

逆境条件下水孔蛋白PIPs作用的研究进展

孙天旭, 李玉花, 张旻*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 质膜内在蛋白(PIPs)能促进水分及不带电分子的跨膜转运。当植物处于干旱、盐碱、低温和低氧等胁迫条件下, 由于脱水等原因造成植物体内水分平衡被打破, PIPs在维持植物体内水平衡以及促进水分运输过程中起重要作用。本文综述最新关于PIPs在各种逆境条件下作用的研究进展, 以期对PIPs研究提供参考。

关键词: 水孔蛋白; 干旱; 低温; 盐碱; 水分运输

Advance in a Role of PIP Aquaporins under Adversity Condition

SUN Tian-Xu, LI Yu-Hua, ZHANG Yang*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) can facilitate the transmembrane transportation of water and neutral molecule. When the plant suffers from the drought, salt and/or low temperature stress, the water balance is usually broken by the dehydration. PIPs play an important role in maintaining water balance and facilitating water transport. This paper reviews the latest progress on PIPs under various stress conditions and the provision of references for PIPs study is expected.

Key words: aquaporin; drought; low temperature; salt; water transport

植物在整个生命周期中, 经常受到各种环境因子的影响。环境压力所导致的光合作用减少、氧化损伤、激素变化及胁迫相关蛋白积累, 通常会导致植物组织脱水。主要内在蛋白(major intrinsic proteins, MIPs)是存在于各类生物体中的一类进化保守的蛋白质, 能够促进水和甘油等极性分子的跨膜运输。质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)是MIPs亚家族的一员, 介导水分和中性分子的双向跨膜转运。在盐碱、干旱等胁迫条件下, PIPs在促进植物水分运输和维持细胞水分平衡方面发挥重要作用。

1 PIPs概述

1.1 PIPs的发现

1992年, Preston等(1992)在爪蟾卵母细胞中发现CHIP28基因并分析其结构, 证明在哺乳动物的肾脏细胞以及红细胞中除扩散吸水外, 细胞对水仍具有渗透性。CHIP28属于MIP超家族蛋白, MIP拥有6个跨膜螺旋, 除了具有水通道活性, CHIP28和MIP也能构成具有选择性透过离子和不带电小分子的通道。Maurel等(1993)发现 γ -TIP对于水的特异性传导。 γ -TIP是位于液泡膜上的水通道蛋白, 通过 γ -TIP和细胞增大区域相关基因的表达, 发

现 γ -TIP对于水的通透性与细胞生长有关。Kammerloher等(1994)通过利用哺乳动物表达系统和免疫选择, 在非洲绿猴肾细胞(African-green-monkey kidney cell, COS)内发现5种相关联蛋白质。这些蛋白质分子量为30.4~30.7 kDa, 并且属于MIP家族。由于这些蛋白质位于质膜上, 第一次将这类蛋白命名为质膜内在蛋白。

1992年, 人们在大量研究水运输功能的实验中发现了PIP基因。此外, 有研究表明, PIPs除了具有运输水的功能, 还具有运输一些小分子的能力, 包括甘油、硼酸、尿素和CO₂。随着研究的不断深入, 越来越多PIPs的功能被发现。近期研究发现, PIPs除了其运输功能外, 也与植物生长相关联。

1.2 PIPs的结构及分类

1.2.1 PIPs的结构 MIPs是一个大且进化保守的家族, 能够促进水和甘油等极性分子的跨膜运输。MIPs家族中特异性运输水的蛋白称为水孔蛋白

收稿 2014-03-04 修定 2014-05-22

资助 “十二五”农村领域国家科技计划课题(2013AA102706)和哈尔滨市应用技术研究与开发项目(2013RFQXJ036)。

* 通讯作者(E-mail: summerzhang@126.com; Tel: 0451-82191783)。

(aquaporin, AQP)。水孔蛋白根据其序列相似性, 可将其分为5个亚型: PIPs (质膜内在蛋白)、TIPs (液泡膜内在蛋白)、NIPs (类NOD-26内在蛋白)、SIPs (小的基本内在蛋白)、XIPs (X内在蛋白) (Park等2010; Danielson等2008; Chaumont等2001; Johanson等2001)。在这5种水孔蛋白亚家族中, 根据其细胞定位, 最先定义的是PIPs和TIPs。由于PIPs位于质膜上, 因此定义为质膜内在蛋白; TIPs位于液泡膜上, 所以定义为液泡膜内在蛋白。目前已发现的水孔蛋白中多数为PIPs。例如, 根据序列同源性, 番茄(*Solanum lycopersicum*)中37种水孔蛋白可被划分为18种PIPs、9种TIPs、6种NIPs、3种SIPs和1种XIPs (Zhang等2013)。PIPs分子量约为30 kDa, 等电点为9.0。对水孔蛋白的石英晶体和氨基酸序列分析发现, PIPs具有6个跨膜 α -螺旋(TM1~TM6)和5个相连接的环(A~E环), 它的N-末端和C-末端均位于细胞质侧的质膜上。位于第2和第3个跨膜结构域之间的细胞质基质环(B环)和位于第5和第6个跨膜结构域之间的细胞质基质环(E环)构成疏水性短螺旋, 从相对的方向插入细胞质中(图1) (Chaumont等2001)。B环和E环都包含MIP家族高度保守的NPA (Asn-Pro-Ala)结构域, 2个Asn构成一个最窄点为3 Å的水通道, 这种结构是运输水和甘油的基础(Beitz等2004; Thomas等2002; Sui等2001; Fu等2000)。

