

液泡膜 H^+ -ATPase 在植物的非生物胁迫响应和信号转导中的作用

赵雅丽 韩冰* 李淑芬 王艳芳 何江峰

内蒙古农业大学生物工程学院, 呼和浩特 010018

The Role in the Response of Vacuolar H^+ -ATPase to the Abiotic Stress and the Signal Transduction in Plants

ZHAO Ya-Li, HAN Bing*, LI Shu-Fen, WANG Yan-Fang, HE Jiang-Feng

College of Biology Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

提要 液泡膜 H^+ -ATPase 是一种多亚基复合体, 在植物受到非生物胁迫后, 其对逆境信号的感知转导即做出相应的变化。在 Ca^{2+} 通道、ABA 信号通路及盐过敏感受途径等信号传递的过程中, 都有 V-ATPase 的参与。文章将对这一领域的研究进展进行介绍。

关键词 液泡膜 H^+ -ATPase; 非生物胁迫; 信号转导

在植物中主要存在 3 种质子泵 (H^+ -ATPase), 即位于细胞质膜上的 P 型质子泵 (P-ATPase)、液泡膜上的 V 型质子泵 (V-ATPase) 和 H^+ 转运无机焦磷酸酶 (H^+ -PPase) (Sze 等 2002)。在植物中, P-ATPase 从细胞中外排 H^+ , 建立跨质膜的质子电化学梯度驱动溶质的跨膜转运。V-ATPase 和 H^+ -PPase 水解 ATP 和 PPi, 把细胞质中的 H^+ 泵到液泡中, 建立跨液泡膜的质子电化学梯度驱动溶质的跨膜转运, 而 V-ATPase 在细胞器的酸化中又起中心作用。V-ATPase 是亚基构成最复杂的质子泵, 自发现 20 年以来, 人们逐渐开始理解 V-ATPase 在植物中的作用。

1 V-ATPase 的结构与功能

V-ATPase 是一类膜结合蛋白, 分布于液泡、质膜、内质网膜以及高尔基体和小泡等内膜系统中。在液泡膜上的分布较丰富, 占液泡总蛋白含量的 6.5%~35%, 每 μm^2 的液泡膜上有 970~3 380 个 V-ATPase 全酶 (Luttge 和 Ratajczak 1997)。V-ATPase 是非常重要的持家酶, 以维持细胞质中的离子稳态和细胞的代谢。另一方面, 在环境胁迫条件下, V-ATPase 作为胁迫响应酶会适当地改变亚基的表达和酶结构, 因此, 又称之为“生态酶”。在动物体内, V-ATPase 除了在细胞内膜上发挥重要作用, 大量分布于肾小管和破骨细胞膜上的 V-ATPase, 还维持着动物体的酸碱平衡和骨骼的新陈代谢过程 (Niikura 等 2004)。在植物的保卫细胞、维管组织和分生组织中以及特有的生

理过程 (如植物的营养运输、开花和胁迫耐受) 中 V-ATPase 都发挥着功能 (Peters 等 2000)。

植物 V-ATPase 由 13 个亚基组成 (图 1), 分成两部分, 即位于细胞质内的 V_1 和膜内的 V_0 。与线粒体和叶绿体上的 F 型 ATP 合成酶 (F-ATPase) 非常相似, V_1 和 V_0 的结构类似于 F-ATPase 的 F_1 和 F_0 域 (Grüber 等 2001)。但在 Momi 等 (2004) 的工作中发现, 由于 C 亚基在 V_0 与 V_1 中的插入, 使得 V-ATPase 实质上长于 F-ATPase, 而且 C 亚基附着于 V_0 域上, 像是一个孔与 V_1 域中的柄相连, 这种构造看起来对于 V_0 和 V_1 域的可逆性结合/分离是

