

植物中的抗坏血酸氧化酶

石永春, 刘卫群*

河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

Ascorbate Oxidase in Plants

SHI Yong-Chun, LIU Wei-Qun*

College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

提要: 文章简要介绍植物中抗坏血酸氧化酶的结构、功能、基因的表达调控及其参与的生理反应研究进展。

关键词: 植物中的抗坏血酸氧化酶; 氧化还原状态; 质体外环境; 生理响应

一般认为, 植物的质体外(apoplast)环境是感受并传导环境变化信号的首要部位。逆境胁迫往往通过诱导质膜的氧化爆发而改变质膜内外的氧化还原状态。植物中主要有两种有机小分子物质参与调节质膜内外氧化还原状态的动态平衡, 一种是谷胱甘肽, 另一种是抗坏血酸。前者仅存在于原生质体内部, 后者在原生质体内外都存在。因此, 抗坏血酸是质体外抵抗氧化胁迫、并维持质体外氧化还原动态平衡的主要分子(Foyer 和 Noctor 2005)。已知质体外的抗坏血酸浓度可达到 mmol 级(Horemans 等 2000), 并能够在生物或非生物胁迫的诱导下产生快速的氧化还原状态变化(Hu 等 2005)。可见质体外抗坏血酸库的氧化还原状态是植物细胞感受并传导外界环境变化的关键信号(Pignocchi 等 2006)。

抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase, AO, EC 1.10.3.3)属于多铜氧化酶家族, 定位于细胞壁, 在植物界广泛存在(Sanmartin 等 2007)。它能将抗坏血酸氧化为单脱氢抗坏血酸, 从而调控植物质体外抗坏血酸库的氧化还原状态。近年来的研究表明, AO 对植物的逆境响应(Sanmartin 等 2003; Fotopoulos 等 2006)、基因表达(Pignocchi 等 2006)、生长发育和成花诱导(Yamamoto 等 2005)都可起调控作用, 这些调控机制均与质体外抗坏血酸库的氧化还原状态有关。本文就这方面的研究进展作介绍。

1 AO 的生理生化特性

1.1 催化机制 AO 定位于细胞壁(Sanmartin 等 2007), 催化原生质体外的抗坏血酸(ascorbate, AA)和氧反应生成单脱氢抗坏血酸(monodehy-

droascorbate, MDHA), MDHA 不稳定, 而后转变为脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA) (Gaspard 等 1997), 从而调节植物原生质体外抗坏血酸库的总体氧化还原状态。

质体外的 AA 占植物中 AA 总量的 10% 左右(Horemans 等 2000), 是调节质体外环境氧化还原状态的主要分子, 但与拥有多种抗氧化分子的胞内环境相比, 仅具有 AA 的质体外环境的氧化还原缓冲能力明显要低。因此, 当 AO 活性升高时, 质体外抗坏血酸库的氧化/还原比升高, 在质膜两侧产生明显的氧化还原梯度。这种梯度能够影响植物的多种生理活动, 包括调节生长发育(Pignocchi 等 2003)、气孔开闭(Chen 和 Gallie 2004)、胁迫响应(Fotopoulos 等 2006)、基因表达(Pignocchi 等 2006)、激素反应(Pignocchi 等 2006)、花期调控(Yamamoto 等 2005)等。表明 AO 在植物的逆境应答和生长发育调控中可能起作用。

1.2 酶学特征 AO 是一个同型二聚体铜蛋白, 分子量为 140 kDa, 共有 2 个亚基(每个亚基为 70 kDa)。对 AO 的晶体结构 X-射线衍射分析表明, 每个亚基大约有 550 个氨基酸残基, 有 3 个结构域, 分别是 Ser 31-Tyr 163 (结构域 1)、Asp 164-Ser 373 (结构域 2)和 Asn 374-Pro 579 (结构域 3)。每个亚基含有 4 个铜原子, 其中 3 个以三核铜簇(trinuclear copper)的形式存在于结构域 1 和 3 之间的交界处, 而另外一个铜原子则以单核形式(mononuclear

