

硝酸还原酶活性的调节及可能机制的研究进展

张涛¹, 陈云², 谢虹², 梁建生^{2*}

(1. 扬州大学农学院, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 氮素是农业研究的重点, 硝酸还原酶是氮代谢中的一个关键酶。有关硝酸还原酶的研究一直是植物生理生化研究的重点。该文就近年来有关硝酸还原酶活性调节的可能机制的研究进展作了简要的综述。

关键词: 硝酸还原酶; 蛋白激酶; 磷酸酯酶; 14-3-3 蛋白

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)04-0367-06

The research progress of the regulation of nitrate reductase activity and the possible mechanism

ZHANG Tao¹, CHEN Yun², XIE Hong²,
LIANG Jian-sheng^{2*}

(1. College of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Biological Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Nitrogen is an emphasis in the study of agriculture. The study of nitrate reductase, which is a key enzyme in the metabolism of nitrogen, is always important in life science. This article summarizes the research progress of the regulation of nitrate reductase activity and the possible mechanism in recent years.

Key words: nitrate reductase; protein kinase; phosphorylation; 14-3-3 protein

硝酸还原酶(nitrate reductase, NR, EC. 1. 6. 6. 1/2)是氮代谢过程中的一个重要的调节酶和限速酶。在植物的根和叶中都有该酶的存在, 它是一种可溶性的钼黄素蛋白, 由黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、细胞色素 b₅₅₇ 和钼等辅助因子组成。研究表明, NR 催化的反应不是唯一的, 它能够催化 2 个电子从 NAD(P)H + H⁺ 至 NO₃⁻, 使后者转变为 NO₂⁻; 还可以催化一个电子从 NAD(P)H + H⁺ 至 NO₂⁻ 生成 NO (Yamasaki 等, 1999); 还有报道 NR 能催化 1 个电子从 NAD(P)H + H⁺ 至 O₂ 生成超氧自由基(图 1) (Barber 和 Kay, 1996; Yamasaki 和 Sakihama, 2000)。

在正常情况下, 还原 NO₃⁻ 为 NO₂⁻ 的反应是硝酸还原酶催化反应的主流, 反应在细胞质中进行。

NR 催化 NO₂⁻ 生成 NO 的反应只占催化 NO₃⁻ 还原能力的很小百分比(约 1%), 尽管产生 NO 的量很少, 但其对植物的一些生理活动有着重要的调节及影响, Radhika Desilan 等发现, NR 催化 NO₂⁻ 产生的 NO 在 ABA 诱导气孔关闭的过程中有重要的作用, 通过对 ABA 钝感型等突变体的研究发现, NR 催化的 NO 的生成是 ABA 诱导气孔关闭所需的。但是 NO 在其他生理活动中的作用机理尚不清楚 (Kaiser 和 Huber, 2001)。

1 硝酸还原酶的组成

研究发现, 高等植物的 NR 似乎是由相同亚基组成的二聚体, 每个亚基含有 3 个辅助因子, 即

收稿日期: 2003-03-24 修订日期: 2003-09-24

作者简介: 张涛(1979-), 男, 山东威海人, 硕士研究生, 植物学专业。* 为通讯作者

FAD、血红素(细胞色素 b_{557})和钼辅因子(MoCo)。每个辅因子相当于一个氧化还原中心。MoCo是一个取代的嘌呤基(又称钼嘌呤),含有由两个硫配体结合的钼。用限制性内切酶对菠菜 NR 进行酶切,发现二聚体结构的分子具有 75 KDa 含钼的区域,血红素辅基与 14 KDa 区域相联系,而 FAD 辅基包含在 28 KDa 的区域,3 个区域似乎通过铰链区域(hinge regions)连接。通过对高等植物 NR 的克隆和序列分析得知:MoCo 结合区域位于蛋白质 N-末端,血红素结合区域位于蛋白质的中心区域,FAD 结合区域位于蛋白质的 C-末端。后来得知, NR 分子中电子的传递途径是 $NAD(P)H + H^+ \rightarrow FAD \rightarrow$ 细胞色素 $b_{557} \rightarrow$ 钼嘌呤 \rightarrow 硝酸盐(宋松泉等,1993; Ahmad 和 Abdin,1999)。

