

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）

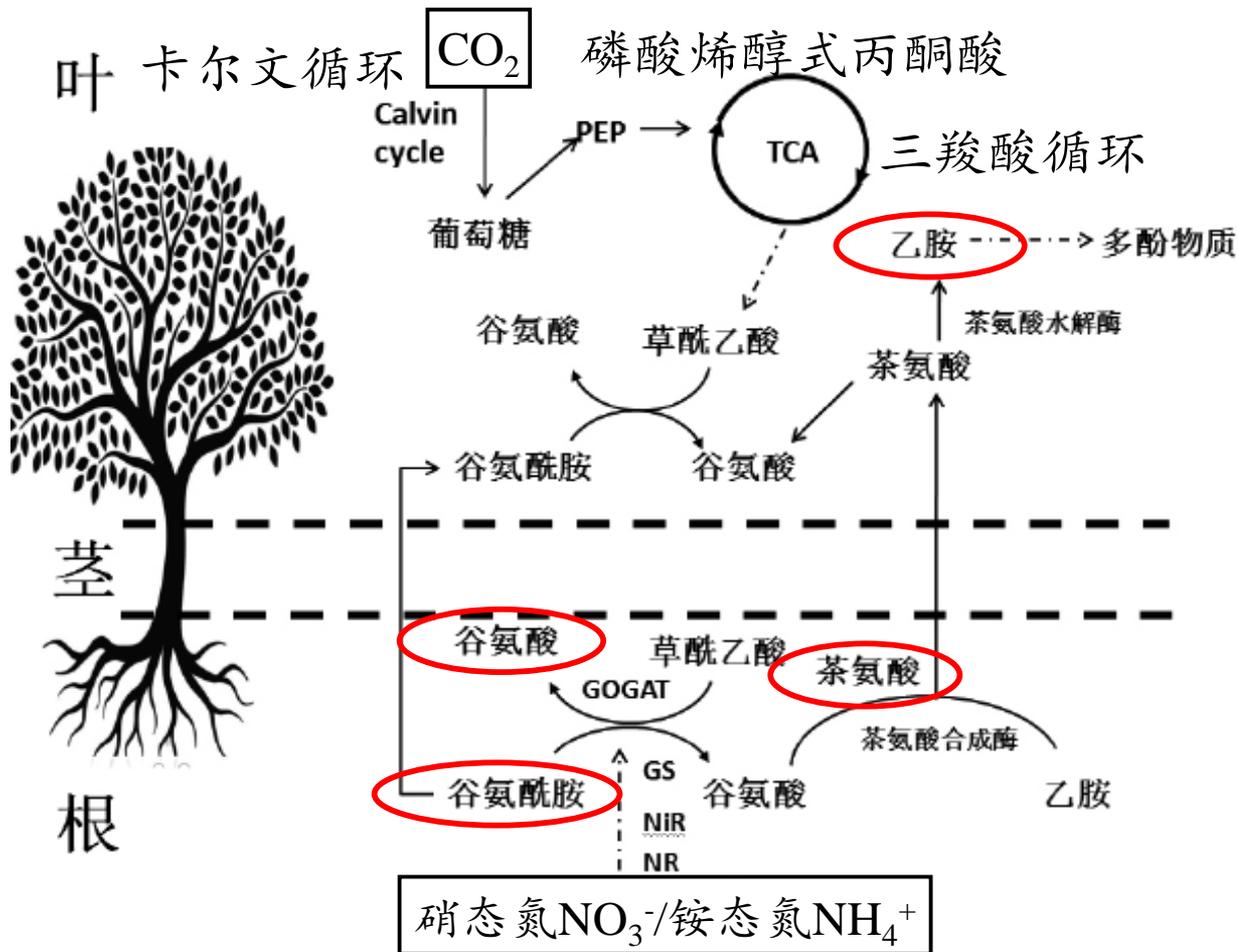
小组成员

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

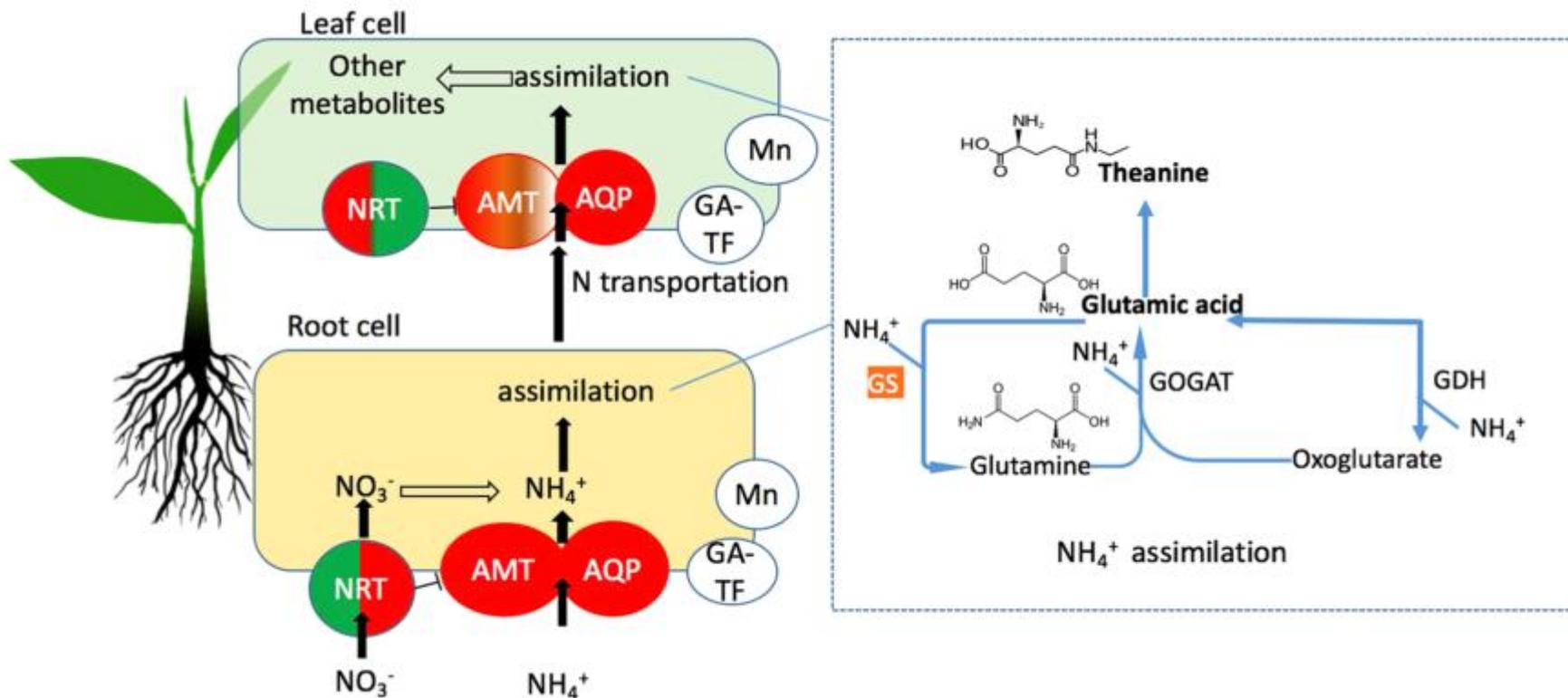
氮素吸收方式：根系吸收为主

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 NH_4^+ -N以铵转运蛋白介导为主



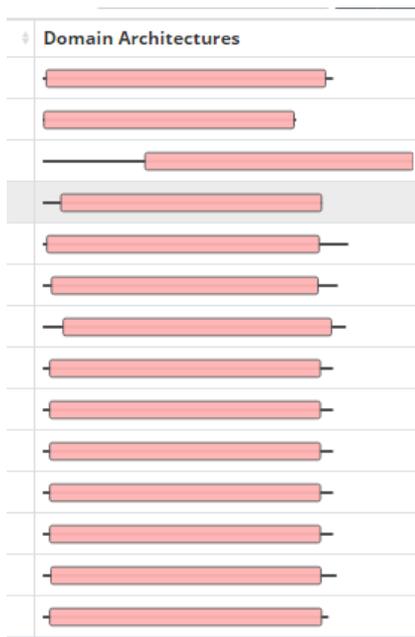
AMT铵转运蛋白 (Ammonium transporter)

