

• 综 述 •

拟南芥内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体研究进展

王立光

甘肃省农业科学院 生物技术研究所以, 甘肃 兰州 730070

王立光. 拟南芥内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1424–1432.

Wang LG. Progress in endosomal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporter in *Arabidopsis thaliana*. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1424–1432.

摘 要: 拟南芥内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体 (Endosomal NHX) 的亚细胞定位、离子转运特性及生物学功能阐释取得了重要进展。拟南芥内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体包含 AtNHX5 和 AtNHX6 两个成员, 它们的氨基酸序列相似性为 78.7%。研究表明, AtNHX5 和 AtNHX6 具有功能冗余, 它们都定位在高尔基体 (Golgi)、反面高尔基体管网状结构 (TGN)、内质网 (ER) 和液胞前体 (PVC), 参与调控耐盐胁迫、pH 平衡和 K^+ 平衡等。有报道显示内膜 NHXs 跨膜结构域存在能够调控自身离子活性的酸性保守氨基酸残基, 对其自身功能具有决定性作用。最新研究结果表明, 拟南芥内膜 NHXs 影响囊泡运输和蛋白存贮, 并参与生长素介导的植物生长和发育。文中主要对拟南芥内膜 NHXs 的亚细胞定位、离子转运、功能及应用进展进行了概述。

关键词: 内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体, 亚细胞定位, 离子转运, 囊泡运输, 蛋白存贮

Progress in endosomal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporter in *Arabidopsis thaliana*

Liguang Wang

Biotechnology Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: Important progress has been made in the interpretation of subcellular location, ion transport characteristics and biological functions of endosomal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporter in *Arabidopsis thaliana*. The endosomal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporter contain two members, AtNHX5 and AtNHX6, whose amino acid sequence similarity is 78.7%. Studies have shown that AtNHX5 and AtNHX6 are functionally redundant, and they are all located in Golgi, trans-Golgi network (TGN), endoplasmic reticulum (ER) and prevacuolar compartment (PVC). AtNHX5 and AtNHX6 are critical for salt tolerance stress and the homeostasis of pH and K^+ . It has been reported that there are conservative acidic amino acid residues that can regulate their ion activity in the endosomal NHXs transmembrane domain, which plays a decisive role in their own functions. The results of the latest research

Received: December 26, 2018; **Accepted:** March 14, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31660391, 31460350), Youth Foundation of Gansu Academy of Agricultural Sciences (No. 2016GAAS53), National Oil Industry System (No. GARS-17-SYZ-6).

Corresponding author: Liguang Wang. Tel/Fax: +86-931-7612683; E-mail: wodepengyouwlg@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 31660391, 31460350), 甘肃省农业科学院中青年基金 (No. 2016GAAS53), 国家特色油料产业技术体系 (No. CARS-17-SYZ-6) 资助。

网络出版时间: 2019-03-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190327.1029.001.html>

indicate that endosomal NHXs affect vacuolar transport and protein storage, and participate in the growth of auxin-mediated development in *A. thaliana*. In this paper, the progress of subcellular localization, ion transport, function and application of endosomal NHXs in *A. thaliana* was summarized.

Keywords: endosomal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporter, subcellular localization, ion transport, vacuolar trafficking, protein storage

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体 (NHX) 是一类跨膜反向转运蛋白, 属于一价阳离子/ H^+ 反向转运体 (Cation/proton antiporter, CPA) 基因家族中的 CPA1 亚家族, 它们在酵母、细菌、植物和动物等生物体内广泛存在, 生化活力是将 Na^+ 或 K^+ 与质子 (H^+) 进行跨膜反向转运^[1-4]。植物内, 质膜 H^+ -ATPase (P-ATPase)、液胞膜 H^+ -ATPase (V-ATPase) 和 H^+ -PPiase 产生 H^+ 电化学势梯度, 为 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体的离子转运提供驱动力^[5-8]。大量研究表明, 维持细胞内离子和 pH 稳态对细胞活动和功能至关重要, 而植物 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体是植物细胞的重要跨膜反向转运蛋白, 对维持离子和 pH 平衡具有重要作用, 并在各种细胞过程中扮演重要角色, 包括逆境响应、膜微囊运输、蛋白存贮、细胞生长、渗透调节、 Na^+ 和 K^+ 离子运输及生长与发育等生理生化过程^[9-20]。

植物 NHX 在细胞内广泛分布, 并多以多基因家族形式存在。植物中 NHX 最先由 Ratner 于 1967 年从大麦质膜上发现, 液胞膜上的 NHX 活性于 1985 年第一次在甜菜贮藏组织中检测到^[21-22]。后来, 人们相继在多种植物内检测到液胞 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运活性, 并展开了深入研究。但是, 第一个被克隆到的 NHX 成员是 Gaxiala 于 1999 年在拟南芥 cDNA 文库中获得的 *AtNHX1*^[23], 随后众多 NHX 基因在植物中被鉴定克隆出来。

