



# 植物激素乙烯作用机制的最新进展

李文阳<sup>†</sup>, 马梦迪<sup>†</sup>, 郭红卫<sup>\*</sup>

北京大学生命科学学院, 蛋白质与植物基因研究国家重点实验室, 北京 100871

<sup>†</sup> 同等贡献

<sup>\*</sup> 联系人, E-mail: hongweig@pku.edu.cn

收稿日期: 2013-09-03; 接受日期: 2013-09-18

国家自然科学基金(批准号: 91017010)和转基因生物新品种培育科技重大专项(批准号: 2010ZX08010-002)资助项目

doi: 10.1360/052013-284

**摘要** 气体植物激素乙烯在植物生长发育及应对胁迫的防御反应中起重要调控作用。通过20多年的研究, 利用模式植物拟南芥, 勾画出一条自内质网膜受体至细胞核内转录因子的线性乙烯信号转导通路。本文概述了研究乙烯信号转导的方法及乙烯信号转导的基本过程; 阐述了最新发现的乙烯信号从内质网膜传递到细胞核的分子机制, 即原本定位于内质网膜上的EIN2蛋白其C端被剪切之后进入细胞核, 然后通过抑制EBF1/2而稳定转录因子EIN3/EIL1; 根据最近多个小组报道EIN3/EIL1直接调控除乙烯响应基因之外的其他生物学过程相关基因, 提出了EIN3/EIL1可以作为网络节点整合多条信号通路的新观点; 通过分析不同信号通路调控EIN3/EIL1的方式, 发现不仅EIN3/EIL1的蛋白稳定性受到调控, 而且其转录活性还受到诸如JAZ, DELLA等转录调节因子的调控。本文展望了未来乙烯信号转导通路的研究方向与研究热点。

**关键词**  
植物激素  
乙烯  
信号转导  
EIN2  
EIN3/EIL1  
EBF1/2

乙烯是最早被确立为植物激素的植物生长调节物质之一<sup>[1,2]</sup>。1901年, 俄罗斯植物生理学家Neljubov D K 就发现照明气中的乙烯会引起黑暗中生长的豌豆幼苗产生特殊的生长变化。1934年, 英国人Gane R 发现植物自身就能产生乙烯, 因此人们认定乙烯是植物生长发育的内源调节物质。1965年, 乙烯首次被称作植物激素, 此后随着研究的深入乙烯作为植物激素的地位逐渐为人们所确立。

随着研究的不断深入, 人们发现乙烯对植物生长、发育的很多过程都有影响。从植物自身发育的角度看, 乙烯在从种子萌发到叶片扩展、根毛伸长、侧根生长、开花、果实成熟以及叶片脱落、衰老等很多阶段都起着极其重要的作用。从植物与外界环境之

间关系的角度看, 乙烯主要是在植物抵抗生物与非生物胁迫等方面发挥作用。植物与动物的区别之一就是植物是固着生长、不可移动。通过自身合成包括乙烯在内的各种激素, 植物可以通过利用激素信号通路灵活地调控基因表达以协调内在生长、发育过程与外界环境刺激之间的关系, 达到存活、生长、发育、繁衍后代的目的。可见, 对于植物激素乙烯信号通路的研究具有重要的理论价值与实践意义。

## 1 乙烯信号通路概述

人们常使用“三重反应”(triple response)作为判断乙烯反应强弱程度的形态学标准, 该现象最初被

引用格式: 李文阳, 马梦迪, 郭红卫. 植物激素乙烯作用机制的最新进展. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 854-863

Li W Y, Ma M D, Guo H W. Advances in the action of plant hormone ethylene. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 854-863, doi: 10.1360/052013-284

Neljubov 描述为: 外源乙烯引起黑暗中生长的黄化苗出现明显的形态学变化, 包括根和下胚轴伸长受抑制、下胚轴横向生长加粗、顶端子叶弯曲生长加剧<sup>[3,4]</sup>(图 1A).

突变体筛选是研究信号转导最常用、最有力的手段. 目前, 对乙烯信号转导通路的相关研究大多是利用模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)进行的. 最初的乙烯突变体筛选都是依据拟南芥黄化苗“三重反应”这一形态学标准, 一方面挑选那些在有外源乙烯施加的情况下, 与野生型相比“三重反应”减弱甚至消失, 表现出部分甚至完全乙烯不敏感的突变体(图 1B), 如 *etr1*(ethylene resistant 1), *etr2*, *ein2*(ethylene insensitive 2), *ein3*, *ein4*, *ein5*, *ein6*, *hls1*(hookless 1), *eir1*(ethylene insensitive root 1); 另一方面挑选那些在没有外源乙烯施加的情况下组成型出现“三重反应”的突变体, 如乙烯过量生成突变体 *eto1*(ethylene overproduction 1), *eto2*, *eto3* 以及乙烯信号组成型活化突变体 *ctr1*(constitutive triple response 1)(图 1C); 还筛选到对外源乙烯及其合成前体 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)表现出超敏感突变体, 如 *eer1*(enhanced ethylene response 1), *ebf1*(EIN3-Binding F-Box 1)和 *ebf2*. 此外, 还有使用乙烯拮抗剂筛选对拮抗剂有反应的突变体 *ran*(response to antagonist)<sup>[3,4,6-9]</sup>.