在大多数高等植物中, NR 以 NADH 为电子供体,这种 NR 对 NO_3^- 有相对低的 K_m 值。而在水稻幼苗、大豆等植物中, NR 可以从 $NADH + H^+$ 或 $NADPH + H^+$ 得到电子,并且以 $NADPH + H^+$ 为电子供体时活性较高。Ahmad 等(1999)发现芥菜幼苗期,当营养液中的 NO_3^- 浓度较低时,以 NADH 为电子供体的 NR 催化占主导,随着 NO_3^- 浓度的升高,以 NADPH 为电子供体的 NR 催化占据了主导作用。

2 硝酸还原酶活性调节机制

2.1 硝酸还原酶的活性状态

NR 对环境条件十分敏感,光、 NO_3^- 含量、 CO_2 浓度等均会影响其活性。例如菠菜由光下移至暗中几分钟后,其叶片 NR 便明显地失活,而 NR 蛋白的合成或降解无法在如此短时间内达到这样的结果(Kaiser 和 Forster,1989)。可以设想,植物体内存在一种机制,能快速准确地调控 NR 的活性以适应环境条件的改变。这种改变可能只是 NR 蛋白自身的改变,并没有涉及到转录或翻译水平。用凝胶柱层析的方法除去粗酶液中的小分子化合物后, NR 仍可以保持相当的活性,这说明该酶不是变构调节(allosteric modulation),其活性的改变是由于 NR 蛋白的修饰而实现的,由此推测最有可能的机制是蛋白的氧化/还原或蛋白的磷酸化/去磷酸化,由于还原剂二硫苏糖醇(DTT)或氧化剂过氧化氢对 NR 的活性影响不大(Kaiser 和 Huber,1994),因而得知 NR 活性的调节不是由蛋白的氧化/还原引起的。

通过 ^{32}P 标记技术,发现菠菜 NR 蛋白在 Ser₅₄₃ 可以被磷酸化,并引起 NR 的失活。后来又发现,磷酸化不是 NR 失活唯一的原因,它还需要额外的蛋白的参与(Kaiser 和 Huber,2001),这类蛋白即 14-3-3 蛋白家族。在有毫摩尔每升浓度级的游离 Mg^{2+} 存在的情况下,14-3-3 蛋白(14-3-3s)与 NR 的磷酸化位点结合,从而导致 NR 失活(Aitken,1996; Moorhead 等,1999)。所以推测细胞中 NR 可能存在 3 种状态:①自由的 NR(具有酶活性);②被磷酸化的 NR(pNR,具有酶活性);③14-3-3s 结合的磷酸化 NR(pNR:14-3-3s,无酶活性)(Kaiser 等,2002)。以上三种状态的 NR 的比率是可变的,且主要是由环境因素决定的,当外界条件例如光、 NO_3^- 、 CO_2 等发生改变时,三种 NR 活性状态的比率会发生可逆而迅速的变化,现在认为这是暗处理一段时间后,菠菜叶片中 NR 快速地失活的主要原因。

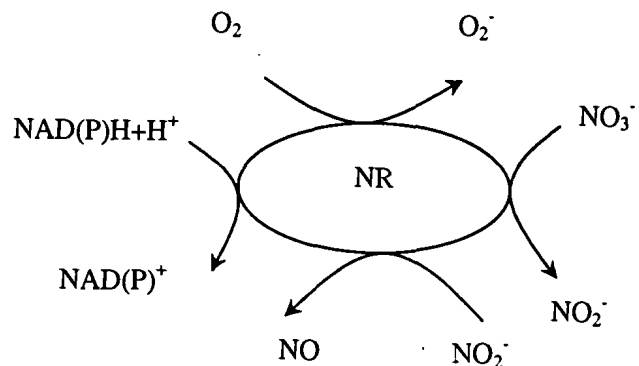


图 1 NR 催化反应示图(由还原性辅酶提供电子, NR 可以催化三种不同的反应)

Fig. 1 Reactions catalyzed by NR(NAD(P)H+H⁺ afford electron, NR can catalyze three reactions)

