

ABC 转运蛋白介导离子跨膜运输的研究进展

郜红建^{1,2}, 广敏¹, 徐佳佳², 史书林¹

(1. 安徽农业大学资源与环境学院农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室, 合肥 230036;

2. 安徽农业大学茶与食品科技学院茶树生物学与资源利用省部共建国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白) 是一类大量存在于原核生物及真核生物的跨膜转运蛋白, 其种类繁多、家族庞大且功能多样, 主要功能是利用 ATP 水解产生的能量将底物进行逆浓度梯度跨膜运输, 同时还参与抗原传递、信号传导和细胞解毒等很多重要的生物生理过程。综述了 ABC 转运蛋白的结构特点、跨膜吸收机制及影响因素, 为研究 ABC 转运蛋白跨膜吸收转运养分离子及其抵抗非生物逆境胁迫提供理论支撑和研究思路。

关键词: ABC 转运蛋白; 跨膜运输; 离子吸收; 机制

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0491-05

Research progress of ABC transporter mediated ion transmembrane transportation

GAO Hongjian^{1,2}, GUANG Min¹, XU Jiajia², SHI Shulin¹

(1. Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention, School of Resources and Environment of Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, School of Tea and Food Science and Technology of Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: ATP-binding cassette transporter is a type of transmembrane transporter family and is ubiquitously found in prokaryotes and eukaryotes. It has a wide variety, a large family and diverse functions, whose main function is to transport the substrate through the reverse concentration gradient across the membrane by using the energy generated by ATP hydrolysis. It also participates in many important physiological processes such as antigen transfer, signal transduction and cell detoxification and etc. In this paper, the structural characteristics, transmembrane transportation mechanism and influencing factors of ABC transporters were reviewed. It provides a theoretical basis and research ideas for studying the ABC transporters mediated ions transmembrane transportation and resistance to abiotic stress in plants.

Key words: ABC transporters; transmembrane transportation; ions absorption; mechanisms

ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters) 是到目前发现最大、最古老的转运蛋白家族之一, 在真核生物和原核生物中均大量存在。ABC 转运蛋白结构中均有腺苷三磷酸 (ATP) 结合盒存在, 其通过水解 ATP 释放的能量来转运底物, 因此称之为腺苷三磷酸结合盒转运蛋白^[1]。ABC 转运蛋白转运的底物种类很多, 包括金属离子、糖类、氨基酸、核苷酸和维生素等无机和有机小分子, 以及多肽、蛋白质、寡核苷酸、细胞代谢产物和药物等各类有机大分子化合物, ABC 转运蛋白还参与细

胞解毒、脂质稳态、信号转导、病毒防御以及抗原呈递等许多重要的生理过程^[2-3]。

ABC 转运蛋白家族在哺乳动物和微生物已经有了广泛的研究, 而在植物上还是一个相对较新的研究领域。20 世纪 90 年代初, 在国际上开始有人报道了第一个从模式植物拟南芥中挖掘出来的 ABC 转运蛋白 AtABCB1, 而后就引起了研究者们对 ABC 转运蛋白的研究兴趣^[4]。近十几年来, 伴随着拟南芥全基因组测序已经完成, 现在有 20 多种植物的 ABC 转运蛋白已经被鉴定出来。现有的研究

收稿日期: 2018-01-31

基金项目: 安徽省自然科学基金青年项目 (1808085QC56) 资助。

共同第一作者简介: 郜红建, 教授, 博士生导师。E-mail: hjgao@ahau.edu.cn 广敏, 硕士。E-mail: 1289922567@qq.com

均表明了, 绝大部分的 ABC 转运蛋白都是通过利用 ATP 水解释放的能量来对各类物质进行跨膜转运, 进而影响植物体内的一系列生理活动, 保证生命活动可以正常进行。

1 ABC 转运蛋白的结构组成及性质

在原核生物中, ABC 转运蛋白定位于质膜上, 其 ATP 的水解发生在细胞质一侧; 而在真核生物中, ABC 转运蛋白在细胞质膜和细胞器膜上均有分布。ABC 转运蛋白的 ATP 水解除发生在线粒体和叶绿体膜上的基质外, 大部分都发生在胞质侧。通常, 研究者们将发生 ATP 水解的一侧称为顺式面, 另一侧则被称作反式面^[5]。

