

细胞分裂素信号转导: 已知的简单性与未知的复杂性

郑丙莲 张素芝 孙加强 邓岩 左建儒*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101. * 联系人, E-mail: jrzuo@genetics.ac.cn)

摘要 在植物的生长发育过程中, 细胞分裂素通过调节细胞分裂与分化起着非常重要的作用. 最近几年的研究表明, 细胞分裂素信号可能采用一种类似于细菌和真菌中的双元组分系统, 通过在不同的组氨酸磷酸蛋白激酶和效应分子之间连续传递磷酸基团而完成其转导过程. 细胞分裂素信号转导途径与其他信号转导途径之间存在异常活跃的相互交叉反应, 同时细胞分裂素受体及其下游众多关键组分明显存在功能冗余的现象. 因此, 这些问题的解决成为阐明细胞分裂素信号转导网络的关键.

关键词 细胞分裂素 信号转导 双元组分系统 突变

细胞分裂素作为植物五大类“经典”激素之一, 在植物的生长发育过程中起着非常重要的作用. 在植物生长发育过程中, 细胞分裂素的生理功能包括参与配子细胞与胚胎发育、促进芽的分化、调控顶端优势、抑制主根的伸长、促进维管束的形成、延缓开花时间以及叶片的衰老等, 这些功能主要是通过调控细胞分裂与分化而实现的^[1,2]. 自被发现以来, 细胞分裂素已被广泛应用于植物体外再生^[3]. 但是尽管几十年来在遗传学、生物化学、生理学等方面做了很多的研究, 目前我们对细胞分裂素的生物合成、转运以及信号转导的了解依然极为有限. 作为一种传统而有效的方法, 筛选对外源激素反应性改变的突变体已被成功地应用于激素信号转导的研究, 如对乙烯^[4]和生长素信号^[5]途径的研究. 同样, 早期的遗传学研究通过施加过量的外源激素来筛选对细胞分裂素反应异常的突变体, 不幸的是, 通过这样方法筛选出来的数十个“细胞分裂素突变体”都并非是细胞分裂素信号转导通路的特异突变体^[6]. 导致这种局面的原因很大程度上是由于外源细胞分裂素能强烈地诱导乙烯的生物合成^[7,8]. 乙烯信号转导途径的激活为特异性地研究细胞分裂素信号转导带来了极大的技术性困难. 长期以来, 由于经典遗传学方法似乎“不适合”于细胞分裂素的研究, 导致该领域进展缓慢, 使之成为了解最少的植物激素^[9]. 直到1996年 *ckil* 突变体的鉴定^[10]以及随后几年在细胞分裂素信号途径方面取得了诸多进展^[11-15], 这种境况才得以改善. 本文对最近几年在细胞分裂素信号转导的研究进展作一小结并对部分重要结果进行简单的讨论.

为了帮助读者更好地阅读本文, 我们首先将拟南芥基因、突变体和蛋白质的通用命名规则作一简

介^[16]. 一般而言, 拟南芥基因、突变体和蛋白质的命名以3个字母和1个数字表示. 3个字母通常为全名的缩写, 而数字则为类似基因\突变体\蛋白质的不同系列(从同一遗传筛选中得到的表型类似的突变体或同源性较高的基因系列等). 例如, *ckil* 和 *cki2* 分别表示 *cytokinin independent 1* 和 *cytokinin independent 2*. 基因(包括其相应的启动子和 mRNA)的名称以大写斜体字母(至少首字母大写)表示, 如 *CKII* 或 *Cki1*, 而蛋白质的名称则以大写正体字母(至少首字母大写)表示, 如 *CKII* 或 *Cki1*. 突变体(mutant)或突变(mutation)的名称以小写斜体字母表示, 例如 *ckil* 等. 但1997~1998年之前的命名不完全采用上述规则, 其一般为多于或少于三个字母或不带数字, 例如 *knolle (kn)*^[17] 和下文讨论的 *woodenleg (wol)*^[18].

