

have been generated and it was found that lots of genes are necessary in the process of learning and memory. However, overlooking the role of background genes is a major problem in the present studies, the phenotypical abnormalities attributed to the targeted gene may be simply result from the effects of background genes. In order to overcome this limitation, it is necessary

to develop new ES cell lines and use inbred mouse strains from pure background, furthermore, methodological details must be improved and fine control over the timing, locale and degree of genetic disruption must be gained.

Key words gene knockout, gene targeting, learning, memory

水通道蛋白研究动态*

朱美君 王学臣 陈 珈 杜 敏

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 水通道蛋白是对水专一的通道蛋白, 它普遍存在于动、植物及微生物中, 不同水通道蛋白之间具有类似特征. 哺乳动物中水通道蛋白主要分为六类, 分布于水分代谢活跃的器官中; 植物除了质膜上水通道蛋白外, 液泡膜也存在着水通道蛋白, 它们在植物生长, 发育及胁迫适应中起着重要作用. 目前有关水通道蛋白的详细结构和功能信息主要来自对红细胞膜上水通道蛋白的研究, 它由同源的四聚体组成, 每个单体具有独立的水通道功能, 四聚体在膜上分布具有不对称性, 在膜内侧四聚体呈伸展状态, 在膜外侧形成大的中心空腔.

关键词 水通道蛋白, 选择性, 结构, 功能

学科分类号 Q 556

水进出细胞虽说是生命的基本过程, 但水如何跨膜运输却是长期以来没有解决的问题, 红细胞膜高的水透性使人推测其存在着对水专一的 AQP (aquaporins, AQP), 利用爪蟾卵表达体系及重组脂质体技术进行的功能实验表明, 红细胞膜确实存在着对水敏感的水通道蛋白 (AQP1)^[1]. AQP1 的发现揭开了长期使膜生物物理学家困惑的谜——某些细胞中水跨膜的快速流动, 进而鉴别了有关 AQP 的家族. 现已清楚 AQP 普遍存在于动植物及微生物中, 对 AQP 的专一性、结构和功能的研究以及 AQP 新成员的鉴别是许多研究者致力研究的课题, 有关这方面的进展也是日新月异.

1 AQP 的选择性

与其他通道蛋白类似, AQP 也具有高度

的专一性, 只允许水分子通过而不允许其他分子及离子通过, 它介导细胞与介质之间快速的被动的水的运输^[1,2]. 新近, Yool 等^[3]利用爪蟾卵表达体系发现用 cAMP 的激动剂 forskolin 或 8Br-cAMP 预处理爪蟾卵后, 卵中表达的 AQP1 对阳离子具有一定的透性. 许多研究小组^[2]重复了 Yool 等的实验, 但结果表明 AQP0、AQP1、AQP2 只具水转运活性, forskolin 或 cAMP 不能激活 AQP1 对阳离子的透性. 以上分歧可能是由于不同的实验材料, 不同测定方法及检测标准引起的, 也可能是由于 AQP 家族成员间的个体差异的结果, 要解决这一分歧, 今后必须进行更多更深入的

* 国家自然科学基金资助项目 (39600090).

收稿日期: 1997-08-11, 修回日期: 1998-01-04

研究.

目前有关 AQP3 转运活性仍有争论, Echevarra 等^[4]认为 AQP3 除了水转运活性外, 对甘油和尿素也有一定的透性, 且其分子内转运水和尿素或甘油分子的部位是不同的. 最近, Yang 和 Verkman^[5]比较了小鼠中 AQP0 ~ 5 对水及甘油的透性, 结果表明除 AQP3 外其他成员对甘油都无透性.

2 AQP 的结构与功能

AQPs 属古老的通道蛋白 MIP (major intrinsic protein) 家族成员, 序列分析显示 MIP 基因内部由两个重复单元组成 (a 2-fold repeat), 表明 MIP 可能由串联的重复基因进化而来^[6], MIP 家族不同成员之间的基因序列具有一定的同源性, 其中 NPA (Asn-Pro-Ala) 修饰子区段同源性最强. 已有的证据还表明 MIP 成员之间的基因组织方式也具相似性, 一个大的外显子 (外显子 1) 编码 N 端半分子, 三个小的外显子 (外显子 2~ 4) 编码 MIP 分子的 C 端半分子^[7]. MIP 分子的两部分结构在细胞中可能行使不同的功能, N 端部分在不同成员之间同源性较高, 因此推测它可能负责一般的或共同的功能, 另一部分 (MIP 分子的 C 端部分) 得到了分化, 使得不同的蛋白质具有特殊的功能^[6].

