

# Calcineurin B-Like Proteins and Their Interacting Protein Kinases

Qing Shen, Wanli Guo, Lixi Jiang

College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou  
Email: [jianglx@zju.edu.cn](mailto:jianglx@zju.edu.cn)

Received: May 9th, 2012; revised: May 20th, 2012; accepted: Jun. 10th, 2012

**Abstract:** Calcium is a critical messenger in several biological processes. Cellular calcium signals are detected and transmitted by  $\text{Ca}^{2+}$  sensor such as calcium-binding proteins. Calcineurin B-Like protein (CBL) family represents a group of such calcium sensors and plays a key role in decoding calcium signals by specifically interacting with and regulating a family of protein kinases CIPKs (for CBL-interacting protein kinases). Many researches have revealed that several CBL proteins and CIPKs are important components of abiotic stress responses and ion transport processes. Here, we discuss structures and functions of CBLs and CIPKs and how specific  $\text{Ca}^{2+}$  signal responds are realized.

**Keywords:** CBL; CIPK

## 类钙调神经磷酸酶 B 亚基蛋白 CBL 和它们的作用激酶蛋白 CIPK

沈 清, 郭万里, 蒋立希

浙江大学农业生物技术学院, 杭州  
Email: [jianglx@zju.edu.cn](mailto:jianglx@zju.edu.cn)

收稿日期: 2012 年 5 月 9 日; 修回日期: 2012 年 5 月 20 日; 录用日期: 2012 年 6 月 10 日

**摘 要:**  $\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使介导大量的信号传递, 在许多生命过程中发挥重要的作用。 $\text{Ca}^{2+}$  信号通过  $\text{Ca}^{2+}$  感受器即  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白来解码并传递。类钙调磷酸酶 B 蛋白 CBL(Calcineurin B-Like Protein)便是其中一类  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白。通过与其特定的激酶蛋白 CIPK(CBL-Interacting Protein Kinase)作用, 在  $\text{Ca}^{2+}$  信号传导通路, 尤其是一些逆境信号传导通路中发挥重要作用。本文主要围绕 CBL 和它们的作用蛋白 CIPK, 在其结构、功能以及它们如何对信号做出不同反应的机制上对一些已经得到的共识和最新获得的成果进行概述。

**关键词:** CBL; CIPK

### 1. 引言

植物细胞通过  $\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使介导大量的信号传递, 是信号传导网络的核心元件。细胞质内不同时间、空间的游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化调控着植物的生长发育过程, 如花粉管和根毛的发育<sup>[1]</sup>。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的另一个重要功能是对生物和非生物胁迫产生应激反

应<sup>[2]</sup>, 如胁迫下气孔的孔径变化、共生作用、光作用等。在这些信号传导过程中,  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白( $\text{Ca}^{2+}$ -Binding Proteins)起到了关键的信号传递作用, 其时空表达模式、亚细胞定位和与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的亲和力决定了信号传导途径不同的和植物对特定逆境信号的特殊反应。 $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白(也可称之为  $\text{Ca}^{2+}$  感受器)主要包括 3 大

类：钙离子依靠蛋白激酶 CDPK(Calcium Dependent Protein Kinase)、钙调蛋白 CaM(Calmodulin)和类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 CBL(Calcineurin B-Like Protein)。CDPK 是一类特殊的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白，它同时包含  $\text{Ca}^{2+}$  结合域和反应器——类蛋白激酶结构。而 CaM 和 CBL 则只拥有  $\text{Ca}^{2+}$  感受器，所以他们需要和其他信号传导构件相作用来完成  $\text{Ca}^{2+}$  信号的传导。CaM 是  $\text{Ca}^{2+}$  信号传导途径中发现较早，研究比较成熟的  $\text{Ca}^{2+}$  感受器，它通过与各种信号传导构件广泛作用来传导  $\text{Ca}^{2+}$  信号。这些传导构件包括转录因子、生理代谢所需各类酶、细胞结构蛋白等。CBL 则是最新发现的一类  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白，因为与动物的钙调磷酸酶蛋白的 B 亚基非常类似而得名<sup>[3,4]</sup>。与 CaM 不同的是 CBL 主要与一类丝/苏氨酸蛋白激酶 CIPKs 相互作用进行  $\text{Ca}^{2+}$  信号的传导。以前认为 CBL 只与 CIPK 作用传导  $\text{Ca}^{2+}$  信号，但最新的发现表明拟南芥 CBL3 也与新的蛋白 AtMTAN (5'-Methylthioadenosine Nucleosidase) 相互作用<sup>[5]</sup>。本文主要围绕 CBL 和它们的作用蛋白 CIPK，在它们的结构、功能以及它们如何对信号做出不同的反应的机制上对一些已经得到的共识和最新取得的成果进行概述。

