

• 农业生物技术 •

异源表达古菌 TRAM 基因增强水稻的耐旱性

陈巍^{1,2}, 李华丽¹, 邱金龙¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

陈巍, 李华丽, 邱金龙. 异源表达古菌 TRAM 基因增强水稻的耐旱性. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1676–1685.

Chen W, Li HL, Qiu JL. Ectopic expression of archaeal TRAM-encoding genes in rice improves its drought-tolerance. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1676–1685.

摘要: 干旱会直接影响水稻的生长发育, 导致其产量和品质下降。在水稻中异源表达细菌 RNA 分子伴侣 Csp 能够显著提高水稻的耐旱能力, 并且不影响水稻的正常生长。古菌中也发现具有类似细菌分子伴侣 Csp 功能的 TRAM (TRM2 and MiaB) 蛋白, 且古菌的 DNA 复制、转录和翻译等过程与真核生物有着更为相似的调控方式, 然而, 古菌中 RNA 分子伴侣蛋白能否调控植物耐旱能力还未见报道。我们选取了嗜冷甲烷古菌 *Methanobacterium psychrophilus* R15 中两个 TRAM 蛋白在水稻中进行研究, 发现在水稻中过量表达 Mpsy_3066 和 Mpsy_0643 两个 TRAM 蛋白均能显著提高水稻苗期和成株期时对干旱胁迫的耐受能力。同时, 我们在水稻原生质体中验证了 TRAM 蛋白可以发挥其分子伴侣的功能消除 RNA 的错误折叠对翻译的影响, 这可能是 TRAM 转基因植物发挥其耐旱能力的作用机制。该工作初步展示了异源表达古菌 TRAMs 可以作为提高水稻耐旱能力的一种有效手段。

关键词: 水稻, 干旱胁迫, RNA 分子伴侣, 古菌, TRAM

Ectopic expression of archaeal TRAM-encoding genes in rice improves its drought-tolerance

Wei Chen^{1,2}, Huali Li¹, and Jinlong Qiu¹

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Drought stress affects the growth and development of rice, resulting in severe loss in yield and quality. Ectopic expression of the bacterial RNA chaperone, cold shock protein (Csp), can improve rice drought tolerance. Archaeal TRAM (TRM2 and MiaB) proteins have similar structure and biochemical functions as bacterial Csp. Moreover, DNA replication, transcription and translation of archaea are more similar to those in eukaryotes. To test if archaeal RNA chaperones could confer plant drought tolerance, we selected two TRAM proteins, Mpsy_3066 and Mpsy_0643, from a cold-adaptive methanogenic archaea *Methanobacterium psychrophilus* R15 to study. We overexpressed the TRAM proteins in rice and performed drought treatment at seedling and adult stage. The results showed that overexpression both TRAM proteins could significantly improve the tolerance of rice to drought stress. We further demonstrated in rice protoplasts that the TRAMs could abolish

Received: March 5, 2019; Accepted: March 28, 2019

Corresponding author: Jinlong Qiu. Tel/ Fax: +86-10-64807398; E-mail: qiujl@im.ac.cn

网络出版时间: 2019-04-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190408.1036.001.html>

misfolded RNA secondary structure and improve translation efficiency, which might explain how TRAMs improve drought tolerance transgenic rice. Our work supports that ectopic expression of archaeal TRAMs effectively improve drought tolerance in rice.

Keywords: rice, drought stress, RNA chaperon, archaea, TRAM

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 为世界上超过一半的人口提供了主粮^[1]。然而水稻的生长发育需要大量的水分供给, 干旱或者供水不足会对水稻的产量和品质产生巨大的影响^[2]。特别是近年来全球气候变暖, 年降水量不稳定且分布不均, 对农业用水特别是水稻等农作物的灌溉用水造成了一定的压力, 威胁着粮食安全^[3]。因此, 提高水稻的抗旱能力是促进粮食增产的一个有效途径。植物在干旱胁迫下会发生一系列的生理应激反应, 包括气孔开度变化、胞内活性氧清除酶的合成、渗透调节小分子物质(例如可溶性糖、甘氨酸、脯氨酸)的积累、叶片卷曲以及叶表面角质层加厚等^[4]。基于基因工程的方法将干旱胁迫相关基因编辑使之功能失活或向植物基因组中导入外源基因以得到稳定表达的植株, 也可增强植物抵抗干旱胁迫的耐受性^[5]。

转录后水平的基因表达调控对真核生物的生长发育和响应外部环境刺激至关重要^[6-8]。RNA 分子伴侣 (RNA chaperone) 是一类广泛存在于动物、植物和微生物中的 RNA 结合蛋白。RNA 分子伴侣通过与非功能性折叠的 RNA 底物结合, 帮助其重排并形成正确的折叠方式或帮助 RNase 降解错误折叠的 RNA, 完成正常的 RNA 代谢过程^[9]。在应激状态下, 一些 RNA 分子伴侣的表达量会显著增加, 以此来帮助生物体更好地应对胁迫^[10-11]。在水稻和玉米中表达细菌中的 RNA 分子伴侣蛋白——冷激蛋白 (Cold shock protein, Csp) CspA 和 CspB, 可以有效地提高其抗冻、抗旱以及抗高温的能力^[12]。在拟南芥和小麦中表达密码子优化的 CspA 和 CspB 蛋白, 也可以提高它们的抵抗干旱和盐胁迫的能力^[13]。在水稻中过表达拟南芥 RNA 伴侣蛋白 GRP2 和 GRP7 同样可以显著提高

