

植物重金属转运蛋白 P_{1B}-ATPase 结构和功能研究进展

张玉秀¹, 张媛雅¹, 孙涛², 柴团耀²

1 中国矿业大学化学与环境工程学院, 北京 100083

2 中国科学院研究生院生命科学学院, 北京 100049

摘要: 植物调节体内重金属的累积量以维持自身生存, 其中, 金属阳离子转运蛋白发挥了关键作用。P_{1B}-ATPase 是在生物中广泛存在的 P-ATPase 中的一个亚族, 也是 P-ATPase 多个亚族中唯一参与重金属稳态的转运蛋白。拟南芥中共发现 8 个 P_{1B}-ATPase。研究表明, P_{1B}-ATPase 在植物体内具有维持金属的稳态、转运以及金属解毒的功能; 与金属离子在根部区域的活化、吸收、地上部分的运输、贮存, 以及植物对重金属的耐受性均相关。以下综述了 P_{1B}-ATPase 的进化分类、结构特征以及功能方面的最新研究进展, 并展望了其在植物修复领域的应用前景。

关键词: P_{1B}-ATPase, 功能, 重金属

Structure and function of heavy metal transporter P_{1B}-ATPase in plant: a review

Yuxiu Zhang¹, Yuanya Zhang¹, Tao Sun², and Tuanyao Chai²

1 School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China

2 College of Life Science, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The regulation of the heavy-metal accumulation *in vivo* for plant survival is very complex. The metal cation transporter plays key roles in the metabolic process. P_{1B}-ATPases are the only subgroup of P-ATPases that contribute to heavy metal homeostasis presented in most organisms. *Arabidopsis thaliana* contains eight genes encoding P_{1B}-ATPases. The current reports show that the functions of P_{1B}-ATPases are involved in maintaining metal homeostasis, transporting and detoxification in plants. P_{1B}-ATPases not only mediated metal ion mobilization and uptake in roots, but also contribute to the metal transport, storage and tolerance in shoots, especially in heavy metal hyperaccumulators. In this paper, we reviewed and discussed the evolution, classification, structure and function of P_{1B}-ATPases in plants. *HMA5*-transgenic manipulation could be a feasible approach for phytoremediation and mineral nutrition fortification.

Keywords: P_{1B}-ATPase, function, heavy metal

Cu、Zn、Mn 和 Fe 等是植物生长发育所必需的微量营养金属元素, 主要作为辅酶参加多种生理过程, 参与蛋白质构成和信号传递, 缺乏或过量都会

导致生物体的代谢紊乱^[1-3]。重金属如 Cd、Hg、Ag 和 Pb 离子具有极大的生物毒性, 能与酶活性中心或蛋白质中的巯基结合, 取代金属蛋白中的必需元素

Received: December 10, 2009; **Accepted:** February 22, 2010

Supported by: National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2009ZX08009-130B).

Corresponding author: Yuxiu Zhang. Tel: +86-10-62331792; E-mail: zhangyuxiu@cumt.edu.cn

国家转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-130B) 资助。

(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+})，导致生物大分子构象改变、酶活性丧失以及必需元素缺乏等；此外，重金属还能干扰物质在细胞中的运输过程，并通过氧化还原反应产生自由基导致细胞氧化损伤^[1-2]，干扰细胞的正常代谢过程，最终引起植物生长发育受抑，甚至死亡。为了维持必需金属离子在生理耐受极限浓度范围内，并减少其毒性对机体的损害，植物拥有的金属稳态系统，通过控制金属离子的吸收、累积、运输和脱毒等过程，不仅能维持细胞区域中必需金属离子的正常浓度，而且能把非必需金属离子的伤害降到最低^[1]。

土壤中的金属首先与植物的根毛接触，通过跨膜运载蛋白系统进入根表皮细胞中。在根部金属离子通过共质体和质外体两条途径，进入维管系统，并运输到地上部，质外体途径主要发生在根尖。多数金属离子是通过内质网膜上的离子转运蛋白，跨膜进入内质网腔，经由胞间连丝形成的共质体系统内运输；少数金属离子通过质外体途径运输，进入维管系统。金属离子通过维管束到达叶片，释放到外质体中的金属离子通过质膜金属离子转运蛋白进入叶片不同组织细胞中。在细胞内的金属离子通过膜转运蛋白和螯合蛋白在亚细胞区域重新分配，定位在细胞质、叶绿体、线粒体、液泡或细胞壁中，从而降低重金属离子的毒害作用^[4-5]。由此可见，转运蛋白在金属阳离子的吸收、运输和分配等方面起关键作用。金属阳离子转运蛋白可分为金属阳离子输入蛋白和金属阳离子输出蛋白两类， $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ ($\text{P}_{1\text{B}}\text{-type ATPase}$ ，或 $\text{P}_{1\text{B}}$ 型 ATPase)属于金属阳离子输出蛋白^[2]。 P-ATPase (P-type ATPase)是一种通过水解 ATP 跨膜运送阳离子的转运蛋白，最初曾被定义为通过水解 ATP 特异转运多种小阳离子和磷脂的转运蛋白，因其涉及磷酸化过程 (Phosphorylated intermediate)，所以被命名为 P-ATPase ^[6-7]。一般来说，植物中的 P-ATPase 具有高亲和性的吸收和泵出重金属的功能。推测其潜在的功能包括：细胞对质外体中必需重金属的吸收、细胞质中毒性金属的泵出以及必需金属的区室化作用以进行特殊的生化途径^[6]。 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 除选择性地运输必需的金属离子 (Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Co^{2+})外，还能转运一些重金属

离子 (Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+})，所以 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 又称为重金属 ATP 酶 (Heavy metal transporting ATPase ， HMA)^[8]。又因为 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 含有一个保守的内膜基序 (CPx : $\text{Cys-Pro-Cys/His/Ser}$) (图1)，所以又称为 CPx-ATPase ^[9-10]。植物 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 除参与金属离子的稳态外，还涉及在植物对重金属的吸收、转运、解毒和富集作用等方面^[1,11]。以下主要综述植物 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 的进化分类、结构、功能以及在重金属累积植物中的作用的研究进展。

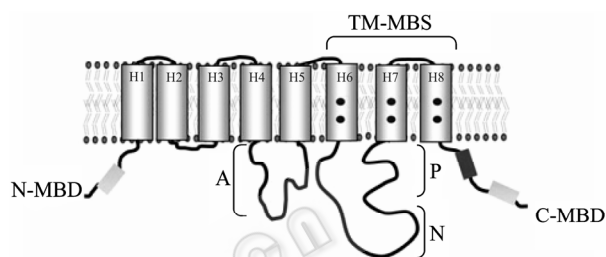


图1 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 结构示意图^[8]

Fig. 1 Topological model of a $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$.