1.2.2 PIPs的分类 在高等植物中, PIPs分为两类: PIP1和PIP2。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和玉米(*Zea mays*)中均发现13种亚型。根据Johanson等(2001)命名法, PIP1家族包括5个成员, 为PIP1;1~PIP1;5, PIP2家族包括8个成员, 被命名为PIP2;1~PIP2;8。Li等(2013)通过对棉花(*Gossypium hirsutum*) PIPs多重序列及结构对比发现, PIP1s和PIP2s均具有6个跨膜 α -螺旋, 以及5个相互作用的环, 并且都具有MIPs家族保守基序NPA。二者不同的是, 与PIP2s相比, PIP1s具有更长的N-末端和更短的C-末端。由于PIP2的C-末端具有更多的磷酸化位点, 因此比PIP1更易发生磷酸化作用。此外, PIP1和PIP2在氨基酸序列上也存在差异。PIP1和PIP2在其保守的6个跨膜 α -螺旋氨基酸残基及NPA基序上具有特异的氨基酸改变。这种不同也导致PIP1和PIP2在功能上的差异。Johansson等(1998)通过爪蟾卵母细胞表达系统发现PIP2表现出较强的水通道活性, 但PIP1却表现出较低的水通道活性。

1.3 PIPs的功能

实验表明PIPs在多个物种中具有运输水的功能。PIPs不仅能够运输水, 还能够运输其他小分子物质, 包括甘油、尿素、CO₂。此外, 还有研究表明PIPs与植物氧化应激反应、损伤修复也存在关联。除了运输功能外, 最近研究还揭示PIPs在促进

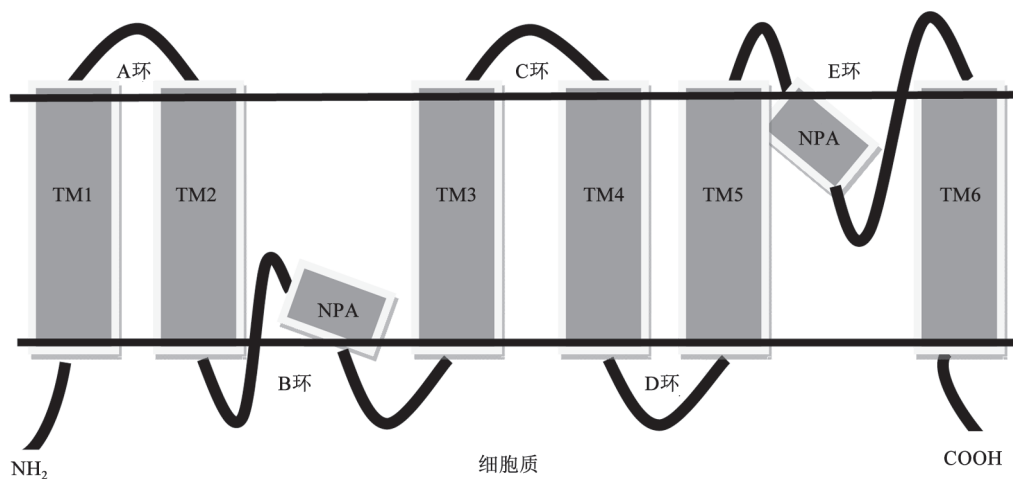


图1 水孔蛋白的结构模型

Fig.1 Model of the structure of an AQP

引自Chaumont等(2001)文献。矩形代表 α -螺旋(TM1~TM6), 被5个环(A~E)所连接。2个螺旋域分别有一半从相对的方向插入细胞质中, 构成了水孔蛋白的核心。B环和E环具有高度保守的NPA残基。