干旱条件下水稻的结实率, 从而提高水稻的产量^[14]。DEAD-box RNA 解旋酶 (DEAD-box RHs) 家族成员也具有 RNA 分子伴侣活性, 拟南芥中该家族成员 RH8 通过与 PP2CA 互作, 对 ABA 信号和干旱胁迫反应具有重要的调节作用^[15]。

古菌作为生物学分类中一个庞大的分支, 其 RNA 分子伴侣蛋白对植物耐旱能力的调控却没有报道。在古菌 DNA 的复制、转录和翻译过程中, 都可以看到与真核生物更为类似的蛋白结构和调控方式^[16], 且古菌多在极端环境下生存, 其本身即具有更强的耐受性。因此, 我们希望在古菌中找到类似细菌冷激蛋白的 RNA 分子伴侣, 检测其是否能使植物具有更好的耐受干旱胁迫的能力。虽然 Csp 类冷激蛋白在细菌中分布广泛, 且在同一物种中含有多个同源蛋白, 在古菌中却鲜有其分布^[17]。有趣的是, 在古菌中存在一类与冷激蛋白结构类似的蛋白 TRAM (TRM2 and MiaB)。TRAM 是一类具有 RNA 结合功能的相关结构域的总称, 包括尿嘧啶甲基化酶 TRM2 和腺嘌呤硫醇化酶 MiaB, 这类结构域在包括古菌在内的多种生物体中普遍存在^[18]。TRAM 蛋白的三维结构已解析, 其由 5 个反向平行的 β 链组成寡核苷酸/寡糖结合折痕区域 (Oligonucleotide/oligosaccharide binding fold, OB-fold), OB-fold 结构域一般由 70–150 个氨基酸组成, 通常被认为与核酸识别有关, 该结构域家族成员之间序列相似性很低, 却具有多个相似的结构^[19]。Csp 类蛋白也是由类似结构域组成且与 TRAM 具有结构同源性。体内和体外的实验证明, TRAM 蛋白同细菌中 Csp 蛋白功能相似, 可以回补大肠杆菌 *csp* 突变体的冷敏感性。TRAM 蛋白与底物 RNA 的结合无明显序列特异性, 且亲和能力在微摩尔级别, 这与 RNA

分子伴侣蛋白相符合, 进一步说明其可能就是存在于古菌中的 RNA 分子伴侣蛋白^[10]。

我们从已知的嗜冷甲烷古菌(*Methanobrevibacter psychrophilus* R15) 4 个 TRAMs 基因中选取了 2 个可以显著改善大肠杆菌 *csp* 突变体冷敏感性的 TRAM 基因 *Mpsy_3066* 和 *Mpsy_0643*, 分别在水稻中进行过量表达, 检测了其对水稻耐受干旱胁迫的影响, 并初步探究了其作用机制。

1 材料与方法

1.1 水稻转基因载体的构建及转化

在 GenBank 数据库中分别获取嗜冷甲烷古菌 (*M. psychrophilus* R15) 中两个 TRAM 蛋白 *Mpsy_3066* (AFV25265) 和 *Mpsy_0643* (AFV22852) 的氨基酸序列, 参考水稻密码子偏好性, 由南京金斯瑞公司对其进行密码子优化并合成相应编码 DNA 序列。分别将该序列通过 *Spe* I 和 *Kpn* I 酶切位点克隆到双元表达载体 pCAMBIA2300-Ubi^[20] 中, 以玉米泛素启动子 *Ubi* 驱动目的基因的表达, 构建的载体命名为 pC2300-Mpsy-3066 和 pC2300-Mpsy-0643。电激法将构建好的载体转入农杆菌 AGL1 中, 利用农杆菌转化日本晴水稻 (*Oryza sativa*

L. ssp. japonica c.v. Nipponbare) 愈伤组织, 并在含有 G418 的筛选培养基上筛选得到阳性转基因植物。以上双元表达载体 pCAMBIA2300-Ubi 由中国科学院遗传与发育研究所储成才研究员提供, 根癌农杆菌菌株 AGL1 及日本晴野生型水稻由本实验室保存。

1.2 转基因植株的鉴定

取培养 14 d 的水稻新鲜叶片, 在液氮中冷冻后破碎, 用 CTAB 法提取水稻基因组 DNA。设计引物 (表 1) 用于插入 DNA 的扩增检测, 由华大基因合成, 稀释至 10 μmol/L。PCR 反应采用 2×*Taq* PCR StarMix with Loading Dye 试剂盒 (康润公司)。反应体系包括 10 μL 2×*Taq* PCR StarMix、正向及反向引物各 1 μL、1 μL DNA 提取物和 7 μL ddH₂O。PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 3 min。

