

## 综述 Reviews

## 植物中钼的吸收转运及钼辅因子与钼酶的研究进展

刘利, 高东升\*

作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安271018

**摘要:** 钼是植物生长发育所必需的微量元素, 只有和蛋白质或者蝶呤结合形成钼辅因子才能产生生物活性。自然界存在2种钼辅因子: 以铁硫簇为基础的铁钼辅因子(FeMoco)和以钼蝶呤为基础的钼辅因子(MPT/Moco)。植物对钼的吸收有2种转运蛋白系统, 一种是专一性转运蛋白, 如MOT1和MOT2; 另一种是共转运蛋白, 如磷酸盐转运蛋白(PHT)和硫酸盐转运蛋白(SULTR)。最近研究发现一种钼酶——线粒体氨脒还原蛋白(mARC)。本文综述了近年来植物体内钼的吸收与转运机制、钼辅因子的合成过程以及钼酶的研究进展, 并提出了今后的重点研究方向。

**关键词:** 钼; 钼转运蛋白; 钼辅因子; 钼酶; 线粒体氨脒还原蛋白

钼是植物正常生长发育所必需的一种微量元素。岩石圈中钼的含量一般是 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 通常以 $\text{MoS}_2$ 、 $\text{PbMoO}_4$ 或 $\text{Fe}_2(\text{MoO}_4)_3$ 的形式存在(Kaiser等2005); 植物体内钼的含量一般是 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Gupta 1991)。在土壤中, 钼主要以钼酸根离子( $\text{MoO}_4^{2-}$ )的形式存在, 参与到各种生命过程中。土壤中有有效钼的含量是评价土壤供钼能力的指标, 钼的可利用性在高浓度的土壤氮素水平、低温以及低的土壤pH (<5.5)下较低(Nie等2014)。世界上很多地方土壤中的有效钼含量不能满足植物正常生长发育所需, 对于酸性土壤这一现象尤其严重(巫飞飞等2015)。据报导, 在我国大约有4 400多万ha耕地缺钼(Nie等2014), 生长在有效钼含量低的酸性黄棕壤上的冬小麦等作物出现了严重的缺钼症状(Yu等2010)。钼缺乏的症状有钼酶活性降低、氮饥饿反应、茎和叶发育受阻、叶枯斑病、种子发育不良、坐果率降低等(Martin和Meybeck 1979; Kaiser等2005; 巫飞飞等2015)。因此, 通过生物学技术手段提高植物钼的吸收转运及利用能力具有长远的经济效益和社会效益。

钼有多种化合价, 钼辅因子是钼酶的组成成分, 钼酶参与了生物体内的多种氧化还原反应。目前在细菌中已发现50多种钼酶(Leimkühler和Iobbi-Nivol 2015); 存在于植物中的钼酶有5种, 分别是硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR)、黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)、醛氧化酶(aldehyde oxidase, AO)、亚硫酸盐氧化酶(sulfite oxidase, SO)和线粒体氨脒还原蛋白(mitochondrial amidoxime reducing component, mARC)。植物通

过这些钼酶参与到氮、碳、嘌呤、激素和硫的代谢过程中。有报道称, 钼辅因子缺乏导致钼酶活性降低, 体内积累的亚硫酸盐、牛磺酸、S-磺酸半胱氨酸和硫代硫酸盐可引起严重的神经功能损伤, 甚至导致出生几周的婴儿夭折(Schwarz 2005; Nagappa等2015; Atwal和Scaglia 2016)。任何提高植物钼吸收利用能力的措施和技术手段都会在改善植物和人类钼缺乏方面发挥重要的作用。因此, 本文综述了植物对钼的吸收转运的生理分子机制、钼辅因子的合成过程以及钼酶的研究进展, 旨在为生产上的植物吸收转运利用钼元素提供理论支撑和技术支持。

### 1 钼吸收和转运系统

植物体内钼的稳态协调不但能够应对环境变化从而引起土壤中钼酸盐可利用性的变化, 而且可以保证细胞对钼的正常需求。矿质元素的吸收和转运在植物的生长、人类的营养健康和植物的生物学修复方面都起着重要的作用(Lahner等2003; 夏金蝉 2015)。最近几年发现了多种与钼转运有关的蛋白, 但是植物体内钼的吸收外排贮运和钼的稳态平衡等的机制还没有完全研究透彻。

植物中较少发生钼中毒现象, 钼外排有关蛋白的证实可以解释植物耐钼的原因。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) MOT1 (*Nit5*突变体)

收稿 2015-12-22 修定 2016-03-18

资助 国家自然科学基金(31372050)和山东省现代农业产业技术体系水果产业创新团队-栽培与设施装备建设专项(SDAIT-03-022-05)。

\* 通讯作者(E-mail: dsgao@sdau.edu.cn)。

的功能缺失表现出对高浓度(50 mmol·L<sup>-1</sup>)钼的耐受性(Llamas等2000)。高效的钼贮存机制也可以提高植物对钼的耐受能力,研究发现衣藻中的钼以钼辅因子的形式结合到钼辅因子载体蛋白(molybdenum cofactor carrier protein, MCP)上(Ataya等2003; Fischer等2006)。高等植物中没有发现MCP的同系物,但是在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现9个赖氨酸脱羧酶类似蛋白(钼辅因子结合蛋白, molybdenum cofactor binding protein, MBP)。研究表明这9个蛋白和衣藻中的MCP结构非常相似,但是只有其中的4个蛋白能够高效结合钼辅因子,这表明MBP可能存在其他的生物学功能(Kruse等2010)。另外一些研究表明,钼积累可能影响花青素和苹果酸的水平(Hale等2001; Steinke等2008; Tejada-Jiménez等2009)。由此可见这些化合物在植物体内钼的贮存方面起着重要的作用。

关于钼辅因子的合成迄今已做了大量的研究工作,但是,钼如何通过根部吸收转运到地上部以及以什么形式贮存在细胞内仍有待深入挖掘。最近的研究表明,钼转运蛋白可以控制细胞内的钼浓度,调控植物的生长发育过程。钼进入植物体内的方式一直存在着争议(Kaiser等2005)。一部分人发现根系对钼的吸收量与外界环境溶液中的钼浓度呈正相关,当降低温度以及加入抑制剂时并不影响根系对钼的吸收,因此认为钼是以被动的方式进入到植物体内的;但多数人认为植物对钼的吸收是需能主动运输过程。

