

细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的研究进展

徐宁¹ 程海娇² 刘清岱² 刘君^{1*} 马延和¹

(1. 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308)

(2. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院 天津 300457)

摘要: Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在维持细胞内 pH 稳态、Na⁺ 离子动态平衡和调控细胞体积方面发挥着重要作用。目前, 细菌中许多参与高盐或高碱性环境压力应答的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白得到了鉴定和功能阐释。继续挖掘高效的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白, 深入探究 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的分子机理, 将为工业菌株或农作物的改良提供新的研究思路。本文以 4 种模式菌株为例, 简要概述细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的种类和特征, 同时对其结构和功能等方面也进行探讨。

关键词: Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白, 细菌, 种类, 功能

Research progress of the Na⁺/H⁺ antiporters in bacteria

XU Ning¹ CHENG Hai-Jiao² LIU Qing-Dai² LIU Jun^{1*} MA Yan-He¹

(1. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

(2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The Na⁺/H⁺ antiporters play a primary role in the maintenance of intracellular pH homeostasis and dynamic balance of cellular Na⁺, and in the regulation of cell volume. Currently, many Na⁺/H⁺ antiporter genes involved in the resistance to high salt and alkaline pH stresses have been identified and functionally characterized in various bacteria. The prospection for novel Na⁺/H⁺ antiporters from unexplored habitats, in conjunction with our understanding of the mechanisms responsible for Na⁺/H⁺ antiport activity, will provide new insights into industrial and agricultural biotechnology. In this review, we chose four physiologically distinct bacteria as examples, and summarized the classification, structure and function of bacterial Na⁺/H⁺ antiporters.

Keywords: Na⁺/H⁺ antiporters, Bacteria, Classification, Function

金属离子作为一种重要的无机营养元素, 无论在维持普通微生物还是病原微生物生理状态和正常机能方面都发挥着不可或缺的作用。笔者前期研究曾证实, 胞内铁离子和钙离子稳态是白假丝酵母等病原性微生物在宿主环境下正常存活和致病的

关键因素, 离子稳态的破坏会显著降低菌株的生长和致病能力^[1-4]。微生物与外界环境在相互作用过程中, 除可能遭遇铁和钙离子等环境因素外, 还经常需要应答高浓度的钠盐压力。尽管钠离子(Na⁺)对于微生物的生长和代谢具有重要作用, 但是外界环境

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目; 国家自然科学基金项目(No. 31500044)

*通讯作者: Tel: 86-22-24828784; ✉: liu_jun@tib.cas.cn

收稿日期: 2014-12-18; 接受日期: 2015-02-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-16

中 Na⁺离子浓度过高, 也会破坏细胞内的渗透压平衡, 从而对细胞产生毒害作用。微生物在长期进化过程中, 逐渐形成了适应高盐环境的多种生理机制: 一方面, 依赖于一种被称为相容性溶质机制的拒盐策略, 在细胞内积累糖类、醇类、氨基酸及其衍生物等小分子极性物质, 用以调节细胞内外渗透压平衡, 起着渗透保护作用^[5]。另一方面, 利用 Na⁺离子外排系统, 将细胞内多余的 Na⁺离子泵出至胞外, 以维持胞内适宜的 Na⁺离子, 这一过程主要由位于细胞膜上的 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白(Na⁺/H⁺ antiporters)介导^[6]。此外, 一些耐盐微生物还具有特殊的细胞壁结构, 富含酸性氨基酸, 易形成负电荷区域, 吸引正电荷的 Na⁺离子, 维持细胞壁的稳定^[7]。

Na⁺/H⁺逆向转运蛋白又称为 Na⁺/H⁺泵, 是一种膜蛋白, 广泛存在于细菌、植物、动物体中, 在维持细胞内 pH 稳态、Na⁺离子动态平衡和调控细胞体

积等方面发挥着重要作用^[6,8-10]。同真核生物 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白功能相似, 原核生物 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白也能够以跨膜的质子电化学梯度为动力, 催化胞内 Na⁺离子的泵出过程, 建立跨膜的 Na⁺离子电化学梯度, 促进 Na⁺离子梯度偶联的一系列生理生化过程, 如 Na⁺/溶质的协同转运过程和 Na⁺离子驱动的鞭毛运动, 最终实现 Na⁺离子的循环利用^[8]。本文主要关注细菌 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白, 以革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、拟坚强芽孢杆菌(*Bacillus pseudofirmus*)为例(图 1), 从细菌 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的种类、结构、机理和应用等方面进行综述。

