

# 植物铜转运蛋白结构、功能及调控机制

赫丽飞<sup>1</sup> 周仲乐<sup>1</sup> 马春婕<sup>1</sup> 王海英<sup>2</sup> 张海燕<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

<sup>2</sup>天津中医药大学中药学院, 天津 301617)

**摘要** 植物通过转运蛋白吸收和转运矿质离子。为保持离子可用性和避免离子过度积累, 离子转运蛋白的丰度和活性受到严格调控。铜转运蛋白(copper transporter, COPT)具有明显的结构特征和独特的亚细胞定位模式, 在植物铜吸收、内源免疫和共生固氮等过程中发挥重要作用。该文对植物COPT家族蛋白的结构特征、生物学功能和调控机制等方面的研究进展进行综述, 为植物铜稳态机制的揭示及品种改良提供参考。

**关键词** COPT蛋白; 铜离子; 内源免疫; 共生固氮

## Structure, Function and Regulatory Mechanism of COPT in Plants

HE Lifei<sup>1</sup>, ZHOU Zhongle<sup>1</sup>, MA Chunjie<sup>1</sup>, WANG Haiying<sup>2</sup>, ZHANG Haiyan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

<sup>2</sup>School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**Abstract** Mineral ion absorption and transport depends on transporters in plants. To maintain ion availability and avoid excessive ion accumulation, the abundance and activity of ion transporters are tightly regulated. COPT (copper transporter) contains distinct structural characteristics and unique subcellular localization, and plays a key role in copper uptake, endogenous immunity and symbiotic nitrogen fixation in plants. In this review, the structural characteristics, biological function and regulatory mechanism of COPT protein were reviewed, providing a reference for revealing the mechanism of copper homeostasis and improving varieties in plants.

**Keywords** COPT protein; copper ion; endogenous immunity; symbiotic nitrogen fixation

铜(Cu)属于过渡金属元素, 可作为蛋白辅因子参与许多生化反应而为所有生命体所必需。铜蛋白有多种生理功能, 如传递电子、贮存铜和作为氧化剂等。另外, 铜还可能在类囊体膜垛叠、氮同化和脱落酸生物合成中起作用<sup>[1-2]</sup>。地壳中铜含量介于3~110 mg/kg, 平均为55 mg/kg, 与地壳中的过渡元素锌的含量(平均为70 mg/kg)相当, 但远远低于过渡元素铁(平均为50 000 mg/kg)和锰(平均为950 mg/kg)的含量<sup>[3]</sup>。铜离子易与有机物结合, 因此富含有机

质的土壤更可能缺乏可被植物利用的游离铜离子。通常植物干物质的铜含量为2~50 mg/kg<sup>[4]</sup>。当营养组织的铜含量低于5 mg/kg(干重)时, 植株就会表现铜缺乏症状, 如叶片失绿且卷曲、细胞壁形成不良、花粉发育障碍和果实形成受阻等<sup>[4-5]</sup>。当营养组织的铜含量超过20 mg/kg(干重)时, 植物就发生铜毒害症状, 如叶片萎蔫发黄或坏死, 这可能是由叶绿体的光系统II和叶绿素对过量铜更加敏感造成的<sup>[6-7]</sup>。

植物铜稳态的维持主要由吸收型铜转运蛋

收稿日期: 2022-06-16 接受日期: 2022-08-23

国家自然科学基金(批准号: 31470292)和天津市自然科学基金重点项目(批准号:18JCZDJC97900)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 022-23766823, E-mail: skyzhy@tjnu.edu.cn

Received: June 16, 2022 Accepted: August 23, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31470292) and Key Projects of Tianjin Natural Science Foundation of China (Grant No.18JCZDJC97900)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23766823, E-mail: skyzhy@tjnu.edu.cn

白和排出型铜转运蛋白协同作用完成的,其中排出型铜转运蛋白主要为植物重金属ATP酶家族P1B-ATPase(heavy metal ATPase, HMA)成员,如拟南芥AtHMA5,该蛋白定位于质膜,受铜离子特异性诱导,在植物对铜离子的解毒过程中发挥作用<sup>[8]</sup>。吸收型铜转运蛋白主要有铜转运蛋白(copper transporter, COPT)、锌铁转运蛋白(zinc-regulated transporters and iron-regulated transporter-like protein, ZIP)和黄色条纹蛋白(yellow stripe-like protein, YSL)家族蛋白<sup>[9]</sup>。COPT家族蛋白主要负责将铜离子进行跨膜运输使其进入细胞质。一些COPT蛋白定位于质膜;而另一些则在液泡等内膜系统上。模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有6个COPT成员,其中AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6定位在质膜,主要介导植物对外界铜离子的吸收,而AtCOPT3和AtCOPT5定位于内膜系统,主要将细胞器内的铜离子转运到胞质中<sup>[10]</sup>。近年来,陆续有关于其他植物COPT蛋白的亚细胞定位、组织表达模式和功能的报道,本文主要对拟南芥外的植物中COPT蛋白的研究进展进行综述。

## 1 COPT家族及其结构特征

### 1.1 COPT家族的发现

真核生物铜稳态维持的分子生物学研究最早始于对模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的铜金属硫蛋白基因*CUPI*<sup>[11]</sup>及调控其表达的转录因子的基因*ACE1*的克隆<sup>[12]</sup>。第一个被克隆的铜转运蛋白Ctr(copper transporter)家族的成员是酿酒酵母的Ctr1<sup>[13]</sup>。在酿酒酵母中共鉴定到3个Ctr家族成员*ScCtr1~3*<sup>[14-15]</sup>。1997年,运用酵母功能互补技术克隆了人*Ctr1*基因<sup>[16]</sup>。首次报道的植物*Ctr*同源基因是拟南芥*COPT1*。该基因是KAMPFENKEL等<sup>[17]</sup>(1995年)用酵母突变体*ctrlActr2Actr3Δ*筛选拟南芥cDNA文库的方法得到的。水稻中首次报道的COPT家族成员是能够与水稻白叶枯病易感基因*Xa13*的编码蛋白XA13相互作用的OsCOPT1和OsCOPT5<sup>[18]</sup>。随后水稻COPT家族其他成员(OsCOPT2-6和OsCOPT7)的功能也被探讨<sup>[19]</sup>。通过序列比对及酵母功能互补实验,研究人员在其他几种植物中也鉴定到COPT家族成员,如玉米(*Zea mays*)有3个,ZmCOPT1~3<sup>[20]</sup>;番茄(*Solanum lycopersicum*)有6个,SICOPT1~6<sup>[21]</sup>;葡萄(*Vitis vinifera*)有8个,VvCTr1~8<sup>[22]</sup>;蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)也有8个,MtCOPT1~8<sup>[23]</sup>;紫花苜蓿

