

综述

# 植物液泡膜阳离子/H<sup>+</sup>反向转运蛋白结构和功能研究进展

张玉秀<sup>1</sup>, 彭晓静<sup>1</sup>, 柴团耀<sup>2</sup>, 张春玲<sup>3</sup>, 刘金光<sup>1</sup>

1 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083

2 中国科学院研究生院生命科学学院, 北京 100049

3 河北维尔康制药有限公司, 石家庄 050031

**摘要:** 阳离子转运蛋白在调节细胞质阳离子浓度过程中发挥关键作用。液泡是一个储存多种离子的重要细胞器, 阳离子 (Ca<sup>2+</sup>)/H<sup>+</sup>反向转运蛋白 CAXs 定位在液泡膜上, 主要参与 Ca<sup>2+</sup>向液泡的转运, 也参与其他阳离子的转运。近年来, 植物中分离鉴定了多个 CAX 基因, 植物 CAXs 主要有 4 个功能域: NRR 通过自抑制机制调节 Ca<sup>2+</sup>转运活性, CaD 和 C 功能域分别赋予 CAXs 的 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>专一性转运活性, D 功能域可调节细胞质 pH。拟南芥 AtCAXs 参与植物的生长发育和胁迫适应过程, AtCAX3 主要在盐胁迫下转运 Ca<sup>2+</sup>, AtCAX2 和 AtCAX4 在重金属胁迫下参与重金属离子 (Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>) 的转运和解毒过程, 表明 CAXs 基因在强化植物营养和提高植物修复潜力方面有重要作用。以下主要综述植物 CAXs 的分类、结构及功能方面的研究进展。

**关键词:** CAXs, 结构, 功能, 重金属

## Structure and function of tonoplast Cation/H<sup>+</sup> antiporters in plant: a review

Yuxiu Zhang<sup>1</sup>, Xiaojing Peng<sup>1</sup>, Tuanyao Chai<sup>2</sup>, Chunling Zhang<sup>3</sup>, and Jinguang Liu<sup>1</sup>

1 School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

2 College of Life Science, Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Hebei Welcome Pharmaceutical Corporation Limited, Shijiazhuang 050031, China

**Abstract:** Cation transporters play important roles in modulating the concentration of intracellular metal ions. The vacuole is an important storage organelle for many ions. Cation (Ca<sup>2+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporters (CAXs) located at vacuolar membrane are mainly involved in the Ca<sup>2+</sup> flux into the vacuole, and appear to be capable of transporting various divalent cations to some degree. Several CAX genes have been isolated and characterized from various plants in recent years. Four domains of plant CAXs have been identified: NRR regulates Ca<sup>2+</sup> transport by a mechanism of N-terminal autoinhibition; Ca domain and C domain confer Ca<sup>2+</sup>

**Received:** July 14, 2010; **Accepted:** November 9, 2010

**Supported by:** National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2009ZX08009-130B), Fundamental Research Funds for the Central University (No. 2010YH05).

**Corresponding author:** Tuanyao Chai. Tel: +86-10-88256343; E-mail: tychai@gucas.ac.cn

国家转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-130B), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 2010YH05) 资助。

and Mn<sup>2+</sup> specificity among CAX transporters, respectively; D domain plays a part in the regulation of cytosolic pH. AtCAXs identified in *Arabidopsis thaliana* are involved in the growth, development and stress adaption of plant. AtCAX3 is the mainly Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> transporter in response to salt stress; AtCAX2 and AtCAX4 participate in transportation and detoxification of heavy metal ions (Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>) in cells under heavy metal stress, and impact root/shoot Cd partitioning in plant. These suggest that CAX genes may be useful for nutritional enhancement of plants, and for increasing phytoremediation potential. Here, the classification, structure and function of CAXs in plants are reviewed.

**Keywords:** CAXs, structure, function, heavy metal

Ca<sup>2+</sup>是细胞结构组分, 又是多种酶的辅助因子和许多细胞代谢过程的信使分子。细胞质中的 Ca<sup>2+</sup>是植物生理代谢的枢纽, 其浓度的变化参与调节植物生长和对环境的适应性过程。Ca<sup>2+</sup>缺乏导致植株叶片坏疽, 产量降低, 甚至死亡; 相反, Ca<sup>2+</sup>浓度过高, 胞内 Ca<sup>2+</sup>平衡破坏, 引起 Ca<sup>2+</sup>中毒, 磷代谢受到干扰。植物细胞内存在精细的 Ca<sup>2+</sup>浓度调节机制, 既能使细胞质中游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度迅速升高以响应环境变化, 又能使其维持基础条件下的低浓度, 这种精细的调节机制主要是通过体内 Ca<sup>2+</sup>转运系统实现的。Ca<sup>2+</sup>转运系统包括 Ca<sup>2+</sup>通道、Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Ca泵) 和 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> 反向转运蛋白 (Cation (Ca<sup>2+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter) 等, Cation (Ca<sup>2+</sup>)/H<sup>+</sup>反向转运蛋白又称为阳离子交换器 (Cation (Ca<sup>2+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger, CAXs)。液泡是细胞存储 Ca<sup>2+</sup>的主要细胞器, Ca<sup>2+</sup>的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 和具有高效转运能力的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运蛋白均定位在液泡膜上, 通过水解 ATP 供能可将细胞质 Ca<sup>2+</sup>转运到液泡中, 从而可部分地调控细胞质的 Ca<sup>2+</sup>水平<sup>[1]</sup>。

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运蛋白 (VCX1) 属于 CAX 家族, 负责向液泡转运 Ca<sup>2+</sup>; 酵母突变株 K667 液泡缺失 Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCI) 和 VCX1, 因此表现 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷, 对 Ca<sup>2+</sup>敏感性增强, 不能在高浓度 Ca<sup>2+</sup> (≥100 mmol/L) 培养基中生长<sup>[2]</sup>。模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtCAX1 和 AtCAX2 可抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷, 是首次被鉴定的植物 CAX 家族蛋白<sup>[3]</sup>。CAX 广泛存在于古生菌、细菌和真核生物<sup>[4]</sup>。植物 CAXs 定位于液泡膜, 由质子泵 H<sup>+</sup>-ATPase 或 H<sup>+</sup>焦磷酸酶 (Pyrophosphatase) 形成的 pH 梯度驱动

将细胞质中的多种金属阳离子输入到液泡中, 使胞质的金属离子维持在合适的浓度范围<sup>[3,5]</sup>。目前, 已鉴定了多种植物 CAX 基因, 如拟南芥 AtCAX1-6、水稻 *Oryza sativa* 的 OsCAX1-4、绿豆 *Vigna radiate* 的 VCAX1、玉米 *Zea may* 的 ZmHCX1 和 ZmCAX2、大豆 *Glycine max* 的 GmCAX1 和绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 的 CrCAX1-2 等, 多数研究主要集中在 AtCAX1-4。植物 CAXs 除具有 Ca<sup>2+</sup>反向转运活性外, 还能转运其他金属离子, 如 AtCAX2 可转运 Mn<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>, CrCAX1 和 AtCAX4 能转运 Cd<sup>2+</sup>等<sup>[6-8]</sup>。过量表达 CAXs 可提高植株的 Ca<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>或 Mn<sup>2+</sup>等金属离子耐受性和累积能力<sup>[2,9-10]</sup>。

土壤重金属污染, 尤其是 Cd、Mn 和 Pb 污染问题日益严重, 重金属不仅能毒害植物, 导致生理代谢紊乱, 产量和品质降低<sup>[1,11]</sup>, 而且能通过食物链的富集作用威胁人类的健康。重金属累积植物可通过吸收和累积重金属清除土壤中的重金属离子, 其中重金属转运蛋白在重金属离子的吸收、转运和解毒方面发挥重要作用。CAXs 可转运重金属 Mn 和 Cd<sup>[7-8]</sup>, 为提高植物的重金属耐受性、增强土壤重金属污染的植物修复能力和强化食物营养元素带来了曙光。近年来, 植物 CAXs 的结构、功能和金属离子转运特性等研究取得了很大进展。本文主要综述了植物 CAXs 的分类、结构、功能及其在重金属累积植物中作用的研究进展。

## 1 植物 CAXs 的分类和在细胞组织中的分布

### 1.1 植物 CAXs 的分类

生物体中有多个 CAX, 为了研究其结构与功能

的关系, 根据 CAXs 的序列和结构相似性对其进行归类分析。利用来源于细菌、真菌、植物、低等脊椎动物 (鱼和两栖动物) 的 138 个全长的 CAX 序列构建进化树, 分析表明 CAXs 可分为 3 个类型, 其中 I 型 CAXs 包括植物以及部分真菌和细菌的 CAXs, I 型 CAXs 又可分为 8 个亚型 (A-G)。虽然不同进化分枝的保守氨基酸重复序列 (c-repeat) 略有不同, 但 A 亚型 CAXs 的第 4 跨膜功能域 (Transmembrane domain 4, TM4) 后面均含有高亲水氨基酸区域, 其中含有多个带正电荷的氨基酸残基, 与 TM6 和 TM7 之间的酸性氨基酸基序不同<sup>[12]</sup>。我们在 GenBank 中搜索了来源于水稻、拟南芥、玉米、绿豆、绿藻以及酵母等的 17 个 CAXs 的氨基酸序列, ClustalX2 分析显示 (图 1), CAXs 分为 4 个进化分支, 酵母 VCX1 和绿藻 CrCAX 分别为独立的 F 亚型和 C 亚型, 高等植物拟南芥、水稻、玉米和绿豆等 CAXs 形成另外两大进化分支: A 亚型和 B 亚型, 其中拟南芥 (AtCAX1、AtCAX3 和 AtCAX4)、水稻 (OsCAX1a、OsCAX1b 和 OsCAX1c)、绿豆 (VCAX1) 和玉米 (ZmHCX1) 属于 A 亚型; 而拟南芥 AtCAX2、AtCAX5 和 AtCAX6 与水稻 OsCAX2、OsCAX3 和 OsCAX4 属于 B 亚型, 与 Shigaki 等<sup>[12]</sup>的分类结果相似。在 A 亚型 CAXs 中, 双子叶植物绿豆 VCAX1 与拟南芥 AtCAX1 的序列一致性为 68%; 禾本科单子叶植物玉米 ZmHCX1 与水稻 OsCAX1b 序列一致性为 77%; 而单子叶植物 OsCAX1a、OsCAX1b、OsCAX1c 和 ZmHCX1 与双子叶植物 AtCAX1 的序列一致性分别为 63%、62%、57% 和 64%, 表明双子叶植物和单子叶植物的 CAXs 差异性较大。A 亚型中的 AtCAX1 主要参与  $\text{Ca}^{2+}$  转运, 而 AtCAX3 和 AtCAX4 分别参与盐胁迫和  $\text{Cd}^{2+}$  转运的。在 B 亚型 CAXs 中, AtCAX5 和 AtCAX6 与 AtCAX2 的一致性分别为 87% 和 82%, OsCAX2、OsCAX3 和 OsCAX4 与 AtCAX2 的序列一致性均高达 70%。拟南芥 AtCAX2 的 CAF 氨基酸残基赋予其  $\text{Mn}^{2+}$  转运特性, 而 AtCAX5 和 AtCAX6 也均含有

