

# 粳稻cPK2的结构预测和功能分析

Function Analysis and Structure Prediction of  
Cytosolic Pyruvate Kinase 2 in Japonica Rice

组 号：3G09

报告人：陈路娜

组 长：王健

组 员：王健，陈路娜，余平

2021.05.10

## 组内分工

王健：Q2QXR8的3D结构和它的3D结构预测模板对比，查询各自的结合位点的氨基酸、功能位点和金属结合位点对比，并将各位点信息进行总结；构想后期实验目的和展望。

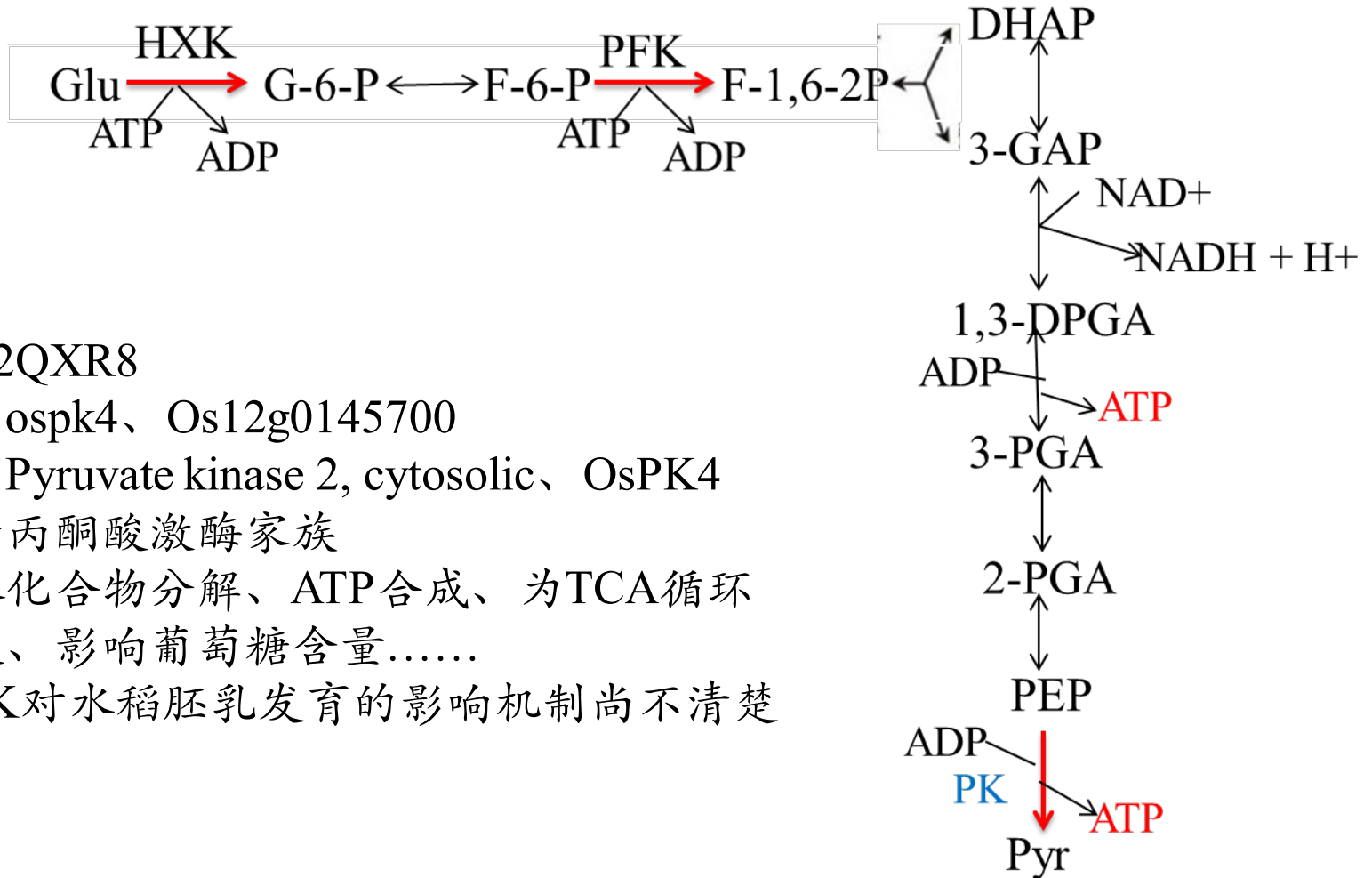
陈路娜：Q2QXR8的研究背景、磷酸化位点预测、亚细胞定位、结构预测和分析（结构域、二级和3D结构）、互作蛋白、进化树和保守性分析

余平：分析Q2QXR8的氨基酸组成、各氨基酸的功能和参考文献格式的修改

- 一、研究背景
- 二、预测模型
- 三、功能预测
- 四、参考文献

# 研究背景

糖酵解途径是将葡萄糖分子催化分解为丙酮酸、NADH) 和ATP的过程，cPK是一种关键的糖酵解酶，使磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸并伴随着ATP的生成。



登录号: Q2QXR8

基因名称: ospk4、Os12g0145700

蛋白名称: Pyruvate kinase 2, cytosolic、OsPK4

家族: 属于丙酮酸激酶家族

功能: 碳水化合物分解、ATP合成、为TCA循环提供丙酮酸、影响葡萄糖含量.....

