

植物Nramp家族参与金属离子吸收和分配的研究进展

陈可欣, 蒋贤达, 朱祝军, 王华森*, 冯圣军*

浙江农林大学农业与食品科学学院, 杭州311300

摘要:天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, Nramp)是一类广泛存在于植物中的金属转运蛋白,其主要参与植物对铁、锰、镉等金属离子的吸收和转运。目前,对于Nramp家族基因在植物体内的组织表达模式、亚细胞定位和金属离子运输专一性等方面的研究揭示了其在植物生长发育过程中的重要作用。本文综述了近年来Nramp基因在植物中的研究进展,分析和总结了Nramp家族基因参与植物吸收、积累和运输重金属的机制,拟为挖掘具有该调节功能的基因资源和培育高营养低积累重金属的优质农产品奠定基础。

关键词: Nramp基因; 重金属; 转运体; 吸收和转运

近年来,随着我国工业的迅猛发展和城市化进程的不断深入,土壤污染问题日益严重,污染物的种类和数量不断增加,并且发生的区域和规模也日益扩大。农田土壤中有毒重金属含量呈急剧增加之势,由此造成的土壤生产力下降、农产品污染与生态环境破坏等问题,已成为阻碍农业生产持续、高效发展的主要因子之一(仓定稳和仓定仲2018)。而农田土壤中镉(Cd)、铅(Pb)、汞(Hg)等重金属污染,尤其镉在水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)、大麦(*Hordeum vulgare*)等大田作物中的超标问题更是严重影响我国粮食生产和食品安全。此外,铁(Fe)、铜(Cu)、锰(Mn)、锌(Zn)等重金属对植物生长和发育至关重要,它们在调节植物生理和生化功能等方面起着关键作用,植物缺少上述必需微量金属离子会生长迟缓、发育不良,但浓度过高又会对植物体造成伤害(孙永娣等2018)。近年来,由于农作物养分利用效率低下以及重金属污染带来的问题越来越严重,植物矿质元素的研究变得更为重要和迫切(晁代印和冷冰2017),因此,植物对土壤重金属选择性吸收、组织内含量平衡维持及过量解毒的分子机制已成为当今研究的热点(Meng等2017;Chen等2017;薛永等2014)。

天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, Nramp)首先在动物中被发现且广泛存在于植物中,它是参与金属离子运输的跨膜转运蛋白,该类蛋白不仅在对锰、铁等微

量元素的吸收分配中发挥作用,还参与了植物对镉等重金属的吸收和转运(Vatansever等2016)。研究发现拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtNramp1, 3, 4* (Curie等2000)和水稻*OsNramp1* (Thomine等2000)的异源表达能够回复酵母铁离子吸收缺陷双突变体*fet3fet4*的缺陷株表型,且*AtNramp1, 3, 4*的表达还增加了该酵母株系对镉离子的敏感性和积累量,这表明植物中的Nramp基因能编码多种金属离子的转运蛋白,具有吸收转运重金属的功能。植物对矿质元素的吸收和转运一直是科学家们研究的热点,前人已经开发了植物微调稳态机制,以确保细胞和整个植株水平上的必需金属离子含量的平衡,其中Nramp家族对植物金属离子的吸收和稳态的维持起到了至关重要的作用(Pottier等2015;谭珺隽等2016;曹玉巧等2018)。本文整合了Nramp家族基因在植物中的生物学功能,并综述了Nramp家族基因在模式植物拟南芥、水稻等作物以及重金属超富集植物中参与金属离子吸收和分配的作用机制(图1),为深入阐明植物对金属离子吸收的分子调控机理、利用现代生物技术培育对有毒重金属高抗和低积累的作物品种提供理论依据和技术支持。

收稿 2019-09-16 修定 2020-01-29

资助 国家自然科学基金(31872105、31972221和31801862),浙江省自然科学基金(Y19C150016)、浙江农林大学大学生科研训练项目(113-2013200128)和2019年国家级大学生创新创业训练计划项目(201910341005)。