1 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的类型和特征

Na⁺/H⁺逆向转运蛋白作为细菌主要的 Na⁺外排系统, 也是细菌中对 Na⁺胁迫的主要适应性应答系

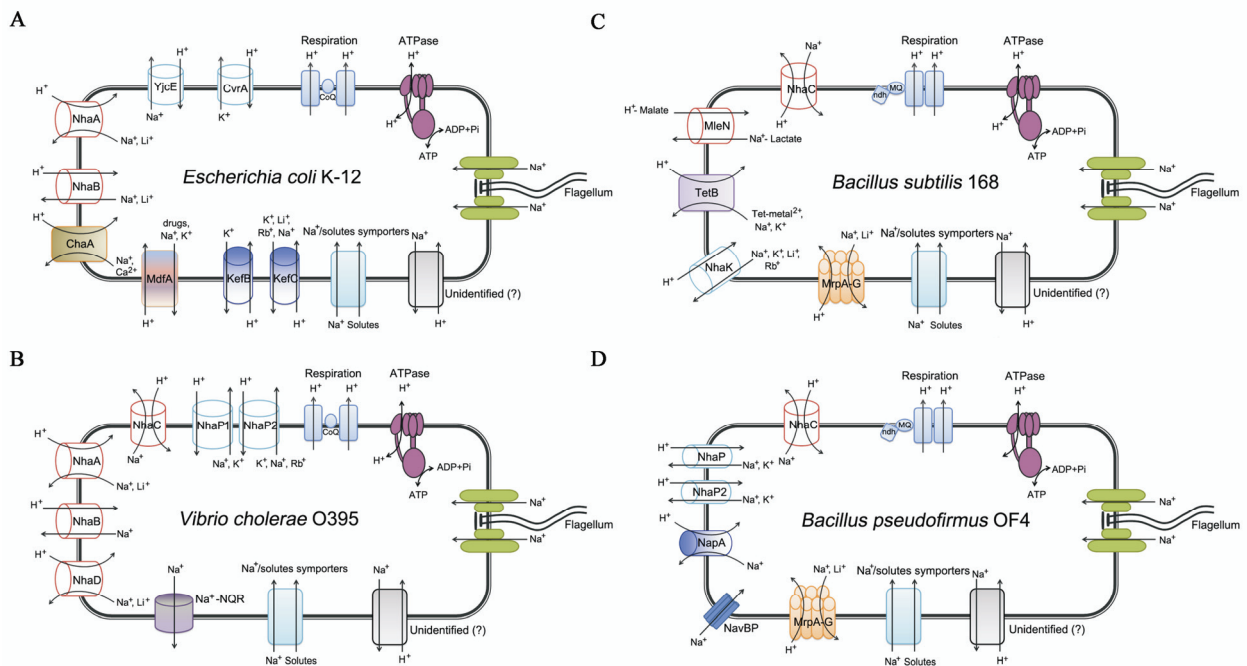


图 1 4 种模式菌株 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白家族示意图

Figure 1 Schematic diagrams of the Na⁺/H⁺ antiporter family in four physiologically distinct bacteria

注: A: 革兰氏阴性嗜中性肠道菌大肠杆菌; B: 革兰氏阴性嗜中性致病菌霍乱弧菌; C: 革兰氏阳性嗜中性菌枯草芽孢杆菌; D: 革兰氏阳性嗜碱菌拟坚强芽孢杆菌。

Note: A: *E. coli*, a Gram-negative neutrophilic enteric bacilli; B: *V. cholera*, a Gram-negative neutrophilic pathogen; C: *B. subtilis*, a Gram-positive neutrophilic organism; D: *B. pseudofirmus*, a Gram-positive alkaliphilic bacterium.

统。在长期的进化过程中,微生物形成了多种类型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,依据其蛋白质结构特点,主要分为单亚基型和多亚基型两大类,其中绝大多数属于单亚基型。目前,已经报道多个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白成员,包括 Cpa1 家族、Cpa2 家族、Cpa3 家族、Mfs 家族、NhaA 家族和 NhaB、NhaC、NhaD、CaCA 等^[8,11-12]。

1.1 Cpa1 家族

阳离子:质子逆向转运蛋白-1 家族(The cation: proton antiporter-1 family, Cpa1 family)广泛分布于革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、植物和动物等膜系统上,具有 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性,主要参与调控胞内 pH 稳态^[13]。在动物和高等植物中,Cpa1 家族成员得到了较为详细的研究,但是对细菌 Cpa1 家族成员的认识相对较少。YjcE 和 CvrA (YcgO)是大肠杆菌中鉴定出的两个 Cpa1 家族成员^[14]。研究发现,YjcE 和 CvrA 在呼吸作用驱动的 Na^+ 离子输出过程中作用较小,基因的缺失对菌株在 50–500 mmol/L Na^+ 离子浓度下的生长速率并没有显著影响。CvrA 蛋白能够参与调控细胞体积的变化,对低渗条件下菌株生长是必需的。有趣的是,在枯草芽孢杆菌 ATCC 9372 中发现了 Cpa1 家族新成员 NhaG,该蛋白具有 Na^+/H^+ 逆向转运活性,但是未能在枯草芽孢杆菌 168 中鉴定出其同源物,表明不同来源的同一菌株可能存在进化差异^[15]。NhaK (YvgP)是枯草芽孢杆菌 168 中唯一鉴定出的 Cpa1 家族成员,该蛋白同时具有 Na^+ (K^+ , Li^+ , Rb^+)/ H^+ 逆向转运活性, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 或 Mn^{2+} 离子存在会抑制其活性^[16]。NhaP 是铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中发现的一种 Cpa1 家族 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,是菌株 Na^+ 离子输出系统的主要组分^[17]。霍乱弧菌中也鉴定出两种 NhaP 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,其中 NhaP1 蛋白在较低的环境 pH 条件下对于维持菌株的生长和胞内 pH 稳态是必需的,而 NhaP2 蛋白对 K^+ 离子具有更高的亲和性^[18]。通过全基因组序列分析,我们发现拟坚强

芽孢杆菌中也含有两个潜在的 NhaP 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(NhaP 和 NhaP1),推测可能参与离子转运和细胞体积调控过程,其生物学功能尚有待进一步阐释^[19]。

1.2 Cpa2 家族

阳离子:质子逆向转运蛋白-2 家族(The cation: proton antiporter-2 family, Cpa2 family)主要存在于细菌和古细菌等原核生物中,较少出现在真核生物膜系统中^[13]。KefB 和 KefC 是大肠杆菌中研究较为详细的 Cpa2 家族成员,是一种谷胱甘肽门控的 K^+ 离子输出蛋白,在胞质酸化和保护细胞抵御活性亲电物质方面具有重要作用^[20]。NapA 是海氏肠杆菌 (*Enterococcus hirae*) 中鉴定出的一种主要的 Cpa2 家族逆向转运蛋白,该蛋白的缺失使菌株丧失 Na^+/H^+ 逆向转运活性,无法在高盐环境下生长^[21]。GerN 是蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 中发现的 NapA 型同源物,同时具有 Na^+/H^+ 和 $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{K}^+$ 逆向转运活性^[22]。全基因组序列分析揭示,拟坚强芽孢杆菌中同样含有潜在的 NapA 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,但是其功能尚不清楚^[19]。

1.3 Cpa3 家族

阳离子:质子逆向转运蛋白-3 家族(The cation: proton antiporter-3 family, Cpa3 family),广泛存在于具有不同生理学功能的原核生物中^[8,11]。Mrp 系统(Multiple resistance and pH-related antiporter)作为一种单价阳离子:质子逆向转运蛋白,是跨膜转运蛋白 Cpa-3 家族的最重要成员^[23]。该系统广泛存在于细菌和古细菌等原核生物中,早期由于命名系统的紊乱,又被赋予了多种别称,如 Mnh、Pha、Sha 和 Sno 等。Mrp 家族能够依靠呼吸作用或者 ATP 酶水解形成的跨膜质子电化学梯度为动力,催化胞质内单价阳离子(如 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 等)输出,同时偶联细胞膜外 H^+ 质子输入过程。

