

• 综述 •

植物重金属转运蛋白 P_{1B} -ATPases 研究进展

安鹏虎¹, 张多民¹, 周子方², 韩丹¹, 许自成¹, 黄五星¹

1 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450002

2 江苏中烟工业有限责任公司, 江苏 南京 210011

安鹏虎, 张多民, 周子方, 等. 植物重金属转运蛋白 P_{1B} -ATPases 研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3020-3030.

An PH, Zhang DM, Zhou ZF, et al. Advances in plant heavy metal transporter P_{1B} -ATPases. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3020-3030.

摘要: P_{1B} -ATPases 是在生物中广泛存在的一类可通过水解 ATP 跨膜运送重金属离子的蛋白, 是 P 型 ATPase 家族的一个亚类。研究发现 P_{1B} -ATPases 在植物中主要负责重金属离子的主动转运, 在植物重金属平衡调节系统中发挥重要作用。文中从 P_{1B} -ATPases 的结构与分类出发, 介绍了 P_{1B} -ATPases 的作用机制, 综述了目前 P_{1B} -ATPases 功能的研究进展, 以期对未来 P_{1B} -ATPases 在改良作物品质以及生态环境治理的研究及应用提供参考。

关键词: 植物, 重金属, 转运蛋白, P_{1B} -ATPases

Advances in plant heavy metal transporter P_{1B} -ATPases

Penghu An¹, Duomin Zhang¹, Zifang Zhou², Dan Han¹, Zicheng Xu¹, and Wuxing Huang¹

1 College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

2 Jiangsu China Tobacco Industry Co., Ltd., Nanjing 210011, Jiangsu, China

Abstract: P_{1B} -ATPases are a group of proteins that can transport heavy metal ions across membranes by hydrolyzing ATP and they are a subclass of the P-type ATPase family. It was found that P_{1B} -ATPases are mainly responsible for the active transport of heavy metal ions in plants and play an important role in the regulation of heavy metal homeostasis in plants. In this paper, we discuss the mechanism of P_{1B} -ATPases from the structure and classification of P_{1B} -ATPases, and review the current research progress in the function of P_{1B} -ATPases, in order to provide reference for future research and application of P_{1B} -ATPases in improving crop quality and ecological environment management.

Keywords: plants, heavy metals, transporters, P_{1B} -ATPases

重金属广泛存在于自然和农业环境中^[1]。铜 (Cu)、锌 (Zn) 和锰 (Mn) 等是植物代谢所必需的微量营养元素, 但植物体内若存在过量积累,

便会产生毒性抑制植物生长发育。非必需金属如镉 (Cd)、铅 (Pb)、汞 (Hg) 等则具有剧毒, 对植物产生危害^[2]。植物自身存在着维持体内金属离

Received: October 20, 2020; Accepted: January 14, 2021

Supported by: Henan Province Science and Technology Research Project, China (No. 202102310026).

Corresponding author: Wuxing Huang. Tel/Fax: +86-371-63555763; E-mail: wxhuang@henau.edu.cn

河南省科技攻关项目 (No. 202102310026) 资助。

网络出版时间: 2021-01-25

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210124.1626.004.html>

子浓度平衡的调节系统, 重金属转运蛋白是其中重要的组成部分。重金属转运蛋白分为吸收蛋白 (Metal uptake proteins) 和排出蛋白 (Metal efflux proteins) 两大类。其中, 吸收蛋白主要有: 黄色条纹转运 (Yellow stripe-like transporter, YSL) 蛋白家族、锌铁蛋白 (ZRT/IRT-like protein, ZIP) 家族、天然抗性巨噬细胞蛋白家族 (Natural resistance associated macrophage protein, NRAMP) 等, 主要位于细胞质膜上, 其功能是将重金属转运至细胞质; 排出蛋白包括 P_{1B} 型 ATPases、阴离子扩散促进子 (Cation diffusion facilitator family, CDF) 蛋白家族等, 其功能是将重金属排出细胞质, 或运载至液泡。P 型 ATP 酶是一大类完整的膜蛋白家族, 它们利用 ATP 水解的能量跨膜运输阳离子和脂质。P_{1B}-ATPases 是 P-ATPase 多个亚族中唯一参与重金属稳态的转运蛋白, 存在于根吸收、根向叶的运输和液泡的整合等关键过程中^[3]。

P_{1B}-ATPases 广泛存在于各种生物中, 在植物中利用水解 ATP 获得能量, 主动运输重金属离子穿过脂质双层膜^[4]。P_{1B}-ATPases 可以运输植物必需的金属离子, 如 Cu⁺、Cu²⁺、Zn²⁺和 Co²⁺等, 为植物生长提供稳定的离子输送。P_{1B}-ATPases 还能转运一些重金属离子, 如 Cd²⁺、Pb²⁺等, 在植物遭遇重金属毒害时, 对重金属的吸收、转运与解毒具有重要作用^[5]。分析 P_{1B}-ATPases 在植物中的作用机制与功能, 对植物体内金属离子的转运以及抵御重金属胁迫的研究具有重要的指导意义。因此, 本文概述了 P_{1B}-ATPases 的结构、分类、作用机制, 并就目前对 P_{1B}-ATPases 功能的研究进行了综述, 以期对未来 P_{1B}-ATPases 在改良作物品质以及生态环境治理的研究及应用方面提供参考。

1 P_{1B}-ATPases 的结构和分类

P_{1B}-ATPases 基因广泛存在于植物当中, 如低等植物绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中存在 3 个基因即 *CrHMA1-3*, 红藻 *Chlamydomonas*

reinhardtii 中存在 2 个基因即 *CmHMA1* 和 *CmHMA2*^[6]。在高等植物水稻 *Oryza sativa* L. 中发现 9 个基因为 *OsHMA1-9*, 玉米 *Zea mays* L. 和高粱 *Sorghum bicolor* L. Moench 中分别发现 11 个基因为 *ZmHMA1-11* 和 *SbHMA1-11*^[7]。在双子叶模式作物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中发现 8 个基因为 *AtHMA1-8*^[8], 在大豆 *Glycine max* L. 中发现 9 个基因为 *GmHMA1-9*^[9]。