(*Medicago sativa*)有12个,MsCOPT1~12<sup>[24]</sup>;禾本科模式植物二穗短柄草(*Brachypodium diachyon*)有5个,BdCOPT1~5<sup>[25]</sup>。

### 1.2 不同物种COPT蛋白的结构特征

不同物种COPT家族成员在结构上非常保守,从N末端到C末端依次为胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域(图1)。胞外结构域通常含有Met基序(Met motif),不同COPT蛋白包含该基序的数目不同。如水稻7个COPT家族成员中,OsCOPT1有4个Met基序,OsCOPT2、OsCOPT3和OsCOPT4均有3个,OsCOPT5有2个,OsCOPT6和OsCOPT7则各仅有1个<sup>[19]</sup>。玉米COPT蛋白含较少Met基序,ZmCOPT1有1个,ZmCOPT2和ZmCOPT3均有2个<sup>[20]</sup>。二穗短柄草COPT蛋白的N-端含有2个以上Met基序,特别是BdCOPT1,共有11个,而BdCOPT2~5分别有2~4个<sup>[25]</sup>。番茄COPT4和葡萄CTr2和CTr6的N末端则缺乏Met基序<sup>[21-22]</sup>。

大多数COPT有3个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)。其中TMD2包含保守基序MXXXM(X为任意氨基酸),TMD3包含保守基序GXXXG(X为任意氨基酸)。TMD2和TMD3中的这两个基序共同形成该家族蛋白中高度保守(>90%)的MXXXM-X<sub>12</sub>-GXXXG标志基序<sup>[26]</sup>。水稻、玉米、番茄和葡萄的所有COPT蛋白均含3个跨膜区及MXXXM-X<sub>12</sub>-GXXXG基序<sup>[19-22]</sup>。而二穗短柄草BdCOPT3只有2个TMD(TMD1和TMD2),推测其N末端和C末端均位于胞质面。另外,BdCOPT3、BdCOPT4和BdCOPT5的TMD2中均有MXXXM基序,BdCOPT1和BdCOPT2的TMD中均缺乏MXXXM基序,而在其TMD2和TMD3之间(BdCOPT1)或TMD3之后的C末端(BdCOPT2)序列中可检测到MXXXM基序<sup>[25]</sup>。紫花苜蓿MsCOPT5则缺乏MXXXM基序<sup>[24]</sup>。

C末端结构域通常含有Cys(以CxC或CC基序的形式存在),如水稻COPT1、COPT2和COPT5均有CC基序,而COPT6和COPT7均有CxC基序。然而也有一些COPT的C末端不含Cys,如玉米COPT3,番茄COPT3和COPT4,葡萄CTr2、CTr3和CTr5以及二穗短柄草COPT1、COPT2和COPT5。

