

Xenopus oocyte에서 애기장대 AtPIP2-1 활성측정을 위한 발현 최적화 조건 규명

김현미^{1,2} · 황현식¹ · 이석찬² · 조수현^{3,4} · 김범기^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 신작물개발과, ²성균관대학교 유전공학과, ³강원대학교 의학전문대학원 생리학교실, ⁴강원대학교 생명공학연구소

The Optimization for Functional Expression of *Arabidopsis Thaliana* AtPIP2-1 in *Xenopus laevis* Oocyte

Hyunmi Kim^{1,2}, Hyunsik Hwang¹, Sukchan Lee², Su-Hyun Jo^{3,4}, and Beom-Gi Kim^{1*}

¹Bio-crop Development Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

³Department of Physiology, Kangwon National University College of Medicine, Chuncheon 200-701, Korea

⁴Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received September 9, 2010; Accepted October 15, 2010

We confirmed the hypo-osmotic shock strengths and duration, different type of vectors, and subcellular localization to identify the optimum analysis condition of plant aquaporin activity in *Xenopus oocyte* using *Arabidopsis thaliana* AtPIP2-1 gene. Six minutes and 1/5ND buffer hypo-osmotic shock treatment was the best condition to show the maximum swelling of *Xenopus oocytes* where AtPIP2-1 was expressed using pcDNA3.1 vector. AtPIP2-1 protein was expressed more efficiently in pGEMHE vector which has 5' and 3' UTR (untranslation region) of *Xenopus β-GLOBIN* gene in multiple cloning site than in pcDNA3.1 vector. Also green fluorescence of GFP fused to AtPIP2-1 was detected onto oocyte plasmamembrane where is the proper subcellular localization target of AtPIP2-1.

Key words: aquaporin activity, AtPIP2-1, *Xenopus oocyte*

세포의 구성 성분 중 80% 이상은 수분으로 이루어져 있으며, 생명현상이 유지되기 위해서는 수분 이동이 세포내외로 이루어져 항상성이 조절되어야 한다. 세포와 외부환경의 경계를 이루고 있는 세포막은 인지질 이중 막 구조를 이루고 있어서 수분 이동의 장벽으로서 역할을 하고 있다. 이러한 세포막을 통한 수분의 이동은 단순 확산과 특정 수분 채널에 의한 이동의 두 가지 경로를 가지고 있다. 1992년도에 Preston 등(1992)이 인간의 적혈구 세포에서 분리한 CHIP28(AQP1) 단백질이 water channel로서 기능을 한다는 것을 최초로 보고 한 이후로 세포 내외의 물 이동에 관여하는 수분 채널에 대한 실마리가 제공되었다 [Preston과 Agre, 1991; Preston 등, 1992]. 이후 이들 단백질들은 aquaporin 으로 명명되었으며, 식물, 미생물 등 다양한 생물체에서 유사한 아미노산 서열을 갖고 있으며 수분 이동 특성을

갖고 있는 단백질들이 분리 보고되었다[Maurel 등, 1993; Maurel 등, 1994; Luyten 등, 1995]. 식물에서는 Maurel 등에 의해서 TIP 단백질의 water channel 활성이 최초로 보고된 이래로 여러 종류의 식물체에서 aquaporin 유전자들이 분리되고 이들 단백질의 water channel 활성이 보고되었다[Maurel 등, 1993; Weig 등, 1997]. 식물의 aquaporin은 다양한 식물조직에 분포되어 있으며, 물의 이동에 관여하고 있다. 식물에서 물은 뿌리를 통하여 흡수되어 지상 부위로 이동하며, 식물에서 이러한 물의 이동은 symplastic pathway와 apoplastic pathway 라는 두 가지의 다른 메커니즘에 의하여 이루어진다. 이들 중 aquaporin은 세포막을 통한 물의 이동인 symplastic pathway에서 주요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 식물은 동물에 비해 훨씬 많은 aquaporin 유전자를 갖고 있어서 애기장대에서는 35개, 벼에서는 33개가 존재하는 것으로 알려져 있다 [Sakurai 등, 2005]. 따라서, 식물의 aquaporin은 동물에서 보다 훨씬 다양한 기능을 수행할 것으로 생각되고 있다[Maurel 등, 2008]. 이들은 아미노산 서열의 유사성에 의해서 크게 PIP(plasmamembrane intrinsic protein), TIP(tonoplast intrinsic

