

# V-ATPase 分子结构与功能及其 RNAi 技术在害虫防治中的应用研究进展

刘 希, 周 琳, 高 飞, 刘向阳, 赵 特\*

(河南农业大学 植物保护学院/河南省新型农药创制与应用重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** V-ATPase 广泛分布在原核和真核细胞内膜系统, 作为 ATP 驱动质子泵调控细胞各种生理过程。系统阐述了 V-ATPase  $V_1$  结构域和  $V_0$  结构域中各亚基(A、B、C、D、E、F、G、H、a、c、c'、c''、d、e)的分子结构和功能, 以及 V-ATPase 相关亚基作为靶标进行 RNAi 的相关研究, 为实现害虫防控、延缓害虫抗药性产生提供了新的思路和方法。

**关键词:** V-ATPase; 分子结构; 功能; 害虫防控

**中图分类号:** S433 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)05-0001-05

## Advance in Molecular Structures and Functions of V-ATPase and Application of Related RNAi Technology in Insect Management

LIU Xi, ZHOU Lin, GAO Fei, LIU Xiang-yang, ZHAO Te\*

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University/Creation and Application of Novel Pesticides of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Widely distributed in prokaryotic and eukaryotic intracellular membranes, the V-ATPase regulates physiological processes of cell as an ATP-driven proton pump. The review elaborated the molecular structures and functions about the multiple subunits(A, B, C, D, E, F, G, H, a, c, c', c'', d, e) distributed in two domains called  $V_1$  and  $V_0$ , and summarized the research results of screening related subunits of V-ATPase as RNAi targets, providing a new idea and approach for RNAi-based insect management strategies and delaying the pest resistance.

**Key words:** V-ATPase; molecular structure; functions; insect management

20 世纪 80 年代初, 人们在真核细胞空泡膜系统中发现了一类新型的 ATPase, 命名为 V-ATPase<sup>[1]</sup>。V-ATPase 作为持家基因广泛存在于原核生物和真核细胞的胞质膜和管泡膜膜系统中, 由 8 个亚基(A、B、C、D、E、F、G、H)构成的  $V_1$  催化结构域和 6 个亚基(a、c、c'、c''、d、e)构成的膜融合  $V_0$  结构域组成<sup>[2]</sup>。 $V_1$  催化结构域水解 ATP 产生的能量驱动转子(由 DFdc'c''亚基构成)旋转实现质子跨膜转运, 从而维持细胞正常的 pH 值, 是溶酶体行使消化功能、受体介导内吞后再循环以及高尔基体加工

蛋白质等生理活动所必需的。V-ATPase 在生命活动中的重要性和在害虫防控中的实际意义也引起了植保工作者的广泛关注和深入研究。为此, 系统阐述了 V-ATPase  $V_1$  结构域和  $V_0$  结构域中各亚基的分子结构和功能, 以及 V-ATPase 相关亚基作为靶标进行 RNA 干扰(RNAi)的相关研究, 为实现害虫防控、延缓害虫抗药性产生提供新的思路和方法。

### 1 V-ATPase 的分子结构

V-ATPase  $V_1$  结构域中, 3 个拷贝 A 亚基和

收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 河南省烟草公司科学研究与技术开发重点项目(201205); 河南省创新型科技人才队伍建设工程项目(134100510009)

