

植物抗性基因 *NPR1* 研究进展

韩永光^{1,2}, 马利刚^{1,2}, 赵乐^{1,2}, 冯卫生^{1,2}, 郑晓珂^{1,2*}

(1.河南中医药大学药学院,河南郑州 450046;2.呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心,河南郑州 450046)

摘要 *NPR1* 是调节植物整体抗病性的重要作用因子,参与植物多种抗性代谢通路,是多个抗病性信号传导通路的交叉点。从 *NPR1* 的结构特点、研究进展,以及其与转录因子的相互作用等方面进行阐述,并对 *NPR1* 的利用进行展望。

关键词 抗性基因; *NPR1*; 转录因子

中图分类号 S184 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)26-0018-03

Research Progress on Resistance Gene *NPR1* in Plants

HAN Yong-guang^{1,2}, MA Li-gang^{1,2}, ZHAO Le^{1,2} et al (1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046; 2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment and Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450046)

Abstract The plant resistance gene *NPR1* (*NPR1*) is an important factor that regulates the disease resistance and participates in multiple resistance metabolic pathways in plants. *NPR1* is also the intersection of multiple signal transduction pathways of disease resistance. In this paper, the structural features and research progress of *NPR1*, and the interaction with the transcription factors were described. The utilization of *NPR1* was also prospected.

Key words Resistance gene; *NPR1*; Transcription factors

病程相关基因非表达子 1 (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1, *NPR1*) 是多个抗病性信号传导通路的交叉点,是调节植物整体抗病性的重要作用因子,又称为 *NIM1* 或 *SAI1*。植物如果缺少 *NPR1* 的功能,就会导致病程性相关蛋白质 *PR* 基因表达的受损和在应对病虫害侵害时,系统性获得抗性 (Systemic Acquired Resistance, SAR) 的抵抗作用几乎全部缺失。通过对 DNA 序列进行比对分析,结果显示 *NPR1* 启动子中含有相对保守的 28 个核苷酸序列,这些序列组成 3 个 W 盒,其中 1 个反向排列,2 个顺向串联。*NPR1* 启动子必需与 *WRKY* 蛋白结合后才能发挥作用,如果 W 盒中的某个核苷酸被替换,则不能与 *WRKY* 蛋白发生结合^[1]。*NPR* 含有多个锚蛋白重复序列和 1 个 BTB/POZ 区,*NPR1* 在细胞核内主要是负责 SA-介导 *PR-1* 基因的诱导表达,而其在细胞溶质中主要在 SA 和 JA 信号通路中发挥重要的拮抗作用^[2]。

在细胞溶质中 *NPR1* 通过氨基酸顺序的第 82 和 216 位半胱氨酸残基分子间的二硫键结合形成寡聚体,可通过硫氧还蛋白 H5 或 H3 还原 2 个半胱氨酸残基 (Cys82 和 Cys216) 调控细胞液中的氧化还原状态,*NPR1* 低聚物二硫键迅速被还原,形成单体。*NPR1* 单体随后由细胞溶质转移到细胞核中,在核中激活防御基因的转录。突变这 2 个半胱氨酸中的任何一个都能导致核定位单体 *NPR1* 水平的升高,而核定位单体 *NPR1* 与不断上调 *PR* 基因的表达密切相关^[3]。

1 *NPR* 家族

最新研究表明 *NPR* 蛋白家族包括研究相对多的 *NPR1* 和另外 5 个可能编码 *NPR* 1 相关基因 (*NPR2-6*),其共同点是均含有保守 BTB / POZ 锚蛋白的相关蛋白重复结构域和高度保守半胱氨酸残基。*NPR3* 是免疫信号 SA 的受体,可