植物细胞生长方面的相关作用。

所有的PIPs均具有保守的丝氨酸(serine, Ser)残基,它是蛋白质磷酸化作用位点。植物PIPs发挥功能依赖磷酸化作用。Horie等(2011)用浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl对大麦(*Hordeum vulgare*)进行预处理,用激酶抑制剂处理大麦4 h后,发现其水渗透性明显下降;在不加入NaCl时,分用0、0.1、1.0、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激酶抑制剂处理大麦发现, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抑制剂处理的大麦,其根部水渗透率明显下降。由此发现,大麦PIPs在发挥水通道作用时需要磷酸化作用的存在。PIPs包括PIP1和PIP2两个亚型,由于其氨基酸序列的特异性导致其结构存在差异,因此在植物体内也表现出不同功能。从菠菜(*Spinacia oleracea*)中得到的SoPIP1在爪蟾卵母细胞中表现出较低的水运输活力,但PIP2的同源蛋白质却表现出很强的质膜渗透性(Törnroth等2006)。这种结果几乎在所有植物的水孔蛋白中得到证实,在拟南芥中也不例外。拟南芥PIP1亚型表现出很低的水渗透性,然而与PIP2相关的蛋白却是高效的水通道蛋白。最近研究发现,在卵母细胞中玉米ZmPIP1;2与ZmPIP2s相互作用后会表现出相应的水通道功能。当ZmPIP1;2与功能性水通道蛋白ZmPIP2s在爪蟾卵母细胞中协同表达会增强膜对水的通透性(Chaumont等2005; Fetter等2004)。在玉米中,通过融合荧光蛋白实验证明了PIP1s和PIP2s的位置与相互作用的特点。当单独表达时,PIP1s融合蛋白停留在内质网上,PIP2s则在质膜上;当PIP1s与PIP2s协同表达时,PIP1s重新定位于质膜上,重新定位是由于蛋白质相互作用导致的。实验数据表明,ZmPIP1s和ZmPIP2s的异源低聚物是将PIP1s运载到质膜上并调节细胞渗透性所必需的。此外,PIP1家族成员可以运输其他分子,包括甘油、硼酸、尿素、 CO_2 (Gomes等2009)。例如,烟草中PIP1家族成员NtAQP1,不仅能介导甘油运输,也能促进 CO_2 扩散。在比较NtAQP1与AQP1调节气体运输能力的实验中发现,在红细胞和植物叶片细胞中二者均在质膜上表达,而且具有很高的 CO_2 运输能力(Uehlein等2003; Biela等1999)。研究表明PIP1s对薄壁组织细胞中 CO_2 传导和光合作用调节机制的进化起到一定作用。通过反义抑制和过表达AQP1能够影响 CO_2 的

传导、光合作用和植物生长(Gomes等2009; Uehlein等2008; Flexas等2006)。AtPIP2;1能够运输 H_2O_2 , H_2O_2 作为一种活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),不仅与氧化应激反应也与植物受伤反应或病原体攻击相关(Dynowski等2008)。此外,Li等(2013)还发现PIP2s的过表达能够促进棉花纤维细胞的伸长。

2 PIPs与逆境胁迫

2.1 PIPs与干旱胁迫

当植物受到干旱胁迫,植物蒸腾作用和根部吸水开始减弱(Bréda等1995)。在干旱起始阶段,根部吸水能力制约着植物体吸水过程。根部吸水能力的下降可以防止根部水分向土壤流失。然而在不同的土壤层其干旱程度也不相同。浅层土壤的干旱程度明显高于深层土壤,因此植物土壤深层根部组织比浅层组织对干旱的耐受性更强(Alsinna等2011)。一些植物能够从深层湿润土壤向浅层干燥土壤的根部运输水分,这种机制被称作液压电梯,这对于耐受干旱是至关重要的。

虽然在干旱条件下根部吸水能力会下降,但在某些特殊的干旱环境下,根部吸水能力反而会上升。Singh和Sale(2000)发现白三叶草(*Trifolium repens*)植物在干旱处理后供给磷会提升根部吸水能力。同样,Siemens和Zwiazek(2004)发现美洲山杨树(*Populus tremuloides*)在中等干旱条件下(暴露在高湿度容器内17 h),表现出吸水能力的上调。这种上调是干旱条件下土壤含水量仍高于根部含水量时的吸水机制。尽管如此,干旱条件下调节根部吸水能力的水力学或化学信号仍处于未知阶段。

许多研究表明,水孔蛋白PIPs可以部分调节吸水能力。但是,根据先前研究发现,根部PIP的表达与PIP蛋白丰度对干旱胁迫会产生不同应答。对9种有代表性物种中的PIP基因在干旱条件下根部组织中表达进行研究分析见表1(Aroca等2012)。在研究的37个PIP基因中,15个为下调表达,13个为上调表达,9个没有变化(Ruiz-Lozano等2009; Aroca等2007)。表达分析结果表明,PIPs丰度变化在干旱条件下对吸水能力的调节作用并不明显。有研究表明PIP基因在特定环境下具有特定功能。Jang等(2007)发现,在干旱条件下,拟南芥中PIP1;4和PIP2;5的过表达会导致水的快速流失,从

表1 干旱胁迫对在不同实验设置及不同物种中PIP基因表达、蛋白丰度和导水率的影响

Table 1 Summary of drought stress effects on PIP gene expression, protein abundance, and hydraulic conductivity in different experimental set-ups and plant species

