

· 专题论坛 ·

拟南芥无机氮素转运蛋白及其磷酸化调控研究进展

张曦, 林金星, 单晓昝*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

摘要 氮元素是植物必需的营养元素之一, 氮素供需失衡会严重影响植物的生长发育。无机氮(硝酸根 NO_3^- 和铵根 NH_4^+)是植物体内氮素的主要来源, 对其有效吸收和利用依赖于多种类型转运蛋白的协同作用。其中, 部分无机氮素转运蛋白的活性受到可逆磷酸化作用的精准调控。该文将对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中硝酸根和铵根转运蛋白的分类、结构、定位和功能特点等进行总结, 并重点对可逆磷酸化调控转运蛋白的分子机制加以阐述。

关键词 氮素, 硝酸根, 铵根, 转运蛋白, 磷酸化

张曦, 林金星, 单晓昝 (2016). 拟南芥无机氮素转运蛋白及其磷酸化调控机制研究进展. 植物学报 51, 120–129.

化学元素氮(N)在自然界中广泛存在, 是植物生长发育必需的大量元素之一(Lawlor et al., 2001)。氮元素不但是蛋白质、核酸及磷脂等生物大分子的组成成分, 也是辅酶、辅基、叶绿素和植物激素等植物生长发育重要成分的构成组分(Evans, 1989)。氮素缺乏会导致植物细胞中重要物质的合成受阻、功能蛋白活性降低以及生长分裂速率减缓, 进而抑制营养生长和生殖生长(Mei and Thimann, 1984)。反之, 氮元素供应过多, 会导致植物营养生长过于旺盛, 从而使其体内光合产物消耗过多、茎秆柔弱易倒伏以及生殖生长受到抑制(Lea and Azevedo, 2006)。

可供植物吸收的氮素在土壤中主要以无机氮和有机氮的形式存在。无机氮源包括硝酸根(NO_3^-)和铵根(NH_4^+)两类, 为植物主要吸收利用的氮素(Mifflin and Lea, 1976)。有机氮是与碳元素结合的有机含氮化合物的总称, 包括氨基酸、硝基化合物、胺和酰胺等(Näsholm et al., 1998)。虽然有机氮是土壤氮素的主要组成成分, 但是植物对其吸收利用效率较低(Chadwick et al., 2000)。为了补充土壤中氮素的不足, 保证作物的良好生长, 在农业生产实践中一般会施以多种氮肥(如铵态氮肥、硝态氮肥和酰胺态氮肥等)。与农业相关的氮肥使用, 是自然界中能源消耗最多的过程之一(Robertson and Vitousek, 2009)。可被农作物利用的氮肥只有30%–50%, 剩下的氮肥则以

硝酸根的形式渗透入地下水或者以氮氧化合物(N_xO_y)以及氨(NH_3)的形式进入大气(Nacry et al., 2013)。氮肥的流失不仅影响农产品的数量和质量, 造成经济和资源的损失, 而且会对土壤、水体和大气等造成污染(Sekhon, 1995)。

自然环境中, 各种氮素和生产实践中的各种氮肥主要通过各类氮素转运蛋白吸收并运输至植物体不同组织器官和细胞部位(Lawlor et al., 2001)。对这些转运蛋白的表达调控及功能鉴定等方面进行深入研究, 不但有助于加深对植物氮素吸收分子机制的理解, 而且将为提高氮肥利用效率、减少氮肥施用量及防止过量氮肥危害环境提供理论依据。本文将对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中硝酸根和铵根转运蛋白的分类、结构、定位和功能特点等进行概述, 并重点对部分硝酸根和铵根转运蛋白的磷酸化调控机制研究进展进行总结。

1 拟南芥硝酸根和铵根转运蛋白

1.1 拟南芥硝酸根转运蛋白

硝酸根是指硝酸盐中的阴离子, 空间结构呈平面正三角形, 不仅为植物生长发育提供必需的营养物质, 而且可作为信号分子, 调节种子萌发、叶片伸展和侧根生长等多个发育过程(Krapp et al., 2014)。在自然生

收稿日期: 2014-12-30; 接受日期: 2015-05-11

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(No.BX2012038)和国家自然科学基金(No.31400221)

* 通讯作者。E-mail: shanxy@bjfu.edu.cn

态环境中, 硝态氮含量比铵态氮含量高10到1 000倍, 是大多数植物最优先利用的氮源(von Wittgenstein et al., 2014)。土壤中硝酸根浓度随着不同地理位置和季节等的变化呈现宽幅波动(Crawford, 1995)。因此, 植物在漫长的进化过程中形成了一系列吸收转运系统, 以应对外界环境中硝酸根浓度的变化。根据结构、定位和功能的不同, 拟南芥体内的硝酸根转运蛋白可分为NRT (nitrate transporter)、CLC (chloride channel) 和 SLAC1/SLAH (slow anion channel-associated 1/slow anion channel homologues)三大类型(Krapp et al., 2014) (表1)。