作为泛素 E3 配体的调节器,以一种 SA 调节的方式调控 *npr1* 的降解。*npr3* 突变体积累了较高水平的 *npr1*,对 SAR 诱导不敏感。该突变体在病原体效应诱发细胞程序性死亡和免疫方面存在缺陷^[4]。*NPR4* 与 *NPR1* 具有 36% 的同源性,并与转录因子 TGA 相互作用。*NPR4* mRNA 水平的表达量会随病原体的侵入和 SA 的处理而激增,但 JA 的处理则会导致其表达水平的下降, *NPR4* 主要在抗病原体的基础防御起到必需的作用,而且它可能与 SA 和 JA 依赖的信号通路之间的交叉通路有关^[5]。*NPR5* 又称为 BOP1, BOP1 能编码一个具有锚蛋白重复序列的 BTB/POZ 域的蛋白。BOP1 属于一类小基因为家族成员,其中包括比较典型的抗病调节蛋白 *NPR1*。BOP1 在调控叶片形态形成和分化起关键作用^[6]。*NPR6* 又被称为 BOP2, BOP2 同样能调节叶片的发育,最新研究表明 BOP2 能通过减少 PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) 蛋白水平,促进光生形态的形成,并通过抑制 PIF4 活性来调节热形态发生^[7]。*NPR2* 功能研究尚不清楚,有文献表明 *NPR2* 与 *NPR1* 序列相似性高,功能类似,同样对 SA 比较敏感^[8]。

2 *NPR* 的抗性

通过转基因技术手段将 *NPR1* 基因转入到拟南芥突变体 *npr1* 后,突变株不仅能在表型上有所改观,其 SAR 的能力也得到恢复, *PR* 基因的表达和植物的抗性能力得到增强。即使在无诱导的条件下,同样具有很强的抗性能力^[9]。有文献表明在 *NPR1* 基因的过量表达植株具有增强植物的抗病能力,且无其他不良的负效应^[10]。Chern 等^[11] 在过量表达拟南芥 *NPR1* 基因的水稻中证实 *NPR1* 基因在单子叶植物中所扮演的作用,发现转基因水稻植株能提高对水稻细菌性枯叶病原体的抗性能力,而且 RNA 点杂交试验表明 *NPR1* 基因的高表达能提高抗病能力,首次确定 *NPR1* 基因可以提高单子叶植物的抗病能力。而过量表达 *NPR1* 基因的转基因拟南芥和水稻中则能够显著地增强植株抗病性,结果表明 *NPR1*

基金项目 河南省科技攻关项目 (172102110099)。

作者简介 韩永光 (1984—),男,河南太康人,讲师,博士,从事植物生理生化研究。* 通讯作者,教授,博士,从事中药学研究。

收稿日期 2018-04-24; **修回日期** 2018-05-03

是 SAR 信号转导途径中作用于 SA 下游的一个关键性调控因子。在 SAR 诱导条件下,拟南芥 *npr1* 突变体积累正常的 SA 浓度,但是不能有效地激活 SAR,更不能积累 PR 蛋白,从而不能高效地提高植物的抗性,*npr1* 突变体表现为对病原体更加敏感,使抗病 *R* 基因参与形成的抗病能力得到降低,表明 NPR1 在感染位置限制病原菌生长方面发挥重要作用。

荷兰科学家 Pieterse 等^[12]发现 NPR1 同样在诱导性系统抗性(induced systemic resistance,ISR)中具有重要的作用。在 *npr1* 突变株中,ISR 不能被 ISR 诱导菌 *Pseudomonas fluorescens* 诱导激发。经过 SA 和 JA 同时处理植株叶片后,SA 能抑制 JA 相关基因的诱导表达,但在 *NahG* 转基因植株侵染 PstDC3000 后,SA 的含量没发生明显地变化,而 JA 水平却增加了 25 倍,参与 JA 信号转导途径的相关基因表达量也显著地增强,在 *npr1* 突变体的植株中,这种抑制作用显著减弱^[2]。说明 NPR1 在 SA 介导的 SAR 和 JA 介导的 ISR 中均具有重要免疫调节作用。在 *jar* 和 *etr* 突变体中 ISR 防御生理过程受抑制,结果表明 ISR 过程需要 JA 和 C₂H₄ 等信号参与。生态型为 RLD 和 Ws 的拟南芥中 ISR 受到抑制,使得拟南芥对 C₂H₄ 的刺激不敏感。而 *eds4* 和 *eds8* 突变体分别对 C₂H₄ 和 JA 的处理不敏感,ISR 生理过程反应也受到抑制。但另一种 *eds* 的突变体 *eds10* 对 C₂H₄ 和 JA 均能做出免疫反应,进而能激活 SAR 反应,但不能激活 ISR 反应。表明 EDS10 是 ISR 中一个很重要的作用因子。在整个 ISR 反应过程中,同时还需要位于 JAR1 和 ETR1 下游的 NPR1 的参与^[12]。因此,可以证实 NPR1 是诱导 SA 或 JA/C₂H₄ 防卫反应的一个重要的调节因子。而大量试验表明 SA 的积累会导致 JA 的生物合成和 JA 调节基因表达的抑制。对野生型和 SA、JA 和 C₂H₄ 缺失的突变体进行大规模研究分析发现,尽管 SA 信号转导途径能被 JA/C₂H₄ 抑制,但 SA 对 JA 信号转导途径的抑制更为普遍^[13]。另外发现用 SA 和 JA 处理拟南芥可以抑制 JA 调节的基因的表达^[2],而对 *npr1* 突变体进行研究发现 SA 对 JA 的拮抗效应需要 NPR1 参与。与激活 SAR 不同,NPR1 不参与抑制 JA 信号转导途径。因此,可以说 NPR1 是植物防御免疫反应(包括 SAR、ISR、SA/JA 交叉转导)的关键调控因子。

