

水稻糊粉层蛋白酶体参与种子萌发的研究

陈文奕, 陈惠萍*

海南大学生命科学学院, 海南海口 570228

摘 要: 种子萌发是植物进入营养生长阶段的关键性环节, 在水稻 (*Oryza sativa* L.) 种子萌发过程中, 糊粉层会合成并分泌一系列的酸性水解酶 (如 α -淀粉酶、蛋白酶) 用于降解胚乳中的贮藏物质, 为水稻幼苗生长提供营养。水稻种子贮藏蛋白的降解离不开蛋白酶体及蛋白酶的作用。为探究 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体及其亚基 PBA1 参与 GA 对萌发水稻种子糊粉层中贮藏蛋白的调节过程, 本研究以水稻杂交种特优 128 为试验材料, 通过采用酶联免疫吸附技术、实时荧光定量 PCR 技术等方法, 检测 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体及 PBA1 的活性和 *OsPBA1* 转录水平, 以及总蛋白含量的变化。结果表明: GA 明显促进糊粉层细胞中贮藏蛋白的降解, 加快水稻种子的萌发; 而在 GA 合成受阻时, 糊粉层细胞中贮藏蛋白的降解进程延缓, 从而延迟水稻种子的萌发。正常培养条件下, 水稻种子糊粉层中 26S 蛋白酶体活性和 20S 蛋白酶体活性的峰值分别出现在 6 d 和 7 d, 而 *OsPBA1* 表达水平及 PBA1 活性则在 5 d 和 8 d 均呈现峰值。进一步研究表明, GA 可以诱导 PBA1、20S 蛋白酶体及 26S 蛋白酶体的活性, 从而加快种子萌发的进程; 而在 26S 蛋白酶体活性抑制剂 MG132 处理下, 抑制了萌发水稻种子的生长, 但提高了 20S 蛋白酶体和 PBA1 的活性。以上研究初步揭示了 26S 蛋白酶体在 GA 调节水稻种子糊粉层贮藏蛋白降解中的作用及其对种子萌发的影响。

关键词: GA; 蛋白酶体; 水稻糊粉层; 贮藏蛋白; 种子萌发

中图分类号: S511

文献标志码: A

Proteasomes Involved in Seed Germination in Rice Aleurone Layer

CHEN Wenyi, CHEN Huiping*

College of Life Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Seed germination is a key link for plants to enter the vegetative growth stage. During the germination of rice (*Oryza sativa* L.) seeds, the aleurone layers synthesize and secrete a series of acid hydrolases (such as α -amylase, protease) to degrade the storage substances in the endosperm and provide nutrition for the growth of rice seedlings. The degradation of storage proteins is inseparable from the role of proteasome and protease in rice seeds. In order to explore the involvement of 26S proteasome, 20S proteasome and its subunit PBA1 in the regulation of GA on the storage proteins in the aleurone layers of germinated rice seeds, the rice hybrid Teyou 128 was used as the experimental material. The activity of 26S proteasome, 20S proteasome and PBA1, the transcription level of *OsPBA1* and the change of total protein content were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and real-time fluorescence quantitative PCR. GA significantly promoted the degradation of storage proteins in aleurone cells and accelerated the germination of rice seeds. When GA synthesis was blocked, the degradation process of storage protein in aleurone layer cells was delayed, thus delaying the germination of rice seeds. Under normal culture conditions, the peak values of 26S proteasome activity and 20S proteasome activity in the aleurone layers of rice seeds appeared at 6 d and 7 d, respectively, while the *OsPBA1* expression level and PBA1 activity showed peaks at 5 d and 8 d. Further studies showed that GA could induce the activity of PBA1, 20S proteasome and 26S proteasome, thereby accelerating the process of seed germination. The 26S proteasome activity inhibitor MG132 inhibited the growth of germinated rice seeds, but increased the activity of 20S proteasome and PBA1. The above studies preliminarily revealed the role of 26S proteasome in GA regulating the deg-

收稿日期 2023-01-29; 修回日期 2023-02-19

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960453)。

作者简介 陈文奕 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物生长发育与调控。*通信作者 (Corresponding author): 陈惠萍 (CHEN Huiping), E-mail: hpchen@sina.com。

radation of storage proteins in rice aleurone layers and its effect on the germination of rice seeds.

Keywords: GA; proteasome; aleurone layers; storage protein; seed germination

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.04.011

禾谷类种子的胚乳由淀粉性胚乳及外层的糊粉层构成。成熟的糊粉层细胞仍具有活性,其形态为规则的多边形,富含蛋白质、矿物质、淀粉和维生素等物质^[1-2]。水稻糊粉层细胞内的贮藏蛋白以清蛋白及球蛋白为主,大多数积累在液泡内从而形成蛋白质贮藏液泡(protein storage vacuoles, PSVs)^[3-4]。赤霉素(gibberellic acid, GA)是植物生长和发育过程中重要的调节激素。在禾谷类种子萌发过程中,胚会释放出GA诱导糊粉层细胞合成一系列的酸性水解酶(如 α -淀粉酶、核酸酶、蛋白酶等)^[5-6],这些酶会在中央大液泡破裂后释放,并用于降解淀粉性胚乳中贮藏的营养物质,为种子萌发提供营养^[7]。与此同时,糊粉层细胞内的贮藏蛋白在水稻种子萌发过程被胚生长所利用^[8]。

