

· 研究报告 ·

拟南芥RabD2b蛋白氨基酸突变对定位和功能的影响

王芳

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室，武汉 430070

摘要 Rab蛋白4个保守的鸟嘌呤核苷酸结合结构域G1、G3、G4和G5共同参与了与GTP的结合及水解过程。将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)RabD2b(AtRabD2b)G4结构域的重要氨基酸位点天冬酰胺(asparagine, N)突变为异亮氨酸(isoleucine, I)(*AtRabD2b*^[N121I])，并研究了N121I突变对AtRabD2b亚细胞定位和功能的影响。结果表明，N121I突变使AtRabD2b由原来的高尔基体点状定位转变为高尔基体和细胞质弥散定位。AtRabD2b能够互补酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)同源蛋白Ypt1突变产生的功能缺陷，而AtRabD2b^[N121I]仅能部分互补Ypt1的功能。*AtRabD2b*^[N121I]转基因植株表现出矮化、丛生、不育和茎顶端坏死等多效性异常表型，与AtRabD2b转基因植株出现的主茎异常抽出表型不同。上述结果表明，N121I突变不仅引起了AtRabD2b亚细胞定位的改变，而且影响了其正常功能。

关键词 AtRabD2b, N121I突变，亚细胞定位，功能

王芳 (2014). 拟南芥RabD2b蛋白氨基酸突变对定位和功能的影响. 植物学报 49, 653–662.

真核生物的细胞生长依赖于细胞内外的物质交流，内吞和分泌作用是细胞内和细胞外物质交换的重要途径，囊泡运输是完成这些途径的主要方式。Rab蛋白是小G蛋白超家族蛋白的成员，它们通过识别货物蛋白(cargo protein)、募集马达蛋白(motor protein)以及与泊定在细胞器膜上的停靠蛋白结合等，促进囊泡的形成、运输以及与细胞器膜的融合，进而调节细胞内不同细胞器之间的蛋白转运过程(Stenmark and Olkkonen, 2001; Rutherford and Moore, 2002)。

Rab蛋白的作用机制在不同生物间非常保守。它们在细胞质和细胞器膜上来回移动，并在非活性的GDP结合形式和活性的GTP结合形式之间进行循环，完成分子开关功能。Rab蛋白结合和水解GTP的循环反应受两类蛋白调节。鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)促进Rab蛋白与GTP的结合，GTP酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)则刺激Rab内在的GTP水解酶活性，促进Rab从GTP结合形式转变为GDP结合形式(Woollard and Moore, 2008; Agarwal et al., 2009)。Rab蛋白的4个保守鸟嘌呤核苷酸结合结构域(G1、G3、G4和G5)均参与了与核苷酸的结合及水解过程(Haubruck et al., 1990; Takai et al., 2001; Agarwal et al.,

2009)。这些保守结构域中重要氨基酸位点的突变会影响Rab蛋白结合GTP或者GDP的状态，产生组成型抑制或者显性激活的突变蛋白，从而影响Rab蛋白的定位和功能。烟草(*Nicotiana tabacum*)Rab2蛋白(NtRab2)的G4结构域处保守的氨基酸天冬酰胺(asparagine, N)突变为异亮氨酸(isoleucine, I)后，产生显性抑制突变体(dominant negative mutant)；突变蛋白由特异的高尔基体定位变为细胞质弥散定位，且突变蛋白抑制了花粉管中分泌蛋白由高尔基体向目的位点的运输，从而使花粉管的极性生长受阻(Cheung et al., 2002)。

目前在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了57个Rab蛋白，根据其结构和功能的同源性可划分为RabA到RabH8个亚家族(Rutherford and Moore, 2002)。拟南芥RabD(AtRabD)亚家族包括4个蛋白成员，它们与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的Ypt1蛋白和小鼠(*Mus musculus*)的Rab1蛋白具有较高的序列同源性。AtRabD亚家族进一步分为At-RabD1(包括AtRabD1蛋白)和AtRabD2(包含3个成员，即AtRabD2a、AtRabD2b和AtRabD2c)2个亚类。Pinheiro等(2009)的研究表明，AtRabD1和AtRabD2a定位在细胞的高尔基体和反面高尔基体点状结构上，

收稿日期: 2013-10-18; 接受日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(No.30623012)

E-mail: wangf@mail.hzau.edu.cn

它们分别通过不同的生化途径调节从内质网到高尔基体的囊泡运输过程; AtRabD1和AtRabD2亚类间及AtRabD2亚类内成员间均存在功能冗余, *atrabd1/atrabd2b/atrabd2c*三突变体出现茎顶端坏死、丛生和不育等多效性表型。Wang等(2012)的研究表明, At-RabD2b定位在细胞的高尔基体点状结构上, 能够互补酵母Ypt1蛋白突变产生的功能缺陷, 也参与细胞内从内质网到高尔基体的囊泡运输过程。此外, Peng等(2011)研究发现 *atrabd2b/atrabd2c* 双突变体的角果长度变短, 细胞学观察结果表明, 角果变短可能与花粉管的发育缺陷有关, 他们推测AtRabD2b和At-RabD2c可能还参与植物花粉管的生长过程。本研究将AtRabD2b的G4结构域重要氨基酸位点N突变为I, 研究了突变蛋白AtRabD2b^[N121I]的亚细胞定位及功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

将拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)哥伦比亚生态型(Columbia)种子点播在含蛭石和腐殖土(1:1)的营养土中, 置于温度为(20±2)℃, 光照条件为16小时光照/8小时黑暗, 光照强度为150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的培养箱中萌发并生长。烟草(*Nicotiana tabacum* L.)的种植条件同拟南芥。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5α、DB3.1和根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株GV-3101为本实验室保存。野生型酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株NSY125和ypt1温敏突变型酵母菌株ASY01由中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所张家明教授(Zhang et al., 2006)馈赠。

含AtRabD2b全长CDS(coding DNA sequence)序列的pT-D2b、pYX142-D2b和p104-D2b载体为本实验室构建并保存。pGEM-T载体购自Promega。Golgi标记载体GmMan1-CFP购自拟南芥生物研究中心(Nelson et al., 2007)。亚细胞定位载体pEARLEY-GATE104和BP反应载体pDONR221由加拿大农业部南方植物保护和食品研究中心崔玉海研究员馈赠。酵母菌转化载体pYX142由张家明教授馈赠。

引物由上海捷瑞公司合成。限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq DNA聚合酶和dNTP等购自Fer-

mentas公司。DNA凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞公司。酵母转化培养基购自Clontech公司。BP和LR反应试剂盒购自Invitrogen公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质序列的比对

首先, 通过NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找并获得Rab1类小G蛋白的编码序列信息, 然后用ClustalW软件进行氨基酸序列同源性比对。将比对结果文件导入Genedoc软件后获得加工后的比对结果。

1.2.2 载体的构建

pT-D2b^[N121I]: 设计引物D2bF(5'-ATGAATCCTGAA-TATGACTATC-3')和N121/R(5'-GAAGTGAGATCG-TTCTTGATCCCAACCAGTAGCTTG-3')以及N121/F(5'-CAAGCTACTGGTTGGGATCAAGAACGATCTCACTTC-3')和D2bR(5'-TCAAGAAGAACACAGC-CTG-3'), 其中引物N121/R和N121/F分别含有1个核苷酸突变位点的互补位点(下划线所示)。用成对引物D2bF和N121/R以及N121/F和D2bR分别扩增在突变位点处重叠的AtRabD2b的前后两段序列。PCR反应体系总体积为25 μL , 包含模板约50 ng, 10×PCR Buffer 2.5 μL , 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂, 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primer, 1.5 U Taq DNA Polymerase。反应程序为: 94℃3分钟; 94℃30秒, 56℃30秒, 72℃1分钟, 30个循环; 72℃延伸7分钟。反应产物于4℃保存。2种PCR产物经琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化后, 分别取5 μL 产物混合, 并以此为模板进行第2轮PCR扩增, 获得突变基因AtRabD2b^[N121I]。按照Promega公司TA克隆技术的操作程序, 将该基因克隆到pGEM-T载体上, 获得pT-D2b^[N121I]载体, 并送交上海生物工程公司进行序列测定。

pYX142-D2b^[N121I]: 以pT-D2b^[N121I]质粒DNA为模板, 用引物D2bEF(5'-CGAGAATTCATGAATCC-TGAATATGACTATCTGT-3', EcoRI)和D2bXR(5'-GAGCTCGAGTCAAGAAGAACACAGCCTG-3', Xhol)扩增AtRabD2b^[N121I]的CDS序列。PCR反应体系和反应程序同上。PCR产物纯化后用EcoRI和Xhol进行双酶切, 然后与同样双酶切的pYX142线状载体

连接, 转化DH5 α 。挑选阳性克隆, 用碱裂解法提取质粒后进行EcoRI和Xhol双酶切鉴定, 并进一步测序验证, 获得转化载体pYX142-D2b^[N121I]。

p104-D2b^[N121I]: 以pT-D2b^[N121I]质粒DNA为模板, 用引物attb1-D2bF和attb2-D2bR进行PCR扩增, 获得两端带有attb接头的AtRabD2b^[N121I]全长序列。将AtRabD2b^[N121I]与入门载体pDONR221进行BP重组, 获得中间载体pDON-D2b^[N121I]; 将pDON-D2b^[N121I]与pearleygate104再进行LR重组, 获得p104-D2b^[N121I]载体。BP和LR反应体系参照Invitrogen试剂盒使用说明书。

1.2.3 根癌农杆菌介导的烟草瞬时表达和亚细胞定位观察

用电转化法将p104-D2b^[N121I]载体转入GV3101。挑取转化子单菌落, 接种到含有3种抗生素(50 mg·L⁻¹kanamycin、50 mg·L⁻¹rifampicin和50 mg·L⁻¹gentamycin)的LB培养基上, 28°C振荡培养过夜。菌液浸染烟草叶片方法参照Wang等(2012)的方案进行。在农杆菌浸染烟草叶片后48–72小时之间, 剪取注射区域叶片制备组织切片, 在激光共聚焦显微镜(Leica DMI-RE2, Germany)下观察并拍照。黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)激发光波长设置为514 nm, 发射波长范围为505–530 nm; 青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)的激发光波长为405 nm, 发射波长范围为450–470 nm。

1.2.4 酵母转化实验

酵母菌株ASY01的感受态制备及质粒转化参照酵母操作手册(yeast protocols handbook, PT3024-1, Clontech)进行。挑取单克隆酵母菌接种到SD-Leu(6.7 g·L⁻¹YNB、20 g·L⁻¹葡萄糖和不含Leu的氨基酸混合物)液体培养基中, 振荡培养24小时后, 用接种棒蘸取少量液体培养物在SD-Leu固体培养基上划线, 并分别置于26°C和37°C培养箱中培养, 观察其生长情况。设置NSY125为阳性对照, 转化了pYX142空载体的ASY01为阴性对照。

