

## 拟南芥细胞分裂素糖基转移酶UGT76C2的N端亮氨酸替换对酶活性的影响

于惠敏<sup>1</sup>, 王会勇<sup>2</sup>, 王军<sup>2</sup>, 侯丙凯<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>齐鲁师范学院生命科学学院, 济南250013; <sup>2</sup>山东大学生命科学学院, 济南250100

**摘要:** UGT76C2是负责细胞分裂素N-糖基化修饰的糖基转移酶, 该基因对于维持植物体内细胞分裂素动态平衡有重要作用。为了进一步研究UGT76C2酶蛋白结构与催化活性的关系, 本文采用定点突变方法, 将UGT76C2的N端第31位的保守亮氨酸替换为组氨酸。结果发现, 突变型UGT76C2在离体实验中完全丧失了对细胞分裂素的糖基化修饰活性, 该突变基因的过表达转基因植物出现与UGT76C2突变体类似的表型, 转基因植物体内的两类主要细胞分裂素的N-糖苷含量显著降低。实验结果证明了UGT76C2 N端亮氨酸残基对于糖基化修饰活性的重要性。

**关键词:** 糖基转移酶; 定点突变; 酶活性; 细胞分裂素; 拟南芥

## Effect of the N-Terminal Leucine Substitution on the Enzyme Activity of Cytokinin Glucosyltransferase UGT76C2 of *Arabidopsis thaliana*

YU Hui-Min<sup>1</sup>, WANG Hui-Yong<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, HOU Bing-Kai<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Qilu Normal University, Jinan 250013, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China

**Abstract:** UGT76C2 is a glucosyltransferases responsible for the N-glucosylation of cytokinins, which is important for *in vivo* cytokinin homeostasis. In order to study the effects of protein structure on catalytic activity, the conserved N-terminal amino acid, leucine (L31), of UGT76C2 was replaced by histidine via site-specific mutation method. It was found that the mutated UGT76C2 completely lost *in vitro* glucosylating activity for cytokinins. The transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing mutated UGT76C2 displayed a typical phenotype for *ugt76c2* mutants. Moreover, the contents of N-glucosides of main cytokinins in *Arabidopsis* were substantially decreased. Our results demonstrated that the conserved N-terminal leucine of UGT76C2 was essential for cytokinin glucosylating activity.

**Key words:** glucosyltransferase; site-specific mutation; enzyme activity; cytokinin; *Arabidopsis thaliana*

糖基转移酶是专门负责催化生物分子发生糖基化反应的酶, 它能够将活化的糖基转移到蛋白、脂类、次级代谢物等一系列生物分子上。糖基化修饰往往会改变生物分子的活性、水溶性、稳定性、在细胞内的定位和运输、以及与受体的相互识别与结合特性等。另外, 糖基转移酶还能消除内源或外源物质的毒性。植物的糖基转移酶数量众多, 底物广泛, 功能多样, 对于植物的生长发育有重要作用(Lim和Bowles 2004; Bowles等2006)。

植物的糖基转移酶可分为很多家族, 其中家族1 (family 1)包含的成员数量最多。这个家族中的酶所催化的底物一般是亲脂性的小分子化合物, 一个或多个糖基可以结合在这些分子的-OH、-COOH、-NH<sub>2</sub>、-SH或C-C基团上(Bowles等2005)。家族1的糖基转移酶通常在C端具有一个由44个氨基酸组成的保守序列, 也叫PSPG盒(plant

secondary product glucosyltransferase box), 推测这一保守序列可能在糖基化过程中与尿嘧啶核苷二磷酸-糖(UDP-sugar)的结合有关, 故家族1糖基转移酶也被称为UDP-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferase, UGT)。拟南芥是第一个得到全面分析糖基转移酶多基因家族的植物。拟南芥家族1的糖基转移酶绝大部分都含有C末端保守序列, 只有3个是例外(Paquette等2003)。根据基因组序列分析, 推测在拟南芥中共有112个具有编码功能的糖

收稿 2014-07-07 修定 2014-10-21

资助 国家自然科学基金项目(30770214)、教育部博士学科点专项基金项目(20120131110023)和植物细胞工程与种质创新教育部重点实验室开放课题(2012-01)。

致谢 Riken Plant Science Center的Sakakibara教授协助测定细胞分裂素浓度。

\* 通讯作者(E-mail: bkhou@sdu.edu.cn; Tel: 0531-88364726)。

基转移酶(www.cazy.org), 目前已有近1/3的成员确定了底物分子或明确了功能。根据现有的研究, 糖基转移酶参与的生理学过程非常广泛, 包括激素调节、次生代谢、抗逆反应、脱毒反应等等, 例如UGT73C5糖基化油菜素内酯并调节生长发育(Poppenberger等2005), UGT74E2糖基化生长素并影响生长和抗逆(Tognetti等2010), UGT87A2虽然尚未鉴定底物但已被证明参与开花调节(Wang等2012)。除拟南芥以外, 其他植物的糖基转移酶研究也获得了一定进展, 例如通过对核酸序列数据库的分析, 发现水稻(*Oryza sativa*)中至少有213个家族1-糖基转移酶基因(Cao等2008; Yonekura-Sakakibara和Hanada 2011), 杨树(*Populus trichocarpa*)中约有236个家族1-糖基转移酶基因(Geisler-Lee等2006; Yonekura-Sakakibara和Hanada 2011), 玉米(*Zea mays*)基因组含有大约147个家族1-糖基转移酶基因(Li等2014)。从玉米中已经克隆到两个顺式玉米素O-糖基转移酶基因*cisZOG1*和*cisZOG2*(Martin等2001; Veach等2003), 分析表明*cisZOG2*和*cisZOG1*在DNA和氨基酸水平上的同源性分别为97.8%和98.3%, 两酶具有相同的最适pH和催化活性。水稻的顺式玉米素糖基转移酶cZOGT1、cZOGT2和cZOGT3也已经被鉴定, 并且发现基因超表达影响株高和根系发育(Kudo等2012)。菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的一个玉米素O-木糖糖基转移酶ZOX1和棉豆(*P. lunatus*)的一个玉米素O-葡萄糖糖基转移酶ZOG1在识别细胞分裂素底物时两个酶均表现出较高的专一性, 仅糖基化玉米素和二氢玉米素, 不识别顺式玉米素及任何玉米素核苷(Turner等1987; Dixon等1989)。当ZOG1转入玉米超表达, 转基因玉米表现出矮化、延迟衰老、雄穗的雌性化等发育变化(Rodo等2008)。以上研究表明糖基转移酶在调控激素活性以及植物生长发育方面发挥重要作用。