26S蛋白酶体是一种依赖ATP,并能水解泛素化蛋白的蛋白酶复合物,主要负责细胞质和细胞核中的蛋白质降解,对于蛋白质稳态至关重要^[9-10]。26S蛋白酶体控制着植物体内平衡的各种过程,包括植物发育、光反应、细胞分裂及响应植物激素反应等^[9, 11-12],并且与植物防御相关^[13],其功能的丧失会显著影响植物的生长^[14]。研究表明,26S蛋白酶体是种子萌发过程中所必需的,它能降解ABA信号传导及合成的正调节因子,从而打破种子休眠并促进萌发^[15];以及维持拟南芥地上部分器官的大小及细胞增殖速率等^[16]。

DELLA蛋白是GA信号转导的核心,在植物生长调控中充当生长抑制因子^[17-18]。外源GA可通过诱导26S蛋白酶体降解DELLA蛋白来促进大麦幼苗的生长^[19],而GA生物合成抑制剂及26S蛋白酶体抑制剂均能抑制DELLA蛋白的降解^[20]。由此可见,GA信号传导在26S蛋白酶体介导的蛋白质降解中起着重要的作用。

26S蛋白酶体由2个不同功能的亚复合体组成,即20S蛋白酶体和19S调节颗粒^[21]。20S蛋白酶体是一个桶形结构,由2个相同的外 α 环和2个相同的内 β 环堆叠组成,使20S蛋白酶体具有 α_1 - β_1 - β_1 - β_1 - α_1 - β_1 - β_1 - β_1 - α_1 - β_1 - β_1 - β_1 - α_1 - β_1 - β_1 - β_1 - α_1 的双重对称性结构,14个 α 亚基和14个 β 亚基的正确组装确保了20S蛋白酶体的

完整性^[22-24]。20S蛋白酶体上含有 β_1 、 β_2 和 β_5 三种蛋白酶活性位点,并形成蛋白水解室,而19S调节颗粒的作用是识别泛素化蛋白,并将其转运到20S蛋白酶体的蛋白水解室内进行降解^[25-26]。近年的研究发现,多种蛋白质可以被20S蛋白酶体本身降解,而不需要与19S调节颗粒结合后发挥其调节作用^[27-28]。20S蛋白酶体介导的蛋白质降解过程不依赖泛素化及ATP,在氧化应激后,20S蛋白酶体活性升高,从而快速降解氧化损伤的蛋白质^[29-30]。20S蛋白酶体 β 亚基1(20S proteasome β subunit1, PBA1)是一种具有催化活性的半胱氨酸蛋白酶,已证实其参与PCD的发生^[31]。在银诱导葡萄悬浮细胞的PCD过程中,PBA1专一性抑制剂AC-APnLD-CHO可使26S蛋白酶体功能受损,伴随着多泛素蛋白的增加^[32]。

本研究通过借助酶联免疫吸附技术和实时荧光定量PCR技术等,探究蛋白酶体及其亚基PBA1参与GA对萌发水稻种子糊粉层中贮藏蛋白的调节过程,为深入研究GA调节泛素-蛋白酶体系统介导水稻糊粉层中蛋白质降解的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为水稻(*Oryza sativa* L.)杂交种特优128,购自海南省儋州市种子公司。

1.2 方法

1.2.1 材料培养 选取去除颖壳后的水稻种子,用0.1%高锰酸钾消毒10 min,用纯水将其洗干净后,分别置于添加不同处理液的培养皿中。根据实验需求,萌发水稻种子分别在浸泡1~9 d后取出,使用手术刀片分离水稻种子糊粉层用于检测相应的指标。

本研究设置2个处理组。处理1:(1)CK(纯水);(2)GA(50 $\mu\text{mol/L}$);(3)GA合成抑制剂烯效唑(Uniconazole, Uni, 75 $\mu\text{mol/L}$)。处理2:(1)CK(DMSO);(2)26S蛋白酶体活性抑制剂MG132(50 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.2 植物糊粉层总蛋白提取及含量测定 本实

验采用 Solarbio 公司的植物蛋白提取试剂盒 (BC3720) 进行水稻糊粉层总蛋白的提取。称取 100 mg 的水稻糊粉层放入液氮中速冻 (最好过夜), 取出糊粉层于含液氮的研钵中研磨成粉末, 加入 1 mL 裂解液后, 置于 4 °C 裂解 20 min。4 °C, 14 000 r/min 离心 30 min 后收集上清, 上清即为水稻糊粉层总蛋白。采用 BCA 法测定上清液中总蛋白含量, 每组样品重复 3 次。

1.2.3 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体和 PBA1 活性测定 称取糊粉层 100 mg, 使用液氮研磨成粉末, 加入 900 μ L 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.2~7.4), 在 4 °C 下 5000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液至预冷离心管中备用。本试验分别采用江苏酶免实业有限公司的植物 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体及 20S 蛋白酶体 β 亚基 1 (PBA1) 的 ELISA 检测试剂盒进行检测, 使用全自动酶标分析仪 (AMR-100) 测定其在 450 nm 处的吸光度。分别将原倍标准品稀释后, 制作出 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体及 PBA1 的标准曲线, 依照其标准曲线计算出酶活性。每组样品重复 3 次。

1.2.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成 根据实验要求选取水稻糊粉层 50 mg, 采用天根生化公司产品 (DP441) 植物总 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取, 按照试剂盒说明书进行操作, 并稍加修改。制取 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳 15 min, 利用凝胶成像分析系统检测所提取的 RNA 完整性。使用微量核酸检测仪检测 RNA 纯度及浓度, 然后将 RNA 定量为 100 ng/ μ L, 以进行逆转录反应。

以定量的水稻总 RNA 为模板, 使用 TaKaRa 公司的产品 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A) 合成 cDNA。总反应体系为 20 μ L。**1.2.5 实时荧光定量 PCR** 本实验采用 biosharp 公司的产品荧光定量试剂盒 SYBR Green Master Mix (BL705A)。以 cDNA 为模板, *OsActin* 为内参基因, *OsPBA1* 为目的基因检测的表达水平, 每个样品重复 3 次。相应基因引物序列如表 1 所示。

