

玉米 1,3,4-三磷酸肌醇 5/6 激酶 ITPK 家族基因的鉴定和分析

张中保, 李向龙, 吴忠义, 魏建华

北京市农林科学院生物中心; 北京市农业基因资源与生物技术重点实验室, 北京 100097

摘要 1,3,4-三磷酸肌醇 5/6-激酶 (ITPK) 是一种在动物、植物、线虫中都比较保守的多功能酶, 在生物信号传导及生长发育中起重要作用。为了充分研究玉米中 ITPK 家族基因系统分析、全生育期基因表达模式及逆境胁迫表达模式, 利用玉米基因组数据库, 通过生物信息学手段, 鉴定玉米 ITPK 家族基因的全序列、定位和编码蛋白, 通过序列比对进行进化和分类分析。利用玉米高通量芯片表达数据进行组织表达差异性、干旱胁迫和病害胁迫表达谱分析。结果表明, 玉米基因组中含有 6 个 ITPK 家族基因, 分布于玉米的 4 条染色体上。MEME 保守结构域分析显示, *ZmITPK1-5* 均含有 3 个保守的 ATP-grasp-4 结构域, *ZmITPK6* 含有两个 ATP-grasp-4 保守结构域。进化树分析表明 *ZmITPK* 可分为 3 个亚家族。各个发育阶段中, 多数成员在生殖器官或营养器官中均有较高的表达量, 只有 *ZmITPK1* 在所有器官中表达量都不高。*ZmITPK2* 和 *ZmITPK3* 基因受干旱胁迫处理诱导不同程度上调表达。而在生物胁迫条件下均无显著上调或下调表达。

关键词 玉米; 三磷酸肌醇 5/6 激酶; 保守结构域; 表达模式

中图分类号 S513

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.16.006

Genome-wide analysis and identification of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase gene family in maize (*Zea Mays*.L.)

ZHANG Zhongbao, LI Xianglong, WU Zhongyi, WEI Jianhua

Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences; Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing 100097, China

Abstract On the basis of maize genome database and bioinformatics method, we obtained maize ITPK family genes and their positions on chromosome and duplication information. ITPK proteins were classified according to their phylogenetic relationship. A total of 6 *ZmITPK* genes were systematically identified from maize and located on 4 chromosomes. Multiple alignment and motif display results indicated that all *ZmITPK* proteins share two or three conserved ATP-grasp-4 domains. Phylogenetic analysis revealed that the *ZmITPK* family could be divided into three groups. Microarray data showed that the *ZmITPK* genes had tissue-specific expression patterns in various maize developmental stages and in response to biotic and abiotic stresses. The results indicated that *ZmITPK2* and 3 were induced by drought stress in the maize inbred lines Han21 and Ye478. While, all of *ZmITPK* genes were not induced by three pathogens.

Keywords maize; trisphosphate 5/6-kinase; conserved domains; expression profile

1,3,4-三磷酸肌醇 5/6-激酶 (EC 2.7.1.159) (ITPK) 是一种在动物、植物、线虫中都比较保守的多功能酶^[1]。ITPK 催化

1,3,4-三磷酸肌醇在 5 或 6 位磷酸化, 生成两种四磷酸肌醇产物: 1,3,4,5-四磷酸肌醇 (Ins(1,3,4,5)P₄) 和 1,3,4,6-四磷酸肌醇

收稿日期: 2015-07-13; 修回日期: 2015-07-20

基金项目: 北京市科技新星计划项目 (Z121105002512031); 北京市农林科学院青年科研基金项目 (QNJJ201303); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (KJCX20140202)

作者简介: 张中保, 副研究员, 研究方向为玉米转基因及分子生物学, 电子信箱: zwu22@126.com

引用格式: 张中保, 李向龙, 吴忠义, 等. 玉米 1,3,4-三磷酸肌醇 5/6 激酶 ITPK 家族基因的鉴定和分析[J]. 科技导报, 2015, 33(16): 46-50.