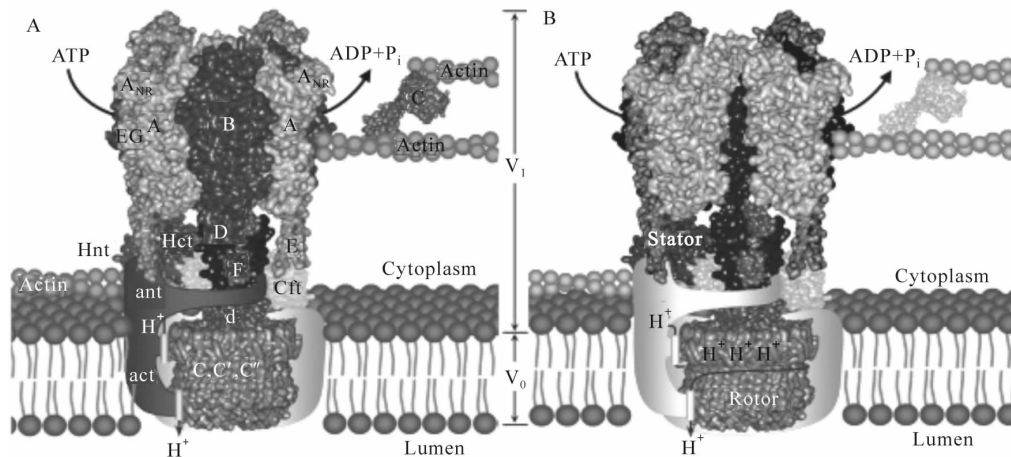
作者简介: 刘 希(1989-), 女, 河南三门峡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 新型农药创制与应用。

E-mail: 13673353179@163.com

\* 通讯作者: 赵 特(1977-), 男, 河南南阳人, 讲师, 博士, 主要从事新型农药创制与应用研究。E-mail: tezhao@126.com

3 个拷贝 B 亚基交替排列成柱状六聚体, 3 个 EG 异质二聚体羧基端位于  $A_3B_3$ -六聚体顶端, 靴子型 C 亚基与 2 个外周轴(即为 EG 异质二聚体)的氨基端相互作用, D 亚基氨基端和羧基端伸入  $A_3B_3$ -六聚体中心腔, D 亚基的底部和 F 亚基的氨基端伸入 d 亚基空腔内, H 亚基羧基端连接 a 亚基氨基端中部区域<sup>[2]</sup>(图 1)。V-ATPase A 亚基由氨基末端结构域( $\beta$  折叠桶状结构域、非同源结构域和中心  $\alpha/\beta$  结构域)和羧基末端结构域(P-loop 和疏水性 loop)组成; 富含甘氨酸的 walker A 元件(位于 P-loop 上)存在保守位点 Cys254(人和牛)或 Cys261(酵母菌), 这些保守位点可结合 ATP 三磷酸根, 赋予 A 亚基催化功能。B 亚基由 3 个结构域组成: 氨基末端  $\beta$  折叠桶状结构域、中心  $\alpha/\beta$  结构域和羧基末端结构域; 亦存在 walker A 和 walker B 元件, 但无保守甘氨酸富集区, 因而 B 亚基无催化功能, 但具有调节能力<sup>[3-4]</sup>。

亲水性 C 亚基由 3 个截然不同的结构域组成: 球形“头”(氨基酸区域 Ile178—Asn261 构成 4 个反向平行的  $\beta$ -折叠和 2 个  $\alpha$ -螺旋)、球状“足”(氨基酸区域 Met1—Lys54 和 Pro322—Leu392 构成 4 个反向平行的  $\beta$ -折叠和 2 个缠绕在一起的  $\alpha$ -螺旋)和狭长“颈”(3 个螺旋由盐桥 Lys165—Glu273、Asp72—Arg310 和 Gly41—Pro108 相连)<sup>[5]</sup>。E 亚基氨基端是一条长达 110 个氨基酸残基的  $\alpha$  螺旋, 羧基端呈现球状, 排列方式为  $\beta 1 : \alpha 1 : \beta 2 : \beta 3 : \beta 4 : \alpha 2$ , 由 2 个弯曲的环(loop)连接<sup>[6-7]</sup>。F 亚基疏水端一侧面向旋转 D 亚基, 另一侧含有大量电荷。F 亚基含有 2 个环, 位于  $\alpha 1-\beta 2$ (<sub>26</sub>GQITPETQE<sub>35</sub>)和  $\alpha 2-\beta 3$ (<sub>60</sub>ERDDI<sub>64</sub>)之间<sup>[8]</sup>。G 亚基从氨基端至羧基端排列方式为:  $\alpha 1 : \text{bulge} : \alpha 2 : \alpha 3 : \alpha 4$ <sup>[2]</sup>。H 亚基(54 kD)是一个  $\alpha$  螺旋亚基, 其氨基端和羧基端区域之间形成一个浅巢, 由灵活的 4 个氨基酸残基构成的环连接<sup>[9]</sup>。