UGT76C2是第一个也是目前唯一一个被鉴定的负责植物细胞分裂素N-糖基化修饰的糖基转移酶(Hou等2004)。该酶能够催化反式玉米素(*trans-zeatin*)、异戊烯基腺嘌呤(isopentenyladenine, iP)、6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)、顺式玉米素(*cis-zeatin*)等细胞分裂素在N<sup>7</sup>-位和N<sup>9</sup>-位发生葡萄糖基化修饰, 该修饰将导致细胞分裂素的永久

失活。到目前为止, 还没有实验证据表明UGT76C2对其他激素或化合物的糖基化修饰作用, 可能反映了该酶对细胞分裂素的专一性较强。Wang等(2011)研究了UGT76C2在植物体的功能作用, 发现UGT76C2在体内同样具有N-糖基化修饰细胞分裂素的活性, 过表达体大量积累细胞分裂素的N-糖苷, 而突变体的N-糖苷则显著降低。当外源施加细胞分裂素, 发现过表达体和突变体在根长、侧根、花青素含量和叶绿素积累等方面出现显著而相反的变化, 说明UGT76C2在植物体内通过糖基化修饰参与细胞分裂素动态平衡并影响植物对细胞分裂素的响应(Wang等2011)。另外, 本实验室还发现, UGT76C2通过糖基化细胞分裂素还能够显著提高植物的耐旱能力(未发表数据)。

尽管植物糖基转移酶的催化活性以及功能研究有了一些进展, 但目前对这类酶的蛋白结构与功能活性的关系还缺乏了解。由于蛋白质结构信息对于研究和了解糖基转移酶的进化和催化机制至关重要, 大力开展酶的结构与活性关系的研究很有必要。Shao等(2005)曾研究蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)糖基转移酶UGT71G1与糖供体UDP-葡萄糖共结晶结构, 发现植物的糖基转移酶有2个罗斯曼折叠结构。Osmani等(2009)总结了之前已知结构的糖基转移酶VvGT1、UGT72B1、UGT85H2和UGT71G1后认为, 虽然这4个蛋白分属不同物种, 氨基酸相似度只有20%~35%, 但它们的二级和三级结构高度保守。Meek等(2008)通过定点突变改变棉豆ZOG1的氨基酸序列, 发现ZOG1蛋白的四个区域内各有一个氨基酸至关重要(R59、D87、L127、F149), 突变这些氨基酸将造成该糖基转移酶活性完全丢失。现有的研究一般认为, 糖基转移酶的N端序列变异较大, 可能与不同底物的识别有关。而C端含有保守的PSPG盒, 推测可能在糖基化过程中与活化态的糖供体(UDP-sugar)结合有关。植物的糖基转移酶种类繁多, 它们都具有各自的底物特异性, 到底哪些氨基酸对底物选择的特异性和催化活性起决定作用? 糖基转移酶与底物相互识别和作用的机理是什么? 这些问题的研究对于理解糖基转移酶的蛋白结构与功能活性的关系、进行蛋白质工程改造以及酶学应用都具有重要意义, 然而目前了解的却很少。

在本研究中, 我们对影响拟南芥细胞分裂素糖基转移酶UGT76C2活性的氨基酸位点进行了探讨, 对N端一个保守的亮氨酸残基进行了突变。结果发现, 在体外实验中该突变造成了酶活性的完全丧失, 而在体内实验中该突变严重影响了内源酶活性的发挥, 证明了细胞分裂素糖基转移酶UGT76C2的N端亮氨酸对于酶活性的重要性, 研究结果对于深入了解细胞分裂素糖基转移酶与底物相互识别和作用的关系奠定了基础。

## 材料与方法

### 1 实验材料

用于实验的植物为拟南芥哥伦比亚生态型 (*Arabidopsis thaliana* L., Col-0)。根癌农杆菌菌株 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、植物表达载体pBI121、原核表达菌株大肠杆菌XL1-Blue以及原核表达载体pGEX-2T均由本实验室保存。

### 2 基因序列改造

基于糖基转移酶基因UGT76C2的标准cDNA序列(GenBank登录号NM\_120668), 设计2对PCR引物(P1-P2, P3-P4), 其中P1和P2用于扩增N端100 bp片段, P3和P4用于扩增C端1 253 bp片段。P2和P3在设计时人为造成重叠区域并引入突变碱基。引物的具体序列如下, P1: 5' CGCGGATCCATG-GAGGAGAAGAGAAATGG 3' (下划线为添加的酶切位点BamHI); P2: 5' TTACGTGATGGATGTTG-GCGAGCTGAAGCA 3' (下划线为突变碱基)。P3: 5' AACATCCATCACGTAAGAGGCTTCTCCATTAC 3' (下划线为突变碱基); P4: 5' CGGGAGCTCT-TACAACAATAGTATATGATTAG 3' (下划线为添加的酶切位点SacI)。PCR扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 循环30次; 72 °C 10 min。采用高保真的Pfu DNA聚合酶。将P1-P2的扩增产物与P3-P4的扩增产物混合后作为模版, 用P1和P4进行第3次PCR扩增, 获得带有突

