

植物蛋白 O-GlcNAc 糖基化及生物学功能*

贾晓晨^{1,2)} 尹恒^{1)**}

(¹⁾ 辽宁省碳水化合物研究重点实验室, 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023; ²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

通讯作者简介

尹恒, 博士, 中国科学院大连化学物理研究所研究员、博士生导师、研究组组长。主要在糖工程与植物糖生物学领域开展研究工作, 代表性工作如下: 研发获得了系列多糖降解酶, 酶法制备得到系列寡糖, 开发了多种糖基农产品; 研究植物糖基化过程的基础糖生物学问题; 研究寡糖激活植物免疫诱导植物抗病的作用机制。累计主持国家重点研发计划课题、国家自然科学基金等 10 余项课题。主编外文专著一部, 参与编著中文著作三部 (副主编一部), 发表论文 70 余篇。现为中国科学院青年创新促进会会员、中国生物工程学会糖生物工程专业委员会委员、中国生物化学与分子生物学会糖复合物专业委员会委员、全国农药标准化技术委员会生物农药分技术委员会委员。

摘要 蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化现象发现迄今已有 30 多年历史。动物中, O-GlcNAc 糖基化在调控细胞信号转导、基因转录、表观遗传和新陈代谢等方面发挥重要作用。而植物中, O-GlcNAc 糖基化在近几年才得到关注并进行初步研究。本文对植物中 O-GlcNAc 修饰的糖供体合成途径、O-GlcNAc 修饰关键酶、O-GlcNAc 修饰蛋白的检测及功能等方面的研究工作进行归纳总结, 发现 O-GlcNAc 糖基化在植物的生长发育、激素网络调控、信号转导、植物病毒侵染等过程均发挥重要作用, 为进一步研究植物中 O-GlcNAc 糖基化的生物学功能提供参考。

关键词 O-GlcNAc 糖基化, 己糖胺途径, SPINDLY, SECRET AGENT, O-GlcNAc 修饰蛋白

学科分类号 Q94, Q51

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0303

蛋白质糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式, 在复杂的生命活动中扮演重要角色。常见的糖基化, 如糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)- 锚定修饰、N- 糖基化和 O- 糖基化, 蛋白质一般会被修饰上结构复杂的糖链^[1-2]。然而, 生物体中还存在着一种常见但比较特殊的糖基化, 它与上述糖基化不同, 仅在蛋白质上修饰一个单糖即 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc) (图 1)^[3]。在此修饰中, GlcNAc 通过 O- 糖苷键连接到蛋白的丝氨酸或苏氨酸(Ser/Thr)上, 因此被称为 O-GlcNAc 糖基化。

O-GlcNAc 糖基化现象在 1984 年由美国约翰霍普金斯大学 G. W. Hart 教授等^[5]最先发现, 由于该种糖基化的独特性及重要性, 从发现至今, 一直是糖生物学的研究热点。到目前为止, 已经鉴定出 1 000 余种 O-GlcNAc 修饰的蛋白, 这些蛋白广

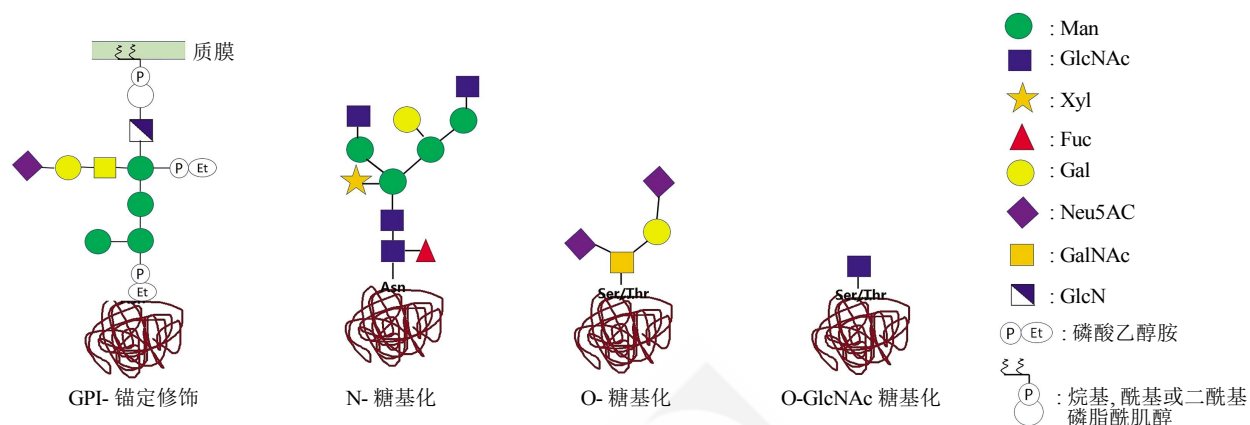
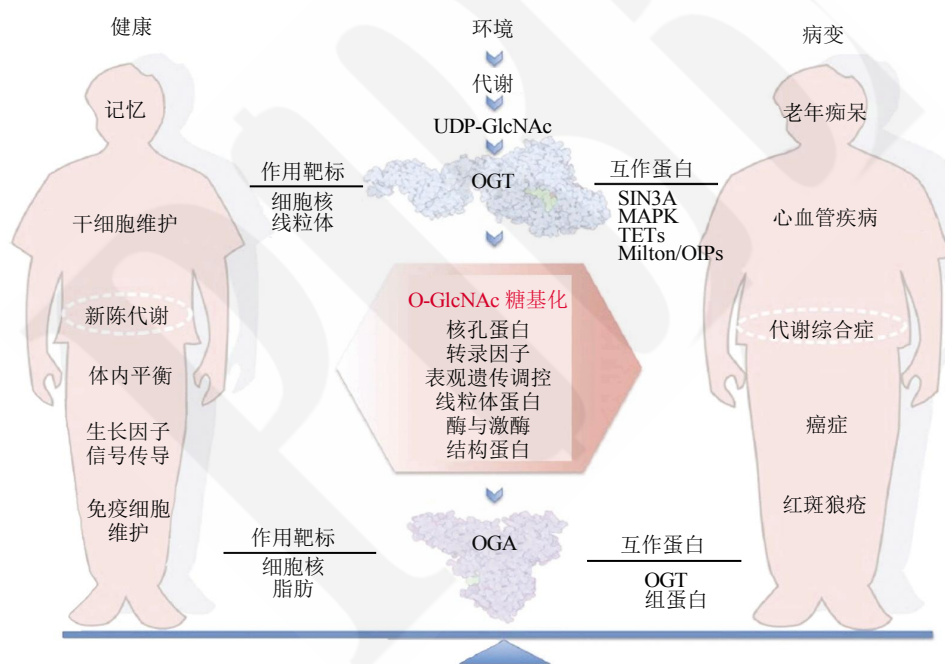
泛存在于细胞核和细胞质中, 包括转录因子、核蛋白、激酶、以及信号转导和新陈代谢等过程的关键蛋白^[3]。研究表明 O-GlcNAc 糖基化对蛋白质的结构、细胞定位和功能都有重要影响, O-GlcNAc 修饰的状态和水平影响及调控细胞的生理活动。因此, 在人体中 O-GlcNAc 糖基化蛋白广泛参与到人的记忆、代谢和免疫等生理过程, 并且人体多种疾病的发生发展都与 O-GlcNAc 修饰水平的异常密切相关, 如癌症、老年痴呆、心血管疾病、糖尿病等 (图 2)^[6]。