目前已进行序列分析或部分序列分析的 MIP 家族成员有 84 个, 其中包括大豆根瘤菌共生膜上的 NOD26 蛋白, 大肠杆菌及其他细菌中甘油转运体, 动植物膜上具有水转运功能的内在蛋白, 植物液泡膜上多个内在蛋白等^[8]. 大多数 MIP 成员的功能还有待于进一步深入了解, 但其中一部分具有水通道功能, 亦即 AQPs 成员.

所有已知的哺乳动物、植物、微生物 AQPs 同源物具有类似特征^[6], 它们约含 250 ~ 290 个氨基酸, 不同 AQPs 之间主要差异位于 N 端和 C 端, 每一个同源物内 C 端和 N 端的氨基酸序列有 20% 同源性. 目前有关 AQPs 详细的结构和功能信息主要来自对红细胞膜上

AQP1 的研究.

2.1 初级结构

AQP1 是红细胞膜上分子质量为 28 ku 的内在蛋白, 研究初期称 CHIP28. 该蛋白以两种形式存在: 28 ku (未糖苷化) 及 gly 28 ku (N 端糖苷化); 两者可以形成多亚基的复合体, 生化分析表明纯化的具有功能的 AQP1 四聚体中只有一个亚基糖苷化. 突变体实验表明 AQP1 糖苷化似乎不是其折叠、定位及功能所必需的.

AQP1 初级结构信息主要来自对 AQP1 cDNA 的分析, AQP1 的 cDNA 开放阅读框架由 807 bp 组成, 此外还含有 38 bp 的 5' 末端及 2 kb 的 3' Poly (A)⁺ 末端^[1]. AQP1 含有四个 Cys 残基, 其中 Cys189 是维持正常结构和功能所必需的, 淬灭实验表明 AQP1 中四个 Trp 基团位于非极性环境中, 它们有可能位于蛋白质的疏水口袋中, 也可能紧挨着膜脂环境. 突变体实验表明虽然 Trp210 具有高度的保守性, 但它不是水通道活性所必需的.

疏水性分析表明, 与所有的 MIP 成员一样, AQP1 含有六个跨膜区段并由五个环相连, 其中 B、D 环位于细胞内, A、C、E 环位于细胞外, A 环上有一个糖苷化位点 (其他 AQPs 成员的糖苷化位点位于 C 环上). AQPs 分子的 C 端和 N 端位于胞质侧. 最近, Stamer 等^[9]用谷胱甘肽转移酶与 AQP1 特定部位的融合蛋白的抗体进一步研究了 AQP1 的跨膜特征, 结果支持了上述结论, 此外, 他们发现 E 环对外界环境非常敏感, 因此推测 E 环在完整的具功能的 AQP1 中起着活跃的作用.

Haris 等^[10]利用傅利叶红外光谱 (FTIR) 分析了含水介质中重组到二维膜中 AQP1 的二级结构, 结果表明 AQP1 含 36% α 螺旋, 42% β 折叠片 (β -sheet). 与以往的圆二色谱 (CD) 分析结果非常类似 (40% α 螺旋, 42% β 折叠片), 但与干样品 AQP1 的 FTIR 图谱有一定的差异 (β 折叠片的含量为 18%). FTIR 光谱分析表明 AQP1 中 β 转角 (β -turn) 的含量为 14%, 然而 CD 谱测的 β 转角只含 1%, 这可

