

· 热点评 ·

一氧化氮介导蛋白质亚硝基化与甲基化协调植物非生物胁迫的分子机制

王宇, 何奕騫*

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

摘要 一氧化氮(NO)作为一种具有活性的小分子物质参与众多动植物生理活动。在蛋白转录后修饰方面, NO主要以S-亚硝基化(S-nitrosylation)的形式参与。而甲基化作为另一种蛋白翻译后修饰, 在DNA损伤及mRNA翻译方面具有重要作用。虽然近年来有关这2种蛋白翻译后修饰方面的研究成果较多, 但是2种途径之间是否存在相互作用却报道较少。近期, 我国科学家发现NO可以通过S-亚硝基化修饰PRMT5的第125位半胱氨酸, 正向调节该精氨酸甲基转移酶活性。*prmt5-1*突变体表现出严重的发育障碍且对非生物胁迫敏感。通过互补第125位半胱氨酸点突变PRMT5基因, 使之转化为不可被S-亚硝基化修饰的氨基酸后, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株可恢复突变体的发育障碍, 但无法恢复其非生物胁迫敏感表型。实验同时证明, PRMT5蛋白第125位半胱氨酸的S-亚硝基化修饰参与调节NaCl诱导的精氨酸对二甲甲基化。该研究引领了蛋白S-亚硝基化和蛋白甲基化修饰新方向, 开辟了新的研究领域, 同时为相关研究树立了新的榜样。

关键词 拟南芥, 蛋白转录后修饰, 一氧化氮, S-亚硝基化, 蛋白甲基化

王宇, 何奕騫 (2017). 一氧化氮介导蛋白质亚硝基化与甲基化协调植物非生物胁迫的分子机制. 植物学报 52, 681–684.

中科院遗传与发育所左建儒研究员与合作者, 于2017年8月17日在 *Molecular Cell* 杂志发表题为“Nitric Oxide Regulates Protein Methylation During Stress Responses in Plants”的论文, 被选为当期Featured Article。该刊同时发表题为“Modulating the Modulator: Regulation of Protein Methylation by Nitric Oxide”的专文评述(Frungillo and Spoel, 2017)。

左建儒研究团队长期致力于探究一氧化氮(nitric oxide, NO)信号通路调控植物生长发育与胁迫反应的分子机理。

NO是自然界中已知存在的10种最小分子之一, 可以自由地穿过细胞膜(其半衰期只有数秒), 是有机体中广泛存在的一类信号分子并调控众多生物学过程。NO主要通过取代蛋白质中特异半胱氨酸残基中巯基基团的氢离子, 形成共价键相连的亚硝基硫醇(S-NO), 从而发挥其生物学功能(Hess et al., 2005; Astier et al., 2011)。这一过程被称为S-亚硝基化(S-nitrosylation) (图1), 是一种基于氧化还原、可逆的蛋白质翻译后修饰机制, 参与调控几乎所有信号通

路。

已有研究表明, S-亚硝基化参与植物多种生理活动。NO可以通过S-亚硝基化修饰涉及水杨酸途径的关键蛋白NPR1, 从而调控拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对病原侵染的应答反应(Tada et al., 2008)。AtMYB30蛋白在由超敏反应引起的细胞死亡过程中发挥关键作用, 该蛋白Cys-49和Cys-53两个位点的S-亚硝基化会降低其结合DNA的能力(Tavares et al., 2014)。植物进化系统中的保守蛋白S-亚硝基谷胱甘肽还原酶(S-nitrosolutathione reductase, GSNOR)催化S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO)的降解。拟南芥*gsnor1-3*及等位突变体*par2*内GSNO含量和大量蛋白S-亚硝基化水平升高, 同时伴有严重的生长发育障碍(Feechan et al., 2005; Chen et al., 2009)。据报道, 拟南芥APX1的Cys32受到S-亚硝基化修饰会增强其清除H₂O₂的活性(Yang et al., 2015)。ABA信号途径中的蛋白激酶OST1/SnRK2.6活性中心附近的半胱氨酸存在S-亚硝基化修饰, 导致活性中心被封闭, 从而在ABA影响下的气孔调节方面发挥作用(Wang et al., 2015)。