收稿 2007-12-07 修定 2008-01-03

资助 河南省自然科学基金(2007210015)。

* 通讯作者(E-mail: liuweiqun2004@126.com; Tel: 0371-63558722)。

copper)存在于结构域1上。这个三核铜簇被认为是AO和氧结合并储存电子的位点(Messerschmidt等1989)。另一个铜原子则被认为是和抗坏血酸结合的位点。酚类化合物能够和这一位点相结合,因此可作为抗坏血酸的竞争性抑制剂(Gaspard等1997),用来调节AO的催化活性。

2 AO的分子生物学特性

2.1 AO的基因 抗坏血酸氧化酶的cDNA最早从黄瓜(Ohkawa等1989)中获得,而后陆续在南瓜(Esaka等1990)、烟草(Kato等1996)中得到克隆。1994年,从黄瓜中分离到第一个AO的基因组DNA(Ohkawa等1994),而后在南瓜(Kisu等1997)、甜瓜(Sanmartin等2007)中也陆续克隆到AO的基因组DNA。

来源于不同植物的AO基因具有相似的结构。Kisu等(1997)从南瓜(*Cucurbita* sp.)中克隆到的AO基因由4个外显子和3个内含子组成,其中外显子的序列与不同来源AO的cDNA上的对应序列一致。基因的结构也与黄瓜中的AO基因结构一致。其中内含子1位于结构域1中,内含子2和3位于结构域2中,而结构域3中没有内含子。这与黄瓜中AO的内含子定位是一致的(Ohkawa等1994)。不同来源的AO基因具有不同的转录调控方式。如南瓜AO基因的转录调控区具有一个受生长素调控的顺式作用元件(Kisu等1997),而黄瓜AO基因的转录起始位点上游-736到-707 bp处存在一个响应伤害的顺式作用元件(Asao等2003)。推测AO基因的表达可受生长素或与伤害信号途径相关的分子的调控。Sanmartin等(2007)的研究表明,AO属于一个小的多基因家族,如甜瓜中含有4个AO基因,而且具有不同的表达特性。

2.2 AO的表达调控

2.2.1 光周期调节 AO在植物的光合组织中含量丰富(Smirnoff 2000),可能影响植物体内与光有关的生理变化。Pignocchi等(2003)发现烟草中AO的表达量受光调节,在黑暗条件下其表达量降至极低水平,而恢复光照后,其表达量缓慢上升,表明AO的表达受光的诱导。但对光周期控制培养的烟草进行检测后发现,AO的表达不受光周期节律控制。说明AO的表达仅受光的调控,而与

植物自身的昼夜节律(circadian rhythmicity)无关。而能够催化DHA还原为AA的脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)的活性受光照强度控制,早晨6点活性较低,午后2点和4点则较高,以后逐渐下降(Chen和Gallie 2004)。DHAR和AO都受光的诱导,两者共同作用调节原生质体内外AA库的氧化还原水平,影响与光有关的植物体内生理变化。

2.2.2 激素调节 生长素类激素,如NAA、2,4-D均能促进AO的表达量升高;而与胁迫信号途径相关的水杨酸(SA)分子则可引起AO的表达量下降。Pignocchi等(2003)用 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SA处理烟苗24 h后,顶芽中AO的表达量降低,继续培养1周后,烟苗的生长速度明显减缓;用 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAA处理24 h后,芽中AO的表达量增加,继续培养1周后,烟苗的生长没有发生明显的异常现象。Esaka等(1992)于MS培养基中添加 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2,4-D后,南瓜果实组织中的AO表达量增加。他们推测2,4-D会影响AO的表达量,继而影响原生质体外AA库的氧化还原状态(redox state),最终导致植物生长发育状态发生变化。Sanmartin等(2007)用不同生长调节物质处理甜瓜(*Cucumis melo*)后的结果显示,*Cm AO4*的表达量受ABA、IAA、SA和AA下调,受茉莉酸(JA)上调。已知JA能够促进细胞的伸展,ABA可以拮抗JA的效应(Takahashi等1995)。二者都能改变*Cm AO4*的表达量,表明AO参与生长调节物质诱导的植物生长发育调控。