1 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 的结构特征和分类

1.1 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 的广泛分布

$\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 广泛存在于从极端的古细菌到人类的所有生物中。 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 运输 Cu 和 Fe 的功能最早在原核生物中被鉴定，如在金黄色葡萄球菌质粒 *Staphylococcus aureus* plasmid p1258 和根瘤菌 *Rhizobium meliloti* 中，该基因敲除导致细菌对金属敏感性提高。利用功能互补实验进一步鉴定了多种生物 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 的功能和底物特异性。耐 Cu 古细菌 *Ferroplasma acidarmanus* 中 $\text{Cu}^+\text{-ATPase}$ 转录水平的提高与其 Cu 耐性相关，闪烁古生球菌 *Archaeoglobus fulgidus* 含有运输 Cu^+ 和 Cu^{2+} 的两种转运蛋白 *CopA* 和 *CopB*。动物基因组中的两个 $\text{Cu}^+\text{-ATPase}$ 基因较为有名，人 ATP7A 和 ATP7B 的突变，导致Menkes症和Wilson病 (肝豆状核变性病)等 Cu 代谢遗传疾病^[8]。 $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPase}$ 基因广泛存在于低等和高等植物中，如绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 基因组中有3个基因 (CrHMA1-3)，红藻 *Cyanidioschizon merolae* 中存在2个基因 (CmHMA1 ， CmHMA2)。单子叶植物水稻 *Oryza sativa* 基因组中发现9个基因 (OsHMA1-9)，大麦 *Hordei vulgaris*

中有 10 个基因 (HvHMA1-HvHMA10)^[11-13]。在拟南芥中克隆出 8 个基因 (AtHMA1~8)^[12,14], 在大豆 *Glycine max* 基因组中发现 9 个 (GmHMA1~GmHMA9)^[15], 此外, 研究者还从甘蓝型油菜 *Brassica napus*、重金属 Zn/Cd 超富集植物鼠耳芥 *Arabidopsis haller* 和遏蓝菜 *Thlaspi caerulescens* 中分别克隆到了 P_{1B}-ATPase 基因 *BnRANI (HMA7)*^[16-17]、*AhHMA4*^[18] 和 *TcHMA4* 基因^[9,19]。植物基因组中存在多个 P_{1B}-ATPase 基因, 其蛋白在植物的根茎叶和细胞中的叶绿体、高尔基体、内质网、液泡及质膜上的定位均有报道 (表 1)。

P_{1B}-ATPase 在细菌、古细菌和真核生物中均有发现, 表明其可能参与了早期生命形式细胞质中过渡金属元素的解毒。随着细胞区域化的出现和对多种金属酶的需求, 高等植物基因组中 P_{1B}-ATPase 的数量增加, 且功能也出现了多样化, 由单细胞外排金属的单一功能进化出更多特异性的功能, 如木质部微量元素的装载以进行长距离运输, 而这一过程对于植物营养至关重要^[3,8,11]。在拟南芥中存在多个 P-ATPase, 一个原因可能是在大约 1.5 亿年前, 在一种植物祖先中可能发生了多倍化事件和若干局部基因重复导致串联基因阵列 (Tandem gene arrays) 产生; 另外一个原因是多数拟南芥 P-ATPase 可能缺乏植物中发生的选择性拼接, 而动物可以通过同一基因的选择性拼接获得蛋白质的多样性。有趣的

是, 只有原核生物和具有光合作用的真核生物拥有 Zn/Cd/Co/Pb P_{1B}-ATPase, 推测植物中存在的这些基因也许是原核内共生体的水平基因转移进化的结果^[11,19]。

1.2 P_{1B}-ATPase 的分类

由于生物体存在多个 P_{1B}-ATPase 基因, 为了研究结构和功能的关系, 有必要对其进行归类。根据金属底物特异性可以将 P_{1B}-ATPase 分为两个亚类: Zn²⁺/Co²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺P_{1B}-ATPase (Zn 亚类) 和 Cu⁺/Ag⁺P_{1B}-ATPase (Cu 亚类), 其中动物只有 Cu 亚类^[7,11]。通过氨基酸多序列比对分析, 将目前鉴定的植物 P_{1B}-ATPase 分为两个亚类, 如拟南芥 AtHMA1-4 属于 Zn 亚类, 而 AtHMA5-8 属于 Cu 亚类^[7]; 水稻 OsHMA1-OsHMA3 属于 Zn 亚类, OsHMA4-OsHMA9 属于 Cu 亚类^[13]。随着基因克隆技术的进步, 人们在基因组中鉴定出了大量的 P_{1B}-ATPase 基因序列, 根据系统发生分析, 用相似性尺度衡量氨基酸序列之间的亲疏程度, 从而可以将 P_{1B}-ATPase 分成 6 个亚类 (图 2): 亚类 1 (AtHMA1)、亚类 2 (AtHMA2-4)、亚类 3 (AtHMA5)、亚类 4 (AtHMA7)、亚类 5 (AtHMA6) 和亚类 6 (AtHMA8)。在基因文库中搜索了拟南芥、大豆和水稻等植物的 P_{1B}-ATPase 基因, ClustalW 聚类分析表明植物 P_{1B}-ATPase 可以分为 Cu 亚类和 Zn 亚类, 与上述根据底物专一性的分类方法相一致^[8,11]。

表 1 植物中的 P_{1B}-ATPases

Table 1 P_{1B}-ATPases in plant

Gene	Organ distribution	Organization and cellular localization	Subcellular localization	Metal specificity	Chromosome	Exon
AtHMA1		Green tissues	Chloroplast envelope	Cu, Zn, Ca, Co, Cd	4	13
AtHMA2		Vascular tissues	Plasma membrane	Cd, Zn	4	9
AtHMA3	Roots, old rosette leaves and cauline leaves	Guard cells, hydathodes, vascular tissues and the root apex	Vacuole membrane	Cd, Co, Pb, Zn	4	8
AhHMA3				Zn		
AtHMA4	Roots, stems and leaves	Mesophyll cells in protoplasts	Plasma membrane	Zn, Cd	2	9
AhHMA4	Roots	Epidermal cells	Plasma membrane	Zn, Cd		
TcHMA4	Roots			Zn, Cd		
AtHMA5	Roots and pollen	Pericycle cells	Plasma membrane	Cu	1	6
AtHMA6	Roots and shoots		Plastid envelope	Cu	4	4
AtHMA7	Roots and pollen		Golgi apparatus	Cu	5	9
AtHMA8	Shoots		Thylakoid membranes	Cu	5	16
GmHMA8			Thylakoid membranes	Cu		
OsHMA9	Roots	Vascular tissues	Plasma membrane	Cu, Zn, Pb	6	10