1.2.5 拟南芥转基因植株的表型观察

采用沾花法转化拟南芥(Clough and Bent, 1998)。T₀转基因拟南芥种子消毒后播种在含50 mg·L⁻¹basta

的MS培养基(Sigma, USA)上。对初步筛选获得的阳性苗的根尖部位进行激光共聚焦显微观察, 根据YFP的表达情况判断外源基因的表达。生长2周后, 将培养皿上的阳性转基因后代和野生型对照植株移栽到营养土中, 在相同条件下种植并观察植株的表型。

2 结果与讨论

2.1 Rab1亚家族蛋白的结构域分析

通过比对不同物种Rab1同源蛋白(拟南芥RabD/Rab1亚家族的4个成员、酿酒酵母的Ypt1和小鼠的Rab1)的氨基酸序列, 发现它们都包含Rab蛋白的4个与鸟嘌呤核苷酸结合和水解有关的结构域G1、G3、G4和G5。G3结构域的氨基酸序列在3个物种的蛋白中完全保守, G1、G4和G5结构域的氨基酸序列存在一些差别, 但这些结构域的重要功能位点, 如G1结构域(VGKS)的丝氨酸和G4结构域(KLLVGNK)的天冬酰胺等都非常保守(图1)。

2.2 突变基因AtRabD2b^[N121I]的扩增

突变基因AtRabD2b^[N121I]是指基因编码的第121位氨基酸序列由天冬酰胺(N)突变为异亮氨酸(I), 对应的核苷酸序列由AAC突变为ATC, 因此只需将AtRabD2b编码序列第362位的A定点突变为T即可获得AtRabD2b^[N121I]。首先, 通过PCR扩增出长度分别为380和265 bp, 并在A碱基处发生了突变的AtRabD2b的前后两段重叠序列; 然后, 将它们纯化回收, 混合的DNA作为第2轮PCR扩增的模板, 扩增获得AtRabD2b^[N121I]的全长编码序列, 长度为609 bp(图2A)。测序结果显示除第362位的A突变为T外, AtRabD2b其余位点的核苷酸序列均未发生突变。将AtRabD2b^[N121I]克隆到pGEM-T上, 获得pT-D2b^[N121I]载体。

2.3 AtRabD2b^[N121I]的亚细胞定位

以pT-D2b^[N121I]为模板, 用引物扩增两端添加了attb接头的AtRabD2b^[N121I]的全长编码序列, 并通过BP和LR重组反应将AtRabD2b^[N121I]克隆到亚细胞定位载体pearleygate104上, 获得AtRabD2b^[N121I]与YFP C端序列融合的亚细胞定位载体p104-D2b^[N121I](图2B)。

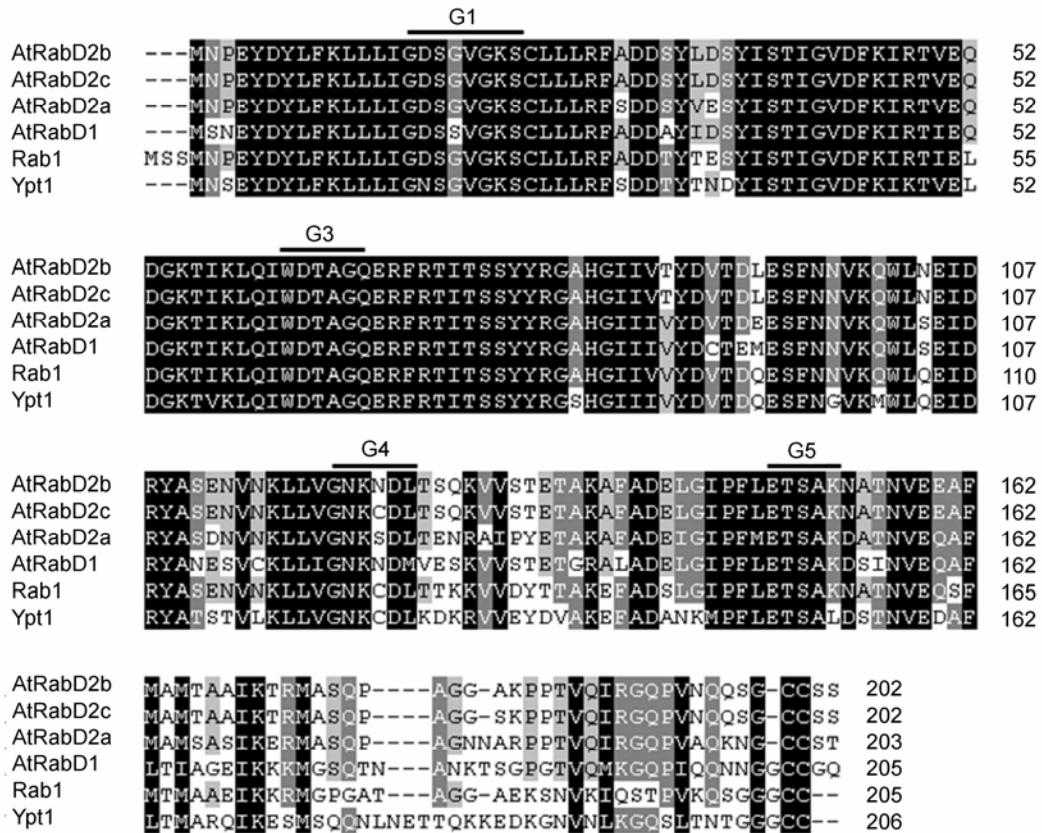


图1 不同物种Rab1同源蛋白的保守结构域比较

右边的数字代表氨基酸的位置; 相同或者相似的氨基酸分别用黑色和灰色标识; 保守结构域G1、G3、G4和G5的序列用上划线标出

Figure 1 Conserved domains of Rab1 homologous proteins within different species

Numbers shown at the right of each sequence are the positions of amino acid residues; Identical and similar amino acid residues are shaded with black and grey, respectively; Conserved regions involved in GTP binding or hydrolysis are overlined and labeled as G1, G3, G4 and G5