*Corresponding author
Phone: +82-31-299-1726; Fax: +82-31-299-1722
E-mail: bgkimpeace@korea.kr

protein), NIP(nodule 26-like intrinsic protein) 그리고 SIP (small and basic intrinsic protein) 4개의 그룹으로 나누어진다. 이들 그룹의 명칭은 단백질의 세포 내 위치를 나타내어 PIP 그룹은 세포막에, TIP 그룹은 vacuole막에, NIP 그룹은 세포막 혹은 ER(endoplasmic reticulum)막에, SIP는 ER막에 존재하는 것으로 알려지고 있다[Kaldenhoff 등, 2007]. 식물체에서 이들 유전자의 발현은 조직 특이적이거나 환경스트레스에 매우 특이적인 경우가 보고되고 있어서, 이들이 식물의 환경스트레스 내성 증진, 특히 물 흡수 및 유지와 관련된 내한발성과 관련이 되어 있을 것으로 생각되어 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[Zhu 등, 2005; Peng 등, 2007]. 최근에는 이들이 물 뿐만 아니라 NH₄⁺와 같은 무기 염이나 수소 이온의 이동에도 관여한다는 것이 보고되어 단순히 water channel로서의 기능만이 아닌 다양한 역할을 수행할 것으로 생각되고 있다[Jahn 등, 2004]. 또한 이들 water channel 활성 조절 기작에 관한 연구가 활발히 진행되어, 인산화와 protonation에 의해서 channel 활성 조절이 이루어진다는 것이 보고되었으나, 식물에서는 아직까지 어떤 인산화 효소에 의해서 aquaporin 활성이 조절되는지는 알려져 있지 않다[Maurel 등, 1995]. 또한 이들의 단백질 구조 규명을 통하여 channel 활성의 분자적 기작에 대한 연구도 이루어지고 있으며 그 예로서 water channel의 pore를 통한 수분의 선별적인 투과의 원리에 대해서 보고된 바 있다.

식물의 수분 스트레스와 밀접한 관계를 갖고 있는 water channel의 활성조절 연구는 작물의 내한발성 기작을 규명하기 위하여 꼭 필요하며, 이러한 연구를 위하여는 water channel의 활성 측정 방법이 필수적이다. Water channel 활성측정법은 *Xenopus oocyte*를 이용한 방법, yeast를 이용한 방법, liposome을 이용한 방법 등이 보고되었다[Yakata 등, 2007; Soveral 등, 2008].

이들 활성 측정법 중에서 *Xenopus oocyte*를 이용한 water channel의 활성측정법은 preston(1992) 등에 의해서 최초로 보고된 방법으로 cRNA를 oocyte에 주입하여 단백질을 발현시키고 저 삼투압의 완충용액에 oocyte를 정치 배양시켜 물의 유입을 유도하여 oocyte의 부풀어 오름 정도를 부피로 측정하여 활성을 계산하는 방법이다[Preston 등, 1992]. 저자들은 *Xenopus oocyte*를 이용하여 식물체의 PIP2-1단백질의 water channel 활성을 측정하기 위한 최적의 조건을 확립하는 실험들을 수행하여 식물체의 water channel 연구를 위한 기본적인 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

식물체 생육. 애기장대(*Arabidopsis thaliana* cloumbia 0)를 재료로 사용하였다. 종자를 Isopropanol에서 3분간, 50% 락스에서 2분간 정치 배양하여 멸균수로 3회 세척한 후, 종자를 배지에 고정시키기 위해 0.1% agarose에 현탁 하여 1/2 MS (Murashige skoog) 고체배지에 치상하였다. 4°C 암 조건에서 2일간 배양 후 22°C 장일 조건으로 옮겨 3주간 배양 하였다.

