

LEA 蛋白及其基因研究进展

鲁松^{1,3} 杨楠^{1,2} 熊铁一^{2,3}

(1. 四川省自然资源科学研究院,四川成都 610015; 2. 峨眉山生物实验站,四川峨眉山 614201;
3. 四川省生物资源保护与可持续利用实验室,四川成都 610015)

摘要: 胚胎发育晚期富集蛋白(LEA)是目前最受关注的一类干旱胁迫诱导蛋白。*lea* 基因不仅在种子成熟和干化阶段诱导表达,在多种胁迫时,植物营养组织中 LEA 蛋白的数量会增加。本文简要综述了 LEA 蛋白的种类、特性、功能和 *lea* 基因的结构及表达。

关键词: LEA 蛋白; *lea*

中图分类号: S718.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-5508(2013)03-0026-03

Advances in Researches on LEA Proteins and *Lea* Genes

LU Song^{1,3} YANG Nan^{1,2} XIONG Tie-yi^{2,3}

(1. Sichuan Nature Resources Science Academy, Chengdu 610015, China;
2. Emei Mountain Biotic Experimental Station, Mount Emei 614201, China;
3. Sichuan Provincial Laboratory for Natural Resources Protection and Sustainable Utilization, Chengdu 610015, China)

Abstract: Late embryogenesis abundant protein(LEA) is one of the most significant drought-induced proteins. *Lea* genes express themselves not only during the period of seed maturation and dehydration, but also would increase when the plant vegetative organs are faced with different stresses. In this article, a brief description is given of the classes and characters, functions of LEA proteins and the structures and expressions of the *lea* genes.

Key words: LEA proteins, *lea*

1 LEA 蛋白的种类及特性

胚胎发育晚期富集蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)自 Dure 等^[1] 1981 年首次在棉花中发现以来,人们在许多植物的花粉、种子中都发现了此种蛋白的存在,特别是在受干旱等逆境胁迫的幼苗营养组织中,发现 LEA 蛋白存在着高水平的表达。近年来,科学家们在线虫等原核生物中也发现了 LEA 组相似的蛋白^[2]。*lea* 基因最初被人们认为在种子成熟及干化过程中诱导表达的基因,但是现在的研究发现当遭受干旱、盐等逆境胁迫时,植物的营养组织中某些 *lea* 基因产物的数量会增加。

LEA 蛋白的分子量大多在 10 KD ~ 30KD 之间,少量在 30 KD 以上。LEA 蛋白大多数都具有高度的亲水性,这与它们在细胞质中的功能定位相一致。关于 LEA 蛋白的分类,人们常常参考的是棉花胚编码 LEA 蛋白的 mRNA 序列的同源性以及 LEA 蛋白的氨基酸序列来划分,一般划分为 5 组(参见表 1)^[3],也有的划分为 6 组。

2 LEA 蛋白质的功能

亲水性氨基酸所占比例较高是 LEA 蛋白的氨基酸组成有共同的特点,这种特殊的结构特点与它们的功能有密切的关系。其中某些环境下细胞中

收稿日期: 2013-01-21

基金项目: 四川省科技条件平台项目资助。

作者简介: 鲁松(1979-),男,助理研究员,博士,主要从事植物学方向研究。E-mail: lusong@cib.ac.cn

表 1
Table 1
LEA 蛋白的分类
Classes of LEA proteins

| 组 | 代表蛋白质 | 结构特征 | 特点 | 可能的功能 |
|--------------------|----------------------------------|--|--|------------------------------|
| 第 1 组 (D-19 族) | Em(早期甲硫氨酸标记蛋白,小麦) | 大多数(70%)蛋白质为可能由 α -螺旋构成的随机盘绕构象。富含带电氨基酸和甘氨酸 | 水合程度高于多数球状肽 | 结合水以使细胞中水含量的损耗最小化 |
| 第 2 组 (D-11 族) | DHN1(玉米) D-11(棉花) | 结构多变。包括一个或多个保守的赖氨酸富集区,它们可能形成 α -螺旋。保守序列为 EKKGIMDKIKELLPG。每个蛋白质中其重复序列的个数有所不同。可能包括或不包括一个多聚(丝氨酸)区。包括长度不定的富含极性残基和脯氨酸及甘氨酸或丙氨酸的区域 | 大多数成员定位到胞质和核上。酸性成员与质膜相连 | 在水分含量不足时可能使大分子稳定 |
| 第 3 组 (D-7 族) | HVA1(ABA 诱导,大麦), D-29 D-7(棉花) | 包括 11 个氨基酸长的重复基序,其保守序列是 TAQAAKEKAXE。推测含有两亲水性 α -螺旋。可以形成二聚体 | D-7 在棉花胚(0.25 mmol \cdot L ⁻¹)中很丰富 | HVA1 可以促使转基因植物产生胁迫耐性 |
| 第 4 组 (D-95 族) | D-95(大豆) | 亲水基团不显著,有微弱的疏水性。N 端区域包含一个可能的两亲水 α -螺旋 | | |
| 第 5 组 (D-113 族) | LE25(番茄) D-113(棉花) | 保守的 N 端序列有同源性,推测可形成 α -螺旋。推测 C 端结构域为长度和序列都不定的随机盘绕。富含丙氨酸、甘氨酸和苏氨酸 | D-113 在棉花种子中含量丰富 | 保持膜或蛋白质结构完整性。可隔离离子保护胞质,可耐寒耐盐 |