1 “不定芽分析”与细胞分裂素受体的分离与鉴定

由于植物细胞具有全能性的特点, 在含有合适浓度的外源细胞分裂素和生长素的培养基上, 植物大部分组织衍生的外植体都可以分化出不定芽(shoots)并再生出完整的植株^[3,19]. 这一体外再生途径即为植物组织培养技术上通常所知的器官发生途径(organogenesis)^[20], 其原理和操作技术与另一类体外再生的主要方法——体细胞胚胎发生途径(somatic embryogenesis)截然不同^[21,22]. 在通过器官发生途径而进行的组织培养操作中, 高比例的细胞分裂素/生长素促进外植体不定芽的分化^[3,19](图1(a)). 目前普遍认为, 生长素和细胞分裂素可能通过激活相应的复杂但受到精细调控的信号转导途径而启动相关的生长发育信号途径, 从而促进了不定芽的分化和形

成。在这些条件下,如果一个基因的突变足以激活细胞分裂素的信号转导,则该突变植物的外植体可能在只有外源生长素的培养基上分化形成不定芽,这类突变(即不依赖于细胞分裂素的突变)的野生型位点代表细胞分裂素信号转导途径中的关键组分。在原理上,这类突变可能与细胞分裂素生物合成有关或为其信号转导途径上的关键调节组分。基于这一想法, Kakimoto^[10]发展和利用了目前已被广泛应用的“不定芽分析”技术,在不加外源细胞分裂素的条件下,用35S增强子的T-DNA标签法筛选到了拟南芥功能获得性突变体 *ckil* (*cytokinin independent 1*; 图1(b)),在无外源细胞分裂素的条件下,过量表达 *CKII*(即 *ckil* 功能获得性突变)足以促进不定芽分化,并在植物幼苗中诱发典型的细胞分裂素反应。*CKII* 基因编码的组氨酸蛋白激酶具有跨膜区、组氨酸蛋白激酶的激酶区和信号接收区(receiver domain);在激酶区和信号接收区分别带有保守的组氨酸和天冬氨酸基团(图2)^[10]。基于在细菌和真菌中,很多信号转导途径都是通过这种结构和功能上保守的组氨酸蛋白激酶来完成的特征^[23], *CKII* 曾被认为可能是细胞分裂素的一个受体,但目前尚无实验证据证明 *CKII* 能与细胞分裂素结合^[24],此推测仍待实验证实。

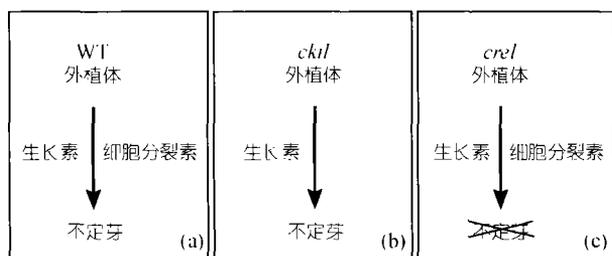


图1 不定芽分析技术模式简图

(a) 在适当浓度的生长素和细胞分裂素的条件下,植物的外植体分化出不定芽^[13,19]; (b) 在 *ckil* 的功能获得性突变体中,过量表达 *CKII* 促使外植体在缺乏细胞分裂素的条件下分化出不定芽^[10]; (c) 在 *crel* 的功能缺失性突变体中,外植体即使在适当浓度的生长素和细胞分裂素的条件下也不能分化出不定芽^[27]

对 *CKII* 在植物正常生长发育过程中的功能,最近的一项研究表明, *CKII* 与雌配子的发育有关;功能缺失性突变体 *ckil* 表现出异常的雌配子发育特征^[25]。但是由于该突变的配子期致死性,还无法确定 *CKII* 是否在植物胚胎发育以及胚胎后发育过程中的作用。 *CKII* 作为细胞分裂素受体的观点在最近受到挑战: *CKII* 在体外不能结合细胞分裂素^[24],在一

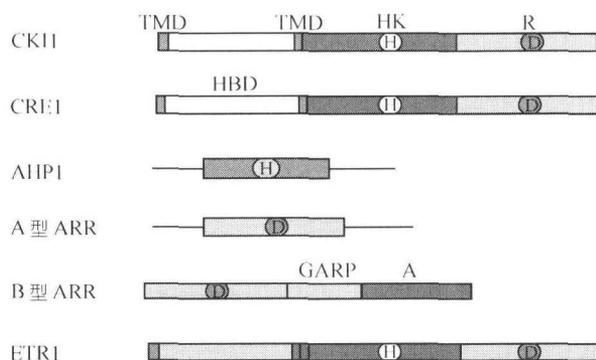


图2 拟南芥中细胞分裂素信号转导的关键组分图示
TMD 示转膜区, HK 示激酶区, R 示信号接受区, H 示组氨酸残基, D 示天冬氨酸残基, HBD (hormone binding domain) 示激素结合域, GARP 示 DNA-结合域, A 示转录激活区

