

Nramp 基因家族及其功能*

戚金亮¹ 韩振海¹ 印莉萍²

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院果树分子生物学实验室 北京 100094)

(² 首都师范大学生物系遗传与生物工程重点实验室 北京 100037)

Nramp Gene Families and Their Role

Qi Jinliang¹ Han Zhenhai¹ Yin Liping²

(¹ *Molecular Biology Laboratory of Fruit Tree, Agriculture & Biotechnology Department of China Agricultural University, Beijing 100094, China*)

(² *The Key Laboratory of Genetics & Biotechnology, Biology Department of Capital Normal University, Beijing 100037, China*)

关键词: *Nramp* 基因, 病原微生物, 铁, 锰

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)02-0293-05

Nramp 基因家族首先在动物中发现并得以克隆。小鼠(*Mus musculus*)对细胞内病原微生物侵染所具有的抗性或敏感性是受 1 号染色体上显性基因 *Bcg*、*Ity* 或 *Lsh* 控制的^[1], 由此将该类基因命名为 *Nramp* (natural resistance-associated macrophage protein) 基因^[2]。编码 *Nramp* 这一膜整合蛋白家族的基因, 在植物、真菌乃至细菌中也得以克隆。对其功能的分析表明, 该家族基因可能通过转运金属离子而使生物体产生抵抗病菌侵染的能力。目前, 国内还未见到有关 *Nramp* 基因家族的报道, 本文将对这一全新领域的研究进展作一简单概述。

1 生物中的 *Nramp* 基因家族及序列结构分析

1.1 动物中的 *Nramp* 基因家族

病原微生物侵染造成的疾病历来是医学研究的焦点之一。随着病原微生物抗药性的增强及高效致病菌株的产生, 使得这一问题更加尖锐。结核病菌的流行病学的研究表明, 宿主对病原微生物侵染的最初的敏感性是受遗传因素控制的。1991 年在小鼠中发现 *Nramp* 基因家族之后, Cellier 等^[3]通过筛选脾脏的 cDNA 文库克隆了人类的 *Nramp1* 基因, 定位于染色体的 2q35 位置。进一步研究表明, *Nramp1* 基因仅仅是小鼠和人类 *Nramp* 基因家族的一个成员, 该家族至少具有 2~3 个成员^[3]。随后 Dosik 等克隆了第二个成员——*Nramp2* 基因。该基因定位于小鼠的 15 号染色体, 人类染色体的 12q13 位置。另外, 在果蝇中也克隆了 *Nramp* 同源基因—*MLV*, 该基因的突变导致果蝇的嗅觉敏感性降低。

* 国家自然科学基金项目(30170552)和教育部“高等院校青年教师科教奖励”基金及北京市自然科学基金委重点实验室“果树逆境生理研究室”资助

作者简介: 戚金亮(1973-)男, 山东泰安人, 中国农业大学农学与生物技术学院 2000 级博士研究生, 研究方向为果树 *Nramp* 基因的克隆及功能研究。E-mail: qjldream@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-04-22, 修回日期: 2002-10-17

1.2 植物中的 *Nramp* 基因家族

Cellier 等通过数据库序列比较发现了 3 个与动物的 *Nramp1* 基因同源的 EST 序列,其中两个来自水稻 (*Oryza sativa*),一个来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)。用 D15268 的 EST 序列为探针筛选水稻的黄花茎的 cDNA 文库, Belouchi 等^[2]克隆了水稻的第一个 cDNA 全长 *Nramp* 基因——*OsNramp1*。用 *OsNramp1* 作探针与基因组 DNA 杂交结果表明, *OsNramp1* 并不是单一的基因,而是水稻 *Nramp* 基因家族的一个成员。随后克隆了另外两个 *Nramp* 成员——*OsNramp2*, *OsNramp3*。

通过对拟南芥的完整基因组序列的分析, Maser 等^[4]发现了 6 个与 *Nramp* 高度同源的基因。Thomine^[5]与 Curie 等^[6]已成功克隆了该家族基因的 cDNA 序列。*AtNramp1*, *AtNramp2*, *AtNramp3*, *AtNramp4* 分别定位于 1 号、2 号、4 号、5 号染色体上, *AtNramp5*、*AtNramp6* 分别定位于 2 号、4 号、5 号染色体上。

另外的一些 ESTs 序列分析^[4]及杂交试验^[2]证明, *Nramp* 基因家族在其他双子叶植物如西红柿 (*Solanum tuberosum*)、卷心菜 (*Brassica oleracea*)、菜豆 (*Vicia faba*) 等和单子叶植物如小麦 (*Triticum aestivum*)、玉米 (*Zea mays*), 以及一些杂草中也有存在。

