毛果杨全基因组铵转运蛋白家族成员及其序列分析

李 磊^{1a,2},罗 杰^{1a},李 红^{1c},罗志斌^{1b}

(1 西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 林学院, c 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100;2 中国科学院 遗传与发育生物学研究所,北京 100101)

[摘 要] 【目的】探讨毛果杨(Populus trichocar pa)全基因组中铵转运蛋白(AMTs)家族成员的系统发育及部分成员的理化性质、结构和亚细胞定位。【方法】以从毛果杨全基因组数据库中搜索并筛选得到的目标蛋白序列为基础,应用软件 CLUSTALX 2.0、GeneDOC 和 MEGA4,对 AMTs 家族成员的系统发育进行了分析,并重点分析了AMT1 亚家族成员 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6 和 AMT2 亚家族成员 PtrAMT2-1、PtrAMT4-5 的保守基序、理化参数、 亲/疏水性、跨膜域、三级结构及亚细胞定位。【结果】在毛果杨基因组数据库中发现了 19 个 AMTs,8 个属于 AMT1 亚家族,11 个属于 AMT2 亚家族;AMT1 和 AMT2 亚家族内的蛋白序列保守性强,而亚家族之间的差异较大;AMT1 与 AMT2 间的共同基序较少;AMTs 是一类位于膜上运输 NH⁺ 的蛋白家族,有 10~11 个跨膜域,亚家族内蛋白三 维结构相似,不同 AMTs 成员的亚细胞定位不同。【结论】在毛果杨中,AMT1 与 AMT2 亚家族分开较早,各 AMTs 在杨树氮素代谢中起着不同的作用,共同维持并调控着杨树体内的氮素平衡。

[关键词] 铵转运蛋白;杨树;基因组;序列分析

[中图分类号] S718.43 [文献标识码] A

E-mail:luozhibin@nwsuaf.edu.cn

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0133-10

Genome-wide analysis of the ammonium transporter gene family in *Populus trichocarpa*

LI Lei^{1a,2}, LUO Jie^{1a}, LI Hong^{1c}, LUO Zhi-bin^{1b}

(1 a College of Life Sciences, b College of Forestry, c College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China; 2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] This study aims to elucidate the phylogenesis of the ammonium transporter (AMTs) family members and to analyze the physical, chemical, structural characteristics and sub-cellular location of four ammonium transporters (PtrAMT1-1, PtrAMT1-6, PtrAMT2-1 and PtrAMT4-5) from *Populus trichocarpa*. [Method] Phylogenetic analysis of AMTs from the sequenced genome of *P. trichocarpa* was performed by using softwares CLUSTALX 2.0, GeneDOC and MEGA4. The physical, chemical, hydrophilicity/hydrophobicity, transmembrane domains, secondary and three-dimensional structure were analyzed by online softwares of bioinfomatics. [Result] Nineteen AMTs are found in the genome of *P. trichocarpa*. Eight PtrAMTs belong to AMT1 subfamily and the other eleven to AMT2 subfamily. Within PtrAMT subfamily the amino acid sequence is highly conserved, but marked difference in amino acid sequence exists between PtrAMT1 and PtrAMT2. There are few common motifs between PtrAMT1 and PtrAMT2. PtrAMTs contain 10-11 transmembrane domains. Within PtrAMT subfamily the three-dimensional structures of PtrAMT3 contain 10-11 transmembrane domains.

* [收稿日期] 2010-07-06
 [基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0468);教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20090204110027);霍 英东教育基金会项目(121026)
 [作者简介] 李 磊(1988-),男,河南新乡人,硕士,主要从事植物分子生物学研究。
 [通信作者] 罗志斌(1973-),男,湖南湘乡人,教授,博士生导师,主要从事植物生态生理与分子生理研究。

are similar. PtrAMT family members distribute different sub-cellular locations. [Conclusion] These results indicate that PtrAMT1 and PtrAMT2 may be separated in an early stage during their evolution processes and PtrAMT family members play different roles in nitrogen metabolism to maintain the nitrogen homeostasis in *P. trichocarpa* under changing nitrogen conditions.

Key words: ammonium transporters; Populus trichocarpa; genome; sequence analysis

铵转运蛋白(Ammonium Transporters, AMTs)是一类广泛存在于微生物、植物及动物细胞 膜上主动转运 NH⁴ 的载体蛋白,分子质量约为 48 ku,含有 10~11 个跨膜结构域^[1-2]。在植物中,已经 从水稻(Oryza sativa)、小麦(Triticum aestivum)、 拟南芥(Arabidopisis thaliana)、番茄(Lycopersicon esculentum)、百脉根(Lotus japonicus)、杨树 (Populus trichocarpa)等植物中分离鉴定了多个铵 转运蛋白^[3],其中拟南芥中有 6 个^[4],水稻中有 10 个^[5-6],杨树中已发现了 14 个^[7]。