赵利辉等^[14]从多种病原真菌中分离纯化出一种新的 42 kD 耐热蛋白,被称之为植物激活蛋白(plant activator protein),研究发现其对 TMV 和 CMV 等多种植物病菌都具有一定的抗性。cDNA 芯片试验表明该蛋白可诱导 NPR1 和乙烯受体相关基因等抗病基因的转录,他们检测该激活蛋白处理水稻叶片能引起水稻 NPR1 的转录水平显著提高,促进抗病蛋白如 PR 蛋白的积累,提高其抗性。说明植物体内某些热激蛋白也可能与 NPR1 发生相互作用。*npr1* 突变体植株对 SAR 多种诱导介质如 SA、INA 均不能明显作出抗性应答,表现为 *PR* 基因的表达几乎无明显变化,而且更容易感染细菌和真菌病毒等病菌。而使用外源性 SA 或人工合成的类似物质,例如 IN A 可使 *PR* 基因的表达得到诱导和可较强地激活

SAR^[15-16]。另外有研究发现 *NPR1* 基因不仅在 SA 介导的 SAR 以及根围细菌介导的 ISR 中具有重要作用,而且在抑制 JA 信号分子介导的防卫反应方面也发挥着重要作用。

尽管在 NPR1 蛋白的研究过程中发现由 SA 介导 SAR 信号转导途径大多为 NPR1 蛋白依赖型,然而有研究发现存在一种不依赖于 NPR1 蛋白的信号转导途径。抗性拟南芥生态型 Di-17 植株感染芜菁卷曲病毒(TCV)后,证实 HR 的形成和对 TCV 抗性均依赖于 SA 途径,而非依赖于乙烯和茉莉酸,并且 *NPR1* 基因突变不能影响这些生理过程,表明拟南芥的 TCV 抗性存在一条仍未确定的依赖 SA 而不依赖 NPR1 的信号转导途径^[17]。在烟草研究证实 TMV 抗性是由一条依赖于 SA 似乎还需要交替氧化酶(Alternative Oxidase, AOX)的介导途径的,奇怪的是 SHAM(一种 AOX 活性的抑制物质)可抑制 TMV 抗性,而不能抑制 PR 表达的 TMV 诱导性的激活抗性,另外细菌或真菌病原体的抗性并不会受到 SHAM 处理的影响。因此,烟草中可能存在至少 2 条不同的 SA 调控防御途径:一条认为是依赖于 NPR1 且调控 *PR* 基因的表达以及抗细菌和病原体;而另一条可能是不依赖于 NPR1 也能激活病原体抗性^[18-19]。Bowling 等^[20]筛选出来的拟南芥 *cpr* 突变株存在 2 种调控转导途径——依赖 NPR1 和不依赖 NPR1 的 SAR 途径的组成表达,这种现象说明这 2 种调控转导途径在早期的信号转导过程是相互关联的,而且在病毒抗性方面可能存在重叠效应。