机制: 对PK对水稻胚乳发育的影响机制尚不清楚

## 研究背景

ospk2 基因编码一个质体丙酮酸激酶，在ospk2突变体内3个AGP基因（OsAGPL2,OsAGPS1和OsAGPS2b）6个支链淀粉合成相关基因（OsSSI, OsSSIVb, OsGBSSI, OsISA1, OsISA3和OsPUL）转录水平显著降低，导致稻米垩白，品质下降。（蔡怡聪,2018）

ospk3垩白粒严重，成熟胚乳不透明，呈粉白色（Hu et al. 2020）  
推测Q2QXR8功能丧失也会导致稻米胚乳垩白。



（蔡怡聪..2018）

## cPK2的氨基酸组成

根据ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 分析cPK2蛋白的氨基酸含量，如右图，该蛋白含量最多的为亮氨酸，而后依次为缬氨酸、丝氨酸和丙氨酸，异亮氨酸和赖氨酸含量也较高，最少的是色氨酸。

此蛋白是非膜蛋白，但它的Leu含量最多，可能一定程度上解释了稻米等是人体亮氨酸最好的来源（盛勤芳，2014）；

Ser和Lys是很多蛋白和家族的催化位点，且Lys在转移酶中使用率高（秦涛，2011）；

Ser是常见的磷酸化修饰位点（邓晓政，2020；Majer A J,2004）。

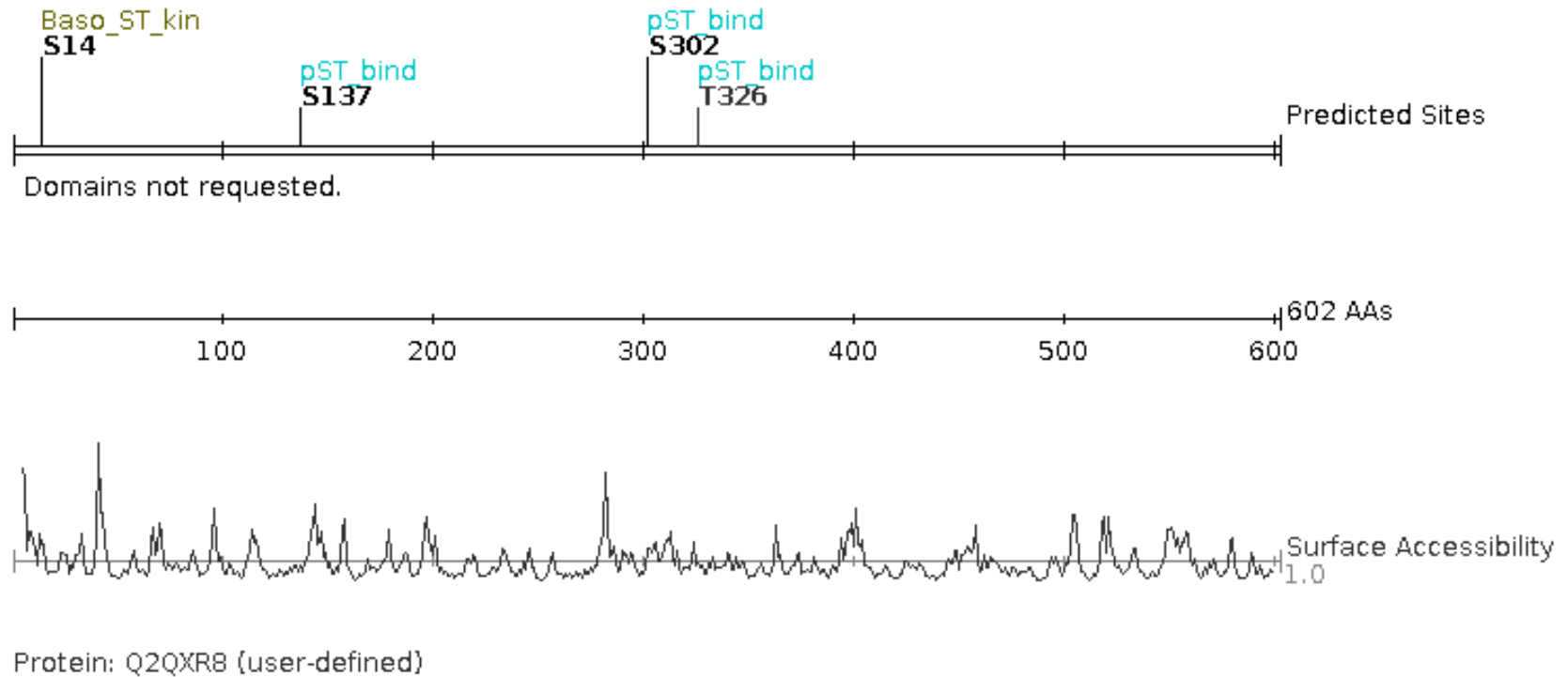
这些氨基酸信息可以一定程度上提示此蛋白质结构和功能情况。

### Amino acid composition:

Ala (A)	43	8.2%
Arg (R)	23	4.4%
Asn (N)	18	3.4%
Asp (D)	29	5.5%
Cys (C)	8	1.5%
Gln (Q)	17	3.2%
Glu (E)	33	6.3%
Gly (G)	31	5.9%
His (H)	11	2.1%
Ile (I)	35	6.6%
Leu (L)	52	9.9%
Lys (K)	35	6.6%
Met (M)	10	1.9%
Phe (F)	20	3.8%
Pro (P)	23	4.4%
Ser (S)	46	8.7%
Thr (T)	33	6.3%
Trp (W)	4	0.8%
Tyr (Y)	6	1.1%
Val (V)	50	9.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

