

拟南芥中 MATE 基因家族的研究进展

吴平治, 栾升, 李东屏

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要:多药和有毒化合物排出家族(Multidrug and Toxic Compound Extrusion, MATE)是一个新的次级转运蛋白家族,此类转运蛋白对氨基葡萄糖、阳离子染料、多种抗生素和药物有转运作用。拟南芥中的 MATE 基因家族是一个多基因家族,大概由 56 个成员构成,文章综述了拟南芥中 MATE 家族基因的研究进展,包括 3 个方面:第一是拟南芥中 MATE 家族成员的构成及主要特征;第二描述了转运蛋白的主要功能;第三分析了其功能多样的大致原因。此外,还展望了此家族研究的一些前景。

关键词:拟南芥;突变体;MATE 家族

中图分类号:Q943 文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2006)07-0906-05

Advances in the Study of MATE Gene Family in *Arabidopsis*

WU Ping-Zhi, LUAN Sheng, LI Dong-Ping

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: A new family of secondary transporters is referred to as the MATE (multidrug and toxic compound extrusion) family. These proteins mediate resistance to a wide range of cationic dyes, aminoglycosides and other structurally diverse antibiotics and drugs. MATE represents a large multigene family in *Arabidopsis*. At least 56 distinct genes were identified. This paper reviewed the research progress in *Arabidopsis* in three aspects. The first is the constitutes and the characteristics of this family in *Arabidopsis*. The second describes the major transport function. And, the third is about the explanation for function diversity of the gene family. The prospects of the research on this family are also viewed in this article.

Key words: *Arabidopsis*; mutant; MATE family

在植物的生长发育过程中,生成和积累大量的代谢产物,包括一些内源有毒化合物;同时植物的不可移动性使其暴露于许多外源有毒化合物,如农用化学物(杀虫剂等)和其他植物或病原微生物分泌的有毒化合物等。处理和解毒包括内源的和外源的有毒化合物对植物的生长和发育非常重要,几种可能的解毒途径包括:由内源酶修饰有毒化合物^[1];螯合至液泡^[2,3];转运出细胞外^[4,5]。

已有的研究表明,在生物中有 4 类输出转运蛋

白,包括:1. 主要促进因子超家族(MFS);2. 小基因多药物抗性家族(SMR);3. 抗性/结瘤/细胞分裂(RND)家族;4. ATP 结合盒(ABC)超家族。MFS, SMR 和 RND 家族是次级转运蛋白家族;而 ABC 家族成员经常被认为是初级转运蛋白^[4,6],其由 ATP 提供能量。ABC 家族已在细菌、酵母、动物和植物中被发现,SMR 和 RND 仅在细菌中被发现^[4],而最特别的是 MFS 转运蛋白类型,它们有 12~14 个跨膜区(TMDs),涉及到各种底物的共转运,反向转运,单向

收稿日期:2005-06-23;修回日期:2005-10-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30470972)[Supported by National Nature Science Foundation of China (No. 30470972)]

作者简介:吴平治(1980—),男,在读硕士生,专业方向:植物分子遗传学。E-mail:wpzh80@163.com

通讯作者:李东屏(1966—),男,副教授,研究方向:植物分子遗传学。Tel:0731-8872724

转运,如糖、Krebs 循环中间物、磷脂、寡糖、抗生素等的转运^[7]。NorM 和 YdhE 是存在于细菌中具较高序列同源性的多药转运蛋白^[8],NorM 可能是 Na⁺/毒素反向转运蛋白^[9],它有 12 个跨膜区,因此以前被归于 MFS 家族,然而,这些蛋白与 MFS 家族成员间既无序列同源性,也缺乏 MFS 家族成员特有的信号序列^[7],因此,Brown M H 等^[6]把 NorM 和 YdhE 命名为一个新的次级转运蛋白家族—多药和有毒化合物排出家族(MATE),成为生物中第 5 类输出转运蛋白。

1 MATE 基因家族的特征基因

MATE 基因家族成员遍布于古细菌、细菌、酵母、动物、植物,大部分成员都有 12 个跨膜区,此类转运蛋白对氨基葡萄糖、阳离子染料、多种抗生素和药物有转运作用。MATE 家族包括 203 个已经完成测序的蛋白^[10],其中最大的转运体来自真核生物,而