变碱基的UGT76C2基因序列(称为UGT76C2m)。经测序确认基因序列符合改造要求。

### 3 酶蛋白的原核表达与纯化

将野生型UGT76C2和突变型的UGT76C2m基因构建进原核表达载体pGEX-2T, 然后导入大肠杆菌XL1-Blue, 用IPTG诱导, 谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)与糖基转移酶的融合蛋白在大肠杆菌中进行表达。GST融合蛋白的纯化方法参考Hou等(2004)的方法。

### 4 酶活性分析方法

酶蛋白纯化以后, 按照如下方法进行酶促反应: 在200  $\mu$ L反应液中包含1  $\mu$ g重组蛋白、50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)、2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> UDP-葡萄糖、0.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> ATP、50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>和0.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 细胞分裂素(反式玉米素或6-苄氨基嘌呤)。将反应液在30 °C温育3 h, 然后加入20  $\mu$ L三氯乙酸终止反应, 用于高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。HPLC的分析条件基本参考Hou等(2004)的方法, 略有改进。仪器为岛津LC-20AT (Shimadzu, 日本)。色谱柱为Ultimate XB-C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)反相柱。流动相为甲醇和水, 均含有0.01%磷酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)。采用二元高压浓度梯度方法洗脱, 流速为1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 洗脱时间为40 min。色谱峰的检测波长为270 nm (Hou等2004)。

### 5 植物过表达载体构建和转基因拟南芥

以植物表达载体pBI121为基础载体, 利用BamHI和SacI将其中的GUS基因切除。UGT76C2m基因片段同样用BamHI和SacI双酶切, 然后构建进切除了GUS的pBI121, 获得突变型基因UGT76C2m的过表达载体(图1)。将构建好的载体转化进根癌农杆菌菌株GV3101, 然后通过浸花法转化拟南芥(Clough和Bent 1998), 获得纯合转基因拟南芥株系。对生长20 d的不同株系叶片中的突变型基因进行表达水平检测。提取叶片RNA, 反

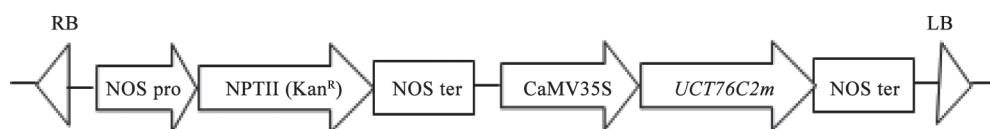


图1 突变型基因UGT76C2m的过表达载体T区结构

Fig.1 The schematic illustration of the T-DNA region of the UGT76C2m expressing vector



转录成cDNA。采用SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 以cDNA为模板进行荧光定量PCR分析。在Bio-Rad荧光定量PCR仪(CFX Connect)上进行实验。以拟南芥*Tubulin*基因为内参。定量方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。所用特异性引物序列为: P5: 5' CAGCTCGCC-AACATCCA 3' (下划线为突变型基因*UGT76C2m*中的突变碱基); P6: 5' GCAAGCAATCACG-AAACG 3'。PCR产物长度205 bp。荧光定量PCR的反应程序如下: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火10 s, 72 °C延伸20 s, 循环40次; 每个反应重复3次。

## 6 转基因植物的根长统计

将野生型拟南芥和2个过表达株系的种子经表面消毒后种在1/2MS培养基上, 4 °C低温处理3 d, 然后放在培养室垂直培养。培养室内的温度(22±1) °C, 相对湿度60%~70%, 光照强度约75  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照时间16  $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。待根长0.5~1.0 cm时, 每个株系选择10株相同根长的植株转移到包含0、0.5、1.0和5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA的1/2MS培养基上, 垂直培养1周后拍照, 按照Wang等(2011)的方法测定根的伸长。实验重复3次, 并对数据进行统计分析。

## 7 细胞分裂素及其糖苷浓度的测定

在MS培养基上垂直培养拟南芥幼苗, 2周后取样, 每个株系取100 mg鲜重, 冷冻干燥后研磨成粉末, 用甲醇:甲酸:水=15:1:4的抽提液抽提各种细胞分裂素及其糖苷, 添加稳定同位素标记的化合物作为内标。抽提物经过离心和过柱等操作后用超级色谱-质谱联用系统(UPLC-ESI-qMS/MS)测定细胞分裂素及其糖苷的含量。测定的各种细胞分裂素及其糖苷包括: 反式玉米素(*trans*-zeatin, tZ)、反式玉米素核苷(tZ riboside, tZR)、顺式玉米素

(*cis*-zeatin, cZ)、顺式玉米素核苷(cZ riboside, cZR)、异戊烯基腺嘌呤(isopentenyladenine, iP)、异戊烯基腺嘌呤核苷(iP riboside, iPR)、反式玉米素核苷酸(tZR phosphates, tZRPs)、二氢玉米素核苷酸(dihydrozeatin riboside phosphates, DZRPs)、顺式玉米素核苷酸(cZR phosphates, cZRPs)、异戊烯基腺嘌呤核苷酸(iPR phosphates, iPRPs)、反式玉米素核苷-O-葡萄糖苷(tZR-O-glucoside, tZROG)、反式玉米素核苷酸-O-葡萄糖苷(tZRPs-O-glucoside, tZRP-sOG)、顺式玉米素核苷酸-O-葡萄糖苷(cZRPs-O-glucoside, cZRPsOG)、异戊烯基腺嘌呤-7-*N*-葡萄糖苷(iP-7-*N*-glucoside, iP7G)、异戊烯基腺嘌呤-9-*N*-葡萄糖苷(iP-9-*N*-glucoside, iP9G)、反式玉米素-7-*N*-葡萄糖苷(tZ-7-*N*-glucoside, tZ7G)、反式玉米素-9-*N*-葡萄糖苷(tZ-9-*N*-glucoside, tZ9G)、反式玉米素-O-葡萄糖苷(tZ-O-glucoside, tZOG)、顺式玉米素-O-葡萄糖苷(cZ-O-glucoside, cZOG)和顺式玉米素核苷-O-葡萄糖苷(cZR-O-glucoside, cZROG)。具体方法参照Kojima等(2009)。实验重复3次, 并对数据进行统计分析。