## 2 不同物种COPT的功能

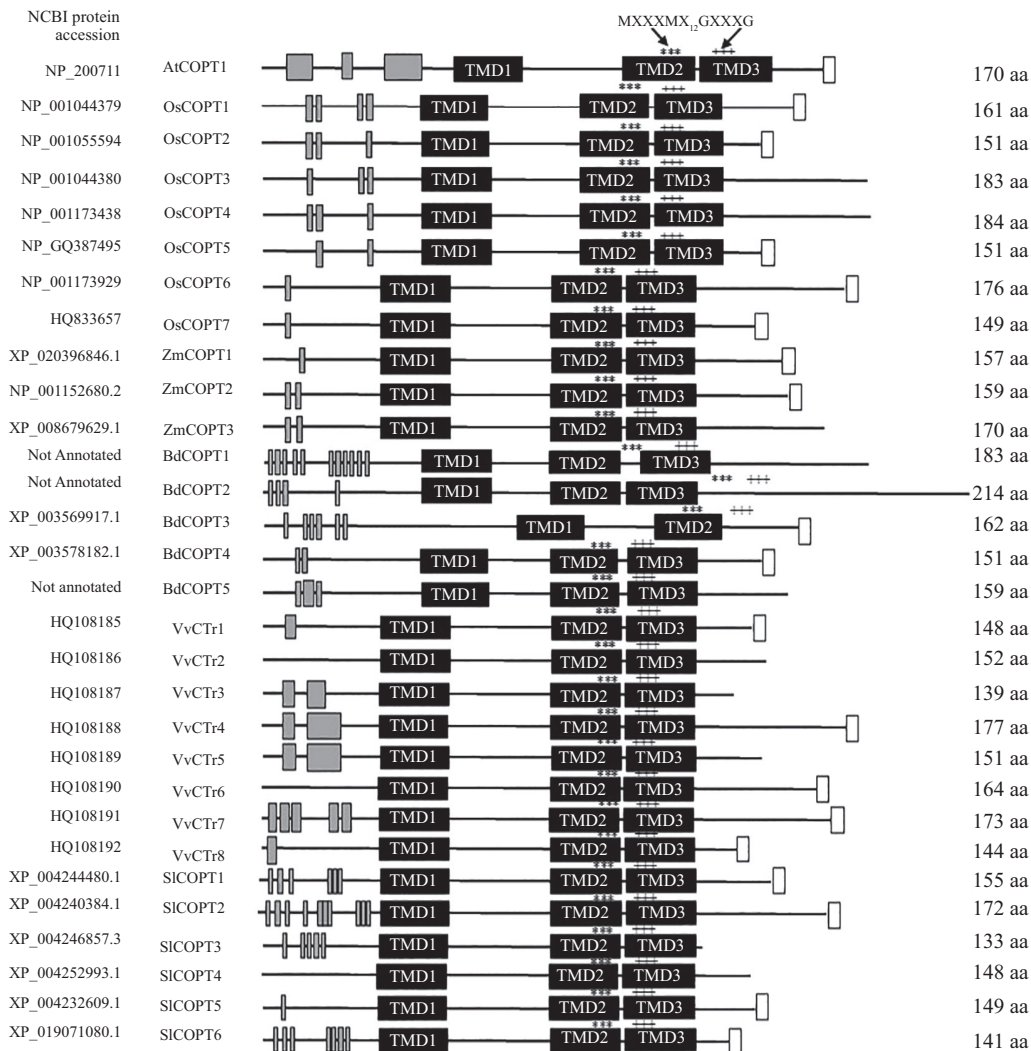
在模式植物拟南芥中,COPT蛋白与细胞对铜

离子的摄取<sup>[27]</sup>、胞内铜离子的储存和再分配等过程有关<sup>[28]</sup>; 另外COPT蛋白也参与拟南芥昼夜节律的调控<sup>[29]</sup>、ABA信号转导过程以及其他离子(如铁离子)的稳态维持<sup>[10,30-31]</sup>。以下报道的是其他物种COPT蛋白的功能。

## 2.1 铜离子吸收和胞内铜离子分配

通常质膜定位的COPT蛋白主要负责将胞外铜离子跨膜转运到胞内。将水稻的COPT与GFP融合后于酵母细胞MPY17中表达后发现, OsCOPT1-GFP和OsCOPT5-GFP能够定位于质膜上, 而OsCOPT2-GFP、OsCOPT3-GFP和OsCOPT4-GFP却不能或大部分不能定位于质膜上, 但当它们分别与OsCOPT6共表达后, 这三种蛋白均主要存在于质膜上, 表明

OsCOPT6可作为辅因子帮助OsCOPT2、OsCOPT3和OsCOPT4定位于质膜<sup>[19]</sup>。植物COPT的铜吸收功能通常运用酵母功能互补实验来鉴定, 即将COPT异源表达于酵母突变体(*ctr1Δctr2Δctr3Δ*、*ctr1Δctr2*、*ctr1Δctr3Δ*或*ctr1Δ*)中。这些突变体由于缺失定位于质膜和/或液泡膜的Ctr蛋白, 其细胞质处于铜缺乏状态, 细胞色素c氧化酶由于缺乏铜而失活, 导致细胞无法进行有氧呼吸, 因此这些突变体在非发酵碳源培养基如YPEG(yeast extract, peptone, ethanol and glycerol)上无法生长<sup>[32]</sup>。运用酵母功能互补技术发现, 在正常YPEG培养基上, 水稻的7个COPT中, 只有OsCOPT7能够完全互补酵母突变体*ctr1Δctr3Δ*的生长缺陷表型, 说明仅OsCOPT7为高亲和铜转运蛋



灰框: Met 基序; 黑框: 跨膜区(TM1、TM2、TM3); 白框: CC或CXC 基序; \*\*\*: MXXXM基序; +++: GXXXG基序。

gray bars: Met-motifs; black bars: transmembrane domains (TM1, TM2, and TM3); white bars: CC or CXC; \*\*\*: MXXXM; +++: GXXXG.

图1 不同物种COPT蛋白的结构特征

Fig.1 Structural characteristics of COPT proteins in different species



白。在 YPEG 培养基中添加较低浓度的铜 (5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ ) 时, OsCOPT6 能够完全互补 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的表型, 而 OsCOPT3 和 OsCOPT4 可部分恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的表型, 说明它们是低亲和铜转运蛋白。在 YPEG 培养基中添加 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ , OsCOPT1、OsCOPT2 和 OsCOPT5 仍不能互补 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的表型。有趣的是, 当 OsCOPT2、OsCOPT3 和 OsCOPT4 分别与 OsCOPT6 共表达时, 在正常 YPEG 培养基上即可恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的表型; 只有 COPT1、COPT5 和 XA13 三个蛋白同时表达才能部分恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的生长, 表明水稻 COPT 家族的大多数成员只有与其他 COPT 蛋白形成二聚体或多聚体才能参与铜吸收过程<sup>[18-19]</sup>。ZmCOPT1 和 ZmCOPT2 能够有效恢复酵母突变体 *ctr1 $\Delta$ ctr2 $\Delta$*  的生长缺陷, 为高亲和铜转运蛋白, ZmCOPT3 则恢复效果较弱<sup>[20]</sup>。SICOPT1 和 SICOPT2 能够完全恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的缺陷表型, 为高亲和铜转运蛋白。在酵母细胞或二穗短柄草的原生质体中, BdCOPT3-EGFP 和 BdCOPT4-EGFP 均定位于质膜。在正常条件下, 所有 BdCOPT 均不能互补 *ctr1 $\Delta$ ctr2 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的表型, 在添加 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  时, BdCOPT3、BdCOPT4、BdCOPT5 能够部分恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr2 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的生长<sup>[25]</sup>。由于 BdCOPT1、BdCOPT3、BdCOPT4 和 BdCOPT5 均不仅能够发生自身相互作用, 而且也能够发生彼此间相互作用, 因此这种 BdCOPT 彼此之间的相互作用或许也是它们高效转运铜离子所必需的<sup>[25]</sup>。

而定位于液泡膜等内膜系统上的 COPT 则主要将液泡等细胞器中的铜离子转运到细胞质中。正常条件下, VvCTR1 只能部分恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的生长表型。VvCTR1 与定位于液泡膜的拟南芥 AtCOPT5 的氨基酸序列相似性高达 53%。将 VvCTR1-GFP 于烟草细胞中表达后发现其定位于早期内体、晚期内体和液泡膜上<sup>[22]</sup>。在铜缺乏时, 拟南芥 *copt5* 突变体的根生长受到显著抑制, 而 *VvCTR1* 的稳定表达能够完全恢复 *copt5* 根的生长<sup>[22]</sup>。类似地, SICOPT3 和 SICOPT5 恢复 *ctr1 $\Delta$ ctr3 $\Delta$*  的表型的能力较弱, 推测其可能定位于胞内细胞器, 而不是质膜上<sup>[21]</sup>。

## 2.2 植物内源免疫反应

在农业生产过程中, 植物病害严重损害农产品的产量和质量, 给农业生产造成巨大经济损失。喷施化学药剂能够增强植物抵抗病原菌侵染的能力。铜是许多化学杀菌剂的主要成分之一。含铜杀菌剂