## 2. CBL 和 CIPK 蛋白的结构

CBL 家族在水稻和拟南芥中分别含有 10 个基因<sup>[6,7]</sup>，所有的 CBL 蛋白都含有保守的  $\text{Ca}^{2+}$  结合结构域 EF(Elongation Factor)手型结构<sup>[7]</sup>。EF 手型结构是一种螺旋-环-螺旋的结构模式，其中环为主要的钙离子结合结构。通过控制环的大小 EF 手型结构可以特异性的结合钙离子。典型的 EF 手型结构中环的部分包含 12 个氨基酸，它利用第 1、3、5、7、9 和 12 位上的氨基酸与钙离子作用。这其中第 1 位上的 Asp，第 6 位上的 Gly 和第 12 位上的 Glu 是所有氨基酸中最保守的，体现了它们在结构和钙离子结合功能上的重要作用，如 Gly 能够维持环结构的稳定性，该功能不能为其他任何氨基酸所替代<sup>[8]</sup>。CBL 蛋白家族各个蛋白都拥有 4 个 EF 手型结构，但拥有的典型完整 EF 手型结构的数量却表现出很大的差异。CBL1 和 CBL9 具有两个典型完整的 EF 手型结构，CBL6、CBL67、CBL610 只有一个，而剩下的成员(在拟南芥中)则一个也没有<sup>[8]</sup>。并且很多 EF 手型结构第 12 个氨基酸位点上发生

了氨基酸的替换，从而影响了它们与钙离子的结合。这些典型完整的 EF 手型结构的数量和结构上的差异在一定程度上表现出了不同 CBL 蛋白对钙离子的亲和程度不同。根据 N 末端结构域的不同，可以把 CBL 家族分为两个主要的大类：第一类包括 CBL1，CBL4，CBL5，CBL8 和 CBL9，他们具有短的(43~48 个氨基酸)N 末端，同时该端具有脂肪修饰位点，但在 CBL8 中退化。脂肪修饰位点对 CBL 的亚细胞定位非常重要，如 CBL4 末端脂肪修饰位点的豆蔻酰化可以帮助其定位于细胞膜<sup>[8]</sup>；第二类包括 CBL2，CBL3，CBL6，CBL7 和 CBL10，这类蛋白具有长的 N 末端域，该结构域类似  $\text{K}^+$ 通道结合蛋白域( $\text{K}^+$ -Channel Interacting Proteins (KCIP))，并且没有脂肪修饰位点<sup>[9-11]</sup>。

通过与钙离子绑定，CBL 发生了构象的转变，从而促进了它与 CIPK 的作用，但是具体机制还不是很清楚。已经发现的与 CBL 相近的 CaM 的构象转变，可以给我们一些启示。在没有绑定钙离子时，CaM 呈现出一个封闭的构象。钙离子的结合则启动了 CaM 构象的转变，使得 CaM 呈现出一个开放的状态，两边各由一对 EF 手型结构组成的球型结构呈现出近  $90^\circ$  的夹角。开放的构象暴露出大面积的疏水表面，从而为后面的目标作用蛋白提供了作用点<sup>[12]</sup>。

CIPK 家族在拟南芥含有 25 个基因。CIPK 蛋白由两部分组成：激酶结构域(又称催化结构域)和 C 端相对较不保守的调节结构域。两者被一段连接结构连接。在调节结构域中有一段保守的 NAF 结构域(根据其最显著的 3 个氨基酸 N，A 和 F 命名)，它是 CBL 的结合位点，同时对激酶结构域中的活性环结构起到自抑制的作用。CBL 在 NAF 部位的结合解除了 NAF 对活性环结构的抑制作用，启动了该结构的自磷酸化从而激活 CIPK 的活性<sup>[8]</sup>。