本图引自文献[3]。A. 分子组装模型; B. 机械模型

图 1 V-ATPase 各亚基的分布结构模型

V-ATPase  $V_0$  结构域中, a 亚基氨基尾端连接胞质氨基端区域和跨膜羧基端区域, 与膜胞质表面平行且与 H 亚基的氨基端十分接近<sup>[10]</sup>;  $c_4c'_4$  共同构成一个六聚体 c-环(c-ring), 其与 a 亚基质子转运区域和羧基端有小范围连接<sup>[11]</sup>; d 亚基位于 D 亚基底部(图 1)。酵母 a 亚基是由 8 个跨膜螺旋构成的拓扑结构, 跨膜螺旋 TM7 含有一个被包埋的精氨酸(Arg)位点, 对质子运输非常必要。分子量约 16 kD 的亚基 c 和  $c'$  含有 4 个跨膜螺旋(TM1、TM2、TM3 和 TM4)和 2 个暴露于胞质的环; 分子量约 23 kD 的亚基  $c''$  含有 5 个跨膜螺旋(TM0、TM1、TM2、TM3 和 TM4)、2 个环和 1 个暴露于胞

质的羧基尾端<sup>[12]</sup>; c-ring 每个亚基都存在一个谷氨酸位点(酵母亚基 c 上为 Glu137,  $c'$  上为 Glu145,  $c''$  上为 Glu108), 该位点通过羧基质子化和去质子化实现  $H^+$  结合和释放<sup>[13]</sup>。疏水性 d 亚基形似倒圆锥状, 折叠成 3 个螺旋结构域。在酵母和哺乳动物中临近 c-ring 拥有单一拷贝的 e 亚基, 此外, 哺乳动物临近 c-ring 还拥有单一拷贝的 Ac45 亚基和 M8-9 亚基, 这 3 个亚基的分子结构和功能还有待进一步探索。

## 2 V-ATPase 的功能

植物体内的 V-ATPase 可对逆境做出响应, 保

护机体免受逆境伤害。如玉米 V-ATPase A 亚基和 B 亚基对干旱、高盐、低温胁迫和脱落酸处理做出响应,提高了植株对逆境的耐受性<sup>[14]</sup>。c 亚基由 c1、c2、c3、c4 和 c5 5 种亚型组成,其中 c4 和 c5 基因表达量受赤霉素、水杨酸、茉莉酸甲酯及渗透和高盐胁迫的强烈诱导,表明 c4 和 c5 基因在植物响应环境胁迫中起作用<sup>[15]</sup>。同时,该酶的调控能力提升了经济作物的品质及商业价值。甘蔗 C 亚基基因编码的亲水蛋白可水解 ATP,为蔗糖逆浓度运输至液泡提供能量,维持液泡内 H<sup>+</sup> 浓度平衡,实现蔗糖在液泡内高浓度积累<sup>[16]</sup>。V-ATPase D 亚基对枇杷果实有机酸含量具有正调控作用<sup>[17]</sup>。F 亚基基因参与乙烯利刺激橡胶树增产的分子调控<sup>[18]</sup>。