* 共同通讯作者: 王华森(whsych66@163.com)、冯圣军(20170039@zafu.edu.cn)。

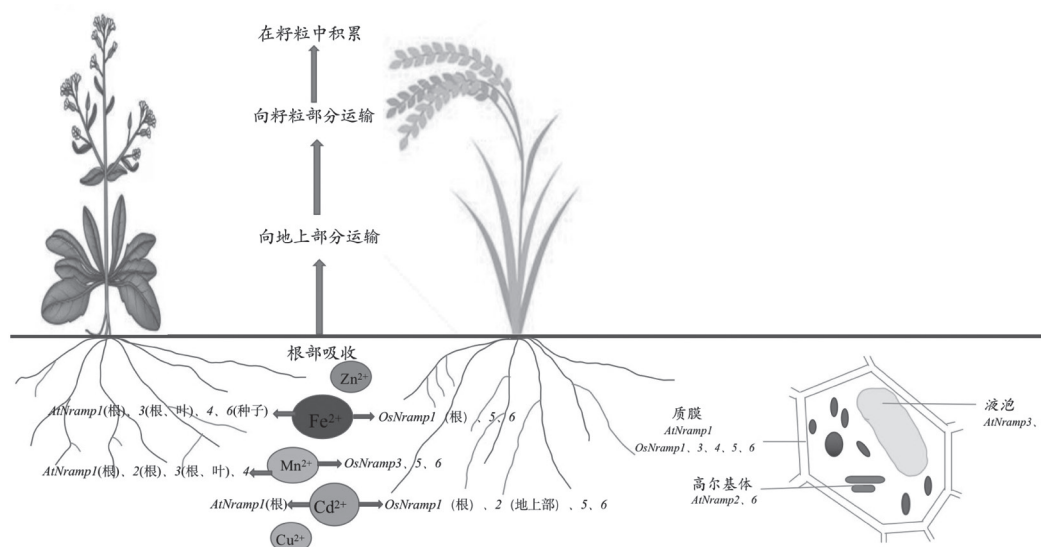


图1 植物Nramp基因作用机制模式图

Fig.1 Model of the functional mechanism of the Nramp gene in plants

1 Nramp蛋白的发现与鉴定

生物体细胞在行使各种基本生理过程中都需要金属离子作为蛋白质的辅助因子(Bozzi等2016)。而Nramp作为一类重要的膜转运蛋白,在植物重金属吸收和解毒过程中发挥着重要作用(Cellier等1994;曹玉巧等2018)。Nramp基因家族在细菌、酵母、昆虫、动物和高等植物中都有分布且高度保守。Vidal等(1993)在哺乳动物小鼠(*Mus musculus*)的巨噬细胞中首次发现并克隆到一个完整的跨膜蛋白基因,并将其命名为Nramp1,该基因编码的蛋白可以调控二价阳离子锰、铁的吸收,并在发生吞噬作用时聚集到巨噬细胞的细胞膜上调节细菌吞噬作用(Malo等1994)。随后,Cellie等(1994)通过脾脏cDNA文库筛选分离到具有相似功能的人类Nramp1基因。Gruenheid等(1995)用交叉杂交分离的方法在小鼠的第15号染色体上克隆到Nramp基因家族的第二个成员,并将其命名为Nramp2。随后的研究发现,小鼠Nramp2缺失性突变会造成小鼠体内铁吸收缺陷,从而导致小鼠红细胞性贫血,小鼠的这一表型特征表明Nramp2作为二价金属离子的转运蛋白可以吸收转运铁离子(Canonne-Hergaux等2000)。此外,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中存在至少两个Nramp同源基因:SMF1和SMF2

(Cellier等1995),同时在麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)中也发现与动物Nramp基因高度同源的蛋白(戚金亮等2003)。

Mäser等(2001)创建了Plantst (<http://plantst.sdsc.edu>)数据库,其中包括植物中阳离子转运蛋白及其染色体定位分析,通过对模式植物拟南芥的完整基因组序列的分析,发现了6个AtNramp基因,即AtNramp1~6,并成功克隆了拟南芥Nramp基因家族成员的cDNA序列。ESTs序列探针筛选研究表明,Nramp家族基因还存在于其他双子叶植物(陆地棉)和单子叶植物(水稻和玉米)中(Mäser等2001)。在水稻中,Belouchi (1995)用D15268的EST序列为探针筛选水稻的黄化茎cDNA库并克隆了水稻的第一个Nramp基因——OsNramp1,随后又克隆了水稻中另外两个Nramp成员——OsNramp2和OsNramp3,迄今为止,在水稻中已经确定了8个Nramp基因家族成员。总而言之,Nramp蛋白是一类膜转运蛋白家族,这些Nramp家族蛋白功能涉及吸收、转运、胞内运输和解毒过量金属。虽然在过去几十年,许多金属转运蛋白基因已经在高等植物中被发现,但大多数研究仍仅局限于拟南芥和水稻等模式植物,其他植物中该类金属转运蛋白家族仍待进一步研究。

2 Nramp蛋白保守的结构与功能域

Nramp蛋白属于一种具有典型膜整合蛋白特征多肽分子的古老膜整合转运蛋白家族, 其序列在各物种间高度保守且具有类似的二级结构。哺乳动物Nramp基因的氨基酸序列与酵母、水稻和果蝇Nramp基因的氨基酸序列一致性分别为28%、40%和55%, 氨基酸序列相似性分别为46%、58%和73% (Cellier等1995)。研究表明, Nramp蛋白结构域在进化上高度保守且均具有离子转运体和离子通道的结构特征, 其TMD (transmembrane domain) 1~8高度同源, TMD 8和9共有转运残基, 这些都说明此保守结构域是Nramp基因家族的关键功能结构且可以在细胞膜水平与金属离子及一系列小分子结合并参与转运(Bairoch等1993)。Nramp基因家族保守的氨基酸序列和特有的结构是Nramp家族功能分化的候选位点(Courville等2004)。近年来, 很多科学家以大肠杆菌中Nramp同源基因MntH (基因编码推定的膜蛋白, 以前称yfeP) 为研究模型, 通过定点突变的方法对Nramp蛋白家族的结构与功能关系进行了研究。Courville等(2004)通过突变实验发现MntH的TMD1、6和11中的四个Nramp基因特异性氨基酸残基在金属吸收和金属依赖性H⁺转运中具有重要作用。Nevo和Nelson (2006)研究发现, MntH的TMD4和TMD6中含有多个高度保守的氨基酸残基, 它们可能对转运蛋白的活性非常重要。此外, MntH的保守肽基序Asp-Pro-Gly (TMD1)和Met-Pro-His (TMD6)形成的反平行“TM螺旋/延伸肽”边界也是其转运功能的关键结构, 而TMD6中鉴定到的两个高度保守的组氨酸残基也被认为在转运中具有重要作用(Haemig等2010)。Mani和Sankaranarayanan (2018)对水稻Nramp基因家族中的7个基因进行了研究, 发现这7个基因编码分子量在55.8~59.7 kDa之间, 包含具有500~588个氨基酸残基的蛋白质, 均含有一个由10~12个跨膜区TMD结构组成的保守Nramp结构域, 1~2个糖基化胞质外环和1个离子转运结构域, 且在保守Nramp结构域中发现了与大肠杆菌中同源的功能性氨基酸残基(Xue等2008)。这些研究为揭示该家族基因结构与功能的关系提供了有利的依据。

3 Nramp蛋白家族基因在植物中的功能研究

近年来, 植物中Nramp基因对矿质元素的吸收和转运功能研究已成为科学家们研究的热点(Zha等2016; Tang等2017; Meng等2017; Mani和Sankaranarayanan等2018)。前人研究表明, 植物Nramp基因家族属于自然进化中保守的金属转运家族, 有广泛的底物特异性, 且具有铁、锰、镉等多种金属的转运活性, 可通过转运金属离子来维持植物体内金属离子的平衡。此外, 该基因家族在光合作用、蛋白质活性维持、代谢和环境应激反应等方面也起到重要的调控作用(Ihnatowicz等2014)。

