

• 农业生物技术 •

芥菜 HDA9 突变体构建及其与开花整合子 *SOC1*、*AGL24* 启动子互作

张俊利¹, 蒋炜¹, 李晟男¹, 周雯文¹, 王志敏¹, 魏大勇¹, 王鹤冰², 汤青林¹

1 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

2 重庆市农业科学研究院, 重庆 401329

张俊利, 蒋炜, 李晟男, 等. 芥菜 HDA9 突变体构建及其与开花整合子 *SOC1*、*AGL24* 启动子互作. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1170–1180.

Zhang JL, Jiang W, Li SN, et al. Mutant construction of HDA9 and its interactions with promoters of flowering integrator *SOC1* and *AGL24* in *Brassica juncea*. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1170–1180.

摘要: 芥菜 HDA9 是去乙酰化酶家族成员, 能通过开花信号整合子 (*SOC1*、*AGL24*) 调控开花时间, 但其深入的分子调控机制仍不清楚。利用重叠延伸 PCR 将芥菜 HDA9 的 3 个关键活性位点 (Asp¹⁷²、His¹⁷⁴ 和 Asp²⁶¹) 分别突变为 Ala, 构建氨基酸位点突变体 HDA9^{D172A}、HDA9^{H174A} 和 HDA9^{D261A}。进一步将突变体融合到 pGADT7 载体, 酵母单杂交表明, HDA9 突变后仍能与开花整合子 *SOC1*、*AGL24* 的启动子结合。双荧光素酶系统深入检测发现, 尽管 HDA9^{D172A}、HDA9^{H174A} 和 HDA9^{D261A} 与 *SOC1*、*AGL24* 启动子的结合仍存在, 但作用强度均显著减弱。由此暗示, 芥菜 HDA9 的第 172、174 和 261 这 3 个关键活性位点可在一定程度上调节它与开花整合子的相互作用。这为 HDA9 开花分子调控及功能解析等深入研究奠定了基础。

关键词: 芥菜, 去乙酰化酶 9, 开花信号整合子, 相互作用

Received: September 16, 2019; **Accepted:** December 18, 2019

Supported by: Natural Science Foundation of Chongqing, China (Nos. cstc2019jcyj-zdxmX0022, cstc2019jcyj-msxmX0335).

Corresponding authors: Qinglin Tang. Tel: +86-23-68251274; Email: swutql@163.com

Hebing Wang. Tel: +86-23-65705208; E-mail: 26498118@qq.com

重庆市自然科学基金 (Nos. cstc2019jcyj-zdxmX0022, cstc2019jcyj-msxmX0335) 资助。

网络出版时间: 2020-01-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200106.1103.008.html>

Mutant construction of HDA9 and its interactions with promoters of flowering integrator *SOC1* and *AGL24* in *Brassica juncea*

Junli Zhang¹, Wei Jiang¹, Shengnan Li¹, Wenwen Zhou¹, Zhimin Wang¹, Dayong Wei¹, Hebing Wang², and Qinglin Tang¹

¹ College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

Abstract: HDA9, a member of the deacetylase family, plays a vital role in regulating plant flowering time through flowering integrator *SOC1* and *AGL24*. However, it remains elusive how HDA9 interacts with *SOC1* and *AGL24* in flowering time control. Here, HDA9 was cloned in *Brassica juncea* and then its three active sites were separately replaced with Ala via overlap extension PCR. Thus, mutants of HDA9^{D172A}, HDA9^{H174A} and HDA9^{D261A} were constructed and fused into the pGADT7 vector. The yeast one-hybrid assays indicated that HDA9 mutants remained the interactions with the promoters of *SOC1* and *AGL24*. Furthermore, the aforementioned results were confirmed in the dual luciferase assays. Interestingly, the DNA-protein interactions were weakened significantly due to the mutation in the three active sites of HDA9. It suggested that flowering signal integrator *SOC1* and *AGL24* were regulated by the key amino acid residues of 172th, 174th and 261th in HDA9. Our results provide valuable information for the in-depth study of the biological function and molecular regulation of HDA9 in *Brassica juncea* flowering time control.

Keywords: *Brassica juncea*, HDA9, flowering signal integrator, interaction

芥菜 (*Brassica juncea* Coss.) 是十字花科重要蔬菜作物, 开花时间提前或延迟, 不仅影响产品器官的产量和品质, 还会影响品种选育进程。因此, 有关芥菜抽薹开花调控研究一直是科研工作者关注焦点。开花时间受光周期途径、春化途径、赤霉素途径和自主途径等调控。Histone deacetylase 9 (HDA9) 属于去乙酰化酶家族 (HDACs) 之中 RPD3/DAD1 亚家族成员, 具有典型的组蛋白去乙酰化酶结构域, 其酶活性的发挥需要 Zn²⁺ 的存在^[1-2]。HDACs 在植物开花调控、防御反应和逆境适应等多个发育事件中起着至关重要的作用^[3]。去乙酰化酶基因 *HDA9* 在拟南芥茎尖、花蕾和种子中表达量较高^[4-5]。

HDA9 基因参与拟南芥开花时间控制^[6], 转基因超量表达 *HDA9* 会延迟植株开花时间, 而其功能缺失则提前开花^[4]。*HDA9* 可逆地调节组蛋白的乙酰化水平。拟南芥 *HDA9* 通过介导染色质重构来抑制 Flowering locus T (FT) 上游激活因子

Agamous-like 19 (AGL19) 的活性, 从而延迟短日照条件下植株的开花时间^[4]。FT 编码蛋白是成花素因子, 主要在叶片中合成, 通过筛管运输到茎顶端分生组织 (SAM), 促进开花^[7-9]。由此说明: FT 促进开花的功能受到 HDA9 的调控。另外, Suppressor of overexpression of constans 1 (*SOC1*) 和 Agamous-like 24 (*AGL24*) 是 MIKC 型转录因子^[10-11], 可促进花分生组织形成, 也可调节开花时间^[12], 它们和 FT 均是开花信号整合子^[11,13-14]。那么, *SOC1* 和 *AGL24* 的开花促进作用是否也受去乙酰化酶 HDA9 的调节? 彼此之间精细的分子调控机制如何?