1.3 转基因植物材料中目的基因的表达分析

取生长 14 d 的新鲜水稻叶片, 迅速加入液氮研磨, 使用 TRNzol 提取试剂盒 (天根公司) 提取总 RNA。RNA 样品反转录采用 Maxima H Minus First Strand cDNA 合成试剂盒 (Thermo 公司)。半定量 PCR 引物设计 (表 1) 位于检测基因的 3'端。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annotation
UBI-F:	TACGCTATTTATTTGCTTGCTACTG	PCR identification
G3066-R	CTACGCCACCTCGCCGAACG	
G0643-R	GGCCACTTCGCCAAACGCGA	
RT-3066-F	ATGTTCTGACTATGCGGGC	RT-PCR
RT-3066-R	GTGTTCTGGCACAAAGACGAC	
RT-0643-F	AGATTACGCTACGCGTACTAGTATG	RT-PCR
RT-0643-R	GAACTTGCTCATGACCTTGTTTAC	
Actin-for	CAGTCCAAGAGGGGTATCTTGAC	RT-PCR
Actin-rev	GGGCGATGTAGGAAAGCTTCTC	
TrpL-F	AGCTTGCAGATTTCTGAGCCCGCACCTGATGCGGGCTTTTTTATG	TrpL insertion sequence
TrpL-R	GATCCATAAAAAAGCCCGCATCAGGTGCGGGCTCAGGAAATCTGCA	
163-muGFP-F	CTCGTGACCACCTTCACCTCGGCGTGACAGTGCTTC	GFP site mutant
163-muGFP-R	AGGGTGAAGGTGGTCACGAGGGTGG	

PCR 反应前先将反转产物稀释 5 倍, 半定量 PCR 反应体系为 10×*Taq* 缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 正向及反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 稀释产物 5 μL, *Taq* 酶 0.5 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。半定量 PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 28 个循环; 72 °C 3 min。以水稻 *Actin1* 基因表达作为内参。

1.4 水稻幼苗对 PEG 和脱水的敏感性分析

选取籽粒饱满、大小均一的水稻种子。水稻种子经 75% 酒精消毒 1 min, 用 2.5% 次氯酸钠 (有效氯含量) 消毒 0.5 h 后, 移至 1/2 MS 固体培养基上培养。4 d 大的水稻苗转移至含有 25% 的 PEG 6000 的 1/2 MS 固体培养基上继续生长, 9 d 后移到营养液中回复培养 2 d 后拍照。脱水处理: 将消毒后的种子放入 37 °C 培养箱中水培催芽 24 h, 萌发后移入营养液中继续培养, 取培养 14 d 的水稻幼苗至吸水滤纸上干旱处理 9.5–10 h, 重新复水 10 d 后拍照。该实验包含 3 次生物学重复。

1.5 水稻植株干旱处理及分析

消毒后的种子放入 37 °C 培养箱中水培催芽 24 h, 后移入光照培养箱中营养液培养。培养箱生长条件为光周期为 13 h 光照/11 h 黑暗, 光照时温度为 28 °C, 黑暗时温度为 25 °C。水培一周的小苗移入营养土中, 营养土配比为花卉营养土与黄土 1:1, 土壤培养温度及光周期条件不变。待植物长到四叶期后, 干旱处理 7 d, 复水 10 d 后拍照。该实验包含 3 次生物学重复, 所呈现实验结果为 3 次重复实验的代表结果。

1.6 原生质体瞬时表达载体的构建

水稻原生质体瞬时表达载体 pJIT163-Ubi 由中国科学院遗传与发育研究所高彩霞研究员提供。Mpsy_3066 和 Mpsy_0643 密码子优化的序列通过 *Hind* III 和 *Bsr*GI 酶切位点分别克隆到 pJIT163-Ubi 载体中, 新构建的载体命名为 pJIT163-Mpsy-3066 和 pJIT163-Mpsy-0643。

pJIT163-TrpL-mCherry 的 TrpL 强终止子序列通过引物 (表 1) 合成直接插入到 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切位点之间, 即 mCherry 表达框之前, GFP Y67L 表达载体通过引物 (表 1) 扩增直接引入点突变, 新构建的质粒为 pJIT163-GFP Y67L。质粒中量提取参考 Promega 试剂盒 Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System, 调整质粒浓度至 1 000 ng/μL。

1.7 水稻原生质体转化及荧光观察和流式细胞分析

原生质体制备及转化主要参考 Zhang 等^[21]的方法并进行了一定改进, 水稻 MS 培养基配制时添加了肌醇 (0.1 g/L), 水稻幼苗在黑暗条件下生长得到无菌黄化苗。原生质体转化过程中 pJIT163-mCherry、pJIT163-TrpL-mCherry 质粒的转化量均为 500 ng。用于转化后荧光观察的原生质体移入含 2 mL WI 溶液的 35 mm 培养皿中孵育。用于转化后流式细胞仪检测的原生质体, 置于含 200 μL WI 溶液的流式管中孵育, 转化 48 h 后进行荧光观察或流式细胞分析。该实验包含 2 次生物学重复, 所呈现实验结果为该重复实验的代表结果。

