

人体线粒体 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶在酿酒酵母中的表达

韩宝仙, 高晓冬*, 中西秀树

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: O-GlcNAc 是一种广泛存在于蛋白质丝/苏氨酸残基上的动态可逆的蛋白质翻译后修饰方式,广泛分布在细胞浆和细胞核中,参与调节多种细胞途径。蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化与许多疾病密切相关,如糖尿病、神经退行性疾病和癌症等。在体内,O-GlcNAc 动态修饰由 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶(OGT) 和 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶(OGA) 协同完成。OGT 具有 3 种异构体,分别是 ncOGT、mOGT 和 sOGT。目前对于 mOGT 的功能和调节机制尚未清楚。作者在酿酒酵母细胞中表达了人源的 mOGT,发现 mOGT 抑制酵母细胞的生长。在酿酒酵母细胞中 mOGT 具有 O-GlcNAc 糖基化活性,当其活性位点突变后,O-GlcNAc 糖基化活性明显降低,但其同样能抑制酵母细胞生长。作者在酿酒酵母细胞中构建了研究 mOGT 的系统。可以利用该人源化的酵母筛选和 mOGT 相互作用的蛋白质和基因,也可以用来筛选抑制 mOGT 活性的药物,进而研究 mOGT 的功能与调节机制。

关键词: O-GlcNAc 糖基化;人源化;酿酒酵母;线粒体 *N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶(mOGT)

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)09—0987—06

Expression of A Human Mitochondrial *N*-acetylglucosamine Transferase in *Saccharomyces cerevisiae*

HAN Baoxian, GAO Xiaodong*, NAKANISHI Hideki

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification on protein serines/threonines is a dynamic,inducible and abundant post-translational modification,which is found on numerous cytoplasm and nucleus proteins,regulating many cellular process. It has demonstrated that O-GlcNAc plays important roles in some human diseases,such as diabetes and neurodegenerative. O-GlcNAcylation cycle is regulated by O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) in vivo. There are three isoforms of OGT have been found in mammalian cell. They are nucleoplasmic OGT(ncOGT),mitochondrial OGT(mOGT) and shorter OGT(sOGT). We have expressed mOGT in yeast cells with a final goal to study its biological function. A certain number of yeast proteins were clearly revealed in mOGT overexpressed cells,demonstrating the activity of mOGT in yeast

收稿日期: 2015-01-07

基金项目: 教育部科学技术研究重大项目(313027);中央高校基本科研业务费专项项目(JUSRP311A02)。

* 通信作者: 高晓冬(1965—),男,浙江桐乡人,农学博士,教授,博士研究生导师,主要从事细胞糖生物学方面的研究。

E-mail:xdgao@jiangnan.edu.cn

cells. Furthermore, it was found that human mOGT protein inhibited the cell growth of yeast. This humanized yeast strain can be used for studying the biological function and the regulation mechanism of human mOGT.

Keywords: O-GlcNAc modification, humanization, *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondrial O-GlcNAc transferase (mOGT)

Hart 于 1984 年发现了蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化现象^[1]。O-GlcNAc 糖基化是 O-GlcNAc 基团通过 β -O-连糖苷键连接到蛋白质的丝氨酸或苏氨酸上的一种蛋白质翻译后修饰方式。这种糖基化方式存在于所有高等真核生物中,与其他的蛋白质糖基化不同,蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化同时存在于胞核和胞浆中。目前已发现的 O-GlcNAc 修饰蛋白有近千种,而且其数量还在不断增加^[2-3]。O-GlcNAc 糖基化与磷酸化一样,是一个动态的过程,不断伴随着 O-GlcNAc 的添加和移除^[4]。如图 1 所示,O-GlcNAc 糖基化只需要两个酶的参与: β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(OGT)^[5]和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(OGA)^[6],其中 OGT 负责 O-GlcNAc 的添加,OGA 负责 O-GlcNAc 的移除。打破 O-GlcNAc 糖基化的动态平衡,会诱发很多疾病,如糖尿病、神经退性疾病、心血管疾病等^[7]。

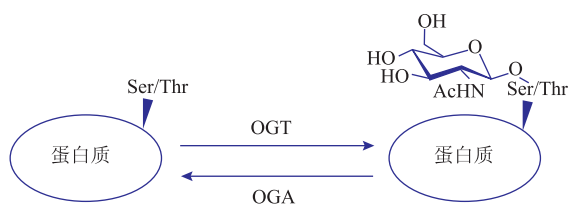


图 1 O-糖基化修饰的方式^[17]