Wang等(2012)前期的研究表明, AtRabD2b主要定位在高尔基体点状结构上。本研究中, 我们用载体p104-D2b^[N121I]转化烟草表皮细胞瞬时表达, 并在转化后48–72小时内观察AtRabD2b^[N121I]的亚细胞定位。图2C显示, YFP-AtRabD2b^[N121I]表达的黄色荧光一部分出现在细胞的点状结构上, 另一部分则弥散在烟草叶片的细胞质中。为了验证这些点状结构是否为细胞内的高尔基体细胞器, 进一步将高尔基体的标记蛋白GmMan1-CFP与YFP-AtRabD2b^[N121I]融合蛋白在烟草表皮细胞中共表达, 发现大部分点状的黄色荧光与标记蛋白表达的青色荧光重叠, 表明这些重叠的点状结构为高尔基体; 但也有少部分黄色点状荧光未

与青色荧光重叠, 这部分可能为细胞内其它细胞器。因此, 与野生型AtRabD2b的高尔基体定位相比(图2C), AtRabD2b^[N121I]的亚细胞定位发生了部分改变, 出现在弥散的细胞质中。

2.4 AtRabD2b^[N121I]能够部分互补酵母ypt1突变体的功能

酵母温敏突变型菌株ASY01的Ypt1蛋白的第136位丙氨酸突变为天冬氨酸, 使其在26°C(非限制性温度)条件下能够正常生长, 而在37°C(限制性温度)条件下生长受到抑制。AtRabD2b能够互补Ypt1突变产生的生长缺陷, 表明其与Ypt1是功能同源的蛋白(Wang

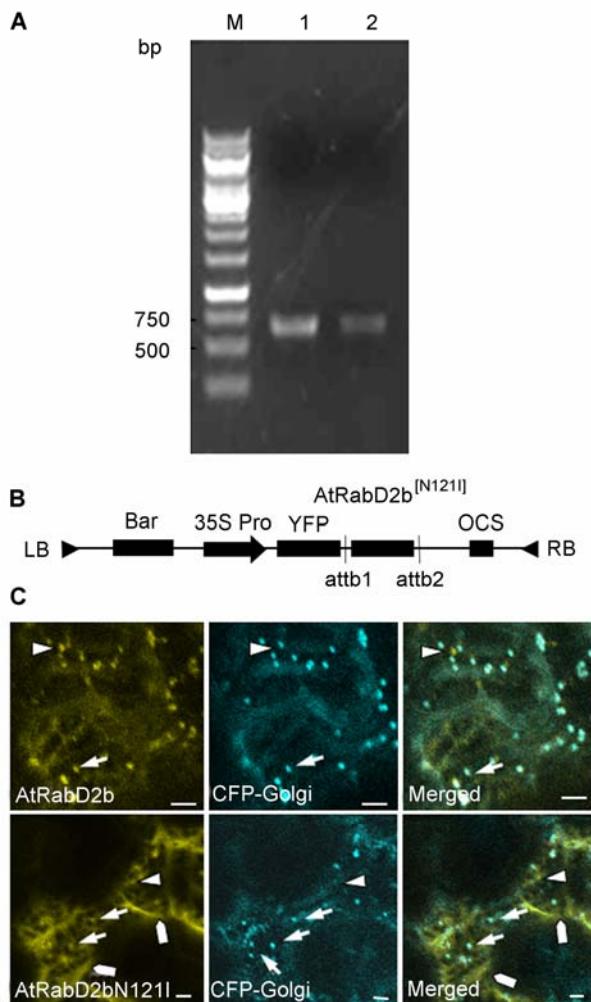


图2 烟草表皮细胞中AtRabD2b^[N121I]与AtRabD2b的亚细胞定位比较

(A) *AtRabD2b^[N121I]*的扩增(M: 1 kb DNA ladder; 1: *AtRabD2b*全长编码序列; 2: *AtRabD2b^[N121I]*全长编码序列); (B) p104-*D2b^[N121I]*载体示意图; (C) AtRabD2b与AtRabD2b^[N121I]在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位。图中箭号示与高尔基体重合的点状结构; 箭头示与高尔基体未重合的点状结构; 五边形示细胞质。Bar=5 μm

Figure 2 The comparation of the subcellular localization of AtRabD2b^[N121I] and AtRabD2b protein in tobacco epidermal cells

(A) The amplification of *AtRabD2b^[N121I]* (M: 1 kb DNA ladder; 1: The full-length coding sequence of *AtRabD2b*; 2: The full-length coding sequence of *AtRabD2b^[N121I]*); (B) Sketch map of the constructed binary vector p104-*D2b^[N121I]*; (C) The subcellular localization of AtRabD2b and AtRabD2b^[N121I] protein in tobacco epidermal cells. Arrows and arrowheads indicate punctate structures that associate with Golgi stacks and that are not labeled by Golgi stacks, respectively; Pentagons indicate the cytoplasm. Bar=5 μm

et al., 2012)。为了检测*AtRabD2b^[N121I]*是否能够互补*Ypt1*的功能, 我们构建了酵母的表达载体pYX142-*D2b^[N121I]*(图3A), 并将其转化ASY01进行组成型表达。结果显示, 在37°C条件下, *AtRabD2b*转化子生长状态良好; 而*AtRabD2b^[N121I]*转化子的生长受到部分抑制(图3B)。可见*AtRabD2b^[N121I]*仅能部分互补*Ypt1*的功能。