根据物质在细胞膜上的转运方向可将 ABC 转运蛋白分为内向转运蛋白 (importer) 和外向转运蛋白 (exporter)^[6]。微生物或植物体通过内向转运蛋白吸收无机离子、糖类、氨基酸和多肽等营养物质, 来维持其正常的生命活动; 与此同时, 外向转运蛋白将植物体产生的代谢副产物或积聚的重金属离子等有毒有害物质排出细胞外, 参与维持渗透压、解毒等生理过程^[7-8]。

ABC 转运蛋白家族在结构组成上非常保守, 从结构上来看, 其具有 2 个核苷酸结合蛋白 (nucleotide-binding domains, NBD) 和 2 个跨膜蛋白 (transmembrane domains, TMD), 其中 NBD 位于细胞膜内侧行使 ATP 水解酶的功能, 为物质的转运提供能量; TMD 组成物质跨膜转运的通道, 识别并使底物通过磷脂双分子层 (图 1)。NBD 在 ABC 转运蛋白家族中具有高度相似性和多个保守基序, 使其成为判定 ABC 转运蛋白的一个重要标记。

参与转运的 NBD 是 ABC 转运蛋白的驱动区域, 其在结构上由类似 RecA 的子域和 α -螺旋子域组成。NBD 中多个保守基序均具有特殊的功能, 包括高度保守的 Walker A 和 Walker B 序列以及较不保守的 LSGGQ 基序、H 环和 Q 环, 其中最重要的是位于类 RecA 蛋白子域的 Walker A 基序; 在 ATP 结合状态下与核苷酸结合的 LSGGQ 基序则位于 α -螺旋形子域。同时可以在 NBD 的 X 射线晶体结构中看到这些子域保守折叠, 在 ABC 转运蛋白中的排列也是保守的^[5,9]。TMD 在基本序列、长度、结构和跨膜螺旋数量方面与 NBD 差异很大, 且晶体结构具有不同的折叠和拓扑结构。TMD 一般含有 12~20 个跨膜 α -螺旋形成的溶质跨膜孔隙, 其结构和序列因转运底物的不同而具有多样性^[10-12]。其中 2 个 NBD 结构域用来结合 ATP, 在 ATP 水解后 NBD

构象也发生改变, 进而激活了 ABC 转运蛋白跨膜转运的整个过程, 然而 2 个 TMD 结构域却形成了一个底物跨膜通道孔隙, 并利用 NBD 释放的能量使底物穿过脂质双分子层, 最终实现了物质跨膜转运。

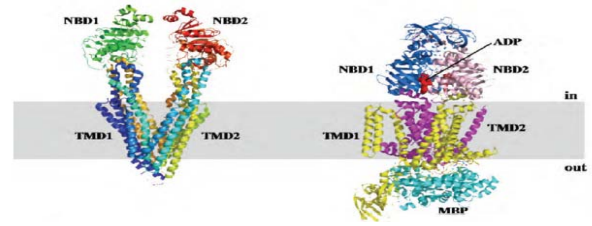


图 1 ABC 转运蛋白的结构组成(根据参考文献[5]修改)
Figure 1 Structural composition of the ABC transporter(cited and revised from reference 5)