1.3 酵母及细菌中的 *Nramp* 同源基因

对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的研究表明^[7], 其存在至少两个 *Nramp* 同源基因—*SMF1*, *SMF2*, 且与哺乳动物的 *Nramp* 基因具有 40% 的一致性。小鼠 *Nramp2* 能互补 *smf* 突变体表型的试验进一步证实了它们之间的同源性^[8]。

另外, 麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 中也发现 *Nramp* 同源基因, 与动物的 *Nramp* 基因具有 32% 的一致性^[1]。*DrMntH*, *EcMntH*, *PaMntH1* 与 *PaMntH2*, *StMntH* 分别来自于耐放射异常球菌 (*Deinococcus radiodurans*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)^[5]。

1.4 各物种 *Nramp* 基因家族的序列分析及比较

应用序列分析软件, 发现 *Nramp* 基因家族编码一具有典型的膜整合蛋白特征的多肽分子^[3], 具有 10~12 个跨膜区 (Transmembrane, TM), 1~2 个糖基化的胞质外环状结构和一个胞质内的转运蛋白特征结构域^[9], 具有高度的氨基酸序列同源性和相似的二级结构。跨膜区 1~8 具有高度的同源性, 推测这些跨膜区可能在 *Nramp* 家族蛋白的结构和/或功能方面起着极为重要的作用^[3,7]。

Cellier 等^[7]对不同物种的 *Nramp* 基因序列进行了综合比较, 结果表明, 哺乳动物的 *Nramp1* 与 *Nramp2* 之间具有 66% 的一致性; 这两者与 *MVL* 之间至少具有 55% 的一致性; 与水稻的 *OsNramp1* 具有 40% 的一致性; 酵母的 *SMF1*、*SMF2* 与动物的 *Nramp1*、*Nramp2* 和 *MVL* 之间具有 52% 的一致性。这些结果表明, *Nramp* 蛋白属于一个古老的膜整合转运蛋白家族, 经过长时间的进化仍保持者各物种的高度保守性^[1]。Thomine 等^[5]对这些 *Nramp* 家族基因进行了进化树分析 (图 1), 为揭示该家族基因的进化提供了有利的依据。

2 *Nramp* 基因家族的转录、表达、调控及亚细胞定位

动物的 *Nramp1* 基因主要在吞噬细胞如巨噬细胞和多核型白细胞中特异表达, 而 *Nramp2* 则在绝大多数组织和细胞中表达^[10]。应用激光共聚焦显微镜进行亚细胞定位表明, *Nramp1* 主要位于吞噬细胞的后期内吞小体上^[11], 而 *Nramp2* 的亚细胞定位仍不清楚。对猴子的两个 *Nramp2* 的同源物—*Nramp2a*、*Nramp2b* 的研究表明, 两者的区别主要在转录后的调控上, 铁饥饿可诱导 *Nramp2a* 的 mRNA 水平的增加, 供给高水平的外源铁后, 仍不会有显著的降低^[12]。

酵母的 *SMF1* 主要定位于质膜系统, 而在内膜系统如线粒体膜和液泡膜上均观察不到^[13]。*SMF1* 主要受翻译后的调控, *Bsd2* 基因和金属离子本身在这一过程中起主要的调控作用。Bsd2p 通过降低 *SMF1p* 的稳定性及液泡结合位点, 抑制其对金属离子的转运, 离子饥饿可导致其积累于细胞表面而不能移向液泡结合位点^[14]。

植物中, *AtNramp1, 2* 优先在根部表达, 而 *AtNramp3, 4* 在根系和地上部均能得以表达^[6]。*OsNramp1* 主要在根部表达 极少量在地上部表达 ;*OsNramp2* 主要在地上部表达 ;*OsNramp3* 在两部分均能表达^[2]。植物的 *Nramp* 基因主要在转录水平和 mRNA 的稳定性方面受到调控。 *AtNramp1, 3, 4* 的 mRNA 受到铁饥饿的正调控。对这些基因的亚细胞定位仍不清楚, 但有研究表明, *AtNramp1* 可能定位于内膜系统。

