

细菌钠离子输出系统的类型及其可能机制

杨礼富^{1,2} 赵百锁³ 杨苏声^{2*}

(¹ 中国热带农业科学院橡胶研究所 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室 儋州 571737)

(² 中国农业大学生物学院微生物与免疫学系 农业部农业微生物资源与应用重点实验室 北京 100094)

(³ 清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084)

摘 要 在高盐条件下,绝大多数微生物通过拒盐策略适应其生存环境,其中,钠离子输出系统在维持细胞正常的盐浓度和 pH 稳态等生命活动过程中扮演十分重要的角色。细菌的钠离子输出系统包括初级钠泵和次级钠泵两种类型,前者所介导的钠离子输出与呼吸相偶联,后者又分为单亚基和多亚基两种类型。到目前为止,有关初级钠泵和次级钠泵转运钠离子的分子机制还停留在推测阶段。对细菌 Na⁺ 输出系统的类型和 Na⁺ 外排的可能机制进行综述,并对有待深入研究的问题进行探讨。

关键词: 细菌; 钠离子输出; 初级钠泵; 次级钠泵

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-1110-05

高浓度的钠离子对生物的生长、发育和繁殖等生命活动产生毒害作用。微生物在长期进化过程中,形成了两种盐适应机制(1)内盐策略。微生物积累高浓度的 KCl 或 NaCl 作为渗透剂,用以维持渗透平衡。迄今为止,该机制仅发现于盐杆菌目(Halobacteriales)中的嗜盐嗜盐古菌、盐厌氧菌目(Haloanaerobiales)中的厌氧细菌和盐杆菌属(*Salinibacter*),以及个别极端嗜盐的好氧细菌^[1](2)拒盐策略(又称为相容性溶质机制)。绝大多数嗜盐和耐盐微生物都是采用拒盐策略抵御高盐环境。这类微生物在高渗条件下,一方面积累有机相容性溶质,用以调节细胞内外的渗透平衡;另一方面通过钠离子输出系统将多余的 Na⁺ 排出细胞外,以维持细胞内较低的盐浓度,从而维持细胞正常的形态、结构和生理功能^[2]。当前,存在于多元地域环境条件下的耐盐和嗜盐微生物已成为生命科学的热点研究领域。研究细菌的 Na⁺ 输出系统,对于深入揭示微生物盐适应的分子机制,发现新的耐盐相关基因资源,以及构建耐盐工程菌株和作物,进而充分开发和利用盐碱地等都具有十分重要的意义。

1 细菌 Na⁺ 输出系统的类型与功能特性

1.1 初级钠泵系统

初级钠泵(primary sodium pump)首先在解藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和肋生盐弧菌(*Salinivibrio costicola*)中得到生理学鉴定,由其介导的 Na⁺ 输出与电子传递相偶联,对碳酰氰对氯苯腈(CCCP,一种解偶联剂)具有抗性,在降低胞内毒性离子的浓度和维持胞内 pH 稳态等方面扮演重要角

色^[3]。截至目前,初级钠泵只在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)等极少数微生物中得到较深入的研究。微生物中的初级钠泵主要包括脱羧酶、ATP 酶、甲基四氢甲烷喋呤辅酶 M 甲基转移酶和 NADH 泛醌氧化还原酶 4 种类型,其中 NADH 泛醌氧化还原酶(即复合物 I)是呼吸链上的一种多亚基酶,在细菌中由 *nuo* 操纵子编码的 14 个亚基所组成。*E. coli* 细胞质膜上参与 Na⁺ 转运的复合物 I 中的保守亚单位 NuoA、H、J、K、L、M 和 N 分别是线粒体复合物中介导 H⁺ 转运的亚单位 ND3、1、6、4L、5、4 和 2 的对应同源物。研究表明,在碱性条件下,当编码 NADH 泛醌氧化还原酶的基因发生突变后,*V. alginolyticus* 即丧失通过呼吸作用输出钠离子的功能^[3]。此外,在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和交替单胞菌(*Aeromonas sp.*)等海洋细菌和嗜盐菌中也发现了具有钠离子转运功能的 NADH 泛醌氧化还原酶。达坂喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus dabanensis*)D-8^T 是分离自新疆达坂盐湖的革兰氏阳性中度嗜盐菌,能在很宽的 NaCl 浓度(0.1 ~ 4.3 mol/L)和 pH(pH5 ~ 11)条件下生长。最近,我们从 *H. dabanensis* D-8^T 中克隆得到一个初级钠泵基因 *nap*,该基因编码的蛋白与芽孢杆菌来源的 NADH 脱氢酶和 NADH 氧化酶有最高的同源性,这是关于极端微生物初级钠泵基因的首例报道^[4]。随着研究的不断深入,人们推测,初级钠泵系统很可能广泛存在于微生物界。