哺乳动物及人体内的 V-ATPase 也成为研究热点,涉及维持肾脏酸平衡、调控细胞凋亡和细胞周期以及影响神经信号传递等生理功能。B 亚基由 B1 和 B2 2 种亚型组成,B1 编码基因(*ATP6V1B1*)的突变可引起肾小管酸化不良,表明该基因调控肾小管的酸化<sup>[19]</sup>;V-ATPase B2 亚基过表达可以通过激活 MEK/ERK 信号通路 MEK 上游活性来抑制人胚肾细胞 HEK293 凋亡,其作为细胞存活因子参与调控细胞凋亡和细胞周期等生理功能<sup>[20]</sup>。V-ATPase a 亚基有 a1、a2、a3 和 a4 4 种亚型,a1 与 a2 亚型共同调控酸化和神经递质的摄取、存储和释放<sup>[21]</sup>。此外,V-ATPase 与人类疾病存在紧密关系,成为治疗人类疾病的候选分子靶标。a3 亚型在破骨细胞中是溶酶体特异亚型,其突变基因(R444L)会引起人类小儿恶性骨硬化病<sup>[22]</sup>。a4 编码基因(*ATP6V0A4*)的突变可引起感音神经性耳聋<sup>[19]</sup>。c 亚基的反义寡核苷酸可以抑制人肺癌细胞 A549 转移<sup>[23]</sup>。

V-ATPase 在昆虫生长、发育和生殖过程中也具有重要作用。昆虫中肠杯状细胞顶端质膜上的 V-ATPase 通过水解 ATP 产生能量,将中肠腔内 H<sup>+</sup> 运输到细胞中,维持中肠内的碱性环境,有利于碱性蛋白发挥作用<sup>[24]</sup>。V-ATPase 的节律性表达调控斜纹夜蛾输卵管酸化的昼夜节律,酸化节律对调控精子成熟是十分重要的<sup>[25]</sup>。桔小实蝇 V-ATPase G 亚基在雄虫生殖器官中表达量是雌虫中的 6.04 倍,表明 G 亚基可能在桔小实蝇雄虫生殖生理过程中发挥重要作用<sup>[26]</sup>。另外,V-ATPase 基因突变会引起运输障碍及昆虫死亡。果蝇编码 d 亚基基因突变会干扰 Notch 信号通路,造成内吞运输障碍,表明该基因可能调控 Notch 信号通路和胞内运输<sup>[27]</sup>。果蝇的 *vha55* 基因编码 B 亚基,该基因 P 元素失活导致胚

胎死亡<sup>[28]</sup>。同时,V-ATPase 也参与昆虫对 Bt 毒素和农药的抗性作用。A 亚基和 B 亚基分别为亚洲玉米螟和棉铃虫中 Bt 的结合部位,很可能与害虫对 Bt 毒素产生的抗性相关<sup>[29-30]</sup>。亚致死剂量三唑磷处理褐飞虱后,雄虫 V-ATPase d 亚基基因表达上调,可能促进精子成熟、刺激褐飞虱生殖,诱导褐飞虱再猖獗<sup>[31]</sup>。

### 3 V-ATPase RNAi 技术在害虫防治中的应用

Baum 等<sup>[32]</sup>将玉米根虫 V-ATPase A 亚基的 dsRNA 导入玉米并使其表达,获得的转基因玉米能有效保护玉米根部免受玉米根虫的损害。Whyard 等<sup>[33]</sup>证实,赤拟谷盗、豌豆蚜虫和烟草天蛾幼虫靶向进食 V-ATPase E 亚基部分片段 dsRNA 可导致害虫死亡,死亡率分别达到 70%、60%、50%。Upadhyay 等<sup>[34]</sup>对烟粉虱饲喂质量浓度为 20 μg/mL 的 V-ATPase A 亚基 siRNA,6 d 后害虫死亡率高达 85.62%,随后该课题组构建的转基因烟草通过表达 siRNA 有效沉默了 V-ATPase A 亚基表达,可有效防控烟粉虱对烟草的侵害<sup>[35]</sup>。Li 等<sup>[36]</sup>通过沉默东亚飞蝗 V-ATPase H 亚基基因,导致害虫个体出现显著的蜕皮缺陷及死亡,死亡率高达 96.7%。Khan 等<sup>[37]</sup>构建的重组烟草花叶病毒(TMV)可引发 V-ATPase 的 RNAi 效应,柑橘粉蚧取食感染重组 TMV 的植株后,导致昆虫繁殖能力降低并发生显著死亡。以 V-ATPase 为靶标基因,利用 RNAi 技术对昆虫产生系统 RNAi 效应,致使昆虫靶标 mRNA 降解、抵抗力下降,从而引起昆虫死亡率上升,这为害虫防治提供了新的方法。