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

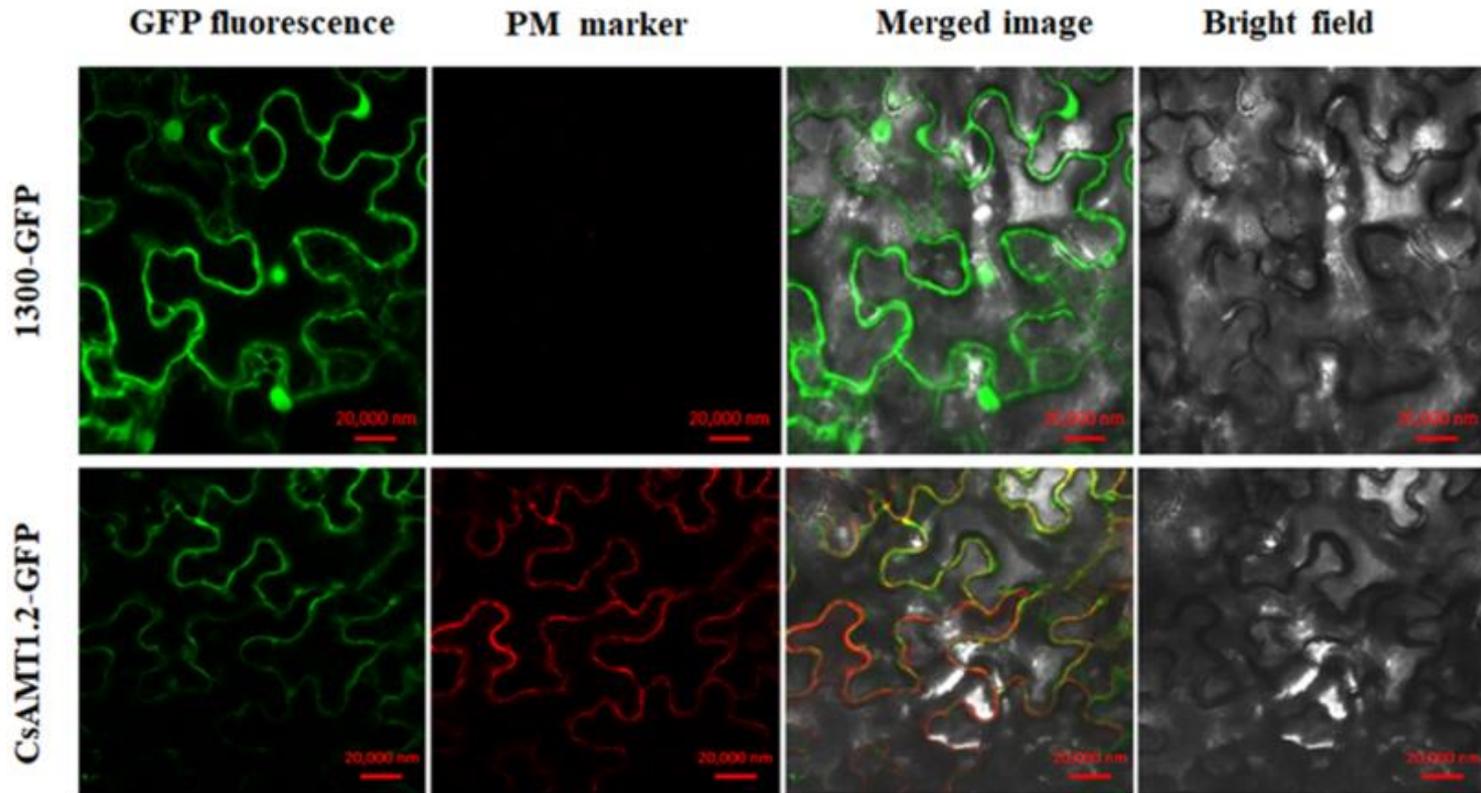


- 结构域非常保守，序列保守，同源三聚体，400-500个氨基酸的疏水蛋白，11~12个假定跨膜区域
- 拟南芥AMT家族成员：AtAMT1.1-5和AtAMT2
- 茶树AMT家族成员：CsAMT1.1-4和CsAMT3.1

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

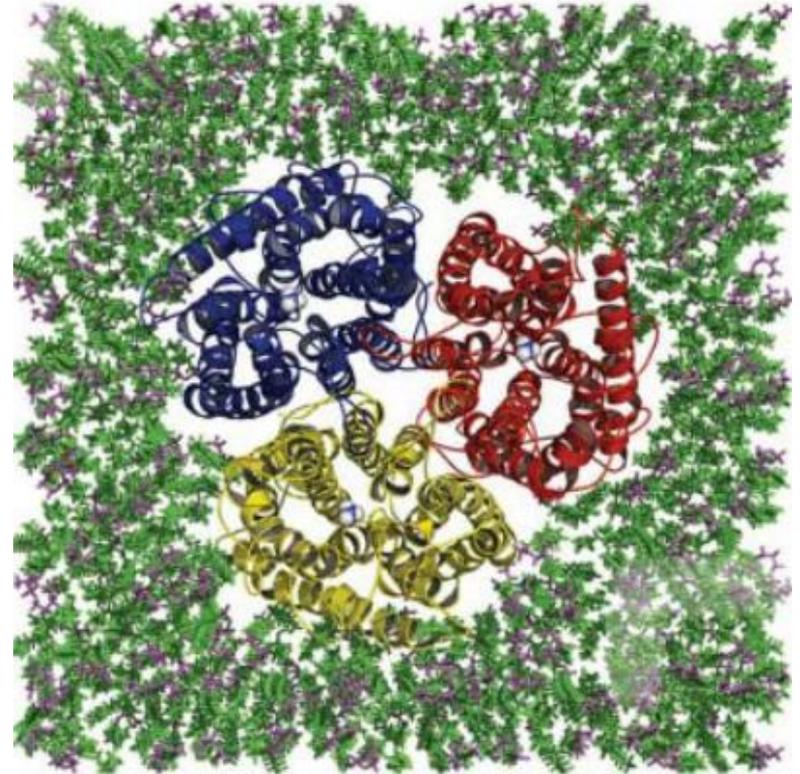
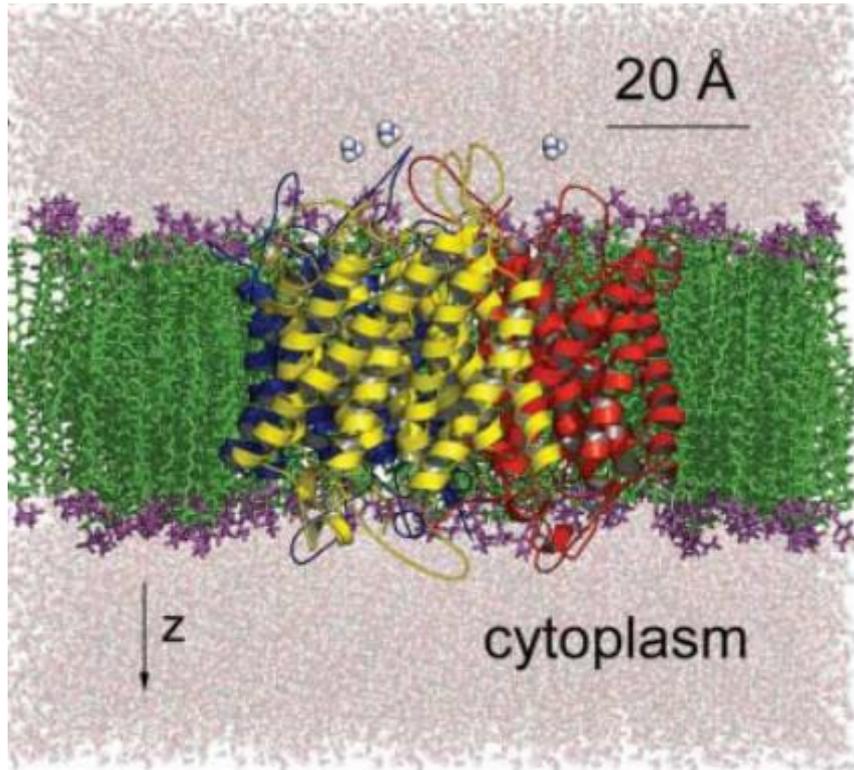
研究背景——CsAMT1.2亚细胞定位