原核生物主要通过对钼酸盐具有高亲和能力的转运系统ModABC来转运钼, ModABC由3种蛋白构成:钼酸盐结合蛋白(ModA)、膜通道蛋白

(ModB)和能量蛋白(ModC)。编码ModE和ModF的操纵子可以影响上述3种蛋白的合成, ModE由N末端DNA结合区域和C末端钼酸盐结合区域组成,它可以感受细胞质内的钼水平进而诱导ModA与钼酸盐结合; ModF在钼酸盐转运过程中的作用尚不清楚。另外两种转运钼酸盐的系统是ABC硫酸盐转运系统和非特异性阴离子转运系统(Mendel和Schwarz 2011; Zhang等2011; Hagen 2011)。

### 1.1 钼的专一性转运蛋白

植物中存在2种钼转运蛋白,一种是专一性转运蛋白,另一种是共转运蛋白。早期在衣藻中发现2种钼转运蛋白,一种是高亲和力低容量转运蛋白,一种是低亲和力高容量转运蛋白。拟南芥的硫转运蛋白(SULTR)家族的SULTR5.1和SULTR5.2后来被证实是钼的专一性转运蛋白的两个成员(AtMOT1;1和AtMOT1;2)。首次报道的衣藻和拟南芥中钼酸盐转运蛋白属于MOT1家族(Tejada-Jiménez等2007; Tomatsu等2007)。迄今为止,已经从植物、藻类、真菌和细菌中分离鉴定了MOT1蛋白,它们可能与钼的吸收转运以及钼的积累有关(Forsberg等2015)。

目前在莱茵衣藻的一个硝酸还原酶缺陷型株系21gr (*Nit5*)中发现了一个高亲和的钼转运蛋白基因MOT1,利用基因沉默技术研究发现MOT1的表达下调减少了MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>的转运, NR的活性也随之降低;同时在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中验证得知MOT1能转运MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Tejada-Jiménez等2007; 杨荣等2012)。

目前在拟南芥中发现了2个MOT1成员,分别是AtMOT1;1和AtMOT1;2(表1)。Tomatsu等(2007)

表1 植物中的钼转运蛋白

Table 1 Molybdenum transporters in plants

转运蛋白	特异性离子	$K_M/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	其他离子	位置	特点	参考文献
AtMOT1;1	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6	WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	叶绿体膜的有机组成部分、线粒体膜、线粒体和液泡	高亲和的钼转运蛋白,负责钼的跨膜转运	Tomatsu等2007
AtMOT1;2	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	—	WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	细胞、株型液泡膜和液泡	液泡中输出钼,钼离子的跨膜运输,把钼从叶子运输到种子中	Gasber等2011
CrMOT1	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	7~20	WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	细胞膜	吸收钼酸盐,细胞间钼酸盐转移分配	Tejada-Jiménez等2007
CrMOT2	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	550	WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	—	属于MFS超家族转运蛋白成员之一,高亲和钼转运蛋白	Tejada-Jiménez等2011
SHST1	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	10 000	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	—	转运SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 和MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Fitzpatrick等2008

在拟南芥At2g25680中插入外来基因片段(T-DNA), 从而鉴别出*AtMOT1;1*基因(先前的*Sultr5.2*)。AtMOT1;1是一种高亲和转运蛋白[米氏常数( $K_M$ )=6 nmol·L<sup>-1</sup>], 即使在土壤中钼含量很低的情况下也可以吸收转运钼, 其在根中和地上部均有表达, 在细胞中主要定位于细胞质膜和内膜上(Tomatsu等2007), 因此AtMOT1;1除了具有吸收钼酸盐的功能之外, 还具有细胞间钼酸盐转移分配的功能。但是, 也有报道称MOT1;1定位于线粒体膜上(Baxter等2008)。目前还没有足够的证据证实MOT1;1到底定位于哪个位置, 可能是绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合的不同位置导致了这一分歧, 比如GFP融合到MOT1;1的N末端或者MOT1;1的C末端(Tomatsu等2007; Baxter等2008; Gasber等2011)。β-葡萄糖苷酸酶(β-glucuronidase, GUS)染色显示表明, 在营养生长阶段, 根部和子叶柄能监测到AtMOT1;1活性; 在生殖生长阶段, 叶肉、叶柄、雄蕊、花萼和长角果中可监测到AtMOT1;1活性。共同存在的硫酸根离子(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)并不影响AtMOT1;1对钼的吸收, AtMOT1;1也不能弥补酵母中*SULTR*突变体对SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>的吸收, 这表明AtMOT1;1并不具备转运硫酸盐的功能, 因此其被认为是专一性的钼酸盐转运蛋白(Tomatsu等2007)。Ide等(2011)利用拟南芥钼转运突变体*Atmot1;1*详细地研究了钼缺乏效应, 转录组测序表明, 在缺钼的条件下约400个基因的转录水平发生变化, 包括NR、MYB转录因子和*SULTR3;5*得到诱导表达, 丝氨酸羧胺酶SCPL13的表达受到抑制。钼缺乏的植物体内氨基酸、糖、有机酸和嘌呤化合物的代谢也发生明显的改变(Ide等2011)。AtMOT1;2原来被称为AtMOT2, 但是这个蛋白已被证实属于MOT1家族的一员(Gasber等2011)。研究表明AtMOT1;2主要定位于液泡膜上, 是细胞内重要的钼酸盐储存蛋白; 和野生型相比, *AtMOT1;2*的T-DNA插入突变体*Atmot1;2*叶子中积累的钼较多, 而种子中积累的钼较少, 所以, AtMOT1;2在器官间的钼酸盐转移也起到非常重要的作用。

Tejada-Jiménez等(2011)从衣藻中分离出一个不属于MOT1家族的钼转运蛋白, 命名为CrMOT2。基因沉默技术表明CrMOT2只有在CrMOT1不存在的前提下才负责钼的吸收转运。CrMOT2也是专一

性高亲和转运蛋白,  $K_M$ 为550 nmol·L<sup>-1</sup> (表1)。但和CrMOT1不同的是, CrMOT2只有在钼饥饿处理的情况下其转录水平才上调, 由此看出CrMOT2表达调控依赖于钼的可利用性。以上的研究结果表明CrMOT1和CrMOT2在钼的稳态调节机制中扮演着不同的角色, CrMOT1可能与NR的活性有关, 而CrMOT2在钼缺乏的条件下调控体内钼的稳态平衡。同源蛋白分析表明MOT2存在于藻类、单子叶植物、双子叶植物和动物中。在酵母中异位表达人体的MOT2 (HsMOT2)发现其能够转运外界的MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mmol·L<sup>-1</sup>浓度水平), 这表明HsMOT2可能是人体的钼转运蛋白。到目前为止, CrMOT2是第一个从MOT2家族中被分离证实的钼转运蛋白, 而植物MOT2家族成员对钼的吸收转运功能有待深入研究。