(引自 B. B. Buchanan et al. 2001)

LEA 蛋白的高含量及高亲水性等都表明它们的作用不与酶相似。LEA 蛋白的作用可能有以下几个方面:

(1) 脱水保护剂的作用。在正常的生理条件下 LEA 蛋白中的氨基酸残基多以无规则的卷曲形式存在。这种无规则卷曲的结构有利于 LEA 蛋白和周围的水分子相结合。这种特点表明在维持细胞生命所需的最低限量的水方面 LEA 蛋白有重要的辅助作用。这种作用可能与 HSP 等热激蛋白和脯氨酸一样既可以与细胞内其它的蛋白质发生相互作用,稳定蛋白结构稳定,又可以作为细胞内束缚水的结合介质,从而避免当细胞遭受胁迫发生脱水时出现较大幅度的破坏。早在 1985 年^[4]在小麦中的研究发现 LEA 蛋白中的 Em 蛋白(D19)的亲水性比其他大多数的球蛋白都要强,这其中的重要原因就在于约 70% 以上的肽链都处于无规则卷曲状态,这有助于增加对水分子的束缚。

(2) 对其他蛋白质或膜结构的保护作用。细胞内的组分会因严重失水而导致结冰,这会严重地损伤细胞内的膜结构。而在缺水条件下,LEA 类蛋白比如 D13 和 D11 等蛋白的结构中未卷曲的部分可形成能够适应其它分子结构的形状,这种结构可与水产生比糖、水结合形成的稳定性更强的结合力,类似于“溶解”在细胞质中,因此在晶体的保护上比蔗糖等溶质效果更好,从而可以减轻由于失水对细胞造成的伤害。

(3) 渗透调节作用。在玉米等植物中的研究发现,干旱、盐及低温胁迫时 *LEA-PMAH9* 基因的编码产物中含有一段已知的核糖核蛋白序列,该序列可

以同单链 DNA 结合,这说明 *lea* 基因可以编码 RNA 调节蛋白从而可以与核酸相结合来调节植物的基因表达及发育^[5]。除此之外,当遭受干旱等逆境胁迫时,脱水素的富含丝氨酸的保守区会被磷酸化,并且可以进入细胞核,这表明脱水素可能具有保护核酸的作用。

(4) 离子螯合剂。植物在遭受干旱、盐碱等逆境胁迫时细胞往往会表现出脱水,在这个过程中,细胞液中的离子浓度会迅速升高,这会导致细胞遭受不可逆转的伤害。一些 LEA 蛋白可以螯合细胞中的浓缩离子,从而减少对细胞的离子伤害。比如 D7 蛋白中具有一 11 个氨基酸残基组成的序列基元,该基元可以形成兼性 α -螺旋结构从而提供一个亲水表面,此亲水表面的带电基团可以螯合细胞脱水过程中浓缩的 Na⁺ 等,从而降低 Na⁺ 对细胞的伤害。在目前 *lea* 基因研究最多的动物线虫中人们同样发现一组类似作用的 LEA 蛋白 Aar LEA,在天然状态下是松散非折叠的状态,但是当干燥脱水时会发生折叠^[6]。

3 *lea* 基因的特征、克隆与表达

与许多植物在干旱、盐碱等逆境胁迫下营养组织中基因的表达方式和途径有相似之处, *lea* 基因的表达也具有 3 种途径: ABA 依赖型、ABA 诱导型和非 ABA 应答型。