2 结果与分析

2.1 古菌 TRAM 编码基因转基因水稻的获得及表达分析

我们对嗜冷甲烷古菌 *M. psychrophilus* R15 中两个 TRAM 蛋白的编码基因 *Mpsy_3066* 和 *Mpsy_0643* 进行了密码子优化, 通过农杆菌介导的方法获得了异源表达 TRAM 的转基因水稻。为了验证 TRAMs 在水稻中是否正常表达, 我们用半定量 PCR 的方法对不同转基因阳性株系中 *Mpsy_3066* 和 *Mpsy_0643* 基因的表达水平进行检测 (图 1)。挑选过表达株系进行传代, 获得 T2 代转基因纯合体, 对其进行扩繁并用于进一步的实验。

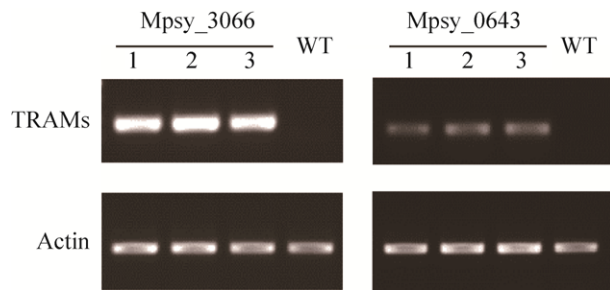


图1 不同转基因水稻株系中 TRAM 的基因表达水平
Fig. 1 Expression levels of TRAM genes in different transgenic rice lines.

2.2 异源表达 TRAM 增强水稻幼苗耐旱能力

为了检测异源表达 TRAM 是否改变水稻的耐旱能力,我们首先利用 PEG 模拟干旱处理,检测水稻幼苗的生长情况。我们将 4 d 大的野生型和各转基因株系水稻幼苗转移至含有 25% PEG6000 的培养基或正常培养基上继续生长 9 d。结果发现,在没有 PEG 胁迫处理的情况下,野生型和转基因幼苗生长没有明显区别(图 2A、2B);而在 PEG 处理后,相比于野生型,转基因幼苗的株高均有不同程度的提高(图 2C、2D)。

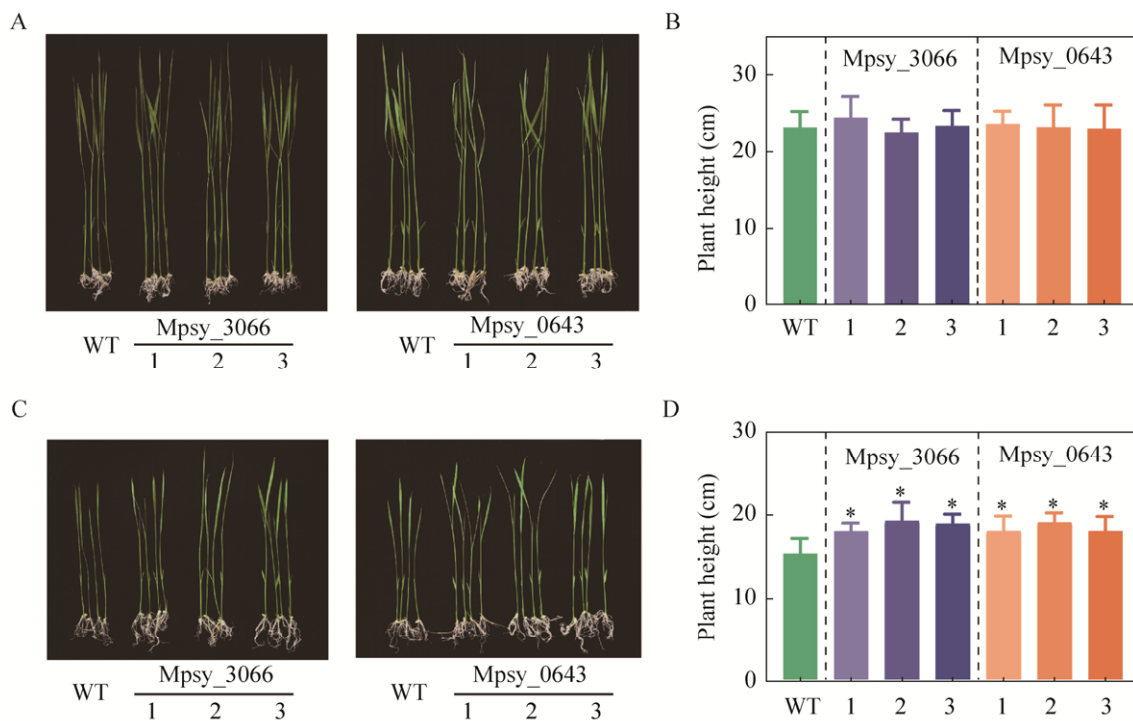


图2 野生型及 TRAM 转基因水稻幼苗对 PEG 处理敏感性的分析

Fig. 2 Sensitivity of the wild-type and TRAM transgenic rice seedlings to PEG treatment. (A) Growth phenotype of the wild type and TRAM transgenic rice seedlings grown on 1/2 MS solid medium. (B) The length of the aerial part of seedlings from (A). (C) Growth phenotype of the wild type and TRAM transgenic rice seedlings grown on 1/2 MS medium supplied with 25% PEG6000. (D) The length of the aerial part of seedlings from (C). Values are $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, the wild type was used as control.