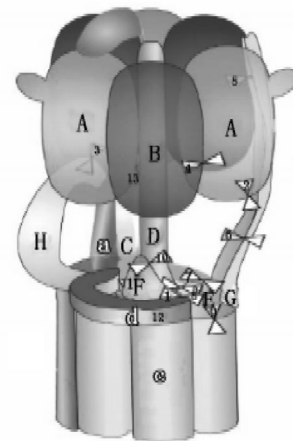


图1 V-ATPase 的三维结构模式 (Ines 等 2002)

收稿 2006-05-11 修定 2006-08-31

资助 内蒙古教育厅研究基金 (K32111)。

*通讯作者 (E-mail: li-user@sohu.com, Tel: 0471-4308800)。

非常关键的, 这也是V-ATPase活性调节所特有的。另外, Chen等(2002)在研究山蔷薇配子体脱水中, 观察到一个编码与V-ATPase C亚基具有非常大相似性的多肽, 而且发现它的137位的Glu残基对于V-ATPase的活性很重要, 认为是质子穿过脂质双膜转运的基本条件。由此可见, C亚基对由于外界环境的调节引起的V-ATPase活性变化以及V₁域和V₀域的聚合/分离是至关重要的。

2 V-ATPase在非生物胁迫后信号转导中的作用

随着环境问题日益受到重视, 植物对恶劣生境的适应机制也逐渐成为人们研究的热点。许多实验证明, 植物的抗逆性是由许多基因控制的, 且与一些小分子有机化合物相关, 如脯氨酸、LEA蛋白、V-ATPase等。目前, 被普遍认为有“生态酶”之称的V-ATPase在受到环境胁迫后, 会改变自身结构, 或是在转录和翻译等不同水平上发生变化, 以达到适应环境的目的。其对环境胁迫的快速反应, 以及由它转运质子导致细胞器

酸化所触发的一系列变化, 说明V-ATPase参与生物体内的信号转导并起着至关重要的作用(图2)。目前的研究发现, 在Ca²⁺通道、NO和脱落酸(abscisic acid, ABA)信号通路以及途径中, 都需要V-ATPase的参与。

2.1 V-ATPase与Ca²⁺通道 植物的液泡是细胞内储量最大的钙离子库, 估计其游离钙离子水平在10⁻³ mol·L⁻¹左右, 它是信号转导过程中胞内Ca²⁺信使的来源。液泡膜上有可对刺激因子起反应的钙离子通道, 受刺激时释放钙离子到细胞质中, 细胞质Ca²⁺水平提高(Sanders 1999)。有报道认为, 细胞内Ca²⁺水平的调节对于植物适应环境的胁迫至关重要, 而液泡中由于一定浓度Ca²⁺的积累而成为细胞的钙库。液泡膜上有2种释放Ca²⁺的通道, 一种通道受肝素抑制和IP₃诱导, 另一种是电压门控的Ca²⁺通道。液泡膜上的V-ATPase可通过水解ATP⁴⁻产生ATP³⁻和Pi²⁻而增加胞质侧的负电性, 并且向液泡内转运质子, 产生内正外负的电

