

# 烟草硝酸还原酶的生物信息学分析

范邓鹏<sup>1</sup>, 王明阳<sup>2</sup>, 石永春<sup>2</sup>, 刘卫群<sup>2\*</sup>

(1. 重庆市烟草公司 石柱分公司, 重庆 石柱 409100; 2. 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为深入研究烟草中硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)的功能, 采用生物信息学方法, 对烟草、拟南芥和水稻中的 NR 氨基酸序列进行了预测和分析。通过构建系统进化树, 发现烟草与拟南芥 NR 的遗传距离较近, 而与水稻中 NR 的遗传距离较远; 蛋白质二级结构分析表明, 烟草、拟南芥和水稻 NR 序列的 C 末端较为相似, 而 N 末端差别较大; 所有 NR 序列中都预测到 5 个结构域, 且磷酸化位点主要位于 N 末端。但烟草中 NR 预测到的磷酸化位点少于拟南芥中预测到的, 说明拟南芥中 NR 的活性受到更复杂的调控。

**关键词:** 烟草; 硝酸还原酶; 生物信息学

中图分类号: Q945 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)04-0050-05

## Bioinformatics Analysis of Nitrate Reductase in Tobacco

FAN Deng-peng<sup>1</sup>, WANG Ming-yang<sup>2</sup>, SHI Yong-chun<sup>2</sup>, LIU Wei-qun<sup>2\*</sup>

(1. Shizhu Branch of Chongqing Tobacco Company, Shizhu 409100, China; 2. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To make further investigation, bioinformatic methods were used to analyze the nitrate reductase (NR) from tobacco, *Arabidopsis* and rice. The phylogenetic relationship of NR between tobacco and *Arabidopsis* was closer than that between tobacco and rice. Protein secondary structure analysis showed that the C-terminus of NR protein sequences was more conservative than N-terminus. In addition, five domains were found in all of the NR sequences, and most phosphorylation sites were located in N-terminus. However, the number of predicted phosphorylation sites in *Arabidopsis* NR was more than that in tobacco NR. This implied that the regulation mechanism of NR activity in *Arabidopsis* was more complex than in tobacco.

**Key words:** tobacco; nitrate reductase; bioinformatics

硝酸还原酶(nitrate reductase, NR; EC. 1. 6. 6. 2)是植物氮代谢中硝酸盐还原的限速酶和调节酶, 催化 NAD(P)H 将  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{NO}_2^-$  的反应, 影响植物氮代谢及其他代谢平衡<sup>[1]</sup>。NR 还是一种诱导酶, 除受底物的影响外, 还受到光、土壤氮素含量等多种因素的调节<sup>[2-3]</sup>。

NR 为单基因编码。现已在水稻、甜菜、白菜等多个物种中发现并克隆到 NR 的基因, 并对其基因表达和生理功能做了一定的分析<sup>[4-6]</sup>, 证明高等植物中的 NR 是相同亚基组成的二聚体, 每个亚基含有 3 个辅因子, 即黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、亚铁血

红素和钼辅因子<sup>[7]</sup>。但目前关于烟草中 NR 基序(motif)在肽链上的位置、翻译后修饰位点以及与其他物种中 NR 比较等的报道较少, 而这些正是调控 NR 活性分子机制的重要组成部分。鉴于此, 以烟草中的 NR 蛋白序列为材料, 应用生物信息学方法对不同序列的结构、性质和翻译后磷酸化修饰进行分析, 为深入研究 NR 在植物氮代谢中的调控机制提供参考。

### 1 材料和方法

从 NCBI 数据库搜索到烟草(*Nicotiana taba-*

收稿日期: 2012-10-22

作者简介: 范邓鹏(1983-), 男, 河南南阳人, 助理农艺师, 硕士, 主要从事烟草科技推广工作。

E-mail: pengd529@yahoo. com. cn

cum, Nt; *Nicotiana benthamiana*, Nb) NR 的蛋白质序列(Nt NR1:CAA32217; Nt NR2:AEV66151; Nt NR3:AEV66150; Nt NR4:CAA32216; Nb NR1:BAE46746; Nb NR2:BAE96752)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At) NR 的蛋白质序列(At NR1:NP\_177899; At NR2:AEE36018; At NR3:NP\_174901; At NR4:AEE31891; At NR5:BAF02035; At NR6:BAE99256; At NR7:AAF19225; At NR8:CAA79494)和水稻(*Oryza sativa*, Os) NR 的蛋白质序列(Os NR1:BAD09558; Os NR2:BAD09562; Os NR3:CAA33817; Os NR4:BAD16843)。采用 MEGA 2.0 对蛋白质序列进行聚类分析;用 ProtParam、NETPHOS 2.0 Server、ProtScale 分析肽链的理化性质、磷酸化修饰;用 Scansite、SOPMA 在线工具完成结构域和二级结构的预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同来源 NR 的聚类分析

