

植物的水通道蛋白*

张军锋^{1,2} 邓西平² 慕小倩¹(¹西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; ²中国科学院、水利部西北水土保持研究所, 陕西杨凌 712100)

Plant Aquaporin

ZHANG Jun Feng^{1,2}, DENG Xi Ping², MU Xiao Qian¹(¹College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100; ²Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Science and Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100)

提要 对近3年来植物水通道蛋白的特性、特异性表达、水分运输机制、表达调控、在植物水分关系平衡中的作用以及这一领域研究中的有关问题作了介绍与评述。

关键词 水通道蛋白 特异性表达 渗透水透性 表达调控

1 水通道蛋白的结构特点

根据水通道蛋白(AQP)的亚细胞定位, 结合序列同源性, 所有植物的AQP均分为质膜上的 plasma membrane intrinsic proteins(PIPs)、液泡膜上的 tonoplast intrinsic proteins(TIPs)及 nodular-like MIP(NLM)3大类。最近Chaumont等^[1]比较31个玉米AQP氨基酸序列的结果表明, 玉米中还存在一类新的碱性的小分子质量内在蛋白(small and basic intrinsic proteins)。它们的一些蛋白结构域相同, 且均含有组成可稳定水孔的B环和E环所需的保守氨基酸残基。氨基酸序列的同源性在16%~100%之间, 一级结构变异主要体现在碱性的小分子质量内在蛋白上, 甚至其第一个 Asn-Pro-Ala(NPA) motif 变为 Ala-Pro-Thr(APT)或 Ala-Pro-Ser(APS)。

大多数AQP均有一个对汞敏感的残基 Cys-189, 其邻近的NPA motif 结合汞后水孔受阻塞, 但拟南芥 Δ 72P 及 γ -TIP 的对汞敏感残基分别变为 Cys-116、Cys-118, 这些残基位于跨膜区的对汞敏感的位点上^[2]。这说明, 尽管AQP的N端次要氨基酸残基有变化, 但不影响其功能与特性。

2 AQP表达的特异性

2.1 特异性表达与组织和发育阶段的关系 一般来说, AQP大量存在于参与水分、离子集流的细胞中, 这些细胞往往是正在分裂和伸长的细胞及幼嫩部位, 如表皮细胞、雄穗、正在发育的根和芽等。其分布表现出明显的器官、组织、细胞特异性^[3~6], 一种AQP可能存在于整个植物体的各器官, 也可能只存在于某一部分器官, 而且同一AQP在各个器官中表达量不同。

Meyrial等^[7]研究酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) AQP表达时见到AQP的表达具有生长阶

段的特异性。Aqy1-1p、Aqy2-1p 是两个公认的水通道蛋白, Aqy1-1p 在爪蟾卵母细胞中有活性, 但对酵母来说, 培养条件和生长阶段的改变均不能诱导其表达; Aqy2-1p 在爪蟾卵母细胞中无活性, 而酵母仅在培养于富含葡萄糖的培养基上且到对数生长期时才表达。植物的AQP也具有发育阶段的表达特异性。

2.2 AQP表达与环境的关系 渗透胁迫处理后冰晶松叶菊(*Mesembryanthemum crystallinum*) MIP-A、MIP-B、MIP-C 的转录呈轻度到中度的下降^[8]。Kirch等^[5]研究冰晶松叶菊的结果表明 NaCl 处理前后叶中的 MIP-A、MIP-B 总量无明显变化, 而 MIP-F 含量在胁迫后快速、大幅度下降, 根中的 MIP-C 含量则明显增加。用 NaCl 处理耐盐水稻后, AQP的转录上调, 1周后才恢复到未处理植株的水平^[9]。Yale等^[10]的实验表明AQP是渗透胁迫响应物质之一, 其与逆境胁迫之间的关系复杂, 不能简单地概括为表达的上升或下降。

最有趣的是AQP mRNA的量呈周期性的日变化。Clarkson等^[11]分析的结果表明, 光照前半期AQP mRNA的量最大, 黑暗来临时AQP mRNA的量最小, 这种循环不受蒸腾作用影响, 但其最大值与最小值可用来估计根渗透水透性(L_{pr})的日变化。他们的实验还发现, 不供给氮、磷、硫3大元素时, 百脉根属植物(*Lotus japonicus*)的L_{pr}下降, 并可为氮的重新供给而逆转; 测得的氮正常供应植株L_{pr}值对Hg处理敏感, 缺氮植株不受Hg处理的影响。这说明氮、磷、硫有利于AQP的形成或活性的