同时,我们检测了短期脱水对水稻苗期存活率的影响。我们将在培养液中生长 14 d 的幼苗置于滤纸上脱水处理 9.5 h,复水 10 d 后统计水稻存

活率。结果表明,转基因水稻幼苗存活率明显好于野生型(图 3A、3B),表明异源表达 TRAM 可以显著提高水稻植株对失水的耐受性。

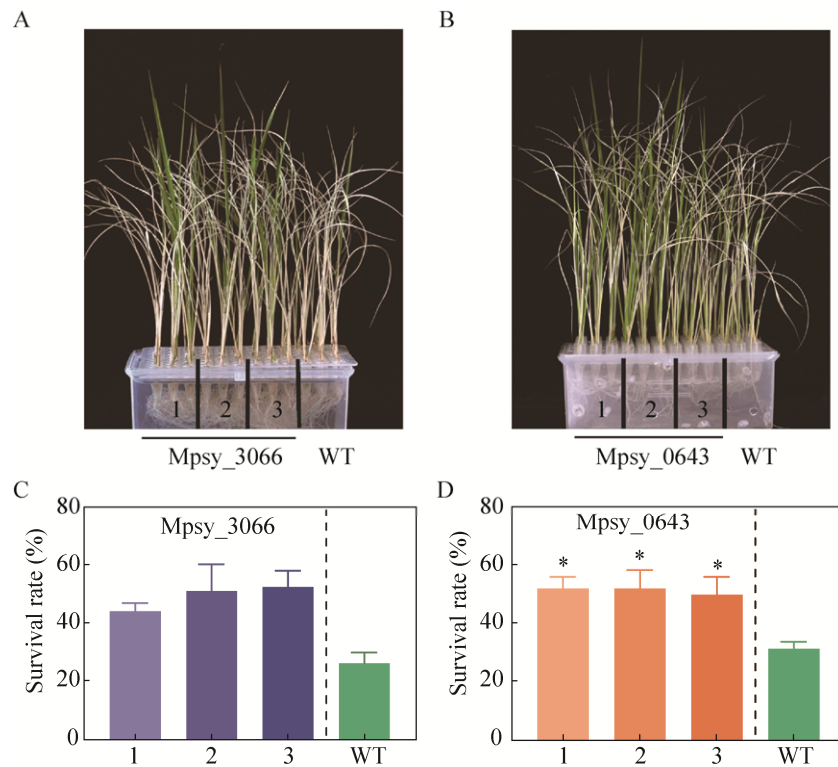


图3 脱水处理后野生型和转基因水稻幼苗的存活率

Fig. 3 Survival rate of the wild type and TRAM transgenic rice seedlings after dehydration treatment. (A–B) Growth phenotype of the wild-type and *Mpsy_3066* (A), *Mpsy_0643* (B) transgenic seedlings after dehydration treatment. (C) Survival rates of the seedlings from (A). (D) Survival rates of the seedlings from (B). Values are $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, the wild type was used as control.

2.3 异源表达 TRAM 增强水稻植株耐旱能力

为了检测水稻植株耐旱能力，我们将土壤中生长的四叶期水稻植株干旱处理 7 d，然后复水 10 d，比较野生型和转基因植物的耐旱能力。结果表明，TRAM 转基因水稻植株的耐旱能力相比于野生型植株明显提高 (图 4)。

2.4 古菌 TRAM 蛋白在水稻细胞中能够解链 RNA 二级结构

为了进一步研究古菌 TRAM 蛋白在植物细胞中可能的作用机制，我们以 mCherry 作为报告基因构建了抗转录终止报告系统，即在 mCherry 荧光蛋白的正常表达框之前插入了 TrpL 强终止子序列 (图 5A)。这个序列可以在转录生成的 mRNA 上形成双链配对的结构，影响其后 mCherry 的翻译过程，降低荧光蛋白表达量。我们将构建的该

系统在水稻原生质体中进行表达验证，发现在引入 TrpL 序列后，mCherry 荧光蛋白表达量明显下降 (图 5B)，证明了这一报告系统的可靠性。

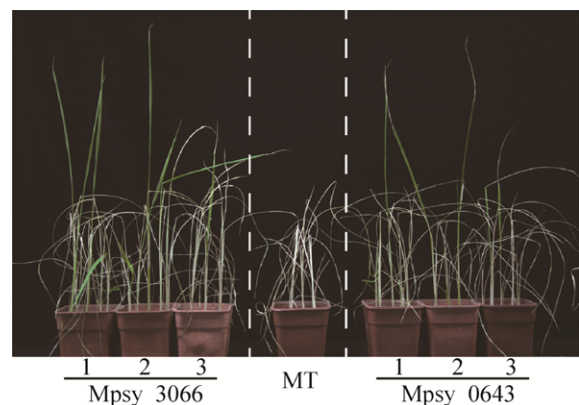


图4 TRAM 转基因水稻植株耐旱能力增强

Fig. 4 Increased tolerance of the TRAM transgenic rice plants to drought stress.