## 3. CBL 和 CIPK 蛋白的功能

众所周知，蛋白的表达模式以及亚细胞定位在一定程度上暗示着该蛋白可能的功能。通过对 CBL 蛋白进行定位，发现他们主要定位在细胞膜和液泡膜上。考虑到这两大膜系统充当着两大钙离子库(细胞外钙离子和液泡内钙离子)的边界，这个现象正好印证了 CBL 在钙离子信号传导中充当着信号感受器的作用。

对 CBL 蛋白功能最早的报道为对拟南芥高盐逆境的研究。在该研究中，工作者发现了对盐浓度高度

敏感(Salt Overly Sensitive)的突变体 *sos1*、*sos2* 和 *sos3*。进一步的研究揭示了 CBL/CIPK 在其中的作用。现在的研究成果认为拟南芥中 CBL4(*sos3*)与 CIPK24 (*sos2*) 在质膜上相互作用, 激活  $H^+/Na^+$  交换体(*sos1*), 从而从细胞内泵出有毒的/过量的钠离子<sup>[13-15]</sup>, 而液泡膜定位的 CBL10 与 CIPK24 相互作用的结果与 CBL4 的一致<sup>[11]</sup>。最近报道在大麦的研究上也发现了 CBL4 参与到对盐逆境的调节过程中的类似现象<sup>[16]</sup>。

对 CBL1 的研究则发现 CBL1 通过调节逆境相关转录因子的表达从而表现出对干旱、高盐和低温的耐受性<sup>[17]</sup>。另外, 对水稻 CBL8 的研究同样发现 CBL8 响应了干旱和盐胁迫<sup>[18]</sup>。通过低温处理水稻, 研究人员发现 CBL2 的表达量异常增高, 进一步的亚细胞定位发现 CBL2 主要定位于液泡膜, 从而揭示出了 CBL2 在糊粉层细胞液泡化过程中发挥的重要作用<sup>[19]</sup>。此外研究人员发现 CBL9 通过与 CIPK3 的结合来调节 ABA 在种子萌发的中作用<sup>[20]</sup>。CBL9 和 CBL1 与 CIPK1 的作用则形成了依赖和非依赖 ABA 的反应体系, 主要响应干旱、冷和盐<sup>[1]</sup>。最新的发现表明拟南芥 CBL3 与新的蛋白 AtMTAN(5'-Methylthioadenosine Nucleosidase)相互作用调控乙烯或多胺的生物合成, 从而调控植物生长发育和环境胁迫响应<sup>[5]</sup>。

这些功能在一定程度上说明了 CBL 蛋白以及其作用蛋白 CIPK 在钙离子信号传导尤其是逆境信号传导中的重要性。

#### 4. 信号特异性的实现

如引言中所述, 很多植物体内的生理生化反应以及对体外生物、非生物的应激都是通过钙离子信号来传导的。把目光聚焦在 CBL-CIPK 体系上, 我们依然可以发现细胞对体内、外信号做出的形形色色的生理生化反应。但问题是, 细胞是如何从及其相近的细胞质游离钙离子浓度变化中提取出不同的信号从而做出不同而又特异的反应的呢? 这里列举了本人比较认可的几种解释。

首先, 钙离子信号本身具有特异性。钙离子信号并不仅仅只有钙离子浓度的变化, 还包含着时间和空间的信息<sup>[6]</sup>, 如细胞质游离钙离子浓度增高的频率、持续时间以及亚细胞位点等信息<sup>[1]</sup>。细胞的膜系统从另一方面促进了钙离子信号的复杂化, 如钙离子通过

细胞内膜和细胞质膜的速率可以作为一个特殊的信息参量<sup>[1]</sup>。

其次, CBL 和 CIPK 的时空表达, 亚细胞定位和 CBL 对钙离子的亲和性从另一个方面解释了钙离子信号的特异性。正如上文结构部分所述, 不同的 CBL 家族成员对钙离子的亲和性不同。此外在不同生长发育时期, 不同的组织、细胞、亚细胞结构内某个 CBL 蛋白的表达量多少可以在很大程度上决定钙离子信号的传导途径的选择, 从而做出截然不同的生理生化反应<sup>[6,8]</sup>。该原理对于 CIPK 一样适用。

