

叶绿体的形成、降解和逆行信号调控

王 姍 遗传学 2017202040053

杂交水稻国家重点实验室，武汉大学生命科学学院，武汉 430072

摘要：叶绿体是活跃的代谢中心，通过光合作用和氧气释放将太阳能转化为碳水化合物，从而维持地球上的生命。本文是叶绿体形成、降解和逆行信号的一个简述综述。

关键词：叶绿体；形成；降解；逆行信号

Abstract: Chloroplasts are active metabolic centers that sustain life on earth by converting solar energy to carbohydrates through the process of photosynthesis and oxygen release. This article is a brief overview of chloroplast biogenesis, degradation and retrograde signaling.

Key words: chloroplast; biogenesis; degradation; retrograde signaling

叶绿体的形成是比预期更复杂的挑战，现在已经确定了这个流程网络中的许多不同方面，有可能回答相关研究中长期存在的问题。由于叶绿体的发育需要细胞器之间复杂的相互作用，环境信号的感觉机制，并受到其他发育阶段的影响，因此需要综合策略。两个众所周知的叶绿体蛋白降解途径是通过自噬和衰老相关的液泡。Wang 等描述了第三个途径，被衰老和非生物胁迫诱导的拟南芥 CV (Chloroplast Vesiculation, 叶绿体囊泡) 表达激活。逆行信号通常是指从细胞器到细胞核的通信。这种现象在近四十年前首先被观察到，当时 Bradbeer 等人发现质体蛋白质合成的抑制扰乱了细胞质蛋白质合成的核编码基因。在随后的几十年中，特别是在过去几年中，在鉴定与形成质体（生物信号）有关的信号组分和途径以及响应环境刺激（操作信号）而改变质体稳态方面已经取得了巨大进展。

1 叶绿体的形成

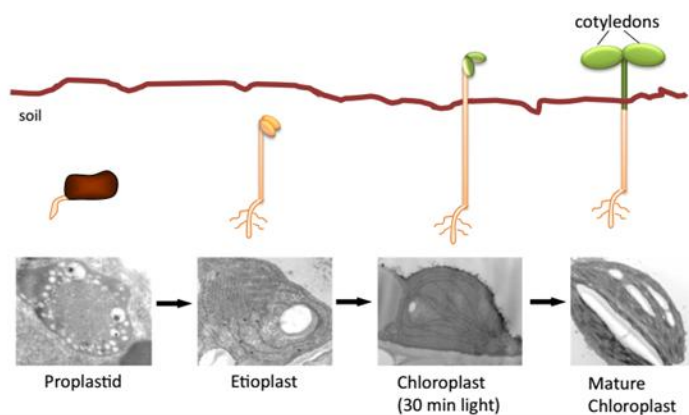


图 1 双子叶植物幼苗（以地栖幼苗为例）发芽过程中叶绿体形成和发育

Fig. 1 Chloroplast biogenesis and development in dicotyledonous seedlings alongside germination. Here illustrating epigeaic seedlings

叶绿体形成的过程高度复杂，且其分子机制的纷繁复杂之处尚未完全表征。一般认为叶绿体来自于包含有囊泡但没有分化结构的未完全发育的前质体。在这种分化过程中，类囊体堆叠成特定的基粒类囊体是与蛋白质复合体交织的内部脂质膜，为光合作用的光反应提供平台，因此可以认为是叶绿体中最重要的结构之一。在特定情况下，黑暗介导的黄色体由前质体发育而来。此外，在一些案例中，叶绿体也可以由其他质体比如有色体发育而来。

同时，单子叶植物和双子叶植物的叶绿体发育呈现出越来越明显的差异。在单子叶植物中，叶绿体的发育过程可以从叶片方向观察到梯度变化（图 2）。遗传研究还揭示叶绿体的形成在叶片的正面与背面及对应的叶中脉与叶片其余部分之间存在差异调节。例如，一方面，在一个水稻突变体 *chr4* 中，含有染色质重塑因子病变，由于在叶片正面的细胞中选择性下调叶绿体发育基因，只有叶的正面表现出白化表型；另一方面，水稻白化的叶绿体钾外转运蛋白突变 *midrib1* (*am1*)，幼叶中显示斑叶表型，老叶局限于叶片中脉浅表型。

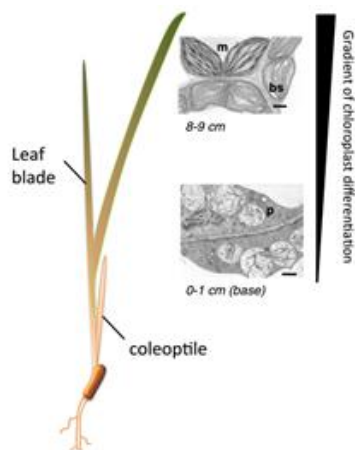


图 2 单子叶植物（示例为玉米）幼苗的叶绿体形成和发育

Fig. 2 Chloroplast biogenesis and development in monocotyledonous seedlings. Example shown for a maize plant.

p: 前质体 m: 叶肉细胞 bs: 维管束鞘细胞

在双子叶植物中，叶绿体的发育在植物的发育阶段，不同器官和组织之间是不同的，它不像在单子叶植物中那样，沿着叶片有可观察的梯度因此考虑双子叶植物叶绿体发育时，必须考虑到的是不同类型的植物其幼苗发育是不同的，比如地面植物和地下植物。