AtPIP2-1 유전자의 분리 및 *Xenopus oocyte* 발현 벡터로의 cloning. 3주간 배양된 어린 애기장대를 액체질소와 막자 사발

을 이용하여 완전히 마쇄 한 후 RNeasy extraction kit (Quiagen, Maryland, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. Total RNA는 1.2% 포름알데하이드 아가로즈 겔을 통하여 확인 하였다. RNA로부터 SuperScript III First-strand Synthesis System For RT-PCR kit(Invitrogen, Carlsbad, California, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. *Xenopus oocyte* 발현용 운반체로서는 pcDNA3.1/Zeo(-)(Invitrogen, Carlsbad, California, USA), pGEMHE 그리고 pGEMHE-GFP vector를 사용하였다[Liman 등, 1992]. 이들 각각의 운반체로 AtPIP2-1 유전자를 클로닝하기 위하여 primer(pcDNA F-AAGAATTCATGGCAAAGGATGTGGAA, pcDNA R-AAGGATCCTTAGAGTTGGCAGCACT), (pGEMHE F-AAGGATCCAATGGCAAAGGATGTGGAA, pGEMHE R-AAAAGCTTTTAGACGTTGGCAGCACT), (pGEMHE-GFP F-AAGGATCCATGGCAAAGGATGTGGAA, Pgemhe-GFP R-AAGAATTCAGACGTTGGCAGCACTTCT)를 각각 사용하여 PCR을 통해 AtPIP2-1 유전자를 증폭 한 후, 제한효소 *EcoRI/BamHI*, *BamHI/HindIII*, *BamHI/EcoRI*으로 처리 후 DNA Ligation kit ver3.1(TaKaRa, Tokyo, Japan)로 ligation 하고 대장균 DH5α에 형질 전환하여 유전자를 클로닝하였다.

cRNA 합성. *Xenopus oocyte* 발현용 운반체를 선형화 시킨 후 mMESSAGE mMACHINE high capped RNA Transcription Kit(Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 전사반응을 통하여 cRNA(complementary RNA)를 합성하였다. DNase로 운반체 DNA를 완전히 제거한 후 Lithium chloride 침전 반응을 통하여 RNA를 회수 하여 20 μL DEPC water에 녹였다. 합성된 cRNA는 1.2% 포름알데하이드 아가로즈 겔을 통하여 확인 후, Nano drop(Thermo Scientific Co. USA)을 이용하여 정량 하였다.

***Xenopus oocyte*의 분리 및 cRNA injection.** 개구리는 *Xenopus laevis*을 사용하였으며, 얼음 마취를 통해 개구리를 해부하여 oocyte를 꺼내 Barth's solution(10 mM HEPES, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.4 mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, pH 7.4)으로 옮겨 해부 현미경으로 관찰하며 포셉으로 포막을 제거하였다. 막이 제거된 oocyte는 50 μg/mL gentamycin이 첨가된 Barth's solution으로 옮겨 17°C에서 하루 동안 안정화하였다. Injection을 위한 파이펫은 1회에 20 nL의 cRNA(0.15 μg/μL)가 주입되도록 고정하였다. injection은 picospritzer® III(Parker Hannifin Corp. USA)를 사용하여 실시하였다. 50 μg/mL gentamycin이 첨가된 Barth's solution 조건하에서 2×2 cm² 크기의 철망으로 oocyte를 고정시킨 후 cRNA시료와 대조 군으로써 DEPC Water를 주입하였다.

Water channel 활성 측정. 주입한 cRNA의 안정적인 발현을 위해 주입 후 17°C 조건하에 3일 간 50 μg/mL gentamycin이 첨가된 Barth's solution에서 배양 한 후 water channel 활성을 측정하였다 Barth's solution에서 유지 되었던 oocyte를 5배 또는 2배로 희석시킨 ND96용액(96 mM NaCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, pH 7.4)으로 옮긴 후 Nikon SMZ1500 해부 현미경을 이용하여 oocyte를 관찰 하고 카메라를 통하여 oocyte 부피 변화를 1분 간격으로 사진을 찍었다. NIS-Elements BR 3.07(Nikon Inc., Japan) 프로그램을 이용하여 oocyte의 지름을 측정하였으며 oocyte의 표면 부피를