CAF 残基, 推测二者可能也参与  $\text{Mn}^{2+}$  转运<sup>[13]</sup>, 所以这 3 个 CAX 同归为 B 亚型。尽管水稻 OsCAX2、OsCAX3 和 OsCAX4 与 AtCAX2 的氨基酸序列一致性较高, 但其转运特性未见报道。绿藻 CrCAX1 和 CrCAX2 与酵母  $\text{Ca}^{2+}$  转运 VCX1 的序列一致性分别为 43% 和 42%, 然而 CrCAX1 同时具有  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^{+}$  转运作用<sup>[6]</sup>。从进化树分析得知 CAXs 是一种进化上保守的蛋白质, 主要参与  $\text{Ca}^{2+}$  转运, 同时也可转运其他多种金属阳离子。

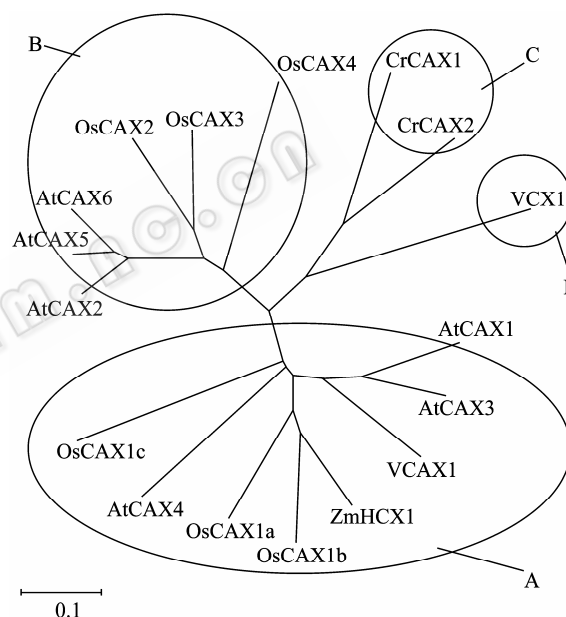


图 1 植物 CAXs 的分类

Fig. 1 Classification of CAXs in plants.

## 1.2 CAXs 在植物组织器官中的表达和定位

AtCAX1 是细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平的重要调节器<sup>[1]</sup>。AtCAX1-GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 融合表达显示 AtCAX1 主要在叶片、花组织、以及子叶和幼叶的维管细胞中表达, 在根、茎表达较少; 全长的 AtCAX1 (Long AtCAX) 和缺失 N-端调节区 (N-terminal regulatory region, NRR) 36 个氨基酸 (aa) 的 AtCAX1 (short AtCAX, sAtCAX) 在 50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  时均可抑制酵母突变株 K667 对  $\text{Ca}^{2+}$  的敏感性<sup>[14]</sup>, 且表达 sAtCAX1 的转基因烟草液泡的  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  反向转运活性增加<sup>[1]</sup>。红细胞凝集素 (Hemagglutinin, HA) 标记

的全长的 AtCAX1 (HA-AtCAX1) 和 NRR 缺失的 sAtCAX1 (HA-sAtCAX1) 在酵母中异源表达, 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析表明 AtCAX1 和 sAtCAX1 均定位在酵母的液泡膜上<sup>[15]</sup>。免疫分析也进一步证实 HA-sAtCAX1 和 AtCAX1 均定位于拟南芥和烟草的液泡膜, 排除了 AtCAX1 位于内质网和叶绿体的可能性<sup>[16]</sup>。绿藻 *CrCAX1-GFP* (Green fluorescent protein, GFP) 和 *sCrCAX1-GFP* 融合表达显示 *CrCAX1* 定位于液泡膜上<sup>[6]</sup>。表明 CAX1 定位于液泡膜上, 具有向液泡转运 Ca<sup>2+</sup>作用, 且 NRR 不影响其定位。

Northern 杂交表明在拟南芥所有组织中的 *AtCAX2* mRNA 水平均低于 *AtCAX1*<sup>[9]</sup>。*AtCAX2-GUS* 融合表达表明 *AtCAX2* 主要在 10 d 苗龄拟南芥的叶片维管组织、顶端分生组织、根部维管组织及根尖表达; 在 30 d 的幼苗中, *AtCAX2* 主要在叶柄、叶片维管组织、叶片水孔 (Leaf hydathodes) 及花组织中表达<sup>[7]</sup>。蛋白质印迹分析显示 *AtCAX2* 定位于野生型拟南芥的液泡膜<sup>[9]</sup>。*AtCAX3* 与 *AtCAX1* 的序列一致性为 78%, 然而, *AtCAX3* 主要在根部表达, 尤其是根尖, 而在叶片及茎组织中很少, 幼花芽和花中也观察到 *AtCAX3* 的表达<sup>[14]</sup>, 表明 *AtCAX1* 和 *AtCAX3* 表达的组织部位特异性不同。免疫印迹分析显示 *HA-AtCAX3* 在拟南芥和烟草的液泡膜表达, 而不是定位在内质网中<sup>[14]</sup>, 与 *AtCAX1* 在细胞中的定位序列一致。*AtCAX4* 与 *AtCAX1*、*AtCAX2* 和 *AtCAX3* 的一致性分别为 53%、42% 和 54%, *AtCAX4* 的 mRNA 水平很低, 在所有组织中都检测不到, 但幼苗经 Mn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 或 Ni<sup>+</sup> 处理后其 mRNA 水平提高。蛋白质印迹结果显示 HA-AtCAX4 定位于酵母液泡膜; 烟草悬浮细胞免疫显色结果显示与 HA 抗体和二级抗体德克萨斯红 (Texas red) 结合的 HA-AtCAX4 在液泡膜上生成红色荧光信号, 表明 AtCAX4 也定位于液泡膜<sup>[8]</sup>。

## 2 CAXs 的结构和功能域

CAXs 是跨膜蛋白 (图 2), 酵母和植物 CAXs

有 11 个 TM, N-端位于细胞质, C-端位于液泡中。TM6 和 TM7 之间的一个酸性氨基酸基序将 CAX 分成大约相等的两部分; TM3 与 TM4、TM8 与 TM9 之间均含有与离子转运专一性有关的两个保守氨基酸重复序列 (c-1 和 c-2)<sup>[12,17]</sup>。CAXs 有 4 个典型的功能域 (图 2): N-末端自抑制区域 NRR、Ca<sup>2+</sup>功能域 (CaD)、C 功能域和 D 功能域, 并确定了起作用的关键氨基酸。NRR 调控 CAXs 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性, 且只有在 N-端的依赖调节区域 (Regulation-dependent region, RDR) 存在时才能抑制 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>转运活性<sup>[15,18-19]</sup>, CaD 决定 CAXs 的 Ca<sup>2+</sup>转运能力<sup>[20]</sup>, C 功能域与 AtCAX2 的 Mn<sup>2+</sup>专一性转运相关<sup>[13]</sup>, D 功能域调节胞质的 pH<sup>[21]</sup>。

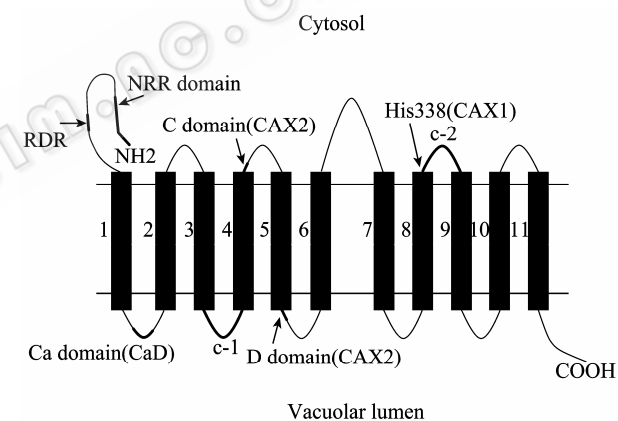


图 2 CAXs 的拓扑结构

Fig. 2 Topology model of CAXs.

### 2.1 NRR 功能域

AtCAX1 的 NRR 功能域调节其 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性。表达序列标签 (Expressed sequence tag, EST) 分析表明 AtCAX1 的 N-端比 VCX1 多 36 aa, 命名为 N1-36 或 NRR (图 2)。AtCAX1 在液泡膜的定位与 NRR 无关<sup>[6,14-15]</sup>。sAtCAX1 可抑制酵母突变株 K667 对高浓度 Ca<sup>2+</sup>的敏感性, 而全长 AtCAX1 无此功能, 说明 NRR 可通过 N-末端自抑制机制调节 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性<sup>[15]</sup>。

合成肽 AtCAX1-NRR 与 AtCAX1 的 NRR 序列一致, 可专一性地抑制 sAtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向

转运活性，却不能抑制 sAtCAX2、VCX1 和 sAtCAX3-9 的  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  反向转运活性，说明 NRR 功能域的抑制作用具有专一性。将 sAtCAX1 的前 1/4 区域 (37-149 aa, A 区域) 融入到 sAtCAX3 的阅读框中，获得 sAtCAX3-A 融合肽，其  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  反向转运活性可被 AtCAX1-NRR 抑制；含有 CaD (9 aa, 位于 A 区域的后半段) 的 sAtCAX1 反向转运活性可被 AtCAX1-NRR 抑制；然而，AtCAX1 的 CaD 分别与 sAtCAX3 和 sAtCAX2 融合得到 sAtCAX3-9 和 sAtCAX2-9 融合肽，其反向转运活性不受 AtCAX1-NRR 影响，说明与 NRR 相互作用的区域位于 A 区域的前半段，而非 CaD。将 sAtCAX1 的 A 区域进一步分成 A1 (37-73 aa) 和 A2 (74-149 aa) 两个区域，AtCAX1-NRR 不能抑制融合肽 sAtCAX3-A2 (sAtCAX1 的 A2 取代 sAtCAX3 相应的区域) 和 sAtCAX1-A1 (sAtCAX3 的 A1 取代 sAtCAX1 相应的区域) 的  $\text{Ca}^{2+}$  反向转运活性，表明 A1 区域是 AtCAX1-NRR 抑制 AtCAX1 反向转运活性的关键区域<sup>[18]</sup>。

