

· 专题论坛 ·

植物谷氨酸受体的研究进展

何明洁^{1, 2†}, 孙伊辰^{2†}, 程晓园², 时冬雪², 李迪秦¹, 陈益银³, 冯永坤²
刘璐², 范腾飞², 杨超³, 曹凤秋^{4*}, 刘来华^{1, 2*}

¹湖南农业大学农学院, 长沙 410128; ²中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193; ³重庆烟草科学研究所, 重庆 400716

⁴中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 中国科学院上海植物逆境生物学研究中心, 上海 200032

摘要 离子型谷氨酸受体(iGLuR)是哺乳动物中一类由L-氨基酸(如谷氨酸、甘氨酸)等配体门控的阳离子通道, 具有调节兴奋性神经信号传递和引导神经元发育等分子功能。1998年研究者在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了20个与iGLuRs同源的序列(即AtGLRs), 它们的功能涉及植物光信号传递、根尖分生细胞活性、花粉管生长、胞质Ca²⁺流以及应答多种生物和非生物环境胁迫等。该文从谷氨酸受体(GLR)的结构特征、离子通道激活与配体的关系、表达模式及可能的生物学功能等方面, 综述了近十几年来关于植物GLR和氨基酸信号的研究成果, 旨在为相关领域的同行提供有益的参考。

关键词 谷氨酸受体, 氨基酸信号, 拟南芥, 钙离子通道, 生长发育

何明洁, 孙伊辰, 程晓园, 时冬雪, 李迪秦, 陈益银, 冯永坤, 刘璐, 范腾飞, 杨超, 曹凤秋, 刘来华 (2016). 植物谷氨酸受体的研究进展. 植物学报 51, 827–840.

Lam等(1998)通过序列的同源性分析, 首次在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了20个与动物离子型谷氨酸受体(ionotropic glutamate receptors, iGLuRs)相似的谷氨酸受体(glutamate receptors-like receptors, AtGLRs), 并依据系统发生分析将此AtGLRs分为3个亚家族(AtGLR-I/-II/-III) (图1) (Lacombe, 2001)。AtGLRs蛋白单体由800–960个氨基酸组成, 分子量为100 kDa。通过对氨基酸的亲/疏水性分析表明, AtGLRs与iGLuRs有极相似的蛋白质跨膜拓扑学结构, 即具有4个(跨)生物膜结构域(M1–M4)和2个配体(ligand)结合区(S1和S2)的6个功能结构域(图2) (Lam et al., 1998)。

AtGLR-I (4个成员)与AtGLR-III (9个成员)为姊妹亚家族, 并推测AtGLR-II可能是由AtGLR-I的基因副本进化而来, 因为GLRs多拷贝基因通常成串地排列在同一条染色体上(Chiu et al., 2002; Singh et al., 2014)。在转录水平上, 发现AtGLR在植物的根系、叶片和生殖器官中均有不同程度的表达, 推测它们在这些器官中可能广泛参与某些基础生物学过程(Chiu et al., 2002)。目前已知AtGLR-I的转录本出现于各种器

官中, 因此很可能执行GLRs进化的原始功能; 而AtGLR-II的表达模式则不同, 目前未发现其中一些成员基因在植物的叶片和生殖器官中表达(Chiu et al., 2002)。该亚家族基因是否具有生物学功能的特异性至今未知。

已有的研究表明, AtGLRs参与许多生物学过程, 如植物的感光/向光性(Lam et al., 1998)、调节碳氮平衡(Kang and Turano, 2003)、光合作用(Tearo et al., 2010, 2011)、响应非生物胁迫(Kang et al., 2004; Meyerhoff et al., 2005)、根形态建成(Walch-Liu et al., 2006; Li et al., 2006; Walch-Liu and Forde, 2008; Miller et al., 2010)、抗病虫害(Kang et al., 2006; Kwaaitaal et al., 2011; Manzoor et al., 2013)、介导Ca²⁺跨膜转运和调节胞内Ca²⁺动态平衡(Kim et al., 2001; Dubos et al., 2003; Kang et al., 2006; Qi et al., 2006; Cho et al., 2009; Vincill et al., 2012)以及调控花粉管的生长(Michard et al., 2011)。此外, AtGLRs亦具有感应和传递外源与内源信号的多重功能。蛋白质分子结构分析表明, 植物GLRs为典型的膜蛋白, 并具有配体门控性离子通道活性。当GLRs受到相应

收稿日期: 2015-12-03; 接受日期: 2016-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(No.Y333ZA1D11)、高等学校博士学科点专项科研基金(No.20134320110015)和中国烟草总公司重庆市公司科技计划(No.NY20140401070017)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: fengqiu.cao@ips.unibe.ch; LL1025@cau.edu.cn

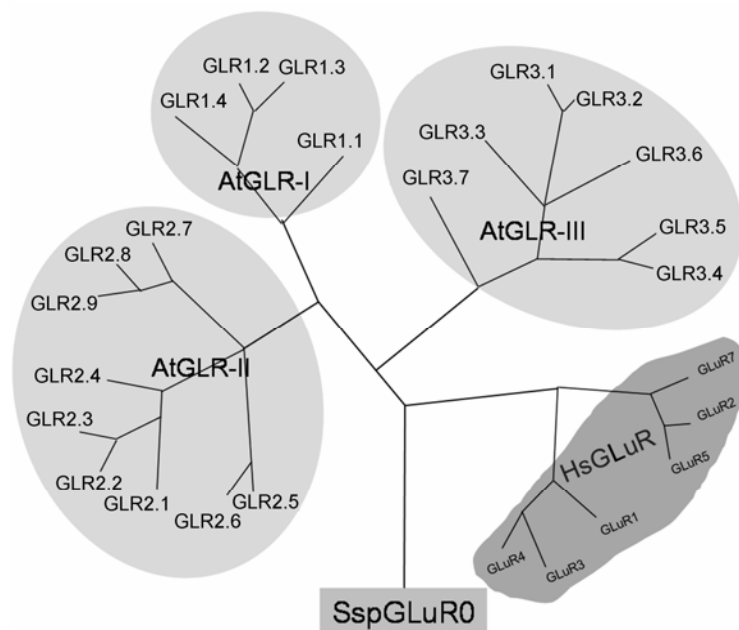


图1 来自细菌、拟南芥和人类的谷氨酸受体同源蛋白的系统进化树

氨基酸序列的对比分析采用Lasergene DNA[®]软件的Clustal W方法, 并使用PAUP^{*} 4.10b软件分析生成进化树。At: *Arabidopsis thaliana* (拟南芥); Hs: *Homo sapiens* (人类); Ssp: *Synechocystis* sp. (单细胞蓝藻菌属, 菌株PCC6803)。AtGLR蛋白序列取自Tair, HsGLuR1-7及SspGLuR0取自NCBI数据库。基因库登录编号或基因模式所编码的可能性完整蛋白质序列名称如下: AtGLR1.1 (At3g04110)、AtGLR1.2 (At5g48400)、AtGLR1.3 (At5g48410)、AtGLR1.4 (At3g07520)、AtGLR2.1 (At5g27100)、AtGLR2.2 (At2g24720)、AtGLR2.3 (At2g24710)、AtGLR2.4 (At4g31710)、AtGLR2.5 (At5g11210)、AtGLR2.6 (At5g11180)、AtGLR2.7 (At2g29120)、AtGLR2.8 (At2g29110)、AtGLR2.9 (At2g29100)、AtGLR3.1 (At2g17260)、AtGLR3.2 (At4g35290)、AtGLR3.3 (At1g42540)、AtGLR3.4 (At1g05200)、AtGLR3.5 (At2g32390)、AtGLR3.6 (At3g51480)和AtGLR3.7 (At2g32400), HsGLuR1 (NP_000818.1)、HsGLuR2 (NP_786944.1)、HsGLuR3 (NP_015564.1)、HsGLuR4 (NP_000820.1)、HsGLuR5 (NP_000821.1)、HsGLuR6 (CAC67487.1)和HsGLuR7 (NP_000822)以及SspGLuR0 (BAA17851.1)。

Figure 1 Phylogenetic tree of glutamate receptor homologs from Arabidopsis, human beings and bacterium