经过上述分离、鉴定突变体之后, 通过图位克隆

获得相关基因, 之后通过遗传上位性分析发现, *ETR1*, *ETR2* 和 *EIN4* 以及它们的同源基因 *ERS1*(ethylene response sensor 1), *ERS2* 作用于 *CTR1* 基因的上游, *EIN2*, *EIN5*, *EIN6*, *EIN3* 和 *ERF1*(ethylene response factor 1)作用于 *CTR1* 的下游, 而 *EIN3* 作用于 *EIN2* 下游<sup>[10]</sup>. 因此, 得出拟南芥中乙烯信号转导通路的线性模型. 在一价铜离子( $Cu^+$ )的作用下乙烯分子与定位在内质网膜上的乙烯受体(*ETR1*, *ERS1*, *ETR2*, *ERS2* 和 *EIN4*)结合, 导致受体-*CTR1* 复合体失活. 失活后的受体-*CTR1* 复合体不再磷酸化下游信号组分 *EIN2*, 此时 *EIN2* 因不被降解而激活. 然后, *EIN2* 蛋白羧基端(*EIN2* CEND)被切割而游离并进入细胞核<sup>[11]</sup>, *EIN2* CEND 可能通过抑制 *EBF1/2* 蛋白介导的核心转录因子 *EIN3/EIL1* 的泛素化降解过程而促进 *EIN3/EIL1* 在细胞核内积累<sup>[12-14]</sup>, 接着 *EIN3/EIL1* 在转录水平激活 *ERF1* 等下游靶基因表达, 同时 *ERF1* 等作为转录因子还会激活更下游的靶基因表达, 于是大量的下游乙烯响应基因在转录水平被激活, 并由此而产生乙烯反应<sup>[10]</sup>(图 2). 需要指出的是, *EIN3/EIL1* 的靶基因包括 *EBF1/2*, 也就是说 *EIN3/EIL1* 在转录水平上激活 *EBF1/2* 表达, 那么这样就形成了一个 *EIN3/EIL1* 与 *EBF1/2* 之间的负反馈调控环路<sup>[12]</sup>. 此外, 5'→3'外切核酸酶 *EIN5* 会在 mRNA 水平抑制 *EBF1/2* 的表达, 从而稳定 *EIN3/EIL1* 蛋白水平<sup>[10]</sup>.

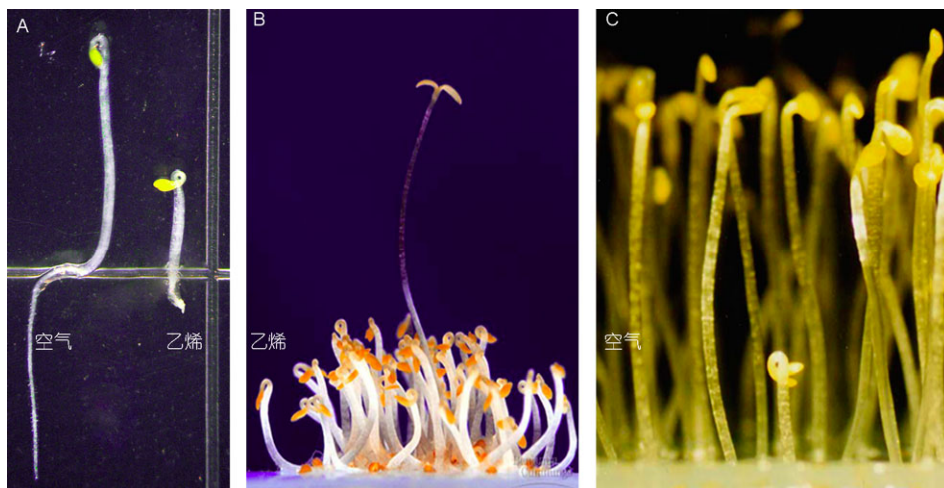


图 1 “三重反应”与突变体筛选

A: 生长在 MS 培养基(Murashige and Skoog medium)上的野生型拟南芥 Col-0 在空气和含  $10 \mu\text{L/L}$  乙烯的空气中避光生长 3 天的黄化苗所具有的表现; B: 存在外源乙烯(浓度  $5 \mu\text{L/L}$ )时避光生长 3 天的拟南芥黄化苗的表现, 其中最高的且完全没有“三重反应”的是乙烯不敏感突变体 *etr1-1*<sup>[3]</sup>; C: 空气中生长的拟南芥黄化苗, 中间最矮且具有“三重反应”的突变体为 *ctr1-1*<sup>[5]</sup>