* 国家自然科学基金(31370811, 31672077), 中国科学院 STS 项目(KFJ-SW-ST5-143), 中国科学院青促会(2015144)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0411-84379061, E-mail: yinhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2017-07-23, 接受日期: 2017-09-20

Fig. 1 The universal types of protein glycosylation^[2, 4]图 1 蛋白质糖基化常见形式^[2, 4]Fig. 2 O-GlcNAcylation impact biological homeostasis and disease pathologies in human^[6]图 2 O-GlcNAc 糖基化影响人体的生理活动和疾病的发生发展^[6]

与动物中所取得的进展相比, 植物中 O-GlcNAc 糖基化的研究远远落后, 但近年来已有研究者关注此方面并开展了相关工作. 对这些研究工作加以了解认识, 有助于揭示植物中 O-GlcNAc 修饰的生物学功能, 进而明确这个重要的蛋白质翻译后修饰现象对植物生理活动的影响. 因此, 本文针对 O-GlcNAc 修饰的糖供体合成途径、O-GlcNAc 修饰过程的关键酶以及植物 O-GlcNAc 修饰蛋白的鉴定及功能等方面的研究现状进行了概述.

1 植物 O-GlcNAc 修饰糖供体途径——己糖胺途径

由于 O-GlcNAc 糖基化仅是一个单糖基修饰, 所以其修饰过程的唯一糖供体就是尿苷二磷酸 - GlcNAc(uridine diphosphate-GlcNAc, UDP-GlcNAc). 在生物体内, 合成 UDP-GlcNAc 的主要途径是己糖胺途径 (hexosamine biosynthesis pathway, HBP). HBP 途径是糖酵解途径的分支, 只占生物

体内葡萄糖代谢的 2%~5%^[7]。在真核生物中, HBP 途径由 4 个特异性的酶催化: 首先果糖 -6- 磷酸(fructose-6-phosphate, Fru-6-P)在葡萄糖胺 -6- 磷酸(glucosamine-6-P, GlcN-6-P)合成酶(glutamine: fructose-6-P amidotransferase, GFAT)的作用下生成 GlcN-6-P; 第二步在 GlcN-6-P 乙酰转移酶(GlcN-6-P acetyltransferase, GNA)的催化下乙酰化为乙酰葡萄糖胺 -6- 磷酸(GlcNAc-6-P); 第三步是由乙酰葡萄糖胺磷酸变位酶(N-acetylglucosamine-phosphate mutase, AGM)催化转变为乙酰葡萄糖胺 -1- 磷酸 GlcNAc-1-P; 最后由焦磷酸化酶(UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, UAP)催化合成 UDP-GlcNAc (图 3)^[7-8]。

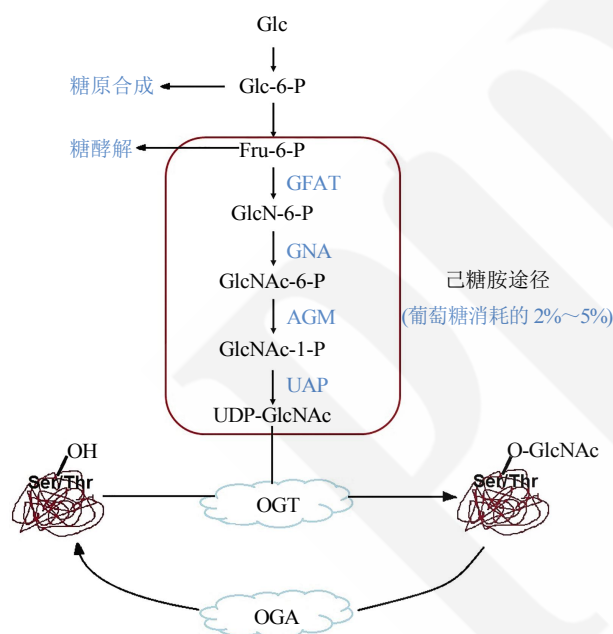


Fig. 3 The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation pathway

图 3 己糖胺途径和 O-GlcNAc 糖基化修饰途径

Glc: 葡萄糖 (glucose), Fru-6-P: 果糖 -6-P (fructose-6-phosphate), GlcN-6-P: 葡萄糖胺 -6-P (glucosamine-6-phosphate), GlcNAc-6-P: N-乙酰葡萄糖胺 -6-P (n-acetylglucosamine-6-phosphate).

