

## 植物阿拉伯半乳聚糖蛋白AG糖链的合成

秦丽霞<sup>1</sup>, 李学宝<sup>2</sup>, 许文亮<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>山西省农业科学院棉花研究所, 山西运城044000

<sup>2</sup>华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉430079

**摘要:** 阿拉伯半乳聚糖蛋白(arabinogalactan-proteins, AGPs)是一类高度糖基化的富含羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)的糖蛋白, 广泛分布于植物的细胞壁、质膜和胞外分泌物中, 在植物生长和发育的多个过程中发挥重要作用。主要进行两种翻译后修饰, 首先通过脯氨酸羟化酶催化的脯氨酸羟化, 随后在一些羟脯氨酸的羟基上添加阿拉伯半乳聚糖(arabinogalactan, AG), 以AG为主的多糖可占到AGP分子量的90%, 这意味着多糖链主要决定着AGP与其他分子间的相互作用进而影响其功能。从2010年2个能特异糖基化AGP的糖基转移酶AtFUT4和AtFUT6被鉴定以来, 越来越多参与AGP多糖合成的糖基转移酶被鉴定。本文综述了近10年来参与AGP多糖链合成的糖基转移酶的研究进展, 并结合棉纤维中AGP研究, 讨论了多糖合成的机制及亟待解决的问题, 展望了其发展趋势。

**关键词:** 阿拉伯半乳聚糖; AG糖链; 糖基化; 糖基转移酶

双子叶植物细胞的细胞壁属于I型细胞壁, 近乎等量的纤维素微纤丝和木葡聚糖组成主体框架, 包埋在丰富的由同聚半乳糖醛酸(homogalacturonan, HGA)和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan, RG-I和RGII)组成的果胶网络中。这三个主要成分, 连同丰富的富含羟脯氨酸的糖蛋白[hydroxyproline (Hyp)-rich glycoproteins, HRGPs]形成一个胶质的网络(Yokoyama和Nishitani 2004; Sandhu等2009)。这些组分如何整合成网络, 形成一个有序的结构是植物生物学的一个悬而未解的中心问题。HRGPs代表了植物细胞壁糖蛋白的一个大家族, 根据糖基化程度的不同, 可分为三类: 高度糖基化的阿拉伯半乳聚糖蛋白(arabinogalactan proteins, AGPs)、中度糖基化的伸展蛋白(extensins, EXTs)和轻微糖基化的富含脯氨酸的蛋白(proline-rich proteins, PRPs) (Showalter等2010)。AGP以含有阿拉伯半乳糖苷(arabinogalactan, AG, 主要是II型)多糖而命名, 主要定位于质膜-细胞壁间隙和植物的分泌物中。AGP可能是自然界中翻译后修饰程度最高的蛋白, 包括N末端信号肽序列的切割、由脯氨酸羟化酶(prolyl 4-hydroxylases, P4H)催化的脯氨酸残基的羟化、GPI锚的修饰和羟脯氨酸羟基上的阿拉伯半乳聚糖糖基化(arabinogalactosylation), 以II型AG为主的多糖链占了分子量的90%以上, 而只含有不到10%分子量的蛋白质主链, 这意味着多糖侧链主要决定着AGP与其他分子间的相互作用进而影响其功能的发挥(Showalter等2010; Ellis等

2010)。尽管II型AG糖苷结构高度异质化, 但一般由1个 $\beta$ -1,3-链接的半乳聚糖苷主链组成, 在O-6位置取代有 $\beta$ -1,6-半乳聚糖苷侧链,  $\beta$ -1,6糖侧链的半乳糖残基上通常主要有阿拉伯糖修饰, 也有其他的单糖如鼠李糖(rhamnose)、岩藻糖(fucose)、木糖(xylose)及甲基化的葡萄糖醛酸(glucuronic acid)等的取代(Tan等2010; Tryfona等2012)。

理解AGP合成和功能最大的挑战是它们的高度糖基化。高度糖基化再加上种类繁多使得纯化一个单一的AGP用于结构分析非常困难。AGP中复杂的多糖链将蛋白质主链包在里面, 阻碍了单个AGP的分离, 也阻碍了蛋白质特异的抗体的检测。AGP蛋白质主链中脯氨酸残基高度的羟化和复杂的糖基化使得在微生物中不可能表达重组蛋白。AGP基因家族成员众多[如在拟南芥基因组中含有85个AGP基因, 在水稻中至少有69个成员(Showalter等2010; Ma和Zhao 2010)]导致基因功能冗余, 经常需要同源基因的双突变体或三突变体才能看到表型。对突变体的研究结果显示AGPs参与许多细胞的和生理的过程, 如参与调控植物体细胞胚胎发生, 控制细胞增殖、膨胀、细胞壁加

收稿 2018-03-01 修定 2018-05-04

资助 国家自然科学基金(31671735, 31371234, 31601350)、湖北省自然科学基金(2016CFA071)、中央高校基本科研业务费(CCNUI8TS021)。

致谢 美国佐治亚大学谭利博士对本文提出宝贵意见。

\* 通讯作者(wenliangxu@mail.ccnu.edu.cn)。

厚,参与细胞程序性死亡、伤害应答,参与调控根形态、花粉管生长和植物激素信号途径等(Showalter等2010)。由于许多AGP含有GPI锚定序列,因此又被认为参与与其他膜蛋白相互作用、细胞-细胞识别和信号传导系统等(Nothnagel 1997; Showalter 2001; Seifert和Roberts 2007)。尽管利用突变体的研究使一些AGP的功能得到了阐释,然而,绝大多数的AGP突变体没有明显的表型变化,这也是为什么植物中含有众多的AGP,但有功能表型的只有极少数例子的原因。