3.1 拟南芥中Nramp家族基因的研究

Mäser等(2001)对拟南芥的6个Nramp基因(*AtNramp1*~*6*)进行克隆后分析发现, 其中, *AtNramp1*、2和6位于染色体I上, *AtNramp3*位于染色体II上, *AtNramp5*位于染色体IV上, *AtNramp4*位于染色体V上。基于系统进化分析, 6个拟南芥Nramp基因被分为两个亚家族, 其中*AtNramp1*和*AtNramp6*为第一亚家族, 而*AtNramp2*~*5*属于第二亚家族(Mäser等2001)。

*AtNramp1*定位于质膜上, 且在根中优先表达(表1和图1) (Thomine等2000; Cailliatte等2010), 根系缺铁状态下会诱导*AtNramp1*表达, 而*AtNramp1*超表达株系对铁有较高耐受性(表1和图1) (Curie等2000), 另一项研究表明, 铁缺乏处理条件下, 拟南芥铁调节转运蛋白*AtIRT1* (IRON-REGULATED TRANSPORTER1)的表达量由最初的上升转为下降, 然而, *AtNramp1*的表达则持续增强(Thomine等2000)。以上表明*AtIRT1*是在低铁处理的早期阶段被诱导表达, 而*AtNRAMP1*在后期的表达中取代了离子转运过程中的铁转运蛋白(*AtIRT1*)。这表明*AtNramp1*可以取代*AtIRT1*的功能, 由此推断*AtNramp1*可以高效调控植物体内铁的吸收转运(表1和图1) (Castaings等2016; Zha等2016)。拟南芥低锰处理的实验表明, *AtNramp1*缺失突变体与对照相比, 在低锰条件下生长减缓且锰积累量降低(Cailliatte等2010), 可见*AtNramp1*是低锰条件下锰吸收的关键转运蛋白, 因此*AtNramp1*具有吸收转运锰和铁的双重功能。

表1 植物Nramp基因
Table 1 *Nramp* genes in plants

物种	目的基因	金属转运功能	组织表达与定位	参考文献
拟南芥	<i>AtNramp1</i>	锰、铁、镉	根; 质膜	Cailliat等2010; Castaing等2016
	<i>AtNramp2</i>	锰	根; 反式高尔基体	Gao等2017
	<i>AtNramp3</i>	锰、铁	叶、根; 液泡	Lanquar等2010
	<i>AtNramp4</i>	锰、铁	液泡	Lanquar等2010
	<i>AtNramp6</i>	铁	种子; 高尔基体	Li等2019
水稻	<i>OsNramp1</i>	镉、铁	根; 质膜	Thomine等2000
	<i>OsNramp2</i>	镉	地上部; 原生质体	Cellier M等1995
	<i>OsNramp3</i>	锰	质膜/液泡	Yamaji等2013
	<i>OsNramp4</i>	铝	质膜	Mani等2018
	<i>OsNramp5</i>	锰、镉、铁	质膜	Ishimaru等2012
	<i>OsNramp6</i>	镉、锰、铁	质膜	Cailliatte等2009
蒺藜苜蓿	<i>MtNramp1</i>	铁	根瘤结节; 质膜	Tejada-Jiménez等2015
番茄	<i>LeNramp1</i>	铁	质膜、囊泡膜	Bereczky等2003
	<i>LeNramp3</i>	—	质膜	Bereczky等2003
小金海棠	<i>MxNramp1</i>	铁	质膜	Zha等2015
	<i>MxNramp3</i>	—	液泡	Zha等2015
烟草	<i>NtNramp5</i>	锰、镉	质膜	Tang等2017
大麦	<i>HvNramp5</i>	锰、镉	质膜	Wu等2016
花生	<i>AhNramp1</i>	铁	质膜	Xiong等2012
遏蓝菜	<i>NcNramp1</i>	镉	质膜	Milner等2014
	<i>NcNramp3</i>	镉、铁、锰	—	Oomen等2009
	<i>NcNramp4</i>	镉、铁、锰、锌	—	Oomen等2009
丹东蒲公英	<i>TaNramp</i>	镉	—	刘晓敏2018
杨树	<i>PaNramp1</i>	镉、锰、铁	—	Romè等2016; Liu等2019
大豆	<i>GmNramp7</i>	铁	质膜	Qin等2017

*AtNramp2*对植物生长至关重要, 它主要定位于高尔基体(Alejandro等2017), GUS染色实验证明*AtNramp2*主要在拟南芥的根表皮和根尖区域的内胚层细胞表达, 尤其靠近根尖(表1和图1) (Alejandro等2017; Gao等2018)。与*AtNramp1*功能相似, *AtNramp2*也具有锰转运活性, 在酵母中可介导锰进入胞质, 挽救缺锰表型(Alejandro等2017)。 *AtNramp2*过量表达可以促进根和植株地上部的生长, 并提高根和植株地上部锰的积累。而在缺锰条件下, *AtNramp2*参与锰从高尔基体向胞质溶胶中转运以进行锰的再利用从而支持根生长。 *AtNramp2*缺失突变不会引起植株铁或锌缺乏条件下生长受损, 但在缺锰条件下, 会表现为光系统II活性降低和氧化应激反应增强, 但锰的总含量保持不变。同时发现, 在亚细胞水平上, 液泡和叶绿体中锰含量有所下降。虽然*AtNramp2*功能的潜在作用机制

尚不清楚, 但可以明确的是*AtNramp2*是一种反式高尔基体网络定位的锰转运蛋白, 是缺锰条件下拟南芥根系生长所必需的(表1和图1) (Gao等2018)。

与其他*Nramp*基因所不同的是, *AtNramp3*和*AtNramp4*蛋白均定位于细胞的液泡膜上(Segond等2009), 在叶和根中都有表达。它们主要负责营养元素缺乏时锰或铁的再利用。 *AtNramp3*和*AtNramp4*在铁缺乏时被诱导表达(表1和图1) (Mary等2015)并在种子萌发和缺锰条件下在植株光合作用时维持所需锰离子的平衡(Lanquar等2010)。同时还调节锰和铁等金属离子从液泡到细胞质的转运, 影响其在叶和根中的含量。而除了液泡之外, Lanquar等(2010)研究发现高尔基体也是用于锰储存和再利用的重要隔室, 当锰过量时会被*AtNramp3*和*AtNramp4*将多余的锰离子隔离到液泡和高尔基球囊中。