## 实验结果

### 1 糖基转移酶UGT76C2的序列改造

通过比较多种植物的不同糖基转移酶的蛋白质氨基酸序列, 发现这些糖基转移酶N端存在一个保守的疏水性的亮氨酸残基(图2, 星号)。我们推测该亮氨酸残基对于酶活性很重要。为了证明该亮氨酸与酶活性的关系, 我们针对拟南芥糖基转移酶UGT76C2进行了氨基酸序列替换。通过在该位点设计PCR引物, 人为引入碱基突变, 经过3次独立的PCR, 扩增获得的突变型*UGT76C2m*, 在该位

```

At76C2  -MEEKRNG-LRVILEFPLPLQGCINPMLQLANIL*LVHVRGFS--ITVIHTRFNAPKAS
At72B1  ---MEESKTPHVVAIIPSPGMGHLIPLVEFAKRLVHLHG---LTVTFVIAGEGPPS
Mt71G1  MSMSDINKNSELIFIPAPGIGHLASALEFAKLLTNHDKNLYITVFCIKFPGMPFA
Mt85H2  -MGNFANRHPHVVMIPYPVQGHINPLFKLAKLL*HLRGFH--ITFVNTEYNHKKLL

```

图2 不同糖基转移酶的N端中的保守亮氨酸残基

Fig.2 Conserved leucine in the N-terminal of different glycosyltransferases

作为代表, 这里只列出部分糖基转移酶的N端氨基酸序列。At76C2和At72B1为拟南芥的糖基转移酶; Mt71G1和Mt85H2为蒺藜苜蓿的糖基转移酶。-表示缺少的氨基酸。

点的三联体密码由CTT改变为CAT (图3, 星号)。相应地, 蛋白质序列中该位点的亮氨酸被替换为

组氨酸(L31H) (图4, 星号)。突变型UGT76C2m可用于后续的酶活性分析。

```

UGT76C2   ATGGAGGAGA AGAGAAATGG TCTGCGTGTG ATTCTCTTCC
UGT76C2m  -----

UGT76C2   CTCTTCCATT ACAAGGTTGC ATCAACCCTA TGCTTCAGCT
UGT76C2m  -----

UGT76C2   CGCCAACATC *CTTCACGTAA GAGGCTTCTC CATTACCGTG
UGT76C2m  ----- -A-----

```

图3 糖基转移酶UGT76C2 N端保守亮氨酸的密码子替换

Fig.3 The codon CTT replacement of conserved leucine at N-terminal of UGT76C2

UGT76C2: 野生型基因序列; UGT76C2m: 突变型基因序列; \*表示CTT替换为CAT; -表示相同的碱基。这里只显示对应蛋白质N端的部分核苷酸序列。

```

UGT76C2   MEEKRNGLRV ILFPLPLQGC INPMLQLANI *LHVRGFSITV IHTRFNAPKA
UGT76C2m  ..... H.....

UGT76C2   SSHPLFTFLQ IPDGLSETEI QDGVMSLLAQ INLNAESPFR DCLRKVLLES
UGT76C2m  .....

UGT76C2   KESERVTC LI DDCGWLFTQS VSESCLKPRL VLCTFKATFF NAYPSLPLIR
UGT76C2m  .....

```

图4 在突变型糖基转移酶UGT76C2m中N端的氨基酸替换

Fig.4 The substitution of N-terminal amino acids in mutated UGT76C2m

\*表示组氨酸替换亮氨酸; -表示相同的氨基酸。这里只显示N端的部分氨基酸序列。

## 2 野生型及突变型糖基转移酶UGT76C2的原核表达与纯化

将野生型UGT76C2基因和突变型UGT76C2m基因构建进原核表达载体pGEX-2T, 然后导入大肠杆菌XL1-Blue, 在适当条件下诱导培养, 以含有pGEX-2T的大肠杆菌做对照。对纯化的GST融合蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测。结果发现, 对照菌株只得到符合预期大小(约26 kDa)的GST标签蛋白(图5, 泳道2)。野生型及突变型基因的融合蛋白分子量均介于66.2~94 kDa之间, 符合预期大小(约76 kDa) (图5, 泳道3和泳道4)。其中野生型酶蛋白总是有一条微弱的带伴随, 推测可能是来自细菌的伴侣蛋白,

属于实验中常见现象。这些纯化的酶蛋白以及标签蛋白GST可用于酶活性研究。

## 3 UGT76C2的N端亮氨酸替换对其酶活性的影响

UGT76C2早已被证明是糖基化修饰细胞分裂素的N-糖基转移酶, 该酶催化细胞分裂素形成2种N位的糖苷, 即N<sup>7</sup>-糖苷和N<sup>9</sup>-糖苷(Hou等2004)。于是, 本研究中我们选用2种细胞分裂素, 即tZ和6-BA, 用于酶活性检测。结果如图6所示, 无论反应液中添加tZ还是6-BA, 都能见到在野生型UGT76C2的催化下形成了对应细胞分裂素的N<sup>7</sup>-糖苷和N<sup>9</sup>-糖苷。而在突变型UGT76C2m的反应液中, 与仅含有标签蛋白GST的反应液相同, 都没有检测到细胞分裂素糖苷的出现。可见, 糖基转移酶UGT76C2的N端第31位Leu至关重要, 它被替换为