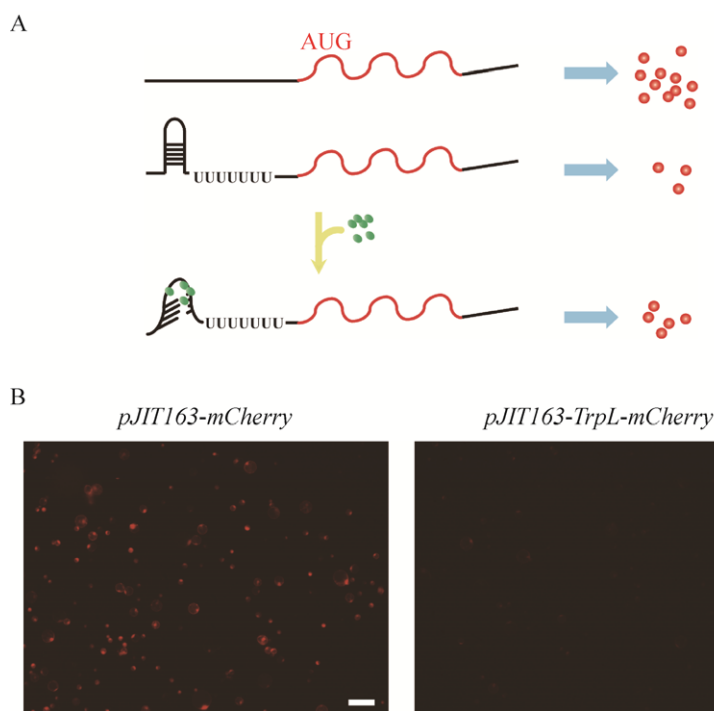


图5 水稻中抗终止报告系统的建立和验证

Fig. 5 Establishment and verification of an anti-terminating reporter system in rice. (A) Diagram of the reporter system. (B) Verification of the anti-terminating reporter system in rice protoplast. Bars=100 μm .

基于以上报告系统，我们对转化后的原生质体样品进行流式细胞仪检测并分别统计其荧光强度，结果显示其荧光强度基本呈正态分布（图6A），我们选取转化 pJIT163-mCherry 和 pJIT163-GFP Y67L 质粒的原生质体作为对照，标记其峰面积 50% 为中间值，以该中间值对应的荧光强度为基准，统计不同转化样品高于该荧光强度的峰面积各自所占比例（图 6B），结合图 6A 和 6B 可以看到共转化 *Mpsy_3066* 或 *Mpsy_0643* 后，其整体荧光强度相比于共转化 pJIT163-GFP Y67L 质粒的荧光强度明显提高。荧光观察也进一步验证了这一结果（图 6C、6D、6E）。以上结果暗示，来自古菌的 TRAM 蛋白在水稻中可以打开错误折叠的 RNA 二级结构，具有 RNA 分子伴侣的功能。

3 讨论

植物可以通过转录及转录后调控响应干旱胁迫。

一条成熟的 mRNA 需经过剪接、加帽、多腺苷酸化等一系列过程才能进入细胞质中进行 RNA 的翻译。而在 RNA 的翻译过程中各种 RNA 二级结构的错误折叠也会影响翻译的进程，使翻译变得缓慢或直接停滞。为了更好地完成生命活动，生物体进化出了多种 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBPs) 来完成转录后水平的调控。在干旱胁迫时，由于机体的紊乱和受损，RNA 分子伴侣的功能的行使显得更为重要。

TRAM 结构域是一类具有 RNA 结合活性的多肽片段。在古菌中该结构域单独存在，直接作为一个功能蛋白发挥着类似于细菌中 Csp 蛋白 RNA 分子伴侣的功能，这为 TRAM 蛋白的开发利用提供了更多的方便性和灵活性。根据已有的报道，细菌中 Csp 蛋白在植物中异源表达，可以显著地提高植物耐受干旱的能力。因此，我们推测古菌中的 TRAMs 蛋白可能同 Csp 蛋白一样

