

小鼠 P 型 ATP 酶 ATP8A2 基因的克隆 及其剪切亚型的分析

刘 娜¹ 丁小燕^{2*}

(¹中国科技大学生命科学院, 合肥 230026;

²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 真核生物细胞各种膜结构两侧的磷脂分布是不对称的, 这种不对称需要磷脂翻转酶的动态调节。目前认为这些酶可以分为三种, 即爬行酶类、外翻酶类和内翻酶类, 对于它们的研究才刚刚起步。P 型 ATP 酶第四类亚型被认为有潜在的磷脂内翻酶活性, 酵母全部 5 个该家族的蛋白质如 DRS2p 都陆续被确定了具有磷脂内翻酶的活性。对于酵母内翻酶的研究还发现该类蛋白质对于细胞极性建立和膜泡运输有重要作用。哺乳动物中由基因组比对发现有 14 个 P 型 ATP 酶第四类亚型成员, 但对于它们的研究仅局限于病理方面。为了能够了解哺乳动物磷脂内翻酶在细胞内活动的分子机制, 克隆了酵母 DRS2p 在哺乳动物中的同源物 ATP8A2 的编码基因, 并发现了它的两种剪切亚型。通过对它们的组织分布分析, 发现该蛋白质主要分布在睾丸中, 提示它可能对于精子的发生有一定功能。

关键词 ATP8A2; P 型 ATP 酶; 内翻酶; 剪切亚型; 睾丸

真核细胞的膜结构, 包括细胞质膜, 以及内质网、高尔基体等细胞器膜, 都是由磷脂双分子层组成的生物膜。正常生理条件下, 真核生物膜两侧的磷脂分布是不对称的。像卵磷脂(phosphatidyl-choline, PC)和神经鞘磷脂(sphingomyelin)集中在膜的胞外侧或者细胞器内腔面, 而酰胺磷脂类, 如磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)则集中在细胞质一侧^[1]。这种膜两侧磷脂的不对称性分布, 需要一类称为磷脂翻转酶的蛋白质进行动态的调节和维持。通常磷脂翻转酶可分为三类: 爬行酶(scramblases)是非 ATP 依赖、底物非专一、可催化磷脂在膜两侧快速双向运动的翻转酶, 其作用是使磷脂顺浓度梯度运动; 外翻酶(floppases)是 ATP 依赖的可催化磷脂从细胞质一侧向胞外或细胞器内腔面迁移的翻转酶; 内翻酶(fippases)是 ATP 依赖的专门催化酰胺磷脂从胞外侧或细胞器内腔向细胞质一侧迁移的翻转酶^[2]。后两种酶促进了膜两侧磷脂分布的不对称, 而这三种酶的共同作用使生物膜两侧的磷脂在不断运动中维持不对称性分布。目前, 这三种酶的研究都刚刚起步, 人们对于这些酶的结构、功能以及与疾病的相关性等方面的准确认知都非常缺乏。内翻酶的最有可能的候选者是 P 型 ATP 酶第四类亚型家族的成员^[3]。P

型 ATP 酶是一大类结构保守, 广泛存在于从原核到真核各个物种的膜蛋白, 介导 ATP 依赖的各种小型阳离子的跨膜转运, 包括铜、锌、镁、钠、钾、钙离子以及氢离子。其第四类亚家族, 仅存在于真核生物, 这类蛋白质的特别之处在于它负责转运的不是阳离子而是磷脂。最早发现两个具有内翻酶活性的蛋白质即牛 ATP8A1 和酵母 DRS2p, 均是这个亚家族的成员。通过数据库搜索和系统发生关系分析发现的其他 4 个酵母第四类亚型家族成员, 也被陆续证明有内翻酶活性^[4]。

酵母由于结构简单, 易于大规模培养和构建缺陷株, 成为研究内翻酶的良好模型。通过对缺陷株细胞以及对其各种膜组分的分析研究, 人们发现酵母中的 5 个内翻酶对于胞吞胞吐过程中膜泡的形成、迁移、蛋白质运输以及细胞极性的建立, 有重要作用^[2]。比如, 研究最多的 DRS2p, 它的缺陷株表现为细胞去极化和一些极性调节蛋白的定位偏差。它定位于反面高尔基体, 对于高尔基体处的膜泡形成有影响, 并且参与碱性磷酸酶从高尔基体到液泡的运输^[5,6]。而其他几个酵母内翻酶, 在不同的细胞器发挥类似的功

收稿日期: 2007-10-22 接受日期: 2007-11-29

* 通讯作者。Tel: 021-54921411, Fax: 021-34230265, E-mail: xyding@sunm.shnc.ac.cn

能并表现出一定的功能重复,但多个内翻酶缺失是致死的^[5]。这说明内翻酶是一类在细胞基础生命活动中发挥重要功能的酶。但是,目前还缺乏证据将这些内翻酶的膜泡形成等生理功能和它的磷脂转运活性联系起来。一种推测是生物膜两侧磷脂的不对称造成膜的弯曲,而这种弯曲是膜泡形成和融合所必需的^[4]。