HBP 途径相关酶的鉴定及研究工作在 1977 年就已经开始, 目前在酵母、线虫、哺乳动物等真核生物, 及结核分枝杆菌、大肠杆菌等原核生物中均已阐明途径, 在酶催化机理及应用方面也取得了较好进展^[7-9]。但是在植物中, HBP 途径的研究要远远落后于其他生物, 至今 HBP 途径酶的鉴定工作尚未完成, 功能研究更少。

目前仅有的几篇文章报道 HBP 在植物的逆

境胁迫、配子形成、胚胎发育过程中可发挥重要作用^[10-12]。开展对 O-GlcNAc 修饰糖供体合成途径的研究, 对于研究 O-GlcNAc 修饰的调控机制及生物学功能, 具有重要意义。

2 植物 O-GlcNAc 修饰关键酶——O-GlcNAc 转移酶 OGT

O-GlcNAc 修饰过程只有 2 种酶参与, 分别是 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(O-GlcNAc transferases, OGT)和 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(O-GlcNAcases, OGA)(图 3)^[3, 13]。OGT 催化唯一的糖供体 UDP-GlcNAc 与蛋白质的 Ser/Thr 相连接, 形成糖苷键, OGA 则使单糖从 Ser/Thr 上移除。O-GlcNAc 糖基化修饰过程简单迅速, 是一种可诱导的、可逆的、动态的翻译后修饰。因此 O-GlcNAc 修饰可以作为对环境刺激的一种应答反应, 通过瞬时的糖基化或去糖基化调节复杂的细胞活动, 这也是其具有重要生物学功能的根本原因^[3]。

OGT 和 OGA 作为 O-GlcNAc 修饰过程的关键酶, 一直是糖生物学的研究焦点。但到目前为止, 植物中的 OGA 仍未被鉴定出来。有研究发现, 一种 OGA 的抑制剂 PUGNAc 可以调节冬小麦的 O-GlcNAc 修饰水平^[14]。说明植物中 OGA 类似蛋白确实是存在的, 但是它的鉴定及功能研究仍需要大量的工作。

植物 OGT 的研究相对较深入, 因为在不同生物体中 OGT 序列高度保守^[15-16]。不同生物来源的 OGT 具有类似的结构域组成, 均是由氨基端(N 端)的细胞定位信号肽、三角四肽重复序列 TPRs(34 个氨基酸组成)、连接区域和羧基端(C 端)催化域 4 个基本结构域组成。OGT 根据其催化域序列构建的系统进化树主要有两大进化分支, 分别是 SPINDLY 类(SPY-like)和 SECRET AGENT 类(SEC-like)^[17]。动物中只有一个 OGT, 属于 SEC-like; 而在所有的高等光合植物中, 均含有 2 个 OGT, 分别是 SPY 与 SEC。这一结论在拟南芥^[18-19]和水稻^[20]中均已证实, 同时在很多高等植物的基因组中找到了类似基因^[15, 21]。

2.1 SPY 与 SEC 在植物生长发育中的功能

植物中 O-GlcNAc 修饰现象的研究起始于赤霉素(GA)响应途径中关键元件的鉴定工作。1996 年, SPY 被鉴定为 GA 信号途径的一个负调控因子, 并于 1999 年被美国明尼苏达大学尼尔实验室确认具有 O-GlcNAc 转移酶功能^[22-23]。研究发现, SPY 的

缺失型拟南芥突变体(spy)虽然表现出较严重的生长缺陷,但是植株仍然能够生长发育、开花结子,这与动物中 OGT 缺失直接致死不同.并且 spy 突变体中蛋白的 O-GlcNAc 修饰水平只是降低而不是消失,所以推测拟南芥中还具有另外一个相同功能的基因.

2002 年,尼尔实验室发现了植物中的另外一个 OGT-SEC^[18].随后 SPY 与 SEC 的生物学功能研究逐步开展,其在植物生长发育过程中的功能被不断揭示. SEC 与 SPY 双缺失突变株(sec spy)在胚胎发育初期致死,而单缺失突变株(sec 或 spy)在胚胎发育过程中并没有明显的缺陷.所以推测两者在配子体和种子发育过程中的部分功能是重叠的,一个基因的存在就可以维持胚胎发育的正常进行^[18].

2004 年,尼尔实验室发现 SPY 可以与 GIGANTEA (GI) 蛋白发生互作,参与到光诱导开花时间和生物周期的调控过程中^[24].然而与 spy 不同, sec 在开花时间、生物周期调控过程中并没有表现出明显的缺陷^[25].后续研究发现, SEC 与 SPY 在拟南芥的根、茎、叶、花、种子等各个组织器官中均有表达,并且单基因的缺失突变体中另外一个基因的表达量就会升高,说明两者在植物发育过程中也具有一些功能重叠^[25].但是与 spy 较严重的生长缺陷相比, sec 仅表现出叶子生长速度较为缓慢,出现植株半矮化等轻微生长缺陷^[26]. spy 比 sec 表现出更严重的生长缺陷,表明 SPY 介导的途径在植物的生长发育过程中发挥更为重要的作用.

综上所述,虽然 SEC 与 SPY 均具有 O-GlcNAc 转移酶功能,两者的生物学功能也存在一定的重合性,但是并不完全相同,上述结果揭示 SEC 与 SPY 可能分别调控两个不同的生物过程,这一推论在之后的多个研究中也得到证实,特别是 SEC 与 SPY 在植物激素信号途径中扮演角色的明确.

2.2 SEC 与 SPY 在 GA 信号途径中的作用

GA 在植物的种子萌发、营养生长、开花结子等过程中均起到关键作用. GA 不足的突变体表现出植株矮小、雄性不育等性状,而将突变体中 SPY 缺失抑制以后, GA 不足带来的表型明显得到缓解.此外,大部分 spy 突变体的表型与 GA 途径激活的拟南芥表型一致^[9].基于以上现象及进一步实验证实, SPY 是 GA 信号转导过程的一个负调控因子^[22].

2001 年,研究发现 SPY 的 TPRs 域会与其他蛋白质互作进而激活 GA 通路^[27].随后发现 SPY

中 TPRs 连同位于 C 端的催化域均发挥重要作用,说明除了蛋白质互作之外, SPY 的 OGT 功能在 GA 信号转导过程也发挥功能^[28-29].此外, SPY 还作为一种正调控因子参与细胞分裂素信号转导过程^[30-31].除在拟南芥的研究证据外,日本名古屋大学 Shimada 等^[20]发现 OsSPY 在水稻中也是作为 GA 途径负调控因子存在的,并且参与到油菜类固醇的合成调控过程.

