

· 专题论坛 ·

植物铜转运蛋白的结构和功能

袁金红^{1,2}, 李靖锐^{2,3}, 张海燕^{1,2*}

¹天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; ²中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室, 北京 100093

³山西师范大学生命科学学院, 临汾 041000

摘要 铜(Cu)是植物必需的微量营养元素, 参与植物生长发育过程中的许多生理生化反应。Cu缺乏或过量都会影响植物的正常新陈代谢过程。因此, 植物需要一系列Cu转运蛋白协同作用以保持体内Cu离子的稳态平衡。通常, Cu转运蛋白可分为两类, 即吸收型Cu转运蛋白(如COPT、ZIP和YSL蛋白家族)和排出型Cu转运蛋白(如HMA蛋白家族), 主要负责Cu离子的跨膜转运及调节Cu离子的吸收和排出。然而, 最近有研究表明, 有些Cu伴侣蛋白家族可能是从Cu转运蛋白家族进化而来, 且它们在维持植物细胞Cu离子稳态平衡中也具重要功能。该文对Cu转运蛋白和Cu伴侣蛋白的表达、结构、定位及功能等研究进展进行综述。

关键词 Cu转运蛋白, 离子吸收, 离子分布, 离子稳态

袁金红, 李靖锐, 张海燕 (2016). 植物铜转运蛋白的结构和功能. 植物学报 51, 849–858.

近年来, 随着工矿业的迅速发展, 土壤环境中重金属含量不断增加, 重金属污染问题日趋严重(袁祖丽等, 2008; 王兆苏等, 2015)。土壤中重金属含量超标, 不仅对植物和土壤微生物具毒害作用, 而且对人类和动物的健康也构成了威胁(赵雪芹等, 2012; 伍自力等, 2015)。Cu矿的开采、冶炼厂“三废”的排放, 以及农业生产中污水灌溉、含Cu化肥和农药的大量使用均增加了土壤中的Cu含量, 使局部土壤含Cu量达到原始土壤的几倍甚至几十倍, 远远超出了土壤环境的承载力, 土壤Cu污染正日渐成为严重的环境问题(金勇等, 2012; 贺瑶等, 2015)。植物修复技术成本低廉、操作简便且不造成二次污染, 在治理土壤Cu污染方面潜力巨大(唐莲等, 2003)。

铜(Cu)是生物体必需的微量营养元素之一, 在植物光合作用、呼吸作用、细胞壁代谢、氧化应激反应以及激素信号转导等生理生化过程中发挥着重要作用(Raven et al., 1999; Gratao et al., 2005; 陈涛和张劲松, 2006; Yruela, 2009; Peñarrubia et al., 2015)。

生理条件下, Cu以Cu⁺和Cu²⁺两种氧化状态存在, 并能在此两种状态之间相互转换, 这使得Cu能作为辅因子参与细胞内一些与氧化还原相关的反应(房茜

等, 2007; 张红晓和张芬琴, 2011)。但同时, Cu的这种特性也使其对植物体具潜在的毒害作用, 植物体内Cu过多会促进自由基和活性氧等有害物质产生, 进而对相关蛋白、DNA和其它生物分子产生损伤, 最终导致植物生长迟缓; Cu缺乏则会抑制氮代谢过程以及蛋白质合成。此外, 还会抑制光合作用的活性, 导致叶片失绿和畸形, 以及影响花粉和胚珠的正常发育, 降低花粉活性, 严重危害生殖器官的生长(Yu et al., 2008; Hansch and Mendel, 2009; 王夏芳, 2015)。因此, 严格控制植物体内Cu的平衡至关重要。

植物对Cu离子稳态的维持是一个精密的调控过程, 具有非常复杂的分子生物学机制。其中, 各类Cu转运蛋白在整个调控过程中发挥着重要作用, 参与Cu的吸收、螯合、区室化和代谢利用等关键步骤。这些Cu转运蛋白分布于植物体内不同器官和细胞内的不同位置, 根据其功能可将其分为吸收型Cu转运蛋白和排出型Cu转运蛋白两大类。其中, 吸收型Cu转运蛋白主要包括COPT (copper transporter)转运蛋白家族、ZIP (ZRT (zinc-regulated transporter)和IRT (iron-regulated transporter)-like protein)蛋白家族和黄色条纹蛋白(yellow stripe-like protein, YSL)家族等。目前已经鉴定的外排型Cu转运蛋白还比较少, 主

收稿日期: 2015-08-14; 接受日期: 2016-02-01

基金项目: 国家自然科学基金(No.31470292, No.31270313)

* 通讯作者。E-mail: hyz@ibcas.ac.cn

要是植物重金属ATP酶家族P_{1B}-ATPase (heavy metal ATPase, HMA)中的成员。另外,位于胞内的Cu伴侣蛋白(copper chaperone)能够将Cu转运至所需受体或Cu离子依赖型酶类。这些转运蛋白在植物吸收与再分配Cu以及维持胞内Cu离子稳态平衡中具有重要作用。

1 吸收型Cu转运蛋白

吸收型Cu转运蛋白主要定位于质膜,主要包括COPT转运蛋白家族、ZIP蛋白家族和YSL蛋白家族,负责将Cu从外界转运至细胞内。

1.1 COPT转运蛋白家族

通过序列比对及酵母Cu吸收缺陷突变体的功能互补实验发现了植物COPT转运蛋白。COPT蛋白属于Ctr (copper transporter) Cu转运蛋白家族。Ctr家族从酵

