

# 泛素化在病原物相关分子模式诱导的植物先天免疫反应中的作用

雷苏炜<sup>1</sup>, 李 魏<sup>1,2</sup>, 董 铮<sup>1</sup>, 李利华<sup>1</sup>, 戴良英<sup>1,2\*</sup>

(1 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; 2 作物基因工程湖南省重点实验室, 长沙 410128)

**摘要:**泛素化广泛参与调控植物体内多种生理生化反应, 如生长发育、先天免疫反应等。综述了泛素化在病原物相关分子模式(PAMPs)激发的植物先天免疫反应(PTI)中的作用, 重点介绍了泛素化在细菌鞭毛蛋白和真菌几丁质等PAMP引起的PTI反应中的作用及其机制。此外, 还综述了病原微生物分泌的部分效应因子泛素化靶标或者通过抑制植物靶标泛素化以抑制PTI反应并达到侵染的目的, 以为解析植物体内抗性调节机制和植物病原菌的防治提供参考。

**关键词:**植物; 泛素化; 病原物; 相关分子模式; 先天免疫反应

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-5280(2017)04-0459-04

DOI: 10.16848/j.cnki.issn.1001-5280.2017.04.26

## Ubiquitination Role of PAMP – triggered Immunity in Plant

LEI Suwei<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1,2</sup>, DONG Zheng<sup>1</sup>, LI Lihua<sup>1</sup>, DAI Liangying<sup>1,2\*</sup>

(1 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

2 Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** Ubiquitination has been widely involved in regulating various physiological and biochemical reactions in plants, such as growth, development and innate immunity. Here, we reviewed the role of ubiquitination in pathogen associated molecular patterns (PAMPs) triggered plants immunity (PTI), especially the function and mechanism of ubiquitination in PTI response activated by bacteria flagellin and fungal chitin. Furthermore, this paper reviews that some of the effectors secreted by pathogen ubiquitinate targets or suppress target ubiquitination to inhibit PTI for its infection. Hopefully, this review can provide reference for analyzing of the regulation mechanism of plant resistance and pathogen management.

**Keywords:** plant; ubiquitination; pathogen; associated molecular pattern; innate immunity

泛素化作为一种重要的蛋白质翻译后修饰, 广泛参与调控植物体内多种生理生化反应, 如激素合成、囊泡运输、细胞死亡、先天免疫反应等, 其中人们越来越关注泛素化参与调控植物先天免疫反应。植物先天免疫反应系统主要由病原物相关分子模式激发的免疫反应(PAMP – triggered immunity, PTI)与效应因子激发的免疫反应(effector – triggered immu-

nity, ETI)组成。植物模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR)识别病原微生物表面保守的病原物相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)后引起PTI反应。许多研究显示, 泛素化在PRR介导的PTI反应中发挥着重要的作用。本文主要综述了泛素化在植物PTI反应中的作用及其作用分子机制, 以为进一步阐明植物先天反应机

收稿日期: 2017-04-08

作者简介: 雷苏炜(1991-), 女, 硕士研究生, Email: leisuiwei@sina.com。\* 通信作者: 戴良英, 教授, 主要研究方向: 植物与微生物分子互作, Email: daily@hunau.net。

基金项目: 国家自然科学基金(31300250); 湖南省自然科学基金(2016JJ3071); 湖南省教育厅项目(62021000032, (G)SCX1622)。