1.1 P_{1B}-ATPases 的结构

P_{1B}-ATPases 的结构一般包括结构域 (M)、3 个功能域 (A、P、N) 以及 N-和 C-末端可溶性金属结合域 (Metal binding domain, MBD)^[10] (图 1)。

核心的 M 结构域中有 6 个基底跨膜区段 (M1-M6), 在此之前还存在 2 个特有的跨膜区段 (MA、MB), 共 8 个跨膜区段, 与其他 P-ATPases 相比跨膜片段较少。其中 M4、M5、M6 3 个螺旋上存在保守氨基酸形成的跨膜金属结合位点 (Transmembrane metal binding sites, TM-MBS), TM-MBS 具有底物特异性, 仅向一侧开放, 且与运输方向一致^[5]。M 结构域组成催化亚基, 在中间含有待运输配体的结合位点。结构域的小部分暴露于膜的胞质外侧, 重金属通过暴露于细胞质的半通道进入 M 结构域, 与 M4 和 M6 中侧链的重金属离子配位。

A 功能域 (Actuator domain) 位于 M2 和 M3 之间, P 功能域 (Phosphorylation domain) 和 N 功能域 (Nucleotide-binding domain) 位于 M3 和 M4 之间, N 功能域插入 P 功能域, 并且连接的两条链非常接近, 使得 N 结构域可以上下移动^[11]。

1.2 P_{1B}-ATPases 的分类

根据 M 结构域中的底物特异性和 M4、M5、M6 这 3 个跨膜金属结合位点上的保守氨基酸序列的不同 (图 2A), 可将 P_{1B}-ATPases 分为 P_{1B-1}-P_{1B-7} 共 7 个亚组^[12]。其中, P_{1B-3}、P_{1B-5}、P_{1B-6} 和 P_{1B-7} 仅在原核生物中存在, P_{1B-1} 是唯一在动物中发现的亚组, 而 P_{1B-1}、P_{1B-2} 和 P_{1B-4} 亚组存在于

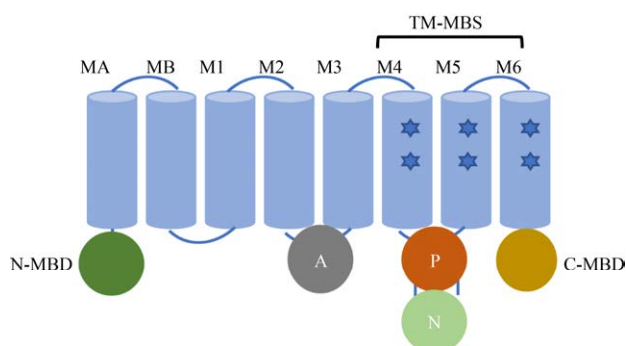


图1 P_{1B} -ATPases 的结构示意图

Fig. 1 Schematic overview of the structural organization of P_{1B} -ATPases.

植物中^[13]。以模式植物拟南芥为例, 根据基因序列分析发现, 在拟南芥中 P_{1B} -ATPases 存在 8 个 HMA ^[14]。其中 $HMA1$ 属于 P_{1B-4} 亚类, $HMA2-4$ 属于 P_{1B-2} 亚类, $HMA5-8$ 属于 P_{1B-1} 亚类。 P_{1B-1} -ATPases 主要负责转运 Cu, 其特征在于 M4 中的 CPC 基序, M5 中的 YN (X)₄P 基序和 M6 中的 MXXSS 基序 (其中“X”可以是任何残基)。 P_{1B-2} -ATPases 负责转运 Zn 和 Cd, 在 M4 中具有 CPC 基序, 在 M5 中具有保守的 K, 在 M6 中具有 DXG 基序, 且含有独有的 C-MBD。 P_{1B-4} -ATPases

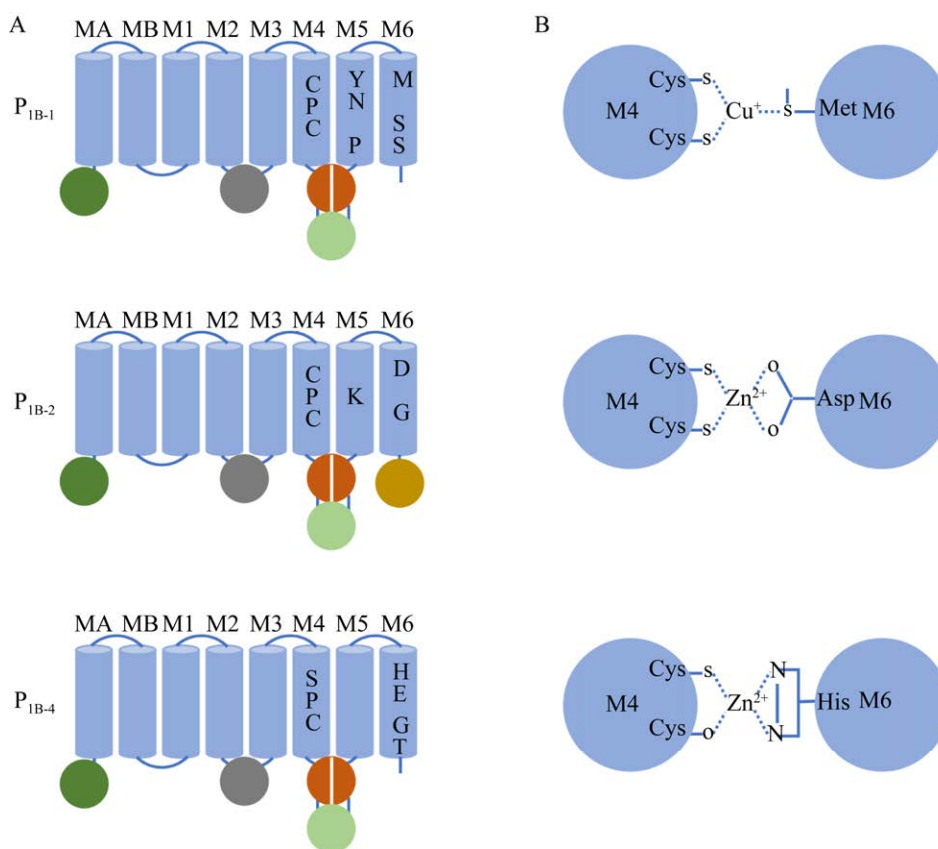


图2 P_{1B-1} 、 P_{1B-2} 和 P_{1B-4} ATP 酶中金属配位的结构组织和特征序列^[16]

