

水稻根部2-酮戊二酸感应蛋白OsGlnB的铵同化碳架结合特性

郭继林¹, 曹倩文², 袁永泽^{2,*}, 郑勇^{1,2,*}

¹新疆师范大学生命科学学院, 新疆特殊环境物种保护与调控生物学重点实验室, 乌鲁木齐830054; ²华中师范大学生命科学学院, 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 武汉430079

摘要: 为了揭示2-酮戊二酸(2-OG)感应蛋白OsGlnB在水稻根部铵同化碳架调节中的功能, 本文采用2-OG、草酰乙酸(OAA)或丙酮酸(PYR)营养液处理水稻(*Oryza sativa* L. cv. 9311)幼苗, 检测根部谷氨酰胺合成酶(GS)活性和OsGlnB基因转录量。克隆表达并分离纯化根部OsGlnB蛋白, 采用同源模建、分子对接与等温滴定鉴定该信号蛋白与碳架效应物的相互作用。结果表明所选碳架分子中只有2-OG和OAA促使根部GS活性与OsGlnB基因转录量同步上升, 2-OG与ATP含量也相应升高。同源模建与分子对接表明OsGlnB蛋白与ATP-Mg²⁺形成的复合物能有效结合2-OG或OAA, 但不能结合PYR。等温滴定证明2-OG与上述复合物的结合常数大于OAA, 未检测到丙酮酸热效应, 结果与分子对接结论一致。本研究说明碳架效应物结合2-OG感应蛋白是这类碳营养信号调节水稻根部铵同化的必要条件。

关键词: OsGlnB; 碳架效应物; 等温滴定; 根部铵同化; 水稻

植物铵同化需要无机氮源、有机碳源(碳架分子)和ATP能源。水稻作为喜铵植物通过GS-GOGAT循环同化铵态氮(Zhang等1997), 即无机氮源NH₄⁺在谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT)联合催化下掺入碳架分子2-酮戊二酸(2-oxoglutarate, 2-OG), 消耗ATP, 合成谷氨酰胺和谷氨酸。其中, 限速酶GS负责合成初级氮同化物谷氨酰胺, 其表达水平由植物碳、氮营养状态精密调控(Standman 1990; Ninfa和Atkinson 2000; Arcondeguy等2001; Chellamuthu等2013; 冯万军等2015)。

P_{II}蛋白感应2-OG信号、调节GS表达以平衡铵同化相关代谢。P_{II}蛋白家族成员包括大肠杆菌GlnB和GlnK (韩涛等1997; Radchenko等2014)、蓝藻GlnZ (常雅军等2015)、拟南芥AtGLB1 (Hsieh等1998)以及水稻OsGlnB (Sugiyama等2004)。大肠杆菌GlnB和GlnK与2-OG相互作用而调节GS和铵转运蛋白Amt表达(Radchenko和Merrick 2011; Huergo等2013; Radchenko等2014)。拟南芥P_{II}感应光合蔗糖及其分解代谢水平以调控花青素合成(Hsieh等1998)。高等植物P_{II}蛋白报道不多, 已开展功能研究的仅有拟南芥和水稻。目前关于禾本科作物水稻P_{II}的研究只有两例: Sugiyama等(2004)克隆表达了OsGlnB并证明其作用靶标为精氨酸合成途径的关键酶N-乙酰谷氨酸激酶; Xu等(2016)报道OsGlnB参与调控水稻盐胁迫下的氨基酸代谢。铵同化是水稻有机氮合成的源头反应, 其代谢调控与OsGlnB的关系目前还未见研究。

有机酸如2-OG、草酰乙酸(oxaloacetate, OAA)和丙酮酸(pyruvate, PYR)是常见的碳代谢中间物, 也是植物有机氮合成必需的碳架分子, 它们具有铵同化调控功能。Oliveira和Coruzzi (1999)报道了2-OG促进拟南芥非光合GS同工酶基因转录。Oliveira等(2001)又进一步指出铵同化碳架2-OG及其相关代谢物包括谷氨酸、天冬氨酸和OAA都能调控拟南芥铵同化关键酶GS基因表达, 并推测这种碳架效应可能由P_{II}蛋白(AtGlnB)介导。笔者曾经报道2-OG促进水稻根部GS活性和铵同化效率(Yuan等2007), 但是尚未调查与2-OG相关的碳代谢物如其代谢前体OAA和PYR对这种非光合GS活性的影响及其与OsGlnB的关系。Smith等(2003)运用等温滴定分析了拟南芥P_{II}蛋白与铵同化碳架效应物的相互作用特性, 证明碳架分子2-OG和OAA是该信号蛋白的效应物, 其靶标结合能力与代谢调控能力正相关。为了更好地认识2-OG及其相关碳架营养调控水稻非光合GS表达的分子机制, 有必要揭示它们与根部OsGlnB相互作用的生物化学特性。

本研究采用铵同化碳架分子2-OG及其相关代谢物OAA或PYR处理三叶期水稻(*Oryza sativa* L. cv. 9311)幼苗, 研究根部GS活性和OsGlnB基因转