1.2 次级钠泵系统

次级钠泵(secondary Na⁺/H⁺ antiporter)即 Na⁺(或单价阳离子)/H⁺ 逆向转运蛋白,简称 Na⁺/H⁺ 泵,其生理功能主要

基金项目: 国家 863 计划(2003AA241150)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62732674; Fax: 86-10-62731332; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

作者简介: 杨礼富(1967-)男,湖北建始县人,副研究员,博士,主要从事微生物分子生物学及蛋白质组学研究。E-mail: ylfri@126.com

收稿日期: 2007-01-19,接受日期: 2007-02-26,修回日期: 2007-07-02

包括(1)以跨膜质子电化学梯度(Δp)为动力,形成跨膜的 Na^+ 电化学梯度(即 Na^+ 驱动力),参与同 Na^+ 相偶联的一系列生理生化过程,如 Na^+ /溶质(如丝氨酸和脯氨酸)的协同运输和 Na^+ 驱动的鞭毛运动;(2)排除细胞质中的 Na^+ 和 Li^+ ,以消除其对细胞的毒害;(3)调控细胞内pH,维持稳定的细胞内环境;(4)调控细胞的增殖和体积^[2]。次级钠泵是微生物外排 Na^+ 的主要途径,对于维持嗜(耐)盐微生物以及嗜(耐)碱微生物细胞正常的钠离子浓度和pH稳态等生命活动起至关重要甚至是决定性的作用。依据结构特点,将次级钠泵分为单亚基型和多亚基型两大类。

1.2.1 单亚基型次级钠泵:绝大多数次级钠泵为单亚基型,且多属于跨膜转运蛋白中CPA-1家族的成员,该家族为细菌、古菌和真核生物的阳离子转运大家族。到目前为止,已有10余种单亚基型次级钠泵得到研究,包括 $nhaA$ 、 $nhaB$ 、 $nhaC$ 、 $nhaD$ 、 $nhaG$ 、 $nhaK$ 、 $nhaP$ 和 $napA$ 等。

大肠杆菌和耐盐细菌中的单亚基型次级钠泵:大肠杆菌含有4种单亚基型钠离子/氢离子逆向转运蛋白,即Ec-NhaA、Ec-NhaB、ChaA和MdfA。其中,Ec-NhaA是在微生物界发现的第一个 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白,对其研究也最清楚。当Ec-NhaA、Ec-NhaB和ChaA3种蛋白均失活后,大肠杆菌在0.2mol/L NaCl存在时无法生长^[5-8];MdfA具有 Na^+ / H^+ 和 K^+ / H^+ 逆向转运蛋白活性,与Ec-NhaA共同维持大肠杆菌细胞的pH稳态^[9]。霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)属于革兰氏阴性耐盐菌,能在较宽范围的pH和NaCl浓度下生长,其基因组包含6种推测的 Na^+ / H^+ 泵,对其中Vc-nhaD的定点突变研究表明,Asp344和Thr345对维持Vc-NhaD的功能活性是必需的^[10]。Habibian等进一步对Vc-NhaD中可能与离子转运和pH调节有关的另外14个保守的极性残基进行了定点突变研究,发现部分残基与阳离子的结合与转运有直接或间接关系,亲水区His-93和His-210的突变则改变Vc-NhaD活性的pH轮廓^[11]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)168菌株属于革兰氏阳性的耐盐菌,对其中的6种 Na^+ / H^+ 泵进行了初步研究,包括MleN(YqkI)、NhaC(YheL)和NhaK(YvgP)3种单亚基型 Na^+ / H^+ 泵^[12]。此外,在枯草芽孢杆菌ATCC9372中还存在 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白NhaG,而编码该蛋白的基因在枯草芽孢杆菌168菌株中并不存在,表明同一菌种的不同菌株之间在钠离子输出途径上可能存在区别。集胞蓝细菌(*Synechocystis* sp. PCC6803)为一种耐盐蓝藻,其基因组中存在5种推测的 Na^+ / H^+ 泵,即 $nhaS1-5$,其中, $nhaS1$ 和 $nhaS2$ 类似于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的 $nhaP$, $nhaS3-5$ 类似于小肠肠球菌(*Enterococcus hirae*)的 $napA$ 。NhaS3对 Na^+ 和 Li^+ 具有较高的亲和性,NhaS1则对 Na^+ 和 Li^+ 具有较低的亲和性,二者协同作用,使*Synechocystis* sp. PCC6803能适应较宽范围的盐浓度^[13]。

