拟南芥NHX5和NHX6: 离子平衡与蛋白质运输

邱全胜*

兰州大学生命科学学院, 兰州 730000

* 联系人, E-mail: qiuqsh@lzu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-20; 接受日期: 2017-01-20; 网络发表日期: 2017-4-20

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB429904)、国家自然科学基金(批准号: 31571464, 31371438)和教育部博士点专项基金(批准号: 20130211110001)资助

摘要 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtNHX5和AtNHX6离子转运特性和生物功能的研究取得了重要进展. AtNHX5和AtNHX6属于内膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向交换体(NHX), 定位于高尔基(Golgi), 反面高尔基网(TGN)和多胞体/液胞前体(MVB/PVC). 研究表明, AtNHX5和AtNHX6在调控细胞 Na^+/K^+ 和pH平衡以及耐盐胁迫和钾营养等方面起着重要的作用. AtNHX5和AtNHX6跨膜结构域存在保守的酸性氨基酸残基; 这些保守的酸性氨基酸残基调控着AtNHX5和AtNHX6的离子转运活性, 从而调节植物的生长发育. 最近研究发现, AtNHX5和AtNHX6调控着蛋白质向液胞的运输过程. 并且发现, AtNHX5和AtNHX6在许多环节上调控着蛋白质的运输过程: AtNHX5和AtNHX6可能调控着液胞分选受体(VSR)与运输物的结合、VSR的循环运输过程以及SNARE复合物的亚细胞定位3个不同的细胞过程. 本文将结合本研究组近年的研究工作, 综述目前关于AtNHX5和AtNHX6的离子转运特性和生物功能方面的研究进展.

关键词 AtNHX5, AtNHX6, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向交换体, 离子平衡, 蛋白质运输, 保守酸性氨基酸残基

跨膜离子吸收和转运是植物细胞的一个重要代谢过程, 它在植物生长发育、信号传导、营养供给以及抵抗逆境胁迫等方面起着重要的作用^[1,2]. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组分析表明, 植物体内存在数量庞大的离子转运蛋白, 编码转运蛋白的基因占整个拟南芥基因组的5%^[1], 进一步揭示了离子转运及其转运蛋白在植物生长发育过程中的重要作用.

1 植物NHX调节细胞离子和pH平衡

植物 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向交换体(antiporter, NHX)是植物

细胞的重要跨膜离子转运蛋白^[3-6]. 植物NHX属于阳离子/ H^+ 反向交换体(cation/proton antiporter, CPA)基因家族的CPA1亚家族^[7]. 植物NHX的生化活力是在跨膜质子电化学梯度推动下进行 Na^+/K^+ 反向跨膜转运^[3,4,8]. 因此, 植物NHX在调节细胞pH和离子平衡方面起着重要的作用^[8-11]. 植物细胞跨膜质子电化学梯度是由质膜 H^+ -ATPase和液胞 H^+ -ATPase与 H^+ -PPase维持^[11,12].

早期跨膜离子转运实验证明植物质膜和液胞膜存在 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ 反向交换活力^[3,12-16]. 近年 Na^+/H^+ 反向交换体已在分子水平得到鉴定. 拟南芥AtNHX1^[17,18]和AtSOS1^[19,20]是最早被克隆鉴定的植物 Na^+/H^+ 反向交

引用格式: 邱全胜. 拟南芥NHX5和NHX6: 离子平衡与蛋白质运输. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 839-846

Qiu Q S. *Arabidopsis* NHX5 and NHX6: ion homeostasis and protein transport. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 839-846, doi: [10.1360/N052016-00351](https://doi.org/10.1360/N052016-00351)

换体. 随后更多的NHX基因被从众多的植物中克隆出来^[4].