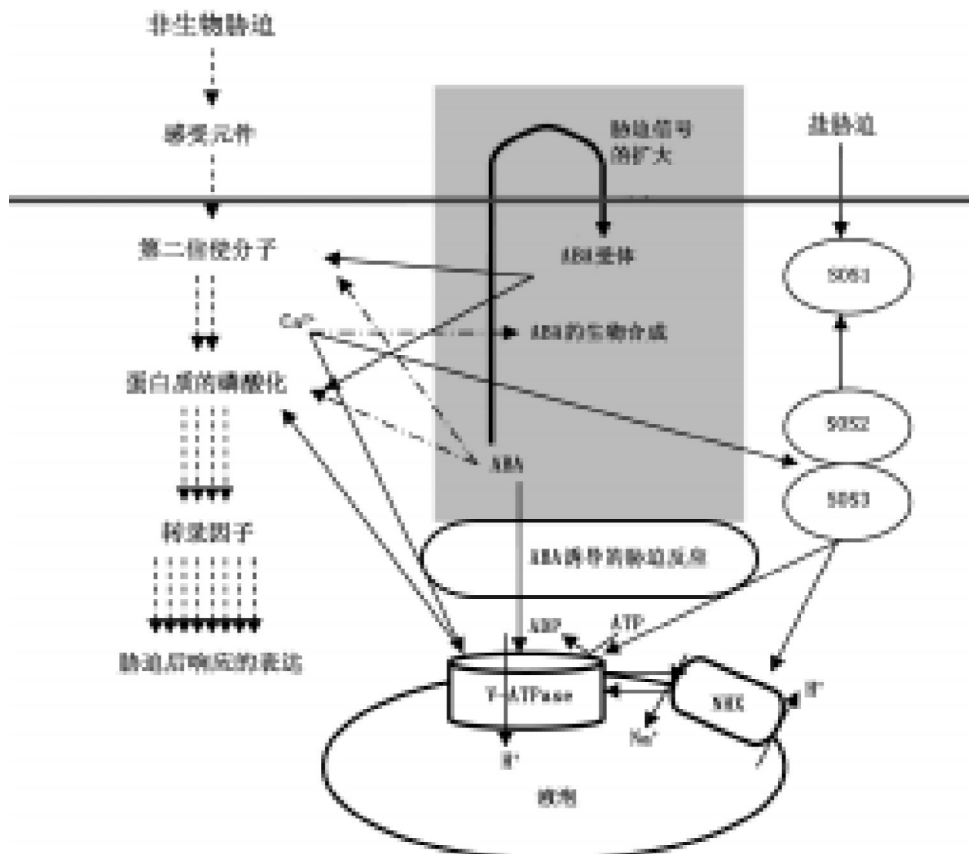


图2 V-ATPase在非生物胁迫后信号转导中的作用

势差, 从而控制电压门控的 Ca^{2+} 通道。在液泡膜上还存有 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 反向转运蛋白, 液泡释放 2 个 H^+ , 就有 1 个 Ca^{2+} 转运到液泡膜中, H^+ 的释放反过来又刺激 V-ATPase 的质子转运活性 (夏朝晖和陈珈 1998)。这样, Ca^{2+} 在液泡内外的跨膜转运都需要 V-ATPase。而且, Geisler 等 (2000) 通过克隆拟南芥中钙调节的 ATPase 的同源体时发现, V-ATPase 的 A 亚基的 N 末端含有 Ca^{2+} 结合位点的自我抑制功能域, 在由高 NaCl 和 KCl 等引起的渗透胁迫后表达, 这使得液泡中的 Ca^{2+} 同 ATPase 一起, 在盐胁迫后对菌株具有保护作用, 从而提高了菌体的耐盐力。另外, 在研究耐盐转基因水稻时发现, 在转基因水稻根部, V-ATPase 的水解活性明显高于对照, 而且 Ca^{2+} 的含量也协同增加 (Zhao 等 2006)。因此, 当非生物胁迫作用于植物后, 引起植物细胞内 Ca^{2+} 水平的变化, 刺激 V-ATPase 的活性以产生质子梯度来达到运输 Ca^{2+} 的目的, 调节液泡膜内外 Ca^{2+} 浓度, 从而使植物适应逆境而正常生长。

2.2 V-ATPase 与 ABA 信号通路 一般来说, 在干旱、寒冷、高温、盐渍和水涝等因素影响下, 植物体内 ABA 迅速增加, 并有许多新基因表达和蛋白质合成, 同时抗逆性也增强, 因此, ABA 即常被称为应激激素或胁迫激素。在逆境胁迫条件下, ABA 含量变化对 V-ATPase 的活性也有一定的影响。王宝山和 Haschke (1991) 报道, 在活体情况下, ABA 可促进 V-ATPase 的水解活性及质子转运活性; 而离体的情况下, ABA 则削弱了 V-ATPase 的活性。后来, Janicka 和 Klobus (2006) 用 NaCl 处理黄瓜时, 发现 V-ATPase 活性增加, ABA 水平也增加; 而后他们再用 ABA 处理黄瓜时, V-ATPase 的活性也增加, 且转录水平也增加。所以, 他们认为 ABA 在转录水平上调控 V-ATPase 对盐胁迫的响应。但是如果将 ABA 直接加入到 V-ATPase 的反应介质中, V-ATPase 的活性没有变化, 究竟是什么原因产生这样结果, 他们并没有作进一步研究。在干旱和盐胁迫条件下, ABA 的增加量很相似, 因此他们断定, 在盐胁迫条件下, ABA 不参与 V-ATPase 的上调。有人报道, 经过 ABA 处理后的大麦 V-ATPase 活性增加; 用 ABA 处理冰叶日中花的叶片, 亦能导致叶片组

