

植物 Tetraspanins 蛋白的研究进展

赵倩倩, 王雨欣 (浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

摘要 Tetraspanins (TETs) 是一大类进化性保守的、具有 4 次跨膜结构域的蛋白超家族, 广泛分布于所有多细胞生物体中。对植物 TETs 蛋白的结构特征、系统进化, 以及模式植物拟南芥的 TETs 蛋白超家族 (AtTET1~17) 和番茄 Tetraspanin3 蛋白的生物功能进行综述, 旨在为今后更好地研究植物 TETs 蛋白超家族提供参考。

关键词 Tetraspanins; 4 次跨膜结构域; AtTET1~17; Tetraspanin 3

中图分类号 Q946 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)14-146-03

Research Progress of Tetraspanins Protein in Plant

ZHAO Qian-qian, WANG Yu-xin (College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004)

Abstract Tetraspanins (TETs) is a large class of evolutionary conserved proteins with four transmembrane domains, which are widely distributed in all multicellular organisms. In this research, we reviewed the structural characteristics, system evolution of the plant TETs protein, as well as the biological function of model plant *Arabidopsis thaliana* TETs protein super family and tomato Tetraspanin3 protein, so as to provide references for better research of plant TETs protein super family.

Key words Tetraspanins; Four transmembrane domain; AtTET1-17; Tetraspanin3

自 1990 年 Oren 等^[1]发现 TAPA-1 (the target of an anti-proliferative antibody) 以来, 到 1997 年为止, 期间发现近 20 个基因, 均编码细胞表面蛋白。其基本结构单元均包含 4 个疏水的跨膜区 (transmembrane domains, TM1~TM4), 形成一小、一大 2 个细胞外环 (extracellular loop, EC1 和 EC2), 一个小的细胞内环 (intracellular loop, ICL), 以及短的 N-末端和 C-末端尾部。由此, 一个新的基因家族诞生, 曾被命名为“四次跨膜超家族” (transmembrane 4, TM4 或 TM4SF 或 4TM), 或“Tetraspanins 超家族”。后被 Maecker 等^[2]提议统一命名“Tetraspanins 超家族”。

对 TETs 超家族的研究, 最早起源于动物医学。研究发现, TETs 蛋白位于细胞表面或细胞内的膜上, 在物种间高度保守, 在真核生物中是多样化的; 它们在动物中的功能和作用机制也被研究地相当深入: 已经证实其在精卵融合^[3]、光感受器运行^[4]、血管发育^[5]、动物免疫应答^[6]等方面起重要作用^[3]; 一些研究理论也在医学上被用于尝试某些病毒引起的疾病防治, 如人乳头瘤病毒^[7]等。在植物中对 TETs 蛋白的研究很少, 目前已报道的植物 TETs 基因也不多。笔者对植物 TETs 蛋白的结构特征、系统进化, 以及几个已报道的 TETs 基因的研究情况进行综述, 旨在为今后更好地研究植物 TETs 蛋白超家族的生物功能及其应用提供借鉴。

1 Tetraspanins 的结构

TETs 是一类从膜上突出 3~5 nm 的整合蛋白^[8], 类似于多细胞动物 TETs 的核心构造。Boavida 等^[9]发现植物的 TETs 蛋白 (图 1) 也包含 4 个跨膜区 (TM1~TM4): 一个小的细胞外环 (EC1), 一个大的细胞外环 (EC2), 一个极小的细胞内环 (ICL), 一个 N-末端和一个 C-末端。

1.1 跨膜区 (TM1~TM4) 跨膜区占 TETs 本身的 50%, 是整个分子中最保守的部分。在所有的 TETs 蛋白中, 位于

TM1、3 和 4 部分的氨基酸残基 (Asn、Gln 和 Glu) 是高度极性的, 且这些氨基酸残基 70%~90% 是保守的^[10], 它们能够在彼此间或与其他氨基酸残基间形成强烈的氢键, 从而稳定跨膜区的三级结构^[11]。

1.2 胞外区 (EC1 和 EC2) 与跨膜区和胞内区相比, 胞外区更多地表现出序列趋异。如在人类和斑马鱼的 TETs 中, EC1 和 EC2 仅显示 43%~58% 的一致性, 而跨膜区和胞内区显示出高达 72%~83% 的一致性^[10]。