植物中铵转运蛋白家族分为 AMT1 和 AMT2 2 个亚家族^[8-9]。目前,对植物铵转运蛋白的研究多 集中在拟南芥、番茄、水稻等 1 年生草本植物中,而 对木本植物中铵转运蛋白的研究较少。最近,Couturier 等^[7]研究了杨树中铵转运蛋白的家族成员及 部分 AMT 基因的表达模式。作为高亲和力铵转运 系统的 AMT1-2,其表达受到细胞内氮浓度的影响; AMT1-6 的表达受到光周期的严格调控;AMT3-1 在衰老的杨树叶片中过量表达,可能与衰老组织中 NH⁴ 的再利用有关;AMT1-5 和 AMT1-6 特异性 表达于花组织中,可能在杨树繁殖器官的发育过程 中起重要作用^[7]。

Couturier 等^[7]对杨树铵转运蛋白的研究是基 于杨树基因组数据库(Populus trichocarpa v1.0)而 完成的。然而,杨树基因组数据库中存在大量冗余 序列和部分微生物污染序列^[10]。为了清除冗余序 列和污染序列,杨树基因组数据库进行了更新(http://genome. jgi-psf. org/Poptr1 _ 1/Poptr1 _ 1. home. html 和 http://www. phytozome. net/ poplar)。此外,Couturier 等的研究没有涉及杨树铵 转运蛋白的理化性质、亚细胞定位和结构等方面的 内容。鉴于杨树基因组数据库的更新和杨树铵转运 蛋白理化特性、亚细胞定位及结构等信息的缺乏,有 必要对杨树基因组中铵转运蛋白的家族成员及其序 列作进一步分析研究。为此,本研究综合毛果杨全 基因组数据库 Populus trichocarpa v1.1 (http:// genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)和 2010 年初公布的 Phytozome v5.0 (http:// www.phytozome.net/poplar)中检索到的铵转运蛋 白序列,获得毛果杨全基因组中铵转运蛋白家族的 成员信息,利用生物信息学软件 CLUSTALX 2.0、 GeneDOC 等,对这些铵转运蛋白序列进行剔除和多 重序列比对,并利用分子进化分析软件 MEGA4,构 建毛果杨基因组中铵转运蛋白的系统发育树;此外, 还对部分铵转运蛋白的理化性质和亚细胞定位进行 了分析,并利用 Swiss-Model 等软件对铵转运蛋白 的跨膜结构域及三级结构等进行了分析,以期为毛 果杨的氮素吸收转运机理研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 杨树铵转运蛋白序列的获取

首先以"Ammonium Transporter"为关键词,在 毛果杨全基因组数据库 Populus trichocarpa v1.1 (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1. home.html)中进行搜索,获得 Ammonium Transporter 基因模型。根据其他生物中已知铵转运蛋白 序列的长度^[3],从杨树铵转运蛋白序列中剔除序列 长度不在 350~550 氨基酸残基的冗余序列;另外, 利用软件 CLUSTALX 和 GeneDOC,分析所得杨树 铵转运蛋白的序列,在蛋白序列相似性大于 96%的 冗余序列中,仅保留其中 1 条。最后,将通过上述方 法获得的蛋白序列进一步导入最新杨树基因组数据 库 Phytozome v 5.0 (http://www.phytozome. net/)中进行 BLAST,寻找其他可能的最新蛋白序 列。

1.2 杨树铵转运蛋白的多重序列比对与系统发育 分析

以"Ammonium Transporter"为关键词,在数据 库 NCBI 中搜索拟南芥(A. thaliana)、水稻(O. satica)、番茄(L. esculentum)、甘蓝型油菜(Brassica napus)和酵母(Saccharomyces cerevisiae)中的非冗余 蛋白序列,获得的铵转运蛋白登录号分别为 AtAMT1-1 (NP_193087)、AtAMT1-2 (NP_ 176658)、AtAMT1-3 (NP_189073)、AtAMT1-4 (NP_194599)、AtAMT1-5 (NP_189072)、AtAMT2 (NP_181363)、OsAMT1-1 (AAL05612)、Os-

135

AMT1-2 (BAD21572)、OsAMT1-3 (BAD21574)、 OsAMT2-1 (Q84KJ7)、OsAMT2-2 (Q8S230)、Os-AMT2-3 (Q8S233)、OsAMT3-1 (Q84KJ6)、Os-AMT3-2 (Q851M9)、OsAMT3-3 (Q69T29)、Os-AMT4-1 (Q10CV4)、LeAMT1-1 (X92854)、 LeAMT1-2 (CAA64475)、LeAMT1-3 (AAG11397)、 BnAMT1-2 (AAG28780)、ScMEP1 (NP_011636)、 ScMEP2 (NP_014257)、ScMEP3 (NP_01546)。将 得到的序列文件导入软件 CLUSTALX 2.0 中进行 多重序列比对。利用分子进化分析软件 MEGA4 中 的邻位连接法构建系统发育树,并对生成的发育树 进行 Bootstrap 校正^[11-12]。利用软件 MEME(http://meme.sdsc.edu/meme4_1_0/cgi-bin/meme. cgi)分析蛋白的保守基序(motif),基序长度设为 6 ~200 氨基酸残基,基序最大数目设为 10^[13]。