基于之前的研究成果及更多的实验数据,波兰科学院 Sarnowska 等^[30]提出了 SPY 调控激素信号的假说模型.如图 4 所示, SPY 可以与染色质重塑复合体 SWI/SNF 发生互作,进而诱导相关激素应答基因的表达,也可以促进 SWI/SNF 与植物中的主生长抑制因子 DELLA 蛋白的互作,从而影响了植物中的整个激素信号网络^[31].但是此模型只能解释 SPY 的 TPRs 域介导的蛋白互作在调控激素信号方面的作用机制,而对于 SPY 的 O-GlcNAc 转移酶功能是如何参与到植物激素调节过程并没有给出明确的机理解释,甚至 SPY 修饰的关键蛋白目前仍不明确.因此, SPY 参与调控植物激素信号网络的机制仍需要大量的工作加以揭示.

SEC 与植物激素关联的直接证据则直到 2012 年才出现.研究发现, SEC 可以与细胞分裂素信号途径关键的转录因子 TCP14 和 TCP15 发生互作,并且可以对两者进行 O-GlcNAc 修饰.随后研究表明,除了 TCP14、15,其他的一些转录因子 TCP2、8、19、23 与 24 均可以被 SEC 催化进行 O-GlcNAc 修饰,说明 SEC 确实参与到植物激素信号调控网络中^[32].

2016 年,尼尔实验室再次发现 SEC 可以修饰主生长抑制因子 DELLA 进而调控拟南芥中多种激素信号途径. DELLA 蛋白家族由 5 种转录调节因子组成,它作为植物中内外部信号的中央调控者,可以调控 GA、脱落酸、乙烯等信号途径来维持植株正常的生长发育.进一步研究揭示 DELLA 蛋白的 O-GlcNAc 修饰专一性由 SEC 完成,并且推测 SEC 对激素信号的调控机制如图 5 所示^[26]. SEC 对 DELLA 蛋白的 O-GlcNAc 修饰阻碍了 DELLA 与其效应蛋白 DIP 的结合,游离的 DIP 会激活其目的基因的转录因子,进而引起目的基因表达水平上调,从而激活 GA 途径(或生长素、乙烯和脱落酸等激素途径).而未被修饰的 DELLA 可与 DIP 结合,通过另一条通路,与其他转录因子互作,导致目的基因的下调,从而抑制 GA 信号的传导.

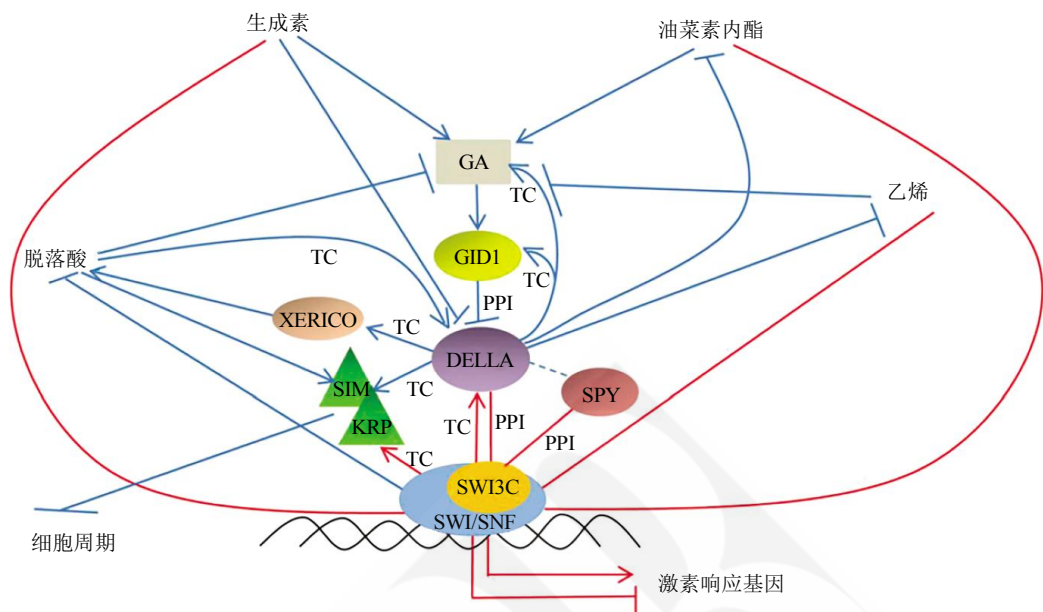


Fig. 4 A hypothetical model of hormone pathway regulatory network by SPY^[31]
图 4 SPY 调控植物激素信号网络的假说模型^[31]

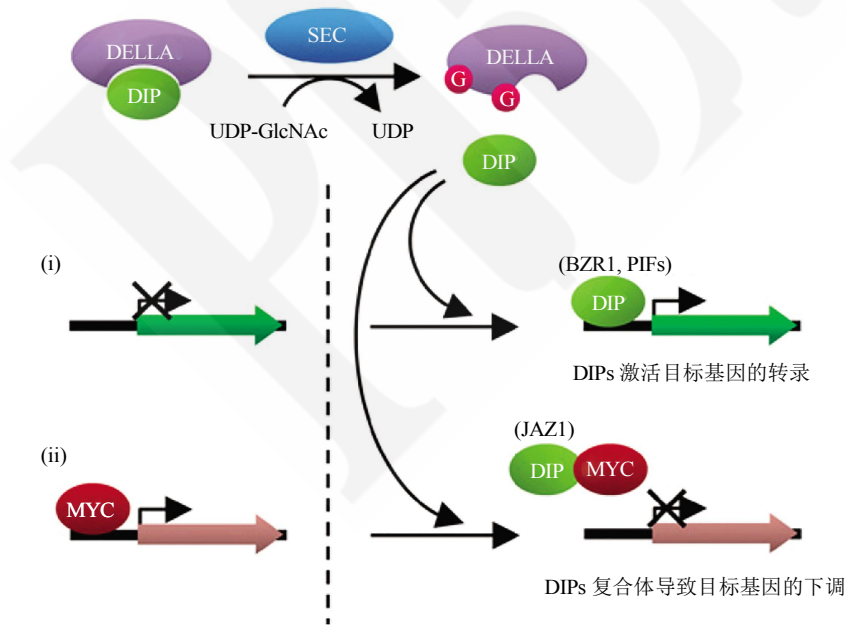


Fig. 5 Model for the role of DELLA O-GlcNAcylation by SEC^[26]
图 5 SEC 介导的 O-GlcNAc 修饰对 DELLA 功能影响的模型^[26]

