

## 原核生物蛋白 O-糖基化的研究进展

翟娅菲<sup>1,2</sup> 李红<sup>1,2</sup> 刘现伟<sup>3</sup> 申瑞玲<sup>1,2\*</sup> 王鹏<sup>3</sup>

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院 河南 郑州 450001)

(2. 食品生产与安全河南省协同创新中心 河南 郑州 450001)

(3. 山东大学 国家糖工程技术研究中心 山东 济南 250100)

**摘要:** 自从在原核生物中发现蛋白糖基化之后,越来越多的 O-糖基化机制在不同种属的细菌中被发现。本文根据对 O-寡糖基转移酶(O-oligosaccharide transferase, OTase)的依赖与否,将原核生物的 O-糖基化分为 OTase 非依赖型和 OTase 依赖型,并分别对这两种糖基化机制进行了详细阐述。通过对不同的 O-糖基化机制的深入了解,为以后更好地利用这些途径来合成工程化的目标糖蛋白奠定基础。

**关键词:** O-糖基化, 原核生物, OTase 依赖型, OTase 非依赖型

## Research progress of protein O-glycosylation in prokaryotes

ZHAI Ya-Fei<sup>1,2</sup> LI Hong<sup>1,2</sup> LIU Xian-Wei<sup>3</sup> SHEN Rui-Ling<sup>1,2\*</sup> WANG Peng<sup>3</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou, Henan 450001, China)

(2. Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Henan Province, Zhengzhou, Henan 450001, China)

(3. National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

**Abstract:** Since protein glycosylation was found in prokaryotes, multiple O-glycosylation mechanisms in the bacteria from varied genera have been reported. According to the requirement of O-oligosaccharyltransferase (OTase), the O-glycosylation in prokaryotes was divided into OTase-independent and OTase-dependent. Furthermore, the two glycosylation mechanisms were elucidated in detail. The insight into various O-glycosylation mechanisms in prokaryotes would facilitate the application of these pathways to explore targeted glycoproteins.

**Keywords:** O-glycosylation, Prokaryotes, OTase-independent, OTase-dependent

蛋白糖基化是碳水化合物以共价方式连接到氨基酸上的过程,是自然界中最常见的翻译后修饰,真核生物中超过三分之二的蛋白均被糖基化所修饰<sup>[1]</sup>。1938 年以来的很长一段时间人们认为蛋白

的糖基化过程只存在于真核生物中,直到 19 世纪 70 年代才在 *Halobacterium* 和 *Clostridium* 中发现了糖蛋白的存在<sup>[2-3]</sup>,自此蛋白的糖基化系统被证明存在于所有形式的生物中并发挥着各种各样的功能。

**Foundation item:** Doctoral Scientific Research Foundation of Zhengzhou University of Light Industry (No. 2015BSJJ039)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-371-86505810; E-mail: shenrl1967@163.com

**Received:** May 20, 2016; **Accepted:** September 19, 2016; **Published online** (www.cnki.net): October 09, 2016

基金项目: 郑州轻工业学院博士科研基金资助项目(No. 2015BSJJ039)

**\*通讯作者:** Tel: 86-371-86505810; E-mail: shenrl1967@163.com

收稿日期: 2016-05-20; 接受日期: 2016-09-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-09

通常情况下,糖蛋白的碳水化合物被共价连接到天冬氨酸残基上形成 N-糖基化,或者连接到苏氨酸或丝氨酸残基上形成 O-糖基化。在这篇综述中,我们将着重讨论细菌中的 O-糖基化。

研究较深入的原核生物 O-糖蛋白大多分布在细胞外,包括 S 层蛋白、鞭毛、类型 IV 菌毛和多种黏附素<sup>[4]</sup>。细菌 O-糖基化根据是否需要寡糖基转移酶可被分为两类:OTase 依赖型和 OTase 非依赖型。OTase 依赖型糖基化目前在真核生物中并未见报道,此途径需要寡糖基转移酶将在脂载体上合成的寡糖完整转移到蛋白受体上,细菌的多种蛋白,包括纤毛蛋白均由此途径完成 O-糖基化。OTase 非依赖型糖基化是由糖基转移酶将对应的单糖顺序添加到目标蛋白的糖结构上,此途径多见于鞭毛和自主转运蛋白的糖基化。