1. NO_3^- 还原成 NO_2^- ; 2. NO_2^- 还原成 NO;
3. O_2 还原成超氧自由基。

1. Deoxidize NO_3^- to NO_2^- ; 2. Deoxidize NO_2^- to NO;
3. Deoxidize O_2 to O_2^- .

2.1.1 14-3-3 蛋白家族 14-3-3s 是起广泛调节作用的一类蛋白。最先发现 14-3-3s 是存在于动物中的含量丰富、酸性的、可溶性的脑蛋白,其分子量为 25~32 kDa。但随着植物领域的进一步研究,发现在所有的已研究的真核生物器官中均有 14-3-3s 家族成员的存在, Rosenquist 等列出在 48 个品种中有 153 种该类蛋白。14-3-3s 有着高度的序列一致性,即使在不同的品种内,它也可以对靶蛋白起作用。14-3-3s 一般是通过与目标蛋白结合而起作用的,目标蛋白通常会有磷酸化位点,14-3-3s 可以识别该位

点, 结合后起到调节的作用。Muslin 等发现 14-3-3s 识别的位点通常有 RSXpSXP 序列(X 表示任意一种氨基酸, pS 表示磷酸化的 Ser。)(Muslin 等, 1996), 当然 14-3-3s 还可以与其他的磷酸化片断或非磷酸化片断结合(Masters 等, 1999)。

在高等植物中, 14-3-3s 可以调节众多的生物代谢过程, 甚至在拟南芥中, 由于 14-3-3s 的这种广泛调节作用, 又称之为广泛调节因子(GRFs)(Rooney 和 Ferl, 1995)。14-3-3s 能够调节蛋白激酶 C 的活化(Toker 等, 1990), 通过植物质膜 H^+ -ATP 酶调节质子泵(Oecking 等, 1994), 调节植物代谢过程中的关键酶(Bachmann 等, 1996; Toroser 等, 1998), 如在氮代谢过程中, 它可以改变 NR 和谷氨酰胺合成酶等的活性状态。

2.2 硝酸还原酶活性状态转换的可能机制

有研究表明, NR 可以在 MoCo 区域与血红素区域之间的铰链区域被磷酸化, 从而产生了一个可与 14-3-3s 结合的位点(Bachmann 等, 1996)。当有毫摩尔每升浓度级的游离 Mg^{2+} 存在时, 14-3-3s 结合到 pNR 上, 使之失去活性。当没有 Mg^{2+} 存在时(加入 EDTA), 所有的 NR 处于活性状态(100%), 当存在 Mg^{2+} 时, NR 活性为实际活性状态(x%)。NR 活性状态的转换可以表示为图 2(Kaiser 和 Huber, 2001)。

2.2.1 硝酸还原酶的磷酸化与去磷酸化

用阴离子交换色谱分析菠菜的叶片提取液, 可以测得数个 NR 激酶(PK)峰, 这些激酶可以磷酸化 NR 的 Ser₅₄₃ 位, 并产生 14-3-3s 结合位点。一种激酶是 SNF1 相关酶(SnRK1)(Subden 等, 1999), 这种酶本身可能被代谢物抑制。另外两种激酶属于 CD-PKs(Calcium-dependent protein kinases)。现在还不清楚 SNF1 相关酶或 CDPKs 是如何磷酸化 NR 或如何通过其它信号调控 NR 的, 但暗中叶片细胞内 Ca^{2+} 浓度伴随 NR 磷酸化、失活的同时而升高的现象可能提供一条研究线索(Miller 和 Sanders, 1987)。

pNR 的去磷酸化是由磷酸酯酶 2A 催化的(PP2A), 它主要存在于胞浆内, 但现在对植物中该酶的结构及组成所知不多, 仅知道其作用于 pNR 的活性也受代谢物的调节。另有研究发现, 去磷酸化并非活化 NR 的唯一途径(Mackintosh 和 Meek, 2001), 一些小分子, 包括磷酸盐、EDTA 和 AMP 也能活化 NR(Aguera 等, 1999; Kaiser 等, 1992)。而