另外，与子叶相比，真叶中的叶绿体发育主要发生在茎尖分生组织（SAM，shoot apical meristem）和叶原基，随后的增殖是通过叶绿体分裂而不是从头组装。最近关于 SAM 中叶绿体发育的详细研究，使用了叶绿体结构和叶绿体内基本光合蛋白的存在来分析 SAM 的不同细胞层，即 L1、L2 和 L3 以及叶原基（LP），以解开这些细胞内叶绿体的分化过程。作者在 L1 层、LP 和大部分 L3 层观察到质体含有发育的类囊体网络以及光合活性蛋白质（图 3）。相反，在 L2 层的中心区，只能观察到类似丙酮的结构，没有光合活性。

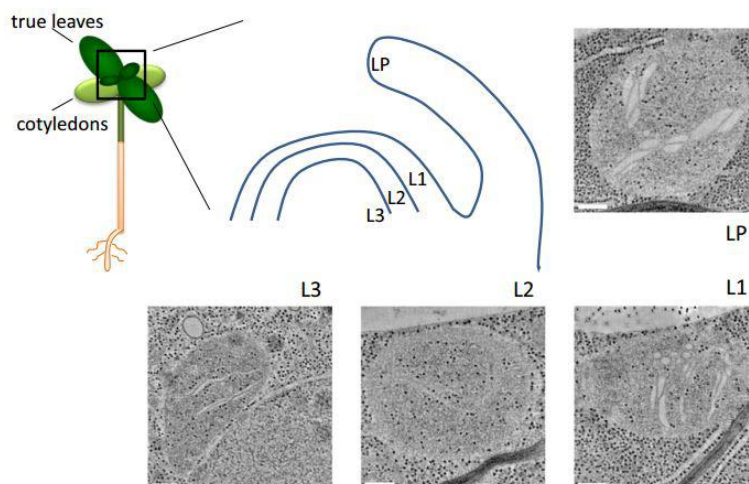


图3 叶尖分生组织中的叶绿体发育

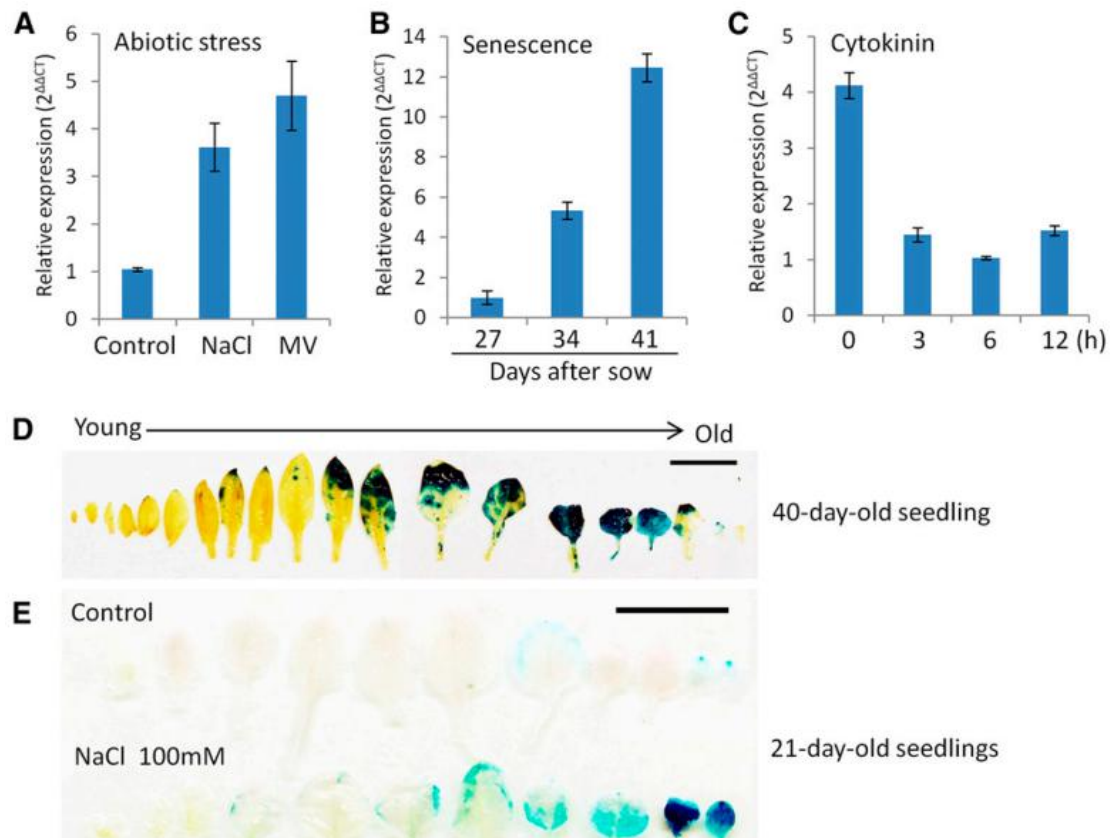
Fig. 3 Chloroplast development in the shoot apical meristem

2 叶绿体的降解

2.1 *CV* 表达被非生物胁迫和衰老激活，而被细胞因子所抑制

拟南芥基因组含有基因 *At2g25625*，研究中克隆了该基因并命名为 *CV*，尽管该基因的表达在年轻的组织中很少检测到，但研究发现其表达在广泛的叶绿体降解过程中被非生物胁迫和衰老显著诱导。如定量 RT-PCR 所示，*CV* 表达被衰老和非生物胁迫如盐胁迫（实验中用 NaCl）和甲基紫精（MV）诱导的氧化应激所激活。通过用细胞分裂素（延迟衰老的植物激素）处理 3 小时，*CV* 表达显著下调（图 4C）。