能是由不同的定量分析方法引起的。因为以上测定都依据溶液蛋白的参照光谱,而溶液蛋白的校准设置不一定适合于膜蛋白,因此要准确估算膜蛋白的二级结构可能还需依据膜蛋白的参照光谱,进行更多更深入的研究。对 AQP1 氨基酸序列的疏水性分析暗示分子含六个跨膜的 α 螺旋,每个 α 螺旋形成基本的含水孔,但不排除存在跨膜 β 折叠片,甚至 β 螺旋和 β 折叠片混合结构的可能性^[10],同年, Fischbarg 等借助计算机分析软件推测 AQPs 主要由 β 折叠桶组成。最近, Cabiaux 等^[11]比较了 AQP1 与细菌视紫红质 FTIR 光谱,结果暗示 AQP1 是一个完全的螺旋蛋白, β 折叠片含量极少甚至没有, α 螺旋含量 (高达 42%~48%) 与其跨膜片段的长度 (17~22 残基) 相吻合,二向色性测定表明所有螺旋具有一定跨膜方向,它们与正常脂双分子层平均成 21° 倾角。要正确了解 AQP1 分子详细的跨膜情况有待于进一步的生物物理实验。

2.2 高级结构

目前有关 AQPs 高级结构的报道比较一致,流体力学研究表明 AQP1 由同源四聚体组成,每个 AQP1 单体具有独立的水通道活性^[1]。从重组到脂质体中 AQP1 的冰蚀刻照片及高度纯化的 AQP1 的负染照片已观察到了直径为 7 nm 的四方结构,它由四个单体组成,中心是明显的凹穴,每个 AQP1 单体的直径为 3 nm。运用高分辨率的电镜 (分辨率约为 1.5 nm) 对重组有生物活性 AQP1 的二维膜晶体观察的结果进一步证实了 AQP1 的四聚体结构^[12], Walz 等^[12]发现每个四聚体都含有四个向外伸长围绕中心凹穴排列的结构域,它们很可能代表四个水孔,但 Walz 等^[12]认为该四聚体在膜上的组装是维持 AQP1 的稳定性及其正常功能所必需的。Walz 等^[13]运用原子力显微镜在纳米水平研究了 AQP1 分子的表面拓扑图谱,结果进一步支持了以往实验得到的三维图谱,实验表明 AQP1 在膜中的分布是不对称的,在膜的一侧四聚体向外伸展,在另一侧形成大的中心空腔,用羧基肽酶 Y 处理

AQP1 晶体可以切除 5 ku 的位于胞内的 C 端片段,并导致主要伸展区域的丢失,从而暗示四聚体中心腔面向细胞外侧。最近, Walz 等^[14]运用低温电镜进一步研究了 AQP1 的三维结构,研究表明每个 AQP1 单体含六个跨膜 α 螺旋,它们围绕一复杂的中心密度 X 右手螺旋,而螺旋束中右手旋转现象是所有溶液蛋白共同特征,因此推测 AQP1 分子中参与水渗透的中心密度 X 可能是由含保守 NPA 序列的 B 环和 E 环组成。要想确切了解 AQP1 对水专一性机理,必须对 AQPs 分子进行更精确的结构研究,高分辨率的电子晶体学技术及原子力显微镜也许能为 AQP1 的结构研究提供更多的信息。

3 AQPs 分类及功能

3.1 哺乳动物中 AQPs 种类及功能

虽然从结构分析来看, AQPs 是一个简单、具水转运活性的膜内在蛋白,但它们在组织中的分配及其表达模式非常复杂,目前关于 AQPs 的分布及功能仍有许多争论^[7],其中某些分歧可能是由于不同的分析方法引起的。

哺乳动物 AQPs 主要分六类,分别称为 AQP0、AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP5,除 AQP4 外,它们都对汞化合物敏感。AQP0 又称 MIP 是眼晶体纤维中主要的内在蛋白,约占总蛋白的 60%,其功能主要维持晶体的透明度, AQP0 功能失调将引起晶体水肿并产生白内障^[7]。AQP1 是目前分布最广,研究最为清楚的 AQPs,主要存在于红细胞、脉络丛、肾近侧管、降支、毛细管、乳汁管、淋巴管等^[7], AQP1 在眼组织中含量高于其他 AQPs 成员^[15]。AQP1 与脑脊髓液、体液、汗液的形成,角膜晶体中水的去除,胆汁的分泌及浓缩密切相关^[7]。