级结构上与 *CREI*(*cytokinin receptor 1*, 细胞分裂素受体 1)具有明显的差异,而且 *CKII* 介导细胞分裂素信号转导途径的功能不需要外源细胞分裂素的存在^[26]。尽管存在这些疑问, *CKII* 的发现在细胞分裂素信号转导的研究上仍具有里程碑式的重要意义。同时, Kakimoto 也通过此发展建立了当今广泛应用的不定芽分析技术。事实上,所谓“不定芽分析技术”的方法和程序早在 20 世纪中后期就已相当成熟,但是直到 20 世纪 90 年代中后期才由 Kakimoto 将其创造性地应用于细胞分裂素的遗传分析。这一发展过程可谓耐人寻味,给人的启发远在“不定芽分析技术”本身之外。

CKII 的鉴定得之于其过量表达导致的细胞分裂素反应,即所谓的“正筛选”法。应用类似的原理, Inoue 等人^[27]采用“负筛选”,即在正常组织培养条件下不能再生不定芽的方法筛选到对外源细胞分裂素不敏感的突变体 *crel* (图1(c))。该突变体植物对细胞分裂素的敏感性明显降低,即使在正常浓度的外源细胞分裂素的条件下也不能分化出不定芽。*CREI* 编码一种组氨酸蛋白激酶,结构上与 *CKII* 有一定的相似性,具有保守的激酶区和信号接收区(图2)^[27]。*CKII* 和 *CREI* 在一级结构上同源性较低(约 30%),但二者具有相似的功能结构域及其排列方式(图2)。通过酵母缺失突变体的遗传互补实验证实了 *CREI* 能与细胞分裂素直接结合,从而直接证明了 *CREI* 是细胞分裂素受体^[27,28]。*CREI* 的发现是近几年来植物生物学领域中最重要发现之一。

虽然 *CKII* 和 *CREI* 可能都是细胞分裂素的主要

受体,但二者在作用机制上存在一定差异。Hwang 和 Sheen^[26]采用拟南芥原生质体瞬时表达体系证明了过量表达 *CKII* 和 *CRE1* 都能特异性地激活下游细胞分裂素应答基因的表达。与细菌和真菌双元组分系统相似的是,结构上保守的组氨酸和天冬氨酸基团对其磷酸化功能是必需的^[26,29,30]。但 *CRE1* 和 *CKII* 在作用机制上却截然不同:前者的激活需要外源细胞分裂素的存在,而后者的激活则不依赖于外源细胞分裂素的存在^[26]。这些结果表明,两者可能通过不同的方式感受并应答不同的发育或外界信号,而在不同条件下激活细胞分裂素下游信号转导通路。值得指出的是,*CKII* 与 *CRE1* 在一级结构上较低的同源性^[27]以及 *CKII* 在酵母细胞中不能结合细胞分裂素^[24],尚不能排除 *CKII* 通过不同于 *CRE1* 的机制或通过不同的结构在体内与细胞分裂素结合的可能性,特别是 *CKII* 在体内应答于低浓度内源激素的可能性。

有趣的是, *cre1* 与以前发现的 *wol*^[18]是等位突变。*wol* 是在筛选根生长发育突变体的研究中分离鉴定的。该突变导致维管束中不对称的异常细胞分裂,从而导致根维管束组织的异常发育^[18,31]。这些“偶然”的独立发现表明细胞分裂素在根的发育特别是维管束的发育中的重要作用。除了根的正常发育外, *cre1/wol* 突变体没有其他明显的形态表型,这似乎就很难解释细胞分裂素在植物生长发育中的重要功能。在发现了其他几个与 *CRE1* 结构类似的组氨酸蛋白激酶以后^[28],则不难解释由于功能冗余性而产生的相对较弱的 *cre1/wol* 表型。在拟南芥全基因组中,共发现 6 个 *AHK* (*Arabidopsis* histidine kinase) 基因。其中 *AHK2* 和 *AHK3* 与 *AHK4*(*AHK4* 即为 *CRE1*)具有较高的同源性(分别为 52%和 54%),表明它们都可能参与了细胞分裂素信号转导途径^[32]。*AHK2* 和 *AHK3* 都可以结合细胞分裂素^[24],而且都能激活下游应答基因^[26],因而不难理解当 *CRE1* 功能缺失时,二者可能在一定程度上互补了 *CRE1* 的功能,这可能是导致 *cre1* 功能缺失性突变体的非致死表型以及前人的遗传学筛选失败的原因。对细胞分裂素信号转导的遗传学研究的阴影最近似乎又重现。Franco-Zorrilla 等人^[33]在试图筛选受细胞分裂素调控的磷代谢的突变体时分离到的所有 7 个突变体均为 *cre1* 的等位突变。他们应用了一个受外源激素负调节的 *IPS* 启动子-GUS 融合报告基因进行筛选,故这一结果也许并不