The amino acid sequence alignment was performed using Clustal W (from Lasergene DNA[®]) and the phylogenetic tree was generated by parsimony analysis using PAUP^{*} 4.10b software. At: *Arabidopsis thaliana*; Hs: *Homo sapiens*; Ssp, *Synechocystis* sp. (strain) PCC6803. AtGLR protein sequences were extracted from Tair, HsGLuR1-7 and SspGLuR protein sequences were obtained from NCBI database. GenBank accession number or gene models for obtaining putative full-length protein sequences are described as below: AtGLR1.1 (At3g04110), AtGLR1.2 (At5g48400), AtGLR1.3 (At5g48410), AtGLR1.4 (At3g07520), AtGLR2.1 (At5g27100), AtGLR2.2 (At2g24720), AtGLR2.3 (At2g24710), AtGLR2.4 (At4g31710), AtGLR2.5 (At5g11210), AtGLR2.6 (At5g11180), AtGLR2.7 (At2g29120), AtGLR2.8 (At2g29110), AtGLR2.9 (At2g29100), AtGLR3.1 (At2g17260), AtGLR3.2 (At4g35290), AtGLR3.3 (At1g42540), AtGLR3.4 (At1g05200), AtGLR3.5 (At2g32390), AtGLR3.6 (At3g51480), AtGLR3.7 (At2g32400); HsGLuR1 (NP_000818.1), HsGLuR2 (NP_786944.1), HsGLuR3 (NP_015564.1), HsGLuR4 (NP_000820.1), HsGLuR5 (NP_000821.1), HsGLuR6 (CAC67487.1), HsGLuR7 (NP_000822); SspGLuR0 (BAA17851.1).

配体的激活后, 就介导Ca²⁺的跨质膜流入, 以启动Ca²⁺信号转导下游的一系列生理和发育等生物学过程。

1 微生物及动物界的谷氨酸受体

1.1 谷氨酸受体的起源与进化

根据对动物离子型谷氨酸受体(iGLuRs)、细菌周质氨

基酸结合蛋白(bacterial periplasmic binding proteins, BPBP)以及植物谷氨酸受体GLRs的系统发生学的分析表明, iGLuRs与植物GLRs有共同的起源, 且早于原始动/植物的出现和iGLuRs三个亚家族的分化(图1)(Chiu et al., 1999)。此外, 原核生物集胞藻或蓝细菌(*Synechocystis* sp.)谷氨酸受体GLuR0的发现则较有力地证实了上述推测(Chen et al., 1999)。原始的谷氨

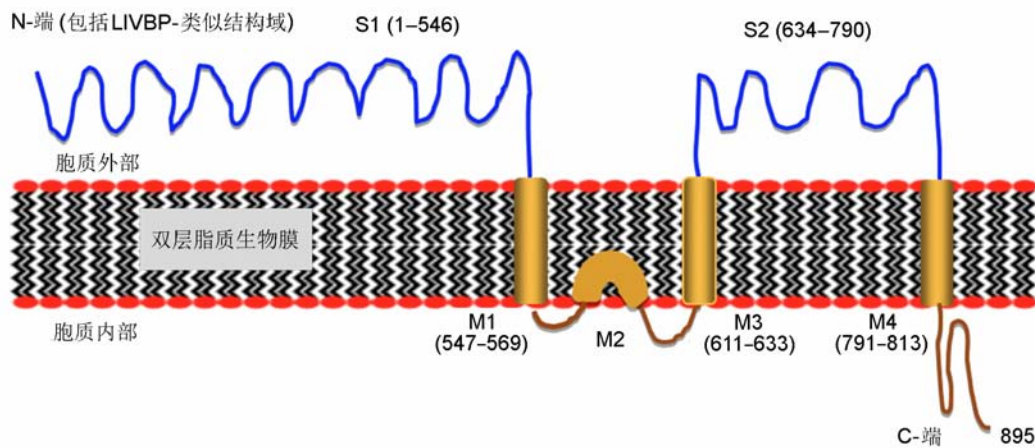


图2 拟南芥谷氨酸受体的拓扑学结构(以GLR3.5为例)

AtGLR3.5序列取自Aramemnon (<http://aramemnon.uni-koeln.de/index.ep>)。蛋白拓扑学结构(或疏水性)的预测使用<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>。AtGLR3.5包含3个跨膜域(M1、M3和M4)、1个嵌入脂质膜内的结构域M2及2个预测的位于胞质外侧的配体结合区S1和S2, 其碳端位于胞质内。图中的数字表示蛋白质肽链的氨基酸残基位置数。

Figure 2 Putative topology of a representative glutamate receptor (GLR3.5) from Arabidopsis

The protein sequence of AtGLR3.5 was extracted from Aramemnon (<http://aramemnon.uni-koeln.de/index.ep>). Topological (or hydrophobicity) prediction of protein was performed using a program from a web server <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. AtGLR3.5 is predicted to exhibit 3 trans-membrane domains (M1, M3, and M4), 1 domain (M2) imbedded in a lipid-layer, 2 domains S1 and S2 locating outside cytoplasm for ligand binding, and a C-terminal region towards the cytosol. Numbers indicate positions of amino acid residues in a peptide sequence.

酸受体(ancestral GLRs)由BPBP演化而来, 继而分别进化为原始动物离子型谷氨酸受体(ancestral iGLuRs)、植物谷氨酸受体(plant GLRs)和原始G蛋白耦联的受体亚家族C (ancestral subC-GPCRs)。

ancestral iGLuRs再分别进化形成N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA受体)、 α -氨基-3羧基-5甲基-4异恶唑受体(AMPA受体)和海人藻酸受体(KA受体); ancestral subC-GPCRs则进化为动物的代谢型谷氨酸受体(metabolic GLR, mGLuR) (Turano et al., 2001)。另有研究者认为, 已知的所有类型的谷氨酸受体皆由原核生物钾离子通道进化而来(Davenport, 2002)。Price等(2012)则提出, 在原始单细胞生命中, 分别编码钾离子通道(potassium channel, KcsA)与BPBP的基因发生了重组和融合, 继而形成了编码原始的原核生物谷氨酸受体的基因。KcsA演化形成原核生物的GLuRs, BPBP则演化形成受体的配体结合结构域; 在原核向真核生物进化的过程中, 原核生物的GLuRs基因又与另一BPBP基因发生融合, 最终形成真核生物中包含2个配体结合区的真核生物GLuRs (Price et

al., 2012)。

1.2 原核生物的谷氨酸受体

Chen等(1999)在集胞藻属(*Synechocystis* PCC 6803)中发现原核生物的谷氨酸受体GLuR0, 其与大鼠(*Rattus norvegicus*) $\delta 1$ 的同源性最高, 其次是拟南芥AtGLRs。进一步研究表明, 与真核生物GLuRs一样, GLuR0能响应谷氨酸并介导 K^+ 的跨膜运动; 决定受体功能和空间折叠结构的基本序列及关键性残基在原核生物的GLuRs和真核生物的GLuRs间是保守的。此外, GLuR0具有 K^+ 通道的代表性序列TVGYG (即苏氨酸-缬氨酸-谷氨酸-酪氨酸-谷氨酸); 原核生物的GLuRs与真核生物的GLuRs在 K^+ 通道之间具有序列的同源性和通道结构的相似性。但是, 原核生物的GLuRs与真核生物的GLuRs之间存在较大差异。GLuR0能响应L-Gln、L-Gly和L-Ser, 但不能响应NMDA、AMPA和KA等这些真核生物GLuRs的主要配体。在结构上, GLuR0没有真核生物GLuRs的N端结构域, 也没有M4跨膜结构域及C末端位于细胞质内的结构域。

GLuR0对K⁺和Rb⁺具有选择通透性,对Na⁺和CS⁺则无通透性,且通道的通透性受亚毫摩尔级别钡离子(Ba²⁺)的抑制(Chen et al., 1999)。

GluR0的发现较有力地支持了GLRs与iGLuRs共同起源于动植物分化出现前的生命形式的理论推测。Chen等(1999)进一步提出真核生物谷氨酸受体由原核生物谷氨酸受体进化而来(图1)。GLuR0是原始离子跨膜转运系统KcsA与谷氨酸受体这种高级的配体门控系统间的过渡形式。