的功效被认为与铜对植物病原菌的毒害作用有关。如铜离子可使核酸变性、酶失活、质膜透性改变, 从而抑制病原菌繁殖和孢子萌发<sup>[33]</sup>。然而有研究显示, 过量铜处理水稻和拟南芥幼苗能够诱导活性氧爆发和  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 导致病程相关 (pathogenesis-related) 基因如 *PR1*、*PR2*、*PR5* 和 *PDF1.2* 表达上调, 说明铜离子可以作为激发子诱导植物的免疫反应<sup>[34-36]</sup>。水稻白叶枯病由黄单胞杆菌水稻变种 (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Xoo*) 引起, 是威胁我国水稻生产的主要病害。白叶枯病菌从水稻叶片的水孔或伤口侵入, 然后进入木质部, 在木质部汁液内大量增殖而致病。YUAN 等<sup>[18]</sup> (2010 年) 发现, 尽管被白叶枯病菌侵染的水稻地上部能够积累较多铜, 但其木质部汁液中的铜水平却较低, 这样使得白叶枯病菌得以在木质部中迅速增殖而使植物发病。研究还发现白叶枯病菌侵染水稻后, 其分泌的效应因子不仅可诱导易感基因 *Xa13* 上调表达, 同时还可诱导 *OsCOPT1*、*OsCOPT5* 表达上调。研究人员对 *OsCOPT1* 和 *OsCOPT5* 的过表达转基因水稻植株进行离子含量检测后发现, 其地上部和根部均积累较多铜, 而其木质部汁液则积累较少铜<sup>[18]</sup>。同时这些过表达植株对白叶枯病菌更敏感, 而抑制 *OsCOPT1* 和 *OsCOPT5* 的表达则增强水稻对白叶枯病菌的抗性<sup>[18]</sup>。双分子荧光互补和免疫共沉淀实验证明, *Xa13* 编码的 XA13 蛋白和 OsCOPT1、OsCOPT5 能够形成复合物, 共同将铜离子从木质部转运到薄壁细胞中, 从而降低木质部汁液中的铜水平<sup>[18]</sup>。这些结果均表明, OsCOPT1 和 OsCOPT5 参与了 XA13-介导的水稻白叶枯病菌的致病反应过程。泛素相关结构域蛋白 UBAC2 [ubiquitin-associated (UBA) domain-containing protein 2] 在植物免疫反应中具有重要作用。拟南芥双突变体植株 *ubac2a ubac2b* 对灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 很敏感<sup>[37]</sup>。UBAC2a 和 UBAC2b 均能够与质膜定位的 AtCOPT1、AtCOPT2 和 AtCOPT6 相互作用, 而不能与拟南芥的其他 3 个 COPT 成员相互作用。免疫印迹实验显示, 该突变体中 COPT1、COPT2 和 COPT6 蛋白丰度均显著低于野生型植株, 离子含量分析后发现 *ubac2a ubac2b* 中的铜含量也显著低于野生型<sup>[38]</sup>, 暗示 COPT1、COPT2 和 COPT6 通过与 UBAC2 形成复合体, 增加其稳定性, 进而促进铜积累, 增强植物免疫力。

### 2.3 豆科植物共生固氮

根瘤菌与豆科植物(rhizobia-legume)形成的共生固氮体系是自然界固氮效率最高、固氮量最大的生物固氮系统。共生体(symbiosome)是根瘤(nodule)中的特殊细胞器,由类菌体(bacteroid)和一层植物起源的共生体膜组成。由于固氮反应需要消耗大量能量,且固氮酶对 $O_2$ 高度敏感,因此固氮菌在长期进化过程中形成了一套高效复杂的氧保护机制,以满足固氮反应的高能量需求,同时保护固氮酶不受氧损伤<sup>[39]</sup>。细胞色素c氧化酶属于含血红素/铜(heme/ $Cu^{2+}$ )末端氧化酶,是唯一能够将 $O_2$ 还原为 $H_2O$ 的复合物。*ccb3*型细胞色素c氧化酶(*ccb3*-type cytochrome c oxidase, *ccb3*-Cox)仅存在于细菌,最早被发现于共生固氮菌。慢性根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的*ccb3*-Cox活性丧失会导致其与大豆的共生固氮能力丧失,说明*ccb3*-Cox活性对大豆根瘤中极低 $O_2$ 条件下的共生固氮反应是必需的<sup>[40-41]</sup>。铜是所有细胞色素c氧化酶的辅因子,根瘤菌铜吸收相关蛋白P1b-ATP酶和铜伴侣蛋白突变,细胞色素c氧化酶不能被有效组装,导致其固氮酶活性降低<sup>[42-43]</sup>。最近有研究表明,在共生体形成后,植物细胞的COPT蛋白在保证共生体获得足够铜中具有重要作用。当中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)与蒺藜苜蓿共生时,*MtCOPT1*在根瘤内特异性表达。*MtCOPT1*的*Tnt1*(transposable element of *Nicotiana tabacum*)缺失突变体*copt1-1*的生物量显著减少,其根瘤类菌体*ccb3*-Cox活性下降60%,固氮酶活性下降50%,然而根瘤的发育(如结瘤率和根瘤形状)未受影响<sup>[23]</sup>。*MtCOPT1*的表达能将*copt1-1*的生物量和酶活性恢复到野生型植株的水平。组织表达模式分析显示*MtCOPT1* mRNA仅限于根瘤菌侵染区末端(late infection)、中间区(inter zone)和固氮区前端(early fixation zone),说明根部吸收的铜离子可能经维管组织传递并释放到根瘤中。*MtCOPT1*将根瘤质外体中的铜离子转运到根细胞后,共生体膜和类菌体外膜的铜转运蛋白将铜离子转运到类菌体周质空间的铜伴侣蛋白,后者将铜离子传递到类菌体内膜上的*ccb3*-Cox上,使其组装为活性形式<sup>[23]</sup>。