植物NHX通常以多基因家族形式存在, 在细胞中广泛分布. 根据亚细胞分布, 植物NHX可以分为3类: 质膜NHX(plasma membrane NHX)、液胞NHX(vacuolar NHX)和内膜NHX(endosomal NHX). 研究表明, 拟南芥基因组含有8个NHX基因; 其中, *AtNHX1*–*AtNHX4*编码液胞NHX, *AtNHX5*和*AtNHX6*编码内膜NHX, *AtNHX7/SOS1*和*AtNHX8*编码质膜NHX^[2,5,21,22].

研究表明, 植物质膜NHX *AtNHX7/SOS1*在维持细胞Na⁺, K⁺和pH平衡、耐盐胁迫、维持生物膜结构以及调控植物生长发育等诸多方面起着重要的作用^[19,20,22–26]. 此外, 植物液胞NHX在调节细胞离子和pH平衡、耐盐胁迫、钾营养、液胞膜融合、气孔运动以及植物生长发育等方面起着重要的作用^[3,21,22,27–30].

近年, 关于拟南芥内膜NHX生物功能的研究取得了重要进展^[22,31]. 研究表明, *AtNHX5*和*AtNHX6*在调控细胞Na⁺, K⁺和pH平衡以及耐盐胁迫、钾营养和蛋白质向液胞运输等方面起着重要的作用^[32–34]. 本文将结合本研究组近年的研究工作, 综述目前关于拟南芥*AtNHX5*和*AtNHX6*在调节细胞离子与pH平衡以及蛋白质运输等方面的研究进展.

2 *AtNHX5*和*AtNHX6*调节植物生长发育

Bassil等人^[32]和Reguera等人^[35]研究了*AtNHX5*和*AtNHX6*的基因表达、细胞定位及其在植物生长发育中的作用. 他们发现, *AtNHX5*和*AtNHX6*定位于高尔基(Golgi)、反面高尔基网(trans-Golgi network, TGN)和多胞体(multivesicular body, MVB)/液胞前体(prevacuolar compartment, PVC)^[32,35]. Bassil等人^[32]发现, *AtNHX5*和*AtNHX6*基因在花、茎、叶片和根系中都有表达. Bassil等人^[32]采用分子遗传学方法, 通过制备*nhx5 nhx6*双突变体, 研究了*AtNHX5*和*AtNHX6*在植物生长发育中的作用. 他们发现, *nhx5 nhx6*双突变体生长迟缓、发育受阻、植株矮小^[32]. 电镜观察发现, *nhx5 nhx6*双突变体细胞体积变小、细胞数量减少^[32]. Wang等人^[33]和Wu等人^[34]也发现*nhx5 nhx6*双突变体生长发育受阻; *nhx5 nhx6*双突变体莲座叶小、植株矮、开花抽苔推迟、种子产量降低. 最近研究发现, *AtNHX5*和*AtNHX6*具有调节Golgi, TGN和PVC的pH平衡(homeostasis)的

作用^[10,33,35]. 这些实验结果表明, *AtNHX5*和*AtNHX6*调控着植物的生长发育; *AtNHX5*和*AtNHX6*在细胞扩展、细胞增殖等过程中起着重要的作用^[32]. 然而, 目前关于*AtNHX5*和*AtNHX6*调控植物生长发育的分子机制尚无任何报道.

3 *AtNHX5*和*AtNHX6*调节细胞Na⁺, K⁺和pH平衡

Bassil等人^[32]发现, *AtNHX5*和*AtNHX6*在耐盐胁迫方面起着重要的作用. 他们发现*nhx5 nhx6*幼苗生长对盐胁迫极为敏感; 在150 mmol/L NaCl胁迫下, 双突变体*nhx5 nhx6*幼苗鲜重显著下降^[32]. 他们还发现双突变体*nhx5 nhx6*种子萌发对盐胁迫更为敏感; 在100 mmol/L NaCl胁迫下, *nhx5 nhx6*在子叶出现后几乎停止生长^[32]. Wang等人^[33]进一步发现, *AtNHX5*和*AtNHX6*能够恢复酵母突变体的耐盐胁迫能力^[22]. 以上研究表明, *AtNHX5*和*AtNHX6*在维持植物细胞Na⁺平衡及植物耐盐胁迫方面起着重要的作用.