1.3 杨树铵转运蛋白一级结构及跨膜区的分析

以毛果杨铵转运蛋白 AMT1 亚家族成员 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6 和 AMT2 亚家族成员 PtrAMT2-1、PtrAMT4-5 为研究对象,利用瑞士生 物信息学研究所提供的 ProtParam (http://expasy.org/tools/protparam.html)和 ProtScale (http://expasy.org/tools/protscale.html)程序,参照 Gasteiger 等^[14]的分析方法,分别对上述4种蛋白序 列的氨基酸残基数目、组成、相对分子质量、理论等 电点和亲/疏水性进行在线分析。同时,参照 Ikeda 等^[15]的分析方法,用 TMpred (http://www.ch. embnet. org/software/TMPRED_form. html)程序 PtrAMT1-1, PtrAMT1-6, PtrAMT2-1, 对 PtrAMT4-5的跨膜区结构进行预测。此外,参照 Claros 等^[16]的分析方法,利用瑞典斯德哥尔摩大学 (Stockholm University)理论化学蛋白质预测服务 器 TopPred (http://bioweb. pasteur. fr/seqanal/ interfaces/toppred.html)和程序 TMpred (http:// www. ch. embnet. org/software/TMPRED_form. html),对 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、PtrAMT2-1、 PtrAMT4-54个膜蛋白跨膜区的拓扑学结构进行 预测。

1.4 杨树铵转运蛋白的三级结构及亚细胞定位分析

利用瑞士生物信息学研究所的蛋白质结构数据 库(http://expasy.org/tools/)中的 Swiss-Model 程序,参照 Bordoli 等^[17]的分析方法,进行同源建 模,进而对 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、PtrAMT2-1、 PtrAMT4-5蛋白的三级结构进行预测。运用结构 仿真模拟程序(ProMod II)和能量最小化分析程序 (GROMOS),构建目标蛋白序列的结构。利用 Deep-View (Swiss-PdbViewer)查看结构分析结果, 并计算得出 Ranachandran 图^[18]。WoLF PSORT 是一种常用的蛋白质亚细胞定位预测工具,它根据 氨基酸组成和 iPSORT 等特征分析生物中蛋白序列 的亚细胞定位。将 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、 PtrAMT2-1和 PtrAMT4-5的蛋白序列导入在线分 析程序(http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/),按照 Horton 等^[19]的方法,对杨树铵转运蛋白的亚细胞 定位进行预测分析。

2 结果与分析

2.1 杨树铵转运蛋白的序列

通过对毛果杨全基因组的数据库检索、软件分 析和冗余序列的手工剔除,最终获得了19个铵转运 蛋白序列(表 1),其中 14个铵转运蛋白序列在数据 库中已有基因和蛋白注释,故采用了数据库中已有 的蛋白名称,其他5个蛋白推荐名称分别为 PtrAMT-N1, PtrAMT-N2, PtrAMT-N3, PtrAMT-N4 和 PtrAMT-N5。从获得的 19 个铵转运蛋白基因 组的信息得知,毛果杨铵转运蛋白的氨基酸残基数目 为400~520,编码杨树铵转运蛋白的基因零散分布在 整个基因组中,但也有 PtrAMT1-4、PtrAMT1-5 和 PtrAMT4-1均在连锁群(LG) [[上。另外, PtrAMT4-3和 PtrAMT4-5均位于杨树基因组 5号染色体上, PtrAMT-N4 和 PtrAMT3-1 在 1 号染色体上, PtrAMT-N5 和 PtrAMT2-1 在 6 号染色体上, PtrAMT-N3 和 PtrAMT4-4 在 13 号染色体上(表 1)