### 3 不同物种COPT的表达和调控机制

在转录水平上,水稻中花11的根和叶中*OsCOPT1*和*OsCOPT5*表达均较高<sup>[19]</sup>。在不含铜(即铜缺

乏)的培养液中生长的水稻幼苗随培养时间的延长,*OsCOPT1*和*OsCOPT5*的表达能力逐渐增强;当被转到正常培养液(0.2  $\mu\text{mol/L}$   $CuSO_4$ )中后1 h,*OsCOPT1*和*OsCOPT5*的表达显著下降,培养24 h时达到正常水平;50  $\mu\text{mol/L}$   $CuSO_4$ 处理水稻幼苗4 h明显抑制*OsCOPT1*和*OsCOPT5*的表达<sup>[18]</sup>。正常条件下,*OsCOPT6*仅在地上部表达,且铜缺乏使其上调表达,铜过量使其下调表达;即使在铜缺乏条件下,根中未检测到*OsCOPT6*的表达。铜过量处理抑制根和地上部*OsCOPT2*、*OsCOPT3*和*OsCOPT4*的表达,然而铜缺乏处理对它们的表达无明显影响<sup>[19]</sup>。在铜缺乏条件下,玉米*ZmCOPT1*和*ZmCOPT2*在地上部表达强烈上调,铜过量时其表达下调<sup>[20]</sup>。另外随着外界铜水平的降低,根和叶(包括幼叶和老叶)的*BdCOPT3*和*BdCOPT4*表达均逐渐上调<sup>[25]</sup>。随着外界铜水平的升高,根和叶中的*SICOPT1*和*SICOPT2*表达持续下调,*SICOPT1*在铜过量(100  $\mu\text{mol/L}$   $CuSO_4$ )时在根中的表达有增加的现象,但仍低于严重缺铜(100  $\mu\text{mol/L}$  BCS)条件下的表达水平<sup>[21]</sup>(表1)。许多COPT基因启动子区包含铜响应元件(Cu responsive element, CuRE),其核心序列为GTAC基序。当铜缺乏时,转录因子SPL7(*SQUAMOSA* promoter-binding protein-like7)会特异性结合到GTAC基序上,进而激活下游COPT基因的表达。当铜充足时,SPL7通过结合铜离子将锌离子从锌指结构中置换出来,破坏其与GTAC基序的结合,从而终止其对COPT基因的激活作用<sup>[44]</sup>。在拟南芥响应外界铜水平变化的过程中正是SPL7通过上述方式对*AtCOPT1*、*AtCOPT2*和*AtCOPT6*的表达进行精密调控<sup>[45-46]</sup>。研究人员对番茄COPT基因上游1.5 Kb的启动子序列进行分析后发现,所有COPT基因的启动子均包含多个GTAC基序,如*SICOPT2*、*SICOPT5*和*SICOPT6*的启动子均包含16个,*SICOPT4*的包含8个,*SICOPT1*和*SICOPT3*的包含较少,分别为2个和4个<sup>[21]</sup>。然而番茄SPL7对COPT表达的调控机制尚缺乏实验证据。

许多离子转运蛋白的丰度不仅受到转录水平的调控,还受到翻译水平的调控。翻译水平的调控通常依赖于蛋白的翻译后修饰(posttranslational modification)。许多研究显示离子转运蛋白的泛素化修饰对植物适应离子胁迫发挥重要作用。当植物遭受离子胁迫时,离子转运蛋白被泛素化和内吞,在内吞体分选转运复合体(endosomal sorting

complex required for transport, ESCRT)的作用下将泛素化的蛋白分选到液泡前体(prevacuolar compartment, PVC)中,最终被转运到液泡内进行降解<sup>[49-50]</sup>。这类离子转运蛋白的降解过程对囊泡运输抑制剂BFA(brefeldin A)和液泡膜H<sup>+</sup>-ATPase抑制剂Conc A(concanamycin A)敏感<sup>[51-53]</sup>。如拟南芥硼转运蛋白BOR1(borate exporter 1)定位于根的内皮层内侧和中柱最外层细胞的质膜上,其功能是在低硼(B)条件下,将硼离子转运到木质部导管中,满足地上部对硼的需求<sup>[54]</sup>。在高浓度硼处理时,BOR1可被单或二泛素化,通过质膜上的网格蛋白(clathrin-mediated endocytosis, CME)介导的胞吞作用运输到液泡中降解,从而避免植物地上部积累过量硼而受到伤害<sup>[54]</sup>。最

新的研究显示,硼处理也可诱导水稻BOR1的快速降解,但这种降解过程与CME介导的内吞过程无关,而与蛋白酶体降解途径有关<sup>[55]</sup>。植物COPT在蛋白水平上的调控机制仅在拟南芥中取得了一定进展。用50 μmol/L CuSO<sub>4</sub>处理拟南芥幼苗后,AtCOPT1-GFP和AtCOPT2-GFP均发生明显降解。BFA和Conc A处理对COPT1-GFP在细胞内的分布没有影响,表明内吞作用、膜泡循环及液泡靶向过程均不参与铜诱导的AtCOPT1和AtCOPT2的降解。体外和体内实验均发现蛋白酶体抑制剂MG132处理能抑制铜诱导的AtCOPT1和AtCOPT2的降解,然而无论是正常还是铜处理条件下,均检测不到AtCOPT1和AtCOPT2的泛素化信号。这些结果说明非泛素化依赖的蛋白

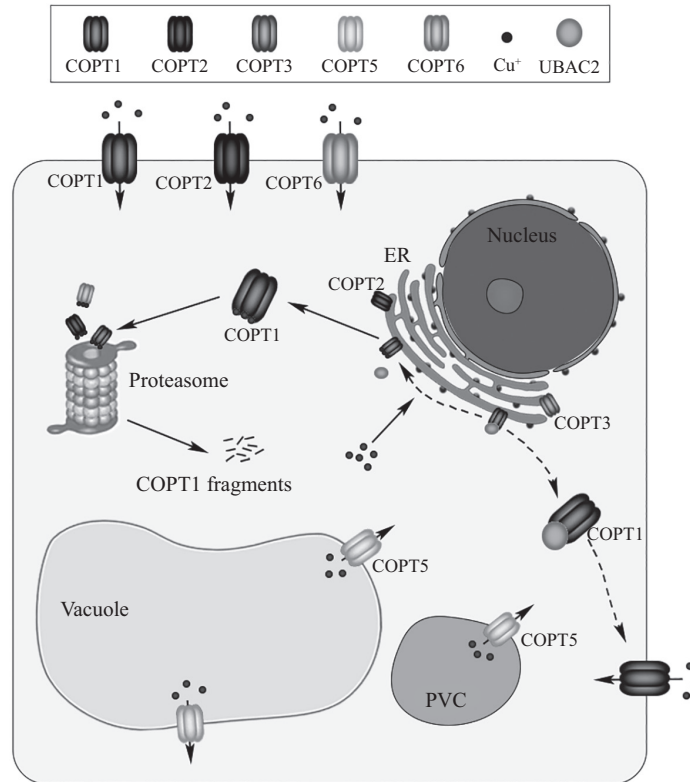
表1 COPT基因的表达及功能  
Table 1 Expression and function of COPT