为研究 *CV* 的组织特异性表达，研究者克隆了其天然启动子，起始密码子上游的 2-kb 区域，并用它来驱动报告基因 β -葡萄糖苷酸酶基因 *GUS*。转基因 Pro*CV*-*GUS* 植物的 *GUS* 染色测定表明，*CV* 在衰老和成熟叶中强表达，而在 40d 植物的幼叶中不表达（图 4D），在 21d 龄幼苗的叶片中，*CV* 表达几乎检测不到，但其表达通过盐胁迫处理显著增强（图 4E）。

图4 非生物胁迫和衰老诱导的 *CV* 表达Fig.4 *CV* Expression Is Induced by Senescence and Abiotic Stress

2.2 *CV* 以叶绿体为靶标诱导叶绿体中囊泡的形成

预测 *CV* 使用 ChloroP 1.1 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 在 N 端包含叶绿体转运信号肽。为了评估 *CV* 亚细胞定位，将增强型绿色荧光蛋白 (GFP) 融合到 *CV* 的 C 末端。融合基因 *CV*-GFP 在组成性表达基质靶向的 *DsRed* (CT-*DsRed*) 的拟南芥植物的子叶中瞬时表达。共聚焦显微镜观察表明，*CV*-GFP 在叶绿体中定位，并集中在一些囊泡样斑点 (图 5A)，且单独的 GFP 表达产生与叶绿体不相关的绿色荧光信号 (图 5B)。通过使用针对 GFP 的抗体进行免疫标记来进一步评估 *CV* 的叶绿体定位 (图 5C 到 E)。

2.3 *CCVs* 通过一个独立于自噬和 *SAVs* (senescence-associated vacuoles) 的途径调运至液泡

使用地塞米松 (DEX) 诱导的启动子在转基因植物中表达 CV-GFP (DEX-CV-GFP)。用 DEX 处理稳定转化的植物, 并监测 GFP 荧光。在 DEX 处理 6 小时后, 发现 CV-GFP 装饰从叶绿体延伸的叶肉细胞叶绿体和小球 (基质填充小管) (图 6B)。在 DEX 处理 18 小时后, CCVs (CV-containing vesicles) 间隔靶向的 CT-DsRed (图 6C) 一起从叶绿体中移出。在子叶 (图 6C) 和下胚轴 (图 6E) 细胞中 DEX 诱导的 CV-GFP 表达中观察到类似的结果; CCVs 也能携带 CT-DsRed 从叶绿体中聚集到真叶叶肉细胞的细胞质中。

为排除在内质网产生 CCVs 的可能性, 将 DEX-CV-GFP 转基因植物用 DEX 处理 17 小时, 并使用细胞内囊泡运输抑制剂刀豆霉素 A (concanamycin A) 再处理 1 h。CCVs 似乎在处理后附着于叶绿体 (图 6D), 表明刀豆霉素 A 处理抑制了叶绿体中 CCVs 的释放。为了评估 CCV 是否最终转运至液泡, 将 CV-GFP 瞬时表达在含有 Rab2a-RFP (定位液泡隔间) 和 VAMP711-RFP (定位液泡膜)。定位结果显示, CV-GFP 在瞬时表达后 3 天与下胚轴细胞中的 RabF2a-RFP 和 VAMP711-RFP 重叠 (图 6E 和 6F), 支持将 CCVs 移动到中央液泡。