研究AGP的功能必需回答一个关键问题:蛋白质主链更重要还是多糖链更重要?实际上早就有研究显示多糖链对AGP的功能非常重要。如*mur1*突变体的根长只有野生型的1/3~1/2,这种根形态的改变不是由于其他细胞壁组分的缺失导致的,而是由于突变体AGP中缺乏岩藻糖致使AGP结构改变而造成的(Van Hengel和Roberts 2002)。在*N. alata*中,完全糖基化的TTS蛋白参与花粉管延伸和影响花粉管引导,而去糖基化的TTS则无此功能(Wu等2000)。关于AGP蛋白质主链的研究,已经取得了不少进展。本文主要从包裹蛋白质主链的AG多糖链入手,综述了目前主要在拟南芥中鉴定的参与糖链合成的糖基转移酶,以及糖链在AGP行使功能过程中发挥的重要作用。

## 1 脯氨酸羟化酶P4Hs

AGP可能是自然界中翻译后修饰程度最高的蛋白,其合成及加工过程主要包括几个步骤: N-端信号肽的切除, Pro到Hyp的羟基化, C端GPI锚的修饰, 及位于Hyp残基上的阿拉伯半乳糖糖基化修饰(Showalter等2010)。首先, AGP核心蛋白骨架和GPI锚分别在在内质网表面合成后被转运至内质网腔; 随后, AGP核心蛋白骨架的N-端信号序列在 $\omega$ 和 $\omega+1$ 之间被剪切, 同时GPI锚通过磷酸乙醇胺结合到C-端GPI信号序列的 $\omega$ 位点; 然后, 核心蛋白骨架上的Pro残基通过P4H进行羟基化反应生成Hyp残基; 随后新生的AGP多肽在糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)的催化作用下在高尔基体或内质网中进行AG-O-糖基化修饰, 最后成熟的AGP通过膜泡运输至细胞表面(Youl等1998; Ellis等2010)。因此, 在AGP的合成过程中, P4H和GT起着至关重要的作用。

AGP核心蛋白骨架上的Pro残基通过P4H进行羟基化反应生成Hyp残基。目前从长春花、菜豆、烟草、康乃馨、拟南芥、西红柿和莱茵衣藻等植物中分离了编码P4H的基因(Hieta和Myllyharju 2002; Tiainen等2005; Yuasa等2005; Keskiäho等2007; Vlad等2010; Fragkostefanakis等2014)。在拟南芥13个P4Hs基因中, *AtP4H1*是第一个克隆并进行生化鉴定的脯氨酸羟化酶(Hieta和Myllyharju 2002)。随后, *AtP4H2*也被克隆出来, 显示与*AtP4H1*不同的底物特异性(Tiainen等2005)。*AtP4H1*过量表达拟南芥除了Hyp含量增加以及一些低氧应答标记基因表达上调外, 还显示其他一些表型变化, 如根毛密度和长度增加, 表皮毛缺失, 种子变小; 此外, 在无碳源条件下, 转基因苗生长只停留在子叶期(Asif等2009)。近来的研究结果显示拟南芥中3个在根中高量表达的基因*AtP4H2*、*AtP4H5*和*AtP4H13*, 它们的T-DNA插入突变体均显示短根毛的表型, 在所有的突变体根中, Hyp含量急剧下降。当过量表达这些羟化酶时, 显示了相反的表型, 根毛变长和根毛密度增加。进一步的研究显示, *AtP4H2*、*AtP4H5*和*AtP4H13*在根毛中除了参与EXTs羟基化修饰过程, 还能以AGP为底物, 参与AGP的Pro残基的羟基化修饰过程, 进而调控根毛细胞膨胀。*AtP4H5*与*AtP4H2*、*AtP4H13*三种脯氨酸羟化酶存在于内质网到高尔基体分泌过程中, 并且*AtP4H5*与*AtP4H2*、*AtP4H13*在高尔基体形成的二聚体是正常完成Pro羟基化所必须的(Velasquez等2011, 2015)。此外, 有报道显示P4Hs对番茄叶子细胞分化及膨大发挥重要作用。番茄*SIP4H1*、*SIP4H7*和*SIP4H9*分别被沉默后, 由于AGP及伸展蛋白含量减少, 促进细胞分化、膨大, 导致植物的根和茎变长、鲜重增加(Fragkostefanakis等2014)。在单细胞绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)基因组中, 有10个P4H基因, 将其中的1个P4H基因*Cr-P4H1*基因利用RNAi的方法沉默后, 导致其细胞壁产生了严重缺陷(Keskiäho等2007)。非常奇怪的是在单一细胞型的莱茵衣藻中竟然有10个P4Hs, 而且尽管莱茵衣藻中还含有其他9个编码P4H的基因, 但它们都不能完全回补*Cr-P4H-1* RNAi突变体细胞壁缺陷的表型(Keskiäho等2007)。从康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)中分离了2个在花瓣中表达的基因*DcP4H1*和*DcP4H2*, 研究显示抑制包括这两个基因在内的

P4Hs, 延长了切花的保鲜期, 暗示脯氨酸羟基化与植物衰老之间有关联; DcP4H1和DcP4H2有不同的催化特性, DcP4H2比DcP4H1在羟基化AGPs和EXTs的脯氨酸残基反应的效率要低得多(Vlad等2010)。我们的实验结果显示, 当用一定浓度的P4H酶抑制剂处理离体胚珠时, 棉纤维伸长受到严重抑制, 说明Pro羟基化与棉纤维生长和发育之间有重要关联(图1)。随后, 我们从棉花基因组中识别了30个可能编码P4H的基因, 表达分析显示许多P4H基因在纤维发育的不同阶段显示特异表达, 进一步表明这些基因在纤维发育过程中发挥作用(图2)。