母到人类是保守的。该家族成员有3个潜在的跨膜结构域,其N端游离在胞外,C端则存在于胞质内,N端富含Met基序,在TM2和TM3两个跨膜区存在保守的MXXXM和GXXXXG基序(图1A, B),研究表明,该结构与Cu离子的结合和转运有关;C端富含CXC基序,与感受细胞内的Cu离子浓度有关;动物中该蛋白通常组装成同源三聚体,中间形成一个锥形的孔道,孔道的胞外直径小于胞内直径,Cu离子通过孔道进入膜内(图1C) (Peñarrubia et al., 2010; Jung et al., 2012)。

在双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现了该家族的6个成员,AtCOPT1–6,其中4个成员(AtCOPT1–3, AtCOPT5)能够互补酵母*ctr1Δ/ctr3Δ*突变体的缺陷生长。根据AtCOPT转运蛋白的结构特点,可将其分为3组。第1组包括AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6,它们有2个富含Met和His的结构域(N端),为质膜蛋白,对Cu有高度亲和性,在植物吸收

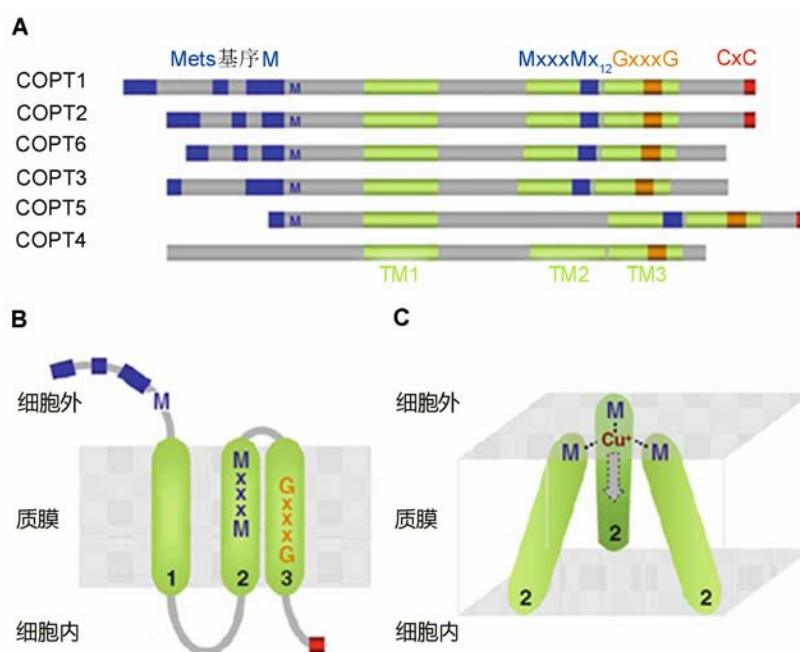


图1 COPT蛋白家族结构示意图(改编自Peñarrubia et al., 2010)

(A) 拟南芥COPT蛋白的序列比对; (B) COPT蛋白的拓扑结构; (C) 人类Ctr1同源三聚体TM2的空间结构。M: 蛋氨酸; G: 甘氨酸; C: 半胱氨酸

Figure 1 The COPT family of Cu transport proteins (modified from Peñarrubia et al., 2010)

(A) Alignment of the putative *Arabidopsis thaliana* COPT Cu transporters; (B) The proposed topological structure of the COPT proteins; (C) The spatial disposition of TM2 in the human Ctr1 homotrimer complex. M: Met; G: Gly; C: Cys

外界Cu离子的过程中行使功能;第2组包括AtCOPT3和AtCOPT5,它们只有其中的1个结构域,对Cu的转运能力较低,推测其可能主要参与胞内的Cu转运过程;第3组仅包括AtCOPT4,缺少Met残基以及介导Cu离子转运必不可少的基序,AtCOPT4基因在根部高水平表达,推测AtCOPT4在Cu离子转运过程中起间接作用(Sancenón et al., 2003)。

拟南芥AtCOPT1定位于质膜,对Cu⁺有很高的亲和性,该蛋白是该家族中研究得最清楚的成员(Andres-Colas et al., 2010)。AtCOPT1基因在拟南芥胚胎、气孔、花粉粒和根尖中均有表达,其中在根尖的表达最强,推测AtCOPT1可能介导拟南芥根尖从土壤中吸收Cu的过程;与拟南芥野生型植株相比,copt1突变体积累Cu的水平较低,且其根生长受到抑制,AtCOPT1过表达植株则积累较高水平的Cu,且根生长受到促进(Sancenón et al., 2004)。最近有研究表明,拟南芥细胞胞质内Cu离子水平变化能改变胞质的OH·水平,进而改变质膜上对OH·敏感的Ca²⁺和K⁺通道的通透性,从而影响根的生长(Rodrigo-Moreno et al., 2013)。例如,在10 μmol·L⁻¹ Cu处理下,拟南芥野生型和AtCOPT1过表达植株中Cu含量均升高,且后者约是前者的2.5倍。细胞内积累的Cu离子能够诱导野生型和AtCOPT1过表达植株中产生较多的OH·,进而诱导Ca²⁺内流和K⁺外流,而Ca²⁺内流和K⁺外流为根尖生长所必需,但在copt1突变体中并未观察到这种现象。当将Cu处理浓度升高到30 μmol·L⁻¹时,copt1的表型与野生型相似,其原因可能是10 μmol·L⁻¹ Cu处理下,AtCOPT1作为唯一的Cu转运蛋白介导Cu离子的吸收,而当Cu浓度升高时(如30 μmol·L⁻¹ Cu),一些其它的转运蛋白(如ZIP2等)也可能参与Cu离子的吸收进而使细胞内Cu含量增加,诱导Ca²⁺内流和K⁺外流(Rodrigo-Moreno et al., 2013)。此外,由于Cu离子在拟南芥中作为生物钟调节组分之一,COPT1被发现拟南芥的生物节律调节过程中发挥作用(Andres-Colas et al., 2010)。