制提供参考。

## 1 泛素化调控由鞭毛蛋白引起的 PTI 反应

flg22 是细菌鞭毛蛋白(flagellin)的 N 端中由 22 个氨基酸残基组成的肽段。该肽段被鞭毛蛋白在植物体内对应的 PRR 蛋白 FLS2 识别后作为激发子引起植物的 PTI 反应<sup>[1]</sup>。研究显示,有多个具有 E3 泛素连接酶活性的 U-box 蛋白参与调控由 flg22 激发的 PTI 反应。拟南芥 U-box 蛋白 PUB12 与 PUB13 都具有 E3 泛素连接酶活性,二者在 flg22 的诱导下可分别与 FLS2 结合,随后泛素化 FLS2 并促进其降解<sup>[2]</sup>。Lu 等人对野生型、pub12、pub13 叶片处理 flg22 后,发现相比于野生型植株,上述 2 个突变体植株体内活性氧的产生增加 2~3 倍,胼胝质积累明显增加,免疫反应相关基因(如 WRKY30、AP2、FRK1)的转录水平明显升高<sup>[2]</sup>。PUB12 和 PUB13 分别与 FLS2 形成蛋白复合体依赖类受体激酶 BAK1,且 BAK1 可磷酸化 PUB12 和 PUB13<sup>[2]</sup>。因此,BAK1 磷酸化 PUB12 和 PUB13,进而引起 PUB12 和 PUB13 泛素化 FLS2 以促进其泛素-26S 蛋白酶体途径的降解,这一信号传导最终导致 PUB12 和 PUB13 负调控鞭毛蛋白引起的植物 PTI 反应<sup>[3]</sup>。

拟南芥 U-box 蛋白 PUB22/PUB23/PUB24 也分别具有 E3 泛素连接酶活性,三者功能冗余且负调控 flg22 诱导的 PTI 反应<sup>[4]</sup>。flg22 介导的 PTI 反应和植物抵抗不同病原物需要囊泡运输途径中的胞吐复合体 Exo70B2<sup>[5]</sup>。拟南芥细胞通过感知 flg22 诱导受体 FLS2 后可稳定 PUB22 蛋白的活性,并通过 26S 蛋白酶体促进 PUB22 介导 Exo70B2 的泛素化及其降解,进而抑制 flg22 介导的 PTI 反应<sup>[5]</sup>。最新研究表明,水稻中具有 E3 泛素连接酶活性的 U-box 蛋白 SPL11 与 Rho 型 GTP 酶激活蛋白 SPIN6 产生蛋白-蛋白互作并体外泛素化 SPIN6,以促进其泛素-26S 蛋白酶体途径的降解<sup>[6]</sup>。在对野生型与 Spin6-RNAi 植株处理 flg22 后,Spin6-RNAi 植株体内活性氧的产生比野生型增加 2~4 倍,茉莉酸(JA)介导抗病途径的应答基因 PBZ1 的表达量相比于野生型在 1 h 后明显升高<sup>[6]</sup>。因此,SPL11 通过泛素化降解 SPIN6 调控水稻对鞭毛蛋白引起的 PTI 反应,且该反应可能通过 JA 信号通路传导<sup>[6]</sup>。类似地,具有 E3 泛素连接酶活性的拟南芥 U-box 蛋白 PUB20/PUB21 及其在番茄中的同源基因、拟南芥 RHA2a 蛋白、马铃薯 StPUB17 蛋白以及烟草 NtPUB17 蛋白等均被证实参与鞭毛蛋白等 PAMP 激

发的 PTI 反应<sup>[7~10]</sup>。

## 2 泛素化调控由几丁质引起的 PTI 反应

几丁质是病原真菌上一种典型的 PAMP 分子,同样能引起植物的 PTI 反应。有研究表明,编码 E3 泛素连接酶的 ATL(*Arabidopsis toxicosen levadura*) 基因家族参与植物的先天免疫反应,部分 ATL 基因能被几丁质等 PAMPs 诱导,如 ATL2、ATL6、ATL9、EL5 等<sup>[11~13]</sup>。Berrocal-Lobo 等<sup>[12]</sup>对 ATL9 基因表达模式进行分析,发现其表达量越高,拟南芥防御白粉菌(*Golovinomyces cichoracearum*)的抗性越强。几丁质处理拟南芥后,atl9 突变体对几丁质诱导的免疫反应比野生型明显减弱,如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生、抗病相关基因的转录水平,因此 ATL9 参与拟南芥体内的 PTI 反应以及增强对白粉菌的抗性。此外,水稻 OsUBC5b 蛋白与 ATL 家族 EL5 蛋白共同完成泛素化过程,其中二者分别作为 E2 泛素结合酶与 E3 泛素连接酶,都能被几丁质明显诱导,说明它们很有可能一起参与几丁质诱导的植物 PTI 反应<sup>[14,15]</sup>。