## 2 参与AG糖链合成的糖基转移酶

AG多糖的O-糖基化修饰主要包括: 在丝氨酸残基上的单半乳糖基化, 在羟脯氨酸残基上添加寡阿拉伯糖或阿拉伯半乳糖苷多糖。连续性Hyp假说(Hyp contiguity hypothesis)指出在连续的Hyp残基上添加阿拉伯糖, 而在聚集但不连续的Hyp残基上添加半乳糖基, 随后在不同的GTs作用下添加半乳糖、阿拉伯糖及其他单糖进而生成阿拉伯半乳糖苷多糖(AG) (Tan等2003)。Tan等(2004)创造性地在烟草中表达1个只编码成簇的非连续Hyp的

合成基因, 解析了1个Hyp-AG的结构。根据AG多糖链的结构和糖基转移酶的特异性, 推测烟草中有15种转移酶参与这个AG多糖链的合成, 它们是: 1个肽链Hyp- $\beta$ -半乳糖基转移酶(AGP-GalTs, 负责将第1个半乳糖加到Hyp残基上进而起始AG多糖的合成), 1个 $\alpha$ -(1,5)阿拉伯糖基转移酶, 4个 $\alpha$ -(1,3)阿拉伯糖基转移酶, 3个 $\beta$ -(1,3)半乳糖基转移酶, 3个 $\beta$ -(1,6)半乳糖基转移酶, 2个 $\beta$ -(1,6)葡糖醛酸基转移酶和1个 $\alpha$ -(1,4)鼠李糖基转移酶。在其他物种中还可能另有其他的转移酶, 因为在拟南芥中,  $\alpha$ -(1,2)岩藻糖基转移酶参与AGP糖基化(Liang等2013; Tryfona等2014)。早期研究显示参与意大利黑麦草(1,6- $\beta$ -Gal)多糖链合成的酶主要位于高尔基体膜(Mascara和Fincher 1982)。随后研究显示AG的糖基化可能在内质网中起始, 但主要发生在高尔基体(Oka等2010)。AG糖链是在糖基转移酶的催化作用下依次将单糖或寡糖添加到AGP蛋白主链上合成的, 因此, 分离鉴定参与AGP合成的糖基转移酶及研究其行使的生物学功能显得非常重要, 同时也为更深入地阐明AGPs的功能提供了一条新的途径。到目前为止, 利用生化、遗传、细胞学的方法, 主要在模式植物拟南芥中分离鉴定了17个在AG糖链合成过程中行使6种不同酶活性的基因(表1)。

### 2.1 $\beta$ -半乳糖基转移酶( $\beta$ -galactosyltransferases, GalTs)

AGP糖基化是由Hyp O- $\beta$ -galactosyltransferase (Hyp-GALIT)起始的, 这个酶负责将第1个半乳糖残基添加到AGP蛋白的Hyp残基上。目前已经分离了8个编码该酶的基因。其中的5个, 分别命名为GALT2、GALT3、GALT4、GALT5和GALT6, 属于GT31家族的一个小亚枝, 每个基因编码的蛋白既含有1个GALT结构域也含有1个GALECTIN结构域。另外的3个基因HPGT1、HPGT2和HPGT3, 位于GT31家族的另一个亚枝, 它们编码的蛋白缺少GALECTIN结构域(Egelund等2011; Basu等2013; Ogawa-Ohnishi和Matsubayashi 2015; Showalter和Basu 2016a, b)。

*galt*和*hpgt*突变体显示多效性表型, 一般在单突变体中表型很微弱但在*galt2galt5*双突变体和*hpgt1hpgt2hpgt3*三突变体中表型很显著。*galt*双突变

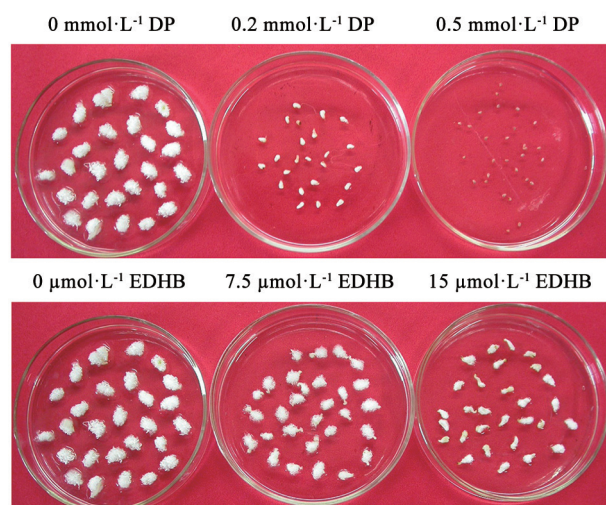


图1 一定浓度的P4Hs抑制剂抑制了棉纤维伸长

Fig.1 Inhibitors of prolyl 4-hydroxylase suppress fiber elongation

上图:  $\alpha, \alpha$ -dipyridyl处理, DP; 下图: ethyl-3,4-dihydroxybenzoate (EDHB)处理。