2.2 杨树铵转运蛋白的系统发育与保守序列分析

由构建的系统发育树(图 1)可见,杨树 AMTs 可明显分为 2 个亚家族,包括目前已经报道的 6 个 AMT1 亚家族成员和 8 个 AMT2 亚家族成员^[7],此 外还包括本研究发现的 5 个铵转运蛋白,其中 PtrAMT-N3 和 PtrAMT-N4 属于 AMT1 亚家族, 其他 3 个属于 AMT2 亚家族。同源性比较分析发 现,在杨树 AMT1 亚家族中,PtrAMT1-1 与 PtrAMT1-3 的亲缘关系最近(89%),但两者分别位 于 10 号和 8 号染色体上,可能是由于近期染色体之 间发生的交换事件造成的;PtrAMT1-4 与 PtrAMT1-5 的相似性为 80%,且两者位于同一染色 体上,可能是由于近期染色体重复事件造成的。杨 树 AMT2 亚家族成员又可以继续分为 3 个分支(图 1),其中,第 3 个分支中的成员最多。AMT2 亚家 族中 PtrAMT2-1 与 PtrAMT2-2 的相似性最高 (94%),两者分别位于6号和16号染色体上,这也 可能是由于近期染色体之间发生的交换事件造成 的;类似情况也存在于 PtrAMT4-1 与 PtrAMT4-3 以及 PtrAMT4-2 与 PtrAMT-N5 之间。

表 1 毛果杨中铵转运蛋白家族成员及其基因组位置

Table 1 AMT family members and their locations in the genome of P. trichocarpa

AMT 基因	位点名称	基因模型名称	基因座位
AMT Genes	Locus names (Phytozome v	75.0) Gene model names (JGI v1.1)	Genome locations
PtrAMT1-1	POPTR_0010s07400	fgenesh4_pm. C_LG_ <u>X</u> 000154	scaffold_10:8458595-8460452
PtrAMT1-2	POPTR_0019s04030	grail3.0085006901	scaffold_19:4125367-4127155
PtrAMT1-3	POPTR_0008s17390	eugene3. 00081611	scaffold_8:11669436-11671568
PtrAMT1-4	POPTR_0002s25640	fgenesh4_pm. C_LG_ [] 001196	scaffold_2:22719626-22721113
PtrAMT1-5	POPTR_0002s25630	grail3.0021033901	scaffold_2:22717331-22718867
PtrAMT1-6	POPTR_0009s04980	fgenesh4_pm. C_LG_[] 000556	scaffold_9:5192479-5194149
PtrAMT2-1	POPTR_0006s10370	fgenesh4_pm. C_LG_1000362	scaffold_6:7770420-7773548
PtrAMT2-2	POPTR_0016s12900	fgenesh4_pm. C_LG_	scaffold_16:12235991-12238430
PtrAMT3-1	POPTR_0001s31280	gw1. [.3790.1	scaffold_1:29615685-29618855
PtrAMT4-1	POPTR_0002s04780	fgenesh4_pg. C_LG_ [[000440	scaffold_2:3015488-3017359
PtrAMT4-2	POPTR_0018s01180	gw1. X ₩.1425.1	scaffold_18:1091196-1092867
PtrAMT4-3	POPTR_0005s23750	gw1. V.1030.1	scaffold_5:22503545-22505866
PtrAMT4-4	POPTR_0013s05980	fgenesh4_pm. C_LG_ ⅓ Ⅲ 000173	scaffold_13:4379509-4381223
PtrAMT4-5	POPTR_0005s10810	gw1. 57. 97. 1	scaffold_5:7749422-7751370
<i>PtrAMT</i> -N1(NA)	NF	gw1.117.99.1	scaffold_117:565994-571884
<i>PtrAMT</i> -N2(NA)	NF	gw1.117.94.1	scaffold_117:547767-555483
<i>PtrAMT</i> -N3(NA)	NF	gw1. X III.1761.1	LG_X III:3601420-3602943
<i>PtrAMT</i> -N4(NA)	NF	gw1. [.943.1	LG_I:16858069-16859896
<i>PtrAMT</i> -N5(NA)	NF	gw1. VI. 2743.1	LG_V[:16769921-16771955

注:NA.数据库中尚未注释该蛋白序列;NF.数据库中未找到。

Note: NA. No annotation is available; NF. The locus name is not found.



图 1 毛果杨铵转运蛋白的系统进化树及基因 外显子/内含子结构

.外显子;—.内含子;….3'或5'非翻译区(UTR)

Fig. 1 Phylogenetic tree and the structures of exon and intron of ammonium transporters (AMTs) in *P. trichocarp*

Exons;—. Introns;…. Untranslated regions

从杨树铵转运蛋白基因的内含子/外显子结构 图(图 1)可以得知,除 PtrAMT-N4 含有1个内含子 外,其余 AMT1 亚家族成员均不含内含子。而杨树 AMT2 亚家族的 11 个成员均含有 2~3 个内含子, 其中只有 4 个家族成员含有 3 个内含子。由此可 见,杨树铵转运蛋白家族成员的基因结构较为保守。