Wang等人^[33]还发现, *AtNHX5*和*AtNHX6*在维持植物细胞K⁺平衡方面也起着重要的作用^[22]. 他们发现*AtNHX5*和*AtNHX6*能够恢复酵母突变体耐高K⁺胁迫的能力^[33]. 他们利用酵母表达系统, 比较了*AtNHX5*和*AtNHX6*与*AtCHX17*在转K⁺活力上的异同, 发现*AtNHX5*和*AtNHX6*在高K⁺低pH下起作用; 相反, *AtCHX17*在低K⁺高pH下起作用, 表明拟南芥NHX与CHX可能具有不同的K⁺转运模式^[33]. Wang等人^[33]进一步发现, 低K⁺胁迫显著抑制*nhx5 nhx6*根系的生长; 在*nhx5 nhx6*过表达*AtNHX5*或*AtNHX6*能够恢复突变体根系生长至野生型水平. 他们还发现, *nhx5 nhx6*的K⁺含量显著低于野生型植株^[33]. 这些研究表明, 与质膜和液胞NHX一样, 内膜NHX在调节细胞Na⁺, K⁺平衡方面也起着重要的作用. 同时, 这些结果预示, 内膜NHX可能具有与质膜和液胞NHX相似的离子转运模式^[22].

Reguera等人^[35]研究了*AtNHX5*和*AtNHX6*在调节内膜系统pH平衡方面的作用. 他们采用先进的基于荧光蛋白pHluorin的pH传感器(pHluorin-based pH sensors), 分析测定了Golgi, TGN和PVC的pH^[35]. pHluorin是pH敏感的荧光蛋白, 通过与细胞器特异定位的蛋白融合, 可以分析测定细胞器的pH^[36,37]. 他们发现, 与野生型植株相比, 双突变体*nhx5 nhx6*的Golgi,

TGN和PVC的pH降低. 此外, Wang等人^[33]采用pH敏感的荧光探针BCECF(2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein)和微电极法分别测定了双突变体 $nhx5 nhx6$ 的根系和叶片细胞的pH. 他们也发现 $nhx5 nhx6$ 的根系和叶片细胞具有较低的pH. 这些研究表明, AtNHX5和AtNHX6可能具有调节细胞pH平衡的功能^[22].

4 AtNHX5和AtNHX6的保守酸性氨基酸残基调控K⁺运输和生长发育

Bowers等人^[38]将酵母ScNhx1p与细菌、植物和动物NHX的氨基酸序列进行比对分析, 发现在酵母、细菌、植物和动物NHX的跨膜区域含有4个保守的酸性氨基酸残基^[22]. 在酵母ScNhx1p中, 这4个酸性氨基酸残基分别为: D201, E225, D230, E355^[38]. 为了研究这4个保守的酸性氨基酸残基的功能, 他们将这4个酸性氨基酸残基分别突变为不带电荷的极性氨基酸: D201N, E225Q, D230N, E355Q. 他们发现, 突变酵母ScNhx1p的4个保守的酸性氨基酸残基中的3个氨基酸残基(D201N, E225Q, D230N), 都会阻止酵母细胞的蛋白质运输过程, 表明这3个保守的酸性氨基酸残基在蛋白向液胞运输的过程中起着重要的作用^[38]. 研究还发现, 如果突变人类NHE1的E262残基(E262对应于酵母ScNhx1p的E225残基), 将会抑制NHE1的离子转运活性, 暗示这3个保守的酸性氨基酸残基对NHX的离子转运活性至关重要^[39]. 同源建模分析表明, 人类NHE1的2个保守的酸性氨基酸残基(E262和D267)位于TM5结构域^[40]. 在蛋白空间结构上, TM5结构域与TM4和TM11两个结构域极为接近. TM4和TM11构成一个组件结构(assembly structure). 在NHE1受pH激活后, TM4和TM11组建结构参与离子结合位点的构象变化^[40,41]. 因此, 由于这3个保守的酸性氨基酸残基位于NHX的核心结构附近, 表明它们可能在离子交换过程中调节着离子的结合与转移(translocating)过程^[22,40,41].