1.2.6 胚根长和胚芽长的测量 在不同处理中随机选取培养 5 d 的萌发水稻种子 10 粒, 使用直尺测量其胚根长度和胚芽长度, 并取 3 次独立实验所测量的平均值进行差异显著性分析。

1.3 数据处理

实验数据采用 Excel 软件进行处理, 并用 SPSS 23.0 软件进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in this study

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列 (5'-3') Primers sequence (5'-3')
<i>OsActin</i>	NM_001057621	F: TCTCTCTGTATGCCAGTGGTCGT R: TCATAGTCCAGGGCGATGTAGG
<i>OsPBA1</i>	XM_015795772	F: GGCTCATCAATTATTGCACTG R: GCTCCACGCTCTTGTATCG

2 结果与分析

2.1 水稻种子萌发过程中糊粉层细胞总蛋白含量的变化

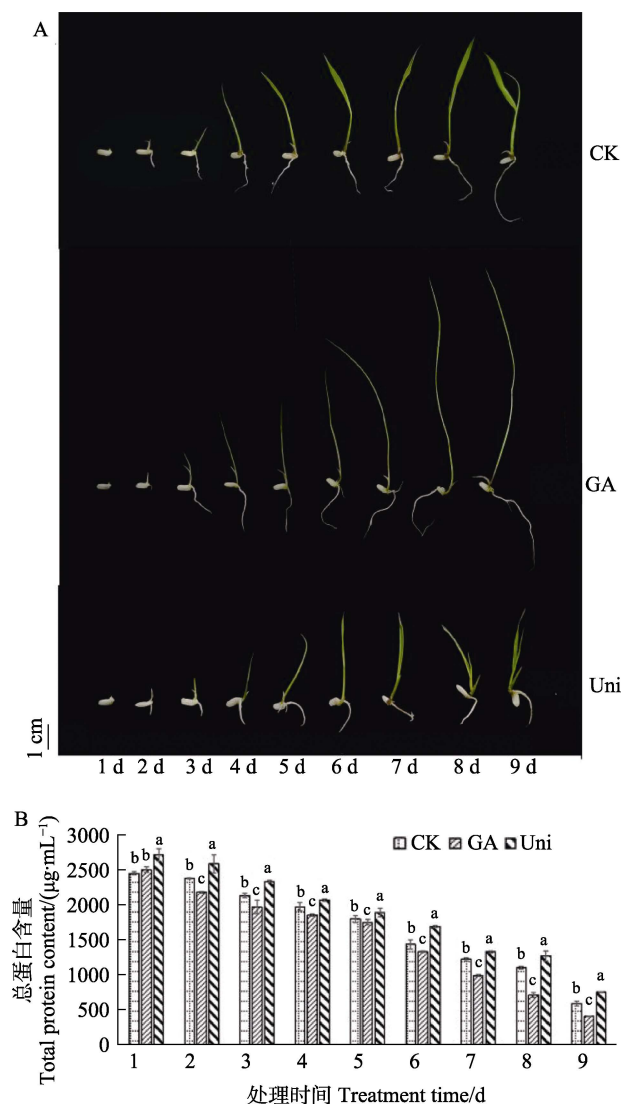
图 1A 为水稻种子萌发 1~9 d 的长势, 与纯水培养相比, GA 处理明显促进水稻种子的萌发, 而 GA 合成抑制剂 Uni 处理后, 水稻种子的萌发受到抑制。如图 1B 所示, 纯水、GA 和 GA 合成抑制剂 Uni 处理的水稻糊粉层在种子萌发过程中, 总蛋白含量均随着时间的增加而逐渐降低。在 2~9 d, 与对照相比, GA 处理的糊粉层中, 总蛋白含量显著降低; 而 GA 合成抑制剂 Uni 处理的糊粉层中总蛋白含量一直维持在较高水平。以上结果表明, 外源 GA 可加快糊粉层中蛋白质的降解, 从而促进水稻种子的萌发, 而 GA 合成抑制剂 Uni 则减缓糊粉层中蛋白质的降解, 抑制水稻种子的萌发。

2.2 水稻种子萌发过程中糊粉层 26S 蛋白酶体及 20S 蛋白酶体活性的变化

由图 2A 可知, 26S 蛋白酶体活性在水稻种子萌发 1~6 d 呈现上升的趋势, 并在 6 d 时达到最高活性水平; 在 7~9 d 时, 26S 蛋白酶体活性水平逐渐下降。该结果表明在水稻种子萌发过程中糊粉层细胞中的 26S 蛋白酶体活性具有依赖时间的效应。

如图 2B 所示, 在水稻种子萌发 1~7 d 时, 糊粉层中 20S 蛋白酶体活性逐渐上升, 并在第 7 天时达到峰值, 随后其活性逐渐下降。表明 20S 蛋白酶体活性在水稻种子萌发过程中同样具有依赖时间的效应。

综合以上结果, 在水稻种子萌发过程中, 糊粉层细胞中含有活性的 26S 蛋白酶体和 20S 蛋白酶体, 二者的活性均随着萌发时间的增加而变化, 且 20S 蛋白酶体活性比 26S 蛋白酶体活性迟 1 d 达到最高峰。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

