

· 专题论坛 ·

拟南芥光敏色素B氨基酸位点突变对其结构与功能的影响

陈艳晓^{1,2}, 李亚萍², 周晋军³, 解丽霞², 彭永彬², 孙伟², 和亚男²
蒋聪慧², 王增兰¹, 郑崇珂^{2*}, 谢先芝^{2*}

¹山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ²山东省农业科学院湿地农业与生态研究所, 济南 250100

³山东省农业科学院农作物种质资源研究所, 济南 250100

摘要 生物体为适应外界不断变化的光环境, 进化出不同的光受体, 其中光敏色素是一类经典的植物感受红光和远红光的受体蛋白, 其通过暗适应的Pr状态和光激活的Pfr状态之间的光转换来检测红光和远红光。植物光敏色素具有1个保守的N端感光区域和1个C端调节区域, 其中N端部分包括NTE、PAS、GAF和PHY亚结构域, C端部分包括2个PAS结构域和1个组氨酸激酶相关结构域(HKRD)。为深入了解光敏色素的结构及功能, 已获得许多光敏色素功能缺失或氨基酸位点突变体, 并对其进行功能研究, 发现N端结构域在光敏色素的光谱特性、光信号感知和光信号转导等方面均具有重要作用; 而C端结构域是光敏色素的二聚化与核定位所必需。该文综述了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中光敏色素B (phyB)各亚结构域中氨基酸位点突变对其功能的影响, 以期深入理解phyB的结构及功能, 为未来通过基因编辑手段进行作物农艺性状的遗传改良奠定基础。

关键词 光敏色素B, 拟南芥, 结构域, 氨基酸位点突变, 功能

陈艳晓, 李亚萍, 周晋军, 解丽霞, 彭永彬, 孙伟, 和亚男, 蒋聪慧, 王增兰, 郑崇珂, 谢先芝 (2024). 拟南芥光敏色素B氨基酸位点突变对其结构与功能的影响. *植物学报* 59, 481–494.

光不仅为植物提供能量, 而且是调节植物生长发育的重要环境信号之一。为了感知周围环境的光强、光质、光向和光周期, 植物进化出能监测外部光照条件并对其生理和发育过程进行光特异性调整的复杂感光系统(Mathews, 2006), 从而将外部光中包含的信息转换为生物信号。植物通过向光素(phototropins, PHOTs)和隐花色素(cryptochromes, CRYs)感知蓝光和近紫外光UV-A (320–500 nm), 通过UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8)感知紫外光UV-B (280–315 nm), 通过光敏色素(phytochrome, Phy)感知红光/远红光(red/far-red, R/FR)信号(Chen et al., 2004; Paik and Huq, 2019)。蓝光诱导的植物向光性主要受向光素调节, 而光敏色素和隐花色素在蛋白修饰及生长素运输等方面参与植物向光性调节(赵翔等, 2015)。不同光受体在感知蓝光或红光/远红光时诱导的光反应中其作用既有交叉又有不同。在这些光受体蛋白中

最突出的一类是光敏色素, 它在植物中普遍存在, 还广泛分布于真菌和细菌中(Rockwell et al., 2006; Auldridge and Forest, 2011; Burgie and Vierstra, 2014)。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的光敏色素家族由5个不同的基因(PHYA–PHYE)编码, 负责调节种子萌发、幼苗光形态建成、避阴反应(shade avoidance responses, SAR)及开花时间等多种光依赖性反应(Clack et al., 1994)。其中phyB是光生长植物中主要的红光和远红光感受器, 以红光吸收形式(phytochrome red light, Pr)合成, 当暴露在红光下, 其转化为具有生物活性的远红光吸收形式(phytochrome far-red light, Pfr), 而Pfr的光吸收反过来被光诱导转化为Pr (Rockwell and Lagarias, 2006)。光敏色素一般分为2类: 光不稳定的I型光敏色素和光稳定的II型光敏色素。phyB属于II型光敏色素, 其Pfr形式相对稳定(Sharrock and Quail, 1989), 因此phyB蛋白在光

收稿日期: 2023-06-05; 接受日期: 2023-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(No.32070216)和山东省农业科学院农业科技创新工程(No.CXGC2023A15)

* 通讯作者。E-mail: zhengck1983@163.com; xzhxie2010@163.com

下相对丰富。

光敏色素在黑暗条件下存在于细胞质中,被光激活后进入细胞核,定位在被称为光小体(photobodies, PBs)的亚核结构(Yamaguchi et al., 1999; Kircher et al., 2002)。目前,对于光小体在光敏色素信号转导中的确切功能尚不完全了解,大多数研究表明光小体的作用依赖于光敏色素相互作用蛋白的功能(Cheng et al., 2021)。phyB的光小体由phyB二聚体及其初级作用蛋白和次级作用蛋白组成,次级作用蛋白与初级作用蛋白直接相互作用,且其只有与初级作用蛋白共表达时才能定位在光小体(Kim et al., 2023)。在细胞核中,phyB的Pfr形式与多个蛋白特异性相互作用,诱导发育相关的大量转录变化与光形态建成(Quail, 2002),其中光敏色素相互作用因子(phytochrome interacting factors, PIFs)是一类重要的互作蛋白。

光敏色素在调节植物生长发育的多个过程中具有重要作用,如种子萌发、幼苗形态建成、光合系统的建立、避阴反应和开花时间。除了在模式植物拟南芥中的功能研究,phyB在多种作物生长发育中也发挥重要作用。水稻(*Oryza sativa*) phyB负调控叶夹角,抑制水稻节间伸长,通过抑制*Hd3a*基因的表达影响水稻的抽穗期和育性(Xie et al., 2007; 顾建伟等, 2011; Sun et al., 2017)。在玉米(*Zea mays*)中,与野生型相比,低种植密度下*phyB1*和*phyB2*突变体叶面积变小(每片叶的细胞数目减少),降低了拦截光的能力,削弱了植物生长能力,*phyB1*突变体的籽粒产量有所降低(Wies et al., 2019)

此外,光敏色素还介导植物对各种生物和非生物胁迫的响应。水稻*phyB*突变体叶片气孔数目及长度均显著小于野生型,植株蒸腾速率低于野生型,具有较强的耐干旱胁迫能力(Liu et al., 2012)。He等(2016)发现水稻*phyB*功能缺失通过*OsPIL16*正调控*OsDREB1*表达以增强细胞膜的完整性和降低丙二醛浓度,从而提高*phyB*突变体的耐冷性。Kwon等(2018)报道*PHYB*基因突变导致 Na^+/K^+ 比值降低并增强细胞膜的完整性,从而提高水稻的耐盐性。水稻光敏色素缺失突变体*phyA1phyB1phyC*对稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的抗性降低(Xie et al., 2011)。Jung等(2023)发现*PHYB*基因突变通过增加 NH_4^+ 的摄取增强水稻对纹枯病和盐碱胁迫的抗性。

综上所述,光敏色素在植物尤其是作物中发挥重

要作用,对解决农业生产中的实际问题,提高作物生长能力以及抗逆境胁迫能力,实现培育多个优异性状聚合的育种目标具有潜在的应用价值。但目前对于决定功能作用的光敏色素结构了解很少,限制了其在育种中的应用。由于已有的光敏色素结构相关研究多集中于模式植物拟南芥,因此本文主要综述拟南芥phyB各亚结构域中氨基酸位点的突变及其功能。

1 光敏色素的光感受特性

早期研究发现,红光促进莴苣(*Lactuca sativa*)种子萌发,随后其又受到远红光的抑制,这种受红光/远红光调控的可逆的生理反应使光敏色素最早被鉴定出来,并认为光敏色素分子是线状排列的4个吡咯环与1个蛋白质相连结的色素蛋白复合体(童哲等, 2000)。随着研究的深入,发现植物光敏色素是一种以同源或异源二聚体形式存在的可溶性蛋白质。拟南芥phyB蛋白质每个单体由1 150个氨基酸残基组成,其中2个脱辅基蛋白共价结合到1个线性四吡咯发色团(phytochromobilin, PΦB)上,形成光敏色素全蛋白(Cheng et al., 2021; Ruiz-Diaz et al., 2022)。