收稿 2017-08-09 修定 2017-09-28

资助 新疆特殊环境物种保护与调控生物学重点实验室项目(XJDX1414-2015-01)和国家自然科学基金(31101595)。

* 共同通讯作者(E-mail: yuan_yongze@163.com; zhengyong-0720@163.com)。

录量的变化,克隆表达与分离纯化根部OsGlnB蛋白,采用同源模建、分子对接与等温滴定研究有机酸与该信号蛋白相互作用的特点。为水稻根部铵同化的碳营养信号调控研究提供生物化学证据。

材料与amp;方法

1 实验材料与试剂

水稻(*Oryza sativa* L. cv. 9311)种子经10% (W/V) HgCl₂消毒,30°C浸种24 h,移至润湿滤纸盘催芽,种子萌发后移栽到铵态氮营养液,水培至三叶期。营养液配方与培养条件参照文献(Zhang等1997)。三叶期幼苗移栽到添加3 mmol·L⁻¹ 2-OG、OAA或PYR的新鲜营养液中培养48 h,剪取根组织,立即提RNA和酶液,保存于-70°C。菌株*E. coli* DH5α和BL21(DE3)、载体pET28、工具酶(*Eco*RI、*Hind*III、DNA连接酶等)、抗生素(氨苄青霉素和硫酸卡那霉素)、IPTG、DNA回收试剂盒、Trizol试剂盒、逆转录和荧光定量试剂盒均为TaKaRa公司产品。Ni-NTA亲和色谱试剂盒购自GE Healthcare公司。其他化学试剂均为分析纯。

2 蛋白质提取与GS活性测定

根据Zhang等(1997)文献方法提取水稻根部酶液和检测GS活性,每克鲜重样品加入3 mL抽提缓冲液;Bradford法(Bradford 1976)测定根部可溶性蛋白含量。

3 2-OG和ATP含量测定

根据Yuan等(2007)文献方法提取和检测水稻根部2-OG含量,每克鲜重样品加入10 mL高氯酸(1 mol·L⁻¹)提取根部2-OG,定量加入L-谷氨酸脱氢酶(Roche, Mannheim, Germany)和辅酶NADH,根据NADH消耗量计算2-OG含量。根据Huo等(2017)文献方法提取和检测水稻根部ATP含量,每0.1克鲜重样品加入0.9 mL双蒸水(已煮沸),100°C沸水浴15 min,离心取上清用于ATP含量检测。

4 RNA提取、cDNA制备与荧光定量PCR (qPCR)检测

Trizol试剂盒(TaKaRa)提取水稻根部总RNA,经RQ1 RNase-free DNase (Promega)处理,约5 μg RNA为模板,逆转录试剂盒(TaKaRa)合成第一链cDNA (oligo-dT₁₈引物)。根据SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)试剂盒说明,ABI 7500 Real-Time PCR系

统(Applied Biosystems)荧光定量检测*OsGlnB*转录量。*OsGlnB*荧光定量引物: 5'-CGGAGTCGGAGTTC-TACA-3' (正向); 5'-CCTTCATGCCTCTCAGTTG-3' (反向)。内参引物和ΔΔC_T定量方法均参照文献(Wang等2000)。

5 同源模建与分子对接

运行SwissModel服务器(<http://www.swissmodel.expasy.org>),以拟南芥AtGlnB晶体结构(PDB登记号: 2O66)为模板同源模建OsGlnB三维结构。运行GROMACS 4.0.6程序包, GROMOS96 43a1力场环境下分子动力学优化与筛选OsGlnB构象, PRO-CHECK 3.5.4评估后用于AutoDock 4.0分子对接。运行GROMACS 4.0.6和AMBERTOOLS程序包,力场Amber99sb环境下优化对接参数,获得构象稳定的对接模型。

6 OsGlnB的克隆表达与分离纯化

根据NCBI数据库*OsGlnB*序列(GenBank登录号: AB119279)设计包含*Eco*RI和*Hind*III酶切位点的特异引物,以水稻根部总RNA反转录制备的cDNA为模板,PCR克隆*OsGlnB*基因。目的基因插入载体pET28a,构建表达质粒pET-*OsGlnB*,转化*E. coli* BL21(DE3),筛选获得可诱导表达OsGlnB蛋白的基因工程菌株。37或20°C, IPTG (终浓度1 mmol·L⁻¹)诱导表达OsGlnB蛋白,0、3、6、12和24 h取样,8 000×g、10 min离心集菌,SDS-PAGE分析。20°C、IPTG诱导24 h后集菌,根据GE Healthcare公司Ni-NTA亲和色谱说明书分离纯化OsGlnB蛋白,SDS-PAGE分析目标蛋白纯度,Bradford法测定蛋白浓度(Bradford 1976)。