植物 Plant	基因 Gene	表达特征 Expression characteristics						多聚体类型 Polymer type	在植物中的功能 Functions in plants	参考文献 References
		根 Root		茎 Stem		叶 Leaf				
		-Cu <sup>2+</sup>	+Cu <sup>2+</sup>	-Cu <sup>2+</sup>	+Cu <sup>2+</sup>	-Cu <sup>2+</sup>	+Cu <sup>2+</sup>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtCOPT1</i>	/	/	/	/	↑	↓	He	Copper absorption	[10,27-29,45,47]
	<i>AtCOPT2</i>	/	/	/	/	↑	↓	/	Copper absorption	
	<i>AtCOPT3</i>	/	/	/	/	↑	=	/	Circadian rhythm	
	<i>AtCOPT4</i>	/	/	/	/	=	=	/	/	
	<i>AtCOPT5</i>	/	/	/	/	=	=	/	Copper mobilization	
	<i>AtCOPT6</i>	↑	=	↑	↓	↑	↓	Ho; He	Copper absorption, distribution	
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsCOPT1</i>	↑	↓	↑	↓	↑	↓	Ho; He	Endogenous immunity	[18-19]
	<i>OsCOPT2</i>	=	↓	=	↓	=	↓	Ho; He	/	
	<i>OsCOPT3</i>	=	↓	=	↓	=	↓	Ho; He	/	
	<i>OsCOPT4</i>	=	↓	=	↓	=	↓	Ho; He	/	
	<i>OsCOPT5</i>	↑	↓	↑	↓	↑	↓	Ho; He	Endogenous immunity	
	<i>OsCOPT6</i>	—	—	↑	↓	↑	↓	Ho; He	/	
	<i>OsCOPT7</i>	↑	↓	↑	↓	↑	↓	Ho	/	
<i>Zea mays</i>	<i>ZmCOPT1</i>	=	=	↑	↓	↑	↓	/	/	[20]
	<i>ZmCOPT2</i>	↑	↓	↑	↓	↑	↓	/	/	
	<i>ZmCOPT3</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↑	/	/	
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>SICOPT1</i>	↑	↑	↓	↑	↑	↓	/	/	[21]
	<i>SICOPT2</i>	↑	↓	↑	↑	↑	↓	/	/	
<i>Brachypodium diachyon</i>	<i>BdCOPT3</i>	↑	↓	/	/	↑	↓	Ho; He	/	[25]
	<i>BdCOPT4</i>	↑	↓	/	/	↑	↓	Ho; He	/	
<i>Vitis vinifera</i>	<i>VvCTR1</i>	/	/	/	/	/	/	Ho	Copper distribution	[22]
<i>Medicago</i>	<i>MtCOPT1</i>	/	/	/	/	/	/	/	Symbiotic nitrogen fixation	[23,48]
<i>Truncatula</i>	<i>MtCOPT2</i>	/	/	/	/	/	/	/	Symbiotic nitrogen fixation	

↑: 表达上调; ↓: 表达下调; —: 不表达; =: 无明显差异; /: 未见报道; Ho: 同源多聚体; He: 异源多聚体。

↑: up-regulated; ↓: down-regulated; —: not express; =: no significant differences; /: none reported; Ho: homomultimer; He: heteromultimer.





拟南芥的铜吸收过程主要依赖于质膜定位的AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6。在细胞内, AtCOPT5定位于液泡(vacuole)膜和液泡前体(PVC)膜, AtCOPT3可能定位于内质网(ER)膜。AtCOPT5和AtCOPT3可分别将液泡/液泡前体或内质网中的Cu<sup>+</sup>转运到细胞质中。在正常条件下, 内质网上合成的AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6与UBAC2相互作用而形成复合物, 其稳定性增加, 利于被运送到质膜; 当细胞质Cu<sup>+</sup>增加时, Cu<sup>+</sup>可能取代复合物中的UBAC2, 此时AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6由于失去UBAC2的保护而被运送到蛋白酶体(proteasome)中降解, 致使向质膜转运的AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6减少。

Copper uptake mainly depends on plasma membrane-localized AtCOPT1, AtCOPT2 and AtCOPT6 in *Arabidopsis thaliana*. AtCOPT5 is located in the vacuole membrane and the prevacuolar compartment membrane (PVC), and AtCOPT3 may be localized in the endoplasmic reticulum (ER). AtCOPT5 and AtCOPT3 transport Cu<sup>+</sup> from vacuoles/PVCs or ER into the cytoplasm, respectively. Under normal conditions, synthesized AtCOPT1, AtCOPT2 and AtCOPT6 in ER forms a complex with UBAC2 and its stability is enhanced, which facilitates its transport to the plasma membrane. When cytoplasmic Cu<sup>+</sup> increases, Cu<sup>+</sup> may replace UBAC2 of the complex, leading to AtCOPT1, AtCOPT2 and AtCOPT6 to the degradation in the proteasome due to loss of UBAC2 protection and subsequent reduction in COPT1 of the plasma membrane.