本实验室最近发现芥菜 HDA9 不能直接作用于 *SOC1* 和 *AGL24* 蛋白, 但可与 *SOC1* 和 *AGL24* 的启动子结合, 调节开花^[5]。然而, 芥菜 HDA9 蛋白究竟依靠哪些氨基酸位点调节该蛋白-DNA 相互作用来参与开花调节, 目前仍不清楚。

HDACs 是典型的含 Zn²⁺ 酶, 前人研究表明, 在人体中有 3 个氨基酸 (D178、H180 和 D267)

负责螯合 HDAC8 的活性位点 Zn^{2+} ，它们中任何一个发生突变都会影响去乙酰化酶的活性^[15-16]。将这 3 个氨基酸突变为丙氨酸，会导致该去乙酰化酶的活性完全丧失，说明它们是调节该去乙酰化酶功能的关键氨基酸位点^[17]。这些氨基酸位点在去乙酰化酶家族中高度保守。与此类似，另一个去乙酰化酶 Histone deacetylase 5 (HDA5) 中这 3 个位点 (D198、H200 和 D291) 突变后也会丧失功能^[17]。本研究中通过序列比对发现，芥菜 HDA9 的这 3 个氨基酸活性位点分别在第 172、174、261 位。那么，这些位点突变是否可改变它与开花整合子 *SOC1*、*AGL24* 启动子的相互作用，迄今未见报道。为此，本研究分别构建芥菜 HDA9 中这 3 个位点的突变体 HDA9^{D172A}、HDA9^{H174A} 和 HDA9^{D261A}，利用酵母单杂交系统和双荧光素酶系统分析 HDA9 突变体与 *SOC1*、*AGL24* 启动子的相互作用。这为深入解析去乙酰化酶 HDA9 调控开花时间的分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料芥菜“QJ”和本氏烟来源于重庆市蔬菜学重点实验室，种植于 RXZ 型人工气候箱。

高保真酶 EasyPfu DNA Polymerase 由北京金式生物技术有限公司提供；质粒提取试剂盒以及胶回收纯化试剂盒由 OMEGA 公司提供。酵母菌株 Y1HGold、酵母单杂交质粒 (pGADT7、pAbAi、p53-AbAi) 和 Aureobasidin A (简称 AbA) 均购自 Clontech 公司。农杆菌菌株 GV3101、双萤光素酶载体 pGreen II 62-SK、pGreen II 0800-LUC 和 pSoup 由本实验室保存并提供。芥菜 *SOC1*

启动子、*AGL24* 启动子的酵母融合载体 pAbAi-*SOC1* 和 pAbAi-*AGL24* 及其酵母转化菌液均由实验室保存并提供。

1.2 芥菜 HDA9 的序列分析与突变体构建

NCBI 搜索 HDAC 家族成员 hsHDAC8 以及拟南芥 HDA2、HDA5、HDA6、HDA15、HDA18 和 HDA19 (GenBank 登录号分别为：NC_000023.11、NC_003076.8、NC_003076.8、NC_003076.8、NC_003074.8、NC_003076.8 和 NC_003075.7)。DNAMAN 软件氨基酸序列比对，寻找 HDAC 家族保守的活性位点。

以芥菜 cDNA 为模板，以 F_{HDA9}/R_{HDA9} (表 1) 为引物扩增目的片段 *HDA9*，胶回收并连接克隆载体，经过 PCR 检测、双酶切鉴定和测序验证后提取质粒。以连接 *HDA9* 基因的克隆载体为模板，利用重叠延伸 PCR 技术 (表 2)，经琼脂糖凝

表 1 实验所用引物^[18]

Table 1 Primers used in this study^[18]

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F _{HDA9}	GAGATGCGGTCCAAGGAC
R _{HDA9}	CGCATCGTTATCGTTGTC
F _{HDA9-AD}	CGCCATATGGAGATGCGGTCCAAGGAC
R _{HDA9-AD}	CGCGGATCCCGCATCGTTATCGTTGTC
F _{HDA9-SK}	GCTCTAGAGAGATGCGGTCCAAGGAC
R _{HDA9-SK}	CGCGGATCCCGCATCGTTATCGTTGTC
F _{m1}	GATATAGCTGTTTCATCACGG
R _{m1}	CCGTGATGAACAGCTATATC
F _{m2}	GATGTTGCTCACGGTGATGG
R _{m2}	CCATCACCGTGAGCAACATC
F _{m3}	GGAGCAGCTTCACTAGCAAG
R _{m3}	CTTGCTAGTGAAGCTGCTCC
T7	TAATACGACTCACTATAGGGCG
3'AD	AGATGGTGCACGATGCACAG

Note: the mutated sites are underlined.

表 2 HDA9 突变体构建^[18]

Table 2 Mutant construction of HDA9 in *Brassica juncea*^[18]

Primer combinations for PCR			Mutation amino acid	Mutants
First round PCR	Second round PCR	Third round PCR		
F _{HDA9-AD} /R _{m1}	F _{m1} /R _{HDA9-AD}	F _{HDA9-AD} /R _{HDA9-AD}	172D_172A	HDA9 ^{D172A}
F _{HDA9-AD} /R _{m2}	F _{m2} /R _{HDA9-AD}	F _{HDA9-AD} /R _{HDA9-AD}	174H_174A	HDA9 ^{H174A}
F _{HDA9-AD} /R _{m3}	F _{m3} /R _{HDA9-AD}	F _{HDA9-AD} /R _{HDA9-AD}	261D_261A	HDA9 ^{D261A}