拟南芥AtCOPT2与AtCOPT1的相似性最高(氨基酸序列相似度达67%),它们都能完全互补酵母ctr1Δ/ctr3Δ突变体的呼吸缺陷表型。AtCOPT2蛋白也定位于质膜,且其组织定位与AtCOPT1很相似。在拟南芥的子叶、毛状体、花药以及成熟的花粉粒等部位均能检测到AtCOPT2的表达,暗示AtCOPT1与

AtCOPT2在其地上部的Cu稳态调节过程中可能存在功能冗余(Sancenón et al., 2003)。然而在拟南芥根部,AtCOPT1仅在主根和侧根根尖表达,在此区域能够激活质膜上对OH·敏感的Ca²⁺/K⁺通道以及下游的根尖生长信号通路,而AtCOPT2只在根的亚顶端表达,在该区域对OH·敏感的Ca²⁺/K⁺通道不能被激活。上述结果表明,在拟南芥根部AtCOPT1和AtCOPT2的功能具区域特异性(Rodrigo-Moreno et al., 2013)。另外,AtCOPT2除了吸收和转运Cu离子外,还可应答铁(Fe)缺乏以及低磷(P)反应(Perea-Garcia et al., 2013)。在缺Cu但Fe充足的条件下,AtCOPT2在拟南芥根部的表达量很高,两种元素都缺乏时,能够进一步增强其表达,推测AtCOPT2启动子中的E-box结构域能够与bHLH型转录因子,如Fe应答蛋白(Fe deficiency-induced transcription factor, FIT)互作,应答Fe缺乏反应。在缺P条件下,AtCOPT2通过将Cu传递到应答低P信号并参与根部生长的Cu蛋白(如多Cu氧化酶(low phosphate root, LPR1和LPR2)),参与P信号转导过程(Perea-Garcia et al., 2013),表明AtCOPT2不仅能够转运Cu离子,而且还能调控其它离子的稳态平衡。这些研究为进一步探索AtCOPT家族蛋白的生物学功能提供了新视角和新方向。

拟南芥COPT6也定位于质膜,其氨基酸序列与AtCOPT1 (79%)和AtCOPT2 (75%)有很高的相似性。AtCOPT6主要在拟南芥维管组织和生殖器官中表达。在Cu缺乏时,与拟南芥野生型植株相比,copt6突变体植株中Cu分布发生变化,如莲座叶中Cu积累增加,种子中Cu积累则减少。在突变体中表达AtCOPT6基因能够恢复该表型,表明AtCOPT6参与了Cu从绿色组织到生殖器官的动员和再分配过程,在维持植物体内的Cu稳态平衡中发挥作用(Garcia-Molina et al., 2013)。外界环境中Cu浓度降低时,AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6均上调表达,但变化程度不同。如Garcia-Molina等(2013)发现,在含1和10 μmol·L⁻¹ Cu的培养基上生长的拟南芥幼苗,AtCOPT2在转录水平的表达没有明显差异;而在含100 μmol·L⁻¹ BCS (bathocuproine disulfonate) (Cu离子螯合剂)培养基上生长的幼苗,其AtCOPT2的表达显著增强。但AtCOPT6的表达模式与AtCOPT2相比明显不同,随着培养基中Cu含量的降低,AtCO-

*PT6*的表达呈现缓慢升高的趋势,表明不同的AtCOPT成员在响应外界Cu水平变化时的表现不同。拟南芥SPL7 (*SQUAMOSA* promoter-binding protein-like 7)转录因子对于AtCOPT6对地上部Cu缺乏的转录应答不可或缺,根部则可能由其它的转录因子调控(Jung et al., 2012)。因此,根部和地上部调控AtCOPT6表达的分子机制也许不同。

目前,关于拟南芥中AtCOPT3–5的研究报道较少。AtCOPT3过表达植株的表型与AtCOPT1过表达植株有一定的相似性,如二者均可增加内源Cu的含量,对培养基中过多的Cu较敏感等。但AtCOPT3的定位及功能还有待进一步研究,推测其可能与Cu向叶绿体的转运有关(Sancenón et al., 2003)。AtCOPT5定位于液泡膜,其基因在根部表达最强,在Cu缺乏时,促进液泡中的Cu离子向胞质流动,与胞内Cu离子的迅速动用和重新分布有关(Garcia-Molina et al., 2011)。另外,与野生型相比,*copt5*突变体对镉胁迫更敏感,说明Cu的转运过程对植物抵抗镉胁迫有重要作用(Carrio-Segui et al., 2015)。AtCOPT4是该家族中唯一不具介导Cu离子转运基序的蛋白,其功能尚未见报道。

在单子叶植物中仅有少数Cu转运蛋白的功能被研究。截至目前,在水稻(*Oryza sativa*)中发现了7个COPT蛋白家族成员(OsCOPT1–7),其中OsCOPT2–4能与OsCOPT6形成异源二聚体或多聚体,介导Cu离子的吸收,OsCOPT7则能单独行使相同的功能(Yuan et al., 2011); OsCOPT1和OsCOPT5能与病原菌效应物(effector)互作进而介导Cu的转运(Yuan et al., 2010)。另外,在小麦(*Triticum aestivum*)中发现了一种新的Cu转运蛋白TaCT1 (*Triticum aestivum* Cu transporter 1)。该蛋白定位于高尔基体,有12个跨膜结构域,2个潜在的Cu离子转运基序,分别位于第1和第9个跨膜区,其中Met³⁵、Met³⁸和Cys³⁶⁵对TaCT1行使功能是必需的(Li et al., 2014)。

1.2 ZIP蛋白家族

ZIP蛋白家族成员通过运输Fe、Zn、Mn、Cu和Cd等金属阳离子进入细胞质来维持胞内金属离子的平衡(Colangelo and Guerinot, 2006)。ZIP蛋白一般由309–476个氨基酸组成,通常具有8个跨膜结构域,N端和C端都定位于质膜外表面,在第III和第四个跨膜