收稿 2001-01-08 修定 2001-11-05

* 国家重点基础研究科学发展规划项目资助课题(编号: G1999011708)。

提高^[11]。但 mRNA 量为什么呈周期性日变化尚待探讨。

3 AQP 水分运输的专一性问题

所谓 AQP 专司水分运输的功能是相对的。一般来说, AQP 只负责水分的跨膜快速流动, 具有严格的选择性, 但细胞中也有一些既可运输水分又允许某些离子及甘油、尿素等有机小分子通过的水通道蛋白^[12, 13]。CO₂ 也可透过 AQP, 其对水分的通透性受单层脂质体囊泡组分变化的影响, CO₂ 透过膜却不受其影响; 若把 AQP1 重组进膜后, 水分和 CO₂ 的通透性大大提高, 并可为 HgCl₂ 抑制和巯基乙醇所逆转。AQP1 在爪蟾卵母细胞中表达后, CO₂ 通透性可增加 40%^[14]。在蓝细菌中^[15], CO₂ 的吸收是一个 AQP 介导的、被动的过程(光系统 I 电子传递提供能量, 用于类囊体膜上催化 CO₂ → HCO₃⁻ 的碱性区域的形成, AQP 与耗能无直接关系), 可为 AQP、电子传递抑制剂所抑制。这说明水分与 CO₂ 转运有密切联系。人们在培育高光合效率和高水分利用效率的农作物新品种时, 对此问题似应考虑。

4 AQP 的功能

AQP 负责水分的快速跨膜转运, 也可能参与长距离或短距离的胞间水分流动, 以及液泡与胞质间、胞质与质外体间的渗透调节^[16], 有专一性、高效性、可控性和活性差异性。如 ZmPIP2a 可增加爪蟾卵母细胞质膜水分透性 8 倍, 而 PIP2 亚家族可增加水分透性 5~20 倍。Kaldenhoff 等^[17]用反义技术下调 AtPIP1b 的表达后, 拟南芥突变体根细胞质膜水分透性下降至野生型的 20%~30%, 而 HgCl₂ 处理可抑制水分透性 90% 以上。Netting 等^[18]发现, 水分是目前发现的胞内唯一的中性小分子^[18]; AQP 的跨膜通道内侧分布着疏水氨基酸残基, 赋予 AQP 水分运输高效性, AQP 对水分的选择是由于跨膜通道直径仅有 3 Å, 这就限制了其它物质的透过; 在跨膜通道内部的 NPA motif 中, Asn76、Asn192 两个残基向内部突出, 因而通道收缩, 当水分以单分子链穿过通道时, 这两个残基与水分子间形成氢键, 于是水分子之间的氢键被打断, 从而形成一道排斥离子而仅允许中性溶质通过的高度非介电屏障, 此时质子不能被传递^[19]。

至于 AQP 的生理功能。已有文章介绍^[20]。这里对近两年有关此问题的研究新进展作一补充。

AQP 组织特异性分布可产生不同效应, 与叶的生长、根尖伸长及实生苗发育等生理过程有关^[5]。Chaumont 等^[4]发现, ZmTIP1 转录活性与叶发育状况有关, 表现出快速生长的幼叶大于生长即将结束

的叶大于完全停止生长的叶; 未受逆境因素胁迫的水稻实生苗叶生长速率不受 HgCl₂ 处理的影响, 而经胁迫处理的叶, 其生长速率可为 HgCl₂ 抑制 49%^[20]。这表明 AQP 在叶生长过程中可能起一定的作用。

AQP 与根的水分吸收密切相关。Barrow clough 等^[21]研究了洋葱不同根段水分导度变化的结果表明, 仅发育形成内皮层凯氏带的较嫩根端部的 Lp 低, 而具有木栓化外皮层的根中部, 以及内皮层已木栓化的根基部的 Lp 明显较高, 这是由于较老根段的轴向水分导度较低所致。汞可降低 3 个根段的 Lp, 这表明 AQP 可降低细胞到细胞途径的水分传导阻力。

AQP 可能具有缓冲渗透振荡的功能。Krajinski 等^[22]从与泡囊丛枝真菌共生的苜蓿属植物 (*Medicago truncatula*) 中克隆到两个 AQP 的 cDNA 片段, 但 Mtaqp1 仅在共生菌诱导下表达, 他们认为 Mtaqp1 在共生体中起着缓冲高度区隔化的丛枝中渗透振荡的作用。