Fig. 1 Modification mode of O-GlcNAcylation^[17]

OGT 几乎存在于所有的组织中,在小鼠和人的体内存在着至少 4 种不同的转录产物及蛋白质亚型。如图 2 所示,OGT 具有两个结构域:一个是含有 12 个 34 肽重复序列(TPR)的 N 端结构域,另一个是具有糖基转移活性的 C 端结构域,C 端结构域由 2 个保守的催化结构域(catalytic domain, C D) C D I、C D II 和 1 个磷酸肌醇结合区域(PPO)组成^[8]。TPR 结构域主要参与调节 OGT 与底物蛋白的结合,能够与不同的蛋白质相互作用^[9]。同时,TPR 结构域对 OGT 的活性存在一定程度的影响。OGT 具有 3 种异构体,分别是 ncOGT(Nucleocytoplasmic

OGT),mOGT (Mitochondrial OGT),sOGT (Shorter OGT),这 3 种异构体的 C 端结构域是相同的,不同在于含有不同数目的 TPR 重复序列,它们分别就有 12,9,2 个 TPR 结构域。ncOGT,sOGT 定位在细胞核和细胞质中,mOGT (Mitochondrial OGT) 定位在线粒体内膜上^[10]。

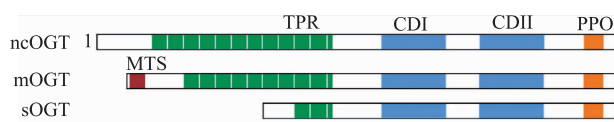


图 2 OGT 的结构示意^[8]

Fig. 2 Schematic diagram of O-GlcNAc transferase (OGT)^[8]

基因组测序表明,人类与酿酒酵母存在着高度的基因保守性,尤其是那些和基本细胞代谢及分裂有关的基因^[11-13]。许多与人类疾病相关的蛋白在酵母中均能找到与其氨基酸序列相似的蛋白质^[14-15]。正是由于基本大分子及细胞生理机制上都存在着保守性,在酵母细胞中表达出的人源性蛋白可以很好地保持原有功能,而且一些人类细胞的生理过程在酵母细胞中也能得以模拟。酵母细胞较之哺乳动物细胞的突出优点就是其基因组的柔韧性和易操作性,而且酵母细胞能为靶蛋白提供一个空白的表达背景,避开了哺乳动物各种复杂的生理过程对靶蛋白研究的干扰。利用酵母系统能很好的研究人类蛋白的功能及调节机制,可以从人的 cDNA 文库中进行高通量的相关基因的筛选。酵母是低等真核生物,其细胞中不存在 OGT。目前对于 mOGT 的研究很少,它的功能及调节机制未知,本研究在酿酒酵母细胞中表达了人源的 mOGT,通过酿酒酵母来研究 mOGT 的功能和调节机制。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae*

YPH499 ,mOGT 表达用质粒 pRS424GAL1pr 及引物相关信息见表 1。

表 1 该研究所用的菌株、质粒和引物

Table 1 Lists of strains, plasmids and primers used in this study

菌株/质粒/引物	说明/基因型/序列 (5'-3')	来源
YPH499	<i>MA Ta, ade2-101, his3-Δ200, leu2-Δ1, trp1-Δ63, ura3Δ52</i>	作者所在实验室保藏
质粒		
pRS424-GALpr	<i>TRPI</i> 标记 多拷贝 含有 GAL1 启动子	本研究
pRS424-GALpr-mOGT	<i>TRPI</i> 标记 多拷贝 含有 GAL1 启动子 含有 mOGT 基因	本研究
pRS424-GALpr-H382A-mOGT	<i>TRPI</i> 标记 多拷贝 含有 GAL1 启动子 含有 H382A-mOGT 基因	本研究
pRS424-GALpr-mOGT-3HA	<i>TRPI</i> 标记 多拷贝 含有 GAL1 启动子 含有 mOGT-3HA 基因	本研究
pRS424-GALpr-H382A-mOGT-3HA	<i>TRPI</i> 标记 多拷贝 含有 GAL1 启动子 含有 H382A-mOGT -3HA 基因	本研究
引物		
HX0324	GGAAACTAGTATGCTGCAGGCTCACTTTTG	本研究
HX0325	GAGGGTCGACTTATGCTGACTCACTGACTT	本研究
HXO 419	AGAATAGGTTGCCTTCTGTGGCTGGTTACCCATACGATGT	本研究
HXO 420	CCTTCTGTGCATCCTGCTCATAGTATGCTATA	本研究
HXO 421	TATAGCATACTATGAGCAGGATGCACAGAAGG	本研究