区之间有1个富含His的可变环,预测其可能与金属的结合及转运有关(Guerinot, 2000)。

在细菌、真菌和动植物中鉴定的ZIP蛋白有100多种,但大多数ZIP蛋白的功能还未确定(Palmgren and Axelsen, 1998; Wintz et al., 2003)。拟南芥ZIP家族包含11个成员,早期通过芯片技术以及RT-PCR检测结果表明,在Cu缺乏条件下,AtZIP2和AtZIP4被诱导表达,Cu过量时它们的表达被抑制。将AtZIP2和AtZIP4转入酵母Cu吸收缺陷突变体(*ctr1Δ*),发现可以互补该突变体的表型,表明AtZIP2和AtZIP4可能参与了Cu的吸收和转运(Wintz et al., 2003)。然而,最近的研究表明,拟南芥ZIP家族的11个成员中,6种ZIP基因(ZIP1、ZIP2、ZIP3、ZIP7、ZIP11以及ZIP12)能够互补酵母锌吸收缺陷突变体*zrt1Δ/zrt2Δ*; 6种(ZIP1、ZIP2、ZIP5、ZIP6、ZIP7以及ZIP9)能互补锰吸收缺陷突变体*smf1Δ*; 1种(AtZIP7)能互补铁吸收缺陷突变体*fet3Δ/fet4Δ*,然而所有这些ZIP基因均不能互补Cu吸收缺陷突变体*ctr1Δ/ctr3Δ* (Milner, 2013)。综上所述,拟南芥ZIP蛋白很可能参与了Cu离子的吸收和转运过程,但该过程还需要其它Cu离子转运蛋白的协作。因此,ZIP蛋白在Cu离子运输中的确切功能及其与其它蛋白的互作尚待进一步探究。

1.3 YSL蛋白家族

YSL蛋白家族基于与玉米(*Zea mays*) YS1的序列相似性被鉴定(Koike et al., 2004)。拟南芥有8个YSL家族成员,水稻有18个(Chu et al., 2010; Wang et al., 2013)。对8个拟南芥YSL蛋白(AtYSLs)和1个玉米YS蛋白(ZmYS1)的拓扑结构进行分析后,发现该家族成员有15个跨膜结构域,其中一个大的膜外片段缺乏序列保守性,为可变区(DiDonato et al., 2004)。另一个可变区存在于N末端,然而,这9个蛋白N末端的可变区均富含酸性Glu残基和Asp残基,在序列上具一定程度的相似性(DiDonato et al., 2004)。

ZmYS1能够在铁缺乏玉米的根系和叶片中大量积累,该蛋白可转运Fe-PC (phytosiderophore complex)螯合物。另外,ZmYS1也与多种重金属(如Cu、Zn和Ni等)螯合物的转运有关(Ueno et al., 2009)。由于AtYSL蛋白能够与金属螯合剂烟草胺(nicotianamine, NA)或麦根酸类(mugineic acids, MA)物质结合,因而这类蛋白常与金属离子的长距离运输有关

(Waters et al., 2006)。例如, 拟南芥AtYSL2参与Cu-NA的转运, AtYSL2能够在植物根部和地上部的不同类型细胞中表达, 说明不同类型的细胞均能够以金属-NA复合物的形式摄取金属离子。DiDonato等(2004)进一步研究表明, AtYSL2主要负责金属离子在维管组织中的横向运输。拟南芥AtYSL1和AtYSL3的双突变体*ysl1/ysl3*的种子和衰老叶片中, Cu和Zn的稳态平衡被破坏, 这可能是AtYSL1和AtYSL3转运Zn与Cu的直接效应, 也可能是AtYSL1以及AtYSL3的缺失打破了Fe的稳态平衡进而引起的间接效应(Waters et al., 2006)。

2 排出型Cu转运蛋白

排出型Cu离子转运蛋白主要负责将胞质或细胞器中过多的Cu离子排出胞外, 防止过多的Cu对细胞正常生理活动产生影响, 目前鉴定的该类蛋白主要来自P_{1B}-type ATPase家族。

P_{1B}-type ATPase是P-type ATPases超家族中的一个亚家族, 与其它P-type ATPases相比, P_{1B}-type ATPase具有明显不同的结构特征: P_{1B}-type ATPase一般含有8个跨膜片段(P_{1B-4}-ATPase除外), 金属结合信号序列及可调节的胞质金属结合域存在于跨膜片段上, ATP结合区小, N端和C端存在多个金属结合域(图2) (Arguello et al., 2007; Migocka, 2015)。P_{1B}-type ATPase含有3个功能域, 即P功能域(phosphorylation domain) (与酶的磷酸化有关)、A功能域(actuator domain) (参与能量转导)和N功能域(nucleotide-binding domain) (包含ATP结合位点, 与核苷酸的结合有关) (张玉秀等, 2010)。

P_{1B}-type ATPase除选择性地运输必需金属离子(Cu⁺、Cu²⁺、Zn²⁺和Co²⁺)外, 还能转运一些重金属离子(Cu²⁺、Cd²⁺和Pb²⁺), 故P_{1B}-type ATPase又被称为重金属ATP酶(heavy metal transporting ATPase, HMA), HMA能通过水解ATP释放能量驱动重金属离子的跨膜转运(Axelsen and Palmgren, 2001)。根据HMA转运金属离子的特异性可将其分为两类, 一类转运二价阳离子(如Zn²⁺、Co²⁺、Cd²⁺和Pb²⁺), 另一类则转运一价阳离子(如Cu⁺和Ag⁺) (Beard, 1997)。拟南芥有8种P_{1B}-type ATPase, 其中AtHMA1-4能够转运二价阳离子, AtHMA5-8则能够转运一价阳离子