NRT类转运蛋白主要在根系对硝酸根的摄取、硝酸根在根和茎中的长距离运输以及硝酸根再分配等过程中发挥作用。NRT类蛋白对硝酸根离子的转运是一个质子偶联($2H^+/1NO_3^-$)的协同转运过程, 转运的能量来自跨膜的质子电化学势梯度(Glass et al., 1992)。根据动力学特征的不同, NRT类蛋白介导的硝酸根转运可分为低亲和性转运系统(low-affinity nitrate transport system, LATS)和高亲和性转运系统(high-affinity nitrate transport system, HATS)两类: 当环境中硝酸根离子浓度较高时($>0.5 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), LATS发挥主要作用; 当环境中硝酸根离子浓度较低时($<0.5 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), HATS的作用更为显著(Liu et al., 1999)。相应地, NRT类转运蛋白包括低亲和硝酸根转运蛋白NRT1和高亲和硝酸根转运蛋白NRT2两个亚家族, 分别在LATS和HATS过程中执行重要功能(Crawford, 1995; Liu et al., 1999; Liu and Tsay, 2003; Li et al., 2007)。NRT1类转运蛋白属于小肽转运体(peptide transporters, PTR)家族, 一般含有450–600个氨基酸残基, 包括12个跨膜区, 第6、7跨膜区之间由一个大的亲水环相连(Tsay et al., 1993, 2007)。NRT2类转运蛋白属于硝酸盐-亚硝酸盐转运体(nitrate-nitrite-transporter, NNP)家族, 一般含有500–600个氨基酸残基, 少数包括6个跨膜区, 多数具有12个跨膜区, 平均分为2组, 中间由大的亲水环连接(Forde, 2000; Filleur et al., 2001)。多数NRT1类转运蛋白具有底物多样性的特点, 除了转运硝酸根, 还可转运氨基酸、多肽、芥子油苷和植物激素等多种生物分子; 而NRT2类转运蛋白一般只特异性地转运硝酸根。与NRT1类转运蛋白不同, 在衣藻属和大多数高等植物中, NRT2类转运蛋白需要与另一种膜蛋白

NAR2 (nitrate assimilation related 2)交互才得以表现出硝酸根转运活性(Okamoto et al., 2006)。目前, 拟南芥基因组中有53个NRT1亚家族成员和7个NRT2亚家族成员。其中, 16个NRT1类转运蛋白和所有NRT2类转运蛋白具有硝酸根转运能力。

2个NRT1类转运蛋白(NRT1.1和NRT1.2)和3个NRT2类转运蛋白(NRT2.1、NRT2.2和NRT2.4)定位于根表皮、皮层或内皮层细胞质膜, 负责从外界吸收硝酸根(Tsay et al., 1993; Huang et al., 1999; Filleur et al., 2001; Kiba et al., 2012)。其中, NRT1.1为双亲和性蛋白, 在LATS和HATS过程中均发挥作用(Liu et al., 1999)。而NRT1类转运蛋白NAXT1 (nitrate excretion transporter 1)可以在酸性pH环境下诱导硝酸根从根部的流出(Segonzac et al., 2007)。根系吸收的硝酸根一部分在根部还原形成多种含氮有机物, 随蒸腾流运输到地上部位, 还有一部分将以硝酸根的形式经木质部直接运送至叶片再被利用。NRT1类转运蛋白NRT1.5定位于原生木质部的中柱鞘细胞质膜, 在硝酸根向木质部转运过程中发挥主要的促进作用(Lin et al., 2008)。最新研究表明, 2个NRT1类转运蛋白(NRT1.1和NRT1.4)也可能在硝酸根由根向茎的转运过程中发挥正调控作用(Léran et al., 2013)。而另外2个NRT1类转运蛋白(NRT1.8和NRT1.9)分别定位于木质部薄壁组织细胞和根部伴胞细胞, 在硝酸根的长距离运输过程中发挥负调控作用(Li et al., 2010; Wang and Tsay, 2011)。被植物吸收利用的硝酸根在植物生长发育的后期可再行运输到幼嫩组织和生殖器官中被重复利用。4个NRT1类转运蛋白(NRT1.6、NRT 1.7、NRT1.11和NRT1.12)和1个NRT2类转运蛋白NRT2.7均在硝酸根再活化过程中发挥重要作用(Wang et al., 2012; Hsu and Tsay, 2013)。

CLC类转运蛋白是一类分布于细胞质膜或细胞器质膜上的能够转运氯离子及其它阴离子的通道蛋白或转运蛋白(Jentsch, 2008)。CLC类蛋白一般由10–12个跨膜结构域和位于胞质内的N端和C端结构域组成, 不同跨膜区之间具有3个高度保守的与阴离子特异性识别相关的氨基酸序列(Jentsch et al., 2002)。拟南芥CLC类转运蛋白包括7个成员(a–g)(Barbier-Brygoo et al., 2011)。其中CLCa定位于液泡膜上, 通过反向协同转运氯离子将硝酸根储存在液泡中; CLCb同样定位于液泡膜上, 以爪蟾卵母细胞为

表1 拟南芥中主要无机氮素转运蛋白的组织定位和功能

Table 1 The location and physiological function of primary nitrogen transporters in *Arabidopsis thaliana*