从上述实验结果可知，SEC 与 SPY 在 GA 信号转导过程中起到了截然相反的作用，SPY 是负调控因子，而 SEC 是正调控因子。SEC 与 SPY 在 GA 信号途径中功能迥异也说明两者的作用蛋白及

调控途径并不完全相同，可以部分解释 SEC 与 SPY 在植物生长发育过程中的不同功能。

2.3 SEC 与 SPY 在病毒侵染过程的功能

李痘病毒(*Plum pox virus*, PPV)，能侵染多种

木本科和草本科植物,造成严重的产量损失。PPV的基因组由一条10 kb左右的单链信使RNA组成,这个基因组被一个外壳蛋白(capsid protein, PPV-CP)所包裹^[33]。PPV病毒在侵染宿主细胞以后,遗传物质RNA会先逆转录为DNA,进而整合到宿主的染色体中,随宿主基因一起进行转录,并利用宿主细胞的翻译系统来完成病毒外壳蛋白的合成。而外壳蛋白上也会存在一系列的翻译后修饰,这些过程也是在宿主细胞中完成的。

2002年,西班牙的Fernandez-Fernandez等^[33]通过MALDI-TOF检测发现烟草中分离提纯的PPV-CP是被O-GlcNAc糖基化修饰的。随后该研究室与尼尔实验室合作,发现PPV在侵染拟南芥时,PPV-CP的O-GlcNAc糖基化专一性地由SEC催化完成^[34]。并且发现由SEC介导的O-GlcNAc修饰对PPV的增殖是非必需的,但在PPV病毒的迁移传播过程中发挥重要作用。这些工作揭示SEC可以作为一个抗病毒的新靶点,可以通过外源喷施SEC的抑制剂来控制PPV病毒迁移,具有潜在的应用价值。

紧接着尼尔实验室分析了PPV-CP的氨基酸序列,对预测的O-GlcNAc修饰位点Thr-19和Thr-24进行突变,发现突变病毒与野生病毒一样,侵染烟草时仍有很强的感染与迁移能力^[35]。说明这些位点的O-GlcNAc修饰对PPV的侵染传播无较大影响,推测PPV-CP上存在没有鉴定出来的O-GlcNAc修饰位点。2011年尼尔实验室与美国弗吉尼亚大学合作,利用新改进的质谱检测方法鉴定出PPV-CP上的5个O-GlcNAc修饰位点^[36]。

2013年,尼尔实验室在PPV-CP上共鉴定出7个O-GlcNAc修饰位点,并将这7个位点全突变得得到无O-GlcNAc修饰的病毒^[37]。利用突变病毒分别侵染烟草和拟南芥时发现,O-GlcNAc修饰影响PPV病毒迁移传播的现象在拟南芥中表现明显,而在烟草中并不明显,说明此机制存在一定的宿主特异性。并且发现O-GlcNAc修饰对PPV-CP的稳定性起到关键作用,无O-GlcNAc修饰的病毒蛋白易发生降解,进而影响了病毒的迁移与繁殖^[37]。

上述植物OGT在GA激素途径调控及李痘病毒侵染过程中的功能研究,是目前对植物OGT研究最系统的两个案例。从仅有的这些研究结果可见,虽然植物中SEC与SPY均具有OGT的功能,并且在植物生长发育过程具有部分的功能重叠性,但它们作用的靶标蛋白及途径并不完全相同,分别

介导不同的生物学过程。

3 植物O-GlcNAc蛋白的功能研究及检测

3.1 O-GlcNAc蛋白的功能研究

除了考察植物O-GlcNAc修饰途径关键酶的功能之外,动物中O-GlcNAc生物学功能的研究成果对植物而言也具有重要借鉴意义。在动物中,O-GlcNAc修饰蛋白在调节信号转导、基因转录、调控表观遗传和胞内代谢等过程发挥重要作用^[38]。与之对应的,植物中O-GlcNAc修饰蛋白在这些过程发挥的作用也有少许研究。

代表性的工作如中国科学院植物研究所的种康研究组发现,小麦在春化处理,整体蛋白的O-GlcNAc修饰水平明显升高,进一步的研究发现TaGRP2(RNA结合蛋白)的O-GlcNAc修饰在介导小麦细胞感受春化信号进而启动开花网络的过程起到关键作用^[14, 39]。未春化处理时,小麦中的TaGRP2会结合春化基因TaVRN1的前体RNA,进而抑制其转录与开花启动。小麦春化处理后,TaGRP2的O-GlcNAc修饰水平升高,同时凝集素VER2(春化诱导基因)会磷酸化并进入细胞核中与O-GlcNAc修饰的TaGRP2发生互作,进而解除TaGRP2对TaVRN1基因转录的抑制,完成春化作用对开花的启动^[14]。此研究表明O-GlcNAc修饰可以接收到春化信号,从而做出应答,说明其参与到植物的信号转导过程中。

2014年,比利时的Delporte等^[40]发现烟草的组蛋白与人类中的一样,均是被O-GlcNAc修饰的,组蛋白的O-GlcNAc修饰水平依赖于细胞周期。这一研究表明O-GlcNAc修饰可能参与到植物的表观遗传调控过程中。目前,关于植物O-GlcNAc蛋白功能的研究很少,存在很大的研究空间。

3.2 植物O-GlcNAc修饰蛋白的规模检测

3.2.1 研究现状及功能验证

直接鉴定出更多O-GlcNAc修饰的蛋白,对于进一步揭示植物中O-GlcNAc修饰的生物学功能至关重要。但是由于O-GlcNAc修饰的蛋白多为低丰度蛋白质,并且O-GlcNAc的糖苷键易于断裂,在样品制备及质谱鉴定过程中容易从蛋白质上脱离,使得O-GlcNAc修饰蛋白组的检测难度极大。虽然在哺乳动物细胞中已经鉴定到了1 000多个O-GlcNAc修饰的蛋白^[41-42],但植物O-GlcNAc修饰蛋白的鉴定工作才刚刚起步。