令人感到意外。这一具有讽刺意味的结果与早期应用外源细胞分裂素得到乙烯突变体的结果似有异曲同工之妙。但是,它给我们的启示远远不止于此:*CRE1* 下游的组分可能是高度功能冗余的,因而应用细胞分裂素调节启动子-报告基因系统进行的突变体筛选可能将止于 *cre1* 本身。

在发现 *CKII* 后,通过改进的“正筛选”方法被用于类似的筛选。Banno 等人^[34]筛选到一个含 AP2 结构域的转录因子 *ESR1*,但其功能及其下游的靶位基因尚不清楚。与此同时,Zuo 等人^[35,36]通过大规模的筛选分离到两类强反应突变体:*ckil* 本身(2 个等位突变体)和 *pga22*。*PGA22* 编码一个与细胞分裂素生物合成有关的酶 *IPT*^[37,38]。

2 细胞分裂素信号转导途径中的双元组分系统

CKII 和 *CRE1* 都属于典型的组氨酸蛋白激酶,都具有保守的组氨酸和天冬氨酸磷酸化基团,在结构上与真菌和细菌中存在的双元组分系统类似^[30]。因此,普遍认为由 His→Asp 的磷酸化通路介导的双元组分系统也适用于植物细胞分裂素信号转导通路。在分离鉴定了与真菌和细菌同源的 *AHP*(*Arabidopsis* His phosphotransfer) 和 *ARR*(*Arabidopsis* response regulator)基因后^[11,13,15,32],上述推测得到了证实。

在真菌和细菌中,组氨酸蛋白激酶 *HK* (histidine kinase) 介导的信号转导需要通过 His→Asp 的磷酸化通路形式把信号传导至下游的应答元件,如 *HP* (His phosphotransfer)^[30]。拟南芥的 5 个 *AHP*(*AHP1*~*AHP5*)之间具有一定的同源性,并都具有保守的 His 残基,可能作为信号传递过程中的磷酸转移位点(图 2)^[28,39]。功能互补实验表明它们都能在酵母 *hp* 缺失突变体中作为磷酸传递子起作用^[28,40]。酵母双杂交实验也表明 *AHP* 能与 *AHK*, *ETR1* (ethylene receptor 1, 乙烯受体 1) 和 *CKII* 以及下游靶基因相互作用^[41]。上述结果表明 *AHP* 的作用是将上游的受体链接于下游的效应分子。与这一推论相吻合的是 *AHP-GFP* 融合蛋白应答于外源细胞分裂素而迅速地转运至细胞核^[26]。另一方面,过量表达 *AHP2* 引起对外源细胞分裂素敏感性增加和黑暗中抑制根与下胚轴伸长^[42],表明细胞分裂素诱导的翻译后修饰对 *AHP* 正常行使功能是必需的。

就目前所知,双元组分系统中 *AHP* 的下游靶标

是 ARR。拟南芥中现已发现 22 种应答基因 ARR。在单子叶植物中(如玉米)也已经发现了 ARR 的同源基因^[15,43,44]。基于其表达模式和结构的差异, ARR 可分为 A 型和 B 型(图 2)^[15,43,45,46]。在拟南芥中, A 型 ARR 基因有 10 个, 其表达明显受细胞分裂素的诱导, 并且都具有保守的信号接受区^[15,45]。稍后发现的 B 型 ARR 的表达不受外源激素调控^[15,47,48]。在结构上除了具有保守的接受区以外, B 型 ARR 具有 c-Myb 类似的 DNA 结合域, 因而可能作为转录因子参与细胞分裂素信号转导^[43]。在瞬时和稳定表达系统中都证明了 B 型 ARR 能直接以不依赖于细胞分裂素的方式激活 A 型 ARR 的表达, 而 A 型 ARR 的表达却受到自身的负反馈调控^[26,47,48]。同时, B 型 ARR 的活性也受到 A 型 ARR 的负反馈调控^[26,48]。上述结果表明 A 型 ARR 和 B 型 ARR 可能分别作为转录抑制子和转录激活子在细胞分裂素信号转导途径中行使功能(图 3)。这一推论得到亚细胞定位实验的支持, 即大部分 ARR(除 ARR16 外)都是核定位蛋白^[49], 且其核定位模式与保守的 Asp 基因是否存在无关, 也不依赖于外源激素^[26,49]。然而, 目前尚未发现 ARR 的其他靶位基因。分离鉴定这些未知的 ARR 靶位基因是进一步了解细胞分裂素复杂的信号转导网络的关键。