基因名称	主要组织定位	功能	参考文献
NRT1.1	根表皮、皮层和内皮层细胞、 叶片保卫细胞	双亲和性硝酸根转运和信号感受	Wang et al., 2012
NRT1.2	根表皮细胞	低亲和性硝酸根转运	Wang et al., 2012
NRT1.4	叶柄	调节硝酸根在叶柄和叶片间的分配	Wang et al., 2012
NRT1.6	珠柄	种子发育时的硝酸根供应	Wang et al., 2012
NRT1.7	老叶小叶脉的韧皮部细胞	由老叶到幼叶的硝酸根再分配	Wang et al., 2012
NRT1.8	根木质部薄壁细胞	调节硝酸根从根部到茎部的转运	Wang et al., 2012
NRT1.9	根韧皮部伴胞	调节硝酸根从根部到茎部的转运	Wang et al., 2012
NRT1.11/NRT1.12	成熟叶片主叶脉伴胞	由成熟叶片到幼叶的硝酸根再分配	Hsu and Tsay, 2013
NAXT1	根皮层细胞	硝酸根的外流	Wang et al., 2012
NRT2.1	根表皮和皮层细胞	高亲和性硝酸根转运	Wang et al., 2012
NRT2.2	根部	高亲和性硝酸根转运	Wang et al., 2012
NRT2.4	根表皮细胞	高亲和性硝酸根转运	Wang et al., 2012
NRT2.7	成熟种子	通过转运将硝酸根储存在液泡中	Wang et al., 2012
CLCa/b	叶肉细胞	通过转运将硝酸根储存在液泡中	Wang et al., 2012
SLAC1/SLAH3	保卫细胞	硝酸根的外流	Wang et al., 2012
AMT1;1	根表皮细胞和皮层细胞	铵根离子吸收	Loqué and von Wirén, 2004
AMT1;2	根皮层和内皮层细胞	通过质外体向维管束转运铵根离子	Loqué and von Wirén, 2004
AMT1;3	根表皮细胞和皮层细胞	铵根离子吸收	Loqué and von Wirén, 2004
AMT1;4	花粉	花粉中特异转运铵根离子	Loqué and von Wirén, 2004

研究材料证明,其同样执行 $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ 反向协同运输功能,但在植物体内的作用尚不明晰(von der Fecht-Bartenbach et al., 2010)。

SLAC1/SLAH3类转运蛋白是定位于保卫细胞质膜的慢速阴离子通道,与脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导的气孔关闭密切相关(Barbier-Brygoo et al., 2011)。拟南芥中有5个SLAC1/SLAH3家族成员,分别是SLAC1及SLAH1–SLAH4,均具有10个螺旋结构域(Barbier-Brygoo et al., 2011)。当外界环境引发内源的脱落酸信号后,SLAC1和SLAH3表现出转运活性,介导氯化物和硝酸根的外流,进而诱导气孔关闭(Geiger et al., 2011)。其中,SLAC1对氯化物和硝酸根的渗透性相似,而SLAH3对硝酸根的转运能力更强(Wang et al., 2012)。

1.2 拟南芥铵根转运蛋白

铵根是指氨分子得到一个质子后形成的铵离子,空间结构为正四面体,是植物根系吸收氮素的另一有效形式(Glass et al., 2002)。虽然土壤环境中的硝态氮含量相对于铵态氮要高许多,但小叶杨(*Populus simonii*)、梨树(*Pyrus spp.*)和某些针叶树种等一部分植

物仍优先选择吸收耗能较少的铵态氮(Gazzarrini et al., 1999)。此外,相比干旱的土壤,铵态氮是水淹环境中氮元素的主要存在形式。除水稻(*Oryza sativa*)外,绝大多数植物体内不能积累高浓度的铵态氮,否则会引起毒害现象(Lea and Azevedo, 2006)。

植物主要通过AMT/MEP/Rh (ammonium transporter/methylammonium permease/Rhesus)家族转运蛋白吸收和转运铵根离子,其过程是需要能量的逆浓度梯度的主动运输过程(von Wirén and Merrick, 2004)。根据动力学特征的不同,铵根转运系统同样可以分为低亲和性转运系统和高亲和性转运系统2种,分别在外界环境中铵根离子浓度 $>1 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $<1 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时发挥作用(Glass et al., 2002)。

拟南芥中AMT/MEP/Rh家族共有6个成员,均包括N端结构域、C端结构域和10–11个跨膜域,大部分成员的N端和C端分别定位于细胞外部和内部(Javelle et al., 2003) (表1)。其中,AMT1;1–AMT1;5五个成员属于AMT1亚家族,为铵根转运蛋白或 NH_4^+/H^+ 共转运蛋白,与蓝细菌中的铵根转运蛋白相似度较高;而AMT2;1属于AMT2/MEP亚家族,与酿酒酵母和细菌中的铵根转运蛋白同源性较高(Loqué

and von Wirén, 2004)。AMT1;1在拟南芥的根、茎和叶等器官中均有表达,在根中定位于表皮细胞和皮层细胞的细胞膜上,是执行吸收功能的主要转运蛋白(Mayer and Ludewig, 2006)。AMT1;3仅在根部特异性表达,细胞定位与AMT1;1相同,与AMT1;1一起承担铵根吸收的任务(Loqué et al., 2006)。AMT1;2主要在根部的皮层和内皮层细胞表达,负责通过质外体向维管束运输铵根离子,而在茎和叶中表达量较低(Yuan et al., 2007)。AMT1;5和AMT2;1虽然分别定位于根部表皮细胞和皮层细胞,但是对植物从土壤中吸收和转运铵根贡献较小(Yuan et al., 2007)。AMT1;4是AMT1亚家族中唯一不在根中表达的成员,是花粉中特异的铵根转运蛋白,可能对花粉发育和萌发过程中的氮素营养转运起重要作用(Yuan et al., 2009)。