同其它的 ABA 应答基因相似, ABA 依赖型的 *lea* 基因不需要特殊蛋白质合成来诱导表达,他们在基因结构上有很多类似真核生物基因的特征,如在

启动子区含 TATA 盒和 CAAT 盒,而在 Poly(A) 尾端含有 1 至多个内含子等。另外 *lea* 基因的表达在结构上也存在一个(或多个)顺式作用元件,反式作用因子与之结合后可促进基因的转录。*lea* 基因 5' 端存在 ABA 诱导响应必需的片段^[7]。如对从大麦中分离得到 *hva1* 基因结构的分析发现,其上游 5' 端包含约 400 bp 的调节序列、完整的编码序列且具一 109 bp 的内含子;另外在上游序列中还发现有四个 ABA 应答基因保守启动子元件。对多种 *lea* 基因启动子元件的序列比较发现,含有相同的 ACGT 核心序列^[8]是 *lea* 基因上游区域的相似结构。ABA 诱导型 *lea* 基因的表达方式常需要特殊蛋白质参与,如 *rd22*(拟南芥干旱诱导基因)。该基因的启动子中含 67 bp 的 DNA 结合蛋白单元。最后,非 ABA 应答型基因的表达不需要 ABA 的参与,但当有外源 ABA 处理时也会产生响应,如 *rd29* 基因。该基因的启动子区域除含有 ABA 应答元件(ABRE)外,还具有一个 9bp(TACCGACAT)的 DRE 反式作用元件,该元件与干旱、高盐及低温等逆境胁迫有关。

目前已先后从棉花、大麦、拟南芥、西红柿和一些禾谷类等多种植物中克隆了 *lea* 基因,并进行了基因转化研究。小麦在胁迫条件下的生长情况,并将小麦 1 组 *lea* 基因转化到酵母菌中,表明 Em 蛋白在酵母中对细胞膜起到渗透保护作用^[9]。以 *GAL1* 为启动子,西红柿 *lea4* 基因及大麦 *hva1* 基因在酵母异源表达体系中表达,基因产物用特异抗病毒检测。实验结果发现,与对照株相比 1.2 M NaCl 处理时,*hva1* 基因在酵母细胞中的表达时间有较短的迟滞,而 *lea4* 基因没有明显变化;而用 1.2 M KCl 处理时,与对照相比 *hva1* 基因和 *lea4* 基因的表达都具短的滞后期,表现出对高 KCl 的耐受性。以上结果说明在渗透胁迫中不同组的 *lea* 基因的保护作用方式并不相同^[10]。

目前尚缺乏直接的实验证据来证明 LEA 蛋白的确切功能^[11],但很多实验证据表明 LEA 蛋白在植物细胞中的积累与抗干旱作用密切相关。另外,实验表明转 *lea* 基因植物对高盐、高渗透胁迫的抗性效果不一致。对大麦 HVA1 蛋白的研究表明其编码基因可被干旱等环境胁迫和 ABA 诱导表达。转 *hva1* 基因水稻、燕麦和小麦对干旱和盐碱的抗性均有较大提高,而且,相应的生物量、水分利用效率等均增加^[12],而且他们的研究结果还发现 LEA 蛋白能提高植物耐脱水胁迫的原因是因为保护了细胞膜的完整性和稳定性。我国的俞嘉宁等^[13]早在 2004

年就已在小麦中克隆了一个第 3 组 *lea* 基因 *Ta-LEA3*,小麦中该基因的表达与耐旱性呈正相关,而且酵母中过量表达的实验也证明其可以改善酵母菌在离子和渗透胁迫下的生长状态。此外,在转基因水稻的实验结果也发现小麦 *PMA80* 和 *PMA1959* 基因可提高转基因水稻的脱水耐受性^[14],但在烟草的实验中发现复苏植物中的 3 个 *lea* 类基因(*pcC6-19*, *pcC3-06* 和 *pcC27-45*)并未使转基因烟草的抗逆性得到提高。

lea 基因及 LEA 蛋白的结构和功能一直以来都吸引着众多科学家的兴趣和重视,到目前为止已克隆获得上百种 *lea* 基因^[15]。众多研究表明 *lea* 基因的功能主要与抗逆性有关,如干旱、低温、ABA 处理及盐胁迫等均能诱导 *lea* 基因的表达^[16]。许多 *lea* 基因转化试验也表明 *lea* 可显著提高植物的抗逆性。如裴金铃等^[17]将紫杆怪柳的 *lea* 基因(DQ663481)导入棉花的结果证明,与对照相比转 *lea* 基因棉花在遭受干旱胁迫时,丙二醛含量显著降低,游离脯氨酸、可溶性还原糖等的含量升高,展现了良好的抗干旱能力。师静等^[18]对沙冬青的 *lea* 基因(AmLEA14)结构及功能的分析发现,AmLEA14 在低温、干旱、盐胁迫及 ABA 处理时均发挥作用,其中主要参与沙冬青的低温防御机制。相信随着研究的继续 *lea* 基因在不同抗逆性的植物的培育及选育上会发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Dure L H I. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing mRNA populations as shown *in vitro* and *in vivo* protein synthesis [J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 4162 ~ 4168.
- [2] Dure L, Crouch M, Harada J. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1989, 12(5): 475 ~ 48.
- [3] Buchanan B B. et al. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* [M]. 2001, 962 ~ 963.
- [4] McFarland M, Kaye I. Chlorofluorocarbons and ozone [J]. *Photochem. and Photobiol.*, 1992, 55: 981 ~ 929.
- [5] Kasuga M, Liu Q, Yamaguchi-Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(3): 287 ~ 291.
- [6] Close T J. Dehydrins: emergence of biochemical role of a family of plant dehydration proteins [J]. *Plant Physiol*, 1996, 97: 795 ~ 803.
- [7] Close T J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature [J]. *Plant Physiol*, 1997, 100: 291 ~ 296.