## 1.2 钼的共转运蛋白

据报道, 植物细胞中的磷酸根离子(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>存在交互效应, *SULTR*和磷酸盐转运蛋白(phosphate transporter, PHT)也能够转运钼(Heuwinkel等1992; Stout和Meagher 1948)。番茄(*Lycopersicon esculentum*)中的PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>能促进钼的吸收而SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>降低钼的吸收(Stout和Meagher 1948)。钼酸盐与硫酸盐在根系表面发生竞争, 硫酸盐的存在能够抑制植物对钼的吸收(Stout等1951), 硫酸盐的缺乏常造成植物过量吸收钼, 因此推测硫酸盐和钼酸盐能够竞争根系相同的吸收转运位点(Alhendawi等2005)。在拟南芥中, 14种*SULTR*被分成5组, 前四组是姐妹群关系, 第五组似乎更加多样化, 但是从结构的角度来看, 显然属于*SULTR*家族的一员(Buchner等2004)。第五组*SULTR*家族包含2个亚型, 即*SULTR5.1*和*SULTR5.2* (Buchner等2004), 这两个亚型在C末端都缺少*SULTR anti-sigma* (STAS)结构域, 这个STAS结构域和细菌的*anti-sigma*因子拮抗剂类似。STAS结构域把*SULTR1.2*运输到拟南芥的细胞膜上, 不但影响*SULTR1.2*运输SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>的属性, 而且还能够结合SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>代谢酶(Shibagaki和Grossman 2004; Shibagaki和Grossman 2006; Shibagaki和Grossman 2010)。Alhendawi等(2005)指出硫酸盐的缺乏导致番茄钼的积累并促进钼在木质部中的运输, 推导植物根系可能通过细胞质膜上的硫酸盐转运系统来吸收转



运钼。已经首次证实植物能够通过一种SUL-TR——柱花草(*Stylosanthes hamata*)硫酸盐转运蛋白(ShST1)来吸收运输钼(Fitapatriek等2008)。Fitzpatrick等(2008)研究发现, ShST1可以转运 $\text{MoO}_4^{2-}$ , 两者化学结构相似, 所以 $\text{SO}_4^{2-}$ 是 $\text{MoO}_4^{2-}$ 的竞争离子。植物中的PHT也可以转运 $\text{MoO}_4^{2-}$ , Heuwinkel等(1992)利用同位素 $^{99}\text{Mo}$ 水培试验研究发现, 缺磷后番茄对钼的吸收显著提高, 当重新施磷后番茄对钼的吸收降低。Ide等(2011)在转录水平上的研究结果表明PHT也介导了钼酸盐的运输。

另外, 钼和铁代谢之间的关系得到初步推测: 首先, 钼和铁的吸收相互影响; 其次, 铁硫簇和亚铁血红素(heme)等是大多数钼酶的组成成分; 再者, 钼代谢需要铁硫簇的合成; 最后, 钼辅因子的合成和线粒体外的铁硫蛋白都与线粒体ABC转运蛋白的功能有关。

## 2 钼辅因子

钼单独存在于生物体时并不具有生物活性, 只有和蛋白质或者蝶呤结合形成钼辅因子才能发挥酶催化功能(Mendel和Schwarz 2011; Mendel和Hansch 2002; Srivastava等2016)。一旦形成辅基, 钼辅因子就成为了钼酶的活性中心, 钼的化合价态有+4、+5和+6价, 因此能够转移电子, 参与氧化还原反应(Hille 2013)。自然界存在2种控制钼的氧化还原状态和催化能力的辅因子: 以铁硫簇为基础的铁钼辅因子(iron-molybdenum cofactor, FeMoco)和以钼蝶呤(molybdopterin, MPT)为基础的钼辅因子(molybdopterin-molybdenum cofactor, MPT/Moco) (Mendel 2011; Gasber等2011; Schwarz等2009)。在固氮菌中发现了FeMoco, 它是固氮酶的组成成分之一, 把大气中的氮气还原为氨, 大豆中的根瘤菌也有类似的作用(Kneip等2007)。和以MPT为基础的钼辅因子不同的是, 固氮酶辅因子是钼结合到铁硫簇和高柠檬酸而形成的, 将其称为FeMoco (Hu和Ribbe 2013; Yokoyama和Leimkühler 2015)。

钼辅因子的合成一般可分为4步(图1) (Rajagopalan 1996; Leimkühler和Iobbi-Nivol 2015), 第一步是三磷酸鸟苷(GTP)的环化。在线粒体中, GTP转变成环吡喃蝶呤单磷酸(cPMP), 也就是前体Z (Hover等2015); 两个酶催化cPMP的形成。利用金

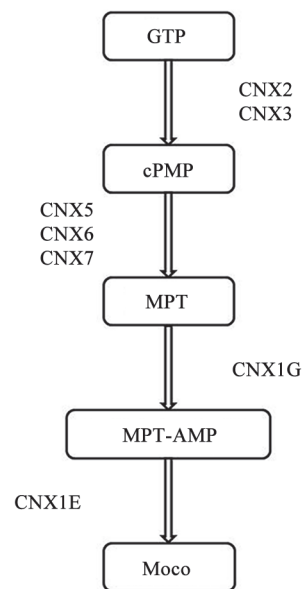


图1 植物中钼辅因子的合成通路

Fig.1 Plant Moco biosynthetic pathway

GTP: 三磷酸鸟苷; cPMP: 环吡喃蝶呤单磷酸; MPT: 钼蝶呤; MPT-AMP: 钼蝶呤-单磷酸腺苷; Moco: 钼辅因子; CNX1G: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子1的G结构域; CNX1E: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子1的E结构域; CNX2: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子2; CNX3: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子3; CNX5: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子5; CNX6: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子6; CNX7: 硝酸还原酶和黄嘌呤脱氢酶辅因子7。