通过对以上蛋白质序列进行比对并构建进化树(图 1),发现烟草 NR 与拟南芥 NR 的遗传距离较近,而与水稻 NR 的遗传距离较远。经过比对分析发现,At NR1 和 At NR2 的序列相同,At NR3、At NR4、At NR5 和 At NR7 的氨基酸序列相同,因此,拟南芥中仅选取 At NR1、At NR3、At NR6 和 At NR8 进行分析。

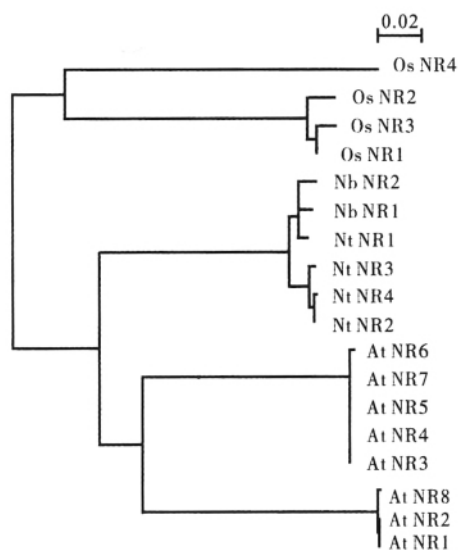


图 1 烟草、拟南芥、水稻中的 NR 氨基酸序列进化树

### 2.2 不同来源 NR 的二级结构预测

对 NR 肽链二级结构进行预测(图 2)可见,各 NR 序列中间部分的二级结构基本一致,C 末端均为  $\beta$ -折叠,而 N 末端差别较大。其中,烟草 Nt NR 和

Nb NR 的 N 末端都为  $\alpha$ -螺旋,拟南芥 At NR1 和 At NR8 的 N 末端均为无规则卷曲,At NR3 和 At NR6 的 N 末端为  $\alpha$ -螺旋,而水稻中 Os NR4 的 N 末端为  $\beta$ -折叠。表明不同物种的 NR,在 C 末端更为保守,而在 N 末端则可能存在物种的特异性。

### 2.3 不同来源 NR 的结构域预测

由图 3 可见,所有 NR 都预测到 5 个结构域:从 N 端到 C 端分别是:钼喋呤结合结构域(Oxidored\_molyb)、二聚体结合所需结构域(Mo-co\_dimer)、亚铁血红素结合结构域(Cyt-b5)、FAD 结合结构域(FAD\_binding\_6)和 NAD 结合结构域(NAD\_binding\_1)。除 At NR6 和 At NR8 外,其他 NR 上结构域距离 N 末端的位置都高度保守,如 Oxidored\_molyb 都在距 N 末端 137—320 个氨基酸处,Cyt-b5 结构域都在距 N 末端 534—607 个氨基酸处。