AtCAX1 中的 NRR 与 RDR 相互作用可调节其  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性 (图 3)。氨基酸序列比对分析表明 AtCAX1 的 A1 有  $\text{V}^{50}\text{I}^{51}$  和  $\text{Y}^{56}\text{K}^{57}\text{G}^{58}\text{L}^{59}\text{K}^{60}\text{D}^{61}\text{F}^{62}$  (7 aa) 2 个异质性区域，其序列与 AtCAX3 的 A1 区域不同。将 sAtCAX3-9 (含有 AtCAX1 CaD 的 9 aa) 和 sAtCAX1-A1 的  $\text{L}^{50}\text{V}^{51}$  定点突变为 AtCAX1 的 A1 的  $\text{V}^{50}\text{I}^{51}$  后，两种突变蛋白均可转运  $\text{Ca}^{2+}$ ，但其反向转运活性不受 AtCAX1-NRR 的影响。将 sAtCAX3-9 和 sAtCAX1-A1 的  $\text{C}^{56}\text{K}^{57}\text{T}^{58}\text{L}^{59}\text{K}^{60}\text{N}^{61}\text{I}^{62}$  定点突变为 AtCAX1 的 A1 中的  $\text{Y}^{56}\text{K}^{57}\text{G}^{58}\text{L}^{59}\text{K}^{60}\text{D}^{61}\text{F}^{62}$  序列，突变的 sAtCAX3-9-7aa 和 sAtCAX1-A1-7aa 均有  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性，且能被 AtCAX1-NRR 抑制，说明 A1 的 7 aa 序列是 NRR 抑制 AtCAX1 反向转运活性的关键氨基酸。AtCAX1 的 7 aa 序列被 AtCAX3 的取代后 (AtCAX1-7aa)，可以抑制酵母突变株 K667 的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性，但其活性低于 sAtCAX1；sAtCAX1 的 7 aa 序列被 AtCAX3 的 7 aa 取代后

(sAtCAX1-7 aa)，其抑制酵母突变株 K667 的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性与 sAtCAX1 的活性一致，但其反向转运活性不受 AtCAX1-NRR 的影响。这些结果表明 RDR 的 7 aa 残基  $\text{Y}^{56}\text{K}^{57}\text{G}^{58}\text{L}^{59}\text{K}^{60}\text{D}^{61}\text{F}^{62}$  是 AtCAX1 自抑制发生所必需的，即只有 RDR 存在时，AtCAX1-NRR 才能抑制  $\text{Ca}^{2+}$  的转运。酵母双杂交系统 (Yeast two-hybrid assay) 分析显示 (图 3) NRR 的 5 个氨基酸残基  $\text{Ser}^{25}$ 、 $\text{Arg}^{26}$ 、 $\text{Arg}^{29}$ 、 $\text{Arg}^{32}$  和  $\text{Thr}^{33}$  在与 RDR 相互作用中发挥重要作用。当受刺激时，AtCAX1 的 NRR 构象发生变化，可阻止 NRR 与 RDR 的相互作用，从而激活 AtCAX1 的反向转运活性；NRR 缺失时 (sAtCAX1)，蛋白质从  $\text{Met}^{37}$  开始翻译，不能与 RDR 相互作用，致使反向转运蛋白 sAtCAX1 一直处于活化状态<sup>[18]</sup>。

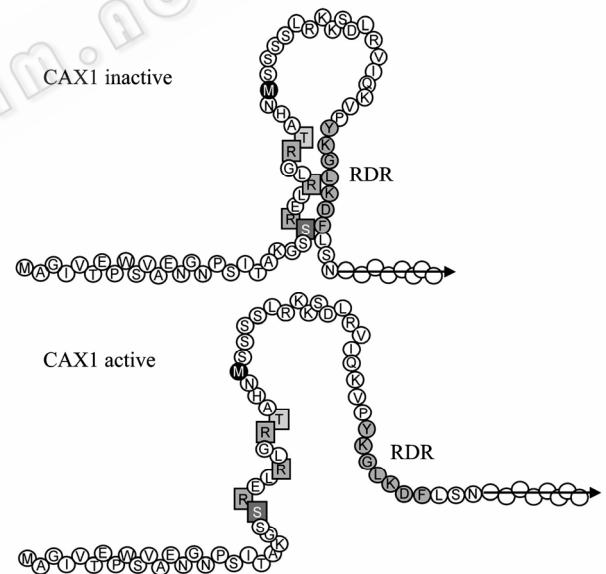


图 3 NRR 调节 AtCAX1 的模型<sup>[18]</sup>

Fig. 3 Model of CAX1 regulation by the NRR<sup>[18]</sup>.

NRR 的磷酸化参与调节 AtCAX1 的  $\text{Ca}^{2+}$  反向转运活性。AtCAX1 的 NRR 有 5 个可能的磷酸化位点，如  $\text{Thr}^6$ 、 $\text{Ser}^{10}$ 、 $\text{Ser}^{24}$ 、 $\text{Ser}^{25}$  和  $\text{Thr}^{33}$ ，这些氨基酸的定点突变可以抑制其磷酸化作用，导致 AtCAX1 失活。将这 5 个氨基酸分别定点突变为 Ala (A)，突变株分析表明只有 T33A (Thr 定点突变为 Ala) 突变的

AtCAX1 可以强烈抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性, 说明 Thr<sup>33</sup> 的磷酸化可降低 K667 突变株对 Ca<sup>2+</sup>敏感性。进一步将 Thr<sup>33</sup> 定点突变为 Asp (T33D) (模拟连续磷酸化) 以及 T33S 和 T33E, 这些突变均可使酵母菌株 K667 在高浓度 Ca<sup>2+</sup>环境中生长, 表明 Thr<sup>33</sup> 在自抑制作用中主要受其结构的影响, 而非磷酸化作用。S25A 突变仅能微弱地抑制 K667 酵母的 Ca<sup>2+</sup>敏感性, S25T 则不能; 但模拟连续磷酸化的 S25D 突变体与 sAtCAX1 一致, 可以有效抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性。S10D 和 S24D 的突变都不能抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷。因此, AtCAX1 的 Ser<sup>25</sup> 磷酸化可激活其 Ca<sup>2+</sup>转运活性。不带电荷的 Ala 取代 Arg 残基时, AtCAX1 被激活, 因此, 带正电荷的 Arg 残基也参与自抑制机制<sup>[18]</sup>。

信号分子 CXIP4 (CAX interacting proteins 4) 是拟南芥细胞核蛋白, 可调节 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性。CXIP4 与 AtCAX1 的 NRR 结合, 可阻止 AtCAX1 自抑制作用, 从而激活 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性。CXIP4 基因只存在于植物中, 编码一个由 332 aa 组成的分子量约为 37.8 kDa 的多肽, CXIP4 富含 Arg (15.1%)、Lys (11.1%)、Glu (11.7%) 和 Ser (15.4%)。MotifScan 显示 CXIP4 的 N-端有一个锌指基序 (CCHC), C-端有一富含 Arg 的区域, 在酵母中可激活 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性。研究表明 CXIP4 或 AtCAX1 在酵母突变株 K667 中单一表达均不能抑制其液泡 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷, 然而, CXIP4+AtCAX1 共表达时酵母突变株 K667 可在 200 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的培养基中生长, 其 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性是 sAtCAX1 突变株的 10%, 表明 CXIP4 可激活 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性。CXIP4 只能激活 AtCAX1 的 Ca<sup>2+</sup>转运活性, 而对 AtCAX2、AtCAX3 和 AtCAX4 无作用, 然而, CXIP4 能激活含有 AtCAX1-NRR 的 AtCAXs 融合体的 Ca<sup>2+</sup>转运活性, 说明 CXIP4 与 AtCAX1 的相互作用位点位于 NRR 功能域。sAtCAX3-A1 N-端的 A1 区域来源于 AtCAX1, 但 sAtCAX3-A1+CXIP4

与 AtCAX1+CXIP4 抑制酵母突变株的 Ca<sup>2+</sup>敏感性的能力不同; 保持有自抑制能力的、NRR 突变的 AtCAX1 和 CXIP4 共表达时, 一些突变可抑制酵母突变株的 Ca<sup>2+</sup>敏感性, 另一些突变则不能, 表明 AtCAX1 的 NRR 有多个区域参与 CXIP4 的激活作用<sup>[22]</sup>。

氨基酸序列分析显示 NRR 普遍存在于 CAXs 中, VCAX1、AtCAX2、AtCAX3、AtCAX4 以及 CrCAX1 都含有相似的 NRR 序列<sup>[6,19]</sup>, CrCAX1 仅能轻微地抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性, 然而, 在 200 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 浓度下, sCrCAX1 与 sAtCAX1 一样能有效抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性<sup>[6]</sup>。AtCAX1 和 AtCAX3 的 NRR 的氨基酸序列 (36 aa) 有 24 个完全相同, 但 AtCAX3 和 sAtCAX3 都不能抑制酵母突变株 K667 对高浓度 Ca<sup>2+</sup>的敏感性。AtCAX4 也不能抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性, 然而, N-端融合体 HA-AtCAX4 与 sAtCAX1 一样, 可有效地抑制酵母突变株 K667 液泡的 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷。sAtCAX4 或融入 AtCAX1 CaD 序列的 AtCAX4 均可轻微地抑制酵母突变株转运 Ca<sup>2+</sup>的缺陷; 融入 AtCAX1 CaD 的 sAtCAX4 与 sAtCAX1 活性一样, 能有效抑制酵母突变株 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷, 表明 CAXs 可能是通过改变 N-端构象调节 Ca<sup>2+</sup>转运活性<sup>[8]</sup>。

CAXs 的 NRR 精确的调节机制存在差异。AtCAX2 的 N-端有 2 个 Met 残基。N-端缺失前 42 aa 的 sAtCAX2 可抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>敏感性, N-端缺失前 16 aa 的 sAtCAX2 与 AtCAX2 一样, 不能抑制酵母突变株 K667 的 Mn<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>敏感性; 而 N-端不完整的 AtCAX1 可抑制酵母突变株 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性<sup>[15]</sup>。AtCAX3 的 NRR 序列与 AtCAX1 高度一致, 但其调节功能与后者存在差异。在 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 培养基中, 表达 sAtCAX3 的酵母突变株与空载体对照株系的生长状况相似, 表达 AtCAX3 的酵母突变株的生长虽然较差, 但优于对照株系。AtCAX3 的 NRR 定点突变后能抑制 sAtCAX1