3 NPR 与转录因子的相互作用

酵母双杂交试验表明与 NPR1 直接相互作用的蛋白主要是 bZIP 转录因子的 TGA 家族的多个成员,还有就是其他 3 种蛋白 NIMIN1,2 和 3(NIM1-相互作用蛋白 1,2 和 3)^[21]。Zhang 等^[22]通过试验证实 NPR1 能与 TGA 转录因子发生相互作用,从而调节 NPR1 的表达。NPR1 上 4 个关键点的任何一个发生突变,均能导致 NPR1 不能与 TGA 发生作用。而这种相互作用是调节 *PR* 基因表达所必需的,说明 NPR1 可能通过 TGA 调控 *PR* 基因的表达和增强植物的抗病能力。TGA 转录因子是 bZIP 转录因子家族非常重要的组成部分,其含有 DNA 结合域和亮氨酸拉链,能与顺式作用元件相结合,从而调控基因的表达^[23]。虽然在经过 SA 处理后,拟南芥中 NIMIN1,2 和 3 被诱导的相对持续时间较短,但 NIMIN1 表现为负调控 SA/NPR1 信号通路。过量表达 NIMIN1 导致 ETI 和 SAR 的钝化效果。而减少 NIMIN1 的表达则 *PR-1* 基因的表达能通过 SA 得到增强^[24]。在酵母中,NPR1 可与 5 个不同的拟南芥 TGA 因子相互作用,而在高等植物中 NPR1 可与 7 个不同的拟南芥 TGA 因子相互作用^[25],而在经过 SA 处理的拟南芥叶片中,仅检测到 TGA1 和 TGA4 与 NPR1 相互作用。这种相互作用依赖于 SA 诱导的氧化状态环境的变化,从而导致 TGA1 和 TGA4 2 个特有的半胱氨酸残基 Cys-260 和 Cys-266 的还原。在非诱导情况下,这 2 个氨基酸残基以氧化状态存在,以二硫键结合,防止与 NPR1 结合;当 SA 处理诱导后,二硫键被还原,使得 TGA 蛋白与 NPR1 相互作用,从而激活基因表达,增强抗性^[26]。在无 SA 存在的

情况下,TGA2 也能与 NPR1 相互作用,但在 SA 处理叶片中,这一相互作用可增强^[27]。然而,TGA2 和 TGA3 激活抗病基因转录需要 SA 和 NPR1。因为 NIMIN1 在酵母中能与 TGA2、TGA6、NPR1 和 PR-1 启动子区域形成复合体,这一复合体可能调控 TGA 依赖的 SA 调节基因的转录激活^[24]。

4 展望

NPR1 是植物抗病性的关键调控转录因子,涉及多种抗性途径,现已知在多种经济作物中均含有 NPR1 或高度同源的基因,在植物保护中具有重要的研究价值,因此可以通过转基因等技术工程手段将 NPR 基因应用于植物保护等方面,在植物抗病害等方面应用前景广阔。实际上,科学家已经构建转基因 NPR1 拟南芥和水稻等植物,对它们在抗性方面的研究也取得重要的成绩。很多研究表明过量表达 NPR1 的单子叶或双子叶植株均表现出对多种致病病原体具有良好的抗性,因此在减少植物病害、增加作物产量方面,NPR1 具有巨大的应用潜力和研究价值。如通过构建转基因植株,特异性高诱导 NPR1 的表达激活植物防御机制,诱导植物抗性。通过筛选、分离和鉴定植物的抗病突变体。同时,还可以筛选一些能够激活植物 SAR 的小分子化合物;尽管科学界对 NPR1 的研究取得很大的进展,但是仍然有许多问题还没有得到解决,如:SA 激活 NPR1 基因表达是否涉及其他代谢分子,还需要进一步深入研究;不同 TGA 转录因子成员如何互相协调共同调控 NPR1 信号传导途径;NPR1 如何在植物体内有机地调控不同的信号传导途径,将涉及 SA、ET 和 JA 的信号之间有机联系在一起;NPR1 和 SA 等信号途径之间是否还存在其他不同的调控因子;NPR1 结合蛋白与 NPR1 的相互作用机制尚不完全清楚;通过分子生物学、基因工程等多种技术手段,应该能够获取更多与 NPR1 相互作用的因子或调节基因,有助于对 NPR1 作用机理的了解,为进一步研究植物抗病防治机制做贡献。

