

# 实用生物信息技术期末总结交流报告会

## 茶树铵转运蛋白CsAMT1.2功能分析和结构预测

Functional analysis and structure prediction of  
ammonium transporter CsAMT1.2 in tea plant

**2020年12月12日**

报告人：张永利

中国农业科学院研究生院

2020级博士班

邮箱：zh042zyl@126.com

微信号：zyl858016（18055937484）

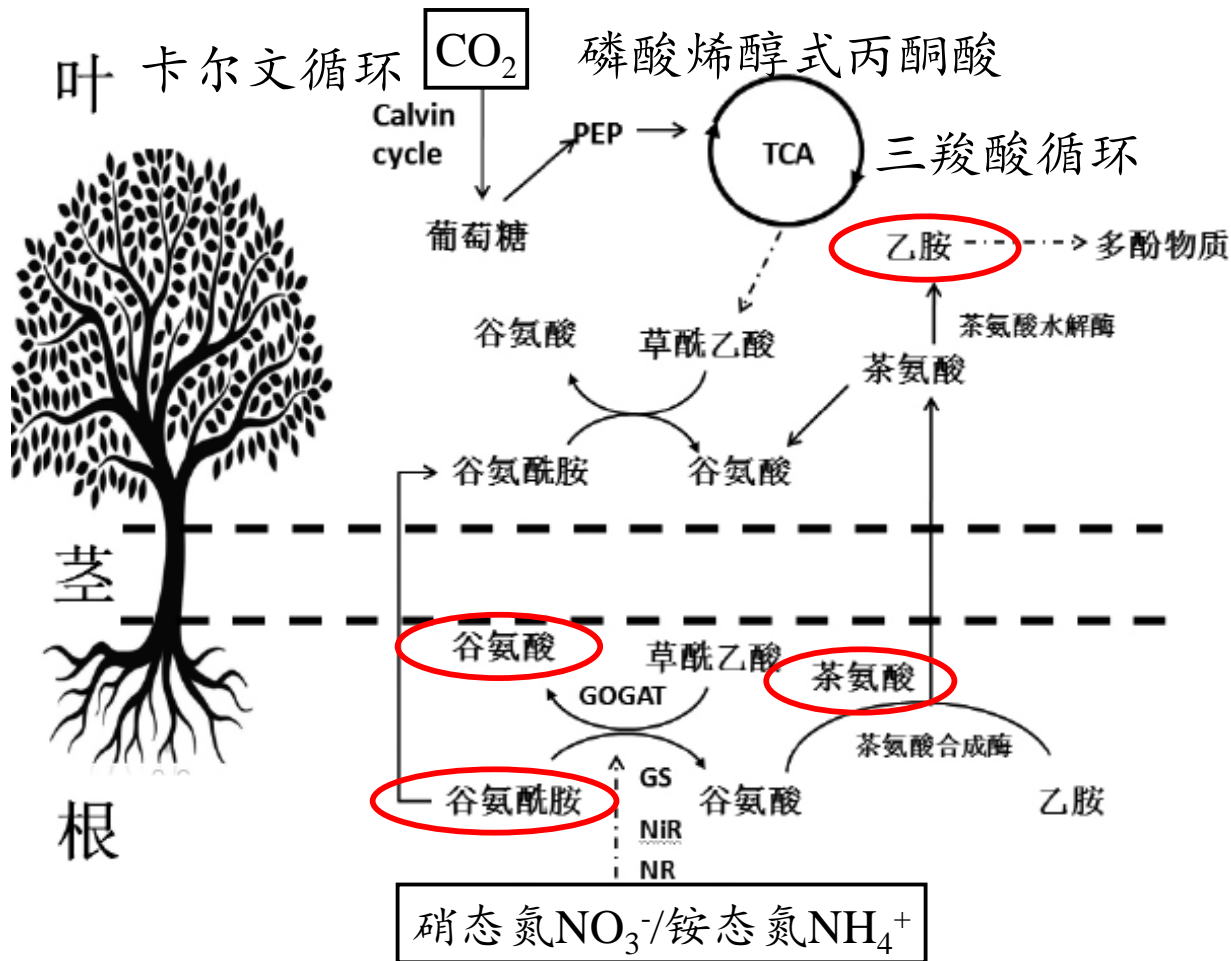
# 小组成员

编号	姓名	研究所	导师	研究方向
G1A	张永利	茶叶所	阮建云	茶树栽培生理与生态
G1B	黄慧	棉花所	叶武威	棉花抗逆种质资源
G1C	李延璨	蜜蜂所	孙成	熊蜂基因组学
G1D	齐丹	果树所	曹玉芬	梨种质资源

# 目录

1. 研究背景与目的
2. CsAMT1.2特征分析
3. CsAMT1.2结构预测
4. 结论

# 研究背景——铵态氮吸收的重要作用



氮磷钾是植物三大必需营养元素

茶Tea (*Camellia sinensis*)

生化成分指标：游离氨基酸、茶多酚、咖啡碱、氮浸出物

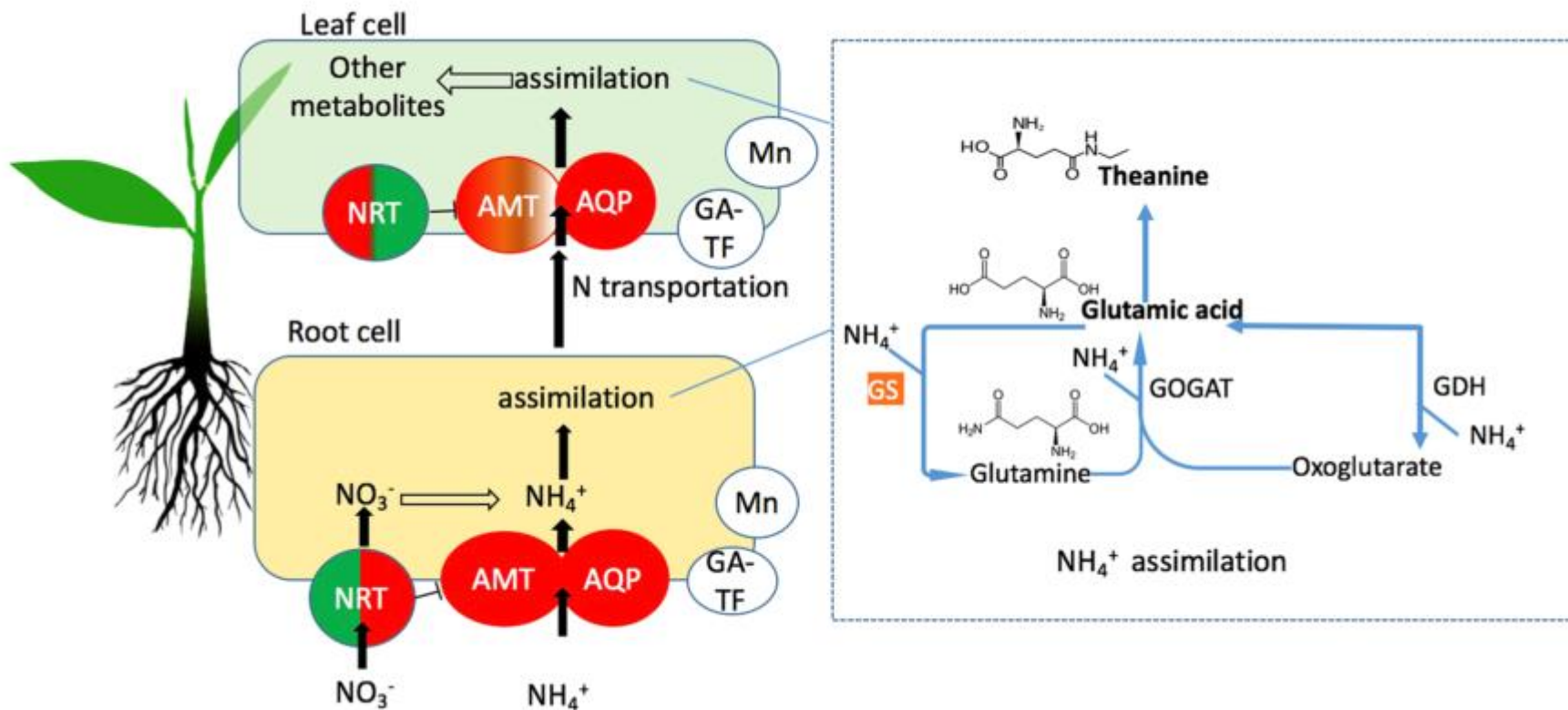
氮素吸收方式：根系吸收为主

吸收形态：铵态氮和硝态氮  
(茶园酸性土壤)