织中 c 亚基的转录水平增加 (Tsiantis 等 1996)。由此看来, ABA 在逆境胁迫后对 V-ATPase 的活性及转录都有影响, 但如果要想得出有关 V-ATPase 和干旱之间的确切关系, 尚需对干旱条件下的 V-ATPase 活性和表达变化以及胁迫引起的 ABA 变化作更为细致的研究。Wang 等 (2001) 认为, 在拟南芥 *gpa1* 突变体保卫细胞中有 pH 依赖型或 pH 非依赖型 2 种途径调节着 ABA 诱导的气孔关闭; pH 依赖型途径中, 质子运输到质外体或是液泡中, 需要 V-ATPase 参与。而 Netting (2000) 认为, 质外体 pH 值升高可能会引发脱落酸前体物质水解而释放出 ABA, 从而导致钙通道的开放; 质外体 pH 值进一步增加, 于是在这种 pH 值梯度下形成液泡膜的电化学势梯度。由此看来, V-ATPase 活性的增加后, 质外体 pH 值升高, 于是脱落酸前体物质水解而释放出 ABA, 从而导致植物体内 ABA 含量升高, 而持续增高的 pH 值下形成液泡膜的电化学势梯度, 并由此而引起 Na^+ 的转运, 形成离子区域化, 从而能适应逆境胁迫。

2.3 V-ATPase 在盐过敏感调控途径中的作用 除了 Ca^{2+} 和 ABA 很可能协同参与对 V-ATPase 的调节外, 人们还发现其它的调节方式。已经证实, 盐过敏感 (salt overly sensitive, SOS) 调控途径在植物耐盐中起关键性的调控作用, 同时, 以此途径控制着离子在植物体内的平衡 (Zhu 2000)。另外, 植物的中心液泡在调节细胞质的离子平衡中也有作用, 而且二者之间有密切关系。它有效地从细胞中排出过量的 Na^+ 以及把 Na^+ 区域化到液泡中, 是植物适应高浓度 NaCl 的主要机制。液泡对 Na^+ 的运输是通过液泡中的次级 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 (Na^+/H^+ antiporter, NHX) 进行的, Na^+/H^+ 反向转运的能量由液泡 V-ATPase 驱动的质子动力提供 (Yamaguchi 等 2003)。首先, 盐胁迫可引发细胞质中的钙离子信号 (Knight 等 1997), 但这种钙离子信号与干旱、冷或其它一些刺激引发的钙离子信号有何不同, 尚不清楚。而后, 由 *SOS3* 编码的钙离子结合蛋白接收这种钙离子信号后, 传到下游反应基因 (Liu 和 Zhu 1998; Ishitani 等 2000), *SOS3* 与一种苏氨酸 / 丝氨酸蛋白激酶相互作用, 并将其激活 (Halfter 等 2000; Liu 等 2000)。SOS2 和 SOS3 可调控 SOS1 的表达水平。SOS1 是一种耐