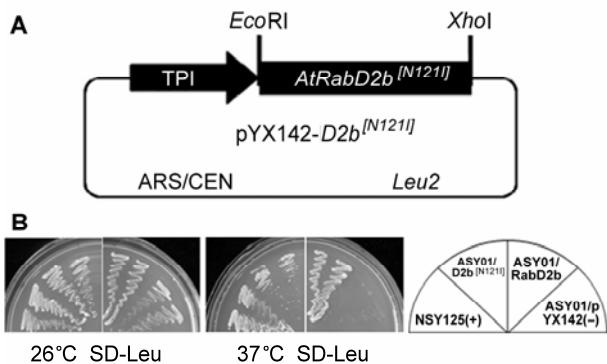


图3 AtRabD2b^[N121I]转化酵母温敏突变体ASY01的互补测验
(A) 酵母表达载体pYX142-*D2b^[N121I]*示意图; (B) 酵母互补测验。左图中所有转化子都能在26°C正常生长; 中间图中*AtRabD2b*转化子在37°C条件下生长良好, 而*AtRabD2b^[N121I]*转化子的生长受到部分抑制; 右图显示左边和中间两个图中转化子对应的名称。野生型NSY125菌株和转化了pYX142空载体的ASY01菌株分别作为正(+)和负(−)对照。

Figure 3 Functional complementation of *ypt1* mutant by *AtRabD2b^[N121I]*.

(A) Sketch map of yeast expression vector pYX142-*D2b^[N121I]*, (B) The yeast complementary assay. All the yeast transformants grew well at 26°C in the left picture. In the middle picture, *AtRabD2b* yeast transformant grew well in 37°C, while the growth of *AtRabD2b^[N121I]* yeast transformant was partially inhibited. The corresponding yeast transformants in left and middle pictures were named in the right picture. The transformant introduced with pYX142 was as a negative control (−) and wild type yeast strain NSY125 was as a positive control (+).

2.5 *AtRabD2b^[N121I]*转基因植株表现多效性表型

超表达野生型*AtRabD2b*的转基因植株表现出主茎不从莲座叶中心而从莲座叶侧面倾斜抽出的表型(王芳, 2011)。为了进一步研究*N121I*突变对*AtRabD2b*功能的影响, 我们将前面构建的含有YFP-RabD2b^[N121I]融合蛋白的亚细胞定位载体p104-*D2b^[N121I]*稳定转化

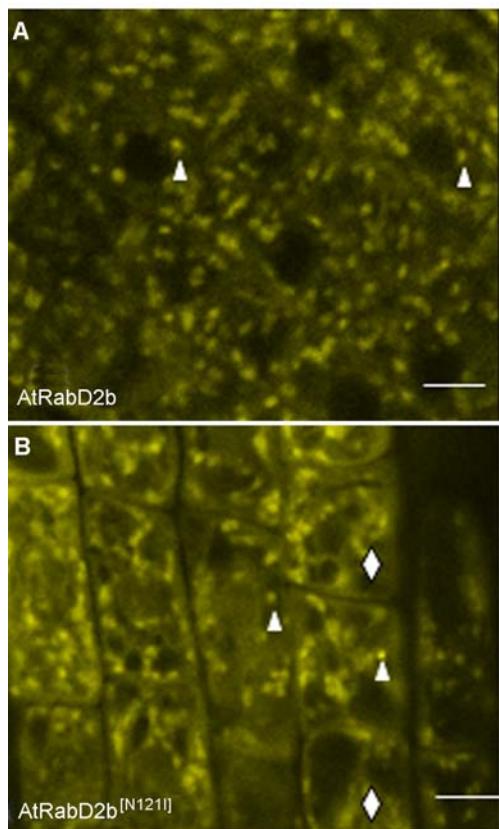


图4 AtRabD2b和AtRabD2b^[N121I]在拟南芥根尖细胞的亚细胞定位观察

(A) AtRabD2b定位在细胞的点状结构上(箭头示点状结构); (B) AtRabD2b^[N121I]定位在细胞的点状结构和细胞质中(箭头示点状结构, 菱形示细胞质成分)。Bar=5 μm

Figure 4 The different subcellular localization of AtRabD2b and AtRabD2b^[N121I] in root tip cells of *Arabidopsis thaliana*. (A) AtRabD2b localized at the punctate structure in root tip cells (Arrowheads indicate punctate structures); (B) AtRabD2b^[N121I] localized at the punctate structure and cytoplasm in root tip cells (Arrowheads indicate punctate structures; Rhombi indicate cytoplasm.). Bar=5 μm

野生型拟南芥, 获得表达突变基因AtRabD2b^[N121I]的转基因植株, 并与超表达野生型AtRabD2b的转基因植株的表型进行比较。将T₀代AtRabD2b^[N121I]转基因植株收获的种子播种在含有Basta除草剂的培养基上筛选, 获得7株阳性幼苗。为了进一步研究这些阳性植株中AtRabD2b^[N121I]的表达情况, 我们对7株阳性植株根尖细胞中是否出现黄色荧光进行了检测。图4B显示, 黄色荧光主要出现在这些阳性植株根尖细胞的