CsAMT1.2 is targeted to the plasma membrane

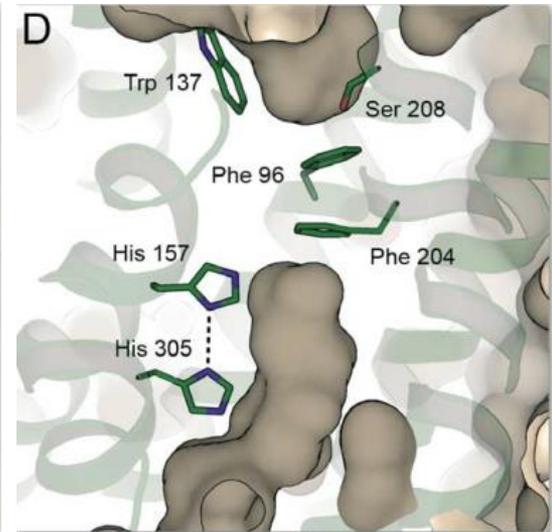
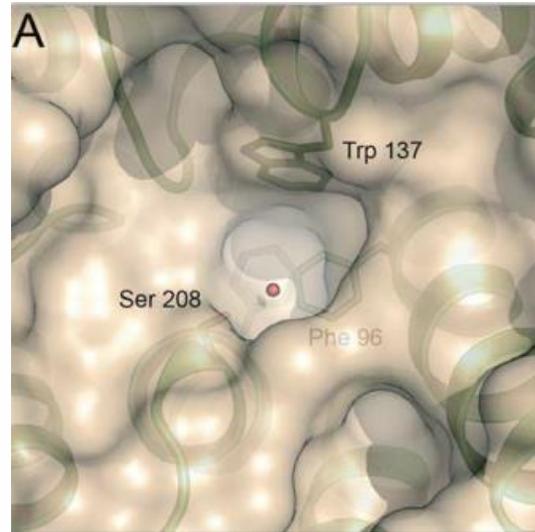
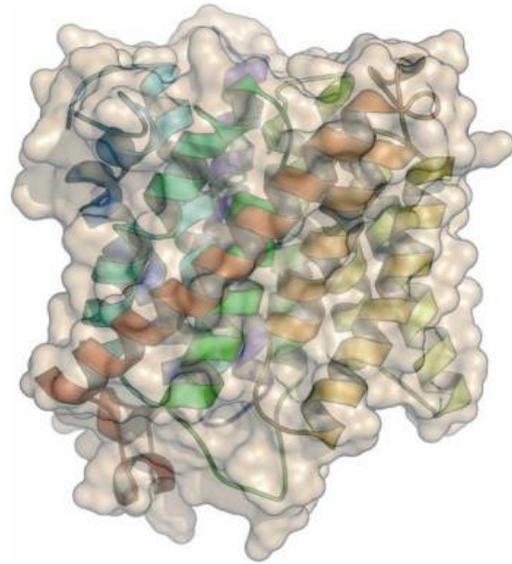


Zhang *et al.* Identification of regulatory networks and hub genes controlling nitrogen uptake in tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *J. Agric. Food Chem.*, 2020

研究背景——AMT在质膜上的分布

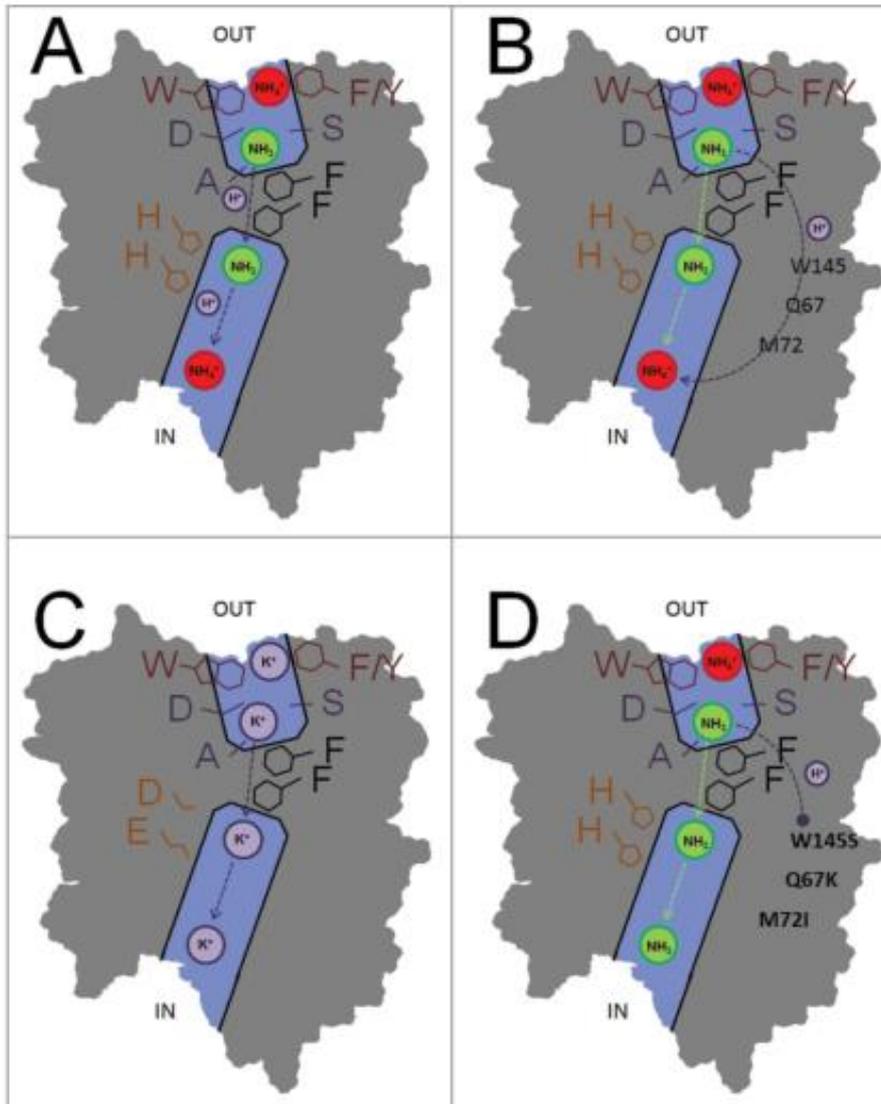


研究背景——AMT1结构特征与运输机理



- 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 γ 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：NH₃与H⁺共运输