1.2.1 小细胞外环 (EC1)。目前, 对于 EC1 的了解较少。植物 TETs 蛋白在 EC1 包含一个保守性的 Cys 残基, 而动物 TETs 的 EC1 却没有; 暗示此 Cys 残基能够交联到 EC2 上的 Cys 残基上。此外, Masciopinto 等^[12]研究发现, 在动物 TETs 蛋白成员 CD81 中, EC1 是 EC2 的表面最佳表达所必需的, EC1 也许可以协助折叠形成 EC2^[13]。

1.2.2 大细胞外环 (EC2)。EC2 一直受到更多的关注, 被研究的也比较清楚。研究推测, 植物 TETs 蛋白的 EC2 也由 2 个亚域构成: 保守性亚域和可变性亚域 (图 1 黄色和蓝色底纹部分)。保守性亚域在近膜侧, 包含 3 个螺旋 (螺旋 A、B 和 E); 可变性亚域连续地插入保守性亚域, 位于保守性亚域的顶端, 在大小、二级结构和折叠方式上极其多变。这 2 个亚域的相对拓扑学结构, 取决于核心二硫桥的出现和 TETs 蛋白的独特亚型数量^[14]。但植物 TETs 的 EC2 包含 9 个 Cys 残基, 可能形成更加复杂的二硫桥, 而不是动物 TETs 典型的 4~6 个 Cys 残基; 植物 EC2 的可变性亚域包含一个保守性的植物专一性“GCCK/RP”模域, 在位置和序列上不同于动物 TETs 蛋白的“CCG”模域。

1.3 胞内区 (ICL, N-末端和 C-末端) 除 EC2 的可变性区域外, N-末端和 C-末端是 TETs 蛋白中的 2 个可变区; 但近膜侧的某些 Cys 残基是相对保守的、潜在的棕榈酰化位点 (图 1 红色波浪线部分), 这有助于 TETs 和其互作物间的作用。已经证实, 在动物的 TETs 蛋白中, C-末端在细胞粘着^[15]、膜融合^[16]和溶酶体靶定位^[17]过程中起重要作用^[12]。

作者简介 赵倩倩 (1989-), 女, 河南郟县人, 硕士研究生, 研究方向: 水稻抗病基因的克隆和功能。

收稿日期 2016-04-10

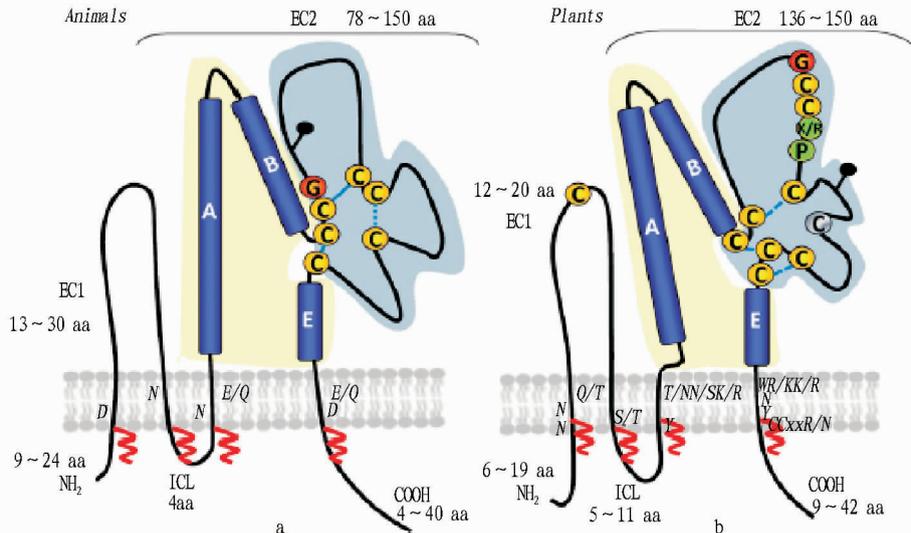


图1 动物(a)和植物(b)中 Tetraspanins 的拓扑结构示意图^[9]

Fig. 1 Schematic diagram of Tetraspanins topological structures in animal(a) and plant(b)

截至目前,对 ICL 的研究较少。在 ICL 上,也存在棕榈酰化位点,可能有助于 TETs 和其伴侣蛋白(tetraspanin-partner)间的互作^[18]。