# 磷酸化位点预测

Pyruvate kinase 2, cytosolic 主要是137aa和302aa处的丝氨酸和326aa处的苏氨酸磷酸化



Scansite4.0 (<https://scansite4.mit.edu/#home>)

## 亚细胞定位

用不同工具对Pyruvate kinase 2, cytosolic进行亚细胞定位预测结果如下：

PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) prediction cyto: 10, chlo: 3, plas: 1;

Plant-Ploc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>) 预测该蛋白定位在细胞质中

因此Pyruvate kinase 2, cytosolic定位于细胞质中，该蛋白为膜内蛋白。

### ----- Plant-PLoc Computation Result -----

Accession number	Predicted location(s)	Prediction approach
Q2QXR8	<b>Cytoplasm</b>	By fusing Gene Ontology (GO) information



# 结构预测：结构域预测



## Confidently predicted domains, repeats, motifs and features:

Name	Start ▲	End	E-value
<a href="#">Pfam:PK</a>	28	380	3.8e-95
<a href="#">Pfam:PK_C</a>	395	523	1.1e-26

Click on a row to highlight the feature in the diagram above. Click the feature name for more information.

## Outlier homologues and homologues of known structure: ?

Name	Sequence	Start ▲	End	E-value
<a href="#">PDB:3GG8 D</a>	3gg8	12	438	1e-99
<a href="#">SCOP:d1e0ta2</a>	d1e0ta2	30	95	0.001
<a href="#">SCOP:d1e0ta2</a>	d1e0ta2	137	378	8e-77
<a href="#">Blast:HDc</a>	E119R5_9CHLR 36-250	197	288	7e-8

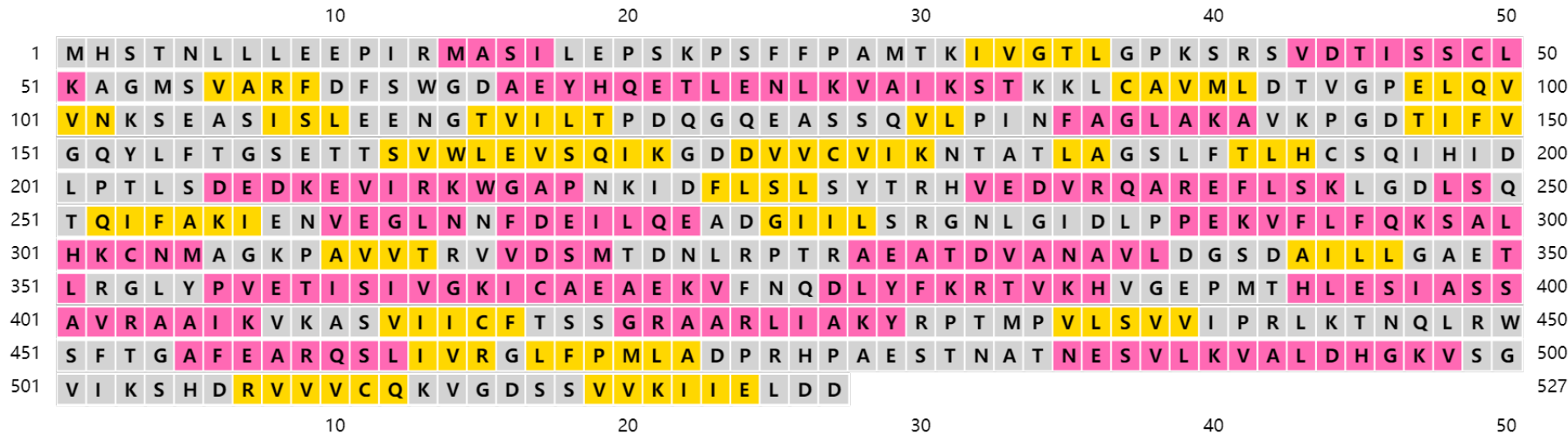
Click on a row to highlight the feature in the diagram above. Click the feature name for more information.

Source	Domain	Start	End
<a href="#">Pfam</a>	<a href="#">PK</a>	28	380
<a href="#">Pfam</a>	<a href="#">PK_C</a>	395	523
<a href="#">disorder</a>	n/a	475	476
<a href="#">disorder</a>	n/a	483	484

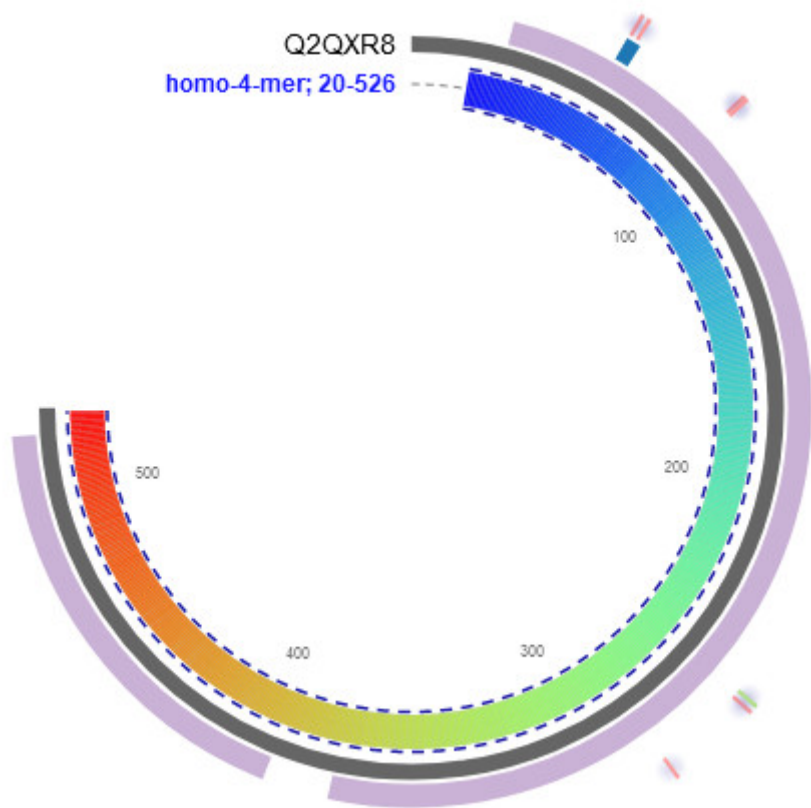
Pfam:PK 和 Pfam:PK\_C 为丙酮酸激酶家族特有的结构域；  
Pfam:PK 为镁离子、钾离子结合区域，丙酮酸激酶活性区域；  
Pfam:PK\_C 为丙酮酸激酶识别区域。  
因此可知带蛋白有丙酮酸激酶活性。