典型的 Mrp 系统是一种多亚基型转运蛋白复合物,由同一操纵子的 6 或 7 个高度保守基因 (*mrpA*–*mrpG*) 编码,每个亚基对激活复合体的完整

功能都是必需的^[23-24]。根据 *mrp* 操纵子中 *mrpA* 和 *mrpB* 基因的排列方式, 可分为两类(Group I 和 Group II)。第一类中, *mrp* 操纵子由 7 个基因构成, 含有单独 *mrpA* 和 *mrpB* 基因, 并且 *mrpA* 基因中含有 *mrpB* 结构域, 在革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及古细菌中均有发现。第二类中, *mrp* 操纵子由 6 个基因构成, 不含有单独的 *mrpB* 基因, 但是 *mrpA* 基因中含有两个 *mrpB* 结构域, 主要存在于革兰氏阳性菌中。Mrp 逆向转运蛋白首次发现于嗜碱菌 *Bacillus halodurans* C-125, 由 7 个亚基组成, 具有 Na^+/H^+ 逆向转运活性, 在维持胞内 pH 稳态方面发挥着至关重要的作用^[25]。在嗜中性枯草芽孢杆菌中, Mrp 蛋白具有很高的 $\text{Na}^+/\text{Li}^+/\text{H}^+$ 逆向转运活性, 在维持细胞对 Na^+ 离子和胆酸盐抗性方面发挥着核心作用, 但是在 Na^+ 和 K^+ 依赖性 pH 稳态调控过程中作用较小^[26]。然而, 嗜碱拟坚强芽孢杆菌 Mrp 蛋白无论在 Na^+ 离子胁迫应答还是胞内 pH 稳态调控方面都扮演着极其重要的角色^[8,27]。

大多数微生物中只含有一种 Mrp 系统, 但是一些菌株中含有多个 Mrp 操作子。例如, 中华根瘤菌中含有两套 Mrp 系统(Pha1 和 Pha2), Pha1 蛋白的缺失会导致菌株固氮能力缺陷和 K^+ 离子敏感性, 而 Pha2 蛋白缺失导致菌株 Na^+ 离子敏感性^[28]。基因组序列分析揭示, 人类病原菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 也含有两套 Mrp 系统(Mnh1 和 Mnh2), 均由 7 个亚基构成, 推测可能与其耐受高盐环境有关^[29]。

1.4 Mfs 家族

细菌能够通过耐药泵将药物主动泵出胞外, 可以有效地抵御抗生素及其他药物的毒性作用。主要协助蛋白转运超家族(Major facilitator superfamily, Mfs family)是由 12 或 14 个跨膜螺旋区组成的转运蛋白, 通过质子交换提供向细胞外泵出药物所需的能量, 作用底物包括氨基糖苷类、四环素类和氯霉素类等药物。MdfA 是大肠杆菌中鉴定出的一种 Drug- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白, 能够将胞内药物泵

出, 在菌株抵御药物压力方面具有重要作用^[30]。枯草芽孢杆菌中 TetB 是一种 Tetracycline- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白, 能够以跨膜的质子电化学梯度为动力, 催化胞内四环素、 Na^+ 离子和 K^+ 离子输出过程, 在 Na^+ 和 K^+ 依赖性 pH 稳态调控过程中发挥着核心作用^[8]。

1.5 NhaA 家族

大肠杆菌 NhaA 是微生物界发现的第一种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 也是目前研究最为详细的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白^[31-34]。NhaA 是大肠杆菌和许多肠道细菌的最主要 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 在维持胞内 pH 稳态方面发挥着至关重要的作用, 该蛋白缺失会导致菌株在高盐环境压力下的生长缺陷^[34-35]。NhaA 蛋白活性具有 pH 依赖性, 能够感应并传导外界环境 pH 信号, 只有当胞内 pH 值达到 6.5 时, 才会激活 NhaA 蛋白活性。研究发现, *nhaA* 基因含有 P1 和 P2 两个启动子, LysR 调控因子 NhaR 能够以 Na^+ 离子依赖性方式直接结合 P1 启动子, 从而参与激活 *nhaA* 基因的表达, 而 P2 启动子在对数期有较低组成性表达, 不受 Na^+ 离子和 NhaR 影响^[35-36]。此外, NhaA 家族 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在许多致病微生物中也有发现, 如霍乱弧菌、破伤风杆菌、幽门螺杆菌、伤寒沙门氏菌等^[12,37-38]。

1.6 其他家族

NhaB 是大肠杆菌中发现的第 2 种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 由 504 个氨基酸残基构成, 也能形成 12 个跨膜区域^[39-40]。NhaB 主要在较低 Na^+ 离子浓度和较低 pH 值环境下发挥作用, 能够弥补 NhaA 在此条件下活性较低的不足, 与 NhaA 蛋白协同参与环境压力应答过程。ChaA 是大肠杆菌中鉴定的第 3 种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白。ChaA 是 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白家族(The calcium cation antiporter family, CaCA family)的重要成员, 主要在碱性条件下参与离子运输, 既能转运 Ca^{2+} 离子也能转运 Na^+ 离子^[41]。研究发现, 当 NhaA、NhaB 和 ChaA 蛋白同时缺失时, 大肠杆菌在 0.2 mol/L NaCl 条件下基本丧失存

活能力^[42]。因此,常以大肠杆菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因缺失菌株 *E. coli* KNabc 为异源宿主系统,通过功能互补策略,筛选和鉴定新型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白^[43-44]。

枯草芽孢杆菌含有 2 个 NhaC 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,分别命名为 NhaC (YheL) 和 MleN (YqkI)^[45-46]。枯草芽孢杆菌中 NhaC 在维持 Na^+ 离子依赖性的 pH 稳态方面作用有限,并且不参与高盐耐受性应答。MleN 蛋白不仅具有 Na^+/H^+ 逆向转运活性,还能偶联苹果酸-乳酸逆向转运能力,增强菌株在较低质子动力势时转运苹果酸的能力。拟坚强芽孢杆菌是一种极端兼性嗜碱菌,具有广泛的 pH 适应性,能够在胞外 pH 7.5-11.4 的环境条件下生长^[19]。拟坚强芽孢杆菌 NhaC5 是从嗜碱菌中鉴定出的第一个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,由 462 个氨基酸残基组成^[47]。该蛋白对 Na^+ 离子具有高亲和性,主要参与低 pH 条件下 Na^+ 离子的输出,对于菌株的嗜碱特性并不是必需的。此外,基因组序列分析表明,拟坚强芽孢杆菌还含有另外 5 种 NhaC 家族成员(NhaC1-4 和 NhaC6),对其功能的研究将会进一步揭示拟坚强芽孢杆菌的嗜碱特性^[19]。