Fig. 2 Structural organization and signature sequences for metal coordination in P_{1B-1} , P_{1B-2} and P_{1B-4} ATPases^[16]. (A) P_{1B-1} , P_{1B-2} and P_{1B-4} -ATPases transmembrane domains structure are shown in blue, N-terminal metal binding domain (MBD) is shown in dark green, A domain is shown in purple, P domain is displayed in orange, the N domain is displayed in light green, and the C-terminal MBD is displayed in brown (only present in P_{1B-2} -ATPase). (B) Schematic diagram of residues in M4 and M6 that are supposed to participate in metal coordination. In P_{1B-1} -ATPase, it is the two Cys residues of the CPC motif in M4 and the conserved Met of M6, which together coordinate Cu^+ in the triangle coordination geometry. In P_{1B-2} -ATPase, it is the Cys residue in the CPC motif in M4 and the conserved Asp in M6, which coordinate Zn^{2+} together in tetrahedral coordination. In P_{1B-4} , the metal binding mechanism may involve the Cys residues of the SPC motif in M4, and may include the backbone carbonyl oxygen of Ser and the conserved His of M6.

则具有广泛的转运特异性,可以转运 Zn、Cu 以及其他重金属,其特征在于 M4 中的 SPC 基序和 M6 中的 HEGT 基序^[15]。M4、M6 参与金属配位如图 2B 所示。P_{1B-1}-ATPases 中的 Cu 由 3 个 S 原子配位,存在于 M4 的 CPC 基序和 M6 的 MXXS 基序中,与 Cu 的配位结合位点形如三角结构。在 P_{1B-2}-ATPases 和 P_{1B-4}-ATPases 中, Zn 除与 M4 中的 2 个 S 原子配位之外,还涉及 M6 中的 O 和 N 原子,使 Zn 存在于四面体结构的配位中^[10]。

2 P_{1B}-ATPases 的作用机制

P_{1B}-ATPases 通过形成和分裂共价磷酸酶中间体,并与离子跨膜易位的构象变化相结合,以 ATP 为供能来建立电化学梯度。Bublitz 等^[17]指出了 P_{1B}-ATPases 与 E1、E2 状态有关的功能周期,表明 E1/E2 循环遵循膜转运蛋白的“交替进入”转运机制(图 3)。P_{1B}-ATPases 在 P 功能域上存在保守的天冬氨酸残基,通过瞬时磷酸酶中间体进行自动磷酸化和自动去磷酸化,其磷酸化将能量引入分子中,并导致主要的构象发生变化^[4]。

在磷酸化前为 E1 状态, M 结构域的功能位点可以自由地接受配体,对其配体具有高亲和性,并在细胞膜内部进行离子交换。排出的离子刺激 ATP 驱动保守天冬氨酸残基进行自动磷酸化,从而导致 E1-P 状态,跨膜转运路径关闭。从 ATP 中释放出 γ -磷酸盐后,转运路径开放,从高亲和 E1-P 态转换为低亲和 E2-P 态。逆转运离子与膜位点的结合刺激了转运路径的重新关闭,产生了 E2 状态。同时, N 结构域从磷酸化位点脱离并向 P 功能域移动,为 A 功能域提供空间以将磷酸化的 P 功能域去磷酸化,将低亲和的 E2 状态还原为高亲和的 E1 态,从而启动一个新的反应周期^[18]。

3 P_{1B}-ATPases 的功能

过去几十年以来研究者已在各种模式植物中鉴定了多种 HMA 基因,并验证了其功能。最近

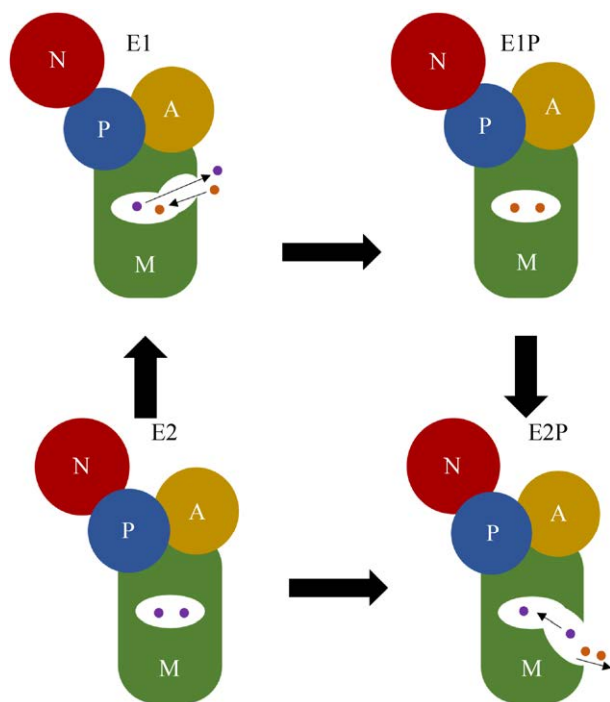


图 3 Post-Albers 循环

Fig. 3 The Post-Albers cycle. The Post-Albers cycle passes through the conformational changes (arrows) of the soluble and transmembrane domains, allowing the transport compound to alternately enter the cell and the cell. The E1 state has a high affinity for the output ion (yellow) and is occluded and phosphorylated (E1P), while in the E2P state the counterion (purple) combines with dephosphorylation and reocclusion (E2P and E2), and then returns to the next transport cycle.