偏好性：喜铵耐铵特性

GOGAT谷氨酸合成酶 GS谷氨酰胺合成酶 NR硝酸还原酶 NIR亚硝酸还原酶

# 研究背景——茶树吸收 $\text{NH}_4^+$ -N以铵转运蛋白介导为主



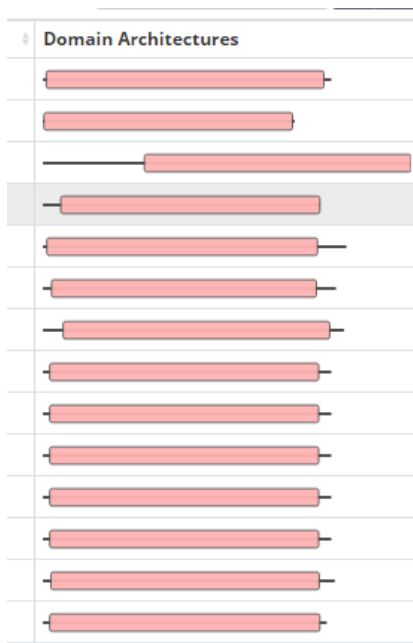
AMT铵转运蛋白（Ammonium transporter）

# 研究背景——铵转运蛋白家族AMTs

- 属于铵转运蛋白/甲胺通透酶/恒河猴蛋白超家族 (Amt/Mep/Rh)

铵转运蛋白 Ammonium transporter (Amt) : 细菌、古菌和植物

真核生物 Eukaryota	绿色植物 Viridiplantae	真菌 Fungi	多细胞动物 Metazoa	节肢动物 Arthropoda	细菌 Bacteria	古菌 Archaea	共计
192	32	97	43	38	805	56	1068

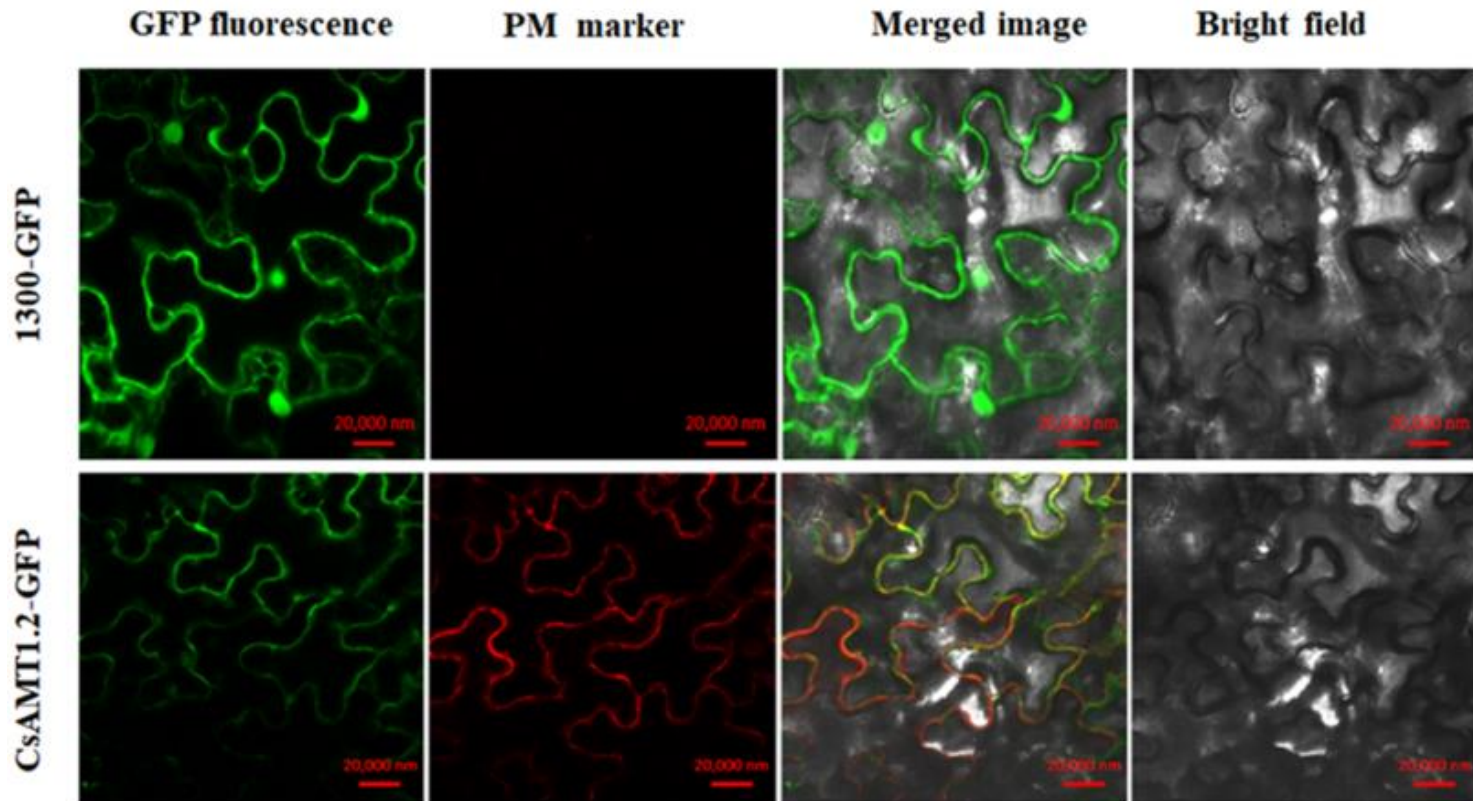


- 结构域非常保守，序列保守，同源三聚体，400-500个氨基酸的疏水蛋白，11~12个假定跨膜区域
- 拟南芥AMT家族成员：AtAMT1.1-5和AtAMT2
- 茶树AMT家族成员：CsAMT1.1-4和CsAMT3.1

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism
Q6F5D8	Q6F5D8_CAMSI	Ammonium transporter	CsAMT1;2 AMT1.2	Camellia sinensis (Tea)

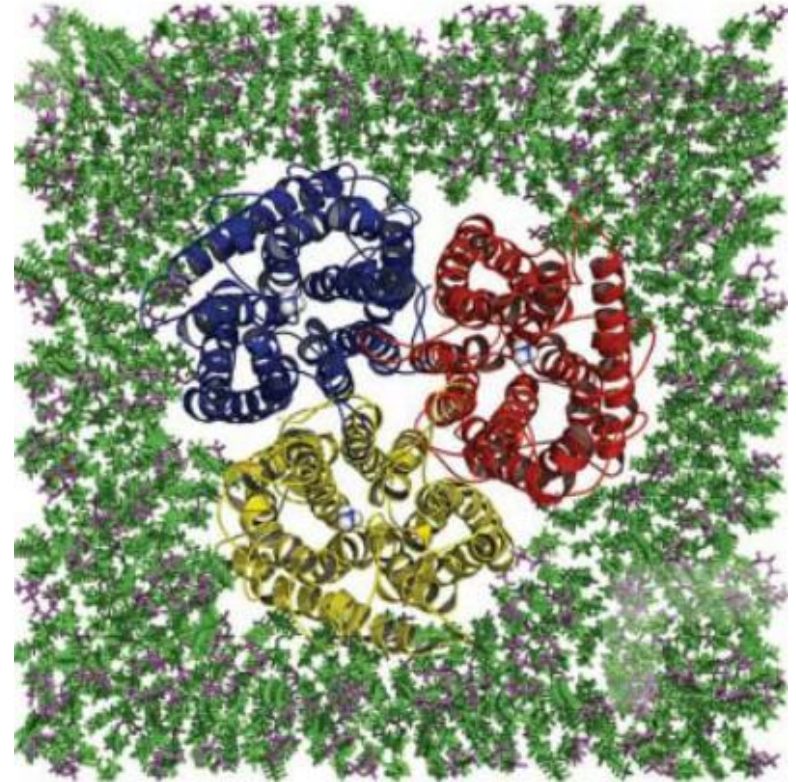
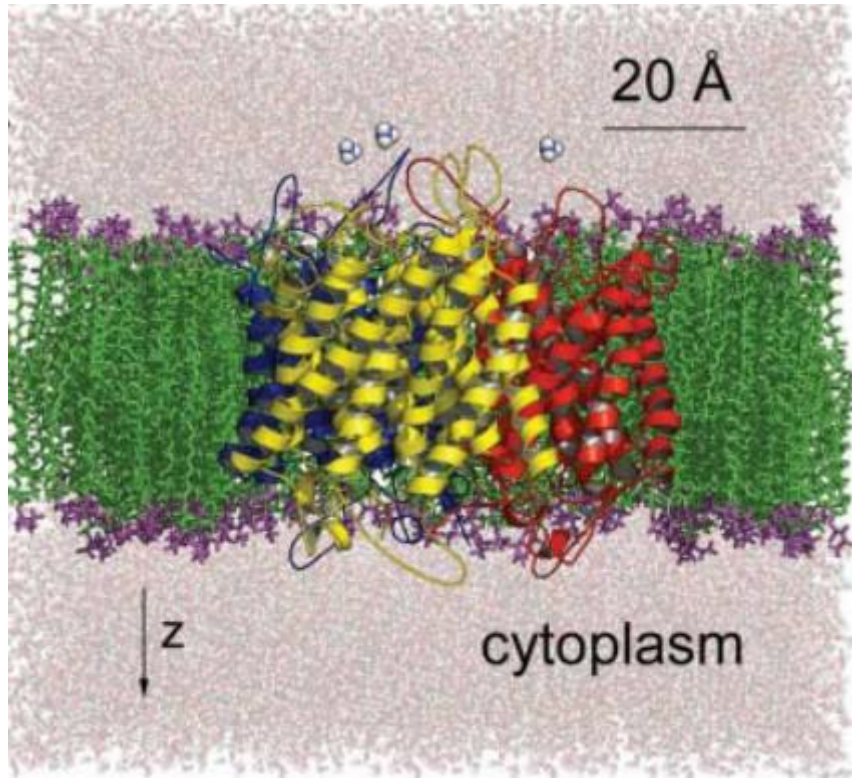
# 研究背景——CsAMT1.2亚细胞定位