最小的来自古细菌^[11]。对超过 70 个转运蛋白的家族的大量系统发育研究发现,转运蛋白质特异性与系统发育相关,MATE 家族的系统发育分析发现此家族有 3 个不同的簇(第 1、2、3 簇)^[6],表明这三个簇可能在某些方面存在区别。第 1 簇有细菌多药排出蛋白 NorM 和 YdhE 等,来自嗜血杆菌属、芽孢杆菌属、集胞蓝细菌属等;第 2 簇独特地由真核蛋白组成,包括真菌、植物等,其中,酵母中的 Erc1 蛋白对甲硫氨酸的类似物乙硫氨酸有抑制作用;第 3 簇包括 DinF 蛋白(来自大肠杆菌和肺炎链球菌)以及这些蛋白的同源物(来自真细菌和古细菌)。

NorM 基因(副溶血弧菌中)是功能描述最好的 MATE 家族成员,它编码一个 Na⁺/毒素反向转运蛋白,对一些无联系的抗生素比如 Norfloxacin、卡那霉素、链霉素和一些有毒物质(溴化乙锭等)有转运作用^[8],表 1 列出了几个 MATE 家族成员的功能。

表 1 几个 MATE 家族成员功能描述

Table 1 Function description of several members in MATE family

生物体 Organism	基因名称(序列号) Gene name (Accession number)	生理功能 Physiological function	参考文献 References
拟南芥 <i>Arabidopsi thaliana</i>	<i>Alf5</i> (BAB02774)	转运四甲铵等 Transport tetramethylammonium etc	[12]
副溶血弧菌 <i>Vibro parahaemolyticus</i>	<i>NorM</i> (O82855)	转运 norfloxacin、卡那霉素链霉素及一些有毒物质 Transport norfloxacin,kanamycin, streptomycin, and some toxic compounds	[8]
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	<i>ydhE</i> (P37340)	转运 ciprofloxacin、黄连素、卡那霉素、链霉素、溴化乙锭等 Transport ciprofloxacin, berberine, kanamycin, streptomycin, and EB etc.	[8]
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Erc1</i> (382954)	转运乙硫氨酸 Transport ethionine	[13]

2 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 MATE 家族成员的构成

通过序列同源性分析,在拟南芥中鉴定出了一个大的基因家族,至少有 56 个基因属于 MATE 基因家族,Li L 等^[14]将其命名为 *AtDTX1-AtDTX56*,这些基因大致可分为 5 个簇:第 1 簇包括 19 个基因,第 2 簇由 22 个基因构成,第 3 簇有 6 个基因,第 4 簇 8 个基因,第 5 簇只有 1 个基因。其中第 1 条染色体上有 21 个成员,第 2 条染色体上有 10 个基因,第 3 条染色体上 7 个基因,第 4 条染色体上有 9 个

基因,第 5 条染色体上 9 个基因。有些基因在同一条染色体上呈串联排列,在同一个串联上的基因往往同源性较高,并且会归为同一个簇,说明他们是由一个基因复制来的,这些成员的亲源系统树见图 1。这些成员预测的蛋白质构成大概从 414 个氨基酸到 539 个氨基酸,亲水性分析发现,除了第 3 簇的基因编码的蛋白质为 8~13 个跨膜区外,其他的基因均含有 12 个跨膜区。不同簇的基因其序列匹配表明,最保守的序列为第 2 和第 3 个跨膜区的 CGQA 及第 8 个跨膜区的 RVSXNLGA 序列。

