1996; Murphy and Vance, 1999), 植物油在内质网上合成后被运输到胞内的贮油细胞器——脂肪体(lipid bodies)或者称为油体(oil bodies)中, 供种子的萌发和幼苗生长之需(Wanner et al., 1981; Huang, 1992)。近年来, 关于植物脂类的代谢及其调节已有较多报道(Buchanan et al., 2000; Taiz and Zeiger, 2002), 有关种子油体的亚细胞结构、化学组成、生物合成与降解的研究对于进一步了解生物柴油的植物贮藏库并提高其产量都

有着重要的理论和实践意义。本文主要综述种子油体的研究进展。

1 油体的组成与结构

油体是植物细胞中最小的细胞器。在电子显微镜下, 油体由一层电子致密的膜包围, 内部为不透明的基质; 其直径为0.5~2.5 μm , 大小因植物种类而异, 且受营养和环境的影响(表1)(Tzen et al., 1993)。在同一粒种子的不同组织细胞中, 油体的大小也不相同。无论在细胞中还是在离体状态下, 油体均非常稳定, 在干燥种子细胞内或在体外离心分离的上浮液中, 油体之间并不发生融合或聚合, 甚至经过长时间的贮存也能保持稳定(Frandsen et al., 2001)。

Tzen 和 Huang (1992) 提出的油体结构模型(图1)认为, 油体是由半单位膜(half unit-membrane)包裹液态三酰甘油而形成的球体。半单位膜由单层磷脂分子及其镶嵌的蛋白组成, 基本单位为13个磷脂分子和1个油体蛋白分子组成; 磷脂占油体表面成分的80%, 其余20%为油体蛋白, 但油体表面的大部分被油体蛋白覆盖。每个磷脂分子的亲水头部基团位于油体外侧, 与细胞液接触, 而2个疏水酰基位于油体的内侧, 与疏水的三酰甘油分子相互作用。镶嵌于半单位膜上的油体蛋白分子主要为油素蛋

表1 不同物种的种子中油体的大小和化学组分

Table 1 Average diameters and the amounts of various chemical constituents of oil bodies isolated from the seeds of various species (Tzen et al., 1993)

	油菜	芥菜	棉花	亚麻	玉米	花生	芝麻
油体直径(μm)	0.65	0.73	0.97	1.34	1.45	1.95	2.00
主要组分(% W/W)							
中性脂	94.21	94.64	96.99	97.65	97.58	98.17	97.37
蛋白质	3.46	3.25	1.70	1.34	1.43	0.94	0.59
磷脂	1.97	1.60	1.18	0.90	0.91	0.80	0.57
游离脂肪酸(FFA)	0.36	0.17	0.13	0.11	0.09	0.09	0.13/1.47*
磷脂组分(% W/W)							
磷脂酰胆碱(PC)	59.9	53.1	58.6	57.2	64.1	61.6	41.2
磷脂酰乙醇胺(PE)	5.9	15.5	4.6	2.8	8.1	5.0	15.8
磷脂酰肌醇(PI)	14.0	13.1	18.1	6.9	7.6	8.4	20.9
磷脂酰丝氨酸(PS)	20.2	18.3	18.7	33.1	20.2	25.0	22.1

* 0.13% 和 1.47% 分别是新鲜种子和贮藏数月后种子油体中的 FFA 含量

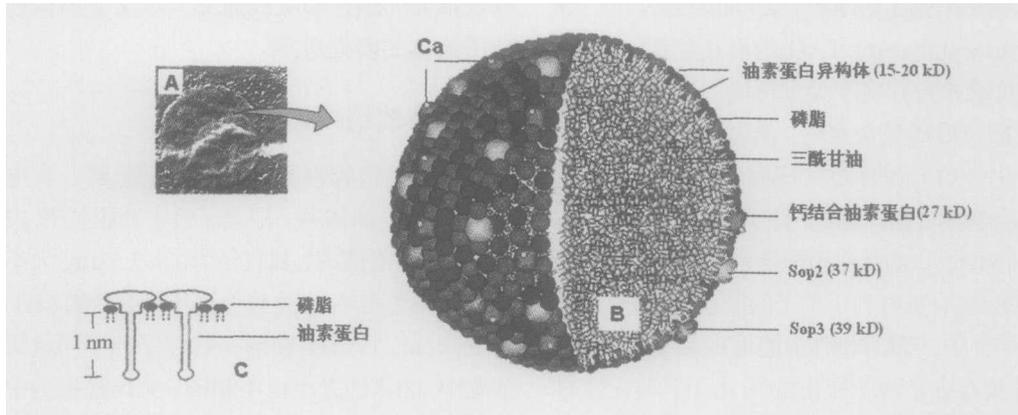


图1 种子油体的结构模型

A. 电子显微镜下的油体蛋白; B. 油体的几何模型; C. 油体半单位膜上的油素蛋白和磷脂

Fig. 1 Structure model of seed oil body

A. Oil body protein under electron microscope; B. Oil body geometric model; C. Oleosin and phospholipids of half unit-membrane of oil body (Tzen and Huang, 1992)

白 (oleosin), 其疏水区域为长约 11 nm 的柄状结构, 占油素蛋白分子的 2/5, 伸入磷脂的疏水酰基部分及油体内部的三酰甘油基质中, 而其余的 3/5 则覆盖在油体表面。研究结果还显示, 油体表面除主要镶嵌油素蛋白外, 还镶嵌少量其他蛋白, 如钙结合油素蛋白 (caleosin) (Tzen and Huang, 1992)。油素蛋白和钙结合油素蛋白是迄今为止研究得最多的 2 种油体蛋白。

2 油素蛋白

2.1 油素蛋白的分布

油素蛋白最早是从芥菜中发现的, 为高度疏水的小分子蛋白, 分子量为 15~20 kD。目前许多植物 (如芝麻、油菜、向日葵、胡萝卜、玉米、大豆、拟南芥和棉花) 的油素蛋白基因序列和氨基酸序列均已有报道。研究发现, 裸子植物中只有一种油素蛋白 (Wu et al., 1999); 而在被子植物中, 在同一个油体内用免疫荧光可以检测出不只一种的油素蛋白 (Tzen et al., 1998)。被子植物中的油素蛋白基因常以基因家族的形式存在, 一种植物常含有几个油素蛋白异构体, 各异构体在植物中的表达量、表达部