先前的研究表明, *AtNramp6*定位于酵母的细胞内膜, 当*AtNramp6*在拟南芥中过表达时会导致植株对镉的超敏反应, *AtNramp6*缺失的拟南芥比野生型拟南芥更耐镉, 因此文章猜测*AtNramp6*参与细胞中镉的分布(表1和图1) (Cailliatte等2009)。然而, 其在拟南芥中的具体定位及其在其他金属离子运输中的潜在作用尚不清楚。直到最近, Li等(2019)证明*AtNramp6*定位于高尔基体, 其在维持细胞内铁离子平衡发挥重要作用, 并且在缺铁条件下影响拟南芥侧根的生长。

综上, 现有的文献中除了*AtNramp5*还未有描述, 拟南芥中其他*Nramp*成员均参与了金属离子锰、铁和镉的吸收转运(Lanquar等2010; Ihnato-wicz等2014)。

3.2 水稻中*Nramp*家族基因的研究

迄今为止, 在水稻中已经鉴定了8个*Nramp*成员, 在这些成员中*OsNramp1*、3、5、6和7对锌、锰、镉和铁等金属有吸收和转运功能(Xia等2010; Takahashi等2011a; Yamaji等2013; Ishimaru等2012; Sasaki等2012)。而*OsNramp4*作为该家族中第一个被鉴定为三价铝离子转运体的转运体, 与其他*Nramp*成员的序列相似度相对较低且不具有吸收和转运锌、锰、镉和铁等金属的功能(表1和图1) (Xia等2010; Mani和Sankaranarayanan等2018)。

*OsNramp1*定位于质膜, 负责镉和铁等金属离子的吸收和转运(表1和图1) (Curie等2000; Takahashi等2011a), *OsNramp1*在缺铁时被诱导, 且在植株叶片、根、茎、花药、子房、胚乳和雌蕊中均有表达, 其中叶片和茎中的表达在生殖生长阶段较高, 根部表达主要在营养生长阶段较高(表1和图1) (Takahashi等2011a)。Curie等(2000)通过将*OsNramp1*质粒转化铁缺失突变体*fet3fet4*菌株进行酵母水平的功能互补实验, 发现*OsNramp1*能够改善*fet3fet4*生长, 由此证明*OsNramp1*具有铁吸收功能。而水稻中*OsNramp1*的过表达可增加镉在叶中的累积, 而根中的高表达能增加镉在茎中的累积, 验证了其参与植物中镉的吸收和运输。*OsNramp1*的表达虽然不具有细胞特异性, 但是水稻地下部分*OsNramp1*的表达要明显高于地上部分。过表达*OsNramp1*水稻植株地上部分积累的镉与野生型相

比更多, 而地下部分要低于野生型。这个结果暗示了*OsNramp1*可能参与了镉在根中的装载, 从而影响镉从地下部分向地上部分的运输。但是截至目前都没有直接的证据表明*OsNramp1*介导镉在水稻根的木质部的装载, 来影响镉向地上部分的运输(表1和图1) (Takahashi等2011b)。研究发现在水稻野生型籼稻(*indica*)中*OsNramp1*的表达丰度非常高, 在一个籼稻的栽培品种‘*Habataki*’中研究发现: 其地下向地上部分转运镉的能力明显强于粳稻栽培品种‘*Sasanishiki*’, 通过QTL (quantitative trait locus)分析这两个栽培品种发现, ‘*Habataki*’地上部分高镉的性状可以定位在水稻7号染色体的短臂上, 并且这个QTL包含了*OsNramp1*基因位点。对‘*Habataki*’和‘*Sasanishiki*’中*OsNramp1*编码区域氨基酸序列进行分析发现它们并没有存在差异位点, 因此关于何种原因导致这两个品种间*OsNramp1*表达的差异, 作者并没有给出直接证据, 他们推测可能在*OsNramp1*启动子区域的插入或者缺失引起了品种间的差异(Takahashi等2011a)。

*OsNramp3*定位于质膜, 在维管束中有特异表达, 是一种响应环境中锰含量变化的锰转运调节器, 其在韧皮部细胞中特异表达。研究表明, 当*OsNramp3*缺失时, 水稻植株对锰缺乏表现出较高的敏感性, 低锰条件下生长的*OsNramp3*基因敲除系的幼叶和根尖会出现严重坏死, 而高锰供应可以回复这一表型(表1和图1) (杨猛2014)。但基因敲除系的坏死幼叶的锰含量与野生型相似, 因此认为*OsNramp3*是一种定位于维管束的锰内流转运体, 参与锰的分布。*OsNramp3*的表达水平随叶龄的增加而增加, 能促进锰离子从幼年叶到老年叶的迁移, 由此得出*OsNramp3*参与锰在地上部分的分配且对叶片中锰的分布具有重要作用(图1) (杨猛2014)。进一步的研究发现, 在低锰浓度下, *OsNramp3*优先向幼叶和圆锥花序输送锰, 然而在锰浓度较高的情况下, *OsNramp3*蛋白会在几个小时内迅速降解, 导致锰在衰老组织中的分布, 这说明*OsNramp3*介导水稻适应环境中锰的变化(Yamaji等2013)。