图2 COPT介导的铜稳态维持机制

Fig.2 Mechanism of COPT-mediated copper homeostasis

酶体降解途径参与了铜诱导的AtCOPT1和AtCOPT2的降解过程<sup>[56-57]</sup>。最近的实验结果支持上述研究结论。LI等<sup>[38]</sup>发现, AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6在内质网合成后能够通过蛋白酶体途径降解, 且泛素相关结构域蛋白AtUBAC2能够与AtCOPT1、AtCOPT2或AtCOPT6相互作用并增强AtCOPTs的稳定性。有许多研究证明, AtUBAC2是泛素连接酶E3复合体的亚基, 主要通过依赖UBA(ubiquitin-associate)结构域的方式靶向泛素化蛋白到26S蛋白酶体降解<sup>[38,58]</sup>。然而AtUBAC2与AtCOPT1的直接相互作用不仅没有诱导AtCOPT1降解, 反而使AtCOPT1更加稳定, 且这种效果是不依赖于UBA结构域的, 说明泛素化与AtCOPT1的降解无关。另外2021年LI等<sup>[38]</sup>还发现, AtCOPT1的N-

端前20个氨基酸残基的缺失就能导致其与AtUBAC2的相互作用完全丧失。由于AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6的N-端的这段序列包含能够与铜离子特异性结合的第一个Met基序, 因此当细胞内铜离子增加时, 与AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6结合的AtUBAC2可能被铜离子取代, AtCOPTs由于失去UBAC2的保护而被转运到蛋白酶体降解(图2)。

#### 4 结语与展望

COPT蛋白对铜具有高亲和力和高特异性, 主要参与细胞从外界环境中吸收铜离子的过程。近年来, 尽管对模式植物拟南芥COPT蛋白的研究较为深入, 然而其他植物中该蛋白的研究仍处于起步

阶段。目前仅在较少的几种非模式植物的COPT蛋白的结构特征、组织表达模式及其对外界铜水平变化的响应规律等进行了研究,使人们对COPT蛋白在其他植物铜稳态维持中的功能有了初步认识,因此存在许多值得探究的问题。(1)需要对非模式植物的COPT表达调控机制进行深入探究。至今COPT在蛋白水平的调控机制仅在模式植物拟南芥中有报道。这种拟南芥中的非泛素化依赖的蛋白酶体途径通过调控COPTs丰度参与细胞铜稳态平衡的研究结果可为其他植物COPT的研究提供启示和思路。(2)水稻中,研究人员发现大多数COPT蛋白需要与同家族的其他蛋白相互作用,才能正确定位并发挥铜吸收功能,且在二穗短柄草中也发现仅表达COPT的某个成员,不能赋予其铜吸收的功能,这是否意味着需要不同成员间的协同作用才具有铜吸收功能是禾本科植物COPT蛋白的共有机制?而且这种不同成员间的相互作用发生的条件有哪些,对植物适应外界环境和作物产量有何意义?(3)COPT蛋白的结构具有许多明显特征(如N-端Met基序数目、TMD中是否存在MxxxM基序和C-端Cys的有无及排列方式等),目前对这些结构的变化对其功能的影响尚未见报道。利用细胞生物学、生物化学和现代分子生物学等手段对植物COPT蛋白在铜吸收和积累及其他生物学过程中的功能进行研究,将有助于阐释铜在植物生长发育中的作用机制,为提高植物对铜水平变化的外界环境适应能力提供理论和技术参考。

### 参考文献 (References)

- [1] BERNAL M, RAMIRO M V, CASES R, et al. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in Glycine max cell suspensions [J]. *Physiol Plantarum*, 2006, 127(2): 312-25.
- [2] KUPER J, LLAMAS A, HECHT H J, et al. Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism [J]. *Nature*, 2004, 430(7001): 803-6.
- [3] BURKHEAD J L, GOGOLIN R K, ABDEL-GHANY S E, et al. Copper homeostasis [J]. *New Phytol*, 2009, 182(4): 799-816.
- [4] EPSTEIN E, BLOOM A J. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives [M]. Sunderland, United States: Sinauer Associates, Incorporated, 2005.
- [5] MARSCHNER H. Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed [M]. London, UK: Academic Press, 1995, 889.
- [6] YRUELA I, PUEYO J J, ALONSO P J, et al. Photoinhibition of photosystem II from higher plants. Effect of copper inhibition [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(44): 27408-15.
- [7] BERNAL M, RONCEL M, ORTEGA J M, et al. Copper effect on cytochrome b of photosystem II under photoinhibitory conditions [J]. *Physiol Plant*, 2004, 120(4): 686-94.
- [8] ANDRES-COLAS N, SANCENON V, RODRIGUEZ-NAVARRO S, et al. The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots [J]. *Plant J*, 2006, 45(2): 225-36.
- [9] 袁金红, 李靖锐, 张海燕. 植物铜转运蛋白的结构和功能[J]. *植物学报*(YUAN J H, LI J R, ZHANG H Y, et al. Structure and function of plant copper transporters [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2016, 51(6): 849-58.
- [10] 王惠, 李谨谨, 徐金玉, 等. 拟南芥COPT家族蛋白研究进展[J]. *植物学报*(WANG H, LI J J, XU J Y, et al. Research progress of copt family proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2019, 54(6): 786-96.
- [11] HAMER D H, THIELE D J, LEMONTT J E. Function and auto-regulation of yeast copper thionein [J]. *Science*, 1985, 228(4700): 685-90.
- [12] THIELE D J. ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(7): 2745-52.
- [13] DANCIS A, HAILE D, YUAN D S, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(41): 25660-7.
- [14] KNIGHT S A, LABBE S, KWON L F, et al. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(15): 1917-29.
- [15] REES E M, LEE J, THIELE D J. Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54221-9.
- [16] ZHOU B, GITSCHIER J. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7481-6.
- [17] KAMPFENKEL K, KUSHNIR S, BABIYCHUK E, et al. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(47): 28479-86.
- [18] YUAN M, CHU Z, LI X, et al. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(9): 3164-76.
- [19] YUAN M, LI X, XIAO J, et al. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11(1): 69.
- [20] WANG H, DU H, LI H, et al. Identification and functional characterization of the ZmCOPT copper transporter family in maize [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e199081.
- [21] ROMERO P, GABRIELLI A, SAMPEDRO R, et al. Identification and molecular characterization of the high-affinity copper transporters family in *Solanum lycopersicum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.032.
- [22] MARTINS V, BASSIL E, HANANA M, et al. Copper homeostasis in grapevine: functional characterization of the *Vitis vinifera* copper transporter 1 [J]. *Planta*, 2014, 240(1): 91-101.
- [23] SENOVILLA M, CASTRO-RODRIGUEZ R, ABREU I, et al. *Medicago truncatula* copper transporter 1 (MtCOPT1) delivers copper for symbiotic nitrogen fixation [J]. *New Phytol*, 2018,