NhaD 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白广泛地存在于细菌中,但是对其详细的生理学功能尚不清楚。科学家最早在弧菌属中鉴定出 NhaD 转运蛋白,发现其能够补救 *E. coli* KNabc 缺失菌株在 10 mmol/L LiCl 或 0.2 mmol/L NaCl 条件下生长缺陷,并且蛋白活性具有 pH 依赖性,在碱性条件下具有最大活性^[48]。通过文库筛选,我们从专性嗜碱微生物 *Alkalimonas amylolytica* N10 中分离鉴定出 NhaD 同源物,该蛋白在碱性条件下才具有 $\text{Na}^+-\text{Li}^+/\text{H}^+$ 逆向转运活性^[49]。进一步研究发现,该菌中另外 3 种逆向转运蛋白也能够参与碱性 pH 耐受和高 Na^+ 抗性应答过程,如 Cpa1 家族 Aa-NhaP、Cpa2 家族 Aa-KefB 和 CaCA 家族 Aa-CaxA^[50]。

霍乱弧菌作为引起霍乱病症的主要病原菌,常发现于水生环境中,能在较宽范围 pH 和盐度条件

下存活。研究发现,霍乱弧菌包括至少 3 种 Nha 家族逆向转运蛋白,即 NhaA、NhaB 和 NhaD^[8]。NhaA 和 NhaB 蛋白在霍乱弧菌应答高盐环境压力过程中发挥着作用,其中 NhaA 蛋白和大肠杆菌 NhaA 蛋白具有相似的活性特征。有趣的是,当 NhaA、NhaB 和 NhaD 蛋白同时缺失时,并未显著影响霍乱弧菌在高盐压力下的生长能力,提示存在其他的未鉴定 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白或 Na^+ 离子外排机制^[51-52]。基因组序列分析也证实,霍乱弧菌还存在其他 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,如 Mrp 家族和 NhaC 家族等。因此,对这些不同类型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白相互协同关系的阐释将会进一步提高我们对霍乱弧菌耐压机制的理解。值得注意的是,随着全基因组测序技术和分子生物学技术的发展,除了上文描述的几种常见 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白家族外,微生物中也报道了许多其他类型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,如 NhaE 等^[53]。随着基因组研究的不断深入,同种微生物中发现了多个推测的不同家族 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,但是其功能分工尚不清楚。因此,对 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白分类学和活性研究将进一步加深我们对该类超家族成员的认识(表 1)。

2 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的结构和机理

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是一类高度保守的膜蛋白,其结构和功能研究受到了学术界的广泛关注。自从 Mitchell 及其同事在大肠杆菌中首次报道 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白后,该蛋白家族在细菌、真菌、植物或动物等整个生命界的细胞膜及内膜系统上被鉴定到^[6,32]。本文以大肠杆菌 NhaA Na^+/H^+ 逆向转运蛋白为例,通过对其结构阐释,初步揭示 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白发挥作用的分子机制,为其他 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的功能阐释提供参考^[34,54-55]。大肠杆菌 NhaA Na^+/H^+ 逆向转运蛋白由 388 个氨基酸残基构成,能够形成 12 个跨膜区域(TMS),其中 C 端和 N 端区域都位于胞质内,而且跨膜区 VII 和 VIII 明显地短于其他区域^[54]。His225、Gly338 是 NhaA 中与 pH 反应有关的残基,G338S 突变导致 NhaA 失

表 1 细菌 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白种类
Table 1 Representative members of bacterial the Na⁺/H⁺ antiporter family