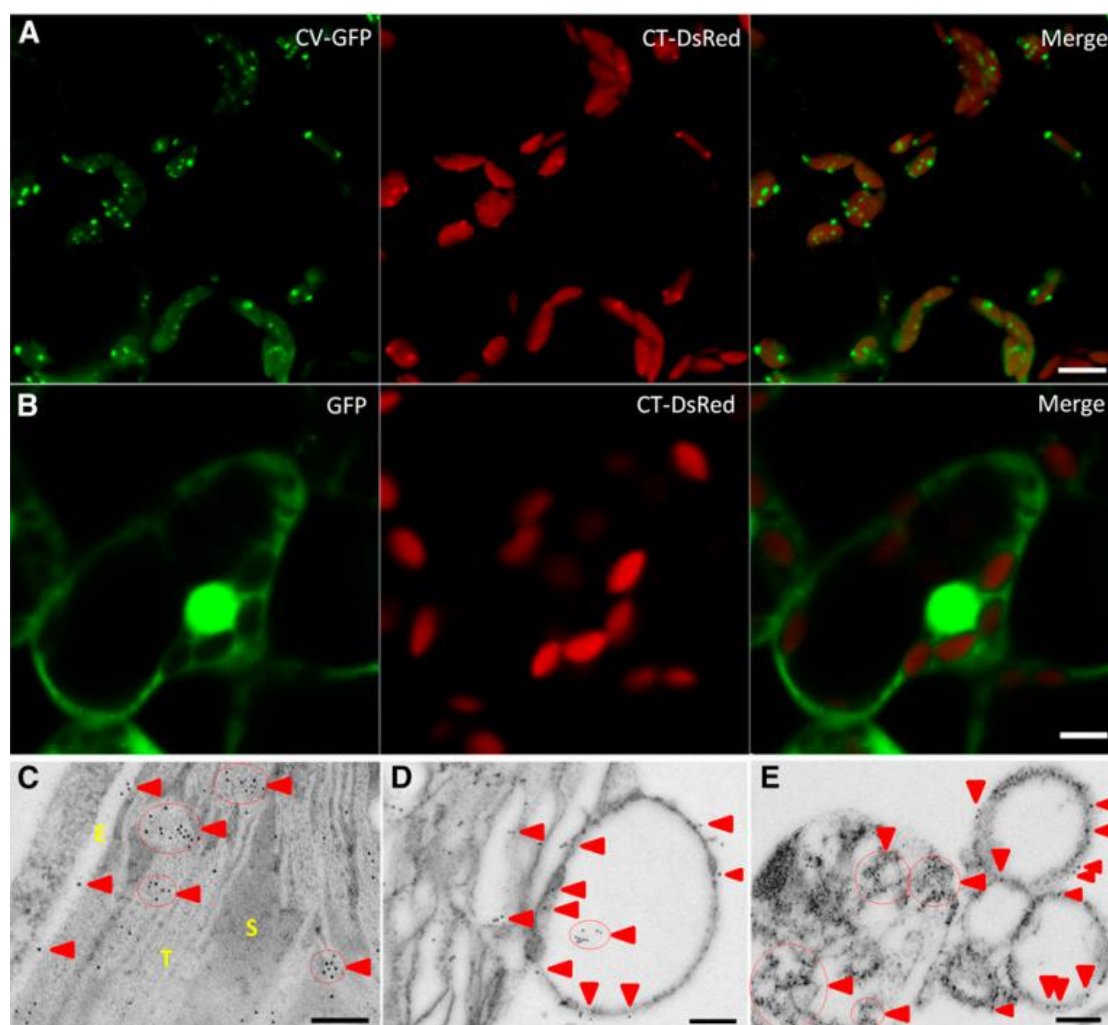


图 5 CV诱导的囊泡从叶绿体释放出来

Fig.5 CV-Induced Vesicles Are Released from Chloroplasts

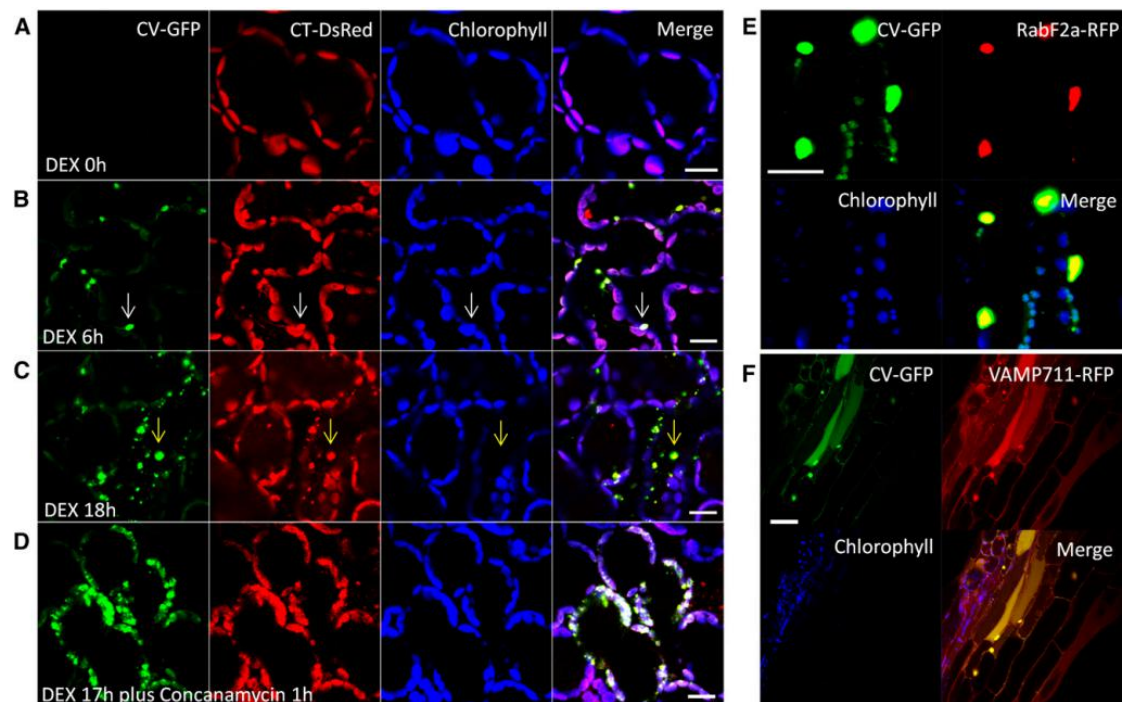


图 6 CV 运输至液泡

Fig.6 Transport of CV to the Vacuole

2.4 CV过表达导致叶绿体降解

CaMV35S 组成型启动子的控制下过表达 *CV* 没有成功，表明高 *CV* 表达是致命的。作为替代方法，我们使用化学诱导表达系统来驱动 *CV-HA* 的表达。三个独立稳定株系 DEX-1, DEX-2 和 DEX-3 (图 7A) 的表型分析显示，DEX 诱导的 *CV* 表达导致叶片萎黄和整体生长迟缓 (图 7B)。在 DEX 处理后，与未处理的转基因植物和野生型植物相比叶片叶绿素含量降低 (图 7C)。在 DEX 处理的植物中的免疫印迹分析揭示了光系统 I (PSI) 复合亚基 PsaB, PSII 亚基 (11 和 D1) 和基质蛋白谷氨酰胺合酶 2 (GS2) 的降解。细胞质蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 的水平在 DEX 处理后保持不变 (图 7D)，而胞质谷氨酰胺合酶 1 (GS1) 的丰度增加，这与以前的研究显示在衰老过程中 GS1 表达的上调一致。通过将植物暴露于 0.3mM MV 实施的氧化胁迫，增强了表达 *CV* 的转基因植物中胁迫诱导的叶绿体降解 (图 7B 和 7C)。这些结果表明，*CV* 的过表达导致早衰和叶绿体降解。