B. 野生电流型：NH₃运输，伴随H⁺传递（未知）

C. Ec AmtB一对组氨酸突变导致K⁺运输

D. AtAMT1;2亚基界面突变导致NH₃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

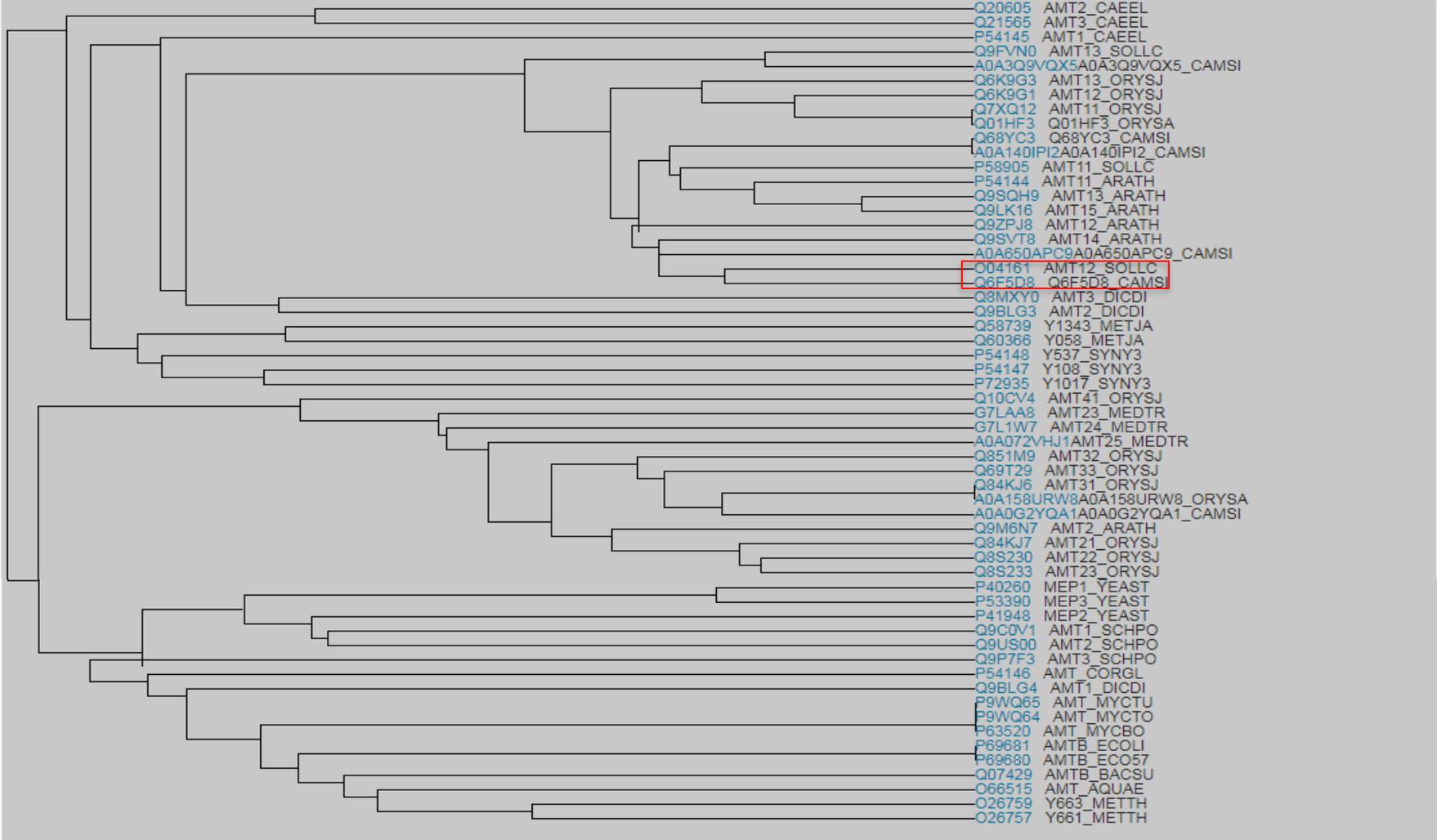
S Ser丝氨酸

H His组氨酸

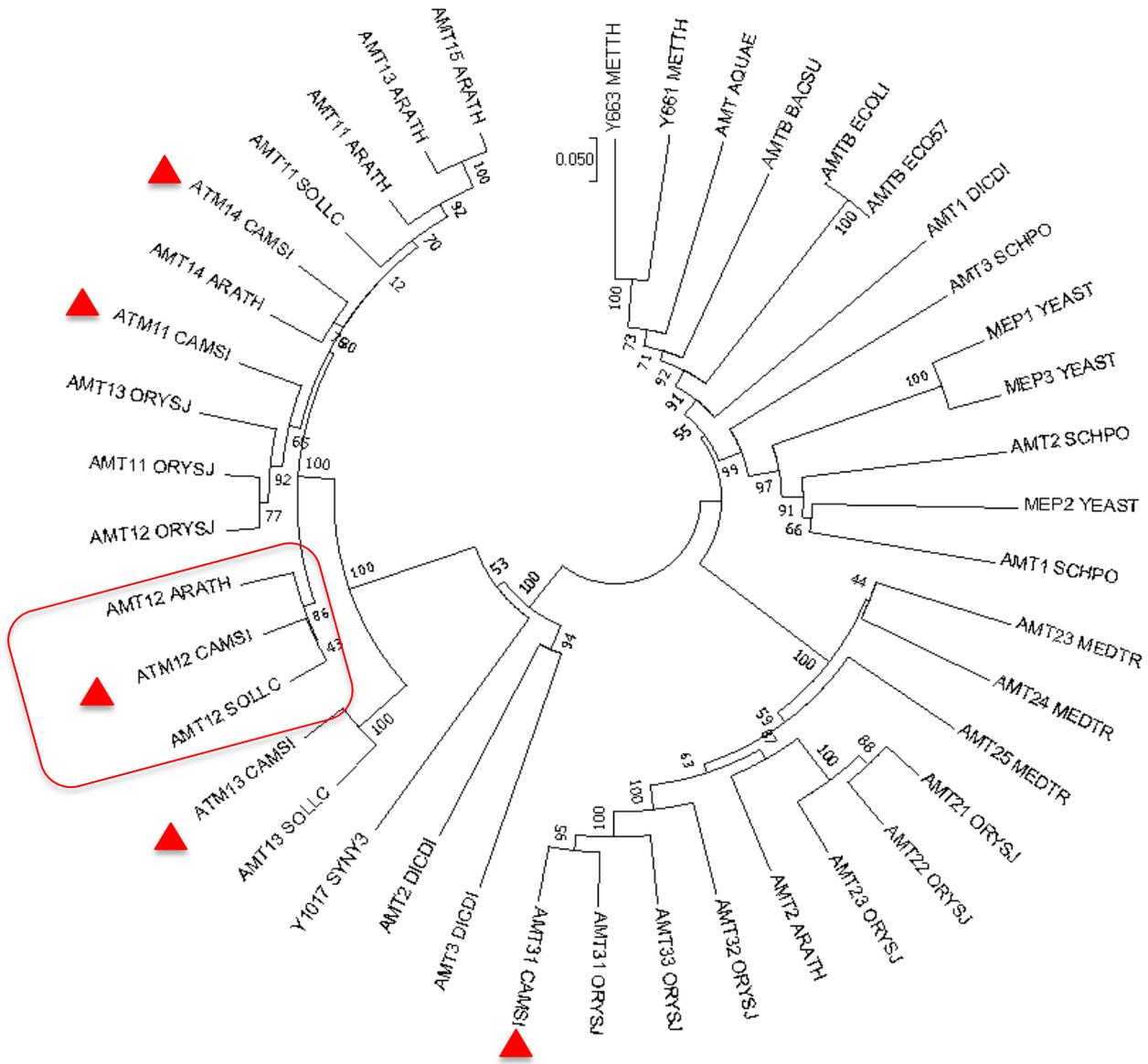
研究背景——研究目的

- 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



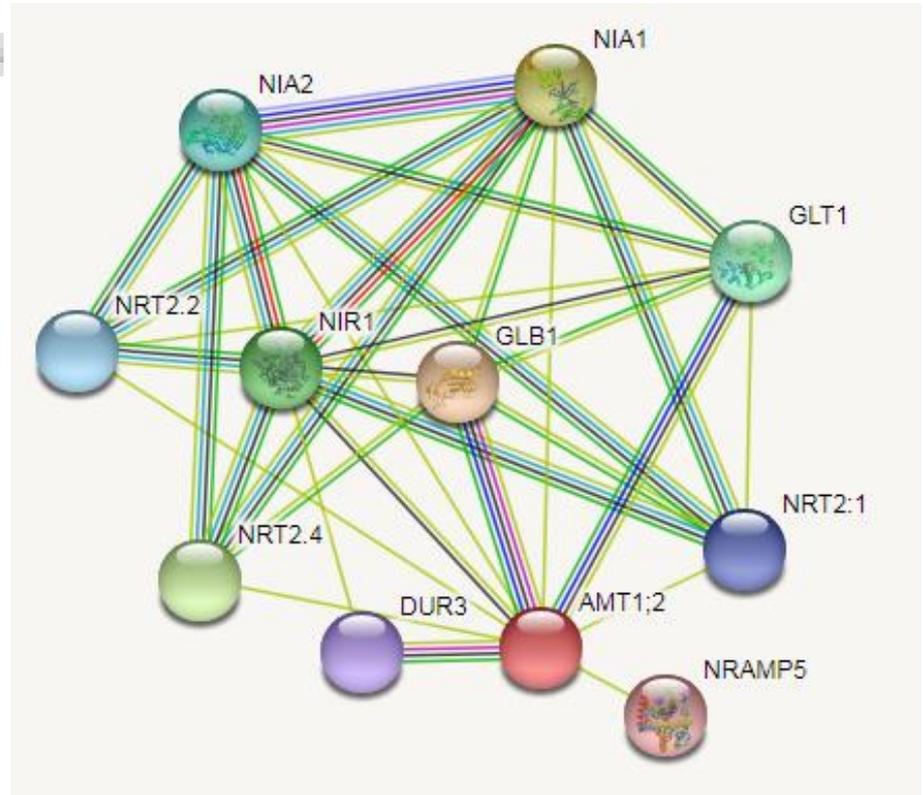
CsAMT1.2特征分析——系统发育树



CsAMT1.2特征分析——AtAMT1.2结构域及蛋白相互作用

Ammonium_transp

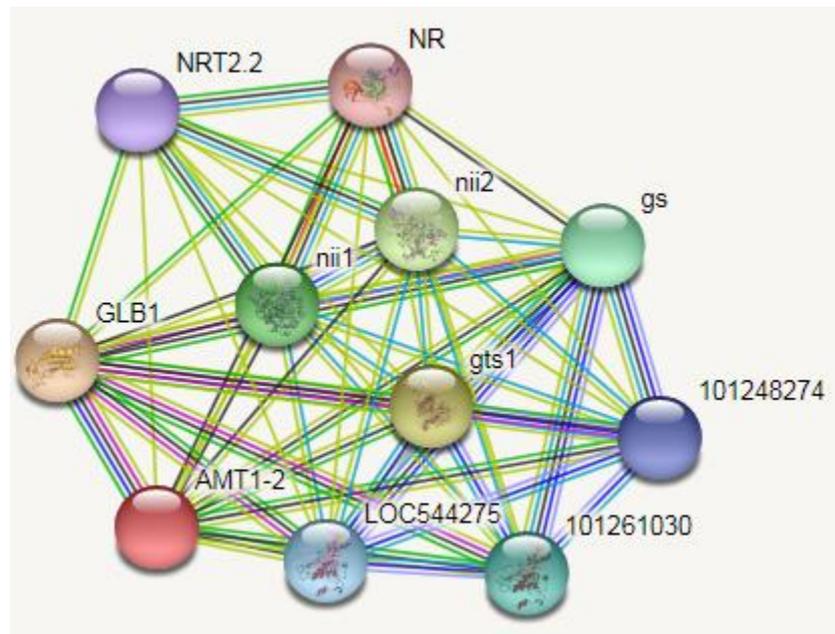
Source	Domain	Start	End
sig_p	n/a	1	30
low_complexity	n/a	8	34
Pfam	Ammonium_transp	53	479
transmembrane	n/a	54	75
transmembrane	n/a	87	110
transmembrane	n/a	140	159
low_complexity	n/a	145	159
transmembrane	n/a	166	188
transmembrane	n/a	208	232
transmembrane	n/a	253	271
transmembrane	n/a	351	371
transmembrane	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 ⁱ	51 – 74	Helical UniRule annotation	Add BLAST		24
Transmembrane ⁱ	86 – 106	Helical UniRule annotation	Add BLAST		21