细胞质和点状结构上。可见AtRabD2b^[N121I]的表达与其在烟草表皮细胞中的瞬时表达情况一致, 说明外源基因AtRabD2b^[N121I]在这些阳性植株中都进行了有效地表达。而AtRabD2b转基因植株的根尖细胞中, 黄色荧光主要集中在点状结构上(图4A)。

将7株阳性植株与野生型种植在同一条件下, 观察它们的表型差异。发现转基因阳性植株表现出多效性的异常表型, 在植株高度、侧枝数目以及茎、花和角果的发育上与野生型(图5A)都有差异(图5D–G)。其中一个最为显著的特征是转基因植株的部分主茎和侧枝顶端部分在快速生长阶段变紫, 然后出现坏死(图5D, E)。成熟期植株的侧枝数目明显比野生型多, 植株表现出丛生矮化的表型, 且多数角果不育(图5F, G)。此类转基因植株的表型与Pinheiro等(2009)报道的三突变体atrabd1/atrabd2b/atrabd2c相似, 但与超表达野生型AtRabD2b的转基因植株(图5B, C)有较大差异(王芳, 2011)。

2.6 讨论

本研究通过定点突变的方式首次获得了AtRabD2b G4核苷酸结合结构域的重要氨基酸位点N处发生突变的突变基因AtRabD2b^[N121I], 并观察了突变蛋白的亚细胞定位和功能。与野生型AtRabD2b相比, AtRabD2b^[N121I]的定位发生了部分的改变, 由以前的高尔基体细胞器特异性定位变为高尔基体和细胞质的弥散定位。类似的研究也表明一些Rab蛋白G4结构域处等位突变造成了蛋白定位的改变, 如N119I突变造成了NtRab2蛋白由原来的高尔基体特异性定位变为弥散的细胞质定位(Cheung et al., 2002); N121I突变造成了AtRabH1b蛋白由原来的高尔基体和细胞质定位转变为细胞质定位(Johansen et al., 2009); N123I突变造成了AtRabF2b蛋白由高尔基体和液泡前体特异性定位变为细胞质定位(Kotzer et al., 2004)。上述突变都与N突变为I引起Rab蛋白在细胞内的结构形式改变有关。Rab蛋白特异的细胞器定位依赖于Rab蛋白的活性形式, 即GTP的结合形式(Takai et al., 2001; Agarwal et al., 2009)。G4结构域处保守氨基酸N突变为I, 会造成Rab蛋白结合GTP和GDP的能力均下降, 使其处于不结合核苷酸的自由状态(Olkkinen and Stenmark, 1997)。而这种自由状态的Rab

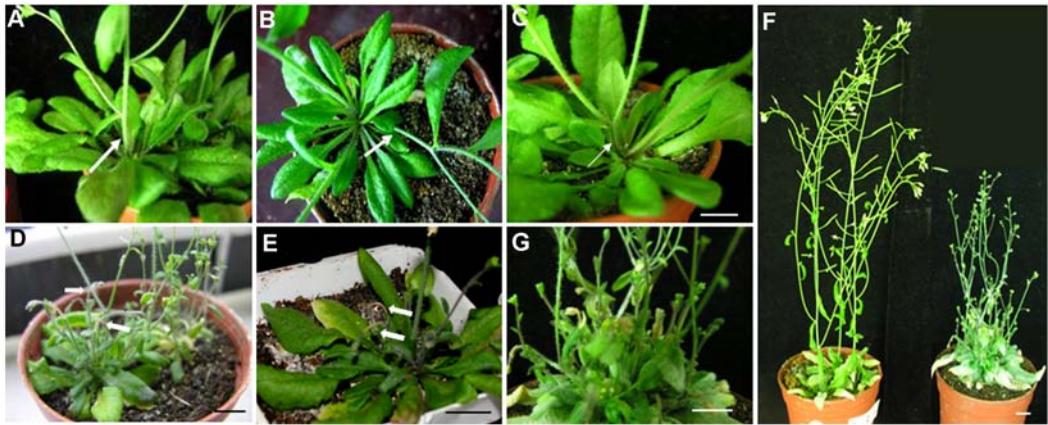


图5 $AtRabD2b$ 和 $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因拟南芥植株的表型

(A) 野生型植株(30天)(王芳, 2011), 箭头示发育正常的主茎; (B), (C) $AtRabD2b$ 转基因植株的2个不同株系(30天), 箭头示从莲座叶侧面倾斜抽出的主茎; (D), (E) $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株的两个不同株系(35天), 箭头示茎顶端坏死部分; (F) 野生型拟南芥(左)和 $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株(右)成熟期(49天)表型比较, $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株出现矮化、丛生和不育等表型; (G) F图中 $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株的放大图片。Bar=1 cm

Figure 5 The phenotypes of $AtRabD2b$ and $AtRabD2b^{N121I}$ transgenic *Arabidopsis thaliana*

(A) 30-day-old wild-type plant (Wang Fang, 2011, in Chinese); The arrow indicates the normal morphology of the main inflorescence of wild-type plant. (B), (C) Two $AtRabD2b$ transgenic lines (30-day-old); The arrows indicate the abnormal morphology that the main inflorescence extracted from the lateral side of rosette of $AtRabD2b$ transgenic plants. (D), (E) The phenotype of two $AtRabD2b^{N121I}$ transgenic lines (35-day-old); The arrows indicate the necrosis at the upper region of the stem. (F) The phenotype of wild type (left) and $AtRabD2b^{N121I}$ transgenic plant (right) at mature time (49-day-old); $AtRabD2b^{N121I}$ transgenic plant showed dwarf, bushy with low fertility phenotype. (G) The enlarged picture of $AtRabD2b^{N121I}$ transgenic plant in Figure 5F. Bar=1 cm