黄色酿脓葡萄球菌的酶研究了这一反应(Hover等2013; Mehta等2013), 细菌的这一反应涉及2个蛋白——moaA和moaC (表2) (Mendel和Leimkühler 2015), 这两个蛋白和人类基因组中MOCS1A和MOCS1B蛋白同源(Reiss等1998), 也和植物基因组中CNX2 (S-腺苷甲硫氨酸自由基酶, SAM自由基酶)和CNX3 (六聚蛋白)同源。CNX2有2个氧敏铁硫簇(4Fe-4S), N末端铁硫簇参与到SAM的还原裂解反应从而产生5'-脱氧腺苷自由基, C末端铁硫簇与底物的结合和活化有关(Hänzelmann等2004)。目前关于CNX3的功能还不清楚, 然而SAM自由基酶中需要能够转移自由基的蛋白, 所以推测CNX3可能具有类似的功能(Hänzelmann和Schindelin 2006)。植物中编码CNX2和CNX3的基因位于不同的染色体上, 然而在人类基因组中双基因(两个连续的开放阅读框)编码MOCS1A和MOCS1B (Gross-Hardt和Reiss 2002)。拟南芥和衣藻的CNX2和CNX3蛋白N末端的延展部分携带靶信号。研究

表2 细菌、植物和人类的钼辅因子合成的相关蛋白及其所催化的反应

Table 2 Proteins for Moco biosynthesis in bacteria, plants and human and the catalyzed reactions

细菌	人类	植物	功能
MoaA	MOCS1A	CNX2	催化GTP形成3',8-cH <sub>2</sub> GTP
MoeB	MOCS3	CNX5	催化MPT合酶小亚基的腺苷酰化反应
MoaC	MOCS1B	CNX3	催化3',8-cH <sub>2</sub> GTP形成cPMP
MoaD	MOCS2A	CNX6	催化硫原子转移到cPMP上, 形成MPT
MoaE	MOCS2B	CNX7	结合cPMP, 形成MPT
MogA	GEPHYRIN-G	CNX1-G	催化形成MPT-AMP
MoeA	GEPHYRIN-E	CNX1-E	钼原子插入到MPT-AMP上, 形成Mo-MPT

表明, 拟南芥的CNX2和CNX3蛋白位于线粒体中 (Teschner等2010), 因为CNX2发挥作用需要铁硫簇的参与, 而铁硫簇存在于线粒体中。cPMP形成后在ATM3的作用下跨线粒体膜进入到细胞质中, ATM3位于线粒体的内膜上, 属于ABC转运蛋白家族的一员 (Teschner等2010)。这些线粒体转运蛋白不仅与细胞内铁硫蛋白的熟化有关, 而且在植物体中能起到抵抗重金属的作用 (Kim等2006)。Teschner等(2010)发现拟南芥ATM3突变体*Atatm3*的NR和SO的活性降低, 依赖铁硫簇的XDH和AO的活性未被检测到。人体细胞中同样需要这个转运蛋白, 其名称为ABC7 (D'Hooghe等2012)。

第二步是MPT的合成。cPMP被转运到细胞质中后 (Teschner等2010), 在MPT合酶的作用下, 两个硫原子插入到cPMP的C1'和C2'端, 从而形成MPT (Pitterle等1993; Daniels等2008)。细菌的MPT合酶形成了由2个MoaD和2个MoaE亚单位组成的( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>异二聚体, 第一个硫原子在MoaD作用下加入到cPMP的C2'端, 然后MoaD从MPT合酶混合物上脱离, 再形成新的MoaD分子, 把硫原子插入到cPMP的C1'端, MPT形成后从MPT合酶异二聚体上释放。MoeB催化MoaD中硫原子的重新形成 (Leimkühler等2001; Schindelin 2005)。人类基因组中, MOCS2编码MPT合酶的2个亚基, MOCS2A和MoaD同源, MOCS2B和MoaE同源, MOCS3和MoeB同源 (表2)。植物与MPT合酶有关的是CNX6 (MoaD)和CNX7 (MoaE), MoeB/MOCS3的同源物是CNX5 (Gutzke等2001)。植物的MPT合酶是由2个小亚基(CNX7)和2个大亚基(CNX6)组成的异二聚体, MPT合酶的每个小亚基携带一个硫原子, 因此MPT二硫纶(dithiolene)的形成分为2步 (Wueb-

bens和Rajagopalan 2003)。MPT的合成可能不是催化反应, 因此在每一步反应中都要重新形成MPT合酶 (Tejada-Jiménez等2013), MPT合酶在硫化酶CNX5的作用下再硫化得以重新激活。

第三步是MPT的活化。上一步形成的MPT在整合钼原子之前需要进行腺苷酰化反应, 从而形成钼蝶呤-单磷酸腺苷(MPT-AMP) (Kuper等2004)。大多数的真核生物需要含有2个结构域的蛋白来催化MPT的腺苷酰化反应, 比如拟南芥的CNX1 (G结构域和E结构域)。有研究证明拟南芥CNX1可以结合到细胞骨架上 (Schwarz等2000), 这可能有利于钼高效地整合到MPT上。拟南芥CNX1G的晶体结构阐明了MPT腺苷酰化反应的动力学机制, MPT在Mg<sup>2+</sup>和ATP的作用下进行腺苷酰化反应形成MPT-AMP, 从而结合到CNX1G上, CNX1G-MPT-AMP复合体的晶体结构表明铜原子需要结合到MPT二硫纶的两个硫原子之间 (Kuper等2004)。有关铜在钼辅因子合成过程中功能的研究尚不清楚, 其可能在硫转移的反应中保护MPT二硫纶上的硫原子, 也可能提高钼整合到MPT上的效率。但有关研究表明1 mmol·L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>可以抑制钼辅因子的合成 (Kuper等2004), 因此研究钼辅因子的合成过程中铜和钼的关系以及合成条件有重要的生物学意义。

第四步是钼插入到MPT上。在MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和Zn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>存在的前提下, MPT-AMP和钼原子绑定到CNX1E结构域上, 然后MPT-AMP发生去腺苷酰化反应 (Llamas等2006), 最后在CNX1的作用下, 钼插入到MPT上形成有活性的钼辅因子 (Joshi 1996)。而在细菌和古生菌中, 钼辅因子的合成分成5步, 第五步是对钼辅因子进一步的修饰, 也就是在