位及表达速率均有差异。如玉米油体中 18 kD 油素蛋白的表达量仅为 16 kD 的 10%~20%, 油菜油体中 24 kD 油素蛋白的表达量仅为 20 kD 的 10%。油素蛋白的抗体能与同科或不同科植物中分子量相近的油素蛋白发生反应, 如十字花科中的 19~20 kD 的油素蛋白抗体能与菊科的 20 kD 和豆科的 24 kD 油素蛋白反应 (Tzen et al., 1990)。

细胞免疫化学定位和亚细胞分离的研究显示, 油素蛋白只存在于种子油体中 (Herman, 1987; Murphy et al., 1989), 绝大多数位于油体的半单位膜上, 少量位于油体附近的内质网片段上 (Sarmiento et al., 1997; Lacey et al., 1999)。目前在花粉、橄榄和鳄梨果实的皮层油体中没有检测到油素蛋白。由于这些油体的脂类物质不是用于长期贮存, 因此 Murphy 和 Vance (1999) 提出油素蛋白可能仅为贮藏器官油体所特有, 但 Naested 等 (2000) 发现根尖油体中也有油素蛋白存在。Murphy 和 Vance (1999) 在拟南芥和油菜的花粉囊中发现有类油素蛋白的 mRNA 存在, 但只在绒毡层中检测到类油素蛋白, 而在花粉粒的油体中没有发现。

2.2 油素蛋白的结构

不同植物来源的油素蛋白均具有3个结构域,即位于油体表面的兼具亲水性和亲脂性的N端和C端结构域,以及伸入三酰甘油基质内的高度疏水的中间区域。N端结构域由50~70个氨基酸残基组成,分布于油体表面半单位膜的外侧,面向胞浆,具有 α 螺旋结构;C端结构域由数目不等的氨基酸残基组成 α 螺旋结构,其带负电荷的区域朝向油体表面,带正电荷的基团朝向油体半单位膜的带负电荷的磷脂层区域(图2)(Li et al., 1992, Tzen et al., 1992)。Tzen和Huang(1992)根据其氨基酸残基极性的分布,推测油素蛋白伸入三酰甘油基质中的疏水区域为反式平行的 β 折叠结构,其顶部具有由3个脯氨酸和1个丝氨酸组成的“脯氨酸结”(praline knot),形成发卡结构。Lacey等(1998)根据对红花和向日葵种子中油素蛋白结构的研究,认为油素蛋白中部的疏水区域具有2个 α 螺旋结构,由68~74个氨基酸残基组成;这个 α 螺旋结构,由“脯氨酸结”连接,并由这个“脯氨酸结”形成180°转角。Li等(1992)观察到油素蛋白在高盐条件下可以形成二聚物或寡聚物,中间区域可能参与二聚作用,使得中间区域在三酰甘油基质中更加紧密。比较各种植物油体蛋白的氨

基酸序列,只有中心疏水区域是高度保守的,尤其是“脯氨酸结”高度保守;因此,从进化上讲,该区域可能对植物具有重要的生物学意义。首先,从中间区域的保守性可以推断,来自不同植物或同一植物及杂交系中的不同油素蛋白可能是由共同的原始蛋白和基因衍生出来的。其次,中心疏水区域的保守性表明,它在功能上可能起着重要的作用,以至于进化过程中不轻易置换氨基酸。N端和C端两性区域在进化过程中也被保留下来,表明它们也是重要的,但这些区域在进行某些氨基酸变换后不至于影响二级结构及其功能(Tzen et al., 1992)。

2.3 油素蛋白的表达

油素蛋白的基因表达具有组织特异性,呈现典型的“时、空”特点,主要在种子发育和成熟过程中的胚(盾片和胚轴)及糊粉层中表达。在以油菜小孢子作为培养来源的球形胚和心形胚中可测出20 kD的油素蛋白,心形胚中可检测到相应的mRNA,表明油素蛋白在种子发育的早期就有表达。在油菜花后2周的早期胚胎中未检测到油素蛋白 mRNA,当种子达最大鲜重后、开始成熟脱水时转录水平增加50~100倍,随后以较低的水平在胚中表达,在叶片中一直未检测到油素蛋白 mRNA 的存在(Murphy et al., 1989)。油素蛋白表达的峰值出现在花后9~11周,比油菜小蛋白(napin)(花后4~6周)和十字花科蛋白(cruciferin)(花后6周)要晚,可以推测油素蛋白的积累比种子贮藏蛋白晚3~4周。油素蛋白积累的表达模式类似于胚胎发生晚期高丰度表达蛋白LEA蛋白(late embryogenesis abundant protein),且转录过程可能独立于napin、cruciferin等主要的种子贮藏蛋白(Murphy et al., 1989; Keddie et al., 1992)。

油素蛋白基因的5'端缺乏信号肽序列,与此相应的是油素蛋白N端也没有剪切信号序列,但油素蛋白却具有很强的组织表达特异性,推测油素蛋白基因内部可能有某些序列,或者油素蛋

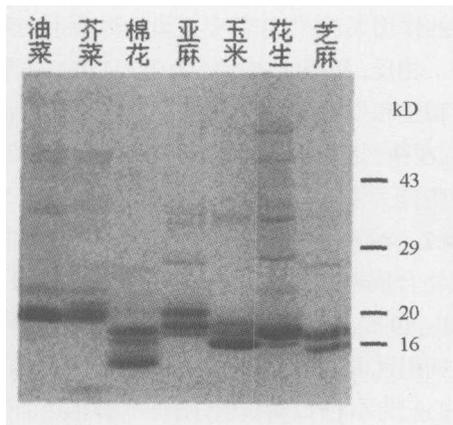


图2 油体中油素蛋白的二级结构模型
Fig. 2 The model of secondary structure of oleosin in oil body (Tzen et al., 1992; Buchanan et al., 2000)