嗜盐菌和嗜碱菌中的单亚基型次级钠泵:Kuroda等从轻度嗜盐菌副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)中克隆得到Vp-nhaA、Vp-nhaB和Vp-nhaD3个次级钠泵基因,并对其生理功

能进行了比较研究^[14];Nakamura等从另一种轻度嗜盐菌*V. alginolyticus*克隆到2个次级钠泵基因Va-nhaA和Va-nhaB。突变实验表明,Asp-125、Asp-155和Asp-156对Va-NhaA的活性维持起重要作用,而Va-NhaB中的Asp-147残基在所有的NhaB蛋白中均保守^[15-17]。我们从达坂喜盐芽孢杆菌D-8^T中克隆到第一个中度嗜盐菌来源的 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因nhaH,该基因预测编码含403个氨基酸、具有12个推测跨膜区的蛋白,与*B. subtilis*中的NhaG存在最高(54%)的同源性,且其活性具有pH依赖性^[18]。进一步对NhaH跨膜区部分带负电荷的保守氨基酸残基进行了定点突变,并研究了其亲水性C末端的9个氨基酸残基对活性和pH感应的影响。

在碱性条件下,嗜碱芽孢杆菌需要借助以下机制适应环境:(1)通过糖发酵和氨基酸脱氨基作用增加细胞内有机酸的含量,达到酸化细胞基质的目的;(2)增加ATP合成酶的生成,使ATP合成与 H^+ 的摄取相偶联;(3)改变细胞表面的生理生化特性;(4)提高次级钠泵的表达量和活性^[2,19,20]。在上述策略中,次级钠泵不仅是嗜碱芽孢杆菌pH稳态机制的核心,同时,也对维持胞内正常的盐浓度起重要作用。拟坚强芽孢杆菌(*Bacillus pseudofirmus*)OF4是一种极端嗜碱芽孢杆菌,Ito等从该菌克隆的Bs-nhaC是第一个嗜碱菌来源的 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因,在pH7.5条件下,Bs-NhaC对 Na^+ 具有高亲和性,使拟坚强芽孢杆菌OF4能在所处环境盐浓度突然升高时起初始保护作用^[21]。通过文库筛选,Liu等从专性嗜碱微生物*Alkalimonas amylolytica*中克隆到一个与nhaD高度同源的基因,该基因编码蛋白在pH8.5以上才有活性,其不同钠离子浓度下的活性差异反映了该菌独特的自然生长环境^[22]。

此外,从古菌*Methanococcus jannaschii*和嗜热菌*Rhodothermus marinus*中也克隆得到单亚基型的次级钠泵基因。

1.2.2 多亚基型钠离子/氢离子逆向转运蛋白复合体(Mrp蛋白):多亚基型钠离子/氢离子逆向转运蛋白复合体属于跨膜转运蛋白中CPA-3家族的成员,曾给予多种名称,如Pha、Mnh、Mrp和Sha等。为避免混乱,现统一称之为Mrp。Mrp系统最早发现于耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)C-125。典型的Mrp蛋白包含6~7个基因,以异源复合体的形式发挥功能,每个亚基对于维持复合体的完整功能都是必需的。Mrp蛋白与细菌的耐盐性、抗碱性以及一些特殊的生理过程密切相关。研究表明,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的Mrp蛋白具有很高的 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白活性,支持细胞对 Na^+ 和碱性pH的抗性,并能协同转运丝氨酸,其编码基因由7个开放阅读框架组成的基因簇 $mnhA-G$ 构成^[23]。枯草芽孢杆菌具有多种Mrp型 Na^+ / H^+ 泵,其中,Bs-mrp蛋白的主要功能是维持细胞对 Na^+ 和胆酸盐的抗性,而在依赖 Na^+ 和 K^+ 的pH稳态调控中不起主要作用^[24],这与嗜碱芽孢杆菌不同,后者的Mrp在pH稳态中扮演中心角色。对Bs-mrp的突变研究表明,所有突变体均对Na⁺敏感,其中Bs-mrpA⁻和Bs-mrpB⁻