### 4 展望

目前,对 V-ATPase 研究已取得较大进展,如识别不同生物体或同一生物不同组织 V-ATPase,明确了各亚基空间排布、分子结构、全酶可逆组装机理,了解 V-ATPase 介导的细胞器酸化、细胞骨架动态组装及细胞分化、发育、通讯功能,并深入探索了 V-ATPase 作为靶标,通过提高干扰效率来防控害虫,延缓害虫抗药性的产生。虽然对 V-ATPase 各亚基的结构功能及其生理生化意义已做了较详尽研究,但选择哪个亚基作为干扰靶标,干扰效应持续时间,干扰机制及干扰作用对非靶标生物的影响等问题还有待进一步解决,这对 V-ATPase RNAi 技术是否能够应用到实际生产具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Kakinuma Y, Ohsumi Y, Anraku Y. Properties of  $H^+$ -translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biological Chemistry, 1981, 256(21): 10859-10863.
- [2] Marshansky V, Rubinstein J L, Grüber G. Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2014, 1837(6): 857-879.
- [3] Ma B, Xiang Y, An L. Structural bases of physiological functions and roles of the vacuolar  $H^+$ -ATPase [J]. Cellular Signalling, 2011, 23(8): 1244-1256.
- [4] Maher M J, Akimoto S, Iwata M, et al. Crystal structure of  $A_3B_3$  complex of V-ATPase from *Thermus thermophilus* [J]. The EMBO Journal, 2009, 28(23): 3771-3779.
- [5] Drory O, Frolov F, Nelson N. Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function [J]. EMBO Reports, 2004, 5(12): 1148-1152.
- [6] Rishikesan S, Thaker Y R, Grüber G. NMR solution structure of subunit E (fragment E1-69) of the *Saccharomyces cerevisiae*  $V_1V_0$  ATPase [J]. Bioenergetics and Biomembranes, 2011, 43(2): 187-193.
- [7] Rishikesan S, Grüber G. Structural elements of the C-terminal domain of subunit E (E133-222) from the *Saccharomyces cerevisiae*  $V_1V_0$  ATPase determined by solution NMR spectroscopy [J]. Bioenergetics and Biomembranes, 2011, 43(5): 447-455.
- [8] Basak S, Lim J, Manimekalai M S S, et al. Crystal and NMR structures give insights into the role and dynamics of subunit F of the eukaryotic V-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biological Chemistry, 2013, 288(17): 11930-11939.
- [9] Sagermann M, Stevens T H, Matthews B W. Crystal structure of the regulatory subunit H of the V-type ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(13): 7134-7139.
- [10] Diepholz M, Venzke D, Prinz S, et al. A different conformation for EGC stator subcomplex in solution and in the assembled yeast V-ATPase: Possible implications for regulatory disassembly [J]. Structure, 2008, 16(12): 1789-1798.
- [11] Toei M, Toei S, Forgacs M. Definition of membrane topology and identification of residues important for transport in subunit a of the vacuolar ATPase [J]. Biological Chemistry, 2011, 286(40): 35176-35186.
- [12] Flannery A R, Graham L A, Stevens T H. Topological characterization of the c, c', and c'' subunits of the vacuolar ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biological Chemistry, 2004, 279(38): 39856-39862.
- [13] Hirata R, Graham L A, Takatsuki A, et al. VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane  $H^+$ -ATPase [J]. Biological Chemistry, 1997, 272(8): 4795-4803.
- [14] 毛毅辉. 玉米抗旱相关基因 *ZmVHA-A* 和 *ZmVHA-B* 的克隆及表达分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [15] 邱娜. 拟南芥液泡  $H^+$ -ATPase c 亚基基因功能的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [16] 许志宇, 王俊刚, 杨本鹏, 等. 甘蔗液泡 ATP 酶 C 亚基基因克隆及序列分析 [J]. 生物技术通报, 2010(9): 82-86.
- [17] 谢晓清, 陈发兴, 赖钟雄. 枇杷果实液泡膜 V-ATPase D 亚基基因的克隆及表达 [J]. 莆田学院学报, 2013, 20(5): 51-54.
- [18] 朱家红, 张全琪, 蔡元保, 等. 巴西橡胶树液泡 ATP 酶 F 亚基基因克隆及表达 [J]. 西北植物学报, 2009(6): 1079-1083.
- [19] Stover E H, Borthwick K J, Bavalia C, et al. Novel *ATP6V1B1* and *ATP6V0A4* mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss [J]. Medical Genetics, 2002, 39(11): 796-803.
- [20] Li G, Yang Q, Krishnan S, et al. A novel cellular survival factor—the B2 subunit of vacuolar  $H^+$ -ATPase inhibits apoptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 2006, 13(12): 2109-2117.
- [21] Saw N M N, Kang S Y A, Parsaud L, et al. Vacuolar  $H^+$ -ATPase subunits  $V_0a1$  and  $V_0a2$  cooperatively regulate secretory vesicle acidification, transmitter uptake, and storage [J]. Molecular Biology of the Cell, 2011, 22(18): 3394-3409.
- [22] Bhargava A, Voronov I, Wang Y, et al. Osteopetrosis mutation R444L causes endoplasmic reticulum retention and misprocessing of vacuolar  $H^+$ -ATPase  $\alpha 3$  subunit [J]. Biological Chemistry, 2012, 287(32): 26829-26839.
- [23] Kubota S, Seyama Y. Overexpression of vacuolar ATPase 16-kDa subunit in 10T1/2 fibroblasts enhances invasion with concomitant induction of matrix metalloproteinase-2 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 278(2): 390-394.