在哺乳动物中,根据基因组序列比对,已发现了14个P型ATP酶第四类亚型成员。对于它们的研究开展得很早。早在1994年,人们就开始研究其中的一个基因ATP8B1与I型进行性家族胆汁郁积症的关系^[7],并最终通过基因突变小鼠的研究证明,ATP8B1基因的突变是引起I型进行性家族胆汁郁积症的直接原因^[8]。但关于缺乏胺酰磷脂转运活性如何导致该疾病的分子机制,至今仍然是空白。有一点可以肯定的是,该类蛋白质必定对于细胞内稳态的动态调节和维持有重要作用,如上述的胆汁郁积症就是由于胆盐代谢的不正常引起的,而其他几个和疾病有关的哺乳动物P型ATP酶第四类亚型成员,如ATP10A、ATP10D,推测可能会影响糖代谢^[9]。由于缺乏合适的研究模型,目前对于哺乳动物内翻酶的研究还主要集中在病理方面。鉴于P型ATP酶第四类亚型是一类比较保守的分子,一个更方便的研究方法,也许是从对于它们的酵母同源物的研究类推出其在哺乳动物细胞中的分子活动机制和功能。

酵母DRS2p在哺乳动物中最近的同源物是ATP8A1和ATP8A2。ATP8A1是最早被克隆的哺乳动物P型ATP酶第四类亚型成员^[3],在动物体内各个组织中广泛表达,并且已经成功地证明了它的内翻酶活性^[10]。但ATP8A2尚无人研究。在这里,我们从小鼠睾丸cDNA中克隆了ATP8A2基因,意外地发现它在体内存在两个剪切亚型,并检测了这两个亚型在体内的组织分布。ATP8A2主要分布在睾丸,而该组织细胞中膜泡运输,磷脂的调控等过程复杂而精确,因此研究ATP8A2在睾丸中的功能,将对理解哺乳动物雄性生殖细胞发生中膜结构的变化有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、连接酶购自NEB公司,反转录酶购自Fermentas公司,质粒提纯试剂盒购自Qiagen公司,Lipofectmine购自Life Technology公司,各种抗体购自Santa Cruz公司,反转录试剂盒购自Fermentas公司,蛋白质预染marker购自Bio-Rad公司。其他常用试剂购自Sigma公司。

所使用的改造过的pcDNA3载体由上海生化细胞所裴钢实验室惠赠,该载体C端插入HA序列。使用的大肠杆菌菌株DH5 α 购自博大泰克。C57小鼠来自中科院上海实验动物中心。

引物合成及质粒测序均由上海生工公司完成。本文所采用的PCR引物见表1。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质序列同源性分析 搜索NCBI数据库中可能的ATP8A2同源蛋白序列,用FASTA格式导入vectorNIT7.0软件,使用内置的clustalW进行多序列比对。

1.2.2 组织总RNA提取以及逆转录反应 成年雄性C57小鼠断颈法处死,冰上快速取组织,投入液氮中冷冻并研磨成粉末,转入EP管中,每500mg组织加入1ml Trizol,冰上放置数分钟,使组织充分裂解,然后10 000 r/min 4℃离心5 min。取上清液为细胞裂解液,弃去未完全裂解的组织。在细胞裂解液中加入1/5体积氯仿,彻底振荡2~3 min,13 000 r/min 4℃离心15 min。将上清液小心取出,加入0.5 ml异丙醇,-80℃放置10~15 min。13 000 r/min 4℃离心15 min。弃去上清液,沉淀用1 ml 75%乙醇洗涤,8 000 r/min 4℃离心5 min。弃去上清液,用20 μ l取样器吸走剩余液体,室温下5 min晾干沉淀,溶解于40 μ l DEPC水中。紫外分光光度仪测量260、280 nm的A值及比值,并电泳检测总RNA质量。总RNA样品保存在-80℃。

取上述5 μ g总RNA,加入1 μ l 0.5 μ g/ μ l Oligo dT引物,补DEPC水至总体积为12 μ l。混匀后在70℃

表1 PCR引物

引物名称		功能
ATP8A2-C-HA-P5	5'-atcggtaccaccatgtcccggccactct	ATP8A2 克隆
ATP8A2-C-HA-P3	5'-atgcctcgagtttcttcttgaattctctt	
Primer1	5'-caaccgggtgaccaagtgtatcc	剪切亚型分析
Primer2	5'-tgcagtgacccagaaaaccttag	
GAPDH-P5	5'-tgaagcagcatctgagg	小鼠管家基因
GAPDH-P3	5'-cgaaggtggaagatgggag	

温育 5 min 后,冰上骤冷,EP管置于冰上依次加入 4 μ l 5 \times 反应缓冲液, 1 μ l RNase 抑制剂, 2 μ l 10 mmol/L dNTP, 混匀并在 37 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 加入 1 μ l M-MuLV RT 酶, 最后终体积为 20 μ l, 在 42 $^{\circ}$ C 温育 60 min, 70 $^{\circ}$ C 温育 10 min。得到的反转录产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。上述实验中所有枪头, 溶液, 容器均应除去 RNA 酶。