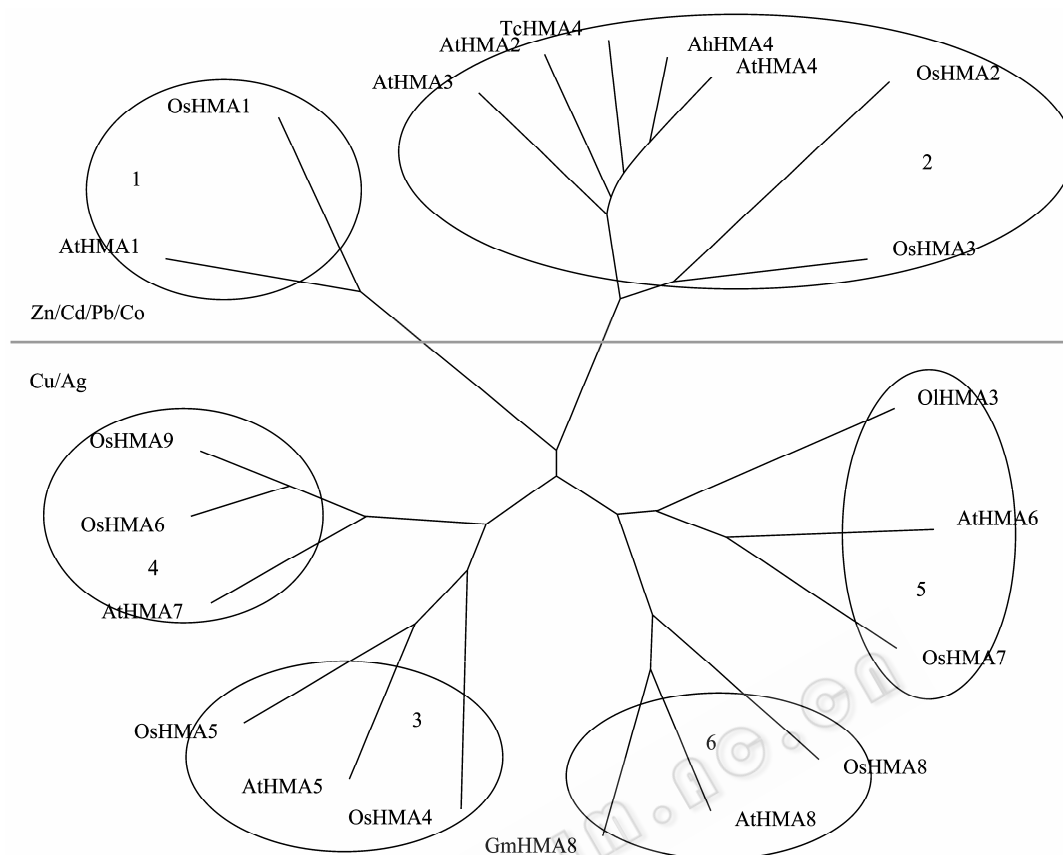


图2 植物 P_{1B} -ATPases 的分类

Fig. 2 Classification of P_{1B} -ATPases in plant. The dendrogram was constructed by ClustalW with multiple alignment, P_{1B} -ATPases are divided into two groups: AtHMA1-4, OsHMA1-3, TcHMA4, AhHMA4 belong to $Zn^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$ ATPases and AtHMA5-8, OsHMA4-9, OIHMA3, GmHMA8 fall in Cu^+/Ag^+ ATPases. According to phylogenetic analysis, P_{1B} -ATPases have 6 clusters: cluster 1 (AtHMA1 and OsHMA1); cluster 2 (AtHMA2-4, OsHMA2-3, TcHMA4 and AhHMA4); cluster 3 (AtHMA5, OsHMA4 and OsHMA5); cluster 4 (AtHMA7, OsHMA6 and OsHMA9); cluster 5 (AtHMA6, OsHMA3 and OsHMA7) and cluster 6 (AtHMA8, OIHMA8 and GmHMA8).

根据 P_{1B} -ATPase 的氨基酸序列预测的结构特点和金属特异性, 结合 ClustalW 聚类分析数据将其分成 5 个亚类: P_{1B-1} (Cu^+/Ag^+)、 P_{1B-2} ($Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$)、 P_{1B-3} ($Cu^{2+}/Cu^+/Ag^+$)、 P_{1B-4} (Co^{2+}) 和 P_{1B-5} (无特异性)^[8,20-21]。拟南芥 HMA1 属于 1B-4 亚类, HMA2-4 属于 1B-2 亚类, HMA5-8 属于 1B-1 亚类^[21]。在真核生物中, 只有植物含有 1B-2 和 1B-4 亚类, 而人类和酵母中的 P_{1B} -ATPase 均属于 1B-1 亚类 (图 3)^[8,19]。

从构建的无根树 (图 2) 中可以看出 P_{1B} -ATPase 分成了 4 大支, 其中亚类 1 (AtHMA1) 和亚类 2 (AtHMA2-4) 属于 Zn 簇, 亚类 3 (AtHMA5)、亚类 4 (AtHMA7)、亚类 5 (AtHMA6) 和亚类 6 (AtHMA8) 属于 Cu 簇, 该分类与其结构特点紧密相关。在拟南芥中 AtHMA1-4 属于 Zn 簇, 其序列中没有重金属相关调节功能域 (Heavy metal associated regulatory

domain, HMA-RD); 另外, AtHMA1 的 N 端只有聚 His 区, 而 AtHMA2 和 AtHMA4 中发现有若干个 CC 二肽和富 His 区域。AtHMA5-8 属 Cu 簇的 P_{1B} -ATPase, 同时也属于 1B-1 亚类, 涉及在 Cu 的转运过程中。AtHMA5 和 AtHMA7 在 N 端有两个 HMA-RD, 参与 Cu 的稳态作用; 而 AtHMA6 和 AtHMA8 在 N 端只有一个 HMA-RD, 位于植物叶绿体中, Cu 离子的转运与光合作用有关^[8,11]。

1.3 P_{1B} -ATPase 的功能位点

与其他的 P-ATPase 相比, P_{1B} -ATPase 具有明显的结构特征: 跨膜片段较少, ATP 结合区 (ATP-BD) 小, N-和 C-末端存在多个金属结合域 (Metal binding domain, MBD) 等^[8]。 P_{1B} -ATPase 中的 ATP 结合残基是不保守的, 例如 KGxxE/D 基序是多数 P-types 的保守基序 (包括 KdpB, 一种 P_{1A} -ATPase), 该基

序中的赖氨酸是组成 ATP 结合穴 (ATP binding pocket) 的要素, 而 P_{1B}-ATPase 中没有该基序^[22]。如图 1 所示, P_{1B}-ATPase (P_{1B-1}-ATPase 和 P_{1B-2}-ATPase) 一般含有 8 个跨膜片段(TM), 而 P_{1B-4}-ATPase 只有 6 个跨膜片段, 金属结合信号序列以及可调节的胞质金属结合域存在于跨膜片段上 (图 1), 与其底物专一性和运输方向一致^[8]。P_{1B}-ATPase 含有 3 个功能域: P 功能域 (Phosphorylation domain), 涉及酶的磷酸化; A 功能域 (Actuator domain), 涉及能量传导; N 功能域 (Nucleotide-binding domain), 涉及核苷酸的结合作用, 包含 ATP 的结合位点^[8,11]。A 功能域位于 H4 和 H5 螺旋之间的小环上; 具有 P 功能域和 N 功能域的保守的大胞质环位于 H6 和 H7 螺旋之间; H6、H7 和 H8 等 3 个螺旋上保守的氨基酸序列形成了跨膜金属结合位点 (Transmembrane metal binding sites, TM-MBS); N-和 C-末端含有 MBD^[8]。