# 结构预测：二级结构分析

根据Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 分析cPK2的二级结构可知，该蛋白主要由无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠组成，无规卷曲> $\alpha$ -螺旋> $\beta$ -折叠。无规则卷曲是一种有序的非重复性结构，通常是构成酶活性部位和其他蛋白质特异的功能部位。



# 结构预测：3D结构分析



cPK2蛋白的三级结构是通过swiss model预测出来的，ID为1aqf.1.A，预测的模板蛋白为P11974（兔子，Pyruvate kinase PKM，一种糖酵解酶）

## Homology Model

Template: **1aqf.1.A** "PYRUVATE KINASE FROM RABBIT MUSCLE WITH MG, K, AND L-PHOSPHOLACTATE" **P11974**

SMTL Version: 2021-01-06

Seq Identity: 35.14%

Seq Similarity: 0.38

Coordinates: [↓](#)

## Model Quality Estimate

QMEAN		-2.16
C $\beta$		-0.83
All Atom		-0.25
solvation		0.40
torsion		-2.10

红色：可信度高  
蓝色：可信度低

# 结构预测：3D结构分析

Model based on 1aqf.1.A PYRUVATE KINASE

```
* MODEL:A PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
MODEL:B PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
MODEL:C PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
MODEL:D PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
1aqf.1.A ID1SAPITARNTGI2ICTIG3PASRSVETLKEMIK4SGMNVARMN5FSHG6THEYHAETIK7NVRTATES8FASDPILYR9PVAVALD10TGPEIR11TGLIK12SGSTA13EVELK14KGAT 138

MODEL:A VILTPDQGG--EASSQVLPINFAGLAKAVKPGDTIFVGGYLF1TGSETTSVM2WLEVSQIK3GDDVVCV4IKNTATLAGS5LFTLHCSQ6IHIDL7PTLSD8EDKEVIR9KWGAP 218
MODEL:B VILTPDQGG--EASSQVLPINFAGLAKAVKPGDTIFVGGYLF1TGSETTSVM2WLEVSQIK3GDDVVCV4IKNTATLAGS5LFTLHCSQ6IHIDL7PTLSD8EDKEVIR9KWGAP 218
MODEL:C VILTPDQGG--EASSQVLPINFAGLAKAVKPGDTIFVGGYLF1TGSETTSVM2WLEVSQIK3GDDVVCV4IKNTATLAGS5LFTLHCSQ6IHIDL7PTLSD8EDKEVIR9KWGAP 218
MODEL:D VILTPDQGG--EASSQVLPINFAGLAKAVKPGDTIFVGGYLF1TGSETTSVM2WLEVSQIK3GDDVVCV4IKNTATLAGS5LFTLHCSQ6IHIDL7PTLSD8EDKEVIR9KWGAP 218
1aqf.1.A I1KRTID2NAYMEKCDENIL3WLDYK4NICKV5VDVGS6KVYVDDG-----LISLQ7VKQK8GPDFL9VEVENGG10FL-G11SKKGVN12LPGA13AVDLP14AVSE15NDIQ16DL-K17FGVE 238

MODEL:A NKIDF1LSYSYTRHVEDV2RQAREFL3SKLGDLSQTQ4IFAKI5EN6VEGLN7NFDEIL8QEADG9IILSRG10NL11GIDL12LPPEK13VFL14FQKSAL15HKCN16MAGK17PAVV-TRV18VD19SMT20DN 322
MODEL:B NKIDF1LSYSYTRHVEDV2RQAREFL3SKLGDLSQTQ4IFAKI5EN6VEGLN7NFDEIL8QEADG9IILSRG10NL11GIDL12LPPEK13VFL14FQKSAL15HKCN16MAGK17PAVV-TRV18VD19SMT20DN 322
MODEL:C NKIDF1LSYSYTRHVEDV2RQAREFL3SKLGDLSQTQ4IFAKI5EN6VEGLN7NFDEIL8QEADG9IILSRG10NL11GIDL12LPPEK13VFL14FQKSAL15HKCN16MAGK17PAVV-TRV18VD19SMT20DN 322
MODEL:D NKIDF1LSYSYTRHVEDV2RQAREFL3SKLGDLSQTQ4IFAKI5EN6VEGLN7NFDEIL8QEADG9IILSRG10NL11GIDL12LPPEK13VFL14FQKSAL15HKCN16MAGK17PAVV-TRV18VD19SMT20DN 322
```