(Ins(1,3,4,6)P6)^[2]。在动物中的研究表明,ITPK可以磷酸化与胁迫应答相关的两种转录因子 c-Jun 和 ATF2^[3],该激酶可能通过调控转录因子参与动物的胁迫应答^[4]。

ITPK 在调控细胞内 Ca²⁺平衡过程起重要作用。三磷酸肌醇(IP3)作为细胞信号传导过程中重要的第二信使,介导 Ca²⁺从内质网释放到细胞质中^[5,6]。IP3经 ITPK 和 1,4,5-三磷酸肌醇 3-激酶(IP3K)磷酸化形成四磷酸肌醇(IP4)。IP4作为一个新的第二信使协同IP3完成Ca²⁺在细胞质中的积累^[3,5,7]。ITPK和IP3K通过控制IP3和IP4在细胞内的浓度来维持Ca²⁺平衡^[8]。因此ITPK可能通过调控细胞内Ca²⁺平衡来参与生物的逆境胁迫反应。研究发现,原生虫(*E. histolytica*)的ITPK基因的表达受热诱导^[1],表明原生虫的ITPK参与了逆境胁迫反应。陈其军等对拟南芥3个ITPK基因在正常和胁迫条件下的表达进行了Northern blot分析,结果表明,其中2个基因可能分别以依赖于ABA和不依赖于ABA的方式参与对逆境胁迫的反应^[9]。在盐处理的盐生植物冰草中也发现ITPK似物的存在(在GenBank上的登录号为BE037040)。

玉米相关研究中,还未曾见到ITPK家族基因系统分析、全生育期基因表达模式及逆境胁迫分析的报道。本研究重点分析玉米ITPK家族基因进化关系及编码蛋白保守结构域,利用高通量芯片表达数据对玉米ITPK家族基因的组织表达特异性及干旱和生物胁迫表达模式进行剖析。

1 材料与方 法

1.1 玉米 ITPK 家族基因全基因组数据、蛋白序列和 cDNA 数据的获得

拟南芥和水稻的ITPK基因及蛋白序列分别下载自TAIR数据库(<http://www.arabidopsis.org>)和TIGR数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu>)。高粱的ITPK基因及蛋白序列下载自Gramene数据库(<http://www.gramene.org/Multi/blastview>)。玉米ITPK全基因组数据、蛋白序列和cDNA数据均下载自Gramene数据库(<http://www.gramene.org/Multi/blastview>)。

1.2 ITPK 家族基因系统进化树的构建及编码蛋白保守结构域分析

通过Clustal X2.0^[10]软件对玉米、拟南芥、水稻和高粱的

ITPK蛋白进行多序列比对分析,将序列比对结果使用MEGA 4.0软件^[11],及Neighborjoining法生成ITPK家族基因的系统进化树,Bootstrap值设置为1000。应用在线软件MEME(multiple expectation maximization for motif elicitation, <http://meme.nbcrl.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>)对玉米、拟南芥、水稻和高粱的ITPK蛋白保守结构进行分析^[12]。

1.3 玉米 ITPK 家族基因组织特异性、干旱胁迫和生物胁迫表达谱分析

玉米ITPK家族基因的转录组表达芯片数据下载于PLEXdb(<http://www.plexdb.org>)。该芯片数据由美国威斯康星大学Kaepler提供(NCBI/GEO登录号GSE27004),该数据描述了玉米B73全生育期的表达数据(不同发育时期的13类组织,共计60个样品)^[13,14]。GEO数据干旱胁迫数据GSE16567、茎腐病(*F. moniliforme*)GSE19501、玉米丝黑穗病(*S. reiliana*)GSE29747和玉米炭疽病(*C. graminicola*)GSE31188)均下载于NCBI GEO表达数据库^[15-17](茎腐病实验组数据为接种后4 d叶片检测结果;丝黑穗病实验组数据为接种种子后28 d叶片检测结果;玉米炭疽病实验组数据为接种后36 h叶片检测结果(处理1)和接种后96 h叶片检测结果(处理2),对照组数据均为不接菌培养相应时间的叶片检测结果)。

使用MultiExperiment Viewer(MeV, v 4.8.1)软件对玉米ITPK家族基因的表达数据进行分析,热图生成的参数设置为完全连锁聚类方法(complete linkage clustering method)和欧氏距离度量法(euclidean distance metric)。

2 结果与分析

2.1 玉米 ITPK 家族基因的鉴定和命名

通过对玉米maizesequence数据库及NCBI数据库比对分析,共获得6个*ZmITPK*基因,这6个基因编码蛋白均含有保守的ITPK结构域。这6个*ZmITPK*基因分布于玉米的1、5、7和9四条染色体上。根据玉米ITPK和水稻ITPK进化树关系,将这6个基因分别命名为*ZmITPK1*~6(表1)。除了*ZmITPK4*和*ZmITPK5*只含有一个外显子,其他4个基因均含有10个及以上内含子(图1)。