CsAMT1.2 is targeted to the plasma membrane



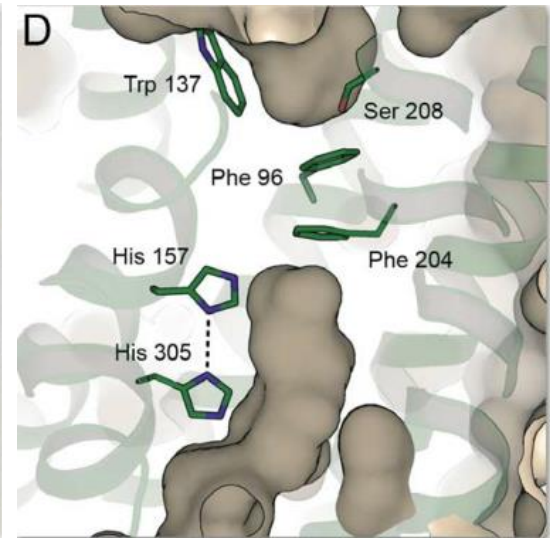
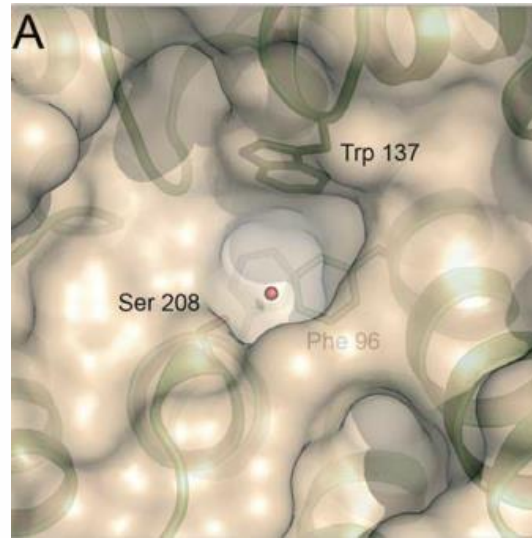
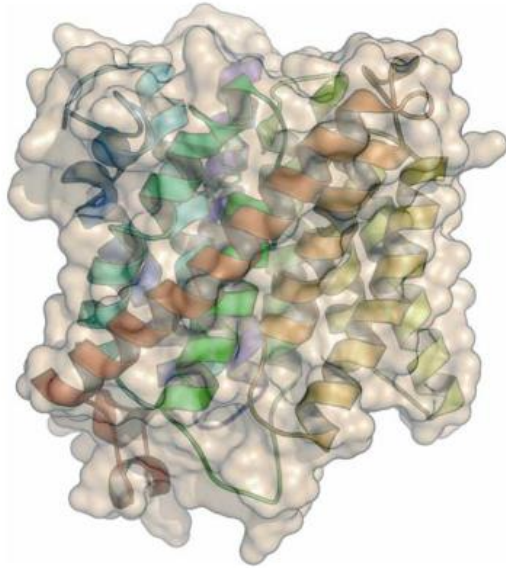
Zhang *et al.* Identification of regulatory networks and hub genes controlling nitrogen uptake in tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *J. Agric. Food Chem.*, 2020

# 研究背景——AMT在质膜上的分布



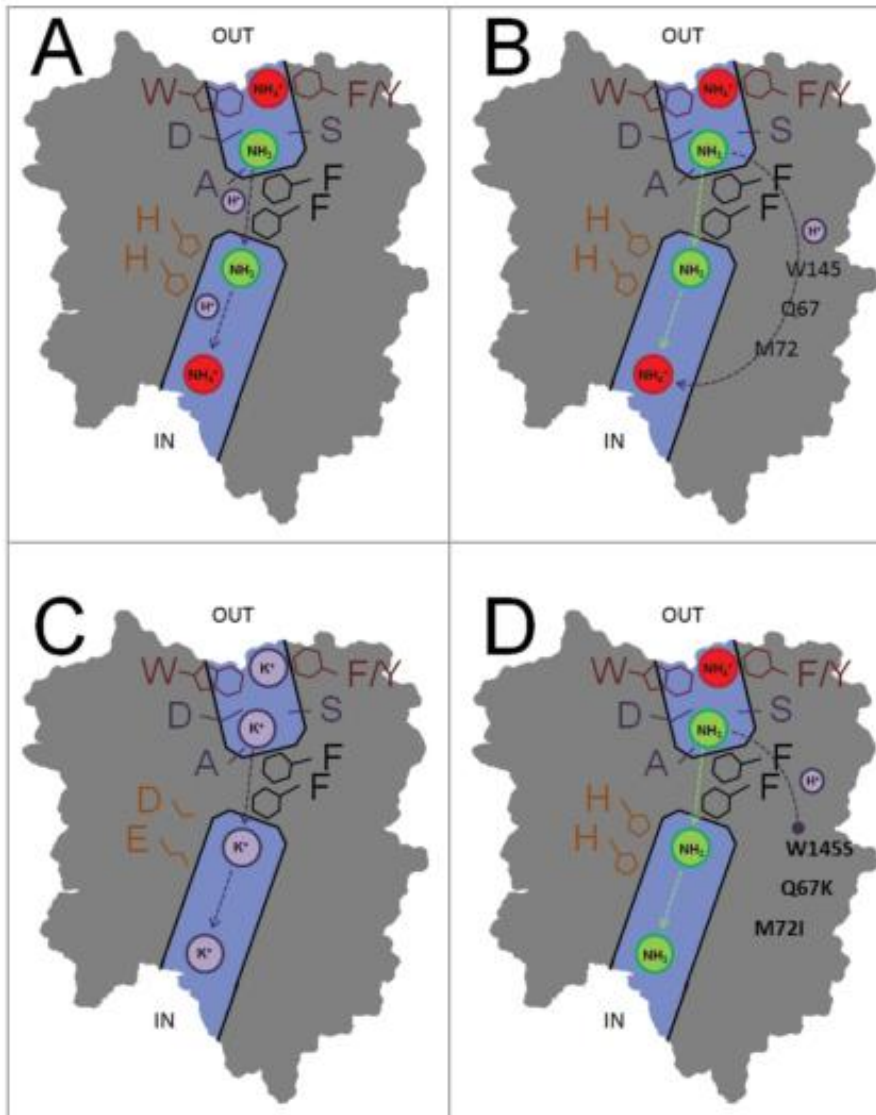


# 研究背景——AMT1结构特征与运输机理



- 闪烁古生球菌 *A. fulgidus* 的 Amt 单体伪双重对称；C 末端区域高度保守，可以作为单体间传输事件的变构开关。
- 膜外侧底物结合位点由两个保守残基 Trp 137 和 Ser 208，及底部的 Phe 96 侧链组成；
- 可能机理：底物与 Ser 208 的 O $\gamma$  形成氢键，与 Trp 137 的吲哚发生阳离子相互作用；
- 两个苯丙氨酸（Phe）阻断了疏水通道，但其柔性较大，转运时发生变构。
- 1 对组氨酸（His）在疏水通道中，与去质子化有关。