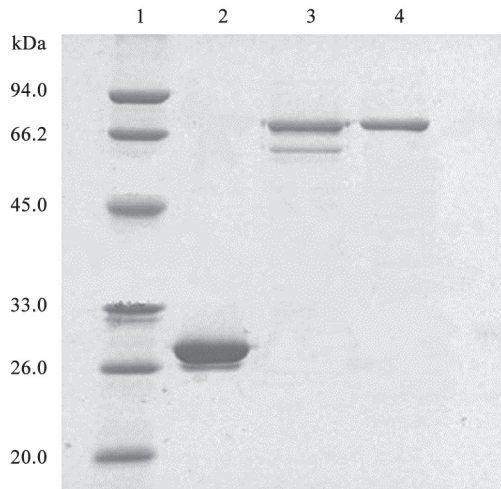


图5 UGT76C2和UGT76C2m的融合蛋白的SDS-PAGE检测

Fig.5 The SDS-PAGE analysis of UGT76C2 and UGT76C2m fusion proteins

1: 蛋白质分子量标准; 2: 纯化的GST标签蛋白; 3: 纯化的GST-UGT76C2融合蛋白; 4: 纯化的GST-UGT76C2m融合蛋白。

His后导致了酶活性的消失。

#### 4 突变型UGT76C2m过表达转基因拟南芥的获得

为了进一步了解糖基转移酶UGT76C2的N端亮氨酸替换对酶活性造成的影响, 我们通过转基因技术观察该突变基因的显性负突变效应。于是, 构建了UGT76C2m基因的过表达载体, 通过遗传转化获得了3个纯合转基因株系(OE-3、OE-5和OE-6)。转基因株系的鉴定采用荧光定量PCR方法直接测定突变型基因的表达量。采用包含突变碱基的特异引物, 在野生型植株中未扩增到UGT76C2m的转录产物。而在转基因植株中, UGT76C2m的转录物都有不同程度的表达, 但表达水平在各株系间有所差异。OE-5和OE-6的相对表达量较高, 为5.0倍左右。OE-3的相对表达量较低, 为3.8倍左右(图7)。在随后的实验中, 我们选用了2个高表达株系(OE-5和OE-6)用于分析。

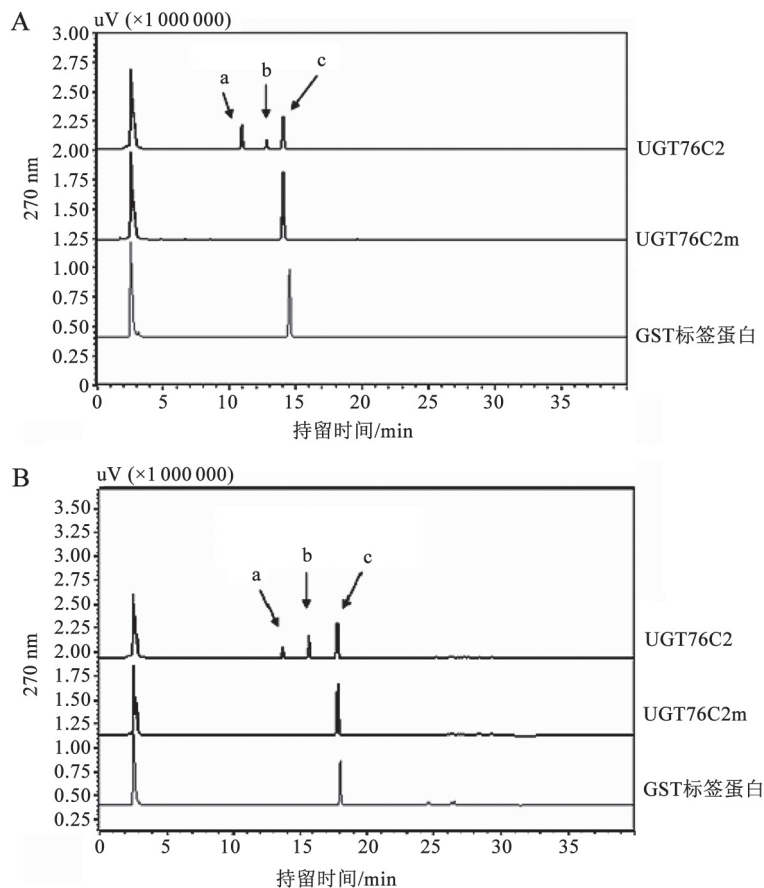


图6 野生型UGT76C2和突变型UGT76C2m的酶活性测定

Fig.6 The enzyme activity assay of wild type UGT76C2 and mutant UGT76C2m

A: z; B: 6-BA。a: 细胞分裂素的 $N^7$ -糖苷; b: 细胞分裂素的 $N^9$ -糖苷; c: 底物细胞分裂素。

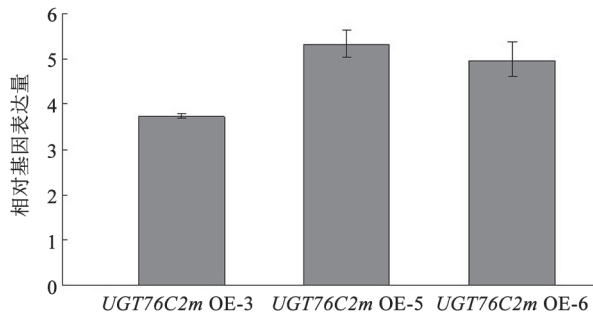


图7 转基因拟南芥不同株系中突变型基因 *UGT76C2m* 的相对表达量

Fig.7 Relative expression levels of *UGT76C2m* in different transgenic *Arabidopsis* lines

## 5 突变型 *UGT76C2m* 过表达转基因植物的表型与生理学分析

首先对突变型 *UGT76C2m* 的2个过表达株系进行了根长实验, 在未添加细胞分裂素的培养基上, 发现过表达体与野生型的根长一致。然而, 当培养基中添加0.5、1和5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA后, 却发现过表达体的根长比对照的更短(图8)。

