

水稻 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体 OsCAX3 的功能分析和亚细胞定位研究 *

祁碧菽 李春光 陈叶苗 陆平利 郝福顺 沈国明 陈 珈 王学臣 **

(中国农业大学生物学院植物学系, 国家植物生理生化重点实验室, 北京 100094)

摘要 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体作为一类 Ca^{2+} 外向转运器, 在植物的营养和信号转导中起着非常重要的作用. 克隆了水稻 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体基因 *OsCAX3*, 序列分析表明 *OsCAX3* 具有 11 个跨膜区, 其中在第 6 和第 7 个跨膜区之间有一个 17 个氨基酸组成的酸性基序 (acid motif), 功能互补实验证明 *OsCAX3* 具有转运 Ca^{2+} 的功能, 并且其 N 端 26 个氨基酸序列对转运 Ca^{2+} 具有一定的抑制作用. RT-PCR 分析表明 *OsCAX3* 的表达受到外源 Ca^{2+} 的诱导. 利用 PSORT prediction 进行亚细胞定位分析, 和利用 *OsCAX3*-GFP 融合蛋白瞬时表达分析证明, *OsCAX3* 定位于细胞质膜. 以上结果表明, *OsCAX3* 是一种定位于细胞质膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体.

关键词 水稻, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体, RT-PCR, 原生质体, 瞬时表达

学科分类号 Q94

Ca^{2+} 在植物中具有非常重要的作用, 它既是植物必需的营养元素, 又是植物响应体内发育信息和外部刺激的重要信使^[1,2]. 为了保持体内的 Ca^{2+} 平衡, 植物必须通过 Ca^{2+} 转运系统来完成对 Ca^{2+} 的运输. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体作为一类 Ca^{2+} 外向转运器, 在植物的营养和信号转导中起着非常重要的作用^[3]: 使胞内 Ca^{2+} 浓度处于静息水平, 终止 Ca^{2+} 信号; 将 Ca^{2+} 储存于内质网、液泡等细胞器, 作为信号转导中的 Ca^{2+} 源来调控 Ca^{2+} 的释放; 将 Ca^{2+} 正确分配到各细胞器中, 从而确保各种特异生化反应的顺利进行^[4]. 水稻既是一种重要的粮食作物^[4], 又是生物学的模式植物, 因此, 研究水稻 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体具有理论和实践的双重意义.

近年来, 已从细菌、酵母和植物中克隆到了一些 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体基因^[5-7]. 拟南芥基因组中存在 12 个可能的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体基因^[8], 其中已经被克隆的有 *CAX1*、*CAX2*、*CAX3* 和 *CAX4*^[9-11]. 研究显示 *CAX1* 有两个重要的结构域: N 端调控区^[12] 和 Ca^{2+} 转运区^[13]. 水稻中只有 *OsCAX1a* 被克隆出来, 它像 *CAX2* 一样能转运 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} ^[14]. 有关水稻的其他 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体基因的研究至今还未见报道. 有生化证据显示, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体在植物中有多种亚细胞定位, 包括液泡膜、质膜和叶绿体^[15-17], 但目前已经克隆到的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体基因中, *CAX1*、*CAX2*、*CAX4*^[11, 18, 19] 的蛋白质产物都定位于植物的液泡膜. 有关质膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体基因的克隆还未见报道.

本文研究了水稻的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体 *OsCAX3*. 我们首先克隆了该基因, 序列分析表明, *OsCAX3* 具有 11 个可能的跨膜区和一个酸性基序 (acid motif). 酵母突变体 K667 的转化实验表明 *OsCAX3* 可以转运 Ca^{2+} , 并且其 N 端的 1~26 位氨基酸序列对 *OsCAX3* 转运 Ca^{2+} 的功能有一定的抑制作用. 用 RT-PCR 的方法证明它在 RNA 水平上受到外源 Ca^{2+} 的显著诱导. 利用 PSORT Prediction 进行亚细胞定位预测分析发现 *OsCAX3* 定位于植物细胞质膜, 为了验证这一结果, 我们构建了 *OsCAX3*-GFP (green fluorescence protein) 融合蛋白表达载体, 转化拟南芥叶肉细胞原生质体, 结果显示 *OsCAX3*-GFP 定位在细胞质膜上. 这些结果表明 *OsCAX3* 是一种定位于细胞质膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体, 这对于深入理解 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体在植物中的功能具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