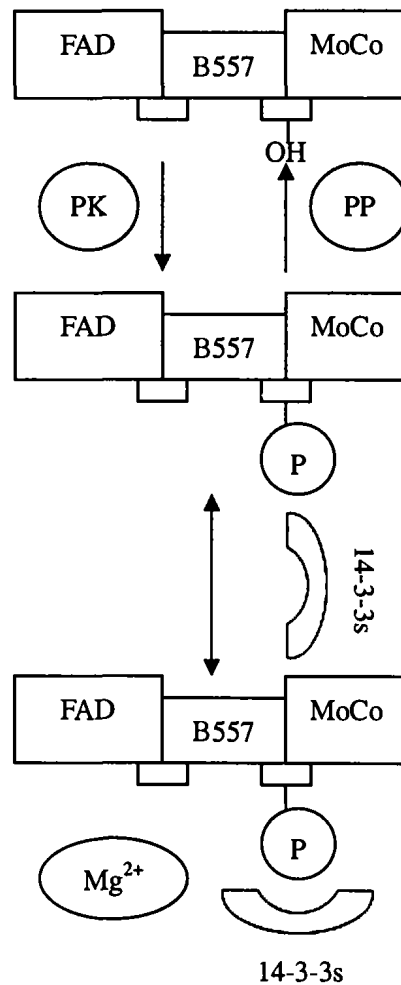


图 2 NR 的活性状态及参与分子

Fig. 2 NR activity state and the relevant molecules

PK 催化 NR 的磷酸化, PP 催化 NR 的去磷酸化。NR 的磷酸化状态并不失去活性, 但由于 NR 的磷酸化, 使得 14-3-3s 能够在 Mg^{2+} 存在的条件下与 pNR 结合, 最终导致 NR 的失活。

NR can be phosphorylated by PK and dephosphorylated by PP. with the existence of Mg^{2+} , 14-3-3s can combine with Phosphorylated NR. The state of pNR, 14-3-3s has no activation.

14-3-3s 与 pNR 结合后会阻碍 pNR 的去磷酸化, 因为 14-3-3s 结合后的 pNR 的去磷酸化比 pNR 的去磷酸化速度更缓慢(Bachmann 等, 1996)。Bachmann 等人认为 14-3-3s 使 NR 的去磷酸化减缓的原因是使 NO_3^- 的还原减慢, 从而光合作用能够提供 NH_4^+ 转化为氨基酸所需足够的碳骨架。还有人认为 14-3-3s 与 NR 结合后会稳定 NR 的磷酸化状态, 阻止去磷酸化。

蛋白激酶的作用与其底物 ATP 水平有关, 缺氧条件下, 组织中 ATP 水平下降, NR 被活化, 这可

能是 NR 磷酸酯酶的作用超过 NR 激酶的作用 (Glaab 和 Kaiser, 1993)。总之,在一般情况下,蛋白激酶和磷酸酯酶的共同作用使得 NR 和 pNR 处于动态的平衡,该平衡会被外界因素快速地调节。

2.2.2 14-3-3 蛋白与硝酸还原酶的结合 现在已经清楚 14-3-3s 在植物及真菌等生物体中起重要的调节作用 (Aitken, 1996)。天然存在的 NR 分子与 14-3-3s 结合的位点是在第一铰链区域可被磷酸化的 Ser₅₄₃附近的序列 (Bachmann 等, 1996)。14-3-3s 与 pNR 结合后引起 NR 失活的原因可能是使 NR 的空间结构发生改变,进而导致 MoCo 区域与血红素区域间的电子传递无法进行 (Kaiser 和 Huber, 2001)。Weiner 和 Kaiser (1999) 利用突变体的研究发现,每个 NR 分子可以与 2 个 14-3-3s 结合,于是推测 NR 分子上可能存在另外一个 14-3-3s 结合位点 (Pigaglio 等, 1999; Weiner 和 Kaiser, 2001), 14-3-3s 与该位点结合的作用可能是稳定 NR 的磷酸化状态,另外还有研究证明除了 Ser₅₄₃ 位点, NR 的 N 末端也参与了 14-3-3s 的结合。

当有二价阳离子存在时,14-3-3s 与磷酸化片段的连接会得到促进 (Athwal 等, 1998)。Provan 等发现,要想分离出 14-3-3s 结合的烟草 pNR,必须要有游离 Mg²⁺ 的存在 (Sugden 等, 1999),这进一步证实了只有毫摩尔每升浓度级的游离 Mg²⁺ 时,14-3-3s 才会与 pNR 结合并使之失活的说法。在光/暗转换的条件下, Mg²⁺ 的存在会明显改变 NR 活性。Kaiser 等 (2001) 推测金属阳离子在 NR 活性调节中可能起以下几个作用: (1) 蛋白激酶本身是一个 Ca 离子依赖酶; (2) 蛋白激酶的底物是 Mg²⁺-ATP; (3) 金属阳离子是使 pNR-14-3-3s 复合体失活所必需的。但至今仍不清楚金属阳离子是在 14-3-3s 与 pNR 结合中所必需的,还是 pNR-14-3-3s 复合体失活中所必需的,或者起到以上二者作用 (Weiner 和 Kaiser, 1999)。