基因名称 Name	种属 Species	定义 Definition	长度 Length (aa)	底物 Substrates	文献 Reference
Ec-nhaA	<i>E. coli</i> K12	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaA family	388	Na ⁺ or Li ⁺	[31-34]
Ec-nhaB	<i>E. coli</i> K12	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaB family	513	Na ⁺ or Li ⁺	[39-40]
Ec-chaA	<i>E. coli</i> K12	Ca ²⁺ -Na ⁺ : H ⁺ antiporter, CaCA family	366	Ca ²⁺ or Na ⁺	[41]
Ec-mdfA	<i>E. coli</i> K12	Multidrug efflux system protein, Mfs family	410	Drugs, Na ⁺ or K ⁺	[30]
Ec-yjcE	<i>E. coli</i> K12	Putative cation: proton antiporter, Cpa1 family	549	Na ⁺	[14]
Ec-cvrA (ycgO)	<i>E. coli</i> K12	Putative cation: proton antiporter, Cpa1 family	578	K ⁺	[14]
Ec-KefB	<i>E. coli</i> K12	K ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa2 family	601	K ⁺	[20]
Ec-KefC	<i>E. coli</i> K12	K ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa2 family	620	K ⁺ , Rb ⁺ , Li ⁺ or Na ⁺	[20]
Eh-napA	<i>E. hirae</i> ATCC9790	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa2 family	383	Na ⁺	[21]
Vc-nhaA	<i>V. cholerae</i> O395	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaA family	382	Na ⁺ or Li ⁺	[8, 51]
Vc-nhaB	<i>V. cholerae</i> O395	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaB family	530	Na ⁺	[8, 51]
Vc-nhaD	<i>V. cholerae</i> O395	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaD family	477	Na ⁺ or Li ⁺	[8]
Vc-nhaC (yqkI)	<i>V. cholerae</i> O395	Putative Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	481	Na ⁺ ?	This study
Vc-nhaP1	<i>V. cholerae</i> O395	Na ⁺ -K ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa1 family	444	Na ⁺ or K ⁺	[18]
Vc-nhaP2	<i>V. cholerae</i> O395	K ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa1 family	581	K ⁺ , Na ⁺ or Rb ⁺	[18]
Bc-GerN	<i>B. cereus</i> AH187	Na ⁺ -K ⁺ : H ⁺ -K ⁺ antiporter, Cpa2 family	375	Na ⁺	[22]
Bh-mrp (mnh, sha)	<i>B. halodurans</i> C-125	Monovalent cation: H ⁺ antiporter A-G, Cpa3 family	95-804	Na ⁺	[23,25]
Bs-mrp (mnh, pha)	<i>B. subtilis</i> 168	Monovalent cation: H ⁺ antiporter A-G, Cpa3 family	94-801	Na ⁺ , Li ⁺ , not K ⁺ , Ca ²⁺	[23,26]
Bs-nhaC (yheL)	<i>B. subtilis</i> 168	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	453	Na ⁺	[46]
Bs-mleN (yqkI)	<i>B. subtilis</i> 168	Na ⁺ -lactate: malate-2H ⁺ antiporter, NhaC family	468	malate, lactate, Na ⁺	[45]
Bs-nhaK (yvgP)	<i>B. subtilis</i> 168	Monovalent cation: H ⁺ antiporter, Cpa1 family	670	Na ⁺ , Li ⁺ , K ⁺ or Rb ⁺	[16]
Bs-tetB	<i>B. subtilis</i> 168	Tetracycline-divalent cation efflux protein, Mfs family	458	Tet-metal, Na ⁺ or K ⁺	[8]
Bp-mrp	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Monovalent cation: H ⁺ antiporter A-G, Cpa3 family	91-805	Na ⁺ or Li ⁺ , not K ⁺	[24,27,29]
Bp-nhaC1	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	439	Na ⁺ ?	This study
Bp-nhaC2	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	515	Na ⁺ ?	This study
Bp-nhaC3	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	251	Na ⁺ ?	This study
Bp-nhaC4	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	220	Na ⁺ ?	This study
Bp-nhaC5	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	462	Na ⁺	[47]
Bp-nhaC6	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaC family	436	Na ⁺ ?	This study
Bp-nhaP	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ -K ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa1 family	494	Na ⁺ or K ⁺ ?	This study
Bp-nhaP2	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Putative Na ⁺ -K ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa1 family	501	Na ⁺ or K ⁺ ?	This study
Bp-napA	<i>B. pseudofirmus</i> OF4	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa2 family	494	Na ⁺ ?	This study
Sa-mnh1	<i>S. aureus</i> N315	Monovalent cation: H ⁺ antiporter A-G, Cpa3 family	97-801	Na ⁺ or K ⁺ ?	This study
Sa-mnh2	<i>S. aureus</i> N315	Monovalent cation: H ⁺ antiporter A-G, Cpa3 family	100-800	K ⁺ ?	This study
Pa-nhaP	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Na ⁺ : H ⁺ antiporter, Cpa1 family	424	Na ⁺ or Li ⁺	[17-18]
Aa-nhaD	<i>A. amylolytica</i> N10	Na ⁺ -Li ⁺ : H ⁺ antiporter, NhaD family	483	Na ⁺ or Li ⁺	[49]

去 pH 控制, 在 pH 6.5–9.0 时处于激活状态^[56-57]。H225R 突变使 NhaA 催化活性的最适 pH 向酸性方向偏移, E252C 突变使 NhaA 催化活性的最适 pH 向碱性方向偏移^[57-58]。研究发现, NhaA 蛋白中存在 2 个漏斗状结构, 两者朝向相反并被周质空间中疏水性氨基酸组成的离子屏障所阻隔(图 2A)^[54]。胞质漏斗结构由 TMS II、IX、IVc 和 V 跨膜螺旋区组成, 富含带负电荷的氨基酸残基; 周质漏斗结构由 TMS II、VIII 和 XIp 跨膜螺旋区组成, 同样富含带负电荷的氨基酸残基。NhaA 蛋白 pH 感应器(pH sensor) 位于 TMS IX 跨膜螺旋区的 N 端部位, 在胞质漏斗结构开口处, 由一系列带负电荷的氨基酸残基构成, 能够作为一种离子陷阱捕获阳离子。TMS IV-XI 结构由一对不连续的朝向相反的螺旋区域构成, 中间被一条延伸链区域阻断。Asp133 能够稳定 TMS IV-XI 结构中带有部分正电荷的 N 端部位, Lys300 也能够抵消 TMS IV-XI 结构中带有部分负电荷的 C 端部位, 最终在膜中间形成一个电荷平衡区, 从而确保 NhaA 蛋白活性的精细调控。NhaA 蛋白中 Na⁺ 结合位点(Na⁺ binding sites)位于 TMS IV-XI 结构的延伸链区域, 靠近胞质漏斗结构底部区域, 含有高度保守性氨基酸残基, 如 Asp163、Asp164、Asp133、Thr132 等, 该区域对维持 NhaA 蛋白活性是必需的。目前的研究模型表明(图 2B): 在酸性条件下, 离子转运过程被周质离子屏障阻隔, 并且只有 Asp164 残基能够暴露在胞质漏斗结构底部区域。在碱性条件下, NhaA 蛋白 pH 感应器能够感应环境信号, 引起 TMS IX 跨膜螺旋区构型的改变, 导致 TMS IVc、XIp 和 X 跨膜螺旋区的重新定位, 并最终完全释放 Na⁺ 离子结合位点。当 NhaA 蛋白与底物 Na⁺ 离子结合后, 引起电荷失衡, 打开周质离子屏障, 将 Na⁺ 离子结合位点暴露于周质漏斗结构底部区域, 最终完成 Na⁺ 离子释放过程。

3 展望

Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是在生物界普遍存在的负责 Na⁺/H⁺ 交换的一种跨膜转运蛋白^[8,59-60]。在高等

植物中, 主要通过降低 Na⁺ 离子吸收、促进 Na⁺ 离子外排和 Na⁺ 离子区隔化 3 种策略, 维持胞内 pH 稳态和离子动态平衡, 从而消除 Na⁺ 离子毒害作用。其中, Na⁺ 离子外排和区隔化是次级主动运输过程, 主要依赖于质膜和液泡膜上的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白来完成^[60]。研究发现, 植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在进化上可能具有多样性, 液泡型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因间具有高度同源性, 质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因也具有高度同源性, 但是两者间的同源性相对较低, 而且细菌、真菌和动物中 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白与植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的同源性更低^[61]。由于大多数原核生物没有恒定的内膜系统, 系统发育分析揭示细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在进化上可能仅与植物质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白间具有一定同源性^[60,62]。