物种	处理方法	PIP转录	蛋白调控	导水率/ $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$	参考文献
拟南芥	250 mmol·L ⁻¹ 甘露醇处理 2~24 h	<i>AtPIP1</i> ;3, 1;2, 2;1, 2;5上调表达; <i>AtPIP1</i> ;1, 1;2, 1;5, 2;2, 2;3, 2;4, 2;6, 2;7, 2;8下调	—	—	Jang等2004
莴苣	75%土地含水量处理7 d	<i>LsPIP2</i> 下调	—	下降	Aroca等2008
冬葡萄× 沙地葡萄	对照组气孔导度的55%~ 18%处理7 d	<i>VvPIP1</i> ;1, 1;2, 2;1不变	—	—	Galmés等2007
烟草	PEG6000处理24 h	<i>NtPIP1</i> ;1, 2;1下调; <i>NtAQPI</i> (<i>PIP1</i>)上调	—	下降	Mahdieh等2008
菜豆	干旱处理4 d	<i>PvPIP1</i> ;1不变; <i>PvPIP1</i> ;3, 2;1 上调; <i>PvPIP1</i> ;2下调	PIP1s上调; PIP2s下调	下降	Aroca等2007
葡萄	干旱处理8~10 d	<i>VvPIP2</i> ;2不变; <i>VvPIP1</i> ;1上调	—	整个根部下降, 细胞水平上升	Vandeleur等2009
水稻	20%PEG处理10 h	<i>OsPIP1</i> ;3上调	上调	—	Lian等2004
玉米	干旱处理4 d	<i>ZmPIP1</i> ;1上调; <i>ZmPIP2</i> ;5, 2;6下 调; <i>ZmPIP1</i> ;2, 1;5, 2;1, 2;2不变	<i>ZmPIP1</i> ;2不变; <i>ZmPIP2</i> ;1, 2;5下调	不变	Ruiz-Lozano等 2009
陆地棉	不同浓度PEG处理	<i>GhPIP1</i> ;1, 2;1上调; <i>GhPIP2</i> ;2不变	—	—	Li等2009

参考Aroca等(2012)文献并作修改。

而延缓种子萌发,阻碍幼苗生长。在寒冷条件下,拟南芥*PIP1*;4和*PIP2*;5过表达会促进植物种子的萌发。Aharon等(2003)发现,转基因烟草中,外源*PIP*基因过表达会提高烟草在正常环境中的生长活力,但并不改变在干旱和盐胁迫下的生长活力。

有研究发现干旱条件会影响根部组织中不同PIP的表达。通常在干旱条件下,PIP2丰度会降低,同时PIP1蛋白发生积累(Jang等2007)。但是PIP蛋白丰度与吸水能力之间没有明显联系。Zhang等(2007)发现将麻疯树(*Jatropha curcas*)暴露在由聚乙二醇模拟的渗透胁迫条件下,在其根部质膜上有PIP2蛋白的积累,但是其根部吸水能力却下降。这种矛盾可能是由于PIP蛋白在质膜上亚细胞定位不同(质膜内陷)或者不同PIP蛋白沿着根轴的定位不同所引起的。

2.2 PIP与低温胁迫

土壤低温是限制植物生长和作物产量的重要因素。对寒冷土壤敏感的植物,在温度降低的几分钟内就会发生水摄取量减少。土壤低温通常会伴随着较高的地表温度,因此植物有较高的蒸腾作用需求,给生长带来困难。这种现象揭示了抗旱与抗寒之间的关系。低温条件下水流动减少是

由于水粘性的增加以及跨膜间水运输受抑制所导致的(Wan等2001)。与低温敏感的小黄瓜相比,抗旱作物黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia*)在低温条件下根部细胞渗透系数不发生变化,表明植物维持跨膜水分运输的能力对于抗寒是至关重要的(Lee等2009, 2008)。植物跨膜间水分运输是由水孔蛋白所调节,它是水分及其他中性小分子的通道。

Lee等(2012)研究发现,拟南芥中*PIP2*;5过表达植株的茎叶和根部生长与野生型植物相比对低温有更强的耐受性。在适宜环境下,PIP1;4和PIP2;5等关键水孔蛋白的表达对植物作用很小;但在低温条件下,对植物抗寒却起到重要作用。在10℃时,PIP2;5过表达的拟南芥茎叶和根部具有较高的生长率,这表明PIP的表达量与低温限制拟南芥生长有关。由于低温造成的根部细胞渗透系数下降可由Ca(NO₃)₂和磷酸酶抑制剂缓解,这表明低温对水运输调控可能与依赖钙离子的PIP蛋白磷酸化/去磷酸化作用相关。这些结果显示植物应答低温胁迫与水孔蛋白介导的水分运输相关,对低温敏感植物的根部摄水与PIP蛋白磷酸化/去磷酸化紧密相联。

研究发现,延长一些抗寒植物在低温下的处

理时间, 其根部渗透系数会恢复到正常生长水平。Aroca等(2001)根据 $HgCl_2$ 实验发现这种细胞渗透系数的恢复是由于水孔蛋白活性的增加所导致的。Matsumoto等(2009)通过化学方法处理水稻(*Oryza sativa*)使其失去抗寒能力, 发现PIP1与植物抗寒能力紧密相关。在4 °C低温处理条件下, *Os-PIP1;3*过表达能够提升水稻的抗寒能力。研究者还发现虽然PIP1;3的水渗透性低于*OsPIP2;2*和*OsPIP2;4*, 但PIP1;3与二者相互作用后会明显提升*OsPIP2;2*或*OsPIP2;4*的水渗透性。因此, 水稻中PIP1与PIP2相互作用会显著提升植物的抗寒能力。水孔蛋白磷酸化作用通过维持其水孔通道的开放状态来增加水孔蛋白活性。当PIPs大量积累时, 处于低温条件生长的植株在高温条件下测定其细胞渗透系数, 发现其数值高于一直在较高温度下生长的植株。Matsumoto等(2009)发现*PIP1*过表达水稻植株比野生型对寒冷有更强的耐受性。因此, PIP对于植物抗寒至关重要。

