

SIZ1 和 ESD4 通过与 SnRK2.6 直接
结合介导其可逆 SUMO 化修饰*

付欢欢** 魏建** 李梦瑶 韩永峰***

(河北师范大学生命科学学院, 河北省细胞生物学基础学科研究中心, 河北省分子细胞生物学重点实验室, 石家庄 050024)

摘要 目的 探寻脱落酸 (abscisic acid, ABA) 通路关键组分蔗糖非发酵 1 相关蛋白激酶 2.6 (sucrose non-fermenting1-related protein kinase 2.6, SnRK2.6) 新的翻译后修饰方式, 如 SUMO 化, 为揭示新修饰方式调控 SnRK2.6 的生理功能与分子机理奠定基础。方法 利用酵母双杂交 (yeast two hybrid, Y2H) 及牵拉沉淀实验 (pull down experiment) 检测 SnRK2.6 与 SUMO E3 连接酶 SIZ1 及 SUMO 蛋白酶 ESD4 之间相互作用; 采用体外 SUMO 化修饰体系检测 SnRK2.6 是否被 SUMO 化修饰, 并通过质谱分析其 SUMO 结合位点。通过体外去 SUMO 化实验进一步分析 SUMO 蛋白酶 ESD4 是否能够介导 SnRK2.6 的去 SUMO 化。在拟南芥哥伦比亚生态型 (Columbia 0, Col 0) 及 *siz1* 突变体中, 通过体外降解实验检测 SnRK2.6 蛋白的积累量, 比较其在 Col 和 *siz1* 背景下的稳定性差异。此外, 构建 *snrk2.6 siz1* 双突变体, 观察 ABA 诱导的气孔关闭表型, 分析 *SnRK2.6* 与 *SIZ1* 的遗传学上下位关系。结果 SnRK2.6 与 SIZ1 以及 SUMO 蛋白酶短日照早花基因 4 (early in short days 4, ESD4) 存在直接结合, 结合区域分别在 SIZ1 的 C 端和 ESD4 的 N 端。SnRK2.6 存在 SUMO 化修饰, 且两条特异性 SUMO 化条带, 分子质量均位于 70~100 ku 之间, 但未鉴定到其关键 SUMO 化位点。与酶活性缺失突变体 ESD4^{C448S} 不同, 野生型 ESD4 能够将 SnRK2.6 去 SUMO 化。SnRK2.6 在 *siz1* 中的稳定性显著高于 Col 对照。*SIZ1* 负调控 ABA 诱导的气孔关闭功能, 但该功能完全依赖 *SnRK2.6*, 因此在气孔开闭调控上 *SnRK2.6* 上位于 *SIZ1*。结论 SnRK2.6 存在 SUMO 化修饰, 但具体修饰位点未知。SIZ1 和 ESD4 分别介导 SnRK2.6 的 SUMO 化和去 SUMO 化过程, 二者动态调控其 SUMO 化平衡。SUMO 化负调控 SnRK2.6 的蛋白质稳定性, *SIZ1* 负调控 ABA 诱导的气孔关闭功能, 且该功能有可能是通过 SUMO 化抑制 SnRK2.6 的稳定性实现的。

关键词 SnRK2.6, SUMO 化, SIZ1, ESD4

中图分类号 Q943, Q784

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0012

CSTR: 32369.14.pibb.20260012

植物常常面临各种非生物胁迫, 如干旱、高盐、极端温度 (热、冷) 等, 严重影响植物的生长发育、产量甚至存活^[1-2]。面对这些不利因素, 植物进化出了多种应对策略和手段, 其中脱落酸 (abscisic acid, ABA) 及其信号通路起着关键作用^[1-2]。干旱或渗透胁迫通常会引起植物体内 ABA 的迅速合成, 或将 ABA 从无活性的耦合形式释放出来, 从而激活 ABA 信号转导, 通过推迟萌发、促进休眠、降低生长、关闭气孔等方式适应环境^[1-2]。

ABA 信号通路的核心组分包括如 ABA 受体 (吡唑萘胺抗性蛋白 (pyrabactine resistance, PYR)/吡唑萘胺抗性类似蛋白 (PYR-like, PYL)/脱落酸响应调节组分 (regulatory components of ABA response, RCAR))、2C 型蛋

白磷酸酶 (phosphatase type-2C, PP2Cs), 以及蔗糖非发酵 1 相关蛋白激酶 2 家族 (sucrose non-fermenting1-related kinase 2s, SnRK2s), SnRK2s 家族中, 最主要的 3 个成员是蔗糖非发酵 1 相关蛋白激酶 (sucrose non-fermenting1-related protein kinase, SnRK) 2.2、SnRK2.3 和 SnRK2.6^[3-8]。

在正常生长条件下, 蛋白磷酸酶 PP2Cs 直接结合 SnRK2s 抑制其激酶活性, ABA 信号关闭; 当植物感受到干旱等非生物胁迫时, 迅速积累的 ABA 会通过结合其受体 PYR1/PYL/PCAR 改变受体构象

* 河北省自然科学基金 (C2022205017) 和河北师范大学博士基金 (L2019B23) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 86-15110171633, E-mail: hanyongfeng@hebtu.edu.cn

收稿日期: 2026-01-08, 接受日期: 2026-06-02

并招募PP2Cs形成三元复合物,此时SnRK2s与PP2Cs解离并从抑制状态转为激活状态,从而级联磷酸化激活下游代谢酶类、离子通道、转录因子等,启动ABA信号以应对不利环境^[6-9]。作为ABA信号的核心组分,SnRK2.6除了调控ABA信号外,还调控不依赖ABA信号的其他功能^[10]。如冷胁迫会通过磷酸化激活SnRK2.6,活化的SnRK2.6进而磷酸化C重复结合因子表达诱导因子1(inducer of C-repeat binding factor expression 1, ICE1)及其相关组分,从而增强植物的抗冷能力或抗冷适应^[11-13]。

磷酸化是SnRK2.6激活的关键环节,SnRK2.6存在自我磷酸化和反式磷酸化,两种磷酸化形式相互促进^[14-15]。除了SnRK2.6本身外,能够磷酸化激活SnRK2.6正向调控ABA信号的蛋白激酶中主要还有有丝分裂原蛋白激酶RAF家族(Raf-like kinases, RAFs)^[15-19]。另外,磷酸化不仅能够激活SnRK2.6的激酶活性,还能增强其蛋白质稳定性或抑制其降解^[20],所以磷酸化对于SnRK2.6的功能发挥至关重要。

除了磷酸化外,其他一些翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)也调控着SnRK2.6的活性或稳定性,主要包括泛素化(ubiquitination)、亚硝基化(S-nitrosylation)、过硫化(persulfidation)和硫酸化(sulfation)等。渗透响应高表达基因15(high osmotic stress15, HOS15)是一个隶属于CUL4-DDB1家族的多亚基E3泛素连接酶,HOS15通过多聚泛素化修饰并借助26S蛋白酶体特异性降解脱磷酸化的SnRK2.6,负调控ABA诱导的植物干旱反应^[20],但具体的泛素化位点未见报道。SnRK2.6第137位的半胱氨酸(C137)可以被一氧化氮(NO)亚硝基化修饰,该修饰会抑制SnRK2.6的激酶活性并介导ABA信号脱敏^[21]。然而,SnRK2.6的两个半胱氨酸(C137和C131)也可以被硫化氢(H₂S)过硫化修饰,进而增强SnRK2.6的激酶活性并增强ABA信号^[22-23]。硫酸化会降低SnRK2.6的蛋白质稳定性,削弱ABA信号,但具体修饰位点未知^[24]。有报道表明,在油菜中,体外纯化的SnRK2.6存在谷胱甘肽化修饰(glutathionylation),但该修饰在体内是否真实存在,以及该修饰是否影响SnRK2.6的活性或功能未知^[25]。可见,SnRK2.6存在多种PTMs,这些修饰通过不同的方式或机制调控SnRK2.6的活性或稳定性,进而调控SnRK2.6下游信号的输出。

然而,上述这些修饰的作用都是独立研究发现的,植物面对非生物胁迫时如何协调这些不同修饰的作用,以及是否存在其他别的修饰参与其中,仍有较大的研究空间和研究意义。

SUMO化(SUMOylation)是一种类似于泛素化的三步酶促反应过程。新生的前体SUMO分子首先被SUMO蛋白酶利用其内肽酶活性切割掉C端一段前体序列,暴露出两个连续的甘氨酸残基(gly-gly, GG),成为有活性的成熟SUMO分子^[26]。成熟SUMO分子依次在SUMO E1激活酶、SUMO E2偶联酶、SUMO E3连接酶的顺序催化下被转移到底物特定的赖氨酸残基(lys, K)上,完成底物的SUMO化修饰^[26-27]。SUMO化修饰有时候不需要E3也能完成,E3只是加快了SUMO化的效率或进程^[27-29]。SUMO化修饰的去除仍由SUMO蛋白酶来完成,SUMO蛋白酶能够利用其异肽酶活性将SUMO修饰基因从底物上直接切割下来^[27-28]。SUMO化修饰在真核生物中普遍存在且功能保守,该修饰通过影响蛋白质活性、稳定性、亚细胞定位、蛋白质相互作用等方式调控底物蛋白质的功能^[27-28]。SnRK2.6是否存在SUMO化修饰以及该修饰是否调控其功能值得研究。

本研究利用酵母双杂交(yeast-two hybrid, Y2H)技术筛选发现,SnRK2.6与SUMO E3连接酶SIZ1(SAP and Miz)和SUMO蛋白酶短日照早花基因4(early in short days 4, ESD4)存在直接结合,表明SnRK2.6是一个潜在的SUMO化底物。利用大肠杆菌SUMO化重建体系证实,SnRK2.6的确存在SUMO化修饰,而且ESD4能够将已经SUMO化的SnRK2.6去SUMO化,表明SnRK2.6的SUMO化修饰水平受到SIZ1和ESD4的动态调控。初步的功能验证实验发现,SUMO化对SnRK2.6的稳定性起抑制作用。生理实验发现,SIZ1负调控ABA诱导的气孔关闭功能,但该功能完全依赖SnRK2.6,因此在遗传学上SnRK2.6上位于SIZ1。这些基础数据为后续研究SnRK2.6的SUMO化功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、载体、植物材料