Transmembrane ⁱ	135 – 154	Helical UniRule annotation	Add BLAST		20
Transmembrane ⁱ	161 – 183	Helical UniRule annotation	Add BLAST		23
Transmembrane ⁱ	203 – 227	Helical UniRule annotation	Add BLAST		25
Transmembrane ⁱ	248 – 266	Helical UniRule annotation	Add BLAST		19
Transmembrane ⁱ	422 – 447	Helical UniRule annotation	Add BLAST		26

Keywords - Cellular componentⁱ

Membrane

跨膜螺旋7个还是11个?

Family & Domainsⁱ

Domains and Repeats

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Domain ⁱ	51 – 474	Ammonium_transp InterPro annotation	Add BLAST		424

Region

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Region ⁱ	491 – 513	Disordered Sequence analysis	Add BLAST		23

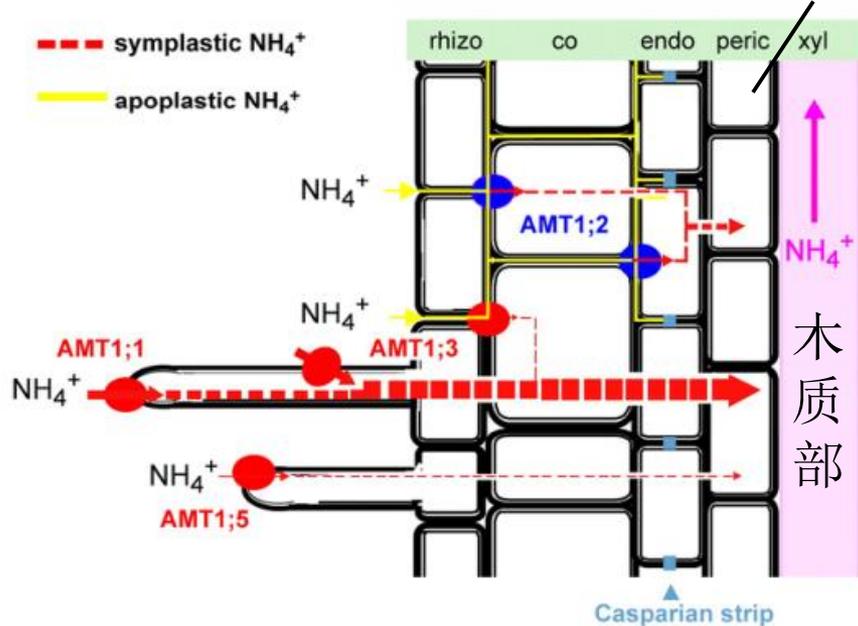
Compositional bias

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Compositional bias ⁱ	494 – 513	Polar Sequence analysis	Add BLAST		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