(如Cu⁺和Ag⁺)(Mills et al., 2003)。水稻OsHMA1-3能转运二价阳离子, 而OsHMA4-9转运一价阳离子(如Cu⁺和Ag⁺) (Williams and Mills, 2005)。

拟南芥中HMAs所有成员的功能都已清楚。AtHMA5-8与Cu离子的转运有关。其中AtHMA5主要在根部的中柱鞘细胞表达, 且受Cu离子特异性诱导, *hma5*突变体对Cu (30 μmol·L⁻¹)高度敏感但对其它金属离子(如Fe、Zn和Cd等)不敏感, 且其根部积累高水平的Cu, 表明AtHMA5在Cu离子的外排和解毒过程中发挥重要作用(Andrés-Colás et al., 2006)。AtHMA5是目前拟南芥中发现的唯一定位于细胞膜的外排型Cu离子转运蛋白(Burkhead et al., 2009)。AtHMA6位于叶绿体外膜, 主要负责将Cu转运到叶绿体, 参与Cu/Zn超氧化物歧化酶的合成(Shikanai, 2003; Sautron et al., 2015); 而AtHMA8定位于类囊体膜, 介导Cu离子向质体蓝素的运输(Abdel-Ghany et al., 2005); AtHMA7在转运Cu⁺通过高尔基体膜, 参与乙烯反应过程中发挥重要作用(Rodriguez et al., 1999)。

到目前为止, 水稻P-type ATPases家族中只有4个成员的功能被研究。但仅OsHMA5和OsHMA9与Cu离子的外排有关(钟茜和李韶山, 2013)。OsHMA5定位于质膜。组织定位分析表明, 其基因主要在根中柱鞘细胞、节点处维管束的木质部区域以及花梗、叶柄和果壳的维管组织中表达(Deng et al., 2013)。水稻OsHMA5基因被敲除后, 突变体植株在营养生长阶段地上部的Cu含量降低, 根部的Cu含量升高; 在生殖生长阶段突变体种子的Cu含量降低, 这说明OsHMA5与水稻营养生长和生殖生长阶段木质部Cu的转运过程有关(Deng et al., 2013)。OsHMA9主要在维管组织中表达, 其缺失突变体中能积累较高水平的Cu、Zn、Pb和Cd等, 表明其在这些金属离子的外排过程中起作用(Lee et al., 2007)。

3 Cu伴侣蛋白

Cu伴侣蛋白是一类胞内的可溶性小分子Cu结合蛋白, 能够将Cu转运至特殊受体及Cu依赖酶, 它们与Cu离子转运蛋白协同调节胞内Cu离子的动态平衡(Changela et al., 2003)。

酵母中已经揭示的Cu伴侣蛋白有3种, 即ATX1

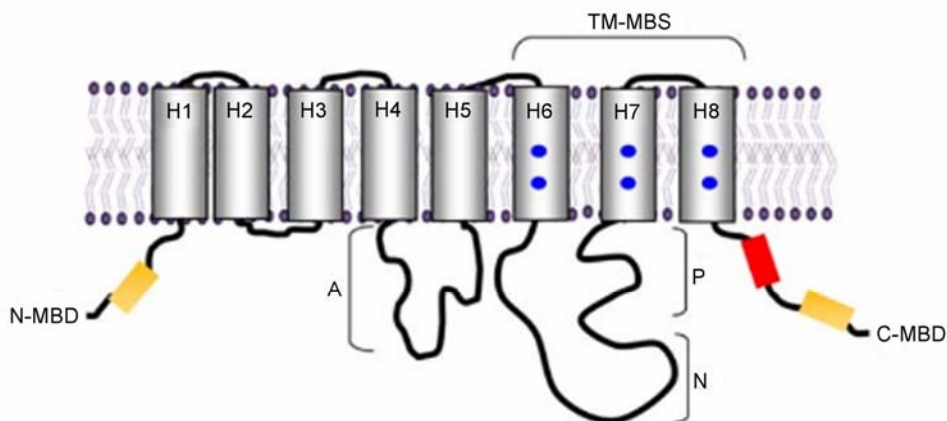


图2 P_{1B}-type ATPase的拓扑结构和主要结构域示意图(Arguello et al., 2007)

H1–H8: 跨膜结构域; TM-MBS: 跨膜金属结合位点; N-MBD: N端金属结合域; C-MBD: C端金属结合域。A、P和N: P_{1B}-type ATPase的3个功能域

Figure 2 Schematic illustration of the topology and main domains present in P_{1B}-type ATPases (Arguello et al., 2007)

H1–H8: Transmembrane segments; TM-MBS: Transmembrane metal binding sites; N-MBD: N-terminal metal binding domain; C-MBD: C-terminal metal binding domain. A, P and N: The main domains present in P_{1B}-type ATPases

(antioxidant)、CCS (copper chaperone for SOD)和COX17 (cytochrome c oxidase17) (Wintz and Vulpe, 2002)。在拟南芥中有2个与酵母ATX1同源的Cu伴侣蛋白, 分别为AtCCH (ATX1-like copper chaperone) 和 AtATX1 (antioxidant protein1) (Pilon et al., 2006)。AtCCH具有ATX1型金属伴侣家族的结构特征, 如典型的Lys残基、 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 折叠结构以及N-端的MXCXXC Cu⁺结合基序。此外, 与拟南芥和酵母ATX1相比, AtCCH有一个独特的未知功能C-末端延伸(C-terminal extension)序列, 该序列可能与AtCCH在伴细胞和筛管分子之间的穿梭有关(Mira et al., 2001)。AtCCH蛋白主要存在于衰老叶片和叶柄的维管组织中, 通过韧皮部参与衰老组织中Cu离子的长距离动员, 在衰老组织中表达量上调(Himelblau et al., 1998)。Cu缺乏能诱导AtCCH mRNA的表达, Cu过量则抑制其表达。与AtCCH不同, Cu过量则诱导AtATX1 mRNA的表达, 说明AtATX1以及AtCCH可能在拟南芥铜稳态维持中的功能不同(Puig et al., 2007)。另外, 研究表明拟南芥中AtATX1过表达不仅能增强Cu过量情况下转基因植物对Cu的耐受性及对Cu的积累, 而且对Cu缺乏的耐受性也增强, 表明AtATX1在Cu过量和缺乏条件下都可行使功能, 但具