所用水稻材料为中作 93. 将水稻种子表面消毒后放在含有 3%蔗糖和 1%琼脂的 MS^[20]培养基上萌发, 30℃暗培养 3 天后转移到 25℃培养室. 生长 10

* 国家重点基础研究发展规划 (973) (2006 CB100100 和 2003 CB114300), 国家自然科学基金资助项目 (30370129 和 30421002).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62732706, Fax: 010-62733450

E-mail: xcwang@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-04-22, 接受日期: 2005-06-29

天的水稻幼苗采收后在液氮中速冻, 保存于 -80°C 备用. 表面消毒的拟南芥种子播种于 MS 培养基 (其中含蔗糖 2%, 琼脂 1%, pH 5.7) 上, 4°C 春化 3 天, 于 25°C 培养室生长 6 天后移栽至土壤中, 于 22°C 温室培养.

1.2 *OsCAX3* 的克隆及序列分析

根据 NCBI 中 *OsCAX3* 的序列设计一对特异引物. *OsCAX3*-F: 5' TGC GGATCC CATGGAGAATC-CTCAGATTGAG 3', *OsCAX3*-R: 5' TCAGAGC-TCTCATCGCTGGATTGTGGA 3'. 引物中下划线处分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点. 从水稻幼苗中提取总 RNA, 用 MMLV (Promega 公司) 酶进行反转录得到第一链 cDNA, 用 PCR 的方法扩增到目的条带, 所得目的条带插入载体 pMD-18 (TaKaRa 公司) 测序鉴定. *sOsCAX3* (截短型 *OsCAX3*) 直接从插入 pMD-18 的 *OsCAX3* 扩增得到, 所用上游引物为 *sOsCAX3*-F: 5' AGGGGATCCTCCAGCATGGTTCAGTCCTGG 3', 下游引物与 *OsCAX3*-R 的相同. 插入目的序列的质粒在大肠杆菌菌株 DH5 α 中筛选和扩繁.

1.3 酵母菌株及其转化

实验中所使用的酵母菌株为 K667 (*MA*Ta, *vcx1*, *pmc1* :: *TRP1*, *ade2-1*, *can1-100*, *his3-11, 15*, *leu2-3, 112*, *trp1-1*, *ura3-1*)^[11], 这一菌株缺失了 Ca^{2+} 泵 (*PMC1*) 基因和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体 (*VCX1*) 基因, 因此在高浓度钙离子的培养基 (200 mmol/L CaCl_2) 上不能生长. 将目的片段插入酵母表达载体 pYES2 (Invitrogen 公司) 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点. 采用 LiAc/PEG (Yeast Protocols Handbook, #PT3024-1, Clontech) 方法转化酵母. 将 pYES2 空载体和 pYES2-*OsCAX3* 分别转化酵母菌株 K667. 所得阳性克隆在 SG-Ura 缺失培养基上筛选.

1.4 Ca^{2+} 耐性分析

在用固体培养基对超表达 *OsCAX3* 基因的酵母所做的 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 耐性分析实验中, 以转化 pYES2 空载体的酵母菌株作为阴性对照进行平行实验. 将转基因酵母菌株分别生长在含有 200 mmol/L CaCl_2 和 4 mmol/L MnCl_2 的固体 YPD 培养基上, 培养基中含 2% 酵母提取物、1% 细菌用蛋白胨、2% 半乳糖和 1% 棉籽糖. 在用液体培养基所做的酵母对 Ca^{2+} 耐性分析实验中, 于 30°C 用 SG-Ura 液体培养基培养酵母细胞, 生长到 A_{600} 为 1.0 时, 将所得酵母菌培养物分别用含有 50 到 200 mmol/L

CaCl_2 的 YPD 培养液稀释 10 倍, 放入 24 孔细胞培养板中, 每孔 1 ml, 于 30°C 生长 24 h 后测 A_{600} . 在培养基和培养液中均加入 Ca^{2+} -ATPase 的抑制剂 FK506 至终浓度为 0.5 mg/L^[21].