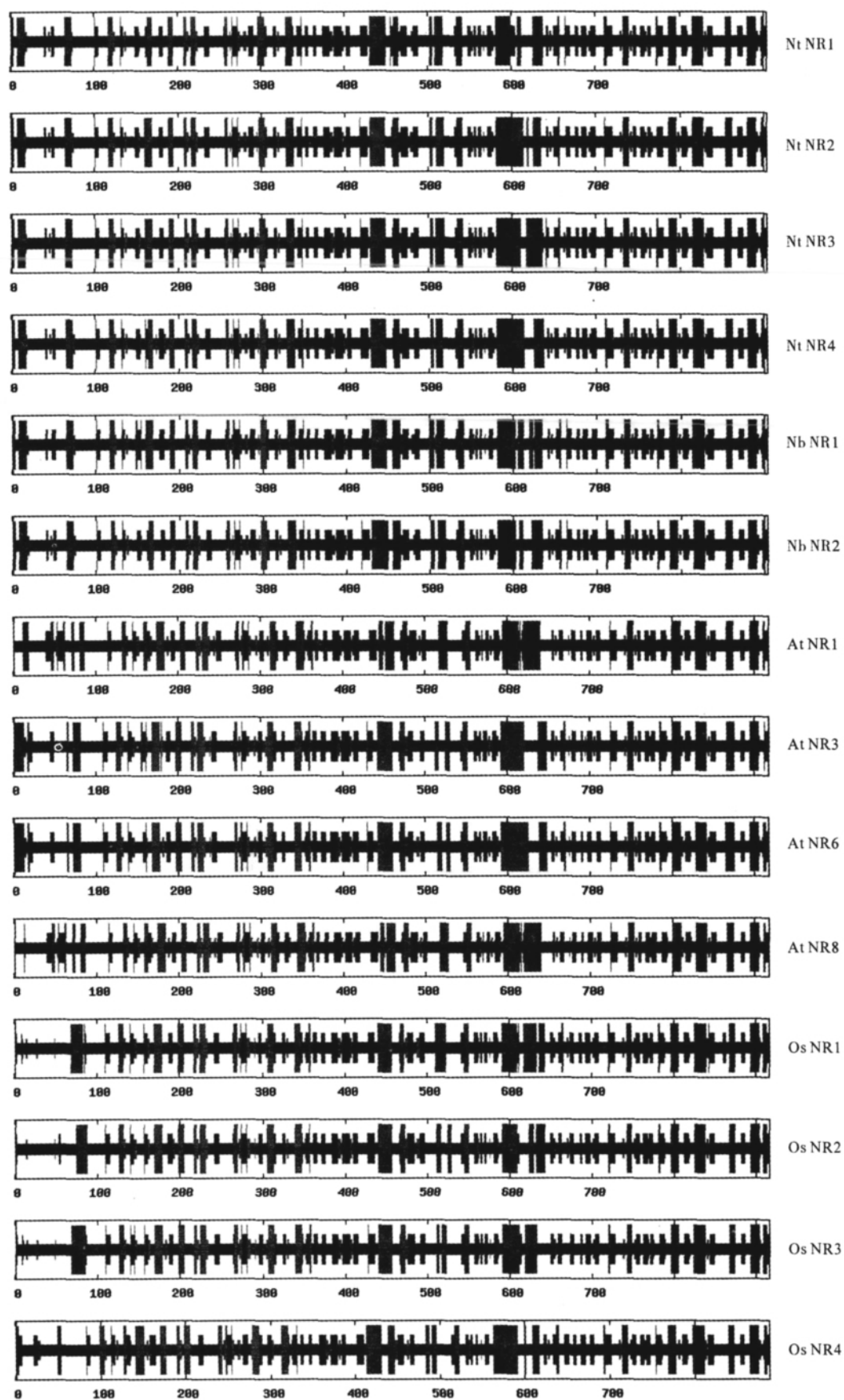
### 2.4 不同来源 NR 的磷酸化位点预测

在磷酸化位点的预测(图 3)中发现,研究所涉及的所有 NR 二聚体结合所需结构域上都预测到一个 MAPK 磷酸化位点,而钼喋呤结合结构域上没有预测到磷酸化位点,拟南芥和烟草的 FAD 结合结构域上也没有预测到磷酸化位点。除 Nt NR1 和 Nt NR3 外,拟南芥和烟草 NR 的亚铁血红素结合结构域 N 端附近还预测到 AMP Kinase。另外,所有 NR 的 N 末端预测到的磷酸化位点要远多于 C 末端。

与拟南芥和水稻相比,烟草中 NR 预测到的磷酸化位点较少,主要为在 N 末端第 57 位的丝氨酸(S57)上预测到酪蛋白激酶(Casein Kinase 2)激活位点,此外,在 Nt NR1 以及 Nb NR1 和 Nb NR2 上还预测到 N 末端第 51 位酪氨酸(Y51)上存在酪氨酸蛋白激酶(Fgr Kinase)磷酸化位点。

拟南芥 NR 的 N 末端都预测到多个丝氨酸的酪蛋白激酶(Casein Kinase 2)磷酸化位点和一个丝氨酸的 AMP 激酶(AMP Kinase)磷酸化位点。在 At NR3 和 At NR6 的 N 末端 29 位脯氨酸和 34 位丝氨酸还分别预测到 PI3 激酶的磷酸化位点(PI3 Kinase)和细胞周期蛋白激酶的磷酸化位点(Cdk5 Kinase)。