的  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性。AtCAX3 的 NRR 与 sAtCAX1 构建的融合体 3N:sAtCAX1 可抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性, 将  $\text{A}^{17}\text{N}^{18}\text{V}^{19}$  定点突变为  $\text{P}^{17}\text{S}^{18}\text{I}^{19}$  (3N-3:sAtCAX1), 仍可抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性; 将  $\text{His}^{30}$  突变为  $\text{Leu}$  (3N-1:sAtCAX1) 则不能抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性。绿豆 VCAX1 也有一个长的疏水的 N-末端, 其 NRR 与 AtCAX1 的相似性较低, 在 31 aa 中只有 18 个相同。VCAX1 虽没有 sAtCAX1 作用显著, 但也可以抑制酵母突变株 K667 的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性, 敲除 N-端前 31 aa 的 VCAX1 (sVCAX1) 与 sAtCAX1 一样, 能有效地抑制 K667 的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性, 其活性比全长 VCAX1 提高了 70%。与 AtCAX1 相比, VCAX1 的 NRR 的 C 端有 3 个异质性区域:  $\text{Pro}^{16}$  之后缺失 SITA,  $\text{V}^{18}\text{L}^{19}\text{T}^{20}$  和  $\text{M}^{23}\text{R}^{24}\text{H}^{25}$  序列分别取代了 AtCAX1 的  $\text{G}^{18}\text{S}^{19}\text{S}^{20}$  和  $\text{L}^{23}\text{R}^{24}\text{L}^{25}$  序列。只有将 VCAX1 中 NRR 的  $\text{M}^{23}\text{R}^{24}\text{H}^{25}$  定点突变为  $\text{L}^{23}\text{R}^{24}\text{L}^{25}$  时, VCAX1 的 NRR 和 sAtCAX1 融合肽 VN:sAtCAX1 才不能抑制酵母突变株 K667 的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性。3N:sAtCAX1 和 VN:sAtCAX1 的定点突变研究表明 AtCAX1 的  $\text{Leu}^{30}$  在其自抑制中发挥重要作用。AtCAX1-L30H ( $\text{Leu}^{30}$  突变为  $\text{His}$ ) 和 sAtCAX1 同样能有效抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性。每一种  $\text{Ca}^{2+}$  转运蛋白的调节功能域均有特定的作用方式, 功能域间的微小差异都会影响其抑制活性, VCAX1 和 AtCAX1 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性差异可能是由于 N-端自抑制区域结合的紧密性不同引起的<sup>[19]</sup>。

## 2.2 Ca 功能域 (CaD)

AtCAX3 与 AtCAX1 有 78% 的一致性。AtCAX3 和 sAtCAX3 均不能抑制酵母突变株 K667 对高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的敏感性。构建的 sAtCAX1 和 sAtCAX3 融合体呈现不同的  $\text{Ca}^{2+}$  转运特性: sAtCAX3-A 融合体 (sAtCAX1 的 N-端融入 sAtCAX3) 在酵母中可转运  $\text{Ca}^{2+}$ ; sAtCAX1-A 融合体 (sAtCAX3 的 N-端融入 sAtCAX1) 不能抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性; sAtCAX1- $\beta$ /sAtCAX1- $\gamma$  或 sAtCAX1- $\delta$  融合体

(sAtCAX3 的中央或 C-端序列融入 sAtCAX1) 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性与 sAtCAX1 没有差异; 相反, sAtCAX3- $\beta$ /sAtCAX3- $\gamma$  或 sAtCAX3- $\delta$  融合体 (sAtCAX1 的中央或 C-端融入 sAtCAX3) 不能抑制酵母突变株 K667 液泡的  $\text{Ca}^{2+}$  转运缺陷, 表明 N-端区域决定 sAtCAX 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性差异。将 sAtCAX1 的 N-端分成  $\alpha 1$  (37-73 aa, 即 A1) 和  $\alpha 2$  (74-149 aa, 即 A2) 两部分, sAtCAX3-A2 (sAtCAX1 的 A2 融入 sAtCAX3) 融合体可抑制酵母突变株 K667 的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性; 而 sAtCAX3-A1 (sAtCAX1 的 A1 融入 sAtCAX3) 融合体在含  $\text{Ca}^{2+}$  的培养基中生长多天之后才有微弱的抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性作用, 因此, sAtCAX1 的 A2 区决定了 sAtCAX1 和 sAtCAX3 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运的绝大部分活性差异<sup>[20]</sup>。

AtCAX1 A2 区域的 9 aa (87-95 aa) 在不同 CAXs 中变化较大。sAtCAX3-9 融合体 (AtCAX1 A2 区域的 9 aa 融入 sAtCAX3) 只能转运  $\text{Ca}^{2+}$ , 其转运能力是 sAtCAX1 的 36.5%, 而 sAtCAX1 既可转运  $\text{Ca}^{2+}$ , 也能转运  $\text{Cd}^{2+}$ 。sAtCAX2-9 (9 aa 融入 sAtCAX2) 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性是 sAtCAX2 的 2 倍, 而  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  转运能力不变, 进一步证实 9 aa, 即 CaD 对  $\text{Ca}^{2+}$  转运的选择专一性<sup>[20]</sup>。

融入 AtCAX1 CaD 前 3 个氨基酸 (87-89 aa) 的 sAtCAX3 (sAtCAX3-3) 可抑制酵母突变株 K667 液泡  $\text{Ca}^{2+}$  转运缺陷, 但活性变化没有 sAtCAX3-9 显著, 在含  $\text{Ca}^{2+}$  的培养基中生长 2 d 后才能观察到明显菌落; 而融入 sAtCAX1 中 CaD 的中间 3 个 (90-92 aa) 或后 3 个氨基酸 (93-95 aa) 的 sAtCAX3 不能抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  转运缺陷, 表明 CaD 的前 3 个氨基酸赋予 sAtCAX3 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运能力。融合表达 sAtCAX3-3 或 sAtCAX3-6 (sAtCAX1 中 CaD 的前 6 个氨基酸分别融入 sAtCAX3 中) 的酵母  $\text{Ca}^{2+}$  吸收能力是表达 sAtCAX3-9 酵母的 60%, sAtCAX3-3 和 sAtCAX3-6 的  $\text{Ca}^{2+}$  转运能力没有差异。进一步改变 sAtCAX3 CaD 的前 3 个和后 3 个氨基酸, sAtCAX3-3X3 (sAtCAX3 CaD 的前 3 个及后 3 个氨

氨酸与 sAtCAX1 的 CaD 相应的氨基酸序列一致) 不能抑制酵母突变株 K667 液泡的 Ca<sup>2+</sup>转运缺陷, 表明 sAtCAX1 的 CaD 中间 3 个氨基酸也是 Ca<sup>2+</sup>转运必不可少的。sAtCAX3 中 CaD 的单个或多个氨基酸突变不能赋予 AtCAX3 高水平的 Ca<sup>2+</sup>转运能力, 推测 CaD 中的氨基酸可能通过形成特定的结构单元发挥作用<sup>[20]</sup>。

AtCAX1 中 CaD 的前 3 个氨基酸 (87-89 aa) 决定 sAtCAX3 的 Ca<sup>2+</sup>转运能力。将 sAtCAX3 的 87-89 aa 定点突变为 sAtCAX1 相应的氨基酸 (L87I、A88C 和 N89T), L87I 赋予 sAtCAX3 (sAtCAX3-I) 的 Ca<sup>2+</sup>转运能力最强, 是 sAtCAX1 的 7.1%。虽然 sAtCAX3-I 抑制酵母 K667 的 Ca<sup>2+</sup>敏感性能力明显不如 sAtCAX3-9, 但在 Ca<sup>2+</sup>培养基生长 2 d 后可明显看到的突变株 K667 菌落, 推测 Ile 可能与 sAtCAX3 跨膜功能域中特定的氨基酸侧链相互作用, 协助 Ca<sup>2+</sup>或 H<sup>+</sup>配位。当 sAtCAX3 的 L<sup>87</sup> 突变为特定的脂肪族或中性氨基酸时, 如 sAtCAX3-L87F、sAtCAX3-L87C、sAtCAX3-L87V 和 sAtCAX3-L87G, 仍可使酵母突变株 K667 在 Ca<sup>2+</sup>培养基中生长, 且抑制酵母突变株的 Ca<sup>2+</sup>敏感性能力与 sAtCAX3-I 突变株相等或降低; 而突变为 sAtCAX3-L87A、sAtCAX3-L87S 和 sAtCAX3-L87E 无 Ca<sup>2+</sup>转运活性。尽管难以从以上研究中推断 CaD 的作用模式, 但可肯定 L<sup>87</sup> 不能自抑制, Ile 也不是专一性转运活性所必须的。推测赋予 sAtCAX3 Ca<sup>2+</sup>转运能力的 CaD 可能形成一种特定的三维结构, 而抑制 sAtCAX3 的 CaD 序列形成与之不同的结构<sup>[20]</sup>。

CaD 以亲水环的形式将 TM1 和 TM2 分开 (如图 2), 但其调节 Ca<sup>2+</sup>转运的机制还不清楚。Ca<sup>2+</sup>结合或转运位点常常是酸性氨基酸, 但 CaD 中没有酸性氨基酸, 因此, CaD 可能不直接与 Ca<sup>2+</sup>结合, 而是通过限制跨膜功能域的运动, 使 Ca<sup>2+</sup>进入或被阻挡在“孔”外<sup>[20,23]</sup>。