收稿日期: 2017-09-20; 接受日期: 2017-11-02

* 通讯作者。E-mail: yhe@cnu.edu.cn

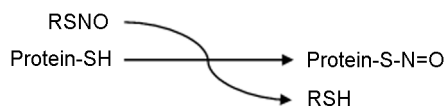


图1 S-亚硝基化反应

Figure 1 The reactions of S-nitrosylation

蛋白质甲基化也是一种非常重要的蛋白转录后修饰作用。甲基化位点多为赖氨酸和精氨酸，不同的氨基酸受到不同类别的甲基化酶催化。其中精氨酸甲基转移酶家族(PRMTs)以精氨酸为底物(Bedford and Clarke, 2009)。拟南芥中PRMTs分为I类和II类，而PRMT5属于II类精氨酸甲基转移酶，参与调控各种生理活动。拟南芥PRMT5缺陷型突变体对盐处理表现为超敏感并伴有严重的发育缺陷(Deng et al., 2010)。

左建儒研究组较早使用质谱技术，通过高通量鉴定和深入系统研究植物体NO对蛋白质S-亚硝基化，发现PRMT5蛋白碱基存在S-亚硝基化现象。随后的生物素-置换分析表明，PRMT5重组蛋白可以被GSNO进行S-亚硝基化修饰；同时，体内实验证明，拟南芥PRMT5在正常生理状态下也会被S-亚硝基化。生物信息学预测分析表明，PRMT5蛋白第125位半胱氨酸(Cys-125)存在S-亚硝基化修饰。为了进一步探明Cys-125 S-亚硝基化对PRMT5功能的影响，他们构建了以缺陷型突变体 $prmt5-1$ 为背景的PRMT5::PRMT5-FLAG和PRMT5::PRMT5^{C125S}-FLAG点突变转基因植株，发现被S-亚硝基化的PRMT5^{C125S}-FLAG蛋白量较对照下降25%，这与体外生化实验(DAN-NAT assay)结果一致，证明PRMT5蛋白第125位半胱氨酸在体外和体内都可以被S-亚硝基化修饰。

随后，他们发现PRMT5蛋白第125位半胱氨酸S-亚硝基化现象对其在甲基转移酶活性调节方面具有重要作用。首先，实验证明PRMT5^{C125S}并未影响到GSNO和NaCl处理下PRMT5在量上的积累，也未影响到其亚细胞定位。在生化实验中，他们发现GSNO显著增加PRMT5重组蛋白甲基转移酶活性，而在PRMT5^{C125S}-FLAG中并未发现这一现象。实验证明，PRMT5蛋白第125位半胱氨酸的S-亚硝基化修饰对于NO调节PRMT5蛋白甲基转移酶活性具有重要作用。

研究结果表明，基因缺陷型突变体 $prmt5-1$ 存在

严重的发育障碍，同时非生物胁迫下表现为超敏感表型。PRMT5和PRMT5^{C125S}转基因植株可以完全恢复缺陷型突变体 $prmt5-1$ 在正常状态下的发育障碍。此外，PRMT5基因可以恢复缺陷型突变体 $prmt5-1$ 对于NaCl和ABA处理下子叶失绿的表型。但是PRMT5^{C125S}转基因植株无法恢复上述表型，表现出对NaCl和ABA超敏感，与突变体 $prmt5-1$ 表型相似。同样，PRMT5^{C125S}转基因植株也只能部分恢复在NaCl处理下根长的表型。研究结果显示，PRMT5蛋白第125位半胱氨酸的S-亚硝基化修饰对于非生物胁迫调节有重要作用。前期实验表明，GSNO和NaCl处理并不影响PRMT5蛋白的积累。