另外, CBL 本身以及其对 CIPK 的选择性和亲和性也在一定程度上决定了信号的特异性<sup>[6]</sup>。CBL 通过和 CIPK 结合传导钙离子信号。但是不同的 CBL 蛋白对作用的 CIPK 激酶蛋白具有选择性, 并且表现出不同的亲和性, 这在一个方面为钙离子信号的特异性提供了可能。此外在 CBL-CIPK 结合体中, CBL 发挥着重要的信号传导路径选择作用。如上文所述 CBL1 和 CBL9 两个蛋白都可以和 CIPK1 结合, 当 CIPK1 和 CBL1 结合时, 该结合体能够引起细胞对高盐的抵抗力。当 CIPK1 和 CBL9 结合时, 该结合体能够对 ABA 的反应发挥作用<sup>[1]</sup>。

#### 5. 展望

随着全球气候的异常变化, 世界范围的粮食作物因为逆境因素(如干旱、冻害、盐渍、酸性土壤等)而减产或绝收, 直接影响到人们的生活及其它方面。在此背景下, 植物抗逆, 特别是作物的抗逆研究和抗逆育种显得尤为重要。现代分子生物学技术的迅速发展, 促使人们摆脱费力耗时的传统育种方式, 进而通过转基因等遗传手段大量地改造现有农作物, 以期在短时间内获得抗逆、优质、高产、环保的农作物新品种。正如本文 CBL 和 CIPK 蛋白的功能部分所述, 许多 CBL 家族蛋白通过与他们特定的激酶蛋白相互作用可以在植物抗旱、冷、高盐等方面发挥作用, 从而在分子抗逆育种上表现出极大地潜力。不过对这些资源的研究总体上还处于传统生理学研究和传统的作物育种领域, 与发掘和利用这些资源的要求差距甚远。相信通过对它们的环境胁迫耐性等位基因的克隆, 抗逆机理研究和通过转基因手段跨物种利用的研究将更好的推进对 CBL 和 CIPK 的认识和利用。

## 参考文献 (References)

- [1] A. N. Dodd, J. Kudla and D. Sanders. The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 593-620.
- [2] P. J. White, M. R. Broadley. Calcium in plants. *Annals of Botany*, 2003, 92(4): 487-511.
- [3] Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10(8): 1391-1406.
- [4] J. Kudla, Q. Xu, K. Harter, et al. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1999, 96(8): 4718-4723.
- [5] S.-I. Oh, J. Y. Park, S. H. Yoon, et al. The *Arabidopsis* calcium sensor calcineurin B-like 3 inhibits the 5'-methylthioadenosine nucleosidase in a calcium-dependent manner. *Plant Physiology*, 2008, 148(4): 1883-1896.
- [6] S. Luan, J. Kudla, M. Rodriguez-Concepcion, et al. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: S389-S400.
- [7] U. Kolukisaoglu, S. Weinl, D. Blazevic, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 43-58.
- [8] O. Batistič, J. Kudla. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1793(6): 985-992.
- [9] M. Ishitani, J. Liu, U. Halfter, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 2000, 12: 1667-1678.
- [10] O. Batistic, N. Sorek, S. Schultke, et al. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20: 1346-1362.
- [11] B. G. Kim, R. Waadt, Y. H. Cheong, et al. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion. *The Plant Journal*, 2007, 52(3): 473-484.
- [12] S. Luan, J. Kudla, M. Rodriguez-Concepcion, et al. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *The Plant Cell*, 2002, 14, 389-400.
- [13] U. Halfter, M. Ishitani and J. K. Zhu. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2000, 97(7): 3735-3740.
- [14] Q. S. Qiu, Y. Guo, M. A. Dietrich, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2002, 99(12): 8436-8441.
- [15] F. J. Quintero, M. Ohta, H. Shi, et al. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2002, 99(13): 9061-9066.
- [16] J. Rivandi, J. Miyazaki, M. Hrmova, et al. A *sos3* homologue maps to HvNax4, a barley locus controlling an environmentally sensitive Na<sup>+</sup> exclusion trait. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 62(3): 1201-1216.
- [17] V. Albrecht, S. Weinl, D. Blazevic, et al. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 2003, 36(4): 457-470.
- [18] B. J. Ma, Z. Gu, H. J. Tang, et al. Preliminary study on function of calcineurin B-like protein gene OsCBL8 in rice. *Rice Science*, 2010, 17(1): 10-18.
- [19] Y. Hwang, C. B. Paul, Y. H. Cheong, et al. A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function. *Plant Physiology*, 2005, 138(3): 1347-1358.
- [20] K. P. Girdhar, J. J. Grant, Y. H. Cheong, et al. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Molecular Plant*, 2008, 1(2): 238-248.