1.3 动物的谷氨酸受体

动物的离子通道型谷氨酸受体(iGLuRs)是一类配体门控性阳离子通道,介导了大多数动物中枢神经系统中的兴奋性神经信号转导(Dingledine et al., 1999)。根据iGLuRs主要结合配体的不同可分为3种类型:KA受体、NMDA受体和AMPA受体(Hollman and Heineman, 1994; Dingledine et al., 1999)。AMPA受体和KA受体通常合称为非NMDA受体,因为这2种受体能交叉应答AMPA与KA,即二者都能结合AMPA或KA,引起通道对Na⁺、K⁺和Ca²⁺等的通透性改变,且它们的序列同源性很高(Parsons et al., 1996)。进一步研究表明,另外2个与非NMDA受体亲缘性很近的蛋白家族包括δ蛋白家族(delta class)(Yamazaki et al., 1992)和海人藻酸结合蛋白(kainate-binding protein)(Gregor et al., 1989)。

在氨基酸序列的总体水平上,植物GLRs与非NMDA受体具有高度同源性(Lam et al., 1998; Chiu et al., 2002)。AtGLRs与iGLuRs有极相似的蛋白质跨膜拓扑学结构,二者的单体蛋白均包含6个功能结构域:GlnH1/S1及GlnH2/S2两个配体结合域,3个全跨膜域(M1、M3和M4)和1个半跨膜域(M2),以形成通道结构域(图2)。AtGLRs与非NMDA受体的M1–M4区同源性为16%–63%(Lam et al., 1998)。GLRs与iGLuRs的整体同源性为50%–60%,但离子通道的孔道形成区M2结构域的同源性则低于此值。植物M2的序列起始缺乏P及K/R(脯氨酸、赖氨酸/精氨酸)残基,推测其离子通透性可能不同。M3在GLRs与iGLuRs之间的同源性最高(61%)。如此的高度同源性说明该结构域对受体功能的完整性具有极其重要的作用(Chiu et al., 2002; Nagata et al., 2004)。但是Kim等(2001)提出AtGLRs中的成员(AtGLR3.2)与海人藻酸受体的同源

性并不高,虽然M3区序列同源性有61%,但是整体序列的同源性仅有21%。

总之,在长期的生物进化中,GLRs与iGLuRs的结构并未出现较大变化,表明它们的结构对其执行生物学功能极为重要。然而,植物没有神经系统,却存在着与介导动物兴奋性神经信号转导的iGLuRs同源的GLRs,且二者的结构与作用机制具有极高的相似性,这可用于解释为何有些植物的天然提取物能作为外源信号直接刺激动物大脑神经系统而引起神经兴奋。典型的例子是,作为iGLuRs亚家族KA受体激动剂(agonist)的红藻氨酸(kainite)即来源于海藻(*Digenea simplex*)的天然提取物。AtGLRs和iGLuRs都能响应谷氨酸并介导Ca²⁺等阳离子的跨膜转运,参与许多与信号转导有关的生理过程,在生命过程中扮演着重要角色。

2 植物谷氨酸受体GLRs的分子结构

2.1 氨基酸序列

AtGLRs单体含800–960个氨基酸残基,分子量约为100 kDa(根据Aramemnon)。Chiu等(1999, 2002)通过比较iGLuRs与AtGLRs之间及AtGLRs成员之间氨基酸序列的保守区域特征,试图寻找保守的氨基酸残基,并以此为切入点找到决定AtGLRs功能和特性的关键性残基,以期解读GLRs的折叠方式和作用机制。此外,通过比较差异性氨基酸及氨基酸序列可能找到决定动植物间的GLuRs及植物GLRs各成员之间的结构特征、响应配体以及介导离子通透性差异等的关键性因子。对于AtGLR1.1而言,其配体结合区S2的G701(701位的甘氨酸)在动植物之间是保守的,该残基出现在所有AtGLRs和除了果蝇(*Drosophila melanogaster*)以外的已发现的动物iGLuRs中。此外,原核生物GLuR0在此位点被脯氨酸取代,鱼腥藻(*Anabaena azotica*)GLuR被精氨酸取代;在真核生物中保守而在原核生物蓝藻菌(*Cyanobacterium*)中发生改变的氨基酸残基包括I501、P538、W544、Y169和L623,其中L623在鱼腥藻GLuR中被丙氨酸取代,但在GLuR0中则是保守的(Chiu et al., 1999, 2002)。然而,这些发生改变的氨基酸是否对GLRs的结构及功能起着决定性作用仍有待验证。对AtGLR1.4而言,Tapken等(2013)的研究表明,在AtGLRs的S1区域中保守的

D499、T501和R506进行氨基酸替换(或点突变), 导致配体门控性阳离子通道活性急剧降低甚至缺失, 说明这些氨基酸残基对配体物质的结合至关重要。

AtGLRs的N末端含有参与分泌途径的信号肽序列, 故推测AtGLRs很可能定位在细胞膜上(Chiu et al., 1999; Nagata et al., 2004; Teardo et al., 2010)。此外, 对AtGLRs3.3、AtGLRs3.4、AtGLRs3.5等序列的分析表明, 它们还同时含有线粒体和叶绿体靶向序列的多重定位信号肽序列, 推测这些受体蛋白也很可能同时作用于细胞膜、线粒体膜和叶绿体膜上。GFP及YFP等荧光蛋白标记实验证实了上述推论(Meyerhoff et al., 2005; Teardo et al., 2011)。同样, 对其它植物中的GLRs(如萝卜(*Raphanus sativus*) RsGLUR和 水稻(*Oryza sativa*) OsGLR3.1)的序列分析和GFP标记实验证明它们能够经分泌途径最终定位于细胞质膜上。

2.2 功能结构域

在蛋白质一、二级结构上, 比较20个AtGLRs成员之间的6个结构域, 发现它们的4个跨膜结构域(M1–M4)仅有很小的差异。在所有亚家族中, M1、M2和M3是最保守的区域, 故而推测其包含了形成离子通道的重要残基并决定通道的离子选择性。然而, 2个配体结合区(S1和S2)则具有明显的差别(Chiu et al., 2002)。此外, 大多数AtGLRs亦包含1个G蛋白耦联受体类结构域(G-protein coupled receptor-like domain), 此结构域在进化上关联了来自不同物种的谷氨酸受体(Chiu et al., 1999; Turano et al., 2001)。另外, 一些AtGLRs的N端有一段相当长的序列与胞外Ca²⁺感应蛋白以及谷氨酰胺/氨基丁酸(GABA)受体有很高的同源性(Turano et al., 2002; Nagata et al., 2004)。

对离子通道的选择性而言, 蓝细菌GLuR0的通道孔域P区(pore region)包含GYGD特殊序列, 该序列赋予GLuR0被谷氨酸激活后对K⁺的通透选择性, 而GLRs与iGLuRs之间的明显差异则在于GYGD区的序列不同(Davenport, 2002)。大部分GLRs的GYGD区域中包含阳离子残基, 推测可与通过的阳离子相互作用并影响通道的选择性(Davenport, 2002)。在AMPA受体的GYGD区域一般则含有阴离子或极性残基, 若在该区域内将Q(极性谷氨酰胺)取代之为R(带正电的精氨酸), 则能降低Ca²⁺的通透性和通道的电导率。这些

差异说明GLRs对离子的选择性可能不同于iGLuRs, 而是一种新的选择机制(Davenport, 2002)。此外, AtGLRs与iGLuRs都有1个很长的N端, 虽然其功能并不明确, 但此N端与mGLuRs(代谢型谷氨酸受体)的配体结合域、GABA_B(γ-氨基丁酸)受体以及胞外Ca²⁺感应器(Ca²⁺ sensors)都具有同源性(Davenport, 2002)。

2.3 完整的结构

目前, 虽然还没有完整的GLRs的三维晶体结构相关实验数据, 但人们推测具有完整功能性的GLRs应与iGLuRs类似, 即同样应以至少4个亚基构成的多聚体形式存在(Dubos et al., 2003)。其原因为AtGLRs与NMDA受体的某些家族成员或亚基之间也存在很近的亲缘性, 而功能性NMDA受体是来自NMDA三个亚家族(NR-1、-2和-3)的单体蛋白相互结合后所形成的同源或异源多聚体(Ulbrich and Isacoff, 2008)。换言之, 在内质网中NMDA受体的N端结构域能引起蛋白亚基间的相互作用, 先形成二聚体, 最后再组装成四聚体(Sobolevsky et al., 2009; Traynelis et al., 2010)。