白能够形成某种构象使其定位到油体表面。油素蛋白中间区域缺失会严重影响其在油体上的定位,而N端或C端缺失则影响较少。玉米油素蛋白能利用napiin启动子表达,并准确地运输和组装到转基因油菜籽的油体上(Lee et al., 1991)。“脯氨酸结”中的3个脯氨酸残基突变为亮氨酸时,油素蛋白不能定位表达,说明“脯氨酸结”是油体所必须的(Abell et al., 1997)。但在体外实验中,“脯氨酸结”突变不影响油素蛋白在内质网上的定位,说明其可能并不负责油素蛋白在内质网上的定位,油素蛋白中间疏水区域可能才是油素蛋白的内质网定位信号部位。

油素蛋白基因5'端上游区域还具有其他的调控序列,如在水稻油素蛋白基因上游存在谷物贮藏蛋白基因的调控元件CATGCANG。油菜油素蛋白启动子上存在的AATGCATG序列,与豆科植物中控制种子特异表达基因的保守序列RY基序(CATGCATG)高度同源(刘昱辉和贾士荣, 2003)。拟南芥油素蛋白基因启动子上存在豆科植物种子蛋白普遍具有的CACACA(TAACACA)序列(刘昱辉和贾士荣, 2003),可以推测这些序列与油素蛋白在种子中的特异表达有关。

油素蛋白受水分胁迫、茉莉酸、ABA和渗透调节剂(如山梨醇)的诱导表达(Hatzopoulos et al., 1990; Plant et al., 1994)。如油菜受ABA诱导后4小时内即可检测到20 kD的油素蛋白及其mRNA;山梨醇处理1小时可测到mRNA,3~6小时可检测到油素蛋白的积累。在油菜和拟南芥油素蛋白基因的启动子区域均存在ABA反应元件基序,特异地受ABA诱导(刘昱辉和贾士荣, 2003)。

2.4 油素蛋白的功能

2.4.1 油素蛋白与油体的稳定性

油素蛋白分子镶嵌在油体的半单位膜上,对维持油体的稳定极为重要。每个油素蛋白分子的3/5覆盖在油体表面,覆盖了油体的大部分表面,可以阻止细胞质中的磷脂酶作用于油体表面的磷

脂。Tzen和Huang(1992)用胰蛋白酶处理离体的油体,其稳定性被破坏,但用磷脂酶处理,油体保持完整,说明油素蛋白能够屏蔽磷脂不受磷脂酶的作用。

等电聚焦结果显示,油素蛋白的等电点为5.7~6.6。pH为中性时,油素蛋白为阴离子,使得油体表面呈负电荷,油体之间相互排斥,在空间上阻止油体间相互聚合(Tzen et al., 1992)。在pH 6.5时,由于组氨酸残基的质子化,油素蛋白为中性,油体表面因失去电荷而互不排斥,导致油体聚合;这些结果进一步证明了油素蛋白稳定油体的作用。油素蛋白的这种特性能够保证种子在脱水状态下其油体处于小而分散的状态,从而保持结构稳定。Murphy和Vance(1999)认为只有那些需要长期贮存脂肪并在随后发生物质动员的组织中才会需要油素蛋白的存在,橄榄和鳄梨的中果皮不像种子一样经历脱水,其油体也不作为长期贮藏脂肪的细胞器,所以不含油素蛋白(Ross et al., 1993)。

油素蛋白含量可能影响到油体的大小(Tzen and Huang, 1992; Sarmiento et al., 1997)。Ting等(1996)的研究发现,与低含油量玉米品种的颖果相比,高含油量的玉米颖果中,油/油素蛋白的比值较高,油体的体积也较大。种子发芽时,小的油体能为脂酶水解三酰甘油提供最大的作用表面,但却需要大量的油素蛋白和磷脂。相反,如果油体直径大于2.5 μm ,虽节省了磷脂和油素蛋白的用量,但由于作用表面过小,在种子发芽及幼苗生长时,脂酶不能迅速水解脂类为植物生长提供所需能量。

2.4.2 油素蛋白与油体的合成

与三酰甘油生物合成相关的酶位于内质网上(Lacey and Hills, 1996),三酰甘油在内质网的磷脂双分子层之间积累,形成微油滴后从磷脂双分子层之间向外凸起为小泡,以磷脂单分子层包裹形成油体的前体(Wanner et al., 1981)(图3)。至于油素蛋白在何时以何种方式积聚于油体前体的表面,还存在争议。Murphy和Vance(1999)发现油素

蛋白的积累晚于三酰甘油和 Δ^9 -硬脂酰基载体蛋白去饱和酶(Δ^9 -stearoyl-acyl carrier protein desaturase)的积累,此酶参与脂肪酸的生物合成,表明被磷脂单分子层包裹的三酰甘油微滴获得油素蛋白的包被是发生在油体合成的后期;有些油体的合成并没有经历此过程,因而不含油素蛋白(Ross et al., 1993)。但有些学者认为三酰甘油的合成以及在内质网上被新形成的磷脂单分子层包裹的过程与油素蛋白在粗面内质网上的合成是同时发生的(Holbrook et al., 1991; Huang 1992; Tzen et al., 1993; Peng and Tzen, 1998)。油素蛋白向内质网上出芽突起的三酰甘油微滴移动,很可能受其高度疏水的中间结构域的定位引导;成熟后的油体随后从内质网释放到胞液中。没有包被油素蛋白的初生油体可以直接从内质网释放,这些小的油体可以融合为较大的油体(10~25 μm)。鳄梨和橄榄果实的中果皮富含油脂,其细胞中的油体不含油素蛋白(Ross et al., 1993),油体大小可能由细胞质组分和黏度等多种因子决定(Sarmiento et al., 1997)。在气候温和地区生长的油料植物,在种子发育早期的胚和胚乳中,油体表面的油素蛋白较少,油体从内质网释放后可与其他油素蛋白含量低的油体融合,直到其体积大小达到油素蛋白能够覆盖其表面的程度;在随后的种子发育过程中,当有更多的油素蛋白合成时,油体的融合逐渐减少,直到达到其最终的体积。Sarmiento等(1997)对油体周围内质网上的油素蛋白进行了免疫细胞化学定位的研究,研究结果支持油体的这一发育模式。梯度离心分离向日葵种子的微粒体膜(microsomal membranes),发现油素蛋白在内质网上的分布随着三酰甘油合成的量而变化(Lacey and Hills, 1996; Lacey et al., 1999)。Ting等(1996)和Sarmiento等(1997)认为,当油素蛋白不再直接作用于油体合成时,其主要作用转变为决定油体的大小。