一些 P_{1B}-ATPase 的 MBD 上存在重金属相关调

节功能域(Heavy metal associated regulatory domain, HMA-RD), 其保守基序为 C_{xx}C^[8,11,23]。保守基序 C_{xx}C 在原核生物 ATPase 中出现一个或两个拷贝, 而在真核生物 ATPase 可能达到 6 个拷贝, 如 WND 和 MNK^[19,21]。HMA-RD 结合重金属, 也可能是重金属的传感器。拟南芥的 Cu²⁺/Ag²⁺ ATPase 的 N 端发现了 HMA-RD, HMA7 有一个 HMA-RD, HMA5 和 HMA6 有两个^[7,11]; 而其他 HMA 没有 HMA-RD, 在 HMA1-4 中 CC 二肽和富 His 区起到与重金属结合的作用, HMA1 的 N 端有聚 His 区, 在 HMA2 和 HMA4 的长 C 端有若干个 CC 二肽和富 His 区域, 其中 HMA4 的富 His 区最为明显^[7-8]。真核生物 Cu⁺-ATPase 有多个拷贝的 N-MBD, 在体外 MBD 可结合单价和双价阳离子, 包括 Cu⁺、Cu²⁺、Zn²⁺和 Cd²⁺; 在体内 N-MBD 从 Cu 分子伴侣获得 Cu⁺, 其金属特异性似乎取决于特异的 N 末端 MBD 与伴侣蛋白的静电和疏水相互作用^[8]。P_{1B}-ATPase 突变型

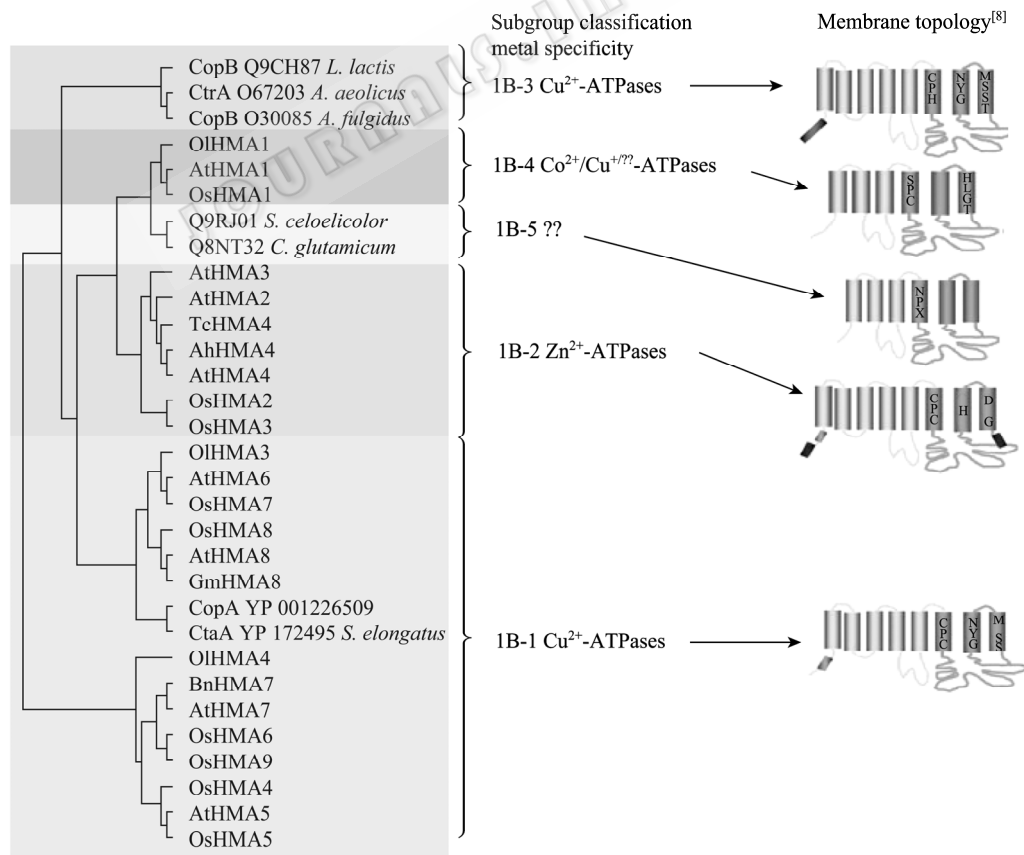


图 3 P_{1B}-ATPases 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the P_{1B}-ATPases.

分析表明,除去 MBDs 的金属结合能力后,酶的转换率下降;截断 ATPase,完全除去 N-MBDs 部分后,酶的转换率更高^[24]。

CPx 基序和 HP 基序是 P_{1B}-ATPase 特有的基序^[12]。位于第 6 跨膜域 (H6, sixth TM) 处的 CPx (或 xPC) 基序是金属配位的定义元件 (x 是 Cys、His 或 Ser), AtHMA1 的 CPx 位于 H4。CPx 基序是金属易位点,其完整性对于 ATPase 的功能是必需的, Cys 突变会减弱酶的功能。CPx 基序存在 CPC、CPH、CPS、SPC、TPC 和 APC 几种形式,其中 CPC 最常见。根据 H6、H7 和 H8 这 3 个跨膜金属结合位点上的保守氨基酸序列的不同,可将 P_{1B}-ATPase 分为 5 个亚族。P_{1B-1} 亚族在 H6 上有 CPC 基序, H7 和 H8 的保守残基分别是 Asn、Tyr 和 Met、Ser; P_{1B-2} 亚族 CPC 基序也在 H6 上, H7 和 H8 的保守残基分别是 Lys 和 Asp、Gly; P_{1B-3} 亚族在 H6 上是 CPH 基序, H7 和 H8 的保守残基分别是 Asn、Tyr 和 Met、Ser; P_{1B-4} 亚族的 SPC 基序在 H4 上; P_{1B-5} 亚族目前还不清楚^[8,11,21]。HP 基序存在于大多数 P_{1B}-ATPase 中,在其他 P-ATPase 中未见报道。在 Wilson 疾病蛋白 ATP7B 的 N 功能域上的 HP 基序被认为对核苷酸配位很重要,但目前还不能确定 HP 基序是 ATP 的直接配体,还是通过与其他功能域的相互作用来调节核苷酸结合位点的亲和力。*E. coli* Znta 突变体的研究表明 HP 基序中的组氨酸除了具有 ATP 配位作用,可能还具有催化功能^[8,11]。