根据亚细胞分布, 植物 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体基因家族成员被分为 3 类, 即质膜 NHXs (Plasma membrane NHX)、液胞 NHXs (Vacuolar NHX) 和内膜 NHXs (Endosomal NHX)^[3]。已有研究已经证实, 质膜和液胞 NHXs 可以逆着 Na^+ 和 K^+ 浓度梯

度运输, 将细胞质内的 Na^+ 和 K^+ 外排出细胞或区室化到液胞内, 降低细胞质的渗透势, 避免水分胁迫^[21]。在盐胁迫条件下, 液胞 NHXs 对细胞质和液胞中 pH 值的调控起着重要作用^[24]。通过 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体氨基酸序列分析发现, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体的 N 端是负责转运的区域, C 端含有多个蛋白激酶作用位点, 是活性调节区域, 在离子选择性方面起着重要作用^[25]。模式植物拟南芥中 NHX 基因家族包含 8 个成员, 其中质膜 NHXs (*AtNHX7/SOS1*、*AtNHX8*)、液胞 NHXs (*AtNHX1-4*) 研究得较早, 并且 *AtNHX7/SOS1* 的调节机制研究得最为清楚。研究表明, *AtNHX7/SOS1* 的表达和蛋白活性受蛋白激酶 *AtSOS2/CIPK24* 调控, 而 *AtSOS2/CIPK24* 的活性又受 Ca^{2+} 感受蛋白 *AtSOS3/CIPK4* 的调控, 当 *AtSOS3/CIPK4* 与 *AtSOS2/CIPK24* 形成复合体, 通过磷酸化去除 *AtNHX7/SOS1* 的 C 端自抑制区, 从而将其激活^[26-30]。而液胞膜上 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向转运体很可能受到 CBL-CIPK 信号通路调控^[31-32], 但具体的研究还未见报道。通过生物技术, 在拟南芥、烟草、甜菜、绿豆、花生及马铃薯等植物中转入拟南芥质膜或液胞 NHXs 成员可以明显提高这些植物的抗盐、抗旱及钾营养代谢能力, 有望获得新的抗逆材料^[33-36]。

拟南芥内膜 NHXs 基因 (*AtNHX5* 和 *AtNHX6*) 虽然早已被发现, 但研究开展相对滞后, 近几年才取得重要进展^[9,37-38]。文中根据已有的报道, 结合其他植物类似基因的研究成果, 对拟南芥内膜 NHXs 的亚细胞定位、调节离子与 pH 平衡、蛋白运输及植物生长发育中的作用机制及其应用的研究进展等方面进行了综述。

1 AtNHX5 和 AtNHX6 的亚细胞定位及基因表达

拟南芥质膜 NHXs (AtNHX7、AtNHX8) 和液胞 NHXs (AtNHX1–4) 的亚细胞定位先后被报道, 证明分别位于质膜和液胞膜上^[33,39-43], 而拟南芥内膜 NHXs (AtNHX5、AtNHX6) 的具体亚细胞定位在相当长的时间内未见报道, 只被认为是存在于质膜和液胞膜间的内膜上^[3], 直到 2011 年 Bassil 等通过带有荧光蛋白标签的 SYP32、VHA-a1 和 SPY61 蛋白与 AtNHX5、AtNHX6 进行共定位分析, 并通过免疫电镜技术对 AtNHX6 亚细胞定位进行分析, 首次报道 AtNHX5 和 AtNHX6 定位在高尔基体和反面高尔基体管网状结构^[44]。王立光等通过对 AtNHX5-GFP 和 AtNHX6-GFP 与带有荧光蛋白标签且位于高尔基体的 SYP31、MEMB12 及位于反面高尔基体管网状结构的 SYP41、VTI12 的蛋白进行共定位分析也证实了 AtNHX5 和 AtNHX6 在高尔基体和反面高尔基体管网状结构存在^[15]。Reguera 等通过进一步研究 NHX5-YFP 与反面高尔基体管网状结构 marker VTI12-RFP、液胞前体 (Prevacuolar compartment) Marker ARA7-RFP 和 Rha1-RFP 发现, AtNHX5 虽然主要存在于反面高尔基体管网状结构, 但在液胞前体也有分布, AtNHX5 很可能在反面高尔基体管网状结构和液胞前体间穿梭, 这是通过囊泡运输实现的^[17]。最新研究成果进一步扩大了 AtNHX5 和 AtNHX6 的定位范围, 利用内质网 (Endoplasmic reticulum) Marker mCherry-HDEL 进行共定位分析表明, 在内质网上存在内膜 NHXs 分布^[19]。以上研究成果表明, 在质膜和液胞膜之间的内膜系统中, AtNHX5 和 AtNHX6 广泛存在, 已经证实存在于亚细胞结构高尔基体、反面高尔基体管网状结构、内质网和液胞前体。目前, 虽然未见 AtNHX5 和 AtNHX6 存在于内膜系统其他部位的报道, 但也不能排除其存在的可能性, 因为 AtNHX5 和