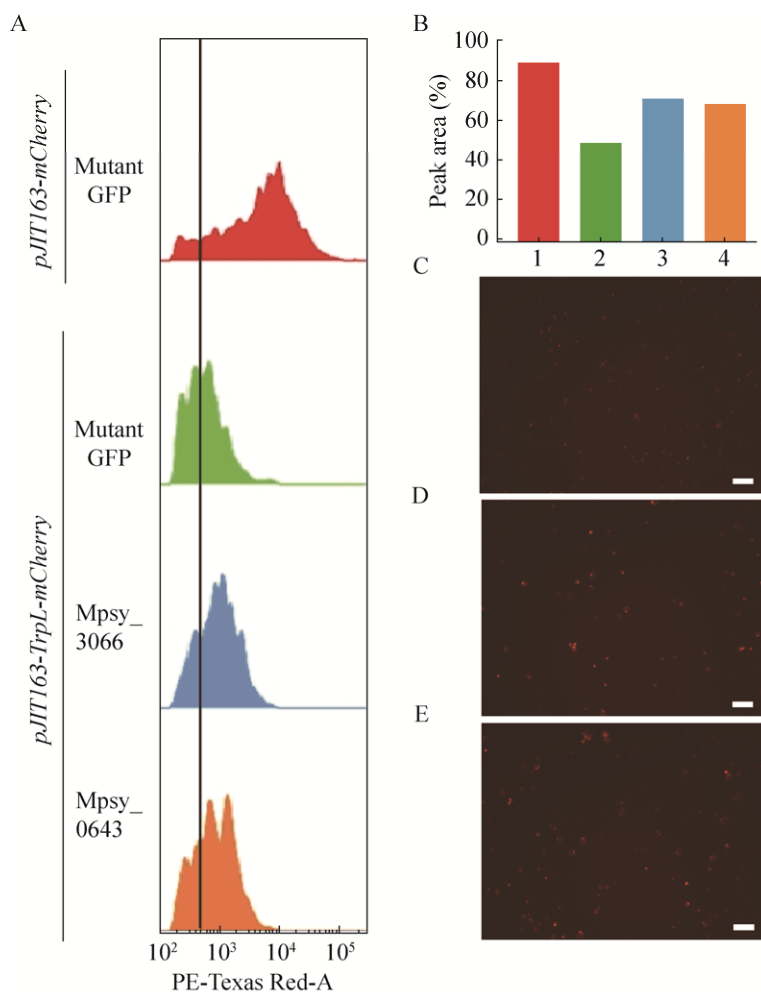


图6 古菌 TRAM 在水稻原生质体中对 RNA 二级结构的解链活性

Fig. 6 Unwinding of RNA structure by archaeal TRAMs in rice protoplasts. (A) Flow cytometry analyses of transformed protoplast samples, horizontal axis represents fluorescence intensity, and vertical axis represents cell counts under different fluorescence intensities. Protoplast transformed with pJIT163-mCherry and pJIT163-GFP Y67L was used as control, the fluorescence intensity corresponding to 50% of the control peak area was used as the standard fluorescence intensity. (B) Peak areas of fluorescence intensity in different samples relative to that in the control samples (set as 50%). Same colors represent the same corresponding samples in Figure 6A and 6B. (C) Fluorescence of protoplasts transformed with pJIT163-TrpL-mCherry and pJIT163-GFP Y67L observed with a fluorescence microscopy. (D) Fluorescence of protoplasts transformed with pJIT163-TrpL-mCherry and pJIT163-Mpsy-3066 observed with a fluorescence microscopy. (E) Fluorescence of protoplasts transformed with pJIT163-TrpL-mCherry and pJIT163-Mpsy-0643 observed with a fluorescence microscopy. Bars=100 μm.

在植物中过表达可以提高植物耐受干旱的能力。我们通过实验进一步验证了这一猜想。在 PEG 模拟干旱的处理条件下，我们统计了植株地上部分的生长能力。与野生型植物相比，过表达 TRAM 的水稻幼苗植物地上部分生长能力均有不同程度

的提高；在对苗期植物脱水处理后复水，水稻幼苗存活率有 15%–20% 的提高。同时，我们进一步验证了水稻成株期时耐受干旱胁迫的能力，在干旱处理 7 d 后，野生型植株在复水后枯死较多，而异源表达 TRAM 的水稻植株仍有半数以上可以

继续生长,证明了转基因水稻植株在成株期的耐旱能力也有所提升。这些结果都支持异源表达 TRAM 可以提高水稻耐受干旱胁迫的能力。

目前,虽然有大量的文献报道了通过改造植物内源基因或表达异源基因来提高植物抗旱的能力,但是一些基因在提高水稻抗旱能力的同时会影响水稻的生长。例如,由 CaMV 35S 启动子过表达的一些转录因子(如 DREB)会导致植物生长缓慢,进而导致产量下降^[22]。AtRZ-1a 过表达拟南芥植株与野生型相比,表现出种子萌发迟缓和幼苗生长变慢的表型。有趣的是,过表达古菌 TRAM 的水稻植株没有表现出明显的植物营养生长的差异,进一步支持了该类基因在水稻抗旱性遗传改良中的利用价值。