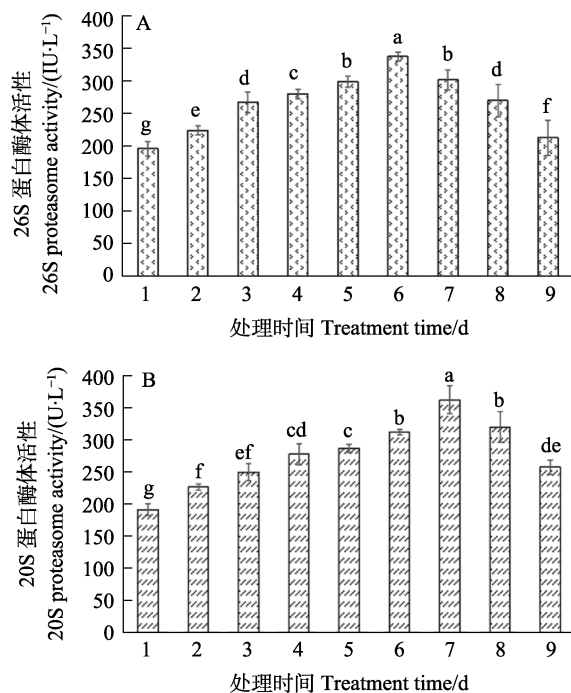
图 1 不同处理下萌发水稻种子长势 (A) 及糊粉层中总蛋白含量 (B) 变化

Fig. 1 Changes of growth (A) and total protein contents of aleurone layers (B) in germinating rice seeds under different treatments

2.3 水稻种子萌发过程中 *OsPBA1* 表达水平及 *PBA1* 活性的变化

OsPBA1 在水稻种子萌发过程出现 2 个表达峰值, *OsPBA1* 的相对表达量在 1~5 d 随时间的增加而上升, 并在第 5 天达到第一个表达峰值, 约为 1 d 的 6.24 倍; 在 6~7 d, 其相对表达量开始下降, 而第 8 天时, 表达量明显升高, 出现第二个表达峰值, 其表达量约为 1 d 的 5.4 倍, 随后糊粉层中 *OsPBA1* 的表达量开始下降 (图 3A)。

如图 3B 所示, 在水稻种子萌发过程中, 糊粉



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 2 萌发水稻种子糊粉层 26S 蛋白酶体活性 (A) 及 20S 蛋白酶体活性 (B) 变化

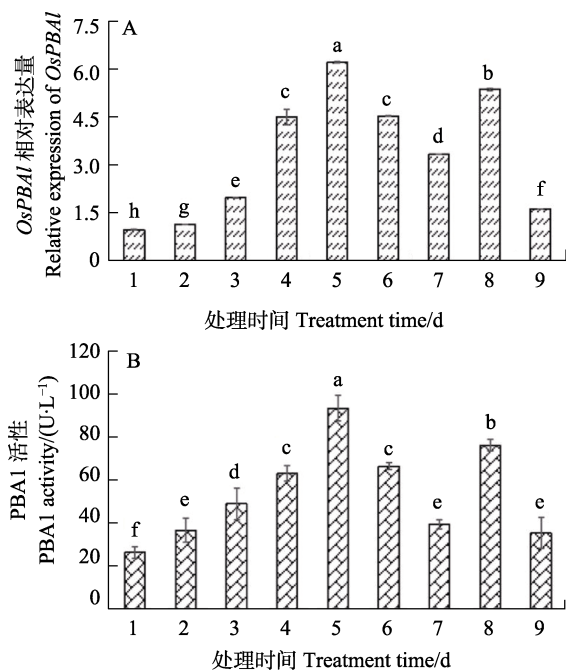
Fig. 2 Activity changes of 26S proteasome (A) and 20S proteasome (B) in aleurone layers of germinating rice seeds

层细胞中 *PBA1* 活性的变化趋势与 *OsPBA1* 转录水平的变化趋势类似。在 1~5 d, *PBA1* 活性随时间的延长而上升, 并在第 5 天达到第一个峰值; 在 6~7 d, *PBA1* 活性下降, 第 8 天时出现上升的趋势, 并达到第二个峰值, 该峰值低于 5 d 的活性峰值; 随后, 水稻糊粉层细胞中的 *PBA1* 活性开始下降。

以上结果表明, *OsPBA1* 表达水平和 *PBA1* 活性随着种子萌发时间的增加而变化, *PBA1* 可能以依赖时间的方式调控水稻种子的萌发过程。

2.4 GA 及 GA 合成抑制剂对水稻糊粉层中 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体及 *PBA1* 活性的影响

如图 4A 所示, 与对照相比, GA 处理 5 d 的水稻糊粉层中 26S 蛋白酶体的活性升高了 9.97% ($P<0.05$), 而 GA 合成抑制剂 Uni 处理 5 d 则使 26S 蛋白酶体的活性降低了 8.67% ($P<0.05$)。同样, 与对照相比, GA 处理 5 d 的水稻糊粉层中 20S 蛋白酶体和 *PBA1* 的活性分别提高了 17% ($P<0.05$) 和 35.09% ($P<0.05$), 而 GA 合成抑制剂 Uni 处理 5 d 后, 20S 蛋白酶体和 *PBA1* 的活性则分别降低了 22.92% ($P<0.05$) 和 24.93%



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 3 萌发水稻种子糊粉层的 *OsPBA1* 表达水平

(A) 及 PBA1 活性 (B) 的变化

Fig. 3 Level changes of *OsPBA1* transcript (A) and PBA1 activity (B) in aleurone layers of germinating rice seeds