光敏色素存在2种光谱形式:非活性的Pr型和活性的Pfr型。光敏色素的合成是在非活性的Pr状态下,吸收红光时转化为活性的Pfr型。Pfr型光敏色素在吸收远红光或经过一个热逆转的温度依赖性热弛豫过程后失去活性并恢复到Pr型。Pr型的红光吸收最大值是660 nm,而Pfr型的远红光吸收最大值为730 nm。Pr型和Pfr型吸收最大值不同,但由于光谱重叠,2种构象总是出现在光下,而只有长时间的黑暗才能使所有光敏色素恢复到Pr型(Klose et al., 2015)。

光敏色素在体内是二聚体,因此phyB可作为Pr-Pr或Pfr-Pfr同型二聚体和Pr-Pfr异型二聚体(Hernando et al., 2021)。当有足够的光时,系统达到了光平衡,其中每个二聚体的比例完全取决于光谱组成。phyB的生理响应与Pfr-Pfr水平相关,因此Pfr-Pfr被认为是其生物活性构象,一般高水平Pfr-Pfr需要较高的红光/远红光比率(Klose et al., 2015)。已发现光敏色素的3种作用模式:低通量反应(low flux reactions, LFRs)、极低通量反应(very low flux reactions, VLFRs)以及高辐射反应(high radiation reactions, HIRs)。光敏色素的R/FR可逆反应属于LFRs,其特征是由红光

脉冲引起,并由随后的远红光脉冲产生可逆反应。在植物中,这种Pr-Pfr交换为量化光通量率、持续时间和光谱质量提供了主光开关,从而使其能够对昼夜周期、光周期和邻位竞争作出响应(Franklin and Quail, 2010; Legris et al., 2019)。

2 光敏色素结构域特征及其功能

光敏色素单体通常由1个N端感光模块(photosensory module, PSM)和1个C端输出模块(output module, OPM)组成,中间通过1个灵活的铰链区连接(图1)。N端PSM可分成4个连续的亚结构域,包括可变的N端延伸区(N-terminal extension, NTE)、PAS (period/ arnt/single-minded)结构域、GAF (cGMP phosphodiesterase/adenylate cyclase/FhlA)结构域以及PHY结构域(phytochrome-specific domains),其中在GAF结构域的1个保守半胱氨酸残基上附着有通过硫醚键共价连接的光敏色素发色团PΦB (Li et al., 2022),而PHY结构域对Pfr构象的稳定性至关重要(图1)。C端OPM包括1个PAS相关结构域(PAS-related domain, PRD)和1个组氨酸激酶相关结构域(histidine kinase-related domain, HKRD),介导二聚化并将信号传递到下游的作用因子(Burgie and Vierstra, 2014) (图1)。PRD结构域包含2个串联的PAS结构域PAS-A和PAS-B (图1)。此外,PSM的空间结构通过1个连接GAF结构域和N端延伸(NTE)的8字形结、1个连接

GAF和PHY结构域的螺旋轴以及1个从PHY结构域延伸到接触发色团附近GAF结构域的舌状基序来稳定(Wagner et al., 2005; Essen et al., 2008; Yang et al., 2008) (图1)。

核磁共振分析和光谱研究表明,光感知触发了光敏色素PΦB C15-C16双键从Z型到E型的异构化,从而导致一系列蛋白质构象变化(Burgie and Vierstra, 2014; Nagano, 2016)。例如,在Pr-Pfr光激活过程中舌状结构在靠近GAF的双蛋白结合袋的PHY结构域,经历了从β折叠到α螺旋的转变。此外,这种结构转换也影响感光结,这是PAS结构域与GAF结构域之间的8字形结,它将2个结构域拉到一起,然后再拖至PHY结构域上(Wagner et al., 2005; Essen et al., 2008; Yang et al., 2009; Burgie and Vierstra, 2014)。最终导致C端OPM位置发生变化,从而引起与核定位所需其它蛋白质的相互作用,以及与核蛋白的相互作用,包括PIF家族转录因子和泛素E3连接酶复合物(Cheng et al., 2021)。

为鉴定光敏色素信号转导的重要蛋白区域, Oka等(2008)对PHYB的N端651个氨基酸中产生的突变衍生物进行了研究,将产生的氨基酸突变分为2种。一种是光谱突变体,它们在发色团掺入、光转换和/或Pfr的稳定性方面存在缺陷,主要与GAF和PHY子结构域相关;另一种是信号突变体,它们的光谱特性正常,但在phyB向下游成分的信号传递方面有缺陷,导致其生物活性不足,主要集中在NTE和PAS结构域。

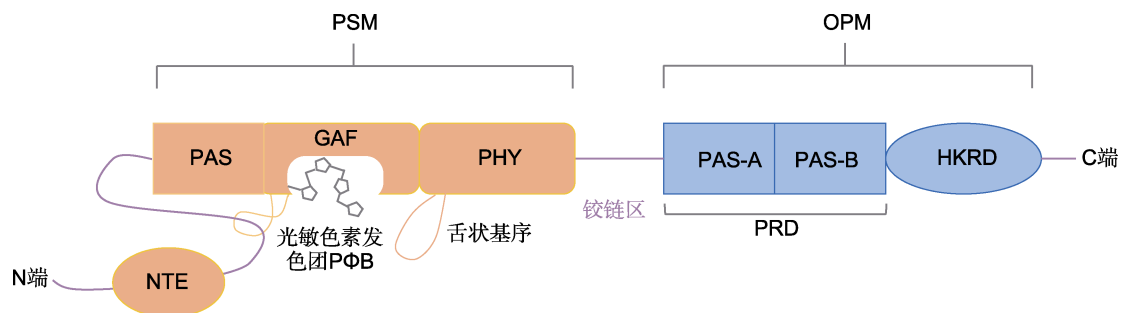


图1 拟南芥phyB结构域示意图

PSM: 感光模块; OPM: 输出模块; NTE: N端延伸区; PAS: Per(昼夜节律蛋白)-Arnt(芳香烃受体核转位蛋白)-Sim(Sim蛋白); GAF: cGMP激活的磷酸二酯酶, 鱼腥藻腺苷酸环化酶, 大肠杆菌FhlA; PHY: 光敏色素; PRD: PAS相关结构域; HKRD: 组氨酸激酶相关结构域

Figure 1 Schematic diagram of phyB domain in *Arabidopsis thaliana*

PSM: Photosensory module; OPM: Output module; NTE: N-terminal extension; PAS: Per (period circadian protein)-Arnt (Ah receptor nuclear translocator protein)-Sim (single-minded protein); GAF: cGMP-stimulated phosphodiesterase, anabaena adenylylase, *Escherichia coli* FhlA; PHY: Phytochrome; PRD: PAS-related domain; HKRD: Histidine kinase-related domain