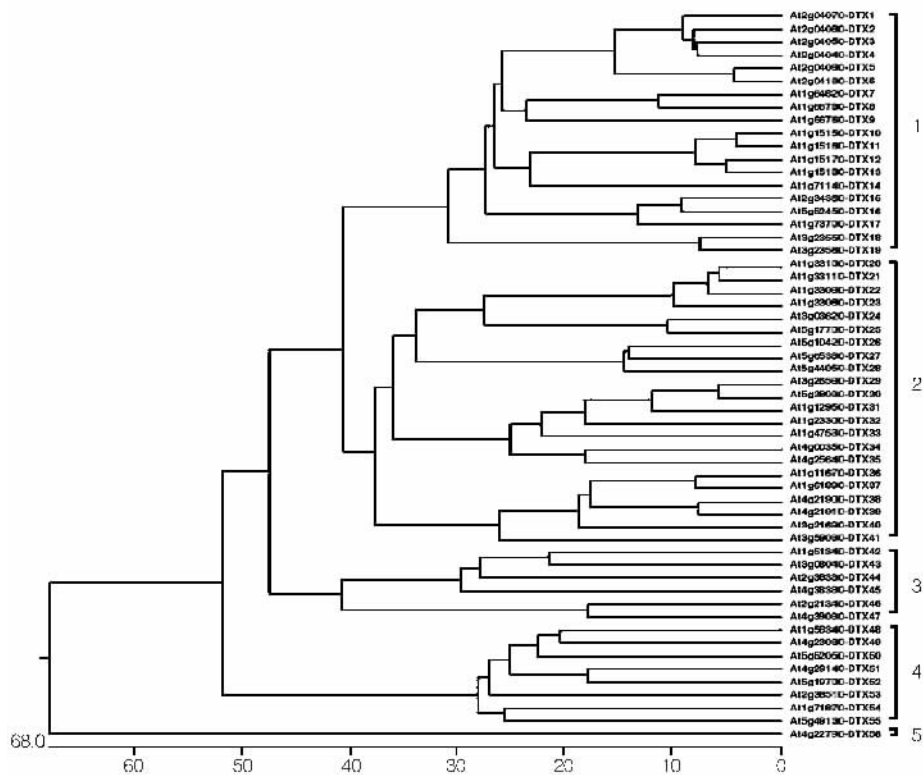


图 1 拟南芥 MATE 家族系统进化树

表明了 *AtDTX1-AtDTX56* 之间的关系, 总共分为 5 簇, 系统树是应用 DNASTar DNA 分析软件的 ClustalX 项目, 把每个成员的多肽序列做的配对^[14]。

Fig. 1 Phylogenetic tree of MATE family in *Arabidopsis*

Phylogenetic tree shows the relationship of *AtDTX1-AtDTX56*, five clusters are indicated and numbered.

The tree was built upon a multiple alignments of polypeptide sequences using the clustal X program (DNASTar DNA analysis software)^[14].

3 拟南芥 MATE 家族基因的生理功能以及取得的进展

拟南芥 MATE 家族是一个多基因家族, 其序列的多样性以及表达模式等的不同决定了它们对不同的物质有转运活性, 从最近的研究进展可以看出, MATE 家族不同的转运蛋白行使不同的功能。

3.1 转运四甲铵

Diener A C 等^[12]由突变体材料表型筛选 *ALF5* (*At3g23560*) 功能时发现, 当此基因的突变体材料生长于含 Bacto 琼脂粉的 MS 培养基上时, 突变体材料的侧根从主根外侧形成后就停止了伸长, 而野生型材料的根生长很正常。进一步研究确定, 此基因的突变会使其对一些抑制性化合物更加敏感, 比如一些商业琼脂中的污染物。此基因在拟南芥根的表皮中表达, 能够保护根, 而使其避免受到一些抑制

性化合物的影响。当把 *ALF5* cDNA 在酵母中表达时, 可以检测到酵母对四甲铵有抑制作用, 把此基因融合至 β -葡糖醛酸酶报告基因, 然后通过荧光检测, 可以看到此基因在根的表皮中有强的表达, 与表型非常一致。由此可得, 其编码的蛋白能转运四甲铵。

3.2 转运类黄酮

Debeaujon I 等^[15]通过其突变体材料表型筛选 *TT12* (*At3g59030*) 的功能发现, 突变体材料的种子颜色呈灰褐色, 通过显微镜观察发现, 在突变体材料发育中或成熟的种子内表皮细胞的液泡中, 原花色素堆积有比较显著的减少。通过 *TT12* 与其他突变体材料的双突变体分析, 确定 *TT12* 影响类黄酮的生物合成途径。此基因编码的蛋白质与其他真核与原核生物中的 MATE 家族成员有相似性, 有 12 个跨膜区。 *TT12* 特异性表达于胚珠和发育中的种子