胶电泳后回收第一、二轮目的片段产物，并等量混合作为模板进行第三轮 PCR，回收目的片段并筛选阳性克隆，测序鉴定并提取质粒备用。

1.3 HDA9 突变体酵母载体构建

用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切上述突变体质粒及酵母表达载体 pGADT7，然后连接并转化大肠杆菌，经 T7 和 3'AD 引物组合 (表 1) PCR 检测后，提取重组质粒，双酶切鉴定并送测序验证。酵母重组质粒分别记为 pGADT7-HDA9^{D172A}、pGADT7-HDA9^{H174A} 和 pGADT7-HDA9^{D261A}。芥菜 *SOC1*、*AGL24* 启动子的重组质粒 pAbAi-*SOC1* 和 pAbAi-*AGL24* 由本实验室前期已构建，可直接用于本研究。

1.4 HDA9 突变体双荧光素酶载体构建

以 F_{HDA9-SK} 和 R_{HDA9-SK} 为引物组合进行 PCR 扩增，亚克隆芥菜 *HDA9* 突变体，并连接到双荧光素酶表达载体 pGreen II 62-SK，经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切和测序验证后分别命名为 pGreen II 62-SK-HDA9^{D172A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{H174A} 和 pGreen II 62-SK-HDA9^{D261A}。芥菜 *SOC1*、*AGL24* 启动子的重组质粒 pGreen II 0800-LUC-*SOC1* 和 pGreen II 0800-LUC-*AGL24* 由本实验室前期构建，已转 GV3101 菌株 (含 pSoup 质粒)，可直接用于本研究。

1.5 酵母单杂交鉴定蛋白-DNA 互作

参考酵母单杂交试剂盒操作手册，以 pAbAi-*SOC1*、pAbAi-*AGL24* 的 Y1HGold 转化子菌株为样本，分别制备酵母感受态细胞。将 pGADT7-HDA9^{D172A}、pGADT7-HDA9^{H174A} 和 pGADT7-HDA9^{D261A} 分别转入上述感受态细胞，获得酵母融合子 Y1HGold (*SOC1*+HDA9^{D172A})、Y1HGold (*SOC1*+HDA9^{H174A}) 和 Y1HGold (*SOC1*+HDA9^{D261A})、Y1HGold (*AGL24*+HDA9^{D172A})、Y1HGold (*AGL24*+HDA9^{H174A}) 和 Y1HGold (*AGL24*+HDA9^{D261A})。在 SD/Leu 和 SD/Leu/AbA 培养基上 28 °C 培养 3–5 d，观察是否有菌落出现。

同时，将 p53-AbAi 和 pGADT7-53 质粒共转化到 Y1HGold 作为阳性对照；将质粒 pAbAi-*SOC1* 和 pGADT7 质粒共转化 Y1HGold 作为 *SOC1* 启动子的阴性对照；将 pAbAi-*AGL24* 和 pGADT7 质粒共转化 Y1HGold 作为 *AGL24* 启动子的阴性对照。按本实验室前期分别筛选出的 *SOC1* 和 *AGL24* 启动子在酵母平板上的 AbA 抑菌浓度 (分别为 100 ng/mL 和 350 ng/mL) 配制酵母培养基。将上述酵母菌液分别稀释 1 倍、10 倍和 50 倍后，点样于 SD/-Leu 平板及其 AbA 抗性酵母平板 SD/-Leu/AbA¹⁰⁰ 或 SD/-Leu/AbA³⁵⁰，检测 HDA9 突变体与 *SOC1*、*AGL24* 启动子之间是否相互作用。

1.6 双荧光素酶检测蛋白-DNA 互作

将载体 pGreen II 62-SK-HDA9^{D172A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{H174A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{D261A} 和 pGreen II 62-SK 分别转化 GV3101 菌株 (含 pSoup 质粒)。单菌落经 PCR 阳性鉴定后，扩大培养，按 OD₆₀₀ 的比值 1 : 9 将 pGreen II 0800-LUC-*SOC1* 或 pGreen II 0800-LUC-*AGL24* 分别与 pGreen II 62-SK-HDA9^{D172A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{H174A} 和 pGreen II 62-SK-HDA9^{D261A} 菌液混匀，作为实验组。pGreen II 0800-LUC-*SOC1* 或 pGreen II 0800-LUC-*AGL24* 分别与 pGreen II 62-SK-HDA9 菌液按 OD₆₀₀ 比值 1 : 9 混匀，作为阳性对照。同样将 pGreen II 0800-LUC-*SOC1* 或 pGreen II 0800-LUC-*AGL24* 分别与 pGreen II 62-SK 混匀后作为阴性对照。分别侵染本氏烟叶片后 60 h 取样，置于 GloMax[®]-Multi⁺ 多功能检测仪，测定双荧光素酶并计算酶活性比值，SPSS 软件方差分析，LSD 法多重比较，显著性水平为 0.01。

2 结果与分析

2.1 芥菜 HDA9 序列分析及其突变体克隆

芥菜 *HDA9* 基因 cDNA 序列为 1 284 bp，编码 426 个氨基酸。参考 Luo 等将此与拟南芥 HDA2、HDA5、HDA6、HDA9、HDA15、HDA18 以及

hsHDAC8 序列比对^[17]: HDAC 家族成员的酶活性位点高度保守, 分别为 Asp (D)、His (H) 和 Asp (D), 其中芥菜 HDA9 的这 3 个位点分别位于第 172 位、174 位和 261 位 (图 1)。利用重叠延伸 PCR 技术分别将上述位点突变为 Ala (A), 构建芥菜 HDA9 的 3 个突变体 HDA9^{D172A}、HDA9^{H174A} 和 HDA9^{D261A}。PCR 扩增产物电泳检测和测序结果 (图 2) 均表明, 上述 HDA9 突变体构建成功。ExPASy SWISS-MODEL 同源建模和蛋白结构预测表明, 芥菜 HDA9 的这 3 个突变体均不会改变蛋白三维空间结构。