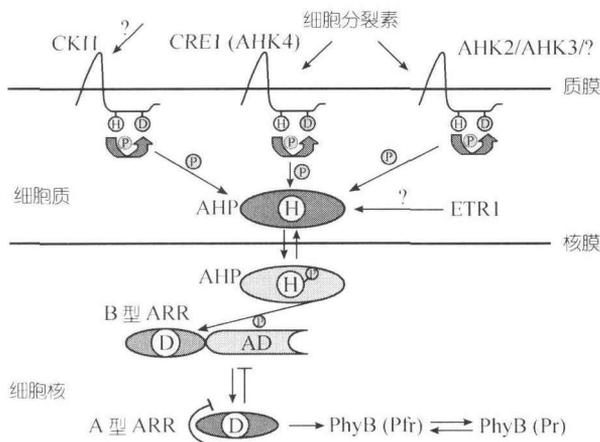


图 3 拟南芥中细胞分裂素信号转导模型

在被细胞分裂素(CRE1, AHK2 和 AHK3)或未知信号(CKII)激活后, 磷酸基团(P)从组氨酸残基(H)转到天冬氨酸残基(D)上, 从而激活定位于质膜上的受体。该磷酸基团转移到 AHP 后而激活后者, 磷酸化后的 AHP 迅速转运通过核膜定位于细胞核, 并激活 B 型 ARR。激活后的 B 型 ARR 结合到 A 型 ARR 的启动子上, 启动后者的转录, 而 A 型 ARR 又通过负反馈机制调节 B 型 ARR 的活性, 进而抑制其自身的表达。细胞分裂素与乙烯和光信号转导途径交叉反应的位点可能分别在 AHP 和 A 型 ARR, 但也可能存在其他位点

由于 A 型 ARR 和 B 型 ARR 完全不同的表达模式以及它们对细胞分裂素的依赖性上的差异, 两者可能通过完全不同的机制进行调控。如意料之中, 过量表达 B 型 ARR(ARR1 和 ARR2)呈现与过量表达 CKII 类似的表型: 对细胞分裂素敏感性增加、不依赖于外源激素的不定芽形成、抑制根伸长, 激活下游 ARR5 和 ARR6 的表达等表型^[26,47,48]。但不同的是, A 型 ARR 的功能获得性和功能缺失性突变体均无明显的表型^[26,48]。有趣的是, A 型 ARR 和 B 型 ARR 中保守的 Asp 残基以及 AHP 中保守的 His 残基突变后并不影响其相应的功能^[26]。这种颇为意外的结果被部分地解释为 B 型 ARR 的过量表达可以绕过 (bypass) 其负调控。如果这种假设成立, 则很难解释 CKII 和 CRE1 对保守的 Asp 和 His 基团的绝对依赖性。然而, 最近的一个发现颇具启发意义。烟草的一个 HK 类似(HK-like)基因可能编码一个与乙烯受体 ETR1 类似的蛋白。令人吃惊的是, 该蛋白并不具有传统认为的组氨酸蛋白激酶活性, 却表现出典型的丝/苏蛋白激酶活性^[50]。类似的情况也发现于 ETR1 本身^[51]。上述结果表明高等植物中的某些二元组分系统可能采取了不同于低等生物中的作用机制。