近来亦有实验数据证实GLRs确实以多聚体的形式存在。利用AtGLRs C端的抗体蛋白在SDS-PAGE上可检测到多聚复合体(Turano et al., 2002)。运用荧光共振能量转换(fluorescence resonance energy transfer, FRET)分子标记技术, 可证明AtGLRs(如AtGLR3.2和AtGLR3.4)以同源或异源多聚体的形式存在。使用酵母双杂交系统(Y2H方法)也能鉴定到细胞质膜上不同AtGLRs的同源或异源蛋白的相互作用, 而且AtGLR2.9、AtGLR3.2及AtGLR3.4很可能是调节相互作用的主导者(Price et al., 2013)。AtGLRs三个亚家族的受体复合物的形成似乎是独立或者不受局限的, 而不同于iGLuRs复合体的组装仅局限于同一亚家族成员并作为亚基之间的相互作用(Dingledine et al., 1999; Price et al., 2013)。植物GLRs的这些特征及属性很可能加强了这类受体系统生物学功能的灵活性。

3 GLRs的配体物质

对拟南芥根尖的电生理实验证实, 0.3–3 mmol·L⁻¹的Glu能引起细胞膜电位的去极化并激发瞬间Ca²⁺的胞内流, 其中对1 mmol·L⁻¹ Glu处理的应答效应最强(Dennison and Spalding, 2000)。另有研究者发现, 低

至 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu及其它激动剂能引起GLRs高达40%的通道活性(Vatsa et al., 2011; Vincill et al., 2012), 而 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Glu就能明显引起拟南芥根系形态的重建(Walch-Liu et al., 2006)。Dubos (2003)的研究表明, 对拟南芥而言, 同时加入 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu和Gly与分别加入 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu或Gly所引起的胞质内 Ca^{2+} 振荡强度相当, 故而推测 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源氨基酸信号即可激活GLRs信号通路(Dubos et al., 2003)。

除Glu之外, Gly也能引起植物细胞膜电位的消极化并激发瞬间 Ca^{2+} 的胞内流。Dubos等(2003)利用结构模拟预测法推测, 对大多数AtGLRs而言, Gly (而非Glu)是它们的主要激动剂, 唯有AtGLR1.1才以Glu作为配体。近年来的研究表明, 除上述2种氨基酸之外, 精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)和苯丙氨酸(Phe)等多种氨基酸及谷胱甘肽也引起同样的生理效应。而且Vincill等(2012)证实上述多种氨基酸的有效作用浓度为 $0.01\text{--}10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Meyerhoff et al., 2005; Vincill et al., 2012)。此外, Qi等(2006)发现在 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源Glu的作用下, Glu激活的野生型植株的细胞膜去极化在AtGLR3.3的突变体中显著降低; AtGLR3.3介导或参与6种氨基酸(Glu、Gly、Ala、Ser、Asn和Cys)引起的 Ca^{2+} 胞质内流和膜的去极化。Frauli等(2006)则认为在根细胞中GLR3.3调控氨基酸门控的 Ca^{2+} 内流, 但可能不是形成通道的必要条件; 在植物中, Gly可能并不直接激活 Ca^{2+} 通道, 而是通过促使谷氨酸的分泌间接开启离子通道; Gly处理与 Ca^{2+} 通透性增加之间的确切关系仍不明确。

iGluRs的激动剂 β -甲氨基L-丙氨酸(β -methyl-amino-L-alanine, BMAA)也能引起拟南芥细胞膜电位的变化, 故推测BMAA亦可能是GLRs的配体之一, 但是BMAA是GLRs的激动剂还是拮抗剂仍存在争议(Brenner et al., 2000)。iGluRs主要的激动剂, 如NMDA、AMPA、KA则不能引起拟南芥等GLRs的应答反应(Vatsa et al., 2011)。基于蛋白质空间结构的生物信息学模拟分析, 人们预测卡那霉素和一些聚胺类物质可以作为AtGLRs尤其是AtGLR2.1和AtGLR3.1的配体激活GLRs信号通路。然而目前仅有实验数据说明AtGLR1.1的通道孔隙P区与多胺有相互作用, 至于卡那霉素和多胺是否可作为植物GLRs的自然配体

及其生理作用还有待验证(Dobus et al., 2005)。

最常用的iGluRs及GLRs的拮抗剂主要有6, 7-二硝基喹啉啉-2, 3-二酮(6, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione, DNQX)和氨基磷酰基戊酸(2-amino-5-phosphonopentanoic aci, AP-5)。通过X射线观察发现DNQX能使iGluR的配体结合区域的瓣闭合(lobe closure)角度改变 3° (McFeeters and Oswald, 2004), DNQX可能与所有AtGLRs的配体结合区结合进而引起相关的(通道)抑制效应(Dubos et al., 2003)。此外, 还发现存在其它的抑制剂或拮抗剂, 如MK-801 (dizocilpine)、美金刚胺(memantine)、5, 7-二硝基喹啉啉-2, 3-二酮(5, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione, MNQX)及6-氰基-7-硝基喹啉啉-2, 3-二酮(6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione, CNQX)等。 La^+ 和 Gd^{3+} 是一类非特异性离子通道阻断剂, 对GLRs参与的信号通路也具有抑制作用(Dubos et al., 2003, 2005; Meyerhoff et al., 2005; Vatsa et al., 2011)。

4 GLR离子通道的特征

对拟南芥的研究表明, L-Glu的处理能激发根细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的瞬间剧增, 故而推测Glu可能开启了质膜上的 Ca^{2+} 通道。当使用 La^{3+} (阳离子通道抑制剂)处理植物时, 胞内 Ca^{2+} 浓度的峰值降低, 而 La^{3+} 在不影响膜电位(V_m)的情况下可抑制Glu激发的去极化, 说明膜的去极化是胞质 Ca^{2+} 流动变化所致。由于 La^{3+} 并非 Ca^{2+} 通道的特异性抑制剂, 故可能是通过阻碍Glu对 Ca^{2+} 通道的调节而抑制膜的去极化(Dennison and Spalding, 2000)。综上, Glu影响胞质 Ca^{2+} 内流说明GLRs可能作为Glu的受体参与细胞内 Ca^{2+} 信号的调控。

植物的GLRs可能具有类似于非选择性阳离子通道(non-selective cation channel, NSCC)的功能, 并在 Ca^{2+} 和一价阳离子的运输过程中起作用(Lacombe, 2001; Davenport, 2002)。在拟南芥中超表达AtGLR-3.2 (AtGLuR2)后, 植株呈现缺钙以及对 K^+ 和 Na^+ 敏感的症状, 外源补充 Ca^{2+} 则可以改善这种症状。随着外源钙量从 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增至 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 转基因植株与野生对照植株的含钙量都相应增加, 但是在相同浓度供钙量下二者的含钙量没有显著差异。然而在二者含钙量低于 $13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW的实验组中, 后者的生物

量大于前者3倍以上。这说明*AtGLR3.2*的超表达并未改变植株对 Ca^{2+} 的吸收,而是改变了植株对 Ca^{2+} 的利用效率(Kim et al., 2001)。*AtGLR1.1*突变体植株表现出对 Ca^{2+} 浓度升高的敏感反应,但是对 Na^+ 和 K^+ 的敏感性则与野生型的表现型相同(Kang and Turano, 2003)。在蟾蜍卵母细胞中异源表达*AtGLR3.4*可以调节细胞对 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 和 Ca^{2+} 的通透性(Meyerhoff et al., 2005)。Dubos等(2003)报道Glu和Gly可能协同调控配体介导的 Ca^{2+} 流动,从而调节拟南芥植株的下胚轴伸长;此外,他们还发现Glu和Gly引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高和下胚轴伸长能被DNQX抑制。*AtGLR3.7*在蛙卵细胞中的异源表达则表现出无需膜电位促进的对外源 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 的离子通透性,表明*AtGLR3.7*可能形成非配体激活的阳离子通道或其它类型的阳离子通道的组成部分(Roy et al., 2008)。此外,人们发现在蛙卵细胞和人胚胎肾细胞中异源表达*AtGLR3.3*和*AtGLR3.4*可调节 Ca^{2+} 内流;*AtGLR3.3*突变体植株的下胚轴和根细胞中,*AtGLR3.3*介导了由Glu引起的细胞内 Ca^{2+} 浓度增加以及膜的去极化(Stephens et al., 2008; Vincill et al., 2012)。在蛙卵细胞中表达全长*AtGLR1.4*可以提高细胞对氨基酸的敏感性、阳离子的非选择性及 Ca^{2+} 通道的通透性,且可被动物iGluR拮抗剂DNQX和CNQX抑制(Tapken et al., 2013)。利用基因片段转接克隆以及在蛙卵细胞中表达的技术,证明*AtGLR1.1*和*AtGLR1.4*具有功能性的离子孔隙结构域,*AtGLR1.1*的孔隙能够通透 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 且受非选择性离子通道阻断剂 La^{3+} 的调控(Tapken and Hollmann, 2008)。