PYRUVATE KINASE P11974 UniProtKB InterPro

## 金属结合位点

Toggle Identical (ABCD)

```
* P11974 IQTQQLHAAMADT1FLEHMCRLD2IDSAPITARNTGII3CTIG4PASRSVETLKEMIK5SGMNVARMN6FSHG7THEYHAETIK8NVRTATES9FASDPILYR10PVAVALD11TGK12P 117
1aqf. (ABCD) IQTQQLHAAMADT1FLEHMCRLD2IDSAPITARNTGII3CTIG4PASRSVETLKEMIK5SGMNVARMN6FSHG7THEYHAETIK8NVRTATES9FASDPILYR10PVAVALD11TGK12P 116

P11974 EIR1TGLIK2SGSTA3EVELK4KGATL5KITLD6NAYMEKCDENIL7WLDYK8NICKV9VDVGS10KVYVDDG11LISLQ12VKQK13GPDFL14VEVENGG15FLG16SKKGVN17LPGA18AVDLP19AVS 222
1aqf. (ABCD) EIR1TGLIK2SGSTA3EVELK4KGATL5KITLD6NAYMEKCDENIL7WLDYK8NICKV9VDVGS10KVYVDDG11LISLQ12VKQK13GPDFL14VEVENGG15FLG16SKKGVN17LPGA18AVDLP19AVS 221

P11974 EKDI1QDLK2FGVEQ3DDVMVFAS4FIRKAADV5HEVRKIL6GKGNIKI7ISKIEN8HEG9VRRFDEIL10EASD11GMVARG12DLGIEI13PAEK14VFLAQ15KMI16IGRC17NRAG18KPVICA 327
1aqf. (ABCD) EKDI1QDLK2FGVEQ3DDVMVFAS4FIRKAADV5HEVRKIL6GKGNIKI7ISKIEN8HEG9VRRFDEIL10EASD11GMVARG12DLGIEI13PAEK14VFLAQ15KMI16IGRC17NRAG18KPVICA 326

P11974 TQ1LESMI2KKPR3TRAEGSD4VANAVLDG5ADCIM6LSGETAK7GDYPLEAV8RMQHLIAREAE9AAMF10H11RKLF12EELAR13SSSH14STDL15MEAM16AGS17VEASY18KCLAAAL19LIVLT 432
1aqf. (ABCD) TQ1LESMI2KKPR3TRAEGSD4VANAVLDG5ADCIM6LSGETAK7GDYPLEAV8RMQHLIAREAE9AAMF10H11RKLF12EELAR13SSSH14STDL15MEAM16AGS17VEASY18KCLAAAL19LIVLT 431

P11974 ESG1RS2AHQVARYR3PRAP4IIAVTRNHQ5TRQ6ANLY7RGIF8PVVC9KD10PEVQEA11WDD12LVN13LAMN14VGKARG15FFK16KG17DV18VIVLT19GW20RPGSG21FTNT22MR23VV24VP 531
-----
```

Model based on 1aqf.1.A PYRUVATE KINASE

```
* MODEL:A PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
MODEL:B PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
MODEL:C PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
MODEL:D PSKPSFFPAMTKIVGTLGPKRSVDTISSCLKAGMSVARFD1FSWGD2AEYHQETLENLKVAIKS-----TKKLC3AVMLD4TVGPELQV5VNKSEA---SISLE6ENGT 115
1aqf.1.A ID1SAPITARNTGII2CTIG3PASRSVETLKEMIK4SGMNVARMN5FSHG6THEYHAETIK7NVRTATES8FASDPILYR9PVAVALD10TGPEIR11TGLIK12SGSTA13EVELK14KGAT 138
```

PYRUVATE KINASE P11974 UniProtKB InterPro

## 核苷酸磷酸盐结合位点

Toggle Identical (ABCD)

```
* P11974 IQTQQLHAAMADT1FLEHMCRLD2IDSAPITARNTGII3CTIG4PASRSVETLKEMIK5SGMNVARMN6FSHG7THEYHAETIK8NVRTATES9FASDPILYR10PVAVALD11TGK12P 117
1aqf. (ABCD) IQTQQLHAAMADT1FLEHMCRLD2IDSAPITARNTGII3CTIG4PASRSVETLKEMIK5SGMNVARMN6FSHG7THEYHAETIK8NVRTATES9FASDPILYR10PVAVALD11TGK12P 116
```