(下转第 49 页)

利于油松的健康生长,而有利于赤枯病、小蠹、天牛等病虫害的危害。如果小蠹的种群出现快速增长,可能会出现油松枯死蔓延的现象。因此,应加强对枯死和枯黄油松的清理,对清理的枯死树、病虫枝应集中处理;加大对赤枯病、小蠹等病虫害的防治力度。

针对不同林分做好抚育工作。对出现枯黄枝的油松树要进行人工抚育,修除枯黄枝;对由于自然灾害及病虫害造成林分质量下降的林分,应及时砍伐病、死树,防止病虫害传播;对林分过密的要及时进行间伐,使林分达到合理的密度,保证营养空间,促进林木生长,提高林木抗性,间伐后及时补植阔叶树种及灌木,减少水土流失,保护林下植被及微生物系统。

同时,应加快建立病虫害监测预警体系。以县林业局为依托,加快建立全县森林病虫害监测预警体系。进一步稳定测报队伍,提高测报员素质,对病虫害的动态进行及时、全面、准确的掌握,实行定岗定位、责任到人、定时调查、指定方法、固定地块,避

免病虫害造成严重的危害。实现对主要病虫害和外来有害生物的有效监测、早期预警和准确预报。

参考文献:

- [1] 包维楷,乔永康,陈庆恒. 岷江上游典型油松人工幼林的生态环境效应[J]. 山地学报, 2003(06): 662~668.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 农业出版社, 1979.
- [3] 公宁宁,马履一,贾黎明,等. 林分密度和立地对油松人工林生长的影响[J]. 辽宁林业科技, 2010, 230(02): 11~14.
- [4] 李春生. 朝阳市油松枯萎死亡原因分析及解决对策探讨[J]. 内蒙古林业调查设计, 2011(4): 50.
- [5] 李淑丽,王路芳,刘志群,等. 邢台市油松死亡情况调查及原因初析[J]. 河北林果研究, 2001(01): 66~67.
- [6] 梁子超,刘广祥,沈宽远,等. 广东沿海地区松树死亡原因调查报告[J]. 林业科技通讯, 1989(05): 31~34.
- [7] 饶桂英,张敏,王立明,等. 云台林区松树死亡原因调查报告[J]. 江苏林业科技, 1992(03): 10~11.
- [8] 苏宝玲,殷有. 辽宁东部山区油松枯死原因及研究趋势分析[J]. 辽宁林业科技, 2001(6): 10~12.
- [9] 杨宝君. 松材线虫病[M]. 中国林业出版社, 2003.
- [10] 周建华,肖育贵,肖银波,等. 四川地区云南松切梢小蠹监测技术研究[J]. 四川林业科技, 2005, 25(4): 1~6.
- [11] 及在酵母中的功能分析[J]. 生物工程学报, 2004, 6(20): 832~838.
- [12] Cheng L, Fuchigami L H. CO₂ assimilation in relation to nitrogen in apple leaves[J]. Journal of Horticulture Science and Biotechnology, 2000, 75: 383~387.
- [13] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways[J]. Curr. Opin. Plant Biol., 2000, 3: 217~223.
- [14] 刘洋,邢鑫,李德全. LEA蛋白的分类与功能的研究进展. 生物技术通报, 2011, 8: 36~43.
- [15] 裴金铃,杨红兰,李春平,等. 转晚期胚胎发生丰富蛋白(LEA)基因棉花及抗旱性分析[J]. 分子植物育种, 2012, 3: 331~337.
- [16] 师静,刘美芹,史军娜. 沙冬青胚胎晚期发生丰富蛋白基因序列及表达特性分析[J]. 北京林业大学学报, 2012, 4: 114~119.
- [17] Zhu J K. Cell signaling under salt, water and cold stresses[J]. Curr. Opin. Plant Biol, 2001, 4: 401~406.
- [18] Campbell J L, Klueva N Y, Zheng H G, et al. Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA[J]. Biochim Biophys. Acta, 2001, 1517(2): 270~277.
- [19] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress[J]. Curr. Opin. Plant Biol, 2003, 6: 441~445.
- [20] Wise R R, Naylor A W. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants[J]. Plant Physiol, 1987, 83: 278~282.
- [21] Chandra R, Zhang B, Blum J, et al. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection[J]. Plant Sci., 2004, 166: 855~862.
- [22] 俞嘉宁,张林生,张劲松,等. 小麦耐逆基因-TaLEA3的克隆

(上接第28页)