AQP2 存在于肾髓和肾皮质收集管主细胞,其活性受后叶加压素的调节,无活性状态的 AQP2 存在于细胞质囊泡中,受后叶加压素刺激时存在于胞质囊泡中无活性的 AQP2 通过囊泡穿梭运动将运到肾的顶端膜并发挥作用,

AQP2 基因的失活将导致稀有的生肾尿崩症^[16]. AQP3 主要存在于肾收集管主细胞基缘膜上, 此外还存在于气管上皮基缘膜, 脑表皮的脑膜细胞, 眼的结膜上皮, 结肠末端长柔毛细胞的基缘膜. 有关 AQP3 的功能目前仍有分歧, 有研究表明 AQP3 在转运水的同时也可以转运甘油, 尿素等小分子溶质^[4, 5]. AQP4 主要存在于脑中, 同时也存在于胃周壁细胞, 肾收集管主细胞基缘膜, 气管、支气管上皮的基缘膜; 睫状体非着色细胞的基缘膜, 视网膜内外核层, 神经节细胞层等. 已有的证据暗示 AQP4 参与许多生理、病理过程, 脑中的 AQP4 可能调节脑脊髓液的外流及细胞外液的体积, 若 AQP4 表达及调控失调将导致后叶加压素释放失调, 从而引起自发性尿崩症等疾病^[7]. AQP5 具有分泌功能, 主要存在于涎腺, 泪腺, 角膜上皮及肺中. 泪腺及次上颌腺腺体上皮中 AQP5 表达及功能的失调可能引起这些腺体机能不全^[7].

从上可见同一细胞膜可以含有多种 AQP, 例 AQP2、AQP3、AQP4 同时存在于收集管主细胞基缘膜, 为什么会出现这种重复现象目前仍不清楚, 也许不同 AQP 在同一组织的不同部位单独起作用, 也许它们的功能存在着潜在的差异. 从 AQP 分布看, 许多代谢活跃的细胞及组织如睫状体着色细胞、汗腺、胰腺、腮腺等仍未发现有 AQP 存在, 此暗示这些部位可能存在着目前尚未被人鉴别的新的 AQP 成员.

3.2 高等植物中 AQP 种类及功能

总体来讲, 植物 AQP 可分为质膜上 AQP 和液泡膜上水通道蛋白 (tonoplast intrinsic protein, TIP). TIP 又可分种子液泡膜上水通道蛋白即 α -TIP, 营养体液泡膜水通道蛋白即 γ -TIP, 最近, Daniels 等^[17]在拟南芥营养体液泡膜又发现了一种新的成员即 δ -TIP. 它们在细胞中表达模式及其在组织中的功能不同, α -TIP 存在于种子贮藏液泡膜, 其作用可能缓解种子吸胀时胞质渗透势变化并控制液泡体积^[18]. γ -TIP 主要位于根中, 可能

与快速生长区细胞的扩展有关; δ -TIP 主要是茎中的 AQP, 它在幼嫩微管束细胞中产生水的流动, 在成熟的微管束组织中保持水的透性^[17].

自 1994 年, 拟南芥质膜上发现 AQP 以来, 植物质膜 AQP 的队伍越来越庞大, 近两年来已先后从冰草、大麦叶表皮、水藻的节间膜、菠菜叶片、向日葵下胚轴的薄壁组织等细胞质膜上鉴别了对水专一的 AQP. 从不同植物质膜上鉴别的 AQP 虽然命名各异, 但都具有相似的特性和功能, 它们在植物的生长、发育及胁迫适应中调节跨细胞膜水的转运. 它们对水高效转运功能大多已用爪蟾卵表达体系得以鉴定, 此外测定植物膜渗透水透性的许多技术如跨细胞膜渗透势、细胞压探针、截流技术等也已用来研究天然膜中 AQP 的功能^[19], 最近, Chaumont 等^[20]利用融合基因技术发现拟南芥质膜上水通道蛋白 RD28 可以在其他有机体 (网状柱菌及前孢子) 中发挥作用, 并影响其正常的生长发育过程.

了解了 AQP 的分布及分子结构后, 我们不难看出 AQP 在维持机体的体内平衡、器官的正常功能中起着重要作用. 但目前对 AQP 结构与功能的关系、导致 AQP 开关的信号及其活性调节知之甚少, 因此要真正揭开水分子快速跨膜移动的分子机理所面临的任务还十分艰巨.