2.2.3 铜离子调节 铜离子含量是影响AO合成的重要因素。Esaka等(1992)在南瓜愈伤组织的培养基中添加铜离子后,AO的含量明显上升。但Northern blotting分析表明,AO的mRNA含量并没有发生明显的变化,因此推测铜可能在翻译水平上对AO的酶量进行调节。但Sanmartin等(2007)用铜离子处理甜瓜后,AO表达量则上升。这可能由于不同植物对铜离子具有不同的响应方式所致。

2.3 AO的功能 AO基因在烟草中正义表达后的结果表明,正常条件下生长的转基因烟草的株型与野生型(WT)相比没有明显的不同(Fotopoulos等2006),原生质体内外的AA总量也没有明显变化,但还原态的AA含量有所减少,其中质体外

的AA含量减少30%以上(Sanmartin等2003)。但与野生型相比,转基因烟草对氧化胁迫具有更强的敏感性(Fotopoulos等2006)。如用100 nmol·mol⁻¹的臭氧处理后,转基因烟草的叶片受到大量损伤,而光饱和条件下的CO₂同化率和胞内RUBP羧化酶含量也明显减少(Sanmartin等2003)。Fotopoulos等(2006)的研究表明,AO过表达引起与AA循环有关基因的表达量下降,原生质体外氧化态的AA含量升高,使植物对氧化胁迫的耐受力降低。

在烟草中正义表达AO基因,还会引起一个编码质膜上双孔钙通道基因(two-pore Ca²⁺ channel, *NtTPC1B*)表达量的明显下降(Pignocchi等2006)。H₂O₂可激活门控电压钙通道*NtTPC1B*,已知NADPH氧化酶催化的氧化爆发(oxidative burst)能够产生H₂O₂(Foreman等2003),而NADPH氧化酶催化的氧化爆发与钙通道的激活相耦联(Torres和Dangl 2005)。因此认为,AO基因的正义表达可能会引起类似于NADPH氧化酶催化后的效应,从而导致原生质体外的H₂O₂含量升高,钙通道激活,*NtTPC1B*的表达丰度降低。

正义表达AO基因会促使烟草的生长速率增加,比AO反义表达的烟草高出30%(Pignocchi等2003)。正义表达AO基因还能导致烟草的开花期提前,花芽数减少,结实率降低。而反义表达AO基因造成的现象则相反(Yamamoto等2005)。这表明AO参与植物生长发育的调控,并与成花诱导有关。

正义表达AO能够影响植物对生长素的响应。Pignocchi等(2006)报道,当AO组成型表达时,外施生长素会导致烟草顶芽中的生长素响应和MAPK活性上升的现象消失。已经知道MAPK可受氧化信号激活,并介导生长素诱导的基因表达发生变化。因此,当AO组成型表达时,质体外呈现氧化态,并持续激活MAPK,以致MAPK对外界刺激的敏感性减小,此时再外施生长素,也不会对MAPK活性及其介导的下游基因的表达量产生明显影响。此外,Kerk等(2000)的研究指出,AO在玉米的根和拟南芥的顶芽中参与生长素代谢中的氧化脱羧基作用。说明AO的组成型表达会减少生长素含量。这两种效应相加会导致芽

中的生长素响应消失。

3 结语

胞外环境氧化还原状态的自我平衡是植物感知外界环境变化和启动激素信号转导途径的枢纽(Pignocchi等2006)。已有实验证明,植物的质体外环境对外界环境的变化非常敏感(Felle和Hanstein 2002; Felle 2006)。抗坏血酸氧化酶能够随环境或激素的变化而改变质体外环境的氧化还原状态,从而影响植物的多种生理过程。迄今人们对AO的分子结构、催化机制、表达调控和参与的生理现象已经进行了广泛研究,并取得一定的进展,但对AO和不同的信号途径之间的关系还不清楚。相信随着研究的不断深入,植物中AO的参与机制和所涉及的信号途径将会陆续得到阐明。