### 2.3 C 功能域

AtCAX2 有较广泛的阳离子底物, AtCAX2 转基

因烟草幼苗中 Ca<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>的累积增加, 尤其是 Mn<sup>2+</sup>耐受性增强<sup>[9]</sup>。AtCAX2 可抑制酵母突变株的 Mn<sup>2+</sup>转运缺陷, 是 CAX 家族中鉴定的唯一可以转运 Mn<sup>2+</sup>的反向转运蛋白<sup>[9]</sup>。AtCAX1、AtCAX2、AtCAX3 和 AtCAX4 的氨基酸序列比对分析表明 AtCAX2 和 AtCAX1 有 5 个由 9-15 aa 组成的相似性很低的区域: A, AtCAX1 的 65-73 aa, 起始于 TM1; B, AtCAX1 的 150-160 aa, 位于在 TM3 和 TM4 之间; C, AtCAX1 的 175-184 aa, 位于 TM4; D, AtCAX1 的 219-233 aa, 位于 TM5 和 TM6 之间; E, AtCAX1 的 257-265 aa, 位于 TM6 和酸性基序之间。AtCAX1、AtCAX3、AtCAX4 和 VCAX1 的 A、B、C 以及 E 区域差异不大, 但 D 区域和 AtCAX1 的 CaD 相应的 9 aa 序列在不同 CAX 中相差很大。AtCAX1 的 A、B、C、D 或 E 区域以及 CaD 分别融入 AtCAX2 中, AtCAX2-A、AtCAX2-B、AtCAX2-C、AtCAX2-D、AtCAX2-E 以及 AtCAX2-9 融合蛋白都缺失 NRR, AtCAX2 和这些 AtCAX2 融合体均能使酵母突变株 K667 在 200 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 培养基中生长; 在 250 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的培养基中, 表达 AtCAX2、AtCAX2-9、AtCAX2-C、AtCAX2-D 或 AtCAX2-E 的酵母突变株生长状况相似, 而表达 AtCAX2-A 或 AtCAX2-B 的酵母突变株生长减少; AtCAX1、AtCAX2-A、AtCAX2-B 或 AtCAX2-C 在 10 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 的培养基中, 完全不能抑制酵母突变株的 Mn<sup>2+</sup>敏感性, 甚至在 5 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 的培养基中仍没有作用; AtCAX2-A 和 AtCAX2-B 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性显著低于 AtCAX2, 分别降低了 57.4% 和 33.4%; AtCAX2-C 的 Ca<sup>2+</sup>转运活性与 AtCAX2 没有显著差异, 但无 Mn<sup>2+</sup>转运活性, 出现 Mn<sup>2+</sup>耐受性专一性缺陷; <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>和 <sup>54</sup>Mn<sup>2+</sup>同位素标记表明在含 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>的培养基中, 只有 AtCAX2 能转运 <sup>54</sup>Mn<sup>2+</sup>, AtCAX1 和 AtCAX2-C 不能; 过量 Mn<sup>2+</sup>抑制 AtCAX2 转运 <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, 而对 AtCAX1 和 AtCAX2-C 无影响, 表明 AtCAX2 的 C 功能域与 Mn<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性有关<sup>[13]</sup>。



AtCAX2 的 C 功能域 (6 aa) 可分成相等的 C1 和 C2 两部分 (3 aa), 其序列与 AtCAX1 对应的氨基酸序列不同。AtCAX2-C2 (AtCAX1 的 IAN 取代 AtCAX2 的 LVF) 融合体与 AtCAX2 一样, 能有效抑制酵母突变株 K667 的  $Mn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  敏感性, 特异性转运活性没有降低; AtCAX2-C1 (AtCAX1 的 TSL 取代 AtCAX2 的 CAF) 与 AtCAX2-C 一样, 可抑制酵母突变株的  $Ca^{2+}$  敏感性,  $Ca^{2+}/H^+$  反向转运活性也无差异, 但在  $Mn^{2+}$  培养基中不能生长, AtCAX2-C1 无  $Mn^{2+}/H^+$  反向转运活性, 因此, 推测 CAF 残基赋予了 AtCAX2 的  $Mn^{2+}$  转运特性。AtCAX5、AtCAX6 和 ZmCAX2 的 C1 区域都存在 CAF 残基, 表明这些 CAXs 均可能转运  $Mn^{2+}$ [13]。酵母 VCX1 的 C2 区域是 LCF 残基, 转运活性可能与 AtCAX2 更相似[13]。

#### 2.4 保守序列 c-1 和 c-2

CAXs 有 11 个跨膜区域, OsCAX1a 暴露在细胞质中的 N-端有 59 aa 组成的亲水序列, TM6 和 TM7 之间有一个酸性基序; 拟南芥和酵母 CAXs 中也有相似的特征。缺失 NRR 的 OsCAX1a (OsCAX1a $\Delta$ 27) 具有  $Ca^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  转运活性。OsCAX1a 与 9 个其他植物和酵母的 CAXs 序列比对表明 CAXs 存在 2 个由 36 aa 组成的高度保守区域 c-1 (GNX2EXIX4AX8VX4LGSXLSNLXV) 和 c-2 (GNAAEHX6AX5DX2LGX3GSX2QX3FX), 二者有 14 个氨基酸相同, 7 个氨基酸在两个重复序列中都是保守的, 相一致的序列为 GNX2EX21GSX8<sup>[17]</sup>。

c-1 位于 TM3 和 TM4 之间, c-2 位于 TM8 和 TM9 之间 (图 2)。c-1 和 c-2 的氨基酸定点突变结果显示: S<sup>155</sup>、S<sup>158</sup>、N<sup>159</sup>、G<sup>325</sup>、K<sup>339</sup>、T<sup>354</sup> 和 S<sup>151</sup> 与离子选择性有关; Gly<sup>128</sup>、Asn<sup>129</sup>、Glu<sup>132</sup>、Lys<sup>144</sup>、Lys<sup>149</sup>、Gly<sup>154</sup>、Asn<sup>326</sup>、Glu<sup>329</sup>、His<sup>330</sup>、Lys<sup>341</sup>、Gly<sup>351</sup>、Ser<sup>352</sup> 和 Gln<sup>355</sup> 是 OsCAX1a 转运  $Ca^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  必需的。将 OsCAX1a $\Delta$ 27 的 8 个 Cys 定点突变为 Ser (Cys 缺失突变体), 其仍然保持 OsCAX1a- $\Delta$ 27 的功能结构, 故可通过 Cys 点突变研究其结构。进一步在 c-1 及其边界区域定点突变引入 19 个 Cys, 其中 12 个

突变株 (S105C、L113C、T118C、A130C、A136C、I145C、V148C、S150C、S158C、S170C、A178C 和 S187C) 在 50 mmol/L  $Ca^{2+}$  的液体培养基中生长虽有差异, 但均可在 200 mmol/L  $CaCl_2$  的琼脂平板培养基中生长; 而其余 7 个突变株 (A139C、K142C、G143C、E146C、V147C、L153C 和 S155C) 缺失  $Ca^{2+}$  的耐受性, 表明 c-1 中的 7 个氨基酸 (A<sup>139</sup>、K<sup>142</sup>、G<sup>143</sup>、E<sup>146</sup>、V<sup>147</sup>、L<sup>153</sup> 和 S<sup>155</sup>) 是酵母中  $Ca^{2+}$  转运或形成特定的结构必需的。同样, 在 c-2 的 25 个 Cys 突变株中, 14 个突变株 (S317C、I335C、A337C、K339C、N340C、K341C、L342C、D343C、I344C、T345C、S352C、A353C、Q374C 和 D378C) 缺失  $Ca^{2+}$  转运活性, 表明这 14 个氨基酸 (S<sup>317</sup>、I<sup>335</sup>、A<sup>337</sup>、K<sup>339</sup>、N<sup>340</sup>、K<sup>341</sup>、L<sup>342</sup>、D<sup>343</sup>、I<sup>344</sup>、T<sup>345</sup>、S<sup>352</sup>、A<sup>353</sup>、Q<sup>374</sup> 和 D<sup>378</sup>) 可能与 OsCAX1a 的活性或形成四级结构有关<sup>[17]</sup>。

巯基试剂 4-乙酰氨基-4'-2,2'-二磺酸 (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, AMS) 不能透过液泡膜, 只能与面向细胞质一侧的 Cys 反应, 而 BM (3-(N-maleimidylpropionyl)-biocytin) 可以穿透液泡膜与亲水区的 Cys 反应。用 BM 处理 c-1 和 c-2 突变株的液泡膜泡, 只有 S158C、S170C、S314C、A331C、L338C、S357C 和 S364C 突变株没有被 BM 标记; 若先与 AMS 反应, 再与 BM 反应, 则 c-1 的 4 个突变株 (T118C、I145T、A178C 和 S187C) 和 c-2 的 4 个突变株 (S308C、A333C、A349C 和 T354C) 没有被 BM 标记, 表明这 8 个氨基酸 (T<sup>118</sup>、I<sup>145</sup>、A<sup>178</sup>、S<sup>187</sup>、S<sup>308</sup>、A<sup>333</sup>、A<sup>349</sup> 和 T<sup>354</sup>) 暴露在细胞质; 而 c-1 的 6 个氨基酸 (S<sup>105</sup>、L<sup>113</sup>、A<sup>130</sup>、A<sup>136</sup>、V<sup>148</sup> 和 S<sup>150</sup>) 及 c-2 的 2 个氨基酸 (G<sup>300</sup> 和 G<sup>325</sup>) 仍然可被 BM 标记, 表明其暴露在液泡腔 (如图 4)。c-1 中的 4 个保守氨基酸残基 Glu<sup>132</sup>、Gly<sup>154</sup>、Ser<sup>155</sup> 和 Asn<sup>159</sup> 与 c-2 的 4 个保守氨基酸残基 Ala<sup>337</sup>、Asp<sup>343</sup>、Gly<sup>351</sup> 和 Ser<sup>352</sup> 也同样存在于动物  $Na^+/Ca^{2+}$  转运蛋白 NCX1、NCX2 和 CalX 的保守序列  $\alpha$ -1 和  $\alpha$ -2 中。推测植物 c-1 和 c-2 可能与  $\alpha$ -1 和  $\alpha$ -2 一样,

形成反向的跨膜的凹形环, c-1 环从液泡腔一侧穿过膜, c-2 环从细胞质一侧穿过液泡膜, 在胞质一侧区域形成“离子过滤”结构, 是 Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 H<sup>+</sup>的通道<sup>[17]</sup>。

## 2.5 D 功能域

在质膜、液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 产生的电化学质子梯度驱动下, 液泡膜 CAXs 将细胞质中过量的 Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>等金属阳离子转运到液泡中, 降低其对植物细胞的毒害。CAX 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性受细胞质 pH 调节, sAtCAX2 活性的最适 pH 较 AtCAX1 低。在 AtCAX2 融合体 (sAtCAX2-A、sAtCAX2-B、sAtCAX2-C、sAtCAX2-D 和 sAtCAX2-E) 中, 只有 AtCAX2-D (AtCAX1 的 219-233 aa 序列 LKNGEASAAVLSDMQ 替换了 AtCAX2 的 221-231 aa 序列 THSEVHAGSSE) 改变了依赖 pH 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性, 其细胞质的 pH 显著提高, 与 sAtCAX1 依赖的 pH 值基本相同, 表明 sAtCAX2 的 D 功能域在 sAtCAX2 依赖的 pH 的调节机制中发挥重要作用。sAtCAX2 的 D 功能域 (221-231 aa) 是位于 TMD5、TMD6 之间的一个亲水区域, 而 sAtCAX1 相应的区域没有与之相同的氨基酸<sup>[5]</sup>。