总之,已有研究表明, GLRs参与体内 Ca^{2+} 的转运与调控,但是GLRs是否通过形成离子通道来调控 Ca^{2+} 的流动,仍需进一步研究。

另外,人们已分离获得完整的NMDA与AMPA型的iGLuRs晶体结构,并从蛋白质三维空间结构关系和具体作用的氨基酸残基水平解析了iGLuRs的激活与脱敏过程(Sobolevsky et al., 2009)。由此推测GLRs也通过类似的机制实现通道的激活与脱敏,该过程可分为3个阶段: (1) GLRs处于活性状态,能识别和应答配体; (2) GLRs结合配体介导 Ca^{2+} 流入,而后处于脱敏状态,此时依然结合着配体,但不再应答其它配体,不再产生 Ca^{2+} 内流; (3) GLRs直接释放配体或通过胞吞作用转运至胞内降解而恢复活性状态(Meyerhoff et

al., 2005; Stephens et al., 2008)。

5 植物中其它的GLRs

继拟南芥之后,人们在水稻基因组中亦发现与*AtGLR*具有很高同源性的包含24个成员的*OsGLR*基因(Li et al., 2006; Singh et al., 2014)。*OsGLR*分4个亚家族(subfamily),其中亚家族I与II可能是姊妹家系;亚家族I、II、III与拟南芥可能有共同的进化祖先;但是,亚家族IV是水稻特有的,且Sign等(2014)认为有可能是由上述3个亚家族基因中的一个在复制过程中产生的副本进化而来。另外,*OsGLRs*蛋白有一个明显的特征,即拥有第5个跨膜结构域。我们对*OsGLRs*的生物学功能仍知之甚少。Li等(2006)报道*OsGLR3.1*的表达模式与拟南芥*GLR-III*十分相似,且在根系中的表达量相对较低。利用异源表达系统研究发现*OsGLR3.1*在人胚胎肾细胞中能形成同源多聚体,推测水稻谷氨酸受体很可能以多聚体的形式执行(通道)功能。利用基因突变技术研究发现,*OsGLR3.1*的表达是维持水稻根尖分生组织细胞活力所必需的。GFP融合表达实验显示,*OsGLR-GFP*信号主要停留在内质网中(Li et al., 2006)。Singh等(2014)亦观察到在烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片中表达*OsGLR1.1-GFP*,荧光信号出现在内质网,这与*OsGLR3.1*的情况相似。以上关于*OsGLR*作用位点的研究结果,从另一侧面反映了使用报告基因实施蛋白定位研究时有很多困难,因为人们已发现在内质网中iGLuRs的N端序列能相互识别,继而在特定辅助蛋白的作用下正确折叠形成具有完整功能的多聚复合体(Ayalon and Stern-Bach, 2001; Ayalon et al., 2005; Mah et al., 2005; Penn et al., 2008)。然而,使用融合蛋白标记很可能会阻碍谷氨酸受体多聚复合体的正确折叠以及随后的分泌与定位,导致谷氨酸受体以单体形式滞留于内质网腔内,而不能在预期的其它细胞膜上正确定位。尽管一些GLRs的靶位点可能确实在内质网膜上。

Kang等(2006)在萝卜中发现了类似的谷氨酸受体基因*RsGLuRs*。*RsGLuR*蛋白含有与iGLuRs和*AtGLRs*相似的6个保守结构域(即M1-M4, S1和S2),并且与*AtGLR3.2*的同源性最高(Kang et al., 2006)。*RsGLuR*包含了1个决定其分泌途径的疏水信号肽序列,C端含有一段决定其途经内质网分泌的SLKS

序列。

Aouini等(2011)报道了番茄(*Solanum lycopersicum*)中的13个SIGLR基因。SIGLRs蛋白的功能结构域与AtGLRs的M1–M4跨膜结构域及配体结合区S1和S2亦很相似;同时发现,在N端有与其它GLRs相似的途经分泌系统的肽段信号序列标签;13个SIGLR基因可分成3个亚家族,其中SIGLR-II和SIGLR-III与AtGLRs有近亲关系,SIGLR-I可能为番茄所特有。根据上述分析结果,可推测陆生植物的GLRs在进化过程中源于共同的祖先,此祖先在茄科和十字花科之间产生了进化分支;然而,番茄在进化中可能丢失了AtGLR-I或者从来就没有整合过AtGLR-I(Aouini et al., 2012)。另外,SIGLR各亚家族没有转录表达的家族特异性。如SIGLR1.1主要在根系中表达,而SIGLR1.2则无表达上的组织特异性,而是随着果实的发育在果实中的表达量增加,在成熟时表达量达到最高。SIGLR2.2主要在叶片中表达,且表达量显著高于同一亚家族的其它基因,推测SIGLR2.2的功能在其亚家族成员中可能占主导作用。SIGLR3.1在地上部组织,如叶片、茎中都有大量表达,且在花中的表达量高于根(Aouini et al., 2012)。鉴于果实成熟过程中谷氨酸的含量相对较高,推测SIGLRs可能通过谷氨酸信号途径调控果实的发育。

6 GLRs的分子生理功能

6.1 GLRs表达的时空特异性

研究表明,AtGLRs的20个成员都有不同程度的转录表达(表1),而且发现其中至少有3个成员(AtGLR2.5、AtGLR3.4和AtGLR3.5)以剪接变异体的形式出现(Chiu et al., 2002; Meyerhoff et al., 2005; Teardo et al., 2015)。不同形式的mRNA剪接变异体可能增加了受体复合物的组成形式,扩展了GLRs参与植物生命过程的途径和方式,为灵敏、灵活地调控信号转导过程提供了可能。

AtGLR-I与AtGLR-II在植物的根、茎、叶、花和角果等所有器官中均有不同程度的表达(表1)。家族III基因大部分成员(除AtGLR3.2与AtGLR3.7外)在根系和角果中的表达水平最高(Chiu et al., 2002)。相比之下,亚家族II基因的表达情况则较复杂,其9个成员中有5个(AtGLR2.1、AtGLR2.2、AtGLR2.3、AtGLR2.6和

AtGLR2.9)仅在根系中表达,1个基因(AtGLR2.4)在根系和角果中表达,AtGLR2.7和AtGLR2.8的转录本出现在除花以外所有的器官中,AtGLR2.5则在整个植物中皆有表达(Chiu et al., 2002)。

对AtGLRs各成员基因的精确表达研究有助于了解它们在植物代谢中所起的作用。Roy等(2008)运用单细胞RNA取样、微量RNA扩增和基因特异性扩增等技术在细胞水平上对拟南芥GLRs表达特性进行了剖析,发现在同一细胞中有5–6个GLRs基因同时表达。此外,一些特定的GLR在不同植株的同一类型细胞中的表达差异很大,但是在同一植株的不同细胞中的表达则表现出高度相似性(Roy et al., 2008)。这一现象说明AtGLRs的表达可能具有植株个体特征而非细胞特异性。研究者推测此现象的一种可能原因是这些基因的表达因植株间的生物和非生物环境或微环境的不同而表现出很大的差异,且植株个体特性导致的表达差异可能比实验预期的还要强烈;另一种可能则是AtGLR基因的功能冗余所致。