## 1 OTase 非依赖型糖基化

### 1.1 鞭毛和一些黏附素的 O-糖基化

细菌鞭毛的 O-糖基化属于 OTase 非依赖型。在细胞质中,相应的糖基转移酶将单糖从其核苷酸活化形式转移到鞭毛蛋白上,并将其它单糖顺序添加到前一个糖基上,合成的 O-糖基化鞭毛蛋白再通过鞭状体分泌到细菌外膜上。

鞭毛的糖基化系统不仅存在于许多革兰氏阴性菌中,还存在于两种革兰氏阳性菌属 *Clostridium* 和 *Listeria*<sup>[5]</sup>。不同的细菌能够在其鞭毛上不同数量的位点添加糖苷。*Burkholderia* spp. 以及 *Listeria monocytogenes* 仅在其鞭毛上的一个位点糖基化,然而 *Campylobacter jejuni* 则能在其鞭毛的 19 个位点发生糖基化,从而使其成为糖基化程度最高的糖蛋白之一<sup>[6-7]</sup>。除此之外,其它大部分鞭毛的糖基化通常发生在 2-7 个位点上。除了糖基化位点的不同,不同细菌鞭毛上的糖苷结构也多种多样,长度从单糖到 10 个单糖组成的寡糖不等<sup>[8]</sup>。

有趣的是,在致病菌中,大部分鞭毛上的糖苷的末端单糖均带负电荷,这一特性说明带负电荷的糖可能在这些致病菌的致病机制中发挥重要作用。此外,一些细菌的鞭毛 O-糖基化所需的遗传因素已

被证实,此过程所需的糖基转移酶以及糖修饰基因均位于编码鞭毛的基因附近<sup>[4]</sup>。

虽然对于鞭毛的糖基化,目前还没有发现固定的识别序列,但是已有研究表明 O-糖基化通常发生在鞭毛的高度可变中心区域,并且此区域通常暴露于环境中<sup>[9]</sup>。迄今为止,鞭毛的 O-糖基化过程已被证明,而鞭毛的 N-糖基化虽被认为可能存在,但还未被进一步证实。

革兰氏阳性菌 *Streptococcus gordonii* 的 O-糖基转移酶 GtfA/B 位于细胞质中,其催化黏附素在富含 Ser/Thr 的重复区域进行 O-糖基化的机理已被报道。GtfA/B 是由两分子 GtfA 和两分子 GtfB 组成的四聚体,其中 GtfA 包含一个活性位点,而 GtfB 包含与黏附素的结合位点。在酶催化糖基化的第一阶段,GtfB 识别黏附素上未经修饰的 Ser/Thr 残基并与底物结合,由 GtfA 催化糖基化的发生;随后第二阶段,GtfB 识别黏附素上已被 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)修饰的 Ser/Thr 残基,并改变自身构象使其与 GtfA 间的接口断裂,催化反应完成<sup>[10]</sup>。

### 1.2 O-甘露糖基化

在放线菌目的 *Streptomyces* 和 *Mycobacterium* 中,一些具有生物活性的天然产物和分泌性抗原也能被 O-糖基化。通常与这些蛋白相连的糖为甘露糖,可能发挥催化作用的转移酶与真核生物中蛋白的甘露糖基转移酶具有一定的结构相似性<sup>[11]</sup>。O-甘露糖基化的底物均为脂蛋白,它极有可能是在所有放线菌属细菌中都普遍存在的途径,在调节信号肽的特异性水解和脂蛋白的正确定位方面发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。

膜相关的甘露糖基转移酶的活性依赖于多萜醇单磷酸甘露糖。在 *Streptomyces coelicolor* 中,O-甘露糖基化需要一个多萜醇单磷酸甘露糖合成酶(Polyprenol-P-mannose synthase, PPM)将甘露糖转移到多萜醇磷酸上,此脂载体随即被翻转穿过革兰氏阳性菌的外膜,然后由 O-甘露糖基转移酶(PMT)同源物将多萜醇单磷酸甘露糖上的甘露糖转移到底