2.2 重组载体构建与鉴定

将上述芥菜 HDA9 的 3 个突变体分别融合到酵母表达载体 pGADT7, 构建酵母融合质粒 pGADT7-HDA9^{D172A}、pGADT7-HDA9^{H174A} 和 pGADT7-HDA9^{D261A}。经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定和测序表明, 目的片段的序列及插入方向完全正确。此外, 酵母质粒 pAbAi-SOC1 和 pAbAi-AGL24 为本实验室前期构建, 可直接用于

后续酵母单杂交检测。

将芥菜 HDA9 的 3 个突变体融合到双荧光素酶载体 pGreenII 62-SK, 获重组载体 pGreen II 62-SK-HDA9^{D172A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{H174A} 和 pGreen II 62-SK-HDA9^{D261A}。经 PCR 检测正确的阳性菌落扩大培养并提取重组质粒, 然后双酶切鉴定和测序分析, 结果表明上述融合载体构建成功。此外, pGreen II 0800-LUC-SOC1 和 pGreen II 0800-LUC-AGL24 载体已由本实验室前期构建, 可直接用于后续实验。

2.3 芥菜 HDA9 突变体与 SOC1、AGL24 启动子酵母单杂交鉴定

本实验室蒋炜等发现芥菜 HDA9 能与开花整合子 SOC1 和 AGL24 的启动子相互作用^[5]。但是, 去乙酰化酶 HDA9 是否会利用其关键活性位点调控它与开花整合子的作用? 为此, 本研究深入检测芥菜 HDA9 活性位点的一系列突变体与开花整合子的相互作用。

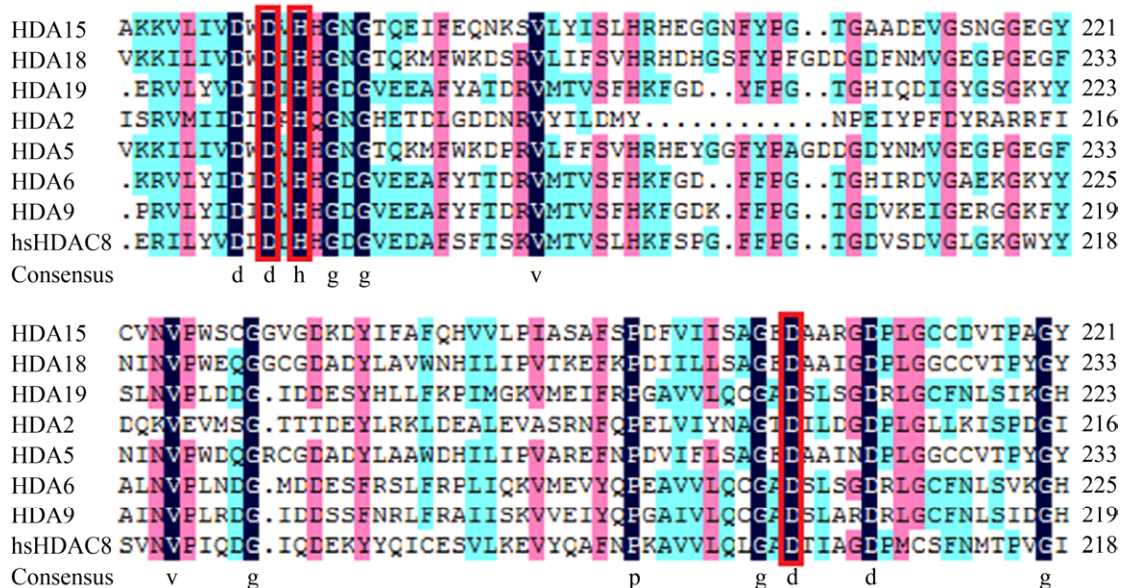


图 1 芥菜 HDA9 和拟南芥菜 HDA2、HDA5、HDA6、HDA15、HDA18 及人 hsHDAC8 催化结构域^[17]

Fig. 1 The conserved catalytic sites of *Brassica juncea* HDA9 compared with *Arabidopsis thaliana* HDA2, HDA5, HDA6, HDA15, HDA18, HDA19 and human hsHDAC8^[17]. The red boxes indicate three conserved amino acids that are responsible for chelating Zn²⁺ in hsHDAC8.