AtNHX6 很可能是随着囊泡运输穿梭于这些膜结构。在其他植物中, 内膜 NHXs 的亚细胞定位研究进行得较少, 远低于拟南芥内膜 NHXs, 但早在 2008 年 Rodriguez-Rosales 等通过在洋葱表皮表达 LeNHX2-GFP 发现, 番茄内膜 LeNHX2 在液胞和细胞核周边的泡状结构上存在, 但进一步的亚细胞定位却未见报道^[45]。拟南芥内膜 NHXs 的亚细胞定位成果将为其他植物中已鉴定的类似反向转运体的定位提供依据和指导。

Yokoi 等研究表明, 在生长 21 d 植株的根和茎中, 通过 Northern blotting 能检测到低丰度 *AtNHX5* mRNA, 而检测不到 *AtNHX6* mRNA, 只有通过灵敏度更高的 RT-PCR 技术检测到 *AtNHX6* 基因表达^[39], 这表明 *AtNHX6* 基因表达在根和茎中应低于 *AtNHX5* 基因表达。Bassil 等通过实时荧光定量 PCR 对 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 基因表达情况进行检测发现, 在花、花蕾、茎、莲座叶和根中 2 个基因都有表达, 且除了果荚中 *AtNHX5* 的表达低于 *AtNHX6* 外, *AtNHX5* 在其他部位的整体表达水平略高于 *AtNHX6*^[44]。王立光等对整株幼苗基因表达检测发现, 在植株抽薹前, 随着幼苗生长, *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 的相对表达含量升高, 且 *AtNHX5* 的整体相对表达明显高于 *AtNHX6*^[15]。Ashnest 等克隆 *AtNHX6* 基因上游 3 kb 的启动子, 通过 GUS 基因检测启动子活性及表达情况发现, *AtNHX6* 启动子在成熟胚、从早期到晚期发育的鱼雷胚及萌发后的弯曲子叶中驱动 GUS 明显表达^[46], 预示着在这些阶段和部位 *AtNHX6* 启动子活性高, 基因表达明显。Dragwidge 等进一步对 *AtNHX6* 启动子活性研究发现, 在主根顶端和侧根原基, GUS 被明显启动表达, 这进一步表明内膜 *AtNHXs* 在根组织中表达^[18]。内膜 NHXs 基因的表达研究也在番茄、水稻和胡杨中展开, 并进行了报道。Venema 等通过 Northern blotting 分析发现番茄 *LeNHX2* 基因在根和茎中强表达, 而在叶中表达较弱^[47]。Fukuda 等对水稻 *OsNHX5* 基因启动子研

究发现,在侧根发生部位、维管束、水孔、根尖和花粉粒等处检测到 GUS 表达^[48],说明该基因启动子在这些部位活性较强,也暗示 *OsNHX5* 基因在这些部位表达。叶楚玉等克隆了胡杨中的内膜 NHX 基因 *PeNHX6*,通过实时荧光定量 PCR 分析发现,在根、茎和叶中都检测到该基因的表达^[49]。这些结果与拟南芥 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 基因表达有很多相似之处,为拟南芥内膜 NHXs 基因的表达研究提供了基础。

2 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 影响生长素介导的生长发育

Shi 等研究发现,过表达 *AtNHX5* 不但提高了夏瑾叶片外植体的再生率,还提高了再生植株移植到土壤中的成活率,转入并表达 *AtNHX5* 基因的夏瑾比野生型开花提前,生长发育受到影响^[50]。通过 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 的氨基酸序列比对发现,两者存在很高的相似性,相似率达到 78.7%,单独敲除两者中的任何一个都不能对植株生长和发育造成影响,但是同时将两个基因敲除,双突变植株表现出生长迟缓、发育受阻及植株矮小,通过电镜切片进一步发现双突变植株细胞数目变小、细胞体积变小^[44]。王立光等和武学霞等也分别发现 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 同时缺失的双突变植株矮小、莲座叶变小、结实率降低^[15-16]。最新研究发现,*AtNHX5* 和 *AtNHX6* 可能通过它们的运输活动产生的 pH 值梯度调节生长素穿越内质网的运输,从而参与生长素介导的生长发育^[19]。同时,Dragwidge 等证明 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 通过改变质膜上 PIN 蛋白丰度介导了植物生长发育^[18]。以上结果表明,*AtNHX5* 和 *AtNHX6* 在细胞增殖和扩展等过程中起到重要作用,调节着植物的生长发育,其调节机制是通过影响生长素而实现的。在番茄中,也有对 *LeNHX2* 相关功能的研究,Rodriguez-Rosales 等通过 RNA 干扰技术对番茄的 *LeNHX2* 进行沉