7 等温滴定分析重组OsGlnB与碳架分子的相互作用

等温滴定仪VP-ITC (Microcal Inc., USA)检测OsGlnB及其ATP复合物与碳架分子2-OG、OAA或PYR的相互作用,实验方法参照Smith等(2003)。样品经4°C、18 000×g离心15 min除气泡后适量加入反应池,滴定温度25°C。储液OsGlnB (100 μmol·L⁻¹)、有机酸(4.0 mmol·L⁻¹)和ATP (1.0 mmol·L⁻¹)均用100 mmol·L⁻¹、pH 7.5咪唑缓冲液配制。以上储液中含有终浓度0.5 mmol·L⁻¹的MgCl₂。配体2-OG、OAA或PYR与OsGlnB的结合实验分别在0或0.5 mmol·L⁻¹ (终浓度) ATP条件下进行。反应系统中有机酸浓

度为 $10\sim 300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别滴定20次, 间隔120 s, 参照功率约 $20\ \mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$, 搅拌转速 $480\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。利用Origin[®] 7.0软件拟合实验数据, 根据非线性回归模型推导结合常数 K_a ($1/K_d$)和摩尔焓 ΔH , 代入公式 $\Delta G = -RT\ln K_a$

实验结果

1 铵同化碳架处理对水稻根部GS活性和OsGlnB转录量的影响

有机酸是植物包括水稻铵同化必需的碳架分子, 碳架丰度是调节铵同化关键酶的重要因素。本实验采用添加 $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-酮戊二酸(2-OG)、

草酰乙酸(OAA)或丙酮酸(PYR)的营养液处理三叶期水稻幼苗48 h, 检测根部GS活性和OsGlnB转录量。如图1-A所示, 与对照(未添加碳架营养)比较, 2-OG提高根部GS活性约2倍, OAA提高约50%, 而PYR没有促进效果。上述碳架分子中, 2-OG和OAA均上调OsGlnB基因转录量, 而丙酮酸对此无影响(图1-B)。水稻幼苗根部GS活性和OsGlnB转录量在上述有机酸处理后的变化趋势一致。根部2-OG和ATP含量在2-OG或OAA处理后亦相应升高(图2)。提示OsGlnB参与了铵同化碳架对水稻根部GS活性及其相关代谢调节。

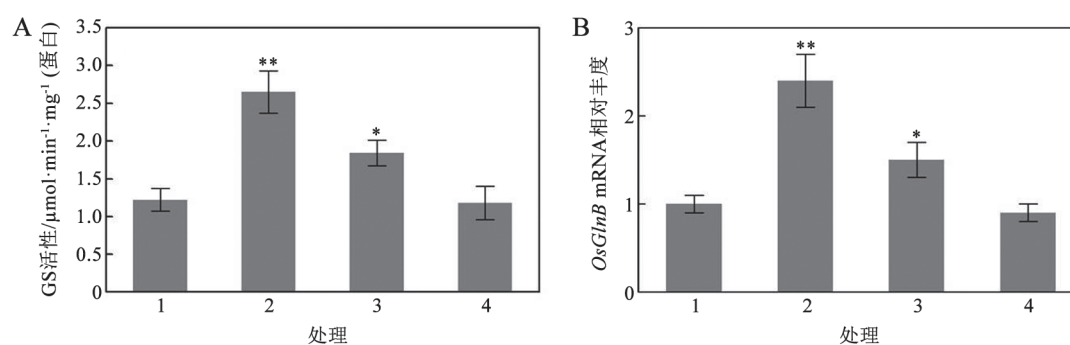


图1 铵同化碳架处理对水稻根部GS活性(A)和OsGlnB基因转录量(B)的影响

Fig.1 Effect of ammonium-assimilation-relating carbon skeleton on GS activity (A) and *OsGlnB* transcriptional abundance (B) in rice roots

1: 对照; 2~4: 2-OG、OAA和PYR处理; 柱形上**和*分别表示差异极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$); 图2同。

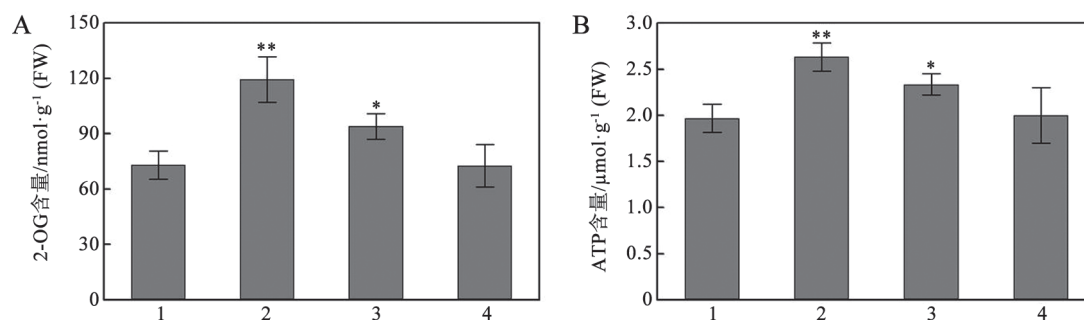


图2 铵同化碳架处理对水稻根部2-OG (A)和ATP (B)含量的影响

Fig.2 Effect of ammonium-assimilation-relating carbon skeleton on 2-OG (A) and ATP (B) contents in rice roots