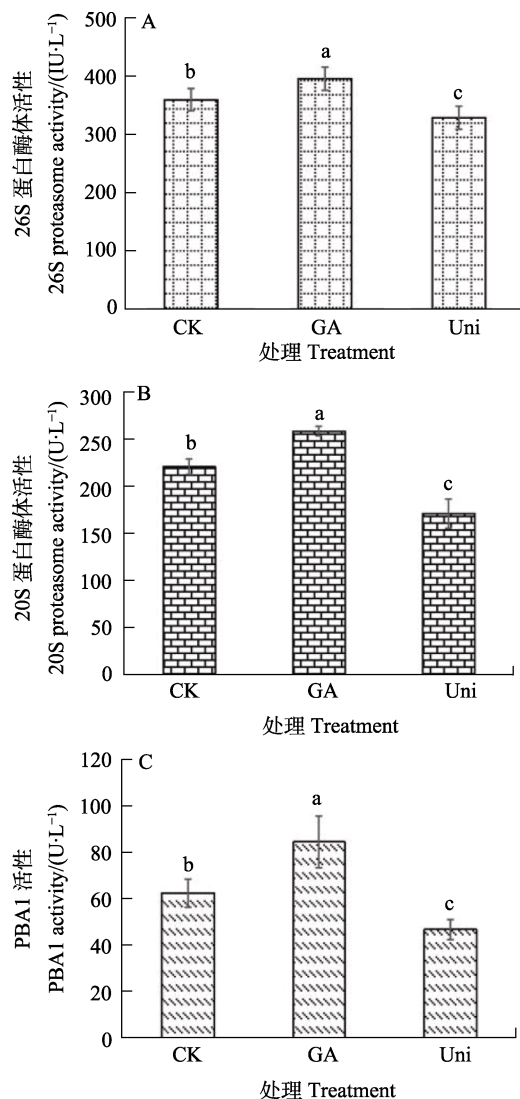
($P < 0.05$) (图 4B、图 4C)。

以上结果表明 GA 对水稻糊粉层中 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体和 PBA1 的活性均具有促进作用, 而 GA 合成抑制剂 Uni 则起着抑制作用。

2.5 MG132 对水稻生长状态及糊粉层中 26S 蛋白酶体、20S 蛋白酶体和 PBA1 活性的影响

使用 MG132 处理 5 d 后, 水稻种子的生长明显受到抑制, 其胚根和胚芽的长度短于对照的长度 (图 5A、图 5B、图 5C)。由图 5D 可知, 与对照相比, MG132 处理的水稻糊粉层 26S 蛋白酶体活性降低了 31.75% ($P < 0.05$), 该结果表明 MG132 能够有效抑制 26S 蛋白酶体的活性, 且在种子萌发过程中, 26S 蛋白酶体的活性与其萌发表型相关。

从图 5E 可知, 与对照相比, MG132 处理的糊粉层中 20S 蛋白酶体活性升高了 25.63% ($P < 0.05$), 表明 MG132 处理可以推进 26S 蛋白酶体的解离, 导致游离 20S 蛋白酶体的活性上升。通过进一步检测 MG132 对 PBA1 活性的影响发现, 在相同处理下, PBA1 活性的变化与 20S 蛋白酶体活性的变化一致。与对照相比, MG132 处理的水稻糊粉层中, PBA1 活性升高 71.37% ($P <$



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 4 GA、Uni 处理 5 d 的 26S 蛋白酶体 (A)、20S 蛋白酶体 (B) 及 PBA1 活性 (C) 变化

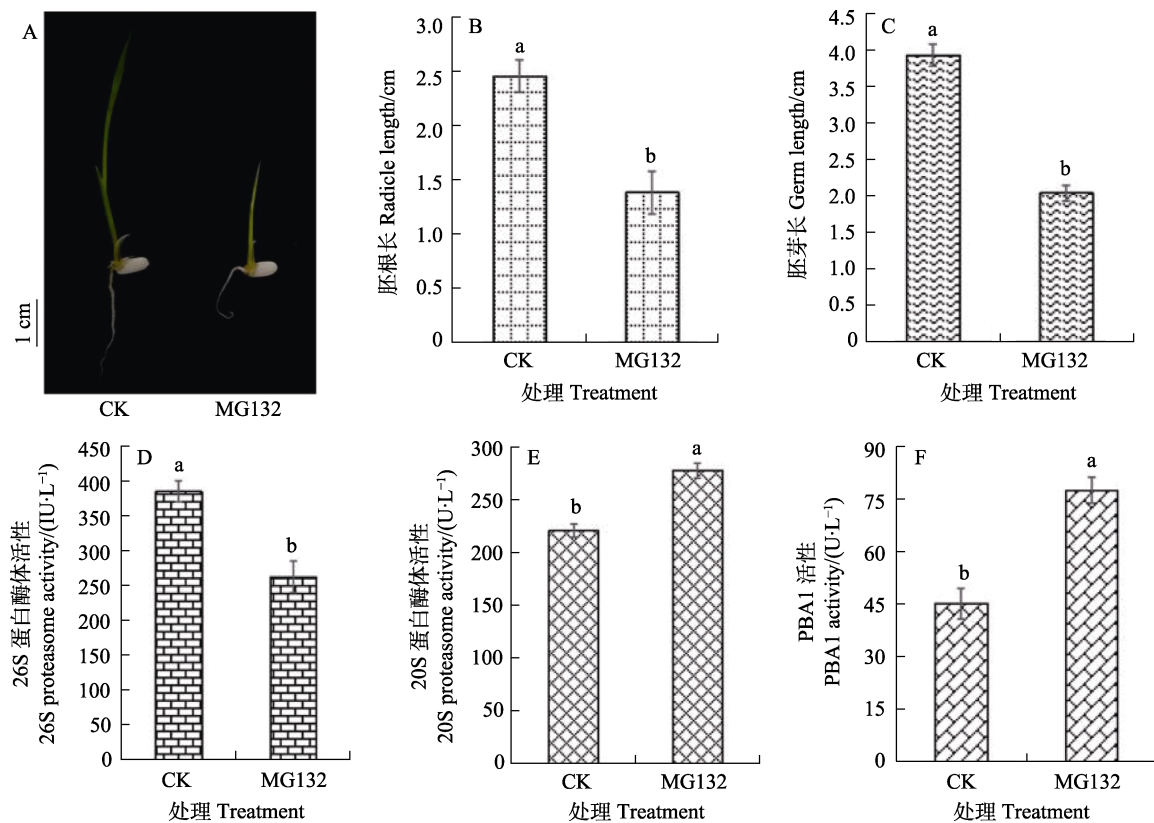
Fig. 4 Activities changes of 26S proteasome (A), 20S proteasome (B) and PBA1 (C) in aleurone layers of germination rice seeds treated with GA and Uni, respectively.