3 与其他途径的交叉反应

虽然普遍认为细胞分裂素与生长素、乙烯、光等途径存在活跃的交叉反应, 但其具体细节并不完全清楚, 其中了解最详尽的是细胞分裂素对 ACC 合成酶活性的正调控(ACC 为乙烯生物合成的主要前体)^[7,8]。这一正调控作用对早期的细胞分裂素突变体遗传学筛选而言无疑是一场噩梦^[6]。这种交叉反应并不仅仅限于细胞分裂素能诱导乙烯的生物合成, 而且也参与了其信号转导本身的调控^[7]。这一推论得到下述实验的支持: AHP2 除了与细胞分裂素信号途径上的组分存在相互作用外, 还可以与乙烯受体 ETR1 相互作用^[41], 表明细胞分裂素和乙烯信号转导途径中可能共享某些组分或二者存在部分重叠的通路^[7,41]。在试图将细胞分裂素和乙烯信号转导“解偶联”设想的基础上, Vogel 等人^[7,52]筛选到 5 个在黑暗中缺乏由细胞分裂素诱导的乙烯三级反应(triple response)的突变体 *cin* (cytokinin insensitive)。与早期的工作类似, 大部分 *cin* 突变体并不能特异性地阻断细胞分裂素信号转导通路, 尽管 *cin1* 在不定芽再生能力方面有所下降。有趣的是, 在所有的 *cin* 突变体中, 细胞

分裂素的主要应答基因 *ARR5* 的表达并没有发生任何变化^[52], 表明 *CIN1* 并没有参与细胞分裂素信号转导的初级反应(primary response)或 *CIN1* 位于 *ARR5* 的下游。

生长素与细胞分裂素在植物的许多发育过程中是相互拮抗的, 包括调控顶端优势和主根的伸长以及不定芽的再生。对 *PLS*(一个含 36 个氨基酸残基的短肽)的分析鉴定, 为生长素和细胞分裂素的信号转导途径之间的交叉反应提供了一个极有说服力的例子^[53]。与野生型相比, *pls* 突变体的根较短, 叶片维管束化程度降低。其表型与细胞分裂素及生长素反应的改变相关联。进一步实验发现, *pls* 突变体对细胞分裂素高度敏感, 细胞分裂素标记基因 *ARR5* 的表达水平显著增加; 与之相反, *pls* 对生长素的敏感程度明显降低, 生长素诱导基因 *IAA1* 的表达水平下降。有趣的是, *PLS* 本身的表达却是受生长素诱导的。这些结果表明, *PLS* 作为一个关键的信号开关分子控制生长素与细胞分裂素信号途径中的交叉反应, 其野生型基因可能分别作为正调控和负调控因子参与了生长素和细胞分裂素的调控^[53]。

最近对 *ARR4* 的一项研究为细胞分裂素与光的交叉反应提供了直接证据^[54]。作为一个受细胞分裂素诱导的 A 型 *ARR*, *ARR4* 与其他 A 型 *ARR* 一样参与了细胞分裂素信号途径的调控^[55,26]。但其稳定性受光的调控: *ARR4* 蛋白在光照下积累, 但在黑暗中不能检测到。这种光调控的表达模式更特异地表现在 *ARR4* 蛋白积累对红光和远红外光的反应上: *ARR4* 在红光培养条件下积累, 但在远红外光下不合成(或降解)^[54]。*ARR4* 的这种表达调控模式和亚细胞定位与光敏色素 *PhyB* 的作用时空和亚细胞定位是高度相似的^[56]。体外实验表明, *ARR4* 可以与 *PhyB* 的 N 端直接相互作用, 并可能通过此作用稳定 *PhyB* 的 Pfr 活性形式。过量表达 *ARR4* 的转基因植物对红光高度敏感^[54]。有趣的是, 包括 *PhyB* 在内的光敏色素均为组氨酸蛋白激酶类似蛋白^[12,14], 表明 *ARR* 蛋白可能利用相同的机制在细胞分裂素和光信号途径中行使功能。上述结果表明 *ARR4* 很可能作为一个信号分子介导了细胞分裂素和红光信号转导途径^[54]。