SYM11抗体杂交结果表明，NaCl导致野生型拟南芥中14 kDa左右的蛋白质条带信号增强，而该位置条带在 $prmt5-1$ 突变体中几乎检测不到。PRMT5^{C125S}转基因植株可以部分恢复该蛋白条带的信号，但这些条带的信号却不受NaCl诱导，证明PRMT5蛋白第125位半胱氨酸的S-亚硝基化修饰在NaCl诱导的精氨酸对称二甲甲基化方面具有调节作用。Pre-mRNA *At1G18-160*的检测结果表明，PRMT5^{C125S}与 $prmt5-1$ 基因缺陷型突变体具有相同的表型，即在NaCl处理下会产生不规则pre-mRNA，说明S-亚硝基化对于PRMT5蛋白第125位半胱氨酸的修饰在PremRNA *At1G18160*响应盐胁迫方面具有重要作用。

目前普遍的观点认为，NO在拟南芥响应盐胁迫方面发挥重要作用。高含量的外源GSNO可以提高拟南芥对盐胁迫的抗性。内源GSNO高含量突变体 $gsnor1-3$ 也表现出对NaCl的抗性。同时NaCl处理可以使拟南芥NO水平升高。左建儒研究组用NaCl处理野生型拟南芥，发现PRMT5的S-亚硝基化水平提高，而在 $gsnor1-3$ 突变体中PRMT5的S-亚硝基化水平也升高。同时他们观测到突变体 $gsnor1-3$ 具有更高的anti-SYM11信号。以上结果说明，NO与精氨酸对称二甲甲基化修饰与拟南芥响应盐胁迫有关。进一步实验表明，GSNO处理无法使PRMT5^{C125S}转基因植株获得更高的NaCl和ABA抗性，其表现型与 $prmt5-1$ 基因缺陷型突变体一致。而在野生型以及PRMT5转基因植株中，GSNO处理可以增强植株对NaCl和ABA的抗性。研究表明PRMT5蛋白第125位半胱氨酸的亚硝基化修饰对于PRMT5发挥功能具有非常重要的作用。

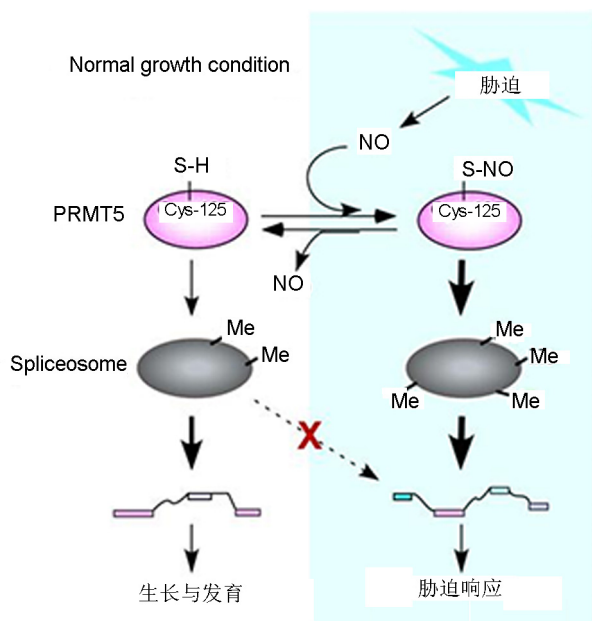


图2 蛋白质亚硝基化与甲基化通路互作调控植物胁迫反应的工作模型(Hu et al., 2017)

Figure 2 The working model of protein S-nitrosylation coordinating with protein methylation during stress in plants (Hu et al., 2017)

综上所述, 左建儒研究组通过生化和分子遗传学数据揭示, 在响应非生物胁迫时, NO通过对PRMT5第125位半胱氨酸残基(Cys-125)特异的亚硝基化修饰来调控其甲基转移酶活性, 即Cys-125为PRMT5感受NO信号所必需; PRMT5甲基转移酶中Cys-125的亚硝基化修饰增强了植物体内精氨酸双对称性甲基化修饰水平, 介导胁迫相关基因pre-mRNA的正常剪切, 从而增强植物对胁迫的耐受性。左建儒研究团队的开创性工作, 首次揭示了NO介导的蛋白质亚硝基化修饰与蛋白质甲基化通路互作、协调植物拮抗非生物胁迫的分子机制(图2)。