参 考 文 献

- 1 Preston G M, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (24): 11110 ~ 11114
- 2 Agre P, Lee M D, Devidas S, *et al.* Aquaporins and ion conductance. *Science*, 1997, **275** (5305): 1490~ 1492
- 3 Yool A J, Stamer W D, Regan J W. Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels. *Science*, 1996, **273** (5279): 1216~ 1218
- 4 Echevarra M, Windhager E E, Frindt G. Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin 3. *J Biol Chem*, 1996, **271** (41): 25079~ 25082
- 5 Yang B X, Verkman A S. Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by

- expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem, 1997, **272** (26): 16140~ 16146
- 6 Reizer J, Reizer A, Saier M H. The MIP family of integral membrane channel proteins: Sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993, **28** (1): 235~ 257
 - 7 King L S, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. Annu Rev Physiol, 1996, **58**: 619~ 648
 - 8 Park J H, Saier M H Jr. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. J Membr Biol, 1996, **153** (3): 171~ 180
 - 9 Stamer W D, Snyder R W, Regan J W. Characterization of the transmembrane orientation of aquaporin 1 using antibodies to recombinant fusion protein. Biochemistry, 1996, **35** (50): 16313~ 16318
 - 10 Haris P I, Chapman D, Benga G. A fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the hydrogen-deuterium exchange and secondary structure of the 28-kDa channel-forming integral membrane protein (CHIP28). Eur J Biochem, 1995, **233** (2): 659~ 664
 - 11 Cabiaux V, Oberg K A, Pancoska P, *et al.* Secondary structures comparison of aquaporin 1 and bacteriorhodopsin: a fourier transform infrared spectroscopy study of two-dimensional membrane crystals. Biophys J, 1997, **73** (1): 406~ 417
 - 12 Walz T, Smith B L, Zeidel M L, *et al.* Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP. J Biol Chem, 1994, **269** (3): 1583~ 1586
 - 13 Walz T, Tittmann P, Fuchs K H, *et al.* Surface topographies at subnanometer-resolution reveal asymmetry and sidedness of aquaporin 1. J Mol Biol, 1996, **264** (5): 907~ 918
 - 14 Walz T, Hirai T, Murata K, *et al.* The three dimensional structure of aquaporin 1. Nature, 1997, **387** (6633): 624 ~ 627
 - 15 Patil R V, Saito I, Yang X, *et al.* Expression of aquaporins in the rat ocular tissue. Exp Eye Res, 1997, **64** (2): 203 ~ 209
 - 16 Wintour E M. Water channels and urea transporters. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997, **24** (1): 1~ 9
 - 17 Daniels M J, Chaumont F, Mirkov T E, *et al.* Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. Plant Cell, 1996, **8** (4): 587~ 599

- 18 Maurel C, Chrispeels M, Lurin C, *et al.* Function and regulation of seed aquaporins. J Exp Bot, 1997, **48** (309): 421~ 430
- 19 Maurel C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. Annu Rev Plant Mol Biol, 1997, **48**: 399~ 429
- 20 Chaumont F, Loomis W F, Chrispeels M J. Expression of an *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin in *Dicystostelium* results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (12): 6202~ 6209

Advances in Aquaporin Research. ZHU Mei Jun, WANG Xue-Chen, CHEN Jia, DU Min (*College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China*).

Abstract Aquaporins, water specific conducting channels, ubiquitously exist among animals, plants and microbes. There are six kinds of aquaporins in mammalian plasma membrane, which locate on the organs that participate actively in water metabolism. Plant aquaporins exist both in plasma membrane and tonoplast, which have a general role in regulating transmembrane water transport during the growth, development, and stress responses of plants. Most information about the structure and function of aquaporins comes from those researches on AQP1 that exists in erythrocyte membrane. Aquaporins assemble in the membrane as a homotetramer with each monomer having its individual water conducting function. The distribution of tetramer in membrane is unsymmetrical, which exhibits four protrusions in the inside surface of membrane and forms a large central cavity outside.

Key words aquaporin, selectivity, structure, function