ABA通过诱导延长酶(elongase)的活性影响三酰甘油的积累(Zou et al., 1995)。在拟南

芥ABA不敏感型突变体*abi 3*的胚中,油素蛋白的表达是滞后的,同时油体体积变大,脂肪酸组分也发生变化(Parcy et al., 1994)。小桐子是一种重要的能源植物,种仁的含油量约为60%,超过油菜和大豆等常见的油料作物。随着种子的发育,种仁中的含油量和油体的数量逐渐增加;但不同生态环境下小桐子所产生的种子中,含油量、油体的大小和数量都有较大的差异(未发表资料)。

2.4.3 油素蛋白与油体的降解 种子萌发时,贮藏组织内发生三酰甘油的动员,油体被降解(Thompson et al., 1998)(图3)。种子萌发过程中,脂酶的合成可能与油素蛋白相关,油素蛋白可能具有脂酶的结合位点,也许油素蛋白本身就是脂酶的活化因子(Huang, 1992; Murphy and Vance, 1999)。脂酶作用于油体内的三酰甘油,产生脂肪酸,而脂肪酸的代谢场所为乙醛酸循环体(glyoxysome)。Thompson等(1998)观察到,在油料种子吸胀后,乙醛酸循环体迅速出现,并随着三酰甘油的消耗和油体的消失而消失,推测油体和乙醛酸循环体有着密切的联系,可能与脂肪酸从降解的油体转移到乙醛酸循环体有关。当三酰甘油降解后,油素蛋白迅速消失,油体的半单位膜上的磷脂与膨大的液泡膜融合,或成为

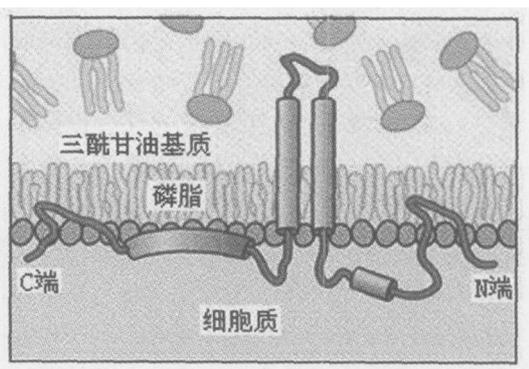


图3 种子成熟和萌发过程中玉米胚细胞油体的合成及降解模型

Fig. 3 Model for synthesis and degradation of oil body during maturation and germination of maize seeds (Buchanan et al., 2000)

不断扩大的乙醛酸循环体的膜来源 (Huang, 1992)。一般认为保持小而分散的油体, 其重要性在于为脂酶提供足够的接触表面, 为种子萌发时三酰甘油能够迅速动员创造条件。油体的降解是脂酶的水解作用以及通过在乙醛酸循环体中的 β -氧化和乙醛酸循环共同完成的。脂酶降解后的油体是不稳定的, 在种子萌发过程中通常持续几天或更长的时间, 油体很可能在降解过程中是逐渐变小的, 残留的油体能够一直保持小而完整的个体, 直到完全消失, 才能在种子萌发过程中长时间持续地提供能量。

3 钙结合油素蛋白

用不同的方法分离多种植物的油体蛋白时, 发现除油素蛋白外, 还含有少量的其他蛋白 (Millichip et al., 1996; Tzen et al., 1997)。Chen 等 (1998) 用免疫标记法确定了在芝麻种子油体中还存在 3 种蛋白 Sop1、Sop2 和 Sop3。Chen 等 (1999) 对芝麻的 Sop1 进行了氨基酸序列分析, 发现其与水稻的一种钙结合蛋白同源, 因此将这类蛋白命名为钙结合油素蛋白。钙结合油素蛋白普遍存在于高等植物中, 藻类和真菌中也有类似的蛋白 (Naested et al., 2000)。

3.1 钙结合油素蛋白的分布

钙结合油素蛋白最早是由 Frandsen 等 (1996) 在水稻成熟种子和 ABA 处理叶片的微粒体膜粗提液中检测到的。此后 Chen 等 (1998) 证明了在芝麻种子油体的表面结合有芝麻钙结合油素蛋白 1 (SiCLO1)。对纯化油体的免疫荧光染色的结果进一步证实了 SiCLO1 的存在, 而且是芝麻种子油体的特有蛋白 (Chen et al., 1999)。Naested 等 (2000) 用拟南芥重组钙结合油素蛋白 1 (AtCLO1) 的抗体在拟南芥种子中检测到了钙结合油素蛋白。从油菜发育早期和晚期的胚提取的膜组分中也检测到了钙结合油素蛋白, 甚至在蛋白结构的强变性条件下 (9 M 尿素), 从发育晚期的胚中纯化的油体上仍然能够检测到紧密结合在油体表面的钙结合油素蛋

白 (Millichip et al., 1996)。AtCLO1 启动子可以启动报告基因在胚和根尖中的共表达, 暗示钙结合油素蛋白在根中分布; 免疫检测结果表明, 油菜根尖细胞中钙结合油素蛋白结合在膜组分以及油体上, 同时也检测到了油素蛋白的存在 (Naested et al., 2000)。Paris 等 (1996) 对豌豆根尖细胞的钙结合油素蛋白进行免疫荧光标记, 细胞核以及细胞的周边、整个分生细胞都被标记, 而维管组织的细胞却没有被标记。