1.2 试剂

限制性内切酶、DNA T4 连接酶及 KOD DNA 聚合酶:TaKaRa 公司 (大连);PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、脱脂奶粉:上海生工;Clarity™ Western ECL Substrate 显色剂、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒:碧云天生物技术研究;Mouse anti-HA 一抗、Goat anti-mouse IgG-HRP 二抗:北京全式金生物技术有限公司;O-Linked N-Acetylglucosamine Antibody (RL2) 抗体:赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;PVDF 膜:美国伯乐公司;无水甲醇、无水乙醇等其他试剂:进口分装或国产分析纯。

1.3 主要仪器

电子天平、pH 计:梅特勒-托利多仪器公司(上海);恒温培养箱、无菌操作台:上海三发科学仪器公司;电泳仪:北京六一仪器厂;压力蒸汽灭菌器(立式):上海申安器械厂;恒温摇瓶柜:太仓强乐设备厂;PCR 仪、移液枪:Eppendorf 公司;凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司;SDS-PAGE 凝胶电泳仪:美国伯乐公司;半干电转仪:美国伯乐公司;紫外分光光度计、ImageQuantTMLAS 400 mini:美国 GE;荧光倒置显微镜:日本尼康公司。

1.4 培养基及其他溶液配制

1.4.1 LB 培养基 胰蛋白胨 10 g/L,酵母抽提物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂粉 20 g/L(固体培养基)。

1.4.2 YPAD 培养基 酵母抽提物 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,腺嘌呤 30 mg/L,琼脂粉 20 g/L(固体培养基),葡萄糖 20 g/L。

1.4.3 SD 培养基 YNB 6.7 g/L,缺陷型粉末 2 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂粉 20 g/L(固体培养基)。SG 培养基是用半乳糖代替葡萄糖。

1.4.4 8 mol/L 尿素 480.48 g 尿素,8.766 g NaCl,25 mmol/L(pH 8.0),加去离子水定容至 1 L。

1.4.5 TBST 溶液 5 mol/L NaCl 30 mL,1 mol/L Tris·HCl(pH 8.0) 10 mL,Tween20 500 uL,加去离子水定容至 1 L。

1.4.6 5%脱脂牛奶 称取 5g 脱脂奶粉,用 TBST 定容至 100 mL。

1.4.7 转膜缓冲溶液 称取甘氨酸 14.4 g,Tris·HCl 3.03,量取无水甲醇 200 mL,加去离子水定容至 1 L。

1.5 实验方法

1.5.1 细胞生长分析 将质粒 pRS424-GALpr, pRS424-GALpr-mOGT 转化至 YPH499 细胞中,在 SD 色氨酸缺陷平板上筛选阳性克隆。将阳性转化子在以葡萄糖为碳源的色氨酸缺陷培养基培养过夜,至 OD₆₀₀ 为 1.0,不同的转化子取相同数量的细胞,分别以 10 倍梯度稀释细胞,在以葡萄糖和半乳糖为碳源的色氨酸缺陷平板上点板,分别在 30 ℃ 和 37 ℃ 培养细胞,观察细胞的生长情况。

1.5.2 蛋白质提取 将不同细胞接种在 5mL 以葡

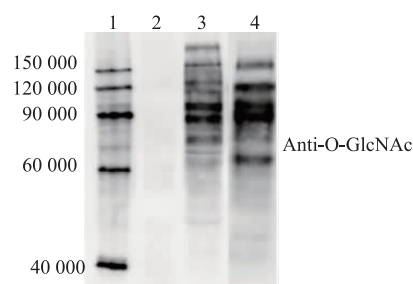
葡萄糖为碳源的 SD 色氨酸培养基上, 于 37 °C 培养至 OD₆₆₀ 为 1.0, 收集细胞转移至 25 mL 以葡萄糖为碳源的 SD 色氨酸培养基上, 于 37 °C 培养至 OD₆₆₀ 为 1.0, 收集细胞转移至 30 mL 以半乳糖为碳源的 SG 色氨酸培养基中, 起始 OD₆₆₀ 为 0.4, 37 °C 培养至 OD₆₆₀ 为 0.8~1.0。不同转化子收集相同数量的细胞, 用 PBS 洗细胞 2 次, 加 8 mol/L 尿素缓冲溶液和蛋白酶抑制剂 PMSF, 加玻璃珠振荡破碎细胞, 15 000 g 离心 10 min, 上清液即为所提取蛋白质。用 BCA 试剂盒测蛋白质浓度。