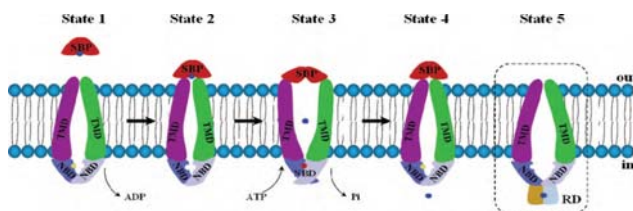
ABC 转运蛋白根据其结构域的组织形式可分为全分子 ABC 转运蛋白、半分子 ABC 转运蛋白和 1/4 分子 ABC 转运蛋白, 其中全分子 ABC 转运蛋白包含 2 个 NBD 和 2 个 TMD, 这 4 个结构域整合到一起执行其跨膜转运的功能。已经有相关研究表明在真核生物 ABC 转运蛋白中, 这 4 个结构域以正向的 TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 或者反向的 NBD1-TMD1-NBD2-TMD2 方式连接在 1 条多肽分子上, 构成全分子 ABC 转运蛋白。而另一些 ABC 转运蛋白却仅有 1 个 NBD 和 1 个 TMD, 将其称为半分子 ABC 转运蛋白, 它们需要通过形成同二聚体、异二聚体或多聚体等结构来实现此物质转运功能。当 NBD 和 TMD 分别存在于不同多肽上的转运蛋白称为 1/4 分子 ABC 转运蛋白。除此之外, 还有一部分 ABC 转运蛋白没有物质跨膜转运功能, 而是参与基因表达的转录和调控、DNA 修复等细胞过程^[1,3,9,13-14]。

NBD 三维结构保守, X 射线晶体结构显示, 2 个 NBD 形成对称二聚体结构, 2 个 ATP 分子夹在二聚体的界面, 称为“三明治二聚体”模型。ATP 分子同时与 NBD1 的 P 环和 NBD2 的 LSGGQ 基序相结合。有 ATP 结合时的三明治二聚体结构和无 ATP 结合时的单体或二聚体的晶体结构均显示, ATP 依赖型的 NBD 二聚化是驱使 TMD 构象变化的一个重要因素^[5,15-16]。

2 ABC 转运蛋白的跨膜吸收过程

现在, 根据 ABC 转运蛋白的结构和生物生理等研究结果提出了一个更为研究者们所接受的假说: ABC 转运蛋白采用“ATP 开关”和“交替开放”2 种模型的混合方式进行底物的跨膜转运功能^[15], 底

物结合位点在转运蛋白向内开放及向外开放 2 种构象中交替变化, 转运的方向由这 2 个构象对底物的相对亲和力决定。底物从细胞膜外向细胞内转运的具体过程是: ABC 转运蛋白的 2 个 TMD 间有一个亲水性通道孔隙, 在转运底物前, 靠近膜外的通道口处于开放状态, 靠近膜内的通道口处于关闭状态; 在进行底物跨膜转运时, 膜外结合蛋白结合底物后并将其传送给 TMD, 同时把信号传递到 NBD, NBD 在水解 ATP 后, 其构象发生变化并将信号传递到 TMD, TMD 的构象亦发生变化; 底物被送到通道孔隙中后, 朝向外周质的通道口随即关闭, 朝向胞质的通道口随即开放, 底物进入细胞内。而底物从细胞内转运到细胞外时, 除 ABC 转运蛋白上的内外通道口开放顺序相反外, 其他转运过程都基本一致^[16-17] (具体转运过程如下图 2 所示)。



SBP(Substrate binding protein): 底物结合蛋白; RD (Regulatory domain): 调节区域; 小球代表底物

图 2 内向 ABC 转运蛋白转运机理模型图(根据参考文献 [17]修改)

Figure 2 Model diagram of the transport mechanism of the inward ABC transporter (cited and revised from reference 17)

对于内向转运蛋白, 其向外开放的构象对底物结合具有较高的亲和力。其结合 ATP 后, NBD 二聚体形成紧密的三明治结构, 使得 TMD 进行重排, 进而 ABC 转运蛋白由内向开放转变成外向开放的构象。而外向转运蛋白, 则与内向转运蛋白相反, 其向外构象对底物结合具有较低的亲和力, NBD 关闭就足以驱动蛋白转换成外向开放的构象, 但内向转运蛋白则需要底物结合的 SBP (Substrate binding protein, 底物结合蛋白) 来实现构象的转换^[18]。SBP 的结合可以显著激活转运蛋白的 ATP 酶水解活性, 虽然转运蛋白与 SBP 的结合时间短暂, 但 SBP 与 ATP 及底物的结合能够稳定它们之间的相互作用^[19-21]。不管是在内向开放还是在外向开放的构象转换过程中, 转运蛋白都会发生 TMD 参与的结构重排。

