# 抑制关键衰老调节因子EPHEMERAL1延长日本牵牛花花瓣寿命的化学途径

开花植物的花瓣寿命在不同物种间具有不同特性，并且与繁殖策略密切相关，它是吸引传粉者的重要因素。花瓣衰老，作为一种细胞程序性死亡（PCD），收到多种因素调节。在花瓣衰老期间，PCD相关基因被诱导，细胞组分开始降解，营养物质从衰老的花瓣重新动员到发育中的组织如子房中。在园艺植物中，花寿命是一个重要的性状，决定了观赏植物的商业价值，因此需要技术来延长它。日本牵牛及其近缘物种因其短暂的花朵寿命而被用作研究花衰老的模式物种，因为它们对衰老有严格的控制和明显的PCD症状，包括类似自噬的过程。近日日本爱媛大学Tatsuya Sawasaki 课题组在Nature Plant期刊上发表了题为“A chemical approach to extend flower longevity of Japanese morning glory via inhibition of master senescence regulator EPHEMERAL1”的论文。研究人员采用了一种新的化学方法，通过抑制EPH1的DNA结合活性来延缓日本牵牛的花瓣衰老。



EPHEMERAL1（EPH1）是一个NAM/ATAF1,2/CUC2（NAC）转录因子（TF），在I. nil花瓣衰老期间的PCD调节中起着至关重要的作用。抑制EPH1显著延缓了花瓣衰老，花瓣凋萎的时间在EPH1敲低转基因植物中大约翻了一番。为了筛选EPH1的抑制剂，使用基于小麦细胞自由系统和AlphaScreen技术的高通量检测系统来检测I. nil EPH1与其靶DNA之间的直接结合。通过无细胞系统合成了带有C端AGIA标签的重组全长EPH1蛋白。通过免疫印迹分析确定了总翻译混合物和上清液中的EPH1蛋白水平，表明重组全长EPH1以可溶形式合成。接下来，为了设计筛选系统，鉴定了EPH1蛋白结合的合适DNA序列。在EPH1敲低转基因植物中，几个PCD相关基因被下调。其中液泡加工酶（InVPE）基因的调控区域发现了NAC TF结合位点的共识序列。使用重组AGIA标签全长EPH1和生物素标记的目标VPE DNA（VPE）或VPE DNA突变体（mVPE）进行相互作用分析。通过EPH1与VPE DNA（EPH1–VPE）之间的相互作用获得了高AlphaScreen信号，而突变DNA（EPH1–mVPE）产生的信号非常低，与阴性对照（二氢叶酸还原酶（DHFR）–VPE）相当。这些结果表明EPH1与VPE DNA（TTGCGTATA）相互作用，该系统可以检测特定DNA序列与EPH1蛋白之间的相互作用。



图1 建立高通量检测EPH1-DNA相互作用的方法并筛选EPH1抑制剂通过高通量筛选，研究人员从9600种化合物中鉴定出106种潜在的EPH1–DNA相互作用抑制剂。进一步的验证筛选排除了可能干扰AlphaScreen系统的化合物，最终选出三种化合物（G1-1, G2-1, 和 G3-1），它们能在10微摩尔浓度下抑制EPH1与DNA的结合。



图2 候选化合物的模拟筛选研究人员进一步对选出的化合物进行了模拟化合物筛选。他们从Drug Discovery Initiative的化学库中筛选了这些化合物的模拟物，发现其中一些模拟物在低浓度下就能显著抑制EPH1的DNA结合活性。特别是G1-1的模拟物，它们共享四氟邻苯二甲酰亚胺骨架，且氟原子的存在对抑制活性至关重要。



图3 Everlastin1和Everlastin2对EPH1的DNA相互作用和二聚化的影响
进一步将G1-21和G1-31分别命名为Everlastin1和Everlastin2，并进一步验证了它们对EPH1-DNA相互作用的抑制效果。通过一系列生物化学和生物学实验，包括体外DNA结合实验、体内ChIP-qPCR分析和花瓣衰老实验，证实了Everlastin1和Everlastin2能够有效抑制EPH1的DNA结合活性，并延缓花瓣的衰老过程。研究人员发现Everlastin1和Everlastin2能够抑制EPH1的二聚化，这是EPH1与DNA结合所必需的。这些化合物主要通过影响EPH1的C端转录调控域来发挥作用，而不是其N端的DNA结合域。此外，这些化合物还能抑制EPH1与其他DNA序列的结合，表明它们具有广泛的抑制作用。
为了分析Everlastin1和Everlastin2对花瓣衰老的生物学效应，分别使用它们处理I. nil的花瓣。结果表明Everlastin1和Everlastin2能够显著延迟日本牵牛花瓣的衰老。这些化合物处理的花瓣显示出水渍减少、细胞死亡延迟、蛋白质含量下降速度减缓以及DNA降解延迟。此外，这些化合物还抑制了与衰老相关基因及自噬相关基因表达。



图4 Everlastin1和Everlastin2对花瓣衰老的影响

综上所述，本研究成功鉴定了能够通过抑制EPH1的DNA结合活性来延长花瓣寿命的新型化学化合物。这些化合物通过抑制EPH1的二聚化来发挥作用，不仅影响了EPH1与其已知靶基因的结合，还可能影响了其他未知的靶基因。这些发现为开发新的花卉保鲜技术提供了可能，同时也为研究花瓣衰老的分子机制提供了新的视角。此外，这种无细胞药物筛选系统为未来发现针对其他转录因子的抑制剂提供了一个有力的工具。

原文链接：

https://www.nature.com/articles/s41477-024-01767-z?utm\_source=xmol&utm\_medium=affiliate&utm\_content=meta&utm\_campaign=DDCN\_1\_GL01\_metadata