mvpD⁻对碱性 pH 尤其敏感^[24, 25]; *ShaA*(早期称为 *YufT* 或 *NtrA*) 参与芽孢形成。 σ^H 是起始芽孢形成所必需的因子, 而细胞内 Na^+ 水平直接影响 σ^H 的转录后调控。芽孢形成早期对细胞内 Na^+ 浓度敏感, 由于 *shaA* 与 Na^+ 输出有关, 当 *shaA* 突变后, 细胞输出 Na^+ 的能力减弱, 导致 σ^H 蛋白的表达量降低, 于是形成芽孢缺陷的突变表型^[26]; *Te(L)* 和 *Te(K)* 为多功能转运蛋白, 不仅具有输出 Na^+ 和 K^+ 的能力以及四环素抗性, 而且在维持胞内的 pH 稳态过程中扮演中心角色^[24]。拟坚强芽孢杆菌 OF4 的 *Bp-mvp* 不仅在 Na^+ 抗性和 pH 稳态中扮演重要角色, 而且拥有苹果酸-醌氧化还原酶活性。此外, 枯草芽孢杆菌和拟坚强芽孢杆菌 OF4 的 *mvp* 操纵子既能互补对 Na^+ 敏感的大肠杆菌缺陷株 KNabc, 也能互补大肠杆菌呼吸链突变株 SBS2115 和 ANN022X(分别缺乏末端氧化酶和 NADH 脱氢酶), 这表明, 某些 Mrp 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白同时具有初级钠泵和次级钠泵的双重特性^[27, 28]。

苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)和费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)中同样存在 Mrp 型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白。通过插入突变手段, Putnoky 等(1998)在苜蓿中华根瘤菌 AK631 中发现了 *phaABCDEF*, 该基因簇不仅与菌体的钾离子转运和 pH 适应密切相关, 可能还参与对氮的固定和 NH_4^+ 输出等生理过程, 而与 Na^+ 抗性无关, 是一个典型的 K^+/H^+ 泵^[29]。随后的基因测序结果表明, 苜蓿中华根瘤菌 1021 存在 2 个 *pha* 基因簇, 分别为 *pha1* (*phaA1C1D1E1F1G1*) 和 *pha2* (*phaA2B2C2D2E2F2G2*) 基因簇。Putnoky 等在稍早报道的 *phaABCDEF* 实际上是 *pha1* 基因簇。2004 年 Jiang 等通过对费氏中华根瘤菌 RT19 进行转座子插入诱变, 获得一系列 *pha2* 突变株, 其耐盐能力比野生型菌株显著下降^[30]。进一步的研究结果表明, 该菌的 *pha2* 基因簇编码单价阳离子/氢离子逆向转运蛋白, 既能耐受 Na^+ , 又能适应 pH 的变化, 与苜蓿中华根瘤菌的 *pha1* 基因簇很不相同^[31]。

除上述列举已经被研究的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白以外, 在基因组已经完成测序的微生物中也发现大量推测的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因, 有待通过研究对其功能进行验证和挖掘。

2 细菌 Na^+ 输出的推测机制

2.1 初级钠泵的作用机制

虽然通过生理学、遗传学、生物化学和分子生物学等手段对多种微生物来源的钠离子输出相关基因及其编码蛋白进行了研究, 但迄今为止, 有关初级钠泵和次级钠泵外排钠离子的机制依然停留在推测阶段, 缺乏足够的实验证据。大肠杆菌存在 2 种 NADH:Q 氧化还原酶, 即 NDH-1 和 NDH-2, 它们催化电子从 NADH 到 Q 的转移。对于大肠杆菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因突变株 EP432, 当存在延胡索酸时, NADH 通过生电的 NADH:Q 氧化还原酶(Nuo)被氧化, 导致 Na^+ 得到转运, 使其能耐受较高浓度的 NaCl; 而当存在葡萄

糖时, Nuo 的表达被抑制, 此时 NADH 主要通过不生电的 NADH:Q 氧化还原酶(Ndh-II)被氧化。由于缺少 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 由 QH_2 氧化形成的质子驱动力不足以有效地降低细胞内的 Na^+ 浓度。因此, 在葡萄糖存在的条件下, 大肠杆菌 EP432 对 Na^+ 的耐受力明显降低^[32]。