1.5 *OsCAX3* 在水稻中的表达特性分析

用 RT-PCR 的方法研究了 *OsCAX3* 在水稻中的表达特性. 经过表面消毒的水稻种子在用水浸湿的滤纸上, 黑暗中 30°C 催芽 3 天, 然后转移至 1/2MS 液体培养基中于 25°C 进行培养. 每天更换一次培养液. 10 天后, 将水稻幼苗移至含有 80 mmol/L CaCl_2 的 1/2MS 溶液中分别放置 0.5~16 h, 对照材料继续用 1/2MS 液体培养基进行培养. 从对照和处理的水稻幼苗中提取总 RNA, 取 0.5 μg 总 RNA 为模板, 反转录所得第一链 cDNA 用来扩增 *OsCAX3* 全长基因和 *OsActin1*^[22]. *OsCAX3* 的引物为 *OsCAX3*-F: 5' ATGGAGAATCCTCAGATTGAG 3'; *OsCAX3*-R: 5' TCATCGCTGGATTGTGGA 3'. *OsActin1* 的引物为 *OsActin1*-F: 5' GGAAGTGGTATGGTCAAGGCPCT 3'; *OsActin1*-R: 5' AGTCTCCCATGGATAACCGCAG 3'. PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 以确保所得 PCR 产物的正确性与专一性. 调整 PCR 反应中所加模板的量和反应循环数, 以保证所得 *OsActin1* 的目的带亮度基本一致.

1.6 拟南芥叶肉细胞原生质体的转化

将 *OsCAX3* 插入 pBI221-GFP 的 *Xba*I 和 *Bam*H I 酶切位点之间, 构建瞬时表达载体. 拟南芥叶肉细胞原生质体的制备和转化参照 Sheen^[23] 的方法, 取温室中生长 3~4 周的拟南芥叶片制备原生质体, 用 PEG 法进行转化. 取 100 μl 制备好的原生质体, 分别加入 20 μl pBI221-GFP 和 pBI221-*OsCAX3*-GFP 质粒 DNA 和 110 μl PEG, 轻轻混匀, 孵育 30 min, 用 W5 (154 mmol/L NaCl, 125 mmol/L CaCl_2 , 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MES pH 5.7) 溶液洗涤 2 次, 用 1 ml W5 溶液稀释, 放入 6 孔培养板中, 23°C 培养 16~24 h. 用 LSM510 型激光共聚焦显微镜 (Zessi) 观察 GFP 所指示的绿色荧光.

2 结 果

2.1 *OsCAX3* 的序列分析

根据 *OsCAX3* 基因的序列设计了一对特异引物. 用 PCR 的方法直接克隆到了 *OsCAX3* 基因, 该基因包含 1 254 碱基, 编码 417 个氨基酸. 根据