Wang等人^[33]分析了AtNHX5和AtNHX6与酵母ScNhx1p和人类NHE1氨基酸序列的相似性, 发现AtNHX5和AtNHX6在跨膜结构域也含有4个保守的酸性氨基酸残基^[22]. 其中, AtNHX5的4个酸性氨基酸残基D164, E188, D193, E320, 分别与酵母ScNhx1p的D201, E225,

D230, E355相对应^[33]. 同样, AtNHX6的4个酸性氨基酸残基D165, E189, D194, E320, 分别与酵母ScNhx1p的D201, E225, D230, E355相对应^[33]. 他们进一步分析了AtNHX5和AtNHX6的4个保守的酸性氨基酸残基的功能. 他们首先进行酵母生长实验, 发现如果突变其中3个位点(AtNHX5的D164N, E188 Q和D193N; AtNHX6的D165N, E189Q和D194N), 酵母菌株在含有高K⁺和hygromycin B培养基上将不能正常生长^[33]. 他们进而采用分子遗传学的方法, 将突变了这4个保守酸性氨基酸残基的AtNHX5和AtNHX6分别表达在 $nhx5 nhx6$ 双突变体中^[33]. 同样, 他们发现, 突变了其中3个位点(AtNHX5的D164 N, E188Q和D193N; AtNHX6的D165N, E189Q和D194N)的AtNHX5和AtNHX6不能恢复 $nhx5 nhx6$ 双突变体的生长^[33]. 这些结果显示, 这3个保守的酸性氨基酸残基对于AtNHX5和AtNHX6离子转运活性至关重要, 它们在调节拟南芥的K⁺运输和生长发育方面起着重要的作用^[33]. 同时, 这些结果暗示, AtNHX5和AtNHX6可能具有与酵母ScNhx1p和人类NHE1相似的核心结构(core structure)和离子转运模式(ion transport mode); 这3个保守的酸性氨基酸残基在离子交换过程中调节着离子的结合与转移过程^[22,33].

5 AtNHX5和AtNHX6调节蛋白质向液胞的运输

植物种子贮藏蛋白是在内质网(endoplasmic reticulum, ER)中合成, 然后从ER经过Golgi, TGN和MVB/PVC, 最终运送到蛋白质贮藏液胞(protein storage vacuole, PSV)而贮藏起来^[42-44]. 最近研究发现, AtNHX5和AtNHX6具有调节蛋白质运输的功能^[22,31,34,35,45].

Reguera等人^[35]研究了AtNHX5和AtNHX6在调节蛋白运输方面的作用(图1)^[22,31]. 他们发现双突变体 $nhx5 nhx6$ 的种子比野生型种子大而且种皮较黑^[35]. 他们还发现双突变体 $nhx5 nhx6$ 的种子含有数目较多但体积较小的PSV^[35]. 采用Western blot和免疫电泳方法, 他们发现大量种子贮藏蛋白的前提蛋白(2S albumin和12S globulin)被运输到细胞之外, 没有运输到PSV之中^[35]. 他们进一步采用BN-PAGE/SDS-PAGE双向电泳技术, 发现液胞分选受体2;1(vacuolar sorting receptors

图1 AtNHX5和AtNHX6调节蛋白质向液胞运输过程的模式图^[31]