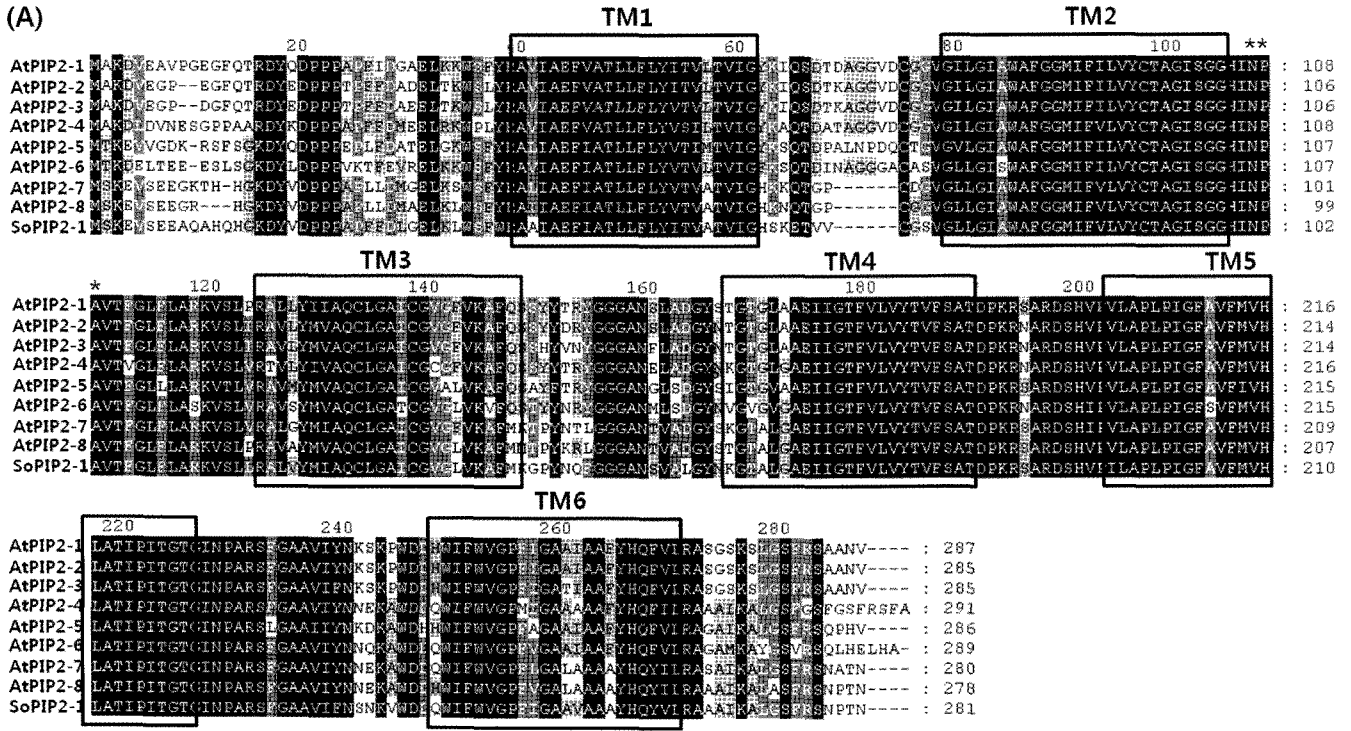


Fig. 1. Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree of all *Arabidopsis thaliana* PIP2s. (A) Comparison of amino acid sequences among AtPIP2s. Amino acid residues that are conserved at least four of 9 proteins are shaded, while amino acid residues that are identical in all 9 proteins are shown in black. Transmembrane domains are boxed and asterisks indicate the NPA motif. (B) Phylogenetic tree of all *Arabidopsis thaliana* PIP2s. The phylogenetic tree was constructed using the Clustal W and MEGA3.1 programs on the basis of the amino acid sequences of PIP2s.

측정을 위하여 $4/3\pi(\text{지름평균}/2)^3=V$, $V/V_0=\Delta V$ 의 식을 이용하였다.