我们又对突变型 *UGT76C2m* 的2个过表达株系进行了内源细胞分裂素及其糖苷含量的测定。结果发现, 与野生型相比, 内源活性细胞分裂素例如反式玉米素(tZ)、顺式玉米素(cZ)和异戊烯基腺

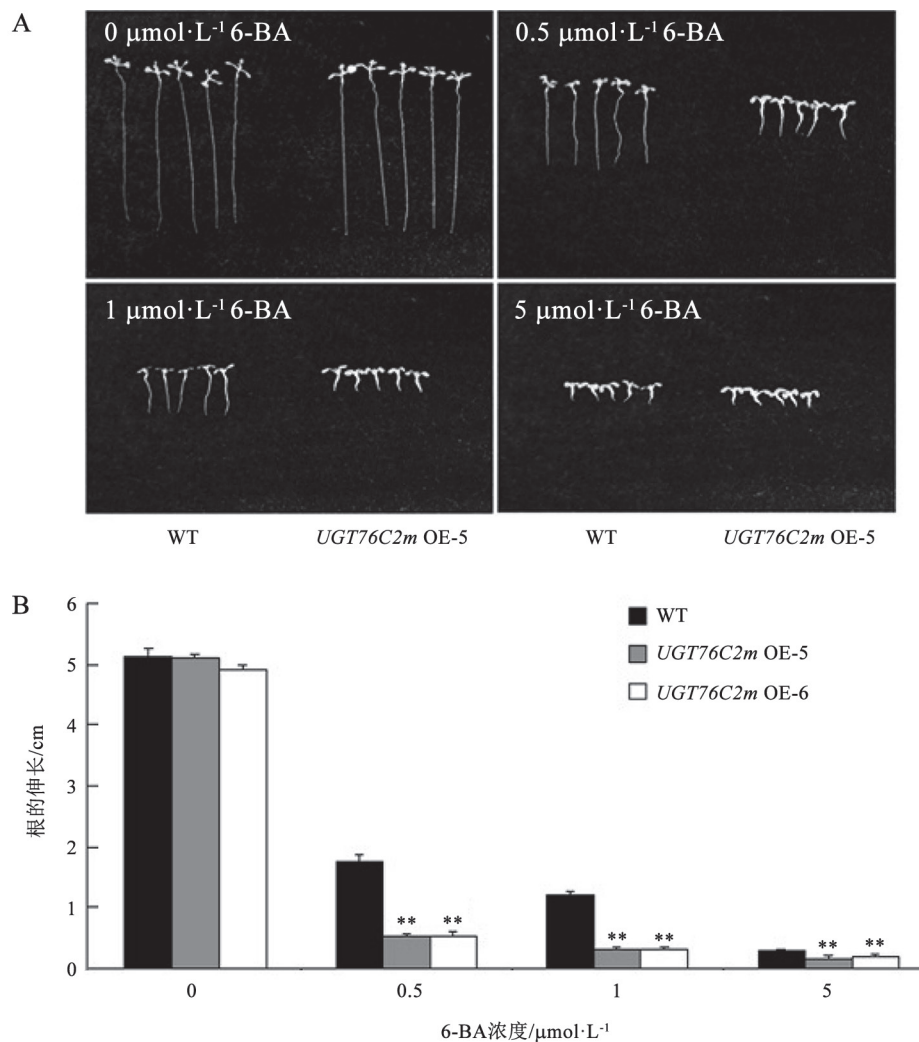


图8 过表达 *UGT76C2m* 植株对外源6-BA的响应

Fig.8 The responses of overexpressing *UGT76C2m* plants to exogenous 6-BA

A: 转基因株系的表型; B: 转基因株系的根长, \*\*表示与野生型相比的差异显著性水平( $P < 0.01$ )。



嘌呤(iP)等的含量并没有发生显著改变。但是,2个最主要的细胞分裂素(tZ和iP)的*N*-糖苷(tZ7G、tZ9G、iP7G和iP9G)在2个过表达系却显著降低(图9)。这一结果恰好印证了我们的推测,即突变型UGT76C2m蛋白在体内竞争性抑制了野生型UGT76C2蛋白的功能,使得细胞分裂素的*N*-糖基化修饰效率大为降低。从另一个方面,也说明突变型UGT76C2m蛋白已经丢失了酶的催化活性,这与体外的酶学检测结果相吻合。

## 讨 论

一般而言,酶蛋白中的保守氨基酸序列是有

着特殊意义的,它们或处于底物结合中心,或处于催化位点,或者为维持蛋白高级结构所必需,这些位点变动后对酶活性和稳定性的影响较大。之前的研究认为,在糖基转移酶N端结构域内,位于第1个 $\alpha$ 螺旋之前的卷曲中有一个保守的组氨酸残基,能使糖的受体(即底物分子)上羟基基团中的氧去质子化,由此产生的电荷被一个天冬氨酸残基平衡,这两个残基在蛋白一级序列中相距100多个氨基酸,共同构成了类似丝氨酸水解酶家族的活性中心(Shao等2005)。Osmani等(2009)通过糖基转移酶蛋白晶体结构的预测和分析认为,在识别和结合底物的N端区域,存在着一个口袋形结构以及疏