# 研究背景——AMT1结构特征与运输机理



A. 野生电流型：NH<sub>3</sub>与H<sup>+</sup>共运输

B. 野生电流型：NH<sub>3</sub>运输，伴随H<sup>+</sup>传递（未知）

C. Ec AmtB一对组氨酸突变导致K<sup>+</sup>运输

D. AtAMT1;2亚基界面突变导致NH<sub>3</sub>净运输

W Trp色氨酸

Y Tyr酪氨酸

F Phe 苯丙氨酸

D Asp天冬氨酸

A Ala丙氨酸

S Ser丝氨酸

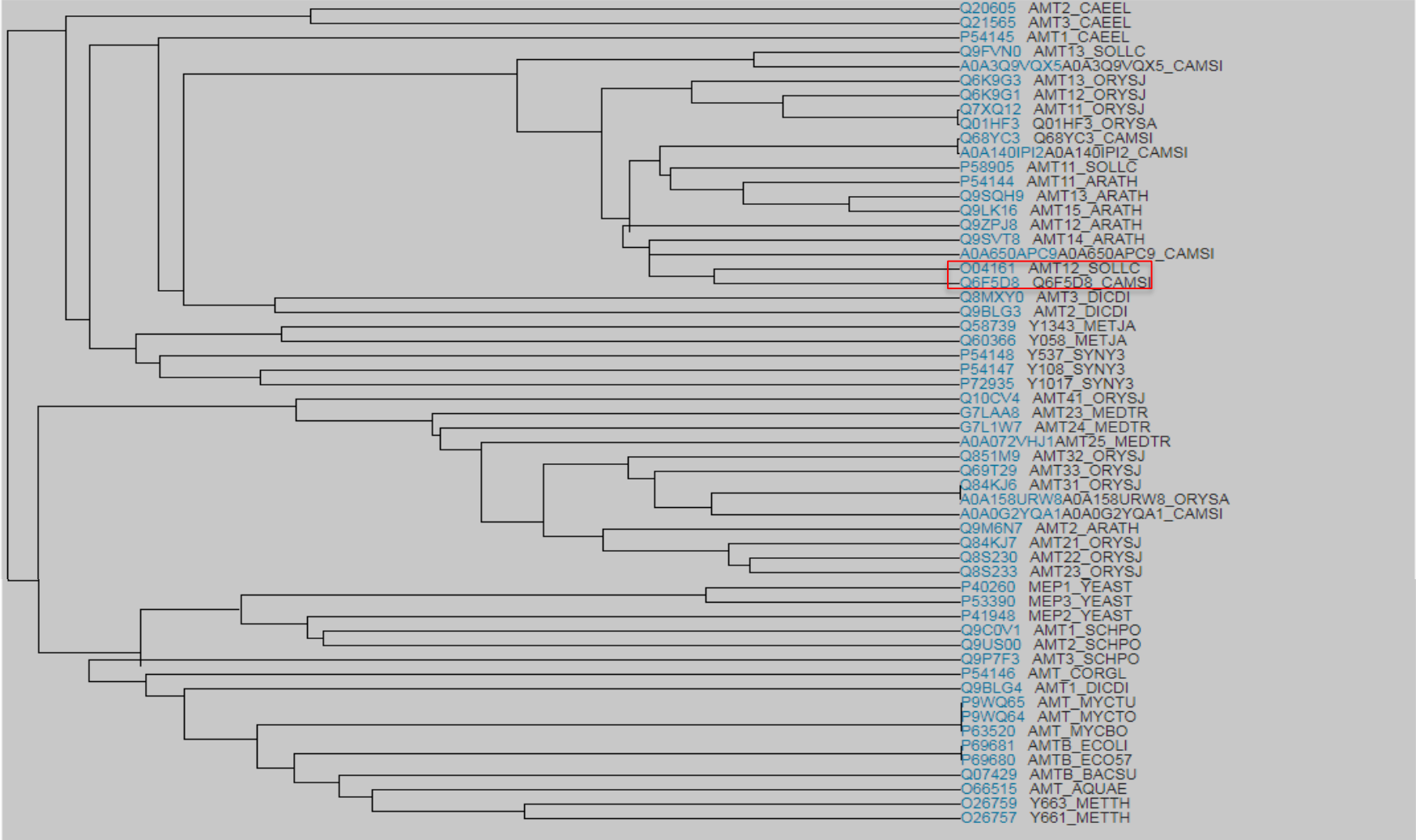
H His组氨酸

# 研究背景——研究目的

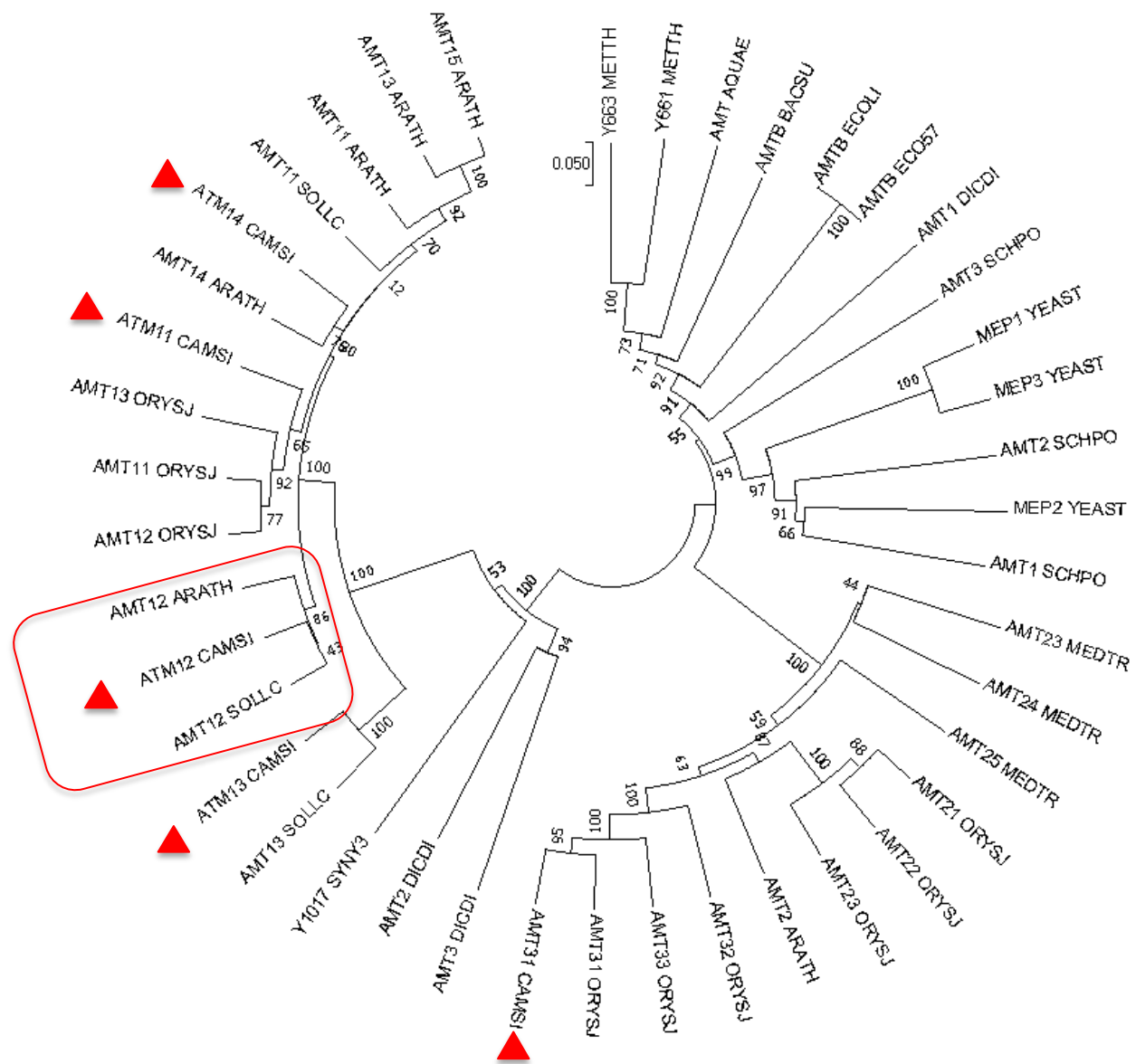
---

- 分析CsAMT1.2序列特征及生物学功能
- 预测CsAMT1.2蛋白结构和关键位点

# CsAMT1.2特征分析——多序列比对



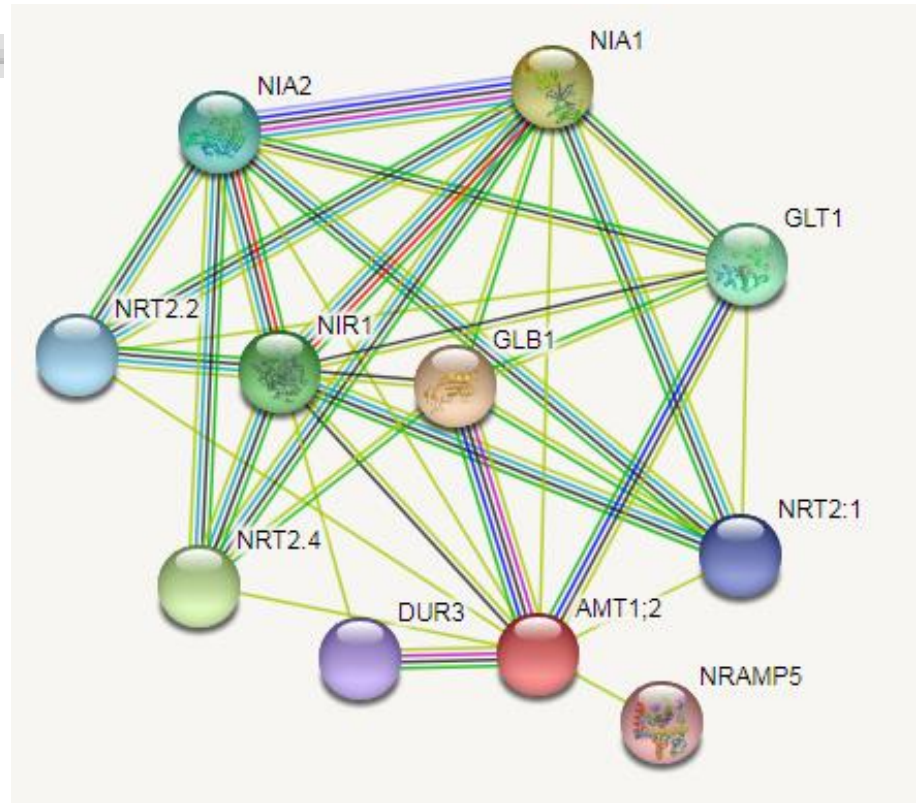
# CsAMT1.2特征分析——系统发育树



# CsAMT1.2特征分析——AtAMT1.2结构域及蛋白相互作用

## Ammonium\_transp

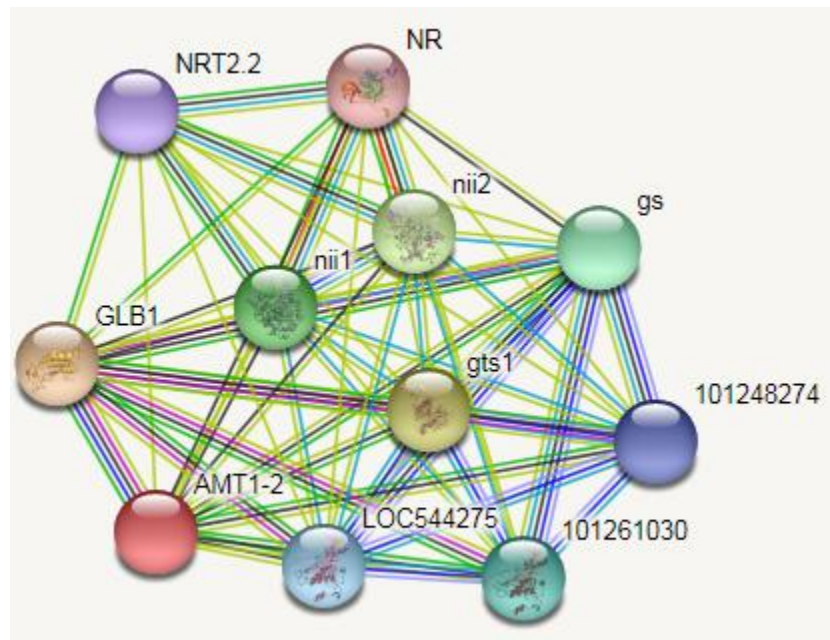
Source	Domain	Start	End
sig_p	n/a	1	30
low_complexity	n/a	8	34
Pfam	<a href="#">Ammonium_transp</a>	53	479
transmembrane	n/a	54	75
transmembrane	n/a	87	110
transmembrane	n/a	140	159
low_complexity	n/a	145	159
transmembrane	n/a	166	188
transmembrane	n/a	208	232
transmembrane	n/a	253	271
transmembrane	n/a	351	371
transmembrane	n/a	383	401
transmembrane	n/a	427	450
low_complexity	n/a	429	437
disorder	n/a	492	494
disorder	n/a	497	514
low_complexity	n/a	500	512



与氮调控蛋白 *P-II* 同系物GLB1基因相邻，共表达；与尿素跨膜转运体DUR3基因相邻，共表达；与谷氨酰胺合酶1 GLT1基因相邻，基因同现

# CsAMT1.2特征分析——LeAMT1.2特征及蛋白相互作用

- 西红柿LeAMT1.2共514aa,  
11Helical
- 表达部位：根毛和叶
- 诱导：  
铵供应或固氮菌定殖  
被根中谷氨酰胺供应下调  
光照下高表达



氮调控蛋白 *P-II* 同系物GLB1  
亚硝酸还原酶nil  
谷氨酰胺合成酶GS gts1 LOC544275

# CsAMT1.2特征分析——序列特征

## Topology

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Transmembrane <sup>i</sup>	51 – 74	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		24