2.1 N端延伸区(NTE)

与大多数细菌的光敏色素结构不同,植物光敏色素PSM中含有一种长的富含甘氨酸/丝氨酸的NTE,可抑制暗逆转(Vierstra, 1993),且其在植物光敏色素不同亚型中存在差异。由于NTE区域富含甘氨酸且包含3个RGG重复序列,Chen等(2022)证明phyB的NTE是一个相位分离的IDR (intrinsically disordered region),其与光小体的液液相分离紧密相关,NTE促进phyB光小体的形成,并赋予phyB热传感能力。研究表明,N端延伸对光敏色素Pfr形式的稳定性和信号转导很重要,缺失NTE的拟南芥突变体显示出光吸收最大值蓝移和热逆转更快(Burgie et al., 2014)。NTE区域发生D64N变异的拟南芥phyB转基因株系在不同光强的红光下其下胚轴长度均与phyB突变体相同,表明该位点突变造成PHYB活性丧失。然而也有研究表明NTE结构域对PHYB的功能并非必需,敲除拟南芥PHYB中1-57位氨基酸能获得具有完整活性的PHYB蛋白质,即使PHYB蛋白质的N端缺失103个氨基酸残基,其在红光下仍具有抑制下胚轴伸长的功能,仅抑制程度有所降低(Wagner et al., 1996)。NTE缺失影响发色团及其周围的氢键网络,特别是在Pfr状态下,这可能影响热逆转动力学(Velázquez Escobar et al., 2017)。由于已发表的拟南芥phyB的PSM晶体结构缺乏NTE,因此尚未见关于拟南芥phyB的NTE三维结构信息(Burgie et al., 2014)。目前,有证据表明NTE控制光敏色素的热逆转,NTE的磷酸化负调控该反应(Cherry et al., 1992; Nito et al., 2013)。NTE中S86位点磷酸化加速热逆转,减少活性Pfr的数量,严重影响phyB介导的红光敏感性(Viczián et al., 2020)。S86D和S86A突变不影响光感受器的稳定性、光转换和光谱特性,但S86D增强了phyB从Pfr到Pr的暗逆转,更快的暗逆转会减弱红光诱导的核输入及其与光敏色素相互作用因子3 (phytochrome interacting factor 3, PIF3)的相互作用(Medzihradsky et al., 2013)。Zhao等(2023)发现了一种“红光-phyB-Ca²⁺-CPKs-phyB”的“光-钙调控环路”,植物通过光-钙调控环快速激活2个钙依赖性蛋白激酶,在Ser80和Ser106位点磷酸化phyB,从而促进phyB入核。S80A和S106A突变会抑制核易位,不能够恢复phyB突变体的功能,而将S80A/S106A突变的phyB与核定位信号结合,便可完全恢复突变体的功能,表明S80/S106位

点磷酸化在phyB核易位和生理功能中发挥重要作用。

2.2 PAS/GAF核心结构域

PAS和GAF构成了光敏色素的核心信号结构域,并且在大多数光敏色素和光敏色素相关蛋白中较为保守。当拟南芥phyB的N端结构域融合1个二聚结构域和1个核定位信号时,其表现出完整的phyB功能,而且即使是缺乏PHY结构域的phyB其N端部分也可以转导光信号(Matsushita et al., 2003; Oka et al., 2004)。已有研究表明,PAS/GAF结构域缺失其中任何一个都会损害发色团的掺入,导致产生无功能的蛋白,因此很难对这2个结构域进行功能分离(Bae and Choi, 2008)。根据细菌光敏色素的晶体结构,2个结构域之间不仅通过蛋白质的肽主干相连,还通过1个三叶草形的感光结紧密相连(Wagner et al., 2005, 2007),其可能与PIF直接相互作用。

GAF结构域具有内在的发色团裂解酶活性,主要负责将发色团共价连接到该结构域357位保守的半胱氨酸上。该结构域的主链构象在超家族中非常保守,在发色团附近具有很强的序列同源性,其由6链 β 折叠(3-2-1-6-5-4 β 链排序)和 α 2- α 4螺旋构成的C形结构组成1个深的裂缝,紧密地支撑发色团(Burgie and Vierstra, 2014)。因此,该结构域对发色团的组装以及光敏色素蛋白的光谱特性具有重要作用。光谱完整性的丧失直接影响光感受器活性Pfr形式的数量或整体结构,因此光谱突变体的生物活性降低可简单解释为Pfr形式的数量少或异常。目前已证实,在发色团附着位点(phyB的357S)上的突变阻止了发色团的连接,表现为生物活性丧失(Wagner et al., 1996)。

Oka等(2008)在对拟南芥N651G-GUS-NLS转基因株系进行遗传筛选时,发现14个phyB错义突变,这些突变均造成长下胚轴表型,其中8个突变定位在GAF结构域,通过用PCB作为发色团在体外重组具有光谱活性的phyB衍生物,发现PHYB错义突变体中发色团组装能力显著降低,且G284E和P309L的光谱特征异常,表明该位点突变造成phyB的感光活性基本丧失。光敏色素的Pfr形式是热不稳定的,在黑暗下通过暗逆转过程自发地转化为Pr,因此暗逆转率反映了Pfr在黑暗中的稳定性,而暗逆转是调节体内Pfr水平的重要过程。R313K、R322Q和V401I突变体的发色团组装正常,但是其表现出暗逆转更快,且对红光

的敏感性降低。P304L和R352K在体外表现出正常的光谱特征及暗逆转率, 但R352K突变显著减弱了红光对下胚轴伸长的抑制, 表明它们对光信号的感知正常, 但向phyB下游成分的信号传递存在缺陷。Oka等(2008)还对之前鉴定到的C327Y、A372T (Chen et al., 2003)和H283T (Reed et al., 1993)突变进行了补充研究, 发现A372T红光差异光谱的最大值出现偏移, 且具有非常高的暗逆转率, C327Y和H283T也表现出较高的暗逆转率。L256C、V264E、V273L和P411L突变造成发色团结合能力降低或缺失, 且光可逆性丧失。S367P和I308T虽然表现出正常的发色团结合能力, 但是S367P未表现出正常的光可逆性, I308T虽显示出光可逆性, 但光谱特征异常。此外, S343Y、C345R、P411L及R415W突变后发色团与蛋白不能结合或结合能力降低, 表明这些氨基酸为光敏色素本身固有的发色团连接酶催化活性所必需, 或者为催化位点结构完整性所必需(Kikis et al., 2009)。

对GAF结构域第276位酪氨酸的突变分析表明, 该结构域在光信号转导中起关键作用。PHYB第276位酪氨酸被组氨酸取代导致红光诱导的光异构化丧失, 从光谱角度看, 这意味着发生Y276H突变的phyB如同phyB的Pr形式(Bae and Choi, 2008)。有趣的是, 具有Y276H突变的phyB不仅触发光形态建成反应(Su and Lagarias, 2007), 还在无光信号输入的情况下诱发光调控的转录反应(Hu et al., 2009)。对PHYB该位点酪氨酸其它突变体的生物活性分析表明, GAF结构域的酪氨酸残基在耦合光感应和信号输出中发挥关键作用(Su and Lagarias, 2007)。

PAS结构域也在光信号转导中发挥重要作用。R110Q、G111D、G112D和P149L突变定位在N端PAS结构域, 其中R110Q、G111D和G112D连续突变的突变体中PHYB的表达水平并未降低, 甚至升高, 且具有完整的光谱特征, 但其在幼苗的去黄化过程中丧失了PHYB的部分功能。Oka等(2008)预测突变残基在三维模型中的位置, 发现3个连续的氨基酸R110、G111和G112与DrCBD中的 $\beta 1'$ 链部分重叠, 而 $\beta 1'$ 链与DrCBD中的 $\beta 2'$ 和 $\beta 3'$ 链共同参与感光结的形成, 目前认为感光结在光敏色素信号转导中起关键作用。

PIF3是与光敏色素相互作用的bHLH转录因子, 为调控快速光响应基因表达所必需。体外实验中的

Y104E突变完全消除了Pfr依赖的PIF3结合, 表明磷酸化使phyB信号失活的机制涉及阻断phyB结合PIF的能力, 而Y104位点或许是植物phyB光活性的关键(Nito et al., 2013)。Kikis等(2009)研究表明, G111D突变造成phyB基本丧失与光诱导的PIF3结合能力, R110Q同样显示出很少与光诱导的PIF3结合, 而G112D受到突变的影响较为轻微, 进一步表明PAS结构域在信号转导中起重要作用。通过对I208T、G118R和S134G突变进行发色团组装分析, 发现I208T的发色团组装正常, 而在G118R和S134G突变体中检测到发色团组装缺失(Oka et al., 2008)。C119Y、S343Y和C345R突变导致发色团与载脂蛋白的连接减少或缺失。而且在S134G和C119Y突变体中无法检测到PIF3的光诱导结合或结合能力显著降低。Liu等(2023)研究发现细胞壁蛋白LRX (leucine-rich repeat extension)和类受体激酶FER (FERONIA)组成1个分子模块来调控植物的生长和耐盐性。其中, FER是phyB的一种磷酸化激酶, 其磷酸化位点为Ser106和Ser227, S106A/S227A突变会延迟光小体的解离和黑暗条件下phyB从Pfr向Pr逆转, 而S86A、S106A和S227A三突变几乎完全消除了Pfr-Pr的暗逆转, 表明这3个氨基酸残基是调控暗触发的Pfr-Pr逆转的主要磷酸化位点。结合Zhao等(2023)对Ser106位点的研究, 钙依赖性蛋白激酶CPK6/12磷酸化Ser80和Ser106可促进phyB功能反应, 而FER磷酸化Ser106和Ser227却破坏了phyB信号通路, 表明S106的磷酸化分别通过控制暗逆转或核输入来负向或正向调节phyB介导的反应(Viczián and Nagy, 2023), 进一步证明了Ser106位点在phyB信号转导中的重要性。