物磷酸盐结合蛋白(Phosphate binding, PstS)上<sup>[13]</sup>。糖基化由 PMT 酶催化的甘露糖基化起始,随后由一个或两个甘露糖基转移酶催化甘露糖顺序添加从而延长甘露糖链<sup>[14-15]</sup>。一些糖蛋白只含有一个糖基化位点,而有些则在一个区域含有多个糖基化位点<sup>[16]</sup>。相应的糖基转移酶不能非特异性地催化底物上所有糖基化位点的 Ser 或 Thr 糖基化,而是有一定的位点偏好性<sup>[13]</sup>。虽然放线菌属细菌中所有的糖基化位点都接近于底物蛋白的 C 端或 N 端,但是迄今为止还没有发现糖基转移酶识别的保守序列。

## 2 OTase 依赖型糖基化

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* 1244、*Neisseria meningitidis* 和 *Neisseria gonorrhoeae* 中的蛋白 O-糖基化系统

近年来大量的研究证实在多种细菌中均存在蛋白糖基化过程。在 *Pseudomonas aeruginosa* 1244、*Neisseria meningitidis* 和 *Neisseria gonorrhoeae* 中存在的蛋白 O-糖基化系统与革兰氏阴性菌中 wzy 依赖途径的 O-抗原生物合成过程相似<sup>[17]</sup>。在 *P. aeruginosa* 1244 的糖蛋白上,只含有一个重复单位的糖苷,其结构为: $\alpha$ -[5-N- $\beta$ -羟基丁酸酰基-7-N-甲酰-pseudaminic acid]-(2 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -木糖-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -乙酰氨基岩藻糖( $\alpha$ -5N $\beta$ OHC(4)7NFmPse-(2 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -FucNAc)<sup>[18]</sup>;在 *N. meningitidis* 中,糖蛋白上的糖链长度有很大的差异性,其糖单位由三糖结构组成:半乳糖- $\beta$ 1,4-半乳糖- $\alpha$ 1,3-[2,4-二乙酰氨基-2,4,6-三脱氧己糖](Gal- $\beta$ 1,4-Gal- $\alpha$ 1,3-DATDH)或者半乳糖- $\beta$ 1,4-半乳糖- $\alpha$ 1,3-[2-甘油酯酰胺 4-乙酰氨基 2,4,6-三脱氧己糖](Gal- $\beta$ 1,4-Gal- $\alpha$ 1,3-GATDH)<sup>[19]</sup>;在 *N. gonorrhoeae* 中,其纤毛蛋白(Pilin)上的糖苷结构为:(己糖衍生物-己糖-DATDH)-(OAc)Hex-Hex-DATDH<sup>[20]</sup>。在这几种细菌的基因组中已经发现了一些使 Pilin 糖基化的基因(*pgl*),它们编码寡糖合成所需的糖基转移酶和糖基修饰酶<sup>[20-21]</sup>。在 *N. meningitidis* 细菌内膜的胞质面,糖基转移酶 PglB、PglA、PglE 和 PglI 依次发挥催化作用,将相应单糖依次连接到聚戊烯二磷酸(und-PP)脂质载体上。在

一些 *N. meningitidis* 亚种中还同时存在其它不同的糖基转移酶,如 PglB2、PglG 和 PglH,通过高频率、可逆的开关来调控这些糖基转移酶的基因表达可以改变糖苷结构。这一现象增加了能被转移到蛋白上的天然糖链结构的多样性。随后 PglF 翻转酶将糖脂翻转到周质空间,再由 O-寡糖基转移酶 PglL 催化糖苷转移到蛋白上形成糖蛋白<sup>[22]</sup>。

PglL 对糖链表现出广泛的底物适应性,能够将许多组成和结构不同的糖苷从 Und-pp 载体上转移到底物蛋白上,包括 *N. meningitidis* 自身多样的糖苷,来自荚膜和 O-抗原生物合成途径中的单糖、寡糖和多糖,甚至可以识别其它的糖基化系统。更有趣的是,在缺乏其它糖供体时,PglL 可以将单个的肽聚糖单位连接到 Pilin 蛋白上<sup>[23]</sup>。然而 *P. aeruginosa* 1244 的 O-寡糖基转移酶 PilO 则只能将含有一个重复单位的寡糖转移到蛋白受体上。PglL 含有 Pfam Wzy\_C 结构域和一个功能未知的 C 端结构域,而 PilO 则只含有 Pfam Wzy\_C 结构域,PglL 和 PilO 结构域组成的差别或许是造成两个酶识别不同重复单位寡糖的原因。