3 *Nramp* 基因家族在动物抗病原微生物侵袭中的可能作用及机制

尽管研究表明, 小鼠的 *Nramp* 家族基因如 *Bcg*、*Ity* 或 *Lsh* 对小鼠抵抗麻风分枝杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、黑热病利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 等病原微生物的侵袭起到决定性的控制作用, 而且通过对病菌侵袭具有抗性和易感性的小鼠的 *Nramp1* 基因的序列比较分析及基因标签试验^[15]表明, 单个密码子突变 (Gly¹⁶⁹ → Asp) 即可导致该基因功能的丧失, 但 *Nramp* 家族基因通何种方式, 即具体的作用机理迄今仍不很清楚。由于 *Nramp* 家族基因的转运域以及其他的结构特征, 与构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中的 *CrnA* 基因合成的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 转运蛋白具有部分的同源性, 以及 NO_2^- 和 NO_3^- 在巨噬细胞杀死病菌中起到关键性的作用, 因此最初认为 *Nramp* 家族基因可能是一种 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 转运蛋白基因^[2]。这种推论显然有其根据性, 但随着酵母中 *Nramp* 同源基因 *SMF3* 在转运金属离子如 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 方面作用的鉴定, Super 等^[13]提出了这样一种作用机理模型 (图 2)。

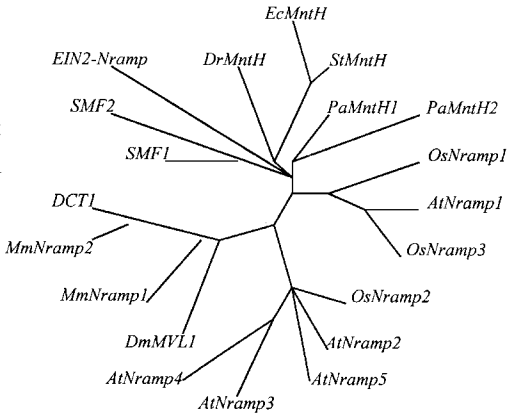


图 1 各物种 *Nramp* 家族基因的进化树

AtNramp1 (AF165125); *AtNramp2* (AF141204); *AtNramp3* (AF202539); *AtNramp4* (AF202540); *AtNramp5* (AL035526) 来自拟南芥 ; *OsNramp1* (L41217); *OsNramp2* (L81152); *OsNramp3* (U60767) 来自水稻 ; *SMF1* (U15929); *SMF2* (U00062) 来自酵母 ; *MmNramp1* (L13732); *MmNramp2* (L33415) 来自小鼠 ; *DmMVL1* (U23948) 来自果蝇 ; *DrMntH* (AE002012); *EcMntH* (AF161318); *PaMntH1* (AF161319); *PaMntH2* (AF161320); *StMntH* (AF161317) 来自细菌。

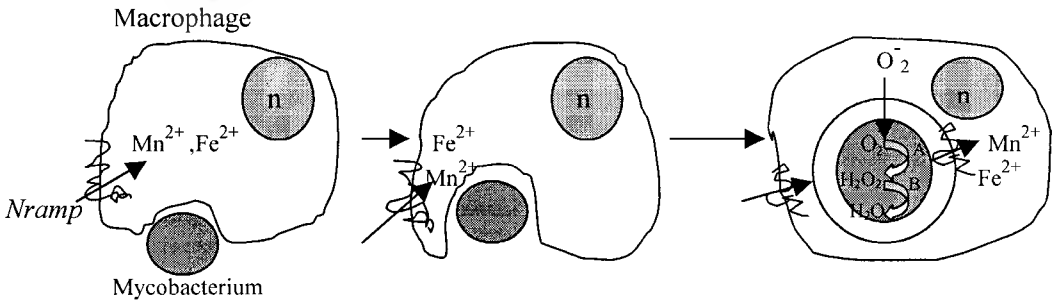


图 2 *Nramp* 基因在动物抗病菌侵袭中的可能作用机理模型

n. nucleus ; A. SOD ; B. CAT.

在这一机制中, 细菌被细胞内吞以后, 形成内吞小体, 此时细胞将产生活性氧和/或氮的中间产物 (NO_2^- 、 NO_3^- 等) 来杀死细菌, 而细菌则会合成自身的以 Fe^{2+} 或其他金属离子为辅助因子的活性氧清除系统, 如 SOD、CAT 等来清除活性氧而得以生存。 *Nramp1* 基因则通过将这些金属离子运出内吞小体而使细菌无法合成防御酶系, 从而活性氧杀死细菌, 使细胞抗菌。越来越多的证据表明^[16], *Nramp* 家族基因可能为金属离子转运蛋白基因而不是 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 转运体基因, 因为真核细胞通过 *Nramp* 蛋白与病菌争夺营养物质 (金属离子) 比争夺有害物质 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) 似乎更为合理些。