His 残基是氨基酸中结合 H<sup>+</sup>、感知 pH 的完美候选者, AtCAX2 的 D 功能域有两个 His<sup>222</sup> 和 His<sup>226</sup> 残基, sAtCAX1 的相应区域没有 His。sAtCAX2 中带正电荷的 His 残基突变为不带电荷的非极性 Ala 时, sAtCAX2-H222A、sAtCAX2-H226A 和 sAtCAX2-H222A/H226A 酵母突变株与 AtCAX2 的酵母突变株相比, sAtCAX2-H226A 能轻微地抑制突变株的 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>敏感性, sAtCAX2-H222A 或 sAtCAX2-H222A/H226A 的酵母突变株均不能在含 Ca<sup>2+</sup>或 Mn<sup>2+</sup>的培养基中生长, 反向转运活性缺失, 表明 His<sup>222</sup> 在 sAtCAX2 的阳离子/H<sup>+</sup>反向转运机制中有重要作用。进一步将 His<sup>222</sup> 定点突变为带负电荷的酸性 Asp (D) 和带正电荷的碱性 Lys (K), 由于 Lys 与 His<sup>222</sup> 相似, 所以, AtCAX2-H222K 抑制酵母突变株的 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>敏感性能力与 sAtCAX2 一致,

而 sAtCAX2-H222D 则无抑制能力。sAtCAX2-H222A 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性低于 sAtCAX2, sAtCAX2-H222K 与 sAtCAX2 的转运活性相当, sAtCAX2-H222D 无转运活性, 表明 His<sup>222</sup> 是 Ca<sup>2+</sup>反向转运活性必需的。sAtCAX1、sAtCAX2、sAtCAX2-H222K 和 sAtCAX2-H222A 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性依赖的胞质 pH 值分析表明, sAtCAX2 和 sAtCAX2-H222A 依赖的 pH 值没有明显差异, sAtCAX1、sAtCAX2 和 sAtCAX2-H222K 依赖的 pH 值显著不同。碱性条件下, sAtCAX2-H222K 的 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活稍高于 sAtCAX2, 接近于 sAtCAX1, 表明 His<sup>222</sup> 在感知和结合 H<sup>+</sup>中发挥作用, 但不影响 sAtCAX2 的离子转运专一性<sup>[5]</sup>。

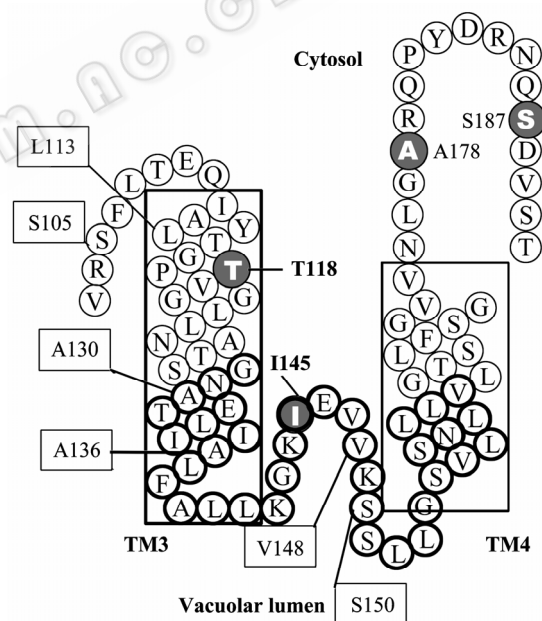


图4 c-1 及其边界的拓扑模型<sup>[17]</sup>

Fig. 4 Topological model of repeat c-1 and its borders<sup>[17]</sup>. The residues that are accessible from the cytosol are indicated by gray circles (Thr<sup>118</sup>, Ile<sup>145</sup>, Ala<sup>178</sup>, and Ser<sup>187</sup>) and those that are not accessible from the cytosol are boxed (Ser<sup>105</sup>, Leu<sup>113</sup>, Ala<sup>130</sup>, Ala<sup>136</sup>, Val<sup>148</sup>, and Ser<sup>150</sup>). Residues in repeat c-1 are boldly circled.

并非所有的 CAXs 的 TMD5 和 TMD6 之间的区域都有 His<sup>222</sup>, 如 AtCAX1, 但 AtCAX1 其他跨膜区域有 7 个 His (H<sup>35</sup>、H<sup>210</sup>、H<sup>259</sup>、H<sup>338</sup>、H<sup>412</sup>、H<sup>443</sup> 和 H<sup>446</sup>)。由于 His 可以在分子内和分子间形成氢键,

改变蛋白质的构象,影响蛋白质对离子的选择、转运作用。将这7个His分别定点突变为Ala,只有H338A突变体无Ca<sup>2+</sup>转运能力。AtCAX1的His<sup>338</sup>在各种CAXs中都是保守的,可能与离子的选择性有关。对His<sup>338</sup>进行多种突变,只有3个突变体(H338K、H338N和H338Q)能轻微的抑制酵母突变株K667的Ca<sup>2+</sup>敏感性,如H338N突变株的Ca<sup>2+</sup>转运活性是sAtCAX1的25%;然而,H338N定点突变株AtCAX1-H338N的Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>转运能力提高,K<sub>m</sub>值降低,V<sub>max</sub>值不变或稍有变化,表明His<sup>338</sup>是影响sAtCAX1转运动力学和离子专一性的关键氨基酸,这一结果为通过定点突变提高CAXs的Cd<sup>2+</sup>转运能力提供理论依据<sup>[21]</sup>。

### 3 CAXs的功能

AtCAX1、AtCAX2因可抑制酵母突变株K667液泡的Ca<sup>2+</sup>转运缺陷而在植物中最先被鉴定<sup>[3]</sup>。AtCAX1是低亲和性、高容量的Ca<sup>2+</sup>转运蛋白,其基因的表达受Ca<sup>2+</sup>的诱导,对维持植物体内Ca<sup>2+</sup>平衡有重要作用<sup>[16]</sup>;AtCAX2有较广泛的底物,除Ca<sup>2+</sup>,还参与Mn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>的转运,是唯一能转运Mn<sup>2+</sup>的CAX<sup>[9]</sup>;AtCAX3的表达受盐胁迫诱导,是盐胁迫下主要的Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运蛋白<sup>[24]</sup>;AtCAX4不能抑制酵母突变株K667的Ca<sup>2+</sup>敏感性,但可抑制表达IRT1的酵母突变株的Cd<sup>2+</sup>敏感性<sup>[8]</sup>,表明不同CAXs作用不同。CAX的表达或缺失不仅能引起植物表型变化<sup>[1-2]</sup>,也能改变植物对离子的耐受性和累积能力<sup>[9-10]</sup>。

#### 3.1 CAXs参与植物的生长发育

CAX1是植物主要的Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运蛋白<sup>[16]</sup>。在200mmol/LCaCl<sub>2</sub>处理下,sCrCAX1与sAtCAX1一样,可有效抑制酵母突变株K667的Ca<sup>2+</sup>敏感性<sup>[6]</sup>。在普通培养基中,拟南芥cax1插入失活突变株cax1-1、cax1-2根发育受抑制,幼苗主根长约减少了11%,侧根数分别减少了25%、10%,侧根长分别减少了50%、20%。sAtCAX1在cax1-1植株中表

达时根生长抑制表型消失<sup>[16]</sup>。表达sAtCAX1的转基因烟草根中Ca<sup>2+</sup>含量是对照植株的2倍,叶片中Ca<sup>2+</sup>含量提高30%,转基因烟草植株中每毫克sAtCAX1蛋白累积14nmolCa<sup>2+</sup>,而对照植株每毫克sAtCAX1蛋白仅累积7nmolCa<sup>2+</sup>;转基因植株根部液泡每毫克sAtCAX1蛋白累积16nmolCa<sup>2+</sup>,对照植株为14nmol<sup>[1]</sup>。sAtCAX1转基因烟草植株在缺乏Ca<sup>2+</sup>的培养基中生长时,由于sAtCAX1将Ca<sup>2+</sup>主要储存在液泡中,胞质Ca<sup>2+</sup>浓度过低,需要Ca<sup>2+</sup>的部位得不到补充,因此,烟草植株出现Ca<sup>2+</sup>缺乏症状,如叶片坏疽、萎蔫,根生物量减少,生产力下降;若在培养基中添加Ca<sup>2+</sup>,可延迟或缓解Ca<sup>2+</sup>缺乏症状,甚至可使叶片的表型恢复正常<sup>[1]</sup>。过量表达sAtCAX1的转基因番茄(TCX1)植株液泡的Ca<sup>2+</sup>转运活性增加,叶片坏疽,并且因胞质Ca<sup>2+</sup>缺乏引起的果顶软腐病几率升高。但由于大量Ca<sup>2+</sup>累积在液泡中,TCX1果实坚实度降低延缓,货架期延长。收获40d后,TCX1果实仍能保持其结构的完整性,而对照果实则显著皱缩;即使在腐烂期30d后,TCX1果实的坚实度仍是对照的2倍<sup>[2]</sup>。

AtCAX2虽可抑制酵母突变株K667液泡Ca<sup>2+</sup>转运缺陷,但其转运Ca<sup>2+</sup>能力低于AtCAX1<sup>[5,9]</sup>。拟南芥AtCAX2敲除突变株cax2-1和cax2-2的萌发、生长和开花时间、及根、茎、叶和花的形态与野生植株没有明显差异。在过量Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>胁迫下(不含Ca<sup>2+</sup>),cax2植株的表型与野生型一致<sup>[7]</sup>,表明AtCAX2的Ca<sup>2+</sup>转运活性较低,敲除后对植物生长影响不大。异源表达AtCAX2的转基因烟草中的Ca<sup>2+</sup>累积量与AtCAX1转基因植株相当,但AtCAX2转基因烟草植株的生长与野生型一样健壮,Ca<sup>2+</sup>缺乏症状较轻<sup>[9]</sup>。拟南芥AtCAX3敲除突变株cax3对盐、Li<sup>+</sup>和低pH敏感性提高,液泡Ca<sup>2+</sup>反向转运活性和H<sup>+</sup>-ATPase活性在盐胁迫下降低,说明AtCAX3是盐胁迫下主要的Ca<sup>2+</sup>转运蛋白<sup>[24]</sup>。AtCAX4也主要转运Ca<sup>2+</sup>,cax1敲除突变株液泡膜的Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运能力与野生

