



DIA磷酸化蛋白组学全面揭示植物I型酪蛋白激酶的功能

渠莉¹, 薛红卫^{1,2*}

1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240;

2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 华南农业大学农学院, 广州 510642

* 联系人, E-mail: hwxue@sjtu.edu.cn

Data-independent acquisition (DIA)-based global phosphoproteomics reveal the diverse roles of plant casein kinase 1

Li Qu¹ & Hongwei Xue^{1,2*}

¹ School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

² Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

* Corresponding author, E-mail: hwxue@sjtu.edu.cn

doi: [10.1360/TB-2024-0632](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0632)

蛋白质磷酸化是由蛋白激酶催化完成的一种重要的蛋白翻译后修饰,是真核生物复杂信号网络的重要组成部分^[1].在各种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶中,I型酪蛋白激酶(casein kinase 1, CK1)的结构和功能在真核生物中都高度保守,通过介导不同底物的磷酸化参与动植物多种信号通路,在细胞增殖、节律等细胞活动中发挥关键调控作用,并调控代谢和疾病的发生等^[2-5].对植物CK1的研究表明其在植物激素合成和信号感知、光信号响应、细胞分裂、开花时间以及叶片衰老等方面发挥重要调控作用^[3,6-8].由于CK1的功能广泛且底物众多(人类蛋白组分析显示近一半的蛋白可以被磷酸化,其中约9.5%的磷酸化由CK1介导^[2]),对CK1内源底物的准确鉴定已成为系统揭示CK1功能的瓶颈.尽管一些公开数据库可以进行底物和磷酸化位点的预测,但这些位点是否在体内存在需要验证,局限性大.

液相色谱结合串联质谱(LC-MS/MS)为体内磷酸化蛋白质组的分析提供了便利^[9,10].随着相关技术发展,数据独立采集data-independent acquisition (DIA)技术可以实现肽段的全时段采集和无偏差识别,显著提高了质谱分析的灵敏度和准确性^[11].基于DIA的磷酸化蛋白质组分析已成功应用于低温和渗透胁迫下拟南芥幼苗的早期信号等研究^[12,13],表明了其广泛的应用潜力.

本课题组借助基于DIA采样的质谱分析策略深入研究AEL(植物中的一类CK1)介导的磷酸化事件^[14].本研究利用过表达及缺失AEL的拟南芥材料,比较分析获得了3985个CK1依赖的磷酸化肽段,对应于1032个磷酸化蛋白.通过数

据非依赖的新型采样方式对CK1介导的磷酸化肽段进行全时段识别和采集,大大提高了磷酸化肽段及蛋白的鉴定数目,为全面揭示CK1的生物学功能提供了重要线索.

我们从与AEL相关的磷酸化肽段中鉴定出了一系列底物识别基序,实验验证其中4个是CK1新的底物识别基序,为CK1的底物预测以及作用机制研究提供了线索.进一步利用CK1已有的4个经典基序和4个新基序对拟南芥蛋白数据库进行全面搜索,获得了3509个AEL可能的底物蛋白.这些潜在底物蛋白功能的富集分析揭示了AEL可能在转录调控、环境胁迫、代谢、细胞分裂、激素响应和营养等生物学过程中的功能,以及AEL已知调控过程的潜在新底物(如发现了调控开花过程的新的候选底物),为系统揭示CK1功能和深入阐明其作用机制提供了重要线索.

考虑到CK1在真核生物中高度保守,我们进一步利用CK1底物识别基序(包括新获得的4个新基序)搜索水稻、小鼠和人类等物种的蛋白数据库,预测并获得了大量候选底物蛋白(图1),这些蛋白的功能聚类分析显示CK1在单子叶和双子叶植物中保守地调控氮素利用、茎秆伸长以及胚胎发育等.染色体和染色质组织、DNA修复及细胞分裂等关键生物学事件的GO类别在小鼠、人和拟南芥中也得以显著富集,暗示了CK1在植物和哺乳动物中的保守功能及调控机制.