几年对 P_{1B}-ATPases 的功能研究重点主要集中在利用模式植物的研究成果鉴定其他植物中存在的 HMA 基因,然后验证其功能。

3.1 P_{1B-1}-ATPases 的功能

P_{1B-1}-ATPases 在植物中广泛存在,主要作用是维持植物体内 Cu 离子浓度的稳定。如拟南芥中的 *AtHMA5* 至 *AtHMA8*、水稻中的 *OsHMA4*–*OsHMA9*、甘蓝型油菜 *Brassica napus* 中的 *BnRAN1* 等均属于 P_{1B-1}-ATPases^[19]。

AtHMA5 至 *AtHMA8* 在 M4 的保守基序是 CPC 基序。其中 *AtHMA5* 和 *AtHMA7* 在 N 端有 2 个 HMA-RD, 基因序列同源性较高,而 *AtHMA6* 和

AtHMA8 在 N 端只有 1 个 HMA-RD^[15]。Kobayashi 等^[20]研究发现 *AtHMA5* 是唯一一个位于质膜中的 P_{1B} -ATPases (图 4), 且主要表达在根部, 通过从细胞质中输出 Cu 离子而缓解其毒害作用。Andrés-Colás 等^[21]研究发现, 含有 *AtHMA5* T-DNA 的突变植株表现出了对 Cu 的超敏性, 且在根部表现尤为明显, 也表明了 *AtHMA5* 在根的缓解 Cu 的毒害中发挥作用。Li 等^[22]研究表明, Cu 的高耐受性与 *HMA5* 基因在拟南芥中的表达增强有关, *HMA5* 定位于内质网中, 当植物所在的外部环境具有高浓度 Cu 时会降解、迁移到质膜上。

AtHMA7/RAN1 是植物中第一个在功能上被表征的 P_{1B} -ATPases, 因在乙烯拮抗剂中对乙烯三重反应呈阳性, 因此也被命名为响应拮抗 (Responsive to antagonist, *RAN1*), 主要作用是将 Cu 输入至内质网中以合成乙烯受体^[23]。*AtHMA7/RAN1* 通过与反式环辛烯 (一种乙烯拮抗剂) 相互作用来调节乙烯的信号传导, 反式环辛烯的乙烯受体是 Cu 依赖性蛋白, 且负责 Cu 在乙烯信号通路中的作用^[24]。del Pozo 等^[25]研究发现经 Cu 处理后拟南芥内 *AtHMA7/RAN1* 的转录水平明显改变, 表明 *AtHMA7/RAN1* 是防止植物体内 Cu 离子过量

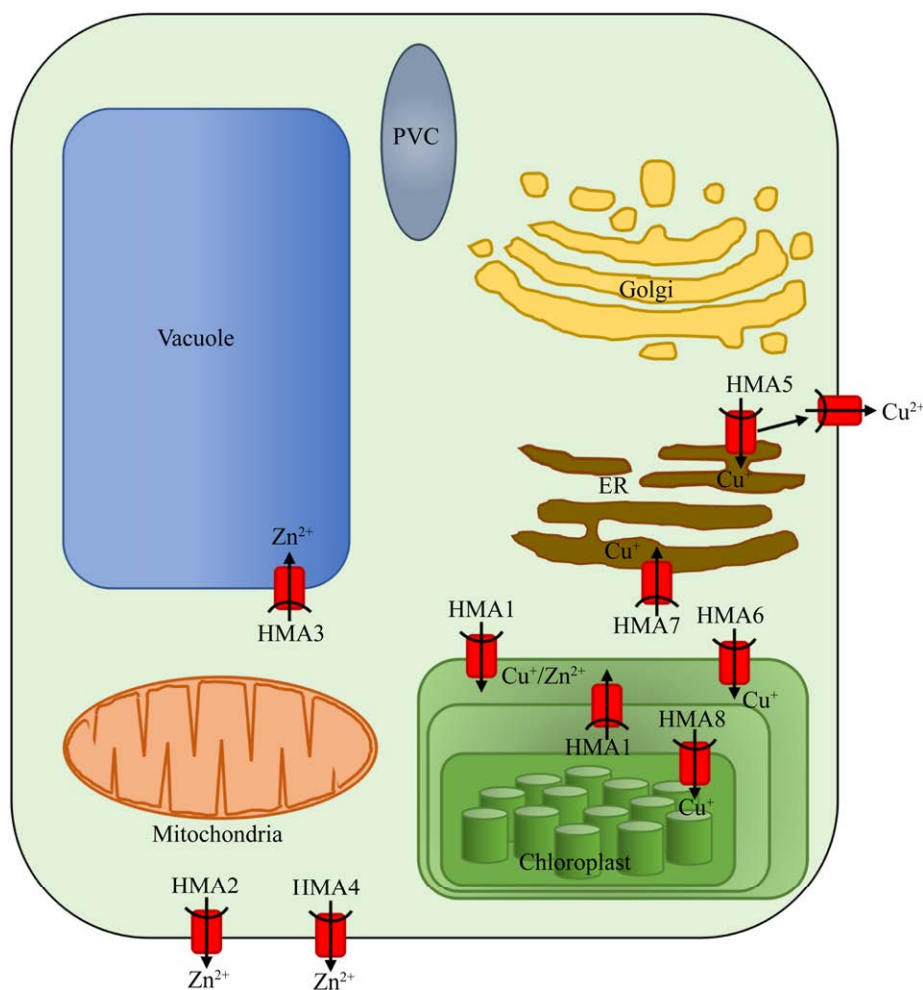


图 4 拟南芥中 P_{1B} -ATP 酶亚细胞定位的示意图^[16]

Fig. 4 Schematic overview of subcellular localization of P_{1B} -ATPase in *Arabidopsis thaliana*^[16].

的重要基因。这与 Baloun 等^[26]的研究结果表现一致,证明 *HMA7* 是铜诱导的基因,并在协调植物体内的 Cu 离子水平中起重要作用。Woeste 等^[27]对遗传通路分析发现, *AtHMA7/RAN1* 作用于乙烯受体基因家族中突变的上游,揭示了 *AtHMA7/RAN1* 对于乙烯信号通路的重要性。

AtHMA6/PAA1 和 *AtHMA8/PAA2* 是密切相关的一对 P_{1B}-ATPase,是位于叶绿体上的高亲和 Cu 转运蛋白(图 4),控制叶绿体对 Cu 的吸收并将 Cu 输送至叶绿体基质和类囊体中,以维持光合和抗氧化的作用^[28]。但 *AtHMA6/PAA1* 和 *AtHMA8/PAA2* 的生化特性不同,其中 *AtHMA8/PAA2* 对 Cu 的亲和力高于 *AtHMA6/PAA1*^[29]。*AtHMA6/PAA1* 负责将 Cu 向叶绿体内转运,这为基质中的铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn SOD)提供了辅因子^[30],之后用于 Cu/Zn SOD 的铜分子伴侣(CCS)负责将 Cu 递送至 Cu/Zn SOD,后将 Cu 递送至 *HMA8* 再转运至内囊体内^[31]。de Pozo 等^[25]研究发现, *AtHMA6/PAA1* 和 *AtHMA8/PAA2* 在暴露于高浓度 Cu 的植物的叶中表达被下调,这可能是减少 Cu 离子含量、维持类囊体功能机制中的一部分。这与 Tapken 等^[32]对拟南芥的研究中 Cu 过量会引起 *AtHMA8/PAA2* 降解的结果一致。相反,在缺少 Cu 的环境中, *AtHMA8/PAA2* 表现上调,表明叶绿体的功能需要适量的 Cu 维持^[25]。当 *AtHMA6/PAA1* 和 *AtHMA8/PAA2* 下调时,均会导致光合电子传递过程的损伤^[19]。