体机制尚不清楚(Shin et al., 2012)。拟南芥CCS蛋白有叶绿体靶向序列, 主要参与叶绿体Cu/Zn超氧化物歧化酶的辅基蛋白的成熟过程(Abdel-Ghany et al., 2005a)。拟南芥COX17蛋白则参与Cu离子向线粒体的转运过程(Balandin and Castresana, 2002; Garcia et al., 2014)。

最近在拟南芥中发现了一类新的植物特异的Cu伴侣蛋白AtPCH1 (plastid chaperone 1), 它们产生于编码叶绿体AtHMA6 (P-type ATPase PAA1)基因的可变剪接过程(Blaby-Haas et al., 2014)。该过程可产生2个转录本, 一个编码AtPAA1, 另一个编码AtPCH1, 其中编码AtPCH1的转录本只包含AtPAA1基因的前2个外显子, 因此AtPCH1与AtPAA1的N端一致, 包含Cu⁺结合基序MxCxxC。AtPCH1可将Cu⁺传递到叶绿体内膜上AtPAA1的金属离子结合位点, Cu⁺通过AtPAA1进入膜内, 进而被AtPAA2 (AtHMA8)转入类囊体, 或者被拟南芥的其它伴侣蛋白(如CCS或Cu/Zn-SOD)分进行不同的功能(Blaby-Haas et al., 2014; Tapken et al., 2015a, 2015b)。通过对大量的植物基因组和ESTs (expressed sequence tags)数据进行分析, 发现很多陆生植物中存在相似的可变剪接过程。这种伴侣蛋白的普遍存在

表明了Cu⁺转运机制的保守性(Blaby-Haas et al., 2014)。

4 结语

Cu是植物必需的营养元素,但同时又是潜在的有毒重金属。因此植物进化出精妙复杂的调节网络来严格控制其体内的Cu含量,以保证正常生长发育。目前已经从植物中分离和鉴定了多个Cu转运蛋白和Cu伴侣蛋白,它们在维持植物体Cu离子的稳态平衡过程中具有重要功能。如在拟南芥中,COPT1能够促进根部Cu离子的吸收(Sancenón et al., 2004),COPT6与地上部Cu离子的再分配过程有关(Garcia-Molina et al., 2013),COPT5能够使液泡中的Cu离子向胞质转运(Garcia-Molina et al., 2011),而COPT2与Cu和Fe离子稳态的维持有关(Perea-Garcia et al., 2013)。SPL7转录因子可以调控COPT1、COPT2和COPT6基因在转录水平上的表达(Jung et al., 2012)。这些研究结果启示我们,Cu转运蛋白除在转录水平对Cu水平进行响应,是否也在蛋白水平对外界Cu水平进行响应?已有的证据表明,其它离子转运蛋白,如铁转运蛋白和硼转运蛋白,均可通过转运蛋白的翻译后修饰作用来调控细胞内铁或硼的稳态平衡(Brumbarova et al., 2015; Wakuta et al., 2015; Zelazny and Vert, 2015)。本实验室最近的研究表明,Cu处理拟南芥植株后,其COPT1发生降解,且随着Cu处理时间的延长,降解加剧。此研究不仅发现了植物可能通过控制质膜上Cu转运蛋白的含量进而对细胞内的Cu离子水平进行调控,而且也有助于进一步了解Cu过量或缺乏对植物产生伤害的机制,为全面阐释植物对外界Cu水平变化的响应机制拓宽了思路。另外,本研究还表明,加入蛋白酶体抑制剂MG132后,在Cu处理下拟南芥COPT1的降解过程被抑制,推测Cu处理诱导的COPT1降解过程与泛素化降解途径有关,其潜在机制尚需深入研究。除此之外,关于植物维持Cu稳态的机制还有以下几个问题值得关注和研究。(1) 拟南芥COPT1转运蛋白在Cu过量的条件下能被降解,拟南芥COPT家族的其它定位于质膜上的转运蛋白(如COPT2和COPT6)是否也能被降解,其降解机制与COPT1有何异同?(2) 许多Cu转运蛋白和Cu伴侣蛋白参与植物对Cu的吸收、转运和调控过程,但是这些

蛋白如何协同工作,即它们的基因是通过何种机制进行表达和关闭的?(3) 已有一些研究结果表明,植物Cu代谢与多个其它的生物学过程如根发育(Rodrigo-Moreno et al., 2013)、铁代谢(Waters et al., 2012)、磷代谢(Perea-Garcia et al., 2013)以及生物钟(Andres-Colas et al., 2010)等有关,但是Cu转运蛋白影响这些生物学过程的具体机制是什么?利用细胞生物学和现代分子生物学等手段对Cu转运蛋白在Cu吸收、转运和积累过程中的作用及与其它生物学过程的关联进行研究,将不仅有助于阐明Cu在植物生命活动过程中的作用机制,而且可为植物不同信号通路的互作网络研究提供证据。