表1 玉米ITPK家族基因的基本特征
Table 1 Characteristics of ITPK genes in maize

基因名称	基因登录号	蛋白登录号	氨基酸数	染色体编号	外显子个数
<i>ZmITPK1</i>	GRMZM2G149903_T01	GRMZM2G149903_P01	343	1	10
<i>ZmITPK2</i>	GRMZM2G167957_T02	GRMZM2G167957_P02	386	9	11
<i>ZmITPK3</i>	GRMZM2G179473_T01	GRMZM2G179473_P01	348	1	10
<i>ZmITPK4</i>	GRMZM2G084609_T01	GRMZM2G084609_P01	374	5	1
<i>ZmITPK5</i>	GRMZM2G456626_T01	GRMZM2G456626_P01	342	1	1
<i>ZmITPK6</i>	NM_001152843	NP_001146315	502	7	12

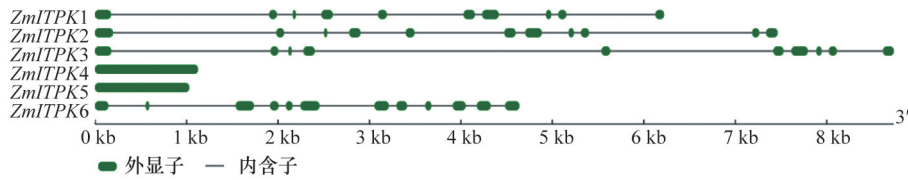


图1 玉米 ITPK 家族基因结构分析

Fig. 1 Gene structure of the maize ITPK gene family

2.2 玉米 ITPK 家族基因的系统进化分析与分类

对玉米6个 ZmITPK 蛋白与拟南芥(4个)、水稻(6个)和高粱(6个)ITPK 蛋白进行多重序列比对和进化树分析。结果显示,这22个 ITPK 分为3个亚家族,分别含有11、7、4个成员,且3个亚家族均含有这4种物种的 ITPK 蛋白(图2)。

2.3 玉米 ITPK 家族基因编码蛋白保守结构域分析

经 MEME 在线软件分析,可知玉米、拟南芥、水稻、和高粱 ITPK 蛋白大部分均含有3个保守的 ATP-grasp-4 保守结构域(Motif1-3),玉米 ZmITPK6、拟南芥 AtITPK 4、水稻 OsITPK6 和高粱 Sb02g030090 ITPK 蛋白只含有2个保守结构域。进化树分析结果显示,ZmITPK6、AtITPK 4、OsITPK6 和 Sb02g030090 四个蛋白均聚类到第III亚家族。这表明进化关系较近的蛋白可能含有相似的保守结构域(图3)。

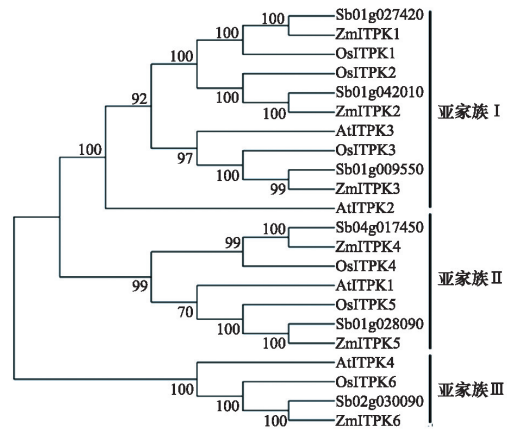


图2 玉米、水稻、拟南芥和高粱 ITPK 蛋白进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree for *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis* and *Sorghum* ITPK