2 同源模建与分子对接模拟OsGlnB与碳架分子的相互作用

以拟南芥AtGlnB晶体结构(PDB: 2O66)为模板同源模建OsGlnB-Mg²⁺复合物(以下简称OsGlnB)的三维结构。图3显示OsGlnB单体结构中有P_{II}蛋白保守结构域B环(B-loop)和T环(T-loop)。OsGlnB

未结合ATP时能够通过T-环底部的谷氨酰胺(Q121)与2-OG或OAA发生氢键作用(图3-A和C), 但结合力很弱, 模型显示氢键键长为0.36和0.39 nm。ATP与OsGlnB的B环区域作用后, 上述氢键键长缩短到0.20和0.28 nm; ATP与配体(碳架分子)之间也能形成氢键, 于是增强了该信号蛋白对效

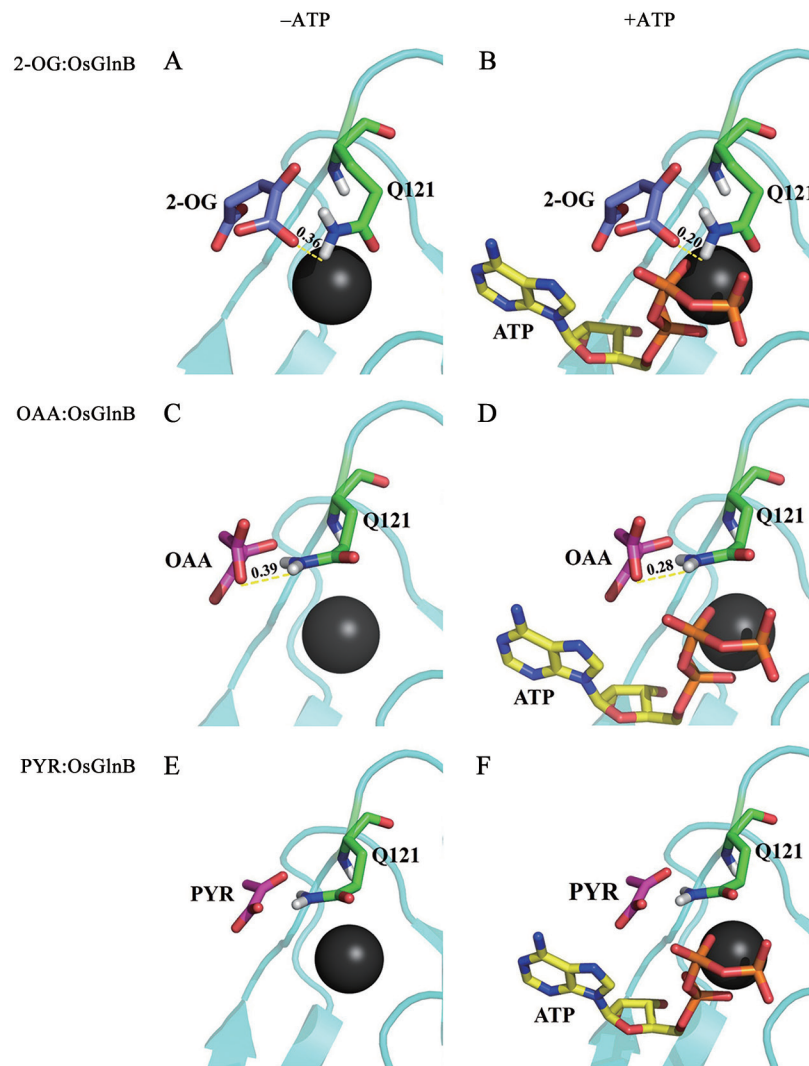


图3 OsGlnB与碳架效应物相互作用的同源建模与分子对接

Fig.3 Homolog modeling and docking simulation for molecular interaction between OsGlnB and carbon skeleton effectors

图3-A~F均显示OsGlnB亚基B环、T环结构域、Q121和碳架分子;黑球表示镁离子(Mg^{2+}); Mg^{2+} 正上方为Q121:绿、蓝、红、白色表示碳、氮、氧、氢原子; Mg^{2+} 左上方为碳架分子(2-OG、OAA或PYR):紫、棕红色表示碳、氧/氢原子; Mg^{2+} 下方为ATP:黄、蓝、橘、棕红色表示碳、氮、磷、氧/氢原子;A~D:黄色虚线表示氢键键长(nm)。

应物的结合能力(图3-B和D)。无ATP时, Q121与PYR原子间距离过大, 超过了氢键力程(图3-E); ATP结合OsGlnB后, PYR与Q121或ATP仍然无法形成氢键(图3-F); 即不论有无ATP, PYR都不能有效结合OsGlnB。模拟对接的结合能按作用力从大到小排序为2-OG/ATP-OsGlnB ($-7.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) > OAA/ATP-OsGlnB ($-4.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) > 2-OG/OsGlnB ($-1.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) > OAA/OsGlnB ($-1.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) > PYR/ATP-OsGlnB ($-0.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) \approx PYR/OsGlnB ($-0.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)。