0.05), 表明 26S 蛋白酶体的正常组装受到抑制后, 亚基 PBA1 的活性会上调 (图 5F)。

以上结果表明, MG132 可抑制萌发水稻种子的生长, 且对水稻糊粉层 26S 蛋白酶体的组装亦具抑制作用, 从而导致 20S 蛋白酶体活性及其亚基 PBA1 活性的上升。

3 讨论

通过泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 调节蛋白质水平是真核生物中最复杂和最普遍的途径之一, UPS 可通过降解受



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图 5 MG132 处理对萌发水稻种子生长 (A、B、C) 及 26S 蛋白酶体活性 (D)、20S 蛋白酶体活性 (E) 和 PBA1 活性 (F) 的影响

Fig. 5 Effects of MG132 on growths (A, B, C) and activities of 26S proteasome (D), 20S proteasome (E), and PBA1 (F) of aleurone layers in the germination of rice seeds

损蛋白质、错误折叠蛋白或短寿命的调节蛋白，从而保证功能蛋白的正常工作^[33-35]。UPS 对蛋白质的降解是一个多步骤的复杂过程，底物蛋白质首先通过泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 和泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligase, E3) 的协同作用被多泛素化，随后泛素化蛋白质被 UPS 的核心 26S 蛋白酶体识别并降解为小肽或氨基酸^[36-37]。26S 蛋白酶体在植物生长发育过程中起着重要的调节作用，可通过选择性降解蛋白质，从而高效控制许多细胞过程^[38-39]。

研究表明，GA 可在种子萌发过程中促进水解酶的分泌，加速了贮藏物质的分解，为种子萌发提供营养^[40]。在本研究中，通过观察萌发水稻种子的长势及检测总蛋白的含量发现，使用 GA 处理水稻种子时，促进糊粉层中贮藏蛋白的降解，从而加快水稻种子的萌发进程；而在 GA 合成受到抑制时，糊粉层中贮藏蛋白的降解受到阻碍，水稻种子的萌发则受到抑制。26S 蛋白酶体在激

素信号传导方面是保守的，GA 可诱导 26S 蛋白酶体靶向降解蛋白质，从而促进种子萌发及果实发育等^[18, 41]，但对于其中机制还待进一步研究。

在水稻种子萌发 1~9 d，20S 蛋白酶体亚基 PBA1 的活性及其编码基因 *OsPBA1* 的表达水平出现 2 个峰值，在 5 d 达到第一个峰值，而 26S 蛋白酶体在其达到峰值的后 1 d，26S 蛋白酶体的活性才随之达到峰值，由此可知，PBA1 水平的升高可促使 26S 蛋白酶体活性升高。NGUYEN 等^[42]研究证实，PBA1 的基因表达能以特异性方式调节 26S 蛋白酶体活性。在本研究中，20S 蛋白酶体活性在 7 d 达到峰值，该峰值在 26S 蛋白酶体活性下降期间，可见，26S 蛋白酶体在解离为 20S 蛋白酶体及 19S 调节颗粒后，游离 20S 蛋白酶体水平增加并达到峰值。有研究表明，在植物发育和胁迫反应过程中，调节 26S 蛋白酶体和 20S 蛋白酶体之间的比例具有重要意义。在植物衰老过程，26S 蛋白酶体活性的下降通常伴随着 20S 蛋白酶体活性的上升，以增加植物细胞降解氧化蛋

白的能力^[14, 43-44]。本研究中 PBA1 的活性及 *OsPBA1* 的表达水平在 8 d 达到第二个峰值, 该峰值出现在 20S 蛋白酶体活性下降期间, 即 20S 蛋白酶体活性的降低推动 PBA1 的活性及 *OsPBA1* 的表达水平达到第二个峰值。

在本研究中, 使用 GA 及 GA 合成抑制剂 Uni 处理水稻种子, 发现 GA 能够诱导 PBA1 活性升高, 进而上调 20S 蛋白酶体及 26S 蛋白酶体活性, 而 Uni 对该过程起着抑制作用。有研究证实, RPX 是植物体内的蛋白酶体基因表达调控因子, 它与 26S 蛋白酶体亚基的编码基因启动子结合后, 能诱导 PBA1 的蛋白质水平升高, 并调节蛋白酶体的活性增加^[42]。而敲除 20S 蛋白酶体亚基 PBE1 会影响 26S 蛋白酶体的组装, 致使其活性下降^[45]。

为了进一步研究在药物抑制 26S 蛋白酶体活性时, 水稻种子生长及 20S 蛋白酶体和 PBA1 的活性所受到的影响, 本研究使用了 26S 蛋白酶体活性抑制剂 MG132 处理水稻种子。当抑制 26S 蛋白酶体活性后, 萌发水稻种子的生长也受到抑制, 表明 26S 蛋白酶体在植物生长过程起着重要作用。CHIU 等^[15]研究证实, 使用 MG132 处理抑制了拟南芥种子的萌发, 直接处理拟南芥胚胎则完全抑制胚胎的生长。当 26S 蛋白酶体活性受到抑制时, 20S 蛋白酶体亚基 PBA1 反馈上调, 从而出现了 20S 蛋白酶体活性的增加, 这点得到了他人实验的支持。在 19S 调节颗粒亚基基因突变或 MG132 处理导致 26S 蛋白酶体活性降低的植株中, 出现其他亚基基因的反馈上调, 伴随着 20S 蛋白酶体活性的增加^[29, 46-47]。在哺乳动物中同样观察到 26S 蛋白酶体活性受抑制后, 其亚基基因反馈上调的情况^[48]。