综上所述, PAS和GAF结构域在光感应和光信号转导中发挥关键作用。

2.3 PHY结构域

PHY结构域在所有光敏色素中均保守, 它是光敏色素Pfr形式的完整性所必需。虽然PHY结构域可能并非phyB信号转导所必需, 但对光化学至关重要, 有助于实现phyB的正常功能。有研究表明, 缺失整个PHY序列的PSM区域能正常合成Pr, 但不能光逆转为Pfr (Burgie et al., 2014)。更高的暗逆转率可降低phyB的生理活性(Oka et al., 2004)。与G564E突变导致极缓慢的暗逆转(Kretsch et al., 2000)相比, PHY结

构域G564A、S584F和A587T的突变都产生更高的暗逆转率(Oka et al., 2008)。这进一步证实PHY结构域具有稳定Pfr的作用。此外,还证明A587T突变破坏了PHYB的核定位(Chen et al., 2003)。

拟南芥*hy (long hypocotyl)*突变体是植物光感受器基因中出现的第1类突变体。Reed等(1993)发现phyB蛋白质3个等位基因*hy3-6064*、*hy3-8-36*和*hy3-EMS142*的PHY结构域的编码区均存在核苷酸突变导致的终止密码子。与野生型相比,这些突变体均表现出长下胚轴、叶柄更细长、叶面积更小及植株更高。这与PHYB功能缺失突变体表型相似。综上,PHY结构域对PHYB的信号转导具有重要作用。在饱和光条件下,去除PHY结构域的N450G-GUS-NLS转基因株系的生理响应明显弱于含有PHYB完整N端的N651G-GUS-NLS转基因株系,原因可能是去除PHY结构域导致phyB与下游成分的相互作用减弱(Oka et al., 2004)。

与一些细菌的光敏色素结构(Essen et al., 2008; Yang et al., 2009; Bellini and Papiz, 2012; Anders et al., 2013)相同,植物PHY结构域包含1个独特的舌状结构。舌状结构作为1个延伸环从PHY结构域向GAF结构域突出,并与带发色团的GAF结构域相互作用。Burgie等(2014)对拟南芥phyB突变分析显示,舌状结构的连接对Pr非必需,但一些氨基酸对适当的Pr/Pfr相互转化和/或Pfr的热稳定性至关重要。PHY结构域的舌状区域发生突变,如R582A或G564E突变导致Pfr形式的热稳定性显著增强,其中R582A突变体的热逆转反应减缓为原来的4%,且这些突变使在弱红光下生长的幼苗具有强烈的超敏性(Kretsch et al., 2000; Ádám et al., 2011; Zhang et al., 2013; Burgie et al., 2014)。Maloof等(2001)发现拟南芥phyA中M548T突变稳定了光不稳定型phyA蛋白,且造成phyA蛋白远红光敏感性阈值降低为原来的1%,之后发现phyB类似突变(M579T)造成植株对低通量红光的反应敏感性降低,但不影响感知高通量红光,表明该氨基酸位点的突变改变了光敏色素的光敏感性。此外,Burgie等(2014)通过研究phyB的三维结构,发现当苏氨酸取代579位甲硫氨酸后,能够与355位组氨酸相互作用,稳定了舌状结构与GAF结构域的结合。此外,Viczian等(2020)发现phyB的D453R突变通过减缓热逆转反应提高了对红光的敏感性。

总之,phyB的N端可以单独结合发色团,并表现出光可逆的构象变化,它不仅在光感知中发挥作用,而且在光信号传递到下游网络中也起作用。因此PHY结构域对于微调Pfr构象的稳定性及确保适当的光谱特性和核定位非常必要。

2.4 PRD结构域

phyB的C端包含2个PAS结构域和1个组氨酸激酶相关结构域(HKRD)。虽然光敏色素的N端结构域包含必要的光化学和光生物活性,但C端结构域发生大量无义和错义突变表型,表明其对完整蛋白的正常功能具有重要作用(Xu et al., 1995; Rockwell and Lagarias, 2006)。光敏色素的C端一直被认为可以将信号转导到下游成分(Matsushita et al., 2003)。研究表明,C端结构域并不直接参与信号转导,而是在phyB的二聚化以及核定位中发挥重要作用(Matsushita et al., 2003; Oka et al., 2004)。Matsushita等(2003)对拟南芥中转基因表达缺失衍生物的生物活性进行检测,发现phyB的C端结构域并非光敏色素活性所必需,而是二聚体形成和减弱phyB信号活性所必需。

C端的PAS结构域对于phyB核定位是不可或缺的(Chen et al., 2003, 2005)。Wagner和Quail (1995)为确定phyB中对调控活性具有重要功能的结构域,对phyB过表达株系进行化学诱变,发现C端4个单一氨基酸的替换(A750V、G767E、G767R和E812K)不影响phyB光谱活性蛋白的活性、吸收光谱特性以及二聚体的形成,但与未突变的亲本相比,phyB活性降低为原来的0.1%–2.5%,这表明由此产生的分子保留了正常的光感受功能,但是在促进信号传递到下游转导成分的调节功能存在缺陷。其中,G767R突变通过阻碍PHYB蛋白在细胞核中的积累降低phyB的活性(Matsushita et al., 2003)。E812K突变造成暗逆转反应增强和功能缺失表型,导致Pfr形式不稳定,这表明远离发色团的蛋白质结构域也影响Pfr的热稳定性(Elich and Chory, 1997)。Wagner和Quail (1995)发现1095和1136突变导致PHYB蛋白被提前截断。之后,Chen等(2003)发现光敏色素定位于细胞核后与核内分散的核小体(nuclear bodies, NBs)相联系,只有Pfr占总phyB的数量达到一定阈值才能形成NBs,且只有当phyB占比较高时,才会形成较大的NBs,较

大的NBs与较强的phyB反应相关。例如, 下胚轴长度随红光通量率的增加而减小, 红光通量率控制Pfr与总phyB的相对数量。然而, PAS结构域G674D和A719V突变的植株对高通量率的红光敏感性较低, 不能形成较大的NBs, 但其phyB功能并未完全丧失, 仅对下胚轴的抑制程度较phyB突变体有所降低, 这表明PAS结构域对phyB的功能发挥起重要作用。

2.5 HKRD结构域

phyB的C端OPM形成二聚体(Matsushita et al., 2003; Wagner et al., 2005), OPM中的HKRD结构域被认为是1个二聚体结构域(Edgerton and Jones, 1992; Wagner et al., 2005; Clack et al., 2009)。许多细菌和蓝藻光敏色素在其OPM中有1个组氨酸激酶结构域, 是真正的去组氨酸激酶感受器; 而植物光敏色素HKRD结构域显示丝氨酸/苏氨酸激酶活性(Cheng et al., 2021)。组氨酸激酶结构域共享5个保守基序, 分别为H、N、G1、F和G2, 其中后3个对ATP的结合和水解很重要。根据海栖热袍菌(*Thermatoga maritima*) CheA组氨酸激酶的晶体结构, 该结构域在G1、F和G2亚结构域形成的ATP结合口袋附近形成1个 α 2螺旋。因此, 在该结构域发生的一些突变可能会破坏ATP或Mg²⁺的结合, 或者它们可能对HKRD的构象产生普遍影响, 对组氨酸激酶相关结构域介导的二聚反应起重要作用(Krall and Reed, 2000)。