2.5 CV沉默导致叶绿体延迟降解

使用 WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) 设计了一种靶向 *CV* 的人工微 RNA (amiR-CV)，并且其表达由 CaMV355S 启动子驱动。选择三个独立的转基因品系 (amiR-CV 1-3)，通过定量 RT-PCR 检测 *CV* 沉默 (图 8A)。然而，当野生型和 amiR-CV 植物的 20 日龄幼苗用增加的 NaCl 浓度处理时 (图 8C)，野生型植物表现出严重的叶衰老症状，而 amiR-CV 植物保持绿色 (图 8B)。处理期间野生型叶片中的叶绿素含量降低，而 *CV* 沉默植物中盐胁迫诱导的叶片衰老延迟 (图 8C)。PSI 亚基 (PsaB)，PSII 亚基 (D1, PsbO1 和 Lhcb2) 的降解，并且在盐处理 10 天后野生型植物中的基质蛋白 GS2 是明显的 (图 8D)。这些结果表明沉默 *CV* 抑制了盐胁迫诱导的叶绿体蛋白降解。另外，后续研究还发现由 MV 引起的氧化应激引起的叶绿体降解也在 amiR-CV 系中延迟。而且，经过 14 天的干旱处理后，它们的存活率显著增加。这些结果表明，沉默 *CV* 增加叶绿体的稳定性，并防止非

生物胁迫诱导的衰老。

2.6 小结

两个众所周知的叶绿体蛋白降解途径是通过自噬和衰老相关的液泡。Wang 等 2014 年描述了第三个途径，被衰老和非生物胁迫诱导的拟南芥 *CV* (Chloroplast Vesiculation, 叶绿体囊泡形成) 表达激活。靶向叶绿体后，*CV* 使叶绿体不稳定，诱导囊泡的形成。携带基质蛋白、包膜蛋白和类囊体膜蛋白的含有 *CV* 的囊泡从叶绿体中释放出来，并被移动到液泡中进行蛋白水解。*CV* 的过表达导致叶绿体退化和叶片衰老，而沉默 *CV* 延迟叶绿体更新和非生物胁迫诱导的衰老。转基因 *CV* 沉默植物显示对干旱、盐度和氧化应激的耐受性增强。免疫沉淀和双分子荧光互补测定表明，*CV* 通过在植物界高度保守的 C-末端结构域与体内的光系统 II 亚基 PsbO1 相互作用。总的来说，研究工作表明 *CV* 在胁迫诱导的叶绿体破裂中起关键作用，并介导叶绿体降解的第三个途径。从生物技术的角度来看，*CV* 的沉默为产生对非生物胁迫耐受性增强的转基因作物提供了合适的策略。