## 结构预测：3D结构分析

P11974和Q2QXR8都为丙酮酸激酶，都含有1个核苷酸磷酸结合位点、6个金属结合位点和一个维持酶过渡态未定性的位点。

P11974 核苷酸磷酸结合位点 74A - 77A Asn Phe Ser His

金属结合位点 74A Asn, 76A Ser ,  
112A Asp, 113A Thr,  
271A Glu, 295A Asp

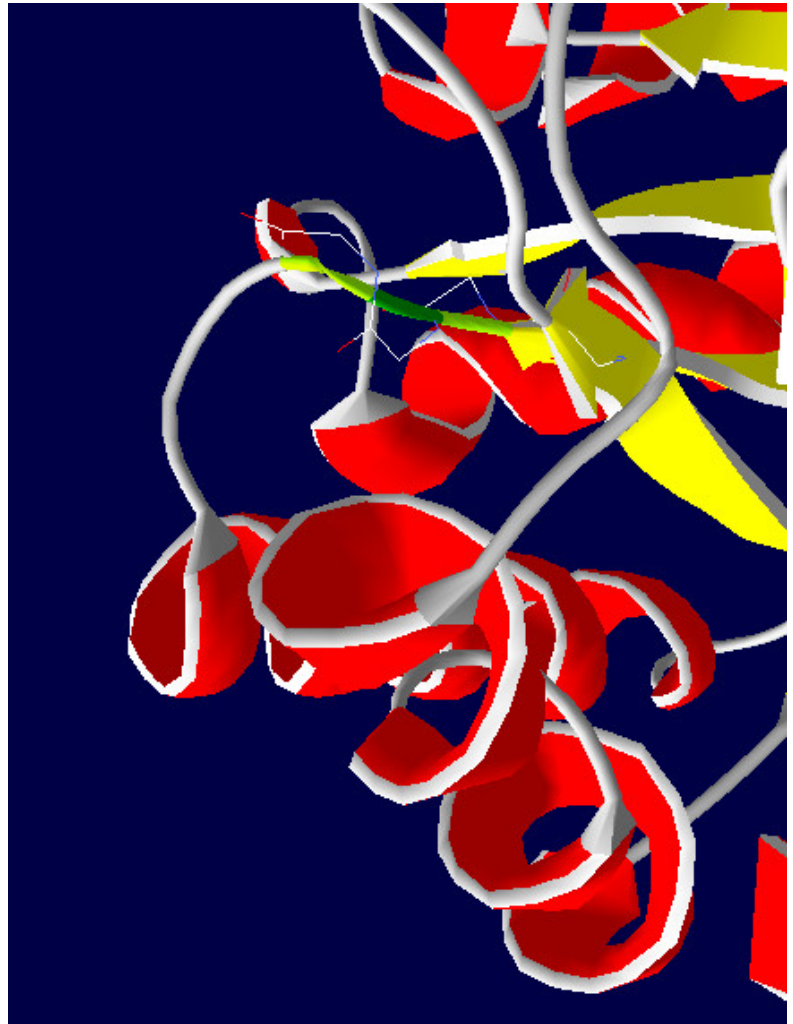
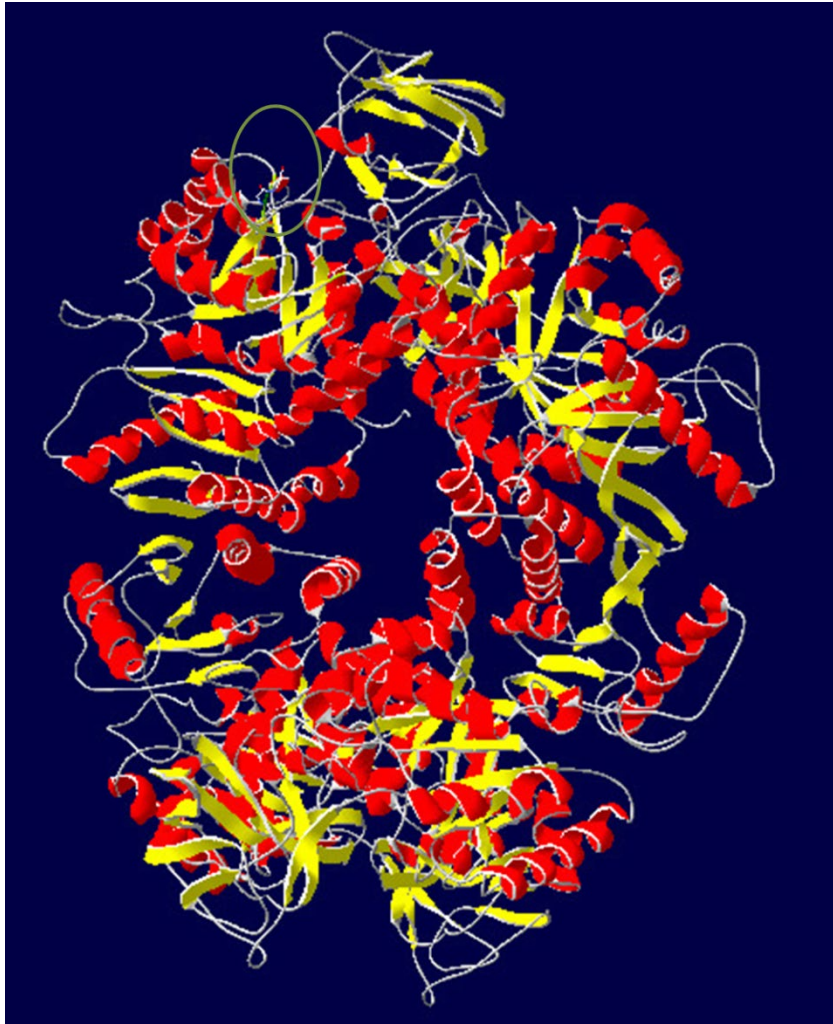
维持酶过渡态稳定功能位点 269A Lys