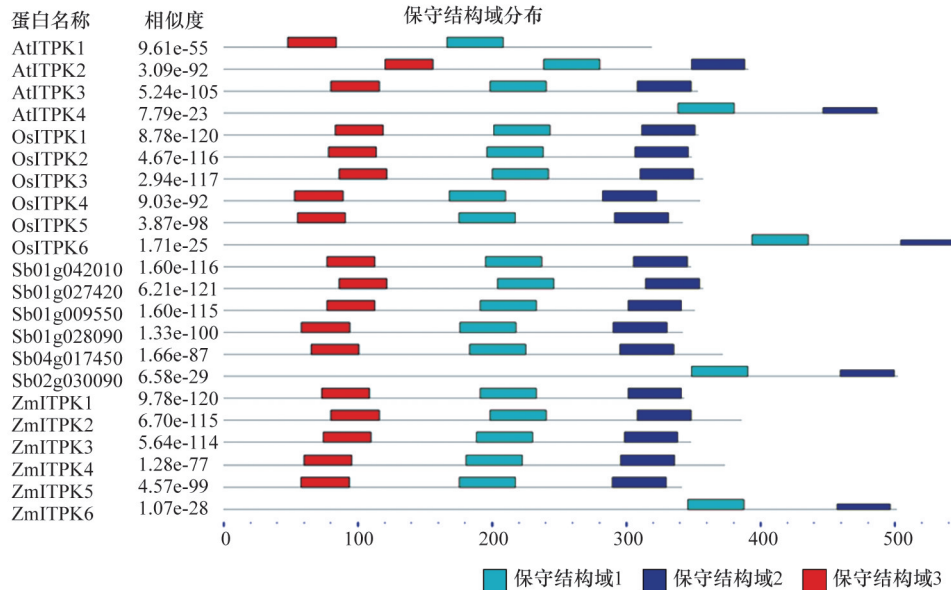


图3 玉米、拟南芥、水稻和高粱 ITPK 家族基因编码蛋白保守结构域分布

Fig. 3 Distribution of conserved motifs in maize, *Arabidopsis*, rice and *Sorghum* ITPK proteins

2.4 玉米 ITPK 家族基因组织特异性表达分析

通过分析玉米转录组芯片数据可知(图4),在玉米全生育期的不同组织中,基因 ZmITPK1 在叶子、节间和主根中表达量较高;ZmITPK2 在叶子、叶鞘、叶尖端、授粉后的穗子、花丝和种子中有较高的表达量;ZmITPK3 在生殖器官胚乳和种

子中表达量较高;ZmITPK4 主要在叶子、叶鞘和主根表达。ZmITPK1、ZmITPK2 和 ZmITPK4 主要在营养器官中表达,但是在生殖器官如胚、胚乳和果皮中表达量相对较低,而 ZmITPK5 和 ZmITPK6 主要在生殖器官雄穗、胚和种子中表达,同时 ZmITPK6 在胚芽鞘中也具有较高表达量。

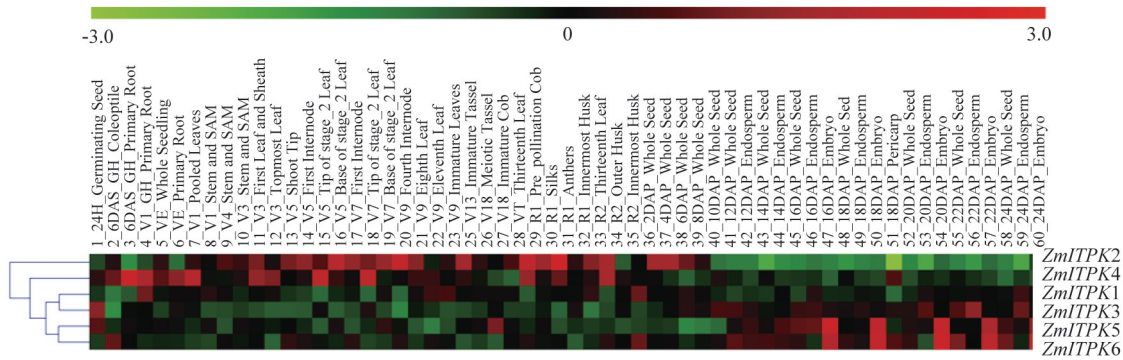


图4 玉米ITPK家族基因组织特异表达模式

Fig. 4 Organ-specific expression patterns of *ZmITPK* genes detected in the microarray data

2.5 玉米ITPK家族基因逆境诱导表达分析

GEO 数据分析结果仅能搜索到 *ZmITPK2*、*ZmITPK3*、*ZmITPK5*、*ZmITPK6* 这 4 个基因的表达数据。经对比分析,结果表明,干旱处理条件下(图5),同一个基因在不同的玉米自交系早 21 和掖 478 中具有相似的表达模式。*ZmITPK2* 在中度干旱(叶片相对含水量:Han21:72.4%,掖478:66.2%^[15])和重度干旱(叶片相对含水量:Han21:53.1%,掖478:41.4%^[15])胁迫条件下,均表现上调表达模式,复水后表达量恢复正