2012年,美国加利福尼亚大学Xu等^[43]利用凝

集素亲和层析和电子转换电离质谱(ETD-MS), 建立了一种检测 O-GlcNAc 修饰位点的新方法, 可应用于拟南芥中 O-GlcNAc 修饰蛋白的检测. 但是随后植物中 O-GlcNAc 修饰蛋白的检测一直停滞不前, 仅局限于采用传统的 Western-blot 法进行全蛋白质检测或者利用 ETD-MS 进行特定蛋白的 O-GlcNAc 修饰位点的检测^[14, 26]. 直到 2017 年, Xu 等^[44]再次利用 ETD-MS 法进行了拟南芥全蛋白 O-GlcNAc 修饰位点的检测, 一共检测到 971 个 O-GlcNAc 修饰位点, 属于 262 个 O-GlcNAc 修饰蛋白. 这些蛋白广泛参与到基因的转录、翻译、表观遗传调控和信号转导等过程.

被鉴定出来的很多蛋白在植物生长发育过程中

起到重要的调节作用, 如胚胎发育、茎叶花发育、新陈代谢和植物激素调控过程等(图 6a)^[44]. 以调控花器官发育的过程为例, 一些 O-GlcNAc 修饰的蛋白如 HEN4、HUA1、NGA1、NAG3 和 SEU 等被鉴定出来, 它们均在花器官发育过程中起到关键作用^[45-47](图 6b). 另外还发现一些鉴定出的蛋白质与调控开花时间和生物周期密切相关, 这与 SPY 所表现出来的生物学功能高度吻合. 这些蛋白质的鉴定进一步验证了之前的研究成果, 揭示了 SEC 与 SPY 生物学功能的深层次机制, 再次证实 O-GlcNAc 修饰在植物的生长发育过程中起到了至关重要的作用.

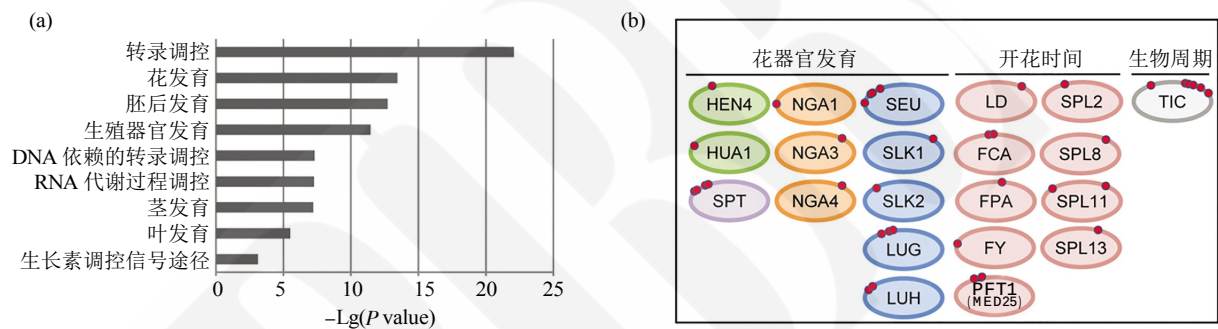


Fig. 6 Gene ontology analysis of detected O-GlcNAcylated proteins (a), the O-GlcNAcylated proteins which are involved in floral organ development, flowering time and circadian clock (b)^[44]

图 6 鉴定的 O-GlcNAc 糖基化蛋白功能分析(a), 参与调控花器官发育、开花时间和生物周期的 O-GlcNAc 修饰蛋白(b)^[44]

之前研究发现 SEC 与 SPY 在整个植物激素信号网络的调控过程发挥重要作用, 包括 GA、细胞分裂素、生长素、ABA 等信号转导过程^[26, 31]. 在此次检测中, 细胞分裂素信号响应的 3 个转录因子 TCP2、8 和 14, ABA 结合因子 ABF3, 乙烯途径的 2 个关键蛋白 EIN2 和 EIN5, 生长素信号响应的 5 个转录因子 ARF4、6、7、8 和 19 等蛋白被鉴定出来^[44]. 这些在激素信号的传导和响应过程的关键蛋白均是被 O-GlcNAc 修饰的, 因此 O-GlcNAc 修饰水平的变化会直接影响植物激素网络的调控. 这是 SEC 与 SPY 参与植物激素网络调控的直接证据, 充分证实了之前的研究成果.

3.2.2 O-GlcNAc 蛋白检测技术发展方向

目前植物中 O-GlcNAc 检测技术存在较大局限性, 鉴定蛋白质数目远远落后于动物方面, 会导致

重要蛋白修饰信息的缺失. 例如, 2017 年拟南芥 O-GlcNAc 蛋白组的鉴定工作, 所采用的蛋白富集方法是较传统的 WGA 凝集素富集法, 这一方法操作繁琐, 而且需要重复三次进行富集, 样品损失极大^[44, 48]. 目前哺乳动物 O-GlcNAc 修饰蛋白组的检测技术不断更新, 可以参考并借鉴应用到植物方面的检测上.

2017 年, 北京蛋白质组研究中心钱小红实验室提出一种 O-GlcNAc 蛋白富集的新策略^[48]. 这一策略是先用酶法去除蛋白上其他修饰糖链, 再用接枝修饰的 HILIC 材料进行富集, 成功提高了 O-GlcNAc 蛋白的检测个数, 约为常用的抗体或凝集素富集方法的 3 倍. 最近, 英国邓迪大学 Daan M F van Aalten 等, 利用定点突变的无催化活性但是具有 O-GlcNAc 修饰蛋白结合能力的 OGA 蛋白

作为富集材料, 进行 HeLa 细胞裂解液中 O-GlcNAc 蛋白的富集, 成功富集并检测到 915 种 O-GlcNAc 修饰蛋白, 约为其他富集方法的 4.6 倍^[49-50]. 此种利用突变的 OGA 进行富集的方法特异性强、富集效率高、操作简便、大大打破了现有 O-GlcNAc 富集方法的局限性. 动物中 O-GlcNAc 蛋白富集及检测方法的改进, 对植物 O-GlcNAc 蛋白组的检测具有很强的指导意义.