采用 MEME^[13]在线工具,分析铵转运蛋白 2 个 亚家族蛋白的保守基序,结果如图 2 所示。图 2 显 示,保守基序 2、3、8 只出现在 AMT1 亚家族中,而 PtrAMT1-6 和 PtrAMT-N4 中不含基序 3, PtrAMT-N4 同时也不含基序 9;而基序 1、4、6、10 只在 AMT2 亚家族中出现,其中 PtrAMT1-6 含有 与 AMT2 亚家族部分相同的基序,这说明在进化过 程中,此蛋白与 AMT1 亚家族其他成员存在差异。 从保守基序及其所处的位置上还可以看出,2 个亚 家族成员的相似性较低,而每一个亚家族之内的成 员几乎含有相同的保守基序,其位置分布也较为保 守。

在杨树与其他模式物种铵转运蛋白的系统进化树(图 3)中发现,杨树 AMT1 亚家族中的 PtrAMT1-1与同家族中其他成员的相似性都在 80%左右,而与 AMT2 亚家族成员的相似性低于 20%,与酵母中3个铵转运蛋白 ScMEP2、ScMEP1、 ScMEP3 的相似性分别为 19%,18% 和 18%;而杨 树及其他植物的 AMT2 亚家族成员与酵母中铵转 运蛋白的相似性均高于 20%,可见植物 AMT2 亚家 族成员与酵母铵转运蛋白的亲缘关系较其与植物 AMT1 亚家族成员更近,说明 AMT2 亚家族可能在 很早以前就与 AMT1 家族分开。

□ Motif1; ■ Motif2; ☑ Motif3; □ Motif4; □ Motif5; ⊠ Motif6; □ Motif7; □ Motif8; ⊞ Motif9; □ Motif10

Sequence		Block Diagram		
PtrAMT1-1				
PtrAMT1-2				
PtrAMT1-3				
PtrAMT1-4				
PtrAMT1-5				_
PtrAMT-N3				
PtrAMT1-6		B		
PtrAMT-N4				
PtrAMT2-1	E <u>[:::::::::::::::::</u> IIIIIIIIIIII		XXXXXXX	_
PtrAMT2-2				_
PtrAMT3-1			XXXXXXXX	
PtrAMT4-1				
PtrAMT4-2	E== <u>\</u>			
PtrAMT4-3	E-34::::::::::::::::::::::::::::::::::::		-XXXXXXXX	
PtrAMT4-4				
PtrAMT-N2				
PtrAMT-N5	E==_[:::::::::::::::::::::::::::::::::::			
PtrAMT4-5				
PtrAMT-N1				
	0 100 200	300	400	500

图 2 毛果杨铵转运蛋白(AMTs)的保守基序

Fig. 2 Diagram of conserved motifs of ammonium transporters (AMTs) in P. trichocarpa



图 3 杨树及其他模式生物铵转运蛋白家族的系统进化树(据 Couturier 等^[7]修改)

Fig. 3 Phylogenetic tree of ammonium transporters (AMTs) in model organisms (adapted from Couturier et al^[7])

2.3 杨树铵转运蛋白的一级结构及跨膜区预测

PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5的基本理化参数见表 2。由表 2 可以看 出,这 4 种铵转运蛋白中带正电和负电的氨基酸残 基数目较为接近,其理论等电点也在 7.0 左右,这可 能与膜转运蛋白的功能相关。4 种蛋白质的总平均 疏水性均为正值,表明这 4 种蛋白质均为疏水性蛋 白质;而 PtrAMT1-1 和 PtrAMT1-6 的不稳定系数

接近 20, PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 的不稳定系数 可能更稳定。

接近 40,这表明在体外试验中,AMT1 亚家族成员

表 2 毛果杨中 4 个铵转运蛋白的理化特性

Table 2 Physical and chemical characteristics of PtrAMT1-1, PtrAMT1-6,

PtrAMT2-1 and PtrAMT4-5 in P. trichocarpa

ب Physical and c	里化参数 hemical characteristics	PtrAMT1-1	PtrAMT1-6	PtrAMT2-1	PtrAMT4-5
氨基酸残基 Number of amino acids		498	465	485	431
相对分子质量 Molecular weight		53 391.2	50 176.8	52 348.0	46 816.7
理论等电点 Theoretical pI		7.6	5.7	6.5	7.7
负电氨基酸残基数目 Total number of negatively charged residues(Asp+Glu)		29	28	30	25
正电氨基酸残基数目 Total positively charged residues(number of Arg+Lys)	30	21	28	26
吸光度(280 nm)	形成胱氨酸 Cys residues form cystines	1.8	2.2	2.4	2.2
coefficients (280 nm)	不形成胱氨酸 All cys residues are reduced	1.8	2.2	2.4	2.2
不稳定系数 Instability index		20.3	19.9	33.9	38.7
亲脂性系数 Aliphatic index		88.8	96.7	106.8	101.2
总平均疏水性 Grand average of hydropathicity		0.373	0.522	0.485	0.547





图 4 毛果杨中 4 个铵转运蛋白的亲/疏水性分析 Fig. 4 Hydrophilicity and hydrophobicity of PtrAMT1-1,PtrAMT1-6,