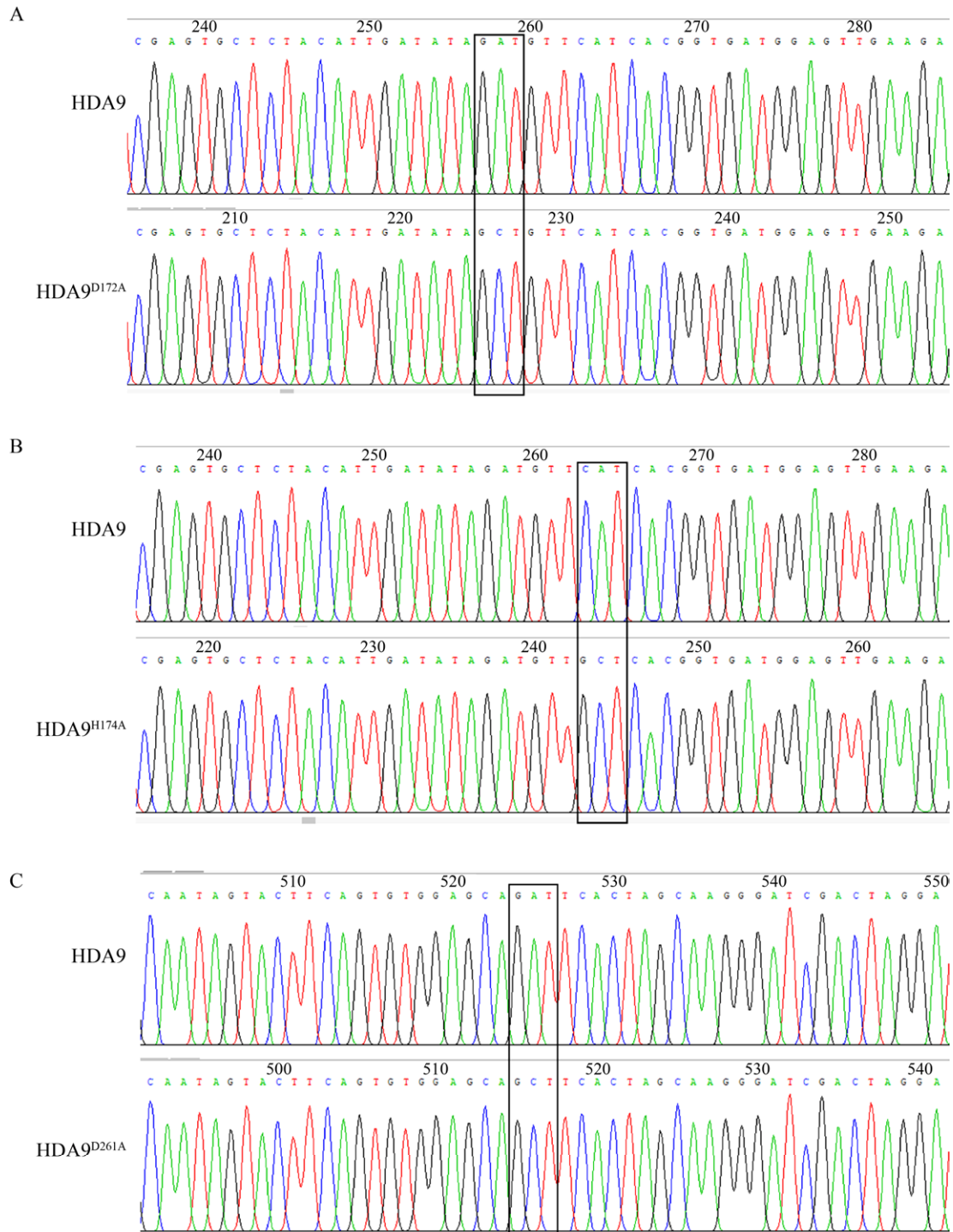


图 2 芥菜 *HDA9* 的 3 个突变体 (*HDA9*^{D172A}、*HDA9*^{H174A} 和 *HDA9*^{D261A}) 的突变区域测序峰图

Fig. 2 Sequencing peak maps in the mutation sections of *HDA9*^{D172A}, *HDA9*^{H174A} and *HDA9*^{D261A}. Rectangular boxes indicate the mutation sites of *HDA9*^{D172A}, *HDA9*^{H174A} and *HDA9*^{D261A} in (A), (B) and (C), respectively.

将酵母重组质粒 pGADT7-HDA9^{D172A}、pGADT7-HDA9^{H174A} 和 pGADT7-HDA9^{D261A} 分别转化到酵母猎物菌株 Y1H (pAbAi-SOC1) 或 Y1H (pAbAi-AGL24), 作为实验处理组; 空载体 pGADT7 也转化到酵母猎物菌株作为阴性对照; 质粒 pGADT7-p53 转化到 Y1H (p53-AbAi) 作为阳性对照。所有处理组合、阳性对照和阴性对照均可以在营养缺陷培养基 SD/-Leu 上生长 (图 3-4), 说明重组质粒成功转入酵母菌, 可用于后续实验。

将上述酵母杂交菌分别稀释 1 倍、10 倍和 50 倍后点样于 SD/-Leu/AbA 抗性培养基进一步检测。结果表明, Y1H (SOC1+HDA9^{D172A})、Y1H (SOC1+HDA9^{H174A}) 和 Y1H (SOC1+HDA9^{D261A}) 均能在 SD/-Leu/AbA¹⁰⁰ 平板生长且呈现白色菌落; 阳性对照 Y1H (p53-AbAi+pGADT7-53) 也可在该平板长出白色酵母菌; 但阴性对照不能生长 (图 3)。由此说明突变体 HDA9^{D172A}、HDA9^{H174A} 和 HDA9^{D261A} 仍能够与开花整合子 SOC1 的启动子相互作用。

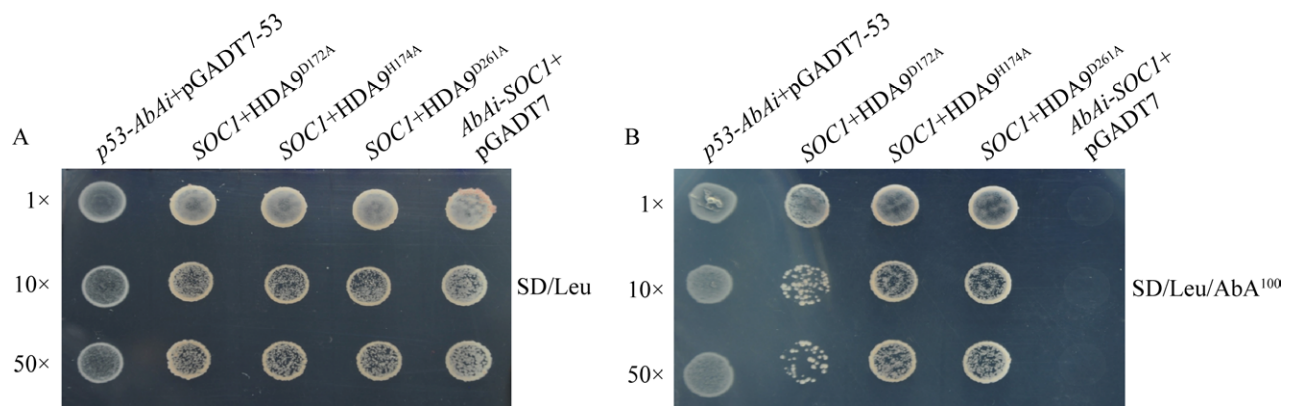


图 3 芥菜 HDA9 突变体与 SOC1 启动子酵母单杂交

Fig. 3 Interaction identification between SOC1 promoter and HDA9 mutants via yeast one-hybrid. Growth of the fusion yeast strain with different dilutions on the defect medium SD/-Leu (A) and SD/-Leu/AbA¹⁰⁰ (B).