默,发现随着干扰程度加强,植株生长受到的抑制作用也随着加强,果实和种子产量逐渐降低,但作者的研究并未涉及是否通过生长素介导^[45]。

3 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 调节胞内离子和 pH 平衡

拟南芥质膜 NHXs 和液胞 NHXs 介导 Na^+ 、 K^+ 的转运及调节 pH 平衡的功能已被证实^[28,33,40,51-52],那内膜 NHXs 是否具有相似的功能呢?根据这些问题,针对内膜 NHXs 相关功能的研究先后展开,并取得了重要的进展。Yokoi 等在酵母突变体 AXT3K 转入 *AtNHX5* 基因,首先发现转基因酵母能通过增加离子区室化增强酵母的盐耐受性^[39]。Bassil 等通过双突变体 *nhx5 nhx6* 胁迫实验发现,内膜 NHXs 缺失将使种子萌发和幼苗生长对盐胁迫极为敏感,在 100 mmol/L NaCl 胁迫下,双突变种子在子叶出现后几乎停止生长,而 150 mmol/L NaCl 处理幼苗将导致鲜重显著下降^[44]。安静等在拟南芥中过表达 *AtNHX5* 发现,过表达能提高种子萌发和苗期的耐盐性,过表达植株在盐胁迫的干重、鲜重及地上部分 Na^+ 、 K^+ 含量均高于野生型植株,耐盐性得到显著提高^[53]。王立光等运用酵母表达系统研究发现,*AtNHX5* 和 *AtNHX6* 除了能恢复酵母突变体的耐盐能力外,在维持 K^+ 平衡方面也具有重要作用,也能够恢复酵母突变体耐高钾胁迫的能力^[15]。他们对 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 与 *AtCHX17* 在 K^+ 转活力的异同进行了比较,发现在高 K^+ 低 pH 下 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 起作用,而 *AtCHX17* 在低 K^+ 高 pH 下具有作用^[15],这表明了拟南芥内膜 NHX 与 CHX 的 K^+ 转运模式可能存在差异。他们进一步研究发现,在低 K^+ 条件下,*nhx5 nhx6* 的根生长明显受到抑制,而在双突变植株内恢复 *AtNHX5* 或 *AtNHX6* 的表达能消除这一现象。通过 K^+ 含量测定发现,在正常生长条件下,*nhx5 nhx6* 植株内的 K^+ 含量明显低于野生型

植株^[15]。这些研究成果表明,拟南芥内膜 NHXs 与基因家族其他成员一样,也具有调节 Na^+ 、 K^+ 平衡的作用,且转运模式也可能是相似的。同时,有报道显示,番茄 LeNHX2、水稻 OsNHX5、杨树 PeNHX6 和桑树 MaNHX6 都具有调节 Na^+ 、 K^+ 平衡的作用^[1,45,47,49,54-55],这些预示着这类亚家族成员在植物中存在相似功能,这都将为其他植物中此类反向转运体的研究提供思路。

内膜系统的 pH 稳态对细胞的功能至关重要。Martinier 等研究发现,胞内不同细胞器及蛋白运输的膜结构囊泡的 pH 存在差异,而在烟草细胞内转入拟南芥内膜 NHXs 将使液胞分选受体 (Vacuolar sorting receptor, VSR)、反面高尔基体管网状结构和液胞前体等的 pH 升高,表明拟南芥内膜 NHXs 在维持内膜系统 pH 稳态具有重要作用。Reguera 等运用基于荧光蛋白 pHluorin 的 pH 传感器 (pHluorin-based pH sensors) 测定了高尔基体、反面高尔基体管网状结构、次级液胞前体和液胞分选受体的 pH,发现双突变 *nhx5 nhx6* 植株的这些部位的 pH 均低于野生型植株^[17]。另外,王立光等通过 pH 敏感的荧光探针 BCECF (2',7'-bis (carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluorescein, 2',7'-二(羧乙基)-5(6)-羧基荧光黄) 和微电极法分别对双突变体 *nhx5 nhx6* 的根部细胞液胞和叶片细胞液的 pH 进行了测定,结果显示与野生型相比,其 pH 都降低^[15]。樊立刚等发现 AtNHX5 和 AtNHX6 调节内质网的 pH,双突变 *nhx5 nhx6* 植株细胞内内质网的 pH 明显降低^[19]。这些结果都表明,拟南芥内膜 NHXs 具有调节细胞 pH 平衡的功能,而在其他植物内类似基因对 pH 平衡调节的研究还未见报道。