在水稻中的研究表明, *OsHMA5* 拥有与 *AtHMA5* 类似的作用。Deng 等^[33]研究表明, *OsHMA5* 将 Cu 带入到根的木质部中,从而将 Cu 长距离运输到地上部。Huang 等^[34]研究发现, *OsHMA4* 的功能是将 Cu 吸附到根的液泡中,从而减少 Cu 在籽粒中的积累。高浓度的 Cu 可显著诱导 *OsHMA6* 和 *OsHMA9* 的表达。Zou 等^[35]、Lee 等^[36]运用 qRT-PCR 技术分别对 *OsHMA6* 和 *OsHMA9* 的研究表明, *OsHMA6* 和 *OsHMA9* 均定

位在质膜中,具有较高的 Cu 离子转运活性,若敲除则会降低水稻对高浓度 Cu 的耐受性。其中, *OsHMA6* 在穗、叶片和根中均有高度表达,但 *OsHMA9* 在根中表达最强,在穗中表达极弱^[35]。

3.2 P_{1B-2}-ATPases 的功能

HMA2-4 在拟南芥中属于 P_{1B2}-ATPases 的亚类,对镉、铅等有毒重金属的转运起着重要作用^[37]。

3.2.1 *HMA2* 和 *HMA4* 的功能

AtHMA2 和 *AtHMA4* 的一级序列拥有很高的相似度,均负责将 Zn 和 Cd 转运至木质部中,有助于锌和镉从根到叶的长距离运输。当植物被敲除 *HMA2*、*HMA4* 基因时,便会出现叶片发黄、发育不良等现象^[38]。Wong 等^[39]研究发现,敲除 *HMA2* 和 *HMA4* 基因的拟南芥,根冠间 Cd 的转移几乎完全消失,表明 *HMA2* 和 *HMA4* 是负责植物根冠间 Cd 转运的主要因素。在烟草中也鉴定出两个 *AtHMA2*、*AtHMA4* 的直系同源物,当两个基因都敲除时植株出现了明显的 Zn 缺乏症状^[40]。

Mills 等^[41]在大麦中研究 *HvHMA2* 的功能特性,发现 *HvHMA2* 的表达可以改善 *hma2 hma4* 突变体缺 Zn 的症状,结果表明 *HvHMA2* 具有提高缺 Zn 环境中植物对 Zn 转运能力的作用。Guo 等^[42]研究发现,当缺少 *HMA2* 基因时,植物表现出了对 Cd 的高敏感性,生长发育迟缓,木质部中 Cd 和 Zn 含量也会显著降低,从而导致 Cd 和 Zn 的根冠间易位显著降低,说明 *HMA2* 不仅负责 Cd 从根到茎的转运,提高植物 Cd 耐受性,还参与调节 Zn 转运系统,从而有助于维持 Zn 含量的稳定。

Ma 等^[43]研究发现,当小麦遭受锑(Sb)胁迫时会诱导重金属进入质外体或液泡中,此时小麦中的 *HMA2* 表现上调,与叶中总 Sb 浓度呈显著正相关,表明 *HMA2* 基因对 Sb 转运的调节有重要作用。Wong 等^[44]通过针对 *HMA2* 的转基因突变体材料研究发现, *HMA2* 中的 N-MBD 对植物的重金属转运是必不可少的,而 C-MBD 虽然与转运关系较不密切,但可能含有重要的对蛋白质

亚细胞定位的信号。

HMA4 是 Zn/Cd/Co/Pb 亚类中第一个被克隆和表征的基因^[45], 它在维持 Zn 离子浓度稳定的系统中处于一个关键的位置, 其表达水平的微小变化都会对 Zn 在植物根、茎、叶中的转运与分配产生重要影响^[46]。

拟南芥中 *AtHMA4* 在根中的表达要比叶中高, 并且在植物受到高浓度重金属离子刺激时, 受 Zn 和 Mn 的影响而上调, 受 Cd 的影响而下调^[47]。GUS 定位的研究表明, *HMA4* 可能将 Zn 从根部维管组织周围的细胞中运出^[48]。Hanikenne 等^[49]通过下调 *HMA4* 的表达, 证明 *HMA4* 对鼠耳芥的 Zn 积累以及对 Cd 的高耐受有着重要作用, 之后再 *HMA4* 基因导入鼠耳芥中, 证明 *HMA4* 参与了 Zn/Cd 木质部的转运过程。

黄瓜中的 *CsHMA4* 基因在根和花中表达丰富。Migocka 等^[50]研究发现在 Zn 和 Pb 过量时表达增加, 而在 Zn 缺乏时基因表达出现显著下降, 表明 *CsHMA4* 在维持 Zn 含量稳定和缓解 Pb 胁迫中有着重要的作用。*HMA4* 在甘蓝型油菜也有相关报道。Wu 等^[51]的研究表明, 根中 *HMA2* 和 *HMA4* 是导致甘蓝型油菜中 Cd 从根到茎高效转运的原因, 但尚未确定影响的同源基因。在此基础上, Zhang 等^[52]研究发现, *HMA4* 的同源基因 *BnaHMA4* 是油菜籽中镉从根转移到叶的关键基因。

3.2.2 HMA3 的功能

HMA3 在不同作物中的表达位置不同, 在拟南芥、水稻、烟草中主要定位于根部的液泡膜中。Morel 等^[53]研究发现, 拟南芥中的 *AtHMA3* 定位于液泡膜上 (图 4), 不仅在根尖有高水平的表达, 在保卫细胞、排水器和维管组织中也有少量表达, 且 *AtHMA3* 的过表达提高了拟南芥对 Zn、Cd、Co、Pb 的耐受性。Chao 等^[54]研究发现, 当拟南芥中的 *AtHMA3* 功能缺失时, 会引起植物体内 Cd 的高度积累, 证明 *AtHMA3* 通过参与液泡螯合调节 Cd 的积累。