基因克隆和原核表达分别使用大肠杆菌DH5 α 和BL21(DE3)菌株,原核表达的载体使用的是pGEX-6P-1和本实验室改造的pET28a(Novagen),即在pET28a载体N端6 $\times$ His标签之后人为引入2个

连续的FLAG标签(2×FLAG),改造成pET28a-6×His-2×FLAG,简称为pET28a-FLAG,方便后续蛋白质印迹检测。大肠杆菌体外SUMO化修饰重建体系使用了pCDFDuet(Spe⁺)、pACYCDuet(Chl⁺),以及改造的pET28a-FLAG(Kan⁺)三个含有不同抗性基因的原核表达载体。pCDFDuet上引入了SUMO分子和E2偶联酶SCE1的全长蛋白质编码序列(coding sequence, CDS),使其分别带有N端6×His标签和C端S-Tag标签;pACYCDuet上引入了SUMO E1激活酶2个亚基SAE1和SAE2的全长CDS,使其分别带有C端S-Tag标签和N端6×His标签;pET28a-FLAG上可引入待检测底物的全长或部分CDS,使其N端带有6×His和2×FLAG串联标签。

本研究使用的植物材料都是Col生态型,*SnRK2.6*和*SIZ1*的T-DNA插入突变体*snrk2.6*(SALK_008068)和*siz1-2*(SALK_065397)均购自拟南芥生物资源中心(Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC),*snrk2.6 siz1*双突变体来自*snrk2.6*和*siz1-2*的手工杂交和F2代分离,相应的突变体鉴定引物见表S1。

1.2 试剂与药品

基因扩增和载体构建相关试剂多数购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司(Vazyme):基因扩增使用高保真酶Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(P505-d3),一步法无缝克隆试剂盒使用ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit(C112-02),菌落PCR使用2×Rapid Taq Master Mix(P222-04),定点突变使用Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2(C214-02),质粒提取和胶回收分别使用质粒提取试剂盒(DC201)和胶回收试剂盒(DC301)。此外,T4 DNA连接酶(M0202T)购自NEB,各种限制性内切酶均购自Thermo Fisher。

IPTG(I5502)、PMSF(P7626)、AP(A3678)、DTT(D9163)、ATP(A9187)、FLAG peptides(F4799)均购自Sigma,EDTA-free的蛋白酶抑制剂Cocktail(4693132001)购自Roche,Tween20(A600560-0500)和脱脂奶粉(A600669-0250)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,ECL化学发光试剂盒购自Thermo Fisher(A38555),PVDF膜购自Millipore(IPVH00010)。壮观霉素(Spectinomycin, S742-25G)、氯霉素(Chloramphenicol, C252-100G)、羧苄青霉素(Carbenicillin, C346-25G)购自Phyto Technology,

硫酸卡那霉素(Kanamycin Sulfate, K9316)购自北京兰博利德商贸有限公司。Y2H相关试剂如YNB、3-AT、Ade和各种缺陷培养基等均购自Clontech。其他常用试剂和药品购自Amresco和生工生物工程(上海)股份有限公司等。

本研究使用的一抗都是鼠源的单克隆抗体,FLAG抗体(M20008L)和GST抗体(M20007L)购自Abmart,His抗体(HRP Conjugated Anti His-Tag Mouse Monoclonal Antibody, CW0285M)和Actin2抗体(CW0264M)购自北京康为世纪生物科技有限公司,S-Tag抗体(YM3017)购自Immuno Way,山羊抗鼠的二抗 Goat Anti-Mouse IgG-HRP, M21001L)也购自Abmart。蛋白质纯化用的琼脂糖凝胶:His标签纯化凝胶(Ni-NTA Agarose)购自德国Qiagen、GST琼脂糖凝胶(Glutathione-Sepharose beads)购自美国GE,anti-FLAG抗体偶联的琼脂糖凝胶(Anti-FLAG M2 Affinity gel, A2220)购自Sigma。

1.3 载体构建

Y2H的载体构建:将*SIZ1*、*SnRK2.6*、SUMO蛋白酶家族8个成员的全长CDS以及*SIZ1*和*ESD4*的截短结构域序列分别用高保真酶扩增出来,将酵母pGADT7(AD)或pGBKT7(BD)载体用*EcoRI*和*BamHI*双酶切进行线性化,然后通过一步法重组将扩增出来的基因全长或片段无缝克隆到线性化的AD或BD载体上。

原核表达的载体构建:将*SnRK2.6*的全长CDS与线性化的pET28a-FLAG载体(*BamHI*和*StuI*双酶切)进行一步法无缝克隆,构建成pET28a-FLAG-*SnRK2.6*,然后利用定点突变试剂盒在该载体上引入各种点突变以及各种点突变组合,构建成pET28a-FLAG-*SnRK2.6*^{K57/63R}、pET28a-FLAG-*SnRK2.6*^{K142/190R}、pET28a-FLAG-*SnRK2.6*^{K57/63/142/190R}、pET28a-FLAG-*SnRK2.6*^{K57/63/174R}和pET28a-FLAG-*SnRK2.6*^{K57/63/142/174/190R}。将*ESD4*的全长CDS与经过*BamHI*和*XhoI*双酶切的pGEX-6P-1载体利用T4 DNA连接酶连接,构建成GST-*ESD4*,然后在该载体上引入*ESD4*酶活性缺失的C448S点突变,构建成GST-*ESD4*^{C448S}。

上述所有载体构建都经过测序,确保基因序列完全正确并与标签正常融合。构建涉及的引物合成和测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成,构建相关引物序列及用途见表S2。

1.4 酵母双杂交

将构建到AD和BD载体上的质粒分别转入酵母AH109和Y187感受态细胞, 分别在亮氨酸合成缺陷培养基(SD-Leu)和色氨酸合成缺陷培养基(SD-Trp)上筛选阳性克隆。将这两种阳性克隆进行杂交(mating), 即在YPD液体培养液中于1 000 r/min下振荡培养过夜(约12~18 h), 然后取10 μ l杂交产物点种于酵母二缺培养基(SD-Leu-Trp)上。次日将在二缺培养基上筛选出来的阳性克隆进行扩培活化, 再次点种于新的二缺培养基以及三缺培养基(SD-Leu-Trp-His)上, 必要时在三缺培养基上补加不同浓度的3-氨基-1,2,4-三唑(3-AT)以降低背景生长或抑制自激活活性。能够在三缺培养基上生长就意味着两个蛋白质存在相互作用。

1.5 蛋白质的诱导表达与鉴定

将构建到pET28a-FLAG或pGEX-6P-1上的质粒转化BL21(DE3)大肠杆菌感受态, 在卡那霉素抗性平板(LB, 50 mg/L Kan^r)或羧苄青霉素抗性平板上(LB, 50 mg/L Cn^r)筛选阳性克隆, 然后进行IPTG诱导表达。收集诱导表达后的菌体, 用蛋白裂解液重悬, 加入等体积的2 $\times$ 蛋白质上样缓冲液, 于100 $^{\circ}$ C的金属浴中变性5~10 min。离心变性后的蛋白质并转移上清至新的EP管中, 上样、电泳, 通过考马斯亮蓝染色(Coomassie brilliant blue, CBB)检测蛋白质的表达情况, 或者电泳结束后转膜、封闭、孵育一抗(1:5 000; 4 $^{\circ}$ C, 过夜)、漂洗、孵育二抗(1:10 000; 室温1 h)、漂洗, 最后通过化学发光自显影条带, 即利用蛋白质印迹法(Western blot, WB)检测蛋白质的表达情况。

1.6 SUMO化位点预测

常见的SUMO化修饰预测工具有GPS-SUMO、SUMOplot、JASSA, 相应的网站分别为<http://sumosp.biocuckoo.org/online.php/>、<https://www.abcepta.com/tools/>、<http://www.jassa.fr/>。因算法或数据库不同等原因, 3个网站的预测结果常有出入, 有时甚至相差甚远。因此, 尽管有一定参考价值, 但准确性和可靠性都不稳定, 往往需要利用质谱鉴定并结合定点突变实验进一步验证和分析。

1.7 体外SUMO化修饰鉴定

首先将E1(含有SAE1和SAE2)导入BL21并制备成感受态细胞, 接着将同时含有E2和成熟SUMO分子的质粒导入其中, 并制备成感受态细胞, 最后将pET28a-FLAG-SnRK2.6导入同时含有

E1、E2、SUMO分子的BL21感受态细胞中, 并在同时含有氯霉素、壮观霉素和卡那霉素3种不同抗生素的培养基上筛选阳性克隆, 阳性克隆筛选出来后再进行IPTG诱导表达和WB检测。FLAG抗体检测SnRK2.6的表达水平及其SUMO化修饰情况, S-Tag抗体检测E2即SCE1以及E1大亚基SAE1的表达水平。

1.8 SUMO化条带的纯化与质谱鉴定

蛋白质纯化: 首先利用细菌SUMO化修饰体系大量诱导产生SUMO化修饰的SnRK2.6, 然后再进行纯化。纯化分两步走, 第一步是Ni-NTA Agarose纯化, 第二步是Anti-FLAG M2 Affinity gel纯化, 两步纯化可最大限度减少各种非特异性条带, 并特异性富集SnRK2.6本底蛋白及其SUMO化修饰条带。大致流程为: 将200 ml大量诱导的菌液用15 ml蛋白质裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 10%甘油(glycerol), 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L咪唑(imidazole), 1 mmol/L PMSF, 1 protease inhibitor cocktail tablet/50 ml (Roche))重悬, 超声10 min(40% duty, 4 s on/6 s off)后离心取上清, 加入800 μ l Ni-NTA Agarose于4 $^{\circ}$ C下缓慢摇培2 h, 离心去上清后用10 ml漂洗液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 300 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, 20 mmol/L imidazole, 1 mmol/L PMSF)漂洗3次, 接着转至1.5 ml EP管中继续用1.3 ml漂洗液漂洗3~5次, 然后用1 ml洗脱液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, 150 mmol/L imidazole, 1 mmol/L PMSF, 1 protease inhibitor cocktail tablet/50 ml (Roche))洗脱SnRK2.6。在洗脱产物中继续加入100 μ l Anti-FLAG M2 Affinity gel于4 $^{\circ}$ C下缓慢摇培2 h, 离心去上清后用1.3 ml新的漂洗液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 300 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF)漂洗5~10次, 最后加入100 μ l 3 $\times$ FLAG peptides将SnRK2.6及其SUMO化条带洗脱下来。在洗脱产物中加入25 μ l 5 $\times$ 蛋白质上样缓冲液终止反应, 100 $^{\circ}$ C下变性后进行常规SDS-PAGE, CBB染色或WB检测。

