

植物氮素同化过程中相关酶的研究进展

张华珍, 徐恒玉

(周口职业技术学院, 河南 周口 466001)

摘要:氮素同化是指植物吸收环境中的 NO_3^- 或 NH_4^+ 合成氨基酸和蛋白质等含氮有机化合物的过程, 在这个过程中多个酶类参与。现对在植物同化过程中硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶的研究进展进行综述, 为进一步研究提高氮素同化率奠定基础。

关键词:植物; 氮素同化; 硝酸还原酶; 亚硝酸还原酶; 谷氨酰胺合成酶; 谷氨酸合成酶

中图分类号:Q 55 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)20-0180-04

氮素是作物生长的必需元素之一。在农业生产实践中, 氮素是影响产量的主要因素, 人们往往通过施用过量的氮肥来保证氮营养的供给。然而, 过量的氮肥不仅增加了农业成本、污染了环境, 而且还危及到了人类的健康。近年来, 提高氮素同化率成为了研究热点。

氮素同化是指植物吸收环境中的 NO_3^- 或 NH_4^+ 合成氨基酸和蛋白质等含氮有机化合物的过程。土壤中的无机氮源(铵盐和硝酸盐)约占土壤含氮量的 1%~2%, 是植物主要的氮源。大多数植物虽然能吸收 NH_4^+ , 但一般在田间条件下, NO_3^- 是植物的主要氮源。通常, 植物主要靠根的皮层细胞从土壤溶液中吸收硝酸盐, 叶也可进行硝酸盐的初级吸收。在硝酸盐的同化过程中, 它先后被硝酸还原酶(Nitrate reductase, NR)和亚硝酸还原酶(Nitrite reductase, NiR)还原成铵, 而后与植物从土壤中吸收的铵一起通过谷氨酸合成酶循环被同化成谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln), 进一步形成天冬氨酸(Asp)和天冬酰胺(Asn), 然后形成其它氨基酸或含氮化合物。在谷氨酸合成酶循环过程中有 2 种重要的酶参与催化作用, 分别是谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合成酶(Glutamate synthase, GOGAT)。现对植物氮素同化过程中的硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶 4 个相关酶的研究进展作以简要概述。

1 硝酸还原酶(Nitrate reductase, NR)

1952 年, Evans 等^[1]在红色链孢菌中首先证实了硝酸还原酶的存在, 翌年又在高等植物中发现。NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, 它是植物氮素同化步骤中的第 1 个酶, 也是整个硝态氮同化过程的关键酶、限速酶, 在植物氮素同化过程中起关键作用。对大部分植物来说, 此反应在根和叶中都可进行, 通常绿色组织中比非绿色组织中更为活跃。在绿叶中硝酸盐的还原

在细胞质中进行, 当硝酸盐被细胞吸收后, 细胞质中的 NR 就利用 NADH 供氢体将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 而 NADH 由叶绿体中生成的苹果酸经双羧酸运转器送至细胞质, 再由苹果酸脱氢酶催化生成。NR 在细胞内定位还不太确定。1988 年, Vanghn 等^[2]利用胶体金免疫技术证实 NR 位于菠菜叶绿体内和玉米胞液内; 1990 年, Solomonson 等^[3]的研究表明 NR 位于胞液内, 这些不同的结果反映出 NR 由于细胞的不同生理状态与叶绿体外膜有不同的结合点。真核生物中的 NR 有 3 种类型, 单特异型 NADH:NR(EC 1. 6. 6. 1)、双特异 NAD(P)H:NR(EC 1. 6. 6. 2)和单特异型 NADPH:NR(EC 1. 6. 6. 3), 植物体内只存在前 2 种^[4-7]。

我国科学家吴相钰等^[8]于 1957 年首先发现它还是一种诱导酶, 试验中水稻幼苗如果培养在硝酸盐溶液中, 体内即生成 NR, 把幼苗转放在不含硝酸盐的溶液中, NR 又逐渐消失。2001 年, Ferrario-Mery^[9]等证明了其活性水平与其底物浓度成正相关, 与氮同化产物 NH_3 、谷氨酰胺、谷氨酸成负相关。同年, Kaiser 等^[10]发现 NR 还受多种因素如光照、温度、 CO_2 、水势等影响。