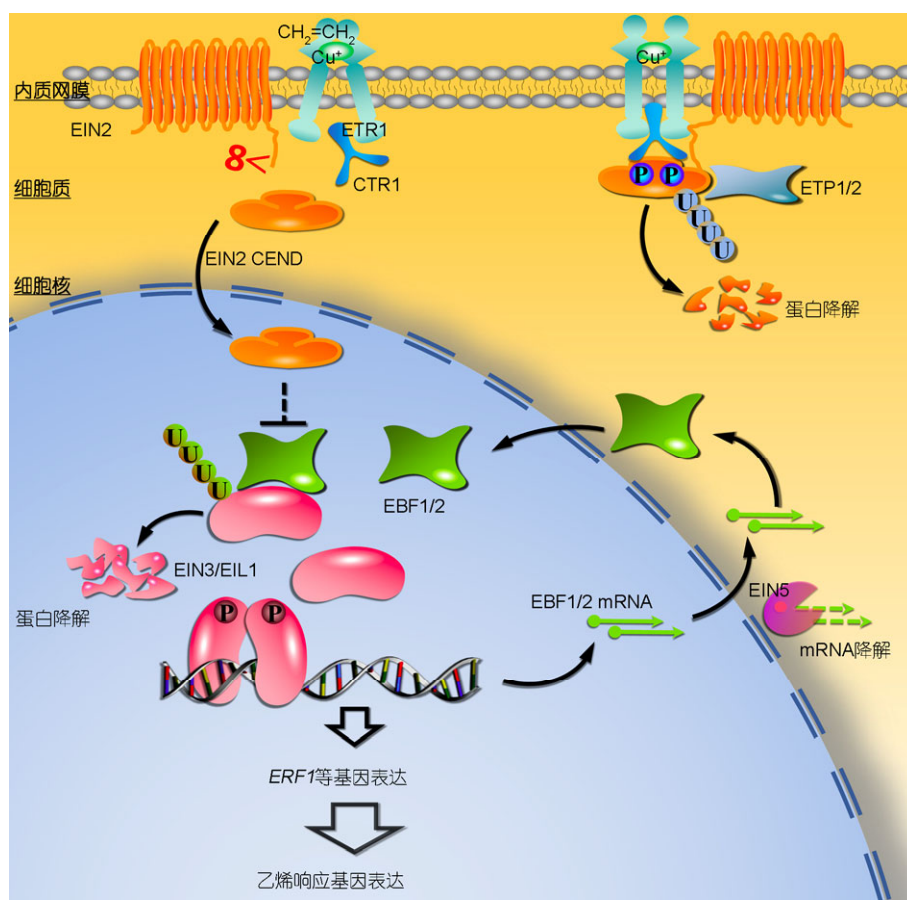


图2 乙烯信号转导通路线性模型示意图

没有外源乙烯时, 定位于内质网膜的受体处于有活性状态, ETR1-CTR1 复合体抑制同样定位于内质网膜的 EIN2 的活性, 此时 EIN2 蛋白的 Ser<sup>645</sup>, Ser<sup>924</sup> 处于磷酸化状态(蓝色实心圆形)并被 ETP1/2 介导的泛素/26S 蛋白酶体途径所降解; 而当有大量外源乙烯存在时, 乙烯与受体结合后导致 EIN2 不再被 CTR1 磷酸化, 此时有活性的 EIN2 蛋白的 C 端被剪切(红色“剪刀”)并从细胞质进入细胞核, 进而引发乙烯反应<sup>[15-17]</sup>. P: 示磷酸化; U: 示泛素化; 尖头直线表示正向调节, 平头直线表示负向调节; 直线的方向表示遗传上下游关系; 虚线表示生化功能机制未知

## 2 乙烯受体

乙烯信号转导途径是从乙烯分子与其受体相互识别、结合、作用起始的。经研究, 拟南芥乙烯受体家族有 5 个成员, 包括 ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 和 EIN4<sup>[3,7,18-22]</sup>。单个受体的功能缺失突变体均没有乙烯相关表型, 后来获得了三重突变体 *etr1 etr2 ein4*, 该三重突变体表现组成型的乙烯反应, 这使得人们认识到乙烯受体负调控乙烯反应且存在功能冗余, 可见受体是在没有乙烯或乙烯浓度较低时具有活性, 与乙烯结合后其活性丧失<sup>[7,20]</sup>。

从蛋白序列特点来看, 乙烯受体家族类似于在细菌和真菌中发现的双元组分信号系统(two-component system)。分析表明, 乙烯受体包括 3 个结构域:

乙烯结合结构域、组氨酸激酶结构域和反应调控结构域。生化实验表明, ETR1 蛋白以同源二聚体的形式存在, 其 N 端疏水性区域结合乙烯, 且需要一价铜离子作辅因子, 负责转运铜离子并维持其浓度梯度的蛋白是一个具有 P-type ATPase 活性的蛋白——RAN1(response to antagonist 1)<sup>[23-25]</sup>。此外, 还有一类在进化上非常保守的膜结合蛋白 RTE1(reversion to ethylene sensitivity 1), 其转录活性受乙烯调控, 通过与乙烯受体相互作用而调控乙烯反应<sup>[26]</sup>。

根据序列相似性可将乙烯受体分成两类。第一类(ETR1 和 ERS1)在其氨基端有 3 个疏水的跨膜结构域, 羧基端有一个非常保守的组氨酸激酶结构域; 第二类(ETR2, ERS2 和 EIN4)在氨基端有 4 个疏水的跨膜结构域, 它们的组氨酸激酶结构域保守性不强, 缺

乏一个或多个激酶活性必需的保守氨基酸。在第一类受体的功能缺失突变体, 即 *ers1 etr1* 双突变体中过表达任何一个第二类受体都不能恢复其表型; 而在第二类受体的功能缺失突变体 *etr2 ein4 ers2* 三重突变体中过量表达第一类受体也不能完全恢复第二类受体缺失的表型, 说明两个类型的受体之间功能部分互补且分别具有特定的功能。另外, ETR1, ETR2 和 EIN4 蛋白均在羧基端有一个接受器结构域, 而 ERS1 和 ERS2 蛋白则缺乏接受器。信号接受器缺失会增加乙烯敏感性, 而替换信号接受器的磷酸化位点会延迟受乙烯抑制效应的恢复, 说明信号接受器可以在某种程度上限定、修饰乙烯信号的强弱<sup>[18,27]</sup>。

乙烯受体定位于内质网膜, 与 CTR1 协同负调控乙烯反应<sup>[28]</sup>。认为在没有乙烯存在时受体具有组氨酸激酶活性, 能激活 CTR1, 进而抑制了下游组分的活性, 抑制了乙烯反应<sup>[29]</sup>。

### 3 负调控组分 CTR1

遗传分析发现, *ctr1 etr1* 双重突变体仍表现为 *ctr1* 突变体的组成型乙烯反应, 表明 CTR1 位于受体 ETR1 下游。CTR1 因与受体 ETR1 等相互作用而定位于内质网<sup>[28]</sup>。利用免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)分析在体内与 CTR1 结合的蛋白发现, 可以从内质网组分中纯化得到 ETR1 蛋白。与此相一致, 直接从受体双重突变体或者受体三重突变体的内质网组分中检测 CTR1, 发现此时内质网组分中的 CTR1 蛋白减少, 表明 CTR1 蛋白能与 ETR1 和 ERS1 蛋白的胞质部分相互作用<sup>[28]</sup>。