4 AtNHX5 和 AtNHX6 调节蛋白运输和存贮

植物蛋白在核糖体中合成后,部分蛋白需经内质网、高尔基体、反面高尔基体管网状结构和

多胞体/液胞前体,最终到达相应部位,在这个过程中,蛋白通过囊泡运输实现转运。现有的证据已经表明,在拟南芥中这些部位都存在内膜 NHXs,它们调节囊泡运输,影响蛋白的转运和存贮。Bassil 等最先发现 AtNHX5 和 AtNHX6 与囊泡运输相关,他们发现与野生型相比,FM4-64 在双突变体 *nhx5 nhx6* 中运到液胞的时间被延迟,用 GFP 标记的 CPY 蛋白在 *nhx5 nhx6* 子叶中不能进入液胞,而是分布到了质外体,同时转录组分析也显示,*nhx5 nhx6* 内很多与囊泡运输相关的蛋白转录水平发生了改变,如 RAB、VTI12、VPS35 和 VSR1 等^[44]。后来 Reguera 等进一步发现 *nhx5 nhx6* 的种子变大,种皮变黑,种子中的 PSV (Protein storage vacuoles) 体积变小而数目增多,存在大量种子贮藏蛋白的前体蛋白 p2S 和 p12S,且种子贮藏蛋白 2S 和 12S 被运输到质外体,而非 PSV 中;他们深入研究认为拟南芥内膜 NHXs 缺失导致液胞分选受体 2;1 (Vacuolar sorting receptors2;1, VSR2;1) 与其运输物 (Cargoes) 间的结合作用降低,从而影响了蛋白质的运输过程,且内膜 NHXs 对内膜体 pH 的影响在蛋白质运输调节方面起着重要作用^[17]。Ashnest 等也发现拟南芥内膜 NHXs 影响种子蛋白存贮,并证明拟南芥内膜 NHXs 的 C-末端与细胞分选复合体 Retromer 的组分 SNX1 相互作用,影响液胞分选受体从反面高尔基体管网状结构回送到内质网的过程从而调节蛋白的运输^[46]。武学霞等通过构建三突变体 *nhx5 nhx6 syp22* 发现,三突变体植株矮小,结实率下降,种子体积增大,种子的 PSV 体积变小而数目增多,存在大量种子贮藏蛋白前体蛋白,这表明种子贮藏蛋白运输受到影响。他们发现在双突变体 *nhx5 nhx6* 细胞内形成 SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) 的成员 SYP22 和 VAMP727 聚集在高尔基体和反面高尔基体管网状结构中,未能被向下运送到液胞前

体内,从而影响 SNARE 调控液胞前体和液胞之间生物膜融合的过程,导致蛋白运输受到影响^[16]。

虽然以上研究对拟南芥内膜 NHXs 调节蛋白运输和存贮提出了不同的分子机制,但都明确了 AtNHX5 和 AtNHX6 参与调节蛋白运输过程。由已有的关于 AtNHX5 和 AtNHX6 的亚细胞定位报道,我们知道它们定位比较特殊,位于内质网、高尔基体、反面高尔基体管网状结构和多胞体/液胞前体,并且调节这些部位的 pH 平衡,而植物中很多蛋白在核糖体开始合成后,正好需要经过这些部位后,才能到达特定的位置,因此 AtNHX5 和 AtNHX6 会参与到蛋白运输的许多环节上。

5 拟南芥内膜 NHXs 具有影响其功能的保守氨基酸残基

Bowers 等进行序列比对发现,在酵母、细菌、植物和动物的 NHX 的跨膜区域存在 4 个保守的酸性氨基酸残基,将酵母 ScNhxl1p 中的 4 个氨基酸残基分别突变为不带电荷的极性氨基酸残基(D201N、E225Q、D230N、E355Q),其中 3 个突变氨基酸残基(D201N、E225Q、D230N)中任何一个突变都会导致酵母蛋白运输受阻,表明这 3 个保守氨基酸残基在蛋白转运过程中具有重要作用^[56]。王立光等将 AtNHX5 和 AtNHX6 与 ScNhxl1p 的氨基酸序列进行比对分析,发现在拟南芥内膜 NHXs 的跨膜结构域也含有 4 个保守的酸性氨基酸残基,AtNHX5 的酸性氨基酸残基 D164、E188、D193、E320 和 AtNHX6 的 D165、E189、D194、E320 氨基酸残基,分别与酵母 ScNhxl1p 的 D201、E225、D230、E355 保守氨基酸残基相对应^[15]。通过酵母生长实验发现,如果 AtNHX5 的 D164、E188、D193 或 AtNHX6 的 D165、E189、D194 中任何一个保守氨基酸残基突变,都将导致拟南芥内膜 NHXs 在酵母内具有的互补功能丧失。同时,AtNHX5 的 D164、E188、