1.5.3 蛋白质免疫印迹 电泳: 取 100 ug 蛋白质样品上样跑电泳, 浓缩胶电压 80 V, 40 min, 分离胶电压 100 V, 90 min; 转膜: 采用半干式转膜方式, 电压 25 V, 电流 1.0 A, 时间 30 min; 封闭: 5 g/dL 的脱脂奶粉封闭 3 h; 孵育抗体: 一抗 1:3 000, 4 °C 过夜; 二抗 1:5 000 室温 1 h; 显色: ECL 显色液 A 和 B 混匀, 涂于膜上, 用 ImageQuant LAS4000mini 显色。

2 结果与讨论

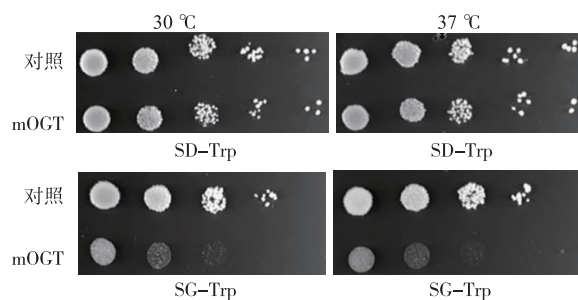
2.1 mOGT 活性表达及其对酿酒酵母细胞生长的影响

作者从人的 cDNA 文库中克隆得到 mOGT, 并将其连接到酵母细胞表达载体 pRS424-GALpr 上, 得到 pRS424-GALpr-mOGT。在酿酒酵母 YPH499 细胞内表达 pRS424-GALpr-mOGT, 研究在酿酒酵母细胞内 mOGT 的活性及 mOGT 对酿酒酵母细胞生长的影响。如图 3(a) 所示, 在以半乳糖为碳源的色氨酸液体培养基上诱导培养 24 h 后, 可检测到细胞内多种蛋白质被 mOGT 糖基化。由此可知, 在酿酒酵母细胞内 mOGT 具有 O-GlcNAc 糖基化活性, 能够糖基化酿酒酵母细胞的多种蛋白质。如图 3(b) 所示, 在以葡萄糖为碳源的色氨酸缺陷培养基上, 无半乳糖 mOGT 不表达, pRS424-GALpr-mOGT 转化子和对照 pRS424-GALpr 转化子生长情况相同, 对酿酒酵母细胞的生长无影响。在以半乳糖为碳源的色氨酸缺陷培养基上, 半乳糖诱导 mOGT 表达, 无论是在 30 °C 还是 37 °C 下, mOGT 的表达都会抑制酿酒酵母细胞的生长。这种抑制作用, 可能正是因为 mOGT 糖基化酵母细胞内的蛋白质而影响它们的结构与功能, 从而影响酿酒酵母细胞的生长。



1. 蛋白质标记; 2. 对照; 3. sOGT; 4. mOGT

(a)



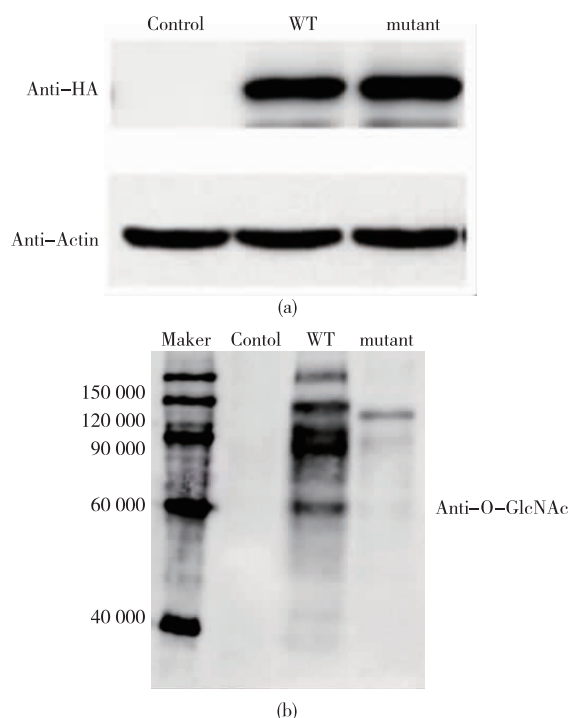
(b)