CTR1 基因编码一个具有 821 个氨基酸的蛋白, 其 C 端含有一个与 Raf 家族丝氨酸/苏氨酸激酶结构域类似的结构域。体外磷酸化实验表明, CTR1 具有丝/苏蛋白激酶活性, 活性特征类似于 Raf-1, 缺失 CTR1 N 端并没有提高激酶活性, 表明在体外其 N 端并不具备自主抑制激酶活性的功能。激酶活性丧失的 *ctr1* 突变体具有组成型的乙烯反应表型, 表明激酶活性为 CTR1 功能所必需<sup>[30]</sup>。

由于功能缺失突变体 *ctr1* 具有组成型的“三重反应”, 说明 CTR1 是乙烯信号转导通路中的负调控组分<sup>[31]</sup>。当乙烯不存在时, 受体活化处于有功能的状态, 可以与 CTR1 结合, CTR1 通过某种方式(N 端丝/苏蛋白激酶活性)抑制了下游的乙烯反应; 当乙烯存在时

受体失活, 不能与 CTR1 结合, CTR1 不再具有抑制下游组分的功能, 表现为乙烯反应。

### 4 正调控组分 EIN2

遗传上位分析表明, EIN2 位于 CTR1 的下游。EIN2 的功能缺失突变导致拟南芥完全乙烯不敏感, 这是到目前为止人们发现的唯一的单基因缺失突变导致完全乙烯不敏感的突变体, 说明 EIN2 是乙烯信号转导途径中的关键组分, 也说明 EIN2 是正调控组分<sup>[32]</sup>。

拟南芥中的 EIN2 于 1999 年被克隆, 其编码一个共有 1294 个氨基酸的跨膜蛋白。EIN2 蛋白 N 端(1~461 aa)含有 12 个跨膜结构域, 与阳离子转运蛋白 Nramp 相似度为 21%。Nramp 家族蛋白普遍存在于从细菌到人类的所有生物中, 其功能为转运二价阳离子, 不过目前尚未发现有力证据证明 EIN2 具有转运金属离子的能力。Alonso 等人<sup>[32]</sup>对所鉴定到的 25 个 EIN2 等位突变体的突变位点进行分析, 发现只要其 C 端 1134 位以后的氨基酸发生突变就会导致乙烯不敏感的表型, 说明 1134 位以后的 C 端功能非常重要。EIN2 蛋白 C 端(462~1294 aa)为亲水区, 含有一个 coiled-coil 结构域, 通常该结构域介导蛋白与蛋白之间的相互作用。在 EIN2 缺失突变体 *ein2-5* 中过量表达 EIN2 的 C 端(EIN2 CEND), 转基因植株表现出组成型乙烯反应, 且转基因植株中的乙烯反应基因表达不受外源乙烯的影响。不过, 暗生长的黄化苗却没有“三重反应”, 而当过量表达 EIN2 蛋白 N 端也并未发现转基因植株具有组成型乙烯反应或对乙烯表现出超敏感, 猜测 EIN2 的整个 N 端作为一个跨膜结构接受上游的信号, 而 C 端负责将上游信号向下传递。

有人利用烟草叶片瞬时表达系统, 观察荧光蛋白标记的 EIN2 发现其定位于内质网膜<sup>[33]</sup>。利用荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)发现, EIN2 的 C 端与 5 个乙烯受体均存在相互作用<sup>[33,34]</sup>。

那么定位于内质网膜上的 EIN2 又是如何将乙烯信号向下传递至细胞核内的呢? 最近有研究报道了关于 EIN2 蛋白 C 端如何激活乙烯信号转导的机制。没有乙烯时, EIN2 的两个位点 Ser<sup>645</sup> 和 Ser<sup>924</sup> 被 CTR1 磷酸化, 然后 EIN2 被泛素-蛋白酶体途径降解, 导致细胞内 EIN2 蛋白水平较低, 此时 EIN3/EIL1 被

EBF1/2 介导的蛋白酶体途径降解, 下游乙烯响应基因不表达, 植物不产生乙烯反应; 而当乙烯存在时, 其与受体 ETR1 结合导致 ETR1-CTR1 复合体失活, 此时 EIN2 不再被 CTR1 磷酸化, 同时其 C 端被蛋白酶以某种方式剪切下来, 然后 C 端进入细胞核, EIN2 的 C 端能够解除 EBF1/2 对 EIN3/EIL1 的抑制, 使得 EIN3/EIL1 大量积累并激活下游基因表达, 产生乙烯反应<sup>[11,15-17]</sup>。

由上面分析不难看出, 在没有乙烯时, 乙烯信号通路的上游组分(包括受体、负调控组分 CTR1 和正调控组分 EIN2)均定位在 ER 膜上, 这是非常有趣的现象, 可能有利于植物响应乙烯分子并快速激活下游乙烯反应。从蛋白与蛋白相互作用的层面看, 受体负责识别 EIN2 蛋白, CTR1 作为蛋白激酶负责磷酸化底物 EIN2 蛋白, 则受体-CTR1 复合体共同调控 EIN2 可能是一种精细而准确的调控方式。