Q2QXR8 核苷酸磷酸结合位点 60A - 63A Asp Phe Ser His

金属结合位点 74A Asp, 76A Ser ,  
112A Asp, 113A Thr,  
271A Glu, 295A Asn

维持酶过渡态稳定功能位点 269A Lys

## 结构预测：3D结构分析



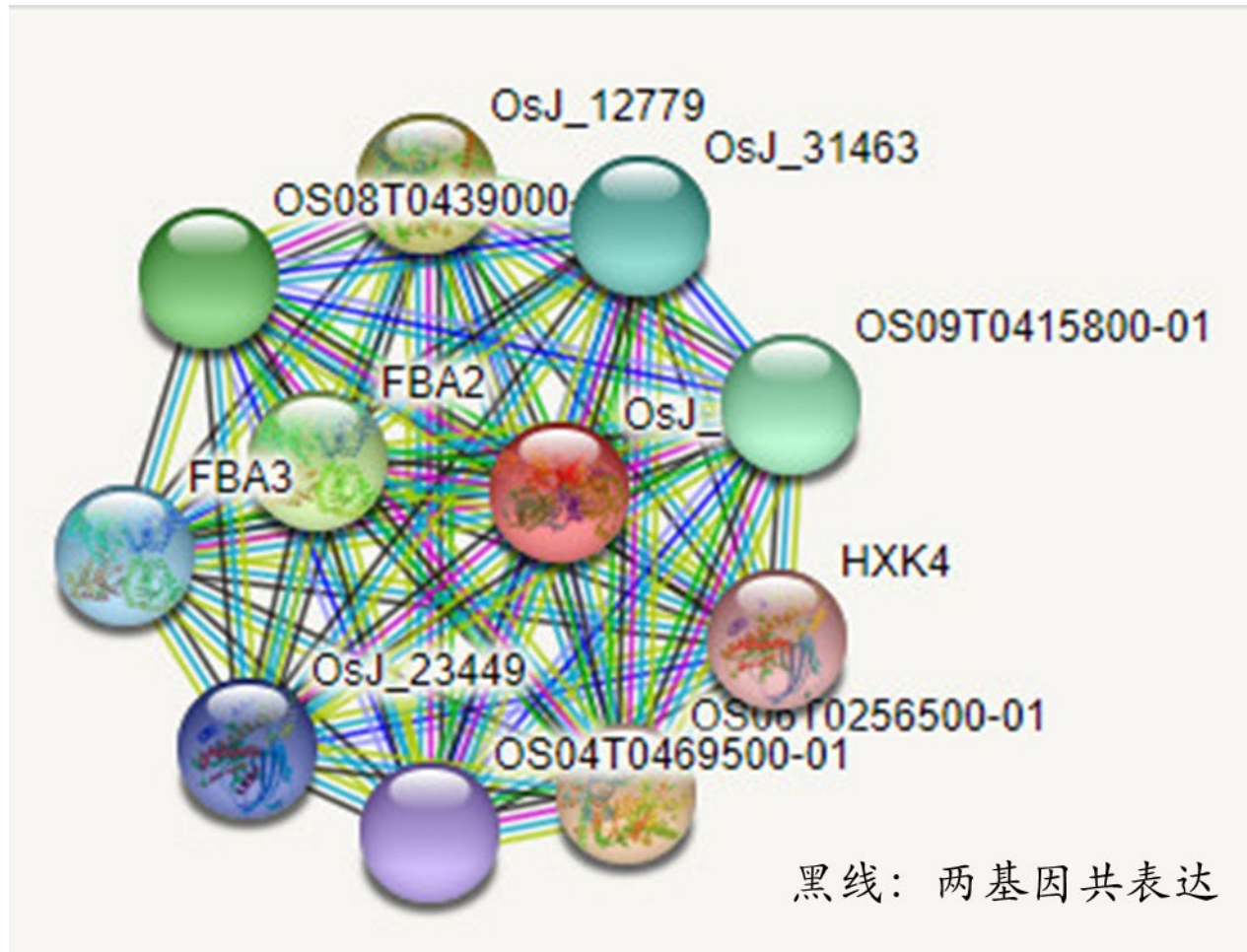
无规卷曲上金属 (Mg\K) 和核酸磷酸盐结合区域

## 结构预测：3D结构分析

在SPD的控制面板上可以看该蛋白无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠在肽链中的位置，与Psipred网站预测出来的二级结构相比，无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠在肽链中的位置略有不同，如SPD中31A Lys处于 $\beta$ -折叠，38A Pro、42A Ser、52A Ala处于 $\alpha$ -螺旋，而在Psipred中这四个位置的氨基酸都处于无规卷曲。

A	PRO20	v	■
A	SER21	v	■
A	LYS22	v	■
A	PRO23	v	■
A	SER24	v	■
A	PHE25	v	■
A	PHE26	v	■
A	PRO27	v	■
A	ALA28	v	■
A	MET29	v	■
A	THR30	v	■
A s	LYS31	v	■
A s	ILE32	v	■
A s	VAL33	v	■
A s	GLY34	v	■
A s	THR35	v	■
A s	LEU36	v	■
A	GLY37	v	■
A h	PRO38	v	■
A	LYS39	v	■
A	SER40	v	■
A	ARG41	v	■
A h	SER42	v	■
A h	VAL43	v	■
A h	ASP44	v	■
A h	THR45	v	■
A h	ILE46	v	■
A h	SER47	v	■
A h	SER48	v	■
A h	CYS49	v	■
A h	LEU50	v	■
A h	LYS51	v	■
A h	ALA52	v	■
A	GLY53	v	■
A	MET54	v	■