图 3 mOGT 活性表达及其对酿酒酵母细胞生长的影响

Fig. 3 mOGT shows the O-GlcNAcylation activity in yeast cell and inhibits the growth of yeast

2.2 H382A-mOGT 突变子构建、表达及活性分析

Michael^[16]等研究发现, His498 为 OGT 的催化活性位点, 当 His498 位点突变为 Ala 后, OGT 活性降低至少 95%, 该位点对应于 mOGT 的 His 382 位点。本研究旨在探究酵母细胞中当 mOGT 的活性位点 His 382 突变为 Ala 后, 突变的 mOGT 是否具有活性。利用融合 PCR 的方法, 将 mOGT 的 1144(C), 1145(A), 1146(T) 位的碱基突变为 GCT, 即将 mOGT 382 位的组氨酸(His)突变为丙氨酸(Ala)。将空质粒 pRS424-GALpr, pRS424-GALpr-mOGT-3HA, pRS424-GALpr-H382A-mOGT-3HA 分别转化至酿酒酵母 YPH499 细胞内, 得到的转化子经半乳糖诱导培养 24 h 后, 用 anti-HA 抗体检测 mOGT 及突变体的表达情况, 用 O-Linked N-Acetylglucosamine Antibody (RL2) 检测细胞内的蛋白质糖基化情况, Actin 作为内参蛋白质。如图 4(a) 所示, 当 mOGT 的 His 382 位点突变为 Ala 后, 对于 mOGT 的表达水平与稳定性无影响。但是, 如图 4(b) 所示, 表达 H382A-mOGT 的细胞内被糖基化的蛋白质明显比表达野生型 mOGT 的被糖基化的蛋白质少。由此可知, 当 mOGT 的活性位点 His 382 突变为 Ala 后, H382A-mOGT 活性较野生型 mOGT 活性明显降低。



control 为空质粒 pRS424GALpr, WT 是 pRS424GALpr - mOGT, Mutant 为 pRS424GALpr-H382A-mOGT。

图 4 H382A-mOGT 在酵母细胞中活性明显降低

Fig. 4 H382A-mOGT mutant protein shows decreased activity in yeast cells

2.3 H382A-mOGT 对酿酒酵母细胞生长的影响

本研究已发现 H382A-mOGT 的 O-GlcNAc 糖基化活性明显降低,是否对于酿酒酵母细胞的抑制作用也明显减弱?为探究 H382A-mOGT 对酿酒酵母细胞生长的影响,将质粒 pRS424-GALpr-mOGT、pRS424-GALpr-H382A-mOGT 分别转化至酿酒酵母 YPH499 细胞内,观察突变体对酿酒酵母细胞生长的影响,结果见图 5。在以葡萄糖为碳源的色氨酸缺陷平板上,mOGT 及 H382A-mOGT 未表达,突变体与野生型生长状况相同,均不抑制酿酒酵母细胞的生长。在以半乳糖为碳源的色氨酸缺陷

平板上,经半乳糖诱导后,mOGT、H382A-mOGT 均表达,结果是 H382A-mOGT 同野生型的 mOGT 相同,都能抑制酿酒酵母细胞的生长,且抑制作用强度完全相同。这说明 mOGT 的 O-GlcNAc 糖基化活性可能不是抑制酿酒酵母细胞生长的主要原因,而 mOGT 的 TPR 结构域与细胞内的蛋白质相互作用,从而影响蛋白质的结构与功能,是抑制酿酒酵母细胞生长的主要原因。