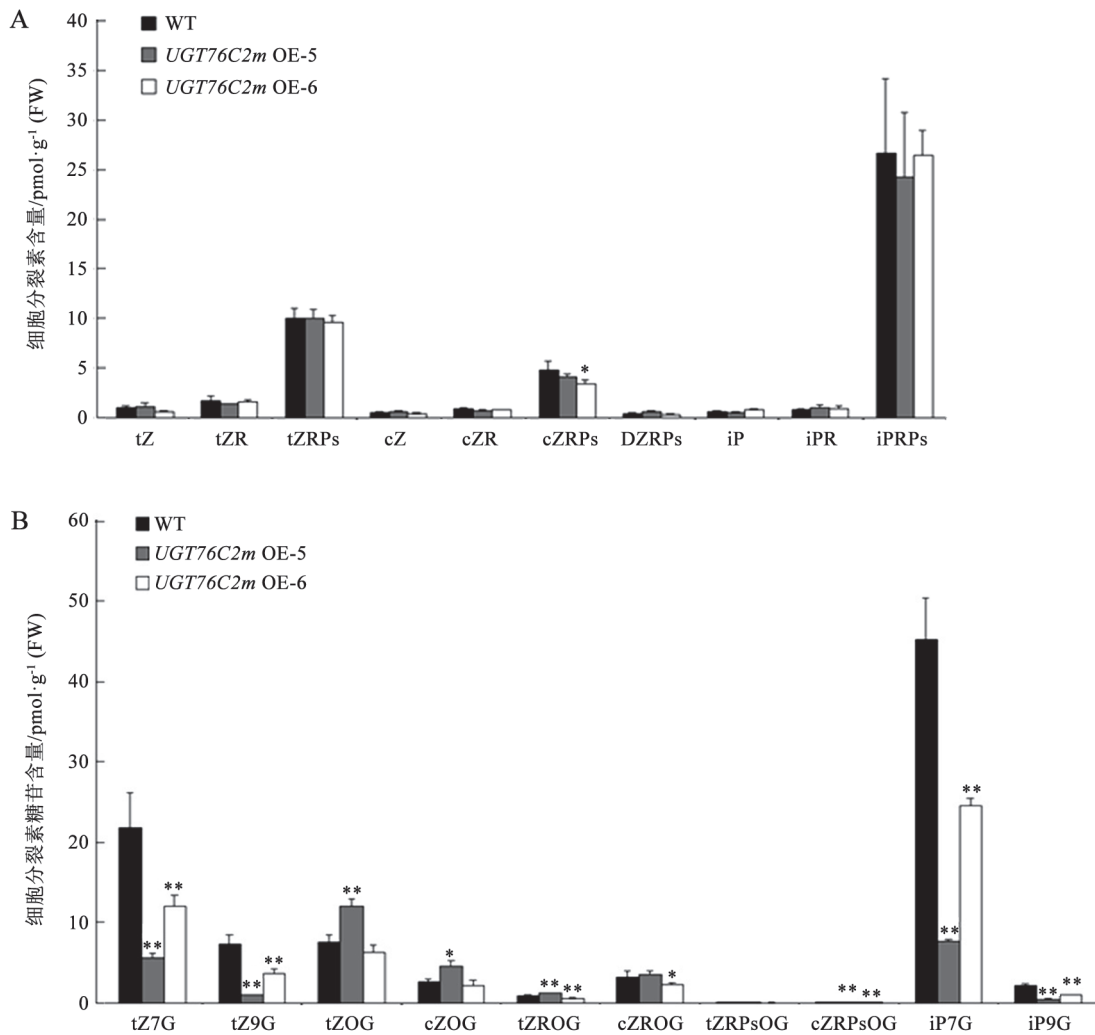


图9 过表达UGT76C2m植株的细胞分裂素及其糖苷的含量

Fig.9 The contents of cytokinins and cytokinin glucosides of overexpressing *UGT76C2m* plants

A: 游离态细胞分裂素含量; B: 各细胞分裂素的*N*-糖苷和*O*-糖苷的含量。\*和\*\*表示与野生型相比的差异显著性水平( $P<0.05$ 和 $P<0.01$ )。



水性的环境。从氨基酸序列可知, 本实验中的UGT76C2突变位点并非是催化活性位点。值得注意的是, 糖基转移酶UGT76C2的N端第31位Leu处在N端的第1个 $\alpha$ 螺旋中间, 推测可能对保持N端口袋结构以及维持疏水性环境起着重要作用。亮氨酸残基是疏水的, 但突变蛋白中的组氨酸残基则是亲水的, 并且非常活泼, 因此这一位点的突变很有可能使口袋结构内的环境发生了变化。我们的离体实验结果表明UGT76C2形成L31H的突变之后, 酶的活性已完全丧失, 这就说明N端第31位Leu(L31)在糖基转移酶UGT76C2催化活性中起着重要作用, 很可能参与了底物的识别和结合。

在根长实验中, 我们使用的细胞分裂素浓度效应是抑制根长, 这从野生型拟南芥的根长变化可以看出。可是为什么突变型UGT76C2m的过表达株系出现了对外源添加的细胞分裂素更加敏感的表现? 根据我们以前的研究, UGT76C2是细胞分裂素的N-糖基化修饰酶, 它的存在能够使得细胞分裂素因修饰而失活, 所以正常基因的过表达体应该对细胞分裂素相对不敏感。相反, 突变体才应该出现对细胞分裂素更加敏感的表现。这些结果在我们早期的研究中已被证实(Wang等2011)。在本研究中, 发现突变型UGT76C2m的过表达体与野生型UGT76C2的过表达体出现了相反的表现, 而与野生型UGT76C2基因的突变体有类似表现。我们推测这可能与陈仲等(2014)在毛白杨的研究结果类似, 即突变型基因在植物体内发挥了显性负突变效应。具体地讲, 是由于体内的突变基因大量表达, 产生了大量的无法行使功能的异常糖基转移酶, 而这些突变的酶与正常的酶在蛋白结构以及蛋白的亚细胞定位上具有相似性, 可能对细胞内正常糖基转移酶产生了竞争性抑制, 影响了正常酶对底物的识别结合或催化活性, 使得正常酶蛋白糖基化修饰细胞分裂素的效率受到很大影响, 因此突变基因的过表达体出现了类似突变体的表现, 造成了根的生长受到更大程度的抑制。