PIP对于植物抗寒是必不可少的, 它对于维持低温条件下植物吸水 and 避免植物叶片脱水尤其重要。另外, PIP在维持质膜完整性和饱和脂肪酸含量等方面也发挥作用。

2.3 PIPs与盐胁迫

土壤盐分是限制作物产量的主要因素。这一点在干旱和半干旱地区表现得十分明显。由于在这些地区中, 用于种植的土地所含的水和其灌溉用水均含有大量盐分。通常盐胁迫会限制植物的正常生长, 由于渗透压力和毒性效应导致根系吸水下降是造成植物生长受限的主要因素。

Horie等(2011)分别用100、200、300、400 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl处理大麦, 观察大麦根部以及茎叶的生长, 在0、2、4、8、12、24 h检测PIP表达量, 发现在加入100 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl时生长不受抑制, 10种大麦*HvPIP*基因表达与对照组相比较也没有明显差异; 当NaCl大于200 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 大麦生长受到明显抑制, 同时, *HvPIP1;2*、*HvPIP1;3*、*HvPIP1;4*、*HvPIP2;1*、*HvPIP2;2*和*HvPIP2;3*在200 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl处理4 h后, 其表达量明显下降。由此可见, 在盐胁迫条件下, 这6种PIP表达量的下降使得大麦无法维持正常生长。有研究发现, 当拟南芥在NaCl浓度为60 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 在开始阶

段, 其细胞渗透系数出现明显下降; 当持续时间达到3 d后, 其细胞渗透系数会部分恢复。在盐胁迫条件下, 质外体途径受到抑制, 因此这种恢复是由于细胞到细胞水运输途径的增强所造成的。长时间盐处理会导致根部细胞PIP蛋白大量积累, 从而促进细胞到细胞的水运输途径(Muries等2011; Marulanda等2010)。López-Pérez等(2009)发现, 将西兰花(*Brassica oleracea*)根部用80 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl处理5 d后, 根部质膜的不饱和脂肪酸含量有所增加, 质膜流动性增强, 这对于PIP功能发挥起到促进作用。在植物响应盐胁迫条件的最初阶段, 根部细胞渗透系数下降可能是由于盐胁迫造成的渗透震荡或离子效应使PIP蛋白活性下降所导致的; 当胁迫持续几天后, 根部渗透系数恢复, 这是由于渗透调节和PIP蛋白活性的增强(图2)(Aroca等2012)。Liu等(2013)研究发现, *OsPIP1;1*过表达会增强水稻对盐胁迫的耐受性。通过免疫电镜技术发现, *OsPIP1;1*位于质膜和内质网上。Luu等(2012)发现细胞内存在着质膜与内质网之间本底水平PIPs循环, 当植物处于盐胁迫条件下会促进PIPs向质膜循环。盐胁迫是否会改变*OsPIP*亚细胞定位还有待进一步研究。

3 PIPs的合成及运输

PIPs在细胞内合成、运输、循环对于植物抵抗胁迫十分重要。PIPs一般在内质网中合成, 运输至质膜上发挥其生物学功能。在紫罗兰(*Matthiola incana*)中, PIPs在粗面内质网中合成后, PIP2与PIP1形成异源/同源低聚物。PIP2s在其N-末端存在一个由COPII外壳蛋白复合体的亚单位Sec24组成的一个二元基序(DxE)复合物。PIPs低聚物通过高尔基体和高尔基体运输网(TGN)运输, 进入分泌囊泡(SVs)中, 最后运输至质膜(PM)上。PIPs通过融合蛋白SYR121的介导嵌合到质膜上。PIPs在质膜上位置是不同的, 通过脂筏能够进入和离开质膜。PIPs在质膜上内在化定位是由环境压力或信号分子所引起的, 如盐、水杨酸、 H_2O_2 , 或者是由PIPs基本循环所导致。细胞共同存在内网格蛋白和脂筏所介导的内吞作用, 但其控制PIPs的内在化是由细胞环境所决定的。PIPs的基本循环通过以下程序完成: (1) PIPs的C-末端出现Yxxφ基序形成网格蛋白覆盖的囊泡; (2)脂筏介导的内吞作用。