Miyadate 等^[55]在水稻中的研究也证实了这个结论, 当水稻缺乏 *OsHMA3* 时, 根部细胞的木质部中会存在更多的 Cd, 结果导致过量的 Cd 转运到了叶, 表明水稻中镉的转运、积累与 *OsHMA3* 基因引起的液泡螯合关系密切。Byeon 等^[56]研究发现, 当水稻处于 Cd 胁迫时, *OsHMA3* 基因出现明显上调, 猜测 *HMA3* 基因可能负责螯合 Cd 到根细胞的液泡中。Wang 等^[57]证实了这个结论, 通过对 Cd 胁迫下的烟草进行基因表达测定, 发现 *HMA3* 通过将 Cd 转运至根细胞的液泡膜中, 将其螯合于根的液泡中, 从而限制 Cd 从根到茎的转移, 有效降低 Cd 胁迫对植物的损害。

大豆的 *GmHMA3* 主要在根部的内质网中实现高表达。Wang 等^[58]研究发现, *GmHMA3* 的过表达不会改变整个植物中的 Cd 含量, 而是将 Cd 螯合到根内质网中, 从而限制了 Cd 从根向茎的转运^[9]。遏蓝菜 *Thlaspi caerulescens* 的 *TcHMA3* 基因则是在叶片的液泡膜中高表达。Ueno 等^[59]研究表明, *TcHMA3* 通过将 Cd 螯合到叶片的液泡中而在 Cd 的解毒中起重要作用, 从而促进 Cd 的过度积累以及提高植物对 Cd 的耐受性。Guo 等^[47]从黑麦草 *Festulolium loliaceum* 中分离出 *FlHMA3*, 发现其包含与水稻 *OsHMA3* 具有 77% 同源性的 833 个氨基酸残基, Cd 通过 *FlHMA3* 螯合到根细胞的液泡, 抑制 Cd 进入细胞质, 从而降低了 Cd 毒性。以及随着外界环境中的 Cd 浓度与黑麦草根、叶中的含量呈正相关, 提出可以考虑使用黑麦草用于 Cd 污染土壤的修复。

3.3 P_{1B-4}-ATPases 的功能

HMA1 属于 P_{1B-4}-ATPase, 在所有 P_{1B}-ATPases 家族中具有最简单的结构。*HMA1* 具有广泛的金属特异性, 在 Zn、Cu、Co、Ca 等多种重金属的转运中都起着重要作用^[60]。拟南芥中的 *AhHMA1* 在地上部的表达量高于根部, 且在地上部的表达量容易受高浓度 Zn 的诱导而升高^[61]。

大部分 *HMA1* 定位于叶绿体被膜上。在叶绿

体中,铜的转运除了由 *HMA6* 和 *HMA8* 介导之外,也可以通过 *HMA1* 转运^[62]。此外, *HMA1* 与另外两种 Zn 转运蛋白 *HMA2* 和 *HMA4* 具有类似的氨基酸序列,含有 Zn 结合蛋白中普遍存在的 Poly-His 基序,因此,在高浓度 Zn 条件下, *HMA1* 可以降低拟南芥中 Zn 的含量,从而缓解过量的 Zn 带来的毒害作用^[63]。

hma1 缺失突变体的叶绿体中的 Cu 比野生型的含量更低, Cu/Zn SOD 活性也出现显著降低, Argüello 等^[64]推测 *AtHMA1* 主要是将 Cu 转运给 Cu/Zn SOD。Higuchi 等^[65]研究表明,由于 *hma1* 缺失突变体的 Cu/Zn SOD 含量降低,产生了过量的活性氧,因此突变体在强光条件下出现了强光敏感性。说明植物若处在高光强环境下, *AtHMA1* 可以在此条件下将 Cu 转运至叶绿体蛋白或高活性酶分子,为抵御高光强胁迫作出贡献。

Mikkelsen 等^[66]研究发现大麦的 *HvHMA1* 定位于叶片叶绿体边缘和糊粉层细胞内,叶片中 *HvHMA1* 的表达受 Zn、Cu、Cd 的影响而降低。但 *HvHMA1* 在籽粒中的表达明显高于叶片, *HvHMA1* 的下调对叶片 Zn 和 Cu 含量没有影响,但使籽粒 Zn 和 Cu 含量显著增加,因此猜测 *HvHMA1* 可能参与了籽粒萌发过程中糊粉层细胞的 Zn、Cu 转运。伴矿景天 *Sedum plumbizincicola* 的地上部易过度积累非必需且剧毒的重金属 Cd, Zhao 等^[67]研究表明, *SpHMA1* 在叶绿体中高度表达,以使叶绿体中的 Cd 高效排毒,抑制 Cd 的过量积累,维持胁迫下叶片的光合作用。

4 展望

近些年来,虽然对 P_{1B}-ATPases 的研究较多,但仍然有很多方面不清楚。如在其结构上 P_{1B}-ATPases 的末端 MBD 尚不足以在晶体结构中观察到,但该问题有望随着膜蛋白的高分辨率冷冻电子显微镜的出现而解决。其次 P_{1B}-ATPases 家族成员众多,虽具有相似的氨基酸序列和功能,

但细微的结构差异都能使其作用机制产生不同,并且在不同作物中也存在差异^[34],这说明并不容易直接将获得的序列转移到其他植物物种中。最后,随着测序基因组库的增加,对植物 P_{1B}-ATPase 起源的见识正在积累,但是关于植物 P_{1B-2} 和 P_{1B-4}-ATPase 的起源仍然不清楚。

根系是重金属离子吸收和运输的主要器官,叶片是重金属离子的主要储存位点。并且重金属(如 Cd)可以通过取代光收集复合物 II 中与叶绿素结合的 Mg 来抑制光合作用,从而导致光化学效率的损失。现如今,很多关于 *hma* 突变体的研究,如 *BraA.hma4a-3* 突变体可以有效增加 Zn 的积累,且在 Zn 过量产生毒性时,使植物具有更好的 Zn 胁迫耐受性^[68]。因此,对于重金属耐受性低的作物,可研究如何利用 P_{1B}-ATPases 提高其耐受性,进行生物强化。同时,可以利用植物在地上部组织中积累重金属的能力,以植物修复的方法从土壤中去掉重金属,如景天^[67]和杨树^[69]。