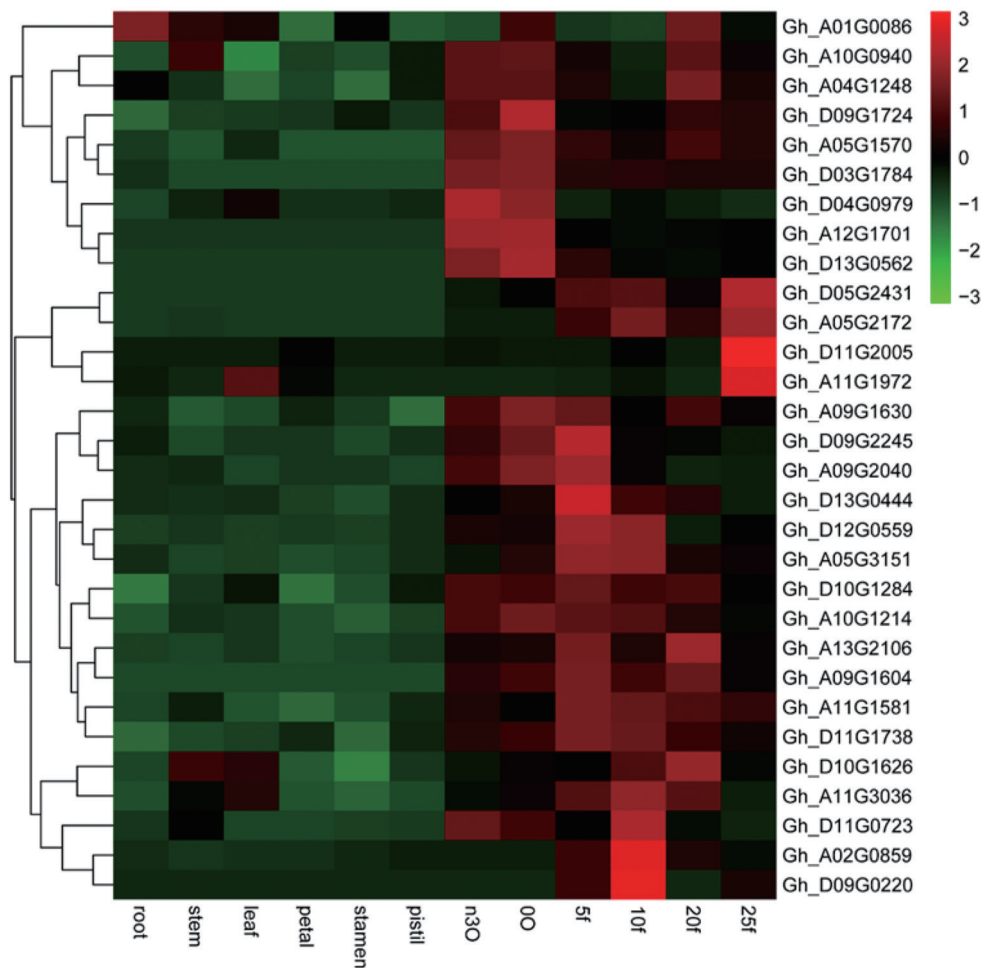


图2 棉花GhP4Hs表达谱

Fig.2 Expression profiling of *GhP4Hs* in different cotton tissues

root: 根; stem: 茎; leaf: 叶; petal: 花瓣; stamen: 雄蕊; pistil: 雌蕊; n30: 开花前3 d的胚珠; 00: 开花当天胚珠; 5f: 开花后5 d的纤维; 10f: 开花后10 d的纤维; 20f: 开花后20 d的纤维; 25f: 开花后25 d的纤维。

体和 $hpgt$ 三突变体中 $\beta$ -Gal-Yariv沉淀的AGPs含量分别下降了43%和70%，此外双突变体和三突变体的Hyp-半乳糖基化活性也分别减少了31%和18%。这些结果显示这两个亚族的酶都可以影响AGP合成。 $galt$ 突变体根毛生长变缓，种皮粘液变少，种子变少，衰老加剧；在盐胁迫下显示根毛生长受阻，根尖肿胀。尽管 $hpgt$ 单突变体没有任何表型，但 $hpgt$ 三突变体显示更长的侧根，更长和更浓密的根毛，肿胀的根尖，变小的叶子，变短的花序茎，育性降低，角果变小。 $galt$ 和 $hpgt$ 突变体表型有相似但也有不同之处，反映GALTs和HPGTs作用不同的AGPs。尽管有这些差别，但这些结果清晰地表明由GALTs和HPGTs起始的链接在Hyp上的AG糖链

对AGP功能是必需的(Ogawa-Ohnishi和Matsubayashi 2015; Showalter和Basu 2016a, b)。

另外，还有3个其他AGP半乳糖基转移酶也被分离了。At1g77810编码 $\beta$ -1,3-GalT，可能参与 $\beta$ -1,3-半乳糖苷主链合成(Qu等2008)。另1个GT31家族基因AtGalT31A，编码 $\beta$ -1,6-GalT，只参与 $\beta$ -1,6-半乳糖苷侧链延长而不参与 $\beta$ -1,3-半乳糖苷主链延伸，其第9外显子上T-DNA插入突变体显示配子体或胚胎致死。1个与AtGalT31A共表达的GT29家族成员AtGALT29A (At1g08280)也具有 $\beta$ -1,6-GalT活性，除了参与AG糖链中的 $\beta$ -1,6-半乳糖侧链的延伸外，还能添加 $\beta$ -1,6-半乳糖到AGP糖苷的 $\beta$ -1,3-半乳糖苷主链上(Geshi等2013; Dilokpimol等2014)。

表1 参与拟南芥AGPs糖基化的糖基转移酶

Table 1 Glycosyltransferases involved with AGP glycosylation in *Arabidopsis thaliana*