拟南芥phyB的991突变是在991密码子上发生1个鸟苷酸缺失, 该突变引入1个移码, 增加4个错义残基, 然后产生1个终止密码子。该突变导致182个氨基酸的截断, 而且截断删除了超过2/3的HKRD结构域, 其中包括N、G1、F和G2基序。研究发现, 该突变植株的下胚轴伸长和早期开花表型均弱于phyB-1突变植株, 而且过表达991位点突变的PHYB基因增强了phyB完全缺失背景下植株对下胚轴伸长的红光抑制并导致开花延迟, 表明被截断的phyB蛋白保留了调节下胚轴伸长和开花的活性。因此, HKRD结构域至少在这2种phyB功能中不可或缺(Krall and Reed, 2000)。D1040V位于HKRD的N亚结构域, 该突变可以消除HKRD的二聚化, 从而减弱phyB在核积累和光小体定位中的早期信号转导功能(Qiu et al., 2017; Kwon et al., 2018)。

植物在光线不足或被其它植物遮挡时, 发生避阴反应, 表现为快速生长、花期提前、叶柄变长和顶端优势明显等(张芳等, 2011)。植物通过光信号途径来诱导避阴反应, 而phyB介导避阴反应。通过对Col-0与Pat (Patagonia)之间的162个重组近交系群体进行QTL定位, 发现PHYB是调控SAR的候选基因。研究表明, 定位于C端HKRD结构域上的V980I和L1072V多态性能降低避阴反应以及种子萌发期和苗期的光敏感性。定位在N端PSM的I143L非同义多态性造成下胚轴的抑制作用受损, 但是增强了避阴反应(Ruiz-Diaz et al., 2022)。

Dash等(2021)通过遗传互补实验证实, 在T-DNA株系SALK_015201中存在1个新的PHYB等位基因*slim shady*, 通过全基因组序列分析, 发现编码序列最后1个外显子内的phyB位点存在1对单碱基缺失, 造成L1125转化为PHYB蛋白C端区域的终止密码子, 产生1个I1124后缺失48个氨基酸的截短蛋白, 该突变导致整个G2子结构域的截短, 可能造成功能等位基因缺失。综上所述, PHYB的PAS-A和PAS-B结构域及HKRD结构域对于光敏色素的二聚化和核定位是必需的。

目前, 我们对光敏色素的结构和分子功能的了解来源于对光受体突变体的分离。对具有不同氨基酸突变位点的光敏色素突变体的研究结果显示, 使用的大多数氨基酸突变位点集中于phyB的N端PSM部分, 而C端发现的突变位点很少(图2)。phyB所有结构域的大量氨基酸残基, 无论是在发色团的近端还是远端, 均被认为影响phyB的光信号传递和/或光化学性质以及光敏色素Pfr形式的稳定性(表1)。基于以上分析, 我们对PHYB各亚结构域的功能进行总结(表2)。光敏色素的N端主要负责感知光信号, 而C端主要负责传递光信号。NTE结构域主要参与光敏色素的热逆转过程。PAS/GAF核心结构域在光信号感知和转导方面均发挥关键作用, 其中GAF结构域主要负责发色团的组装, 保证光敏色素Pr与Pfr形式的正常转换, GAF结构域上的感光结与PIF3转录因子相互作用。PHY结构域为稳定光敏色素Pfr活性形式所必需, 其对光信号的逆转有重要作用。PRD结构域在光敏色素的核定位以及热逆转反应中发挥重要作用。HKRD结构域主要介导光敏色素的二聚化反应。

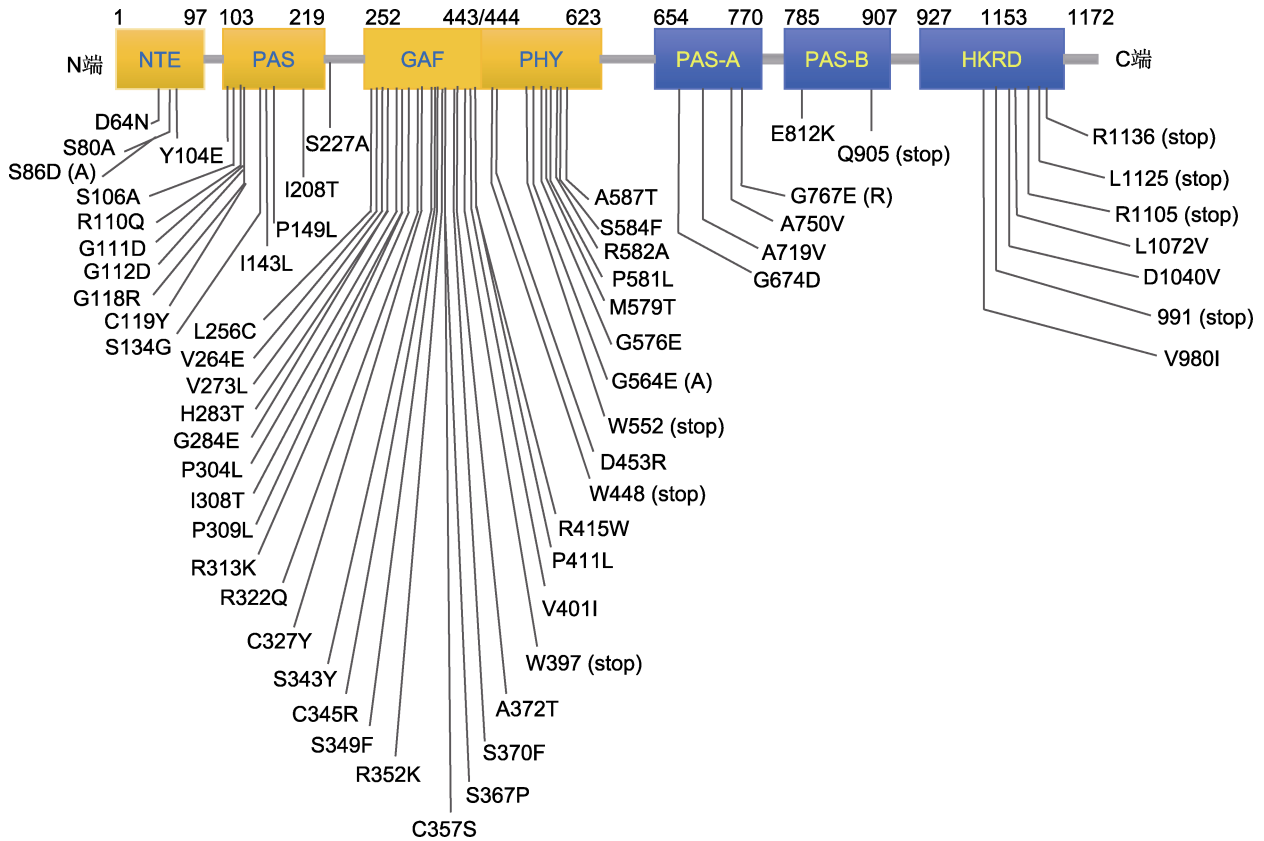


图2 携带错义突变拟南芥phyB蛋白结构域示意图
各结构域简称同图1。

Figure 2 Schematic diagram of the phyB protein domain in *Arabidopsis thaliana* carrying a missense mutation
The alphabet abbreviation of each domain is explained in Figure 1.