AtNHX5和AtNHX6调节: (i) VSR与运输物的结合; (ii) VSR的循环运输过程; (iii) SNARE复合物的亚细胞定位

2;1, VSR2;1)与其运输物(cargoes)之间的相互作用降低。他们采用pHluorin技术,测定了Golgi, TGN和PVC以及VSR的pH,发现双突变体 $nhx5 nhx6$ 的内膜系统具有较低的pH。Reguera等人^[35]的结果表明, AtNHX5和AtNHX6可能通过调节VSR与其运输物之间的结合作用而调节蛋白质的运输过程(图1);内体pH在调节蛋白质运输方面起着重要的作用^[22,31]。

Ashnest等人^[45]也证实AtNHX5和AtNHX6具有调节蛋白运输的作用(图1)^[31]。他们发现AtNHX5和AtNHX6可以通过其C-末端与SNX1相互作用^[45]。SNX1是Retromer的一个组分;Retromer是细胞分选复合体(sorting machinery),其功能是将VSR从TGN回送到ER,完成一个循环过程。Ashnest等人^[45]的结果表明, AtNHX5和AtNHX6可能通过调节VSR的循环运输过程而调节蛋白运输(图1)^[31]。

Wu等人^[34]最近报道, AtNHX5和AtNHX6可以通过调节SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)复合物而调节蛋白质的运输过程(图1)^[31]。Ebine等人^[46]的研究发现, VAMP727, SYP22, VTI11和SYP51这4个SNARE蛋白分子可以形成一个SNARE复合物。他们发现,这一SNARE复合物

对于拟南芥种子蛋白运输以及PSV的形成至关重要^[46]。实验证明,这一SNARE复合物可以调控PVC和液胞之间的生物膜融合,从而调节蛋白质向液胞的运输过程^[46]。由于AtNHX5和AtNHX6也定位于Golgi, TGN和PVC, Wu等人^[34]试图证明, AtNHX5和AtNHX6是否可以通过调节这一SNARE复合物而调节蛋白质的运输过程。他们首先采用分子遗传学的方法寻找两者之间的关联性^[31]。他们利用 $nhx5 nhx6$ 双突变体与SNARE蛋白 $syp22$ 单突变体杂交制备 $nhx5 nhx6 syp22$ 三突变体,分析 $nhx5 nhx6 syp22$ 三突变体种子生长发育和蛋白质运输过程^[31,34]。他们发现, $nhx5 nhx6 syp22$ 三突变体植株生长和种子发育都受到显著影响; $nhx5 nhx6 syp22$ 三突变体植株矮小、果荚短小、座果下降、种子体积变大。显微镜观察发现, $nhx5 nhx6 syp22$ 三突变体种子的PSV体积小且数目多。Western blot分析发现, $nhx5 nhx6 syp22$ 三突变体中积累大量种子贮藏蛋白的前体蛋白,表明种子贮藏蛋白的运输受到影响。Wu等人^[34]进一步采用激光共聚焦显微镜观察了SNARE蛋白SYP22和VAMP727在 $nhx5 nhx6$ 双突变体细胞中的分布。结果显示,在 $nhx5 nhx6$ 双突变体细胞中, SYP22和VAMP727被聚集到Golgi和TGN之中,不能向下运送到PVC之中,表明

SYP22和VAMP727向PVC的运送过程依赖于AtNHX5和AtNHX6. 为了分析AtNHX5和AtNHX6与SNARE复合物之间的相互作用机制, Wu等人^[34]进行了Co-IP分析实验. 结果表明, AtNHX5和AtNHX6与SNARE复合物之间没有直接的相互作用; 暗示, AtNHX5和AtNHX6可能通过间接作用调节着SNARE复合物的功能. 他们进一步发现, AtNHX5和AtNHX6的3个保守的酸性氨基酸残基(AtNHX5的D164, E188和D193; AtNHX6的D165, E189和D194)对种子贮藏蛋白的运输至关重要, 表明AtNHX5和AtNHX6可能是通过其离子转运活力调节着细胞蛋白质的运输过程^[31,33]. 这一结果支持Co-IP实验结果, 说明AtNHX5和AtNHX6可能是通过调节细胞pH, 间接地调节着SNARE复合物的功能. Wu等人^[34]的研究结果表明, AtNHX5和AtNHX6可能通过调节SNARE复合物的亚细胞定位而调控着细胞蛋白质的运输过程(图1)^[31].