AQP 可以维持木质部薄壁细胞与蒸腾流间的水势平衡^[18]: 即使在轻度水分胁迫下木质部导管中水分大多运送到地上部分^[23, 24], 但如果导管蒸腾流水势高于薄壁细胞时, 水分就可通过虹吸作用贮存于液泡中, 木质部薄壁细胞起贮水库的作用。Link 等^[25]所观察到的苹果茎直径在夜晚可增加 1.0%~1.4% 的现象, 似乎证实了这一点; 相反当薄壁细胞水势高时, 贮存的水分又可通过虹吸作用释放到导管中。水分跨越薄壁细胞质膜和液泡膜是由 AQP 完成的, 蒸腾流中水的张力通过调节胞质中的 Ca²⁺ 浓度而调节 AQP 的活性。

AQP 还参与栓塞的修复。近年来, 人们发现根的轴向导水阻力受木质部导管中栓塞的存在与否影响很大, 栓塞的形成可显著降低导管导水率, 这表明水分张力增大, 因而可诱导气孔关闭。在栓塞的修复中, 由于栓塞的形成, 仅在导管的管壁及纹孔场壁覆盖一层水膜, 因此溶液浓度高, 水势低, 当 AQP 被木质部薄壁细胞质中高浓度 Ca²⁺ 激活开启后, 水分就可从薄壁细胞流入导管^[18]。

AQP 还能防止渗透伤害。Netting^[18]认为, 质外体水势高时, 水分从导管流向叶肉细胞, 轻度水分胁迫下, 叶肉细胞失水、气孔关闭, 若胁迫进一步加重, 细胞则处于静息状态; 重新供水时, 细胞又恢复正常生理状态。AQP 参与了所有这些过程。AQP 在细胞水分平衡中可阻止干旱条件下的水分丢失, 这就为植物采取诸如合成渗透调节物质等方法, 防止干

旱胁迫赢得了时间。

AQP 参与渗透胁迫响应。Suleyman 等^[26]用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 处理聚球藻 (*Synechococcus* sp.) 时发现, 初期 PS I 的电子传递和 PS II 的氧气释放活性均可逆的快速下降, 后期则呈不可逆的缓慢下降。这是由于盐胁迫导致 Na^+ 向胞内流动, 而水分则通过 AQP 流向胞外, 因而胞内 Na^+ 和 K^+ , 可能还有 Cl^- 浓度均升高, 以致光系统失活。他们认为, 可逆下降由渗透效应引起, 而不可逆下降则由离子效应引起, AQP 参与这种可逆下降过程^[26]。

从细胞水平来说, PIP 负责水分的吸收与外排, TIP 负责调节膨压, 因而细胞结构的完整性得以维持^[27]。AQP 的特异性分布表明, AQP 所在区域发生了强烈的水分跨细胞流动^[28]。

5 AQP 活性的调控

Murata 等^[19]研究人体中 AQP-1 的结果表明, 水分是以不间断的单个水分子组成的水链方式穿过 AQP 孔道的, 打开的 AQP 控制通过的水量^[24], 水分流动方向由胞质与质外体以及胞质与液泡之间的水势梯度决定^[29]。Netting^[18]指出, 渗透胁迫下, 水分亏缺引起的张力可激活质膜上的 Ca^{2+} 通道蛋白, Ca^{2+} 进入细胞后, 胞质中 Ca^{2+} 浓度升高, 液泡膜上 Ca^{2+} 通道受到激活, 于是胞质中 Ca^{2+} 浓度进一步升高。 Ca^{2+} 浓度足够高时, 一方面引起质膜内向 K^+ 通道关闭, 液泡膜 K^+ 通道打开, 另一方面导致质膜 $\text{H}^+ / \text{ATPase}$ 磷酸化失活。失活的 $\text{H}^+ / \text{ATPase}$ 可激活 $\text{K}^+ - \text{H}^+$ 共转运, H^+ 向胞质内运输, 质外体 pH 升高, 同时进入细胞的 H^+ 由液泡膜 $\text{H}^+ / \text{ATPase}$ 转移到液泡中, 以致胞质中 pH 升高。由于进入的 K^+ 与 Ca^{2+} 的共同效应, 质膜 $\text{H}^+ / \text{ATPase}$ 进一步失活, 同时 K^+ 由外向 K^+ 通道转移到胞外, 细胞内外形成水势差, 这时若 AQP 打开, 水分就可由细胞流到质外体, 膨压消失。若发生在保卫细胞中, 则气孔关闭。Netting 的这些结果也暗示, AQP 种类不同, 水分运输方向也不同, 一些负责向胞外运输, 而另一些则负责向胞内运输, 两者均可作为胞质中高浓度的 Ca^{2+} 激活。这说明众多的 AQP 是植物调节膜透性的一种方式。