一些植物仅含有单基因编码的 1 种硝酸还原酶类, 一些植物由于电子供体的特异性或组织特异性含有 2 种或 3 种不同的硝酸还原酶类, 不同的酶似乎有不同的基因编码^[11]。1991 年前后, 拟南芥的 2 种不同硝酸还原酶基因 *NLA1* 和 *NLA2* 已先后被 Cheng^[12]和 Wilkinson 等^[13]成功克隆且被定位到不同的位点。随后, 有研究人员采用基因工程的技术手段将 NR 在莴苣^[14]和马铃薯^[15]中超表达, 检测结果显示莴苣叶片的硝酸盐含量有所下降, 而马铃薯块茎中的硝酸盐的含量下降了 95%。因此, 通过转基因手段提高硝酸还原酶的表达量, 可以降低转基因植物中的硝酸盐含量。

2 亚硝酸还原酶(Nitrite reductase, NiR)

亚硝酸还原酶在高等植物、藻类植物和微生物中广泛存在, 在植物器官中的含量很大, NiR 位于叶片的叶绿体中和非绿色组织中的质体中^[16], 所以在正常有

第一作者简介: 张华珍(1982-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为生物技术。

收稿日期: 2011-06-28

氧条件下,由硝酸还原酶催化形成的亚硝酸盐很少在植物体内积累。 NO_3^- 还原成 NO_2^- 后被运送至叶绿体,叶绿体内存在的亚硝酸还原酶利用光合链提供的还原型铁氧还蛋白(Fd)作电子供氢体将 NO_2^- 还原为 NH_4^+ 。根据辅基的不同,目前普遍认为亚硝酸还原酶分为2类:血红素 cdl 型亚硝酸还原酶和铜型亚硝酸还原酶。目前,国内外研究者们已经从豌豆叶片、大麦根、多类细菌中分离提纯到了 NiR,并对其酶学性质和蛋白结构做了较为深入的研究。一些国外学者还从分子水平研究 NiR 的基因结构、调控和转录表达等。NiR 的编码基因包括 *nirs* 和 *nirK*。*nirs* 指导合成血红素 cdl 型 NiRs,*nirK* 转录翻译成铜型 NiRs,*nirs* 比 *nirK* 分布广泛^[17-19]。因为亚硝酸还原酶可以将致癌的 NO_2^- 转化为无毒的 NH_4^+ ,所以关于它的研究大多是利用微生物体内的亚硝酸还原酶来降低食品和蔬菜中亚硝酸盐含量^[20-21]。

3 谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase,GS)

谷氨酰胺合成酶在与谷氨酸合成酶(Glutamate synthase,GOGAT)的联合作用下,将植物吸收的无机态氮转变成有机态的谷氨酰胺和谷氨酸。GS以多种形式存在于植物体中。生化研究表明,谷氨酰胺合成酶同工酶因定位不同而产生差异,当GS定位于细胞质时,以细胞质型GS(GS1)的形式存在;当GS定位于叶绿体时,以叶绿体型GS(GS2)的形式存在。

谷氨酰胺合成酶对氮有着高度的亲和性,它可以在活细胞的低氮浓度环境中发挥功能。2000年,Becker等^[22]将植物GS分为2类,绿色组织的质体GS由1个基因编码,同化硝酸还原和光呼吸所产生的氮;根细胞的胞质GS由1个多基因家族编码,主要同化植物根系统中硝酸还原作用产生的氮。2001年,Hirel等^[23]用玉米重组自交群体进行QTL作图发现,一些控制产量的QTL与3个胞质GS基因位于相同基因组区间内。同年,在水稻中Obara等^[24]用98个回交系定位出1个QTL:一些控制产量性状的基因和1个GS1的结构基因位于相同基因组区间。然而,基因工程技术手段得到的研究结果却与此不尽相同。1997年,Vincent等^[25]将大豆胞质GS在莲属植物中组成性超表达,叶中总GS活性增加50%~80%,根中GS活性则没变化,转基因植株发育加快,开花提前和早衰。2000年,Migge等^[26]在烟草苗期,将叶片中的质体GS-2超量表达后,烟草长势加快。随着GS-2含量的提高,叶片内的铵含量降低,游离的谷氨酸和谷氨酰胺含量增加,每克鲜重的蛋白质含量并没有变化。充足的氮源被植株吸收后,只是以游离的谷氨酸和谷氨酰胺的形式被积累,没有进入植株代谢途径。2003年,Fei等^[27]发现在豌豆中超量表达GS后,GS活性并不总和生物量成相同趋势,GS和生物学产量的关系有待进一步研究。