由上文所述, NR 的三种活性状态中只有 14-3-3s 结合 pNR 态无活性,所以 14-3-3s 的结合与否很重要。有试验证明,营养条件、激素均可能对 14-3-3s 进行翻译后调节,从而改变 14-3-3s 与 pNR 的结合比例,进一步调节 NR 的活性 (Mackintosh 和 Meek, 2001)。另外, 14-3-3s 是一类起广泛调节作用的蛋白家族, pNR 不是它们的唯一受体,细胞内 14-3-3s 含量远高过 NR 的量,二者要想结合, pNR 必须要和可与 14-3-3s 结合的磷酸化片段竞争,该

竞争也在 NR 的活化/去活化过程中起一定的调节作用 (Camoni 等, 1998)。

在 NR 参与磷酸化失活的位点的研究中, 首先发现马铃薯 NR 的 N-末端参与了该酶磷酸化失活的过程。Pigaglio 等 (1999) 发现 NR 蛋白的 N-末端氨基酸去除后, 较野生型对热更为敏感, 但是相应的对黑暗条件下的磷酸化去活不敏感, 而且缺失 N-末端的突变体不会受光/暗交叉处理的影响。在菠菜中, 当蛋白质水解 NR 使之失去前 45 个氨基酸时, NR 活性不再因 14-3-3s 的结合而失活尽管它仍会被磷酸化。这表明, NR 的 N-末端区域在一定程度上参与其磷酸化失活的过程。Provan 等的研究结果与 Pigaglio 有所不同, 在有 Mg²⁺ 和磷酸酯酶抑制剂存在的条件下, NR 与内生 14-3-3s 通过层析可以共分离。NR 活性的测定与蛋白质杂交表明内生 14-3-3s 可以与野生型 NR 和突变体 NR 共同分离。突变体 NR 的电子传递在亚铁血红素结合区域被 Mg²⁺/14-3-3s 抑制, 而在野生型 NR 中不存在这种现象, 这可能是 14-3-3s 与野生型 NR 和突变体 NR 的结合形式不同。而且认为 NR 的不稳定性与钼喋呤所在的部位有关, N 末端的 56 位氨基酸可能与钼喋呤的稳定性有关 (Bachmann 等, 1996)。

2.3 蓖麻 *Ricinus communis* 中硝酸还原酶活性调节

就现研究的高等植物中, 绝大部分 NR 活性的调节是通过 NR、磷酸化 NR、14-3-3s 结合的磷酸化 NR 三者之间的转换而实现的, 但也有例外, *Ricinus communis* 的叶片和根中的 NR 活性调节机制就与其它高等植物不同。据 Kandlbinder 等 (2000) 的研究, 在 pH 7.6 且有 5~10 mM Mg²⁺ 存在的条件下, *Ricinus* 的 NR 活性极低, 光下与暗中的差别也不大, 但在 EDTA 存在的条件下, 最大 NR 活性是正常的。但当调节 pH 低于 7 时, 提取液中 NR 活性快速提高, 调节 pH 大于 7.3 时, NR 活性又变得极低。其原因可能是在不同 pH 值条件下, NR 对 Mg²⁺ 的敏感度相差很大, 在生理 pH 值下, *Ricinus* 对 Mg²⁺ 较其它高等植物更敏感。

用免疫研究技术进一步研究蓖麻 NR 活性调节的机制, 发现其 NR 的 Ser 磷酸化位点和 14-3-3s 结合修饰是与其它植物相同的, 所以关于 *Ricinus* NR 活性的调节机制仍然没有明确的答案。只是推测 NR 分子上存在重金属离子结合位点, 金属离子如 Zn²⁺ 的结合会引起 NR 的失活 (Campbell, 1999), 该结合位点的序列可能会发生改变, 使得 Mg²⁺ 亦