## cPK2蛋白互作情况

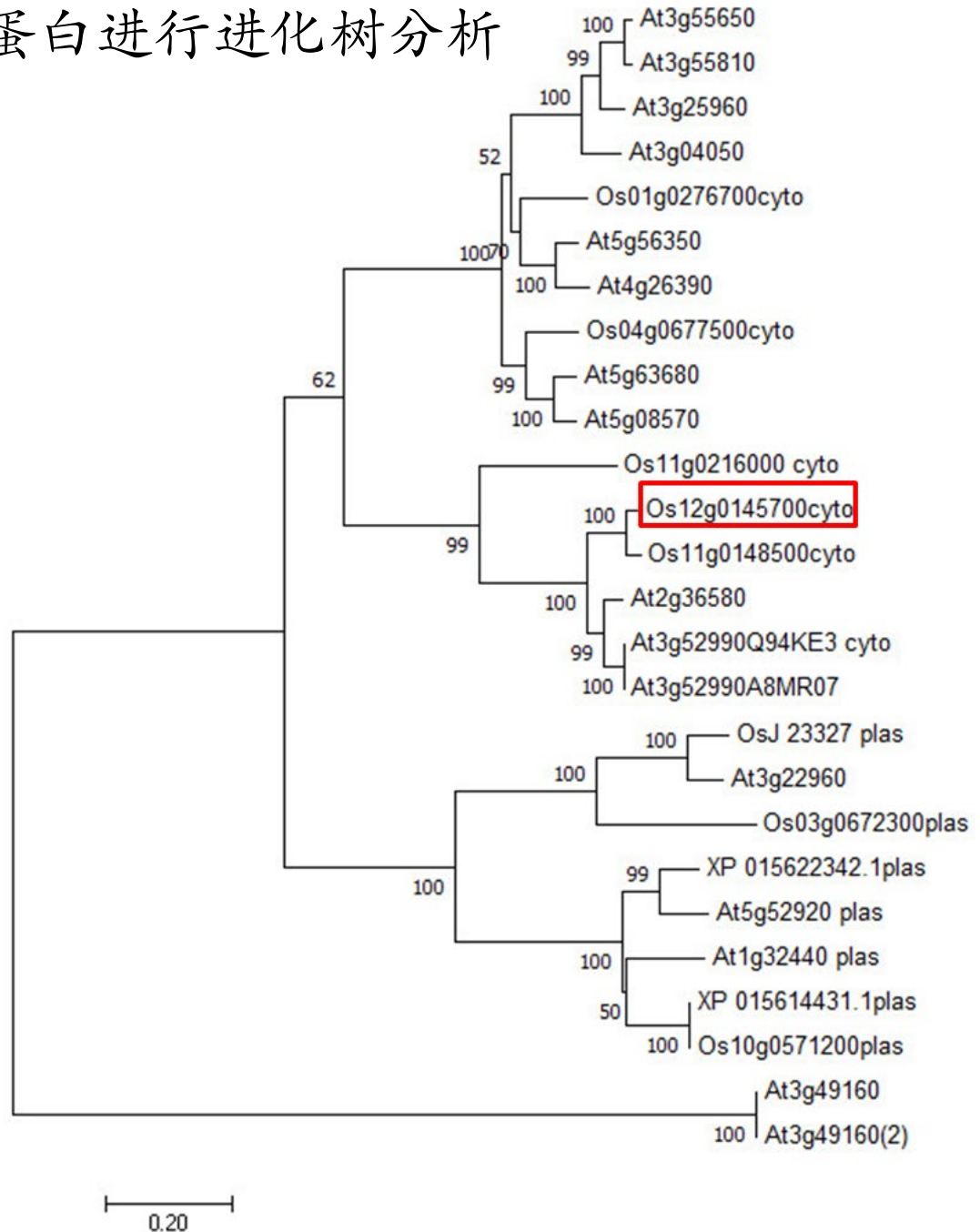


Os06T0256500-01是胞质中的葡萄糖6-磷酸异构酶，催化G-6-P和F-6-P相互转化，G-6-P是淀粉合成的原料（蔡怡聪,2018）



# 对水稻和拟南芥中所有的PK蛋白进行进化树分析

跟目标蛋白亲缘关系最近的为 Os11g0148500，其次为 At3g52990Q94KE3、At2g36580 和 At3g52990A8MR07，目标蛋白与他们的相似性分别达到 96.39%、87.48%、86.15% 和 87.76%。





# 目的

- 1.根据Pyruvate kinase 2相似或者同源蛋白预测蛋白结构域，以相似的思路设计蛋白互作实验，找相应的抗体或抗原
- 2.根据相似或者同源蛋白预测出现相应实验现象的原因
- 3.根据参与调控的已知功能蛋白，挑选合适的蛋白调控目标蛋白或者被调控，研究目标蛋白的作用
- 4.利用蛋白互作分析预测Pyruvate kinase 2, cytosolic和哪些蛋白互作或能形成异源复合体，Pyruvate kinase 2, cytosolic的表达的量改变会影响哪些蛋白的表达，可能导致怎样的表型

## 参考文献

- [1]蔡怡聪. 水稻垚白基因 OsPK2 的图位克隆与功能研究[D]. 中国农业科学院,2018.
- [2]Hu Li,Tu Bin,Yang Wen,Yuan Hua,Li Jialian,Guo Lianan,Zheng Ling,Chen Weilan,Zhu Xiaobo,Wang Yuping,Qin Peng,Ma Bingtian,Li Shigui. Mitochondria-Associated Pyruvate Kinase Complexes Regulate Grain Filling in Rice[J]. Plant Physiology,2020,183(3).
- [3]盛勤芳.人体内八种必需氨基酸的初步探究及其意义[J].科技视界,2014(28):239.
- [4]秦涛.蛋白质结构与功能中的位点氨基酸[J].生命科学仪器,2011,9(02):41-43.
- [5]邓晓政. 基于机器学习的磷酸化修饰位点预测研究[D]. 青岛大学,2020.
- [6]Meijer Alfred J,Dubbelhuis Peter F. Amino acid signalling and the integration of metabolism.[J]. Biochemical and biophysical research communications,2004,313(2).

Thank you for your attention !