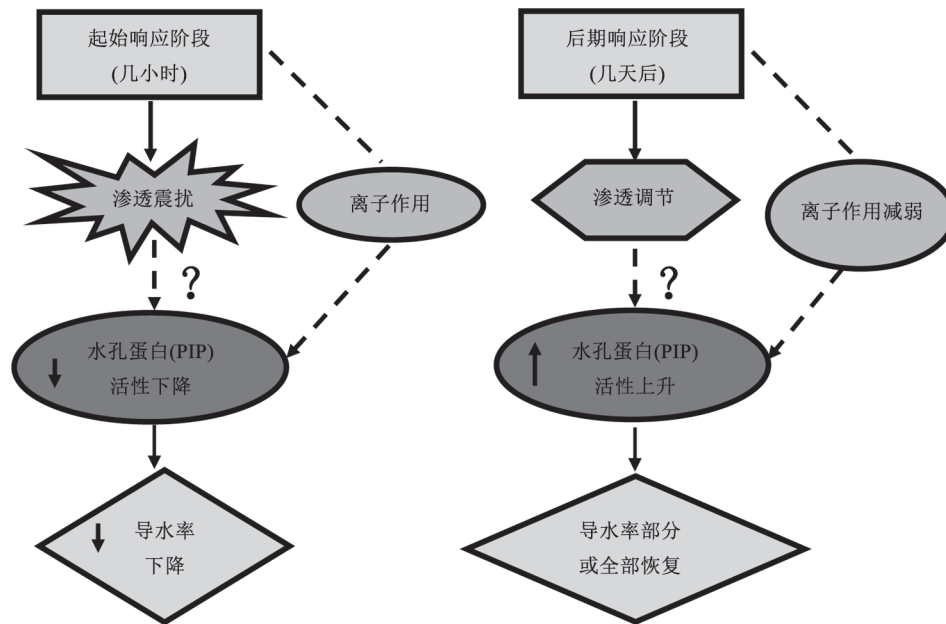


图2 根部细胞导水率对盐胁迫的应答

Fig.2 Diagram representing root hydraulic conductivity responses to salt
引自Aroca等(2012)文献。

由于披网格蛋白小泡(CCVs)在TGN中的萌发不被蛋白覆盖,使得CCVs在再循环内体中成熟,从而导致PIPs一旦进入囊泡中后,在其重新运输回质膜前被传递至TGN中,PIPs离开TGN后再运输至多泡小体(MVB)或者降解前会被运输至成熟的TGN中,其成熟标志是具有分选连接蛋白(sorting nexin 1, SNX1)标签。盐胁迫会导致PIPs去磷酸化和内在化。干旱胁迫会诱导泛素酶E3表达, E3泛素酶会在PIPs上加上泛素组群U,随后通过泛素途径被降解(Hachez等2013)。

大量研究证明,水孔蛋白在植物响应环境胁迫过程中表现出主要作用。PIPs在质膜上运输和丰度的调节是植物快速适应环境改变的重要途径。盐胁迫会导致细胞渗透系数下降,在细胞水平表现为质壁分离和内在化,这种内在化是细胞内吞作用增强引起的(Geldner等2003)。盐胁迫对拟南芥PIPs的作用是由作用强度和持续时间所决定的,主要会导致细胞内PIPs的重定位和质膜上PIPs循环率的改变(Boursiac等2008; Martinière等2012)。用 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理拟南芥45 min和2 h后出现包含AtPIP2;1的细胞内部结构(Boursiac等2005)。当用 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理45 min后,在细胞内的囊泡结构中发现大量AtPIP2;1积累(Bour-

siac等2008)。Boursiac等人的实验证明,当盐胁迫强度较大且时间较长时会引起PIP蛋白大量积累。由于PIP蛋白积累,植物能快速适应环境改变,并且对环境胁迫做出响应。对拟南芥根部细胞在正常环境和盐胁迫下PIP蛋白循环过程进行研究发现,在盐胁迫下AtPIP2;1的循环速率显著增加(Martinière等2012; Boursiac等2005; Luu等2012)。由以上研究结果可见,短时间、低强度盐胁迫并不会大量积累PIP蛋白,而是加快细胞内PIP蛋白循环,使其定位于质膜上发挥功能;长时间、高强度的盐胁迫不仅会加快PIP蛋白循环速率,同样会加快合成PIP蛋白,从而应对盐胁迫环境对植物产生的刺激,使植物快速适应胁迫环境。无论在盐胁迫条件还是施加水杨酸均会导致细胞内 H_2O_2 的积累,表明 H_2O_2 诱导PIPs的细胞内重定位,它是调节质膜渗透性从而应答环境胁迫的一种重要的信号分子(Martinière等2012)。

PIPs的运输调节是制约PIP蛋白能否运输至质膜并发挥其功能的关键因素。翻译后的修饰对于PIP蛋白发挥其作用显得尤为关键。通常水孔蛋白在质膜上以四聚体形式存在。有研究发现,PIP1和PIP2的相互作用使得PIP1s从内质网重新定位于质膜上,从而调节细胞质膜的水渗透性(Fetter等