*OsNramp5*定位于质膜, 是锰和镉的主效转运蛋白(Yang等2018), 同时负责这些离子从根部向地

上部的运输(表1和图1) (Ishimaru等2012; Sasaki等2012; 杨猛等2014)。OsNramp5在水稻根的表皮、外皮层、皮层的外层以及所有木质部的附近组织均有表达(表1) (Ishimaru等2012), 在水稻根和穗中高度表达, 在茎中表达适中, 而在叶片和叶鞘表达较低, 且表达随着叶龄逐步降低(杨猛2014)。由于osnramp5突变体(Ishikawa等2012)和RNAi干扰材料(Sasaki等2012)极大降低了水稻根部对镉的吸收, 因此相对于OsNramp1而言OsNramp5充当了一个主要的镉吸收转运体, 同时OsNramp5有助于锰、镉、铁的运输且对水稻的生长发育有重要作用(Ishimaru等2012)。其不仅影响根系对锰、镉、铁的吸收, 还影响它们在根部和叶片的分布, 以及从根部向茎部的运输, 对维持这些离子的动态平衡有重要作用(杨猛2014)。最近, 黄朝锋课题组通过CRISPR/Cas9技术在两个粳稻品种(‘NanJing 46’、‘HuaiDao5’)中获得了三个独立的osnramp5敲除突变体, 进一步研究发现三个突变体所有组织中, 镉的积累均显著减少, 但是低锰条件下, osnramp5突变体的植株生长和叶绿素含量均显著降低, 而高锰生长条件可以回复突变体中的这种缺陷表型。然而在稻田实验中, 尽管osnramp5突变体中的茎叶和谷粒中的镉含量大大降低, 但突变体中一些农艺性状(包括株高、结实率和每穗粒数)却受到影响, 最终导致水稻产量降低了约20% (Yang等2019)。因此今后的研究还需要进一步挖掘OsNramp5对不同金属底物特异性结合的机制, 在镉低积累育种中避免OsNramp5缺失对重要农艺性状产生影响。

OsNramp6定位于质膜(Peris-Peris等2017), 在幼叶中高度表达, (表1和图1)在酵母实验中被证明具有镉转运功能(杨猛2014), 随后, Peris-Peris等(2017)利用OsNramp6异源转化酵母的实验表明, 在锰缺乏条件下, OsNramp6能够回复smf1和smf2酵母突变体生长缺陷的表型, 并且在缺铁条件下, 突变体相较于野生型菌株, 吸收了更多的铁。因此, 酵母互补研究表明, OsNramp6也参与了铁和锰的运输, 同时他们还发现OsNramp6负调控水稻免疫, 有助于提高水稻的抗病性(Peris-Peris等2017)。

综上, OsNramp1作为铁转运蛋白, 能够同时

参与镉向细胞内的运输(Takahashi等2011), OsNramp3是植物中组织锰分布的调控因子(Yamaji等2013), OsNramp5则被确定为根部从土壤中吸收锰和镉的主要转运蛋白(图1) (Ishikawa等2012; Sasaki等2012)。但到目前为止, 人们对OsNramp2、OsNramp7的功能知之甚少, 仅有文献报道OsNramp2主要在地上部分表达(Cellier等1995)。

3.3 其他作物中Nramp家族基因的研究

Qin等(2017)通过生物信息学分析从大豆中鉴定出了13个GmNramp基因, 这13种GmNramp蛋白通过进化树分析同样被分成两个不同的亚家族。GmNramp基因受氮(N)、磷(P)、钾(K)和硫(S)缺乏以及铁、铜、镉和锰的毒性差异所调节, 且受到大豆叶或根中铁缺乏的影响, 这表明GmNramp基因参与铁的吸收转运。值得一提的是, 研究发现GmNramp不仅作用于金属离子转运蛋白(例如锌/铁转运蛋白), 而且还有几种在根瘤菌蛋白的相互作用中发挥功能。特别是定位于质膜的GmNramp7在根和结节中高度表达, 且在缺铁时显著上调(表1) (Qin等2017), 这个结果暗示了GmNramp7可能在共生固氮期间的铁摄取过程中发挥作用。在豆科模式作物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中, 发现定位于质膜的MtNramp1在根和根瘤结节中高度表达。MtNramp1功能缺失突变体在共生条件下生长减弱, 但是在施氮肥的条件下则与野生型无明显表型差异, 进一步的研究表明该转运蛋白参与非原质体的铁吸收, 进而影响豆科植物的固氮作用(Tejada-Jiménez等2015) (表1)。

在番茄(*Lycopersicon esculentum*)和小金海棠(*Malus xiaojinensis*)中对Nramp基因的研究表明, 番茄LeNramp1和小金海棠MxNramp1均定位于质膜, 番茄LeNramp3和小金海棠MxNramp3则定位于液泡膜(表1) (Bereczky等2003; Zha等2016)。在低铁胁迫下, 番茄LeNramp1可以通过吞噬作用将二价铁转运到相应的细胞器(Bereczky等2003)。而在酵母实验中, 小金海棠MxNramp1和MxNramp3两种蛋白能转运镉而不能转运其他金属离子(表1) (Zha等2015)。烟草(*Nicotiana tabacum*)中的NtNramp5和大麦中的HvNramp5均定位于质膜, 且均具有锰和镉的转运活性(表1) (Tang等2017; Wu等2016)。

与拟南芥和水稻中的*Nramp1*基因相似, 铁缺乏可以显著诱导花生(*Arachis hypogaea*) *AhNramp1*在根和叶中的表达, 并且在烟草中异源表达*AhNramp1*导致幼叶中的铁积累和对铁缺乏的耐受性(表1)(Xiong等2012)。Chen等(2019)研究了杨树缺铁过程中的生理生化和转录组变化, 并阐明了杨树后期缺铁的反应机制。发现缺铁条件能诱导杨树*Nramp1*的表达, 特别是后期促进根系对铁的吸收过程。表明杨树*Nramp1*可能是杨树缺铁后期主要的铁转运体, 而不是更为人熟知的IRT1, 这个结果与*AtNramp1*在拟南芥缺铁后期的功能非常相似(Zha等2016)。对这些非模式植物中*Nramp*基因家族的研究表明, *Nramp*基因家族对重金属具有吸收转运的功能且十分广泛。