除此之外, 许可等^[22]还提出了叶酸 ECF 型 (energy-coupling factor, ECF) ABC 转运蛋白的转

运模型: 在 ABC 转运蛋白结构呈外向构象时, 叶酸结合蛋白的 6 个 α -螺旋结构与细胞膜垂直, 底物结合蛋白与膜外的底物识别并结合; ATP 水解后, 2 个 ATP 结合蛋白的构象变化信号通过一个跨膜蛋白传递给叶酸结合蛋白, 从而引起叶酸结合蛋白的向膜内翻转, 进入内向构象, 底物结合蛋白朝向膜内, 进而将结合的底物释放到细胞内被吸收利用。当在 ATP 重新结合或者水解后, 转运蛋白又重新回到一开始的外向构象, 进行下一轮的底物结合转运。由此可知, 底物的跨膜转运, 既可以通过“ATP 开关”和“交替开放”的模型, 又可以通过转运蛋白的内向翻转实现。

3 ABC 转运蛋白跨膜吸收离子的影响因素

3.1 抑制剂对 ABC 转运蛋白介导离子跨膜吸收影响

抑制剂对 ABC 转运蛋白跨膜吸收的影响机制可分为 3 类即: ①转运蛋白与竞争或非竞争性抑制剂相结合, 减少了与底物结合位点结合, 从而降低跨膜转运效率; ②抑制 ATP 水解与合成, 从而切断转运蛋白的能量供应, 如王玉梅等^[23]研究表明, 抑制剂 2, 4-DNP 阻碍了 ATP 的合成, 从而降低了氟在茶树根系上的转运吸收; ③改变细胞膜脂质的完整性, 从而改变细胞膜上转运蛋白环境, 如聚乙二醇在疏水环境中的干扰而导致 P-糖蛋白转运功能丧失^[24-25]。

3.2 温度对 ABC 转运蛋白介导离子跨膜吸收影响

ABC 转运蛋白在主动吸收离子过程中所释放的能量主要为离子跨膜运动提供动力, ATP 水解是其主要的能量来源。低温可以显著降低合成 ATP 所需要的丙酮酸激酶和线粒体 ATPase 等的活性, 使细胞中 ATP 的含量大幅下降, 这样 ATP 的消耗速率明显大过合成速率, 致使细胞代谢紊乱^[23]; 而高温则降低了 ATPase 和转运蛋白的活性。在一定的温度范围内, 转运蛋白跨膜吸收离子的速度随温度的升高而加快, 当超过一定温度时, 吸收速度反而下降。因此, 只有在适宜的温度下, ABC 转运蛋白才可以更好地进行物质跨膜运输。

3.3 pH 对 ABC 转运蛋白介导离子跨膜吸收的影响

研究表明, 物质的跨膜转运对 pH 有较高的依赖性, 这是因为 pH 能影响底物的存在状态、脂质通透性及 ABC 转运蛋白的功能等。Estudante 等^[26]研究表明, 槲皮素在不同 pH 条件下结构不同, 其跨膜转运方式也随之改变。多胺对 pH 较为敏感, 更适宜在偏碱性条件下通过多胺转运蛋白进行跨膜吸收^[27]。所以, 严格控制 pH 是消除 pH 对底物跨

膜转运影响的关键因素。

3.4 共存离子对 ABC 转运蛋白介导离子跨膜吸收的影响

共存阳离子和共存阴离子对离子的跨膜吸收既有竞争抑制作用,又有促进作用。抑制作用是由于共存离子结合了转运蛋白上有限的结合位点,减少了目标离子的吸收。如 Cl^- 竞争 F^- 在转运蛋白上的同一结合位点,致使其在茶树根系上的富集量减少^[23]; NO_3^- 竞争质膜上转运蛋白的同一结合位点而抑制植物对 Cl^- 的吸收,降低了叶片中 Cl^- 的浓度^[28]。共存离子主要是竞争细胞上有限的活性结合位点,从而导致对应离子的吸收减少,起到抑制作用。但也有例外,屠娟等研究发现, Cu^{2+} 的存在增加了黑根霉对 Cr(VI) 的吸附,这可能是由于 Cu^{2+} 中和了细胞壁上的电负性基团,这样就使得 Cr(VI) 更易接近细胞壁而被吸附^[29]。这些都表明了共存离子会明显影响离子的跨膜吸收过程,可通过调控共存离子的类型和浓度,促进或抑制目标离子的吸收。