综合以上结果可知, 在水稻种子萌发过程中, GA 通过诱导 PBA1 的活性升高, 调节 20S 蛋白酶体的活性, 进而介导 26S 蛋白酶体的组装, 并以此介导 26S 蛋白酶体依赖性降解贮藏蛋白, 加快种子萌发的进程。

参考文献

- [1] JESTIN L, RAVEL C, AUROY S, LAUBIN B, PERRENT M R, PONT C, CHARMET G. Inheritance of the number and thickness of cell layers in barley aleurone tissue (*Hordeum vulgare* L.): an approach using F2-F3 progeny[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116(7): 991-1002.
- [2] YU R, WU X, LIU J, HOWITT C A, BIRD A R, LIU C M, LARKIN P J. Rice with multilayer aleurone: a larger sink for multiple micronutrients[J]. Rice, 2021, 14(1): 102.
- [3] 高新起, 王秀玲, 席湘媛. 荞麦糊粉层和子叶中贮藏蛋白质积累过程的超微结构[J]. 实验生物学报, 2002(4): 283-288.
- [4] GAO X Q, WANG X L, XI X Y. The ultrastructures of storage protein accumulation in aleurone layer and cotyledon of fagopyrum esculentum[J]. Acta Biologica Experimental Sinica, 2002(4): 283-288. (in Chinese)
- [5] 孙红正, 郭凯, 宋宁垣, 赵全志. 稻米贮藏蛋白家族的生物信息学分析[J]. 中国稻米, 2018, 24(1): 52-57.
- [6] SUN H Z, GUO K, SONG N Y, ZHAO Q Z. Bioinformatics analysis of rice storage proteins families[J]. China Rice, 2018, 24(1): 52-57. (in Chinese)
- [7] FATH A, BETHKE P, LONSDALE J, MEZA-ROMERO R, JONES R. Programmed cell death in cereal aleurone[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 44(3): 255-266.
- [8] HARRIS L J, MARTINEZ S A, KEYSER B R, DYER W E, JOHNSON R R. Functional analysis of *TaABF1* during abscisic acid and gibberellin signalling in aleurone cells of cereal grains[J]. Seed Science Research, 2013, 23(2): 89-98.
- [9] 郑岩, 李江, 杨鹏, 陈惠萍. 水稻糊粉层 PCD 过程细胞形态观察[J]. 热带作物学报, 2016, 37(2): 298-303.
- [10] ZHENG Y, LI J, YANG P, CHEN H P. The cell morphology of rice aleurone layers during programmed cell death[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(2): 298-303. (in Chinese)
- [11] 王忠, 顾蕴洁, 李卫芳, 黄山, 李克武. 水稻糊粉层的形成及其在萌发过程中的变化[J]. 扬州大学学报, 1998(1): 19-24.
- [12] WANG Z, GU Y J, LI W F, HUANG S, LI K W. Formation of rice aleurone layer and its changes during germination[J]. Journal of Yangzhou University, 1998(1): 19-24. (in Chinese)
- [13] VIERSTRA R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(6): 385-397.
- [14] ADAMS E H G, SPOEL S H. The ubiquitin-proteasome system as a transcriptional regulator of plant immunity[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(19): 4529-4537.
- [15] LAU O S, DENG X W. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(5): 571-577.
- [16] SADANANDOM A, BAILEY M, EWAN R, LEE J, NELIS S. The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling[J]. New Phytologist, 2012, 196(1): 13-28.
- [17] USTUN S, SHEIKH A, GIMENEZ-IBANEZ S, JONES A, NTOUKAKIS V, BORNKE F. The proteasome acts as a hub