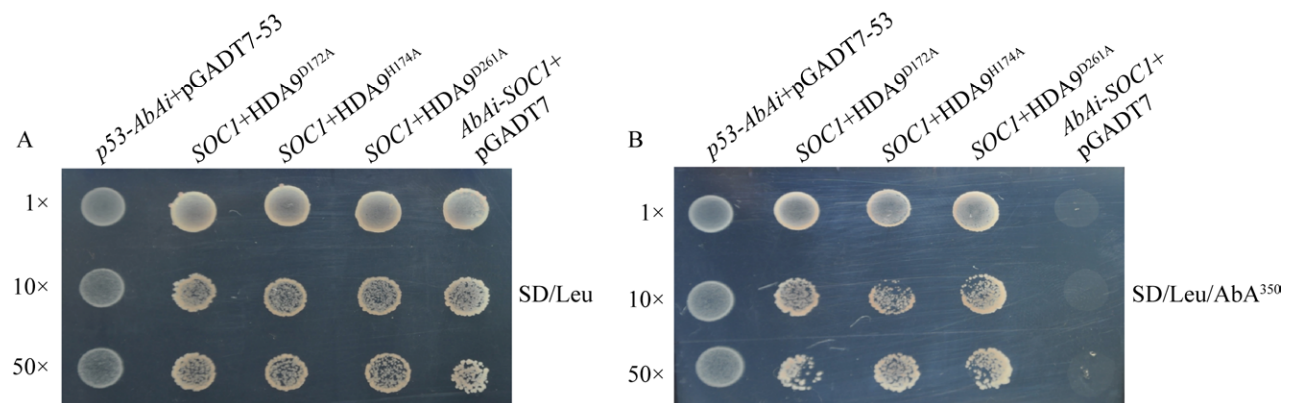


图 4 芥菜 HDA9 突变体与 AGL24 启动子酵母单杂交

Fig. 4 Interaction identification between AGL24 promoter and HDA9 mutants via yeast one-hybrid. Growth of the fusion yeast strain with different dilutions on the defect medium SD/-Leu (A) and SD/-Leu/AbA³⁵⁰ (B).

同样,将酵母杂交融合菌 Y1H (*AGL24*+*HDA9*^{D172A})、Y1H (*AGL24*+*HDA9*^{H174A})、Y1H (*AGL24*+*HDA9*^{D261A}) 以及阳性对照菌株 Y1H (p53-AbAi+pGADT7-53) 分别涂布于 SD/-Leu/AbA³⁵⁰ 平板,也都可长出白色酵母菌;但阴性对照不能生长(图 6)。由此表明,*HDA9*^{D172A}、*HDA9*^{H174A} 和 *HDA9*^{D261A} 突变体与另一个开花整合子 *AGL24* 的启动子仍能够互作。

综上所述可知,芥菜去乙酰化酶 HDA9 的 3 个活性位点(第 172、174 和 261 位)突变之后并不会导致它与开花整合子 *SOC1*、*AGL24* 的相互作用消失。

2.4 芥菜 HDA9 突变体与 *SOC1*、*AGL24* 启动子双荧光素酶鉴定

利用双荧光素酶系统进一步检测芥菜 HDA9 活性位点突变之后与开花信号整合子的作用关系,设计了双荧光素酶检测系统的实验(图 5)。

将 pGreen II 62-SK-HDA9^{D172A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{H174A} 和 pGreen II 62-SK-HDA9^{D261A} 分别与 pGreen II 0800-LUC-*SOC1* 菌液混匀作为实验处理组合;pGreen II 62-SK-HDA9 和 pGreen II 62-SK 分别与 pGreen II 0800-LUC-*SOC1* 菌液混匀,作为阳性和阴性对照。结果表明,*HDA9* 突变体组合的酶活性比值(LUC/REN)均极显著高于阴性对照,但又极显著低于 *HDA9* 未突变的阳性对照(图 6)。由此说明,芥菜 HDA9 蛋白突变之后仍然能够与开花整合子 *SOC1* 结合,但结合强度会显著降低。

同样,将 pGreen II 62-SK-HDA9^{D172A}、pGreen II 62-SK-HDA9^{H174A} 和 pGreen II 62-SK-HDA9^{D261A} 分别与 pGreen II 0800-LUC-*AGL24* 菌液混匀,浸染本氏烟,检测酶活性及比值(图 7),结果表明,*HDA9*^{D172A}、*HDA9*^{H174A} 和 *HDA9*^{D261A} 均能够与 *AGL24* 的启动子结合,但结合强度也显著降低。

综上所述,芥菜 HDA9 第 172、174 和 261 位

的氨基酸突变后,会显著降低其与开花整合子 *SOC1*、*AGL24* 启动子的结合强度。由此暗示,芥菜 HDA9 的这 3 个关键位点在一定程度上调节其与 *SOC1*、*AGL24* 启动子的结合作用。这为基于去乙酰化酶 HDA9 调控芥菜开花时间等深入研究提供了新的突破口。

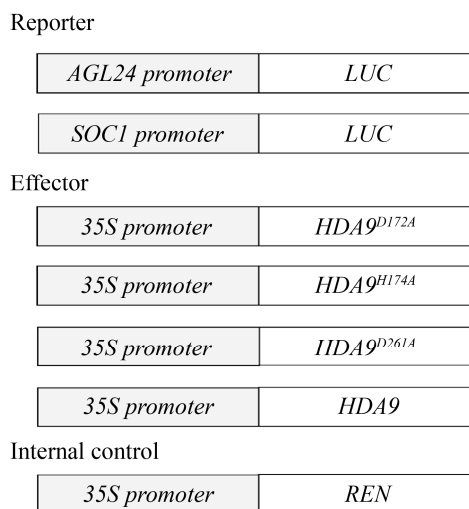


图 5 双荧光素酶检测系统的实验设计示意图

Fig. 5 Schematic diagram of experimental design of dual luciferase detection system.