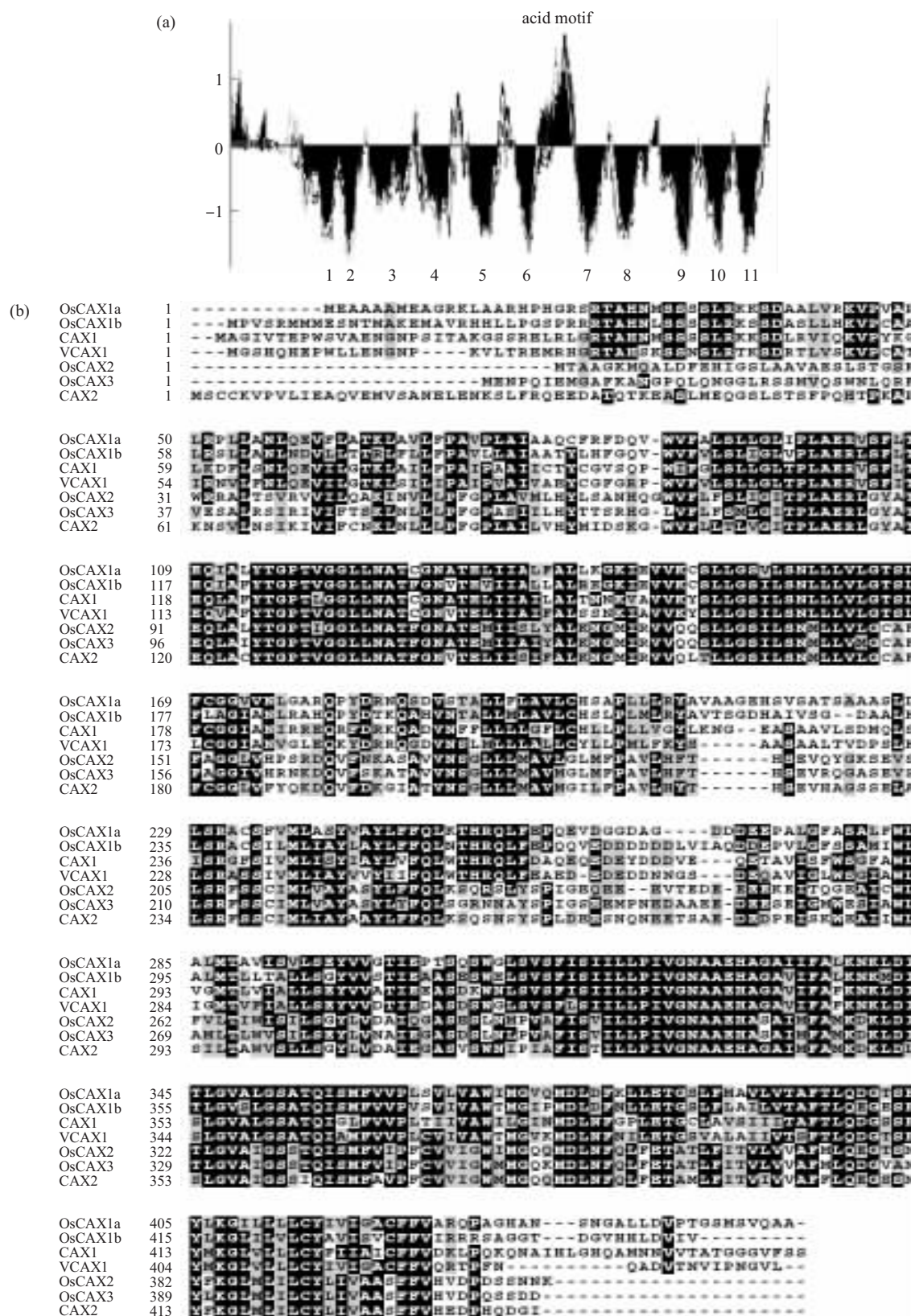


Fig.1 Deduced amino acid sequence analysis of *OsCAX3*

(a) Hydropathy values were determined according to Kyte and Doolittle over a running window of *OsCAX29* amino acid residues. The protein has 11 transmembrane domains and an acidic motif which is a hydrophilic, acidic-residue-rich region between the sixth and seventh transmembrane domains (residues 234 ~ 250). (b) Alignment of deduced amino acid sequences of polypeptides encoded by *OsCAX1a*, *OsCAX1b*, *OsCAX2*, *OsCAX3*, *CAX1*, *CAX2* and *VCAX1*. The accession numbers for them are AB112656, AB112770, AB112772, AB112773, AF461691, AF424628, and AB012932 respectively.

Kyte等^[24]的方法进行亲水性分析表明, 该基因编码的蛋白含有 11 个跨膜区, 其中在第 6 个与第 7 个跨膜区之间有一个由 17 个酸性氨基酸残基组成的酸性基序 (acidic motif) 结构 (图 1a). *OsCAX3* 与 *OsCAX1a*、*OsCAX2*、*CAX1*、*CAX2* 和绿豆的 *VCAX1* 的序列有很高的同源性 (图 1b, <http://www.ch.embnet.org>). 在 *OsCAX3* 的 N 端有一个亲水区域, 类似拟南芥的 *CAX1* 的自抑制区^[1].