总之, 以上3项研究都发现, AtNHX5和AtNHX6调节着细胞蛋白质的运输过程. 但是, 他们分别提出了3个不同的作用机理假说(图1)^[31]. Reguera等人^[35]认为, AtNHX5和AtNHX6通过调节VSR与其运输物之间的结合作用而调节蛋白质的运输过程. Ashnest等人^[45]认为, AtNHX5和AtNHX6通过调节VSR的循环运输过程而调节蛋白运输. Wu等人^[34]提出, AtNHX5和AtNHX6通过调节SNARE复合物的亚细胞定位而调控着细胞蛋白质的运输过程.

为什么以上3项研究分别提出了3个不同的假说? 或者说, 为什么AtNHX5和AtNHX6在调节细胞蛋白质运输方面具有如此多样的调节机制? 植物种子贮藏蛋白是在ER中合成, 然后从ER经过Golgi, TGN和MVB/PVC, 最终运送到PSV而贮藏起来^[42-44]. 可见, Golgi, TGN和MVB/PVC作为细胞蛋白运输的分选站(sorting stations)在蛋白运输中起着重要的作用^[47,48]. 有趣的是, 内膜NHX成员的AtNHX5和AtNHX6也恰好定位于Golgi, TGN和MVB/PVC, 即, AtNHX5和AtNHX6

与细胞蛋白运输途径高度重合^[32,33,35]. 因此, 由于AtNHX5和AtNHX6的特殊的亚细胞定位, 它们就会影响Golgi, TGN和MVB/PVC的功能, 从而在蛋白运输的许多环节上调控蛋白质向液胞运输的过程, 其中包括前面提出的SNARE复合物和受体蛋白VSR的功能^[31]. 这就是为什么AtNHX5和AtNHX6在调节细胞蛋白质运输方面具有如此多样的功能的原因.

6 结语与展望

近年关于拟南芥内膜体NHX成员AtNHX5和AtNHX6的基因表达、亚细胞定位、离子转运特性和生理功能等方面的研究取得了重要进展. 实验证明AtNHX5和AtNHX6与质膜和液胞NHX一样, 在调控细胞Na⁺, K⁺和pH平衡以及耐盐胁迫和钾营养等方面起着重要的作用, 暗示内膜NHX可能具有与质膜和液胞NHX相似的离子转运模式. 然而, AtNHX5和AtNHX6与AtCHX17在K⁺转运方面具有不同的催化特性, 表明拟南芥NHX家族与CHX家族可能具有不同的离子转运模式. 令人感兴趣的是, 研究发现AtNHX5和AtNHX6具有调控蛋白质运输的功能; 并且发现AtNHX5和AtNHX6在调节蛋白运输方面具有多样的调节作用, 它们在蛋白运输的诸多环节上调控着蛋白质向液胞的运输过程. 尤为重要的是, 分子遗传学研究发现 $nhx5\ nhx6$ 双突变体生长迟缓、发育受阻, 表明AtNHX5和AtNHX6具有调控植物的生长发育的功能.

然而, 目前只是初步地认识了AtNHX5和AtNHX6的离子转运特性和生理功能, 对于它们作用的分子机制还很不清楚. 例如, 不知道AtNHX5和AtNHX6是通过何种机制调控植物的生长发育过程? AtNHX5和AtNHX6是如何调节SNARE复合物的亚细胞定位的? 进一步阐明AtNHX5和AtNHX6的生物功能及其作用的分子机制, 尚需更多深入的研究工作.