有趣的是, 嗜盐或嗜碱等极端微生物能在高 Na⁺ 离子或 pH 环境条件下生长, 但是其胞内 Na⁺ 离子并不高, 提示其膜系统具有较强的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白活性^[7]。近年来, 尽管细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的研究取得了一定进展, 鉴定和描述出许多新型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白, 为发掘功能强大的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因资源奠定了基础, 但是关于细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白功能特征和应答调控机制的研究仍处于起步阶段。另一方面, 越来越多的细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因被相继克隆和鉴定, 也为其在农业或工业上的应用提供了可能。在番茄细胞中异源表达嗜碱菌 *Alkalimonas amylolytica* Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白后, 显著提高转基因植物在盐碱土壤中的生长能力^[63]; 在水稻中异源表达大肠杆菌 NhaA Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白后, 同样明显增强转基因水稻的耐盐和耐旱特性, 有效提高农作物产量^[64]。利用基因工程技术进行的类似尝试, 将为培育抗盐碱农作物提供了新的思路。但是, 由于菌株的耐盐特性是多基因协同作用的结果, 单一基因的过表达具有较大的局限性, 通常而言并不会影响菌株的耐盐性。在大肠杆菌中, 尽管过表达 NhaA 和

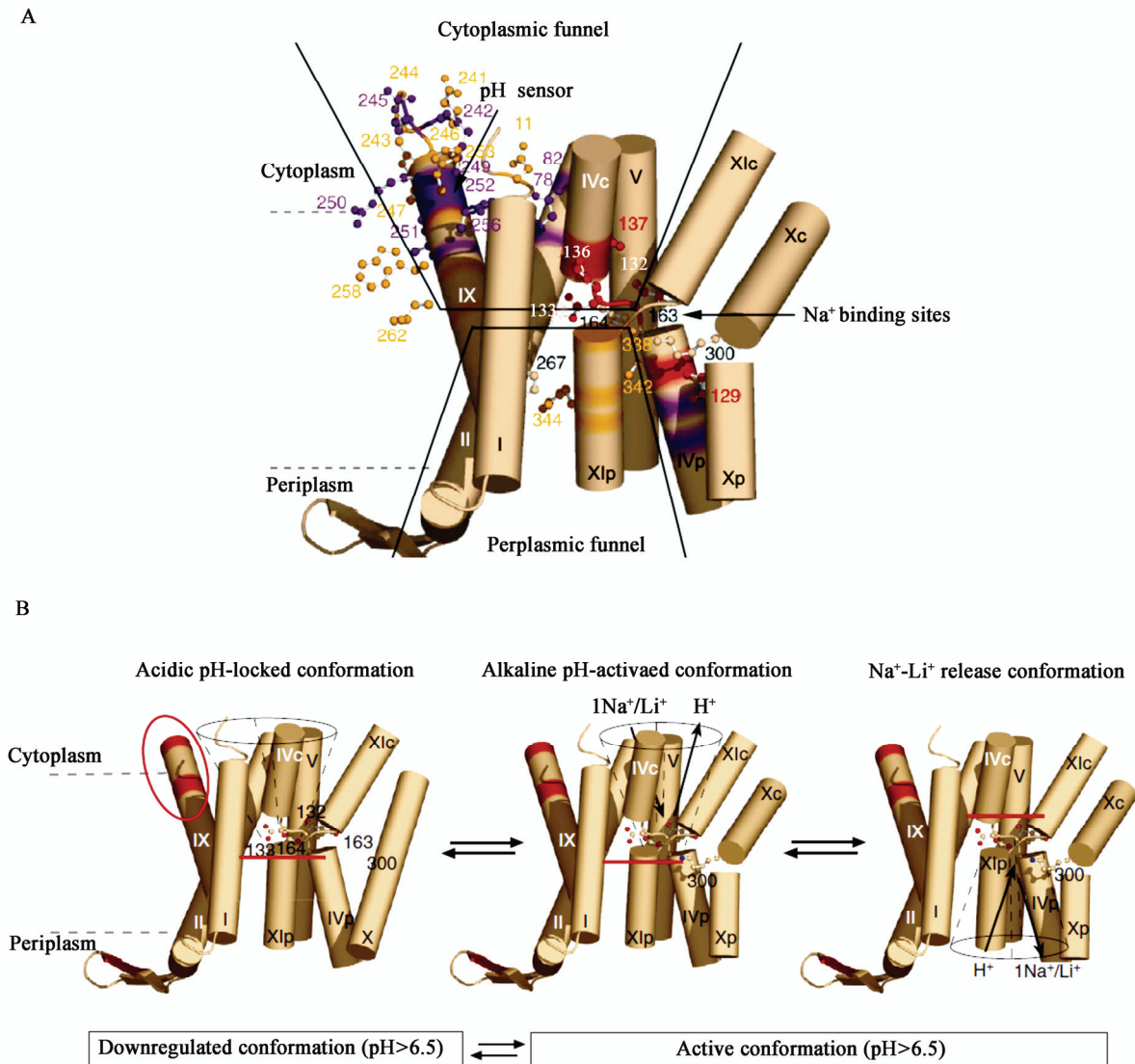


图2 大肠杆菌 NhaA Na^+/H^+ 逆向转运蛋白结构和作用机制^[54]

Figure 2 The overall architecture (A) and proposed mechanism (B) of *E. coli* NhaA Na^+/H^+ antiporter^[54]

NhaR 后并没有显著提高菌株的耐盐性, 但却改变了菌株的中心碳代谢途径, 显著增加了菌株发酵过程中的乳酸积累量^[65]。因此, 继续挖掘和研究耐盐碱菌高活性的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 将为工业菌株改造和抗盐碱农作物培育提供新的工具和手段。

通过异源表达策略, 以大肠杆菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因缺失菌株 KNabc 为宿主系统, 分离和鉴定出许多新的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 是研究细菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的最主要方法之一^[42]。需要注

意的是, 尽管许多微生物, 尤其是嗜碱菌和嗜盐菌, 都存在多种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 但是这些 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白间的内在关系和调控机制尚不清楚, 仍有许多 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白需要进行功能注释。因此, 利用高通量筛选和分子生物学方法, 发现更多的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 并在分子和细胞水平上阐释不同 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的应答机理和互作关系, 将为我们更好地了解和应用 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白提供重要的理论依据和指导意义。