4 结束语

最近几年对细胞分裂素信号转导途径的研究进展迅速, 特别是对 *CRE1*, *CKII*, *AHP* 和 *ARR* 的功能

作出了开创性的诠释^[11-14,28], 从而使得细胞分裂素信号转导的研究有了良好的开端。尽管如此, 我们仍面临许多问题。目前普遍接受的 *AHK*→*AHP*→*ARR* 模型(图 3)让人难以置信地简单。与其他信号转导途径(包括与细胞分裂素相似的乙烯信号转导途径)比较, 我们毫不怀疑在这个与其他激素和光信号途径有着复杂联系的细胞分裂素信号途径上还存在尚未鉴定的重要关键组分。目前看到的“简单性”可能意味着这些关键组分与其他信号转导途径的相互偶联和相互反应。无疑, 这种复杂性增加了后续工作的难度。例如, 乙烯受体 *ETR1* 被一直认为是定位于质膜上的一个组氨酸蛋白激酶, 但最近的研究却表明 *ETR1* 中保守的 Asp 和 His 残基并非其功能必需; 换言之, *ETR1* 并不具备组氨酸蛋白激酶活性^[51]。同样让人吃惊的是, *ETR1* 主要定位于内质网膜上而非质膜上^[57]。上述两项发现对细胞分裂素信号转导的研究可能具有相当的影响。如前述, 与细菌和真菌中情况不同的是, 拟南芥 *ARR* 中保守的 Asp 残基和 *AHP* 中保守的 His 残基并非为功能所必需^[26]。另一方面, *CRE1* 和 *CKII* 的转膜区并不具备定位于质膜上所必需的至少 21~23 个连续的疏水性残基。指出这些事实并不意味着细胞分裂素信号转导应用了与乙烯信号转导相似甚至相同的机制、或者一种非二元组分机制。显而易见, 对细胞分裂素信号转导途径更深入的了解必须建立在系统的遗传学、生物化学和细胞生物学研究的基础上, 特别是有待于相关特异性抗体的制备。另一方面, 与乙烯信号转导途径比较, 细胞分裂素信号通路是否也存在类似的偶联其受体与下游组分的 *MAPK* 级联反应呢? 考虑到这些复杂性, 在如此活跃反应的神经网络中分离鉴定细胞分裂素信号转导的特异组分并非易事。

最简单但又最重要的问题是如何找到这些关键组分。通过基因微阵列(microarray)分析比较激活细胞分裂素信号途径后基因表达的变化不失为一条有效而充满希望的途径。通过比较愈伤组织和不定芽形成过程中的基因表达谱已对此进行了初步的尝试^[58,59]。类似的策略也可以用于比较细胞分裂素与其他途径(如光和乙烯)的基因表达谱。通过基因微阵列鉴定的候选基因将为反向遗传学研究提供有价值的材料。此外, 分离鉴定与已知关键组分(如 *CRE1* 和 *CKII* 等)相互反应的蛋白/基因(如通过酵母双杂交方法), 并结合这些基因的功能获得型和功能缺失型突

变体来研究其功能将有助于了解细胞分裂素信号转导机制。

通过遗传学的方法筛选细胞分裂素信号转导途径的突变体可能仍是一种最有力的工具。过去大规模的遗传筛选仅分离到有限的突变体,而且其中关键的突变体是借助于“不定芽分析”方法而获得的。“不定芽分析”的成功之处在于巧妙地避开了筛选条件下的乙烯反应。在进行了三次大规模的筛选后^[10,27,34,35,22],该筛选系统是否已饱和?就理论上而言,一些已知而又应该分离到的基因(如B型ARR和其他IPT类似基因)尚未在上述3个筛选中出现,充分表明“不定芽分析”还有很大的余地。我们相信除了“不定芽分析”方法之外,发展新的特异性遗传筛选方法将是取得进一步突破乃至基本了解细胞分裂素信号转导途径的关键。

致谢 感谢薛勇彪博士对本文的审阅。本工作为中国科学院“百人计划”、国家杰出青年科学基金(批准号:30125025)和国家自然科学基金(批准号:30270142)以及国家高技术研究发展计划(批准号:2001AA225021)资助项目。