MPT上加入单磷酸核苷酸(Neumann等2011; Reschke等2013)。大肠杆菌的钼辅因子的合成涉及到*moa* (*moaABCDE*)、*mob* (*mobAB*)、*moc* (*mocA*)、*moe* (*moeAB*)和*mog* (*mogA*)五个基因位点(Shanmugam 1992), 这些位点以操纵子的形式组织起来, 共编码11个蛋白, 其中的9个蛋白与钼辅因子合成有关的功能已得到研究(Rajagopalan 1996; Shanmugam 1992)。在人体中, 与钼辅因子合成有关的基因和蛋白质一般用MOCS (*molybdenum cofactor synthesis*)命名(Mendel和Schwarz 2011; Reiss等1998; Reiss 2000)。目前人类基因组中已鉴定出4个编码钼辅因子生物合成酶的基因(*MOCS1*、*MOCS2*、*MOCS3*和*GEPH*), 编码6种与钼辅因子合成有关的蛋白, 分别是MOCS1A、MOCS1B、MOCS2A、MOCS2B、MOCS3和GEPHYRIN (Mendel和Kruse, 2012)。在原核和真核生物中, 蝶呤型钼辅因子的生物合成既有保守性, 也有差异性。植物中与钼辅因子合成有关的基因和蛋白质的命名为CNX (*cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase*) (Tejada-Jiménez等2013)。人体中有5种酶含有钼辅因子, 分别是SO、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)、AO以及两个mARC: mARC1和mARC2 (Duran等1978; Duran等1996; Mendel和Kruse 2012; Hille等2011)。

### 3 钼酶

根据钼辅因子的结构组成和催化功能将钼酶分为两大家族: 含FeMoco的固氮酶和含MPT的钼酶(Schwarz等2009)。Hille等(2014)把含MPT的钼酶分为3类, XO家族、SO家族和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)还原酶家族。植物中含钼辅因子的钼酶有5种: NR、XDH、SO、AO和mARC (Schwarz 2005; Chamizo-Ampudia等2011)。

#### 3.1 NR

NR广泛存在于植物和微生物中, 属于DMSO还原酶家族成员(Coelho和Romão, 2015)。NR是高等植物氮同化过程中的关键限速酶, 可直接调节硝酸盐的还原, 从而调节氮代谢, 并影响光合碳代谢(Kovács等2015)。NR是一种诱导性酶, 受硝酸根和钼共同诱导。钼是NR的活性成分, 参与硝态氮还原为亚硝态氮的过程, 缺钼会影响植物对氮的吸收与利用(喻敏和王运华1999; 孙学成和胡承

孝2005; Kovács等2015)。NR是一种可溶性的钼黄素蛋白, 分子量约为210 kDa, 为同型二聚体, 每个单体的分子量约为105 kDa, 它由C末端结构域黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)、中心结构域以heme作为辅基的细胞色素 $b_5$  (*cytb<sub>5</sub>/heme*)和N末端结构域钼辅因子组成, 这三个结构域形成3个氧化还原中心, 把电子从NAD(P)H经过FAD、heme和钼辅因子传递到硝酸盐(Campbell 1999; Kisher等1998; Zhou等2015)。根据细胞位置、结构和功能的不同, NR可分为周质型硝酸盐还原酶(periplasmic nitrate reductase, Nap)、细胞质型硝酸盐还原酶(cytoplasmic nitrate reductase)和膜结合型硝酸盐还原酶(membrane-bound nitrate reductase) (Sparacino-Watkins等2014a; Coelho和Romão 2015)。研究发现NLP、LBDs和HY5等转录因子可以调控高等植物NR的表达(Yanagisawa 2014)。目前已克隆出拟南芥、小白菜(*Brassica Campestris* ssp. *chinensis*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、大豆(*Glycine max*)、番茄、大麦(*Hordeum vulgare*)、玉米(*Zea mays*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、豆梨(*Pyrus calleryana*)和桑树(*Morus alba*)等作物上的NR基因(丁广洲等2011; 孙淑斌等2006; 李慧等2014; 王茜龄等2015)。

#### 3.2 AO

AO是含有2个150 kDa亚基的二聚体, 存在于细胞质中, FAD、铁硫簇和钼辅因子是其单体(Sekimoto等1997; Bittner和Mendel 2009; Atwal和Scaglia 2016)。目前已克隆出拟南芥、玉米和番茄的AO基因(Sekimoto等1997; Sekimoto等1998; Ori等1997)。拟南芥存在4个AO基因: *AO1*、*AO2*、*AO3*和*AO4*。AO在植物体激素合成中有重要作用, 具有广泛的底物特异性。AO同工酶可以以脱落醛、吲哚-3-醛、吲哚-3-乙醛和苯甲醛为底物, 催化合成脱落酸(abscisic acid, ABA)和吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA) (Seo等2004)。另有研究表明, 在干旱胁迫和外源ABA处理下AO能诱导植物产生 $H_2O_2$  (Yesbergenova等2005)。由此可见, AO对植物的生长发育和生理调节起着重要的作用。

#### 3.3 XDH

XDH和XO可催化相同的底物, 但电子受体不



一样,得到的产物也就不同。XDH是以脱氢酶形式存在于植物的多种组织与器官中,以氧化酶形式存在于动物的多种组织与器官中。目前绿藻(*Chlorophyta*)、豆类作物根瘤和小麦(*Triticum aestivum*)叶片中的XDH已被分离纯化(Boland 1981; Pérez-Vecinte等1992; Bittner和Mendel 2009; Yu等2010)。拟南芥基因组中发现了2个高度同源串联复制的XDH基因: *AtXDH1*和*AtXDH2*。*AtXDH1*与XDH的活性密切相关,抗性条件下诱导表达,而*AtXDH2*复制表达(Hesberg等2004)。拟南芥XDH含有2个相同的亚基,是一种同型二聚体,结构分子量为300 kDa,每个亚基含有1个钼辅因子、1个FAD和4个铁硫簇组分(Hille等2011)。*AtXDH1*主要利用黄嘌呤和次黄嘌呤作为底物,电子从底物传给 $\text{NAD}^+$ ,当 $\text{NAD}^+$ 的浓度很低时,分子氧可以作为替代的电子受体产生超氧阴离子(Hesberg等2004; Yesbergenova等2005; Zarepour等2010)。XDH参与植物的生理代谢过程,可调控植物的生长发育、衰老和繁殖(Nakagawa等2007; Brychkova等2008)。