3.4 超富集植物中*Nramp*家族基因的研究

植物可以通过吸收、挥发、根滤、降解、积累等作用净化土壤中的污染物, 使土壤重金属含量降低到可接受的安全水平, 进而达到净化环境的目的, 因而植物修复是一种很有潜力且正在发展的预防环境污染的绿色技术(Ghosh等2005)。而这些都得益于超富集植物的发现, 总结来说超富集植物有三个基本特征: 第一, 植物所吸收的重金属大部分被分布在地上部分; 第二, 植物体内的某一元素浓度高于一定的临界值, 是普通植物在同一生长条件下的100倍; 第三, 在重金属土壤污染的情况下可以正常生长, 不会出现毒害现象(沈振国等1998)。目前, 被发现的重金属超积累植物约有700种, 且最终可能不会超过1 000~1 500种(Reeves等2018), 广泛分布于植物界的45个科, 其中以十字花科植物居多(Jale等2018)。已有的超富集植物研究发现, *Nramp*基因在重金属富集过程发挥重要作用, 以锌镉超积累植物天蓝遏蓝菜(*Thlaspi Cereulescens*)的*TcNramp1*基因为例, *TcNramp1*是定位于质膜的转运蛋白, 参与了细胞水平镉吸收的过程以及地下部向地上部运输的过程(表1)(Milner等2014)。而在酵母中的实验发现*TcNramp3*和*TcNramp4*能够转运镉、铁和锰, 同时*TcNramp4*还参与了锌的吸收过程(Ronald等2009)。在丹东蒲公英(*Taraxacum antungense*)中, 刘晓敏(2018)成功构建*PR1101-TaNramp*过表达载体, 通过农杆菌介导方

式转入到丹东蒲公英中, 获得2株转基因植株。并对其进行了0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镉处理, 与对照丹东蒲公英进行比较, 发现转基因植株地上部分吸附重金属含量是对照的2~3倍, 这也验证*Nramp*基因在丹东蒲公英中对镉吸附具有直接作用(表1)。此外, 由于杨树的快速生长和高生物量, 被建议作为植物修复应用的候选植物, Romè等(2016)对杨树各种栽培品种进行了金属耐受试验, 在杨树中鉴定了*PaNramp1*, 并测定了其表达量, 发现*PaNramp1*的表达增加, 不仅可以增强植物对镉的耐受性, 还可以增强对锰和其他必需的二价阳离子的吸收能力, 这说明*PaNramp1*具有对镉和锰的转运功能(表1), 这使它们成为土壤重金属修复的有效植物。

4 展望

现国内外学者已围绕植物对金属吸收和积累的生物学机制展开了研究, 截至目前, 已有的研究表明, 当植物受到金属离子胁迫时会通过相应的金属转运蛋白表达水平的变化来调节金属离子的吸收转运或隔离外排, 以此来平衡植物中金属的稳态, 避免植物受到金属毒害(图1)。这意味着植物中有很多转运蛋白受不同金属离子的诱导表达, 目前已鉴定出多种金属转运相关蛋白, 例如*Nramp*、重金属转运ATP酶(heavy metal transporting ATPase, HMA)、锌铁调控蛋白(ZRT; IRT-like protein, ZIP)、ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABC)(王晓珠等2017)等基因家族, 并且建立了一定的吸收和转运的理论模型。但只有少数的金属转运蛋白及其功能被完整报道, 且转运的关键位置及过程还不甚清楚。而*Nramp*基因家族仅在拟南芥和水稻中有报道, 且依然没有将上述两个物种所有的*Nramp*基因的功能进行挖掘, 特别是对可食用部分金属离子分布的报道还未曾涉及, 而在其他物种中有关*Nramp*基因研究则较薄弱。关于物种特异性的功能, 例如豆科固氮这种模式, 是不是其他物种特异性的生物学功能也受到*Nramp*家族基因影响则需要今后更多的研究工作去揭晓。

现有的研究并不能全面概括或解释植物通过这些金属转运蛋白平衡金属离子的生理过程, 转运的关键过程中还有多种转运蛋白的参与及协作

也尚未知,为此探索和阐明这些植物对重金属的吸收、积累和运输机制,发掘具有调节功能的基因资源是一个非常重要的步骤和必要的前提。随着高通量测序技术的不断更新以及生物信息学方法的进步,植物中越来越多的金属转运体/解毒蛋白被相继挖掘出来(Grant等2008; Liu等2009),以水稻*OsNramp5*基因为例,因*OsNramp5*为水稻主效镉吸收转运体,我们可培育*OsNramp5*表达量低的低积累作物,使可食部位中重金属含量较低,而以种子(果实)作为食用部位的作物,则可以筛选 *Nramp3/4* 高表达的品种,培育种子(果实)高富集有益金属铁和锰,为食品营养和健康提供植物源材料。另一方面,高积累植物则会通过*Nramp*基因高富集毒害重金属,例如*SaNramp6*在改善土壤镉积累方面发挥重要作用,可能对转基因植物的植物修复生物技术发展有益。因此对*Nramp*基因家族进行更系统更全面的挖掘,深入分析其生物学功能将是下一步研究的重点。

参考文献(References)