表1 phyB突变体中氨基酸突变位点及其对光敏感性、发色团组装与结合、光敏色素稳定性、光小体形成、光敏色素核定位及光信号传递的影响

Table 1 Overview of amino acid point mutation in phyB mutants and their effects on photosensitivity, chromophore assembly and binding, phytochrome stability, photobodies formation, phytochrome nuclear localization and light signaling

结构域	突变位点	光敏感性	发色团组 装及结合	光敏色素 稳定性	光小体 形成	光敏色素 核定位	光信号 传递	参考文献
NTE	D64N	-						Oka et al., 2008
	S80A					-		Zhao et al., 2023
	S86D(A)	-(+)		o(o)				Medzihradsky et al., 2013; Viczián et al., 2020
PAS	Y104E	-						Nito et al., 2013
	S106A					-		Zhao et al., 2023
	R110Q	-						Oka et al., 2008; Kikis et al., 2009
	G111D	-						Oka et al., 2008; Kikis et al., 2009
	G112D	-						Oka et al., 2008
	G118R		-					Oka et al., 2008
	C119Y		-					Kikis et al., 2009
	S134G	-	-					Oka et al., 2008; Kikis et al., 2009
	I143L	+						Ruiz-Diaz et al., 2022

表1 (续)

Table 1 (continued)

结构域	突变位点	光敏感性	发色团组 装及结合	光敏色素 稳定性	光小体 形成	光敏色素 核定位	光信号 传递	参考文献
PAS	P149L	-						Oka et al., 2008
	I208T	-	o					Oka et al., 2008
	S227A			+			-	Liu et al., 2023
GAF	L256C		-					Kikis et al., 2009
	V264E		-					Kikis et al., 2009
	V273L		-					Kikis et al., 2009
	Y276H	+					+	Su and Lagarias, 2007; Bae and Choi, 2008; Hu et al., 2009
	H283T			-				Reed et al., 1993; Oka et al., 2008
	G284E	-						Oka et al., 2008
	P304L	o		o			-	Oka et al., 2008
	I308T		o					Kikis et al., 2009
	P309L	-						Oka et al., 2008
	R313K	-	o	-				Oka et al., 2008
	R322Q	-	o	-				Oka et al., 2008
	C327Y			-				Chen et al., 2003; Oka et al., 2008
	S343Y		-					Kikis et al., 2009
	C345R		-					Kikis et al., 2009
	R352K	o		o			-	Oka et al., 2008
	C357S		-					Wagner et al., 1996
	S367P		o					Kikis et al., 2009
	S370F	-						Oka et al., 2008
	A372T	-		-				Chen et al., 2003; Oka et al., 2008
	V401I	-	o	-				Oka et al., 2008
P411L		-					Kikis et al., 2009	
R415W		-					Kikis et al., 2009	
PHY	D453R	+		+				Viczian et al., 2020
	G564E(A)	+	o	+			+(-)	Kretsch et al., 2000; Oka et al., 2008
	M579T	-						Maloof et al., 2001; Burgie et al., 2014
	R582A	+		+				Burgie et al., 2014
	S584F			-				Oka et al., 2008
A587T			-			-	Chen et al., 2003; Oka et al., 2008	
PRD	G674D	-			-			Chen et al., 2003
	A719V	-			-			Chen et al., 2003
	A750V	-					-	Wagner and Quail, 1995
	G767E(R)	-(-)					-(-)	Wagner and Quail, 1995; Matsushita et al., 2003
	E812K	-		-			-	Wagner and Quail, 1995; Elich and Chory, 1997; Chen et al., 2003
HKRD	V980I	-						Ruiz-Diaz et al., 2022
	D1040V	-			-		-	Qiu et al., 2017; Kwon et al., 2018
	L1072V	-						Ruiz-Diaz et al., 2022

各结构域简称同图1。突变体功能活性增强(+), 降低(-)及不受影响(o), 空格表示未确定。

The alphabet abbreviation of each domain is explained in Figure 1. Mutants showed enhanced functional activity (+), reduced activity (-), and unaffected (o), with blank cells indicating undetermined.

表2 拟南芥光敏色素结构域功能

Table 2 Summary on the function of phytochrome domains in *Arabidopsis*

模块	亚结构域	功能	主要作用
PSM	NTE	调控光敏色素Pfr形式的稳定性, 如影响光敏色素的热逆转反应; 负责光信号传递, 如影响phyB与下游转录因子PIF结合及通过光-钙调控环促进phyB入核	光信号感知及传递
	PAS	调控发色团的组装; 负责光信号传递, 如影响phyB与下游转录因子PIF3的结合能力	
	GAF	负责发色团的组装, 感应光信号; 维持phyB Pr/Pfr形式正常的可逆转换; 保持光敏色素Pfr形式的数量或整体结构, 如影响phyB的暗逆转率; 负责光信号传递, 如感光结可能直接与PIF相互作用	
	PHY	调控光敏色素Pfr形式的稳定性, 如影响phyB的暗逆转率以及热逆转反应; 维持phyB Pr/Pfr形式正常的可逆转换; 负责光信号传递, 如影响phyB与下游成分的相互作用及phyB的核定位	
OPM	PRD	调控光敏色素Pfr形式的稳定性, 如影响phyB的暗逆转反应; 负责光信号传递, 如影响phyB的核定位	光信号传递
	HKRD	介导光敏色素的二聚化, 从而影响phyB在核内积累和光小体定位中的早期信号传递	

各结构域简称同图1。The alphabet abbreviation of each domain is explained in Figure 1.

3 总结与展望

在过去的几十年中, 涉及结构域定位和突变的研究已解析了光敏色素的结构和功能域。然而, 经过几十年的研究, 仍有一些重要的问题有待回答。目前对原核生物phy光受体的认识比较系统, 但对植物尤其是作物中的phy如何传递信号以及如何进一步调控生长发育(如从种子萌发和叶绿体发育到避阴反应和开花时间)的研究仍不深入(Franklin and Quail, 2010; Legris et al., 2019)。phyB是光生长植物中的主要光敏色素, 是一种有效的光质和光强传感器, 并逐渐控制光形态建成(Klose et al., 2015)。截至目前, 只有拟南芥phyB的PSM具有晶体结构, 而其NTE则没有(Burgie et al., 2014)。在分子水平上, 细菌光敏色素的结构及其从光到暗的转变为我们提供了一个样例, 但高等植物的光敏色素结构仍不完整, 关于phyB的三维结构还需进一步明确。比较植物与微生物的光敏色素, 主要差异在PSM后插入2个预测的PAS结构域(PAS-A和PAS-B), 这可能影响内部的信号传输, 且它们的HKRD与真正的激酶存在显著差异, 这可能破坏了植物光敏色素的激酶活性。植物光感受器如何以光调节的方式与PIFs结合, 内部PAS结构域的作用, HKRD二聚化潜能之外的功能(Cherry et al., 1993; Cheng and Tu, 2018), 以及植物光敏色素的结构是否类似于同源的原核生物等, 目前尚不清楚。

综上, phyB在农作物抗旱、耐盐以及抗病(如水稻

抗纹枯病和稻瘟病)等方面发挥重要作用, 在作物抗病育种方面具有巨大的应用潜力, 而如何应用于农业生产实践还需要进一步研究。phyB调控植物的避阴反应或可为培育适于玉米-大豆带状复合种植方式的大豆品种提供新思路。phyB对植物开花时间以及生物量的影响都对农业生产有重要应用价值。刘莎等(2017)对125份亚洲栽培稻及野生稻PHYB基因进行测序, 分析了PHYB基因变异位点的多态性以及该位点的自然变异对栽培稻抽穗期多样性的影响, 发现栽培稻中日照抑制基因PHYB受到明显驯化, 阐明了PHYB基因长日照抑制开花的分子机制。研究表明, 籼稻与粳稻的phyB蛋白质有4个氨基酸的差异, 籼稻phyB的光敏感性较粳稻低。目前, 我们正在深入解析籼稻与粳稻phyB功能差异的分子基础。因此, 在未来研究中需进一步明确光敏色素各结构域的功能, 寻找对PHYB功能具有重要作用的关键氨基酸位点, 从而实现PHYB基因的定点改造, 以获得人类所需性状的农作物。