### 3.4 SO

SO被证实是植物体中第四种钼酶,存在于过氧化物体中(Hille等2014)。拟南芥的SO是一种分子量为90 kDa的二聚体,以氧作为电子受体产生硫酸盐、超氧阴离子和 $\text{H}_2\text{O}_2$  (Byrne等2009)。但是,衣藻中的SO位于线粒体中,是一种二聚体,每个亚单位分子量约为55 kDa,并且每个亚单位包含一个N末端 $\text{cyt}b_5$ 结构域和C末端钼辅因子结构域(Gérin等2010)。植物硫代谢过程中产生亚硫酸盐,在叶绿体中当硫酸盐转化为3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAPS)后可以被重新吸收(Hänsch等2007)。但有报道称亚硫酸盐可以重新氧化回硫酸盐,比如,当存在 $\text{SO}_2$ 气体或用放射性亚硫酸盐标记分离出的叶绿体,在黑暗或明亮的条件下就能检测出SO活性,因此推测SO可能参与到叶绿体中的硫酸盐的同化过程中。植物SO是迄今为止植物中发现的最小的钼酶,能以细胞色素、铁氰化物或染料代替钼催化亚硫酸的氧化,氧化植物体内过量的亚硫酸盐,以防止中毒(Atwal和Scaglia 2016)。

### 3.5 ARC

最近在原核和真核生物中发现了一种新的钼

酶——ARC (Havemeyer等2006; Kozmin等2008; Sparacino-Watkins等2014b)。有证据表明在细菌羟基氨基嘌呤(6-*N*-hydroxylaminopurine, HAP)类似物毒性试验中发现钼酶参与到*N*-羟基化合物(*N*-hydroxylated compounds, NHC)的还原反应,因此推测这个蛋白可能参与NHC的还原过程(Kozmin等2000)。尽管这个钼酶目前还没有得到分离证实,但是先前的研究发现ARC能将几种氨基前体药物转变成氨基形式(Havemeyer等2006)。这个转变过程类似于HAP转变为腺嘌呤的过程——把NHC还原为相应的氨基形式。人体含有2种ARC蛋白, hmARC1和hmARC2, 两者序列和功能高度同源。hmARC2位于线粒体外膜上,是新的信号锚定蛋白(Klein等2012)。mARC属于钼酶SO家族(Chamizo-Ampudia等2011; Hille等2014),这两种蛋白与由ARC酶、 $\text{cyt}b_5$ 和 $\text{NADH-cyt}b_5$ 还原酶组成的三组分系统有关(Havemeyer等2006; Havemeyer等2011; Atwal和Scaglia 2016),因此把这个复合体命名为ARCO (amidoxime reducing complex)。目前已研究了细菌和衣藻中的ARCO的组成(Kozmin 2010; Chamizo-Ampudia等2011),但是人体中的钼如何结合到ARC上尚不清楚(Wahl等2010)。在草本单子叶和双子叶植物中也发现了ARC (图2),拟南芥的两个ARC氨基酸序列和核苷酸序列高度同源,衣藻中仅有一个ARC (Llamas等2011),但是两者ARC蛋白的亚细胞定位有待研究发现(Llamas等2011)。

植物体的ARC蛋白有2个保守结构域: N末端 $\beta$ -barrel结构域和钼辅因子-硫化酶羧基端结构域(Moco-sulfurase carboxy-terminal domain, MOSC)。目前关于ARCO的生理学功能还不清楚。可以利用基因沉默或超表达等生物技术来研究ARCO的功能。ARC的结构与功能的进一步探索也将成为未来研究的重点。

## 4 展望

了解矿质元素、基因、蛋白质和代谢分子之间的功能关系是后基因组时代的重大挑战。近年来,钼酶和钼辅因子的研究取得了较快的进展。总体来说,生物体内钼辅因子的合成大体保守,但是原核生物和真核生物中的钼辅因子合成途径不完全一致。植物体内钼辅因子合成过程中的一些

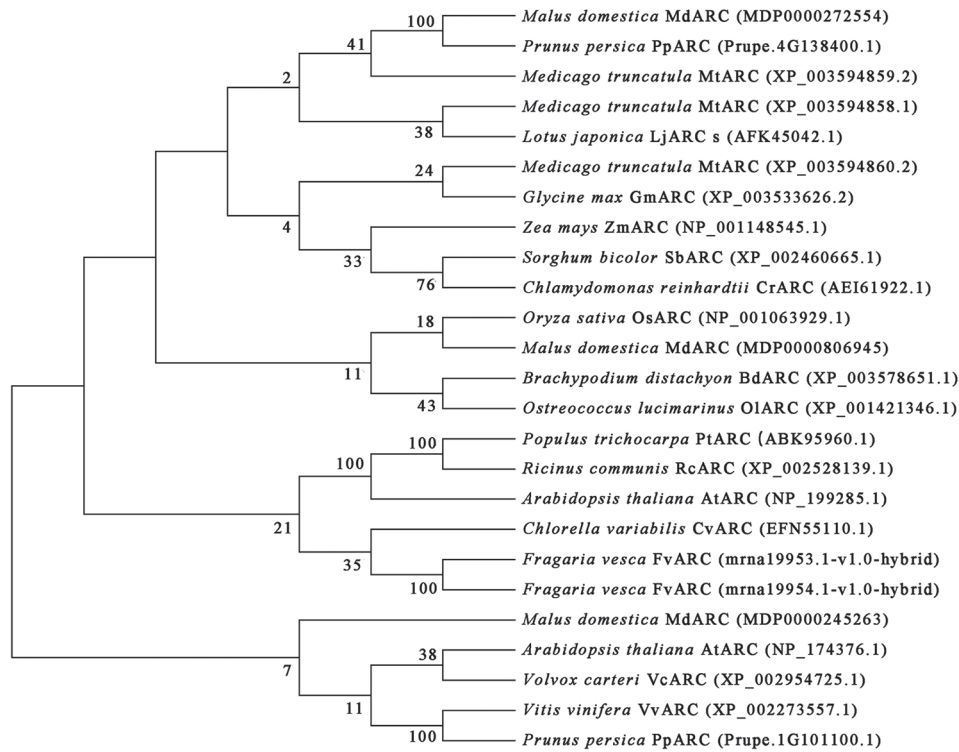


图2 ARC家族同源蛋白的进化树  
Fig.2 Phylogenetic tree of ARC homologous proteins

蛋白和酶已被鉴定和克隆出,并且一些钼高效转运蛋白也被相继发现,但是关于植物体内钼的平衡机制的一些关键环节还不大清楚,比如说,有没有一种钼转运蛋白可以把钼运输到植物不同的组织用来平衡细胞内钼的浓度?钼如果在植物细胞和组织中过量存在应该如何解决?各种钼转运蛋白及其与钼辅因子合成有关的蛋白亚细胞定位尚不完全清楚;细胞中钼辅因子合成途径和生物体如何调控钼辅因子的合成之间的联系、MPT和钼辅因子在细胞内的运输以及钼辅因子结合到钼酶上的方式还需要进一步的研究,这也是今后研究的重点;植物体内ARCO系统的功能研究报道较少,有待进一步加强。这些科学问题的解决对于生产上缺钼地区的植物提高钼的吸收利用效率具有重要的理论和实践意义。