值得注意的是, 细胞内的蛋白质活性和相关调控功能与其分布的亚细胞区域及其精确定位密切相关。随着单分子标记活体观察和高分辨率显微技术的不断提高, 我们将可以更清晰准确地解析NO介导的蛋白质修饰后生理生化效应。

上述研究成果由中科院遗传与发育所左建儒研究组、曹晓风研究组、鲍时来研究组与中科院微生物所孔照胜研究组合作完成。左建儒研究组博士后胡济

梁、左建儒研究组与孔照胜研究组联合培养博士后杨焕杰为该论文共同第一作者。该研究还获得国家自然科学基金、中科院战略性先导科技专项、植物基因组国家重点实验室、中国博士后科学基金会与中科院联合资助博士后基金等项目资助。

参考文献

- Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C, Wendehenne D (2011). S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Sci* **181**, 527–533.
- Bedford MT, Clarke SG (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**, 1–13.
- Chen RQ, Sun SL, Wang C, Li YS, Liang Y, An FY, Li C, Dong HL, Yang XH, Zhang J, Zuo JR (2009). The Arabidopsis *PARAQUAT RESISTANT2* gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res* **19**, 1377–1387.
- Deng X, Gu L, Liu C, Lu T, Lu F, Lu Z, Cui P, Pei Y, Wang B, Hu S, Cao X (2010). Arginine methylation mediated by the Arabidopsis homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 19114–19119.
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang YQ, Pallas JA, Loake GJ (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8054–8059.
- Frunzillo L, Spoel SH (2017). Modulating the modulator: regulation of protein methylation by nitric oxide. *Mol Cell* **67**, 535–537.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 150–166.
- Hu JL, Yang HJ, Mu JY, Lu TC, Peng JL, Deng X, Kong ZS, Bao SL, Cao XF, Zuo JR (2017). Nitric oxide regulates protein methylation during stress responses in plants. *Mol Cell* **67**, 702–710.
- Tada Y, Spoel SH, Pajeroska-Mukhtar K, Mou ZL, Song JQ, Wang C, Zuo JR, Dong XN (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Tavares CP, Vernal J, Delena RA, Lamattina L, Cassia R, Terenzi H (2014). S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 810–817.
- Wang PC, Du YY, Hou YJ, Zhao Y, Hsu CC, Yuan FJ, Zhu

XH, Tao WA, Song CP, Zhu JK (2015). Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 613–618.

Yang HJ, Mu JY, Chen LC, Feng J, Hu JL, Li L, Zhou JM, Zuo JR (2015). S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiol* **167**, 1604–1615.

The Molecular Mechanism of Nitric Oxide-mediated S-nitrosylation Coordinating with Protein Methylation During Abiotic Stress Responses

Yu Wang, Yikun He*

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

Abstract Nitric oxide, as a small active particle, is involved in many physiological activities of animals and plants. In protein posttranslational modifications, NO is mainly in the form of (NO)-based S-nitrosylation. Methylation, as another protein transcription modification, also has an important role in DNA damage and mRNA translation. Although these two areas have many published articles in recent years, there are few reports of the interaction between the two approaches. Recently, Chinese scientists have found that NO can positively regulate the activity of PRMT5, an enzyme that catalyzes Arg symmetric demethylation, through S-nitrosylation at Cys-125. The Arabidopsis *prmt5-1* mutant shows severe developmental defects and hypersensitivity in stress responses. A PRMT5^{C125S} transgene with non-nitrosylatable mutation at Cys-125 in a *prmt5-1* background shows recovered developmental defects but not the stress responses. Furthermore, S-nitrosylation at Cys-125 of PRMT5 was found involved in regulating Arg symmetric demethylation induced by NaCl. The study led to a new direction of protein S-nitrosylation and protein methylation modification, which opened up new research fields and set a new example for research in this field.

Key words Arabidopsis, protein posttranscriptional modification, nitric oxide, S-nitrosylation, protein methylation

Wang Y, He YK (2017). The molecular mechanism of nitric oxide-mediated S-nitrosylation coordinating with protein methylation during abiotic stress responses. *Chin Bull Bot* **52**, 681–684.

* Author for correspondence. E-mail: yhe@cnu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)