参考文献

- 陈涛,张劲松 (2006). 乙烯的生物合成与信号传递. 植物学通报 23, 519-530.
- 房茜,李鹏,靳思,印莉萍 (2007). 酵母和植物中铜的转运系统及其调控. 植物学通报 24, 807-815.
- 贺瑶,周惜时,夏妍,郭攀,王桂萍,沈振国,陈亚华 (2015). 铜排斥型植物黄花月见草(*Oenothera glazioviana*)对铜胁迫的响应以及在铜污染土壤上的合理利用. 农业环境科学学报 34, 449-460.
- 金勇,付庆灵,郑进,康薇,刘永红,胡红青 (2012). 超积累植物修复铜污染土壤的研究现状. 中国农业科技导报 14, 93-100.
- 唐莲,刘振中,蒋任飞 (2003). 重金属污染土壤植物修复法. 环境保护科学 29, 33-36.
- 王夏芳 (2015). 铜离子对环境危害现状及对策研究. 国土与自然资源研究 1, 55-57.
- 王兆苏,王新军,陈学萍,朱永官 (2015). 微生物铁氧化作用对砷迁移转化的影响. 环境科学学报 31, 328-333.
- 伍自力,余孟瑶,陈露,魏静,王晓琴,胡勇,闫妍,万平 (2015). 小立碗藓对重金属铜胁迫的应答特征. 植物学报 50, 171-179.
- 袁祖丽,孙晓楠,刘秀敏 (2008). 植物耐受和解除重金属毒性研究进展. 生态环境 17, 2494-2502.
- 张红晓,张芬琴 (2011). 铜在植物细胞中的运输和分布. 洛阳理工学院学报 21, 1-5.
- 张玉秀,张媛雅,孙涛,柴团耀 (2010). 植物重金属转运蛋白P_{1B}-ATPase结构和功能研究进展. 生物工程学报 26, 715-725.
- 赵雪芹,张海燕,刘维仲 (2012). 植物铜转运相关蛋白研究

- 进展. 广西植物 **32**, 280–284.
- 钟茜, 李韶山 (2013). 水稻P_{1B}-型ATPase重金属转运蛋白的结构与功能研究进展. 宁夏师范学院学报 **34**, 62–69.
- Abdel-Ghany SE, Burkhead JL, Gogolin KA, Andres-Colas N, Bodecker JR, Puig S, Peñarrubia L, Pilon M (2005a). AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett* **579**, 2307–2312.
- Abdel-Ghany SE, Muller-Moule P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005b). Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**, 1233–1251.
- Andres-Colas N, Perea-Garcia A, Puig S, Peñarrubia L (2010). Deregulated copper transport affects Arabidopsis development especially in the absence of environmental cycles. *Plant Physiol* **153**, 170–184.
- Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L (2006). The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* **45**, 225–236.
- Arguello JM, Eren E, Gonzalez-Guerrero M (2007). The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases. *Biometals* **20**, 233–248.
- Axelsen KB, Palmgren MG (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**, 696–706.
- Balandin T, Castresana C (2002). AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol* **129**, 1852–1857.
- Beard SJ, Hashim R, Membrillo-Hernández J, Hughes MN, Poole RK (1997). Zinc(II) tolerance in *Escherich coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (*o732*) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* **25**, 883–891.
- Blaby-Haas CE, Padilla-Benavides T, Stube R, Arguello JM, Merchant SS (2014). Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E5480–E5487.
- Brumbarova T, Bauer P, Ivanov R (2015). Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends Plant Sci* **20**, 124–133.
- Burkhead JL, Reynolds KAG, Abdel-Ghany SE, CoHu CM, Pilon M (2009). Copper homeostasis. *New Phytol* **182**, 799–816.
- Carrio-Segui A, Garcia-Molina A, Sanz A, Peñarrubia L (2015). Defective copper transport in the *copt5* mutant affects cadmium tolerance. *Plant Cell Physiol* **56**, 442–454.
- Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, O'Halloran TV, Mondragon A (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**, 1383–1387.
- Chu HH, Chiecko J, Punshon T, Lanzirotti A, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2010). Successful reproduction requires the function of Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant Physiol* **154**, 197–210.
- Colangelo EP, Guerinot ML (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 322–330.
- Deng F, Yamaji N, Xia J, Ma JF (2013). A member of the heavy metal P-type ATPase OshMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol* **163**, 1353–1362.
- DiDonato Jr RJ, Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL (2004). Arabidopsis *Yellow Stripe-Like2* (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* **39**, 403–414.
- Garcia-Molina A, Andres-Colas N, Perea-Garcia A, del Valle-Tascon S, Peñarrubia L, Puig S (2011). The intracellular Arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. *Plant J* **65**, 848–860.
- Garcia-Molina A, Andres-Colas N, Perea-Garcia A, Neumann U, Dodani SC, Huijser P, Peñarrubia L, Puig S (2013). The Arabidopsis COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant Cell Physiol* **54**, 1378–1390.
- Garcia L, Welchen E, Gonzalez DH (2014). Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* **19**, 269–274.
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* **32**, 481–494.
- Guerinot ML (2000). The ZIP family of metal transporters. *BBA-Biomembranes* **1465**, 190–198.
- Hansch R, Mendel RR (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* **12**, 259–266.
- Himmelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Peñarrubia L, Amasino RM (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from Arabidopsis. *Plant Physiol* **117**, 1227–1234.