作者贡献声明

陈艳晓: 撰写论文及作图; 李亚萍: 整理文献及作图; 周晋军, 解丽霞, 彭永彬, 孙伟, 和亚男, 蒋聪慧, 王增兰: 整理文献, 对论文撰写提出指导和建议; 郑崇珂: 参与论文修改; 谢先芝: 论文构思及修改, 提供资金支持。

参考文献

- 顾建伟, 刘婧, 薛彦久, 臧新, 谢先芝 (2011). 光敏色素在水稻生长发育中的作用. *中国水稻科学* **25**, 130–135.
- 刘莎, 郑晓明, 冯雳, 乔卫华, 王君瑞, 公婷婷, 梁新霞, 齐兰, 苏龙, 丁膺宾, 许睿, 张丽芳, 程云连, 杨庆文 (2017). 水稻长日抑制基因 *PhyB* 的多样性及区域适应性初探. *植物遗传资源学报* **18**, 283–289.
- 童哲, 赵玉锦, 王台, 李念华, 毛居代·亚力 (2000). 植物的光受体和光控发育研究. *植物学报* **42**, 111–115.
- 张芳, 张晓枫, 王进征, 胡勇, 刘祥林 (2011). 植物光敏色素 PHYA、PHYB 研究进展. *生物学通报* **46**, 11–14.
- 赵翔, 赵青平, 杨煦, 慕世超, 张骁 (2015). 向光素调节植物向光性及其与光敏色素/隐花色素的相互关系. *植物学报* **50**, 122–132.
- Ádám É, Hussong A, Bindics J, Wüst F, Viczián A, Essing M, Medzihradzsky M, Kircher S, Schäfer E, Nagy F (2011). Altered dark- and photo-conversion of phytochrome B mediate extreme light sensitivity and loss of photoreversibility of the *phyB-401* mutant. *PLoS One* **6**, e27250.
- Anders K, Daminelli-Widany G, Mroginski MA, von Stetten D, Essen LO (2013). Structure of the cyanobacterial phytochrome 2 photosensor implies a tryptophan switch for phytochrome signaling. *J Biol Chem* **288**, 35714–35725.
- Auldrige ME, Forest KT (2011). Bacterial phytochromes: more than meets the light. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**, 67–88.
- Bae G, Choi G (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 281–311.
- Bellini D, Papiz MZ (2012). Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor. *Structure* **20**, 1436–1446.
- Burgie ES, Bussell AN, Walker JM, Dubiel K, Vierstra RD (2014). Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 10179–10184.
- Burgie ES, Vierstra RD (2014). Phytochromes: an atomic perspective on photoactivation and signaling. *Plant Cell* **26**, 4568–4583.
- Chen D, Lyu M, Kou XX, Li J, Yang ZX, Gao LL, Li Y, Fan LM, Shi H, Zhong SW (2022). Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B. *Mol Cell* **82**, 3015–3029.
- Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* **38**, 87–117.
- Chen M, Schwab R, Chory J (2003). Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14493–14498.
- Chen M, Tao Y, Lim J, Shaw A, Chory J (2005). Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Curr Biol* **15**, 637–642.
- Cheng MC, Kathare PK, Paik I, Huq E (2021). Phytochrome signaling networks. *Annu Rev Plant Biol* **72**, 217–244.
- Cheng YL, Tu SL (2018). Alternative splicing and cross-talk with light signaling. *Plant Cell Physiol* **59**, 1104–1110.
- Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Keller JM, Hershey HP, Vierstra RD (1993). Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* **5**, 565–575.
- Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Vierstra RD (1992). Phytochrome requires the 6 kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5039–5043.
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**, 413–427.
- Clack T, Shokry A, Moffet M, Liu P, Faul M, Sharrock RA (2009). Obligate heterodimerization of *Arabidopsis* phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* **21**, 786–799.
- Dash L, McEwan RE, Montes C, Mejia L, Walley JW, Dilkes BP, Kelley DR (2021). *Slim shady* is a novel allele of *PHYTOCHROME B* present in the T-DNA line SALK_015201. *Plant Direct* **5**, e00326.
- Edgerton MD, Jones AM (1992). Localization of protein-protein interactions between subunits of phytochrome. *Plant Cell* **4**, 161–171.
- Elich TD, Chory J (1997). Biochemical characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *Plant Cell* **9**, 2271–2280.
- Essen LO, Mailliet J, Hughes J (2008). The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14709–14714.
- Franklin KA, Quail PH (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* **61**, 11–24.
- He YN, Li YP, Cui LX, Xie LX, Zheng CK, Zhou GH, Zhou JJ, Xie XZ (2016). Phytochrome B negatively affects cold

- tolerance by regulating *OsDREB1* gene expression through phytochrome interacting factor-like protein OsPIL16 in rice. *Front Plant Sci* **7**, 1963.
- Hernando CE, Murcia MG, Pereyra ME, Sellaro R, Casal JJ** (2021). Phytochrome B links the environment to transcription. *J Exp Bot* **72**, 4068–4084.
- Hu W, Su YS, Lagarias JC** (2009). A light-independent allele of phytochrome B faithfully recapitulates photomorphogenic transcriptional networks. *Mol Plant* **2**, 166–182.
- Jung JH, Li Z, Chen H, Yang S, Li DD, Priatama RA, Kumar V, Xuan YH** (2023). Mutation of phytochrome B promotes resistance to sheath blight and saline-alkaline stress via increasing ammonium uptake in rice. *Plant J* **113**, 277–290.
- Kikis EA, Oka Y, Hudson ME, Nagatani A, Quail PH** (2009). Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3. *PLoS Genet* **5**, e1000352.
- Kim C, Kwon Y, Jeong J, Kang MJ, Lee GS, Moon JH, Lee HJ, Park YI, Choi G** (2023). Phytochrome B photobodies are comprised of phytochrome B and its primary and secondary interacting proteins. *Nat Commun* **14**, 1708.
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognár L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Ádám É, Schäfer E, Nagy F** (2002). Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**, 1541–1555.
- Klose C, Venezia F, Hussong A, Kircher S, Schäfer E, Fleck C** (2015). Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nat Plants* **1**, 15090.
- Krall L, Reed JW** (2000). The histidine kinase-related domain participates in phytochrome B function but is dispensable. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8169–8174.
- Kretsch T, Poppe C, Schäfer E** (2000). A new type of mutation in the plant photoreceptor phytochrome B causes loss of photoreversibility and an extremely enhanced light sensitivity. *Plant J* **22**, 177–186.
- Kwon CT, Song G, Kim SH, Han J, Yoo SC, An G, Kang K, Paek NC** (2018). Functional deficiency of phytochrome B improves salt tolerance in rice. *Environ Exp Bot* **148**, 100–108.
- Legris M, Ince YÇ, Fankhauser C** (2019). Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nat Commun* **10**, 5219.
- Li H, Burgie ES, Gannam ZTK, Li HL, Vierstra RD** (2022). Plant phytochrome B is an asymmetric dimer with unique signaling potential. *Nature* **604**, 127–133.
- Liu J, Zhang F, Zhou JJ, Chen F, Wang BS, Xie XZ** (2012). Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* **78**, 289–300.
- Liu X, Jiang W, Li YL, Nie HZ, Cui LN, Li RX, Tan L, Peng L, Li C, Luo JY, Li M, Wang HX, Yang J, Zhou B, Wang PC, Liu HT, Zhu JK, Zhao CZ** (2023). FERONIA coordinates plant growth and salt tolerance via the phosphorylation of phyB. *Nat Plants* **9**, 645–660.
- Maloof JN, Borevitz JO, Dabi T, Lutes J, Nehring RB, Redfern JL, Trainer GT, Wilson JM, Asami T, Berry CC, Weigel D, Chory J** (2001). Natural variation in light sensitivity of *Arabidopsis*. *Nat Genet* **29**, 441–446.
- Mathews S** (2006). Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol Ecol* **15**, 3483–3503.
- Matsushita T, Mochizuki N, Nagatani A** (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**, 571–574.
- Medzihradzsky M, Bindics J, Ádám É, Viczián A, Klement É, Lorrain S, Gyula P, Mérai Z, Fankhauser C, Medzihradzsky KF, Kunkel T, Schäfer E, Nagy F** (2013). Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 535–544.
- Nagano S** (2016). From photon to signal in phytochromes: similarities and differences between prokaryotic and plant phytochromes. *J Plant Res* **129**, 123–135.
- Nito K, Wong CCL, Yates III JR, Chory J** (2013). Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell Rep* **3**, 1970–1979.
- Oka Y, Matsushita T, Mochizuki N, Quail PH, Nagatani A** (2008). Mutant screen distinguishes between residues necessary for light-signal perception and signal transfer by phytochrome B. *PLoS Genet* **4**, e1000158.
- Oka Y, Matsushita T, Mochizuki N, Suzuki T, Tokutomi S, Nagatani A** (2004). Functional analysis of a 450-amino acid N-terminal fragment of phytochrome B in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2104–2116.
- Paik I, Huq E** (2019). Plant photoreceptors: multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Semin Cell Dev Biol* **92**, 114–121.
- Qiu YJ, Pasoreck EK, Reddy AK, Nagatani A, Ma WX, Chory J, Chen M** (2017). Mechanism of early light signaling by the carboxy-terminal output module of *Arabi-*