REFERENCES

- [1] Snow DD, Cassada DA, Bartelt-Hunt S L, et al. Detection, occurrence and fate of emerging contaminants in agricultural environments. *Water Environ Res*, 2012, 84(10): 764-785.
- [2] Williams LE, Pittman JK, Hall JL. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, 1465(1/2): 104-126.
- [3] Rascio N, Navari-Izzo F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci*, 2011, 180(2): 169-181.
- [4] Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. *Ann Rev Biophys*, 2011, 40: 243-266.
- [5] Argüello JM, Eren E, González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases. *Biometals*, 2007, 20(3/4): 233-248.
- [6] Blaby-Haas CE, Merchant SS. The ins and outs of algal metal transport. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 2012, 1823(9): 1531-1552.

- [7] Zhiguo E, Li TT, Chen C, et al. Genome-wide survey and expression analysis of P_{1B} -ATPases in rice, maize and sorghum. *Rice Sci*, 2018, 25(4): 208-217.
- [8] Zorrig W, Abdelly C, Berthomieu P. The phylogenetic tree gathering the plant Zn/Cd/Pb/Co P_{1B} -ATPases appears to be structured according to the botanical families. *Compt Rend Biol*, 2012, 334(12): 863-871.
- [9] Wang Y, Wang C, Liu YJ, et al. *GmHMA3* sequesters Cd to the root endoplasmic reticulum to limit translocation to the stems in soybean. *Plant Sci*, 2018, 270: 23-29.
- [10] Omasits U, Ahrens CH, Müller S, et al. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 2014, 30(6): 884-886.
- [11] Møller JV, Olesen C, Winther AML, et al. What can be learned about the function of a single protein from its various X-ray structures: the example of the sarcoplasmic calcium pump. Lacapère JJ, ed. *Membrane Protein Structure Determination*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010: 119-140.
- [12] Argu'ello JM, González-Guerrero M, Raimunda D. Bacterial transition metal P_{1B} -ATPases: transport mechanism and roles in virulence. *Biochemistry*, 2011, 50(46): 9940-9949.
- [13] Smith AT, Smith KP, Rosenzweig AC. Diversity of the metal-transporting P_{1B} -type ATPases. *JBIC J Biol Inorgan Chem*, 2014, 19(6): 947-960.
- [14] Axelsen KB, Palmgren MG. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 696-706.
- [15] Williams LE, Mills RF. P_{1B} -ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(10): 491-502.
- [16] Østerberg JT, Palmgren M. Heavy metal pumps in plants: structure, function and origin. *Adv Botanical Res*, 2018, 87: 57-89.
- [17] Bublitz M, Poulsen H, Morth JP, et al. In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr Opin Struct Biol*, 2010, 20(4): 431-439.
- [18] Mattle D, Sitsel O, Autzen HE, et al. On allosteric modulation of P-Type Cu^{+} -ATPases. *J Mol Biol*, 2013, 425(13): 2299-2308.
- [19] Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, et al. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell*, 2005, 17(4): 1233-1251.
- [20] Kobayashi Y, Kuroda K, Kimura K, et al. Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-type ATPase *HMA5* are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 969-980.
- [21] Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, et al. The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase *HMA5* interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J*, 2006, 45(2): 225-236.
- [22] Li YB, Iqbal M, Zhang QQ, et al. Two *Silene vulgaris* copper transporters residing in different cellular compartments confer copper hypertolerance by distinct mechanisms when expressed in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 2017, 215(3): 1102-1114.
- [23] Li WB, Lacey RF, Ye YJ, et al. Triplin, a small molecule, reveals copper ion transport in ethylene signaling from *ATX1* to *RAN1*. *PLoS Genet*, 2017, 13(4): e1006703.
- [24] Himelblau E, Amasino RM. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J Plant Physiol*, 2001, 158(10): 1317-1323.
- [25] del Pozo T, Cambiazo V, González M. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(2): 248-252.
- [26] Baloun J, Nevrtalova E, Kovacova V, et al. Characterization of the *HMA7* gene and transcriptomic analysis of candidate genes for copper tolerance in two *Silene vulgaris* ecotypes. *J Plant Physiol*, 2014, 171(13): 1188-1196.
- [27] Woeste KE, Kieber JJ. A strong loss-of-function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell*, 2000, 12(3): 443-455.
- [28] Catty P, Boutigny S, Miras R, et al. Biochemical characterization of *AtHMA6/PAA1*, a chloroplast