在我们以前的研究中, 已经发现UGT76C2对反式玉米素和异戊烯基腺嘌呤有最大的催化活性(Hou等2004), 并且拟南芥中的活性细胞分裂素是以这两种类型为主, 故本文对包括这两种在内的

几类细胞分裂素的自由态、N-葡糖苷、O-葡糖苷、核苷以及它们的核苷酸进行了测定。结果发现, 几类激素的非糖基化形式在过表达体中与野生型中的含量基本相似, 只有个别种类达到差异显著水平, 反映出植物自身对于活性激素的动态平衡具有很强的调节控制能力。但是, 如果考察细胞分裂素N-糖苷的含量变化, 能够很明显地发现突变型基因被过表达以后, 导致了植物体中的tZ7G、tZ9G、iP7G和iP9G四种N-糖苷的含量比野生型显著降低。这一结果与之前发表的UGT76C2基因的突变体(*ugt76c2*)的测定数据也是相似的, 而与正常基因的过表达体相反(Wang等2011)。这些结果再次说明由于UGT76C2m的突变, 它的酶活性消失, 在植物活体内干扰了正常UGT76C2的功能发挥, 于是过表达体出现了类似突变体的表现与生理特征。

总之, 本实验从一个突变基因入手, 探索了该突变位点对酶活性和转基因植株的影响, 有助于对细胞分裂素糖基转移酶的结构与功能关系进行进一步分析。目前, 由于细菌和植物的糖基转移酶缺乏共性, 对植物中有代表性的糖基转移酶的晶体结构又缺乏了解, 因此对糖基转移酶催化的分子基础知之甚少。从基因突变和氨基酸替换的角度深入研究这些基因的结构和功能关系, 对于了解糖基转移酶的催化机理有重要的理论意义。不仅如此, 随着酶工程与应用技术的飞速发展, 通过对酶分子的结构修饰能够增加其稳定性、改善其溶解度, 甚至通过工程改造可以提高酶的特异性以及催化效率。深入了解糖基转移酶的分子结构和各氨基酸残基的重要性, 研究其作用机理, 将有助于开展酶的工程改造, 对于今后糖基转移酶在植物代谢工程和作物改良上的应用也将提供重要参考依据。

## 参考文献

- 陈仲, 王静澄, 安新民(2014). 外源突变基因*AP1M2*转化毛白杨的研究. 植物生理学报, 50 (3): 331~337
- Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, Poppenberger B (2005). Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (3): 254~263
- Bowles D, Lim EK, Poppenberger B, Vaistij FE (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 567~597

- Cao PJ, Bartley LE, Jung KH, Ronald PC (2008). Construction of a rice glycosyltransferase phylogenomic database and identification of rice-diverged glycosyltransferases. *Mol Plant*, 1 (5): 858~877
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735~743
- Dixon SC, Martin RC, Mok MC, Shaw G, Mok DW (1989). Zeatin glycosylation enzymes in *Phaseolus*: isolation of *O*-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to *O*-Xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiol*, 90 (4): 1316~1321
- Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, Aspeborg H, Djerbi S, Master E, Andersson-Gunnerås S (2006). Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses. *Plant Physiol*, 140: 946~962
- Hou B, Lim EK, Higgins G S, Bowles DJ (2004). *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 279: 47822~47832
- Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H, Takei K, Kuroha T, Mizutani M, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M, Suzuki K et al (2009). Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*, 50 (7): 1201~1214
- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, Sakakibara H (2012). Cytokinin activity of *cis*-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative *cis*-zeatin-*O*-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol*, 160 (1): 319~331
- Li Y, Li P, Wang Y, Dong R, Yu H, Hou B (2014). Genome-wide identification and phylogenetic analysis of family-1 UDP glycosyltransferases in maize (*Zea mays*). *Planta*, 239: 1265~1279
- Lim EK, Bowles DJ (2004). A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J*, 23 (15): 2915~2922
- Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DWS (2001). A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (10): 5922~5926
- Meek L, Martin RC, Shan X, Karplus PA, Mok DWS, Mok MC (2008). Isolation of legume glycosyltransferases and active site mapping of the *Phaseolus lunatus* zeatin *O*-glucosyltransferase ZOG1. *J Plant Growth Regul*, 27 (2): 192~201
- Osmani SA, Bak S, Moller BL (2009). Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry*, 70: 325~347
- Paquette S, Møller BL, Bak S (2003). On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 62 (3): 399~413
- Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S et al (2005). The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (42): 15253~15258
- Rodo AP, Brugiére N, Vankova R, Malbeck J, Olson JM, Haines SC, Martin RC, Habben JE, Mok DWS, Mok MC (2008). Overexpression of a zeatin *O*-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation. *J Exp Bot*, 59: 2673~2686
- Shao H, He X, Achnine L, Blount JW, Dixon RA, Wang X (2005). Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 17 (11): 3141~3154
- Tognetti VB, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, van de Cotte B, De Clercq I, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W et al (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell*, 22: 2660~2679
- Turner JE, Mok DW, Mok MC, Shaw G (1987). Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of *O*-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 (11): 3714~3717
- Veitch YK, Martin RC, Mok DWS, Malbeck J, Vankova R, Mok MC (2003). *O*-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol*, 131 (3): 1374~1380
- Wang B, Jin SH, Hu HQ, Sun YG, Wang YW, Han P, Hou BK (2012). UGT87A2, an *Arabidopsis* glucosyltransferase, regulates flowering time via *FLOWERING LOCUS C*. *New Phytol*, 194: 666~675
- Wang J, Ma XM, Kojima M, Sakakibara H, Hou BK (2011). *N*-Glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 52: 2200~2213
- Yonekura-Sakakibara K, Hanada K (2011). An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant J*, 66 (1): 182~193