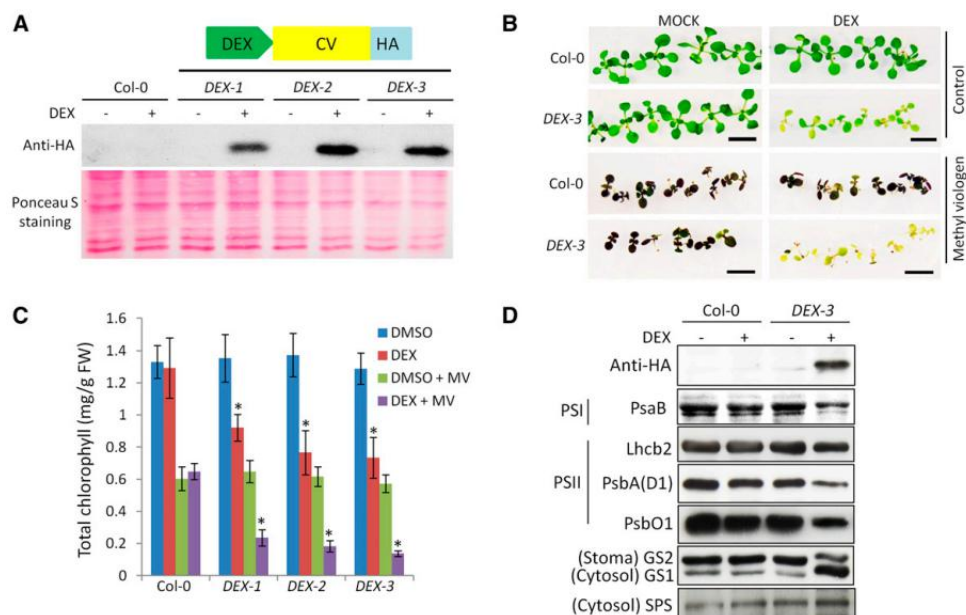


图7 *CV* 过表达导致叶绿体降解

Fig.7 Overexpression of *CV* Resulted in Chloroplast Degradation

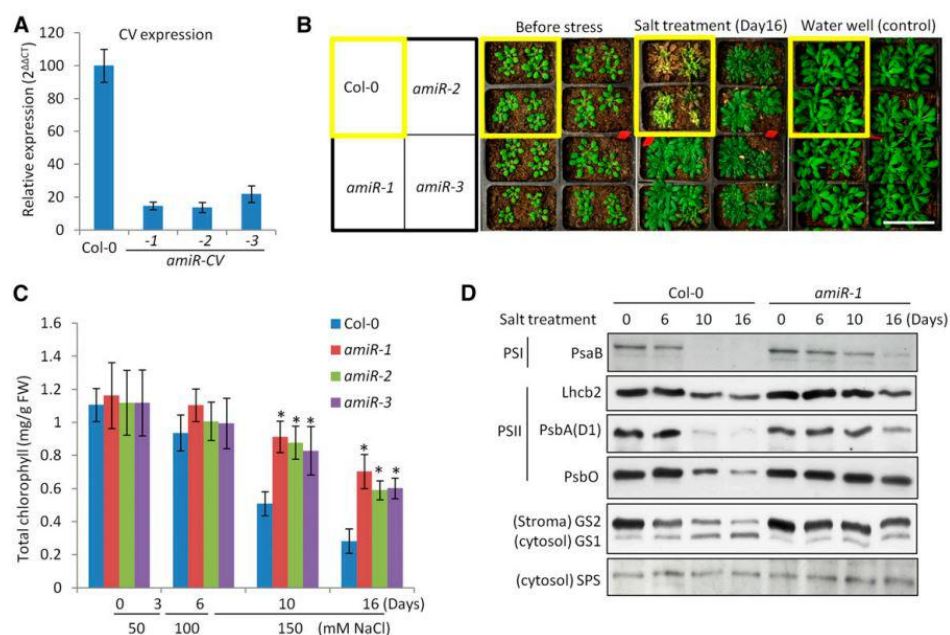


图8 人工 microRNA 沉默 *CV* 导致盐胁迫诱导的叶绿体降解延迟

Fig.8 Artificial MicroRNA Silencing of *CV* Delayed Salt Stress-Induced Chloroplast Degradation

3 叶绿体的逆行信号调控

3.1 逆行信号：植物生命过程中的一个连续的过程

叶绿体可以作为环境传感器，在生物发生和操作过程中与细胞进行交流，以改变成千上万种蛋白质的表达。这个过程称为逆行信号，调节表达以响应影响光合作用和产量的发育线索和压力。图9和表1总结了逆行信号的状况。在过去十年取得了实质性的进展。在2005年，图9中所示的40多个组件中仅有4个已知参与逆行信号。

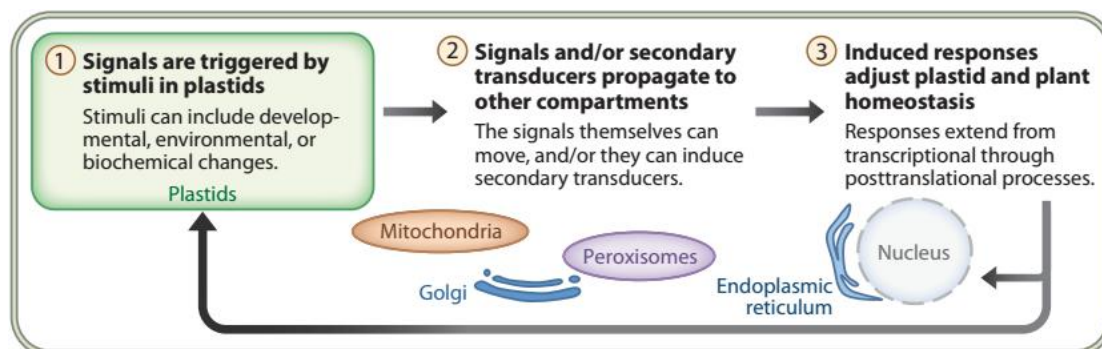


图9 逆行信号

Fig.9 retrograde signaling

提出的逆行信号的定义包括三个阶段：①响应于在生物发生期间（例如，蛋白质化学计量的变化）或在环境扰动之后感知为质体稳态的变化的刺激产生一个或多个信号；②信号或信号直接或通过转导传播到其他亚细胞区室，如细胞溶质和细胞核；③尽管有越来越多的例外 - 转录通过翻译后反应 - 主要由核介导 - 或者直接靶向叶绿体来调节体内平衡或可以涉及其他亚细胞区室，只要最终结果有利于质体或整体植物功能。

表 1 质体与核逆向交流活跃的已知生物过程的总结

Table 1 Summary of known biological processes in which plastid-to-nucleus retrograde communication is active

Purpose of communication	Organelle	Process/stimulus	Retrograde pathway/components	Nuclear, cellular, or physiological response, with example target genes	Reference(s)
Biogenesis	Chloroplast	Photosystem assembly and maintenance	Heme, tetrapyrroles	Photosynthesis-associated nuclear genes (PhANG) regulation (<i>LHcb</i> , <i>CAB</i>) PEP and NEP	133, 157
			GUN1-PTM-ABI4		68, 136
			PRIN2-PEP		65
			GLK		55, 155
Operation	Chloroplast	PSII overexcitation ($^1\text{O}_2$)	β -Cyclocitral	Programmed cell death (<i>AAA-ATPase</i>)	107, 108
			EX1, EX2	Singlet oxygen-responsive genes (SORG) regulation (<i>GSTU13</i> , <i>AAA-ATPase</i>)	72
		PQ redox state	SAL1-PAP	Plastid redox-associated nuclear genes (PRANG) regulation (<i>APX2</i> , <i>ZAT10</i> , <i>ERF</i>)	26
			DHAP-TPT-MPK6		151
		PSI overexcitation (H_2O_2 , O_2^-)	STN7	8	
			Plastid redox state ^a	PRIN2	PhANG regulation (<i>LHcb</i> , <i>CAB</i>)
		MEcPP		159	
		Hormonal crosstalk	Chloroplast	SA and biotic stress	MEcPP
Jasmonate synthesis and signaling	SAL1-PAP			JA accumulation (<i>LOX2</i> , <i>OPR3</i> , <i>AOC3</i>)	113
	β -Cyclocitral			Programmed cell death (<i>AAA-ATPase</i>)	108
ABA signaling	SAL1-PAP			Stomatal closure and PRANGs (<i>APX2</i>)	116
Development	Chloroplast	Shoot development	GUN1	Hypocotyl elongation	119, 137
			SAL1-PAP	Leaf morphology	59, 112
			Apocarotenoids		5
	Nongreen plastids	Fruit development		Chromoplast biogenesis	100