1.2.3 基因克隆 根据 NCBI 上发表的小鼠 (GenBank AF156550) ATP8A2 基因预测序列, 基于它的开放读码框 (ORF) 设计引物, 上游引物包括 *KpnI* 酶切位点, 下游引物包括 *XhoI* 酶切位点。以小鼠睾丸 cDNA 为模版, 使用 KOD-plus 酶扩增 ATP8A2 基因, 得到 PCR 产物, 连接入改造过的 pcDNA3 载体中。酶切鉴定后测序, 与 NCBI 提供的序列比对后确定得到阳性克隆。

1.2.4 细胞培养 细胞培养液配方: Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (补加 0.3 g/L 谷氨酰胺, 0.11 g/L 丙酮酸钠, 2.5 g/L HEPES, 2.5 g/L 碳酸氢钠), 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)。细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 隔天传代一次。

1.2.5 细胞转染 转染前 24 h 细胞以合适的密度传代铺入培养皿中, 过夜后长至 80%~90% 比较适合转染。质粒用合适的比例预混入 DMEM 中, 加入 plus 溶液混匀室温放置 15 min, 再加 Lipofectamine 混匀再放 15 min。细胞预先换掉培养液, 加入规定体积的 DMEM 溶液, 均匀缓慢加入上述的混合液, 放回培养箱中, 3 h 后换为 10% 胎牛血清, 培养 36~48 h 收细胞。具体质粒和各种溶液用量参见 Lipofectamine 说明书。

1.2.6 电泳样品制备 将细胞置于冰上去除培养液, 用冷 PBS 洗一遍, 然后加入细胞裂解液 (配方见后), 在 4 $^{\circ}$ C 摇动 5 min 后, 用细胞刮棒刮下, 1 ml 注射器抽打均匀。由于 ATP8A2 是比较大的膜蛋白, 不容易溶解在裂解液中, 最后用注射器抽打很重要。细胞裂解液配方: NaCl, 150 mmol/L; Tris-HCl, 50 mmol/L (pH 8.0); NP-40, 1%; SDS, 0.1%; 脱氧胆酸钠, 0.5%; EDTA, 5 mmol/L (pH 8.0)。得到的细胞裂解液中按比例加入 4 \times 上样缓冲液, 混匀后煮沸 3~5 min, 自然冷却。蛋白质样品放置在 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.7 Western 印迹 细胞蛋白用丙稀酰胺凝胶进行稳压电泳, 恒流 400 mA 转膜至硝酸纤维素膜。将膜浸泡在封闭液 (3% 脱脂奶粉配置于 TBST 溶液中) 室温缓慢摇动 1 h, 然后在稀释好的一抗溶液 (按照推

荐浓度稀释于 TBST 溶液中) 中室温温育 1 h, 用 TBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min。接着室温温育于二抗溶液中 1 h, TBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min, 然后显色。

1.2.8 蛋白质二级结构预测和结构域分析 根据测序获得的核酸序列, 用 DNASTAR 软件分析得到开放读码框, 翻译为蛋白质序列, 用 FASTA 格式导入 Rhoibus 软件进行数据分析, 得到二级结构。FASTA 格式的蛋白质序列提交到 SMART 程序, 得到结构域分析结果。网址为 <http://smart.embl-heidelberg.de/>。

2 结果

2.1 ATP8A2 在不同物种中的保守性分析

我们比较了酵母、拟南芥、鸡、小鼠及人等具有代表性的模式生物中可能的 ATP8A2 同源物, 使用 vecotorNTI1.1 软件分析它们蛋白质序列的保守性, 结果如图 1 所示。可以看到所有的 ATP8A2 同源物均具有高度的序列相似性, 从 33% 到 86%, 提示它们在功能上可能也是保守的。其中小鼠与人的序列相似性达到 80% 以上, 说明小鼠内的 ATP8A2 的研究成果很大程度上可以代表在人类细胞中的实际情况, 这给我们对于 ATP8A2 的病理研究等方面带来很多方便。小鼠 ATP8A2 和酵母 DRS2p 的序列相似性也达到了 41%。

2.2 ATP8A2 基因的克隆

查阅 NCBI 数据库, 与小鼠 ATP8A2 基因序列匹配的很多 EST 序列的组织来源为睾丸。为了得到小鼠 ATP8A2 全长基因的真核表达质粒, 用成年雄性 C57 小鼠睾丸 cDNA 为模板, 扩增出该基因的全长片段。由于该基因较长, 使用了高保真的 KOD plus 作为催化 PCR 的 DNA 聚合酶。*XhoI* 和 *KpnI* 酶切后, 将 PCR 片段连入带有 C 端 HA-tag 的 pcDNA3 载体中。全长的 ATP8A2 ORF 共有 3 447 个碱基, 其中第 771 和 3 429 处各有一处 *EcoRI* 的酶切位点。由于片段 (3.5 kb) 比较大, 为了更好的在琼脂糖凝胶电泳中区分片段和载体, 我们没有用克隆时片段两端设计的酶切位点, 而是用 *EcoRI* 做酶切鉴定克隆, 这样根据 NCBI 数据库公布的序列, 阳性克隆经 *EcoRI* 酶切就应该有 2.7 kb 的片段, 在琼脂糖凝胶电泳中很容易就可以和载体分开。PCR 和酶切鉴定结果如图 2 所示。