常。*ZmITPK3* 在重度干旱胁迫时表现上调表达,复水后表达量恢复正常。*ZmITPK5* 和 6 在中度和重度干旱胁迫条件下均被抑制表达,复水后表达量恢复正常。在生物胁迫条件下(茎腐病:*F. moniliforme*, 玉米丝黑穗病:*S. reiliana*, 玉米炭疽病:*C. graminicola*) (图6), *ZmITPK2*, 3, 5 和 6 均无显著上调或下调表达。这表明,可能在玉米应答该 3 种生物胁迫时 *ZmITPK2*、*ZmITPK3*、*ZmITPK5* 和 *ZmITPK6* 四个基因无明显的功能。

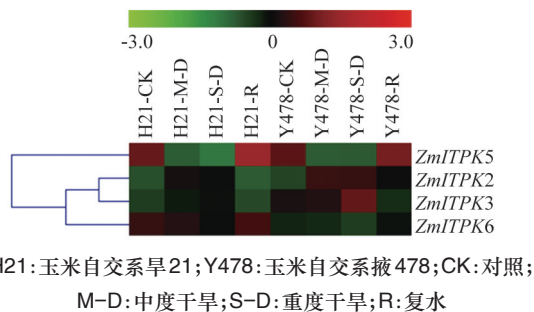


图5 *ZmITPK2*, 3, 5 和 6 基因在干旱胁迫下的表达模式

Fig. 5 Expression levels of *ZmITPK2*, 3, 5 and 6 genes under drought stresses

3 讨论

鉴定了玉米 6 个 ITPK 基因,根据其与水稻 ITPK 进化树关系命名为 *ZmITPK1*~6。Du 等研究表明水稻和高粱中 ITPK 基因家族均含有 6 个成员,这说明在进化过程中单子叶植物 ITPK 基因家族成员个数可能是保守的;系统进化树分析结果(图2)表明,3 个亚家族中均含有玉米、水稻、高粱和拟南芥的 ITPK 基因,这表明在进化过程中无论是单子叶还是双子叶植物,其 ITPK 基因家族成员均分为保守的 3 个亚家族;同时玉米、水稻、高粱和拟南芥的 ITPK 蛋白均含有保守的 ATP-grasp-4 蛋白结构域(图3)。这些结果表明,植物 ITPK 基因家族在进化过程可能是保守的。

本研究利用高通量芯片表达数据对玉米 ITPK 家族基因

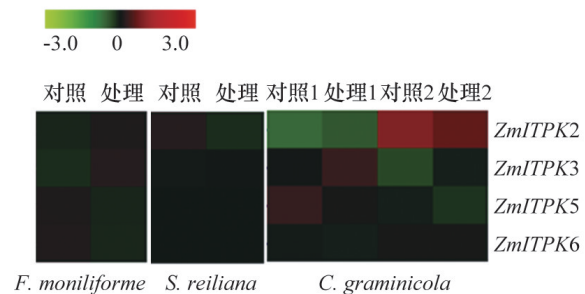


图6 *ZmITPK2*, 3, 5 和 6 基因在生物胁迫下的表达模式

Fig. 6 Expression levels of *ZmITPK2*, 3, 5 and 6 genes under biotic stresses

的组织表达特异性进行分析(图4)。结果显示,*ZmITPK1*, 2 和 4 主要在营养器官中表达,但是在生殖器官如胚、胚乳和果皮中表达量相对较低,而 *ZmITPK5* 和 6 主要在生殖器官雄穗、胚和种子中表达。这表明基因家族中的成员在不同的组织器官中表达量不尽相同,进而可能发挥不同的功能,这也可能进一步表明在进化过程中,基因家族成员通过复制和变异来调控植物的生长发育。

拟南芥 3 个 ITPK 家族基因在正常和胁迫条件下的表达结果表明,其中 2 个基因可能分别以依赖于 ABA 和不依赖于 ABA 的方式参与对逆境胁迫的反应^[9],该研究初步证明植物 ITPK 基因可能参与逆境胁迫应答。本研究结果表明, *ZmITPK2* 和 *ZmITPK3* 基因受干旱胁迫处理诱导不同程度上