CAZy家族	转移酶活性	基因名(基因号)	实验方法及证据	参考文献
GT31	Hyp-GalT	<i>AtGALT2</i> (At4g21060)	HE-P; MA	Basu等2013
		<i>GALT3</i> (At3g06440)	HE-P; MA	Basu等2016, 2015a, b;
		<i>GALT4</i> (At1g27120)		Showalter和Basu 2016a,b
		<i>GALT5</i> (At1g74800)		
		<i>GALT6</i> (At5g62620)		
		<i>HPGT1</i> (At5g53340)	PUR; HE-N; MA; HE-A	Ogawa-Ohnishi和
		<i>HPGT2</i> (At4g32120)		Matsubayashi 2015
		<i>HPGT3</i> (At2g25300)		
GT31	$\beta$ -1,3-GalT	At1g77810	Bioinformatics; HE	Qu等2008
GT31	$\beta$ -1,6-GalT	<i>AtGALT31A</i> (At1g32930)	HE-N; HE-E; MA	Geshi等2013
GT29	$\beta$ -1,6-GalT	<i>AtGALT29A</i> (At1g08280)	HE-N	Dilokpimol等2014b
GT14	$\beta$ -GlcAT	<i>AtGlcAT14A</i> (At5g39990)	HE-P; MA	Knoch等2013; Dilokpimol
		<i>AtGlcAT14B</i> (At5g15050)	HE-P	和Geshi 2014
		<i>AtGlcAT14C</i> (At2g37585)	HE-P	
GT37	$\alpha$ -1,2-FuT	<i>AtFUT4</i> (At2g15390)	HE-B; MA	Wu等2010; Liang等2013;
		<i>AtFUT6</i> (At1G14080)		Tryfona等2014
GT77	AraT	<i>AtRAY1</i> (At1g70630)	HE-N; MA	Gille等2013

HE: 来自于异源表达的蛋白进行酶活分析; A: *A. thaliana* (拟南芥); B: 烟草BY2细胞; E: *E. coli* (大肠杆菌); N: *N. benthamiana* (烟草); P: *P. pastoris* (毕氏酵母); MA: 突变体分析; PUR: 蛋白质纯化分析; Bioinformatics: 生物信息学。

## 2.2 $\beta$ -葡萄糖醛酸转移酶 ( $\beta$ -glucuronosyltransferases, GlcATs)

GT14家族的AtGlcAT14A、AtGlcAT14B和AtGlcAT14C负责将葡萄糖醛酸加到AGP糖链上(Knoch等2013; Dilokpimol和Geshi 2014)。在毕氏酵母中分别表达AtGlcAT14A、AtGlcAT14B和AtGlcAT14C, 体外酶活分析显示它们均具有 $\beta$ -葡萄糖醛酸转移酶活性, 能够将葡萄糖醛酸(GlcA)添加到 $\beta$ -1,6-半乳糖链和 $\beta$ -1,3-半乳糖链上(Dilokpimol和Geshi 2014)。AtGlcAT14A与AtGalT31A共表达, 定位于高尔基体。AtGlcAT14A的T-DNA插入突变体中GlcA的取代水平降低导致出现更长的 $\beta$ -1,3-半乳糖链和 $\beta$ -1,6-半乳糖链。另外其突变体中半乳糖含量显著增加, 阿拉伯糖含量明显减少, 在黑暗条件下, 突变体幼苗的下胚轴和根细胞伸长速率显著增加。突变体所显示出的表型很可能是由于AGP中不同糖组分的改变使AG糖链的动力学构象发生改变所导致(Knoch等2013, 2014)。

## 2.3 $\alpha$ -岩藻糖基转移酶 ( $\alpha$ -fucosyltransferases, FUT)

AtFUT4 (At2g15390)和AtFUT6 (At1G14080)是最先被鉴定的能特异糖基化AGP的GTs。FUT4和FUT6属于GT37家族, 其中AtFUT6定位于高尔

基体。AtFUT4和AtFUT6都具有 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶活性, 并都参与根中AGP的岩藻糖基化, 但叶子中AGP的岩藻糖糖基化只有AtFUT4参与(Wu等2010)。AtFUT4和AtFUT6可以添加岩藻糖残基到AGP侧链的不同位点上。*atfut4*和*atfut6*单突变体的AGPs中岩藻糖含量降低, 而*atfut4/atfut6*双突变体的AGP中岩藻糖缺失(Liang等2010, 2013)。尽管岩藻糖缺失, 在正常生长条件下, 单、双突变体均无明显表型变化, 而仅在盐胁迫条件下, 突变体植株的根变短(Liang等2013; Tryfona等2014)。

## 2.4 阿拉伯呋喃糖糖基转移酶( $\beta$ -arabinofuranosyltransferase, ArafT)

RAY1 (REDUCED ARABINOSE YARIV1)具有阿拉伯呋喃糖糖基(Araf)转移酶活性, 属于GT77家族成员。RAY1定位于高尔基体, *ray1*突变体黄化苗、根及莲座叶的细胞壁单糖组分分析显示阿拉伯糖含量降低了15%~22%。对纯化的Yariv-AGP复合物的单糖组分分析显示*ray1*突变体中阿拉伯糖含量降低了37%, 糖苷键链分析显示2-Araf和3-Araf分别降低了35%和91%。当*ray1*突变体幼苗垂直培养时, 其主根伸长速率比野生型慢, 而萌发未受影响。在土壤中生长的*ray1*突变体的莲座叶