D193 或 AtNHX6 的 D165、E189、D194 中任何一个保守氨基酸残基突变也将不能使双突变 *nhx5 nhx6* 植株生长恢复到野生型水平^[15]。武学霞等进一步证实,拟南芥内膜 NHXs 的 3 个保守酸性氨基酸在种子存贮蛋白转入 PSV 过程中具有重要作用,任何一个酸性保守氨基酸残基突变都会使转基因株系种子中存贮蛋白像双突变 *nhx5 nhx6* 的一样,含有大量前体蛋白 p2S 和 p12S^[16]。这些结果显示,3 个保守酸性氨基酸残基对 AtNHX5 和 AtNHX6 的离子运输、蛋白转运及调节生长发育等功能至关重要,也暗示这 3 个保守氨基酸残基很可能影响 AtNHX5 和 AtNHX6 对 pH 平衡的调节。

6 拟南芥内膜 NHXs 在植物改良中的应用

Shi 等从拟南芥 Landsberg 的实生苗叶片内克隆得到 AtNHX5 基因的 cDNA 序列,并导入蓝猪耳植株内,发现表达 AtNHX5 的蓝猪耳植株的耐盐力获得提高,转基因植株能在 100 mmol/L NaCl 的培养基上生长,而野生型不能生长^[50]。他们进一步发现 AtNHX5 不仅提高了转基因蓝猪耳叶片富集 Na^+ 的能力,还对盐处理降低叶片 K^+ 含量有着显著的削弱作用,证实 AtNHX5 能应用于提高蓝猪耳的耐盐性,并认为其对植物耐盐性的改良作用与该反向转运体对 Na^+ 和 K^+ 的富集有关^[50]。林小浩等通过 AtNHX5 转化烟草发现,转基因植株在 300 mmol/L NaCl 的条件下,生长明显优于野生型,且处理 4 d 后去除盐胁迫,转基因植株快速恢复生长,而野生型生长停滞,这表明 AtNHX5 能提高烟草耐盐性,可用于培育耐盐烟草品种^[57]。Li 等分别在水稻和构树中表达 AtNHX5 发现,转基因水稻和构树不仅增强了对盐胁迫的耐受力,还增强了抗干旱胁迫的能力,这暗示 AtNHX5 也可在抗逆境胁迫树木和作物改良中进行有效利用^[58-59]。Wu 等和杨权等都对 AtNHX5 基因转化大豆开展了研究,他们的结果都证明,AtNHX5

转化大豆能增强大豆的耐盐性,可用于大豆抗盐品种的改良利用^[60-61]。另外,有研究表明,在马铃薯内转入并表达 AtNHX5 或 AtNHX6 基因,可以提高转基因植株的耐盐性和抗旱性,提高块茎产量^[62]。