- Alejandro S, Cailliatte R, Alcon C, et al (2017). Intracellular distribution of manganese by the Trans-Golgi network transporter NRAMP2 is critical for photosynthesis and cellular redox homeostasis. *Plant Cell*, 29: 3068–3084
- Bairoch A (1993). A possible mechanism for metal-ion induced DNA-protein dissociation in a family of prokaryotic transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res*, 21 (10): 2515
- Belouchi A, Cellier M, Kwan T, et al (1995). The macrophage-specific membrane protein *Nramp* controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Mol Biol*, 29 (6): 1181–1196
- Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, et al (2003). Differential regulation of *nramp* and *irt* metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *J Biol Chem*, 278 (27): 24697–24704
- Bozzi AT, Bane LB, Weihofen WA, et al (2016). Conserved methionine dictates substrate preference in Nramp-family divalent metal transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (37): 10310–10315
- Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, et al (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem J*, 422 (2): 217–228
- Cailliatte R, Schikora A, Briat J, et al (2010). High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *Plant Cell*, (3): 904–917
- Cang DW, Cang DZ (2018). Research status of soil pollution and control. *Tech Econ Mark*, (2): 172–173 (in Chinese with Chinese abstract) [仓定稳, 仓定仲(2018). 土壤污染与治理研究现状. *科技经济市场*, (2): 172–173]
- Canonne-Hergaux F, Fleming MD, Levy JE, et al (2000). The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia *mk* mice but is not properly targeted to the intestinal brush border. *Blood*, 96 (12): 3964–3970
- Cao YQ, Nie QK, Gao Y, et al (2018). The studies on cadmium and its chelate related transporters in plants. *Crops*, (3): 15–24 (in Chinese with English abstract) [曹玉巧, 聂庆凯, 高云等 (2018). 植物中镉及其螯合物相关转运蛋白研究进展. *作物杂志*, (3): 15–24]
- Castaings L, Caquot A, Loubet, et al (2016). The high-affinity metal transporters NRAMP1 and IRT1 team up to take up iron under sufficient metal provision. *Sci Rep*, 6: 37222
- Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al (1994). Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med*, 180 (5): 1741–1752
- Chao DY, Ieng B (2017). Plant nutrient efficiency and heavy metal pollution. *J Plant Physiol*, (8): 21–24 (in Chinese with English abstract) [晁代印, 冷冰(2017). 植物养分高效与重金属污染. *植物生理学报*, (8): 21–24]
- Chen HM, Wang YM, Yang HL, et al (2019). NRAMP1 promotes iron uptake at the late stage of iron deficiency in poplars. *Tree Physiol*, 39 (7): 1235–1250
- Chen S, Han X, Fang J, et al (2017). *Sedum alfredii* *SaNramp6* metal transporter contributes to cadmium accumulation in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 7 (1): 13318
- Courville P, Chaloupka R, Veyrier F, et al (2004). Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *J Biol Chem*, 279 (5): 3318–3326
- Curie C, Alonso JM, Jean ML, et al (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J*, 347 (3): 749–755
- Gao HL, Xie W, Yang C, et al (2018). NRAMP2, a Trans-Golgi network-localized manganese transporter, is required for *Arabidopsis* root growth under manganese deficiency. *New Phytol*, 217 (1): 179–193
- Ghosh M, Singh SP (2005). A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environ Pollut*, 133 (2): 365–371
- Grant CA, Clarke JM, Duguid S, et al (2008). Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accu-

- mulation. *Sci Total Environ*, 390 (2–3): 301–310
- Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, et al (1995). Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics*, 25 (2): 514–525
- Haemig HAH, Brooker RJ (2004). Importance of conserved acidic residues in mntH, the *Nramp* homolog of *Escherichia coli*. *J Membr Biol*, 201 (2): 97–107
- Ihnatowicz A, Siwinska J, Meharg AA, et al (2014). Conserved histidine of metal transporter AtNRAMP1 is crucial for optimal plant growth under manganese deficiency at chilling temperatures. *New Phytol*, 202 (4): 1173–1183
- Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, et al (2012). *OsNRAMP5*, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice. *Plant Signal Behav*, 7 (7): 763–766
- Jale C, Ahmet A, Zeliha Z (2018). Metal hyperaccumulating Brassicaceae from the ultramafic area of Yahyalı in Kayseri province, Turkey. *Ecol Res*, 33: 705–713
- Lanquar V, Ramos MS, Lelièvre F, et al (2010). Export of vacuolar manganese by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiol*, 152 (4): 1986–1999
- Li JY, Wang YR, Zheng L, et al (2019). The intracellular transporter AtNRAMP6 is involved in Fe homeostasis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, doi: 10.3389/fpls.2019.01124
- Liu T, Liu S, Guan H, et al (2009). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ Exp Bot*, 67 (2): 377–386
- Liu XM (2018). Cloning and functional identification of *NRAMP* in *Taraxacum antungense* Kitag. (dissertation). Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese with English abstract) [刘晓敏 (2018). 丹东蒲公英 NRAMP 基因克隆及功能鉴定. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Malo D, Vogan K, Vidal SM, et al (1994). Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics*, 23 (1): 51–61
- Mani A, Sankaranarayanan K (2018). In silico analysis of natural resistance associated macrophage protein (NRAMP) family of transporters in rice. *Protein J*, 37 (3): 237–247
- Mary V, Schnell RM, Gillet C, et al (2015). Bypassing iron storage in endodermal vacuoles rescues the iron mobilization defect in the *natural resistance associated-macrophage protein3natural resistance associated-macrophage protein4* double mutant. *Plant Physiol*, 169 (1): 748–759
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, et al (2002). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 4 (126): 1646–1667
- Meng JG, Zhang XD, Tan SK, et al (2017). Genome-wide identification of Cd responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of *NRAMP1* mediated by miR167 in *Brassica napus*. *Biomaterials*, 30 (6): 917–931
- Milner MJ, Mitani-Ueno N, Yamaji N, et al (2014). Root and shoot transcriptome analysis of two ecotypes of *Nocca caerulea* uncovers the role of *NcNramp1* in Cd hyperaccumulation. *Plant J*, 78 (3): 398–410
- Nevo Y, Nelson N (2006). The NRAMP family of metal ion transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1763 (7): 609–620
- Peris-Peris C, Serra-Cardona A, Sánchez-Sanuy F, et al (2017). Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice. *Mol Plant Microbe Interact*. 30 (5): 385–398
- Pottier M, Oomen R, Picco C, et al (2015). Identification of mutations allowing natural resistance associated macrophage proteins (NRAMP) to discriminate against cadmium. *Plant J*, 83 (4): 625–637
- Qi JL, Han ZH, Yin LP (2003). *Nramp* gene families and their role. *Acta Microbiol Sin*, 43 (2): 293–297 (in Chinese with English abstract) [戚金亮, 韩振海, 印莉萍 (2003). *Nramp* 基因家族及其功能. 微生物学报, 43 (2): 293–297]
- Qin L, Han P, Chen L, et al (2017). Genome-Wide identification and expression analysis of NRAMP family genes in soybean (*Glycine Max* L.). *Front Plant Sci*, 8: 1436
- Reeves RD, Baker AJM, Jaffré T, et al (2018). A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloids trace elements. *New Phytol*, 218 (2): 407–411
- Romè C, Huang XY, Danku J, et al (2016). Expression of specific genes involved in Cd uptake, translocation, vacuolar compartmentalisation and recycling in *Populus alba* Villafraña clone. *J Plant Physiol*, 202: 83–91
- Ronald, J, F, et al (2009). Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol*, 181 (3): 637–50
- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, et al (2012). *Nramp5* is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell*, 24 (5): 2155–2167
- Segond D, Dellagi A, Lanquar V, et al (2009). *NRAMP* genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J*, 58 (2): 195–207
- Shen ZG, Liu YL (1998). Progress in the study on the plants that hyperaccumulate heavy metal. *J Plant Physiol*, 34 (2): 133–139 (in Chinese with English abstract) [沈振国, 刘友良 (1998). 重金属超量积累植物研究进展. 植物生理学报, 34 (2): 133–139]
- Sun YD, Chao JG, Gu W, et al (2018). Effects of cadmium stress on the physiological and biochemical characteristics of *Rhizoma atticus*. *Plant Physiol J*, 54 (12): 116–123 (in Chinese with English abstract) [孙永娣, 巢建国, 谷巍等 (2018). 镉胁迫对茅苍术生理生化特征的影响. 植物生理学报, 54 (12): 116–123]
- Takahashi R, Ishimaru Y, Nakanishi H, et al (2011a). Role of