2.3 两种亚型的确定

测序结果与 NCBI 数据库中提供的 ATP8A2 基因序列相比, 在 2 559 处多了一段 106 bp 碱基的插入, 如图 3a、图 3b。为了查明数据库中给出的 ATP8A2

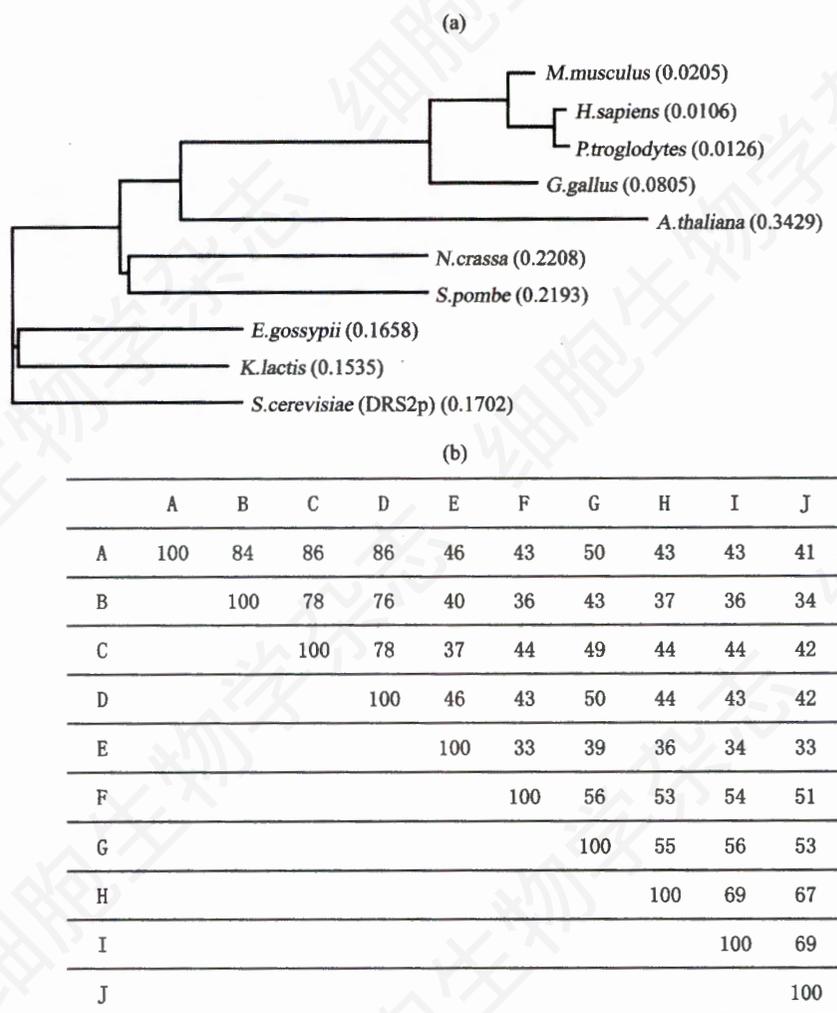


图1 ATP8A2在不同物种中的保守性分析

(a)ATP8A2及其同源物亲缘关系的系统树图。(b)每一对蛋白质直接的同源性比对。字母A到J分别代表以下各物种中的ATP8A2同源物: A: *M.musculus*; B: *H.sapiens*; C: *P.troglodytes*; D: *G.gallus*; E: *A.thaliana*; F: *N.crassa*; G: *S.pombe*; H: *E.gossypii*; I: *K.lactis*; J: *S.cerevisiae*。

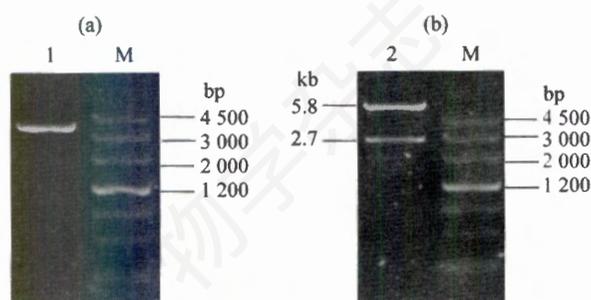


图2 ATP8A2的克隆

M: marker; 1: ATP8A2 基因 PCR 产物; 2: 阳性克隆的酶切检测。

基因亚型是否也实际存在,我们又重新制备小鼠睾丸cDNA并以此为模板,用以上同样的方法得到若干克隆。测序结果表明数据库中的ATP8A2序列也是存在的。我们将网上原有的形式称为亚型 α ,有插入的称为亚型 β 。用DNASTAR分析发现亚型 α 有一