Transmembrane <sup>i</sup>	86 – 106	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		21
Transmembrane <sup>i</sup>	135 – 154	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		20
Transmembrane <sup>i</sup>	161 – 183	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		23
Transmembrane <sup>i</sup>	203 – 227	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		25
Transmembrane <sup>i</sup>	248 – 266	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		19
Transmembrane <sup>i</sup>	422 – 447	Helical <a href="#">UniRule annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		26

## Keywords - Cellular component<sup>i</sup>

Membrane

跨膜螺旋7个还是11个?

## Family & Domains<sup>i</sup>

### Domains and Repeats

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Domain <sup>i</sup>	51 – 474	Ammonium_transp <a href="#">InterPro annotation -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		424

## Region

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Region <sup>i</sup>	491 – 513	Disordered <a href="#">Sequence analysis -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		23

## Compositional bias

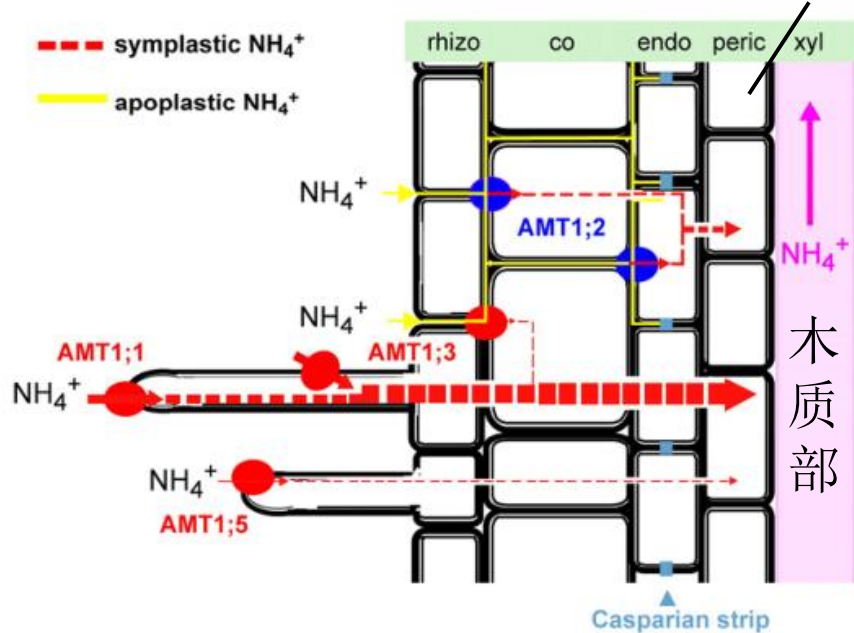
Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Compositional bias <sup>i</sup>	494 – 513	Polar <a href="#">Sequence analysis -</a>	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>		20