将单个根尖细胞的钙结合油素蛋白免疫标记结果与不同亚细胞结构的标记蛋白进行比较, 发现钙结合油素蛋白存在的部位都不能结合 BP-80 抗体, 而 BP-80 是液泡前体和高尔基体的标记蛋白 (Paris et al., 1996)。Jauh 等 (1999) 观察到钙结合油素蛋白不与水孔蛋白 (aquaporin) γ -液泡膜结合蛋白 (tonoplast binding protein, TIP) 或 δ -TIP 共定位, 这 2 个水孔蛋白是液泡的功能标记蛋白, δ -TIP 标记具有贮藏功能的液泡, 如贮藏色素和植物生长相关蛋白的液泡; 而 γ -TIP 标记含有细胞溶酶的液泡 (lytic vacuole) (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996)。但钙结合油素蛋白却与内质网的标记蛋白 BiP (binding protein) 以及蛋白贮藏型液泡 (protein storage vacuole) 或自吞噬液泡 (autophagic vacuole) 的标记蛋白 α -TIP 共定位 (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999)。这些研究结果表明, 钙结合油素蛋白并不是一个广泛分布于内质网或蛋白贮藏型或自吞噬型液泡膜上的蛋白。

许多植物根尖和根冠的细胞具有油体 (Sargent and Osborne, 1980; Busch et al., 1993), 在根细胞中钙结合油素蛋白可能与油体结合; 在拟南芥 *pickle* 突变体根细胞中发现有油素蛋白 (Ogas et al., 1997), 其初生根明显地保持胚性状态, 并像种子细胞一样贮藏蛋白和其他贮藏物质。免疫定位和免疫杂交实验表明, 油素蛋白和钙结合油素蛋白在油菜根尖的油体中存在 (Naested et al., 2000)。这些油体在 α -TIP 标记液泡的内部和外部都存在, 说明这些液泡可能是

自吞噬型液泡 (van der Wilden et al., 1980)。细胞质油体 (处于液泡外的) 中, 大部分钙结合油素蛋白与 α -TIP共定位, 但有一部分却与油素蛋白共定位。这表明钙结合油素蛋白与胚和根尖的油体都有结合。此外, 钙结合油素蛋白也与内质网折叠区域的BiP共定位 (Naested et al., 2000)。Neuhaus 和 Rogers (1998) 认为蛋白贮藏型液泡可能是由内质网上的池 (cisternae) 出芽或成熟而成, 液泡膜蛋白可能直接来自内质网。油体的形成可能发生在内质网上, 所以, 与钙结合油素蛋白的共定位的液泡膜上的 α -TIP以及内质网的标记蛋白BiP, 可能指示内质网形成液泡和油体的小区域 (图4)。

钙结合油素蛋白与内质网微区域上的 α -TIP共定位, 而 α -TIP是蛋白贮藏型液泡和自吞噬液泡的标记蛋白。这些结果说明内质网上的微区域与小囊泡的生物合成和油体的形成有

关。新合成的油体, 连同油素蛋白和钙结合油素蛋白以小而未成熟的油体形式释放到胞液中。这些小而未成熟的油体融合为成熟的油体, 这个融合过程受钙的调节。在有些细胞中, 油体被液泡吞噬, 这些液泡的液泡膜上含有来自内质网微区域的 α -TIP和钙结合油素蛋白。钙结合油素蛋白可能与具有贮藏和运输功能的细胞器的小囊泡之间的膜的融合和分离有关 (图5)。

3.2 钙结合油素蛋白的结构

对已获得的钙结合油素蛋白进行系统进化分析, 可将其分为3个亚族, 其中2个亚族存在于高等植物中, 1个亚族存在于藻类和真菌中 (Naested et al., 2000)。高等植物钙结合油素蛋白分子含有以下3个结构域 (Frandsen et al., 1996; Chen et al., 1999) (图5)。(1) N端亲水区: 含有一个与 Ca^{2+} 结合的EF-手臂结构(EF-

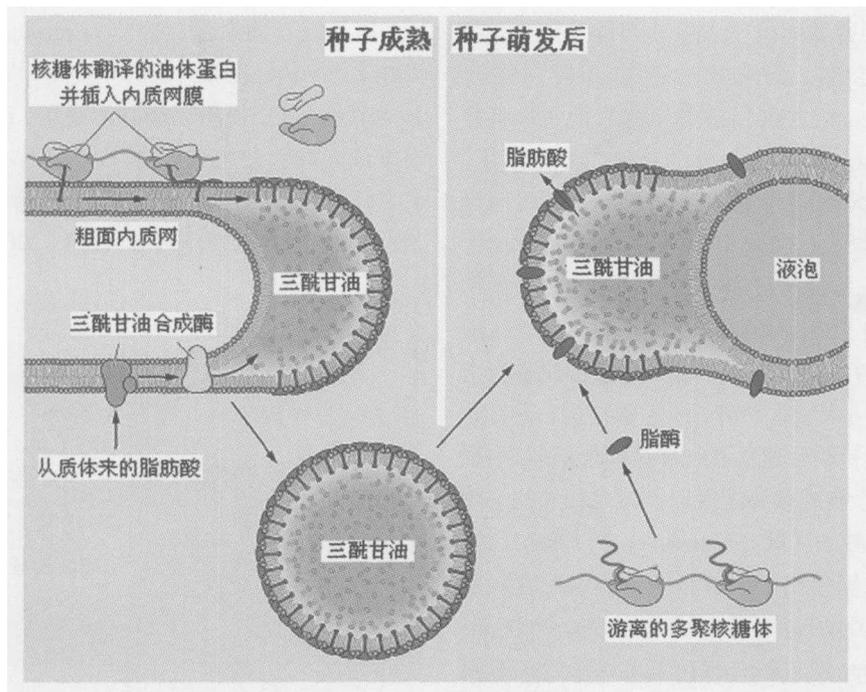


图4 钙结合油素蛋白在根尖细胞中的定位示意图

Fig. 4 Diagram of caleosin localization in root tips (Buchanan et al., 2000)