初级钠泵将 Na^+ 从细胞内转移到周质空间, 所需能量来源包括 ATP 水解、脱羧作用、甲基转移或者 NADH 的氧化。每氧化一分子 NADH, 有 2 个电子转移至泛醌, 从而使 2 个 Na^+ 得到转运(化学计量式为 $2\text{H}^+ / 2\text{Na}^+$)^[32]。已有的研究表明, 在呼吸链复合物 I 中, 参与 Na^+ 转运的亚基包括 NuoL (ND5), NuoM (ND4) 和 NuoN (ND2), 这些亚单位与 CPA-3 家族成员的部分亚基(MrpA, MrpB, MrpD)之间存在一定的同源性^[33]。根据目前已有的研究结果推测, 初级钠泵外排钠离子的机制可能是电子传递引起复合物 I 特异构象的变化, 这种构象变化随即传递到该泵位于膜上的疏水亚单位, 从而导致离子转移。

2.2 次级钠泵的作用机制

绝大多数微生物主要依靠次级钠泵输出 Na^+ , 该过程由跨膜的质子电化学梯度所驱动, 将由呼吸链建立的 H^+ 电化学电位转化为 Na^+ 的跨膜电化学电位(即转化为 Na^+ 的驱动力)。对大肠杆菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的研究发现, Ec-NhaA 每泵进 2 个 H^+ 的同时, 可泵出 1 个 Na^+ (化学计量式为 $2\text{H}^+ / \text{Na}^+$), 而 Ec-NhaB 的化学计量式为 $3\text{H}^+ / 2\text{Na}^+$ 。最近, 对 Ec-NhaA 空间结构的研究, 可从一定程度上揭示次级 Na^+/H^+ 泵转移 Na^+ 的分子机制。Ec-NhaA 存在 2 个漏斗状结构, 其中, 由 TMS II、IX、IV c 和 V 形成的带负电荷的离子漏斗开口于细胞基质, 终止于细胞质膜内推测的离子结合位点; 另一个带负电荷的漏斗由 TMS II、VIII 和 XI p 形成, 开口于细胞质周质。TMS IV 和 TMS XI 在细胞质膜内部形成一个维持电荷平衡的稳态环境, 当 Ec-NhaA 结合带电底物(如 Na^+)后, 会导致电荷失衡, 从而快速引发某种未知的离子通道转换机制。此时, 位于第一个漏斗口的 pH 感应器将感受到的 pH 信号通过 TMS IX 传递给 IV/XI, 从而引起 Ec-NhaA 的构象变化, 并进一步使 Na^+ 得到转运^[34]。

3 细菌 Na^+ 输出系统有待深入研究的问题

目前, 用于研究细菌中与钠离子输出有关基因的手段主要包括 (1) 互补大肠杆菌钠离子输出相关基因的缺陷株。这是用于分离和鉴定 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因, 并研究其功能特性最有效的方法, 如 NM81(*nhaA*⁻)、EP432(*nhaA*⁻*nhbB*⁻)、KNabc(*nhaA*⁻*nhbB*⁻*chaA*⁻) 和 TO114(*nhaA*⁻*nhbB*⁻*chaA*⁻) 等菌株都是克隆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的理想筛选模型和便捷实验材料; (2) 基因敲除和定点突变; (3) 蛋白质组学和转录组学手段以及微阵列技术。

已有的研究表明, 大多数微生物都存在多种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 这些 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白不仅介导 Na^+ 输出和细胞内的 pH 调控, 还参与其它多种生理活动, 如外排抗生

素、启动孢子发育以及固氮等。因此,除继续深入研究 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在 Na^+ 抗性和 pH 稳态等生理过程中的作用外,还应当以下方面对细菌的钠离子输出系统开展进一步研究(1)继续克隆 Na^+ 输出相关基因,为全面揭示 Na^+ 输出系统作用的分子机制提供原始素材(2)初级 Na^+ 泵和次级 Na^+ 泵对维持细胞低盐度和碱性 pH 稳态的相对重要性,以及同一物种的不同次级 Na^+ 泵之间在功能上的差异与相互关系(3)阴离子(如 Cl^-)排出细胞外的生理过程与 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白之间是否存在联系(4)Mrp 型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的各亚基之间如何协同作用(5) Na^+ 输出相关蛋白的体外表达、纯化和晶体结构的研究。