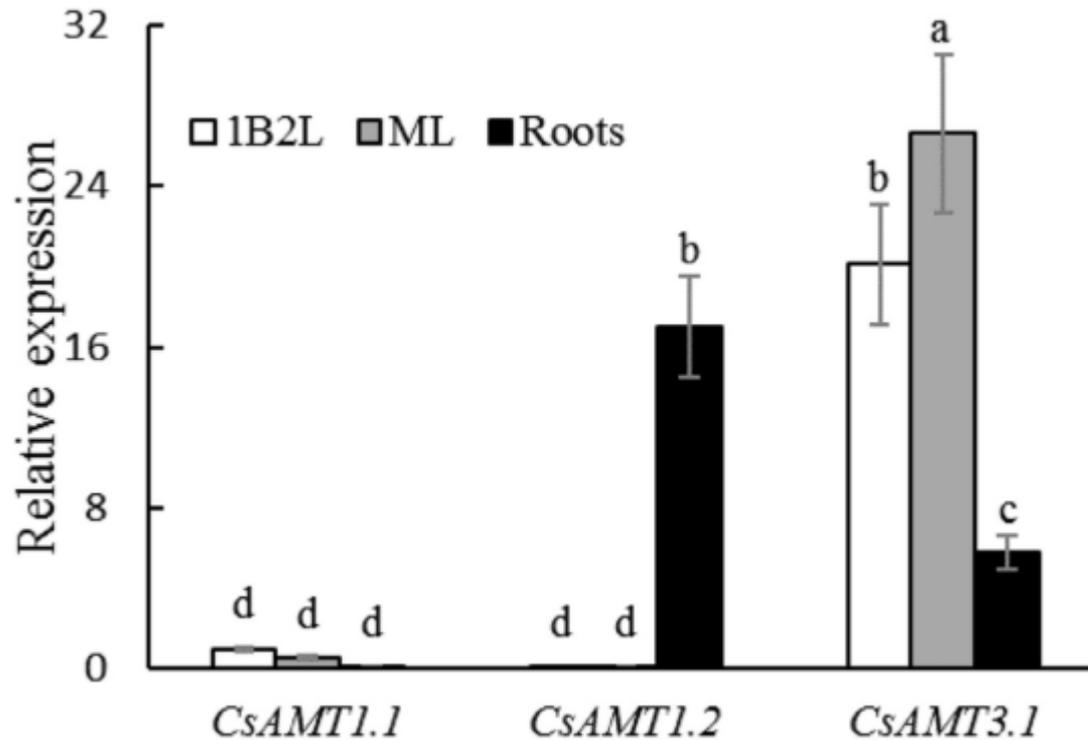
表皮 皮层 内皮层 中柱鞘



- 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

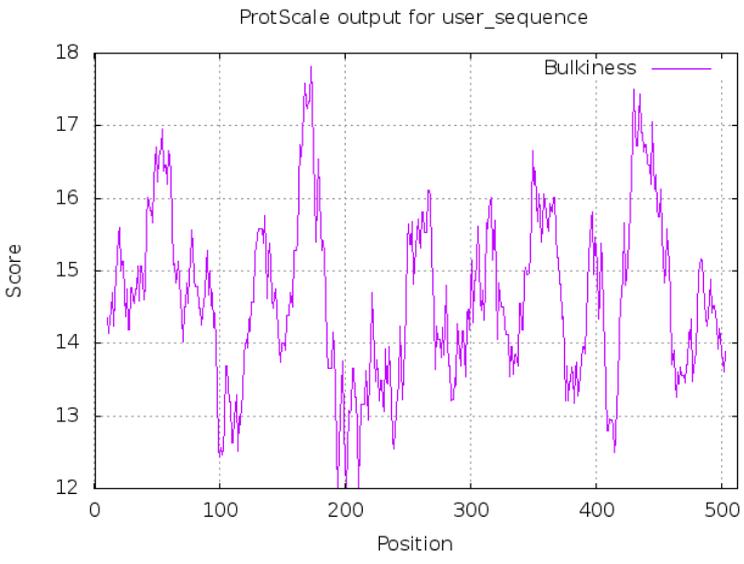
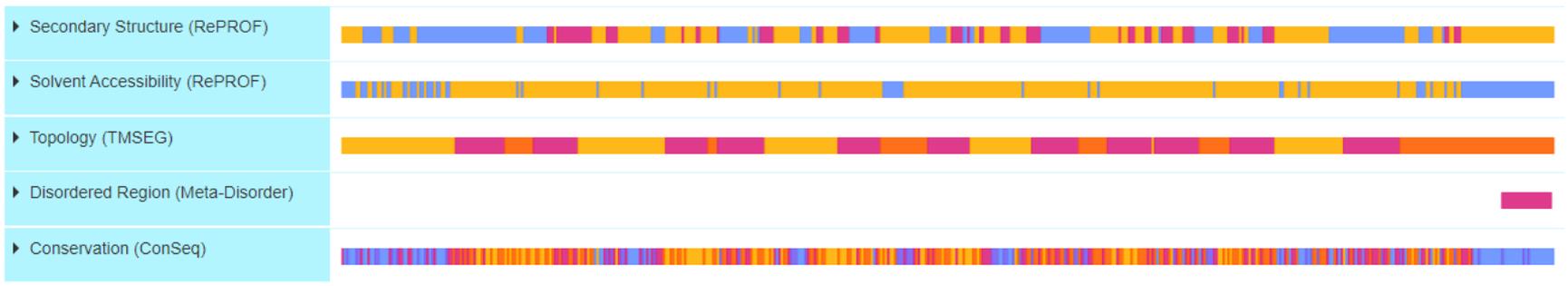
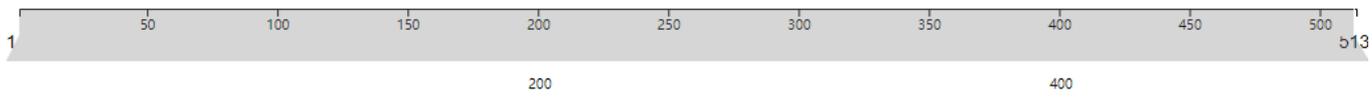
拟南芥根系中AMT1s的分布与功能

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

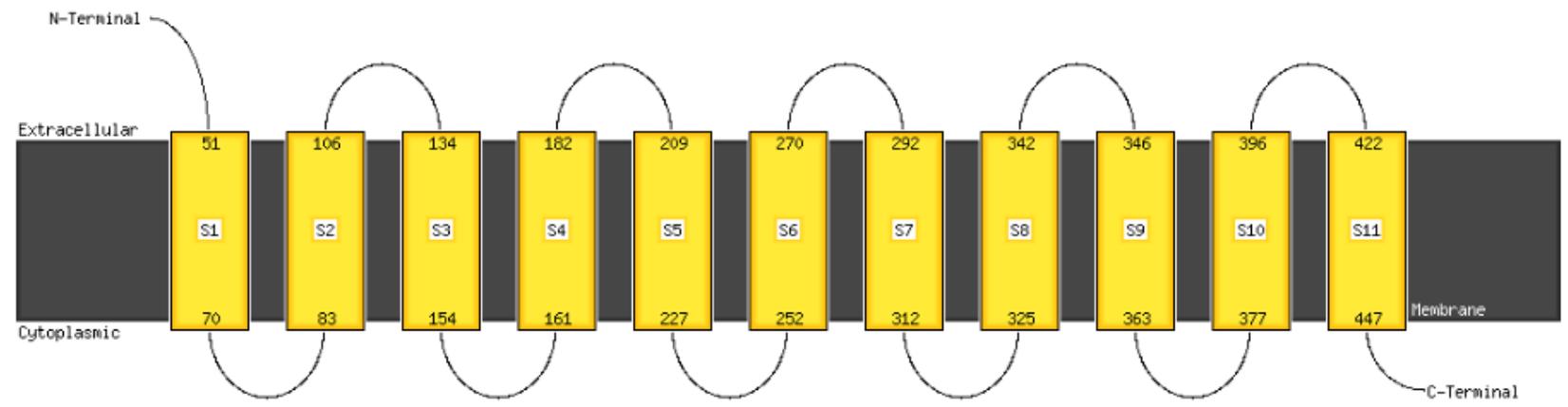
Confidence: **100.0%** Coverage: **87%**

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

3D viewing

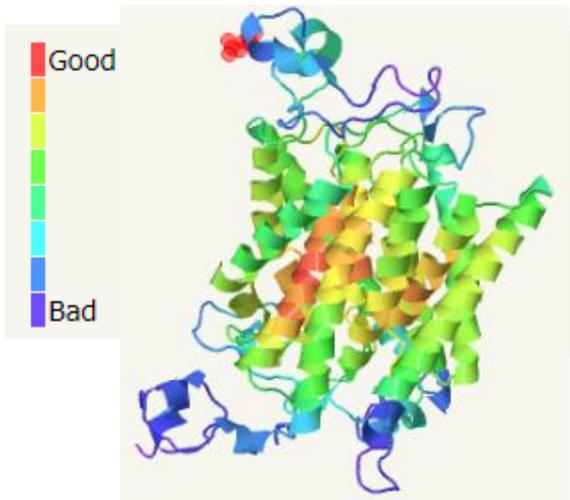
[Interactive 3D view in JSmol](#)