PtrAMT2-1 and PtrAMT4-5 in P. trichocarpa

正值越大表示疏水性越强,负值越大表示亲水 性越强,分值为+0.5~-0.5的氨基酸主要为两性 氨基酸。由图4可见,4种铵转运蛋白的大部分氨 基酸分值大于一0.5,其中 PtrAMT1-1 和 PtrAMT1-6均有10个疏水性区域(大于1),而 PtrAMT2-1和 PtrAMT4-5均含11个疏水性区域,

PtrAMT4-5的亲/疏水性分析结果见图 4。

这些区域可能是跨膜区。

蛋白质的疏水性区域可以作为评判潜在跨膜区 的依据,但预测得到的疏水区并不一定是跨膜区域。 通过软件 TMpred 分析得到的结果与亲/疏水性分 析结果一致。TopPred 为主要的膜蛋白跨膜区拓扑 结构 预测软件^[16],采用该软件对 PtrAMT1-1、 PtrAMT1-6、PtrAMT2-1和 PtrAMT4-54种蛋白 进行了跨膜区拓扑结构预测,结果见图5。由图5 可知,与上述亲/疏水性分析结果相似,PtrAMT1-1 和 PtrAMT1-6中均有10个跨膜结构域,在 PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 中均有 11 个跨膜结构 域,这也与以前报道的植物铵转运蛋白含有 9~11 个跨膜结构域的结论相吻合^[20]。

从图 5 还可以看出, PtrAMT1-1 的 N 端和 C 端都位于胞质内侧, 而 PtrAMT1-6 恰好与之相反, 这与前人对 AtAMT1-1 的预测结果相似^[21]; AMT2 亚家族中的 PtrAMT2-1 与 PtrAMT4-5 的跨膜结 构域拓扑结构类似, 都含 11 个跨膜结构域, N 端位 于膜外侧, C 端位于膜内侧。



图 5 TopPred 对毛果杨中 4 个铵转运蛋白跨膜拓扑结构的预测 Fig. 5 Diagrams of trans-membrane topology of PtrAMT1-1,PtrAMT1-6,PtrAMT2-1 and PtrAMT4-5 predicted by TopPred in *P. trichocarpa*

2.4 杨树铵转运蛋白的三级结构及亚细胞定位

采用 Swiss-Model 程序自动在蛋白结构数据库 (http://expasy.org/tools/)中搜索相似序列,得到 2 条相似度较高的序列: 2b2hA(1.54Å)和 2nuuD (2.50Å);其中,PtrAMT1-1 和 PtrAMT1-6 与 2b2hA 的相似度分别为 27.6%和 29.2%, PtrAMT2-1和 PtrAMT4-5 与 2nuuD 的相似度分 别为 31.6%和 31.1%,符合同源建模相似度需大于 20%的要求^[17]。4种铵转运蛋白三级结构的预测结 果如图 6 所示。图 6 显示,PtrAMT1-1 和 PtrAMT1-6 各含有 11 个跨膜结构域,这与 2.3 中 得到的跨膜结构域预测结果不同,可能是因为模板 蛋白的相似度稍低所致,也有可能是因为疏水性分 析中的 2 个相临区域在三级结构分析中被分开所 致;PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 的三级结构预测结 果与亲/疏水性分析及跨膜结构域分析结果一致,即 均有 11 个由 α 螺旋组成的跨膜结构域。通过对建 模结果的检测,计算得出了 Ramachandran 图(图 7),Ramachandran 图中实线区域是最理想的 Φ 角 和 Ψ 角分布区域,而虚线区域外部则为不合理区 域。如果预测的蛋白质残基的二面角有 90%以上 位于实线区域内,则表明其有稳定的空间结构^[22]。



图 6 毛果杨中 4 个铵转运蛋白的三级结构预测 Fig. 6 Diagrams of three-dimensional structures of PtrAMT1-1,PtrAMT1-6, PtrAMT2-1 and PtrAMT4-5 in P. trichocar pa





从图 7 可以看出, PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、 PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 三级结构的 Φ 角和 Ψ 角 90%均位于理想区域,理论上表明模拟得到的铵 转运蛋白的三级结构是可靠的。

采用 WoLF PSORT 程序对所获得的杨树铵转

运蛋白序列进行分析,结果见表 3。

```
表 3 毛果杨中 4 个铵转运蛋白的亚细胞定位预测
```

Table 3 Analyses of predicted subcellular localizations of PtrAMT1-1, PtrAMT1-6,

PtrAMT2-1 and PtrAMT4-5 in P. trichocarpa						
亚细胞定位 Subcellular localizations	质膜 Plasma membrane	叶绿体(膜) Chloroplast	内质网 Endoplasmic reticulum	液泡膜 Vacuolar membrane	胞质溶胶 Cytosol	
PtrAMT1-1	5.0	2.0	2.0	—	2.0	
PtrAMT1-6	4.0	4.0	4.0	_		
PtrAMT2-1	10.5	—	—	—	—	
PtrAMT4-5	4.0	—	_	7.0	1.0	