参 考 文 献

- [1] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 504 – 544.
- [2] Padan E, Venturi M, Gerchman Y, et al. Na^+/H^+ antiporters. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1505**: 144 – 157.
- [3] Tokuda H, Unemoto T. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na^+ pump functions. *J Bacteriol*, 1983, **156**: 636 – 643.
- [4] Yang L, Jiang J, Zhang B, et al. A primary sodium pump gene of the moderate halophile *Halobacillus dabanensis* exhibited secondary antiporter properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **346**: 612 – 617.
- [5] Rimon A, Gerchman Y, Olami Y, et al. Replacements of histidine 226 of NhaA- Na^+/H^+ antiporter of *Escherichia coli*. Cysteine (H226C) or serine (H226S) retain both normal activity and pH sensitivity, aspartate (H226D) shifts the pH profile toward basic pH, and alanine (H226A) inactivates the carrier at all pH values. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 26813 – 26817.
- [6] Tzuberly T, Rimon A, Padan E. Mutation E252C increases drastically the K_m value for Na^+ and causes an alkaline shift of the pH dependence of NhaA Na^+/H^+ antiporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 3265 – 3272.
- [7] Pinner E, Kotler Y, Padan E, et al. Physiological role of nhaB, a specific Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 1729 – 1734.
- [8] Ivey DM, Guffanti AA, Zemsky J. Cloning and characterization of a putative $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na^+/H^+ antiporter-deficient strains by the overexpressed gene. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 11296 – 11303.
- [9] Lewinson O, Padan E, Bibi E. Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 14073 – 14078.
- [10] Ostroumov E, Dzioba J, Loewen PC, et al. Asp(344) and Thr(345) are critical for cation exchange mediated by NhaD, Na^+/H^+ antiporter of *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1564**: 99 – 106.
- [11] Habibian R, Dzioba J, Barrett J, et al. Functional analysis of conserved polar residues in Vc-NhaD Na^+/H^+ antiporter of *Vibrio cholerae*. *J Bio Chem*, 2005, **280**: 39637 – 39643.
- [12] Fujisawa M, Kusumoto A, Wada Y, et al. NhaK, a novel monovalent cation/ H^+ antiporter of *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol*, 2005, **183**: 411 – 420.
- [13] Inaba M, Sakamoto A, Murata N. Functional expression in *Escherichia coli* of low-affinity and high-affinity $\text{Na}^+(\text{Li}^+)\text{H}^+$ antiporters of *Synechocystis*. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 1376 – 1384.
- [14] Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Physiological roles of three Na^+/H^+ antiporters in the halophilic bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol*, 2005, **49**: 711 – 719.
- [15] Nakamura T, Komano Y, Itaya E, et al. Cloning and sequencing of an Na^+/H^+ antiporter gene from the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1190**: 465 – 468.
- [16] Nakamura T, Enomoto H, Unemoto T. Cloning and sequencing of nhaB gene encoding an Na^+/H^+ antiporter from *Vibrio alginolyticus*. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1275**: 157 – 160.
- [17] Nakamura T, Fujisaki Y, Enomoto H, et al. Residue aspartate-147 from the third transmembrane region of Na^+/H^+ antiporter NhaB of *Vibrio alginolyticus* plays a role in its activity. *J Bacteriol*, 2001, **183**(19): 5762 – 5767.
- [18] Yang LF, Jiang JQ, Zhao BS, et al. A Na^+/H^+ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T: cloning and molecular characterization. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **255**: 89 – 95.
- [19] Kitada M, Kosono S, Kudo T. The Na^+/H^+ antiporter of alkaliphilic *Bacillus* sp. *Extremophiles*, 2000, **4**: 253 – 258.
- [20] Swartz TH, Ikegawa S, Ishikawa O, et al. The Mrp system: a giant among monovalent cation/proton antiporters. *Extremophiles*, 2005, **9**: 345 – 354.
- [21] Ito M, Guffanti AA, Aemsky J, et al. Role of the nhaC-encoded Na^+/H^+ antiporter of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. *J Bacteriol*, 1997, **63**: 3851 – 3857.
- [22] Liu J, Xue Y, Wang Q, et al. The activity profile of the NhaD-type $\text{Na}^+(\text{Li}^+)\text{H}^+$ antiporter from the soda Lake Haloalkaliphile *Alkalimonas amylolytica* is adaptive for the extreme environment. *J Bacteriol*, 2005, **187**: 7589 – 7595.
- [23] Hiramatsu T, Kodama K, Kuroda T, et al. A putative multisubunit Na^+/H^+ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 6642 – 6648.
- [24] Ito M, Guffanti AA, Oudega B, et al. mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na^+ and in pH homeostasis. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 2394 – 2402.
- [25] Ito M, Guffanti AA, Wang W, et al. Effects of nonpolar mutations in each of the seven *Bacillus subtilis* mrp genes suggest complex interactions among the gene products in support of Na^+ and alkali