2004)。另外, 通过SDS-PAGE实验发现, PIPs通常形成二聚体。这是由于PIPs的细胞外的A环上存在着一个保守的半胱氨酸残基。突变分析发现这个残基在形成连接两个单体的二硫键桥过程中起作用(Gerd等2012)。但是该半胱氨酸残基的突变并未抑制ZmPIP单体间的相互作用, 突变的ZmPIP2s与野生型相比较, 其二聚体更不稳定, 表明二硫键并不是PIPs间相互作用所必需的, 而是维持质膜上低聚物稳定性所必需(Gerd等2012)。最近研究表明, PIP四聚体可以由1~4个独特的亚型所构成, 说明四聚体包括同源/异源二聚体。不同PIPs包含的四聚物可能会调节其活性或者其通道的特异性。例如, 在酵母中一元表达发现, 四聚体的构成会影响烟草NtPIP2;1的运输活性以及NtAQP1的CO₂通道的特异性(Hachez等2013)。

此外, 磷酸化作用也会对PIPs的运输产生影响。在盐胁迫条件下, 拟南芥中AtPIP2;1的C-末端Ser283的磷酸化会调节其向质膜运输和内在化。在哺乳动物中, 水孔蛋白的磷酸化作用在调节其由囊泡向质膜运输起到主要作用。

4 展望

随着水孔蛋白研究的深入及技术的发展, PIPs在环境胁迫下的功能也越来越明确, 显示出PIPs在胁迫条件下介导水分运输的重要性。但对于PIPs仍存在诸多尚待研究的问题。例如, PIPs的磷酸化会影响其向质膜运输以及形成, 但是控制PIPs磷酸化关键位点和发生磷酸化位点的数量仍不明确, 通过定量蛋白质组学分析能够发现环境改变时控制PIPs运输的关键残基(Prak等2008); 控制PIPs磷酸化作用和转录前的调控机制, 如二硫键的形成、泛素化的关键因子仍处于未知阶段, 对于胁迫环境下PIPs在质膜上的膜受体和调节机制尚待研究; 虽然在拟南芥、玉米、水稻等植物中对PIPs的研究较为透彻, 但不同物种在系统发育过程中必然存在差异, 因此也必然存在物种特异性的PIPs调节机制, 对于介导PIPs调节机制的关键因子研究是至关重要的(Besserer等2012); 现阶段研究发现在拟南芥、玉米、水稻中存在着与PIPs相互作用的蛋白网, 但它们之间的特异性相互作用有待进一步研究。此外, 为了进一步研究PIPs在环境胁迫条件下所表现出的功能, PIPs表达下调的突变体在未来研究中须

应用更加广泛。我们要明确不同PIPs在什么组织细胞内表达, 从而构建PIPs表达特异的突变体, 这将有助于对PIPs进行更透彻的研究。

参考文献

- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell*, 15 (2): 439~447
- Alsina MM, Smart DR, Bauerle T, Herralde F, Biel C, Stockert C, Negron C, Save R (2011). Seasonal changes of whole root system conductance by a drought-tolerant grape root system. *J Exp Bot*, 62: 99~109
- Aroca R, del Mar Alguacil M, Vernieri P, Ruiz-Lozano JM (2008). Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (*sitiens*). *Microb Ecol*, 56: 704~719
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007). How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity conditions? *New Phytol*, 173: 808~816
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot*, 63 (1): 43~57
- Aroca R, Tognoni F, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Pardossi A (2001). Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant Physiol Biochem*, 39 (12): 1067~1073
- Beitz E, Pavlovic-Djuranovic S, Yasui M, Agre P, Schultz JE (2004). Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 1153~1158
- Besserer A, Burnotte E, Bienert GP, Chevalier AS, Errachid A, Grefen C, Blatt MR, Chaumont F (2012). Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell*, 24 (8): 3463~3481
- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J*, 18 (5): 565~570
- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu DT, Tournaire-Roux C, Maurel C (2008). Stimulus-induced down regulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J*, 56 (2): 207~218
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol*, 139 (2): 790~805
- Bréda N, Granier A, Barataud F, Moyne C (1995). Soil water dynamics in an oak stand. *Plant Soil*, 172 (1): 17~27
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein fami-