3 OsGlnB克隆表达、分离纯化与等温滴定

克隆表达与分离纯化水稻根部OsGlnB用于等温滴定研究。提取未经有机酸处理的三叶期水稻幼苗根部总RNA, 逆转录合成cDNA模板, 参考NCBI数据库OsGlnB序列(GenBank: AB119279)设计引物, PCR扩增OsGlnB基因, 获得大小约为700 bp的特异条带(图4-A), 连接pMD18-T载体鉴定正确(图4-B)。PCR产物纯化后插入pET28, 转化*E. coli* DH5 α , *Eco*RI和*Hind*III酶切鉴定阳性转化子(图4-C)。测序表明: OsGlnB开放阅读框639 bp, 与已

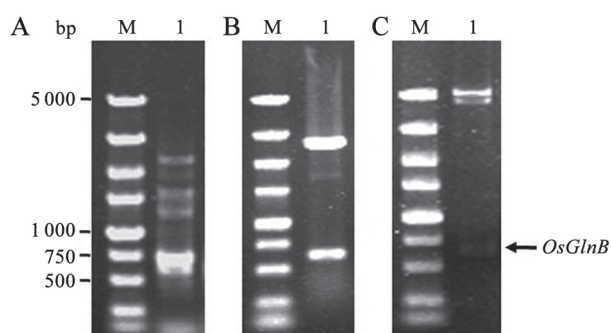


图4 水稻根部*OsGlnB*全长cDNA克隆与pET-*OsGlnB*酶切鉴定
Fig.4 Cloning of full-length cDNA of rice root *OsGlnB* and identification of pET-*OsGlnB* by restriction enzyme digestion

A: PCR扩增*OsGlnB*全长cDNA; B: pMD-*OsGlnB*酶切鉴定; C: pET-*OsGlnB*酶切鉴定; B和C均采用*EcoRI/HindIII*双酶切; M为DNA Marker DS5000。

报道的水稻叶片*OsGlnB*基因(GenBank: AB119279)同源性100%; 编码212个氨基酸, 推测蛋白分子量约为26 kDa。

质粒pET-*OsGlnB*转化*E. coli* BL21(DE3), IPTG诱导, SDS-PAGE分析表达产物。如图5-A所示, 在约26 kDa处出现特异条带, 重组*OsGlnB*分子量与理论预测一致, 证明目标蛋白表达成功。37°C诱导表达重组*OsGlnB*以包涵体为主, 大部分位于沉淀(图5-A泳道7)。低温20°C诱导重组*OsGlnB*以可溶性表达为主(图5-B泳道6和7)。经Ni-NTA亲和色谱分离纯化, 获得电泳纯的目标蛋白(图5-C泳道5)。

重组*OsGlnB*纯化后透析除去离子和小分子,

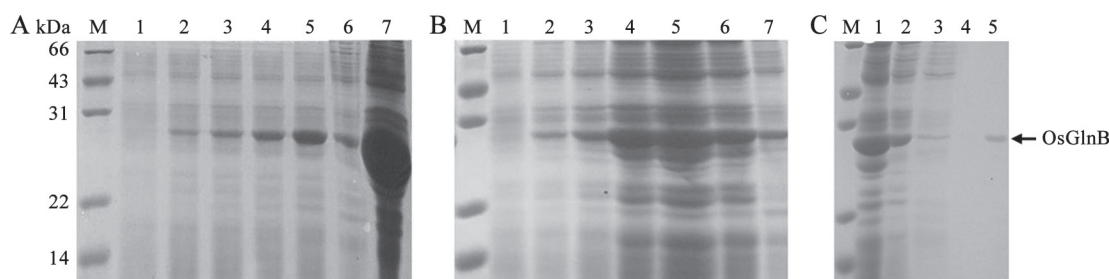


图5 SDS-PAGE分析重组*OsGlnB*诱导表达与分离纯化

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant *OsGlnB* expression and purification

A和B分别为37和20°C诱导, 泳道1~5: 诱导0、3、6、12和24 h, 泳道6~7: 细胞破碎、离心后收集的上清和沉淀; C为亲和色谱分离纯化, 泳道1~5: 粗酶液、流出液、100 mmol·L⁻¹咪唑漂洗、150 mmol·L⁻¹咪唑漂洗和200 mmol·L⁻¹咪唑洗脱; 各泳道的蛋白上样量均为10 μL。

重新溶解于咪唑缓冲液(100 mmol·L⁻¹、pH 7.5)用于等温滴定。碳架分子与*OsGlnB*相互作用的有关参数列于表1。无ATP时, *OsGlnB*可以结合2-OG和OAA, 但结合力非常弱, K_a (1/ K_d)分别为(2.0±0.2)和(1.7±0.3) L·mmol⁻¹; 存在ATP时, 2-OG和OAA与*OsGlnB*-ATP复合物的结合常数升高到(10.3±0.5)

和(4.8±0.3) L·mmol⁻¹, 结合力分别提高5.2和2.8倍。说明ATP促进*OsGlnB*与碳架效应物的相互作用。不论*OsGlnB*是否预先结合ATP, 该信号蛋白与碳架效应物发生作用时均有 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta G < 0$, 说明此过程由热力学驱动自发完成, 焓变是*OsGlnB*单独结合碳架效应物的主要驱动力。不论ATP是否存