直径比野生型小19%，花序茎发育延迟。这些结果显示AGP的阿拉伯糖基化对正常根生长和植物生长有显著的影响(Gille等2013)。

### 3 AGP糖基转移酶(AGP-glycosyltransferases, AGP-GT)酶活调节

在哺乳动物细胞中,参与蛋白质糖基化的酶相互作用在分泌途径中形成流水线来合成糖链。已有实验证据显示参与植物细胞壁组分合成的GT之间能形成复合物,如果胶的合成(GAUT1和GAUT7)、木葡聚糖的合成(CSLC4、XXT1/XXT2和XXT5)和木聚糖(IRX10、IRX9和IRX14)等的合成。这些GT能和它们自身形成同源二聚体,也能与其他GT或非GT蛋白形成异源二聚体(Atmodjo等2011; Chou等2015; Zeng等2016)。复合物的形成有重要生物学意义,比如激活/稳定催化活性,改变底物特异性,控制内质网/高尔基体定位。此外,GT复合物可为高效和精确生产某些糖苷提供一条流水线。已经证实GAUT1和GAUT7的结合对将GAUT1的催化区定位到高尔基体非常重要(Atmodjo等2011)。但是AG合成过程中AGP-GTs之间是否存在相互作用,如有相互作用对酶活性有什么样的影响还不明晰。近来研究表明AtGAL29A和AtGAL31A、AtGAL29A和AtGAL31A可以自身相互作用形成同源二聚体,同时AtGAL29A和AtGAL31A也可以相互作用形成异源二聚体,而AtGAL31A与AtGlcAT14A不能相互作用。当AtGAL29A和AtGAL31A同时存在时,AtGAL29A和AtGAL31A会优先形成异源二聚体(Geshi 2014)。酶活分析显示单个AtGALT31A和AtGALT29A具有 $\beta$ -1,6-GalT活性,能延伸 $\beta$ -1,6-半乳糖苷,AtGALT29A还能将单个 $\beta$ -Gal加到 $\beta$ -1,3-半乳糖苷上,但活性都较低。当同时表达AtGALT29A和AtGALT31A时,这个异源二聚体能显著增加 $\beta$ -1,6-GalT酶活性。可见AtGALT29A和AtGALT31A通过形成异源二聚体有协作增效作用,推测蛋白-蛋白相互作用比起转录调控来更能适应环境。AtGALT31A和AtGALT29A异源二聚体可能是一种更快速响应 $\beta$ -1,6-半乳糖苷合成的方式,也可能是植物发育过程中精细改变AG糖苷的一种调节机制(Dilokpimol等2014)。

因此,复合物的形成在II型AG中 $\beta$ -1,6-半乳糖苷合成中可能发挥一个调节作用。合成酶之间形

成蛋白复合物对AG合成的调控要比转录调控快,而且这种调控模式使得植物在细胞分化过程中II型AG结构的细微变化成为可能。但是该机制对参与合成II型AG的其他GT有多少普遍性还有待进一步研究。

我们之前的研究表明轻微糖基化的PRP蛋白及高度糖基化的AGP蛋白在棉纤维起始和伸长及次生壁加厚阶段发挥重要作用(Huang等2008, 2013; Xu等2014; 许文亮等2007)。进一步的研究发现某些AGP糖链可能是纤维伸长的决定因子,我们找到了1个GT31家族成员GhGalT1,其编码的蛋白在拟南芥基因组中找到同源基因,但都未见功能报道。抑制GhGalT1基因的表达能够促进棉纤维的伸长发育,导致成熟棉纤维变长,过量表达GhGalT1抑制棉纤维的伸长发育,导致成熟棉纤维变短。GhGalT1具有 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶活性,能形成同源二聚体,也可以与其他GalTs形成异源二聚体,来参与AGPs的糖基化过程,该结果也进一步表明由GhGalT1同源二聚体和异源二聚体介导合成的AG糖链在纤维发育过程中的重要性(Qin等2013, 2017)。

## 4 展望

AG糖链在很大程度上决定了AGP与其他分子之间的相互作用表面,进而影响功能,因此,理解不同的糖是如何加到AGP上的以及对AGP功能发挥的贡献是非常重要的。尽管目前已分离鉴定多个参与AGP合成的GT,但是关于GT与AGP糖链及细胞壁结构、功能之间的确切关系,还有待进一步深入研究。还有许多问题需要在将来的研究中得以解决:(1)目前的工作主要在拟南芥中开展的,在其他重要植物中,分离的GT还很少,识别和鉴定新的起始和延伸多糖链的GTs,能进一步丰富和扩展对AGP合成的理解,阐明糖苷链的生物学作用。(2)每一个AGP-GT确切的酶活性是怎样的?每个酶到底是在糖链的哪一个具体位置添加单糖?每个酶到底作用哪些具体AGPs(AGPs分为五个亚类:传统的AGPs、富含赖氨酸的AGPs、AG肽、FLAs以及嵌合的AGPs)。是否存在偏好或特异性?这些酶如何协同来精细调控糖链的密度、长度和序列?单个AGP糖链在植物生长发育

中的分子作用也未知。(3)除了GALTs之间能形成多酶复合物来调控酶活性外,其他的酶也能形成复合物吗?是否还有其他的酶参与?AGP-GTs与P4Hs之间存在何种关系?形成多酶复合物是否是AG链合成过程中的一种普遍调节机制?不同的AGP-GT相互作用形成的AG糖链如何与果胶、木聚糖等相互作用来影响细胞壁的结构和功能还有待研究。其他翻译后修饰途径(如磷酸化)能否影响酶活?有许多转录因子参与调控植物次生壁的合成,有无转录因子如NAC、MYB等参与AGP-GT酶活的调控?回答上述问题将最终理解AG糖链是如何合成的以及对AGP生物学功能的贡献。