流入、流出细胞的水分有 70% ~ 90% 通过 AQP^[21], AQP 的发现为人们研究水分以受调控的方式跨膜运输带来了曙光。它是如何调控的呢? 一般认为, 植物(生物)可通过组织、细胞特异性表达进行调控, 也可通过发育阶段的特异性表达进行调控; 既可在核酸水平调控, 又可在蛋白水平调控。从而组成了 AQP 活性调控的复杂网络。

前面已经说过, 不同发育阶段和不同组织表达的 AQP 的种类及数量均可改变, AQP 的比例也改变, 以致膜的水分通透性也改变。

磷酸化调节是 AQP 活性调节的重要方式, 许多研究表明 AQP 可被磷酸化^[30]。

pH 对 AQP 活性有调节作用^[31]。AQP₀ 的水分通透性在 pH 6.5 时大大增加; 中性时 AQP₃ 允许水分、甘油通过, pH < 6 时关闭; AQP₆ 在 pH < 5.5 时可选择性地透过水分与 Cl^- 。AQP₀ 和 AQP₆ 均有一个 Tyr-24 结构, AQP₃ 有一个亮氨酸对结构, 这些结构与 pH 调节 AQP 活性有关。

最近 Engel 等^[31]提出 AQP 的活性可受附属蛋白调节。如泪腺的 AQP₅ 可被蛋白拮抗剂钝化; 星形胶质细胞中的 AQP₄ 与细胞骨架系统结合决定了其高度极性分布, 从而影响膜的水分透性。

激素对 AQP 活性也有调节作用。Morillon 等^[32]的研究结果表明, 油菜素内酯可改变拟南芥质膜的水分通透性, 这一效应可能与 AQP 有关: 两种矮生型拟南芥的下胚轴长度与质膜渗透水透性 (Pos) 相关; 油菜素内酯引起的下胚轴和叶柄的生长与下胚轴质膜 Pos 相关。Hose 等^[33]发现 $100 \sim 1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 可增加离体玉米根组织和细胞水平的水导值, 他们认为 ABA 可能是通过与 AQP 的相互作用而改变质膜水分透性起作用的。

还有, 一般认为汞是大多数 AQP 可逆的专一性阻塞剂, 它与 Cys-189 残基作用而阻塞通道, 因此常用来研究 AQP 的水分运输能力。但近期 Zhang 等^[34]的研究结果表明, HgCl_2 削弱小麦细胞膜的 Lp 并非是 AQP 阻塞的结果, 细胞代谢活动可能起很大作用。 HgCl_2 抑制新陈代谢后会产生几方面的效应: (1) 质膜的水分通透性降低, 这可能是 AQP 的磷酸化减弱; (2) 胞间连丝的水分通透性降低。 HgCl_2 引起整个细胞 Lp 下降可能是质膜与胞间连丝、液泡膜或者二者 Lp 都下降的结果。

6 结语

迄今, AQP 的研究已取得了很大的进展。今后这一领域的研究可从以下几方面进一步深入: (1) 水分在细胞内除了极少量用作光合作用底物外, 主要起维持各种生理生化过程所需的液相环境的作用, AQP 正是通过空间转移(亚细胞、细胞、组织水平)水分而影响这些过程。因此应将 AQP 与其它生理生化过程结合起来研究, 从抗旱分子生物学角度着手, 搞清干旱信号产生、AQP 活性调节的信号转导通路及其与其它干旱响应物质信号转导通路间的对话, 探讨其在正常和水分胁迫生理中的作用。(2) 改

造AQP的结构与特性, 构建对水分亏缺更敏感的AQP, 使气孔处于振荡状态, 培育既有高水分利用效率又有高光合效率的农作物新品种或针对AQP开发新型的抗蒸腾剂, 提高作物对短期干旱的抗性。(3)通常, 逆境条件下, AQP只暂时起到平衡细胞水分的作用, 如果能把AQP的基因工程与抗旱活性物质(如甘露糖醇、6-磷酸海藻糖)结合起来研究, 可能会更好地改善作物抵御严重干旱和长期干旱的能力。