4 谷氨酸合酶(Glutamate synthase,GOGAT)

NH_4^+ 进入氮同化途径后,首先由GS催化合成谷氨酰胺,然后由谷氨酸合酶将谷氨酰胺和2-戊二酸转变

为2个分子谷氨酸,其中1个分子谷氨酸可作为谷氨酰胺合成酶的底物,另1个分子谷氨酸可用于合成蛋白质、核酸等含氮化合物。在同化 NH_4^+ 时,GS和GOGAT是同时起作用的,因而该途径被称为GS/GOGAT循环。GOGAT可分为3类,具有不同的分子量、动力学特征、细胞定位和依赖还原力的专一性。第1类是Fd-GOGAT,主要位于质体和叶绿体中;第2类是NADH-GOGAT,主要位于根瘤、根、茎和细胞质中^[28];第3类是NADPH-GOGAT,主要存在细菌中^[29]。在高等植物中,主要有Fd-GOGAT和NADH-GOGAT 2种形式存在,前者主要在绿色组织中存在,参与氮的初步吸收与光呼吸释放氮的再吸收,NADH-GOGAT则主要存在于非绿色组织中,如根和根瘤。2种酶在分子结构、动力学以及抗原性等方面都不相同,是2种不同的蛋白,在植物中担任角色不同^[28,30]。

目前已经从苜蓿^[31]、拟南芥^[29]和水稻^[32]等植物中分离到了NADH-GOGAT酶类的cDNA,它们编码的蛋白质的功能域与大肠杆菌NADPH-GOGAT大小亚基同源性较高,如都具有C末端NADH结合区域^[31]。1998年,Goto等^[32]研究表明,水稻NADH-GOGAT基因是单基因,转录区11.7 kb,包含23个Exon和22个Intron,cDNA 7 047 bp,编码2 166个氨基酸的蛋白,其分子量为236.7 KD,包含前端99个氨基酸的质体转运肽序列。1999年,Hayakawa等^[30]发现该基因的表达具有发育阶段特异性和细胞特异性,同时受到氮胁迫的诱导。如低浓度氮诱导后,在根尖表皮细胞和维管束薄壁细胞中检测到特异表达。2003年,Ishiyamaya等在启动子与GUS融合实验中也证实了该结论^[33]。

植物Fd-GOGAT存在于光合组织中,玉米^[34]、烟草^[35]、以及拟南芥^[36]等植物的Fd-GOGAT已经被成功克隆。除拟南芥具有2个Fd-GOGAT(*GLU1*和*GLU2*)外,其余物种均为单Fd-GOGAT基因。该基因的表达受到光和碳源诱导,在光刺激下,玉米、烟草以及拟南芥的Fd-GOGAT的mRNA主要在叶片组织种表达,伴有光敏色素的参与。外源添加蔗糖后,即使无光,*GLU1*的mRNA仍然得到积累^[36]。

5 氮素同化基因工程策略展望

植物碳代谢和氮代谢的关系非常密切。光合碳代谢与 NO_2^- 同化都发生在叶绿体内,碳氮代谢都需要消耗来自 CO_2 同化和光合以及其它电子传递链的有机碳和能量。光合作用产生的能量及其中间产物大部分用于碳、氮代谢,在某些组织中氮代谢甚至可消耗掉光合作用能量的55%。叶绿体中 NO_2^- 同化不仅需要光反应产生的还原态铁氧还蛋白(red Fd),还利用碳代谢合成的酮酸作碳架合成氨基酸^[37]。氮素同化是个动态过程,它受到外界因素及植物体内碳氮代谢物的储存等内部因素的调节。提高氮素同化率的研究也许不能单单只顾及1条代谢链,更不能期望单个基因的转化能在不影响作物农艺性状的同时达到预期目的。多基