- Jung HI, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian LV, Vatamaniuk OK** (2012). COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in Arabidopsis and is a novel target of *SQUAMOSA* promoter-binding protein-like 7. *J Biol Chem* **287**, 33252–33267.
- Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2004). OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J* **39**, 415–424.
- Lee S, Kim YY, Lee Y, An G** (2007). Rice P_{1B}-type heavy-metal ATPase, OshMA9, is a metal efflux protein. *Plant Physiol* **145**, 831–842.
- Li HX, Fan R, Li LB, Wei B, Li GL, Gu LQ, Wang XP, Zhang XQ** (2014). Identification and characterization of a novel copper transporter gene family *TaCT1* in common wheat. *Plant Cell Environ* **37**, 1561–1573.
- Migocka M** (2015). Copper-transporting ATPases: the evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. *IUBMB Life* **67**, 737–745.
- Mills RF, Krijger GC, Baccarini PJ, Hall JL, Williams LE** (2003). Functional expression of AtHMA4, a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* **35**, 164–176.
- Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV** (2013). Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *J Exp Bot* **64**, 369–381.
- Mira H, Martínez-García F, Peñarrubia L** (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *Plant J* **25**, 521–528.
- Palmgren MG, Axelsen KB** (1998). Evolution of P-type ATPases. *BBA-Bioenergetics* **1365**, 37–45.
- Peñarrubia L, Andres-Colas N, Moreno J, Puig S** (2010). Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? *J Biol Inorg Chem* **15**, 29–36.
- Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, Sanz A** (2015). Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Front Plant Sci* **6**, 255.
- Perea-García A, García-Molina A, Andres-Colas N, Vera-Sirera F, Perez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L** (2013). Arabidopsis copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling. *Plant Physiol* **162**, 180–194.
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H** (2006). Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 256–263.
- Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenón V, Andrés-Colás N, García-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE, Thiele DJ, Ecker JR, Pilon M, Peñarrubia L** (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 385–390.
- Raven JA, Evans MCW, Korb RE** (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth Res* **60**, 111–149.
- Rodrigo-Moreno A, Andres-Colas N, Poschenrieder C, Gunse B, Peñarrubia L, Shabala S** (2013). Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in Arabidopsis root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant Cell Environ* **36**, 844–855.
- Rodríguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB** (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* **283**, 996–998.
- Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L** (2004). The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* **279**, 15348–15355.
- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L** (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**, 577–587.
- Sautron E, Mayerhofer H, Giustini C, Pro D, Crouzy S, Ravaud S, Pebay-Peyroula E, Rolland N, Catty P, Seigneurin-Berny D** (2015). HMA6 and HMA8 are two chloroplast Cu⁺-ATPases with different enzymatic properties. *Biosci Rep* **35**, e00201.
- Shikanai T** (2003). PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**, 1333–1346.
- Shin LJ, Lo JC, Yeh KC** (2012). Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol* **159**, 1099–1110.
- Tapken W, Kim J, Nishimura K, Wijk KJ, Pilon M** (2015). The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the PAA2/HMA8 copper transporter in chloroplasts. *New Phytol* **205**, 511–517.
- Tapken W, Ravet K, Shahbaz M, Pilon M** (2015). Regulation of Cu delivery to chloroplast proteins. *Plant Signal Behav* **10**, e1046666.
- Ueno D, Yamaji N, Ma JF** (2009). Further characterization of ferric-phytosiderophore transporters ZmYS1 and Hv-

- YS1 in maize and barley. *J Exp Bot* **60**, 3513–3520.
- Wakuta S, Mineta K, Amano T, Toyoda A, Fujiwara T, Naito S, Takano J** (2015). Evolutionary divergence of plant borate exporters and critical amino acid residues for the polar localization and boron-dependent vacuolar sorting of AtBOR1. *Plant Cell Physiol* **56**, 852–862.
- Wang JW, Li Y, Zhang YX, Chai TY** (2013). Molecular cloning and characterization of a *Brassica juncea* yellow stripe-like gene, BjYSL7, whose overexpression increases heavy metal tolerance of tobacco. *Plant Cell Rep* **32**, 651–662.
- Waters BM, Chu HH, Didonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL** (2006). Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol* **141**, 1446–1458.
- Waters BM, McInturf SA, Stein RJ** (2012). Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **63**, 5903–5918.
- Williams LE, Mills RF** (2005). P_{1B}-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* **10**, 491–502.
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C** (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 47644–47653.
- Wintz H, Vulpe C** (2002). Plant copper chaperones. *Biochem Soc T* **30**, 732–735.
- Yruela I** (2009). Copper in plants acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* **36**, 409–430.
- Yu ZL, Zhang JG, Wang XC, Chen J** (2008). Excessive copper induces the production of reactive oxygen species, which is mediated by phospholipase D, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and antioxidant systems. *J Integr Plant Biol* **50**, 157–167.
- Yuan M, Chu Z, Li X, Xu C, Wang S** (2010). The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell* **22**, 3164–3176.
- Yuan M, Li X, Xiao J, Wang S** (2011). Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biol* **11**, 69.
- Zelazny E, Vert G** (2015). Regulation of iron uptake by IRT1: endocytosis pulls the trigger. *Mol Plant* **8**, 977–979.

Structure and Function of Copper Transporters in Plants

Jinhong Yuan^{1,2}, Jingrui Li^{2,3}, Haiyan Zhang^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; ²Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³School of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041000, China

Abstract Copper (Cu) is an essential micronutrient involved in many physiological and biochemical reactions in growth and development in plants. Cu deficiency or excess can affect plant metabolism. Therefore, a series of Cu transporters are needed to act synergistically to sustain Cu homeostasis in plants. Plant Cu transporters can be classified into 2 general classes — Cu-uptake transporters (e.g., COPT, ZIP and YSL protein families) and Cu-efflux transporters (e.g., HMA protein family) — responsible for membrane transport of Cu and mediating Cu uptake and efflux. Recent studies have shown that some Cu chaperone protein families may be evolved from Cu transporter protein families, and Cu chaperones play an important role in maintaining Cu homeostasis. Here, we review developments in the expression, structure, location and function of Cu transporters as well as Cu chaperones.

Key words copper transporter, ion absorption, ion distribution, ion homeostasis

Yuan JH, Li JR, Zhang HY (2016). Structure and function of copper transporters in plants. *Chin Bull Bot* **51**, 849–858.

* Author for correspondence. E-mail: hyz@ibcas.ac.cn