利用细菌的 O-抗原或者荚膜多糖亚基进行蛋白糖基化是完全可行的,因为这些糖苷都聚集在相同的脂载体上,并且 O-OTases 具有广泛的底物特异性。这一特点在细菌进化中发挥着重要作用,细菌通过水平转移获得一个 OTase 就能利用已经存在的脂多糖合成途径来实现蛋白的糖基化。

既然 PglL 对糖苷结构没有选择性,研究者们推测其对糖供体的识别位点主要在脂载体上。然而研究发现,在体外 PglL 能够利用非天然的不同结构的糖脂,甚至可以将稀有氨基酸 Bacillosamine (Bar)双乙酰氨基化衍生出的单糖 diNAcBac 从其对应的核苷酸活化形式转移到底物纤毛蛋白上<sup>[24]</sup>。这一发现说明 PglL 对糖脂的脂载体部分选择性也不高,也许 PglL 三维结构的阐明将推动 PglL 催化反应的研究。

虽然这 3 种细菌中的 O-寡糖基转移酶呈现出广泛的糖苷底物特异性,但它们的受体底物蛋白并不

多样。PilO 对 Pilin 的糖基化发生在 C 端的 148 位 Ser 残基上, 并且 Pilin 蛋白的二硫化物环所带的电荷以及末端的 Ser 是其催化糖基化反应所必需的识别因素<sup>[25]</sup>。然而 PglL 对底物蛋白的识别机制仍然未知。在 *N. meningitidis* 中, O-糖基化通常发生在蛋白富含丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸和天冬酰胺的低复杂性区域内<sup>[26]</sup>, 但是通过比较 PglL 的天然底物亚硝酸盐还原酶 AniA 和纤毛蛋白发现, 它们的糖基化位点附近相同的序列只有 Ser-Ala, 而此序列不仅在许多非糖基化蛋白的序列中出现, 甚至在这两个天然底物的其它非糖基化区域也存在, 这说明此序列不能用来判定 PglL 的底物。将 PglL 的底物 Pilin 蛋白从 C 端进行不同程度的截短, 试图寻找 PglL 的最小识别区域, 却发现 Pilin 蛋白经过截短就不能在大肠杆菌中表达。同样, 研究发现 *Clostridium thermocellum* 或者 *Mycobacterium tuberculosis* 中的 O-糖基化通常发生在富含脯氨酸的蛋白区域, 也没有发现既能够实现糖基化且又必不可少的基序<sup>[27]</sup>。*N. gonorrhoeae* 来源的 PglL 在体外实验中能够将纯化的完整 Pilin 蛋白糖基化, 却不能将 Pilin 上的含糖基化位点及其附近氨基酸残基的一段肽链糖基化<sup>[28]</sup>, 这些都说明底物蛋白的二级结构可能是影响 PglL 底物识别的主要因素。据报道, Pilin 的糖基化位点在一个包含短  $\alpha$  螺旋的表面环上<sup>[29]</sup>, AniA 肽的圆二色光谱显示其结构包含规则的螺旋结构, 糖基化位点附近的脯氨酸可能引入了发生糖基化所需的与 Pilin 糖基化位点相似的结构, 这些分析初步说明 PglL 识别的并不是初级氨基酸序列, 而是糖基化位点附近的结构<sup>[30]</sup>。与此类似, 有报道显示催化 *Escherichia coli* 黏附素(AIDA-I)糖基化的 AIDA 相关七糖转移酶(AIDA associated heptosyltransferase, Aah)可以识别右旋的  $\beta$  螺旋结构, 而不是特异的氨基酸序列<sup>[31]</sup>。