O. Oleosin; a. α -TIP; c. Caleosin

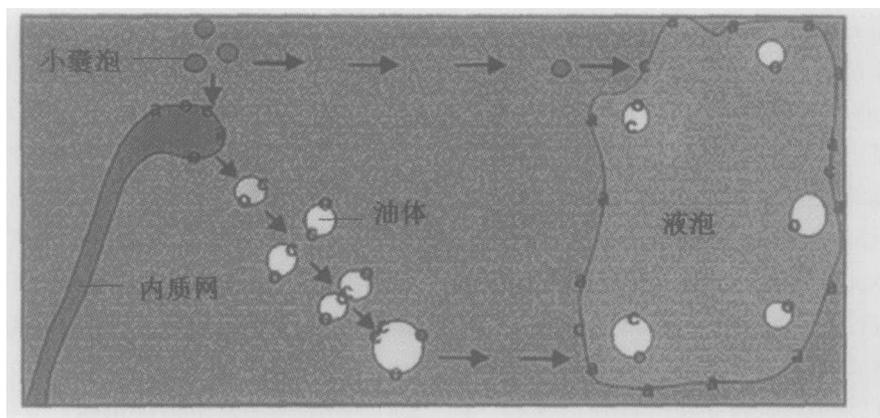


图5 油体中的钙结合油素蛋白的结构模型

Fig. 5 The model of caleosin structure in oil body (Buchanan et al., 2000; Frandsen et al., 2001)

hand)。每个EF-手臂结构的疏水“杯”上结合一个钙离子。通常EF-手臂结构成对出现,这样有利于2个钙离子的结合。对于单个钙结合油素蛋白分子,推测其钙结合发生在EF-手臂结构和油体表面的结合处,或2个钙结合油素蛋白的EF-手臂结构相互结合,也可能是钙结合油素蛋白与另一个未知的钙结合蛋白结合(Naested et al., 2000)。值得注意的是,EF-手臂结构也能结合 Ca^{2+} 以外的其他二价阳离子。由于细胞质中 Mg^{2+} 的浓度远远高于 Ca^{2+} , 而且在体外钙结合的实验中所用的 Ca^{2+} 浓度远比生理浓度高,所以很可能在细胞内 Mg^{2+} 才是钙结合油素蛋白EF-手臂结构的主要配体(Allouche et al., 1999)。(2) 中部疏水区: 钙结合油素蛋白的第2个结构域紧邻着EF-手臂结构。在有些异构体中,钙结合油素蛋白的中部疏水区域包括N端的一个胞外膜锚定区以及与之相邻的一个富含脯氨酸的区域(Frandsen et al., 1996), 已知这一结构仅存在于某些高等植物如芝麻、水稻和拟南芥的钙结合油素蛋白中(Naested et al., 2000)。Chen等(1999)根据芝麻钙结合油素蛋白与油素蛋白的部分相似性提出了SiCLO1的结构模型。他们认为,中间疏水区域分为2个部分,一个为兼具亲水和亲脂性的 β 螺旋结构;

另一个为紧邻其后的较短的锚定区域,由一对反式平行的 β 折叠结构组成,此 β 折叠连接一个类似脯氨酸结的元件(图6)。这一模型还没有得到实验数据的支持,但显著地表明钙结合油素蛋白比油素蛋白在油体半单位膜上的锚定区域较小,而且没有油素蛋白稳定(Frandsen et al., 2001)。当中间疏水区域被一段相对亲水的片段取代时,这一模型可能并不适用。这类基因在非油贮藏组织中表达,编码的类钙结合油素蛋白并不与油体结合,但可能具有钙和磷酸化信号转导的生物功能(Frandsen et al., 2001)。(3) C

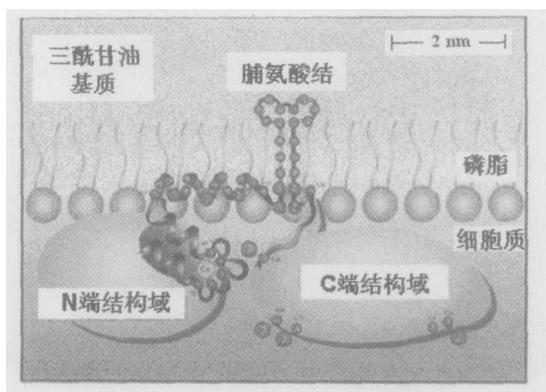


图6 钙结合油素蛋白的二级结构

Fig. 6 The secondary structure of caleosin (Chen et al., 1999)

端亲水区:多数植物钙结合油素蛋白的C端亲水区域一般都包括4个磷酸化位点,3个位点为酪蛋白激酶II,1个为蛋白酪氨酸激酶。酪蛋白激酶II的磷酸化已在高等植物中证实(Plana et al., 1991),而酪氨酸的磷酸化还没有被证实。

3.3 钙结合油素蛋白的表达

不同植物来源的钙结合油素蛋白,其表达特性不同。水稻钙结合油素蛋白(OsClo)主要在胚形成后期表达,与一些油素蛋白和LEA蛋白的表达类似,而且受ABA或水分胁迫诱导,可在幼苗和营养生长组织中表达。与水稻钙结合油素蛋白不同的是,芝麻钙结合油素蛋白(SiCLO1)具有明显的种子表达特异性,其mRNA的积累类似于芝麻的油素蛋白,在开花2周后表达量最大,其后SiCLO1 mRNA在成熟的种子中消失(Chen et al., 1999)。

在干旱状态下,受ABA诱导的拟南芥中可检测到与钙结合油素蛋白同源蛋白的mRNA(Takahashi et al., 2000)。Naested等(2000)报道在拟南芥第4和第5染色体上至少有5个类钙结合油素蛋白基因(*AtClo 1-5*), Northern blot的结果显示,*AtClo 2-4*在多种组织中有低水平表达,其中包括非贮藏油组织,由*AtClo 2-4*编码的类钙结合油素蛋白可能并不与油体结合。而*At-Clo 1*的表达具有种子表达特异性。但从转基因拟南芥*AtClo1*启动子表达的GUS报告基因的分析表明,*AtClo1*不仅在胚中高效表达,而且在整个发育过程中的根尖也表达;这说明在胚和根中油体的结构和功能可能有类似之处。营养组织中*AtClo 1-4*基因的表达对ABA或渗透胁迫没有应答,而水稻的*OsClo*基因的表达却受ABA或渗透胁迫的诱导;胡萝卜油素蛋白只在胚性组织中对ABA产生应答,而在非胚性组织中没有这种应答(Hatzopoulos et al., 1990)。