质谱鉴定SUMO化修饰位点: 将上述两步走的纯化产物经CBB染色后, 用一次性刀片将分子质量不等的两条SUMO化条带分别切割下来, 分

别置于不同的EP管中,交给中国科学院遗传与发育生物学研究所质谱与代谢组学中心进行SUMO化修饰位点的鉴定。样品处理、鉴定和分析过程参照文献[29],具体过程和主要细节如下。

胶内酶解:将样品置于含有50 mmol/L碳酸氢铵的10 mmol/L的DTT溶液中于56°C下还原1 h;随后转移至含有50 mmol/L碳酸氢铵的55 mmol/L的碘乙酰胺溶液中于避光条件下烷基化45 min;最后加入胰蛋白酶于37°C下过夜酶解。酶解产物用含有5%三氟乙酸和50%乙腈的提取液通过超声处理对凝胶中的多肽进行两次提取。提取液经真空浓缩仪冷冻干燥后,使用StageTip小柱对多肽进行脱盐处理。

液相色谱(liquid chromatography, LC)-串联质谱法(tandem mass spectrometry, MS/MS)分析:将脱盐后的多肽复溶于含有0.1%甲酸的溶液中,采用Thermo Fisher公司生产的LTQ Orbitrap Elite质谱仪联用Easy nLC高效液相色谱系统(1 000纳流)进行LC-MS/MS分析,以数据依赖型采集模式完成检测。多肽经反相液相色谱分离,使用的色谱柱为内径150 μm 、长度250 mm的分析柱,填料为粒径1.9 μm 的C18填料。液相色谱流动相包括A液(含0.1%甲酸)与B液(含0.1%甲酸的纯乙腈溶液),采用非线性梯度洗脱,B液比例在90 min内由3%线性升至30%。在Orbitrap分析器中检测母离子,分辨率设定为240 000(400 m/z),目标离子数设定为 10^6 。选取每张一级质谱图中信号强度最高的20个母离子进行分离、碎裂,并在线性离子阱中完成二级质谱检测。碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)的标准化碰撞能量设定为35。

蛋白质鉴定:采用Thermo Fisher预发版的Proteome Discoverer™ 1.4软件进行数据分析,数据库检索选用拟南芥信息资源库(The Arabidopsis Information Resource, TAIR)提供的蛋白质组序列(NCBI参考序列库, www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/)以及常见的污染蛋白质数据库(如人的角蛋白等)。检索参数设置为:母离子质量偏差为0.05 u,允许胰蛋白酶的漏切位点数最多为2个,检索时限定多肽的最小长度为6个氨基酸、最大长度为144个氨基酸,多肽与蛋白质鉴定的假阳性率均设定为0.01。检索时,将半胱氨酸氨甲酰甲基化(57.021 u)和甲硫氨酸氧化(15.995 u)设为固定修饰,将赖氨酸SUMO化(QTGG-325.139 u;

pyroQTGG-326.123 u)设为可变修饰。利用 Scaffold软件中的Peptide Prophet工具对数据进行质控筛选,对候选SUMO化肽段进行人工图谱核验。鉴定标准为:蛋白质置信度99%,且至少含1条置信度 $\geq 95\%$ 的肽段。

1.9 细菌牵拉沉淀实验

纯化GST-ESD4、pET28a-FLAG-SnRK2.6以及对照pET28a-FLAG-GFP三个蛋白质。将1 μg 的GST-ESD4与1 μg 的pET28a-FLAG-SnRK2.6或1 μg 的pET28a-FLAG-GFP在1 ml蛋白质结合缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 protease inhibitor cocktail tablet/50 ml (Roche))中混合均匀,取出100 μl 作为输入样本(Input),剩下的900 μl 混合液中加入GST琼脂糖凝胶50 μl ,于4°C下孵育2 h,之后离心收集GST凝胶。漂洗干净后加入2 $\times$ 蛋白质上样缓冲液100 μl ,于100°C下变性5 min,离心后上样、电泳、转膜,利用GST抗体检测ESD4,利用FLAG抗体检测SnRK2.6以及GFP,分析ESD4能否特异性结合SnRK2.6。

1.10 体外去SUMO化活性分析

利用细菌SUMO化体系获得SUMO化修饰的SnRK2.6,用Ni-NTA Agarose纯化后取出1 μg 纯化产物,分别与等量的GST空载体蛋白、GST-ESD4以及GST-ESD4^{C448S}在50 μl 去SUMO化反应缓冲液中(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 0.2% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 1 protease inhibitor cocktail tablet/50 ml [Roche])于30°C恒温水浴锅中孵育不同时间,然后加入13 μl 5 $\times$ 蛋白质上样缓冲液终止反应,100°C下变性5 min,离心、上样、10%的凝胶电泳分离,之后WB鉴定。用FLAG抗体检测SnRK2.6的本底表达水平和SUMO化修饰情况,用GST抗体检测GST、ESD4以及ESD4^{C448S}的表达情况。

1.11 SnRK2.6的体外降解实验

使用无细胞缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ATP, 5 mmol/L DTT)分别提取Col和siz1-2七天龄小苗的总蛋白质,离心后将上清与细菌中纯化的FLAG-SnRK2.6蛋白在室温下分别孵育0、3、6、9 h。将各时间点的孵育产物经高温变性后用FLAG抗体检测外源SnRK2.6的蛋白质含量,用Actin2抗体检测内源Actin2的蛋白质含量,并将

Actin2 作为各时间点上样量相对一致的对照。用 ImageJ 软件分析各时间点 SnRK2.6 的相对含量, 将 0 h 的 SnRK2.6 蛋白含量人为设置为 1, 其他时间点的蛋白质含量分别与 0 h 的蛋白质含量进行对比和计算。

1.12 ABA处理的气孔关闭实验

将长日照条件下生长 4 周左右的拟南芥莲座叶剪下, 置于气孔开放液 (10 mmol/L KCl, 100 μmol/L CaCl₂, 10 mmol/L MES, pH 6.2) 中浸泡 2 h 使气孔充分打开, 然后转至含有 20 μmol/L ABA 的新鲜气孔开放液中, 在相同条件 (22℃, 长日照) 下继续浸泡 2 h 以诱导气孔关闭。ABA 处理结束后, 用透明胶带轻轻粘取叶片下表皮, 将其平整贴附于载玻片上, 在显微镜下观察并拍摄表皮图像。每次实验选取至少 30 个气孔, 用 ImageJ 软件测量每个气孔的长度与宽度, 计算气孔开度 (宽

度/长度), 用 prism 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 SnRK2.6与SIZ1直接结合

蛋白激酶 SnRK2.6 是 ABA 信号的核心组分, 多种 PTMs 调控其活性或功能, 为了探究 SnRK2.6 是否存在 SUMO 化修饰, 本研究分别构建了 AD-SIZ1、BD-SIZ1、AD-SnRK2.6、BD-SnRK2.6, 然后利用 Y2H 技术分析 SnRK2.6 与 SIZ1 的结合情况。结果发现, AD-SIZ1 与 BD-SnRK2.6 能够直接结合, 尽管 BD-SnRK2.6 存在一定的自激活活性, 但加大 3-AT 浓度可有效抑制之 (图 1a)。同时发现, BD-SIZ1 也存在较强的自激活活性, 3-AT 很难有效抑制之, 因此按照结构域不同将 SIZ1 人为分成两段, 构建成 BD-SIZ1-N 和 BD-SIZ1-C, 然后再检测其与 AD-SnRK2.6 的结合情况 (图 1b, c)。结果显

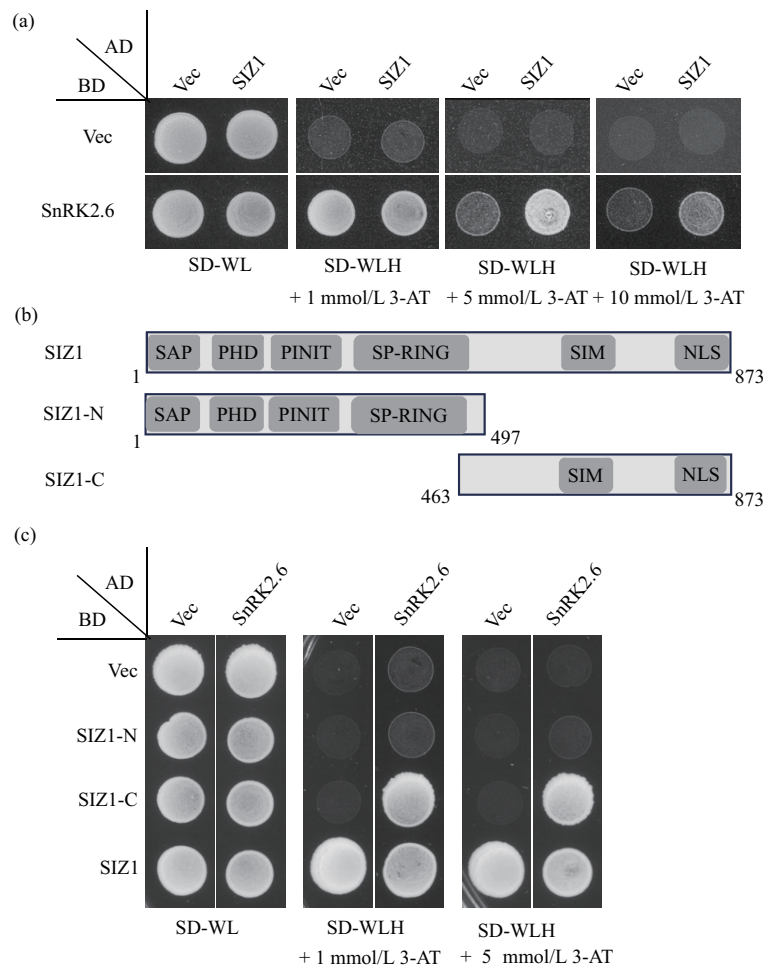


Fig. 1 SnRK2.6 interacts with SIZ1 as determined by yeast two-hybrid assays (Y2H)

(a) BD-SnRK2.6 interacts with AD-SIZ1 in yeast. (b) Schematic representation of SUMO E3 ligase SIZ1 in *Arabidopsis thaliana*. Domains are illustrated by dark grey boxes, including SAP domain, plant homeodomain (PHD), PINIT domain, SP-RING domain, SIM domain and the NLS. (c) AD-SnRK2.6 interacts with the truncated version of SIZ1 (BD-SIZ1-C) in yeast. SIZ1-N: 1-497 aa; SIZ1-C: 463-873 aa. SD-WL, without Trp and Leu; SD-WLH: without Trp, Leu and His.