6.2 GLRs与光信号传递

拟南芥种子用BMAA处理后,引起2–3倍的下胚轴伸长,同时亦抑制种子早期萌发过程中的子叶展开,这种作用于下胚轴的效应具有光特异性并且能被外源Glu修复。由此推测,BMAA可能阻断了拟南芥的光信号传递,而外源添加Glu能提高体内的谷氨酸水平,以致与BMAA竞争、恢复AtGLRs的分子生理功能(Brenner et al., 2000)。在光照培养条件下,加入DNQX能引起拟南芥幼苗下胚轴伸长1.5–2倍,同时减少叶绿素的合成,表明DNQX能部分阻止光对下胚轴伸长的抑制和对叶绿素合成的诱导。DNQX的这些效应亦具有光特异性,在黑暗条件下不起作用(Lam et al., 1998)。这些结果说明谷氨酸受体可能影响植物的光信号传递,因为有研究表明钙调蛋白7(calmodulin7, CaM7)直接作用于部分光诱导基因的启动子并且调节它们的表达(Kushwaha et al., 2008)。因此推测GLRs可能作为离子通道,通过对胞质Ca²⁺浓度的调控而参与光信号转导,但目前仍缺乏详细的实验证据。

6.3 GLRs与植物器官发育

谷氨酸受体的分子功能涉及植物生长及发育过程中的许多生物学事件。在拟南芥根系中,AtGLR3.2和At-

表1 拟南芥谷氨酸受体AtGLRs表达的时空特异性

Table 1 Overview of glutamate receptors-like receptors (AtGLRs) expression pattern in *Arabidopsis thaliana*

基因名称及 登录号	家族	苗龄	表达位点			参考文献
			器官水平	组织水平	亚细胞水平	
<i>AtGLR1.1</i> <i>At3g04110</i>	I	1周	根、茎、叶	根部皮层, 托叶着生部	NR	Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008
4周			主要是根、叶; 花、角果中很微弱	花、角果中检测不到GUS信号	NR	
8周			主要是根、叶; 花、角果中很微弱	花、角果中检测不到GUS信号	NR	
<i>AtGLR1.2</i> <i>At5g48400</i>	I	4周后	根、茎、叶、花、角果; 主要是根与角果	花粉管	NR	Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008
<i>AtGLR1.3</i> <i>At5g48410</i>		4周	根、茎、叶, 叶中很微弱	NR	NR	
8周		叶和花中微弱; 主要是根与角果	NR	NR		
<i>AtGLR1.4</i> <i>At3g07520</i>	I	4周后	根、茎、叶、花、角果	NR	NR	Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008
<i>AtGLR2.1</i> <i>At5g27100</i>		1周后	根、茎、叶、叶柄	根系除根尖外各组织; 托叶着生部位	NR	
4周后		根	根系所有组织; 花药和胚珠检测到微弱且转瞬即逝的GUS信号	NR		
<i>AtGLR2.2</i> <i>At2g24720</i>	II	4周后	根	NR	NR	Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008
<i>AtGLR2.3</i> <i>At2g24710</i>		4周后	根	NR	NR	
<i>AtGLR2.4</i> <i>At4g31710</i>		4周后	根、角果	NR	NR	
<i>AtGLR2.5</i> <i>At5g11210</i>	II	4周后	根、茎、叶、花、角果	NR	NR	Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008
<i>AtGLR2.6</i> <i>At5g11180</i>		4周后	根	NR	NR	
<i>AtGLR2.7</i> <i>At2g29120</i>		4周后	叶、角果, 根中微弱	NR	NR	
<i>AtGLR2.8</i> <i>At2g29110</i>	II	4周后	根、叶柄、叶、角果	NR	NR	Chiu et al., 2002; Roy et al., 2008
<i>AtGLR2.9</i> <i>At2g29100</i>		4周	根、叶、茎、叶柄	NR	NR	
8周		根	NR	NR		
<i>AtGLR3.1</i> <i>At2g17260</i>	III	5天后	根、茎、叶、叶柄	所有维管组织; 保卫细胞	NR	Cho et al., 2009
8周		根、茎、叶、花、角果	花丝和花药连接部位强烈表达	NR		
<i>AtGLR3.2</i> <i>At4g35290</i>		7天后	根、茎、叶柄、叶	所有维管组织及其邻近的导管, 随着植物生长表达更强烈; 根系韧皮部细胞中表达量远高于邻近细胞, 原生韧皮部更为强烈	NR	
<i>AtGLR3.3</i> <i>At1g42540</i>	III	8周	根、茎、叶、花、角果, 主要是叶与角果	花、茎维管组织; 花芽; 胚珠, 尤其是外皮层和生长中心	NR	Kim et al., 2001; Kong et al., 2015; Meyerhoff et al., 2005 Turano et al., 2002 Teardo et al., 2011
<i>AtGLR3.4</i> <i>At1g05200</i>		4周后	根、茎、叶、花、角果, 莲座叶中最强	叶肉组织; 维管束; 保卫细胞, 排水孔; 根内外皮层, 根毛	细胞质膜, 叶绿体内膜	
<i>AtGLR3.5</i> <i>At2g32390</i>		0	种子发芽时强烈, 随发芽完成降低	胚胎与子叶中强烈表达	线粒体内膜;	
<i>AtGLR3.7</i> <i>At2g32400</i>	III	4周后	根、茎、叶、花、角果	NR	叶绿体膜	al., 2015
整个生长阶段		所有器官	所有组织	细胞质膜		

NR: 未见报道。NR: Not reported.

*GLR3.4*主要在韧皮部表达,尤其是在筛板附近。*AtGLR3.3*在大多数初生根的细胞中皆有表达,但是在韧皮部及筛板区的表达量较低。*AtGLR3.2*和*AtGLR3.4*突变体以及它们的双突变体植株具有类似的表型,即出现大量异常的侧根原基,而*AtGLR3.3*突变体的侧根原基则无此表型。研究者推测*AtGLR3.2/AtGLR3.4*相关的离子通道可能通过韧皮部的 Ca^{2+} 信号调控侧根的生长(Vincill et al., 2013)。

Li等(2006)报道水稻*OsGLR3.1*被T-DNA插入后,该突变体的根尖分生组织结构出现异常且伴有细胞程序性死亡,并呈现短根的生长表型。这表明*OsGLR3.1*基因的功能在种子萌发早期对维持根尖生长点的细胞分化和细胞活力是必要的,它可能协调了根顶端分生组织的细胞核分裂能力。Walch-Liu等(2006)研究发现 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Glu可明显引起拟南芥根系形态的重建。应用动物iGLuRs的拮抗剂和激活剂可影响拟南芥根细胞的伸长和根尖细胞的分生能力(Forde et al., 2013),但此现象/效应是否涉及某些GLR的功能仍待研究。

Michard等(2011)运用药理学和电生理学等技术并利用基因功能缺失突变体,在烟草和拟南芥中发现GLRs利用D-丝氨酸(D-serine)作为配体介导 Ca^{2+} 的跨质膜内流,进而调节花粉管顶端细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度,最终影响花粉管的生长及其形态建成(Michard et al., 2011)。研究表明,野生型植物的花粉管在敲除丝氨酸消旋酶基因的拟南芥突变体*sr1*雌蕊中的伸长生长发生缺陷并伴以GLR1.2和GLR3.7的 Ca^{2+} 通道活性降低。上述研究成果首次阐明了高等植物GLR家族成员需要特定的配体物质以开启其 Ca^{2+} 通道功能,以及与此直接关联的一系列分子生理学事件——胞质钙振荡与花粉管发育,揭示了植物雄性配子体与雌蕊组织之间相互识别及生长适应的新型生物信号机制。

6.4 GLRs与种子萌发

GLRs也可能参与植物碳/氮(C/N)代谢平衡的调节过程以及植物激素的作用。在DNQX处理下,拟南芥*AtGLR1.1*突变体(*anti AtGLR1.1*植株)的种子萌发受阻,但是在BMAA激活剂处理下能够恢复其萌发表型。*anti AtGLR1.1*株系内源脱落酸(ABA)的浓度在DNQX处理下升高,而在BMAA处理下降低,说明*AtGLR1.1*参与了ABA对种子萌发的调控。与野生型相

比,*anti AtGLR1.1*转基因植株呈现出对C/N和 Ca^{2+} 敏感的表型。当碳源为 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖时,种子萌发受抑制;外加氮源(NO_3^-)后能恢复种子萌发(NH_4^+ 则无此效应)。通过基因表达、酶活鉴定和生理学测试等实验证明*AtGLR1.1*在转录水平上调节C和N代谢酶、己糖激酶(HXK1)和ABA1参与的植物C/N代谢以及ABA的生物合成,从而控制种子的萌发过程。此外,人们还发现*AtGLR1.1*亦参与植物的水分调节(Kang and Turano, 2003; Kang et al., 2004)。