4 总结与展望

近几年来, 随着糖生物学的发展, 针对植物蛋白 O-GlcNAc 修饰的研究工作取得了一定进展, 但是总的来说, 对于这种形式特殊、分布广泛、功能重要的蛋白质修饰形式, 其研究工作仍十分欠缺, 所取得的成果尤其是 O-GlcNAc 修饰的生物学功能, 修饰蛋白及作用机理方面的研究还十分有限, 具有很大的研究空间.

对于植物中的 O-GlcNAc 转移酶 SEC 与 SPY, 虽然它们均具有 OGT 的活性, 但是这两个蛋白的作用底物并不相同, 介导不同的生物学过程. 今后的研究需要深入考察并揭示两者的功能, 可以从以下三个方面着手: 首先, SEC 与 SPY 具有不同的蛋白质结构, 准确获得 SEC 与 SPY 的晶体结构, 揭示其修饰机制是一个重要的研究方向; 其次, 直接找寻与 SPY 或 SEC 发生互作的蛋白, 有助于进一步研究 SEC 与 SPY 介导的途径及生物学功能; 此外, 发展提升现有的植物 O-GlcNAc 修饰蛋白的检测技术, 鉴定出更多 O-GlcNAc 修饰的蛋白, 并且利用相关的突变株进行 O-GlcNAc 修饰蛋白的考察, 这对于揭示植物 O-GlcNAc 修饰的功能及考察 SPY 及 SEC 的作用途径是十分重要的.

对植物中蛋白 O-GlcNAc 糖基化功能的研究, 除了丰富植物糖生物学知识体系, 具有重要的理论意义外, 还具有十分重要的实际用途. 如利用 SEC 与 SPY 在 GA 途径中的不同作用, 调控植物的生长发育; 利用 SPY 在开花时间调控方面的功能, 控制观赏植物的开花时间; 利用 SEC 在病毒修饰方面的专一性, 作为靶标进行新型抗植物病毒药剂的研制等. 相信随着糖生物学研究技术手段的进步, 以及研究者对植物糖生物学的逐渐重视, 植物 O-GlcNAc 修饰这一领域将在近期迎来较大发展.

参 考 文 献

[1] Strasser R. Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 2016, **26**(9):

926-939

- [2] Kinoshita T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*, 2014, **90**(4): 130-143
- [3] Hart G W, Housley M P, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 2007, **446**(7139): 1017-1022
- [4] Nguema-Ona E, Vre-Gibouin M, Gotte M, *et al.* Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**(499): 1-11
- [5] Torres C R, Hart G W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes-evidence for O-linked glcnac. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, **259**(5): 3308-3317
- [6] Bond M R, Hanover J A. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol*, 2015, **208**(7): 869-880
- [7] Hsieh T J, Fustier P, Zhang S L, *et al.* High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology*, 2003, **144**(10): 4338-4349
- [8] Milewski S, Gabriel I, Olchow J. Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. *Yeast*, 2006, **23**(1): 1-14
- [9] Zhou Y, Xin Y, Sha S, *et al.* Kinetic properties of Mycobacterium tuberculosis bifunctional GlmU. *Archives of Microbiology*, 2011, **193**(10): 751-757
- [10] Nozaki M, Sugiyama M, Duan J, *et al.* A missense mutation in the glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase-encoding gene causes temperature-dependent growth defects and ectopic lignin deposition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, **24**(8): 3366-3379
- [11] Wang Z H, Wang Y, Hong X, *et al.* Functional inactivation of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 (UAP1) induces early leaf senescence and defence responses in rice. *J Exp Bot*, 2015, **66**(3): 973-987
- [12] Chen Y H, Shen H L, Hsu P J, *et al.* N-acetylglucosamine-1-P uridylyltransferase 1 and 2 are required for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2014, **55**(11): 1977-1993
- [13] Peterson S B, Hart G W. New insights: A role for O-GlcNAcylation in diabetic complications. *Crit Rev Biochem Mol*, 2016, **51** (3): 150-161
- [14] Xiao J, Xu S J, Li C H, *et al.* O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits TaVRN1 mRNA accumulation during vernalization in winter wheat. *Nature Communications*, 2014
- [15] Olszewski N E, West C M, Sassi S O, *et al.* O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Bba-Gen Subjects*, 2010, **1800**(2): 49-56
- [16] Gambetta M C, Muller J. A critical perspective of the diverse roles of O-GlcNAc transferase in chromatin. *Chromosoma*, 2015, **124**(4): 429-442
- [17] Olszewski N, Oldenhof H, Saathoff K, *et al.* Plant O-GlcNAc Transferases. *Glycobiology*, 2009, **19**(11): 1368-1368