2 系统进化分析

研究表明,从原生动动物到多细胞动物,从真菌(酵母除外)到植物和哺乳动物,TETs 蛋白均存在;它们广泛存在于几乎所有的生物体内,表明 TETs 经历了漫长的进化历程。

目前,TETs 蛋白超家族在哺乳动物中有 33 个成员,在果蝇中有 37 个成员,在秀丽隐杆线虫中有 20 个成员,在真菌中有 3 个成员和一个类似于 TETs 家族的成员^[19]。因为酵母体内不存在 TETs,在其基因组内,即使是远亲的同源物也未被找到一个^[20],因此,TETs 最初被认为仅存在于多细胞生物体内。

随后在原生动物变形虫 *Entamoeba histolytica* 体内鉴定出 TETs 蛋白,且发现在单细胞生物体变形虫 *D. discoideum* 中,TspanE 蛋白包含多细胞动物典型的“CCG”模域;而其他 4 个 Tspans 却表现出一个修饰的“CCK/Y/C”模域,这类似于一些陆生植物突变体中的模域结构^[21]。这表明 TETs 可能在单细胞到多细胞的过渡中行使功能。

另外,苔藓 *P. patens* 和石松门 *S. moellendorffii* 的 TETs 蛋白,也存在植物专一性的“GCKK/RP”模域,暗示“GCKK/RP”模域早在陆生植物世系之前即出现。原因可能是一个新的世系分支出现^[21],或者陆生植物世系趋异分支出来前的一个遗传模域的修饰或者重组。

3 植物 Tetraspanins 蛋白的功能

目前,对植物中 TETs 的研究远落后于动物。为了调查植物基因组是否编码 TETs 蛋白,Wang 等^[22]利用 PLAZA 对比基因组学平台的方法探究了 11 个植物物种,共发现 155 个 TETs 基因,并以此构建了一个系统进化树。依据拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 TETs 基因,该进化树分为七大组。类似于二穗短柄草、水稻、高粱以及玉米的大多数 TETs 基因序列处于同一组,大豆和苜蓿也处于同一组,反映了它们的

亲密关系。

研究还发现,拟南芥编码 17 个 TETRASPANIN (*AtTET1* ~ 17) 基因,其中大多数的功能未知,唯一进行功能性描述的 TETs 成员是 *AtTET1* 基因;番茄 *tetraspanin3* 基因的功能也被报道。

3.1 拟南芥 *AtTET1* 基因 2000 年,Cnops 等^[23]在研究 *TORNADO1* (*TRN1*) 基因时,利用 EMS 诱变拟南芥 Col 种子,获得了 *tornado2* (*trn2*) 突变体,描述了其总体形态表型,发现 TRN1 蛋白和 TRN2 蛋白均在初生根表皮模式建立中起重要作用,可能在同一形态建成调控途径中起作用。2003 年,Olmos 等^[24]筛选拟南芥 T-DNA 插入突变体获得了 *ekeko* 突变体,鉴定、描述了 *EKEKO* 基因 (*At5g46700* 人) 的结构和功能,发现该基因是植物正常发育所必需的。2004 年,Peters 等^[25]克隆到 *TRN2* 基因,和 Olmos 等^[24]鉴定的 *At5g46700* 一致。2006 年,Cnops 等^[26]研究发现,TRN2 蛋白包含 269 个氨基酸,可能是一个分泌蛋白,并由 4 个跨膜区域(TM1 ~ TM4),2 个胞外环(EC1 和 EC2),和胞质 N-末端及 C-末端。由此推测,TRN2 蛋白是拟南芥 TETs 家族的成员,即拟南芥的 TETRASPANIN1 (*TET1*) 蛋白,*TRN2*/*EKEKO*/*TET1* 和 *TRN1* 基因(编码一个富亮氨酸重复蛋白)均在叶片和根的早期发育中起重要作用。2007 年,Chiu 等^[27]对拟南芥的 *TRN2*/*TET1* 基因缺失突变体的研究发现,*TRN2*/*TET1* 基因能够影响拟南芥顶端分生组织周边区的细胞分裂。2011 年,Lieber 等^[28]在研究高等植物大孢子形成的遗传途径中,发现 *TET1*/*EKEKO*/*TTRN2* 和 *WINDHOSE1* (*WIH1*) 及 *WIH2* 基因(编码一类植物和真菌中存在,动物中却没有的小多肽)共同作用可以促进大孢子产生。