C端有1个无序区和极性区，可能与转运底物在单体间转移有关



# CsAMT1.2特征分析——在根系中的分布预测

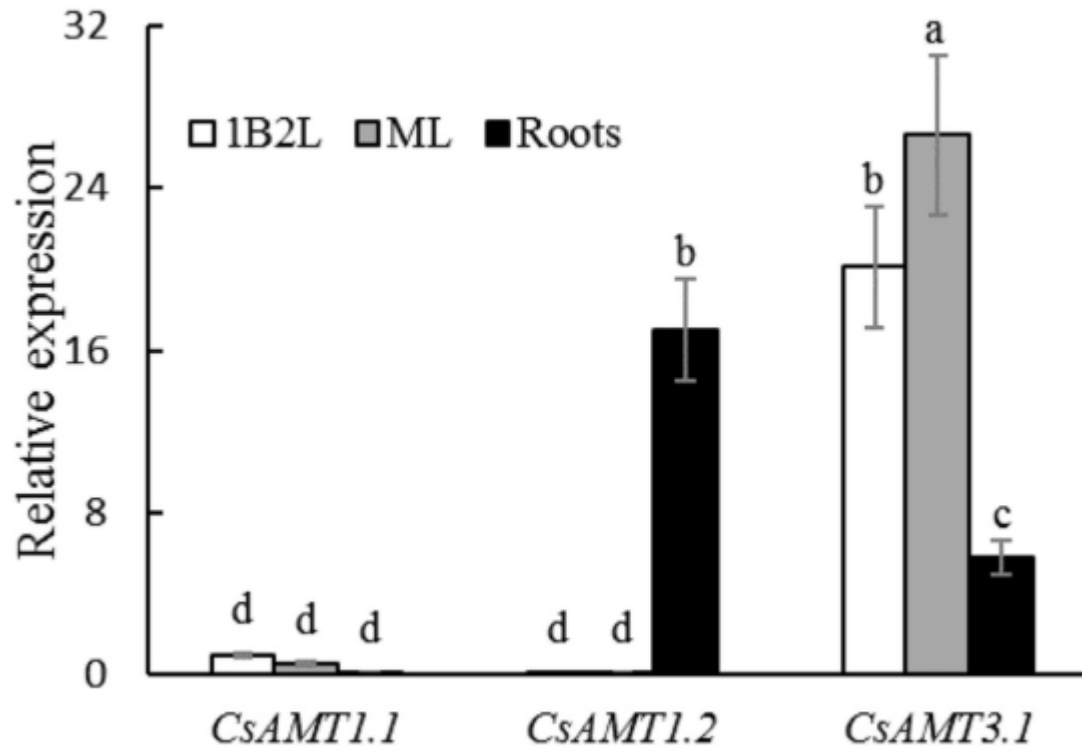
表皮 皮层 内皮层 中柱鞘



- AtAMT1.1-3负责90%的高亲和铵离子吸收。
- AtAMT1.1和AtAMT1.3表皮
- AtAMT1.2皮层和内皮层凯氏带
- AtAMT1.2在根中高表达
- 在18-26位点有丝氨酸多聚体
- 与铵、甲胺转运有关
- 受线虫影响

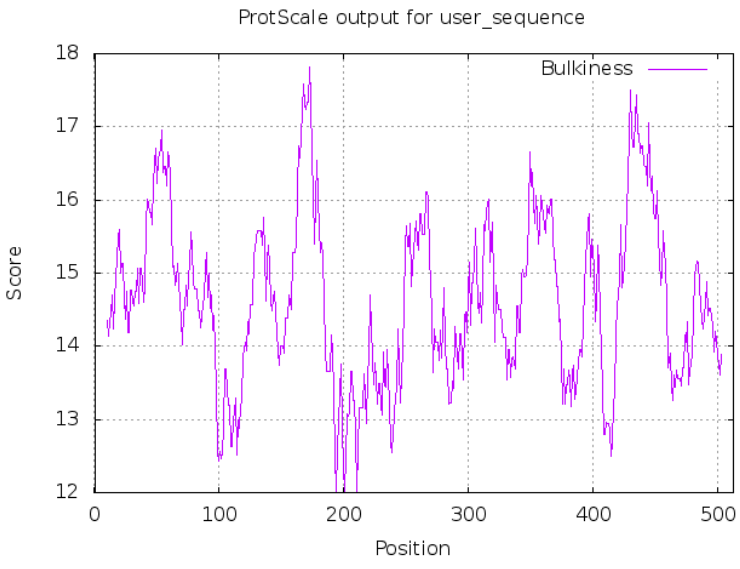
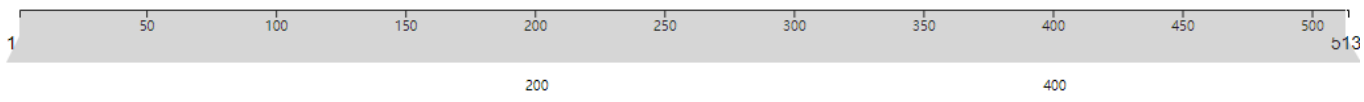
拟南芥根系中AMT1s的分布与功能

# CsAMT1.2特征分析——特异表达



**CsAMT1.2**遵循根特异性表达模式，在短时间内（2 h，6 h）可以被N供应极大地诱导

# CsAMT1.2结构预测——疏水性与跨膜预测



铵转运体结构域，11个跨膜螺旋，  
C端1个无序区，易改变构象

# CsAMT1.2结构预测——三维结构预测Phyre2



Model (left) based on template [c5aezA](#)

### Top template information

**PDB header:**membrane protein  
**Chain:** A: **PDB Molecule:**mep2;  
**PDBTitle:** crystal structure of candida albicans mep2

### Confidence and coverage

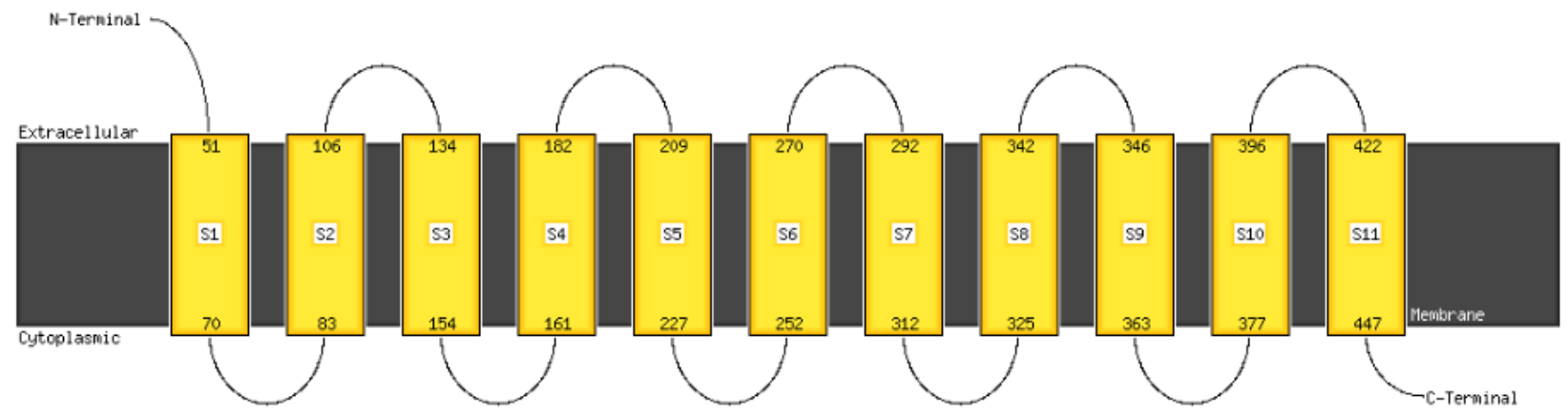
Confidence: **100.0%** Coverage: **87%**

445 residues ( 87% of your sequence) have been modelled with 100.0% confidence by the single highest scoring template.

### 3D viewing

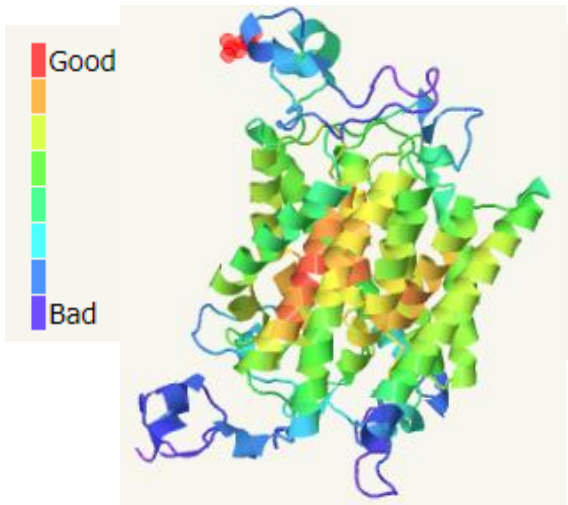
[Interactive 3D view in JSmol](#)

For other options to view your downloaded structure offline see the [FAQ](#)