7 展望

内膜 NHXs 亚家族作为 NHXs 家族重要成员之一,在植物的生长发育和逆境胁迫中起到重要的作用。近些年,植物中内膜 NHXs 的研究工作相继展开,尤其 AtNHX5 和 AtNHX6 的亚细胞定位、基因表达、功能和抗逆改良应用等取得了一系列进展,但关于它们过表达能否影响蛋白存贮的研究还未见详细报道,尚需深入研究。虽然越来越多物种的内膜 NHXs 基因被鉴定和克隆,但针对内膜 NHXs 的研究,大多仍围绕模式植物拟南芥的 AtNHX5 和 AtNHX6 展开,其他植物中类似反向转运体的亚细胞定位、功能等研究才初步开展。因此,其他植物的内膜 NHXs 的研究有待进一步深入。这将对培育抗逆作物新品种及提高作物产量具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] Cao BN, Long DP, Zhang M, et al. Molecular characterization and expression analysis of the mulberry Na⁺/H⁺ exchanger gene family. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 99: 49–58.
- [2] Chanroj S, Wang GY, Venema K, et al. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 25.
- [3] Brett CL, Donowitz M, Rao RN. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(2): C223–C239.
- [4] Rodriguez-Rosales MP, Gálvez FJ, Huertas R, et al. Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav*, 2009, 4(4): 265–276.
- [5] Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465(1/2): 140–151.
- [6] Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(4): 431–434.
- [7] Rausch T, Kirsch M, Löw R, et al. Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na⁺/H⁺-antiporters. *Plant Physiol*, 1996, 148(3/4): 425–433.
- [8] Schachtman D, Liu WH. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(7): 281–287.
- [9] Bassil E, Coku A, Blumwald E. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *J Exp Bot*, 2012, 63(16): 5727–5740.
- [10] Padan E, Venturi M, Gerchman Y, et al. Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1505(1): 144–157.
- [11] Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot*, 2006, 57(5): 1181–1199.
- [12] Reguera M, Bassil E, Blumwald E. Intracellular NHX-type cation/H⁺ antiporters in plants. *Mol Plant*, 2014, 7(2): 261–263.
- [13] Wang LG, Feng XY, Zhao H, et al. Functional analysis of the Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter PeNHX3 from the tree halophyte *Populus euphratica* in yeast by model-guided mutagenesis. *PLoS ONE*, 2014, 9(8): e0117869.
- [14] Andrés Z, Perez-Hormaeche J, Leidi EO, et al. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(17): E1806–E1814.
- [15] Wang LG, Wu XX, Liu YF, et al. AtNHX5 and AtNHX6 control cellular K⁺ and pH homeostasis in *Arabidopsis*: three conserved acidic residues are essential for K⁺ transport. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e144716.
- [16] Wu XX, Ebine K, Ueda T, et al. AtNHX5 and AtNHX6 are required for the subcellular localization of the SNARE complex that mediates the trafficking of seed storage proteins in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2016, 11(3): e151658.
- [17] Reguera M, Bassil E, Tajima H, et al. pH Regulation by NHX-type antiporters is required for receptor-mediated protein trafficking to the vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27(4): 1200–1217.
- [18] Dragwidge JM, Ford BA, Ashnest JR, et al. Two endosomal NHX-type Na⁺/H⁺ antiporters are involved

- in auxin-mediated development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(8): 1660–1669.
- [19] Fan LG, Zhao L, Hu W, et al. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ antiporters regulate the pH of endoplasmic reticulum and auxin-mediated development. *Plant Cell Environ*, 2018, 41(4): 850–864.
- [20] Bassil E, Tajima H, Liang YC, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ Antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3482–3497.
- [21] Blumwald E, Poole RJ. Na^+/H^+ Antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of beta vulgaris. *Plant Physiol*, 1985, 78(1): 163–167.
- [22] Ratner A, Jacoby B. Effect of K^+ , its counter anion, and pH on sodium efflux from barley root tips. *J Exp Bot*, 1976, 27(5): 843–852.
- [23] Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1480–1485.
- [24] Carden DE, Walker DJ, Flowers TJ, et al. Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na^+ and K^+ to salt tolerance. *Plant Physiol*, 2003, 131(2): 676–683.
- [25] Yamaguchi T, Apse MP, Shi HZ, et al. Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(21): 12510–12515.
- [26] Tang RJ, Zhao FG, Garcia VJ, et al. Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(10): 3134–3139.
- [27] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6896–6901.
- [28] Wu SJ, Ding L, Zhu JK. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, 1996, 8(4): 617–627.
- [29] Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8436–8441.
- [30] Quintero FJ, Martinez-Atienza J, Villalta I, et al. Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2611–2616.
- [31] Wang XT, Zhang HL, Gao HC, et al. Research progress on the mechanism of CBL-CIPK signaling pathways in response to abiotic stress. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(4): 1295–1303 (in Chinese).
王晓彤, 张海玲, 高慧纯, 等. 植物 CBL-CIPK 信号通路响应非生物胁迫作用机制的研究进展. *分子植物育种*, 2017, 15(4): 1295–1303.
- [32] Zhu S, Zhou XP, Wu XM, et al. Structure and function of the CBL-CIPK Ca^{2+} -decoding system in plant calcium signaling. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31(6): 1193–1202.
- [33] Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285(5431): 1256–1258.
- [34] Jiang XY, Leidi EO, Pardo JM. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance?. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(7): 792–795.
- [35] Asif MA, Zafar Y, Iqbal J, et al. Enhanced expression of *AtNHX1*, in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improves salt and drought tolerance. *Mol Biotechnol*, 2011, 49(3): 250–256.
- [36] Sahoo DP, Kumar S, Mishra S, et al. Enhanced salinity tolerance in transgenic mungbean overexpressing *Arabidopsis* antiporter (NHX1) gene. *Mol Breed*, 2016, 36: 144.
- [37] Qiu QS. Plant endosomal NHX antiporters: activity and function. *Plant Signal Behav*, 2016, 11(5): e1147643.
- [38] Qiu QS. AtNHX5 and AtNHX6: roles in protein transport. *Plant Signal Behav*, 2016, 11(6): e1184810.
- [39] Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant J*, 2002, 30(5): 529–539.
- [40] Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, et al. The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 465–477.
- [41] An R, Chen QJ, Chai MF, et al. *AtNHX8*, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li^+/H^+ antiporter. *Plant J*, 2007, 49(4): 718–728.
- [42] Liu H, Tang RJ, Zhang Y, et al. AtNHX3 is a vacuolar K^+/H^+ antiporter required for low-potassium tolerance