示, AD-SnRK2.6 特异性结合 BD-SIZ-C 而非 BD-SIZ1-N (图 1b, c)。以上酵母中的实验表明, SnRK2.6 与 SIZ1 能够直接结合, 结合区域位于 SIZ1 的 C 端。

2.2 SnRK2.6 存在 SUMO 化修饰

SnRK2.6 与 SIZ1 的直接结合意味着 SnRK2.6 可能存在 SUMO 化修饰, 因此本研究利用大肠杆菌 SUMO 化修饰体系进行了检测 (图 2a)。结果显示, 不管以 SUMO1、SUMO2 还是 SUMO3 为供体, 总能在 SnRK2.6 本底蛋白 (~55 ku) 上方检测到两条特异性高分子质量条带, 条带大小均介于 70~100 ku 之间, 表明 SnRK2.6 存在 SUMO 化修

饰, 且有条 SUMO 化条带 (图 2b)。从带型和分子质量大小看, SUMO1 和 SUMO2 完全一致, SUMO3 与 SUMO1/2 带型类似但存在分子质量差异, SUMO3 的高分子质量 SUMO 化条带显著低于 SUMO1/2 的高分子质量条带, SUMO3 的低分子质量 SUMO 化条带也略低于 SUMO1/2 的低分子质量条带 (图 2b), 推测与不同 SUMO 分子本身的氨基酸组成以及三维结构有关。在一级结构上, SUMO1 与 SUMO2 存在 94% 的氨基酸一致性, 而 SUMO1 与 SUMO3 仅有 48% 的氨基酸一致性, 与 SUMO3 比, SUMO1 和 SUMO2 在蛋白质结构上更接近些。

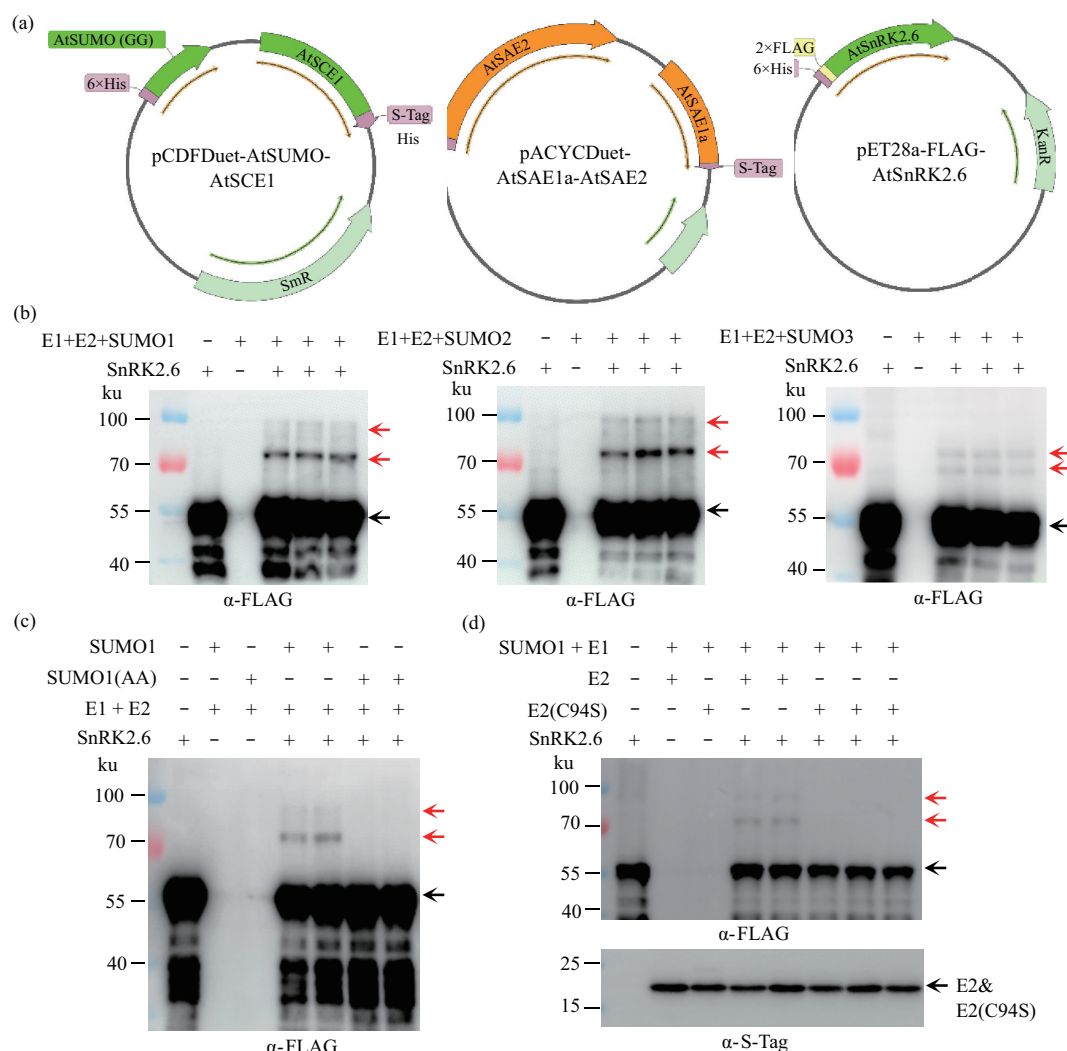


Fig. 2 SnRK2.6 was SUMOylated as determined by the SUMOylation system in *E. coli*

(a) Diagrams of three representative plasmids used for reconstruction of the SUMOylation system in *E. coli*. (b) SnRK2.6 was SUMOylated in *E. coli*. Three plasmids were co-transformed into BL21 (DE3) for protein expression, and the expression level of SnRK2.6 was detected using an anti-FLAG-tag antibody. Black arrows: the predicted protein molecular mass of SnRK2.6, nearly 55 ku; red arrows: two specific SUMOylated bands of SnRK2.6. (c, d) The mutation of active sites in SUMO1 or E2 abolished the SUMOylated bands of SnRK2.6.

为了验证 SnRK2.6 存在 SUMO 化修饰的特异性, 随后将 SUMO 分子的活性位点突变, 即将 SUMO 分子 C 端两个连续的甘氨酸突变为丙氨酸 (GG-AA), 或者将 E2 偶联酶的活性位点突变, 即将 SCE1 的第 94 位的半胱氨酸突变为丝氨酸 (C94S), 然后检测 SnRK2.6 的 SUMO 化情况。结果发现, 不管是 SUMO 分子失活还是 E2 失活后, SnRK2.6 的两条 SUMO 化条带均不复存在 (图 2c, d), 表明两条特异性高分子质量条带的确是 SnRK2.6 的 SUMO 化条带。由于一个成熟 SUMO 分子大概为 12 ku, 从分子质量判断, SnRK2.6 的 SUMO 化位点不止 1 个, 有可能 2 个或多个。

2.3 探究SnRK2.6的SUMO化位点

为了探究 SnRK2.6 具体的 SUMO 化位点, 首先借助 SUMO 化预测工具进行了分析。将 SnRK2.6 蛋白全长序列分别导入 GPS-SUMO、SUMOplot、JASSA 三个 SUMO 预测工具对应的网站, 总共分析出 4 个最有可能的 SUMO 化位点, 即 K57、K63、K142、K190 (图 3a)。将这些位点分别进行单点突变和多点突变, 将 K 突变成 R, 模拟不能发生 SUMO 化的突变, 然后借助细菌 SUMO 化体系依次验证。由于 K57 与 K63 很近, K142 与 K190 较近, 所以优先构建 K57/63R 双突变和 K142/190R 双突变, 最后构建 K57/63/142/190R 四突变。蛋白质诱导表达后的 WB 结果显示, K57/63R 的双突变不影响 SnRK2.6 的迁移率和蛋白质稳定性, K142/190R 的双突变加快了 SnRK2.6 的迁移率并降低了其蛋白质稳定性, K57/63/142/190R 四突变的迁移率与 K142/190R 一致但进一步削弱了 SnRK2.6 的蛋白质稳定性 (图 3b)。细菌 SUMO 化实验发现, K57/63/142/190R 的四突变基本不影响 SnRK2.6 的 SUMO 化带型和强度 (图 3c), 表明这些位点可能不是 SnRK2.6 真实的 SUMO 化位点, 真实的 SUMO 化位点独立于这几个位点之外, 或者 SUMO 化位点较多且存在冗余, 可能还存在区别于这 4 个位点之外的其他 SUMO 化位点, 这需要借助别的手段进一步挖掘。

根据早期文献报道, 将成熟 SUMO1 分子第 89 位的组氨酸突变为精氨酸 (SUMO1-H89R) 人为引入胰蛋白酶切点后, SUMO1 足迹由 25 aa 缩减为 4 aa, 这将显著增加 SUMO 化肽段的富集水平, 方便进行 SUMO 化底物的鉴定和位点检测 [30]。因此, 为了探究 SnRK2.6 真实的 SUMO 化位点, 本研究也采用了同样的策略, 以 SUMO1-H89R 为供体,