因转化以及同时作用于多基因的转录因子转化提高氮素利用率是个前景。Yanagisawa 等^[38]将玉米 *ZmDof1* 在拟南芥中过量表达后,植株氮含量提高 30%,在低氮条件下拟南芥生长也可有所改善。

参考文献

- [1] Evans H J, Nason A. The effect of reduced triphosphopyridine nucleotide on nitrate reduction by purified nitrate reductase [J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 39(1): 234-235.
- [2] Vanghn K C, Campbell W H. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves [J]. Plant Physiol, 1988, 88: 1354-1357.
- [3] Solomonson L P, Batber M J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation [J]. Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol., 1990, 41: 225-253.
- [4] Redinbaugh M G, Campbell W H. Purification and characterization of NAD(P)H: nitrate reductase and NADH: nitrate reductase from corn roots [J]. Plant Physiol, 1981, 68: 115-120.
- [5] Streit L, Martin B A, Harper J E. A method for the separation and the partial purification of the three forms of nitrate reductase in *Erythrina senegalensis* DC [J]. New Phytol, 1987, 83: 311-357.
- [6] Guerrero M G, Vega J M, Losada M. The assimilatory nitrate—reducing system and its regulation [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1981, 88: 383-388.
- [7] Padidam M, Venkatesvarlu K, Johri M M. Ammonium represses NADPH-nitrate reductase in the moss *Funaria hygrometrica* [J]. Plant Science, 1991, 75: 184-194.
- [8] 吴相钰, 汤佩松. 植物呼吸及代谢的研究. II. 水稻幼苗中硝酸还原酶的适应形成 [J]. 植物学报, 1958, 7(3): 135-148.
- [9] Ferrario-Mery S, Masclaux C, Suzuki A, et al. Glutamine and alpha-ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine-alpha-ketoglutarate aminotransferase [J]. Planta, 2001, 213: 265-271.
- [10] Kaiser W M, Huber S C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers [J]. J Exp Bot, 2001, 52: 1981-1989.
- [11] Caboche M, Rouze P. Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants [J]. Trends Genet, 1990(6): 187-192.
- [12] Cheng C, Dewdney J, Nam H, et al. A new Locus (NLA1) in *Arabidopsis thaliana* encoding nitrate reductase [J]. Embo J, 1988 (11): 3309-3314.
- [13] Wilkinson J Q, Crawford N M. Identification of the *Arabidopsis* CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2 [J]. Plant Cell, 1991(3): 461-471.
- [14] Curtis I S, Power J B, De Laat A M M, et al. Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves [J]. Plant Cell Repro, 1999, 18(11): 889-896.
- [15] Djennane S, Chauvin J E, Quillere I, et al. Introduction and expression of a deregulated tobacco nitrate reductase gene in potato lead to highly reduced nitrate levels in transgenic tubers [J]. Transgenic Res, 2002, 11(2): 175-184.
- [16] Lilli Sander, Poul E Jensen. Structure and expression of a nitrite reductase gene from bean (*Phaseolus vulgaris*) and promoter analysis in transgenic tobacco [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 165-177.
- [17] You S J. Identification of denitrifying bacteria diversity in a nactivated sludge system by using nitrite reductase genes [J]. Biotechnology Letters, 2005, 27: 1477-1482.
- [18] Kim Hawker, Paul Montague, James R Kinghorn. Nitrate reductase and nitrite reductase Transcript levels in various mutants of *Aspergillus nidulans*: confirmation of autogenous regulation [J]. Mol Gen Genet, 1992, 231: 485-488.
- [19] Sachiko Yoshic, Naohiro Noda, Satoshi Tsuneda. Salinity Decrease