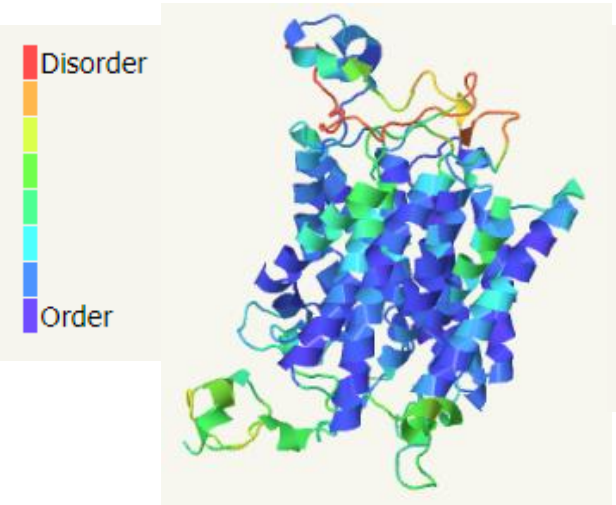


# CsAMT1.2结构预测——三维结构预测Phyre2

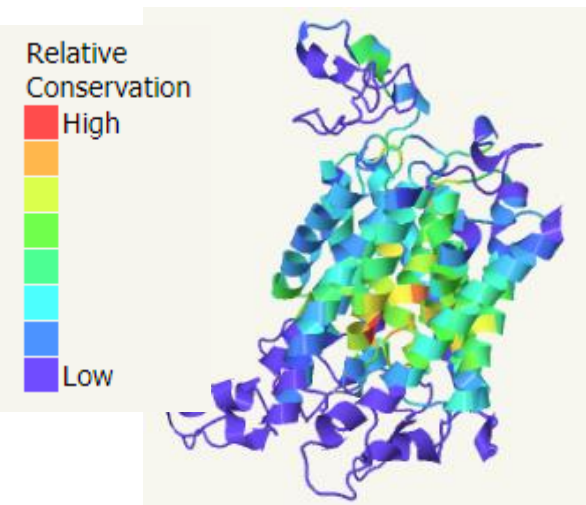
预测质量



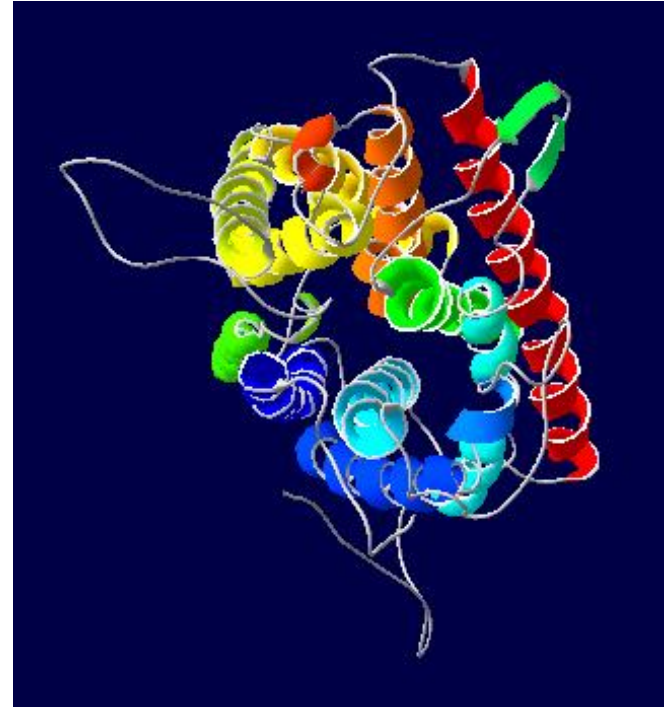
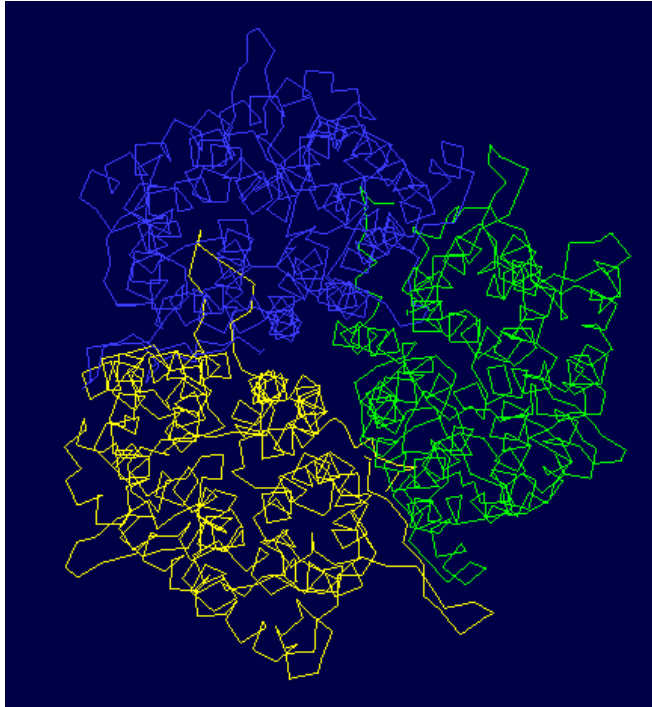
无序区域