参考文献

- 1 Mäser P, Thomine S, Schroeder J I, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1646-1667
- 2 Brett C L, Tukaye D N, Mukherjee S, et al. The yeast endosomal Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 1396-1405

- 3 Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 431–434
- 4 Rodríguez-Rosales M P, Gálvez F J, Huertas R, et al. Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav*, 2009, 4: 265–276
- 5 Chanroj S, Wang G, Venema K, et al. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 25
- 6 Qiu Q S. Plant and yeast NHX antiporters: roles in membrane trafficking. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54: 66–72
- 7 Unajak S, Santos M D, Hikima J I, et al. Molecular characterization, expression and functional analysis of a nuclear oligomerization domain proteins subfamily C (NLRC) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31: 202–211
- 8 Bassil E, Blumwald E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H⁺ transporters. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 22: 1–6
- 9 Pittman J K. Multiple transport pathways for mediating intracellular pH homeostasis: the contribution of H⁺/ion exchangers. *Front Plant Sci*, 2012, 3
- 10 Martinière A, Bassil E, Jublanc E, et al. *In vivo* intracellular pH measurements in *Tobacco* and *Arabidopsis* reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell*, 2013, 25: 4028–4043
- 11 Schumacher K. pH in the plant endomembrane system—an import and export business. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 22: 71–76
- 12 Cooper S, Lerner H R, Reinhold L. Evidence for a highly specific K⁺/H⁺ antiporter in membrane vesicles from oil-seed rape hypocotyls. *Plant Physiol*, 1991, 97: 1212–1220
- 13 Sze H. Proton-pumping adenosine triphosphatase in membrane vesicles of tobacco callus. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 732: 586–594
- 14 Scherer G G F E, Martiny-Baron G. K⁺/H⁺ exchange transport in plant membrane vesicles is evidence for K⁺ transport. *Plant Sci*, 1985, 41: 161–168
- 15 Hassidim M, Braun Y, Lerner H R, et al. Na⁺/H⁺ and K⁺/H⁺ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte atriplex and the glycophyte cotton. *Plant Physiol*, 1990, 94: 1795–1801
- 16 Ballesteros E, Blumwald E, Donaire J P, et al. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant*, 1997, 99: 328–334
- 17 Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256–1258
- 18 Gaxiola R A, Rao R, Sherman A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1480–1485
- 19 Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6896–6901
- 20 Qiu Q S, Guo Y, Dietrich M A, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8436–8441
- 21 Pardo J M, Cubero B, Leidi E O, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1181–1199
- 22 Qiu Q S. Plant endosomal NHX antiporters: activity and function. *Plant Signal Behav*, 2016, 11: e1147643
- 23 Shi H, Quintero F J, Pardo J M, et al. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: 465–477
- 24 Qiu Q S, Barkla B J, Vera-Estrella R, et al. Na⁺/H⁺ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1041–1052
- 25 Qi Z, Spalding E P. Protection of plasma membrane K⁺ transport by the salt overly sensitive1 Na⁺-H⁺ antiporter during salinity stress. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2548–2555
- 26 Oh D H, Lee S Y, Bressan R A, et al. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *J Exp Bot*, 2010, 61: 1205–1213
- 27 Qiu Q S, Guo Y, Quintero F J, et al. Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279: 207–215
- 28 Qiu Q S, Fratti R A. The Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1p regulates the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuole fusion. *J Cell Sci*, 2010, 123: 3266–3275
- 29 Bassil E, Coku A, Blumwald E. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *J Exp Bot*, 2012, 63: 5727–5740
- 30 Qiu Q S. V-ATPase, ScNhx1p and yeast vacuole fusion. *J Genets Genomics*, 2012, 39: 167–171
- 31 Qiu Q S. AtNHX5 and AtNHX6: roles in protein transport. *Plant Signal Behav*, 2016, 11: e1184810
- 32 Bassil E, Ohto M, Esumi T, et al. The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell*, 2011, 23: 224–239
- 33 Wang L, Wu X, Liu Y, et al. AtNHX5 and AtNHX6 control cellular K⁺ and pH homeostasis in *Arabidopsis*: three conserved acidic residues are