2.2 *OsCAX3* 转运 Ca^{2+} 的功能分析

由于可能存在着 N 端自抑制区, 我们以 *OsCAX3* 的第 27 个氨基酸为起始设计上游引物, 扩增后得到截短型的 *OsCAX3*, 命名为 *sOsCAX3*. 将 *OsCAX3* 和 *sOsCAX3* 转入酵母突变体菌株

K667, *OsCAX3* 和 *sOsCAX3* 都能抑制 K667 对 Ca^{2+} 的敏感性, 表达 *sOsCAX3* 的酵母细胞比表达 *OsCAX3* 的酵母细胞生长旺盛, 但 *OsCAX3* 和 *sOsCAX3* 都不能使 K667 在含 4 mmol/L Mn^{2+} 的培养基上恢复生长 (图 2a). 在培养液 Ca^{2+} 的耐性分析中, *OsCAX3* 和 *sOsCAX3* 都能使酵母菌 K667 在含 200 mmol/L 的 Ca^{2+} 培养液中生长, 而转入空载体 pYES2 的对照菌株在只含 50 mmol/L Ca^{2+} 培养液中也不能生长. 同样, 转 *sOsCAX3* 的菌株比转 *OsCAX3* 的菌株生长旺盛 (图 2b). 这表明 *OsCAX3* 能够转运 Ca^{2+} , 并且其 N 端序列对 Ca^{2+} 的转运具有一定的抑制作用.

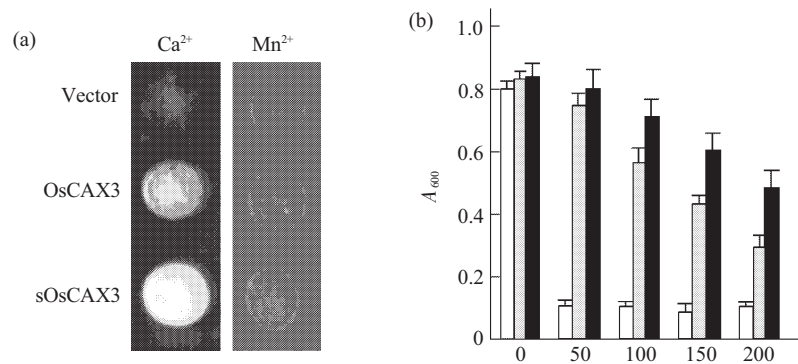


Fig.2 Cation sensitivity assay of yeast K667 strain expressing vector, *OsCAX3* and *sOsCAX3*
(a) Ca^{2+} and Mn^{2+} sensitivity assay of K667 strain transformed with vector, *OsCAX3* and *sOsCAX3*. The indicated yeast strains are grown on solid media supplemented with 200 mmol/L CaCl_2 and 4 mmol/L MnCl_2 . (b) Ca^{2+} sensitivity assay in liquid media. The indicated yeast strains are grown in liquid media supplemented with 200 mmol/L CaCl_2 . Cells are diluted 10-fold into fresh media containing a range of CaCl_2 concentrations from 50 mmol/L to 200 mmol/L and incubated for 1 day at 30°C in flat-bottom 24-well dishes (1.0 ml/well). Optical density at 600 nm was measured for each resuspended culture. □: Vector; ▤: *OsCAX3*; ■: *sOsCAX3*.

2.3 *OsCAX3* 在水稻中的表达特性

用 RT-PCR 的方法检测了 *OsCAX3* 的 mRNA 在水稻幼苗根和叶中的表达特性以及是否受到外源的 Ca^{2+} 诱导. 结果表明, *OsCAX3* 在水稻幼苗根中的表达量略低于在叶中的表达量 (图 3a), 当用

80 mmol/L 的 CaCl_2 处理水稻幼苗时, *OsCAX3* 的 mRNA 随着处理时间的增加逐步增加 (图 3b), 这说明 *OsCAX3* 在 mRNA 水平上的表达受到外源 Ca^{2+} 的诱导.

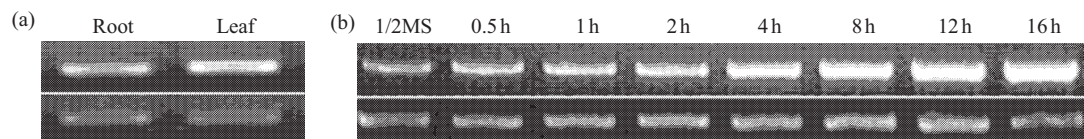


Fig.3 RT-PCR analysis of *OsCAX3* gene expression in rice seedlings
(a) *OsCAX3* transcripts were detected in total RNA from root and leaf by RT-PCR. (b) *OsCAX3* transcripts were detected in total RNA from seedlings treated with 80 mmol/L CaCl_2 for different period of time by RT-PCR.