在富集的CK1参与胚胎发育调控的候选底物中,我们鉴定了一个锌指转录因子, C3H17,该蛋白位于植物生殖发育和胚胎发育相关的多个核心过程的重要节点.遗传分析表明C3H17功能缺失突变体的胚胎发育异常和停滞,进一步的实

验证明AEL通过磷酸化C3H17促进其蛋白稳定性和转录活性,进而调控植物早期胚胎发育,为植物生殖发育调控的翻译后修饰研究提供了线索(图1)。

基于DIA的磷酸化蛋白组学分析较为全面地获得了AEL依赖的磷酸化肽段,为后续底物鉴定和底物识别基序的富集奠定了基础。DIA采样方法能够在固定时间内或特定 m/z 范围内获得所有母离子及二级子离子信息,突破了通量限制,在蛋白组学的定性稳定性和定量准确性上具有优势。但考虑到扫描速度和分辨率,DIA方法对质谱仪的硬件配置有更高要求。此外,所获得的高通量数据的处理也需要特定的算法和运算能力的提高。目前的DIA方法仍然需要依赖于数据依赖型采集方法(DDA)建立的谱图库进行匹配,实现定性确证和定量离子选择。未来随着软件硬件的不断发展,DIA方法将会为蛋白质组学研究提供更大的便利。

本研究基于全面获取的AEL依赖的磷酸化肽段,获得了对应的磷酸化蛋白并开展功能分析,富集并验证了CK1新的底物识别基序,为CK1的底物识别和磷酸化位点预测提供了新标准。证明了AEL介导的C3H17蛋白磷酸化参与拟南芥胚胎发育的作用及机制。利用底物基序对其他物种中潜在CK1

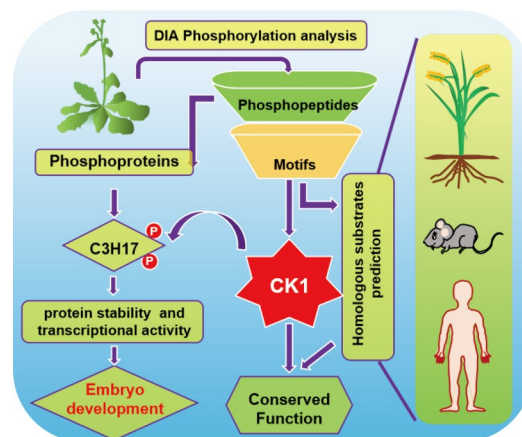


图1 磷酸化蛋白组学全面揭示I型酪蛋白激酶的保守功能及调控植物发育的作用机制

Figure 1 Phosphoproteomics comprehensively reveals the conserved function of casein kinase 1 and its functional mechanism in regulating plant development

底物的预测大大扩展了CK1的底物范围,有助于深入揭示CK1的保守功能和作用机制。

推荐阅读文献

- Mergner J, Frejno M, List M, et al. Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome. *Nature*, 2020, 579: 409–414
- Venerando A, Ruzzene M, Pinna L A. Casein kinase: The triple meaning of a misnomer. *Biochem J*, 2014, 460: 141–156
- Kang J, Wang Z. Mut9p-like kinase family members: New roles of the plant-specific casein kinase I in plant growth and development. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 1562
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, et al. The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, 2005, 17: 675–689
- McKay R M, Peters J M, Graff J M. The casein kinase I family: Roles in morphogenesis. *Dev Biol*, 2001, 235: 378–387
- Chen H H, Qu L, Xu Z H, et al. EL1-like casein kinases suppress ABA signaling and responses by phosphorylating and destabilizing the ABA receptors PYR/PYLs in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2018, 11: 706–719
- Qu L, Wei Z, Chen H H, et al. Plant casein kinases phosphorylate and destabilize a cyclin-dependent kinase inhibitor to promote cell division. *Plant Physiol*, 2021, 187: 917–930
- Zhu G Q, Qu L, Xue H W. Casein kinase 1 AELs promote senescence by enhancing ethylene biosynthesis through phosphorylating WRKY22 transcription factor. *New Phytol*, 2024, doi: 10.1111/nph.19785
- Benschop J J, Mohammed S, O'Flaherty M, et al. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6: 1198–1214
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, et al. Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 193
- Bekker-Jensen D B, Bernhardt O M, Högberg A, et al. Rapid and site-specific deep phosphoproteome profiling by data-independent acquisition without the need for spectral libraries. *Nat Commun*, 2020, 11: 787
- Tan J, Zhou Z, Feng H, et al. Data-independent acquisition-based proteome and phosphoproteome profiling reveals early protein phosphorylation and dephosphorylation events in *Arabidopsis* seedlings upon cold exposure. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 12856
- Xue L, Wang P, Wang L, et al. Quantitative measurement of phosphoproteome response to osmotic stress in *Arabidopsis* based on library-assisted extracted ion chromatogram (LAXIC). *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 2354–2369
- Qu L, Liu M Y, Zheng L L, et al. Data-independent acquisition-based global phosphoproteomics reveal the diverse roles of casein kinase 1 in plant development. *Sci Bull*, 2023, 68: 2077–2093