3.2 拟南芥 *tetraspanins* 超家族的其他 *AtTETs* 基因 除 *TRN2*/*EKEKO*/*TET1* 外,拟南芥基因组中还有 16 个 TETs 成员(*TET2* ~ *TET17*),但其功能尚不明确。Boavida 等^[9]研究拟南芥的 TETs 家族发现,大部分的 TETs 基因有一个内含子(约 1 kb)和一个保守的内含子/外显子连接;*TET2*、*TET5* 和

TET6 在编码序列的 5' 或 3' 侧多一个小的内含子, 而 TET10 却含有 10 个内含子。亚细胞定位试验表明, 除 TET15 (由于几个氨基酸残基组成的一个延伸导致其产生一个较长的胞质 N-末端) 外, 拟南芥的其他 TETs 成员优先定位于质膜上。其中, TET14、TET15 和 TET17 潜在定位于内质网上; 而 TET3 已经明确定位于质膜上, 是一个胞间连丝相关蛋白^[29]。表达分析试验表明, 拟南芥的 TETs 成员在生殖细胞或生殖组织区域呈现出独特却重叠的表达模式, 这表明拟南芥的 TETs 成员可能存在基因冗余。

当拟南芥的 TETs 成员在酵母中表达时, 它们之间能够形成同二聚体和异二聚体。这也表明拟南芥 TETs 家族存在功能冗余, 且可能源自于 TET-TET 互作的多样性。

3.3 番茄 tetraspanin 3 基因 Tetraspanin 3 蛋白是番茄 TETs 蛋白超家族的一员, 裴延飞等^[30] 研究发现, 番茄的 *tetraspanin 3* 基因与葡萄的同源基因在一个独立的进化分支上; 其在番茄的各器官中均有表达; 当正常番茄植株感染黄瓜花叶病毒 (TYLCV) 后, *tetraspanin 3* 基因表达量上调; 当敲除番茄植株的 *tetraspanin 3* 基因后, 叶片出现扭曲, 且在接种 TYLCV 后, 被感染的 TYLCV 病毒量降低 50% 以上。这表明 Tetraspanin 3 蛋白与番茄叶片的生长发育有关, 并对 TYLCV 侵染番茄植株起正调控作用。

4 展望

由于特异的病毒感染需要特别的 TETs 以被识别并进入细胞, 一些哺乳动物的 Tetraspanins 蛋白成为药物作用的靶点, 为预防或治疗相应疾病提供了新途径。而 TETs 蛋白的高度保守性研究表明, TETs 基因家族具有相似或相近的功能^[31], 因此, 从理论上讲, 植物的 TETs 蛋白超家族在植物发育过程中有许多重要的作用。然而, 目前对植物中 TETs 基因家族的研究相对较少, 其作用机制和生化途径更是鲜有报道。该研究对植物 TETs 蛋白超家族的研究情况进行了综述, 以期对植物 TETs 蛋白的深入研究和将来的实际应用提供参考。