虽然 EIN2 蛋白的 C 端可以进入细胞核并激活乙烯反应, 但是在 *ein2-5* 突变体中过量表达 EIN2 的 C 端却并未导致暗生长的黄化苗产生“三重反应”。分析乙烯处理时 EIN2 蛋白 C 端的亚细胞定位变化, 发现其在细胞质内会有点状聚集, 暗示 EIN2 的 C 端在细胞质中可能具有重要的功能, 这或许是其介导上游乙烯信号向下传递的另一种方式<sup>[15-17]</sup>。通过转基因过表达的 C 端与因乙烯激活 EIN2 而剪切下来的 C 端在蛋白修饰上可能有所不同, 所以功能不完全相同。过表达的 EIN2 C 端可能只是替代了剪切下来的 C 端的一部分功能, 所以转基因过表达的 C 端只能引起部分的乙烯反应。

此外, Qiao 等人<sup>[35]</sup>利用酵母双杂交技术, 大规模筛选与 EIN2 相互作用的蛋白发现了负责 EIN2 降解的 F-box 蛋白: ETP1(EIN2 targeting protein 1)和 ETP2。生化实验表明, 在细胞内乙烯水平较低时, ETP1/2 通过 26S 蛋白酶体途径降解 EIN2, 导致 EIN2 蛋白含量较低。当外源施加乙烯时, ETP1/2 的蛋白水平下降, EIN2 蛋白因不再被降解而逐渐积累, 并激活乙烯信号。遗传及生化分析发现, 与拟南芥野生型 Col-0 相比, *etr1-1* 突变体内 EIN2 蛋白水平较低, *ctr1-1* 突变体内 EIN2 蛋白水平较高, *ein3 eil1* 突变体内蛋白水平不变, 表明乙烯对 ETP1/2 的蛋白水平及 EIN2 蛋白水平的影响不依赖于 EIN3/EIL1, 而是依赖于上游组分 ETR1 和 CTR1。说明乙烯通过抑制蛋白降解过程而激活 EIN2, 并引起乙烯反应。

## 5 核心转录调控因子 EIN3/EIL1

乙烯信号转导的下游事件是在细胞核内发生的基因转录调控, 由植物所特有的核蛋白 EIN3/EIL1 所介导<sup>[36]</sup>。在 *ein2* 功能缺失突变体中过量表达 EIN3 导致植物组成型乙烯应答, 表明 EIN3 在乙烯信号途径中处于 EIN2 的下游。 *ein3* 功能缺失突变体表现乙烯部分不敏感, 说明 EIN3 是一个乙烯反应的正调节因子<sup>[36]</sup>。

EIN3 属于 EIL 转录因子家族, 拟南芥中有 5 个 EIN3 类似蛋白 EILs(EIN3-like proteins), 分别为 EIL1, EIL2, EIL3, EIL4 和 EIL5, 其中 EIL1 与 EIN3 的相似度最高。过量表达 EIN3 或 EIL1 的植株表现出组成型乙烯反应。功能缺失突变 EIN3 或 EIL1, 表现出部分的乙烯不敏感, 表明 EIN3 家族成员之间存在功能冗余。双突变体 *ein3 eil1* 表现出完全的乙烯不敏感, 说明 EIL 转录因子家族 5 个成员中的 EIN3/EIL1 在乙烯信号通路中功能最重要<sup>[36]</sup>。

EIN3 编码一个由 628 个氨基酸组成的转录因子。生化实验及结构生物学的证据表明, EIN3/EIL1 可以划分为 3 个基本的结构域: DNA 结合结构域(80~359 aa)、二聚体化结构域(113~257 aa)和 C 端。其中, DNA 结合结构域识别并结合 EBS(EIN3-binding site: 5'-ATGTA-3'); C 端负责蛋白-蛋白相互作用, 比如, 与 EBF1/2 交互; 另外, 来自番茄(*Lycopersicon esculentum*)的研究表明, 区段 92~95 aa 负责磷酸化且对二聚体化亦有影响<sup>[36-39]</sup>。

凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)表明, EIN3/EIL1/EIL2 是以同源二聚体形式与 *ERF1*(ethylene response factor 1)基因的启动子结合, 激活该基因的转录, 称此过程为初级乙烯应答反应。 *EDF1/2/3/4*(ethylene response DNA binding factor 1/2/3/4)也是 EIN3 的靶基因, 代表乙烯反应的一个分支。 *ERF1* 和 *EDF1/2/3/4* 又可分别与许多乙烯和病原诱导基因启动子的 GCC-box 结合, 进而调控次级乙烯反应基因的表达<sup>[37,40]</sup>。

目前为止, 人们发现大部分乙烯相关的生物学过程都是通过核心转录因子 EIN3/EIL1 调控下游靶基因实现的。 EIN3/EIL1 可以激活很多靶基因, 涉及到诸如乙烯反应<sup>[10]</sup>、光形态建成<sup>[41-43]</sup>、根的发育<sup>[44]</sup>、生长素的合成与运输<sup>[45]</sup>、细胞分裂素反应<sup>[46]</sup>、水杨

酸的合成<sup>[47]</sup>、冷刺激<sup>[46]</sup>、盐胁迫<sup>[48]</sup>、病原微生物胁迫<sup>[47,49]</sup>、铁元素代谢<sup>[50]</sup>等生物学过程。可见, EIN3/EIL1 不仅仅激活乙烯反应响应基因表达, 还参与到其他生物学过程, 这些现象表明转录因子 EIN3/EIL1 是植物体内整个转录调控网络中一个非常重要的节点, 其具有整合信号、调控基因表达网络的作用。