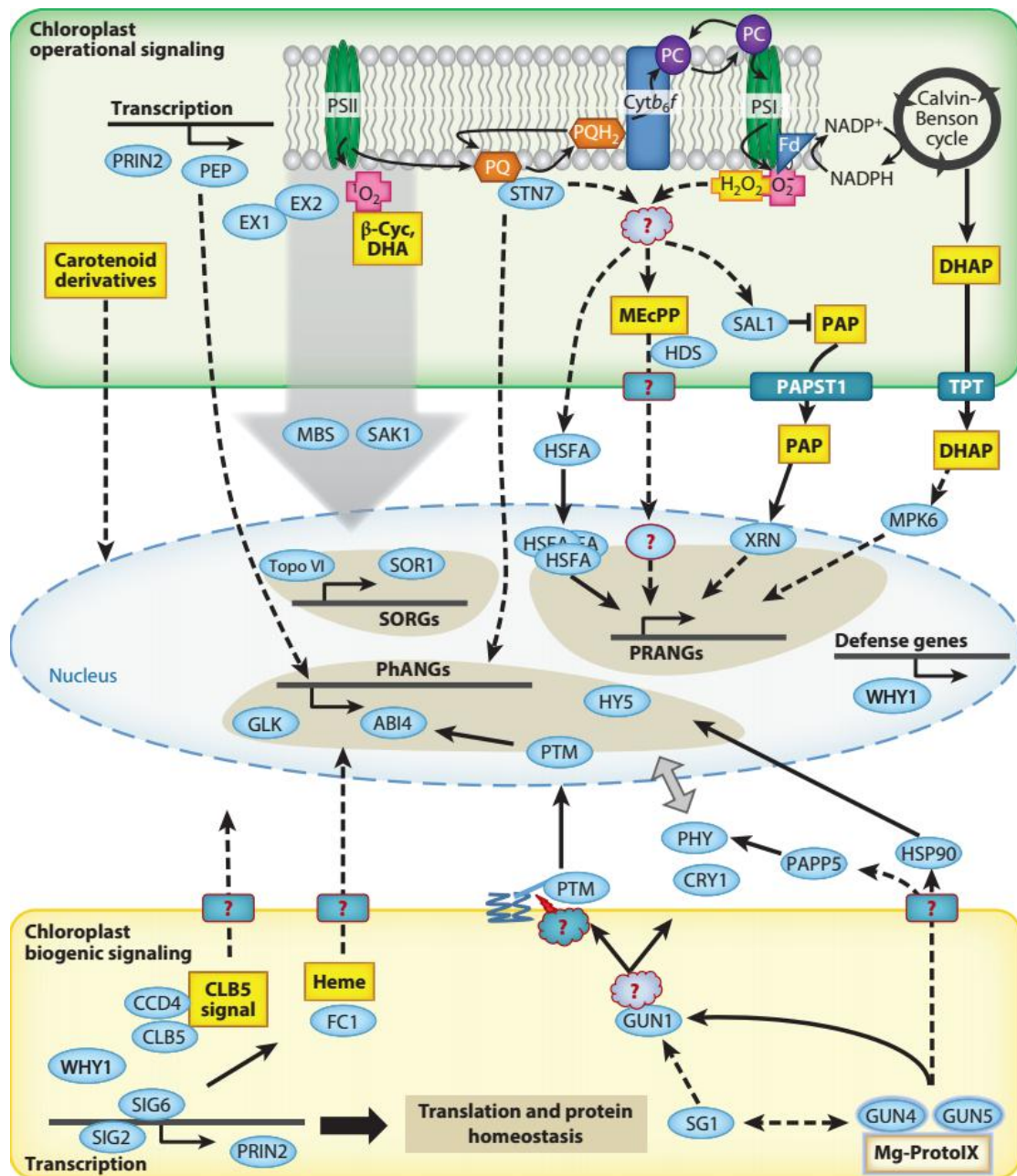


图 10 叶绿体的逆行信号

Fig.10 Chloroplast retrograde signaling

虚线和大阴影箭头表示已知通过尚未确定的机制或相互作用调节核基因的成分；实箭头表示相对更多的验证机制。黄色框表示逆行信号，蓝色椭圆形和矩形分别表示蛋白质和转运蛋白。

来自发育中的叶绿体（生物信号）和成熟叶绿体响应于环境扰动（操作信号）而发送的代谢物和蛋白质信号调节可以大致分类为：与光合蛋白复合体和功能相关的基因[光合相关核基因（PhANG）]，响应单线态氧由光系统 II [单基因氧响应基因（SORG）]产生，对质体氧化还原平衡[质体氧化还原相关核基因（PRANGs）]的一般或特定变化作出反应的那些。

3.2 逆行信号中的关键问题

(a) 质体中的信号起始，(b) 信号移动或转导，(c) 细胞溶质中的感知和/或转导到细胞核，以及 (d) 信号感知领先 到转录或转录后反应。对于本评价中确定和讨论的每一条途径，至少有四分之一的分类仍未得到解决（表 2）。我们将这些逆行信号的黑盒视为这一领