- dopsis* phytochrome B. *Nat Commun* **8**, 1905.
- Quail PH** (2002). Phytochrome photosensory signaling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 85–93.
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J** (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**, 147–157.
- Rockwell NC, Lagarias JC** (2006). The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* **18**, 4–14.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC** (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837–858.
- Ruiz-Diaz MJ, Matsusaka D, Cascales J, Sánchez DH, Sánchez-Lamas M, Cerdán PD, Botto JF** (2022). Functional analysis of PHYB polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* collected in Patagonia. *Front Plant Sci* **13**, 952214.
- Sharrock RA, Quail PH** (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* **3**, 1745–1757.
- Su YS, Lagarias JC** (2007). Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of *Arabidopsis* phytochromes in transgenic plants. *Plant Cell* **19**, 2124–2139.
- Sun W, Xu XH, Lu XB, Xie LX, Bai B, Zheng CK, Sun HW, He YN, Xie XZ** (2017). The rice phytochrome genes, *PHYA* and *PHYB*, have synergistic effects on anther development and pollen viability. *Sci Rep* **7**, 6439.
- Velázquez Escobar F, Buhre D, Fernandez Lopez M, Shenkutie SM, von Horsten S, Essen LO, Hughes J, Hildebrandt P** (2017). Structural communication between the chromophore-binding pocket and the N-terminal extension in plant phytochrome phyB. *FEBS Lett* **591**, 1258–1265.
- Viczián A, Ádám É, Staudt AM, Lambert D, Klement E, Romero Montepaone S, Hiltbrunner A, Casal J, Schärer E, Nagy F, Klose C** (2020). Differential phosphorylation of the N-terminal extension regulates phytochrome B signaling. *New Phytol* **225**, 1635–1650.
- Viczián A, Nagy F** (2024). Phytochrome B phosphorylation expanded: site-specific kinases are identified. *New Phytol* **241**, 65–72.
- Vierstra RD** (1993). Illuminating phytochrome functions (There is light at the end of the tunnel). *Plant Physiol* **103**, 679–684.
- Wagner D, Koloszar M, Quail PH** (1996). Two small spatially distinct regions of phytochrome B are required for efficient signaling rates. *Plant Cell* **8**, 859–871.
- Wagner D, Quail PH** (1995). Mutational analysis of phytochrome B identifies a small COOH-terminal-domain region critical for regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 8596–8600.
- Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, Vierstra RD** (2005). A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**, 325–331.
- Wagner JR, Zhang JR, Brunzelle JS, Vierstra RD, Forest KT** (2007). High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J Biol Chem* **282**, 12298–12309.
- Wies G, Mantese AI, Casal JJ, Maddonni GÁ** (2019). Phytochrome B enhances plant growth, biomass and grain yield in field-grown maize. *Ann Bot* **123**, 1079–1088.
- Xie XZ, Shinomura T, Inagaki N, Kiyota S, Takano M** (2007). Phytochrome-mediated inhibition of coleoptile growth in rice: age-dependency and action spectra. *Photochem Photobiol* **83**, 131–138.
- Xie XZ, Xue YJ, Zhou JJ, Zhang B, Chang H, Takano M** (2011). Phytochromes regulate SA and JA signaling pathways in rice and are required for developmentally controlled resistance to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant* **4**, 688–696.
- Xu Y, Parks BM, Short TW, Quail PH** (1995). Missense mutations define a restricted segment in the C-terminal domain of phytochrome A critical to its regulatory activity. *Plant Cell* **7**, 1433–1443.
- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A** (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* **145**, 437–445.
- Yang XJ, Kuk J, Moffat K** (2008). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14715–14720.
- Yang XJ, Kuk J, Moffat K** (2009). Conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 15639–15644.
- Zhang JR, Stankey RJ, Vierstra RD** (2013). Structure-guided engineering of plant phytochrome B with altered photochemistry and light signaling. *Plant Physiol* **161**, 1445–1457.

Zhao Y, Shi H, Pan Y, Lyu M, Yang ZX, Kou XX, Deng XW, Zhong SW (2023). Sensory circuitry controls cytosolic

calcium-mediated phytochrome B phototransduction. *Cell* **186**, 1230–1243.

Effect of Amino Acid Point Mutations on the Structure and Function of Phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*

Yanxiao Chen^{1,2}, Yaping Li², Jinjun Zhou³, Lixia Xie², Yongbin Peng², Wei Sun², Yanan He²,
Conghui Jiang², Zenglan Wang¹, Chongke Zheng^{2*}, Xianzhi Xie^{2*}

¹School of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; ²Institute of Wetland Agriculture and Ecology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; ³Institute of Crop Germplasm Resources, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

Abstract Organisms have evolved different photoreceptors to adapt to the ever-changing conditions of the external light environment. Phytochromes (phys) are one of the classic plant photoreceptors, mainly perceiving red and far-red light. Phytochromes detect red and far-red light through the light conversion between the dark-adapted Pr state and the light-activated Pfr state. All plant phytochromes have a conserved N-terminal photoreceptor region and a C-terminal regulatory region. The N-terminal includes NTE, PAS, GAF, and PHY subdomains, while C-terminal includes two PAS domains and a histidine kinase-related domain (HKRD). In order to understand how the structure of photochromes controls its function, many function-deficient photochrome derivatives and amino acid point mutants have been obtained and studied. The N-terminal domain plays important roles in the spectral properties, light signal perception and light signal transduction of phyB. The C-terminal domain is essential for dimerization and nuclear localization of photochrome. This paper mainly reviews point mutations of amino acid in various subdomains of phyB in *Arabidopsis thaliana* and their effects on the function of phyB, in order to have a better understanding of the structure and functional regulation of phyB. It lays a foundation for obtaining crops with desired agronomic characteristics through gene editing.

Key words phyB, *Arabidopsis thaliana*, domain, amino acid point mutation, function

Chen YX, Li YP, Zhou JJ, Xie LX, Peng YB, Sun W, He YN, Jiang CH, Wang ZL, Zheng CK, Xie XZ (2024). Effect of amino acid point mutations on the structure and function of phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Bull Bot* **59**, 481–494.

* Authors for correspondence. E-mail: zhengck1983@163.com; xzhxie2010@163.com

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者/团队简介

谢先芝, 山东省农业科学院湿地农业与生态研究所研究员, 博士生导师, 山东省自然科学基金获得者。长期从事水稻光信号转导研究和水稻抗逆品种培育。以通讯作者和第一作者身份在 *Nature Communications*、*New Phytologist* 和 *National Science Review* 等国内外权威学术期刊发表研究论文 90 余篇。目前其研究团队利用遗传学、基因组学、发育生物学等手段在水稻光信号转导机制解析和水稻抗逆功能基因挖掘等方面取得重要成果, 完善了水稻光信号转导网络, 并为水稻新品种培育提供了基因资源。