## 6 乙烯通过抑制 EBF1/2 而稳定 EIN3/EIL1

从上面的叙述可见, EIN3/EIL1 作为转录因子可以激活很多基因的表达, 具有非常重要的作用。那么上游乙烯信号是如何调控 EIN3/EIL1 的? *EIN3/EIL1* 在转录水平上不受乙烯调控, 属于转录后调控基因<sup>[36]</sup>。当没有乙烯时, EIN3 与 EIL1 迅速地被 2 个 F-box 蛋白 EBF1(EIN3-binding F-box protein)和 EBF2 介导的 26S 泛素/蛋白酶体途径降解; 而乙烯存在时, EIN3 蛋白与 EIL1 蛋白稳定性增加并不断积累。EBF1 和 EBF2 中的任一个缺失突变都可以导致 EIN3 蛋白与 EIL1 蛋白水平增加, 增强乙烯反应。功能不完全缺失的 *ebf1 ebf2* 双突变体显示组成型的乙烯反应, 功能完全缺失的 *ebf1 ebf2* 双突变体致死。而过量表达 EBF1 或 EBF2 均表现出乙烯不敏感的表型<sup>[12,13]</sup>。说明 EBF1 和 EBF2 促进 EIN3/EIL1 蛋白降解而乙烯诱导 EIN3/EIL1 蛋白积累。

An 等人<sup>[14]</sup>研究发现, *ein3 ebf1 ebf2* 三重突变体中虽然 EIL1 蛋白大量积累, 且该突变体具有组成型乙烯反应的表型, 但其并不能响应外源乙烯; 生化实验表明, 乙烯可以促进 EBF1/2 蛋白的降解, 且此过程依赖于 EIN2, 说明上游乙烯信号是通过抑制 EBF1/2 蛋白的积累而稳定 EIN3/EIL1, 使其蛋白因不被降解而大量积累, 最终激活下游乙烯响应基因表达<sup>[10,14,51]</sup>。虽然如此, EIN2 如何解除 EBF1/2 对 EIN3/EIL1 的抑制的具体生化过程仍然需要进一步研究。

另一方面, 乙烯可以明显诱导 EBF2 的转录, 而对于 EBF1 的转录激活比较弱<sup>[12,13,52,53]</sup>。 *ein3* 突变体中 EBF1 和 EBF2 转录水平均明显下降, 而 EIN3 过表达的植株中 EBF1 和 EBF2 转录水平却明显上调, 说明 EBF1 和 EBF2 的表达均受 EIN3 的调控。 EMSA 实验表明, EIN3 可以结合到 EBF2 启动子区的 5'-TACAT-3'序列上, 直接激活其转录。可见, EIN3/EIL1 与 EBF1/2 之间的直接相互调控, 形成了一个负

反馈回路<sup>[12,13,52,53]</sup>。

由于 EBF1/2 的蛋白水平直接决定了 EIN3/EIL1 的蛋白水平, 所以对 EBF1/2 的调控会影响 EIN3/EIL1 的蛋白水平。 一个重要的发现是 5'→3'外切核酸酶 EIN5(ethylene-insensitive 5)可以调控乙烯信号转导通路。 遗传分析表明, *EIN5* 位于 *EBF1* 和 *EBF2* 的上游, Tiling array 与 Northern 分析均表明, 在 *ein5* 突变体中 *EBF1* 和 *EBF2* 的 mRNA 水平明显上调; 生化分析表明, 乙烯诱导的 EIN3 蛋白积累需要 EIN5, 可见 EIN5 是通过促进 EBF1/2 mRNA 的降解而降低细胞内 EBF1 和 EBF2 的蛋白水平, 导致 EIN3 蛋白积累, 进而调控乙烯反应<sup>[54,55]</sup>。

## 7 JAZ, DELLA 等抑制子调控 EIN3/EIL1 的转录活性

转录因子 EIN3/EIL1 除了蛋白水平受调控外, 其转录活性也受到调控。 近期有报道发现, EIN3/EIL1 与植物激素茉莉酸信号通路中重要的转录抑制子 JAZ(jasmonatezim-domain)蛋白直接结合, 而且 EIN3/EIL1 与其靶基因 *ERF1* 启动子区 DNA 的结合能力被 JAZ 蛋白抑制。 研究还发现, JAZ1/3/9 与组蛋白去乙酰酶 6(histone deacetylase 6, HDA6)之间存在直接的蛋白-蛋白相互作用。 更进一步, EIN3/EIL1 与 HDA6 之间也存在直接蛋白相互作用, 并且茉莉酸处理后可以抑制这种相互作用<sup>[44]</sup>。 由此推测, 转录抑制子 JAZ 招募组蛋白去乙酰化酶 HDA6 与 EIN3/EIL1 发生相互作用, 抑制 EIN3/EIL1 的 DNA 结合活性并影响 EIN3/EIL1 靶基因启动子区 DNA 组蛋白的乙酰化状态, 进而调控 EIN3/EIL1 下游靶基因的表达(图 3)。 此外, 有报道 EIN3/EIL1 的 DNA 结合结构域可以被赤霉素信号通路中的关键抑制子 DELLA 蛋白所识别结合(图 3), 且 EIN3/EIL1 对其靶基因 *HLS1* 的转录激活调控受到 DELLA 蛋白的抑制<sup>[56]</sup>。 由上述现象可见, EIN3/EIL1 作为转录因子其转录活性受到严格调控。