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

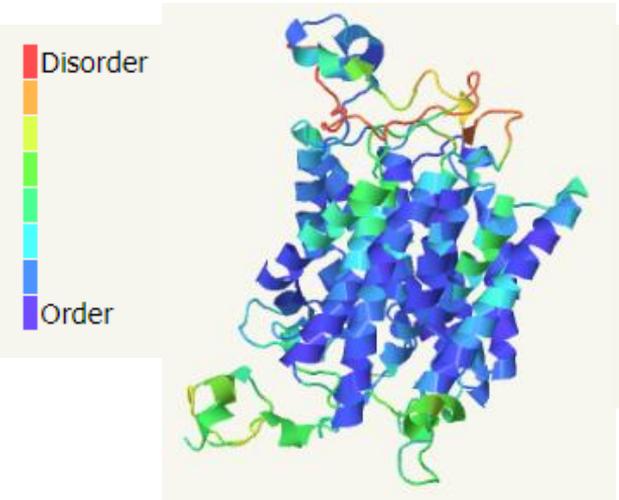


CsAMT1.2结构预测——三维结构预测Phyre2

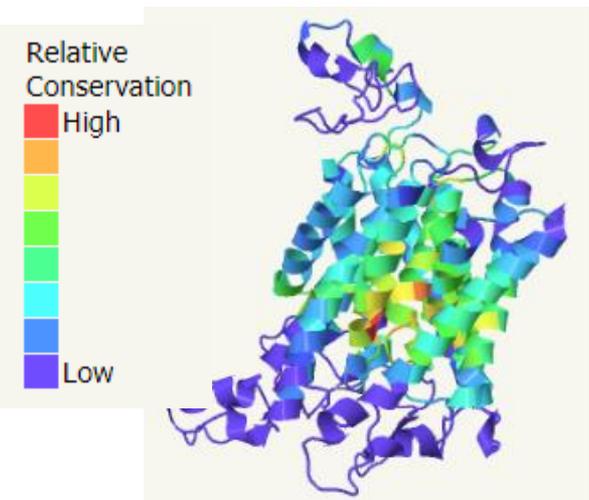
预测质量



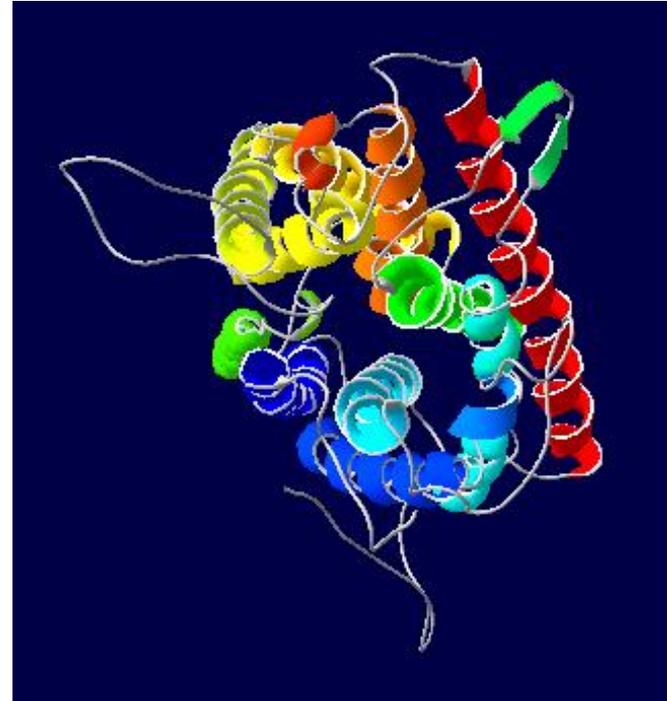
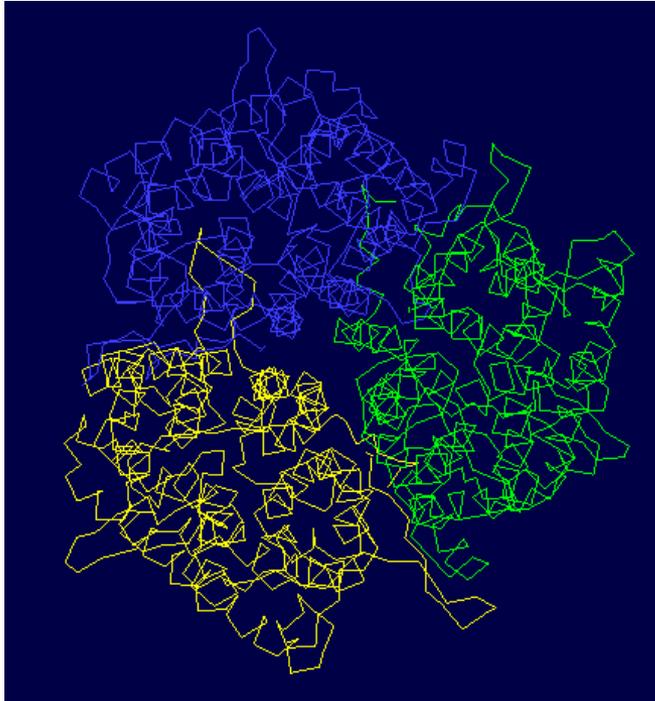
无序区域