参考文献

- [1] Xu N, Dong Y, Cheng X, et al. Cellular iron homeostasis mediated by the Mrs4-Ccc1-Smf3 pathway is essential for mitochondrial function, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843(3): 629-639
- [2] Xu N, Cheng X, Yu Q, et al. Aft2, a novel transcription regulator, is required for iron metabolism, oxidative stress, surface adhesion and hyphal development in *Candida albicans*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62367
- [3] Xu N, Cheng XX, Yu QL, et al. Research advances of iron homeostasis regulatory networks in *Candida albicans*[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(3): 386-393 (in Chinese)
徐宁, 程欣欣, 喻其林, 等. 白念珠菌铁稳态调控网络研究进展[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(3): 386-393
- [4] Yu QL, Xu N, Li MC. Calcium homeostasis systems and calcium signaling pathways in *Candida albicans*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(4): 422-428 (in Chinese)
喻其林, 徐宁, 李明春. 白念珠菌钙稳态系统及钙信号途径的研究进展[J]. *微生物学报*, 2012, 52(4): 422-428
- [5] Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 319-330
- [6] Padan E, Venturi M, Gerchman Y, et al. Na⁺/H⁺ antiporters[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2001, 1505(1): 144-157
- [7] Krulwich TA. Alkaliphiles: 'basic' molecular problems of pH tolerance and bioenergetics[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(3): 403-410
- [8] Padan E, Bibi E, Ito M, et al. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2005, 1717(2): 67-88
- [9] Yang LF. Cloning and functional study on Na⁺ extrusion related genes in Gram-positive moderately halophilic bacteria[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2006 (in Chinese)
杨礼富. 革兰氏阳性中度嗜盐菌钠离子输出相关基因的克隆与功能研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2006
- [10] Du LX, Dong KH, Zhu HS. Research progress on Na⁺/H⁺ antiporter of plant[J]. *Grassland and Turf*, 2012(2): 82-86 (in Chinese)
杜利霞, 董宽虎, 朱慧森. 植物 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白研究进展[J]. *草原与草坪*, 2012(2): 82-86
- [11] Saier MH Jr, Reddy VS, Tamang DG, et al. The transporter classification database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: D251-258
- [12] Krulwich TA, Hicks DB, Ito M. Cation/proton antiporter complements of bacteria: why so large and diverse?[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(2): 257-260
- [13] Saier MH Jr, Eng BH, Fard S, et al. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1999, 1422(1): 1-56
- [14] Verkhovskaya ML, Barquera B, Wikstrom M. Deletion of one of two *Escherichia coli* genes encoding putative Na⁺/H⁺ exchangers (ycgO) perturbs cytoplasmic alkali cation balance at low osmolarity[J]. *Microbiology*, 2001, 147(Pt11): 3005-3013
- [15] Gouda T, Kuroda M, Hiramatsu T, et al. *nhaG* Na⁺/H⁺ antiporter gene of *Bacillus subtilis* ATCC9372, which is missing in the complete genome sequence of strain 168, and properties of the antiporter[J]. *Journal of Biochemistry*, 2001, 130(5): 711-717
- [16] Fujisawa M, Kusumoto A, Wada Y, et al. NhaK, a novel monovalent cation/H⁺ antiporter of *Bacillus subtilis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2005, 183(6):411-420
- [17] Kuroda T, Fujita N, Utsugi J, et al. A major Li⁺ extrusion system NhaB of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison with the major Na⁺ extrusion system NhaP[J]. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48(4): 243-250
- [18] Resch CT, Winogrodzki JL, Hase CC, et al. Insights into the biochemistry of the ubiquitous NhaP family of cation/H⁺ antiporters[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2011, 89(2): 130-137
- [19] Janto B, Ahmed A, Ito M, et al. Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(12): 3289-3309
- [20] Fujisawa M, Ito M, Krulwich TA. Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(33): 13289-13294
- [21] Waser M, Hess-Bienz D, Davies K, et al. Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(8): 5396-5400
- [22] Southworth TW, Guffanti AA, Moir A, et al. GerN, an endospore germination protein of *Bacillus cereus*, is an Na⁺/H⁺-K⁺ antiporter[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 5896-5903
- [23] Swartz TH, Ikewada S, Ishikawa O, et al. The Mrp system: a giant among monovalent cation/proton antiporters?[J]. *Extremophiles*, 2005, 9(5): 345-354
- [24] Morino M, Natsui S, Ono T, et al. Single site mutations in the hetero-oligomeric Mrp antiporter from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 that affect Na⁺/H⁺ antiport activity, sodium exclusion, individual Mrp protein levels, or Mrp complex formation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(40): 30942-30950
- [25] Hamamoto T, Hashimoto M, Hino M, et al. Characterization of a gene responsible for the Na⁺/H⁺ antiporter system of alkaliphilic *Bacillus* species strain C-125[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(5): 939-946
- [26] Ito M, Guffanti AA, Oudega B, et al. mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholera and to Na⁺ and in pH homeostasis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2394-2402
- [27] Morino M, Suzuki T, Ito M, et al. Purification and functional reconstitution of a seven-subunit mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(1): 28-35
- [28] Yamaguchi T, Tsutsumi F, Putnoky P, et al. pH-dependent regulation of the multi-subunit cation/proton antiporter Pha1 system from *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 8): 2750-2756
- [29] Swartz TH, Ito M, Ohira T, et al. Catalytic properties of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* members of the secondary cation/proton antiporter-3 (Mrp) family are revealed by an optimized assay in an *Escherichia coli* host[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 3081-3090
- [30] Fluman N, Adler J, Rotenberg S A, et al. Export of a single drug molecule in two transport cycles by a multidrug efflux pump[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4615
- [31] Padan E, Tzuberly T, Herz K, et al. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na⁺/H⁺ antiporter[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2004, 1658(1/2): 2-13
- [32] West IC, Mitchell P. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Journal*, 1974, 144(1): 87-90
- [33] Mager T, Rimon A, Padan E, et al. Transport mechanism and pH regulation of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaA from *Escherichia coli*: an electrophysiological study[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(26): 23570-23581
- [34] Padan E. Functional and structural dynamics of NhaA, a prototype for Na⁺ and H⁺ antiporters, which are responsible for Na⁺ and H⁺ homeostasis in cells[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2014, 1837(7): 1047-1062
- [35] Padan E, Schuldiner S. Molecular physiology of the Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Experimental*