在 *E. coli* 中, PglL 能够将 Pilin 的另外两个位点糖基化。在 *N. gonorrhoeae* 和 *N. meningitidis* 中, 这两个位点被磷酸甘油所修饰, 这一结果说明糖基化和甘油磷酸化有可能识别相同的结构基序<sup>[32]</sup>, 而

在 PglL 的原始菌株以及体外反应中, PglL 均只能催化 63 位的丝氨酸发生糖基化<sup>[23]</sup>。这些差别可能是由细菌周质空间里发生的转位、折叠和糖基化间的协调情况不同造成的。

对不同 O-寡糖基转移酶的生物信息学分析表明, 它们虽然序列相似性较低, 但均含有 Wzy-C 结构域, 并与一些保守氨基酸一起位于接近 C 端的弯向周质空间的环上。PglL 与脂载体结合后将使其自身的构象发生改变, 从而使 PglL 的 C 端结构域更加稳定。Q178A 和 Y405A 突变体也能与脂载体相结合通过自身构象的改变而稳定 C 端结构域, 但其表现出的糖基化活性降低, 由此可见, 178 和 405 位的氨基酸在酶的催化活性方面发挥着重要作用。而 H349A 突变体则不能与脂载体结合, 其 C 端部分很容易被蛋白酶所降解并且失去催化活性, 分析 349 位的组氨酸可能与 UndPP-糖苷结构中的磷酸基团相互作用<sup>[33]</sup>, 促使酶的构象发生改变。

## 2.2 拟杆菌门细菌的 O-糖基化系统

之前很长一段时间只在很少一些种属的微生物中被发现有普遍蛋白糖基化系统的存在, 而目前发现拟杆菌门的细菌都存在普遍的 O-糖基化系统。*Bacteroides* 细菌在人类肠道微生物中占有较大比重, 且大多能产生多样的糖苷结构, 其糖蛋白的糖链部分由核心糖苷和外糖苷两部分组成。在拟杆菌门的 4 个不同的纲, 所有细菌的糖蛋白均具有免疫原性相同的核心糖苷。核心糖苷由两个单糖组成, 可能为甘露糖和甲基化的鼠李糖, 其合成基因很有可能没有聚集在一起形成一个基因簇。然而外糖苷则在不同种的微生物中具有多样性, 但外糖苷对应的遗传区域相对保守。在 *Bacteroides* 细菌中存在一个保守区域, 此区域包含一些负责外糖苷合成的基因<sup>[34]</sup>。更特别的是, 拟杆菌门微生物的糖基化系统还识别相同的糖基化位点。糖基化位点的识别所需的氨基酸序列为 Asp-Ser/Thr-Ala/Ile/Leu/Val/Met/Thr, 最后的氨基酸必需包含甲基<sup>[35]</sup>。细菌 N-糖基化系统识别的氨基酸序列为 NX(S/T), 天冬酰胺侧链的羰基和丝氨酸或苏氨酸的骨架氨基间形成氢键作用,

从而增加了天冬酰胺侧链的亲核性,因此这一结构对糖基化的位点识别和催化反应均非常重要<sup>[36]</sup>。同理, *Bacteroides fragilis* 的 O-糖基化识别的基序既参与了识别又参与了催化反应。识别序列的第三个带甲基的氨基酸具有很强的惰性,很可能仅在糖基化位点的识别中起作用,而第一个天冬氨酸可能发挥催化作用。

*B. fragilis* 能够在特定的氨基酸序列上添加糖苷,这一特性使研究者们可以利用电脑分析可能的糖蛋白。通过在 *B. fragilis* 中寻找有信号肽酶 I 或者 II 的酶切位点,或有穿膜区域且同时至少有一个糖基化识别基序的蛋白,最终发现了 1 021 个可能的糖蛋白。通过实验选取一些蛋白进一步验证,目前还没有发现未被糖基化的现象<sup>[37]</sup>。因此推测脆弱拟杆菌中有超过一半的细胞质外蛋白均被糖基化。利用 *Bacteroides* 的糖基化系统,通过在没有糖基化的天然蛋白上引入糖基化基序,此工程蛋白会在引入的位点发生糖基化,这一特性使此糖基化系统能够精确地在蛋白的各种目标位点引入 O-糖基化来构建各种各样的工程糖蛋白,拥有广阔的应用前景。