결과 및 고찰

애기장대 AtPIP2-1의 cloning 및 phylogenetic tree. 애기장대의 PIP2-1은 aquaporin superfamily 중 PIP2계열에 속하며, 애기장대의 PIP2계열은 8개의 유전자들로 구성되어있다. PIP2-1의 locus number는 At3G53420으로서 이 단백질은 Fig. 1(A)와 같이 280개의 아미노산으로 구성되어 있으며 6개의 transmembrane domain을 가지고 있다. 또한 water channel pore의 전형적인 특징인 NPA site를 가지며, 세포질 쪽의 carboxyl terminal 지역에 인산화 site를 가지고 있다. Fig. 1(B)의 phylogenetic tree에서 보는 바와 같이 PIP2-2 그리고 PIP2-3에 가장 상동성이 높은 aquaporin 유전자이다. 또한 atPIP2-1 단백질의 C-terminal 지역에 인산화가 salt stress에 반응하여 본

단백질의 subcellular localization을 변화시켜 활성을 변화시킨다는 보고가 있어 환경스트레스에 의한 aquaporin 단백질의 활성 조절 연구의 좋은 재료로 생각된다[Prak 등, 2008].

외부 배지의 삼투압 변화에 따른 AtPIP2-1 단백질의 활성 변화. Aquaporin에 의한 물 이동은 능동수송이 아닌 수동수송으로서 oocyte 외부의 완충액에서 hypotonic shock를 가하면 AtPIP2-1 단백질 채널을 통하여 수분이 oocyte로 이동하고 oocyte의 swelling을 일으킨다. 이로 인한 부피 변화를 측정하여 aquaporin 활성을 측정하게 된다. 동일한 PIP2-1 단백질을 발현시킨 다 하여도 *Xenopus* oocyte의 swelling assay는 외부 완충용액의 hypoosmotic 조건에 따라 크게 변화하게 되므로 본 실험에서는 PIP2-1의 활성 측정을 위한 최적의 hypoosmotic 조건을 규명하고자 실험을 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 pcDNA3.1 vector를 사용하여 AtPIP2-1 단백질을 발현시킨 경우 1/2ND buffer 조건에서는 6분간 hypoosmotic shock를 지속할 경우 부피가 7% 증가하는 것을 관찰 할 수 있었으며, 이

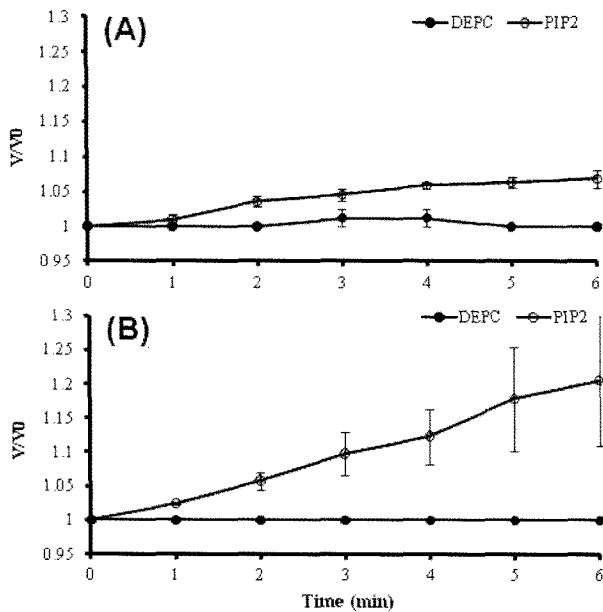


Fig. 2. Water permeability of AtPIP2-1 under different hypo-osmotic shock. DEPC water and cRNA of AtPIP2-1 synthesized from pCDNA3.1 vector were injected into each *Xenopus oocyte*. The rate of oocyte swelling in hypo-osmotic buffer was plotted as V/V_0 , where V is the volume at a given time point and V_0 is the initial volume. (A) Swelling assay was performed in 1/2ND96 buffer condition. (B) Swelling assay was performed in 1/5ND96 buffer condition. Data were given as the mean \pm SE (n \geq 5).

것은 동물에서 보고된 경우보다 매우 작은 값이다. 외부의 hypoosmotic 조건을 1/5ND buffer 조건하에서 6분간 hypoosmotic shock를 지속 할 경우 부피가 20% 이상 현저히 변화하는 것을 관찰 할 수 있었다[Preston 등, 1992]. 따라서 pcDNA3.1를 사용할 경우 swelling assay를 1/5ND buffer 조건에서 수행하는 것이 1/2ND buffer에 비하여 AtPIP2-1의 활성을 극대화하여 보여줄 수 있었다. 또한 hypoosmotic shock의 적절한 시간을 규명하기 위하여 관찰한 바에 의하면, 1/5ND 조건에서 6분 이상 지속시킬 경우 oocyte의 파열이 시작되는 것을 알 수 있었으므로, 6분 이내에서 swelling assay를 중지시키는 것이 적당하다는 것을 알 수 있었다. 본 실험을 통하여 pcDNA vector를 이용하여 애기장대의 AtPIP2-1의 활성측정을 위하여는 1/5ND buffer 수준의 hypoosmotic shock가 적당하며, hypoosmotic shock 후 6분 이내에 활성을 측정하는 것이 적당하다는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 vector의 발현 수준에 따라서 hypoosmotic stress의 최적 조건을 찾을 필요가 있음을 확인할 수 있었다.