4 研究展望

目前,虽然对一些 ABC 转运蛋白结构、理化性质及转运机制的研究取得了一定进展,但大多还是在动物体和微生物体上的研究为主,在植物体上的研究还有待进一步加强。可以借鉴在动物和微生物体上的研究方法,研究植物体上 ABC 转运蛋白的跨膜吸收方式、底物结合方式、水解 ATP 机制、TMD 与 NBD 之间的信号传递方式及影响因素等,为阐明 ABC 转运蛋白介导植物根系跨膜吸收养分的微观机制提供理论依据。

4.1 ABC 转运蛋白介导植物根系跨膜吸收养分离子的微观过程问题

养分离子的跨膜转运是植物生长获取养分的一个重要环节。氮磷钾等营养元素的吸收转运受到膜转运蛋白的调节,通过调控相关转运蛋白基因表达可以促进植物对养分离子的吸收。严小龙和张福锁等指出,通过改变离子转运蛋白的结构基因或对结构基因的表达调控来提高转运蛋白的离子转运能力,这将极好的改良作物的营养性状^[30]。氮磷钾等养分离离子与底物结合蛋白或一些螯合肽络合,通过 ABC 转运蛋白转运进入细胞膜,为细胞所吸收利用,而代谢抑制剂、pH、温度及共存离子等因素会影响 ABC 转运蛋白的活性,进而影响其对养分离子的转运,因此可通过调控这些影响因素来提高 ABC 转运蛋白活性。此外,可通过基因过表达调控来提高 ABC 转运蛋白离子转运能力。而目前通过

对 ABC 转运蛋白基因的表达调控来促进养分离离子转运吸收的研究还较少。

4.2 ABC 转运蛋白在植物抵抗非生物逆境中的作用机理

ABC 转运蛋白可以提高作物对干旱、盐碱、重金属、高温及低温等非生物胁迫的抗性^[31]。ABC 转运蛋白将盐离子或重金属以植物螯合肽结合物的形式转运至液泡中,并把这些离子在液泡中阻隔起来,降低这些离子对细胞的毒害。除此之外,ABC 转运蛋白亦可将离子与螯合肽结合物或裸离子直接转运出细胞膜外,从而提高细胞对这些离子的耐性^[32]。如 Kim 等^[31]证明了 ABC 转运蛋白基因 *AtABCG36* 过表达时,极大地增加了 ABC 转运蛋白输送钠离子的能力,降低细胞内钠含量并显著促进了拟南芥的抗盐性和抗旱性。目前的研究主要集中在 ABC 转运蛋白提高细胞耐性及有害离子的结合形式等方面,但对 ABC 转运蛋白的非生物胁迫解毒机制尚未有清晰、系统的认识。总之,深入研究 ABC 转运蛋白的结构及其转运机制,对理解植物抵抗非生物逆境中的作用机理具有重大的理论意义和应用价值。

参考文献:

- [1] LANE T S, REMPE C S, DAVITT J, et al. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology[J]. BMC Biotechnol, 2016, 16(1): 47.
- [2] WILKENS S. Structure and mechanism of ABC transporters[J]. F1000Prime Rep, 2015, 7: 14.
- [3] 王晓珠, 孙万梅, 马义峰, 等. 拟南芥 ABC 转运蛋白研究进展[J]. 植物生理学报, 2017, 53(2): 133-144.
- [4] DUDLER R, HERTIG C. Structure of an mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications[J]. J Biol Chem, 1992, 267(9): 5882-5888.
- [5] 刘艳青, 赵永芳. ABC 转运蛋白结构与转运机制的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(3): 223-229.
- [6] LOCHER K P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters[J]. Nat Struct Mol Biol, 2016, 23(6): 487-493.
- [7] 徐志弘, 周爱萍, 姚玉峰, 等. 结核分枝杆菌 ABC 转运蛋白与物质的跨膜转运[J]. 微生物学报, 2014, 54(6): 608-615.
- [8] LUCKENBACH T, FISCHER S, STURM A. Current advances on ABC drug transporters in fish[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2014, 165(3): 28-52.
- [9] 金宏滨, 刘东辉, 左开井, 等. 植物 ABC 转运蛋白与次生代谢产物的跨膜转运[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3): 32-37.
- [10] LOCHER K P. Structure and mechanism of ABC transporters[J]. Curr Opin Struct Biol, 2004, 14(4): 426-431.
- [11] SCHMITT L, TAMPÉ R. Structure and mechanism of

- ABC transporters[J]. *Curr Opin Struc Biol*, 2002, 12(6): 754-760.
- [12] HOLLENSTEIN K, DAWSON R J, LOCHER K P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins[J]. *Curr Opin Struc Biol*, 2007, 17(4): 412-418.
- [13] OLDHAM M L, DAVIDSON A L, CHEN J. Structural insights into ABC transporter mechanism[J]. *Curr Opin Struc Biol*, 2008, 18(6): 726-733.
- [14] THEODOULOU F L, KERR I D. ABC transporter research: going strong 40 years on[J]. *Biochem Soc T*, 2015, 43(5): 1033-1040.
- [15] JONES P M, GEORGE A M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(6): 682-699.
- [16] DE ANGELI A, THOMINE S, FRACHISSE J M, et al. Anion channels and transporters in plant cell membranes[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(12): 2367-2374.
- [17] 赵胡,李裕红.植物 ABC 转运蛋白研究综述[J].*海峡科学*,2012(2):13-16.
- [18] ORELLE C, AYVAZ T, EVERLY R M, et al. Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12837-12842.
- [19] AUSTERMUHLE M I, HALL J A, KLUG C S, et al. Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 28243-28250.
- [20] CHEN J. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1525-1530.
- [21] VIGONSKY E, OVCHARENKO E, LEWINSON O. Two molybdate/tungstate ABC transporters that interact very differently with their substrate binding proteins[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(14): 5440-5445.
- [22] 许可,赵琴,张鹏.叶酸 ECF 转运蛋白的结构和转运机制[J].*中国细胞生物学学报*,2013,35(6):747-750.
- [23] 王玉梅,柴如山,郜红建,等.茶树根系跨膜主动吸收氟的表观特征[J].*农业环境科学学报*,2016,35(8):1473-1479.
- [24] VARMA M. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement[J]. *Pharmacol Res*, 2003, 48(4): 347-359.
- [25] 杨孝育,刘存德.水稻幼苗的低温伤害及其与腺苷酸代谢的关系[J].*植物生理学报*,1988,14(4):344-349.
- [26] ESTUDANTE M, MORAIS J G, SOVERAL G, et al. Intestinal drug transporters: an overview[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65(10): 1340-1356.
- [27] 王贵鸿,马容,康波,等.多胺跨膜物质转运的机制[J].*动物营养学报*,2014,26(11):3245-3250.
- [28] TEAKLE N L, TYERMAN S D. Mechanisms of Cl-transport contributing to salt tolerance[J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(4): 566-589.
- [29] 屠娟,张利,赵力,等.非活性黑根霉菌对废水中重金属离子的吸附[J].*环境科学*,1995,16(1):12-15.
- [30] 严小龙,张福锁.植物营养遗传学[M].北京:中国农业出版社,1997.
- [31] KIM D Y, JIN J Y, ALEJANDRO S, et al. Overexpression of AtABCG36 improves drought and salt stress resistance in *Arabidopsis*[J]. *Physiol Plantarum*, 2010, 139(2): 170-180.
- [32] 曹冠华,柏旭,陈迪,等.ABC 转运蛋白结构特点及在植物和真菌重金属耐性中的作用与机制[J].*农业生物技术学报*,2016,24(10):1617-1628.