参考文献

- 1 Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E *et al.* Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*, 2001, **125**: 1206~ 1215
- 2 Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE *et al.* Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *The Plant Cell*, 1996, **8**: 587~ 599
- 3 Chaumont F, Barrieu F, Jung R *et al.* Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol*, 2000, **122**: 1025~ 1034
- 4 Chaumont F, Barrieu F, Herman EM *et al.* Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol*, 1998, **117**: 1143~ 1152
- 5 Kirch HH, Rosario VE, Goltdack D *et al.* Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol*, 2000, **123**: 111~ 124
- 6 Høfte H, Hubbard L, Reizer J *et al.* Vegetative and seed specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1992, **99**: 561~ 570
- 7 Meyrall V, Vincent L, Gobin R *et al.* Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 2001, **268**: 334~ 343
- 8 Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB *et al.* A family of transcripts encoding water channel protein: tissue specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1129~ 1142
- 9 Shinji Kawasakia, Chris Borchert, Michael Deyholos *et al.* Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 2001, **13**: 889~ 906
- 10 Yale J, Bohnert HJ. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem*, 2001, **276**(19): 15996~ 16007
- 11 Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T *et al.* Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J Exp Bot*, 2000, **51**(342): 61~ 70
- 12 Yool AJ, Stamler WD, Regan JW. Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin1 water channels. *Science*, 1996, **273**: 1216~ 1218
- 13 Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K *et al.* Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6269~ 6273
- 14 Ramesh Prasad GV, Coury LA, Finn F *et al.* Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO₂ across membranes. *J Biol Chem*, 1998, **273**(50): 33123~ 33126
- 15 Tchernov D, Helman Y, Keren N *et al.* Passive entry of CO₂ and its energy-dependent intracellular conversion to HCO₃⁻ in cyanobacteria are driven by a photosystem I-generated H^+ . *J Biol Chem*, 2001, **276**: 23450~ 23455
- 16 Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ. The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol*, 1997, **114**: 1347~ 1357
- 17 Kaldenhoff R, Grote K, Zhu J-J *et al.* Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J*, 1998, **14**: 121~ 128
- 18 Netting AG. 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. *Exp Bot*, 2000, **51**(343): 147~ 158
- 19 Murata K, Mitsuoka K, Hirai T *et al.* Structural determinants of water permeation through aquaporin 1. *Nature*, 2000, **407**: 599~ 605
- 20 侯彩霞, 黄昊, 汤章城. 植物细胞的水孔蛋白. 植物生理学通讯, 1997, **33**(2): 151~ 156
- 21 Barrowclough DE, Peterson CA, Steudle E. Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. *Exp Bot*, 2000, **51**(344): 547~ 557
- 22 Krajinski F, Biele A, Schubert D *et al.* Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta*, 2000, **211**(1): 85~ 90
- 23 Lu Z, Neumann PM. Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings, but not the transport of water via mercury sensitive water channels in the root. *Plant Physiol*, 1999, **120**: 143~ 151
- 24 Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C *et al.* Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Exp Bot*, 1999, **50**: 1055~ 1071
- 25 Link SO, Thiede ME, van Bavel MG. An improved strain gauge device for continuous field measurement of stem and fruit diameter. *Exp Bot*, 1998, **49**: 1583~ 1587
- 26 Suleyman I, Allakhverdiev, Sakamoto A *et al.* Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol*, 2000, **123**: 1047~ 1056
- 27 Fotiadis D, Jenő P, Mini T *et al.* Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *J Biol Chem*, 2001, **276**(3): 1707~ 1714
- 28 Otto B, Kaldenhoff R. Cell specific expression of the mercury insensitive plasma membrane aquaporin NtAQPI from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 2000, **211**(2): 167~ 172
- 29 Schöffner AR. Aquaporin function, structure and expression: are there more surprises to surface in water relation? *Planta*, 1998, **204**: 131~ 139
- 30 Johanson I, Karlsson M, Shukla UK *et al.* Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM 28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 1998, **10**: 451~ 460
- 31 Engel, Fujiyoshi Y, Agre P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *The EMBO J*, 2000, **19**: 800~ 806
- 32 Morillon R, Catterou M, Sangou R *et al.* Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2001, **212**(2): 199~ 204
- 33 Hose E, Steudle E, Hartung W. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a root cell and pressure probe study. *Planta*, 2000, **211**: 874~ 882
- 34 Zhang WH, Tyerman DS. Inhibition of water channels by HgCl₂ in intact wheat root cells. *Plant Physiol*, 1999, **120**: 849~ 858