2 植物 P_{1B}-ATPase 的功能

2.1 P_{1B-4}-ATPase 参与叶绿体 Cu 运输

目前,植物 P_{1B}-ATPase 的结构和功能研究主要在拟南芥中, AtHMA1 属于 P_{1B-4}-ATPase,有 6 个跨膜区, SPC 基序代替经典的 CPx 保守序列,缺少 HMA-RD, N 端富含 His^[8,12,23]。RT-PCR 实验发现 AtHMA1 主要在绿色组织中表达,绿色荧光蛋白 (GFP) 显示其定位于叶绿体被膜上, N 端部分 His 区缺失影响其金属的转运。纯化的叶绿体被膜 AtHMA1 的 ATPase 活性受 Cu 的特异促进,表明其可能参与 Cu 进入叶绿体的运输过程。T-DNA 缺失突变体 *hmal* 和 *AtHMA1* 过表达植株的表现型均与

野生型相比无明显改变,只是 *hmal* 突变体中的叶绿体 Cu 含量更低,叶绿体 Cu/Zn 超氧化物歧化酶活性的降低,而质体蓝素含量不变,推测 AtHMA1 主要是将 Cu 传递给 Cu/Zn 超氧化物歧化酶。另外, *hmal* 缺失突变体表现出对强光的敏感性,表明 AtHMA1 是植物在高光强下生长所必需的,其作用可能是在不良的光照条件下将 Cu 传递给叶绿体蛋白或高活性酶分子^[23-24]。AhHMA1 在地上部的表达量高于根部,且在地上部的表达量受高 Zn 浓度的诱导而升高^[25]。AtHMA1 是一种对毒胡萝卜素敏感的 Ca²⁺/重金属 ATPase,可转运 Ca,参与 Cd、Zn 和 Co 的解毒。在高浓度 Zn²⁺下,表达缺失 N 端叶绿体靶信号 (Chloroplast-targeting signal) 的 AtHMA1 可改变酵母对 Zn²⁺的敏感性^[26-27]。另外,也有证据显示 AtHMA1 既可以转运二价金属 Cu/Zn/Cd/Co^[23,26-27],也可以转运一价金属 Cu⁺^[28],如 *Oscillatoria brevis* 的 CPx-ATPase Bxa1 可以由单价和双价的重金属诱导表达^[29]。

2.2 P_{1B-1}-ATPase 参与 Cu 稳态

P_{1B-1}-ATPase 在生物界中广泛存在,如人类的 Menkes/Wilson 蛋白、酵母的 Ccc2p、拟南芥 AtHMA5-8、水稻 OsHMA4-9 和甘蓝型油菜 *Brassica napus* 的 BnRAN1 都属于 P_{1B-1}-ATPase。人 ATP7A 和 ATP7B 基因突变,可导致 Menkes 症和 Wilson 病。Wilson 疾病蛋白 (WNDP) 使肝脏、大脑和血液中的 Cu 过量累积,而 Menkes ATPase (MNKP) 的突变可导致 Cu 在肠中吸收减少^[8,30]。酵母 Ccc2p (Cu²⁺-ATPase) 将 Cu 运送到多铜氧化酶 (Multicopper oxidase) Fet3p 处, Fet3p 是高亲和性 Fe 摄取所必需的酶,因此 Ccc2 蛋白在 Cu 和 Fe 的稳态中起作用,其他真核生物如线虫和人的 P_{1B}-ATPases 也具有同样的作用^[16,31]。

AtHMA5-8 在 H6 的保守基序是 CPC 基序, N 端存在 HMA-RD 且数量不同,氨基酸序列分析表明 AtHMA5 和 AtHMA7 同源性较高,在 N 端有两个 HMA-RD,而 AtHMA6 和 AtHMA8 的序列同源性较高,在 N 端只有一个 HMA-RD。HMA5 和 HMA7 涉及 Cu 稳态,在动植物中均有发现, AtHMA6 和 AtHMA8 则参与植物光合作用。

RT-PCR 证明 *AtHMA5* 和 *AtHMA7* 主要在花和根部表达, *AtHMA7* 在所有根组织中都很丰富, 而 *HMA5* 主要在根部中柱鞘细胞表达, Cu 处理强烈诱导其在整个植株中特异表达。T-DNA 插入 *AtHMA5* 的第二外显子得到突变体 *hma5-1*, 插入第一内含子得到 *hma5-2*。*hma5-1* 和 *hma5-2* 对 Cu 都非常敏感, 但对其他金属如 Fe、Zn 或 Cd 都不敏感。*hma5* 突变体幼苗根尖在早期表现出波浪形 (Wave-like) 表型, 之后主根生长完全被抑制, 侧根出现在根冠附近, Cu 含量分析显示在 Cu 过量的条件下 *hma5* 突变体根部富集的 Cu 多于野生型, 表明 P_{1B}-ATPase 缺失导致根部 Cu 的过量累积。酵母双杂交实验表明 *AtHMA5* 金属结合域能与拟南芥类 ATX1 样 Cu 伴侣相互作用, 推测 Cu 伴侣蛋白 CCH 对植物特异功能域具有调节作用^[32]。TM-MBS 对于酶的磷酸化和随后的运输是必需的, 然而, Cu⁺不能以水合的形式结合到 Cu⁺-ATPases 上, 而是结合到伴侣蛋白上。如 *Archaeoglobus fulgidus* 的 Cu 伴侣蛋白 CopZ 可将 Cu⁺运送到 CopA(Cu⁺-ATPases) 的 MBDs 上; CopA 缺失 MBDs 后, CopZ 则把 Cu⁺运送到 TM-MBS 上^[33]。在酵母中 Cu 是通过金属伴侣 Atx1 和 Ccc2 的 N 端相互作用运送到反面高尔基网上。Ccc2 的 N 端具有双重作用, 从 Atx1 上获取 Cu 和运送 Cu 到 Ccc2 的其他结合域, 从而激活 ATPase。与原核生物同源基因不同的是 Atx1 不能激活缺失 N 端的 Ccc2^[34]。为什么一些转运需要金属伴侣蛋白而另一些不需要? 一种解释是金属伴侣蛋白可以克服细胞的高金属离子螯合能力。例如 ATX1 的功能是通过蛋白-蛋白的相互作用将 Cu 运送到 HMA5 和 HMA7, 这两个蛋白的 Cu 的结合常数很低。另一种是金属伴侣蛋白给细胞提供一种机制从而控制金属离子供应的特异运输途径。最后, 金属伴侣蛋白能够防止不适当的相互作用, 对这一功能的最好解释是蓝细菌的细胞膜上的 3 个 P-Type ATPases 可以吸收 Cu(CtaA), 或排出 Zn(ZiaA) 和 Co(CoaT)^[28]。