对于 TRAM 蛋白在植物细胞中可能的作用机制,我们发现 TRAM 蛋白在植物细胞中具有促进错误折叠的 RNA 结构改变而抗终止的功能,进一步证明了古菌 TRAMs 发挥 RNA 分子伴侣的功能。我们推测 TRAM 在水稻中也是利用其 RNA 分子伴侣的功能,在干旱胁迫条件下消除 RNA 二级结构的错误折叠对蛋白翻译的影响,从而保证机体代谢的正常进行。

在分子水平上,古菌和真核生物相比有更多的相似之处。古菌在转录、翻译及蛋白降解系统的组成元件上,都表现出明显的真核特征^[16]。如,古菌中 RNA 聚合酶比细菌中复杂的多,而且它们的亚基组成与真核生物相似^[23];又如,核糖体的三维结构也预示真核生物可能与泉古菌门在进化上的联系^[24]。阿斯加德古菌的发现进一步深化了人们对古菌和真核生物关系的认识^[25-26]。古菌作为生物学分类中一个庞大的分支,来自于古菌更多的分子元件、代谢产物有待我们开发,相信也将在植物基因工程改造上或者在更大范围获得更好的利用。

总之,本研究阐明了异源表达古菌 TRAM 基

因可以提高水稻耐受干旱的能力,TRAM 蛋白在植物细胞中发挥功能可能是通过打开错误配对的二级结构以稳定 RNA 的正常代谢。本研究也为开发利用古菌中多样的分子资源提供了参考。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所东秀珠研究员为我们提供 TRAM 的相关信息及材料。

REFERENCES

- [1] Jiang Y, van Groenigen KJ, Huang S, et al. Higher yields and lower methane emissions with new rice cultivars. *Glob Chang Biol*, 2017, 23(11): 4728–4738.
- [2] Serraj R, McNally KL, Slamet-Loedin I, et al. Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. *Plant Prod Sci*, 2011, 14(1): 1–14.
- [3] Tardieu F, Simonneau T, Muller B. The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 733–759.
- [4] Varshney RK, Tuberosa R, Tardieu F. Progress in understanding drought tolerance: from alleles to cropping systems. *J Exp Bot*, 2018, 69(13): 3175–3179.
- [5] Basu S, Ramegowda V, Kumar A, et al. Plant adaptation to drought stress. *F1000Res*, 2016, 5, doi: 10.12688/f1000research.7678.1.
- [6] Jorin JV, Maldonado AM, Castillejo MA. Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics*, 2007, 7(16): 2947–2962.
- [7] Choudhary MK, Basu D, Datta A, et al. Dehydration-responsive nuclear proteome of rice (*Oryza sativa* L.) illustrates protein network, novel regulators of cellular adaptation, and evolutionary perspective. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(7): 1579–1598.
- [8] Swamy BPM, Kumar A. Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1308–1318.
- [9] Herschlag D. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem*, 1995, 270(36): 20871–20874.

- [10] Zhang B, Yue L, Zhou LG, et al. Conserved TRAM domain functions as an archaeal cold shock protein via RNA chaperone activity. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1597.
- [11] Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(1): 283–287.
- [12] Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, et al. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol*, 2008, 147(2): 446–455.
- [13] Yu TF, Xu ZS, Guo JK, et al. Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene SeCspA. *Sci Rep*, 2017, 7: 44050.
- [14] Yang DH, Kwak KJ, Kim MK, et al. Expression of *Arabidopsis* glycine-rich RNA-binding protein AtGRP2 or AtGRP7 improves grain yield of rice (*Oryza sativa*) under drought stress conditions. *Plant Sci*, 2014, 214: 106–112.
- [15] Baek W, Lim CW, Lee SC. A DEAD-box RNA helicase, RH8, is critical for regulation of ABA signalling and the drought stress response via inhibition of PP2CA activity. *Plant Cell Environ*, 2018, 41(7): 1593–1604.
- [16] Eme L, Spang A, Lombard J, et al. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(12): 711–723.
- [17] Shcherbakova V, Yoshimura Y, Ryzhmanova Y, et al. Archaeal communities of Arctic methane-containing permafrost. *FEMS Microbiol Ecol*, 2016, 92(10): fiw135.
- [18] Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. TRAM, a predicted RNA-binding domain, common to tRNA uracil methylation and adenine thiolation enzymes. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 197(2): 215–221.
- [19] Theobald DL, Mitton-Fry RM, Wuttke DS. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003, 32(1): 115–133.
- [20] Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol*, 1992, 18(4): 675–689.
- [21] Zhang Y, Su JB, Duan S, et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 2011, 7: 30.
- [22] Shen YG, Zhang WK, He SJ, et al. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(5): 923–930.
- [23] Huet J, Schnabel R, Sentenac A, et al. Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J*, 1983, 2(8): 1291–1294.
- [24] Lake JA, Henderson E, Oakes M, et al. Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(12): 3786–3790.
- [25] Spang A, Saw JH, Jørgensen SL, et al. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 2015, 521(7551): 173–179.
- [26] Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, et al. *Asgard archaea* illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 2017, 541(7637): 353–358.

(本文责编 陈宏宇)