## 8 展望

虽然气体激素乙烯结构非常简单, 但其对植物发育以及适应性反应起着非常重要的作用。 最初, 人

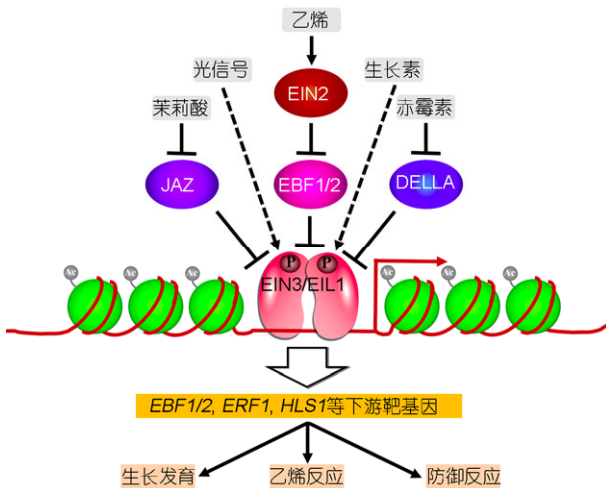


图3 EIN3/EIL1 作为网络节点整合不同信号通路

EIN3/EIL1 不仅可以调控 *EBF1/2*, *ERF1* 等乙烯响应基因的表达<sup>[10]</sup>, 还可以调控光形态建成<sup>[41-43]</sup>、根的发<sup>[44]</sup>、生长素的合成与运输<sup>[45]</sup>、细胞分裂素信号反应<sup>[46]</sup>、水杨酸的合成<sup>[47]</sup>、冷刺激<sup>[46]</sup>、盐胁迫<sup>[48]</sup>、病原微生物胁迫<sup>[47,49]</sup>、铁元素代谢<sup>[50]</sup>等生物学过程相关基因的表达; 乙烯信号<sup>[12,13]</sup>、葡萄糖信号<sup>[57]</sup>、光信号<sup>[43]</sup>、生长素信号<sup>[45]</sup>等通路可以影响 EIN3/EIL1 的蛋白稳定性; 茉莉酸信号通路的转录抑制子 JAZ<sup>[44]</sup>、赤霉素信号通路的转录抑制子 DELLA<sup>[56]</sup>等可以调控 EIN3/EIL1 与 DNA 的结合能力, 即转录活性。粉红色椭圆形代表 EIN3/EIL1 蛋白, 且以二聚体形式结合在靶基因的启动子区; 红色实线代表 DNA; 绿色实体圆表示组蛋白; Ac 代表组蛋白乙酰化; P 表示磷酸化; 尖头直线表示正向调节, 平头直线表示负向调节, 虚线表示生化功能机制未知

们研究乙烯信号通路主要采用正向遗传学的手段, 通过突变体筛选而分离、鉴定信号通路中的各个组分。近年来, 生化机制方面的成果大大地丰富和扩展了人们对乙烯信号转导通路的认识。目前, 关于 EIN2 的具体生化功能是乙烯信号转导研究领域内备受关注的焦点。下一步, EIN2 CEND 剪切的生化机制, 以及 EIN2 CEND 如何解除 EBF1/2 对 EIN3/EIL1 的抑制的具体生化过程等问题将会成为研究热点。

在最初的线性信号转导模型中, 认为 EIN3/EIL1 主要在乙烯反应中行使调控功能。近年来, 随着越来越多的 EIN3/EIL1 下游靶基因被发现, 人们逐渐认识到 EIN3/EIL1 还可以调控其他信号通路。同时, EIN3/EIL1 蛋白稳定性会受到诸如 EBF1/2 介导的乙烯信号通路<sup>[12,13]</sup>、生长素<sup>[45]</sup>、葡萄糖<sup>[57]</sup>、冷刺激<sup>[46]</sup>、光信号<sup>[43]</sup>等通路的影响。此外, 许多转录调节因子如 DELLA<sup>[56]</sup>和 JAZ<sup>[44]</sup>可以抑制 EIN3/EIL1 的转录活性。以上内容说明, EIN3/EIL1 具有整合、调节多层次复杂信号网络的功能。越来越多的证据表明, EIN3/EIL1 作为整个信号网络中一个重要的节点, 整合并调控信号通路之间的相互作用。因此, 从信号网络节点的角度出发, 对 EIN3/EIL1 介导不同信号通路之间的“对话”(cross-talk)、影响植物生长发育以及应答环境刺激等的精细调控过程的研究将会是另一个热点。

参考文献

- 1 Kepsinski S, Leyser O. SCF-mediated proteolysis and negative regulation in ethylene signaling. *Cell*, 2003, 115: 647-648
- 2 Burg S P. Ethylene in plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 591-597
- 3 Bleeker A B, Estelle M A, Somerville C, et al. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 1988, 241: 1086-1089
- 4 Ecker J R. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 1995, 268: 667-675
- 5 Kieber J J, Rothenberg M, Roman G, et al. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 1993, 72: 427-441
- 6 Guzmán P, Ecker J R. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 1990, 2: 513-523
- 7 Hua J, Meyerowitz E M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 1998, 94: 261-271
- 8 Bleeker A B, Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 1-18
- 9 Alonso J M, Stepanova A N, Solano R, et al. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2992-2997
- 10 Zhao Q, Guo H W. Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Mol Plant*, 2011, 4: 626-634
- 11 Ji Y, Guo H. From endoplasmic reticulum (ER) to nucleus: EIN2 bridges the gap in ethylene signaling. *Mol Plant*, 2013, 6: 11-14
- 12 Guo H, Ecker J R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 2003, 115: 667-677
- 13 Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, et al. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F-box

- proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 2003, 115: 679–689
- 14 An F, Zhao Q, Ji Y, et al. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2010, 22: 2384–2401
- 15 Ju C, Yoon G M, Shemansky J M, et al. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 19486–19491
- 16 Qiao H, Shen Z, Huang S S, et al. Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, 2012, 338: 390–393
- 17 Wen X, Zhang C, Ji Y, et al. Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res*, 2012, 22: 1613–1616
- 18 Chang C, Kwok S F, Bleecker A B, et al. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 1993, 262: 539–544
- 19 Hua J, Chang C, Sun Q, et al. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* *ERS* gene. *Science*, 1995, 269: 1712–1714
- 20 Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, et al. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1321–1332
- 21 Sakai H, Hua J, Chen Q G, et al. *ETR2* is an *ETR1-like* gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5812–5817
- 22 Hall A E, Findell J L, Schaller G E, et al. Ethylene perception by the ERS1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1449–1458
- 23 Binder B M, Rodriguez F I, Bleecker A B. The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2010, 285: 37263–37270
- 24 Schaller G E, Ladd A N, Lanahan M B, et al. The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem*, 1995, 270: 12526–12530
- 25 Rodriguez F I, Esch J J, Hall A E, et al. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 283: 996–998
- 26 Resnick J S, Wen C K, Shockey J A, et al. *REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1*, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7917–7922
- 27 Chang C, Meyerowitz E M. The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: a eukaryotic two-component signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4129–4133
- 28 Gao Z, Chen Y F, Randlett M D, et al. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 34725–34732
- 29 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
- 30 Huang Y, Li H, Hutchison C E, et al. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2003, 33: 221–233
- 31 Kieber J J, Rothenberg M, Roman G, et al. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 1993, 72: 427–441
- 32 Alonso J M, Hirayama T, Roman G, et al. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 284: 2148–2152
- 33 Bisson M M, Bleckmann A, Allekotte S, et al. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochem J*, 2009, 424: 1–6
- 34 Bisson M M, Groth G. New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 164–166
- 35 Qiao H, Chang K N, Yazaki J, et al. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2009, 23: 512–521
- 36 Chao Q, Rothenberg M, Solano R, et al. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 1997, 89: 1133–1144
- 37 Solano R, Stepanova A, Chao Q, et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev*, 1998, 12: 3703–3714
- 38 Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, et al. Solution structure of the major DNA-binding domain of *Arabidopsis thaliana* ethylene-insensitive3-like3. *J Mol Biol*, 2005, 348: 253–264
- 39 Li J, Li Z, Tang L, et al. A conserved phosphorylation site regulates the transcriptional function of ETHYLENE-INSENSITIVE3-like1 in tomato. *J Exp Bot*, 2012, 63: 427–439
- 40 Stepanova A N, Alonso J M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12:



- 548–555
- 41 Zhong S, Shi H, Xi Y, et al. Ethylene is crucial for cotyledon greening and seedling survival during de-etiolation. *Plant Signal Behav*, 2010, 5: 739–742
- 42 Zhong S, Shi H, Xue C, et al. A molecular framework of light-controlled phytohormone action in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2012, 22: 1530–1535
- 43 Zhong S, Zhao M, Shi T, et al. EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21431–21436
- 44 Zhu Z, An F, Feng Y, et al. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 12539–12544
- 45 He W, Brumos J, Li H, et al. A small-molecule screen identifies L-kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 3944–3960
- 46 Shi Y, Tian S, Hou L, et al. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of *CBF* and type-A *ARR* genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012; 24: 2578–2595
- 47 Chen H, Xue L, Chintamanani S, et al. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 2527–2540
- 48 Zhang L, Li Z, Quan R, et al. An AP2 domain-containing gene, *ESE1*, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 157: 854–865
- 49 Boutrot F, Segonzac C, Chang K N, et al. Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14502–14507
- 50 Lingam S, Mohrbacher J, Brumbarova T, et al. Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 1815–1829
- 51 Guo H. Understanding the mode of phytohormones' action in plants. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 1062–1063
- 52 Gagne J M, Smalle J, Gingerich D J, et al. *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6803–6808
- 53 Konishi M, Yanagisawa S. Ethylene signaling in *Arabidopsis* involves feedback regulation via the elaborate control of *EBF2* expression by EIN3. *Plant J*, 2008, 55: 821–831
- 54 Olmedo G, Guo H, Gregory B D, et al. *ETHYLENE-INSENSITIVE5* encodes a 5'–3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 13286–13293
- 55 Potuschak T, Vansiri A, Binder B M, et al. The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18: 3047–3057
- 56 An F, Zhang X, Zhu Z, et al. Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Cell Res*, 2012, 22: 915–927
- 57 Yanagisawa S, Yoo S D, Sheen J. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 2003, 425: 521–525

## Advances in the Action of Plant Hormone Ethylene

LI WenYang, MA MengDi & GUO HongWei

*State Key Laboratory of Protein and Plant Gene Research, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China*

The simple gaseous phytohormone ethylene influences an extensive array of developmental processes and stress-resistance responses in plants. Based on molecular genetics studies, a nearly linear ethylene signaling pathway from endoplasmic reticulum (ER) membrane-bound receptors to nuclear-localized transcription factors has been established in the model plant *Arabidopsis* during the past two decades. In this review, we firstly summarize the approaches used to study ethylene signal transduction and depict the overall picture of ethylene signaling pathway. Then, we focus on the latest discovery of the cleaved EIN2 carboxyl terminus (CEND) translocating from ER membrane to the nucleus and promoting the accumulation of EIN3/EIL1 by repressing the activity of EBF1/2. We also propose that EIN3/EIL1 act as a hub in plant signaling networks that senses a broad range of stimuli and integrates these stimuli to shape plant growth, development and stress resistance. A collection of regulators, such as JAZ and DELLA proteins, have been identified recently to modulate the functions of EIN3 and EIL1 by different mechanisms including protein stability and transcriptional activity. In the end, several interesting questions regarding ethylene action are raised and briefly discussed.

**plant hormone, ethylene, signal transduction, EIN2, EIN3/EIL1, EBF1/2**

doi: 10.1360/052013-284