拟南芥中含 LysM 功能结构域的一类受体激酶 LYK5 可以识别几丁质并引起 PTI 反应。研究表明,上面提及的 PUB13 与 LYK5 产生蛋白-蛋白互作并可在体外泛素化 LYK5<sup>[16]</sup>。pub12 突变体与 pub13 突变体对几丁质诱导的免疫反应比野生型明显增强,如活性氧的产生、MAP 激酶的磷酸化。而利用 MG132 处理拟南芥后,发现 LYK5 的蛋白丰度增加。因此,PUB13 通过泛素化 LYK5 以促进其泛素-26S 蛋白酶体途径的降解,从而导致 PUB13 负调控几丁质诱导的 PTI 反应<sup>[16]</sup>。此外,小 G 蛋白 OsRac1 参与由几丁质引起的 PTI 反应,而上面提及的 SPIN6 可使 OsRac1 失活并促进其水解以抑制 OsRac1 介导的先天免疫反应<sup>[6]</sup>。Liu 等人对水稻野生型植株、Spin6-RNAi 与 spin6 处理几丁质后发现,Spin6-RNAi 与 spin6 对几丁质诱导的 PTI 反应均比野生型增强,如活性氧的产生、PBZ1 以及水杨酸(SA)抗病途径的应答基因 PR1a、PAL 表达量的明显增加<sup>[6]</sup>。因此,SPL11 参与由几丁质介导的 PTI 反应可能同时通过 SA 与 JA 抗病途径以调节<sup>[6]</sup>。此外,上面提及的 PUB22/PUB23/PUB24 也参与调控几丁质引起的 PTI 反应<sup>[4]</sup>。

## 3 病原微生物分泌的效应因子通过泛素化过程抑制 PTI 反应

为了抵抗植物产生的免疫反应,病原微生物会释

放各种毒性因子至植物体内干扰植物的免疫应答。细菌的某些Ⅲ型效应因子具有 E3 泛素连接酶活性,可以直接泛素化 PRRs 或其他宿主蛋白以抑制植物的 PTI 反应。AvrPtoB 是植物病原细菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tamato* 的Ⅲ型效应因子,其 C 端因在结构上与 RING/U-box 结构域同源而具有 E3 泛素连接酶活性<sup>[17]</sup>。有研究显示,AvrPtoB 能够泛素化鞭毛蛋白受体 FLS2 和几丁质受体 CERK1;AvrPtoB 的 N 端结构域可以与 FLS2 及 BAK1 产生蛋白-蛋白互作,并泛素化 FLS2 的激酶结构域,从而抑制鞭毛蛋白引起的 PTI 反应<sup>[18]</sup>;AvrPtoB 泛素化 CERK1 的激酶结构域,并促进 CERK1 体内降解从而抑制植株 PTI 的产生<sup>[19]</sup>。类似地,XopL 是病原细菌 *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* 的Ⅲ型效应因子,其 C 端也具有 E3 泛素连接酶活性<sup>[20]</sup>。XopL 依靠其泛素连接酶活性促进细胞死亡,其 N 端 LRR 结构域抑制宿主植物体内的 PTI 反应,但是目前 XopL 作用的宿主靶标并不清楚<sup>[20]</sup>。

病原体释放的效应因子中还有一些可以与宿主的泛素连接酶直接作用以抑制植物的 PTI 反应。例如,马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)释放的效应因子 Avr3a,通过与宿主体内 U-box 型 E3 泛素连接酶 CMPG1 产生蛋白-蛋白互作,稳定 CMPG1 的活性,阻止其自泛素化,从而抑制 PAMP INF1 引发的植物 PTI 反应<sup>[21]</sup>。水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)分泌的效应蛋白 XopP<sub>Xoo</sub> 可以将水稻体内的 U-box 蛋白 OsPUB44 作为靶标蛋白,同时抑制 OsPUB44 的 E3 泛素连接酶活性,而 OsPUB44 作为一个正调控因子参与肽聚糖(peptidoglycan, PGN)和几丁质等 PAMP 诱导的水稻 PTI 反应<sup>[22]</sup>。因此,XopP<sub>Xoo</sub> 可能通过与 OsPUB44 蛋白互作并抑制其活性以降低水稻体内的 PTI 反应以及对白叶枯病菌的抗性<sup>[22]</sup>。此外,宿主体内的 E3 泛素连接酶可以通过泛素化降解病原体释放的效应因子以增强植物的 PTI 反应。水稻中具有 E3 泛素连接酶活性的 AP<sub>IP6</sub> 蛋白,可以与稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)的效应因子 AvePiz-t 产生蛋白-蛋白互作,并且泛素化 AvePiz-t 以促进其体内的降解<sup>[23]</sup>。研究发现,在 AvePiz-t 超表达水稻植株中敲除 AP<sub>IP6</sub> 后,对鞭毛蛋白诱导的反应比没有敲除 AP<sub>IP6</sub> 的超表达植株明显降低,如该植株体内活性氧的含量降低约 60%、免疫反应相关基因 NAC4 的转录水平明显降低<sup>[23]</sup>。因此,AP<sub>IP6</sub> 通过泛素化降解 AvePiz-t 以增强水稻体内的 PTI 反