2.4 OsCAX3-GFP 的亚细胞定位

亚细胞定位预测分析 (<http://psort.nibb.ac.jp>) 表明 OsCAX3 定位在植物细胞质膜上. 为了验证这一结果, 我们构建了 pBI221-OsCAX3-GFP 瞬时表达载体, 分别将 pBI221-GFP 载体和 pBI221-OsCAX3-GFP 融合载体转化拟南芥叶肉细胞原生质体. 结果表明, 在转化 GFP 的对照细胞中, 荧光在细胞质和细胞核中均有分布, 而表达 OsCAX3-GFP 的细胞中, 绿色荧光则分布在细胞的质膜上(图 4), 这说明 OsCAX3 是一个质膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体.

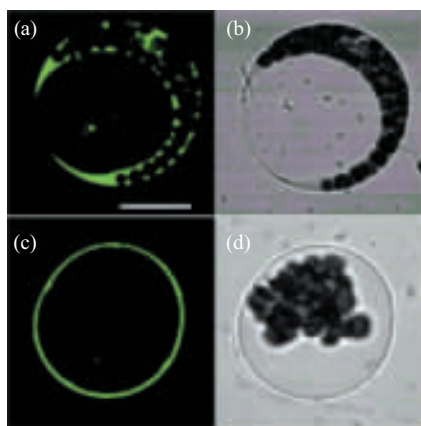


Fig.4 Transient expression and subcellular localization analysis of OsCAX3-GFP fusion protein in mesophyll cell protoplast of *Arabidopsis*

(a) Confocal microscopy images of green fluorescence in protoplasts expressing GFP alone. (c) Optical sectioning microscopy image of green fluorescence in protoplasts expressing OsCAX3-GFP. (b), (d) The same cells of (a) and (c) in bright field. Bar in (a)= 20 μm . (b), (d) Cells were photographed in bright field shown in (a) and (b).

3 讨 论

3.1 OsCAX3 对 Ca^{2+} 转运的特异性

在氨基酸序列同源性分析中, OsCAX3 与 CAX1 同源性为 42%, 与 CAX2 的同源性则高达 74%, 但是, OsCAX3 对二价金属离子的转运选择性方面却与 CAX1 更相近. 它像 CAX1 一样, 转化酵母突变体 K667 后, 只能使该菌株的 Ca^{2+} 敏感性受到抑制, 不能抑制其 Mn^{2+} 敏感性. CAX2 则可以转运 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} . 在 CAX1 中有一个 CaD (Ca^{2+} domain) 位于 CAX1 的第一和第二个跨膜区之间的 87~95 个氨基酸, 在 OsCAX3 的相应区域与 CAX1 的 CaD 同源性很小. 在 CAX2 第 4 个跨膜区中有 3 个氨基酸 CAF 被认为与 Mn^{2+} 的转运有关^[25]. 在 OsCAX3 的第 4 个跨膜区中也同样存在一个 CAF

区域, 而 OsCAX3 却不能转运 Mn^{2+} . 我们推测这可能是由于 CAX 对离子转运的特异性不仅仅决定于某段特殊的序列, 更与它们的三维结构以及在细胞中不同的定位有关.

3.2 OsCAX3 的表达特性

用外源 Ca^{2+} 处理水稻幼苗可以诱导 OsCAX3 mRNA 的表达, 这与 OsCAX3 可以转运 Ca^{2+} 的功能是相符的. 另外, 在水稻幼苗的根和叶中 OsCAX3 的表达量区别不大, 在根中的表达略低于在叶中的表达. 这说明 OsCAX3 在水稻的不同组织中都有表达, OsCAX3 可能在水稻的不同发育时期、不同的生理过程中都起着重要的作用.