2 拟南芥无机氮素转运蛋白的磷酸化调控机制

蛋白磷酸化是指蛋白质激酶催化的把ATP或GTP γ 位的磷酸基团转移到底物蛋白质氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸)上的过程。反之,在蛋白磷酸酶的作用下去掉相应磷酸基团的过程称为蛋白去磷酸化。磷酸基团的添加或去除可影响蛋白的构象,进而调控蛋白的活性和功能,最终对物质转运、能量代谢和信号转导等诸多生命过程起到开关的作用。

2.1 硝酸根转运蛋白的磷酸化调控机制

2.1.1 NRT1.1的磷酸化调控机制

NRT1.1, 又称CHL1 (chlorate resistant 1), 是拟南芥中最先被鉴定出来的NRT1类转运蛋白,在根系对土壤中硝酸根的吸收和结合响应过程中发挥主导作用(Tsay et al., 1993; Liu et al., 1999; Liu and Tsay, 2003; Ho et al., 2009)。蛋白激酶CIPK23 (calcineurin B-like interaction protein kinase 23)是调控CHL1蛋白磷酸化状态的关键酶,经类钙调磷酸酶B蛋白CBL9 (calcineurin B-like protein 9)激活后,可将CHL1蛋白第101位苏氨酸(T101)磷酸化(Ho et al., 2009)。

对CHL1基因缺失突变体 $chl1-5$ 的研究表明,CHL1是一个双亲和性硝酸根转运蛋白,在高浓度和低浓度硝态氮存在的情况下,均具有硝酸根吸收转运

活性,既参与到LATS过程,也参与到HATS过程中(Liu et al., 1999)。CHL1的双亲和性与T101的磷酸化状态密切相关:外界环境中的硝酸根浓度较低时,该位点的苏氨酸被磷酸化,表现出高亲和力,以尽可能多地获取氮源;外界环境中的硝酸根浓度较高时,该位点的苏氨酸未被磷酸化,表现出低亲和力,以调节对多余底物的摄取(Liu and Tsay, 2003)。这种精确的调控机制使植物可以很快地在高亲和力和低亲和力系统间转换,以适应土壤中广域的硝态氮供应水平,有利于植物获取必要且充裕的氮素养分。

Tsay实验室筛选到了1个CHL1基因点突变株系 $chl1-9$ 。该突变体丧失了转运硝酸根的能力,却仍然保留了植物正常的硝酸根应答反应,从而证明CHL1蛋白不但是硝酸根的转运器,而且是硝酸根的感受器,在硝酸根响应和信号转导途径中发挥重要作用(Ho et al., 2009)。对持续磷酸化转基因植株T101D (第101位的苏氨酸转变为天冬氨酸)和持续未磷酸化转基因植株T101A (第101位的苏氨酸转变为丙氨酸)的研究进一步表明,T101的磷酸化状态同样影响其感受和响应硝酸根的能力:磷酸化的CHL1蛋白可引发低水平的硝酸根初级反应,而未磷酸化的CHL1蛋白则引发较高水平的硝酸根初级反应(Ho et al., 2009)。

上述研究表明,当植物处于低硝酸根浓度环境中时,蛋白激酶CIPK23将CHL1蛋白的T101磷酸化,磷酸化的CHL1转变为高亲和力的硝酸根转运蛋白,从而促进植物在不利的条件下吸收更多的硝酸根。磷酸化后的CHL1同时使植物在低浓度硝酸根下保持低水平的硝酸根初级反应,以适应外界环境中低水平的硝酸根浓度,防止基因过量表达造成植物生长过于旺盛而硝酸根却供应不足。当植物处于高硝酸根浓度环境中时,CHL1蛋白保持在未磷酸化状态,具备低亲和力的硝酸根转运能力,并激活高水平的硝酸根初级反应,以充分利用摄入的硝酸根(图1)(Vert and Chory, 2009)。

最近,Sun等(2014)及Parker和Newstead (2014)对CHL1蛋白的晶体结构进行了深入解析,为其转运硝酸根的磷酸化调控机制给出了初步解释。Sun等(2014)认为磷酸化会影响CHL1蛋白的聚合状态,进而改变自身的亲和性;而Parker和Newstead (2014)认为磷酸化会改变CHL1蛋白胞内部分的局部结构,从而改变自身的亲和性。Sun等(2014)获得了未磷酸