个BamHI酶切位点,而亚型 β 有两个。这样用BamHI酶切后,亚型 α 质粒仅能线性化,而亚型 β 可以得到1 kb的片段。用这种方法鉴定我们得到的11个克隆,如图3c,发现既有亚型 α ,又有亚型 β ,说明这两种形式都存在于体内。

2.4 两种亚型的组织表达分析

为了研究这两种亚型在体内的组织分布,我们抽取成年雄性C57小鼠的肌肉、肾、肝、脾、睾丸、心、脑、肺等组织的总RNA,通过反转录PCR得到cDNA。同时做NO RT对照管不加反转录酶,用跨内含子的管家基因引物做PCR检测没有条带,说明抽取的总RNA中没有基因组污染。用管家基因GAPDH引物做PCR调节不同组织中cDNA模板量。为了取得比较好的PCR效果并且使两种亚型较易区分,我们所设计的引物刚好在亚型 β 插入片段的前

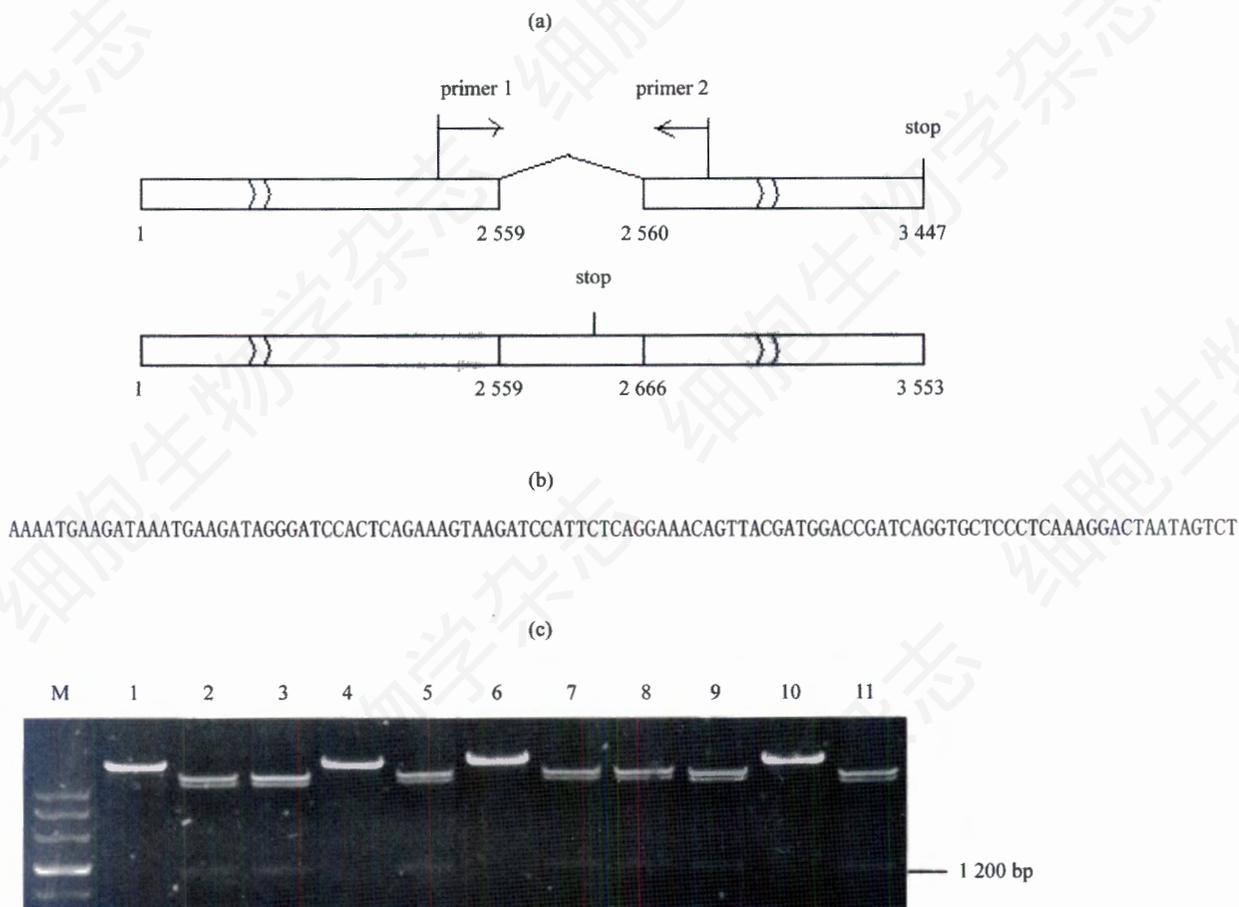


图3 ATP8A2 基因两种剪切亚型的确定

(a)ATP8A2 基因两种剪切亚型的模式图。上图为亚型 α , 下图为亚型 β 。Primer1 和 primer2 为用于鉴定两种亚型的引物位置。(b)亚型 β 中插入的一段 DNA 序列。(c)酶切鉴定所得的克隆, M 为 DNA marker, 1、4、6、10 为亚型 α 克隆, 其余为亚型 β 克隆。