3.3 OsCAX3 的亚细胞定位

亚细胞定位预测分析和 OsCAX3-GFP 融合蛋白亚细胞定位研究表明, OsCAX3 定位在质膜上. 液泡膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体与存在于质膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体可能存在着分工上的不同. 转 CAX1 基因的拟南芥体内 Ca^{2+} 含量明显高于野生型对照, 这说明液泡膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体可以使植物体内过多的 Ca^{2+} 从胞质中转运到液泡中, 从而消除高浓度的 Ca^{2+} 对细胞的毒害^[18]. 而那些存在于质膜上的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体对于 Ca^{2+} 在细胞之间的传递以及 Ca^{2+} 在植物整个植株中的分配起着重要作用. 质膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体可以将 Ca^{2+} 泵入植物的共质体, 从而实现 Ca^{2+} 在植物体内的按需分配^[4]以及信号在细胞间的传递.

3.4 N 端参与了 OsCAX3 转运 Ca^{2+} 功能的调控

在拟南芥的 CAX1、绿豆的 VCAX1 和水稻的 OsCAX1a 中, 都存在着一个 N 端的自抑制区, 这个区域可以抑制这些 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体的转运活性, 该调控区通过与它相邻的 N 端区域相互作用来调节 Ca^{2+} 的转运活性^[12]. 我们用截去 N 端 1~26 个氨基酸的 OsCAX3, 即 sOsCAX3 转化酵母菌株 K667, 通过 Ca^{2+} 耐性分析显示, 无论是在含 200 mmol/L CaCl_2 的 YPD 固体培养基中还是在含 50 ~ 200 mmol/L CaCl_2 的 YPD 液体培养基中, sOsCAX3 转基因酵母菌株生长量都大于 OsCAX3 转基因酵母菌株(图 2). 这说明 OsCAX3 对 Ca^{2+} 转运功能的调节与已知的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运体的调控方式存在着差异, 这种差异可能与它们具有不同的亚细胞定位有关. 在 OsCAX3 的 N 端存在一个对其 Ca^{2+} 转运活性调节的区域, 但这一区域不能完全抑制 OsCAX3 对 Ca^{2+} 的转运, 而只是起到一定的削弱作用. 这个 N 端调控区可能不是通过与其相邻的

区域来行使调控功能,而是通过其他方式来进行的.序列特征分析表明,在 OsCAX3 的 N 端 1~26 个氨基酸中存在着两个可能的肉豆蔻酰化位点,分别是 GAFK 和 GGLR,我们推测在 OsCAX3 对其 Ca^{2+} 转运的调控中, N 端的肉豆蔻酰化可能起重要的作用.

致谢 感谢 Hirsch 博士、Ning Hui Cheng 博士和 Cunningham 博士为我们提供了酵母菌株 K667.感谢北京大学第三附属医院泌尿科医生们帮我们购买 FK506.感谢陈叶苗博士为我们提供 pBI221-GFP 载体.