在拟杆菌门内蛋白糖基化系统的保守性说明,蛋白翻译后修饰系统的进化相比于拟杆菌门分化为 4 个纲的过程要早,而且由于其生理功能的重要性一直保留至今,其 O-糖基化的具体过程还有待进一步探索。

### 2.3 其它种属细菌的 O-糖基化系统

一些不动杆菌属的微生物有两个 O-寡糖基转移酶,其中一个编码基因紧邻 *pilin* 基因,位于其下游负责 Pilin 蛋白的 O-糖基化,而另一个编码基因则位于较远的一个糖苷生物合成基因簇内,负责除 Pilin 外其它蛋白的糖基化<sup>[38]</sup>。

OTase 依赖的 O-糖基化也存在于革兰氏阳性菌中。在 *Clostridium thermocellum* 的纤维素体中就存在被 O-寡糖基转移酶所糖基化的 O-糖蛋白<sup>[27]</sup>。PglI 同源物也被发现存在于别的一些革兰氏阳性菌中,因此,以后在这些微生物中发现 PglI 依赖的 O-糖基化过程也将不足为奇。

## 3 总结

O-糖基化没有通用的保守序列,不同的寡糖基转移酶可能拥有不同的底物特异性,或者它们识别的是除初级序列之外的其它信息。在大多数情况下,O-糖蛋白从细胞质被运输到细胞外,或者在细菌细胞的内膜或外膜上。蛋白转运和糖基化过程必定相互协调来保证效率。然而这些过程怎样同步协调进行还有待进一步的研究。

原核生物 O-糖基化的研究还处于初级阶段,相信随着细菌全基因组测序工作的进展以及糖蛋白结构检测技术的进步,将会对 O-糖基化修饰系统有更多、更全面的认识。可以预见,将来通过选择合适的寡糖基转移酶,并根据其底物特异性要求定向改造蛋白序列或结构,便可获得定制的糖蛋白,从而使其在糖蛋白疫苗的生产及抗致病菌感染等方面发挥重要作用。

## 参考文献

- [1] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1999, 1473(1): 4-8
- [2] Sleytr UB. Heterologous reattachment of regular arrays of glycoproteins on bacterial surfaces[J]. Nature, 1975, 257(5525): 400-402
- [3] Mescher MF, Strominger JL. Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(7): 2005-2014
- [4] Iwashiki JA, Vozza NF, Kinsella RL, et al. Pour some sugar on it: the expanding world of bacterial protein O-linked glycosylation[J]. Molecular Microbiology, 2013, 89(1): 14-28
- [5] Parker JL, Lowry RC, Couto NAS, et al. Maf-dependent bacterial flagellin glycosylation occurs before chaperone binding and flagellar T3SS export[J]. Molecular Microbiology, 2014, 92(2): 258-272
- [6] Thibault P, Logan SM, Kelly JF, et al. Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(37): 34862-34870
- [7] Scott AE, Twine SM, Fulton KM, et al. Flagellar glycosylation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(14): 3577-3587
- [8] de Maayer P, Cowan DA. Flashy flagella: flagellin modification is relatively common and highly versatile among the *Enterobacteriaceae*[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 377
- [9] Beatson SA, Minamino T, Pallen MJ. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(4): 151-155
- [10] Chen Y, Seepersaud R, Bensing BA, et al. Mechanism of a cytosolic O-glycosyltransferase essential for the synthesis of a bacterial adhesion protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016,