- envelope Cu (I)-ATPase. *J Biol Chem*, 2011, 286(42): 36188-36197.
- [29] Sautron E, Mayerhofer H, Giustini C, et al. *HMA6* and *HMA8* are two chloroplast Cu⁺-ATPases with different enzymatic properties. *Biosci Rep*, 2015, 35(3): e00201.
- [30] Zhang YY, Chen K, Zhao FJ, et al. OsATX1 interacts with heavy metal P_{1B}-type ATPases and affects copper transport and distribution. *Plant Physiol*, 2018, 178(1): 329-344.
- [31] Aguirre G, Pilon M. Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Front Plant Sci*, 2016, 6: 1250.
- [32] Tapken W, Kim J, Nishimura K, et al. The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the *PAA2/HMA8* copper transporter in chloroplasts. *New Phytol*, 2015, 205(2): 511-517.
- [33] Deng FL, Yamaji N, Xia JX, et al. A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol*, 2013, 163(3): 1353-1362.
- [34] Huang XY, Deng FL, Yamaji N, et al. A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. *Nat Commun*, 2016, 7: 12138.
- [35] Zou WL, Li C, Zhu YJ, et al. Rice heavy metal P-type ATPase *OsHMA6* is likely a copper efflux protein. *Rice Sci*, 2020, 27(2): 143-151.
- [36] Lee S, Kim YY, Lee Y, et al. Rice P_{1B}-type heavy-metal ATPase, *OsHMA9*, is a metal efflux protein. *Plant Physiol*, 2007, 145(3): 831-842.
- [37] Takahashi R, Bashir K, Ishimaru Y, et al. The role of heavy-metal ATPases, *HMA*s, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signal Behavior*, 2012, 7(12): 1605-1607.
- [38] Hussain D, Haydon MJ, Wang YW, et al. P-Type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1327-1339.
- [39] Wong CKE, Cobbett CS. *HMA* P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 2010, 181(1): 71-78.
- [40] Hermand V, Julio E, De Borne FD, et al. Inactivation of two newly identified tobacco heavy metal ATPases leads to reduced Zn and Cd accumulation in shoots and reduced pollen germination. *Metallomics*, 2014, 6(8): 1427-1440.
- [41] Mills RF, Peaston KA, Runions J, et al. *HvHMA2*, a P_{1B}-ATPase from barley, is highly conserved among cereals and functions in Zn and Cd transport. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e42640.
- [42] Guo Q, Tian XX, Mao PC, et al. Functional characterization of *IIHMA2*, a P_{1B2}-ATPase in *Iris lactea* response to Cd. *Environ Exp Bot*, 2019, 157: 131-139.
- [43] Ma CL, He MC, Zhong QY, et al. Uptake, translocation and phytotoxicity of antimonite in wheat (*Triticum aestivum*). *Sci Total Environ*, 2019, 669: 421-430.
- [44] Wong CKE, Jarvis RS, Sherson SM, et al. Functional analysis of the heavy metal binding domains of the Zn/Cd-transporting ATPase, *HMA2*, in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 2009, 181(1): 79-88.
- [45] Mills RF, Krijger GC, Baccarini PJ, et al. Functional expression of *AtHMA4*, a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J*, 2010, 35(2): 164-176.
- [46] Nouet C, Charlier JB, Carnol M, et al. Functional analysis of the three *HMA4* copies of the metal hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *J Exp Bot*, 2015, 66(19): 5783-5795.
- [47] Courbot M, Willems G, Motte P, et al. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol*, 2006, 144(2): 1052-1065.
- [48] Verret F, Gravot A, Auroy P, et al. Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett*, 2004, 576(3): 306-312.
- [49] Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, et al. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature*, 2008, 453(7193): 391-395.
- [50] Migocka M, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubinska E, et al. Molecular and biochemical properties of two P_{1B2}-ATPases, *CsHMA3* and *CsHMA4*, from

- cucumber. *Plant Cell Environ*, 2015, 38(6): 1127-1141.
- [51] Wu ZC, Zhao XL, Sun XC, et al. Xylem transport and gene expression play decisive roles in cadmium accumulation in shoots of two oilseed rape cultivars (*Brassica napus*). *Chemosphere*, 2015, 119: 1217-1223.
- [52] Zhang FG, Xiao X, Wu XM. Physiological and molecular mechanism of cadmium (Cd) tolerance at initial growth stage in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 197: 110613.
- [53] Morel M, Crouzet J, Gravot A, et al. *AtHMA3*, a P_{1B} -ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009, 149(2): 894-904.
- [54] Chao DY, Silva A, Baxter I, et al. Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2012, 8(9): e1002923.
- [55] Miyadate H, Adachi S, Hiraizumi A, et al. *OsHMA3*, a P_{1B} -type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytol*, 2011, 189(1): 190-199.
- [56] Byeon Y, Lee HY, Hwang OJ, et al. Coordinated regulation of melatonin synthesis and degradation genes in rice leaves in response to cadmium treatment. *J Pineal Res*, 2015, 58(4): 470-478.
- [57] Wang M, Duan SH, Zhou ZC, et al. Foliar spraying of melatonin confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum* L. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 68-76.
- [58] Wang Y, Yu KF, Poysa V, et al. A single point mutation in *GmHMA3* affects cadmium (Cd) translocation and accumulation in soybean seeds. *Mol Plant*, 2012, 5(5): 1154-1156.
- [59] Ueno D, Milner MJ, Yamaji N, et al. Elevated expression of *TcHMA3* plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Plant J*, 2011, 66(5): 852-862.
- [60] Zielazinski EL, Cutsail III GE, Hoffman BM, et al. Characterization of a cobalt-specific P_{1B} -ATPase. *Biochemistry*, 2012, 51(40): 7891-7900.
- [61] Purohit R, Ross MO, Batelu S, et al. Cu^{+} -specific CopB transporter: revising P_{1B} -type ATPase classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(9): 2108-2113.
- [62] Boutigny S, Sautron E, Finazzi G, et al. *HMA1* and *PAA1*, two chloroplast-envelope P_{1B} -ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis. *J Exp Bot*, 2014, 65(6): 1529-1540.
- [63] Kim YY, Choi H, Segami S, et al. *AtHMA1* contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. *Plant J Cell Mol Biol*, 2010, 58(5): 737-753.
- [64] Argüello JM, González-Guerrero M. Cu^{+} -ATPases brake system. *Structure*, 2008, 16(6): 833-834.
- [65] Higuchi M, Ozaki H, Matsui M, et al. A T-DNA insertion mutant of *AtHMA1* gene encoding a Cu transporting ATPase in *Arabidopsis thaliana* has a defect in the water-water cycle of photosynthesis. *J Photochem Photobiol B Biol*, 2009, 94(3): 205-213.
- [66] Mikkelsen MD, Pedas P, Schiller M, et al. Barley *HvHMA1* is a heavy metal pump involved in mobilizing organellar Zn and Cu and plays a role in metal loading into grains. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e49027.
- [67] Zhao HX, Wang LS, Zhao FJ, et al. *SpHMA1* is a chloroplast cadmium exporter protecting photochemical reactions in the Cd hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Plant Cell Environ*, 2019, 42(4): 1112-1124.
- [68] Blasco B, Navarro-León E, Ruiz JM. Study of Zn accumulation and tolerance of *HMA4* TILLING mutants of *Brassica rapa* grown under Zn deficiency and Zn toxicity. *Plant Sci*, 2019, 287: 110201.
- [69] Romè C, Huang XY, Danku J, et al. Expression of specific genes involved in Cd uptake, translocation, vacuolar compartmentalisation and recycling in *Populus alba* villafranca clone. *J Plant Physiol*, 2016, 202: 83-91.

(本文责编 陈宏宇)