蛋白将不能被定位在特定的细胞器膜上或可能从细胞器上解离下来, 从而产生弥散的细胞质定位。

$AtRabD2b$ 能够互补酵母 $ypt1$ 突变体在37°C条件下的生长缺陷, 表明 $AtRabD2b$ 在酵母体内行使与 $Ypt1$ 相同的功能, 即都介导了从内质网到高尔基体的囊泡运输过程(Wang et al., 2012)。N121I的突变导致 $AtRabD2b$ 仅能部分互补酵母 $Ypt1$ 的功能, 可能与 $AtRabD2b$ 的定位改变有关, 其原因为Rab蛋白的功能在很大程度上依赖于其特异的细胞器定位(Stenmark and Olkkonen, 2001; Takai et al., 2001; Agarwal et al., 2009); $AtRabD2b$ 的细胞质非特异性定位可能抑制了Rab蛋白正常的囊泡运输过程, 从而使其功能发生改变。功能改变的另一方面表现为 $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株出现了与 $AtRabD2b$ 转基因植株不同的异常表型。因此, N到I的突变不仅影响了 $AtRabD2b$ 的定位, 而且对其功能也产生了影响。

$AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株表现出矮化、丛生和

不育等多效性表型, 其异常表型与Pinheiro等(2009)报道的 $atrabd1/atrabd2b/atrabd2c$ 三突变体的表型相同。 $AtRabD2b^{N121I}$ 转基因植株中只有 $AtRabD2b^{N121I}$ 进行了表达, $AtRabD1$ 、野生型 $AtRabD2b$ 和 $AtRabD2c$ 的表达量没有变化, 因此其作用机制可能与三突变体不同, 而可能与 $AtRabD2b^{N121I}$ 在体内产生的显性抑制效应有关。Batoko等(2000)的研究表明, 在烟草叶片表皮细胞中表达 $AtRabD2a^{N121I}$ 的突变体能够抑制高尔基体标记蛋白向高尔基体的分泌, 使标记蛋白聚集在内质网。通过共表达野生型 $AtRabD2a$ 则可解除 $AtRabD2a^{N121I}$ 产生的抑制效应, 使标记蛋白正常进行分泌, 推测 $AtRabD2a^{N121I}$ 突变体中野生型Rab蛋白的功能可能受到了抑制。Jones等(1995)、Rybin等(1996)以及Cool等(1999)通过遗传和生化研究表明, G4结构域处N121I突变及其等位的突变不仅减弱了Rab蛋白与GTP和GDP的结合能力, 而且突变体的表达抑制了Rab蛋白的调控蛋白GEF的功能,

进而造成了对调控GEF的一类Rab蛋白的功能抑制,但目前其具体作用机制尚不清楚。许多GEF特异性调控1种或多种Rab亚家族蛋白从非活性GDP到活性GTP结合形式的转换(Boguski and McCormick, 1993; Buday and Downward, 1993)。本研究中, Rab-D亚家族蛋白AtRabD1、AtRabD2b和AtRabD2c可能同时由1种GEF蛋白调控, *AtRabD2a^[N121]*在野生型拟南芥植株中的表达可能抑制了GEF的功能,从而对其调控的AtRabD1、AtRabD2b和AtRabD2c功能都产生了影响,故出现了*AtRabD2b^[N121]*转基因植株与 $atrabd1/atrabd2b/atrabd2c$ 三突变体植株表型相同的现象。

分枝增多是*AtRabD2b^[N121]*转基因植株的一个主要表型特征。植物的分枝发育是决定植物形态建成的重要因素,是影响作物生物量和结实量的重要农艺性状(李亚栋等, 2009)。分枝发育受到植物激素生长素(auxin, IAA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)及新型植物激素独脚金内酯(strigolactones, SL)的协同调控。IAA和SL抑制植物的分枝发育, CTK则促进植物的分枝发育。*PINFORMED1* (*PIN1*)编码一种生长素输出载体蛋白(pin-formed auxin efflux carriers, PIN) (Gälweiler et al., 1998), 水稻中该基因突变导致生长素从顶端到基部的极性运输受阻,引起了植物分蘖数增加(Xu et al., 2005)。*rgp1*是水稻中分离的一个与酵母*Ypt3*同源的Rab基因,在烟草植株中表达水稻*rgp1*可产生与本研究中*AtRabD2b^[N121]*转基因植株(丛生、矮化以及不正常的花器官发育)类似的多效性表型;检测结果表明,转基因植株内源细胞分裂素的含量比野生型提高了6倍(Kamada et al., 1992; Sano et al., 1994),推测*rgp1*可能介导了细胞分裂素的信号路径。本研究中, *AtRabD2b^[N121]*转基因植株和野生型的不同组织在上述激素的种类和含量上是否存在变化,及*AtRabD2b*是否也介导了激素信号调控等诸多问题尚需进一步深入研究。

综上所述,我们通过定点突变获得了*AtRabD2b*的突变基因*AtRabD2b^[N121]*,并研究了点突变对*AtRabD2b*定位和功能的影响,在以往研究的基础上更深入地揭示了*AtRabD2b*的功能,为今后开展*AtRabD2b*点突变在体内的作用机制研究奠定了理论基础。