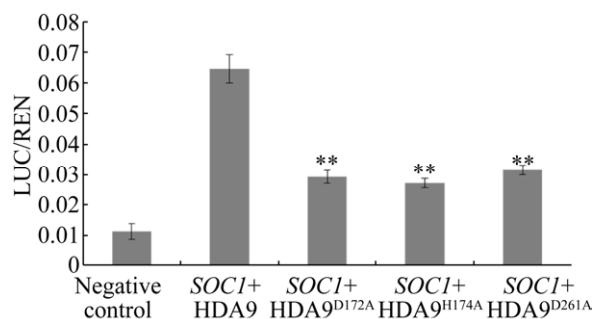


图 6 芥菜 HDA9 突变体与 *SOC1* 启动子作用的双荧光素酶检测

Fig. 6 Interaction identification of HDA9 mutants and *SOC1* promoter via dual luciferase system. The experiments were conducted at three replicates per experiment and the data was analyzed at $P < 0.01$. Double stars (**) showed extremely significant differences compared with positive and negative controls.

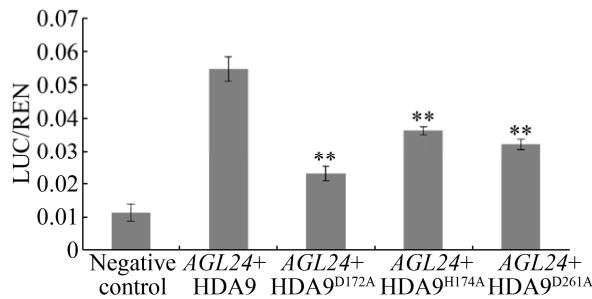


图7 芥菜 HDA9 突变体与 AGL24 启动子作用的双荧光素酶检测

Fig. 7 Interaction identification of HDA9 mutants and AGL24 promoter via dual luciferase system. The experiments were conducted at three replicates per experiment and the data was analyzed at $P < 0.01$. Double stars (**) showed extremely significant differences compared with positive and negative controls.

3 讨论

3.1 HDA9 与 RPD3/HDA1 亚家族成员高度保守
去乙酰化酶 HDACs 参与基因表达、DNA 修复和应激反应等^[19]。真核生物中 HDAC 家族可分为 3 个亚族: RPD3/HDA1 (Reduced potassium dependence 3/Histone deacetylase 1)、SIR2 (Silent information regulator 2) 和 HD2 (Histone deacetylase 2)^[20-21]。其中, RPD3/HDA1 亚族又进一步分为 3 类: I 类包括 HDA19、HDA6、HDA7 和 HDA9; II 类包括 HDA5、HDA15 和 HDA18; III 类仅包括 HDA2^[3,22]。本研究克隆的芥菜 HDA9 属于 RPD3/HDA1 亚族第 I 类, 与 HDAC 家族成员具有高度的保守性, 3 个关键活性位点与拟南芥 HDA2、HDA5、HDA6、HDA15、HDA18 以及人类 hsHDAC8 完全一致, 分别为天冬氨酸、组氨酸和天冬氨酸, 它们分别位于芥菜 HDA9 蛋白的第 172、174 和 261 位。

3.2 HDA9 介导开花信号整合子调控开花时间

拟南芥 HDA9 基因突变后会打破种子休眠并加速种子萌发^[23], 也可调节大量非生物胁迫应答基因的表达水平^[24]。拟南芥 HDA9 也可参与开花

时间调控^[4-5]。HDA9 与 AHL22 相互作用并调节 FT 基因表达, 控制开花^[25]。另外, 开花信号整合子 SOC1 和 AGL24 整合光周期、春化等多条开花途径。本实验室前期研究发现, 芥菜 HDA9 不能与 SOC1 和 AGL24 蛋白相互作用, 但是可与其启动子相互结合, 调节开花时间^[5]。此外, 拟南芥 hdf5 突变体植株中 FLC 和 MAF1 表达增加; HDA5 能够与 FLD、FVE 蛋白相互作用, 也能与 HDA6 蛋白互作^[17]。HDA5 和 HDA6 可通过调节 FLC 基因的表达调控开花时间^[26]。在拟南芥 hda5 和 hda6 突变植株中, 2 个下游开花整合子 FT 和 SOC1 的转录水平均降低^[17]。由此暗示, HDA9 与 HDA5、HDA6 类似, 通过调节开花整合子的基因表达调控开花时间。

3.3 HDA9 通过其关键活性位点调控开花整合子

Vannini 等研究表明, 在人类 HDAC8 的 3 个酶活性位点中 (Zn^{2+} 螯合位点), 每一个氨基酸位点突变均会影响蛋白结合底物, 因此导致酶活性完全丧失^[16]。与此类似, 拟南芥 HDA5 的这 3 个保守位点 (D198、H200、D2) 被丙氨酸替换后, 体外表达的 GST-HDA5 原核蛋白也会失去酶活性。由此表明 HDA5 的第 198、200 和 291 位均为金属离子螯合所必需^[17]。Luo 等对拟南芥 HDA5 组蛋白去乙酰酶的研究表明, 它的 3 个保守氨基酸分别突变成丙氨酸后, 失去了组蛋白去乙酰基酶活性^[17]。另外, 在野生芥菜 ALS 基因突变的抗除草剂研究中, 发现第 23 号野生芥菜株系, 它的 ALS 编码蛋白的 122 位点突变成丙氨酸后, 导致 ALS 酶的敏感性降低, 显示出对除草剂的抗性^[27]。李素云等在人体鼻咽癌组织 STGC3 基因研究中, STGC3 基因单碱基突变, 丝氨酸突变为丙氨酸时, 突变的 STGC3 蛋白质不改变功能基因^[28]。以上述研究为借鉴, 本实验将芥菜 HDA9 的 3 个活性位点突变成丙氨酸, 并对突变体蛋白结构预测, 结果表明, 芥菜 HDA9 的这 3 个突变体均不会改变蛋白三维空间结构和亲水性。本研