调表达(图5),并且启动子顺式作用元件分析显示(结果未显示),*ZmITPK2*和*ZmITPK3*基因启动子区域含有ABRE(ABA responsive element)^[18,19]、DRE(dehydration-responsive element)^[20]等与逆境胁迫相关的顺式作用元件,这些事实说明,*ZmITPK*基因启动子区域含有的逆境胁迫相关的顺式作用元件与该基因应答不同的逆境胁迫有密切的相关性。与*ZmITPK2*进化关系较近的水稻*OsITPK2(DSM3)*在应答干旱和盐胁迫时也起重要作用^[8]。拟南芥、玉米和水稻的ITPK基因均表现出对不同逆境胁迫的应答,初步证明单子叶和双子叶植物ITPK基因均可能参与逆境胁迫应答。

4 结论

鉴定了玉米基因组中6个ITPK家族基因,这6个基因分布于玉米的4条染色体上。*ZmITPK1~5*均含有3个保守的ATP-grasp-4结构域,*ZmITPK6*含有两个ATP-grasp-4保守结构域。各个发育阶段中,*ZmITPK2~6*在生殖器官或营养器官中均有较高的表达量,只有*ZmITPK1*在所有器官中表达量均较低。*ZmITPK2*和*ZmITPK3*基因受干旱胁迫处理诱导不同程度上调表达。而在生物胁迫条件下均无显著上调或下调表达。

参考文献(References)

[1] Field J, Wilson M P, Mai Z, et al. An *Entamoeba histolytica* inositol 1, 3,4- trisphosphate 5/6-kinase has a novel 3-kinase activity[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2000, 108(1): 119-123.

[2] Vebrsky J W, Wilson M P, Kisseleva M V, et al. The synthesis of inositol hexakisphosphate[J]. Journal of Biological Chemistry. 2002, 277(35): 31857-31862.

[3] Wilson M P, Sun Y, Cao L, et al. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a protein kinase that phosphorylates the transcription factors c-Jun and ATF-2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(44): 40998-41004.

[4] Sun Y, Wilson M P, Majerus P W. Inositol 1,3,4- trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(48): 45759-45764.

[5] Mignery G A, Johnston P A, Sudhof T C. Mechanism of Ca²⁺ inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP3) binding to the cerebellar InsP3 receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(11): 7450-7455

[6] Richardson A, Taylor C W. Effects of Ca²⁺ chelators on purified inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors and InsP3-stimulated Ca²⁺

mobilization[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(16): 11528-11533.

[7] Hill T D, Dean N M, Boynton A L. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate induces Ca²⁺ sequestration in rat liver cells[J]. Science, 1988, 242(4882): 1176-1178.

[8] Du H, Liu L, You L, et al. Characterization of an inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6- kinase gene that is essential for drought and salt stress responses in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 77: 547-563.

[9] Chen Q J, Niu X G, Chai M F, et al. Isolation of an *Arabidopsis* gene encoding Ins(1,3,4)P3 56/- kinase-like protein and involved in plant response to abiotic stresses[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45: 211-218.

[10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.

[11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.

[12] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: 202-208.

[13] Sekhon R S, Childs K L, Santoro N, et al. Transcriptional and metabolic analysis of senescence induced by preventing pollination in maize[J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1730-1744.

[14] Sekhon R S, Lin H, Childs K L, et al. Genome-wide atlas of transcription during maize development[J]. Plant Journal, 2011, 66(4): 553-563.

[15] Zheng J, Fu J, Gou M, et al. Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(4-5): 407-421.

[16] Ghareeb H, Becker A, Iven T, et al. *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize[J]. Plant Physiology, 2011, 156(4): 2037-2052.

[17] Voll L M, Horst R J, Voitsik A M, et al. Common motifs in the response of cereal primary metabolism to fungal pathogens are not based on similar transcriptional reprogramming[J]. Front Plant Science, 2011, 2: 39.

[18] Pla M, Vilardell J, Gultinan M J, et al. The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21(2): 259-266.

[19] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters [J]. Trends Plant Science, 2005, 10(2): 88-94.

[20] Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses[J]. Plant Journal, 2003, 34(2): 137-148.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映中国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域中国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。