中, *TT12* 可能控制种子内表皮细胞中液泡对类黄酮的整合, *TT12* 蛋白能将类黄酮转运至种子内表皮的液泡中。

3.3 转运水杨酸或其前体

此基因为 *EDS5* (*At4g39030*), *EDS5* 编码的蛋白质可能含有 9~11 个跨膜区, 并且在 N 末端有一个螺旋区。 *eds5* 植株对某些细菌病原体异常敏感, 当病原体侵染后表现出比较低的水杨酸含量。 *EDS5* 可能的生理功能为转运水杨酸或其前体^[16]。

3.4 转运生物碱如黄连素、溴化乙锭, 重金属等

AtDTX1 (*At2g04070*) 基因功能是 Li L 等^[14] 通过功能互补实验筛选得到的, 其将 cDNA 构建到表达载体 pTrc99A 上, 转化至菌株 KAM3 (大肠杆菌的一种, 是由 TG1 菌株缺失 *AcrAB* 基因而衍化来的, 此基因对多种药物和有毒物质有抑制作用) 中被诱导表达。通过互补实验发现, 此基因在 KAM3 中作为一个排出载体, 能够转运从植物分离的一些生物碱如黄连素和小檗碱; 转运一些抗生素如 Norfloxacin 等; 转运一些有毒的化合物比如溴化乙锭等; 它还能转运一些重金属比如 Cd^{2+} 等。序列分析表明其具有 12 个跨膜区。把其 cDNA 构建至 pMD1-GFP 上, 通过荧光显微镜观察, 发现其定位于质膜上, 由此可以确定, 此基因编码的蛋白从细胞质中排出生物碱和内源有毒化合物。

3.5 转运铁离子

FRD3 (*At3g08040*), Rogers E E 等^[17] 从它的突变体材料的表型和功能分析看, 说明 *FRD3* 是关系拟南芥内环境中铁离子稳定的重要组件, 此基因在根内的表达水平可以检测到, 但在苗里却很少能够检测到它的表达。最新的研究表明, 它在根中特异性表达, 它可能在根的木质部装载铁整合剂或其他将铁排出木质部及质外体空间所必需的部件, 从而将足够的铁从根运至叶肉细胞^[18]。

综上所述, 拟南芥中 MATE 家族成员大部分都是运用反义遗传学的原理, 通过与野生型拟南芥对照筛选突变体材料的表型进而得出其转运功能的, 如 *TT12*、*FRD3*、*EDS5*, 而 *ALF5* 是将其 cDNA 构建至表达载体上, 进而在酵母中将其表达, 然后测定其转运水平的。而正如大部分细菌或酵母中 MATE 家族基因的研究, *AtDTX1* 的研究运用 KAM3 突变株互补系统, 利用功能互补实验检测其转运功能, 因为 KAM3 是大肠杆菌突变株, 其缺失了 *AcrAB* 多药转

运系统, 将目的 cDNA 构建至表达载体, 然后转入 KAM3 中, 通过互补 KAM3 的功能而得出目的 cDNA 的转运功能。但除 *AtDTX1* 外, 其他成员的研究只停留在通过表型或简单的转运测定而推测其功能, 而并没有通过观察其亚细胞定位及检测基因的组织表达特异性而确定其表达模式, 并没有将转运功能与亚细胞定位结合起来了解基因的具体转运原理。

4 拟南芥中 MATE 基因功能多样性的可能原因

4.1 整个大家族中不同簇成员的序列多样性表明其结构特征上的多样性

虽然同簇的序列相似性比较高, 但与不同簇的成员比较, 序列同源性将大大降低, 这些结构多样性可能导致功能的不同。如果发现同簇或异簇内成员如果起相同的或相反功能将是一件有趣的事情。

4.2 基因表达模式和亚细胞定位的不同可能引起功能的差异

不同的 MATE 家族基因在不同组织的表达模式和植物的不同发育时期是不一样的, 不同的表达模式反映不同的功能, 比如 *TT12* 可能是一个液泡膜转运体使类黄酮转运入液泡中, 而比如如果用 PSORT (psort.nibb.ac.jp) 定位 *At1g58340* 可能定位于叶绿体上。植物细胞有很多组成部分可能是次级代谢产物的储存地, 需要此些化合物处于代谢过程中, 所以需要不同的基因行使不同的功能。