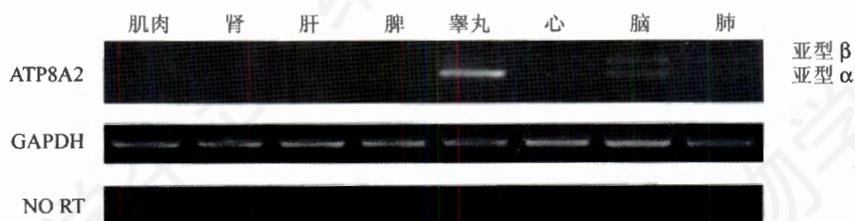


图4 两种剪切亚型的组织分布

以识别插入片段的引物 primer1 和 primer2 做 PCR 鉴定各个组织中 ATP8A2 两种亚型的分布, 不同分子量的条带分别代表亚型 α 和 β , 小鼠 GAPDH 和 NO RT 为对照。

后若干 bp, 这样以组织 cDNA 中两种亚型为模板可以分别得到约 300 bp 和 400 bp 的片段。各组织 RT-PCR 的结果显示, ATP8A2 在睾丸中表达量非常高, 心脏, 脑, 肺中有很少量表达, 而在肾、肌肉、肝、脾中几乎没有表达, 显示它有较好的组织特异性。有表达的组织里显示均有两种亚型存在, 但是量不尽相同, 脑中两种亚型基本等量, 而睾丸中亚型 α 的

占绝对优势(图 4)。

2.5 两种亚型的蛋白质结构预测和表达

亚型 α 编码 1 148 个氨基酸, 而亚型 β 的插入片段中包含了终止密码子, 实际上表达的氨基酸只有 866 个。Phobius 程序预测亚型 α 有 10 个跨膜区段, 在第四第五跨膜区之间有一个很长的胞浆内环(loop)区, N 端和 C 端均在胞质一侧, 这些特征在 P 型 ATP