注:表中数值为利用 WoLF PSORT 计算获得的 kNN(k-Nearest Neighbors)值, kNN 值为与预测蛋白序列最近邻且亚细胞定位已知蛋白 成员的数目^[19]。同一蛋白的多个 kNN 值表明该蛋白可能在多个亚细胞器间转运物质。

Note: The values in the table are the k-Nearest Neighbors calculated based on the algorithm of the programme PSORT WoLF, kNN value is the number of protein family members with known locations and the most similar to the predicted amino acid sequence^[19]. The multiple kNN values for the same protein indicate that the protein may transport substances among cellular organelles.

由表 3 可以看出,在 PtrAMT1-6 中有一叶绿体

转运蛋白,其很可能在叶绿体与胞质之间的 NH₄+

转运中起作用,尤其与转运光呼吸过程中产生的 NH₄ 再利用有关^[23];另外,发现 PtrAMT4-5 定位 于液泡膜上的可能性较大,这表明杨树通过铵转运 蛋白 PtrAMT4-5,将吸收到的细胞质中 NH⁴ 转运 至液泡等细胞器中,暂时储存氮素营养,同时调节胞 质内的 NH⁴ 浓度^[8]。这表明在长期进化过程中, 铵转运蛋白的亚细胞定位发生了变化,以适应不同 的氮素营养环境,调控不同浓度氮的吸收利用效率。

3 讨 论

本研究通过杨树全基因组数据库获取铵转运蛋 白家族序列,除获得 Couturier 等^[7]公布的 14 条序 列外,还另外发现了 5 个铵转运蛋白家族成员,其中 PtrAMT-N3 和 PtrAMT-N4 属于 AMT1 亚家族, 经 对 比 可 知, PtrAMT-N1、PtrAMT-N2 和 PtrAMT-N5 属于 AMT2 亚家族。PtrAMT1-1 与 拟南芥中 AtAMT1 亚家族成员序列的相似度为 72%~80%,而与 AtAMT2 的相似度仅有 20%。 铵转运蛋白 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 含有 10~11个疏水性区域,均属于 疏水性膜蛋白。

三级结构的预测既是蛋白质结构预测的重点和 难点,也是解析蛋白质结构和功能间关系的关键步 骤。目前,通过计算机预测目标蛋白三级结构的主要 有同源建模、折叠识别和从头预测法3种方法^[24]。三 级结构预测结果显示,毛果杨铵转运蛋白 PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 为 10~11 个 α 螺旋组成的球状蛋白质。通过分析预测蛋白质 中 ϕ 角和 Ψ 角的分布方式,可以评估模拟结构是否 与自然结构趋势相同。从 Ramachandran 图可以看 出, PtrAMT1-1、PtrAMT1-6、PtrAMT2-1 和 PtrAMT4-5 三级结构的 Φ 角和 Ψ 角有 90%位于理 想区域,表明模拟得到的三级结构是可靠的。随着 生物信息学的发展,用计算机程序预测蛋白质亚细 胞定位的系统也在逐步建立中,其主要原理是根据 目标蛋白质的氨基酸序列特征以及亚细胞的比较, 查询序列中所包含的特征参数与各类已被定位蛋白 质的相似度,对目标蛋白质的亚细胞定位进行模拟 预测^[25]。由于铵转运蛋白除了能够吸收外界 NH⁺ 外,可能还转运细胞代谢产生的 NH⁴。另外,NH⁴ 在不同亚细胞器之间的转运也可能需要不同铵转运 蛋白的协同作用。因此,不同铵转运蛋白可能定位 在不同的亚细胞结构上。通过对拟南芥 AtAMT2 和绿色荧光蛋白在叶细胞的瞬时融合表达进行研究 发现,AtAMT2蛋白定位于细胞质膜上,并可能在 植物细胞共质体和质外体间的 NH4 转运过程中起

着非常重要的作用^[26]。本研究的亚细胞定位预测 结果表明,PtrAMT1-1和PtrAMT2-1均位于质膜 上,PtrAMT1-6和PtrAMT4-5分别位于叶绿体膜 和液泡膜上,表明PtrAMT1-6很可能在叶绿体与胞 质之间的NH⁴ 转运中起作用,尤其与转运光呼吸 过程中产生的NH⁴ 再利用有关^[23],而PtrAMT4-5 通过调控胞质和液泡内NH⁴ 的浓度,调控植物体 对氮素的吸收和利用^[8]。