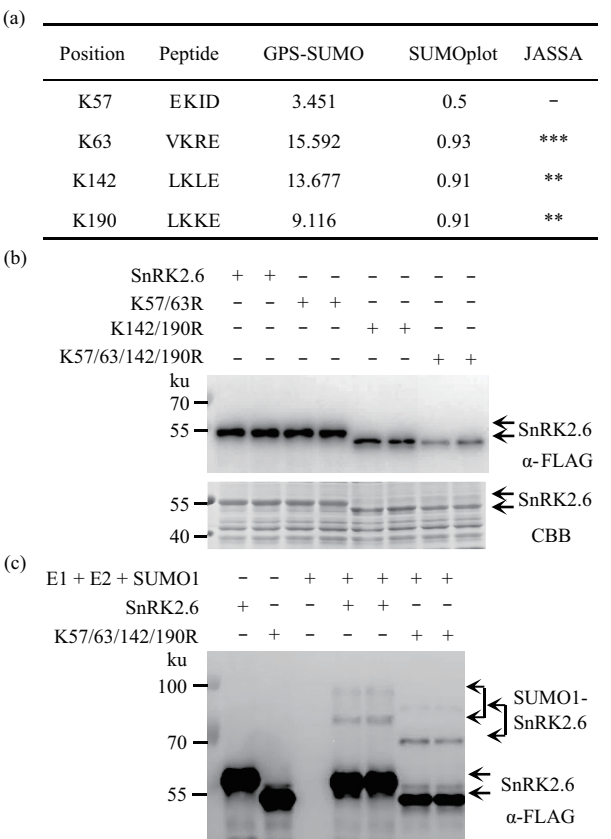


Fig. 3 Exploration of the SUMOylation sites on SnRK2.6 using website prediction and WB analysis

(a) Four putative SUMOylation sites in SnRK2.6 by three websites prediction. The scores or asterisks calculated by different websites indicate divergent possibilities of SUMOylation sites on SnRK2.6. (b) Detection the protein stability and mobility of SnRK2.6 by “K-R” mutation combinations. (c) The SUMOylation bands of SnRK2.6 were nearly not affected by the quadruple mutation “K57/63/142/190R” in SnRK2.6.

大量诱导 SUMO 化修饰的 SnRK2.6 蛋白, 然后利用 Ni-NTA 和 FLAG 抗体偶联的琼脂糖凝胶顺序进行亲和纯化, 最后进行质谱鉴定。CBB 染色和 WB 鉴定锁定了 SnRK2.6 两条特异性 SUMO 化条带的相对位置 (图 4a)。将这两条 SUMO 化条带从 CBB 胶中分别切割下来进行质谱鉴定。结果显示, 高分子质量 SUMO 化条带①鉴定到 K63、K142、K174 三个位点 (图 4b), 低分子质量 SUMO 化条带②鉴定到 K63 和 K142 两个位点 (图 4c)。可见, 质谱共鉴定到 K63、K142、K174 三个 SUMO 化位点, 其中 K63 和 K142 位点存在于前面 SUMO 化网站预测结果中, 只有 K174 是新鉴定到的位点。

构建 K63/142/174R 三突变的 SnRK2.6, 蛋白质诱导表达和 WB 结果显示, K63/142/174 的三突变

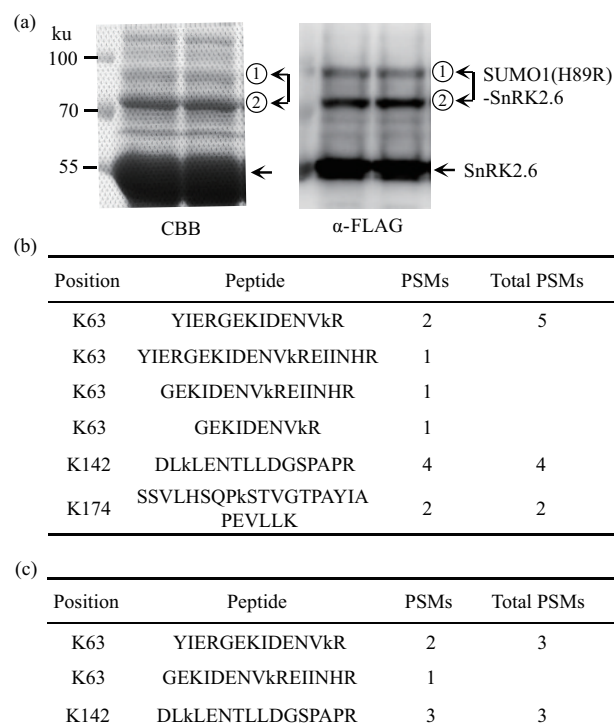


Fig. 4 Exploration of the SUMOylation sites on SnRK2.6 using affinity purification coupled LC-MS/MS analysis

(a) Two specific SUMOylation bands in SnRK2.6 were individually subjected to LC-MS/MS analysis. The SUMOylation bands on SnRK2.6 were subjected to sequential Ni-NTA and anti-FLAG antibody-conjugated beads affinity purification, the eluates were separated by SDS-PAGE, stained by coomassie brilliant blue (CBB) or subjected to immunoblot analysis by anti-FLAG antibody. (b) Three SUMOylation sites on band ① were detected by LC-MS/MS analysis. (c) Two SUMOylation sites on band ② were detected by LC-MS/MS analysis.

加快了 SnRK2.6 的蛋白质迁移率, 削弱了其稳定性, 但不影响 SnRK2.6 的 SUMO 化带型和强度 (图 5a, b)。于是, 又构建了 K57/63/142/174/190R 五突变的 SnRK2.6。K57/63/142/174/190R 的五突变与 K142/190R 和 K63/142/174R 的结果类似, 仅仅是加快了 SnRK2.6 的迁移率 (图 5c), 削弱了其稳定性, 但依旧基本不影响 SnRK2.6 的 SUMO 化带型和强度 (图 5d)。这些结果表明, 网站预测和质谱鉴定得到的这 5 个位点仍然不是 SnRK2.6 真实的 SUMO 化位点, 或者还存在独立于这 5 个位点之外的其他 SUMO 化位点。

2.4 SnRK2.6 与 ESD4 直接结合

SUMO 化修饰是可逆的, 既然 SIZ1 能够与 SnRK2.6 直接结合 (图 1), 那就一定存在与

SnRK2.6 结合并介导其去 SUMO 化的 SUMO 蛋白酶。因此, 将已知的 8 个 SUMO 蛋白酶的全长 CDS 全部构建到酵母 BD 载体上 (BD-ESD4 对酵母有毒性, 转化后酵母不能存活, 按照结构域打断为 N 端调节域和 C 端酶活性域再转化后酵母能够正常生长), 然后与 AD-SnRK2.6 一对一验证。结果显示, 在所有检测的 8 个 SUMO 蛋白酶成员中, 只有 BD-ESD4-N 与 AD-SnRK2.6 存在特异性结合 (图 6a)。为了验证二者结合的真实性, 随后又将 GST-ESD4、pET28a-FLAG-SnRK2.6 以及阴性对照 pET28a-FLAG-GFP 三个蛋白质在大肠杆菌 BL21 中纯化出来, 开展了体外牵拉沉淀实验。结果显示, 在 GST 抗体的免疫沉淀产物中, SnRK2.6 而非 GFP 能够被 FLAG 抗体检测到 (图 6b), 表明 ESD4 与 SnRK2.6 的确能够特异性直接结合。

2.5 ESD4 能够将 SnRK2.6 去 SUMO 化

鉴于 ESD4 能够与 SnRK2.6 直接结合, 于是就开展了体外去 SUMO 化实验, 分析 ESD4 能否将 SUMO 化的 SnRK2.6 去 SUMO 化。利用细菌 SUMO 化体系富集 SUMO 化修饰的 SnRK2.6, 然后与空载体 GST、实验组 GST-ESD4 以及 SUMO 蛋白酶活性缺失形式的 GST-ESD4^{C448S} 分别孵育不同时间, 利用 FLAG 抗体检测 SnRK2.6 的本底表达水平和 SUMO 化修饰情况, 利用 GST 抗体检测 GST、GST-ESD4 以及 GST-ESD4^{C448S} 的蛋白质表达水平。结果显示, 在 1 h 内, GST-ESD4 就能够将 SnRK2.6 的两条 SUMO 化条带完全去除, 而空载体 GST 和 GST-ESD4^{C448S} 没有任何去除效果, 孵育 2 h 也是类似结果 (图 6c), 这表明 ESD4 的确是一个有活性的 SUMO 蛋白酶, 能够将 SnRK2.6 去 SUMO 化, 且去 SUMO 化的功能依赖其 SUMO 蛋白酶活性的存在。

2.6 SUMO 化抑制了 SnRK2.6 的蛋白质稳定性

为了检测 SUMO 化是否影响 SnRK2.6 的蛋白质功能, 本研究优先检测了 SnRK2.6 的蛋白质稳定性。SIZ1 是拟南芥中仅有的两个 SUMO E3 连接酶之一, 其基因缺失突变体常被用作模拟底物 SUMO 化缺失/缺陷的研究模型。因此, 本研究利用无细胞缓冲液 (cell-free buffer) 分别提取 Col 和 *siz1-2* 七天龄小苗的总蛋白质, 与体外纯化的 FLAG-SnRK2.6 蛋白于室温下孵育不同时间, 比较 FLAG-SnRK2.6 在 Col 和 *siz1-2* 中的降解情况。WB 结果显示, 在所有检测的时间范围内, 在同一时间点上, FLAG-SnRK2.6 在 *siz1-2* 中的相对蛋白含量