RAN1 (Responsive to Agonist1) 是 HMA7, 是从具有乙烯拮抗性、可引起乙烯三重反应的幼苗中分离出来的基因。RT-PCR 技术显示 *HMA7/RAN1* 与 *HMA5* 有相似的表达模式, 主要在根部和花粉中表

达, 且受 Cu 诱导^[32]。*HMA7/RAN1* 隐性突变具有莲座叶致死 (Rosette-lethal) 表型。拟南芥 *ran1-3* 突变体叶片上表皮细胞比野生型小, 且更圆, 叶片表面绒毛减少^[30]。*AtHMA7* 突变体对 Cu 超敏感, RAN1 等位基因的功能缺失突变影响细胞延长等多个过程, 而加入 Cu 后能部分缓解细胞延伸的抑制作用, 因此说明 RAN1 具有运送 Cu 到乙烯受体的作用, 也可能是把 Cu 运送给分泌途经中的 Cu 蛋白分子^[12]。*AtHMA7/RAN1* 定位在高尔基体上, 油菜 *Brassica napus* 的 BnRAN1 和 *AtHMA7* 基因序列有 88% 的一致性, 氨基酸序列有 91% 的一致性。BnRAN1 的 cDNA 能和酵母 *ccc2* 突变体互补, 而 Ccc2 蛋白定位于分泌途径中的后高尔基体 (Late Golgi) 或前高尔基体 (Post Golgi) 区室^[35], 经过酵母互补试验证明 CCC2 基因可能是一个 Cu²⁺-ATPase^[31]。因此, BnRAN1 cDNA 编码的产物具有 Cu 转运功能, 并可能位于分泌区域 (Secretory compartment)^[16]。

AtHMA6 曾被命名为 PAA1 (P-type ATPase of Arabidopsis), 存在于植物的芽和根部, 可能在绿色和非绿色质体中都起作用^[12]。*AtHMA6* 定位在叶绿体外膜上, 调节质体 Cu 的输入, 是叶绿体 Cu 转运体系的关键部件。*AtHMA6* 是叶绿体 Cu 转运的关键组分, 主要是为质体蓝素和 Cu/Zn 超氧化物歧化酶提供 Cu 离子, 可见 *AtHMA6* 对维持叶绿体铜蛋白的正常功能非常重要^[12]。拟南芥有 6 个 *paal* 插入突变体, 其中 *paal-1* 是发生在第 8 外显子上的无义突变体, 导致离子转运、磷酸化和 ATP 结合位点的 C 端区域的截短, 因此 *paal-1* 可能是缺少 PAA1 活性的无效等位基因; *paal-4* 突变体是在第 15 外显子上的无义突变体, 导致最后两个跨膜区的缺失; *paal-3* 在保守 GMxCxxC 基序附近的金属结合区 3 个氨基酸产生缺失; *paal-2* 和 *paal-6* 在金属结合区附近的氨基酸有所改变; *paal-5* 造成了第 4 跨膜区的极其保守的 Gly 残基的改变。6 个突变体的株型都非常小, 表明这些突变位点对 PAA1 的功能非常重要。Cu 向基质的运输由 PAA1 抑制, 而不是 *AtHMA8* (PAA2)^[36]。

PAA2 和 *AtHMA1* 存在非常相似的表达模式, 因此认为这两种酶的重要作用是可以为叶绿体光合作

用中提供铜。PAA2 和 PAA1 运送铜到质体蓝素中。PAA2 基因突变体导致光合作用电子传递受影响,其中 *paa2-1* (第二外显子的无义突变) 受到的影响比 *paa2-2* (第二内含子和第三外显子之间的核苷酸替换突变) 更严重^[12,36]。而 *paa1* 和 *paa2* 双突变幼苗致死, 显示出铜对于光合作用的重要性^[36]。PAA2 主要在地上部分中表达, 免疫荧光标记和胶体金免疫电镜标记技术证明大豆 GmHMA8 定位于类囊体膜上^[15]。

OsHMA9 是第一个进行功能研究的单子叶植物的 P_{1B}-ATPase, 具有输出 Cu、Zn 和 Pb 的功能。OsHMA6 和 OsHMA9 序列高度相似, 但它们的表达模式不同, 前者主要在叶片中表达, 后者在根部强烈表达。Cu 处理后的 OsHMA9 表达比 OsHMA6 更强烈。OsHMA9 突变体比野生型在地上部分累积更多的 Cu、Zn、Pb 和 Cd。GFP 定位显示 OsHMA9 定位于质膜上, GUS 报告基因分析证明 OsHMA9 主要在维管束和花药中表达^[13]。

2.3 P_{1B-2}-ATPase 参与毒性重金属转运

拟南芥的 HMA2、HMA3 和 HMA4 转运蛋白被归为 P_{1B-2}-ATPase, 是参与重金属运输的蛋白。AtHMA2-4 在第 6 跨膜域处的保守基序是 CPC 基序, 都具有 CC 二肽, 在 AtHMA2 和 AtHMA4 的长 C 端有富 His 区域与重金属结合。AtHMA3 的 N 端有一个退化的 HMA-RD, 由 GICCxxx 代替了一般的 GMxCxxC 基序。AtHMA2、AtHMA3 和 AtHMA4 具有相似的序列, 似乎是在拟南芥进化历史过程中由复制产生的。AtHMA2 和 AtHMA3 在第 4 染色体上串联, 而这一区域被复制在了第 2 染色体上, 其中含有 AtHMA4^[14]。启动子活性研究表明 AtHMA2 和 AtHMA4 主要在根茎叶的维管组织中表达^[14,37-38], GFP 定位和蛋白质凝胶斑点分析显示 AtHMA2 定位在质膜上, 与 AtHMA2 运输 Zn 进出细胞的功能一致, 说明 AtHMA2 在植物中具有运输 Zn 的作用。AtHMA2 在木质部中可能具有装载或卸载 Zn 的功能, 在韧皮部具有从地上部向根部转运 Zn 的作用^[4,14], 敲除 AtHMA2 导致植株中 Zn²⁺浓度增加。T-DNA 插入 *hma4* 突变体和 *hma2/hma4* 双突变体中 Zn 的累积降低, 且 *hma2/hma4* 双突变体具有 Zn 营养缺乏

的表型, 而在施加外源 Zn 后, Zn 缺陷表型有所改善^[14]。HMA2 的 N 端和 C 端结构域可高亲和性地结合 Zn²⁺, C 端 244 个氨基酸缺失的突变 HMA2 可以拯救大部分 *hma2/hma4* 的 Zn 缺乏表现型, 而 GFP 定位表明 C 端 244 个氨基酸缺失的 HMA2 部分导致其错误地在根的中柱鞘细胞中表达; 缺失 C 端 121 个氨基酸和 21 个氨基酸的突变 HMA2 可以拯救所有表现型并正确定位。N 端结构域突变的 HMA2 定位正常, 但是不能与 *hma2/hma4* 表现型互补。表明在植物中 HMA2 的 N 端结构域对于功能是必需的, 而 C 端结构域虽然对金属转运功能不是必需的, 但也许包含对 HMA2 蛋白亚细胞定位的重要信号^[39]。