### 参考文献(References)

- Asif MH, Trivedi PK, Misra P, et al (2009). Prolyl-4-hydroxylase (AtP4H1) mediates and mimics low oxygen response in *Arabidopsis thaliana*. *Funct Integr Genomics*, 9 (4): 525–535
- Atmodjo MA, Sakuragi Y, Zhu X, et al (2011). Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (50): 20225–20230
- Basu D, Liang Y, Liu X, et al (2013). Functional identification of a hydroxyproline O-galactosyltransferase specific for arabinogalactan protein biosynthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 288: 10132–10143
- Basu D, Tian L, DeBrosse T, et al (2016). Glycosylation of a fasciclin-like arabinogalactan-protein (SOS5) mediates root growth and seed mucilage adherence via a cell wall receptor-like kinase (FEI1/FEI2) pathway in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 11: e0145092
- Basu D, Tian L, Wang W, et al (2015a). A small multigene hydroxyproline-O galactosyltransferase family functions in arabinogalactan-protein glycosylation, growth and development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 15: 295
- Basu D, Wang W, Ma S, et al (2015b). Two hydroxyproline galactosyltransferases, GALT5 and GALT2, function in arabinogalactan-protein glycosylation, growth and development in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 10: e0125624
- Dilokpimol A, Geshi N (2014). *Arabidopsis thaliana* glucuronosyltransferase in family GT14. *Plant Signal Behav*, 9: e28891
- Dilokpimol A, Poulsen CP, Vereb G, et al (2014). Galactosyltransferases from *Arabidopsis thaliana* in the biosynthesis of type II arabinogalactan: molecular interaction enhances enzyme activity. *BMC Plant Biol*, 14: 90
- Chou YH, Pogorelko G, Young ZT, Zabolina OA (2015). Protein-protein interactions among xyloglucan-synthesizing enzymes and formation of Golgi-localized multiprotein complexes. *Plant Cell Physiol*, 56 (2): 255–267
- Egelund J, Ellis M, Doblin M, et al (2011). Genes and enzymes of the GT31 family: towards *Arabidopsis* the function(s) of the plant glycosyltransferase family members. In: Ulvskov P (ed). *Annu Plant Reviews: Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering*. Vol 14. UK: Wiley-Blackwell, 213–234
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, et al (2010). Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol*, 153: 403–419
- Fragkostefanakis S, Sedeek KEM, Raad M, et al (2014). Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Mol Biol*, 85: 459–471
- Geshi N (2014). Arabinogalactan glycosyltransferases: enzyme assay, protein-protein interaction, subcellular localization, and perspectives for application. *Adv Bot*, doi: 10.1155/2014/434979
- Geshi N, Johansen JN, Dilokpimol A, et al (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 76: 128–137
- Gille S, Sharma V, Baidoo EEK, et al (2013). Arabinosylation of a Yariv-precipitable cell wall polymer impacts plant growth as exemplified by the *Arabidopsis* glycosyltransferase mutant *ray1*. *Mol Plant*, 6: 1369–1372
- Hieta R, Myllyharju J (2002). Cloning and characterization of a low molecular weight prolyl 4-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*. Effective hydroxylation of proline-rich, collagen-like, and hypoxia-inducible transcription factor alpha-like peptides. *J Biol Chem*, 277: 23965–23971
- Huang GQ, Gong SY, Xu WL, et al (2013). A fasciclin-like arabinogalactan protein, GhFLA1, is involved in fiber initiation and elongation of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Physiol*, 161: 1278–1290
- Huang GQ, Xu WL, Gong SY, et al (2008). Characterization of the 19 novel cotton FLA genes and their expression profiling in fiber development and in response to phytohormones and salt stress. *Physiol Plant*, 134: 348–359
- Keskiaho K, Hieta R, Sormunen R, et al (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* has multiple prolyl 4-hydroxylases, one of which is essential for proper cell wall assembly. *Plant Cell*, 19: 256–269
- Knoch E, Dilokpimol A, Geshi N (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Front Plant Sci*, 5: 198
- Knoch E, Dilokpimol A, Tryfona T, et al (2013). A  $\beta$ -glucuronosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* involved in biosynthesis of type II arabinogalactan has a role in cell elongation during seedling growth. *Plant J*, 76: 1016–1029