- 113(9): E1190-E1199
- [11] VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, et al. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways[J]. *Science*, 2005, 309(5736): 941-943
- [12] Coddeville B, Wu SW, Fabre E, et al. Identification of the *Mycobacterium marinum* Apa antigen O-mannosylation sites reveals important glycosylation variability with the *M. tuberculosis* Apa homologue[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(18): 5695-5705
- [13] Wehmeier S, Varghese AS, Gurcha SS, et al. Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(2): 421-433
- [14] Liu CF, Tonini L, Malaga W, et al. Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(16): 6560-6565
- [15] Córdova-Dávalos LE, Espitia C, González-Cerón G, et al. Lipoprotein N-acyl transferase (Lnt1) is dispensable for protein O-mannosylation by *Streptomyces coelicolor*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 350(1): 72-82
- [16] Espitia C, Servín-González L, Mancilla R, New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes[J]. *Molecular Biosystems*, 2010, 6(5): 775-781
- [17] Power PM, Roddam LF, Dieckelmann M, et al. Genetic characterization of pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*[J]. *Microbiology*, 2000, 146(4): 967-979
- [18] Castic P, Cassels FJ, Carlson RW. Structural characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(28): 26479-26485
- [19] Chamot-Rooke J, Rousseau B, Lanternier F, et al. Alternative *Neisseria* spp. type IV pilin glycosylation with a glyceramido acetamido trideoxyhexose residue[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(37): 14783-14788
- [20] Aas FE, Vik Å, Vedde J, et al. *Neisseria gonorrhoeae* O-linked pilin glycosylation: functional analyses define both the biosynthetic pathway and glycan structure[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(3): 607-624
- [21] Power PM, Roddam LF, Rutter K, et al. Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(3): 833-847
- [22] Gault J, Ferber M, Machata S, et al. *Neisseria meningitidis* Type IV Pili composed of sequence invariable pilins are masked by multisite glycosylation[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(9): e1005162
- [23] Faridmoayer A, Fentabil MA, Haurat MF, et al. Extreme substrate promiscuity of the *Neisseria* oligosaccharyl transferase involved in protein O-glycosylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50): 34596-34604
- [24] Musumeci MA, Hug I, Scott NE, et al. *In vitro* activity of *Neisseria meningitidis* PglL O-oligosaccharyltransferase with diverse synthetic lipid donors and a UDP-activated sugar[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(15): 10578-10587
- [25] Horzempa J, Comer JE, Davis SA, et al. Glycosylation substrate specificity of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(2): 1128-1136
- [26] Vik Å, Aas FE, Anonsen JH, et al. Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(11): 4447-4452
- [27] Gerwig GJ, Kamerling JP, Vliegthart JF, et al. The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(36): 26956-26960
- [28] Hartley MD, Morrison MJ, Aas FE, et al. Biochemical characterization of the O-linked glycosylation pathway in *Neisseria gonorrhoeae* responsible for biosynthesis of protein glycans containing N,N'-diacetyl bacillosamine[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(22): 4936-4948
- [29] Craig L, Volkmann N, Arvai AS, et al. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions[J]. *Molecular cell*, 2006, 23(5): 651-662
- [30] Schulz BL, Jen FEC, Power PM, et al. Identification of bacterial protein O-oligosaccharyltransferases and their glycoprotein substrates[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62768
- [31] Charbonneau MÈ, Côté JP, Haurat MF, et al. A structural motif is the recognition site for a new family of bacterial protein O-glycosyltransferases[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(5): 894-907
- [32] Anonsen JH, Egge-Jacobsen W, Aas FE, et al. Novel protein substrates of the phospho-form modification system in *Neisseria gonorrhoeae* and their connection to O-linked protein glycosylation[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(1): 22-30
- [33] Musumeci MA, Faridmoayer A, Watanabe Y, et al. Evaluating the role of conserved amino acids in bacterial O-oligosaccharyltransferases by *in vivo*, *in vitro* and limited proteolysis assays[J]. *Glycobiology*, 2014, 24(1): 39-50
- [34] Coyne MJ, Fletcher CM, Chatzidaki-Livanis M, et al. Phylum-wide general protein O-glycosylation system of the Bacteroidetes[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 88(4): 772-783
- [35] Fletcher CM, Coyne MJ, Villa OF, et al. A general O-glycosylation system important to the physiology of a major human intestinal symbiont[J]. *Cell*, 2009, 137(2): 321-331
- [36] Imperiali B, Hendrickson TL. Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1995, 3(12): 1565-1578
- [37] Fletcher CM, Coyne MJ, Comstock LE. Theoretical and experimental characterization of the scope of protein O-glycosylation in *Bacteroides fragilis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(5): 3219-3226
- [38] Harding CM, Nasr MA, Kinsella RL, et al. A *cinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(5): 1023-1041