- essential for K⁺ transport. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0144716
- 34 Wu X, Ebine K, Ueda T, et al. AtNHX5 and AtNHX6 are required for the subcellular localization of the SNARE complex that mediates the trafficking of seed storage proteins in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0151658
- 35 Reguera M, Bassil E, Tajima H, et al. pH regulation by NHX-Type antiporters is required for receptor-mediated protein trafficking to the vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 1200–1217
- 36 Karagiannis J, Young P G. Intracellular pH homeostasis during cell-cycle progression and growth state transition in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, 2001, 114: 2929–2941
- 37 Shen J, Zeng Y, Zhuang X, et al. Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Mol Plant*, 2013, 6: 1419–1437
- 38 Bowers K, Levi B P, Patel F I, et al. The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 4277–4294
- 39 Faournoux P, Noel J, Pouyssegur J. Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *J Biol Chem*, 1994, 269: 2589–2596
- 40 Landau M, Herz K, Padan E, et al. Model structure of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications. *J Biol Chem*, 2007, 282: 37854–37863
- 41 Schushan M, Xiang M, Bogomiakov P, et al. Model-guided mutagenesis drives functional studies of human NHA2, implicated in hypertension. *J Mol Biol*, 2010, 396: 1181–1196
- 42 Bassham D C, Raikhel N V. Unique features of the plant vacuolar sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12: 491–495
- 43 Shimada T, Fuji K, Tamura K, et al. Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 16095–16100
- 44 Fuji K, Shimada T, Takahashi H, et al. *Arabidopsis* vacuolar sorting mutants (green fluorescent seed) can be identified efficiently by secretion of vacuole-targeted green fluorescent protein in their seeds. *Plant Cell*, 2007, 19: 597–609
- 45 Ashnest J R, Huynh D L, Dragwidge J M, et al. *Arabidopsis* intracellular NHX-type sodium-proton antiporters are required for seed storage protein processing. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 2220–2233
- 46 Ebine K, Okatani Y, Uemura T, et al. A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2008, 20: 3006–3021
- 47 Otegui M S, Spitzer C. Endosomal functions in plants. *Traffic*, 2008, 9: 1589–1598
- 48 Richter S, Voss U, Jürgens G. Post-Golgi traffic in plants. *Traffic*, 2009, 10: 819–828

***Arabidopsis* NHX5 and NHX6: ion homeostasis and protein transport**

QIU Quan-Sheng

School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Great progress has been made in understanding the transport properties and function of AtNHX5 and AtNHX6, the endosomal Na⁺, K⁺/H⁺ antiporters (endosomal NHX) in *Arabidopsis*. Studies have shown that AtNHX5 and AtNHX6 are localized in the endosomal compartments, including the Golgi, TGN and MVB/PVC. AtNHX5 and AtNHX6 are critical for the homeostasis of cellular Na⁺, K⁺ and pH. They play important roles in salt tolerance and potassium nutrition in plants. Three conserved acidic amino acid residues in the transmembrane domains of AtNHX5 and AtNHX6 are essential for their ion exchange activity and seedling growth. Recent studies have found that AtNHX5 and AtNHX6 regulate the transport of seed storage proteins into the vacuole in *Arabidopsis* seeds. AtNHX5 and AtNHX6 may control multiple steps of the protein transport; they may control the binding of VSR to its cargoes, the recycling of VSRs, and the subcellular localization of the SNARE complex. Recent progress in characterizing ion transport and physiological functions of AtNHX5 and AtNHX6 is summarized in this article.

AtNHX5, AtNHX6, Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter, ion homeostasis, protein transport, conserved acidic amino acid residue

doi: [10.1360/N052016-00351](https://doi.org/10.1360/N052016-00351)