- Liang Y, Basu D, Pattathil S, et al (2013). Biochemical and physiological characterization of *fut4* and *fut6* mutants defective in arabinogalactan-protein fucosylation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 64: 5537–5551
- Liang Y, Faik A, Kieliszewski M, et al. (2010). Identification and characterization of *in vitro* galactosyltransferase activities involved in arabinogalactan-protein glycosylation in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 154: 632–642
- Ma H, Zhao J (2010). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 61: 2647–2668
- Mascara T, Fincher G (1982). Biosynthesis of arabinogalactan protein in *Lolium multiflorum* (rye grass) endosperm cells. II. *In vitro* incorporation of galactosyl residues from UDP-galactose into polymeric products. *Aust J Plant Physiol*, 9: 31
- Nothnagel EA (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. *Int Rev Cytol*, 174: 195–291
- Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2015). Identification of three potent hydroxyproline O-galactosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant J*, 81: 736–746
- Oka T, Saito F, Shimma Y, et al (2010). Characterization of endoplasmic reticulum-localized UDP-D-galactose: hydroxyl-proline O-galactosyltransferase using synthetic peptide substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 152: 332–340
- Qin LX, Chen Y, Zeng W, et al (2017). The cotton  $\beta$ -galactosyltransferase 1 (*GalT1*) that galactosylates arabinogalactan proteins participates in controlling fiber development. *Plant J*, 89 (5): 957–971
- Qin LX, Rao Y, Li L, et al (2013). Cotton *GalT1* encoding a putative glycosyltransferase is involved in regulation of cell wall pectin biosynthesis during plant development. *PLoS One*, 8: e5911
- Qu Y, Egelund J, Gilson PR, et al (2008). Identification of a novel group of putative *Arabidopsis thaliana*  $\beta$ -(1,3)-galactosyltransferases. *Plant Mol Biol*, 68: 43–59
- Sandhu AP, Randhawa GS, Dhugga KS (2009). Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Mol Plant*, 2: 840–850
- Seifert GJ, Roberts K (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 137–161
- Showalter AM (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci*, 58: 1399–1417
- Showalter AM, Basu D (2016a). Extensin and arabinogalactan-protein biosynthesis: glycosyltransferases, research challenges, and biosensors. *Front Plant Sci*, 7: 814
- Showalter AM, Basu D (2016b). Glycosylation of arabinogalactan-proteins essential for development in *Arabidopsis*. *Commun Integr Biol*, 9 (3): e1177687
- Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, et al (2010). A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol*, 153: 485–513
- Tan L, Leykam JF, Kieliszewski MJ (2003). Glycosylation motifs that direct arabinogalactan addition to arabinogalactan-proteins. *Plant Physiol*, 132: 1362–1369
- Tan L, Qiu F, Lamport DT, et al (2004). Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem*, 279 (13): 13156–13165
- Tan L, Varnai P, Lamport DT, et al (2010). Plant O-hydroxyproline arabinogalactans are composed of repeating trigalactosyl subunits with short bifurcated side chains. *J Biol Chem*, 285: 24575–24583
- Tiainen P, Myllyharju J, Koivunen P (2005). Characterization of a second *Arabidopsis thaliana* prolyl 4-hydroxylase with distinct substrate specificity. *J Biol Chem*, 280 (2): 1142–1148
- Tryfona T, Liang HC, Kotake T, et al (2012). Structural characterization of *Arabidopsis* leaf arabinogalactan polysaccharides. *Plant Physiol*, 160: 653–666
- Tryfona T, Theys TE, Wagner T, et al (2014). Characterisation of FUT4 and FUT6  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-fucosyltransferases reveals that absence of root arabinogalactan fucosylation increases *Arabidopsis* root growth salt sensitivity. *PLoS One*, 9: e93291
- Van Hengel AJ, Roberts K (2002). Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 32: 105–113
- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, et al (2011). O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science*, 332: 1401–1403
- Velasquez SM, Ricardi MM, Poulsen CP, et al (2015). Complex regulation of prolyl-4-hydroxylases impacts root hair expansion. *Mol Plant*, 8 (5): 734–746
- Vlad F, Tiainen P, Owen C, et al (2010). Characterization of two carnation petal prolyl 4 hydroxylases. *Physiol Plant*, 140: 199–207
- Wu HM, Wong E, Ogdahl J, et al (2000). A pollen tube growth promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J*, 22: 165–176
- Wu Y, Williams M, Bernard S, et al (2010). Functional identification of two nonredundant *Arabidopsis* alpha (1,2) fucosyltransferases specific to arabinogalactan proteins. *J Biol Chem*, 285: 13638–13645
- Xu WL, Huang GQ, Wang XL, et al (2007). Molecular characterization and expression analysis of five novel genes encoding proline-rich proteins in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Prog Biochem Biophys*, 34 (5): 509–517 (in Chinese with English abstract) [许文亮, 黄耿青, 王秀兰等(2007). 一类新的编码PRPs基因的分离及其在棉花



- 纤维等组织细胞中的表达. 生物化学与生物物理进展, 34 (5): 509–517]
- Xu WL, Zhang DJ, Wu YF, et al (2013). Cotton PRP5 gene encoding a proline-rich protein is involved in fiber development. *Plant Mol Biol*, 82 (4-5): 353–365
- Yokoyama R, Nishitani K (2004). Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 45 (9): 1111–1121
- Youl JJ, Bacic A, Oxley D (1998). Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7921–7926
- Yuasa K, Toyooka K, Fukuda H, et al (2005). Membrane-anchored prolyl hydroxylase with an export signal from the endoplasmic reticulum. *Plant J*, 41: 81–94
- Zeng W, Lampugnani ER, Picard KL, et al (2016). Asparagus IRX9, IRX10, and IRX14A are components of an active xylan backbone synthase complex that forms in the Golgi apparatus. *Plant Physiol*, 171 (1): 93–109

## Biosynthesis of arabinogalactan (AG) polysaccharides of arabinogalactan-proteins in plants

QIN Li-Xia<sup>1</sup>, LI Xue-Bao<sup>2</sup>, XU Wen-Liang<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cotton, Shanxi Academy of Agricultural Science, Yuncheng, Shanxi 044000, China*

<sup>2</sup>*Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China*

**Abstract:** Arabinogalactan-proteins (AGPs) are highly glycosylated hydroxyproline (Hyp)-rich glycoproteins. They are widely distributed in cell walls, plasma membranes and extracellular secretions of plants and play important roles in various processes of plant growth and development. These proteins undergo extensive post-translational modification, which includes the conversion of proline (Pro) residues to hydroxyproline (Hyp) and subsequent addition of arabinogalactan (AG) polysaccharides to Hyp residues. Given that the carbohydrate moieties typically account for up to 90% of the molecular mass of AGPs, they are probable to define the interactive surface of the molecules and hence their functions. Since AtFUT4 and AtFUT6, two AGP-specific enzymes, were first characterized in Arabidopsis in 2010, more and more glycosyltransferases for AGP glycosylation were characterized. This paper reviews the recent progress on glycosyltransferases involved in AG biosynthesis during the last ten years. In combination with AGP research performed during cotton fiber development, possible mechanism of AG sugar biosynthesis and future research challenges are also discussed.

**Key words:** arabinogalactan-proteins; AG polysaccharide; glycosylation; glycosyltransferases

Received 2018-03-01 Accepted 2018-05-04

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31671735, 31371234, 31601350), Hubei Provincial Natural Science Foundation (2016CFA071), and Self-determined Research Funds of CCNU from the Colleges' Basic Research and Operation of MOE (CCNU18TS021). We thank Dr. Tan Li at University of Georgia for critical reading and helpful suggestions.

\*Corresponding author (wenliangxu@mail.ccnu.edu.cn).