3.4 钙结合油素蛋白的功能

钙结合油素蛋白可能直接参与膜和油体的融合(Naested et al., 2000)。种子发育过程中,

油体从内质网释放后,需要经过多次融合才能成为成熟的油体(Huang, 1996; Sarmiento et al., 1997)。与此类似,在动物脂肪贮存细胞中,钙调节的融合在脂肪微体从内质网释放到细胞质并形成成熟脂肪体的过程中起重要作用(Murphy and Vance, 1999)。根据已有的研究,可以推测钙结合油素蛋白可能参与钙对油体融合的调节。发育的油菜籽中的钙结合油素蛋白的亚细胞定位也随发育过程而变化。对酵母的研究表明小的油体可能参与细胞内脂肪的转运和代谢,植物油体可能有类似的功能,钙结合油素蛋白可能参与这些过程(Leber et al., 1998)。钙结合油素蛋白结构的保守性意味着其功能可能受钙和磷酸化调控。钙结合油素蛋白参与ABA调节的应答,水稻OsCLO受ABA诱导表达(Frandsen et al., 1996),而钙和磷酸化都参与ABA的信号转导(Leung et al., 1994)。

在种子萌发过程中,油体降解,贮存的三酰甘油被动员,部分反应在乙醛酸循环体内完成。Thompson等(1998)认为油体可能与乙醛酸循环体对接。Naested等(2000)也观察到在拟南芥种子萌发的几天内,钙结合油素蛋白一直结合在油体上,可能在脂肪转运过程中起作用。此外,结合在膜组分上的钙结合油素蛋白可能参与内质网、运输小囊泡或油体之间与脂肪转运相关的膜融合和膜分离(图5),这种转运可能通过分别位于不同膜或油体表面钙结合油素蛋白之间的相互作用进行调节。

参考文献

- 刘昱辉,贾士荣(2003). 植物油体表达体系的研究进展. 农业生物技术学报 11, 531-537.
- Abell, B.M., Holbrook, L.A., Abenes, M., Murphy, D.J., Hills, M.J., and Moloney, M.M. (1997). Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *Plant Cell* 9, 1481-1493.
- Allouche, D., Parello, J., and Sanejouand, Y.H. (1999). Ca^{2+}/Mg^{2+} exchange in parvalbumin and other

- EF-hand proteins. A theoretical study. *J. Mol. Biol.* **285**, 857-873.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L.** (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (New York: American Society of Plant Physiologist), pp.511-525.
- Busch, M.B., Koertje, K.H., Rahmann, H., and Sievers, A.** (1993). Characteristic and differential calcium signals from cell structures of the root cap detected by energy-filtering electron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* **60**, 88-100.
- Chen, E.C.F., Tai, S.S.K., Peng, C.C., and Tzen, J.T.C.** (1998). Identification of three novel unique proteins in seed oil bodies of sesame. *Plant Cell Physiol.* **39**, 935-941.
- Chen, J.C.F., Tsai, C.C.Y., and Tzen, J.T.C.** (1999). Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1079-1086.
- Frandsen, G.I., Müller-Uri, F., Nielsen, M., Mundy, J., and Skriver, K.** (1996). Novel plant Ca²⁺-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J. Biol. Chem.* **271**, 343-348.
- Frandsen, G.I., Munday, J., and Tzen, J.T.C.** (2001). Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol. Plantarum* **112**, 301-307.
- Hatzopoulos, P., Franz, G., Choy, L., and Sung, R.Z.** (1990). Interaction of nuclear factors with upstream sequences of a lipid body membrane protein gene from carrot. *Plant Cell* **2**, 457-467.
- Herman, E.M.** (1987). Immunogold localization and synthesis of an oil-body membrane protein in developing soybean seeds. *Planta* **172**, 336-345.
- Hoh, B., Hinz, G., Jeong, B. K., and Robinson, D. G.** (1995). Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J. Cell Sci.* **108**, 299-310.
- Holbrook, L.A., van Rooijen, G.J.H., Wilen, R.W., and Moloney, M.M.** (1991). Oilbody proteins in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **97**, 1051-1058.
- Huang, A.H.C.** (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 177-200.
- Huang, A.H.C.** (1996). Oleosin and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**, 1055-1061.
- Jauh, G.Y., Phillips, T., and Rogers, J.C.** (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuole functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882.
- Keddie, J.S., Hubner, G., Slocombe, S.P., Jarvis, R.P., Cummins, I., Edwards, E.W., Shaw, C.H., and Murphy, D.J.** (1992). Cloning and characterisation of an oleosin gene from *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **19**, 443-453.
- Lacey, D.J., Beaudoin, F., Dempsey, C.E., Shewry, P.R., and Napier, J.A.** (1999). The accumulation of triacylglycerols within the endoplasmic reticulum of developing seeds of *Helianthus annuus*. *Plant J.* **17**, 397-405.
- Lacey, D.J., and Hills, M.J.** (1996). Heterogeneity of the endoplasmic reticulum with respect to lipid synthesis in developing seeds of *Brassica napus* L. *Planta* **199**, 545-551.
- Lacey, D.J., Wellner, N., Beaudoin, F., Napier, J.A., and Shewry, P.R.** (1998). Secondary structure of oleosins in oil bodies isolated from seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem J.* **334**, 469-477.
- Leber, R., Landl, K., Zinser, E., Ahorn, H., Spök, A., Kohlwein, S.D., Turnowsky, F., and Daum, G.** (1998). Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, on yeast reflects a relationship between endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol. Biol. Cell* **9**, 375-386.
- Lee, W.S., Tzen, J.T.C., Kridl, J.C., Radke, S.E., and Huang, A.H.C.** (1991). Maize oleosin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the maize oleosin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6181-6185.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chefdor, F., and Giraudat, J.** (1994). *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**, 1448-1452.
- Li, M., Smith, L.J., Clark, D.C., Wilson, R., and Murphy, D.J.** (1992). Secondary structures of a new