突变敏感性

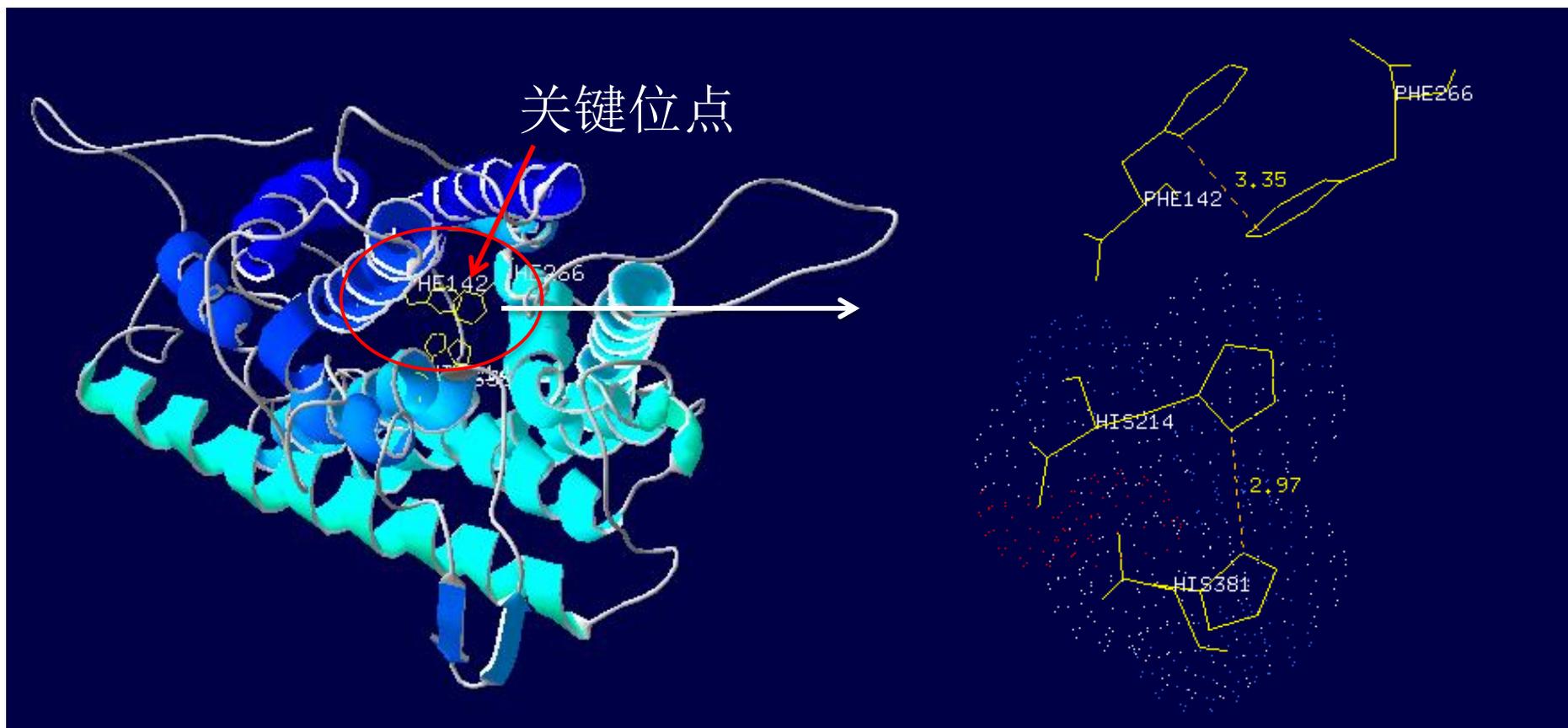


CsAMT1.2结构预测——三维结构预测Phyre2



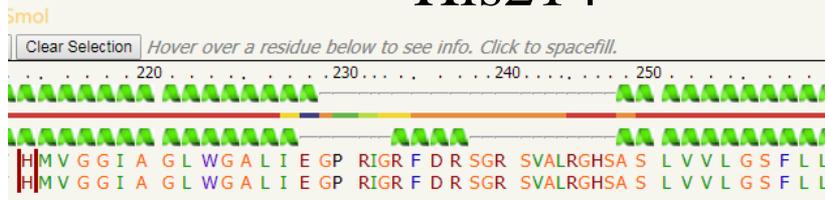
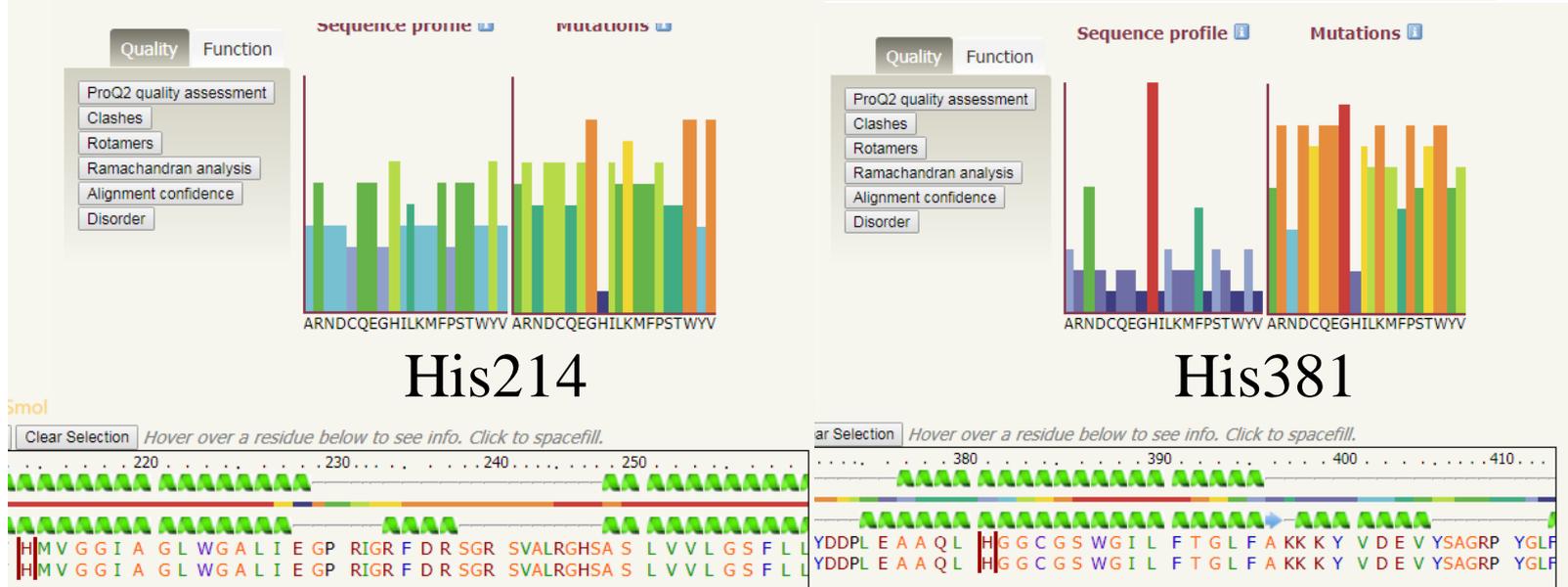
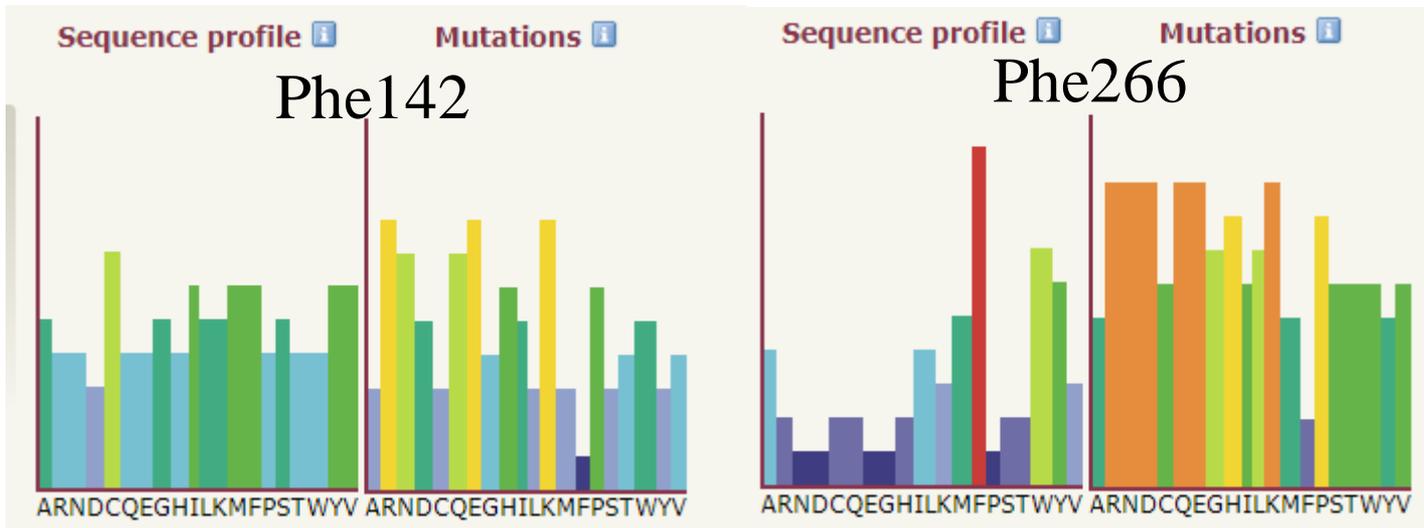
- 3个亚基
- 11个跨膜螺旋
- TM4 和TM5之间有2个beta折叠

CsAMT1.2结构预测——结构关键位点

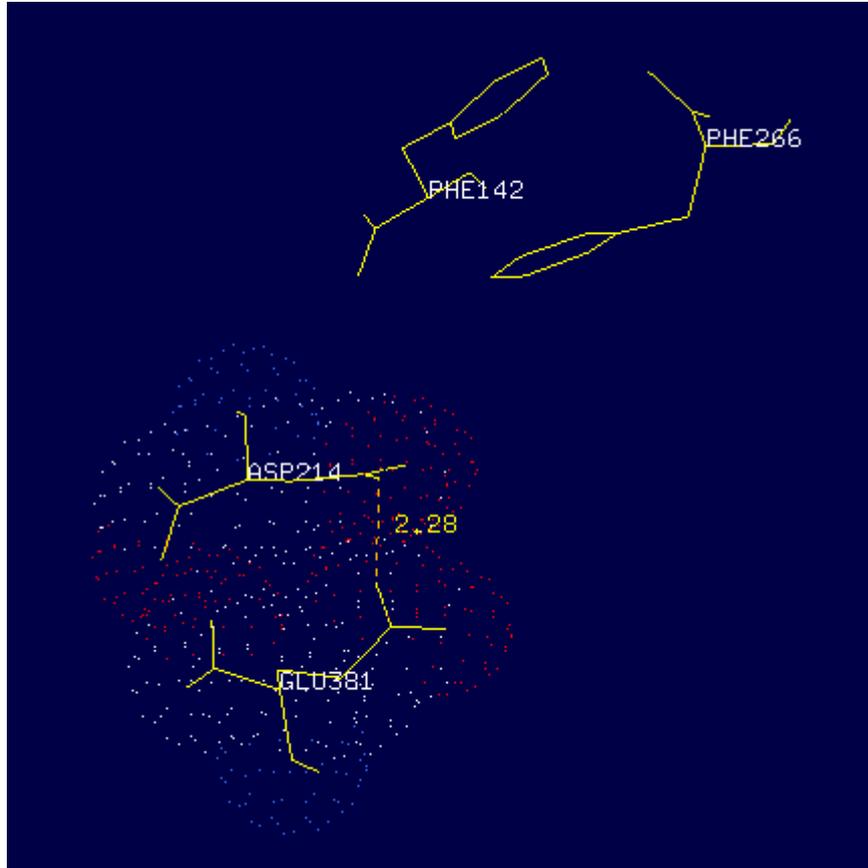


- 找到了关键位点：1对苯丙氨酸门控Phe142和Phe266，1对组氨酸His214和His381（咪唑环带极性正电荷，可以传递质子）

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