- [18] Hartweck L M, Scott C L, Olszewski N E. Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics*, 2002, **161**(3): 1279–1291
- [19] Thornton T M, Swain S M, Olszewski N E. Gibberellin signal transduction presents . . . the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci*, 1999, **4**(11): 424–428
- [20] Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Sakamoto T, *et al.* The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *Plant J*, 2006, **48**(3): 390–402
- [21] Kilcoyne M, Shah M, Gerlach J Q, *et al.* O-glycosylation of protein subpopulations in alcohol-extracted rice proteins. *J Plant Physiol*, 2009, **166**(3): 219–232
- [22] Jacobsen S E, Binkowski K A, Olszewski N E. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(17): 9292–9296
- [23] Thornton T, Kreppel L, Hart G, *et al.* Genetic and biochemical analysis of arabidopsis SPY. *Curr Plant Sci Biot*, 1999, **36**(1999): 445–448
- [24] Tseng T S, Salome P A, Mcclung C R, *et al.* SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *Plant Cell*, 2004, **16**(6): 1550–1563
- [25] Hartweck L M, Genger R K, Grey W M, *et al.* SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of *Arabidopsis thaliana* L. Heyn. *J Exp Bot*, 2006, **57**(4): 865–875
- [26] Zentella R, Hu J H, Hsieh W P, *et al.* O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in *Arabidopsis*. *Gene Dev*, 2016, **30**(2): 164–176
- [27] Izhaki A, Swain S M, Tseng T S, *et al.* The role of SPY and its TPR domain in the regulation of gibberellin action throughout the life cycle of *Petunia hybrida* plants. *Plant J*, 2001, **28**(2): 181–190
- [28] Silverstone A L, Tseng T S, Swain S M, *et al.* Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, **143**(2): 987–1000
- [29] Filardo F, Robertson M, Singh D P, *et al.* Functional analysis of HvSPY, a negative regulator of GA response, in barley aleurone cells and *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, **229**(3): 523–537
- [30] Samowska E A, Rolicka A T, Bucior E, *et al.* DELLA-interacting SWI3C core subunit of switch/sucrose nonfermenting chromatin remodeling complex modulates gibberellin responses and hormonal cross talk in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2013, **163**(1): 305–317
- [31] Putarjuna A, Rodermeel S. Gigantea suppresses immutans variegation by interactions with cytokinin and gibberellin signaling pathways. *Plant Physiology*, 2014, **166**(4): 2115–2132
- [32] Steiner E, Efroni I, Gopalraj M, *et al.* The *Arabidopsis* O-linked N-acetylglucosamine transferase SPINDLY interacts with class I TCPs to facilitate cytokinin responses in leaves and flowers. *Plant Cell*, 2012, **24**(1): 96–108
- [33] Fernandez-Fernandez M R, Camafeita E, Bonay P, *et al.* The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(1): 135–140
- [34] Chen D, Juarez S, Hartweck L, *et al.* Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum Pox virus infection. *Journal of Virology*, 2005, **79**(15): 9381–9387
- [35] Scott C L, Hartweck L M, Perez J D, *et al.* SECRET AGENT, an *Arabidopsis thaliana* O-GlcNAc transferase, modifies the Plum pox virus capsid protein. *FEBS Letters*, 2006, **580**(25): 5829–5835
- [36] Kim Y C, Udeshi N D, Balsbaugh J L, *et al.* O-GlcNAcylation of the Plum pox virus capsid protein catalyzed by SECRET AGENT: characterization of O-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Amino Acids*, 2011, **40**(3): 869–876
- [37] Perez J D, Udeshi N D, Shabanowitz J, *et al.* O-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus Plum pox virus enhances viral infection. *Virology*, 2013, **442**(2): 122–131
- [38] Liu Y, Dai S J, Xing L J, *et al.* O-linked beta-N-acetylglucosamine modification and its biological functions. *Sci Bull*, 2015, **60**(12): 1055–1061
- [39] Xing L, Li J, Xu Y, *et al.* Phosphorylation modification of wheat lectin VER2 is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular motility. *PLoS One*, 2009, **4**(3): e4854
- [40] Delporte A, De Zaeytijd J, De Storme N, *et al.* Cell cycle-dependent O-GlcNAc modification of tobacco histones and their interaction with the tobacco lectin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, **83**(2014): 151–158
- [41] Wang Z H, Udeshi N D, Slawson C, *et al.* Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal*, 2010, **3**(104): 1–12
- [42] Alfaro J F, Gong C X, Monroe M E, *et al.* Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(19): 7280–7285
- [43] Xu S L, Chalkley R J, Wang Z Y, *et al.* Identification of O-linked beta-D-N-acetylglucosamine-modified proteins from *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology*, 2012, **876**(2012): 33–45
- [44] Xu S L, Chalkley R J, Maynard J C, *et al.* Proteomic analysis reveals O-GlcNAc modification on proteins with key regulatory functions in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(8): E1536–E1543
- [45] Cheng Y, Kato N, Wang W, *et al.* Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 2003, **4**(1): 53–66
- [46] Bao F, Azhakanandam S, Franks R G. SEUSS and SEUSS-LIKE transcriptional adaptors regulate floral and embryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2010, **152**(2): 821–836
- [47] Franks R G, Wang C X, Levin J Z, *et al.* SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development*, 2002, **129**(1): 253–263

- [48] Shen B, Zhang W, Shi Z, *et al.* A novel strategy for global mapping of O-GlcNAc proteins and peptides using selective enzymatic deglycosylation, HILIC enrichment and mass spectrometry identification. *Talanta*, 2017, **169**(2017): 195–202
- [49] Selvan N, Williamson R, Mariappa D, *et al.* A mutant O-GlcNAcase enriches *Drosophila* developmental regulators. *Nature Chemical Biology*, 2017, **13**(8): 882–888
- [50] Nandi A, Sprung R, Barma D K, *et al.* Global identification of O-GlcNAc-modified proteins. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**(2): 452–458

Research Advances in Plants Protein O-GlcNAcylation*

JIA Xiao-Chen^{1,2)}, YIN Heng^{1)**}

⁽¹⁾ Liaoning Provincial Key Laboratory of Carbohydrates, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The phenomenon of protein O-GlcNAcylation has been discovered for more than 30 years. In animals, O-GlcNAcylation plays important roles in cellular signaling transduction, gene transcription, epigenetic, metabolism regulation and etc. While the functions of O-GlcNAcylation in plants is remain unclear, and only few studies were reported in recent years. In this review paper, the research advances on plants O-GlcNAcylation were reviewed, including UDP-GlcNAc biosynthesis pathway, the key enzymes in O-GlcNAc modification pathway, the detection and function analysis of O-GlcNAc modified proteins. These works revealed that O-GlcNAcylation has essential functions in plant growth and development, plant hormone networks regulation, signal transduction and plant virus infection process. This article will facilitate the subsequent research on the O-GlcNAcylation in plants.

Key words O-GlcNAcylation, hexosamine biosynthesis pathway, SPINDLY, SECRET AGENT, O-GlcNAc modified proteins

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0303

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31370811, 31672077), CAS Science and Technology Service Network Initiative (KFJ-SW-STS-143) and CAS Youth Innovation Promotion Association (2015144).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-84379061, E-mail: yinheng@dicp.ac.cn

Received: July 23, 2017 Accepted: September 20, 2017