AtHMA3 属于 Zn/Cd/Pb/Co P_{1B}-ATPase, 其表达可与 Cd/Pb 敏感酵母菌株 *vyef1* 互补, 但对 Zn 敏感突变型菌株 *vzrc1* 无影响。AtHMA3 的 mRNA 主要在根部、老莲座叶和茎叶中表达, 表达水平不受 Cd 或 Zn 处理的影响。AtHMA3 定位于液泡, 将 Cd 运进液泡, 在细胞内具有封闭 Cd 的功能。与 AtHMA4 相比, AtHMA3 的 mRNA 在植物中的表达非常低, 在不同组织都有分布^[34]。最新研究表明 AtHMA3 定位于液泡膜, 在保卫细胞、水孔、维管组织和根尖中表达量高。过量表达 AtHMA3 可增强植物对 Cd、Co、Pb 和 Zn 的耐性, Cd 的富集量较野生型增加了 2~3 倍。AtHMA3 可能具有封闭重金属在液泡中的原始功能, 在必需重金属 (Zn) 和非必需重金属 (Cd、Co 和 Pb) 的解毒过程中具有重要作用^[40]。利用拟南芥基因芯片在鼠耳芥克隆了 AhHMA3, 实时 RT-PCR 显示 AhHMA3 在地上部的表达量高于根部, 且 Zn 可诱导 AhHMA3 的表达, 且在低 Zn 和高 Zn 处理下 AhHMA3 的表达量均高于 AtHMA3^[25]。

AtHMA4 是植物 P_{1B}-ATPase 中第一个被克隆和表征的 Zn/Co/Cd/Pb P_{1B}-ATPase, HMA4 也是目前植物中研究得比较深入的基因。AtHMA4 的 T-DNA 插入突变体对 Cd 和 Zn 浓度的升高敏感。AtHMA4 在野生型酵母中的异源表达可提高其 Cd 抗性, 还可使 Zn 敏感大肠杆菌 *zntA* 突变体存活下来^[3]。AtHMA4 可增加酵母对 Zn、Cd 和 Pb 的抗性, 并能与超敏感型酵母突变体表型互补。过表达 AtHMA4 可增加拟南芥叶片的 Zn 和 Cd 水平^[32]。AtHMA4 在野生型酵

母和 Co 超敏感突变体 *cot1* 中的表达提高了酵母对 Co 的敏感性^[41]。RT-PCR 实验证明 *AtHMA4* 在多种组织中表达, 根中的表达量最高; *AtHMA4* 在根部的表达受 Zn 和 Mn 上调, 但受 Cd 下调。*GUS* 定位分析表明 *AtHMA4* 主要在维管组织中表达。在正常的金属离子水平下 *AtHMA4* 在木质部薄壁细胞中表达^[3-4,41]; EGFP 荧光定位分析显示 *AtHMA4* 位于酵母细胞的质膜上^[41]。因此, 推测 *AtHMA4* 在植物中可能具有双重功能: 在 Zn 低于正常水平时, *AtHMA4* 能有效地将 Zn 从根部共质体泵到木质部, 为地上部提供必需元素; 而在高水平的 Cd 和 Zn 存在时, *AtHMA4* 将根部的 Cd 和 Zn 运输到地上部或土壤溶液中^[4]。

遏蓝菜是重金属 Zn/Cd 超富集模式植物, *TcHMA4* 序列与 *AtHMA4* 具有 71% 的一致性, 具有长的 C 端有金属结合功能区, 其中包括一个长的 His 区 (9 个 His 残基)、13 个 Cys 对和许多单个的 His 残基。*TcHMA4* 蛋白在转译后修饰, 分成 60 kDa 和 50 kDa 两个特异性条带^[42]。*TcHMA4* 在酵母中具有提高金属耐性和输出运送不同重金属 (Cd、Zn、Pb 和 Cu) 的功能^[17]。Northern 分析表明 *TcHMA4* 在根部强烈表达, 而在地上部组织和器官中的表达水平很低^[17]。*AtHMA4* 在根部的表达受 Zn、Mn 胁迫上调, 受 Cd 下调; 而遏蓝菜 *TcHMA4* 的表达受 Cd 胁迫上调。*TcHMA4* 在根部的表达水平远高于 *AtHMA4*, 说明 HMA4 涉及在 Cd²⁺ 的运输过程中, 且可能赋予植物的超富集特性^[10,43]。非富集植物倾向于将重金属封闭于根部, 而超富集植物如遏蓝菜则将大量的重金属转运到地上部的叶表皮细胞中储存^[17]。推测 *TcHMA4* 在遏蓝菜根部主要是将重金属和微量元素从木质部薄壁组织上载到木质部导管中, 以便长距离转运^[10,17]。

鼠耳芥也是一种研究重金属超富集机制的模式植物, 其基因组编码区与拟南芥有 94% 的序列同源性。*AhHMA4* 在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中的过量表达可降低细胞中的 Zn 和 Cd 含量, 表明 *AhHMA4* 具有跨膜转运 Zn 和 Cd 作用^[17]。GFP 定位显示 *AhHMA4* 定位在质膜上^[18]。*AhHMA4* 在根部的

转录水平高于 *AtHMA4*, RNAi 和转基因技术研究表明在鼠耳芥中高水平的 *HMA4* 表达量是由于顺式调节序列的改变和拷贝数的增加所致。在鼠耳芥中有 3 个 *AhHMA4* 的拷贝, 相似性达 99%, 与 *AtHMA4* 相似性为 88%, 3 个拷贝的表达水平相似。*AhHMA4* 拷贝数的增加和单个 *AhHMA4* 基因的表达量增加是鼠耳芥中 HMA4 的表达量提高的原因。顺式调节元件突变和基因拷贝数的增加可能是进化中一个自然选择的极端特性, 因此, 阐明了重金属超富集植物的自然策略^[43]。*AhHMA4* 的高水平表达有利于提高 Zn 向木质部导管的转运和地上部 Zn 的超富集, 另外, *AhHMA4* 还承担了上调根部 Zn 缺乏响应基因表达的生理总开关的功能, 如拟南芥中转入鼠耳芥的 *HMA4* 基因后, 与野生型相比, *ZIP4* 和 *IRT3* 的表达量都有增加^[43]。