4.3 功能多样性可能归功于 MATE 成员的底物特异性

由 *AtDTX1* 的转运功能可以看出, *AtDTX1* 转运一个很大范围的物质, 包括 Norfloxacin、溴化乙锭、黄连素等, 还可能转运重金属, 通过观察, *TT12* 确实转运类黄酮至液泡中, 它可能与无类黄酮转运功能的 *AtDTX1* 有不同的底物特异性。由此, 可能不同的物质是由不同的成员转运的。

5 展望

拟南芥作为很大范围内认可的拥有最简单基因组的显花植物, 一直以来作为模式植物成为研究对象, 自从基因组测序完成后, 拟南芥基因功能的研究成为比较热门的话题。近几年, MATE 家族的研究进展比较快, 在酵母、细菌等中都有很多成员的报道, 拟南芥中也有比较多的描述, 通过遗传筛选和基

因转运功能的测定,初步确定了一些基因的转运功能,但在其转运机制的研究方面还是比较少,包括其转运的具体机理等都没有很多研究。同时,转运蛋白的结构方面的研究也很少涉及,没有将功能与其结构结合起来,随着研究的不断深入,比如蛋白质突变技术的引入,可能在与转运特性相关的关键氨基酸方面取得比较大的突破。

参 考 文 献 (References):

- [1] Dixon D P, Cummins L, Cole D J, Edwards R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1(3):258~266.
- [2] Yelin R, Rotem D, Schuldiner S, Emr E. A small Escherichia coli multidrug transporter, protects *Saccharomyces cerevisiae* from toxins by sequestration in the vacuole. *J Bacteriol*, 1999, 181(3):949~956.
- [3] Liu G, Sanchez-Fernandez R, Li Z S, Rea P A. Enhanced multi-specificity of arabidopsis vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2. *J Biol Chem*, 2001, 276(12):8648~8656.
- [4] Putman M, van Veen H W, Konings W N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(4):672~693.
- [5] Zgurskaya H I, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol*, 2000, 37(2):219~225.
- [6] Brown M H, Paulsen I T, Skurray R A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol*, 1999, 31(1):394~395.
- [7] Pao S S, Paulsen I T, Saier M H Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(1):1~34.
- [8] Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(7):1778~1782.
- [9] Morita Y, Kataoka A, Shiota S, Mizushima T, Tsuchiya T. NorM of *vibrio parahaemolyticus* is an Na⁽⁺⁾-driven multidrug efflux pump. *J Bacteriol*, 2000, 182(23):6694~6697.
- [10] Hvorup R N, Winnen B, Chang A B, Jiang Y, Zhou X F, Saier M H Jr. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur J Biochem*, 2003, 270(5):799~813.
- [11] Chung Y J, Krueger C, Metzgar D, Saier M H Jr. Size comparisons among integral membrane transport protein homologues in bacteria, Archaea, and Eucarya. *J Bacteriol*, 2001, 183(3):1012~1021.
- [12] Diener A C, Gaxiola R A, Fink G R. Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell*, 2001, 13(7):1625~1638.
- [13] Shiomi N, Fukuda H, Murata K, Kimura A. Improvement of S-adenosylmethionine production by integration of the ethionine-resistance gene into chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 42(5):730~733.
- [14] Li L, He Z, Pandey G K, Tsuchiya T, Luan S. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *J Biol Chem*, 2002, 277(7):5360~5368.
- [15] Debeaujon I, Peeters A J, Leon-Kloosterziel K M, Koornneef M. The TRANSPARENT TESTA12 gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*, 2001, 13(4):853~871.
- [16] Nawrath C, Heck S, Parinthewong N, Metraux J P. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell*, 2002, 14(1):275~286.
- [17] Rogers E E, Guerinot M L. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2002, 14(8):1787~1799.
- [18] Green L S, Rogers E E. FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2004, 136(1):2523~2531.