Xenopus oocyte내에서 AtPIP2-1단백질의 안정적 생산이 활성에 미치는 영향. *Xenopus oocyte*내에서 단백질의 발현은 *in vitro*에서 합성된 RNA를 이용하기 때문에 발현용 promoter로서 최초에는 동물 발현용 vector가 그대로 사용되었으나, *in vitro* transcription에 의해서 생산된 RNA의 경우에도 oocytes내에서 RNA의 안정성과 단백질 합성의 효율을 높인 전용 vector들이 개발되어 사용되고 있다[Shih 등, 1998]. 본 실험에서는 PIP2-1 단백질의 oocyte내의 안정적인 발현을 비교하기 위하여 동물발

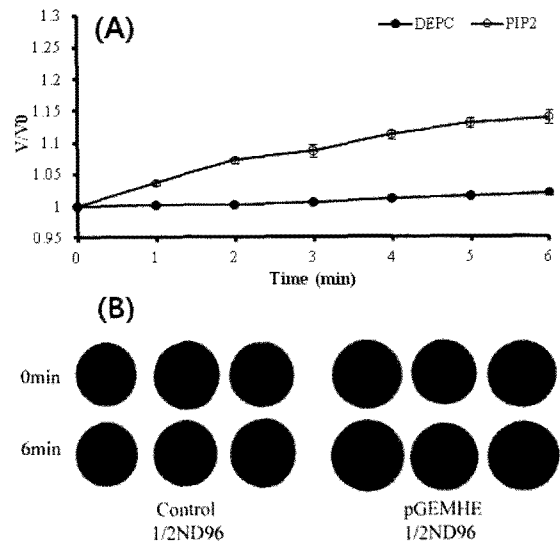


Fig. 3. Water permeability of AtPIP2-1 using pGEMHE vector. DEPC water and cRNA of AtPIP2-1 synthesized from pGEMHE vector were injected into each *Xenopus oocyte*. The rate of oocyte swelling in hypo-osmotic buffer was plotted as V/V_0 , where V is the volume at a given time point and V_0 is the initial volume. (A) Swelling assay was performed in 1/2ND96 buffer condition. Data are given as the mean \pm SE (n \geq 5). (B) The photograph of each oocyte under swelling assay. It was captured using NIS-Elements BR 3.07 program.

현용 vector와 oocyte전용 vector를 사용하여 AtPIP2-1의 활성 변화 차이를 관찰하였다. pCDNA3.1은 T7 reverse transcriptase가 인식하는 T7 promoter부위만을 가지고 있는 일반적인 동물 세포 발현용 vector이며, pGEMHE vector는 *Xenopus* β -globin 유전자의 5'과 3' UTR(untranslation region) 부위를 T7 promoter부위와 multiple cloning site사이에 갖고 있어서 mRNA의 안정성과 translation 효율을 증진시키는 것으로 알려진 vector이다(Liman 등, 1992). Fig. 3에서와 같이 pGEMHE vector의 경우 동량의 cRNA를 주입하였음에도 불구하고 pCDNA3.1 vector에 비하여 1/2ND buffer 조건에서 활성이 2배 이상 증가된 것을 보여 주고 있으며, 1/5ND buffer를 사용하였을 경우 oocyte의 과도한 swelling에 의해서 oocyte가 터지는 것을 관찰 할 수 있었다(Data 보이지 않음). 또한 1/2ND buffer에서 6분 이상 지속시킬 경우 oocyte의 터짐이 발생하는 것으로 보아 1/2ND buffer조건이 적당하다는 것을 알 수 있었다. 이것은 cRNA의 안정성 혹은 단백질 합성효율에 5'과 3' UTR부분이 크게 기여함을 보여주는 결과이며, 따라서 *Xenopus oocyte*에서 애기장대의 PIP2-1 활성측정을 위하여는 pGEMHE vector를 사용하는 것이 효율적이라고 여겨진다.