- for plant immunity and is targeted by pseudomonas type III effectors[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(3): 1941-1958.
- [14] KUREPA J, WANG S, LI Y, SMALLE J. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance[J]. *Plant Signaling Behavior*, 2009, 4(10): 924-927.
- [15] CHIU R S, PAN S, ZHAO R, GAZZARRINI S. ABA-dependent inhibition of the ubiquitin proteasome system during germination at high temperature in *Arabidopsis*[J]. *Plant*, 2016, 88(5): 749-761.
- [16] KUREPA J, WANG S, LI Y, ZAITLIN D, PIERCE A J, SMALLE J A. Loss of 26S proteasome function leads to increased cell size and decreased cell number in *Arabidopsis* shoot organs[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 178-189.
- [17] ITOH H, MATSUOKA M, STEBER C M. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling[J]. *Trends Plant Science*, 2003, 8(10): 492-497.
- [18] FUENTES S, LJUNG K, SOREFAN K, ALVEY E, HARBERD N P, OSTERGAARD L. Fruit growth in *Arabidopsis* occurs via DELLA-dependent and DELLA-independent gibberellin responses[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(10): 3982-3996.
- [19] FU X, RICHARDS D E, AIT-ALI T, HYNES L W, OUGHAM H, PENG J, HARBERD N P. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(12): 3191-3200.
- [20] FENG S, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, WANG Y, ZHOU J, WANG F, CHEN L, YU L, IGLESIAS-PEDRAZ J M, KIRCHER S, SCHAFER E, FU X, FAN L M, DENG X W. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins[J]. *Nature*, 2008, 51(7177): 475-479.
- [21] TOMKO R J, HOCHSTRASSER M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 415-445.
- [22] BORISSENKO L, GROLL M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(3): 687-717.
- [23] SUTY L, LEQUEU J, LANCON A, ETIENNE P, PETITOT A S, BLEIN J P. Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes"[J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003, 35(5): 637-650.
- [24] KUMAR V, SHARMA H, SAINI L, TYAGI A, JAIN P, SINGH Y, BALYAN P, KUMAR S, JAN S, MIR R R, DJALOVIC I, SINGH K P, KUMAR U, MALIK V. Phylogenomic analysis of 20S proteasome gene family reveals stress-responsive patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. *Front Plant Science*, 2022, 13: 1037206.
- [25] GLICKMAN M H, CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(2): 373-428.
- [26] KUNJAPPU M J, HOCHSTRASSER M. Assembly of the 20S proteasome[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843(1): 2-12.
- [27] BEN-NISSAN G, SHARON M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway[J]. *Biomolecules*, 2014, 4(3): 862-884.
- [28] KUMAR DESHMUKH F, YAFFE D, OLSHINA M A, BEN-NISSAN G, SHARON M. The contribution of the 20S proteasome to proteostasis[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(5): 190.
- [29] KUREPA J, TOH-E A, SMALLE J A. 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance[J]. *The Plant Journal*, 2008, 53(1): 102-114.
- [30] SAHU I, MALI S M, SULKSHANE P, XU C, ROZENBERG A, MORAG R, SAHOO M P, SINGH S K, DING Z, WANG Y, DAY S, CONG Y, KLEIFELD O, BRIK A, GLICKMAN M H. The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6173.
- [31] HUAI B, BAI M, TONG P P, HE H J, LIANG M J, CHEN C Y, WU H. *CgPBA1* may be involved in nuclear degradation during secretory cavity formation by programmed cell death in *Citrus grandis* 'Tomentosa' fruits[J]. *Plant Physiology And Biochemistry*, 2021, 60: 306-314.
- [32] FILIPPI A, ZANCANI M, PETRUSSA E, BRAIDOT E. Caspase-3-like activity and proteasome degradation in grapevine suspension cell cultures undergoing silver-induced programmed cell death[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 233: 42-51.
- [33] COLLINS G A, GOLDBERG A L. The logic of the 26S proteasome[J]. *Cell*, 2017, 169(5): 792-806.
- [34] SHIN J Y, MUNIYAPPAN S, TRAN N N, PARK H, LEE S B, LEE B H. Deubiquitination reactions on the proteasome for proteasome versatility[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5312.
- [35] CETIN G, KLAFACK S, STUDENCKA-TURSKI M, KRUGER E, EBSTEIN F. The ubiquitin-proteasome system in immune cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 60.
- [36] WANG F, DENG X W. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling[J]. *Cell Research*, 2011, 21(9): 1286-1294.
- [37] QI S M, DONG J, XU Z Y, CHENG X D, ZHANG W D, QIN J J. Protac: an effective targeted protein degradation strategy for cancer therapy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 692574.
- [38] BARD J A M, GOODALL E A, GREENE E R, JONSSON E, DONG K C, MARTIN A. Structure and function of the

- 26S proteasome[J]. Annual Review of Biochemistry, 2018, 87: 697-724.
- [39] MAO Y. Structure, dynamics and function of the 26S proteasome[J]. Subcell Biochem, 2021, 96: 1-151.
- [40] HOU H, ZHENG X, ZHANG H, YUE M, HU Y, ZHOU H, WANG Q, XIE C, WANG P, LI L. Histone deacetylase is required for GA-induced programmed cell death in maize aleurone layers[J]. Plant Physiology, 2017, 175(3): 1484-1496.
- [41] HU Y, ZHOU L, YANG Y, ZHANG W, CHEN Z, LI X, QIAN Q, KONG F, LI Y, LIU X, HOU X. The gibberellin signaling negative regulator RGA-LIKE3 promotes seed storage protein accumulation[J]. Plant Physiology, 2021, 185(4): 1697-1707.
- [42] NGUYEN H M, SCHIPPERS J H, GONI-RAMOS O, CHRISTOPH M P, DORTAY H, HOORN R A, MUELLER-ROEBER B. An upstream regulator of the 26S proteasome modulates organ size in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 2013, 74(1): 25-36.
- [43] WANG X, YEN J, KAISER P, HUANG L. Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress[J]. Science Signal, 2010, 3(151): 88.
- [44] RAYNES R, POMATTO L C, DAVIES K J. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2016, 50: 41-55.
- [45] HAN J J, YANG X, WANG Q, TANG L, YU F, HUANG X, WANG Y, LIU J X, XIE Q. The $\beta 5$ subunit is essential for intact 26S proteasome assembly to specifically promote plant autotrophic growth under salt stress[J]. New Phytologist, 2019, 221(3): 1359-1368.
- [46] YANG P, FU H, WALKER J, PAPA C M, SMALLE J, JU Y M, VIERSTRA R D. Purification of the *Arabidopsis* 26S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(8): 6401-6413.
- [47] LEE K H, MINAMI A, MARSHALL R S, BOOK A J, FARMER L M, WALKER J M, VIERSTRA R D. The RPT2 subunit of the 26S proteasome directs complex assembly, histone dynamics, and gametophyte and sporophyte development in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2011, 23(12): 4298-4317.
- [48] LUNDGREN J, MASSON P, MIRZAEI Z, YOUNG P. Identification and characterization of a drosophila proteasome regulatory network[J]. Molecular and Cellular Biology, 2005, 25(11): 4662-4675.