- Biology, 1994, 196: 443-456
- [36] Rahav-Manor O, Carmel O, Karpel R, et al. NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR), regulates nhaA, the sodium proton antiporter gene in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(15): 10433-10438
- [37] Lentjes CJ, Mir SH, Boehm M, et al. Molecular characterization of the Na⁺/H⁺-antiporter NhaA from *Salmonella Typhimurium*[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101575
- [38] Calinescu O, Danner E, Bohm M, et al. Species differences in bacterial NhaA Na⁺/H⁺ exchangers[J]. FEBS Letters, 2014, 588(17): 3111-3116
- [39] Pinner E, Padan E, Schuldiner S. Kinetic properties of NhaB, a Na⁺/H⁺ antiporter from *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(42): 26274-26279
- [40] Pinner E, Kotler Y, Padan E, et al. Physiological role of NhaB, a specific Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(3): 1729-1734
- [41] Ohyama T, Igarashi K, Kobayashi H. Physiological role of the chaA gene in sodium and calcium circulations at a high pH in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(14): 4311-4315
- [42] Nozaki K, Inaba K, Kuroda T, et al. Cloning and sequencing of the gene for Na⁺/H⁺ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 222(3):774-779
- [43] Wang X, Xu F, Chen S. Metagenomic cloning and characterization of Na⁺/H⁺ antiporter genes taken from sediments in Chaerhan Salt Lake in China[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(4): 619-624
- [44] Meng L, Hong S, Liu H, et al. Cloning and identification of Group I mrp operon encoding a novel monovalent cation/proton antiporter system from the moderate halophile *Halomonas zhaodongensis*[J]. Extremophiles, 2014. DOI: 10.1007/s00792-014-0666-5
- [45] Wei Y, Guffanti AA, Ito M, et al. *Bacillus subtilis* YqkI is a novel malic/Na⁺-lactate antiporter that enhances growth on malate at low protonmotive force[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(39): 30287-30292
- [46] Pragai Z, Eschevins C, Bron S, et al. *Bacillus subtilis* NhaC, an Na⁺/H⁺ antiporter, influences expression of the phoPR operon and production of alkaline phosphatases[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(8): 2505-2515
- [47] Ito M, Guffanti AA, Zemsky J, et al. Role of the nhaC-encoded Na⁺/H⁺ antiporter of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(12): 3851-3857
- [48] Nozaki K, Kuroda T, Mizushima T, et al. A new Na⁺/H⁺ antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1998, 1369(2): 213-220
- [49] Liu J, Xue Y, Wang Q, et al. The activity profile of the NhaD-type Na⁺-Li⁺/H⁺ antiporter from the soda Lake Haloalkaliphile *Alkalimonas amylolytica* is adaptive for the extreme environment[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(22): 7589-7595
- [50] Wei Y, Liu J, Ma Y, et al. Three putative cation/proton antiporters from the soda lake alkaliphile *Alkalimonas amylolytica* N10 complement an alkali-sensitive *Escherichia coli* mutant[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 7): 2168-2179
- [51] Herz K, Vimont S, Padan E, et al. Roles of NhaA, NhaB, and NhaD Na⁺/H⁺ antiporters in survival of *Vibrio cholerae* in a saline environment[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(4): 1236-1244
- [52] Steuber J, Halang P, Vorburger T, et al. Central role of the Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase (Na⁺-NQR) in sodium bioenergetics of *Vibrio cholerae*[J]. Biological Chemistry, 2014. DOI: 10.1515/hsz-2014-0204
- [53] Sousa PM, Videira MA, Vorburger T, et al. The novel NhaE-type Na⁺/H⁺ antiporter of the pathogenic bacterium *Neisseria meningitidis*[J]. Archives of Microbiology, 2013, 195(3): 211-217
- [54] Padan E, Kozachkov L, Herz K, et al. NhaA crystal structure: functional-structural insights[J]. Journal of Experimental Biology, 2009, 212(Pt 11): 1593-1603
- [55] Padan E. The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2008, 33(9): 435-443
- [56] Rimon A, Gerchman Y, Kariv Z, et al. A point mutation (G338S) and its suppressor mutations affect both the pH response of the NhaA-Na⁺/H⁺ antiporter as well as the growth phenotype of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(41): 26470-26476
- [57] Olami Y, Rimon A, Gerchman Y, et al. Histidine 225, a residue of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* is exposed and faces the cell exterior[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(3): 1761-1768
- [58] Tzuberly T, Rimon A, Padan E. Mutation E252C increases drastically the Km value for Na⁺ and causes an alkaline shift of the pH dependence of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(5): 3265-3272
- [59] Reguera M, Bassil E, Blumwald E. Intracellular NHX-type cation/H⁺ antiporters in plants[J]. Molecular Plant, 2014, 7(2): 261-263
- [60] Rodriguez-Rosales MP, Galvez FJ, Huertas R, et al. Plant NHX cation/proton antiporters[J]. Plant Signal Behavior, 2009, 4(4): 265-276
- [61] Brett CL, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2005, 288(2): C223-239
- [62] Chen GP, Wang HZ, Shi NN, et al. Na⁺/H⁺ antiporter and its relationship with plant salt tolerance[J]. China Biotechnology, 2006, 26(5): 101-106 (in Chinese)
- 陈观平, 王慧中, 施农农, 等. Na⁺/H⁺逆向转运蛋白与植物耐盐性关系研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(5): 101-106
- [63] Zhong N, Han L, Wu X, et al. Ectopic expression of a bacterium NhaD-type Na⁺/H⁺ antiporter leads to increased tolerance to combined salt/alkali stresses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(6): 412-421
- [64] Wu L, Fan Z, Guo L, et al. Over-expression of the bacterial nhaA gene in rice enhances salt and drought tolerance[J]. Plant Science, 2005, 168(2): 297-302
- [65] Wu X, Altman R, Eiteman MA, et al. Effect of overexpressing nhaA and nhaR on sodium tolerance and lactate production in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Engineering, 2013, 7(1): 1-7