AtPIP2-1단백질의 Xenopus oocyte내의 발현 및 localization. 애기장대 AtPIP2-1 cRNA를 *Xenopus oocyte*내로 주입하여 water channel 활성이 변화하는 것을 볼 수 있었으나, 실제로 단백질이 발현되어 활성이 변화되었는지를 볼 필요성이 있으며, 발현된 단백질이 plasmamembrane intrinsic protein으로서 기능을 갖는 부위인 plasmamembrane에 위치하는지를 확인하여야 한다. 이를 위하여 Geiger 등(2010)은 oocyte에서 GFP(Green fluorescent protein)를 이용하여 유전자의 발현을 확인하는 실험

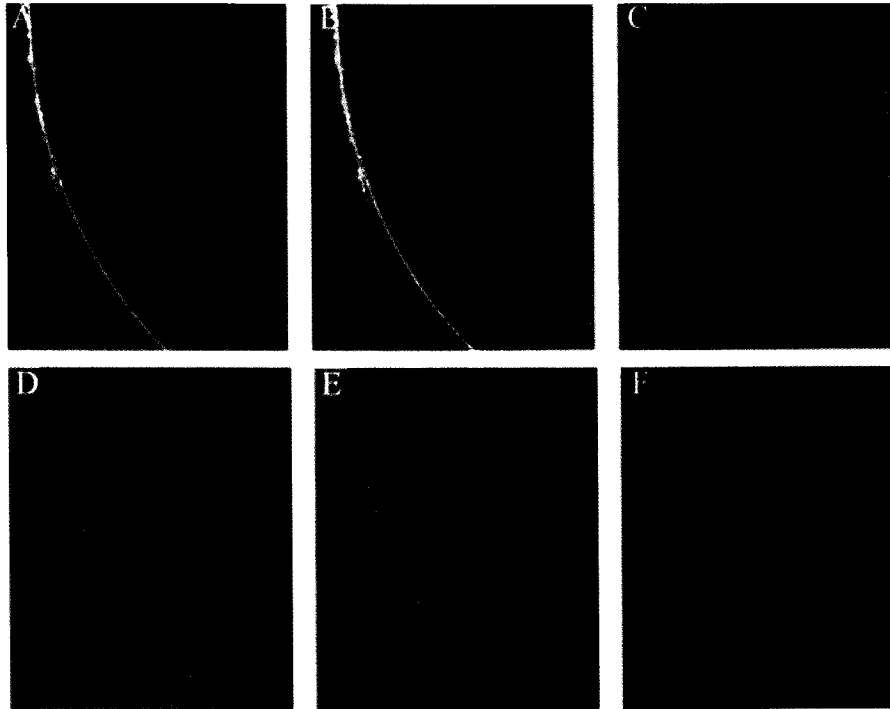


Fig. 4. Expression and subcellular localization of AtPIP2-1 fused with GFP in *Xenopus oocyte*. GFP tagged AtPIP2-1 cRNA synthesized from pGEMHE vector was injected into each oocyte. (A)-(C) show the oocyte injected with cRNA which have only GFP, (D)-(F) show the oocyte injected with cRNA which have AtPIP2-1 fused with GFP. (A) and (D) are DIC images. (C) and (F) are GFP images. (B) and (E) are merged images.