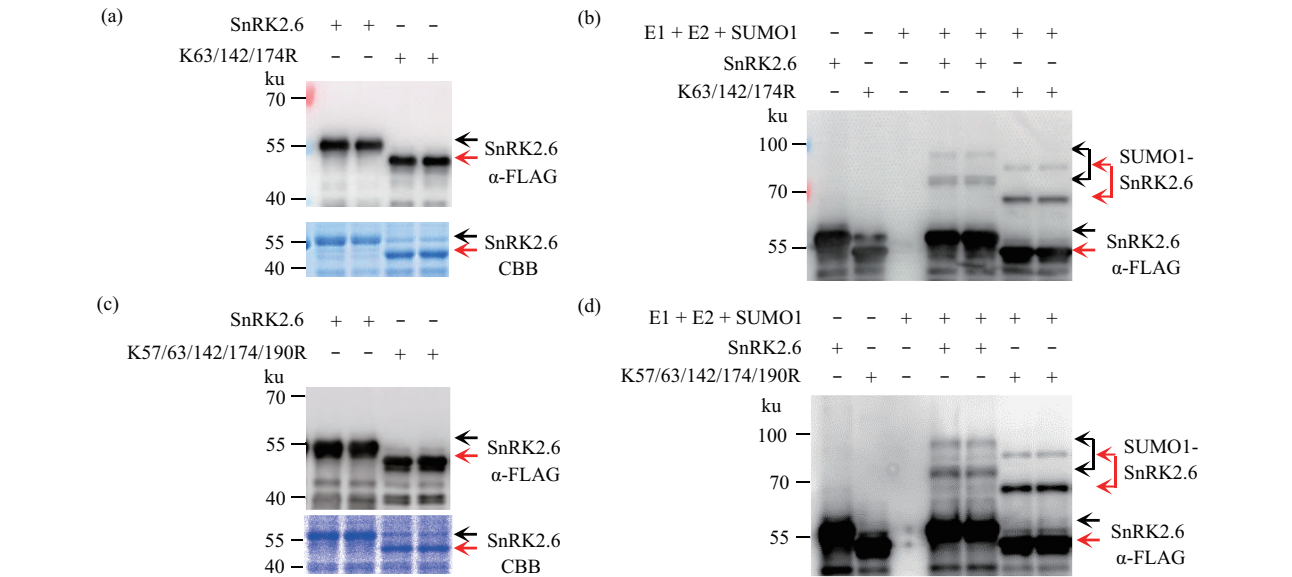


Fig. 5 Verification of the SUMOylation sites on SnRK2.6 identified by LC-MS/MS analysis
(a, c) Detection the protein stability and mobility of SnRK2.6 by site-directed mutation combinations. (b, d) The SUMOylation bands of SnRK2.6 were nearly not affected by the triple mutation “ K63/142/174R ” (b) and quintuple mutation “ K57/63/142/174/190R ” (d) on SnRK2.6.

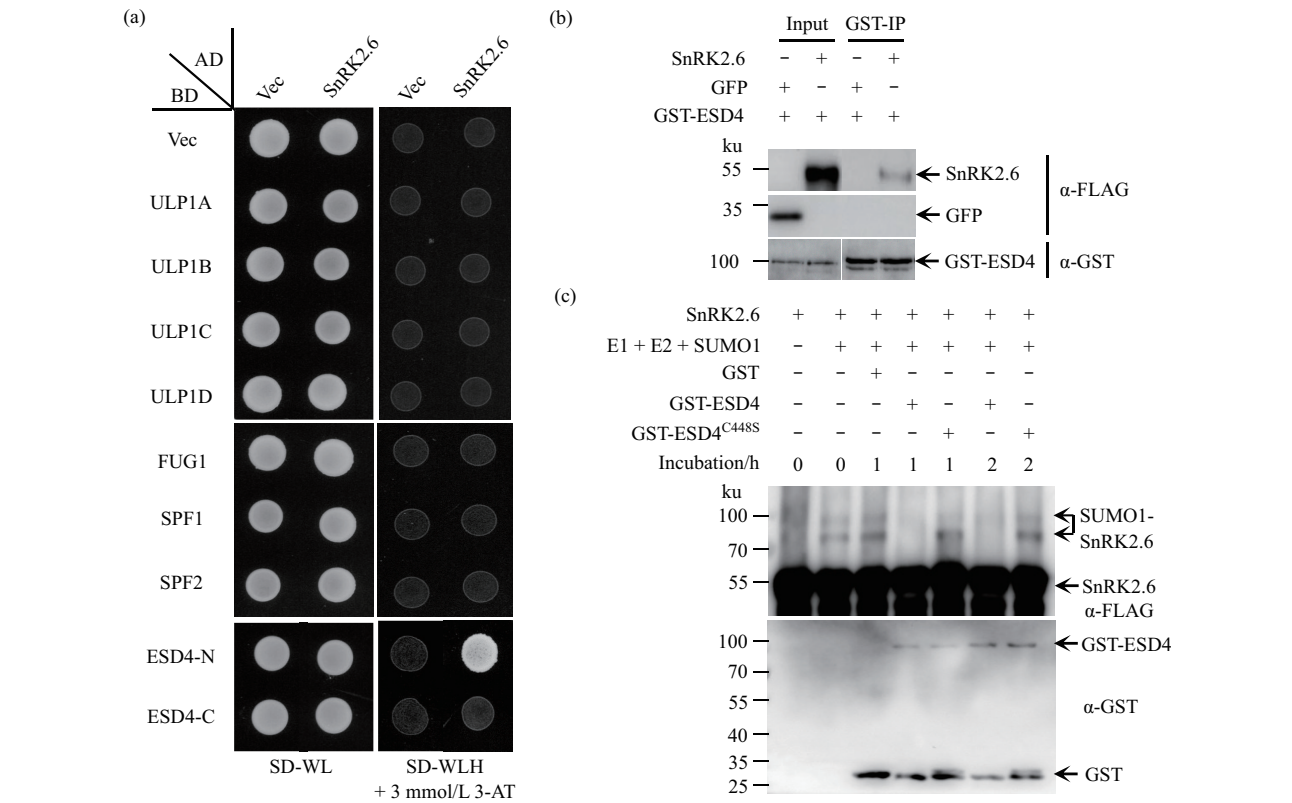


Fig. 6 ESD4 specifically interacts with and deSUMOylates SnRK2.6
(a) Screening the SUMO proteases interacting with SnRK2.6 by Y2H assay. (b) Verification the interaction between SnRK2.6 and ESD4 by pull-down assay. (c) The two specific SUMOylation bands of SnRK2.6 were deSUMOylated by ESD4 but not by the mutated version ESD4^{C448S} that without SUMO protease activity.

均显著高于在 Col 中的相对蛋白含量 (图 7a, b), 表明 SUMO 化对 SnRK2.6 的蛋白质稳定性起抑制

作用。

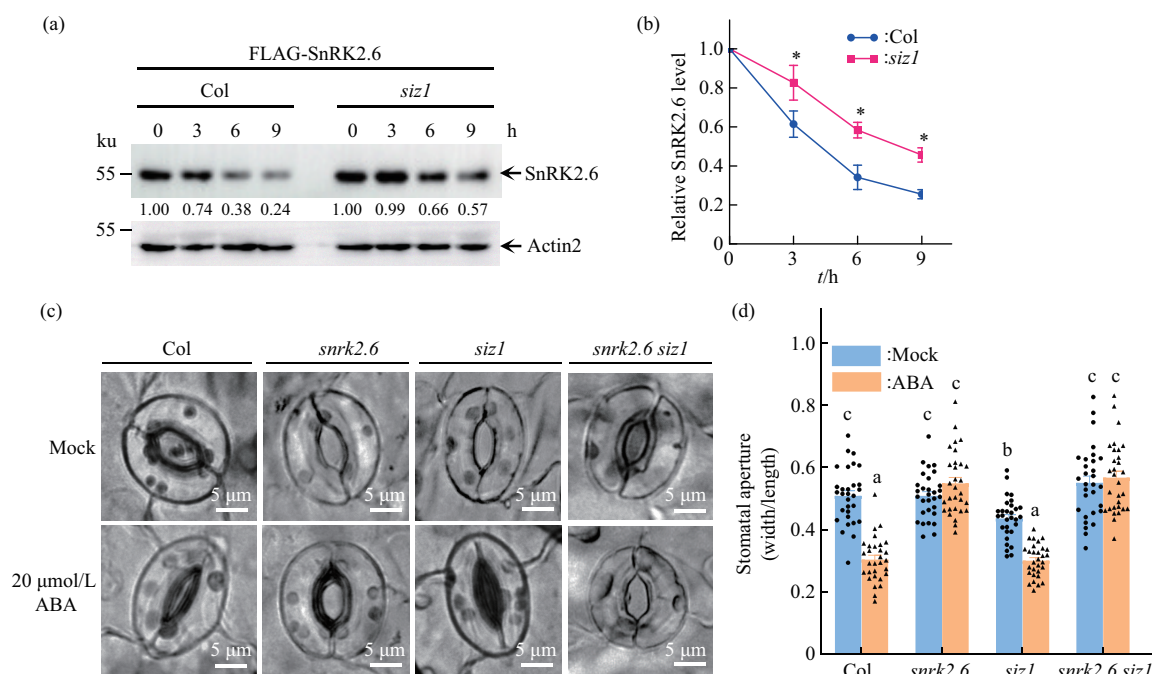


Fig. 7 SUMOylation inhibits the stability of SnRK2.6 and SnRK2.6 is genetically epistatic to SIZ1 in stomatal closing

(a) Cell-free degradation of SnRK2.6 in Col and *siz1*. FLAG-SnRK2.6 protein purified from *E. coli* was incubated with protein extracted from Col or *siz1* mutant at room temperature for 0, 3, 6 or 9 h. The numbers below the blots indicate the relative intensities of SnRK2.6. Actin2 was used as loading control. (b) The relative levels of SnRK2.6 (mean $\pm$ SD) corresponding to (a) from three biological replicates for the indicated time course. Asterisks indicate statistically significant differences (*t*-test, $*P<0.05$). (c) Stomatal apertures of Col, *snrk2.6*, *siz1* and *snrk2.6 siz1* without or with 20 $\mu\text{mol/L}$ ABA treatment for 2 h. (d) Quantification data of stomatal aperture (width/length) corresponding to (c). At least 30 stomatal aperture from three biological replicates were analyzed per replicate. Values are mean $\pm$ SD. Different letters indicate statistically significant differences according to two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($P<0.05$).