表1 等温滴定分析碳架分子与*OsGlnB*-Mg²⁺或*OsGlnB*-ATP-Mg²⁺的相互作用

Table 1 Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis of interactions between carbon skeleton molecules and *OsGlnB*-Mg²⁺ or *OsGlnB*-ATP-Mg²⁺

碳架分子	ATP/mmol·L ⁻¹	$K_a/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\Delta H/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
2-OG	0	489.4±6.1	-2.4±0.2	-4.5±0.1	2.1±0.2
	0.5	97.3±5.5	-8.9±0.4	-5.5±0.2	-3.4±0.2
OAA	0	578.2±9.9	-2.1±0.1	-4.3±0.1	2.2±0.1
	0.5	208.7±9.1	-5.9±0.3	-5.0±0.2	-0.9±0.2

表中数据为平均值±标准差(n=5)。

在, 均未检测到PYR与OsGlnB的结合热, 说明两者间没有相互作用。上述实验结果与分子对接模型预测一致。

另外, 碳架效应物结构影响其靶标结合力。如表1所示, 五碳二羧酸2-OG比四碳二羧酸OAA更容易结合OsGlnB-ATP复合物, 根据 K_d 估算2-OG结合力是OAA的2倍以上。比较2-OG和OAA结合OsGlnB-ATP的热力学和动力学参数变化, 焓变差值 $\Delta\Delta H$ ($\Delta H_{2-OG/OsGlnB-ATP} - \Delta H_{OAA/OsGlnB-ATP}$)约为3.0 kcal·mol⁻¹, 自由能变化的差值 $\Delta\Delta G$ ($\Delta G_{2-OG/OsGlnB-ATP} - \Delta G_{OAA/OsGlnB-ATP}$)约为0.5 kcal·mol⁻¹, $\Delta\Delta H$ 明显大于 $\Delta\Delta G$ 。说明碳架效应物结构主要影响热力学过程。

讨 论

植物包括水稻有机氮合成必须在碳-氮代谢协同作用下完成, 碳架分子2-OG衔接碳-氮代谢并参与铵同化调节。GS是代谢调控的重要靶点(常雅军等2015; 冯万军等2015; 何亚飞等2016)。2-OG促进拟南芥GS表达(Oliveira和Coruzzi 1999)和水稻根部GS活性(Yuan等2007)。蔗糖和有机氮譬如谷氨酰胺和天冬酰胺通过胞内2-OG含量变化调控烟草硝酸盐和亚硝酸盐还原酶以及拟南芥GS和天冬酰胺合成酶表达(Vincentz等1993; Lam等1994, 1998; Oliveira等2001)。2-OG与细菌GlnB蛋白相互作用而调节大肠杆菌GS活性(Jiang等1998; Zhang等2010)。说明2-OG调控GS等铵同化酶与P_{ii}蛋白关系密切。本研究观察到2-OG促进水稻根部GS活性的同时亦上调*OsGlnB*基因转录(图1), 根部2-OG含量同步升高(图2-A), 说明这种非光合铵同化调控与其2-OG感应蛋白表达水平有关。OAA调控与2-OG相似但比较弱, 而PYR不影响GS活性也不影响*OsGlnB*基因转录(图1)。这种GS活性调节与*OsGlnB*转录的相关性说明该信号蛋白与碳架效应物的相互作用是它们参与根部铵同化调节的必要条件。

本研究同源模建获得的OsGlnB三维结构具有P_{ii}蛋白保守结构域B环和T环(图3)。细菌、藻类和拟南芥P_{ii}蛋白结构研究揭示B环和T环结构域分别负责结合ATP和2-OG (Forchhammer和Lüddecke 2016)。本研究分子对接显示OsGlnB-Mg²⁺复合物(以下简称OsGlnB)通过T环底部结合2-OG (图3-A)

或OAA (图3-C)以及通过B环区域结合ATP (图3-B和图3-D)。符合已报道P_{ii}蛋白与效应物作用的结构特征。对接模型表明OsGlnB的Q121对于效应物结合非常关键, 该残基在空间上连接T环和B环结构域, 其侧链以氢键作用于Mg²⁺-ATP和碳架分子(2-OG或OAA)。现已证明蓝藻*S. elongatus*和大肠杆菌P_{ii}蛋白Q39以及拟南芥P_{ii}蛋白Q112是效应物结合位点的关键残基(Smith等2003; Truan等2010; Radchenko等2010)。目前尚未报道水稻P_{ii}晶体结构, 我们通过分子建模并根据效应物结合位点的结构保守性推测OsGlnB的Q121与上述谷氨酰胺功能相同。另外, 本研究克隆的根部OsGlnB与Sugiyama等(2004)报道的水稻叶片P_{ii}蛋白的序列同源性100%, 提示该信号蛋白在水稻光合与非光合组织中高度保守。Sugiyama等(2004)证明水稻旗叶(光合组织)发育进程中P_{ii}蛋白与胞质和叶绿体型GS (即GS1和GS2)协同表达。水稻根部(非光合组织)GS均为胞质型同工酶(Zhang等1997), 本研究表明这种GS活性与该组织中的*OsGlnB*转录量正相关。提示水稻非光合与光合组织P_{ii}蛋白在氮同化调控功能上具有一致性。