盐基因, 它编码一种细胞质膜上的NHX (Shi等2000)。NHX编码液泡膜上的NHX, 它们可促进离子在液泡中的区隔化效应, V-ATPase向此过程提供能量, 已有实验证明了这一点。并有人用NaCl处理冰叶日中花时发现, NaCl诱导液泡膜和质膜NHX活性的增加, 与盐处理下植物V-ATPase活性增加是密切相关的, 这证明V-ATPase可为通过NHX的液泡和质膜Na⁺的积累提供质子驱动力(Barkla等1995)。更重要的是, 有人观察到SOS1转运活性的激活需要SOS2和SOS3, 并且共表达的SOS3、SOS2和SOS1能显著增强酵母突变体的耐盐性(Guo等2001)。外界盐胁迫可引发细胞的钙离子信号, 并由此激活SOS3、SOS2蛋白激酶复合物, 而这一蛋白激酶复合物可激活SOS1的Na⁺/H⁺交换活性, 从而将Na⁺排出细胞外; 同时, SOS3、SOS2蛋白激酶复合物还可激活V-ATPase和NHX的活性, 从而形成Na⁺的液泡区域化效应(Zhu 2002)。Rosario等(2005)研究盐水平蕨(*Thellungiella halophila*)在盐条件下生长的生化机制时也发现, 盐胁迫后, 盐水平蕨中V-ATPase水解活性及转运活性均增加, Na⁺主要积累在老叶子, 其次是幼叶和主根, 侧根积累最少, 而在蛋白水平上, SOS调控途径中的SOS1表达增加, 但V-ATPase的A、B亚基没有明显变化, 而E亚基在叶中表达增加, 根中则无变化。Zhao等(2006)在研究耐盐转基因水稻时发现, 转基因的水稻中液泡NHX的表达增加, 根中V-ATPase的水解活性也明显增加, 从而引起了体内Ca²⁺、K⁺、Mg²⁺和可溶性糖的升高, 但降低了活性氧的产生。这些结果表明, NHX基因在转基因植物中的上调可促进V-ATPase活性的增加, 从而引起其他与抗性相关机制的多效性上调, 于是植物的抗性增加。所以可以认为, 在SOS调控途径的信号传递过程中, V-ATPase是能量供应的驱动者, 它的作用是不言而喻的。

2.4 V-ATPase与NO信号转导途径 NO是生物体中活性很强的极性分子, 也是一种活性氮, 对生物细胞有毒害和保护的效应。最近的研究表明, NO在植物体内广泛存在, 主要通过一氧化氮合酶和硝酸还原酶合成, 并与植物的抗病和对各种胁迫的应答, 以及细胞编程性死亡有关。刘开力

等(2004)用不同浓度梯度的NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)浸泡水稻种子后, 盐胁迫下的水稻幼苗地上部分和地下部分生长受抑即有一定程度的缓解, 耐盐力也有所提高。NO是如何缓解盐胁迫抑制植物生长的? V-ATPase在其中是否起作用? Zhang等(2006)报道, 用SNP处理玉米幼苗时, K⁺在根、叶和插入鞘中积累, 叶绿素含量也增加, 但Na⁺的积累和叶细胞中的膜渗透则降低; 而NO的“清道夫”——亚甲基蓝阻碍SNP的效应。这些结果表明, NO可增强玉米幼苗对盐的耐受力。他们进一步分析得知, NaCl可诱导玉米叶中NO短暂的增加, 而NO和NaCl处理则都促进V-ATPase和H⁺-PPase活性增加, 从而导致H⁺转运和Na⁺/H⁺交换的增加。但NaCl诱导的V-ATPase和H⁺-PPase的活性可为磷脂酸(phosphatidic acid, PA)产物的抑制子——丁醇所削弱; 相反, PA则可促进V-ATPase活性的增加。这说明在植物响应NaCl胁迫中, NO作为信号分子, 可增加V-ATPase和H⁺-PPase的活性, 从而为Na⁺/H⁺交换提供主要驱动力。据此可知, V-ATPase对NO在增强植物耐受盐胁迫时的作用, 但其中机制还不十分清楚。