Os NR1、Os NR2 和 Os NR3 的 N 末端第 67 位丝氨酸都预测到酪蛋白激酶(Casein Kinase 2)磷酸化位点,Os NR1 和 Os NR3 还预测到细胞周期蛋白激酶(Cdk5 Kinase)的磷酸化位点,而 Os NR4 的磷酸化位点与其他 3 个有较大差异,暗示其可能参与其他信号途径。



竖线从长到短依次为： $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规则卷曲

图 2 NR 的二级结构预测

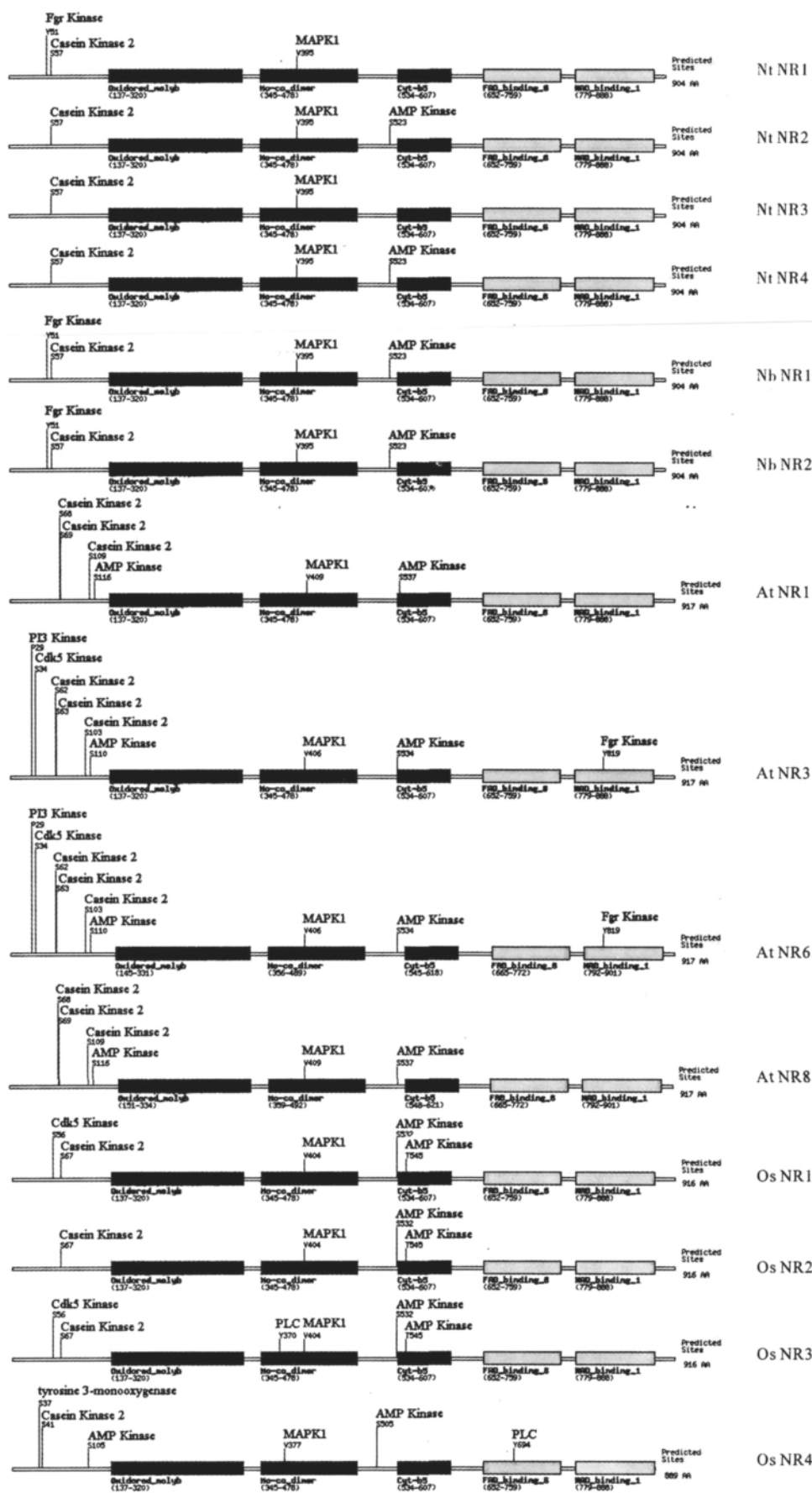


图 3 NR 的结构域和磷酸化位点预测

### 3 结论与讨论

本研究结果显示,从 NCBI 上搜索到烟草、拟南芥和水稻的 NR 具有物种特异性,同一种植物中的 NR 被聚类到一起,且大多具有相同的氨基酸残基数。如烟草 NR 都具有 904 个氨基酸残基,拟南芥 NR 具有 917 个氨基酸残基,水稻中 Os NR1、Os NR2 和 Os NR3 都具有 916 个氨基酸残基,Os NR4 具有 889 个氨基酸残基。