3 展望

P-ATPase 分为 5 个亚型, 总共分为 10 种, 在拟南芥基因组里共有 45 个基因编码 P-ATPase^[7], 有 8 个基因是 P_{1B}-ATPase, 约占 18%。近 20 年来, 虽然对 P_{1B}-ATPase 的拓扑结构、保守基序、金属特异性、功能、进化过程和组织细胞定位研究较多, 但是仍然有很多方面不清楚。如 HMA1 作为转运重金属的 P_{1B}-ATPase, 为何也可以转运 Ca? SPC 基序的底物特异性为何会与其他 CPx 基序有这么大的差别? HMA4 可以转运多种重金属, 而 Zn 可以作为第一底物被优先结合的机制是什么? 目前克隆出来的 P_{1B}-ATPase 有很多, 但纯化出来的蛋白质只有 *TcHMA4*, 对于 P_{1B}-ATPase 蛋白质水平的研究远远不足。P_{1B}-ATPase 蛋白如何与重金属离子结合和参与重金属转运机制依然不清楚。P_{1B}-ATPase 在植物中广泛分布, 但目前的研究仍仅局限在拟南芥中, 尤其是对重金属超富集植物中的 P_{1B}-ATPase 没有进行系统全面地研究。

鼠耳芥 *AhHMA4* 的顺式调节元件的突变和基因拷贝数的增加, 是其响应重金属胁迫和重金属超富集的自然策略之一。比较研究 P_{1B}-ATPase 在非重金属富集植物与超富集植物中的表达模式将是未来

研究的重点之一, 据此或许可以揭开植物富集重金属的重要机制。对 AhHMA4 的研究也提示 HMA4 可能是鼠耳芥对 Zn 吸收的关键基因, 这对于开发 Zn 高累积作物具有重要意义。可以预见, 通过深入研究 P_{1B}-ATPase 的作用机理, 全面了解重金属超富集植物累积重金属的机制, 必然会对开发和利用植物修复技术, 改造农作物品质和治理环境污染提供技术支持。

REFERENCES

- [1] Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 2001, **212**: 475–486.
- [2] Zhang YX, Chai TY. Isolation and Function of Heavy Metal Responsive Gene in Plant. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 26–34.
张玉秀, 柴团耀. 植物重金属调节基因的分离和功能. 北京: 中国农业出版社, 2006: 26–34.
- [3] 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*, 2003, **35**: 164–176.
- [4] Mills RF, Francini A, Pedro SC, *et al.* The plant P_{1B}-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett*, 2005, **579**: 783–791.
- [5] Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**(7): 309–315.
- [6] Palmgren MG, Harper JF. Pumping with plant P-type ATPases. *J Exp Bot*, 1999, **50**: 883–893.
- [7] Axelsen KB, Palmgren MG. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, **126**: 696–706.
- [8] Argüello JM, Eren E, González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases. *Biomaterials*, 2007, **20**: 233–248.
- [9] Bernard C, Roosens N, Czernic P, *et al.* A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett*, 2004, **569**: 140–148.
- [10] Solioz M, Vulpe C. CPx-type ATPase that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci*, 1996, **21** (7): 237–241.
- [11] 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.
- [12] Puig S, Andrés-Colás N, García-Molina A. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ*, 2007, **30**: 271–290.
- [13] 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.
- [14] Hussein D, Haydon MJ, Wang Y, *et al.* P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, **16**: 1327–1339.
- [15] Bernal M, Testillano PS, Alfonso M, *et al.* Identification and subcellular localization of the soybean copper P_{1B}-ATPase GmHMA8 transporter. *J Struct Biol*, 2007, **158**: 46–58.
- [16] Jennafer LS, Basu U, Gregory JT. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* ccc2 mutant by a putative P_{1B}-ATPase from *Brassica napus* supports a copper-transporting function. *FEBS Lett*, 2004, **266**: 218–222.
- [17] Papoyan A, Kochian LV. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiol*, 2004, **36**(11): 3814–3823.
- [18] 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*, 2007, **144**(2): 1052–1065.
- [19] Cobbett CS, Hussain D, Haydon MJ. Structural and functional relationships between type 1B heavy metal transporting P-type ATPases in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 2003, **159**: 315–321.
- [20] Hertogh BD, Lantin Anne-Catherine, Baret PV, *et al.* The archaeal P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, **36**(1): 135–142.
- [21] Argüello JM. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P_{1B}-type ATPases. *J Membrane Biol*, 2003, **195**: 93–108.
- [22] Hall JL, Lorraine EW. Transition metal transporters in plants, a P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *J Exp Bot*, 2003, **54**(393): 2601–2613.
- [23] Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, *et al.* HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem*, 2006, **281**(5): 2882–2892.
- [24] Argüello JM, González-Guerrero M. Cu⁺-ATPases brake system. *Structure*, 2008, **16**: 833–834.
- [25] Becher M, Talke IN, Krall L. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of

- metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J*, 2004, **37**: 251–268.
- [26] Moreno I, Norambuena L, Maturana D, *et al.* AtHMA1 is a thapsigargin sensitive Ca²⁺/heavy metal pump. *J Biol Chem*, 2008, **283**(15): 9633–9641.
- [27] Kim YY, Choi H, Segami S. AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn (II) in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, **58**: 737–753.
- [28] Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, *et al.* Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, **9**(3): 256–263.
- [29] Liu T, Nakashima S, Shibasaka M, *et al.* A Novel histidine-rich CPx-ATPase from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* related to multiple-heavy-metal cotolerance. *J Bact*, 2002, **184**(18): 5027–5035.
- [30] Woeste KE, Kieber JJ. A strong loss-of-function mutation in *RANI* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell*, 2000, **12**: 443–455.
- [31] Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, *et al.* Responsive-to-antagonist1, a menkes/wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, 1999, **97**: 383–393.
- [32] 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**: 256–236.
- [33] González-Guerrero M, Argüello JM. Mechanism of Cu-transporting ATPases: soluble Cu-chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(16): 5992–5997.
- [34] Morin I, Gudin S, Mintz E, *et al.* Dissecting the role of the N-terminal metal-binding domains in activating the yeast copper ATPase *in vivo*. *FEBS J*, 2009, **276**(16): 4483–4495.
- [35] Yuan DS, Dancis A, Klausner RD. Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 25787–25793.
- [36] 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**: 1233–1251.
- [37] Eren E, Kennedy DC, Maroney MJ. A novel regulatory metal binding domain is present in the C terminus of *Arabidopsis* Zn²⁺-ATPase HMA2. *J Biol Chem*, 2006, **281**(45): 33881–33891.
- [38] Eren E, Argüello JM. *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavymetal-transporting P_{1B}-type atpase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiol*, 2004, **136**: 3712–3723.
- [39] 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 Phytologist*, 2009, **181**: 79–88.
- [40] Morel M, Crouzet J. AtHMA3, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009, **149**: 894–904.
- [41] Verret F, Gravot A, Auroy P, *et al.* Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His₁₁ stretch. *FEBS Lett*, 2005, **79**: 1515–1522.
- [42] Parameswaran A, Leitenmaier B, Yang M. A native Zn/Cd pumping P_{1B} ATPase from natural overexpression in a hyperaccumulator plant. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, **363**: 51–56.
- [43] Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, 2008, **453**: 391–396.