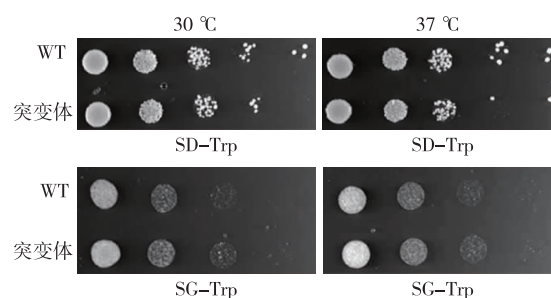


图 5 H382A-mOGT 突变体同样抑制酿酒酵母细胞生长

Fig. 5 H382A-mOGT protein still inhibit the cell growth of yeast

3 结 语

在酿酒酵母细胞中表达了人源的 mOGT,研究发现,在酿酒酵母细胞中 mOGT 具有 O-GlcNAc 糖基化活性,能够糖基化酿酒酵母细胞的蛋白质。可以利用该人源糖基化酵母,通过蛋白质组学的方法来确定酵母细胞被糖基化的蛋白质及位点,进而研究在人体细胞内被 mOGT 糖基化的蛋白质,因此可通过该人源化酵母来研究 mOGT 的功能和调节机制。研究发现,mOGT 的 TPR 结构域与细胞内的蛋白质相互作用是抑制酿酒酵母细胞生长的主要原因,可以通过该现象来研究与 TPR 结构域相互作用的蛋白质,进而研究这些蛋白质对于 mOGT 的生理功能的影响,可进一步研究 mOGT 的调节机制。

参考文献:

- [1] TORRES C R, HART G W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of interact lymphocytes. evidence for O-GlcNAc[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259(6): 330 8-3317.
- [2] WELLS L, VOSSELER K, HART G W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc[J]. *Science*, 2001, 291(5512): 2376-2378.
- [3] HART G W, HOUSLEY M P, SLAWSON C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins[J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017-1022.
- [4] SLAWSON C, HOUSLEY M P, HART G W. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing

- the way we think about signaling networks[J]. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2006, 97(1): 71-83.
- [5] KREPEL L K, HART G W. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase Role of the tetratricopeptide repeats[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1999, 274(45): 32015-32022.
- [6] GAO Y, WELLS L, COMER F I, et al. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(13): 9838-9845.
- [7] YI W, CLARK P M, MASON D E, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism [J]. **Science**, 2012, 337(6097): 975-980.
- [8] RUAN H B, SINGH J P, LI M D, et al. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism [J]. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 2013, 24(6): 301-309.
- [9] IYER S P N, HART G W. Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2003, 278(27): 24608-24616.
- [10] HANOVER J A, YU S, LUBAS W B, et al. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2003, 409(2): 287-297.
- [11] LANDER E S, LINTON L M, BIRREN B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. **Nature**, 2001, 409(6822): 860-921.
- [12] VENTER J C, ADAMS M D, MYERS E W, et al. The sequence of the human genome[J]. **Science**, 2001, 291(5507): 1304-1351.
- [13] GOFFEAU A, BARRELL B G, BUSSEY H, et al. Life with 6000 genes[J]. **Science**, 1996, 274(5287): 546-567.
- [14] BOTSTEIN D, CHERVITZ S A, CHERRY J M. Yeast as a model organism[J]. **Science**, 1997, 277(5330): 1259.
- [15] REITER L T, POTOCKI L, CHIEN S, et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*[J]. **Genome Research**, 2001, 11(6): 1114-1125.
- [16] LAZARUS M B, NAM Y, JIANG J, et al. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate[J]. **Nature**, 2011, 469(7331): 564-567.
- [17] 徐林, 于洪蛟, 管栋, 等. 蛋白分子 O-糖基化的研究进展[J]. **中国细胞生物学学报**, 2013, 35(11): 1689-1694.
- XU Lin, YU Hongjiao, GUAN Dong, et al. Research advances in protein O-GlcNAcylation [J]. **Chinese Journal of Cell Biology**, 2013, 35(11): 1689-1694. (in Chinese)

科 技 信 息

欧盟批准转基因大豆用于食物或动物饲料

欧盟委员会宣布,已批准进口美国孟山都公司研发的 Roundup Ready 2 Xtend 转基因大豆,同时还宣布批准德国拜耳作物科学公司(Bayer CropScience)的 1 款转基因大豆产品。在获得欧盟批准后,这 2 款转基因大豆将被允许在食物或动物饲料中使用,但不得用于种植。欧盟委员会在声明中表示:“这些转基因作物所生产的任何产品都将受制于欧盟严格的标签和可追溯性规定。”

[信息来源]国家质量监督检验检疫总局. 加拿大批准苹果酸氢钠作为被膜剂用于部分食品 [EB/OL]. (2016-7-25). http://jckspaqj.aqsiq.gov.cn/wxts/gwbz/201607/t20160725_470884.htm