#### 参考文献

- Alhendawi RA, Kirkby EA, Pilbeam DJ (2005). Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. *J Plant Nutr*, 28 (8): 1347–1353
- Ataya FS, Witte CP, Galván A, Igeño MI, Fernández E (2003). *Mcp1*

encodes the molybdenum cofactor carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii* and participates in protection, binding, and storage functions of the cofactor. *J Biol Chem*, 278 (13): 10885–10890

- Atwal PS, Scaglia F (2016). Molybdenum cofactor deficiency. *Mol Genet Metab*, 117 (1): 1–4
- Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot ML, et al (2008). Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (*MOT1*). *PLoS Genet*, 4 (2): e1000004
- Bittner F (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Front Plant Sci*, 5: 28
- Bittner F, Mendel RR (2009). Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta*, 1763 (7): 621–635
- Boland MJ (1981).  $\text{NAD}^+$ : xanthine dehydrogenase from nodules of navy beans: partial purification and properties. *Biochem Int*, 2 (6): 567–574
- Brychkova G, Alikulov Z, Fluhr R, Sagi M (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant J*, 54 (3): 496–509
- Buchner P, Stuiiver CEE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ (2004). Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric  $\text{H}_2\text{S}$  and pedospheric sulfate nutrition. *Plant*



- Physiol, 136 (2): 3396–3408
- Byrne RS, Hänsch R, Mendel RR, Hille R (2009). Oxidative half-reaction of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase: generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. *J Biol Chem*, 284 (51): 35479–35484
- Campbell WH (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50 (1): 277–303
- Chamizo-Ampudia A, Galvan A, Fernandez E, Llamas A (2011). The *Chlamydomonas reinhardtii* molybdenum cofactor enzyme crARC has a Zn-dependent activity and protein partners similar to those of its human homologue. *Eukaryot Cell*, 10 (10): 1270–1282
- Coelho C, Romão MJ (2015). Structural and mechanistic insights on nitrate reductases. *Protein Sci*, 24 (12): 1901–1911
- Daniels JN, Wuebbens MM, Rajagopalan KV, Schindelin H (2008). Crystal structure of a molybdopterin synthase-precursor Z complex: insight into its sulfur transfer mechanism and its role in molybdenum cofactor deficiency. *Biochemistry*, 47 (2):615–626
- D’Hooghe M, Selleslag D, Mortier G, Van Coster R, Vermeersch P, Billiet J, Bekri S (2012). X-linked sideroblastic anemia and ataxia: a new family with identification of a fourth *ABC7* gene mutation. *Eur J Paediatr Neurol*, 16: 730–735
- Ding G, Hou J, Chen L, Ma F, Chen L (2011). Cloning and sequence analysis of NADH-NR gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biotechnol Bull*, (10): 90–96 (in Chinese with English abstract). [丁广洲, 侯静, 陈丽, 马凤鸣, 陈连江 (2011). 甜菜 NADH-NR 基因的克隆和序列分析. *生物技术通报*, (10): 90–96]
- Duran M, Beemer FA, vd Heiden C, Korteland J, de Bree PK, Brink M., Wadman SK, Lombeck I (1978). Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport? *J Inher Metab Dis*, 1 (4): 175–178
- Duran M, de Bree PK, de Klerk JBC, Dorland L, Berger R (1996). Molybdenum-cofactor deficiency: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Pediatr Int*, 11: 334–338
- Fischer K, Llamas A, Tejada-Jimenez M, Schrader N, Kuper J, Ataya FS, Galvan A, Mendel RR, Fernandez E, Schwarz G (2006). Function and structure of the molybdenum cofactor carrier protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 281 (40): 30186–30194
- Fitzpatrick KL, Tyerman SD, Kaiser BN (2008). Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS Lett*, 582 (10): 1508–1513
- Forsberg SKG, Andreatta ME, Huang XY, Danku J, Salt DE, Carlborg Ö (2015). The multi-allelic genetic architecture of a variance-heterogeneity locus for molybdenum accumulation acts as a source of unexplained additive genetic variance. *PLoS Genet*, 11 (11): e1005648
- Gasber A, Klamann S, Trentmann O, Tranmpczynska A, Clemens S, Schneider S, Sauer N, Feifer I, Bittner F, Mendel RR, et al (2011). Identification of an *Arabidopsis* solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biol*, 13: 710–718
- Gérin S., Mathy G, Blomme A, Franck F, Sluse FE (2010). Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii*: the logic of *aox1* gene localization. *Biochim Biophys Acta*, 1797 (6): 994–1003.
- Gross-Hardt S, Reiss J (2002). The bicistronic *MOCS1* gene has alternative start codons on two mutually exclusive exons. *Mol Genet Metab*, 76 (4), 340–343
- Gupta UC (1991). Boron, molybdenum and selenium status in different plant parts in forage legumes and vegetable crops. *J Plant Nutr*, 14 (6): 613–621
- Gutzke G, Fischer B, Mendel RR, Schwarz G (2001) Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J Biol Chem*, 276 (39): 36268–36274
- Hagen WR (2011). Cellular uptake of molybdenum and tungsten. *Coord Chem Rev*, 255 (9): 1117–1128
- Hale KL, McGrath SP, Lombi E, Stack SM, Terry N, Pickering IJ, George GN, Pilon-Smits EAH (2001). Molybdenum sequestration in *Brassica* species. A role for anthocyanins? *Plant Physiol*, 126 (4): 1391–1402
- Hänsch R, Lang C, Rennenberg H, Mendel RR (2007). Significance of plant sulfite oxidase. *Plant Biol*, 9 (5): 589–595
- Hänzelmann P, Hernández HL, Menzel C, García-Serres R, Huynh BH, Johnson MK, Mendel RR, Schindelin H (2004). Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*, 279 (33): 34721–34732
- Hänzelmann P, Schindelin H (2006). Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (18): 6829–6834
- Havemeyer A, Bittner F, Wollers S, Mendel R, Kunze T, Clement B (2006). Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem*, 281 (46): 34796–34802
- Havemeyer A, Lang J, Clement B (2011). The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Meta Rev*, 43 (4): 524–539
- Hesberg C, Hänsch R, Mendel RR, Bittner F (2004). Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J Biol Chem*, 279 (14): 13547–13554
- Heuwinkel H, Kirkby EA, Le Bot J, Marschner H (1992). Phosphorus deficiency enhances molybdenum uptake by tomato plants. *J Plant Nutr*, 15 (5): 549–568
- Hille R (2013). The molybdenum oxotransferases and related enzymes. *Dalton Trans*, 42 (9): 3029–3042
- Hille R, Hall J, Basu P (2014). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev*, 114 (7): 3963–4038
- Hille R, Nishino T, Bittner F (2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord Chem Rev*, 255 (9): 1179–1205
- Hover BM, Lilla EA, Yokoyama K (2015). Mechanistic investigation of cPMP synthase in molybdenum cofactor biosynthesis using an uncleavable substrate analogue. *Biochemistry*, 54 (49), 7229–7236