- 218(2): 696-709.
- [24] WANG Q, WEI N, JIN X, et al. Molecular characterization of the COPT/Ctr-type copper transporter family under heavy metal stress in alfalfa [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.173.
- [25] JUNG H, GAYOMBA S R, YAN J, et al. *Brachypodium distachyon* as a model system for studies of copper transport in cereal crops [J]. *Front Plant Sci*, 2014, doi: 10.3389/fpls.2014.00236.
- [26] MANDAL T, KAR S, MAJI S, et al. Structural and functional diversity among the members of CTR, the membrane copper transporter family [J]. *J Membr Biol*, 2020, 253(5): 459-68.
- [27] ANDRES-COLAS N, PEREA-GARCIA A, PUIG S, et al. Deregulated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(1): 170-84.
- [28] GARCIA-MOLINA A, ANDRES-COLAS N, PEREA-GARCIA A, et al. The *Arabidopsis* COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(8): 1378-90.
- [29] PEREA-GARCIA A, SANZ A, MORENO J, et al. Daily rhythmicity of high affinity copper transport [J]. *Plant Signal Behav*, 2016, 11(3): e1140291.
- [30] YAN S, DONG X. Perception of the plant immune signal salicylic acid [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, doi: 10.1016/j.pbi.2014.04.006.
- [31] PEREA-GARCIA A, GARCIA-MOLINA A, ANDRES-COLAS N, et al. *Arabidopsis* copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling [J]. *Plant Physiol*, 2013, 162(1): 180-94.
- [32] DIMAURO S, SCHON E A. Mitochondrial respiratory-chain diseases [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(26): 2656-68.
- [33] BORKOW G, GABBAY J. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities [J]. *FASEB J*, 2004, 18(14): 1728-30.
- [34] YEH C, HUNG W, HUANG H. Copper treatment activates mitogen-activated protein kinase signalling in rice [J]. *Physiol Plant*, 2003, 119(3): 392-9.
- [35] SUDO E, ITOUGA M, YOSHIDA-HATANAKA K, et al. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(12): 3465-74.
- [36] LIU J, PARK C H, HE F, et al. The Rho GAP SPIN6 associates with SPL11 and OsRac1 and negatively regulates programmed cell death and innate immunity in rice [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2): e1004629.
- [37] ZHOU J, WANG Z, WANG X, et al. Dicot-specific ATG8-interacting ATI3 proteins interact with conserved UBAC2 proteins and play critical roles in plant stress responses [J]. *Autophagy*, 2018, 14(3): 487-504.
- [38] LI X, WANG Z, FU Y, et al. Two ubiquitin-associated ER proteins interact with COPT copper transporters and modulate their accumulation [J]. *Plant Physiol*, 2021, 187(4): 2469-84.
- [39] BOBIK C, MEILHOC E, BATUT J. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(13): 4890-902.
- [40] KAHN D, DAVID M, DOMERGUE O, et al. Rhizobium meliloti fix GHI sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 929-39.
- [41] PREISIG O, ANTHAMATTEN D, HENNECKE H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(8): 3309-13.
- [42] SERVENTI F, YOUARD Z A, MURSET V, et al. Copper starvation-inducible protein for cytochrome oxidase biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum* [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(46): 38812-23.
- [43] ARUNOTHAYANAN H, NOMURA M, HAMAGUCHI R, et al. Copper metallochaperones are required for the assembly of bacteroid cytochrome c oxidase which is functioning for nitrogen fixation in soybean nodules [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(7): 1242-6.
- [44] SOMMER F, KROPAT J, MALASARN D, et al. The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(12): 4098-113.
- [45] YAMASAKI H, HAYASHI M, FUKAZAWA M, et al. *SQUAMOSA* promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 347-61.
- [46] JUNG H I, GAYOMBA S R, RUTZKE M A, et al. 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]. *J Biol Chem*, 2012, 287(40): 33252-67.
- [47] SANCENON V, PUIG S, MIRA H, et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(4): 577-87.
- [48] SENOVILLA M, ABREU I, ESCUDERO V, et al. MtCOPT2 is a Cu<sup>+</sup> transporter specifically expressed in *Medicago truncatula* mycorrhizal roots [J]. *Mycorrhiza*, 2020, 30(6): 781-8.
- [49] ISONO E, KALINOWSKA K. ESCRT-dependent degradation of ubiquitylated plasma membrane proteins in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, doi: 10.1016/j.pbi.2017.07.003.
- [50] REYNOLDS G D, WANG C, PAN J, et al. Inroads into internalization: five years of endocytic exploration [J]. *Plant Physiol*, 2018, 176(1): 208-18.
- [51] TAKANO J, TANAKA M, TOYODA A, et al. Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(11): 5220-5.
- [52] BARBERON M, ZELAZNY E, ROBERT S, et al. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(32): E450-8.
- [53] MARTINS S, DOHMANN E M, CAYREL A, et al. Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination [J]. *Nat Commun*, 2015, doi: 10.1038/ncomms7151.
- [54] KASAI K, TAKANO J, MIWA K, et al. High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6175-83.
- [55] HUANG S, KONISHI N, YAMAJI N, et al. Boron uptake in rice

- is regulated post-translationally via a clathrin-independent pathway [J]. *Plant Physiol*, 2022, 188(3): 1649-64.
- [56] LI J, YUAN J, WANG H, et al. *Arabidopsis* COPPER TRANSPORTER 1 undergoes degradation in a proteasome-dependent manner [J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(19): 6174-86.
- [57] LI J, WANG W, YUAN J, et al. Ubiquitin-independent proteasome system is required for degradation of *Arabidopsis* COPPER TRANSPORTER 2 [J]. *Plant Science*, 2021, doi: 10.1016/j.plantsci.2021.110825.
- [58] CHRISTIANSON J C, OLZMANN J A, SHALER T A, et al. Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 14(1): 93-105.