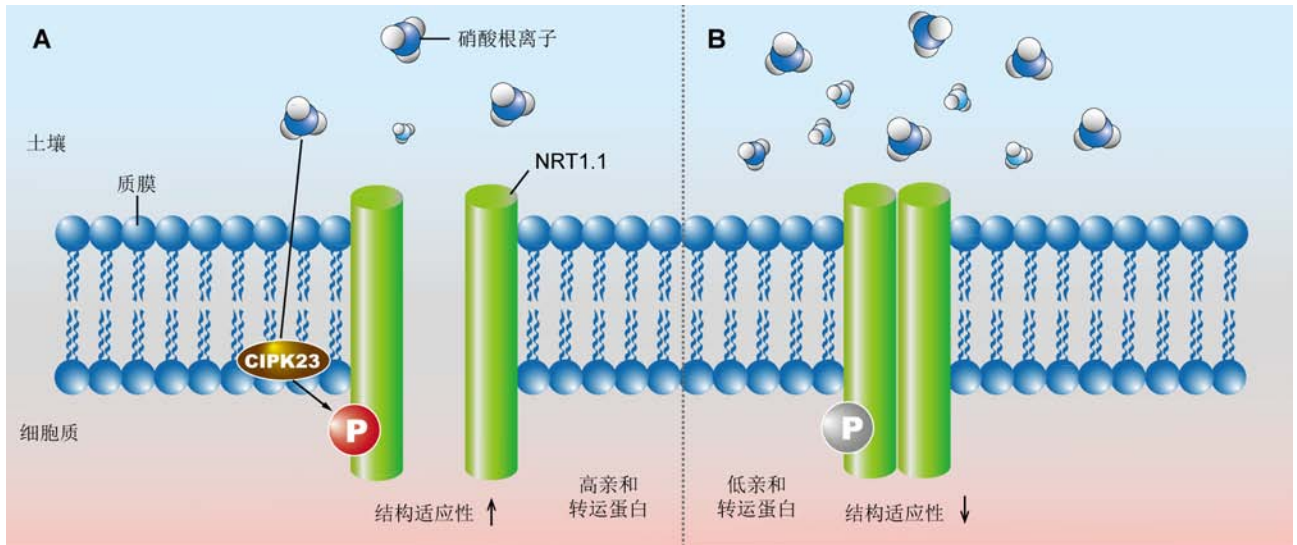


图1 NRT1.1磷酸化调控机制(改自Tsay, 2014)

(A) 低浓度硝酸根; (B) 高浓度硝酸根

Figure 1 NRT1.1 phosphorylation regulatory mechanism (modified from Tsay, 2014)

(A) Low nitrate concentration; (B) High nitrate concentration

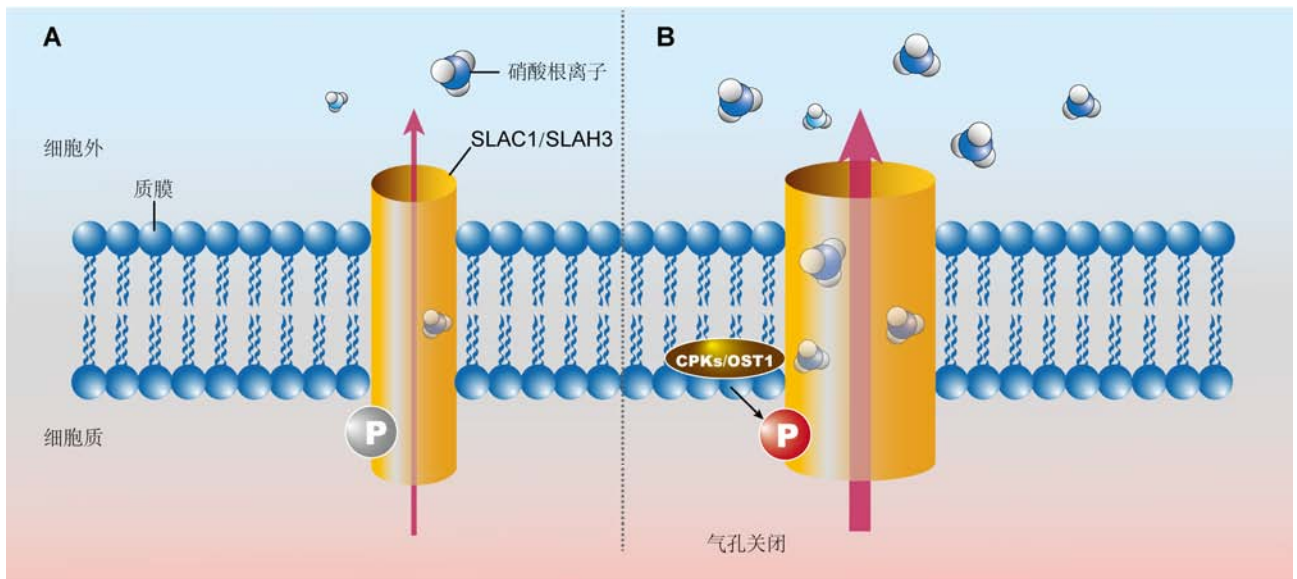


图2 SLAC1/SLAH3磷酸化调控机制(改自Geiger et al., 2011)

(A) -ABA; (B) +ABA

Figure 2 SLAC1/SLAH3 phosphorylation regulatory mechanism (modified from Geiger et al., 2011)