究中利用酵母单杂交和双荧光素酶系统发现, 芥菜 HDA9 的 3 个突变体 HDA9^{D172A}、HDA9^{H174A} 和 HDA9^{D261A} 仍然与 *SOC1*、*AGL24* 的启动子结合, 但是结合强度会显著削弱。由此暗示, 芥菜 HDA9 的第 172、174 和 261 位氨基酸能在一定程度上调控其与开花整合子的相互作用。如果将这些位点突变成疏水性且羧基解离常数接近的亮氨酸或异亮氨酸后又如何调控开花整合子呢? 或者换成其他亲水或酸性氨基酸会有怎样的生物学功能? 由此可见, 去乙酰化酶 HDA9 调控抽薹开花的精细作用机制仍需后续深入研究。

REFERENCES

- [1] Pandey R, Müller A, Napoli CA, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(23): 5036–5055.
- [2] Han ZF, Wang QP, Luo XJ. Characteristic and function of histone deacetylases in plants. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2017, 33(10): 1008–1013 (in Chinese).
韩召奋, 王秋苹, 罗鑫娟. 植物组蛋白去乙酰化酶的特性及功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(10): 1008–1013.
- [3] Hollender C, Liu ZC. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *Integr Plant Biol*, 2008, 50(7): 875–885.
- [4] Kang MJ, Jin HS, Noh YS, et al. Repression of flowering under a noninductive photoperiod by the *HDA9-AGL19-FT* module in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2015, 206(1): 281–294.
- [5] Jiang W, Wei DY, Zhou WW, et al. HDA9 interacts with the promoters of *SOC1* and *AGL24* involved in flowering time control in *Brassica juncea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(3): 519–523.
- [6] Kim W, Latrasse D, Servet C, et al. *Arabidopsis* histone deacetylase HDA9 regulates flowering time through repression of *AGL19*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(2): 394–398.
- [7] Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 2007, 316(5827): 1030–1033.
- [8] Jaeger KE, Wigge PA. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2007, 17(12): 1050–1054.
- [9] Notaguchi M, Abe M, Kimura T, et al. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(11): 1645–1658.
- [10] Fernandez DE, Wang CT, Zheng YM, et al. The MADS-Domain factors AGAMOUS-LIKE15 and AGAMOUS-LIKE18, along with SHORT VEGETATIVE PHASE and AGAMOUS-LIKE24, are necessary to block floral gene expression during the vegetative phase. *Plant Physiol*, 2014, 165(4): 1591–1603.
- [11] Li CC, Ma GP, Xie T, et al. Analysis of interactions between AGL18 family members and flowering time integrator factor *SOC1* in *Brassica juncea*. *Acta Horticult Sin*, 2017, 44(3): 463–474 (in Chinese).
李朝闯, 马关鹏, 谢婷, 等. 芥菜 AGL18 家族成员与开花整合子 *SOC1* 的互作分析. *园艺学报*, 2017, 44(3): 463–474.
- [12] Lee H, Suh SS, Park E, et al. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2000, 14(18): 2366–2376.
- [13] Lee JH, Yoo SJ, Park SH, et al. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2007, 21(4): 397–402.
- [14] Li D, Liu C, Shen LS, et al. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2008, 15(1): 110–120.
- [15] Lombardi PM, Cole KE, Dowling DP, et al. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(6): 735–743.
- [16] Vannini A, Volpari C, Filocamo G, et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(42): 15064–15069.

- [17] Luo M, Tai R, Yu CW, et al. Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2015, 82(6): 925–936.
- [18] Jiang W. Cloning, expression of HDA9 and AGL19 and their mechanism in regulating key flowering integrators of *Brassica juncea*[D]. Chongqing: Southwest University, 2018 (in Chinese).
蒋炜. 芥菜 HDA9 和 AGL19 克隆、表达及其与核心开花整合子的作用机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [19] Hassig CA, Schreiber SL. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1(3): 300–308.
- [20] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5310–5318.
- [21] Liu XC, Yang SG, Zhao ML, et al. Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. *Mol Plant*, 2014, 7(5): 764–772.
- [22] Alinsug MV, Yu CW, Wu KQ, et al. Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 37, doi: 10.1186/1471-2229-9-37.
- [23] van Zanten M, Zöll C, Wang Z, et al. HISTONE DEACETYLASE 9 represses seedling traits in *Arabidopsis thaliana* dry seeds. *Plant J*, 2014, 80(3): 475–488.
- [24] Zheng Y, Ding Y, Sun X, et al. Histone deacetylase HDA9 negatively regulates salt and drought stress responsiveness in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2016, 67(6): 1703–1713.
- [25] Yun J, Kim YS, Jung JH, et al. The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying *FLOWERING LOCUS T* chromatin in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15307–15316.
- [26] Yu CW, Liu X, Luo M, et al. HISTONE DEACETYLASE6 interacts with *FLOWERING LOCUS D* and regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 156(1): 173–184.
- [27] Khaledi R, Fayaz F, Kahrizi D, et al. PCR-based identification of point mutation mediating acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in weed wild mustard (*Sinapis arvensis*). *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5): 5113–5121.
- [28] Li SY, Liu HQ, Liu F, et al. Construction of the STGC3 recombinant mutation vector and its expression in CNE2 cells. *Chin J Anat*, 2019, 42(5): 453–457 (in Chinese).
李素云, 刘慧晴, 刘芳, 等. STGC3 基因突变载体的构建及其在 CNE2 细胞中的表达. *解剖学杂志*, 2019, 42(5): 453–457.

(本文责编 陈宏宇)