植株相比降低了 61%，在 CaMV 35S 启动子驱动下表达 *AtCAX4* 的 *cax1-1* 植株液泡 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运能力与野生植株相比仅降低了 33%<sup>[11]</sup>，说明 *AtCAX4* 具有较高的 Ca<sup>2+</sup>转运活性。*AtCAX4* 可抑制酵母突变株对 Ca<sup>2+</sup>的超敏感表型，高浓度的 Cd<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>或 K<sup>+</sup>能抑制 s*AtCAX1* 和 s*AtCAX4-9* (含有 *AtCAX1* 的 CaD) 突变体的 Ca<sup>2+</sup>转运活性，而 HA-*AtCAX4* 不受影响，表明 *AtCAX4* 的 Ca<sup>2+</sup>转运专一性比 s*AtCAX1* 更强<sup>[2]</sup>；*AtCAX4* 在番茄中的过量表达可适度的提高其 Ca<sup>2+</sup>水平，没有出现生长副作用，果实货架期延长<sup>[2]</sup>。表明过量表达 *AtCAX4* 可以强化植物的 Ca<sup>2+</sup>营养，从而为延长农产品的货架期提供了一条可选择的途径。

### 3.2 CAXs 参与二价阳离子转运与解毒

*AtCAX2* 可提高酵母突变株 K667 和野生型的 Mn<sup>2+</sup>耐受性，在维持植物胞质 Mn<sup>2+</sup>平衡中有重要作用<sup>[7]</sup>。表达 *AtCAX2* 的转基因烟草根组织中 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>含量增加 1 倍，茎中含量增加了 15% 和 20%；而根中 Cd<sup>2+</sup>累积量是对照的 3 倍，茎中 Cd<sup>2+</sup>含量增加了 15%<sup>[9]</sup>，说明 *AtCAX2* 可参与 Cd<sup>2+</sup>的转运和解毒。*AtCAX4* 主要在根尖、侧根原基中表达，*AtCAX4* 转运的底物主要是 Ca<sup>2+</sup>，但 Cd<sup>2+</sup>存在时可有效转运 Cd<sup>2+</sup>。*AtCAX4* 敲除突变株 *cax4-1* 和 RNAi 突变体在含 Mn<sup>2+</sup>或 Cd<sup>2+</sup>培养基中萌发生长时，其幼苗植株较野生型小，主根长度、侧根数目显著减少，侧根的发育几乎完全被破坏，表明 Cd<sup>2+</sup>严重影响 *cax4-1* 的生长。与生长在 2 μmol/L Cd<sup>2+</sup>培养基中的野生型植株相比，*cax4-1* 的侧根减少了 70%。*cax4-1* 和 RNAi 突变体植株子叶变黄、叶绿体数量显著减少，HA-*AtCAX4* 在这两种突变体中的表达可抑制其 Cd 敏感表型<sup>[11]</sup>。表明在重金属 Cd 胁迫下 *AtCAX4* 是根生长和发育必需的。

增强液泡 *CAX* 的表达可提高植物根细胞液泡转运二价阳离子 (Cd<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>) 的能力<sup>[9-10,25]</sup>。组成型表达启动子 35S 分别驱动 *AtCAX2* 和 *AtCAX4* 在烟草中表达，烟草根细胞 Cd<sup>2+</sup>浓度最

多分别提高 53% 和 34%；*AtCAX4* 在根部特异性启动子 FS3 驱动下，根液泡 Cd<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>的转运能力提高，而 Ca<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>的转运变化不大，表明两种启动子驱动 *AtCAX4* 的表达均可提高根细胞的重金属浓度。这可能是由于 *AtCAX4* 在根中的特异性表达提高了 Cd<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>向液泡的转运，或 *AtCAX4* 趋于在根组织中起作用，或通过转录后调节使其 mRNA 更稳定，也可能是 *AtCAX4* 的表达改变了液泡的二价阳离子选择性，更偏向于累积 Cd<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>，而偏离 Ca<sup>2+</sup>的转运作用<sup>[10]</sup>。在 3 μmol/L Cd 水培条件下，35S:*AtCAX2* 和 FS3:*AtCAX4* 转基因烟草植株生物量分别是对照的 2.8 倍和 1.9 倍；地上部 Cd 的累积量分别是对照的 3.4 和 2.4 倍；另外，表达 35S:*AtCAX2* 或 FS3:*AtCAX4* 的烟草植株分别在 150 μmol/L Zn 或 500 μmol/L Mn 胁迫下，地上部 Zn 累积量为对照的 1.9 倍和 2.2 倍，Mn 累积量是对照的 2.3 倍和 2.8 倍，表明 *AtCAX2* 和 *AtCAX4* 均可提高植物的生物量和地上部重金属 (Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>) 的累积能力。同样，在 3 μmol/L Cd 胁迫下，与比对照植株相比，FS3:*AtCAX4* 转基因植株根液泡膜泡的 Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性提高 30%，且根/地上部的 Cd 浓度比值增加，表明 *AtCAX4* 在烟草根中的特异性表达可提高根的 Cd 累积能力，减少 Cd 向地上部的转运<sup>[25]</sup>。推测根胞质或液泡中 Cd 被 Cd 诱导合成的植物络合素螯合，或根部高浓度的 Cd 抑制了其向地上部的转运。

进一步研究表明在 Cd 胁迫下，转基因烟草 35S:*AtCAX2* 或 FS3:*AtCAX4* 的地上部/根部 Cd 含量的比值远低于对照，且转基因植株叶片的 Cd 累积量比对照减少了 15%~25%<sup>[26]</sup>。生长中期的 35S:*AtCAX2* 转基因烟草植株地上部 Cd 含量与对照植株相比降低了 20%，而根部的 Cd 含量提高了 20%。对照烟草植株幼穗/35S:*AtCAX2-2B* 根嫁接苗的根部和地上部 Cd 含量的比值与转基因植株 35S:*AtCAX2-2B* 相似；相反的嫁接烟草植株 (35S:*AtCAX2-2B* 幼穗/对照根) 根部和地上部 Cd 含

量的比值与对照植株相似,表明 *AtCAX2* 和 *AtCAX4* 在烟草根部的特异性表达可提高 Cd 在根部的累积,降低其向地上部的转运<sup>[26]</sup>。从而可以利用 CAX 基因降低重金属在地上部的累积,为绿色蔬菜和农作物的生产提供一条新的途径。

#### 4 CAXs 之间的相互影响

维持胞质阳离子水平是多种金属转运蛋白共同作用的结果。拟南芥 *cax1* 插入失活突变植株中 *AtCAX3*、*AtCAX4*、*ACA4* (*Arabidopsis*  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, isoform 4) 水平显著提高。与野生植株相比, *cax1-1* 植株的 *AtCAX3*、*AtCAX4* 和 *ACA4* 的 mRNA 水平分别提高了 4 倍、3 倍和 2 倍,以补偿 *AtCAX1* 的损失; *sAtCAX1* 在 *cax1-1* 中的表达导致 *AtCAX3*、*AtCAX4* 和 *ACA4* 表达降低。表明 *AtCAX3* 和 *AtCAX4* 在维持  $\text{Ca}^{2+}$  平衡中有一定作用,同时也表明了 CAXs 之间具有相互作用<sup>[18]</sup>。

转运蛋白相互作用可以扩大其调节范围和功能。*AtCAX1* 和 *AtCAX3* 的物理相互作用是植物生长和获得养分所必需的。*AtCAX3* 不是转运  $\text{Ca}^{2+}$  的主要转运蛋白,仅能轻微地抑制酵母突变株的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性。*AtCAX3* 和 *AtCAX1* 的反向转运活性差异可能源于 V-ATPase 产生的 pH 差异。*cax1* 突变株叶片的  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  水平降低;*cax1/cax3* 双突变株叶片的  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  水平升高,然而根细胞中  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  水平没有显著变化;同时双突变植株中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的缺乏引起坏疽、叶片萎蔫等现象,这些离子水平的差异可能是质子泵的变化或 CAXs 之间相互作用被破坏引起的。*AtCAX3* 主要在根中表达,在叶片中的表达水平低;*AtCAX1* 与之相反,但是在脱落酸处理时,两者都可在叶片保卫细胞中大量表达,这就为研究 *AtCAX1* 和 *AtCAX3* 以二聚体的形式相互作用提供了条件<sup>[14]</sup>。

*AtCAX1* 和 *AtCAX3* 同时表达时可形成异二聚体,其离子转运性质与两者单独表达时的二聚体不同。*AtCAX1* 或 *AtCAX3* 在酵母突变株的表达只能轻

微的抑制其  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性,但是 *AtCAX1+AtCAX3* 共表达时可显著抑制酵母突变株在 150 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  培养基中的  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性,表明二者相互作用可改变其转运活性。*AtCAX1+AtCAX3* 共表达的酵母突变株耐  $\text{Li}^+$ , 而 *sAtCAX1* 或 *sAtCAX3* 单独表达时均无耐性;其它 CAXs 共表达时没有出现相似的结果,如 *AtCAX2* 和 *AtCAX4*, 表明 *AtCAX1* 和 *AtCAX3* 可形成具有新转运能力的二聚体。推测 *AtCAXs* 的相互作用可导致构象改变,从而引起酶对底物亲和力改变<sup>[14,27]</sup>。

酵母分离泛素评价 (Yeast split ubiquitin assay) 及 *AtCAX1* 和 *AtCAX3* 的免疫共沉淀研究表明 *AtCAX1* 与 *AtCAX3* 具有物理相互作用。*AtCAX1* 和 *AtCAX3* 在植物细胞中共表达时可形成 CAXs 异源二聚体, *AtCAX1+AtCAX3* 复合物可能是特定胁迫条件下必需的<sup>[27]</sup>。