- [24] Wieczorek H, Grber G, Harvey W R, *et al.* Structure and regulation of insect plasma membrane H(+) V-ATPase[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2000, 203(1):127-135.
- [25] Bebas P, Cymborowski B, Giebultowicz J M. Circadian rhythm of acidification in insect vas deferens regulated by rhythmic expression of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(1):37-44.
- [26] 胡黎明, 申建梅, 宾淑英, 等. 桔小实蝇 V-ATPase G 亚基基因的克隆及组织表达特异性分析[J]. *昆虫学报*, 2012, 54(12):1452-1458.
- [27] Yan Y, Denef N, Schüpbach T. The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*[J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(3):387-402.
- [28] Davies S A, Goodwin S F, Kelly D C, *et al.* Analysis and inactivation of *vha55*, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype[J]. *Biological Chemistry*, 1996, 271(48):30677-30684.
- [29] 徐丽娜. Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟对不同 Bt 毒素的交互抗性及其产生的分子机理[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.
- [30] 陈利珍. 棉铃虫中肠 Cry1A 结合蛋白分离、鉴定及其与抗性的关系[D]. 北京:中国农业科学院, 2008.
- [31] 朱友理, 王剑, 谢志娟, 等. 褐飞虱 V-ATPase d 亚基基因的克隆与 mRNA 表达分析[J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(3):666-674.
- [32] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11):1322-1326.
- [33] Whyard S, Singh A D, Wong S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(11):824-832.
- [34] Upadhyay S K, Chandrashekar K, Thakur N, *et al.* RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route[J]. *Journal of Biosciences*, 2011, 36(1):153-161.
- [35] Thakur N, Upadhyay S K, Verma P C, *et al.* Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of V-ATPase A gene[J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e87235.
- [36] Li C, Xia Y. Vacuolar ATPase subunit H is essential for the survival and moulting of *Locusta migratoria manilensis* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2012, 21(4):405-413.
- [37] Khan A M, Ashfaq M, Kiss Z, *et al.* Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) [J]. *Plos One*, 2013, 8(9):e73657.