突变敏感性

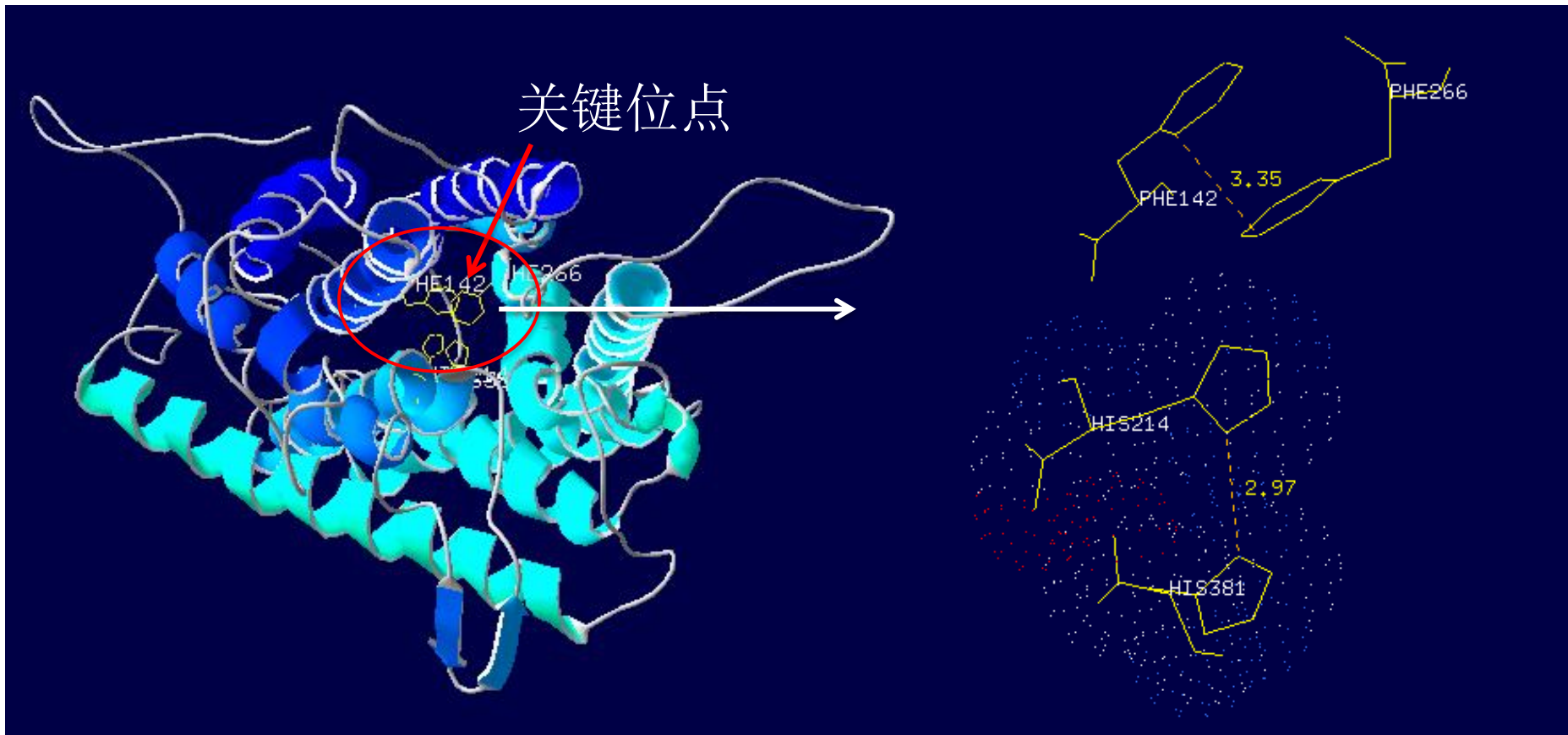


# CsAMT1.2结构预测——三维结构预测Phyre2



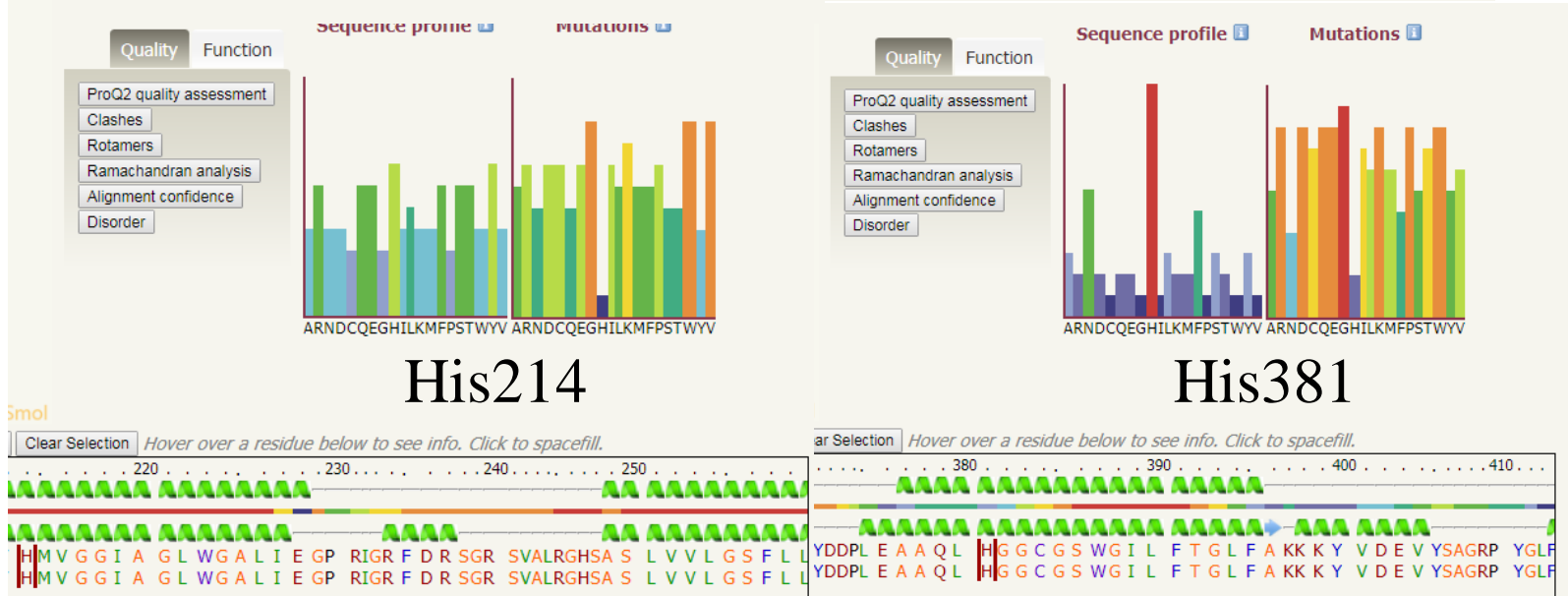
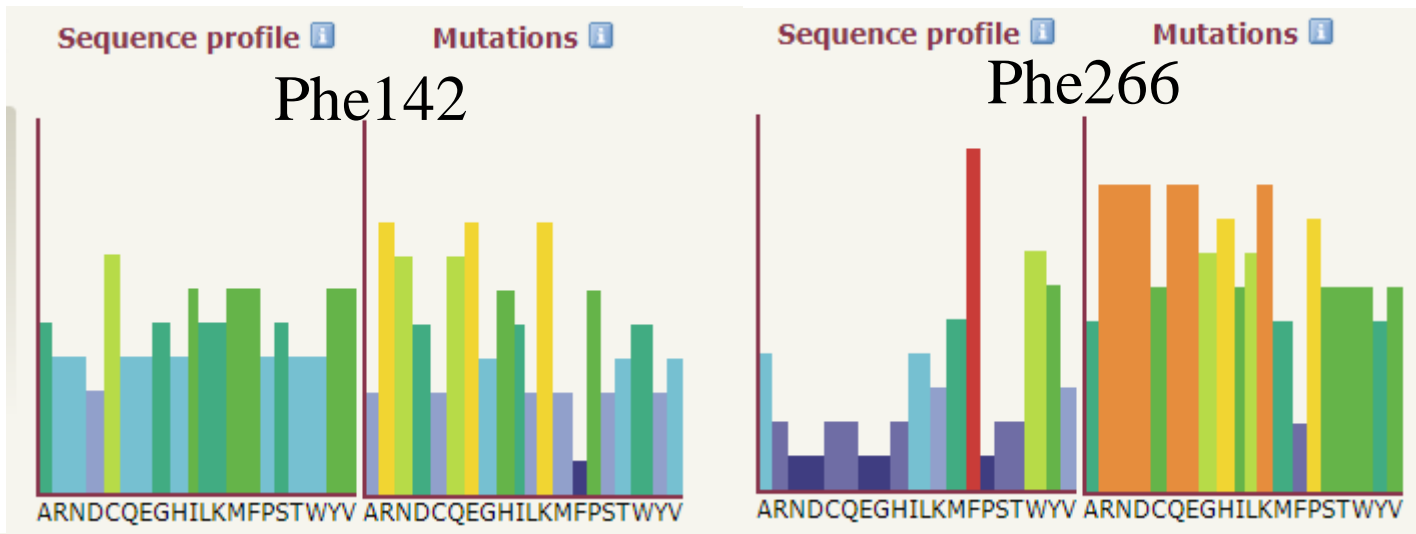
- 3个亚基
- 11个跨膜螺旋
- TM4 和TM5之间有2个beta折叠

# CsAMT1.2结构预测——结构关键位点



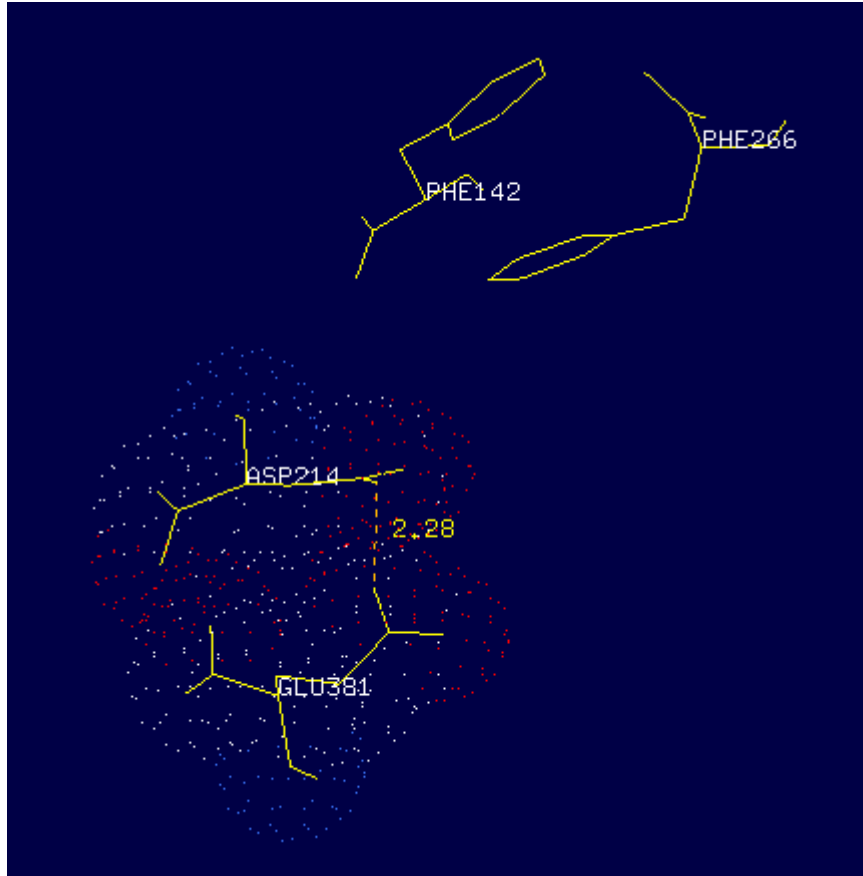
- 找到了关键位点：1对苯丙氨酸门控Phe142和Phe266，1对组氨酸His214和His381（咪唑环带极性正电荷，可以传递质子）

# CsAMT1.2结构预测——位点保守性和突变敏感性





# CsAMT1.2结构预测——关键位点突变模拟



His214→D (Asp)

His381→E (Glu)

间隙变小，不易变构

极性负电荷，不能传递质子

# 结论

- CsAMT1.2在根中特异表达，属于高亲和力铵转运系统，被氮素供应诱导
- CsAMT1.2蛋白嵌入细胞质膜上，有3个亚基，每个亚基由11个跨膜螺旋构成，Phe142和Phe266以及His214和His381是关键位点，但运输机理尚不明确

# 参考文献

- [1] Benjamin Neuhäuser, Marek Dynowski & Uwe Ludewig. Switching substrate specificity of AMT/MEP/ Rh proteins. *Channels*, 2014, 8:6, 496-502. DOI:10.4161/19336950.2014.967618.
- [2] Fen Zhang, Liyuan Wang, Peixian Bai, et al. Identification of regulatory networks and hub genes controlling nitrogen uptake in tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (8), 2445-2456. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b06427.
- [3] Fen Zhang, Yuan Liu, Liyuan Wang, et al. Molecular cloning and expression analysis of ammonium transporters in tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] under different nitrogen treatments. *Gene*, 658:136-145. Doi: 10.1016/j.gene.2018.03.024.
- [4] Lixing Yuan, Dominique Loqué, Soichi Kojima, et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of amt1-type transporters. *The Plant Cell*, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052134>.
- [5] Susana L. A. Andrade & Oliver Einsle. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins (Review). *Molecular Membrane Biology*, 2007, 24(5-6): 357-365.
- [6] Wei Li, Fen Xiang, Micai Zhong, et al. Transcriptome and metabolite analysis identifies nitrogen utilization genes in tea plant (*Camellia sinensis*). *Scientific Reports*, 2017, 7: 1693. DOI: 10.1038/s41598-017-01949-0.

# 小组成员照片



从左到右：齐丹、张永利、黄慧、李延璨

Thank you for your attention