这些研究开辟了 *Nramp* 基因转运金属离子的研究。*Nramp1* 基因决定了巨噬细胞通过转运金属离子如 Mn^{2+} 或 Fe^{2+} 从而使动物抗病菌侵袭^[13,47]。*Nramp2* 对 Fe 的吸收转运和重新利用起到决定性的作用^[16,47]。在大鼠中,*DCT1/Nramp2* 作为一种依赖于膜电势且与离子泵相结合的金属离子转运蛋白基因,表现出一宽范围的离子吸收转运功能,如 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 等^[18]。近年来研究表明,在铁离子转运进胞质的过程中,*Nramp2* 基因参与了不依赖于转铁蛋白的转运系统。这种系统需要将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,*Nramp2* 基因即将内吞小体释放出的自由 Fe^{2+} 转运进胞质中^[19]。Fleming 等^[16]在对大鼠 b 和 mk 突变系研究的基础上,还提出了 *Nramp* 基因所参与的铁离子代谢的机理模型。

在植物方面,Curie^[6]和 Thomine 等^[5]的研究表明,*AtNramp1* β A 和 *OsNramp1* 的表达能够弥补酵母的铁离子高低亲和系统双突变体 *fet3 fet4* 和锰离子吸收突变体 *smf1* 的营养缺陷株表型,但与植物抗病方面的关系还未见报道,这方面的研究将具有更为重要的意义。

4 展 望

尽管目前已克隆了多种生物的 *Nramp* 家族基因,对其作用已得到初步实验证据,但对其抗病菌侵袭的作用机理似乎仍停留在假设水平上,特别是在植物和微生物中还没有发现 *Nramp* 家族基因的抗病菌侵袭作用,今后还需在以下几个方面加强研究:1. *Nramp* 基因在抗病菌侵袭中的具体作用机制。这方面的研究具有双重重要意义。其一可通过生物技术途径合成人类新型的抗生素药品,此类药品可能具有广谱的抗菌性。其二可培育广谱抗病和/或金属离子高效吸收转运的动、植物新品种。2. 新基因的克隆及功能的鉴定。这方面的研究可通过酵母或植物突变体的异源、同源功能互补,基因敲除技术,基因的过表达等方法加以鉴定。3. 各物种 *Nramp* 基因的确切亚细胞定位,表达条件及部位,调控因子等。

参 考 文 献

- [1] Skamene E, Pietrangeli C E. Genetics of the immune response to infectious pathogens. *Curr Opin Immunol*, 1991 **3** :511 ~ 517.
- [2] Belouchi A, Cellier M, Kwan T, et al. The macrophage-specific membrane protein *Nramp* controlling natural to infections in mice has homologs expressed in the root system of plants. *Plant Molecular Biology*, 1995 **29** :1181 ~ 1196.
- [3] Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med*, 1994 **180** :1741 ~ 1752.
- [4] Maser P, Thomine S, Schroeder J I, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant physiol*, 2001 **126** :1646 ~ 1667.
- [5] Thomine S, Wang R, Ward J M, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *PNAS*, 2000 **25** :4991 ~ 4996.
- [6] Curie C, Alonso JM, Jean M L, et al. Involvement of *Nramp1* from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J*, 2000 **347** :749 ~ 755.
- [7] Cellier M, Prive G, Belouchi A, et al. *Nramp* defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995 **92** :10089 ~ 10093.
- [8] Pinner E, Gruenheid S, Raymond M, et al. Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family *SMF* by *Nramp2*, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J Biol Chem*, 1997 **272** :28933 ~ 28938.
- [9] Bairoch A. The prosite dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acids Res*, 1993 **21** :3097 ~ 3103.
- [10] Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, et al. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics*, 1995, **25** :514 ~ 525.
- [11] Gruenheid S, Piner E, Desjardins M, et al. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the *Nramp1* protein

- is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med*, 1997, **185**: 717 ~ 730.
- [12] Li Z, Timothy L, Yue W, et al. Heterologous expression, functional characterization and localization of two isoforms of the monkey iron transporter *Nramp2*. *Biochem J*, 2000, **349**: 289 ~ 297.
- [13] Super F, Supekova L, Nelson H, et al. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5105 ~ 5110.
- [14] Liu X F, Culotta V C. Post- translation control of *Nramp* metal transport in Yeast: role of metal ions and the *BSD2* gene. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 4863 ~ 4868.
- [15] Vidal S M, Tremblay M, Govoni G, et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med*, 1995, **182**: 655 ~ 666.
- [16] Fleming M, Romano M, Maureen A, et al. *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade(b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 1148 ~ 1153.
- [17] Fleming M, Trenor C, Su M A, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, 1997, **16**: 383 ~ 386.
- [18] Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, **388**: 482 ~ 488.
- [19] Mori S. Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, **2**: 250 ~ 253.

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于 1953 年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊科学严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证 京东工商广字第 0034 号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

通讯地址 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

《微生物学报》编辑部

邮政编码 100080

电 话 (010) 62630422 62554303

传 真 (010) 62554303

电子信箱 actamicro@sun.im.ac.cn; cjb@sun.im.ac.cn

联系人 武 文 王晋芳