(A) -ABA; (B) +ABA

化的CHL1蛋白的晶体结构, 并发现CHL1蛋白单体可根据外界硝酸根浓度的不同动态地进行二聚化和去偶联作用。在外界硝酸根浓度高的时候, T101磷酸

化位点埋入紧邻CHL1同源二聚体界面的口袋中, CHL1蛋白以非磷酸化的二聚体状态发挥作用; 在外界硝酸根浓度低的时候, T101磷酸化将CHL1二聚体

解偶联,使其转变为单相的高亲和性转运蛋白(图1)(Sun et al., 2014)。因此, T101的磷酸化和去磷酸化作为控制CHL1二聚化的开关,使其能够以两种不同的亲和模式吸收并转运硝酸根(Tsay, 2014)。Parker和Newstead (2014)获得了相同的未磷酸化的CHL1晶体结构,并且认为T101的磷酸化作用会导致CHL1蛋白N端集束螺旋的局部扭曲,这种扭曲会使蛋白的可塑性增强,进而影响硝酸根的转运能力(图1)。阐明CHL1晶体结构不仅为理解其双亲和性硝酸盐转运活性提供了一个结构框架,而且还揭示了翻译后修饰作用调控转运蛋白功能的一种新机制。

2.1.2 SLAC1和SLAH3的磷酸化调控机制

SLAC1及其同系物SLAH3是定位于保卫细胞上的慢型阴离子通道,可直接响应植物ABA信号,促进氯化物和硝酸根的外流,进而诱导气孔的关闭(Geiger et al., 2011)。在没有ABA信号时,蛋白磷酸酶2C (protein phosphatases 2C)家族成员ABI1 (ABA insensitive 1)和ABI2等抑制了钙离子依赖蛋白激酶CPKs (calcium-dependent protein kinases) (如CPK21和CPK23等)与非钙离子依赖蛋白激酶(如OST1 (open stomata 1))的自磷酸化,从而使激酶失去磷酸化底物的活性。当干旱等外界环境启动内源ABA的合成后,ABA与其受体PYR/PYL/RCARs (pyrabactin resistance/pyrabactin resistance-like/regulatory component of ABA receptors)结合,进而与PP2C结合并抑制其磷酸酶活性。这样,具有活性的蛋白激酶CPKs和OST1等可将SLAC1与SLAH3蛋白N端结构域磷酸化,改变其构象,开放通道,促进氯化物和硝酸根的释放(图2)(Lee et al., 2009; Geiger et al., 2010, 2011; Brandt et al., 2012)。阴离子的外流将导致保卫细胞质膜的去极化,进而促进外向整流钾离子通道释放钾离子,降低细胞膨压,促进气孔关闭(Geiger et al., 2011)。

2.2 铵根转运蛋白的磷酸化调控机制

AMT1;1和AMT1;2蛋白分别在根系对土壤铵根的吸收及根系中铵根从表皮到内皮层的转运过程中发挥主要作用(Yuan et al., 2007)。二者同源性较高,均具有保守的C末端变构调节域,可通过与相邻转运蛋白单体结合形成同源三聚体发挥铵根的转运功能

(Neuhäuser et al., 2007)。其中, AMT1;1蛋白第460位的苏氨酸T460和AMT1;2蛋白第472位的苏氨酸T472的磷酸化状态对C末端的变构调节机制非常重要(Loqué et al., 2007; Neuhäuser et al., 2007; Lanquar et al., 2009)。当外界环境中铵离子浓度较低时, AMT蛋白C末端的苏氨酸残基未被磷酸化,形成开放的铵离子通道,尽可能多地将铵离子转运到胞内;伴随着铵离子浓度的提高, C末端的苏氨酸残基被未知的蛋白激酶磷酸化,通过变构作用导致复合物中3个亚基的合作关闭,抑制了其铵离子的转运能力,防止植物中过量铵态氮的积累(图3)(Loqué et al., 2007; Neuhäuser et al., 2007; Lanquar et al., 2009)。

3 总结和展望

氮元素是植物必需的营养物质,其转运和利用是影响植物生长发育和品质形成的重要因子。无机氮是植物吸收利用的主要氮源,其转运是一个相当复杂的生命过程,包括吸收、运输、储存和外排等多个步骤,需要定位于不同组织器官的多个转运蛋白共同作用。近年来,研究者从模式植物拟南芥中克隆到多个硝酸根和铵根转运蛋白,并对这些蛋白的分子结构、表达调控和转运功能等方面进行了深入分析,较为系统地揭示了无机氮素吸收和转运的分子基础。尽管如此,无机氮素转运机制仍有待于进一步补充和完善,如各转运蛋白的多层次调控模式、多个转运蛋白之间的协同合作以及氮素转运如何协调外界环境变化和自身的发育需要等。最新研究表明,区别和独立于营养功能,硝酸根还可作为重要信号分子调节植物生长发育和逆境响应等多个过程。目前,硝酸根信号通路中的部分感受器、转录因子和下游基因等正逐步得到解析,但整个信号网络还存在大量空白,如可能存在的其它硝酸根感受器、特异性调控不同硝酸根响应基因的转录因子及与其它信号网络的交叉点蛋白等。值得注意的是,以往的研究多是利用遗传、分子及生化等手段在组织水平对无机氮素转运蛋白的生物学功能进行探讨,这种宏观层面的分析很可能掩盖了硝酸根转运过程中单个蛋白分子所呈现的复杂的生物学过程。因此,利用多种细胞生物学手段对无机氮素转运蛋白在质膜上的时空分布和胞内转运进行活体实时动态观测,将