Kong等(2015)发现,在拟南芥种子吸水萌发的最初阶段,*AtGLR3.5*在转录水平上有明显上调,萌发过程中该基因的表达量在初始24小时内迅速升高,但在后期(萌发48小时)逐渐降低。*AtGLR3.5*在萌发的种子中大量表达且与 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增加呈正相关,以此解除ABA对萌发的抑制,促进种子发芽;抑制*AtGLR3.5*的表达则恢复 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 水平,显著推迟萌发,增加种芽对ABA的敏感性;超表达*AtGLR3.5*的种子萌发表型则与上述情形相反。再者,胞质 Ca^{2+} 浓度增加可抑制种子响应ABA的关键转录因子基因*ABI4* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE4*)的表达,而*ABI4*在依赖 Ca^{2+} 调控的萌发过程中起着重要作用。根据上述实验结果,推测*AtGLR3.5*通过调节 Ca^{2+} 的胞质内流而抑制*ABI4*的表达,以缓解或阻断ABA对种子萌发的抑制作用,刺激种子发芽。

6.5 GLRs与气孔的开闭及细胞器功能

Cho等(2009)发现*AtGLR3.1*在叶片的保卫细胞中表达。当对*AtGLR3.1*超表达的株系和野生型植株进行外源 Ca^{2+} 处理后,观察到两者的叶片气孔均表现出短时刻关闭的表型;当对植株进行连续的间歇性外源 Ca^{2+} 处理时,野生型植株气孔则表现为处于长时间关闭状态,而*AtGLR3.1*超表达株系则无此反应;同时,研究者也观察到*AtGLR3.1*的超表达导致植株内的 Ca^{2+} 长距离运输受抑制,但不影响 Ca^{2+} 的胞间短距离转运。因此,研究者认为*AtGLR3.1*基因的超表达影响了保卫细胞对 Ca^{2+} 信号接收或转导(Cho et al., 2009)。

利用在植物中表达融合蛋白的方法,Teardo等(2015)发现*AtGLR3.5*的一个可变剪接转录本编码的蛋白质定位于线粒体内膜,而另一个可变剪接的转录本则位于叶绿体膜。敲除*AtGLR3.5*后引起植株的线粒体亚显微结构异常,并影响相关的植物生理功能,最

终导致植株早衰, 而且突变体植株的线粒体对 Ca^{2+} 的吸收亦有一定程度的减少。由此, 研究者推测At-GLR3.5在这类细胞器中可能行使一种离子通道功能。

6.6 GLRs与抗逆反应

金属铝离子的毒害能迅速导致拟南芥根细胞皮层微管束解聚以及质膜的去极化, 人们推测谷氨酸受体GLRs可能通过调控 Ca^{2+} 内流而抑制这类毒害效应(Sivaguru et al., 2003)。拟南芥植株在受到外界机械损伤(如针刺或寒冷)等刺激时, AtGLR3.4基因的表达量增加3–6倍, 而且这种响应快速并短暂; 同时细胞质的酸中毒亦可作为诱导AtGLR3.4表达上调的信号(Meyerhoff et al., 2005)。当在拟南芥中超表达小萝卜RsGLuR时, 能增强植株对真菌的抗感染能力(Kang et al., 2006)。Mousavi等(2013)发现AtGLR参与调节植物受伤信号的长距离转导, 影响茉莉酸的信号转导机制, 激发受茉莉酸调节的基因的表达, 以促使叶子之间受伤信号的传递。

7 研究展望

现有的研究表明, 谷氨酸受体基因在植物的各个器官中均有转录水平上的表达, 但它们相应的生理学功能或意义在很大程度上仍不明确。在研究过程中, 目前仍存在一些值得学术界关注的问题。(1) 鉴于AtGLR家族的成员很多且序列高度相似, 可能导致它们所编码蛋白质的分子功能之间发生互补或冗余现象。(2) 作为功能性的阳离子通道, GLR很可能与动物的iGLuR类似, 即离子通道的形成需要不同的GLR作为亚基。(3) 植物中离子通道的开启与关闭所需要的自然配体物质(如L-Glu、L-Gly、L-Met和D-Ser等)比动物的更复杂。(4) 利用基因异源表达技术研究植物膜蛋白基因的功能时, 在某些情况下因异源表达蛋白的致毒性或异源表达位点的错误等, 导致对植物GLR基因的克隆或功能鉴定非常困难。所以, 有关Glu或氨基酸信号-GLR的离子通道功能- Ca^{2+} 的第二信使作用-生物信号转导引起的植物最终生理表型间的直接关联性, 仍是学术界亟需探索认识的重点方向。总之, 一方面在过去的10多年间, 虽然学术界对拟南芥20个谷氨酸受体(GLR)的生物学功能开展了很多有启迪性的研究, 试图诠释这类基因在高等植物中所参与的各种

分子生物学事件, 但是GLR家族中大多数成员的功能迄今未知, 亟待人们全方位地进行深入研究。

另一方面, 迄今相关的研究成果亦在生物学理论层面上证明了基于氨基酸的信号转导机制广泛存在于各种生命系统中。值得一提的是, 介导 Ca^{2+} 流的谷氨酸受体通道的相似结构域是决定这类膜蛋白基本功能的前提条件。虽然各类型谷氨酸受体行使其离子通道功能时的精确方式在微生物、动物及植物之间可能存在差别, 但是它们在不同的生命系统中都具有类而广泛的生物学意义。

GLR分子功能的发挥涉及许多分子生物学机制, 故GLR通道蛋白可能是植物信号转导途径中的必要组成因子。在今后的研究中解析并认识GLR在复杂蛋白质互作机理过程中的关键作用极为重要。

参考文献

- Aouini A, Matsukura C, Ezura H, Asamizu E (2012). Characterization of 13 glutamate receptor-like genes encoded in the tomato genome by structure phylogeny and expression profiles. *Gene* **493**, 36–43.
- Ayalon G, Segev E, Elgavish S, Stern-Bach Y (2005). Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J Biol Chem* **280**, 15053–15060.
- Ayalon G, Stern-Bach Y (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* **31**, 103–113.
- Brenner ED, Martinez-Barboza N, Clark AP, Liang QS, Stevenson DW, Coruzzi GM (2000). Arabidopsis mutants resistant to S(+)- β -methyl- α , β -diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol* **124**, 1615–1624.
- Chávez AE, Singer JH, Diamond JS (2006). Fast neurotransmitter release triggered by Ca^{2+} influx through AMPA-type glutamate receptors. *Nature* **443**, 705–708.
- Chen GQ, Cui CH, Mayer ML, Gouaux E (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**, 817–821.
- Chiu JC, Brenner ED, Desalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM (2002). Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol* **19**, 1066–1082.
- Chiu JC, Desalle R, Lam HM, Meisel L, Coruzzi G (1999).