聚类分析发现,每种植物中的 NR 都被分为两大类。烟草中 Nt NR1、Nb NR1 和 Nb NR2 亲缘关系较近,Nt NR2、Nt NR3 和 Nt NR4 亲缘关系较近,这 2 组 NR 在距 N 末端 600—650 个氨基酸处二级结构具有明显差异,后一组较前一组出现较多  $\alpha$ -螺旋。在拟南芥和水稻的 NR 上,该区域的二级结构也具有明显差异:拟南芥中多为 2 组螺旋,而水稻中多具有 3 组螺旋。同时,距 N 末端 600—650 个氨基酸处恰好是亚铁血红素结合结构域和 FAD 结合结构域的连接区,因此,该区域序列和结构的差异可能在进化和分类上具有重要意义。

结构域和磷酸化预测结果显示,尽管 NR 的来源不同,但在肽链上结构域的位置和磷酸化位置方面都具有极高的保守性,且结构域的预测结果与 Campbell<sup>[7]</sup> 的结论一致。不同植物的 NR 上预测的磷酸化位点出现的位置和数量与聚类分析的结果一致,即亲缘关系较近的 NR 具有相似的磷酸化位点和数量。但与拟南芥和水稻相比,烟草 NR 上的磷酸化位点明显较少。由于不同的磷酸化酶参与不同的信号途径,这就意味着烟草 NR 响应的信号途径较少。

在所有 NR 中都预测到酪蛋白激酶(Casein Kinase 2)和 MAPK 的磷酸化位点。酪蛋白激酶基因是组成型表达,且酪蛋白激酶在细胞中分布广泛<sup>[8]</sup>,而 MAPK 参与多种信号途径,说明硝酸还原酶在细胞中被持续激活并受多种因素影响。在有些 NR 中还预测到酪氨酸蛋白激酶(Fgr Kinase)、AMP 激酶(AMP Kinase)和 PI3 激酶(PI3 Kinase)的磷酸化位点。酪氨酸蛋白激酶参与细胞表面受体传递的信号转导<sup>[9]</sup>;AMP 激酶是 AMP 激活的蛋白激酶,参与调控细胞内能量贮存,是细胞内能量状态的感受器<sup>[10]</sup>;PI3 激酶催化磷酸肌醇的磷酸化,参与细胞的多种代谢途径,并受细胞内营养状态的调控<sup>[11]</sup>。这

些磷酸化位点说明 NR 的活性受细胞内能量状态、营养状态和胞外环境的影响。但这些因素是如何影响 NR 活性的,还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 刘丽,甘志军,王宪泽.植物氮代谢硝酸还原酶水平调控机制的研究进展[J].西北植物学报,2004,24(7):1355-1361.
- [2] Druart N, Goupil P, Dewaele E, et al. Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) which acquire radial growth[J]. J Exp Bot, 2000, 51: 539-546.
- [3] Kaiser W M, Huber S C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers[J]. J Exp Bot, 2001, 52: 1981-1989.
- [4] 赵丽华,豆献英,赵志光,等.两个水稻硝酸还原酶基因的克隆及其在不同环境刺激下的表达分析[J].华北农学报,2010,25(6):57-63.
- [5] 张杰,彭胜民,周波,等. RT-PCR 克隆甜菜硝酸还原酶 cDNA 全长序列及分析[J].植物研究,2008,28(4):412-417.
- [6] 孙菲菲,侯喜林,李英,等.不结球白菜硝酸还原酶基因 cDNA 的克隆及序列分析[J].南京农业大学学报,2006,29(2):15-19.
- [7] Campbell W H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 277-303.
- [8] Huang G, Chen S, Li S, et al. Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop[J]. Genes Dev, 2007, 21: 3283-3295.
- [9] Fumagalli L, Zhang H, Baruzzi A, et al. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine [J]. J Immunol, 2007, 178: 3874-3885.
- [10] Barnes K, Ingram J C, Porras O H, et al. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK) [J]. J Cell Sci, 2002, 115: 2433-2442.
- [11] Yeh C, Chien P, Huang H. Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots[J]. J Exp Bot, 2007, 58: 659-671.