3 结语

尽管有关植物V-ATPase的结构、功能和调节的研究已经取得了很大进展, 在许多植物中也已经克隆到许多V-ATPase的亚基, 但仍有许多问题不清楚而待解决。如: V-ATPase的组装; 亚基同工型在酶的结构、组装、活性中的作用; 在不同的组织发育阶段以及胁迫条件下基因的表达调控等。另外, 迄今为止, 对盐和干旱胁迫下植物体内信号转导还有很多不清楚的地方。现在虽然已经鉴定出一些信号元件的分子特性, 但其中机制并不清楚, 特别是V-ATPase在非生物胁迫的信号传递网络中究竟起着怎样的作用, 还需继续探索。

参考文献

- 刘开力, 凌腾芳, 刘志兵, 花榕, 孙永刚, 沈文飏(2004). 外源NO供体SNP浸种对盐胁迫下水稻幼苗生长的影响. 植物生理学通讯, 40(4): 419~422
- 王宝山, Haschke HP(1991). Na⁺, K⁺和ABA对盐胁迫大麦液泡膜ATPase活性的影响. 植物生理学报, 17(4): 403~406
- 夏朝晖, 陈珈(1998). V-type胁迫反应中液泡膜H⁺-ATPase. 植

- 物生理学通讯, 34: 168~174
- Barkla BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith JAC (1995). Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol*, 109: 549~556
- Chen X, Kanokporn T, Zeng Q, Wilkins TA, Wood AJ (2002). Characterization of V-type H⁺-ATPase in the resurrection plant *Tortula ruralis*: accumulation and polysomal recruitment of proteolipid C subunit in response to salt-stress. *J Exp Bot*, 53 (367): 225~232
- Geisler M, Frangne N, Gomès E, Martinoia E, Palmgren MG (2000). The *ACA4* gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiol*, 124: 1814~1827
- Grüber G, Wiczeorek H, Harvey WR, Müller V (2001). Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J Exp Biol*, 204: 2597~2605
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 13: 1383~1400
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3730~3734
- Ines D, David V, Ulrich L, Rafael R, Bettina B (2002). Three-dimensional map of a plant V-ATPase based on electron microscopy. *J Biol Chem*, 277 (15): 13115~13121
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, Zhu JK (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 12: 1667~1677
- Janicka-Russak M, Klobus G (2006). Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPase in response to NaCl and ABA. *J Plant Physiol*, 141: 97~107
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997). Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J*, 12: 1067~1078
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3735~3740
- Liu J, Zhu JK (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280: 1943~1945
- Luttge U, Ratajczak R (1997). The physiology biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. *Adv Bot Res*, 25: 253~296
- Momi I, Hiromi I, So I, Masasuka Y (2004). Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuolar-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (1): 59~64
- Netting AG (2000). pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *J Exp Bot*, 51 (343): 147~158
- Niikura K, Takano M, Sawada M (2004). A novel inhibitor of vacuolar ATPase, FR167356, which can discriminate between osteoclast vacuolar ATPase and lysosomal vacuolar ATPase. *Brit J Pharmacol*, 142: 558~566
- Peters C, Bayer MJ, Bühler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A (2000). *Trans*-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*, 409: 581~588
- Rosario V, Bronwyn J, Liliana GR (2005). Salt stress in *TheIlugiella halophia* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol*, 139: 1507~1517
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11: 691~706
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6896~6901
- Sze H, Schumacher K, Müller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002). A simple nomenclature a complex proton pump: *VHA* genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci*, 7 (4): 157~161
- Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith AC (1996). Salt regulation of transcript levels for the subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta*, 9 (5): 729~736
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM (2001). G protein regulation channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science*, 292: 2070~2072
- Yamaguchi T, Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (2003). Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (21): 12510~12515
- Zhang Y, Wang L, Liu Y (2006). Nitric oxide enhance salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta*, 224 (3): 545~555
- Zhao F, Wang Z, Zhang Q, Zhao Y, Zhang H (2006). Analysis of the physiological mechanism of salt tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Suaeda salsa*. *Planta*, 119 (2): 95~104
- Zhu JK (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124: 941~948
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247~273