- Molecular evolution of glutamate receptors: a primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Mol Biol Evol* **16**, 826–838.
- Cho D, Kim SA, Murata Y, Lee S, Jae SK, Nam HG, Kwak JM** (2009). De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog AtGLR3.1 impairs long-term Ca²⁺ programmed stomatal closure. *Plant J* **58**, 437–449.
- Davenport R** (2002). Glutamate receptors in plants. *Ann Bot* **90**, 549–557.
- Dennison KL, Spalding EP** (2000). Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**, 1511–1514.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF** (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7–61.
- Dubos C, Huggins D, Grant GH, Knight MR, Campbell MM** (2003). A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *Plant J* **35**, 800–810.
- Dubos C, Willment J, Huggins D, Grant GH, Campbell MM** (2005). Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation. *Plant J* **43**, 348–355.
- Forde BG, Cutler SR, Zaman N, Krysan PJ** (2013). Glutamate signaling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in Arabidopsis root architecture. *Plant J* **75**, 1–10.
- Kang J, Sohum M, Turano FJ** (2004). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol* **45**, 1380–1389.
- Kang J, Turano FJ** (2003). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6872–6877.
- Kang S, Kim HB, Lee H, Choi JY, Heu S, Oh CJ, Kwon SI, An CS** (2006). Overexpression in Arabidopsis of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated Ca²⁺ influx and delays fungal infection. *Mol Cell* **21**, 418–427.
- Kim SA, Kwak JM, Jae SK, Wang MH, Nam HG** (2001). Overexpression of the *AtGluR2* gene encoding an Arabidopsis homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant Cell Physiol* **42**, 74–84.
- Kong DD, Ju CL, Parihar A, Kim S, Cho D, Kwak JM** (2015). Arabidopsis glutamate receptor homolog atglr3.5 modulates cytosolic Ca²⁺ level to counteract effect of abscisic acid in seed germination. *Plant Physiol* **167**, 1630–1642.
- Kushwaha R, Singh A, Chattopadhyay S** (2008). Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in Arabidopsis seedling development. *Plant Cell* **20**, 1747–1759.
- Lacombe B** (2001). The identity of plant glutamate receptors. *Science* **292**, 1486–1487.
- Lam H, Chiu J, Hsieh M, Lee M, Oliveira IC, Shin M, Coruzzi G** (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**, 125–126.
- Li HJ, Yang WC** (2012). Emerging role of ER quality control in plant cell signal perception. *Protein Cell* **3**, 10–16.
- Li J, Zhu SH, Song XW, Shen Y, Chen HM, Yu J, Yi K, Liu YF, Karplus VJ, Wu P, Deng XW** (2006). A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell* **18**, 340–349.
- Manzoor H, Kelloniemi J, Chiltz A, Wendehenne D, Pugin A, Poinssot B, Garcia-Brugger A** (2013). Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant J* **76**, 466–480.
- McFeeters RL, Oswald RE** (2004). Emerging structural explanations of ionotropic glutamate receptor function. *FASEB J* **18**, 428–438.
- Meyerhoff O, Müller K, Roelfsema MR, Latz A, Lacombe B, Hedrich R, Dietrich P, Becker D** (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta* **222**, 418–427.
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam MG, Liu LH, Obermeyer G, Feijó J** (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* **332**, 434–437.
- Mousavi SAR, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE** (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature* **500**, 422–441.
- Nagata T, Iizumi S, Satoh K, Ooka H, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Kikuchi S** (2004). Comparative analysis of plant and animal calcium signal transduction element using plant full-length cDNA data. *Mol Biol Evol* **21**, 1855–1870.
- Parsons CG, Panchenko VA, Pinchenko VO, Tsyndreko AY, Krishtal OA** (1966). Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal

- neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantin. *Eur J Neurosci* **8**, 446–454.
- Penn AC, Williams SR, Greger IH** (2008). Gating motions underlie AMPA receptor secretion from the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **27**, 3056–3068.
- Price MB, Jelesko J, Okumoto S** (2013). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Front Plant Sci* **3**, 1–10.
- Price MB, Kong DD, Okumoto S** (2013). Inter-subunit interactions between glutamate-like receptors in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **8**, e27034.
- Qi Z, Stephens NR, Spalding EP** (2006). Calcium entry mediated by glr3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol* **142**, 963–971.
- Roy SJ, Gilliam M, Berger B, Essah PA, Cheffings C, Miller AJ, Davenport RJ, Liu LH, Skynner MJ, Davies JM, Richardson P, Leigh RA, Tester M** (2008). Investigating glutamate receptor-like gene co-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **31**, 861–871.
- Singh A, Kanwar P, Yadav AK, Mishra M, Jha SK, Baranwal V, Pandey A, Kappor S, Tyagi AK, Pandey GK** (2014). Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice. *FEBS J* **281**, 894–915.
- Sivaguru M, Pike S, Gassmann W, Baskin TI** (2003). Aluminum rapidly depolymerized cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol* **44**, 667–675.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E** (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**, 745–756.
- Stephens NR, Qi Z, Spalding EP** (2008). Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the *GLR3.3* and *GLR3.4* genes. *Plant Physiol* **146**, 529–538.
- Tapken D, Anshütz U, Liu LH, Huelsken T, Seebohm G, Becker D, Hollmann M** (2013). A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids. *Sci Signal* **6**, a47.
- Tapken D, Hollmann M** (2008). *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. *J Mol Biol* **383**, 36–48.
- Teardo E, Carraretto L, Bortoli SD, Costa A, Behera S, Wagner R, Schiavo FL, Formentin E, Szabo I** (2015). Alternative splicing-mediated targeting of the Arabidopsis GLUTAMATE RECEPTOR3.5 to mitochondria affects organelle morphology¹. *Plant Physiol* **167**, 216–227.
- Teardo E, Formentin E, Segalla A, Giacometti GM, Marin O, Zanetti MA, Schiavo FL, Zoratti M, Szabò I** (2011). Dual localization of plant glutamate receptor AtGLR3.4 to plastids and plasmamembrane. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 359–367.
- Teardo E, Segalla A, Formentin E, Zanetti M, Marin O, Giacometti GM, Schiavo FL, Zoratti M, Szabò I** (2010). Characterization of a plant glutamate receptor activity. *Cell Physiol Biochem* **26**, 253–262.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan HJ, Myers SJ, Dingledine R** (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **62**, 405–496.
- Turano FJ, Muhitch MJ, Felker FC, McMahon MB** (2002). The putative glutamate receptor 3.2 from *Arabidopsis thaliana* (AtGLR3.2) is an integral membrane peptide that accumulates in rapidly growing tissues and persists in vascular-associated tissues. *Plant Sci* **163**, 43–51.
- Turano FJ, Panta GR, Allard MW, Berkum PV** (2001). The putative glutamate receptors from plants are related to two superfamilies of animal neurotransmitter receptors via distinct evolutionary mechanisms. *Mol Biol Evol* **18**, 1417–1420.
- Ulbrich MH, Isacoff EY** (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14163–14168.
- Vatsa P, Chiltz A, Bourque S, Wendehenne D, Garcia-Brugger A, Pugin A** (2011). Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production. *Biochimie* **93**, 2095–2101.
- Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP** (2012). Ca²⁺ conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol* **159**, 40–46.
- Vincill ED, Clarin AE, Molenda JN, Spalding EP** (2013). Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 1304–1313.
- Walch-Liu P, Forde BG** (2008). Nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J* **54**, 820–828.
- Walch-Liu P, Liu LH, Remans T, Tester M, Forde BG** (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**, 1045–1057.

Current Research Advances on Glutamate Receptors (GLRs) in Plants

Mingjie He^{1,2†}, Yichen Sun^{2†}, Xiaoyuan Cheng², Dongxue Shi², Diqin Li¹, Yiyin Chen³, Yongkun Feng², Lu Liu², Tengfei Fan², Chao Yang³, Fengqiu Cao^{4*}, Laihua Liu^{1,2*}

¹College of Agriculture Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ³Institute of Tobacco Research of Chongqing, Chongqing 400716, China; ⁴Shanghai Center for Plant Stress Biology, Institute of Plant Physiology Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract In mammals, ionotropic glutamate receptors (iGLuR) are amino acids (e.g. glutamate and glycine) -gated cation channels, and exhibit molecular functions in the regulation of excitatory neurotransmission as well as in directing neuron growth. Since 1998 twenty genes homologous to *iGLuR* have been identified in Arabidopsis genome (termed *AtGLRs*), with reported functions involved in many biological processes including light signaling, root-tip meristematic cell activity, pollen tube growth, cytosolic calcium ion flux and response to varied biotic and abiotic stresses. This paper comprehensively summarizes research achievements or advances in terms of plant glutamate receptors and amino acid (e.g. glutamate) signaling in the past more than ten years, with major issues focusing on e.g. the protein structure of GLRs, a relationship between activation of ion channels and their ligands, their gene expression patterns as well as possible biological roles in plants, thus hopefully providing valuable information for researchers related to this field.

Key words glutamate receptor, amino acid signaling, Arabidopsis, calcium ion-channel, growth and development

He MJ, Sun YC, Cheng XY, Shi DX, Li DQ, Chen YY, Feng YK, Liu L, Fan TF, Yang C, Cao FQ, Liu LL (2016). Current research advances on glutamate receptors (GLRs) in plants. *Chin Bull Bot* 51, 827–840.

† These authors contributed equally to this paper

* Authors for correspondence. E-mail: fengqiu.cao@ips.unibe.ch; LL1025@cau.edu.cn