- ly in maize. *Plant Physiol*, 125 (3): 1206~1215
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell*, 97 (10): 749~764
- Danielson JÅH, Johanson U (2008). Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol*, 8 (1): 45
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, Ludewig U (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem J*, 414: 53~61
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, 16 (1): 215~228
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R (2006). Tobacco aquaporin NtAQPI is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *Plant J*, 48 (3): 427~439
- Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, 290 (5491): 481~486
- Galmés J, Pou A, Alsina MM, Tomàs M, Medrano H, Flexas J (2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 226 (3): 671~681
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112 (2): 219~230
- Gerd PB, Damien C, Arnaud B, Marie CB, Dimitri G, Marianne R, Francois C (2012). A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem J*, 445 (1): 101~111
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta*, 1788 (6): 1213~1228
- Hachez C, Besserer A, Chevalier AS, Chaumont F (2013). Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Plant Sci*, 18 (6): 344~352
- Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, Sasano S, Panda SK, Shibusaka M, Katsuhara M (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiol*, 52 (4): 663~675
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 54 (5): 713~725
- Jang JY, Lee SH, Rhee JY, Chung GC, Ahn SJ, Kang H (2007). Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol*, 64 (6): 621~632
- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 10 (3): 451~459
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Alfons RW, Kjellbom P (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, 126 (4): 1358~1369
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schiiffner AR (1994). Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J*, 6 (2): 187~199
- Lee SH, Chung GC, Jang JY, Ahn SJ, Zwiazek JJ (2012). Overexpression of PIP2;5 aquaporin alleviates effects of low root temperature on cell hydraulic conductivity and growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 159 (1): 479~488
- Lee SH, Chung GC, Zwiazek JJ (2009). Effects of irradiance on cell water relations in leaf bundle sheath cells of wild-type and transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants overexpressing aquaporins. *Plant Sci*, 176 (2): 248~255
- Lee SH, Zwiazek JJ, Chung GC (2008). Light-induced transpiration alters cell water relations in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) seedlings exposed to low root temperatures. *Physiol Plantarum*, 133 (2): 354~362
- Li DD, Ruan XM, Zhang J, Wu YJ, Wang XL, Li XB (2013). Cotton plasma membrane intrinsic protein 2s (PIP2s) selectively interact to regulate their water channel activities and are required for fibre development. *New Phytol*, 199 (3): 695~707
- Li DD, Wu YJ, Ruan XM, Li B, Zhu L, Wang H, Li XB (2009). Expressions of three cotton genes encoding the PIP proteins are regulated in root development and in response to stresses. *Plant Cell Rep*, 28 (2): 291~300
- Lian HL, Yu X, Ye Q, Ding XS, Kitagawa Y, Kwak SS, Su WA, Tang ZC (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol*, 45 (4): 481~489
- Liu CW, Fukumoto T, Matsumoto T, Gena P, Frascaria D, Kaneko T, Katsuhara M, Zhong SH, Sun XL, Zhu YM et al (2013). Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination. *Plant Physiol Biochem*, 63: 151~158
- López-Pérez L, Martínez-Ballesta MDC, Maurel C, Carvajal M (2009). Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry*, 70 (4): 492~500
- Luu DT, Martiniere A, Sorieul M, Runions J, Maurel C (2012). Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in *Arabidopsis* roots under salt stress. *Plant J*, 69 (5): 894~905
- Mahdieh M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M (2008). Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol*, 49 (5): 801~813
- Martinière A, Li X, Runions J, Lin J, Maurel C, Luu DT (2012). Salt stress triggers enhanced cycling of *Arabidopsis* root plasma-membrane aquaporins. *Plant Signal Behav*, 7 (4): 529~532
- Marulanda A, Azcón R, Chaumont F, Ruiz-Lozano JM, Aroca R

- (2010). Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta*, 232 (2): 533~543
- Matsumoto T, Lian HL, Su WA, Tanaka D, Liu WC, Iwasaki I, Kitagawa Y (2009). Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiol*, 50 (2): 216~229
- Maural C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993). The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 12 (6): 2241~2247
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407 (6804): 599~605
- Muries B, Faize M, Carvajal M, del Carmen Martínez-Ballesta M (2011). Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. *Mol Biosyst*, 7 (4): 1322~1335
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, Campbell BT (2010). Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol*, 10 (1): 142
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V (2008). Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics*, 7 (6): 1019~1030
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256 (5055): 385~387
- Ruiz-Lozano JM, del Mar Alguacil M, Bárzana G, Vernieri P, Aroca R (2009). Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. *Plant Mol Biol*, 70 (5): 565~579
- Siemens J, Zwiazek JJ (2004). Changes in root water flow properties of solution culture-grown trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under different intensities of water-deficit stress. *Physiol Plantarum*, 121 (1): 44~49
- Singh DK, Sale PW (2000). Growth and potential conductivity of white clover roots in dry soil with increasing phosphorus supply and defoliation frequency. *Agron J*, 92 (5): 868~874
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414 (6866): 872~878
- Thomas D, Bron P, Ranchy G, Duchesne L, Cavalier A, Rolland JP, Raguénès-Nicol C, Hubert JF, Haase W, Delamarque C (2002). Aqauglyceroporins, one channel for two molecules. *Biochim Biophys Acta*, 1555 (1): 181~186
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439 (7077): 688~694
- Uehlein N, Lovisol C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, 425 (6959): 734~737
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R (2008). Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell*, 20 (3): 648~657
- Vandeleur RK, Mayo G, Shelden MC, Gilliam M, Kaiser BN, Tyerman SD (2009). The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol*, 149 (1): 445~460
- Wan X, Zwiazek JJ, Lieffers VJ, Landhäusser SM (2001). Hydraulic conductance in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings exposed to low root temperatures. *Tree Physiol*, 21 (10): 691~696
- Zhang DY, Ali Z, Wang CB, Xu L, Yi JX, Xu ZL, Liu XQ, He XL, Huang YH, Khan IA et al (2013). Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS One*, 8 (2): e56312
- Zhang Y, Wang YX, Jiang LD, Xu Y, Wang YC, Lu DH, Chen F (2007). Aquaporin JcPIP2 is involved in drought responses in *Jatropha curcas*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 39 (10): 787~794