2.7 在调控气孔关闭上SnRK2.6上位于SIZ1

SnRK2.6 是 ABA 诱导气孔关闭的关键激酶, 既然 SUMO 化负调控 SnRK2.6 的蛋白质稳定性, 那 SUMO 化是否影响 SnRK2.6 的气孔关闭功能就非常值得探究。因此, 本研究检测了 ABA 处理前后 *snrk2.6*、*siz1-2* 以及 *snrk2.6 siz1-2* 的气孔开闭情况。结果发现: 未添加 ABA 时, *siz1-2* 的气孔开度就明显低于 Col、*snrk2.6* 以及 *snrk2.6 siz1-2*, 而 Col、*snrk2.6* 和 *snrk2.6 siz1-2* 之间的气孔开度没有明显差异; ABA 处理后, Col 的气孔开度显著降低, 说明 ABA 处理成功; 在 ABA 诱导的气孔关闭过程中, 与 Col 相比, *siz1-2* 对 ABA 处理超敏感, *snrk2.6* 对 ABA 处理不敏感, *snrk2.6 siz1-2* 对 ABA 的敏感程度与 *snrk2.6* 接近 (图 7c)。这些结果表明, 在 ABA 诱导的气孔关闭过程中, SIZ1 起负调控作用, SnRK2.6 起正调控作用, 但 SIZ1 的负调控

作用完全依赖 SnRK2.6, 因此在遗传学上 SnRK2.6 上位于 SIZ1。由此推测, SIZ1 负调控 ABA 诱导的气孔关闭功能有可能是通过抑制 SnRK2.6 的蛋白质稳定性实现的。

3 讨 论

PTMs 是一种将修饰基团共价连接到底物蛋白特定氨基酸残基上的耗能过程, 通过修饰调控底物蛋白的活性、稳定性、三维结构、蛋白质相互作用、亚细胞定位等最终影响底物蛋白质的功能及其参与的生物学过程^[31-32]。在响应非生物胁迫中尤其是非生物胁迫诱发的 ABA 信号转导中, 蛋白激酶 SnRK2.6 发挥着举足轻重的作用。SnRK2.6 在其功能发挥中被报道存在磷酸化、泛素化、亚硝基化、过硫化、硫酸化等多种 PTMs, 这些修饰通过增强或抑制 SnRK2.6 的激酶活性或稳定性以及

SnRK2.6与下游转录因子的结合强弱等调控ABA信号的输出^[20-24]。多种不同修饰共同作用于SnRK2.6表明, SnRK2.6的PTMs调控存在多样性、复杂性、灵敏性和精准性。研究不同修饰之间的时序性和相互关系将是后续解析多修饰调控机制的重要方向, 以SnRK2.6为例展开研究是一个很好的切入点。

SUMO化作为真核生物中普遍存在且功能保守的一种PTMs同样参与ABA信号转导。已知SUMO E3连接酶SIZ1负调控ABA信号, 因为缺失SIZ1后植物表现出显著的ABA敏感表型, 究其原因SIZ1对ABA下游ABI5和MYB30两个转录因子SUMO化修饰的协同调控^[33-34]。脱落酸不敏感蛋白5 (abscisic acid-insensitive 5, ABI5) 和源自动物Myeloblastosis病毒癌基因同源家族 (v-myb) (myeloblastosis 30, MYB30) 分别是ABA信号的正负调控因子, SIZ1通过SUMO化修饰抑制了ABI5的转录激活活性并增强了MYC30的转录抑制活性和蛋白质稳定性, 从而负调控ABA信号^[33-34], 这对于ABA信号解除后植物适时向生长发育转换具有重要意义。这些数据也表明, SUMO化是抑制ABA信号的。另外, SUMO蛋白酶ASPI (*Arabidopsis* SUMO protease 1) 的功能缺失突变体表现出子叶转绿对ABA不敏感的表型, 同时伴随ABA处理后ABI5蛋白积累减少和MYB30蛋白积累增加的现象^[35], 暗示去SUMO化正调控ABA信号。然而, 拟南芥SUMO蛋白酶ESD4的功能缺失突变体同样表现出ABA超敏感的表型, 而且还伴随SnRK2.2/2.3/2.6激酶活性的提高和蛋白质的量的积累^[36-37], 暗示SUMO化又是促进ABA信号的。SUMO化到底是促进还是抑制ABA信号的、有无组织表达特异性或发育阶段特异性以及时空调节特异性等目前仍无定论。值得注意的是: SIZ1与ABI5以及MYB30都能够直接结合, 且SIZ1介导ABI5和MYB30的SUMO化修饰是组成型的, 不受ABA处理的影响^[33-34], 但介导二者去SUMO化的特异性SUMO蛋白酶却未见报道; ASPI的缺失伴随ABI5的降解和MYB30的积累, 但ASPI能否直接结合ABI5和MYB30并将其去SUMO化也不清楚^[35]; ESD4的缺失会造成SnRK2.2/2.3/2.6激酶活性的提高和蛋白质的量的积累, 但这些功能是否依赖ESD4的去SUMO化活性仍然未知^[36-37]。因此, 探究ABA信号组分的SUMO化修饰情况以及该修饰到底如何调控不同底物的蛋白质功能仍有广阔的

研究前景和研究意义。

本研究通过Y2H实验, 发现SnRK2.6与SIZ1直接结合, 并确定了二者的结合区域位于SIZ1的C端 (图1); 利用大肠杆菌SUMO化体系证实SnRK2.6存在SUMO化修饰, 且有两条特异性修饰条带 (图2); 进一步发现SnRK2.6只能与SUMO蛋白酶家族中的ESD4特异性结合, 结合区域位于ESD4的N端调节域, 且SnRK2.6的两条SUMO化条带能够被ESD4清除 (图6)。这些数据佐证了SnRK2.6存在可逆SUMO化修饰的真实性和可靠性。初步的体外稳定性实验表明, SUMO化负调控SnRK2.6的蛋白质稳定性 (图7a, b)。ABA诱导气孔关闭的生理实验发现, SIZ1在该过程中起负调控作用, 但该功能完全依赖SnRK2.6 (图7c, d)。这些数据表明, SUMO化至少是通过抑制SnRK2.6的稳定性调控其蛋白质功能的, SIZ1有可能通过SUMO化修饰降低SnRK2.6的稳定性进而负调控SnRK2.6促进气孔关闭的功能。这些推测是否正确以及详尽的机制有待后续研究。

另外, 尽管进行了各种尝试, SnRK2.6具体的SUMO化位点仍旧未知 (图3~5), 这是本研究的不足与遗憾。SUMO化鉴定质量受到鉴定系统、质谱仪器性能、参数设置、数据分析方法、人员经验等多种因素的影响。本研究是以前人报道的SUMO1-H89R为供体开展的SUMO化修饰鉴定^[30], 尽管人为引入胰蛋白酶切点后有助于在一定程度上提高酶切后SUMO化肽段的富集水平, 但不能完全模拟体内SUMO化的真实情况, 有可能遗漏一些真实的SUMO化肽段或SUMO化位点, 也不能同时检测除SUMO1外其他SUMO分子为供体的SUMO化情况。针对这些问题, 以后使用高灵敏度和高特异性的其他质谱鉴定手段有助于改善这一情况。

据报道, 有人利用动物中4个SUMO分子C端“GG”活性位点前面都是苏氨酸“T”的保守性, 改用“WaLP酶切+KGG抗体富集”的联用手段, 能够在动物体内直接高效检测SUMO化底物及其SUMO化位点^[38]。在拟南芥的4个SUMO分子中, 至少SUMO1/2的“GG”前也是“T”, 所以利用该特点可以借鉴动物中的鉴定手段, 在植物体内在蛋白质组层面上直接鉴定SUMO化底物及其具体位点, 也可以单独鉴定具体底物如SnRK2.6的SUMO化位点。近期, 两个独立的课题组分别报道, 将拟南芥成熟SUMO1分子中所有7个赖氨酸全部突变

为精氨酸改造成赖氨酸缺失型的表达系统 (K0-SUMO1) 后, 发现该系统基本不影响拟南芥正常的生长发育过程和热胁迫下植物整体的 SUMO 化带型和强度, 但大幅提升了 SUMO 化肽段的富集效率与特异性^[39-40]。因此推测, 利用该系统富集 SnRK2.6 的 SUMO 化肽段并进行质谱鉴定有望获得 SnRK2.6 关键的 SUMO 化位点。另外, 除了使用各种改良版的质谱鉴定手段高效检测 SUMO 化底物之外, 积极开发一些可信度高的生物信息软件进行 SUMO 化预测也是一条重要途径。随着数据库中 SUMO 化底物数量的逐渐增多和生物信息软件的升级换代, 相信更多的 SUMO 化底物将被陆续发现, 这对于探究底物蛋白 SUMO 化修饰的功能与机制具有积极的推动作用。

4 结 论

蛋白激酶 SnRK2.6 存在 SUMO 化修饰且有两条 SUMO 化条带, SUMO 蛋白酶 ESD4 与 SnRK2.6 直接结合介导其去 SUMO 化过程, SUMO 化修饰负调控 SnRK2.6 的蛋白质稳定性, *SIZ1* 有可能是通过 SUMO 化修饰抑制 SnRK2.6 的蛋白质稳定性进而负调控 ABA 诱导的气孔关闭功能的。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20260012_Table_S1.pdf

PIBB_20260012_Table_S2.pdf

数据可用性声明 本篇论文的关联数据 (DOI: 10.57760/sciencedb.38562/CSTR: 31253.11. sciencedb.38562) 可在科学数据银行 (ScienceData Bank, ScienceDB) 数据库 <https://www.scidb.cn/detail?dataSetId=66c23362057643bea5fe8a794954b2ad> 中访问获取。

参 考 文 献

- [1] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 2016, **167**(2): 313-324
- [2] Zhang H, Zhu J, Gong Z, *et al.* Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet*, 2022, **23**(2): 104-119
- [3] Fujii H, Zhu J K. Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(20): 8380-8385
- [4] Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, *et al.* Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 2009, **50**(12): 2123-2132
- [5] Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, *et al.* Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol*, 2009, **50**(7): 1345-1363
- [6] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, *et al.* Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 2009, **324**(5930): 1064-1068
- [7] Park S Y, Fung P, Nishimura N, *et al.* Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 2009, **324**(5930): 1068-1071
- [8] Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, *et al.* PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J*, 2010, **61**(2): 290-299
- [9] Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, *et al.* *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 2009, **462**(7273): 660-664
- [10] Gong Z, Xiong L, Shi H, *et al.* Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Sci China Life Sci*, 2020, **63**(5): 635-674
- [11] Ding Y, Li H, Zhang X, *et al.* OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in Arabidopsis. *Dev Cell*, 2015, **32**(3): 278-289
- [12] Ding Y, Jia Y, Shi Y, *et al.* OST1-mediated BTF3L phosphorylation positively regulates CBFs during plant cold responses. *EMBO J*, 2018, **37**(8): e98228
- [13] Ding Y, Lv J, Shi Y, *et al.* EGR2 phosphatase regulates OST1 kinase activity and freezing tolerance in Arabidopsis. *EMBO J*, 2019, **38**(1): e99819
- [14] Ng L M, Soon F F, Zhou X E, *et al.* Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(52): 21259-21264
- [15] Lin Z, Li Y, Wang Y, *et al.* Initiation and amplification of SnRK2 activation in abscisic acid signaling. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 2456
- [16] Katsuta S, Masuda G, Bak H, *et al.* Arabidopsis Raf-like kinases act as positive regulators of subclass III SnRK2 in osmotic stress signaling. *Plant J*, 2020, **103**(2): 634-644
- [17] Lin Z, Li Y, Zhang Z, *et al.* ARAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 613
- [18] Lozano-Juste J, Alrefaei A F, Rodriguez P L. Plant osmotic stress signaling: MAPKKs meet SnRK2s. *Trends Plant Sci*, 2020, **25**(12): 1179-1182
- [19] Saruhashi M, Kumar Ghosh T, Arai K, *et al.* Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(46): E6388-E6396
- [20] Ali A, Kim J K, Jan M, *et al.* Rheostatic control of ABA signaling