参考文献

- OREN R, TAKAHASHI S, DOSS C, et al. TAPA-1, the target of an anti-proliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(8): 4007-4015.
- MAECKER H T, TODD S C, LEVY S. The tetraspanin superfamily: Molecular facilitators[J]. FASEB J, 1997, 11(6): 428-442.
- JÁGOU A, ZIYYAT A, BARRAUD-LANGE V, et al. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(27): 10946-10951.
- CONLEY S M, STUCK M W, NAASH M I. Structural and functional relationships between photoreceptor tetraspanins and other superfamily members[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(7): 1035-1047.
- BAILEY R L, HERBERT J M, KHAN K, et al. The emerging role of tetraspanin microdomains on endothelial cells[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(6): 1667-1673.
- RUBINSTEIN E. The complexity of tetraspanins[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(2): 501-505.
- RICHARDS K F, MUKHERJEE S, BIENKOWSKA-HABA M, et al. Human papillomavirus species-specific interaction with the basement membrane-resident non-heparan sulfate receptor[J]. Viruses, 2014, 6: 4856-4879.
- CHARRIN S, JOUANNET S, BOUCHEIX C. Tetraspanins at a glance[J]. Journal of cell science, 2014, 127(Pt17): 3641-3648.
- BOAVIDA L C, QIN P, BROZ M, et al. Arabidopsis tetraspanins are confined to discrete expression domains and cell types in reproductive tissues and form homo- and heterodimers when expressed in yeast[J]. Plant physiology, 2013, 163(2): 696-712.
- STIPP C S, KOLESNIKOVA T V, HEMLER M E. Functional domains in tetraspanin proteins[J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(2): 106-112.
- SENES A, UBARRTXENA-BELANDIA I, ENGELMAN D M. The C_α-H...O hydrogen bond: A determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(16): 9056-9061.
- MASCIOPINTO F, CAMPAGNOLI S, ABRIGNANI S, et al. The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor[J]. Virus Res, 2001, 80(1/2): 1-10.
- RAJESH S, SRIDHAR P, TEWS B A, et al. Structural basis of ligand interactions of the large extracellular domain of tetraspanin CD81[J]. Journal of virology, 2012, 86(18): 9606-9616.
- MICHEL S, ALIX D, CECILE L G, et al. Structure of the tetraspanin main extracellular domain[J]. J Biol Chem, 2001, 276(43): 40055-40064.
- WANG H X, KOLESNIKOVA T V, DENISON C, et al. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization[J]. J Cell Sci, 2011, 124(16): 2702-2710.
- EDRINGTON T C, YEAGLE P L, GRETZULA C L, et al. Calcium-dependent association of calmodulin with the C-terminal domain of the tetraspanin protein peripherin/rds[J]. Biochemistry, 2007, 46(12): 3862-3871.
- TAKINO T, MIYAMORI H, KAWAGUCHI N, et al. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(1): 160-166.
- MAZUROV D, HEIDECKER G, DERSE D. The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag Protein[J]. J Biol Chem, 2007, 282(6): 3896-3903.
- HUANG S, YUAN S, DONG M, et al. The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms[J]. Genomics, 2005, 86(6): 674-684.
- GARCIA-ESPA A A, CHUNG P J, SARKAR I N, et al. Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution[J]. Genomics, 2008, 91(4): 326-334.
- DESALLE R, MARES R, GARCIA-ESPAÑA A. Evolution of cysteine patterns in the large extracellular loop of tetraspanins from animals, fungi, plants and single-celled eukaryotes[J]. Mol Phylogenet Evol, 2010, 56(1): 486-491.
- WANG F, VANDEPOELE K, VAN LJSEBETTENS M. Tetraspanin genes in plants[J]. Plant Sci, 2012, 190: 9-15.
- CNOPS G, WANG X, LINSTAD P, et al. Tornado1 and Tornado2 are required for the specification of radial and circumferential pattern in the Arabidopsis root[J]. Development, 2000, 127(15): 3385-3394.
- OLMOS E, REISS B, DEKKER K. The ekeko mutant demonstrates a role for tetraspanin-like protein in plant development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(4): 1054-1061.
- PETERS J L, CNOPS G, NEYT P, et al. An AFLP-based genome-wide mapping strategy[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108(2): 321-327.
- CNOPS G, NEYT P, RAES J, et al. The TORNA1 and TORNA2 genes function in several patterning processes during early leaf development in Arabidopsis thaliana[J]. Plant cell, 2006, 18(4): 852-866.
- CHIU W H, CHANDLER J, CNOPS G, et al. Mutations in the TORNA2 gene affect cellular decisions in the peripheral zone of the shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(6): 731-744.
- LIEBER D, LORA J, SCHREMPF S, et al. Arabidopsis WIHI and WIH2 genes act in the transition from somatic to reproductive cell fate[J]. Curr Biol, 2011, 21(12): 1009-1017.
- FERNANDEZ-CALVINO L, FAULKNER C, WALSHAW J, et al. Arabidopsis plasmodesmal proteome[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4): 18880.
- 裴延飞, 刘廷利, 连梓伊, 等. 番茄中受 TYLCV 诱导上调表达基因 tetraspanin3 的功能分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(6): 896-900.
- HUANG S, TIAN H, CHEN Z, et al. The evolution of vertebrate tetraspanins: Gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications[J]. BMC evolution biology, 2012, 10: 306.