域的关键问题，以及关于不同信号的连通性和协调性，信号代谢调节，代谢物作为信号的性质以及叶绿体衍生信号的更广泛作用的总体问题 在植物功能。

表 2 涉及调节野生型植物中质体稳态的生物发生和操作信号转导途径中的质体、亚细胞转运、胞质和核组分的总结

Table 2 Summary of plastidic, subcellular transport, cytosolic, and nuclear components involved in biogenic and operational signaling pathways that modulate plastid homeostasis in wild-type plants

Pathway components	Plastidic components			Cytosolic components	Nuclear components
	Sensor	Other	Export		
GUN	?	GUN1, CHLH, GUN4 SG1, SIG2, SIG6	PTM protease	HY5, CRY1, PhyB	PTM, ABI4, GLK1, GLK2
Heme	?	FC1	?	?	?
$^1\text{O}_2$	β -Carotene	β -Cyclocitral, DHA	Volatile	MBS, SAK1	Topo VI complex, SOR1
Redox state and PSI ROS	?	EX1, EX2	?	?	?
	?	SAL1, PAP	PAPST	PAP	XRN2, XRN3
	?	HDS, MEcPP	?	?	?
	?	STN7, PRIN2, H_2O_2 /redox	?	HSFAs	HSFAs, CDKE1, RCD1/RIMB1- Rap2.4a
	?	DHAP	TPT	MPK6	?
?	?	WHY1	?	?	WHY1
?	?	ZDS, clb5 signal, CCD	?	?	?

3.3 不同信号的连通性和协调性

现在的逆行沟通的范式认为个体信号和途径是彼此不同的，因此他们主要是孤立地研究。然而，更仔细的检查表明信号在代谢上、空间上、时间上和生理上都有不同程度的联系（图 3）。

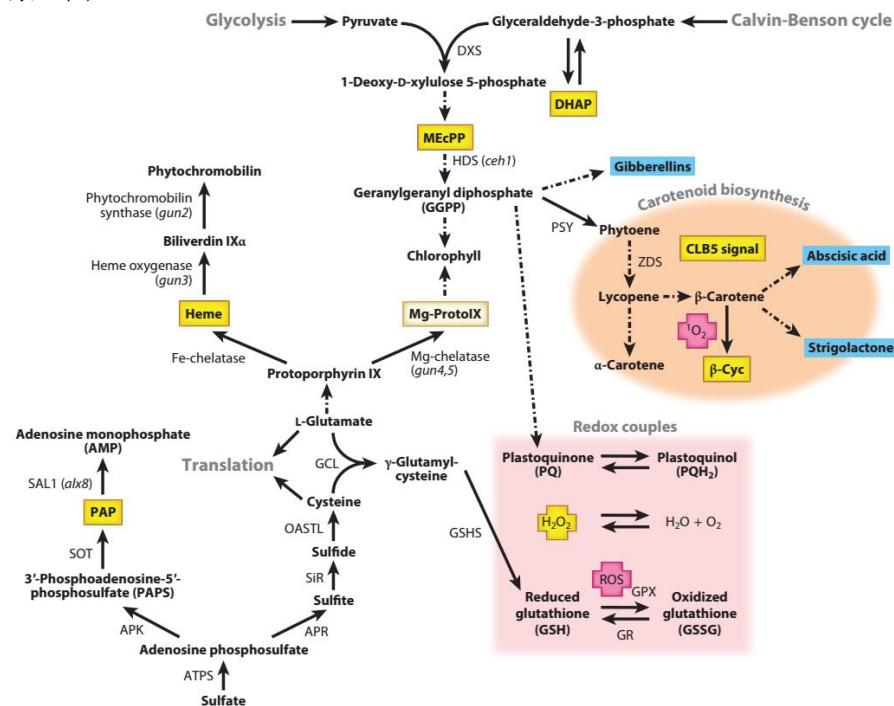


图 3 不同代谢物逆行信号的生化途径

Fig.3 Biochemical pathways of the different metabolite retrograde signals

已知的逆行信号以黄色显示，而激素显示为蓝色。实线箭头表示单个生物化学步骤，虚线箭头表示多于一个的简化表示。

3.4 小结

a.化学和蛋白质信号在多个组织和发育阶段将质体的代谢，生物化学和生理状态传递给细胞核；

b.大量新的证据表明逆行信号在调控核基因转录中发挥关键作用，从而改变叶绿体稳态，提高对发育和环境刺激的适应能力。在十年的时间里，已知部件的数量已经从4个增加到40个以上；

c.逆行信号通路具有不同的组成部分，但也有共同点，例如对相同的刺激作出反应，共享转录反应的核调节子，并调节重叠的基因子集。它们的功能可能在空间上，发育上或时间上受到限制；

d.除了双边交流之外，逆行途径更多地与激素信号网络交织在一起，有些可能作为第二使者具有更广泛的功能。而且，正在出现的观察表明，叶绿体通讯不一定完全是双边的；

e.叶绿体逆行信号与来自其他细胞器和细胞过程的信号的收敛表明，可以整合胞间信号和环境信号以协调对影响质体和细胞功能的质体刺激的细胞核和细胞响应；

f.随着对逆行途径组成部分的了解的增加，探索这些途径之间的相互作用以及来自其他细胞器的通讯，以及它们与细胞网络的整合将是令人兴奋的。整合是进步的关键——与“罗塞塔石”一样，单独考虑的语言可能难以理解。

参考文献(References)

- [1] Pogson, B. J., Ganguly, D., & Albrechtborth, V. (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1847(9), 1017-1024.
- [2] Wang, S., & Blumwald, E. (2014). Stress-induced chloroplast degradation in arabidopsis is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell*, 26(12), 4875.
- [3] Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., Mcquinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 25.
- [4] Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, & Yanovsky MJ, et al. (2014). A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6182), 427.