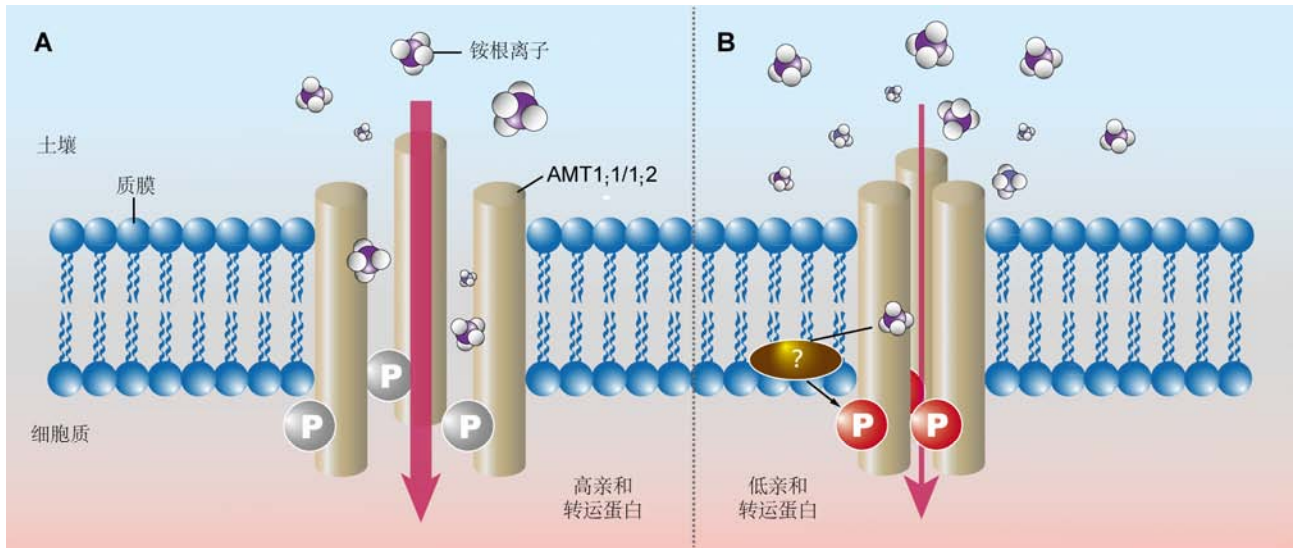


图3 AMT1;1/1;2磷酸化调控机制(改编自Lanquar et al., 2009)

(A) 低浓度硝酸根; (B) 高浓度硝酸根

Figure 3 AMT1;1/1;2 phosphorylation regulatory mechanism (modified from Lanquar et al., 2009)

(A) Low nitrate concentration; (B) High nitrate concentration

为深入揭示其转运调控机理提供新的思路和方法。综上所述, 更加深入地了解 and 阐释植物无机氮素转运系统及信号转导途径, 不仅为植物氮素利用遗传改良奠定良好的理论基础, 而且将为农业生产中低耗能高环保的氮肥施用提供有力的技术支持。

参考文献

Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 25–51.

Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjärvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 10593–10598.

Chadwick DR, John F, Pain BF, Chambers BJ, Williams J (2000). Plant uptake of nitrogen from the organic nitrogen fraction of animal manures: a laboratory experiment. *J Agric Sci* **134**, 159–168.

Crawford NM (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859–868.

Evans JR (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* **78**, 9–19.

Filleur S, Dorbe M, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F (2001). An Arabidopsis T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett* **489**, 220–224.

Forde BG (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Bba-Biomembranes* **1465**, 219–235.

Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. *Plant Cell* **11**, 937–947.

Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* **4**, a32.

Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid K, Grill E (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 8023–8028.