应以及减弱对稻瘟病的抗性<sup>[23]</sup>。

## 4 展望

近年来,人们对泛素化和植物先天免疫反应的研究越来越深入,但泛素化在植物先天免疫反应的相关重要组成部分 PTI 反应中所起到的调控作用机制有待研究。尽管已经有许多研究结果表明泛素化参与调控植物的 PTI 反应,但不同种类的泛素化(如多聚泛素化、多泛素化以及单泛素化)在植物先天免疫反应中的作用机制差别仍有待进一步研究。E3 泛素连接酶广泛参与调控植物先天免疫反应特别是 PTI 反应,但是它们调控植物先天免疫反应的大多数靶标蛋白目前仍然不清楚。通过对植物进行各种体内外泛素化水平试验,并与定量蛋白质组学相关原理结合,可能有助于发现在泛素化介导的植物 PTI 反应中新的靶标蛋白,从而进一步揭示泛素化参与植物免疫反应的新机制,为植物病原菌的防治提供参考。

## 参考文献:

- [1] Hao GX, Pitino M, Ding F, et al. Induction of innate immune responses by flagellin from the intracellular bacterium, "Candidatus Liberibacter solanacearum" [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 211-223.
- [2] Lu DP, Lin WW, Gao XQ, et al. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity [J]. Science, 2011, 332: 1439-1442.
- [3] 戴树元, 李魏, 任佐华, 等. 植物 U-box 蛋白在植物先天免疫反应中的作用及其研究进展 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(14): 56-61.
- [4] Zhou JG, Lu DP, Xu GY, et al. The dominant negative ARM domain uncovers multiple functions of PUB13 in *Arabidopsis* immunity, flowering, and senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(11): 3353-3366.
- [5] Stegmann M, Anderson RG, Ichimura K, et al. The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2012, 24(11): 4703-4716.
- [6] Liu JL, Park CH, He F, et al. The RhoGAP SPIN6 associates with SPL11 and OsRac1 and negatively regulates programmed cell death and innate immunity in rice [J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(2): e1004629.
- [7] Kobayashi S, Tsugama D, Liu SK, et al. A U-box E3 ubiquitin ligase, PUB20, interactions with the *Arabidopsis* G-Protein  $\beta$  subunit, AGB1 [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49207.