参考文献

- 李亚栋, 张芊, 孙学辉, 路铁刚 (2009). 植物分枝发育的调控机制. 中国农业科技导报 11(4), 1–9.
- 王芳 (2011). 拟南芥小G蛋白RabD2b的表达、定位及功能研究. 博士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 73–75.
- Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK, Agarwal PK** (2009). Plant rabs: characterization, functional diversity, and role in stress tolerance. *Plant Mol Biol Rep* 27, 417–430.
- Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I** (2000). A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *Plant Cell* 12, 2201–2218.
- Boguski MS, McCormick F** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643–654.
- Buday L, Downward J** (1993). Epidermal growth factor regulates p21^{ras} through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611–620.
- Cheung AY, Chen CY, Glaven RH, de Graaf BH, Vidali L, Hepler PK, Wu HM** (2002). Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell* 14, 945–962.
- Clough SJ, Bent AF** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735–743.
- Cool RH, Schmidt G, Lenzen CU, Prinz H, Vogt D, Wittighofer A** (1999). The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Mol Cell Biol* 19, 6297–6305.
- Gälweiler L, Guan CH, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998). Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226–2230.
- Haubruck H, Engelke U, Mertins P, Gallwitz D** (1990). Structural and functional analysis of *ypt2*, an essential Ras-related gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encoding a Sec4 protein homologue. *EMBO J* 9, 1957–1962.
- Johansen JN, Chow CM, Moore I, Hawes C** (2009). At-RAB-H1b and AtRAB-H1c GTPases, homologues of the yeast Ypt6, target reporter proteins to the Golgi when expressed in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 60, 3179–3193.

- Jones S, Litt RJ, Richardson CJ, Segev N** (1995). Requirement of nucleotide exchange factor for Ypt1 GTPase mediated protein transport. *J Cell Biol* **130**, 1051–1061.
- Kamada I, Yamauchi S, Youssefian S, Sano H** (1992). Transgenic tobacco plants expressing *rgp1*, a gene encoding a Ras-related GTP-binding protein from rice, show distinct morphological characteristics. *Plant J* **2**, 799–807.
- Kotzer AM, Brandizzi F, Neumann U, Paris N, Moore I, Hawes C** (2004). AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *J Cell Sci* **117**, 6377–6389.
- Nelson BK, Cai X, Nebenfuhr A** (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* **51**, 1126–1136.
- Olkkinen VM, Stenmark H** (1997). Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int Rev Cytol* **176**, 1–85.
- Peng JL, Ilarslan H, Wurtele ES, Bassham DC** (2011). AtRabD2b and AtRabD2c have overlapping functions in pollen development and pollen tube growth. *BMC Plant Biol* **11**, 25.
- Pinheiro H, Samalova M, Geldner N, Chory J, Martinez A, Moore I** (2009). Genetic evidence that the higher plant Rab-D1 and Rab-D2 GTPases exhibit distinct but overlapping interactions in the early secretory pathway. *J Cell Sci* **122**, 3749–3758.
- Rutherford S, Moore I** (2002). The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 518–528.
- Rybin V, Ullrich O, Rubino M, Alexandrov K, Simon I, Seabra MC, Goody R, Zerial M** (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266–269.
- Sano H, Seo S, Orudgev E, Youssefian S, Ishizuka K** (1994). Expression of the gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels, abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to *Tobacco mosaic virus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10556–10560.
- Stenmark H, Olkkonen VM** (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* **2**, Reviews 3007.1–3007.7.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153–208.
- Wang F, Liu C, Wei C, Cui YH, Zheng Q, Zhang JM, Wu JS, Liu KD** (2012). AtRabD2b, a functional ortholog of the yeast Ypt1, controls various growth and developmental processes in Arabidopsis. *Plant Mol Biol Rep* **30**, 275–285.
- Woppard AA, Moore I** (2008). The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 610–619.
- Xu M, Zhu L, Shou HX, Wu P** (2005). A *PIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell Physiol* **46**, 1674–1681.
- Zhang JM, Sylvester AW, Li DQ, Sun XP** (2006). Complementation and expression analysis of SoRab1A and SoRab2A in sugarcane demonstrates their functional diversification. *J Integr Plant Biol* **48**, 1450–1457.

RabD2b Protein N121I Mutation Affects the Subcellular Localization and Functions in *Arabidopsis thaliana*

Fang Wang

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The four conserved guanine-base-binding motifs of Rab GTPase—G1, G3, G4 and G5—are involved in the binding and hydrolysis of GTP. We obtained the full-length coding sequence of the *Arabidopsis thaliana* *RabD2b* mutant allele *AtRabD2b*^[N121I] within the conserved G4 motif by changing asparagine 121 to isoleucine and studied the effects of N121I mutation on the sublocalization and functions of AtRabD2b. The N121I mutation altered the specific localization of AtRabD2b from Golgi stacks to both Golgi and cytoplasm. AtRabD2b could completely complement the functional defect induced by the mutation of *Saccharomyces cerevisiae* Ypt1, which is homologous to AtRabD2b in yeast. However, AtRabD2b^[N121I] only partly complemented the function of Ypt1. *AtRabD2b*^[N121I] transgenic *A. thaliana* showed dwarf, bushy, sterile and necrotic phenotypes, which differed from that of *AtRabD2b*-overexpressing *Arabidopsis* with its abnormal main-inflorescence extension phenotype. The N121I mutation alters the subcellular localization of AtRabD2b and affects its normal functions.

Key words *AtRabD2b*, N121I mutation, subcellular localization, function

Wang F (2014). RabD2b protein N121I mutation affects the subcellular localization and functions in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Bull Bot* **49**, 653–662.

E-mail: wangf@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)