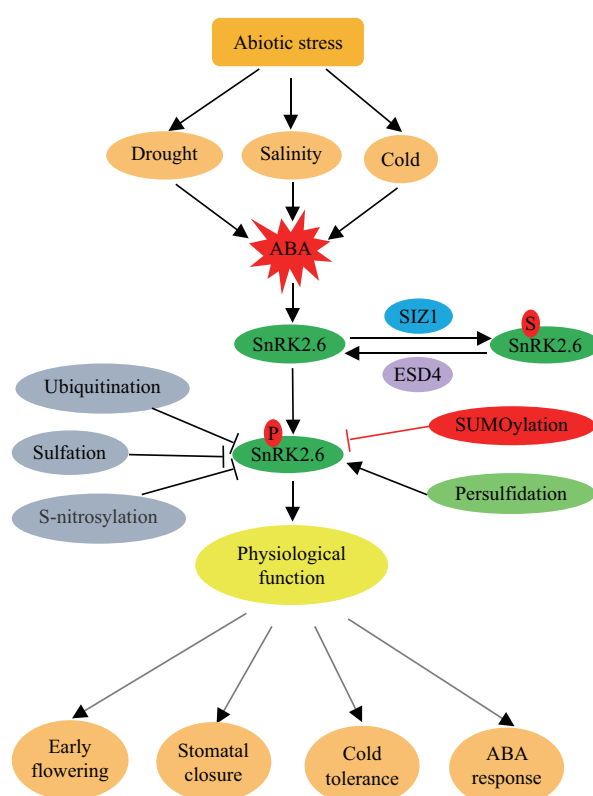
- through HOS15-mediated OST1 degradation. *Mol Plant*, 2019, **12**(11): 1447-1462
- [21] Wang P, Zhu J K, Lang Z. Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins. *Plant Signal Behav*, 2015, **10**(6): e1031939
- [22] Chen S, Jia H, Wang X, *et al.* Hydrogen sulfide positively regulates abscisic acid signaling through persulfidation of SnRK_{2.6} in guard cells. *Mol Plant*, 2020, **13**(5): 732-744
- [23] Chen S, Wang X, Jia H, *et al.* Persulfidation-induced structural change in SnRK2.6 establishes intramolecular interaction between phosphorylation and persulfidation. *Mol Plant*, 2021, **14**(11): 1814-1830
- [24] Wang J, Wang C, Wang T, *et al.* Tyrosylprotein sulfotransferase suppresses ABA signaling via sulfation of SnRK2.2/2.3/2.6. *J Integr Plant Biol*, 2023, **65**(8): 1846-1851
- [25] Ma T, Yoo M J, Zhang T, *et al.* Characterization of thiol-based redox modifications of *Brassica napus* SNF1-related protein kinase 2.6-2C. *FEBS Open Bio*, 2018, **8**(4): 628-645
- [26] Johnson E S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, 2004, **73**: 355-382
- [27] Miura K, Jin J B, Hasegawa P M. Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, **10**(5): 495-502
- [28] Han D, Lai J, Yang C. SUMOylation: a critical transcription modulator in plant cells. *Plant Sci*, 2021, **310**: 110987
- [29] Okada S, Nagabuchi M, Takamura Y, *et al.* Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol*, 2009, **50**(6): 1049-1061
- [30] Miller M J, Barrett-Wilt G A, Hua Z, *et al.* Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(38): 16512-16517
- [31] Deribe Y L, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(6): 666-672
- [32] Keenan E K, Zachman D K, Hirschey M D. Discovering the landscape of protein modifications. *Mol Cell*, 2021, **81**(9): 1868-1878
- [33] Miura K, Lee J, Jin J B, *et al.* Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(13): 5418-5423
- [34] Zheng Y, Schumaker K S, Guo Y. Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(31): 12822-12827
- [35] Wang Q, Qu G P, Kong X, *et al.* *Arabidopsis* small ubiquitin-related modifier protease ASP1 positively regulates abscisic acid signaling during early seedling development. *J Integr Plant Biol*, 2018, **60**(10): 924-937
- [36] Chang Y N, Wang Z, Ren Z, *et al.* Nuclear pore anchor and early in short days 4 negatively regulate abscisic acid signaling by inhibiting Snf1-related protein kinase2 activity and stability in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 2022, **64**(11): 2060-2074
- [37] Cui X, Lv M, Cao Y, *et al.* NUA and ESD4 negatively regulate ABA signaling during seed germination. *Stress Biol*, 2022, **2**(1): 38
- [38] Lumpkin R J, Gu H, Zhu Y, *et al.* Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 1171
- [39] Rytz T C, Feng J, Barros J A S, *et al.* *Arabidopsis*-expressing lysine-null SUMO1 reveals a non-essential role for secondary SUMO modifications in plants. *Plant Direct*, 2023, **7**(7): e506
- [40] Sang T, Xu Y, Qin G, *et al.* Highly sensitive site-specific SUMOylation proteomics in *Arabidopsis*. *Nat Plants*, 2024, **10**(9): 1330-1342

SIZ1 and ESD4 Mediate The Reversible SUMOylation of SnRK2.6 Through Direct Physical Interaction*

FU Huan-Huan**, WEI Jian**, LI Meng-Yao, HAN Yong-Feng***

(College of Life Sciences, Hebei Normal University, Hebei Research Center of the Basic Discipline of Cell Biology,
Hebei Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Shijiazhuang 050024, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To investigate the novel post-translational modifications (PTMs) of SnRK2.6, a central component in the abscisic acid (ABA) signaling pathway, such as SUMOylation, and to establish a foundation for revealing the physiological functions and molecular mechanisms of SnRK2.6 regulated by these new modifications. **Methods** The interaction between SnRK2.6 and the SUMO E3 ligase SIZ1, as well as members of the SUMO protease family, was examined using yeast two-hybrid and *in vitro* pull-down assays. An *in vitro*

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2022205017) and the Science Foundation of Hebei Normal University (L2019B23).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-15110171633, E-mail: hanyongfeng@hebtu.edu.cn

Received: January 8, 2026 Accepted: June 2, 2026

SUMOylation system in *Escherichia coli* was utilized to determine whether SnRK2.6 undergoes SUMOylation. Mass spectrometry, combined with site-directed mutagenesis of candidate lysine residues, was employed to identify potential SUMOylation sites on SnRK2.6. *In vitro* de-SUMOylation assays were performed to assess whether SUMO proteases interacting with SnRK2.6 could catalyze the removal of SUMO moieties from modified SnRK2.6. The protein stability of SnRK2.6 was assessed in a cell-free degradation assay using bacterial-purified SnRK2.6 incubated with total protein extracts from Col and *siz1* mutant seedlings. To dissect the genetic relationship between *SnRK2.6* and *SIZ1*, stomatal aperture assays were performed under ABA treatment using *snrk2.6*, *siz1*, and *snrk2.6 siz1* double mutant plants. **Results** SnRK2.6 physically interacts with SIZ1 and the SUMO protease ESD4, with the binding domains localized to the C-terminal region of SIZ1 and the N-terminal region of ESD4, respectively. SnRK2.6 was found to be SUMOylated, exhibiting two distinct high-molecular-mass bands ranging from 70 to 100 ku, indicative of modified forms. Bioinformatics analysis predicted four putative SUMOylation sites on lysine residues K57, K63, K142, and K190. Mass spectrometry identified three SUMOylation sites on K63, K142, and K174. However, individual or combinatorial point mutations on these sites had minimal impact on the pattern or intensity of SUMOylation signals, suggesting that these residues may not be responsible for the SUMOylation on SnRK2.6. Instead, such mutations only weaken the protein stability or accelerate the protein mobility of SnRK2.6. Therefore, the exact SUMOylation sites on SnRK2.6 remain unidentified. In de-SUMOylation experiments, incubation of GST-ESD4 with SUMOylated SnRK2.6 for 1–2 h led to the near-complete disappearance of both SUMOylated bands. In contrast, neither the GST control nor the catalytically inactive mutant GST-ESD4^{C448S} exhibited any de-SUMOylation activity. In protein turnover experiments, SnRK2.6 exhibited markedly enhanced half-life in *siz1* compared with Col, indicating that SIZ1-dependent SUMOylation promotes SnRK2.6 turnover. Phenotypically, *snrk2.6* mutants were completely insensitive to ABA-induced stomatal closure; *siz1* mutants displayed pronounced hypersensitivity; and the *snrk2.6 siz1* double mutant phenocopied *snrk2.6*—showing no significant response to ABA beyond that of the *snrk2.6* mutant. These data indicate that *SIZ1* acts as a negative regulator of ABA-triggered stomatal closure and *SnRK2.6* functions as a positive regulator, and the inhibitory activity of *SIZ1* is strictly dependent on *SnRK2.6*, placing *SnRK2.6* genetically upstream of *SIZ1* in the ABA signaling pathway. **Conclusion** SnRK2.6 undergoes SUMOylation, although the specific SUMOylation sites have not been defined. SnRK2.6 is dynamically regulated by reversible SUMOylation—catalyzed by SIZ1 and reversed by ESD4—which controls its protein stability. SUMOylation acts as a destabilizing signal for SnRK2.6, and SIZ1 exerts its negative effect on ABA-triggered stomatal closure probably through promoting SnRK2.6 degradation *via* SUMOylation. These findings uncover SUMOylation as a critical regulatory layer fine-tuning SnRK2.6 abundance in ABA signaling.

Key words SnRK2.6, SUMOylation, SIZ1, ESD4

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0012

CSTR: 32369.14.pibb.20260012