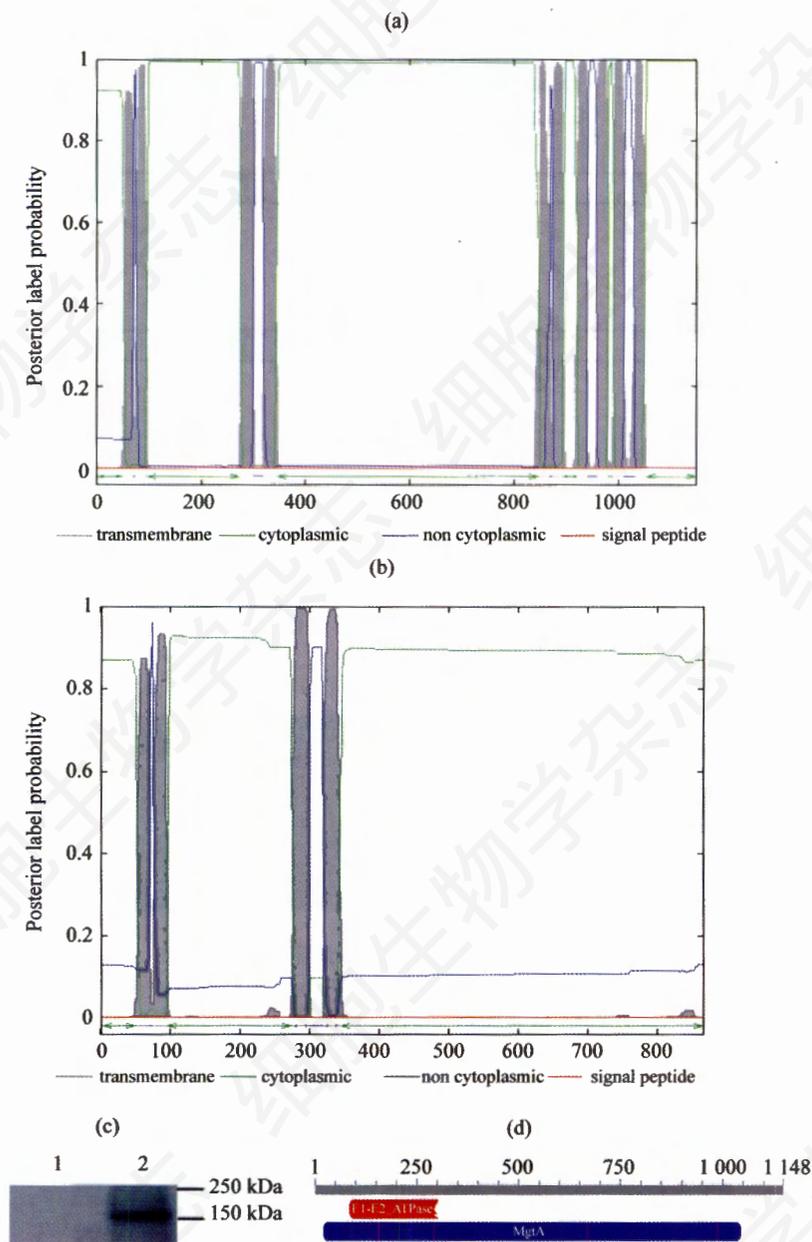


图5 两种亚型的蛋白质的结构预测和表达

(a)和(b)分别为ATP8A2亚型 α 和亚型 β 的结构预测。使用Phobius软件,图中阴影的是跨膜区段。(c)为Western印迹检验外转亚型 α 在293T细胞的表达,泳道1、2样品分别为转染pcDNA3空载体和ATP8A2亚型 α 质粒的细胞裂解液。(d)为亚型 α 结构域的分析,使用SMART软件。

酶第四类亚型都是保守的。而亚型 β 的二级结构仅有前4个跨膜区段,C端有一段长的区域游离在胞浆内,如图5。两种亚型都具有P型ATP酶特有的E1E2结构域,经典的P型ATP酶作用模式就是基于E1E2结构域发生的。在该结构域处可以发生ATP介导的磷酸化,底物结合以及后来的去磷酸化等一系列反应。而其中388氨基酸处的序列DKTGT是极其保守的,尤其是天冬氨酸残基对于P型ATP酶的反应循

环很重要。

睾丸中亚型 α 的量占绝对优势,亚型 α 必定在睾丸细胞膜结构的调控中起着主导作用。由于精子细胞难于分离和培养,一个比较好的方法是将亚型 α 质粒转染入合适的细胞系,在比较简单容易培养的模式下研究该蛋白质与其他蛋白质的关系以及对细胞极性和膜泡形成等方面的影响,然后再回到体内验证。为此,我们将带有HA-tag的亚型 α 质粒转入293T

细胞中过量表达,收取细胞裂解液并使用HA抗体通过Western印迹检验,在Bio-Rad预染marker指示的分子量约170 kDa处检测到单一条带,如图5(c)所示,比根据蛋白质序列预测的分子量130 kDa略大。一般情况下SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中蛋白质的迁移率与其分子量成正比,但也会受到该蛋白质拓扑结构、高疏水性、磷酸化修饰等的影响^[11,12]。ATP8A2是一个十次跨膜蛋白,蛋白质内部的多个疏水片段使SDS不能均匀的分布在变性蛋白的表面,从而影响电泳中的该蛋白质的迁移率,造成表观分子量与理论分子量存在偏差。由于我们检测到的条带单一清晰,而且在转染pcDNA3的负对照细胞裂解液中检测不到,可以认为我们检测到的条带就是ATP8A2。

3 讨论

P型ATP酶第四类亚型在哺乳动物中有多达14个成员,广泛分布在各个组织,它在体内的功能理应较酵母中更加精确和复杂,但事实上,对于这一类蛋白质的研究刚刚起步,大多数这类蛋白质的生化活性,底物特异性以及细胞内的分子机制,还有待研究。我们选择研究ATP8A2,一方面是由于它是与酵母DRS2p在哺乳动物中最近的同源物之一,或许可以从酵母的研究成果中得到某些提示;另一方面,大部分该类蛋白质,包括ATP8A1都是泛组织表达的,而ATP8A2在睾丸中有较集中的表达,有可能在精子发育过程这一特殊的生理过程中具有功能。本文克隆了小鼠基因ATP8A2,并且确认了它在体内的两个不同的剪切亚型。这两个亚型具有不同的跨膜次数,在体内的不同组织的表达丰度也各不相同,尤其在睾丸两者的表达丰度差别很大,有可能共同参与体内的酰胺磷脂转运的精确调控,在不同组织体现不同的调节水平。

就目前已经有所研究的几个哺乳动物P型ATP酶第四类亚型成员而言,存在剪切亚型并不特别。如ATP8A1就有4个剪切亚型,Ding等^[10]成功地克隆了牛脑组织中ATP8A1的4个剪切亚型,其中两个亚型也表现为C端缺失一部分氨基酸序列。本文确认的两个ATP8A2亚型中亚型 α 与NCBI上公布的序列一致,有完整的十个跨膜区,具有典型的P型ATP酶第四类序列特征^[13]。而亚型 β 相当于C端被截短的亚型 α ,缺失了靠近C端的6个跨膜区,但是包括了第四跨膜区后面一个长的环区,据推测这部分对于P型ATP酶第四类亚型的底物特异性有重要作用^[14]。