- sNitrite Reductase Gene Diversity in Denitrifying Bacteria of Wastewater Treatment Systems [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004 (5): 3152-3157.
- [20] 吕玉涛. 产亚硝酸还原酶短乳杆菌发酵条件优化及酶的分离纯化研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2010.
- [21] 龚钢明, 吕玉涛, 管世敏, 等. 乳酸菌亚硝酸盐还原酶制备及酶学性质 [J]. 中国酿造, 2011(1): 58-60.
- [22] Becker T W, Carrayol E, Hirel B. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport [J]. Planta, 2000, 211: 800-806.
- [23] Hirel B, Bertin P, Quillere I, et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize [J]. Plant Physiol, 2001, 125: 1258-1270.
- [24] Obara M, Kajiura M, Fukuta Y, et al. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Exp Bot, 2001, 52: 1209-1217.
- [25] Vicente-Carbajosa J, Moose S P, Parsons R L, et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 7685-7690.
- [26] Migge A, Carrayol E, Hirel B, et al. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings [J]. Planta, 2000, 210: 252-260.
- [27] Fei H, Chaillou S, Hirel B, et al. Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate [J]. Planta, 2003, 216: 467-474.
- [28] Lam H M, Coschigano K T, Oliveira I C, et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants [J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol, 1996, 47: 569-593.
- [29] Oliver G, Gosset G, Sanchez-Pescador R, et al. Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12 [J]. Gene, 1987, 60: 1-11.
- [30] Hayakawa T, Hopkins L, Peat L J, et al. Quantitative intercellular localization of NADH-dependent glutamate synthase protein in different types of root cells in rice plants [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 409-416.
- [31] Gregerson R G, Miller S S, Twary S N, et al. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules [J]. Plant Cell, 1993(5): 215-216.
- [32] Goto S, Akagawa T, Kojima S, et al. Organization and structure of NADH-dependent glutamate synthase gene from rice plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1387: 298-308.
- [33] Ishiyama K, Kojima S, Takahashi H, et al. Cell type distinct accumulations of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41: 643-647.
- [34] Sakakibara H, Matanabe M, Hase T, et al. Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin dependent glutamate synthase in maize leaf [J]. J. Biol. Chem, 1991, 266: 2028-2035.
- [35] Zehnacker C, Becker T W, Suzuki A, et al. Purification and properties of tobacco ferredoxin-dependent glutamate synthase, and isolation of corresponding cDNA clones [J]. Planta, 1992, 187: 266-74.
- [36] Coschigano K T, Melo-Oliveira R, Lim J, et al. *Arabidopsis* gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes: implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation [J]. Plant Cell, 1998, 10: 741-752.
- [37] 谢祝捷, 姜东, 戴廷波, 等. 植物的糖信号及其对碳氮代谢基因的调控 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38: 399-405.
- [38] Yanagisawa S, Akiyama A, Kikawa H, et al. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 7833-7838.

Research Progress on the Enzymes During Plant Nitrogen Assimilation

ZHANG Hua-zhen, XU Heng-yu

(Zhoukou Vocational and Technical College, Zhoukou, Henan 466001)

Abstract: Nitrogen assimilation was the process that the plant uptakes NO_3^- and NH_4^+ from the environment to synthesize amino acids and proteins, involving many enzymes. In this paper, the related enzymes were reviewed and the review had great significance for further research on improving nitrogen assimilation rate.

Key words: plant; nitrogen assimilation; nitrate reductase; nitrite reductase; glutamine synthetase; glutamate synthase

ISSN 1003-4749
CN 41-1392/S

《种业导刊》 服务种业

主管：河南省农业科学院 主办：河南省农业科学院
农业经济与信息研究中心
河南省种业商会

本刊创刊于1981年



邮发代号：36-119
单价：8元 全年96元

欢迎投稿、订阅、刊登广告

地址：河南省郑州市花园路116号 邮编：450002

单位：河南省农业科学院《种业导刊》编辑部

电话/传真：0371-65727121 65719198 87000220 (广告部)

电子信箱：zydaokan@126.com