可与之结合, pH 值的改变可能引起 NR 重金属结合位点序列发生改变, 使得 NR 对 Mg^{2+} 的敏感性提高, 从而调节酶的活化/失活。

3 硝酸还原酶的降解

NR 的半衰期很短, 仅为几小时, 所以细胞内 NR 的含量不仅决定于 NR 的合成速率, 还决定于 NR 的降解速率。光下 NR 的合成高于暗中, ^{35}S 标记的 NR 在暗中的降解速率快于在光下 (Weiner 和 Kaiser, 1999)。Kaiser 和 Huber 通过蛋白质杂交技术发现, 黑暗处理菠菜时, 去磷酸化会减缓其叶片中 NR 的降解。他们还发现, NR 蛋白磷酸化酶不仅控制 NR 的催化活性, 而且是 NR 降解过程中的信号, 磷酸化的 NR 更易被降解。后来, 有人用人工手段使黑暗处理中的叶片 NR 恢复活性后, 发现 NR 蛋白量处于较稳定的状态, 这表明非活性态的 NR 比有活性的 NR 更容易被降解 (Kaiser 等, 1999)。由此可以推测 NR 降解的一个重要前提是 14-3-3s 与 pNR 的结合。Weiner 等推测, 14-3-3s 在 NR 的降解过程中起到以下三点作用: (1) 促进 NR 的失活; (2) 阻止 pNR 的分裂; (3) 引发 NR 的蛋白水解。

Cotelle 等 (2000) 却发现在缺少糖的情况下, *Arabidopsis* 的细胞内 NR 及其它蛋白失去了 14-3-3s 的结合位点, 如果按上述观点, 则 NR 实际活性会增强, 但事实与之相反, NR 快速地被降解。于是推测可能存在另一种完全不同的蛋白酶, 它由于糖缺乏而产生, 其作用底物是未结合 14-3-3s 的 NR。而在糖充分的条件下, 并无上述情况发生。至今仍不清楚细胞内高糖含量、高 NR 活性状态、高 NR 稳定性之间是相互关联还是有因果关系。

4 结语

关于 NR 活性调节的研究已由过去的生理水平逐步深入到分子水平。随着研究的深入, 人们发现 NR 能催化数种反应。它催化 NO_2^- 生成的 NO 在植物体内可能起一定的信号作用, 但此反应受哪些内外条件的调节, 生成的 NO 在植物体内又如何起作用, 其作用是在特定条件下产生还是一直有产生, 这些将是今后研究的一个重点。另外, 尽管对 NR 的翻译后调节已经有一定程度的了解, 但仍有许多问题要解决: 影响 NR 活性的因素是否能够调节

NR 降解酶, 是否与 NR 的降解有直接关系, NR 降解过程中是否还有其他一些物质起作用。影响 NR 活性的因素中, 光是如何起作用的, 其作用是直接的还是间接的, 与糖含量有无关联。我们发现干旱、氮素浓度的高低对 NR 活性有着很大的影响 (待发), 这种影响是直接的还是间接的还有待进一步研究。在 NR 翻译后调节过程中, 14-3-3s 本身的调节机制与其和 pNR 的结合有何联系, pNR 和其他磷酸化片段与 14-3-3s 结合的竞争机制如何。重金属离子在 NR 活性调节过程中起何种作用等等。虽然仍有很多问题需要解决, 但随着多种突变体的得到, 分子生物学技术及免疫技术的深入应用, 又将使 NR 的研究进入一个全新的领域。

参考文献:

- 宋松泉, 王永锐, 傅家瑞. 1993. 高等植物中硝酸还原酶的研究进展[J]. 作物杂志, (4): 32-35.
- Aguera E, Poblete L, *et al.* 1999. Light modulation and in vitro effects of adenine nucleotides on leaf nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 105: 218-223.
- Ahmad A, Abdin MZ. 1999. NADH; nitrate reductase and NAD(P)H; nitrate reductase activities in mustard seedlings [J]. 143: 1-8.
- Aitken A. 1996. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signaling pathways [J]. *Trends Cell Biol*, 6: 341-347.
- Athwal GS, Huber JL, Huber SC. 1998. Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation [J]. *Plant Cell Physiol*, 39: 1 056-1 072.
- Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, *et al.* 1996. Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase [J]. *The Plant Cell* 8: 505-517.
- Bachmann M, Huber JL, *et al.* 1996. 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases [J]. *FEBS Letters*, 398: 26-30.
- Barber MJ, Kay CJ. 1996. Superoxide production during reduction of molecular oxygen by assimilatory nitrate reductase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 326: 227-232.
- Campbell WH. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and