- the iron transporter *OsNRAMP1* in cadmium uptake and accumulation in rice. *Plant Signal Behav*, 6 (11): 1813–1816
- Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, et al (2011b). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J Exp Bot*, 62 (14): 4843–4850
- Tan JJ, Zhang H, Liu Y (2016). Research progress on the response mechanism of plants under heavy metal stress. *Biotechnol World*, (4): 14–15 (in Chinese with English abstract) [谭珺隽, 张昊, 刘阳(2016) 植物在重金属胁迫下响应机制的研究进展. *生物技术世界*, (4): 14–15]
- Tang Z, Cai H, Li J, et al (2017). Allelic variation of *NtNramp5* associated with cultivar variation in cadmium accumulation in tobacco. *Plant Cell Physiol*, 58 (9): 1583–1593
- Tejada-Jiménez M, Castro-Rodríguez R, Kry-voruchko I, et al (2015). *Medicago truncatula* natural resistance-associated macrophage protein1 is required for iron uptake by rhizobia-infected nodule cells. *Plant Physiol*, 168 (1): 258–272
- Thomine S, Wang R, Ward JM, et al (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (9): 4991–4996
- Vatansever R, Filiz E, Ozyigit II (2016). In silico analysis of Mn transporters (NRAMP1) in various plant species. *Mol Biol Rep*, 43 (3): 151–163
- Vidal S, Gros P, Skamene E (1995). Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies *Nramp1* as the *Bcg/Ity/Lsh* locus. *J Leukoc Biol*, 58 (4): 382–390
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, et al (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell*, 73 (3): 469–485
- Wang XZ, Sun WM, Ma YF, et al (2017). Advances in the study of ABC transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 53 (2): 4–15 (in Chinese with English abstract) [王晓珠, 孙万梅, 马义峰等(2017). 拟南芥ABC转运蛋白研究进展. *植物生理学报*, 53 (2): 4–15]
- Wu D, Yamaji N, Yamane M, et al (2016). The HvNramp5 transporter mediates uptake of cadmium and manganese, but not iron. *Plant Physiol*, 172 (3): 1899–1910
- Xiong H, Kobayashi T, Kakei Y, et al (2012). AhNRAMP1 iron transporter is involved in iron acquisition in peanut. *Environ Exp Bot*, 63 (12): 4437–4446
- Xue R, Wang S, Qi H, et al (2008). Structure analysis of the fourth transmembrane domain of Nramp1 in model membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (6): 1444–1452
- Xue Y, Wang YY, Yao QH, et al (2014). Research progress of plants resistance to heavy metal Cd in soil. *Ecol Environ*, 3: 528–534 (in Chinese with English abstract) [薛永, 王苑颀, 姚泉洪等(2014). 植物对土壤重金属镉抗性的研究进展. *生态环境学报*, (3): 528–534]
- Yamaji N, Sasaki A, Xia JX, et al (2013). A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice. *Nat Commun*, 4 (9): 2441–2442
- Yang CH, Zhang Y, Huang CF, et al (2018). Reduction in cadmium accumulation in japonica rice grains by CRISPR/Cas9-mediated editing of *OsNRAMP5*. *J Integr Agr*, 18 (3): 688–697
- Yang M (2014). Function analysis of rice *NRAMP* genes in Mn and Cd transporter (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [杨猛(2014). 水稻NRAMP家族基因在Mn和Cd转运中的功能研究. 武汉: 华中农业大学]
- Zha Q, Xiao Z, Zhang X, et al (2016). Cloning and functional analysis of *MxNRAMP1* and *MxNRAMP3*, two genes related to high metal tolerance of *Malus xiaojinensis*. *S Afr J Bot*, 102: 75–80

Advances in the study of plant Nramp family involved in metal ion absorption and distribution

CHEN Kexin, JIANG Xianda, ZHU Zhujun, WANG Huasen*, FENG Shengjun*

School of Agriculture and Food Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

Abstract: The natural resistance-associated macrophage proteins (Nramps) constitute a large family that are evolutionarily conserved throughout organisms. Studies showed that Nramp members function as proton-coupled metal ion transporters that can transport Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , etc. At present, studies focused on the expression pattern, subcellular localization and transport specificity of *Nramp* gene in plants, which indicated their pivotal roles in plant growth and development. In this paper, we review the recent advances of *Nramp* gene in plants. The purpose of this review is to discuss the functional mechanism of *Nramp* genes in plant absorption, accumulation and transportation of heavy metals, and to lay a foundation for the development of high-nutrient agricultural products with high nutrition and low accumulation heavy metal.

Key words: *Nramp* gene; heavy metals; transporter; absorption and transport

Received 2019-09-16 Accepted 2020-01-29

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (31872105、31972221 and 31801862), the Science Foundation of Zhejiang Province (Y19C150016), the Students Research Training Project of Zhejiang A&F University (113-2013200128) and the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (201910341005).

*Co-corresponding authors: Wang HS (whsych66@163.com), Feng SJ (20170039@zafu.edu.cn).