参 考 文 献

- Davies P J. Plant hormones: Physiology, biochemistry, and molecular biology. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995
- Mok D W, Mok M C. Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 89~118
- Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118~131
- Wang K L, Li H, Ecker J R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 2002, 14: S131~S151
- Leyser O. Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2002, 53: 377~398
- Su W, Howell S H. A single genetic locus, *ckr1*, defines *Arabidopsis* mutants in which root growth is resistant to low concentrations of cytokinin. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1569~1574
- Vogel J P, Woeste K E, Theologis A, et al. Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 4766~4771
- Chae H S, Faure F, Kieber J J. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*, 2003, 15: 545~559
- Abel S, Blazquez M, Dangel J, et al. *Arabidopsis* Research 2000. *Plant Cell*, 2000, 12: 2302~2308
- Kakimoto T. CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 1996, 274: 982~985
- Sheen J. Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science*, 2002, 296: 1650~1652
- Hwang I, Chen H-C, Sheen J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 129: 500~515
- Haberer G, Kieber J J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol*, 2002, 128: 354~362
- Hutchison C E, Kieber J J. Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14: S47~S59
- D'Agostino I B, Kieber J J. Phosphorelay signal transduction: The emerging family of plant response regulators. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24: 452~456
- Meinke D W, Koornneef M. Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant J*, 1997, 12: 247~253
- Mayer U, Torres Ruiz R A, Berleth T, et al. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 1991, 353: 402~407
- Scheres B, Laurenzio L D, Willemsen V, et al. Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 1995, 121: 53~62
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~497
- Sugiyama M. Organogenesis *in vitro*. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2: 61~64
- Zimmerman J L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 1993, 5: 1411~1423
- Zuo J, Niu Q-W, Ikeda Y, et al. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of Regeneration-promoting genes. *Curr Opin Biotech*, 2002, 13: 173~180
- Thomason P, Kay R. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci*, 2000, 113: 3141~3150
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, et al. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 1017~1023
- Pischke M S, Jones G L, Otsuga D, et al. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15800~15805
- Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 2001, 413: 383~389
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 2001, 409: 1060~1063
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 67~74
- Stock J B, Stock A M, Mottonen J M. Signal transduction in bacteria. *Nature*, 1990, 344: 395~400

- 30 Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 183~215
- 31 Mahonen A P, Bonke M, Kauppinen L, et al. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Dev*, 2000, 14: 2938~2943
- 32 Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, et al. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 231~235
- 33 Franco-Zorrilla J M, Martin A C, Solano R, et al. Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation response in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 32: 353~360
- 34 Banno H, Ikeda Y, Niu Q -W, et al. Overexpression of *Arabidopsis* *ESRI* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell*, 2001, 13: 2609~2618
- 35 Zuo J, Niu Q -W, Frugis G, et al. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 30: 349~359
- 36 Sun J, Niu Q -W, Tarkowski P, et al. The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol*, 2003, 131: 167~176
- 37 Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2001, 276: 26405~26410
- 38 Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 677~685
- 39 The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408: 796~815
- 40 Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, et al. Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 2486~2489
- 41 Suzuki T, Sakurai K, Ueguchi C, et al. Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains. signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 37~45
- 42 Suzuki T, Ishikawa K, Yamashino T, et al. An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal transduction: Overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 123~129
- 43 D'Agostino I B, Deruere J, Kieber J J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1706~1717
- 44 Sakakibara H, Hayakawa, A, Deji A, et al. His-Asp phosphotransfer possibly involved in the nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize: Molecular cloning of cDNAs for two-component regulatory factors and demonstration of phosphotransfer activity *in vitro*. *Plant Mol Biol*, 1999, 41: 563~573
- 45 Brandstatter I, Kieber J J. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1009~1019
- 46 Imamura A, Hanaki N, Umeda H, et al. Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2691~2696
- 47 Sakai H, Aoyama T, Oka A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J*, 2000, 24: 703~711
- 48 Sakai H, Honma T, Aoyama T, et al. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 2001, 294: 1519~1521
- 49 Kiba T, Yamada H, Mizuno T. Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 1059~1066
- 50 Xie C, Zhang J -S, Zhou H -L, et al. Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco. *Plant J*, 2003, 33: 385~393
- 51 Wang W, Hall A E, O'Malley R, et al. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 352~357
- 52 Vogel J P, Schuerman P, Woeste K, et al. Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics*, 1998, 149: 417~427
- 53 Casson S A, Chilly P M, Topping J F, et al. The *POLARIS* gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. *Plant Cell*, 2002, 14: 1705~1721
- 54 Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, et al. Interaction of the response regulator arr4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, 2001, 294: 1108~1111
- 55 Yamada H, Hanaki N, Imamura A, et al. An *Arabidopsis* protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His-Asp phosphorylay signal transduction. *FEBS Lett*, 1998, 436: 76~80
- 56 Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, et al. Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell*, 1999, 11: 1445~1456
- 57 Chen Y F, Randlett M D, Findell J L, et al. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19861~19866
- 58 Che P, Gingerich D J, Lall S, et al. Global and cytokinin-related gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14: 2771~2785
- 59 Cary A J, Che P, Howell S H. Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2003, 32: 867~877

(2002-12-20 收稿, 2003-03-18 收修改稿)