这样,第一,与典型的P型ATP酶第四类亚型蛋白相比,亚型 β 缺失了大部分跨膜区,与生物膜的结合力大大降低,而且会影响到它与某些膜蛋白的结合。据在酵母中的研究,DRS2p等P型ATP酶第四类亚型成员需要与另一类保守的膜蛋白CDC50p相互作用才能正确定位到细胞器上^[15,16]。而CDC50p在哺乳动物中也有很近的同源物^[17]。ATP8A2亚型 α 和 β 可能与CDC50家族蛋白有不同的结合特性。另一类与DRS2p有相互作用的蛋白质是和膜泡生成有关的ADP核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, ARF)。ARF在招募COP I、clathrin等起始膜泡形成的蛋白质中有重要作用,它自身需要胞质内蛋白鸟嘌呤核苷交换因子(ARF-guanine nucleotide exchange factors, ARF-GEF)的帮助才能结合到膜上并开始招募下游蛋白。酵母中的ARF-GEF Gea2p与DRS2p有直接的相互作用,DRS2p相当于Gea2p在膜上的锚点^[18]。假设ATP8A2也有类似的蛋白质结合,那么亚型 α 和 β 一方面由于构型不同可能与小鼠中ARF-GEF结合力不同,另一方面,它们自身与膜的结合力也有很大差别,因此可能会影响到下游一系列膜泡形成相关蛋白在膜附近的聚集,进而影响到膜泡的形成特性。第二,亚型 β 保留了前4个跨膜区的E1E2结构域和一部分环区,可能仍然具有内翻酶活性,但它的活性大小,底物特异性等特征可能已与亚型 α 有所不同。如ATP8A1的4个剪切亚型,C端缺失的两种亚型就表现为较低的ATP酶活性。在睾丸中具有10个跨膜区的亚型 α 表达占主要地位,可能也与该组织特性有关。在精子形成过程中,顶体发育早期需要大量的膜泡将蛋白质从高尔基体运进顶体中,晚期又涉及到细胞极化,高尔基体和顶体分居细胞两极^[19]。这些过程很大程度上都可能需要活跃的内翻酶活性。

在精子发育过程中,质膜两侧的磷脂分布调节,复杂而又灵敏。内翻酶ATP8A2在睾丸中大量表达,并且包括两种剪切亚型,而其中亚型 α 的mRNA量又远远大于亚型 β ,它们在睾丸生理功能和精子发育过程中发挥的作用,值得我们进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Williamson P et al. *Mol Membr Biol*, 1994, 11: 199
- [2] Paulusma C et al. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1741: 11
- [3] Tang X et al. *Science*, 1996, 272: 1495
- [4] Pomorski T et al. *J Cell Sci*, 2004, 117: 805
- [5] Hua Z et al. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 3162
- [6] Gall W E et al. *Curr Biol*, 2002, 12: 1623
- [7] Jacquemin E et al. *Eur J Pediatr*, 1994, 153: 424

- [8] Pawlikowska L *et al. Hum Mol Genet*, 2004, **13**: 881
[9] Flamant S *et al. Mamm Genome*, 2003, **14**: 21
[10] Ding J *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 23378
[11] Krietsch T *et al. Mol Endocrinol*, 2006, **20**: 3146
[12] Mirkka H *et al. Plant Physiol*, 2004, **134**: 470
[13] Moller J V *et al. Biochim Biophys Acta*, 1996, **1286**: 1
[14] Catty P *et al. FEBS Lett*, 1997, **409**: 325
[15] Saito K *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 3418
[16] Graham T R *et al. Trends Cell Biol*, 2004, **14**: 670
[17] Katoh Y *et al. Oncol Rep*, 2004, **12**: 939
[18] Chantalat S *et al. J Cell Sci*, 2004, **117**: 711
[19] Moreno R D *et al. Biol Reprod*, 2000, **63**: 89

Cloning and Identification of Two Isoforms of ATP8A2, Member of Murine P Type ATPase

Liu Na¹, Xiao-Yan Ding^{2*}

(¹*School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;* ²*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China)*

Abstract Specific phospholipids are asymmetrically and dynamically distributed in the two leaflets of the eukaryotic membrane bilayers, by the activities of phospholipid translocation. However, the mechanisms and proteins involved in these processes are still poorly understood. Members of the type 4 subfamily of P-type ATPases have been implicated in the translocation of phospholipids from the outer to the inner leaflet of membrane bilayers, which we now call flippase activity. All of the 5 yeast type 4 subfamily of P-type ATPases have been demonstrated to have flippase activity as well as function in cell polarity establishment and vesicle traffic. In mammalian, the studies of flippase mostly focus on pathology, and little has been known about the molecular mechanism underlying these disorders. Here we cloned a murine P-type ATPases ATP8A2 which is an ortholog of DRS2p. Surprisingly, we found it has two isoforms. The tissue expression pattern indicates ATP8A2, especially isoform α is mainly expressed in testis, providing cases for analysing its function during spermatogenesis.

Key words ATP8A2; P type ATPase; flippase; splicing isoform; testis

Received: October 22, 2007 Accepted: November 29, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921411, Fax: 86-21-34230265, E-mail: xyding@sunm.shnc.ac.cn