- class of lipid body proteins from oilseeds. *J. Biol. Chem.* **267**, 8245-8253.
- Millichip, M., Tatham, A.S., Jackson, F., Griffiths, G., Shewry, P.R., and Stobart, A.K.** (1996). Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem J.* **314**, 333-337.
- Murphy, D.J., Cummins, I., and Kang, A.S.** (1989). Synthesis of the major oil-body membrane protein in developing rapeseed embryos. *Biochem. J.* **258**, 285-293.
- Murphy, D.J., and Vance, J.** (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 109-115.
- Naested, H., Frandsen, G.I., Jauh, G.Y., Hernandez-Pinzon, I., Nielsen, H.B., Murphy, D.J., Rogers, J.C., and Mundy, J.** (2000). Caleosins: Ca²⁺ binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol. Biol.* **44**, 463-476.
- Neuhaus, J. M., and Rogers, J.C.** (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **38**, 127-144.
- Ogas, J., Cheng, J.C., Sung, Z.R., and Somerville, C.** (1997). Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* **277**, 91-94.
- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J.** (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: Role of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**, 1567-1582.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C.** (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Peng, C.C., and Tzen, J.T.C.** (1998). Analysis of the three essential constituents of oil bodies in developing sesame seeds. *Plant Cell Physiol.* **39**, 35-42.
- Plana, M., Itarte, E., Ertija, R., Goday, A., Pages, M., and Martinez, M.C.** (1991). Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.* **266**, 22510-22514.
- Plant, A.L., van Rooijen, G.J.H., Anderson, C.P., and Moloney, M.M.** (1994). Regulation of an *Arabidopsis* oleosin gene promoter in transgenic *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 193-205.
- Ross, J.H.E., Sanchez, J., Millan, F., and Murphy, D.J.** (1993). Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*). *Plant Sci.* **93**, 247-280.
- Sargent, J.A., and Osborne, D.J.** (1980). A comparative study of the fine structure of coleorhiza and root cells during the early hours of germination of rye embryos. *Protoplasma* **104**, 91-103.
- Sarmiento, C., Ross, J.H.E., Herman, E., and Murphy, D.J.** (1997). Expression and subcellular targeting of a soybean oleosin in transgenic rapeseed. Implications for the mechanism of oil-body formation in seeds. *Plant J.* **11**, 783-796.
- Taiz, L., and Zeiger, E.** (2002). *Plant Physiology* (Third edition). (Sunderland: Sinauer Associates Inc.), pp. 247-255.
- Takahashi, S., Katagiri, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2000). An *Arabidopsis* gene encoding a Ca²⁺-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration. *Plant Cell Physiol.* **41**, 898-903.
- Thompson, J.E., Froese, C.D., Madey, E., Smith, M. D., and Hong, Y.** (1998). Lipid metabolism during plant senescence. *Prog. Lipid Res.* **37**, 119-141.
- Ting, J.T.L., Lee, K., Ratnayake, C., Platt, K.A., Balsamo, R.A., and Huang, A.H.C.** (1996). Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents, size and shape of intracellular oil bodies are determined by oleosins/oil ratio. *Planta* **199**, 158-165.
- Tzen, J.T.C., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C.** (1993). Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.* **101**, 267-276.
- Tzen, J.T.C., Chuang, R.L.C., Chen, J.C.F., and Wu, L.S.H.** (1998). Coexistence of both oleosin isoforms on the surface of seed oil bodies and their individual stabilization to the organelles. *J. Biochem.* **123**, 319-324.

- Tzen, J.T.C., and Huang, A.H.C.** (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J. Cell Biol.* **117**, 327-335.
- Tzen, J.T.L., Lai, Y.K., Chan, K.L., and Huang, A.H.C.** (1990). Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiol.* **94**, 1282-1289.
- Tzen, J.T.C., Lie, G.C., and Huang, A.H.C.** (1992). Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J. Biol. Chem.* **267**, 15626-15634.
- Tzen, J.T.C., Peng, C.C., Cheng, D.J., Chen, E.C.F., and Chiu, J.M.H.** (1997). A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. *J. Biochem.* **121**, 762-768.
- van der Wilden, W., Herman, E.M., and Chrispeels, M.J.** (1980). Protein bodies of mung bean (*Vigna radiata*) cotyledons as autophagic organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 428-432.
- Wanner, G., Formanek, H., and Theimer, R.R.** (1981). The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. Ultrastructural evidence. *Planta* **151**, 109-123.
- Wu, L.S.H., Hong, G.H.H., Hou, R.F., and Tzen, J.T.C.** (1999). Classification of the single oleosin isoform and characterization of seed oil bodies in gymnosperms. *Plant Cell Physiol.* **40**, 326-334.
- Zou, J.T., Abrams, G.D., Barton, D.L., Taylor, D.C., Pomeroy, M.K., and Abrams, S.R.** (1995). Induction of lipid and oleosin biosynthesis by (+)-abscisic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv. Reston. Biological responses in the presence of 8'-hydroxy abscisic acid. *Plant Physiol.* **108**, 563-571.

(责任编辑: 于昕)

第七届全国植物基因组学大会

为了及时了解和交流国内外植物基因组学研究领域的最新进展,进一步促进我国植物基因组学的深入研究和生物技术产业的快速发展,2006年8月8日~10日在哈尔滨市黑龙江大学召开“第七届全国植物基因组学大会”。会议将邀请国内外在植物基因组学研究领域有建树的科学家作报告,欢迎从事该研究领域及其相关领域的人员参加。

大会主席: 张启发(华中农业大学)

秘书长: 平文祥(黑龙江大学生命科学学院)

会议专题: (1)基因组研究的新领域;(2)作物功能基因组;(3)系统生物学;(4)小分子RNA和非编码RNA;(5)种质资源与自然变异;(6)非生物逆境;(7)植物营养;(8)病原与寄主互作;(9)作物产量、品质与杂种优势;(10)作物遗传改良新策略。

作大会报告的专家(以拼音为序): Gynheung An(韩国); Beat Keller(瑞士); Andrew H. Paterson(美国); Patrick Schnable(美国); Ko Shimamoto(日本); Rod Wing(美国); 邓兴旺(美国); 何光存(中国); 贾继增(中国); 李家洋(中国); 林辰涛(美国); 龙漫远(美国); 马红(美国); 马正强(中国); 裴炎(中国); 孙其信(中国); 王道文(中国); 王兴智(中国); 武维华(中国); 熊立仲(中国); 薛勇彪(中国); 张启发(中国); 周道绣(法国)。

会议注册: 本次会议采取网上注册,原则上不再接收电子邮件注册。

会议网址: <http://www.plantgenomics.cn>