4 结 论

在毛果杨全基因组中发现的 19 个铵转运蛋白 可分为 2 个亚家族,其中 8 个为 AMT1 亚家族成 员,其余 11 个为 AMT2 亚家族成员。杨树铵转运 蛋白定位于膜上起转运 NH⁺ 的作用。由保守基序 预测结果可知,铵转运蛋白亚家族内的蛋白质序列 保守性强,且亚家族之间的差异较大。AMT1 和 AMT2 亚家族可能分开较早,差异显著,共同基序 较少。毛果杨铵转运蛋白一般具有 10~11 个跨膜 区域,家族内蛋白的三级结构相似。毛果杨铵转运 蛋白不同家族成员的亚细胞定位不同。以上结果表 明,铵转运蛋白家族成员在杨树氮素代谢中起着不 同的作用,共同维持并调控着杨树体内的氮素平衡。

[参考文献]

- [1] Li X D, Lupo D, Zheng L, et al. Structural and functional insights into the AmtB/Mep/Rh protein family [J]. Transfus Clin Biol, 2006, 13(1/2):65-69.
- [2] 骆媛媛,柳参奎.植物中铵转运蛋白的研究进展 [J]. 基因组学 与应用生物学,2009(2):373-379.
 Luo Y Y,Liu S K. Research progress of ammonium transporter in plants [J]. Geomics and Applied Biology,2009(2):373-379. (in Chinese)
- [3] 董越梅,李久蒂,朱至清. 铵载体(Amt)研究进展[J]. 植物学 通报,2000(1):39-45.
 Dong Y M, Li J D, Zhu Z Q. Molecular research progress of ammonium transporter [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000 (1):39-45. (in Chinese)
- [4] von Wiren N, Gazzarrini S, Gojon A, et al. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval [J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3(3): 254-261.
- [5] Sonoda Y,Ikeda A,Saiki S,et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3) in rice [J]. Plant Cell Physiol,2003,44(7):726-734.
- [6] 邓若磊,谷俊涛,路文静,等.水稻铵转运蛋白基因 OsAMT1;4 和 OsAMT5 的特征分析、功能和表达 [J].中国农业科学, 2007(11):2395-2402.

Deng R L, Gu J T, Lu W J, et al. Characterization, function and expression analysis of ammonium transporter gene *OsAMT*1;4

and OsAMT5 in rice(Oryza sativa) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007(11):2395-2402. (in Chinese)

- [7] Couturier J, Montanini B, Martin F, et al. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant [J]. New Phytol, 2007, 174(1):137-150.
- [8] Loque D, von Wiren N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots [J]. J Exp Bot, 2004, 55(401):1293-1305.
- [9] 邓若磊,徐海荣,曹云飞,等. 植物吸收铵态氮的分子生物学基础 [J]. 植物营养与肥料学报,2007(3):512-519.
 Deng R L,Xu H R,Cao Y F,et al. The molecular basis of ammonium transporters in plants [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,2007(3):512-519. (in Chinese)
- [10] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. Science, 2006, 313(5793):1596-1604.
- [11] Harrison C J, Langdale J A. A step by step guide to phylogeny reconstruction [J]. Plant J, 2006, 45(4):561-572.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J].
 Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [13] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic Acids Res, 2009,37(Suppl 2):W202-W208.
- [14] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis
 [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [15] Ikeda M, Arai M, Lao D M, et al. Transmembrane topology prediction methods: a re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies [J]. In Silico Biol,2002,2(1): 19-33.
- $[\,16\,]$ Claros M G, von Heijne G. Top
Pred: [] .
 an improved software

for membrane protein structure predictions [J]. Comput Appl Biosci, 1994, 10(6): 685-686.

- [17] Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, et al. Protein structure homology modeling using SWISS- MODEL workspace [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1):1-13.
- [18] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: an environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18(15):2714-2723.
- [19] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: W585-W587.
- [20] Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, et al. ARAMEM-NON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins [J]. Plant Physiol, 2003, 131(1):16-26.
- [21] Howitt S M, Udvardi M K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1465(1/2): 152-170.
- [22] Ho B K, Brasseur R. The Ramachandran plots of glycine and preproline [J]. BMC Struct Biol, 2005, 5:14.
- [23] Suarez M F, Avila C, Gallardo F, et al. Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants [J]. J Exp Bot,2002.53(370):891-904.
- [24] 张 漫,常延琦.蛋白质三级结构预测方法简述 [J].中国动物检疫,2005,22(5):36-37.
 Zhang M,Chang Y Q. Review on protein 3D structure prediction [J]. Chinese Journal of Animal Quarantine,2005,22(5): 36-37. (in Chinese)
- [25] Feng Z P. An overview on predicting the subcellular location of a protein [J]. In Silico Biol, 2002, 2(3): 291-303.
- [26] Sohlenkamp C, Wood C C, Roeb G W, et al. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane [J]. Plant Physiol, 2002, 130 (4):1788-1796.