- [26] Kosono S , Ohashi Y , Kawamura F , *et al.* . Function of a principal Na^+/H^+ antiporter , ShaA , is required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* . *J Bacteriol* , 2000 , **182** : 898 – 904 .
- [27] Ito M , Guffanti AA , Krulwich TA . Mrp-dependent Na^+/H^+ antiporters of *Bacillus* exhibit characteristics that are unanticipated for completely secondary active transporters . *FEBS Lett* , 2001 , **496** : 117 – 120 .
- [28] Swartz TH , Ito M , Hicks DB , *et al.* . The Mrp Na^+/H^+ antiporter increases the activity of the malate :quinone oxidoreductase of an *Escherichia coli* respiratory mutant . *J Bacteriol* , 2005 , **187** : 388 – 391 .
- [29] Putnoky P , Kereszt A , Nakamura T , *et al.* . The *pha* gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K^+ efflux system . *Mol Microbiol* , 1998 , **28** : 1091 – 1101 .
- [30] Jiang JQ , Wei W , Du BH , *et al.* . Salt-tolerance genes involved in cation efflux and osmoregulation of *Sinorhizobium fredii* RT19 detected by isolation and characterization of Tn5 mutants . *FEMS Microbiol Lett* , 2004 , **239** : 139 – 46 .
- [31] Yang LF , Jiang JQ , Wei W , *et al.* . The *pha2* gene cluster involved in resistance to Na^+ and adaption to alkaline pH in *Sinorhizobium fredii* RT19 encodes a monovalent cation/proton antiporter . *FEMS Microbiol Lett* , 2006 , **262** : 172 – 177 .
- [32] Steuber J . The Na^+ -Translocating NADH :quinine oxidoreductase (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* : implications for the mechanism of redox-driven cation translocation by complex I . *J Bioenerg Biomembr* , 2001 , **33** : 179 – 186 .
- [33] Mathiesen C , Hagerhall C . Transmembrane topology of the NuoL , M and N subunits of NADH : quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters . *Biochim Biophys Acta* , 2002 , **1556** : 121 – 132 .
- [34] Hunte C , Screpanti M , Venturi M , *et al.* . Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH . *Nature* , 2005 , **534** : 1197 – 1202 .

Sodium ion transportation system and its possible mechanisms in Bacteria

YANG Li-fu^{1,2} , ZHAO Bai-suo³ , YANG Su-sheng^{2*}

(¹ Rubber Research Institute , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences ,

Key Laboratory of Physiology for Tropical Crops of Ministry of Agriculture , Danzhou 571737 , China)

(² Department of Microbiology and Immunology , College of Biological Sciences , China Agricultural University , Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application , Ministry of Agriculture , Beijing 100094 , China)

(³ Department of Environmental Science and Engineering , State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract Sodium ion with high concentration is toxic to living cells , and microorganisms adapt to the environment containing high concentration of salt by the strategies of salt-in-cytoplasm and compatible solutes . The Na^+ extrusion system plays important roles in maintaining cytoplasmic Na^+ homeostasis and pH level in microbial cells . Two possible mechanisms of Na^+ circulation across the cytoplasmic membrane have been proposed , namely primary Na^+ pump and secondary Na^+/H^+ antiporter . Primary sodium pumps coupled the extrusion of Na^+ to respiration , and the activity of which was insensitive to uncoupler CCCP (carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazine) . There were two types of secondary Na^+/H^+ antiporters-encoding genes designated single gene and multiple subunits , respectively . The types of transportation systems for Na^+ , possible mechanisms of Na^+ extrusion , and projects for further study in bacteria are reviewed .

Keywords : bacteria ; sodium ion transportation ; primary Na^+ pump ; secondary Na^+/H^+ antiporter