等温滴定表明ATP与OsGlnB结合能促进后者结合碳架效应物(表1)。Smith等(2003)运用等温滴定证明拟南芥P_{ii}蛋白只有与ATP形成复合物才能结合2-OG或OAA, 我们发现OsGlnB效应物结合机制与此相似。说明OsGlnB与其他已报道的P_{ii}蛋白一样能协调感应能量水平和碳架丰度这两类代谢信号。根据ATP和碳架效应物的结合顺序, 我们推测OsGlnB感应碳架信号与产能代谢有关。植物氮生理研究已经证明2-OG促进水稻根部铵同化必需同时激活HXK控制的糖分解代谢, 提示2-OG效应与能量代谢关系密切(Yuan等2007)。本研究亦发现, 2-OG或OAA处理后, 与*OsGlnB*转录量的变化同步, 水稻根部2-OG与ATP含量均升高(图2)。提示OsGlnB在生理水平上感应铵同化相关碳架丰度和能量状态。本研究进一步证明OsGlnB结合ATP后才能更好地结合2-OG, 说明水稻根部铵同化2-OG调控在信号-靶标互作层面上有赖于细胞能量水平, 这也提供了2-OG是铵同化代谢调控的信号分子的一个生化证据。

我们还注意到2-OG或OAA在无ATP条件下与

OsGlnB-Mg²⁺复合物存在弱结合(表1)。Smith等(2003)通过等温滴定证明未复合镁离子(Mg²⁺)的拟南芥P_{II}蛋白不能结合碳架效应物。我们实验亦确定Mg²⁺在生理浓度(≈0.5 mmol·L⁻¹)下介导OsGlnB结合2-OG和OAA, 即镁营养也是促进OsGlnB活性构象的必要条件。表1显示, OsGlnB-Mg²⁺结合碳架分子时满足 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$, 而OsGlnB-Mg²⁺-ATP结合碳架分子时满足 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 。根据Ross规则(Ross和Subramanian 1981), 前者主要依靠静电作用(譬如Mg²⁺与有机酸羧基负电荷之间的引力), 后者主要依靠范德华力或氢键作用。上述推测与分子对接结论一致。表明OsGlnB与配体分子作用方式灵活以感应不同能量水平下的铵同化相关碳素营养。本文以水稻根部OsGlnB为靶标分析了碳架效应物结合特性, 以此为基础可深入研究植物非光合铵同化的碳信号调控机制。

参考文献

- Arcondeguy T, Jack R, Merrick M (2001). P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65 (1): 80–105
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254
- Chang YJ, Liu XJ, Yao DR (2015). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Plant Physiol J*, 51 (6): 821–828 (in Chinese with English abstract) [常雅军, 刘晓静, 姚东瑞(2015). 蓝藻中氮同化及其调控的研究进展. *植物生理学报*, 51 (6): 821–828]
- Chellamuthu VR, Alva V, Forchhammer K (2013). From cyanobacteria to plants: conservation of PII functions during plastid evolution. *Planta*, 237: 451–462
- Feng WJ, Xing GF, Niu XL, Dou C, Han YH (2015). Progress and application prospects of glutamine synthase in plants. *Chin J Biotech*, 31 (9): 1301–1312 (in Chinese with English abstract) [冯万军, 邢国芳, 牛旭龙, 袁晨, 韩渊怀(2015). 植物谷氨酰胺合成酶研究进展及其应用前景. *生物工程学报*, 31 (9): 1301–1312]
- Forchhammer K, Lüddecke J (2016). Sensory properties of the P_{II} signalling protein family. *FEBS J*, 283: 425–437
- Han T, Wu YQ, Song HY (1997). Nucleotide sequences of *glnB* and *glnA* genes from *Rhodobacter sphaeroides*. *Plant Phytophysiol Sin*, 23 (2): 130–138 (in Chinese with English abstract) [韩涛, 吴永强, 宋鸿遇(1997). 浮球红细菌谷氨酰胺合成酶基因(*glnA*)及PII蛋白基因(*glnB*)的序列分析. *植物生理学报*, 23 (2): 130–138]
- He YF, Li X, Xie YF (2016). Research progress in sugar signal and its regulation of stress in plants. *Plant Physiol J*, 52 (3): 241–249 (in Chinese with English abstract) [何亚飞, 李霞, 谢寅峰(2016). 植物中糖信号及其对逆境调控的研究进展. *植物生理学报*, 52 (3): 241–249]
- Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ, Coruzzi G (1998). A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13965–13970
- Huergo LF, Chandra G, Merrick M (2013). P_{II} signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*, 37: 251–283
- Huo K, Li X, He YF, Wei XD, Lu W, Zhao CF, Wang CL (2017). Exogenous ATP enhance signal response of suspension cells of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) expressing maize *C4-pepc* encoded phosphoenolpyruvate carboxylase under PEG treatment. *Plant Growth Regul*, 82: 55–67
- Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ (1998). Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37: 12795–12801
- Lam HM, Hsieh MH, Coruzzi GM (1998). Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (3): 345–353
- Lam HM, Peng SS, Coruzzi GM (1994). Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 106: 1347–1357
- Ninfa AJ, Atkinson MR (2000). PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol*, 8 (4): 172–179
- Oliveira IC, Brenner E, Chiu J, Hsieh MH, Kouranov A, Lam HM, Shin MJ, Coruzzi G (2001). Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Braz J Med Biol Res*, 34 (5): 567–575
- Oliveira IC, Coruzzi GM (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 121: 301–309
- Radchenko M, Merrick M (2011). The role of effector molecules in signal transduction by P_{II} proteins. *Biochem Soc Trans*, 39: 189–194
- Radchenko MV, Thornton J, Merrick M (2010). Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarate. *J Biol Chem*, 285 (40): 31037–31045
- Radchenko MV, Thornton J, Merrick M (2014). Association and dissociation of the GlnK-AmtB complex in response to cellular nitrogen status can occur in the absence of GlnK post-translational modification. *Front Microbiol*, 5: 731
- Ross PD, Subramanian S (1981). Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochem*, 20: 3096–3102
- Smith CS, Weljie AM, Moorhead GB (2003). Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 33: 353–360
- Standman ER (1990). Discovery of glutamine synthetase cascade. *Meth Enzymol*, 182: 793–809
- Sugiyama K, Hayakawa T, Kudo T, Ito T, Yamaya T (2004). Interaction of *N*-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol*, 45 (12): 1768–1778
- Truan D, Huergo LF, Chubatsu LS, Merrick M, Li XD, Winkler FK (2010). A new P_{II} protein structure identifies the 2-oxoglutarate