- physiology[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 277—303.
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG. 1998. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) [J]. *FEBS Letters*, **430**: 381—384.
- Cotelle V, Meek SEM, *et al.* 2000. 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells[J]. *EMBO Journal*, **112**: 2 869—2 876.
- Glaab J, Kaiser WM. 1993. Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots[J]. *Planta*, **191**: 173.
- Kaiser WM, Weiner Hendrik, *et al.* 2002. Modulation of nitrate reductase; some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction[J]. *Journal of Experimental Botany*, **53**(370): 875—882.
- Kaiser WM, Huber SC. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase; mechanism, physiological relevance and environmental triggers[J]. *Journal of Experimental Botany*, **52**(363): 1 981—1 989.
- Kaiser, Forster 1989. Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves[J]. *Plant Physiol*, **91**, 970—974.
- Kaiser WM, Huber SC. 1994. Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plant [J]. *Plant Physiol*, **106**: 817.
- Kaiser WM, Spill D, Brendle-Behnisch E. 1992. Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach-leaf nitrate reductase[J]. *Planta*, **186**: 236—240.
- Kaiser WM, Weiner H, Huber SC. 1999. Nitrate reductase in higher plants; a case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity[J]. *Physiol Plant*, **105**: 385—390.
- Kandlbinder A, Weiner H, Kaiser WM, *et al.* 2000. Nitrate reductase from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L.) and *Spinach* (*Spinacia oleracea* L.) have different regulatory properties[J]. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 1 099—1 105.
- Mackintosh C, Meek S. E. M 2001. Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis[J]. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**: 205—214.
- Masters SC, Pederson KJ, *et al.* 1999. Interaction of 14-3-3 isoforms on rat brain using specific antibodies[J]. *Journal of Neurochemistry*, **63**: 2 259—2 265.
- Miller AJ, Sanders D. 1987. Depletion of cytosolic free calcium induced by photosynthesis[J]. *Nature*, **326**: 397—400.
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, *et al.* 1999. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins[J]. *Plant J*, **18**: 1—12.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, *et al.* 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine[J]. *Cell*, **84**: 889—897.
- Oecking C, Eckerson C, Weiler EW. 1994. The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins[J]. *FEBS Letters*, **352**: 163—166.
- Pigaglio E, Durand N, Meyer C. 1999. A conserved acidic motif in the N-terminal domain of nitrate reductase is necessary for the inactivation of the enzyme in the dark by phosphorylation and 14-3-3 binding[J]. *Plant Physiology*, **119**: 219—229.
- Provan F, Aksland LM, *et al.* Deletion of the nitrate reductase N-terminal domain still allow binding of 14-3-3 proteins but affects their inhibitory properties [J]. *Plant Physiology*, **123**: 757—764.
- Rooney MF, Ferl RJ. 1995. Sequences of three Arabidopsis general regulation factor genes encoding GF14 (14-3-3) proteins[J]. *Plant Physiology*, **127**: 142—149.
- Sugden C, Crawford RM, *et al.* 1999. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP[J]. *Plant Journal*, **19**: 433—439.
- Toker A, Ellis CA, Sellers LA, Aitken A. 1990. Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein[J]. *European Journal of Biochemistry*, **191**: 421—429.
- Toroser D, Athwal GS, Huber SC. 1998. Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 protein[J]. *FEBS Letters*, **435**: 110—114.
- Weiner H., Kaiser WM. 2001. Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins[J]. *Journal of Experimental Botany*, **52**(359): 1 165—1 172.
- Weiner H, Kaiser WM. 2000. Binding of 14-3-3 proteins is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves [J]. *FEBS Letters*, **480**: 217—220.
- Weiner H, Kaiser WM. 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves[J]. *FEBS Letters*, **455**: 75—78.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants; new features for an old enzyme[J]. *Trends Plant Science*, **4**: 128—129.
- Yamasaki H, Sakihama Y. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxonitrite by plant nitrite reductase; in vitro evidence for the NR-dependent formation of reactive nitrogen species[J]. *FEBS Letters*, **468**: 89—92.