을 하였으며, BiFC(Bimolecular fluorescent complementation)와 같은 단백질 상호작용과 complex의 localization을 확인하는 실험을 수행하여 보고하였다(Geiger 등, 2010). 본 실험에서도 PIP2-1 단백질의 발현과 세포 내 위치를 확인하기 위하여 pGEMHE vector에 GFP(Green fluorescent protein)가 융합된 vector에 PIP2-1를 클로닝하고 이를 cRNA에 주입하여 Green fluorescent를 확인하였다. Fig. 4에서와 같이 GFP만 발현시켰을 경우 Green fluorescence가 oocyte 전체에 나타나지만, PIP2-1과 GFP 융합 단백질의 경우는 Green fluorescence 발현이 확인되어 PIP2단백질이 발현되었음을 확인 할 수 있었으며, Green fluorescent가 oocyte 외곽의 plasmamembrane지역에 위치하므로, *Xenopus oocyte*내에서 water channel이 기능하는 위치에서 발현됨을 알 수 있었다. 또한 GFP가 fusion된 PIP2-1에서도 water channel 활성이 존재하는 것을 통하여 water channel 활성은 AtPIP2-1단백질의 발현에 의한 것임을 알 수 있었다. 이 결과를 보았을 때 애기장대의 PIP2-1단백질이 oocyte에서 발현되고 기능하는 위치인 plasmamembrane에 위치한다는 것을 알 수 있었다.

초 록

*Xenopus oocyte*을 이용하여 식물 aquaporin 단백질의 물 흡수 활성을 측정하기 위한 최적의 조건을 확립하기 위하여 애기장대의 AtPIP2-1유전자를 클로닝하여 cRNA 제작용 vector, buffer osmolarity, hypoosmotic shock 처리 시간, 발현 단백질의 localization등을 검토한 결과, *Xenopus β-globin* 유전자의 5'

과 3' UTR(untranlation region)염기서열을 갖고 있는 pGEMHE vector가 단백질 생산에 더욱 효과적이며, 이 vector를 사용하였을 경우 hypoosmotic stress는 1/2ND buffer에서 6분간 처리 시 가장 큰 차이를 볼 수 있었으며, 애기장대 AtPIP2-1단백질과 GFP를 결합시켜 발현시킬 경우 GFP가 plasmamembrane에 위치하는 것을 보아 올바른 subcelluar localization이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

Kew words: water channel activity, AtPIP2-1, *Xenopus oocyte*

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Agenda(PJ0066472010) 과제, 바이오그린 21 사업(PJ0070112010) 과제 그리고 2010년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사 후 연수과정 지원사업에 의해 이루어 졌음.

참고문헌

Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Marten I., Ache P., Matschi S., Liese A., Wellmann C., Al-Rasheid K.A., Grill E., Romeis T., Hedrich R. (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 8023-8028.
 Jahn T.P., Moller A.L., Zeuthen T., Holm L.M., Klaerke D.A., Mohsin B., Kuhlbrandt W., Schjoerring J.K. (2004) Aquaporin

- homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett* **574**, 31-36.
- Kaldenhoff R., Bertl A., Otto B., Moshelion M., Uehlein N. (2007) Characterization of plant aquaporins. *Methods Enzymol* **428**, 505-531.
- Liman E.R., Tytgat J., Hess P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**, 861-871.
- Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B.A., Ramos J., Thevelein J.M., Hohmann S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* **14**, 1360-1371.
- Maurel C., Reizer J., Schroeder J.I., Chrispeels M.J. (1993) The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **12**, 2241-2247.
- Maurel C., Kado R.T., Guern J., Chrispeels M.J. (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. *EMBO J* **14**, 3028-3035.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 595-624.
- Maurel C., Reizer J., Schroeder J.I., Chrispeels M.J., Saier M.H., Jr. (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **269**, 11869-11872.
- Peng Y., Lin W., Cai W., Arora R. (2007) Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* **226**, 729-740.
- Prak S., Hem S., Boudet J., Viennois G., Sommerer N., Rossignol M., Maurel C., Santoni V. (2008) Multiple phosphorylation in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1019-1030.
- Preston G.M., Agre P. (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11110-11114.
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385-387.
- Shih T.M., Smith R.D., Toro L., Goldin A.L. (1998) High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* **293**, 529-556.
- Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., Maeshima M. (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* **46**, 1568-1577.
- Soveral G., Madeira A., Loureiro-Dias M.C., Moura T.F. (2008) Membrane tension regulates water transport in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 2573-2579.
- Weig A., Deswarte C., Chrispeels M.J. (1997) The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol* **114**, 1347-1357.
- Yakata K., Hiroaki Y., Ishibashi K., Sohara E., Sasaki S., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y. (2007) Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 688-693.
- Zhu C., Schraut D., Hartung W., Schaffner A.R. (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot* **56**, 2971-2981.