- binding site. *J Mol Biol*, 400: 531–539
- Vincenz M, Moureaux T, Leydecker M-T, Vaucheret H, Caboche M (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J*, 3 (2): 315–324
- Wang J, Jiang J, Oard JH (2000). Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 156: 201–211
- Xu JW, Huang X, Lan HX, Zhang HS, Huang J (2016). Rearrangement of nitrogen metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Plant Signal Behav*, 11: e1138194
- Yuan YZ, Ou JQ, Wang ZQ, Zhang CF, Zhou ZP, Lin QH (2007). Regulation of carbon and nitrogen metabolisms in rice roots by 2-oxoglutarate at the level of hexokinase. *Physiol Plant*, 129: 296–306
- Zhang CF, Peng SB, Peng XX, Chavez AQ, Bennett J (1997). Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice *Oryza Sativa*. L roots. *Plant Sci*, 125: 163–170
- Zhang Y, Pohlmann EL, Serate J, Conrad MC, Roberts GP (2010). Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. *J Bacteriol*, 192 (11): 2711–2721

Binding characteristics of ammonium-assimilation-relating carbon skeletons with rice root 2-oxoglutarate (2-OG)-sensing protein OsGlnB

GUO Ji-Lin¹, CAO Qian-Wen², YUAN Yong-Ze^{2,*}, ZHENG Yong^{1,2,*}

¹Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China; ²Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract: To investigate the function of 2-oxoglutarate (2-OG)-sensing protein OsGlnB in the carbon-skeleton regulation of rice root ammonium assimilation, rice (*Oryza sativa* L. cv. 9311) seedlings were treated with 2-OG, oxaloacetate (OAA), or pyruvate (PYR) nutrient solution to determine glutamine synthetase (GS) activity and *OsGlnB* transcriptional abundance in roots. We further cloned root *OsGlnB*, expressed and purified the recombinant protein, and performed homolog modeling, molecular docking simulation and isothermal titration calorimetry (ITC) analysis to characterize molecular interaction(s) between this signaling protein and the putative carbon skeleton effectors. The results showed that among the carbon skeletons selected, 2-OG and OAA were able to synchronously increase root GS activity and *OsGlnB* transcriptional abundance, and 2-OG and ATP contents were also accordingly enhanced. Homolog modeling and molecular docking simulation indicated effective interactions of OsGlnB-ATP-Mg²⁺ complex with 2-OG and OAA, rather than PRY. ITC results well agreed with those of molecular docking simulation, revealing the higher binding constant (K_d) of 2-OG than OAA and no thermal effect observed from PYR-OsGlnB interaction. The present study suggested the binding of carbon skeleton effector with 2-OG-sensing protein was required for the carbon-signal regulation of rice root ammonium assimilation.

Key words: OsGlnB; carbon skeleton effectors; isothermal titration calorimetry; root ammonium assimilation; rice (*Oryza sativa*)

Received 2017-08-09 Accepted 2017-09-28

This study was supported by Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology Project (Grant No. XJDX1414-2015-01) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31101595).

*Co-corresponding authors (E-mail: yuan_yongze@163.com; zhengyong0720@163.com).