参考文献

- [1] YU D Q, CHEN C H, CHEN Z X. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression[J]. The plant cell, 2001, 13: 1527-1539.
- [2] SPOEL S H, KOORNNEEF A, CLAESSENS S M C, et al. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol[J]. Plant cell, 2003, 15(3): 760-770.
- [3] MOU Z L, FAN W H, DONG X N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes[J]. Cell, 2003, 113(7): 935-944.
- [4] FU Z Q, YAN S P, SALEH A, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants[J]. Nature, 2012, 486(7402): 228-232.
- [5] LIU G S, HOLUB E B, ALONSO J M, et al. An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance[J]. Plant J, 2005, 41(2): 304-318.
- [6] HA C M, JUN J H, NAM H G, et al. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant & Cell Physiol, 2004, 45(10): 1361-1370.
- [7] ZHANG B, HOLMLUND M, LORRAIN S, et al. BLADE-ON-PETIOLE pro-

- teins act in an E3 ubiquitin ligase complex to regulate PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 abundance[J]. Elife, 2017, 6: e26759.
- [8] CANET J V, DOBÓN A, ROIG A, et al. Structure-function analysis of npr1 alleles in *Arabidopsis* reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid[J]. Plant Cell Environ, 2010, 33(11): 1911-1922.
- [9] NANDI A, KACHROO P, FUKUSHIGE H, et al. Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the *Arabidopsis* ssl1 mutant[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2003, 16(7): 588-599.
- [10] CHERN M S, FITZGERALD H A, YADAV R C, et al. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2001, 27(2): 101-113.
- [11] CHERN M S, FITZGERALD H A, YADAV R C, et al. A disease resistance pathway in rice similar to the mediated pathway in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2001, 27(2): 101-113.
- [12] PIETERSE C M J, VAN WEES S C M, VAN PELT J A, et al. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 1998, 10: 1571-1580.
- [13] GLAZE BROOK J, CHEN W Q, ESTES B, et al. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping[J]. Plant J, 2003, 34(2): 217-228.
- [14] 赵利辉, 邱德文, 刘铮, 等. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1358-1363.
- [15] GÖRLACH J, VOLRATH S, KNAUF-BEITER G, et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat[J]. The plant cell, 1996, 8: 629-643.
- [16] LAWTON K, FRIEDRICH L, HUNT M, et al. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired signal transduction pathway[J]. Plant J, 1996, 10(1): 71-82.
- [17] KACHROO P, YOSHIOKA K, SHAH J, et al. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene and jasmonate independent[J]. Plant cell, 2000, 12(5): 677-690.
- [18] CHIVASA S, MURPHY A M, NAYLOR M, et al. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase[J]. Plant J, 1997, 10: 1489-1498.
- [19] CHEN W, CHAO G, SINGH K B. The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites[J]. Plant J, 1996, 10(6): 955-966.
- [20] BOWLING S A, CLARKE J D, LIU Y, et al. The cpr5 mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance[J]. The plant cell, 1997, 9(9): 1573-1584.
- [21] DESPRÉS C, DE LONG C, GLAZE S, et al. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors[J]. The plant cell, 2000, 12(2): 279-290.
- [22] ZHANG Y L, FAN W H, KINKEMA M, et al. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene[J]. Proceeding of the national academy of sciences, USA, 1999, 96: 6523-6528.
- [23] WEIGEL R R, BÄUSCHER C, PFITZNER A J P, et al. NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants[J]. Plant Mol Biol, 2001, 46: 143-160.
- [24] WEIGEL R R, PFITZNER U M, GATZ C. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*[J]. Plant cell, 2005, 17(4): 1279-1291.
- [25] KESARWANI M, YOO J, DONG X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2007, 144(1): 336-346.
- [26] DURRANT W E, DONG X. Systemic acquired resistance[J]. Annu Rev Phytopathol, 2004, 42(10): 185-209.
- [27] FAN W H, DONG X N. *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*[J]. Plant cell, 2002, 14(6): 1377-1389.