参 考 文 献

- Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Calcium at the crossroad of signaling. *Plant Cell*, 2002, **14** (Suppl): S401~S417
- Curran A C, Hwang I, Corbin J, *et al.* Autoinhibition of a calmodulin-dependent calcium pump involves a structure in the stalk that connects the transmembrane domain to the ATPase catalytic domain. *J Biol Chem*, 2000, **275** (39): 30301~30308
- White P J, Broaley M R. Calcium in plant. *Annals of Botany*, 2003, **92** (4): 487~511
- Kennedy D. The Importance of Rice. *Science*, 2002, **296** (5565): 13
- Waditee R, Hossain G S, Tanaka Y, *et al.* Isolation and functional characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters from cyanobacteria. *J Biol Chem*, 2004, **279** (16): 4330~4338
- Cunningham K W, Fink G R. Calcineurin inhibits VCX1-dependent $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} -ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (5): 2226~2237
- Ueoka-Nakanishi H, Nakanishi Y, Maeshima M. Properties and molecular cloning of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in the vacuolar membrane of mung bean. *Eur J Biochem*, 1999, **262** (2): 417~425
- Mäser P, Thomine S, Schroeder J I, *et al.* Phylogenetic relationships within cation-transporter families of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 2001, **126** (4): 1646~1667
- Hirschi K D, Zhen R G, Cunningham K W, *et al.* CAX1, an $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (16): 8782~8786
- Pittman J K, Hirschi K D. Regulation of CAX1, an *Arabidopsis* $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter: identify cation of an N-terminal autoinhibitory domain. *Plant Physiol*, 2001, **127** (3): 1020~1029
- Cheng N H, Pittman J K, Shigaki T, *et al.* Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* $\text{H}^{+}/\text{Cation}$ antiporter. *Plant Physiol*, 2002, **128** (4): 1245~1254
- Pittman J K, Shigaki T, Cheng N H, *et al.* Mechanism of N-terminal autoinhibition in the *Arabidopsis* $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter CAX1. *J Biol Chem*, 2002, **277** (29): 26452~26459
- Shigaki T, Cheng N H, Pittman J K, *et al.* Structural determinants of Ca^{2+} transport in the *Arabidopsis* $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ antiporter CAX1. *J Biol Chem*, 2001, **276** (46): 43152~43159
- Kamiya T, Maeshima M. Residues in internal repeats of the rice Cation/ H^{+} exchanger are involved in the transport and selection of cations. *J Biol Chem*, 2004, **279** (1): 812~819
- Blumwald E, Poole R J. Kinetics of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol*, 1986, **80** (3): 727~731
- Kasai N, Muto S. Ca^{2+} pump and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from maize leaves. *J Membr Biol*, 1990, **114**: 133~142
- Ettinger W F, Clear A M, Fanning K J, *et al.* Identification of a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport in the plant chloroplast thylakoid membrane. *Plant Physiol*, 1999, **119** (4): 1379~1385
- Hirsch K D. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell*, 1999, **11** (11): 2113~2122
- Hirsch K D, Korenkov V D, Wilganowski N L, *et al.* Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol*, 2000, **124** (1): 125~134
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, **15** (4): 473~497
- Sze H, Liang F, Hwang I, *et al.* Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, **51** (1): 433~462
- 田秀红. 水稻 DREB 转录因子基因的克隆及相关研究. [博士论文]. 北京: 中国农业大学, 2004
- Tian X H. Identification and characterization of DREB genes from rice (*Oryza sativa* L.). [doctoral dissertation]. Beijing: China Agricultural University, 2004
- Sheen J. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 2001, **127** (4): 1466~1475
- Kyte J, Doolittle R R. A simple method of displaying the hydropathic character of protein. *J Mol Biol*, 1982, **157** (1): 105~132
- Shigaki T, Pittman J K, Hirschi K D. Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/ H^{+} antiporter CAX2. *J Biol Chem*, 2003, **278** (8): 6610~6617

Functional Analysis of Rice $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporter OsCAX3 in Yeast and Its Subcellular Localization in Plant*

QI Bi-Shu, LI Chun-Guang, CHEN Ye-Miao, LU Ping-Li, HAO Fu-Shun,

SHEN Guo-Ming, CHEN Jia, WANG Xue-Chen**

(College of Biological Science, China Agricultural University,

State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Beijing 100094, China)

Abstract $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters play important roles in plant nutrition and signal transduction. A novel $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters gene *OsCAX3* was identified from rice. Sequence analysis revealed that OsCAX3 has 11 transmembrane domains, and an acid motif consisting of 17 amino acids between sixth and seventh transmembrane domains. When expressed in yeast, OsCAX3 complemented the mutant growing deficiency at high Ca^{2+} concentrations, and its N-terminal(1~26 amino acid) partially suppressed its ability to transport Ca^{2+} . RT-PCR analysis showed that *OsCAX3* mRNA was induced by exogenous calcium. OsCAX3 was predicted to localize in plant plasma membrane by PSORT prediction, and this was further confirmed by transiently expressing OsCAX3-GFP fusion protein in mesophyll cell protoplast of *Arabidopsis*. All these findings strongly suggested that OsCAX3 is a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter located in plasma membrane.

Key words rice, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter, RT-PCR, protoplast, transient expression

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2006 CB100100, 2003 CB114300) and The National Natural Sciences Foundation of China (30370129, 30421002).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62732706, Fax: 86-10-62733450, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

Received: April 22, 2005 Accepted: June 29, 2005