参考文献

- Asao H, Yoshida K, Nishi Y, Shinmyo A (2003). Wound-responsive *cis*-element in the 5'-upstream region of cucumber ascorbate oxidase gene. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 (2): 271~277
- Chen Z, Gallie DR (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 16: 1143~1162
- Esaka M, Fujisawa K, Goto M, Kisu Y (1992). Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol*, 100: 231~237
- Esaka M, Hattori T, Fujisawa K, Sakajo S, Asahi T (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells. *Eur J Biochem*, 191 (3): 537~541
- Felle HH (2006). Apoplastic pH during low-oxygen stress in barley. *Ann Bot*, 98: 1085~1093
- Felle HH, Hanstein S (2002). The apoplastic pH of the substomatal cavity of *Vicia faba* leaves and its regulation responding to different stress factors. *J Exp Bot*, 53: 73~82
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD et al (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422 (6930): 442~446
- Fotopoulos V, Sanmartin M, Kanellis AK (2006). Effect of ascorbate oxidase over-expression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *J Exp Bot*, 57 (14): 3933~3943
- Foyer CH, Noctor G (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17: 1866~1875
- Gaspard S, Monzani E, Casella L, Gullotti M, Maritano S, Marchesini A (1997). Inhibition of ascorbate oxidase by phenolic compounds. *Enzymatic and spectroscopic studies*.

- Biochemistry, 36 (16): 4852~4859
- Horemans N, Foyer CH, Potter G, Asard H (2000). Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol Biochem*, 38: 531~540
- Hu JF, Li GF, Cao ZH, Chen L, Ren HB, Jia WS (2005). Regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation by apoplastic ascorbic acid in maize seedlings. *J Integr Plant Biol*, 47: 1335~1344
- Kato N, Esaka M (1996). cDNA cloning and gene expression of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Mol Biol*, 30 (4): 833~837
- Kerk NM, Jiang K, Feldman LJ (2000). Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol*, 2 (122): 925~932
- Kisu Y, Harada Y, Goto M, Esaka M (1997). Cloning of the pumpkin ascorbate oxidase gene and analysis of a *cis*-acting region involved in induction by auxin. *Plant Cell Physiol*, 38: 631~637
- Messerschmidt A, Rossi A, Ladenstein R, Huber R, Bolognesi M, Gatti G, Marchesini A, Petruzzelli R, Finazzi-Agro A (1989). X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands. *J Mol Biol*, 206 (3): 513~529
- Ohkawa J, Ohya T, Ito T, Nozawa H, Nishi Y, Okada N, Yoshida K, Takano M, Shinmyo A (1994). Structure of the genomic DNA encoding cucumber ascorbate oxidase and its expression in transgenic plants. *Plant cell Re*, 13: 489~492
- Ohkawa J, Okada N, Shinmyo A, Takano M (1989). Primary structure of cucumber (*Cucumis sativus*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence: homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 1239~1243
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH (2003). The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol*, 132: 1631~1641
- Pignocchi C, Kiddle G, Hernandez I, Foster SJ, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer CH (2006). Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol*, 141: 423~435
- Sanmartin M, Drogoudi PA, Lyons T, Pateraki I, Barnes J, Kanellis AK (2003). Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*, 216 (6): 918~928
- Sanmartin M, Pateraki I, Chatzopoulou F, Kanellis AK (2007). Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress. *Planta*, 225 (4): 873~885
- Smirnoff N (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 229~235
- Takahashi Y, Ishida S, Nagata T (1995). Auxin-regulated genes. *Plant Cell Physiol*, 36: 383~390
- Torres MA, Dangl JL (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 397~403
- Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf AT, Takabe T (2005). Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *J Exp Bot*, 56: 1785~1796