- [8] 景晓辉. 野油菜黄单胞菌效应蛋白 XopD<sub>xcc8004</sub> 与 NAC 转录因子 ATAF2 互作干扰寄主植物的免疫反应 [D]. 海口:海南大学博士学位论文,2014.
- [9] González - Lamothe R, Tsitsigiannis DI, Ludwig AA, et al. The U - box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(4):1067 - 1083.
- [10] He Q, McLellan H, Boevink PC, et al. U - box E3 ubiquitin ligase PUB17 acts in the nucleus to promote specific immune pathways triggered by *Phytophthora infestans* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(11):3189 - 3199.
- [11] Guzmán P. The prolific ATL family of RING - H2 ubiquitin ligases [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(8):1014 - 1021.
- [12] Berrocal - Lobo M, Stone S, Yang X, et al. ATL9, a RING zinc finger protein with E3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin - and NADPH oxidase - mediated defense responses [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e14426.
- [13] E ZG, Zhang YP, Li TT, et al. Characterization of the ubiquitin - conjugating enzyme gene family in rice and evaluation of expression profiles under abiotic stresses and hormone treatments [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0122621.
- [14] Takai R, Hasegawa K, Kaku H, et al. Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from *Arabidopsis*, in response to N - acetylchitoooligosaccharide elicitor [J]. *Plant Science*, 2001, 160(4):577 - 583.
- [15] Takai R, Matsuda N, Nakano A, et al. EL5, a rice N - acetylchitoooligosaccharide elicitor - responsive RING - H2 finger protein, is a ubiquitin ligase which functions in vitro in co - operation with an elicitor - responsive ubiquitin - conjugating enzyme, OsUBC5b [J]. *The Plant Journal*, 2002, 30(4):447 - 455.
- [16] Liao DH, Cao YR, Sun X, et al. *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase PLANT U - BOX13 (PUB13) regulates chitin receptor LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) protein abundance [J]. *New Phytologist*, 2017, doi:10.1111/nph.14472.
- [17] Zhou BJ, Mural RV, Chen XY, et al. A subset of ubiquitin - conjugating enzymes is essential for plant immunity [J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(2):1371 - 1390.
- [18] Mathieu J, Schwizer S, Martin GB. Pto kinase binds two domains of AvrPtoB and its proximity to the effector E3 ligase determines if it evades degradation and activates plant immunity [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(7):e1004227.
- [19] Zeng LR, Velásquez AC, Munkvold KR, et al. A tomato LysM receptor - like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB [J]. *The Plant Journal*, for *Cell and Molecular Biology*, 2012, 69(1):92 - 103.
- [20] Singer AU, Schulze S, Skarina T, et al. A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(1):e1003121.
- [21] Chaparro - Garcia A, Schwizer S, Sklenar J, et al. *Phytophthora infestans* RXLR - WY effector AVR3a associates with dynamin - related protein 2 required for endocytosis of the plant pattern recognition receptor FLS2 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0137071.
- [22] Ishikawa K, Yamaguchi K, Sakamoto K, et al. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP - triggered immunity in rice [J]. *Nature Communications*, 2014, 5:doi:10.1038/ncomms6430.
- [23] Park CH, Chen SB, Shirsekar G, et al. The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz - t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen - associated molecular pattern - triggered immunity in rice [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(11):4748 - 4762.
- (上接第 458 页)
- [57] 黄凤宽, 黄所生, 吴碧球, 等. 抗褐飞虱兼抗白背飞虱水稻种质资源发掘 [J]. *植物保护*, 2012, 38(4):152 - 155.
- [58] 陶林勇. 若干中晚稻品种的稻飞虱抗性鉴定及其丰产性评价 [J]. *浙江农业科学*, 1990(4):180 - 183.
- [59] 李容柏, 秦学毅, 韦素美. 普通野生稻稻褐飞虱抗性在水稻改良中的利用研究 [J]. *广西农业生物科学*, 2003, 22(2):75 - 83.
- [60] 赵鹏, 冯冉冉, 肖巧珍, 等. 聚合抗褐飞虱基因 *Bph20(t)* 和 *Bph21(t)* 及抗稻瘟病基因 *Pi9* 水稻株系筛选 [J]. *南方农业学报*, 2013, 44(6):885 - 892.
- [61] 胡巍, 李艳芳, 胡侃, 等. 分子标记辅助选择抗褐飞虱基因改良桂农占的 BPH 抗性 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(5):951 - 960.
- [62] 闫成业, Mamadou Gandeka, 朱子建, 等. 分子标记辅助选择改良水稻恢复系 R1005 的褐飞虱抗性 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(5):8 - 14.
- [63] 刘开雨, 卢双楠, 裘俊丽, 等. 培育水稻恢复系抗褐飞虱基因导入系和聚合系 [J]. *分子植物育种*, 2011, 9(4):410 - 417.
- [64] 楼珏, 杨文清, 李仲惺, 等. 聚合稻瘟病、白叶枯病和褐飞虱抗性基因的三系恢复系改良效果的评价 [J]. *作物学报*, 2016, 42(1):31 - 42.