- in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ, 2010, 33(11): 1989–1999.
- [43] Li HT, Liu H, Gao XS, et al. Knock-out of *Arabidopsis AtNHX4* gene enhances tolerance to salt stress. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(3): 637–641.
- [44] Bassil E, Ohto MA, Esumi T, et al. The *Arabidopsis* intracellular Na^+/H^+ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. Plant Cell, 2011, 23(1): 224–239.
- [45] Rodríguez-Rosales MP, Jiang XY, Galvez FJ, et al. Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytol, 2008, 179(2): 366–377.
- [46] Ashnest JR, Huynh DL, Dragwidge JM, et al. *Arabidopsis* intracellular NHX-type Sodium-proton antiporters are required for seed storage protein processing. Plant Cell Physiol, 2015, 56(11): 2220–2233.
- [47] Venema K, Belver A, Marín-Manzano MC, et al. A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. J Biol Chem, 2003, 278(25): 22453–22459.
- [48] Francia ME, Wicher S, Pace DA, et al. A *Toxoplasma gondii* protein with homology to intracellular type Na^+/H^+ exchangers is important for osmoregulation and invasion. Exp Cell Res, 2011, 317(10): 1382–1396.
- [49] Ye CY, Zhang HC, Chen JH, et al. Molecular characterization of putative vacuolar NHX-type Na^+/H^+ exchanger genes from the salt-resistant tree *Populus euphratica*. Physiol Plant, 2009, 137(2): 166–174.
- [50] Shi LY, Li HQ, Pan XP, et al. Improvement of *Torenia fournieri* salinity tolerance by expression of *Arabidopsis AtNHX5*. Funct Plant Biol, 2008, 35(3): 185–192.
- [51] Barragán V, Leidi EO, Andrés Z, et al. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2012, 24(3): 1127–1142.
- [52] Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes. J Biol Chem, 2002, 277(4): 2413–2418.
- [53] An J, Hou L, Kong XQ. Overexpression of AtNHX5 Increases salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*. Acta Botan Boreali-Occidental Sin, 2012, 32(6): 1106–1111 (in Chinese).
- 安静, 侯蕾, 孔祥强. AtNHX5 基因过量表达对拟南芥耐盐性的影响. 西北植物学报, 2012, 32(6): 1106–1111.
- [54] Huertas R, Rubio L, Cagnac O, et al. The K^+/H^+ antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K^+ homeostasis in transgenic tomato. Plant Cell Environ, 2013, 36(12): 2135–2149.
- [55] Fukuda A, Nakamura A, Hara N, et al. Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na^+/H^+ antiporter genes. Planta, 2011, 233(1): 175–188.
- [56] Bowers K, Levi BP, Patel FI, et al. The sodium/proton exchanger Nhxl is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2000, 11(12): 4277–4294.
- [57] Lin XJ, Li HQ. Overexpression of AtNHX5 improves tolerance to salt stress in tobacco. Northern Horticulture, 2011(9): 123–126 (in Chinese).
- 林小洁, 李洪清. 转拟南芥 AtNHX5 基因烟草的耐盐性研究. 北方园艺, 2011(9): 123–126.
- [58] Li MR, Lin XJ, Li HQ, et al. Overexpression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and water stress in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell, Tissue Organ Cult, 2011, 107(2): 283–293.
- [59] Li MR, Li Y, Li HQ, et al. Overexpression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and drought stress in *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. Tree Physiol, 2011, 31(3): 349–357.
- [60] Yang Q, Wang YY, Liu YG, et al. Study on optimization of soybean cotyledonary node genetic transformation system and the transformation of resistance gene AtNHX5. Soybean Sci, 2015, 34(2): 205–211 (in Chinese).
- 杨权, 王月月, 刘炎光, 等. 大豆子叶节遗传转化体系优化及抗逆基因 AtNHX5 的转化研究. 大豆科学, 2015, 34(2): 205–211.
- [61] Wu XX, Li J, Wu XD, et al. Ectopic expression of *Arabidopsis thaliana* $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporter gene, AtNHX5, enhances soybean salt tolerance. Genet Mol Res, 2015, 15(2): 1–12.
- [62] Wan P. Transformation of potato with *Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporter genes. Lanzhou: Lanzhou University, 2015 (in Chinese).
- 万鹏. 拟南芥 Na^+/H^+ 反向交换体基因转化马铃薯研究. 兰州: 兰州大学, 2015.

(本文责编 陈宏宇)