Glass AD, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kron-

- zucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE** (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot* **53**, 855–864.
- Glass AD, Shaff JE, Kochian LV** (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley IV. Electrophysiology. *Plant Physiol* **99**, 456–463.
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF** (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194.
- Hsu PK, Tsay YF** (2013). Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. *Plant Physiol* **163**, 844–856.
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF** (1999). Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* **11**, 1381–1392.
- Javelle A, Morel M, Rodríguez Pastrana BR, Botton B, André B, Marini AM, Brun A, Chalot M** (2003). Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mol Microbiol* **47**, 411–430.
- Jentsch TJ** (2008). CLC chloride channels and transporters, from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol* **43**, 3–36.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA** (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**, 503–568.
- Kiba T, Feria-Bourrellier A, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H** (2012). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* **24**, 245–258.
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F** (2014). Nitrate transport and signaling in Arabidopsis. *J Exp Bot* **65**, 789–798.
- Lanquar V, Loqué D, Hörmann F, Yuan L, Böhner A, Engelsberger WR, Lalonde S, Schulze WX, von Wirén N, Frommer WB** (2009). Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 3610–3622.
- Lawlor DW, Lemaire G, Gastal F** (2001) Nitrogen, Plant Growth and Crop Yield. Berlin: Springer. pp. 343–367.
- Lea PJ, Azevedo RA** (2006). Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Ann Appl Biol* **149**, 243–247.
- Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S** (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 21419–21424.
- Léran S, Muños S, Brachet C, Tillard P, Gojon A, Lacombe B** (2013). Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. *Mol Plant* **6**, 1984–1987.
- Li JY, Fu YL, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J** (2010). The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* **22**, 1633–1646.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass AD** (2007). Dissection of the *AtNRT2.1*: *AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol* **143**, 425–433.
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB** (2008). Mutation of the Arabidopsis *NRT1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* **20**, 2514–2528.
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF** (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**, 865–874.
- Liu KH, Tsay YF** (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J* **22**, 1005–1013.
- Loqué D, Lalonde S, Looger LL, Von Wirén N, Frommer WB** (2007). A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* **446**, 195–198.
- Loqué D, von Wirén N** (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* **55**, 1293–1305.
- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H, Von Wirén N** (2006). Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant J* **48**, 522–534.
- Mayer M, Ludewig U** (2006). Role of AMT1;1 in NH_4^+ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* **8**, 522–528.
- Mei HS, Thimann KV** (1984). The relation between nitrogen deficiency and leaf senescence. *Physiol Plant* **62**, 157–161.
- Mifflin BJ, Lea PJ** (1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* **15**, 873–885.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A** (2013). Nitrogen Acquisi-

- tion by Roots: Physiological and Developmental Mechanisms Ensuring Plant Adaptation to a Fluctuating Resource. Berlin: Springer. pp. 1–29.
- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högberg M, Högberg P** (1998). Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* **392**, 914–916.
- Neuhäuser B, Dynowski M, Mayer M, Ludewig U** (2007). Regulation of NH_4^+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiol* **143**, 1651–1659.
- Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass AD** (2006). High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol* **140**, 1036–1046.
- Parker JL, Newstead S** (2014). Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter *NRT1.1*. *Nature* **507**, 68–72.
- Robertson GP, Vitousek PM** (2009). Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Annu Rev Environ Resour* **34**, 97–125.
- Robertson JL, Kolmakova-Partensky L, Miller C** (2010). Design, function and structure of a monomeric ClC transporter. *Nature* **468**, 844–847.
- Segonzac C, Boyer JC, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B, Sommerer N, Rossignol M, Gibrat R** (2007). Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an Arabidopsis excretion transporter. *Plant Cell* **19**, 3760–3777.
- Sekhon GS** (1995). Fertilizer-N use efficiency and nitrate pollution of groundwater in developing countries. *J Contam Hydrol* **20**, 167–184.
- Sun J, Bankston JR, Payandeh J, Hinds TR, Zagotta WN, Zheng N** (2014). Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter *NRT1.1*. *Nature* **507**, 73–77
- Tsay YF** (2014). Plant science: how to switch affinity. *Nature* **507**, 44–45.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* **581**, 2290–2300.
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM** (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.
- Vert G, Chory J** (2009). A toggle switch in plant nitrate uptake. *Cell* **138**, 1064–1066.
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U** (2010). CLCb-mediated NO_3^-/H^+ exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. *Plant Cell Physiol* **51**, 960–968.
- von Wirén N, Merrick M** (2004). Regulation and Function of Ammonium Carriers in Bacteria, Fungi, and Plants. Berlin: Springer. pp. 95–120.
- von Wittgenstein NJ, Le CH, Hawkins BJ, Ehling J** (2014). Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evol Biol* **14**, 11.
- Wang YY, Hsu PK, Tsay YF** (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci* **17**, 458–467.
- Wang YY, Tsay YF** (2011). Arabidopsis nitrate transporter *NRT1.9* is important in phloem nitrate transport. *Plant Cell* **23**, 1945–1957.
- Yuan L, Graff L, Loqué D, Kojima S, Tsuchiya YN, Takahashi H, von Wirén N** (2009). *AtAMT1;4*, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**, 13–25.
- Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wirén N** (2007). The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell* **19**, 2636–2652.

Progress in Inorganic Nitrogen Transport Proteins and Their Phosphorylation Regulatory Mechanism in Arabidopsis

Xi Zhang, Jinxing Lin, Xiaoyi Shan*

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract Nitrogen (N) is an essential nutrient element. Its supply and demand imbalance would seriously affect plant growth and development. Inorganic N (nitrate and ammonium radical) is the major N source in plant, with assimilation and transportation depending on synergistic action of various transport proteins. The activity of some inorganic N transporters is regulated at the post-translation level by phosphorylation. This review describes a global picture of the inorganic N transporters including their classification, molecular structure, location and biological function in Arabidopsis. The phosphorylation regulatory mechanisms of some inorganic N transporters are mainly discussed.

Key words nitrogen, nitrate radical, ammonium radical, transport proteins, phosphorylation

Zhang X, Lin JX, Shan XY (2016). Progress in inorganic nitrogen transport proteins and their phosphorylation regulatory mechanism in Arabidopsis. *Chin Bull Bot* **51**, 120–129.

* Author for correspondence. E-mail: shanxy@bjfu.edu.cn