酸性氨基酸基序可将 CAXs 蛋白分成轻微相似性的 N-端和 C-端两部分,即 N-sCAX 和 C-CAX。*N-sCAX1* 和 *C-CAX3* 均独立定位在同一酵母细胞内膜上,且发生物理相互作用。研究发现 CAXs 的 N-端部分调节  $\text{Ca}^{2+}$  转运活性,而 C-端部分决定 CAXs 的耐盐表型。表达 *sCAX1* 的酵母对  $\text{Ca}^{2+}$  有耐受性,对  $\text{Na}^+$  和  $\text{Li}^+$  敏感,而表达 *CAX3* 的酵母对  $\text{Na}^+$  和  $\text{Li}^+$  稍有耐性,但对  $\text{Ca}^{2+}$  敏感。共表达 *N-sCAX1+C-CAX1* 的酵母 K667 耐  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Li}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$ 。相反,共表达 *N-sCAX3+C-CAX3* 或 *N-sCAX1+C-CAX3* 的酵母 K667 对  $\text{Ca}^{2+}$  敏感,但耐  $\text{Na}^+$ 。在高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Li}^+$  条件下,表达 *N-sCAX1+C-CAX1* 和 *N-sCAX1+C-CAX3* 的酵母  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Li}^+$  和  $\text{Na}^+$  的累积增加。*N-sCAX1+C-CAX1* 比 *N-sCAX1+C-CAX3* 累积的  $\text{Ca}^{2+}$  多,而后者累积更多的  $\text{Li}^+$ 。这些结果表明异源 CAX 复合物有较好的可塑性,为设计新型 CAX 转运蛋白提供了一种全新的方法<sup>[28]</sup>。

#### 5 展望

CAX 广泛存在于细菌、真菌、盘基网柄菌、植

物和低等脊椎动物<sup>[4]</sup>。植物 CAXs 可将胞质中过量的 Ca<sup>2+</sup>转运到液泡, 调节胞质中 Ca<sup>2+</sup>浓度<sup>[2]</sup>, 以保持植物正常的生理代谢。拟南芥有 6 个 CAXs 中, 现已鉴定的 *AtCAX1-4* 表达的组织部位特异性不同<sup>[14,7-8]</sup>, 然而, 其在小液泡和中央液泡膜的定位是否存在差别未见报道。

*AtCAXs* 反向转运活性和底物特异性取决于 4 个功能域: N-端 NRR、CaD、C 功能域和 D 功能域。*AtCAX1* 的 NRR 可与 RDR 相互作用, 导致自抑制作用, 使其 Ca<sup>2+</sup>转运活性丧失; 当 NRR 缺失时, *sAtCAX1* 可恢复其 Ca<sup>2+</sup>转运活性<sup>[15,18]</sup>, 但是, 发生自抑制时 CAXs 蛋白构象发生哪些变化至今还不清楚。*AtCAX1* 的 Ca<sup>2+</sup>转运活性受 NRR 结构完整性的调节, N-端缺失不同数目氨基酸残基的 *AtCAX1*, 其 Ca<sup>2+</sup>转运活性有不同程度的提高; 然而, 完全缺失 NRR 的 *AtCAX4* 只能轻微的抑制酵母突变株的 Ca<sup>2+</sup>敏感性, 相反延长 N-端的 *AtCAX3* 和 *AtCAX4* 的 Ca<sup>2+</sup>转运活性均提高<sup>[2,15]</sup>。因此 NRR 对 CAXs 反向转运活性的调节机制还需进一步研究。CaD 决定 CAXs 的 Ca<sup>2+</sup>转运能力<sup>[23]</sup>, 然而, 其如何调控 Ca<sup>2+</sup>转运活性尚不清楚。*AtCAX2* 参与植物 Mn<sup>2+</sup>装载和卸载, 其中 C 功能域是 Mn<sup>2+</sup>转运必需的, 表达 *AtCAX2* 的烟草对 Mn<sup>2+</sup>的耐受性稍有增加, 但 Cd<sup>2+</sup>耐受性没有增加<sup>[9]</sup>, 因此, 进一步研究 C 功能域的氨基酸序列, 改变其离子转运特性, 以提高植物积累重金属的能力; Zn<sup>2+</sup>可抑制 *AtCAX2* 的 <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>转运活性, 推测 C 功能域可能也参与 Zn<sup>2+</sup>转运<sup>[13]</sup>。拓扑结构预测表明 *AtCAX2* 的 D 功能域位于 TM5 和 TM6, 推测其面向液泡腔一侧, 然而, 其可调节胞质的 pH, 因此, D 功能域面向液泡腔一侧的推测可能是错误的。另外, D 功能域也许可与面向细胞质一侧的 pH 感应区发生间接作用, 调节胞质的 pH<sup>[5]</sup>。因此, 需要进一步分离纯化 CAXs, 研究其高级结构。

CaD 与 C 功能域都与金属离子转运的专一性有关<sup>[13,20]</sup>, 深入研究 CAXs 结构可设计专一性的金属离子转运蛋白, 将矿质元素转运到蔬菜和水果可食

用的部分。*AtCAX1* 和 *AtCAX4* 转基因番茄果实中除 Ca<sup>2+</sup>水平提高外, Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>等含量也升高, 且果实的储存期延长<sup>[2]</sup>。*AtCAX1* 突变体 *AtCAX1-H338N* 的 Cd 转运能力增强。表达 *AtCAX1-H338N* 的矮牵牛 *Petunia hybrida* Cd 耐受性和累积能力提高。在 50 μmol/L 或 100 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 中生长 6 周, 转基因植株较对照植株健壮, Cd 累积量是对照的 2.5 倍, 并且形态和发育特征没有受影响<sup>[29]</sup>。*AtCAX2* 和 *AtCAX4* 也有 Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运活性, 在植物根部表达可减少 Cd<sup>2+</sup>在地上部的累积<sup>[10,26]</sup>。一方面, 可以通过提高 *AtCAX2* 和 *AtCAX4* 的表达或基因修饰, 降低 Cd<sup>2+</sup>在植物可食用部分的累积, 减少人类对重金属 Cd 的摄入; 另一方面, 应用基因工程的技术提高 Cd 超富集植物中 Cd<sup>2+</sup>向地上部的转运, 为 Cd 污染土壤的植物修复提供技术支持。

## REFERENCES

- [1] Hirschi KD. Expression of *Arabidopsis CAX1* in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell*, 1999, 11(11): 2113–2122.
- [2] Park S, Cheng NH, Pittman JK, et al. Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>* transporters. *Plant Physiol*, 2005, 139(3): 1194–1206.
- [3] Mei H, Zhao J, Pittman JK, et al. *In planta* regulation of the *Arabidopsis Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>* antiporter CAX1. *J Exp Bot*, 2007, 58(12): 3419–3427.
- [4] Cai XJ, Lytton J. The cation/Ca<sup>2+</sup> exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(9): 1692–1703.
- [5] Pittman JK, Shigaki T, Hirschi KD. Evidence of differential pH regulation of the *Arabidopsis vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>* antiporters CAX1 and CAX2. *FEBS*, 2005, 579(12): 2648–2656.
- [6] Pittman JK, Edmond C, Sunderland PA, et al. A cation-regulated and proton gradient-dependent cation transporter from *Chlamydomonas reinhardtii* has a role in calcium and sodium homeostasis. *J Biol Chem*, 2009, 284(1): 525–533.
- [7] Pittman JK, Shigaki T, Marshall JL, et al. Functional and

- regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(6): 959–971.
- [8] Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, et al. Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/cation antiporter. *Plant Physiol*, 2002, 128(4): 1245–1254.
- [9] Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, et al. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol*, 2000, 124(1): 125–133.
- [10] Koren'kov V, Park S, Cheng NH, et al. Enhanced Cd<sup>2+</sup>-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta*, 2007, 225(2): 403–411.
- [11] Mei H, Cheng NH, Zhao J, et al. Root development under metal stress in *Arabidopsis thaliana* requires the H<sup>+</sup>/cation antiporter CAX4. *New Phytol*, 2009, 183(1): 95–105.
- [12] Shigaki T, Nakhleh L, Hirschi KD, et al. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *J Mol Evol*, 2006, 63(6): 815–825.
- [13] Shigaki T, Pittman JK, Hirschi KD. Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/H<sup>+</sup> antiporter CAX2. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 6610–6617.
- [14] Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, et al. Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol*, 2005, 138(4): 2048–2060.
- [15] Pittman JK, Hirschi KD. Regulation of CAX1, an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Identification of an N-terminal autoinhibitory domain. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 1020–1029.
- [16] Cheng NH, Pittman JK, Barkla BJ, et al. The *Arabidopsis* *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 347–364.
- [17] Kamiya T, Maeshima M. Residues in internal repeats of the rice cation/H<sup>+</sup> exchanger are involved in the transport and selection of cations. *J Biol Chem*, 2003, 279(1): 812–819.
- [18] Pittman JK, Shigaki T, Cheng NH, et al. Mechanism of N-terminal autoinhibition in the *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CAX1. *J Biol Chem*, 2002, 277(29): 26452–26459.
- [19] Pittman JK, Sreevidya CS, Shigaki T, et al. Distinct N-terminal regulatory domains of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 1054–1062.
- [20] Shigaki T, Cheng NH, Pittman JK, et al. Structural determinants of Ca<sup>2+</sup> transport in the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter CAX1. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43152–43159.
- [21] Shigaki T, Barkla BJ, Miranda-Vergara MC, et al. Identification of a crucial histidine involved in metal transport activity in the *Arabidopsis* cation/H<sup>+</sup> exchanger CAX1. *J Biol Chem*, 2005, 280(34): 30136–30142.
- [22] Cheng NH, Liu JZ, Nelson RS, et al. Characterization of CXIP4, a novel *Arabidopsis* protein that activates the H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter, CAX1. *FEBS Lett*, 2004, 559(1/3): 99–106.
- [23] Shigaki T, Sreevidya C, Hirschi KD. Analysis of the Ca<sup>2+</sup> domain in the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporters CAX1 and CAX3. *Plant Mol Biol*, 2002, 50(3): 475–483.
- [24] Zhao J, Barkla BJ, Marshall J, et al. The *Arabidopsis* *cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Planta*, 2007, 227(3): 659–669.
- [25] Korenkov V, Hirschi K, Crutchfield JD, et al. Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 2007, 226(6): 1379–1387.
- [26] Korenkov V, King B, Hirschi K, et al. Root-selective expression of *AtCAX4* and *AtCAX2* results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(3): 219–226.
- [27] Zhao J, Shigaki T, Mei H, et al. Interaction between *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers CAX1 and CAX3. *J Biol Chem*, 2009, 284(7): 4605–4615.
- [28] Zhao J, Connorton JM, Guo YQ, et al. Functional studies of split *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Biol Chem*, 2009, 284(49): 34075–34083.
- [29] Wu QY, Shigaki T, Williams KA, et al. Expression of an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CAX1 variant in petunia enhances cadmium tolerance and accumulation. *J Plant Physiol*, 2011, 168(2): 167–173.