- Hover BM, Loksztajn A, Ribeiro AA, Yokoyama K (2013). Identification of a cyclic nucleotide as a cryptic intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 135: 7019–7032
- Hu Y, Ribbe MW (2013). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Biol Chem*, 288 (19): 13173–13177.
- Ide Y, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Tomatsu H, Saito K, Hirai MY, Fujiwara T (2011). Effects of molybdenum deficiency and defects in molybdate transporter MOT1 on transcript accumulation and nitrogen/sulphur metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 62 (4): 1483–1497
- Joshi MS, Johnson JL, Rajagopalan KV (1996) Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli mod* and *mog* mutants. *J Bacteriol*, 178 (14): 4310–4312
- Kaiser BN, Gridley KL, Brady JN, Phillips T, Tyerman SD (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann Bot*, 96 (5): 745–754
- Kim DY, Bovet L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E, Lee Y (2006). AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140 (3): 922–932
- Kisker C, Schindelin H, Baas D, Rétey J, Meckenstock RU, Kroneck PMH (1999). A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol Rev*, 22 (5): 503–521.
- Klein JM, Busch JD, Potting C, Baker MJ, Langer T, Schwarz G (2012). The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 287 (51): 42795–42803
- Kneip C, Lockhart P, Voß C, Maier UG (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes – new models for symbiosis. *BMC Evol Biol*, 7 (1): 55
- Kovács B, Puskás-Preszner A, Huzsvai L, Lévai L, Bódi É (2015). Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 96: 38–44.
- Kozmin SG, Leroy P, Pavlov YI, Schaaper RM (2008). *YcbX* and *yiiM*, two novel determinants for resistance of *Escherichia coli* to *N*-hydroxylated base analogues. *Mol Microbiol*, 68 (1): 51–65
- Kozmin SG, Pavlov YI, Dunn RL, Schaaper RM (2000). Hypersensitivity of *Escherichia coli*  $\Delta$  (*uvrB-bio*) mutants to 6-hydroxylaminopurine and other base analogs is due to a defect in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Bacteriol*, 182 (12): 3361–3367
- Kozmin SG, Wang J, Schaaper RM (2010). Role for CysJ flavin reductase in molybdenum cofactor-dependent resistance of *Escherichia coli* to 6-*N*-hydroxylaminopurine. *J Bacteriol*, 192 (8): 2026–2033
- Kruse T, Gehl C, Geisler M, Lehrke M, Ringel P, Hallier S, Hänsch R, Mendel RR (2010). Identification and biochemical characterization of molybdenum cofactor-binding proteins from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 285 (9): 6623–6635
- Kuper J, Llamas A, Hecht HJ, Mendel RR, Schwarz G (2004). Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature*, 430 (7001), 803–806
- Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinet ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, et al (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 21 (10): 1215–1221
- Leimkühler S, Iobbi-Nivol C (2015). Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes. *FEMS Microbiol Rev*, 40 (1): 1–18
- Leimkühler S, Wuebbens MM, Rajagopalan KV (2001). Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of molybdopterin synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J Biol Chem*, 276 (37): 34695–34701
- Li H, Cong Y, Chang YH, Lin J, Sheng BL (2014). Cloning, expression and enzyme activity analysis of nitrite reductase gene from *Pyrus calleryana*. *J Fruit Sci*, 31 (5): 760–768 (in Chinese with English abstract) [李慧, 丛郁, 常有宏, 蔺经, 盛宝龙(2014). 豆梨NADH型硝酸还原酶基因克隆、表达及酶活性分析. 果树学报, 31 (5): 760–768]
- Llamas A, Kalakoutsii KL, Fernández E (2000). Molybdenum cofactor amounts in *Chlamydomonas reinhardtii* depend on the *Nit5* gene function related to molybdate transport. *Plant Cell Environ*, 23 (11): 1247–1255
- Llamas A, Otte T, Multhaupt G, Mendel RR, Schwarz G (2006). The mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin: a novel route toward metal cofactor assembly. *J Biol Chem*, 281 (27): 18343–18350
- Llamas Á, Tejada-Jiménez M, Fernández E, Galván A (2011). Molybdenum metabolism in the alga *Chlamydomonas* stands at the crossroad of those in *Arabidopsis* and humans. *Metallomics*, 3 (6), 578–590.
- Martin JM, Meybeck M (1979). Elemental mass-balance of material carried by major world rivers. *Mar Chem*, 7 (3): 173–206
- Mehta AP, Abdelwahed SH, Begley TP (2013). Molybdopterin biosynthesis: trapping an unusual purine ribose adduct in the MoaA-catalyzed reaction. *J Am Chem Soc* 135: 10883–10885
- Mendel RR (2011). Cell biology of molybdenum in plants. *Plant Cell Rep*, 30 (10): 1787–1797
- Mendel RR, Hansch R (2002). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J Exp Bot*, 53 (375): 1689–1698
- Mendel RR, Kruse T (2012). Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim Biophys Acta*, 1823 (9): 1568–1579
- Mendel RR, Leimkühler S (2015). The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *J Biol Inorg Chem*, 20 (2): 337–347
- Mendel RR, Schwarz G (2011). Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans. *Coord Chem Rev*, 255 (9): 1145–1158.
- Nagappa M, Bindu PS, Taly AB, Sinha S, Bharath RD (2015). Child Neurology: molybdenum cofactor deficiency. *Neurology*, 85 (23): e175–e178.
- Nakagawa A, Sakamoto S, Takahashi M, Morikawa H, Sakamoto A (2007). The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility and accelerates leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Physiol*, 48 (10): 1484–1495
- Neumann M, Seduk F, Iobbi-Nivol C, Leimkühler S (2011). Molybdopterin dinucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of amino acid residues of molybdopterin dinucleotide transferases that determine specificity for binding of guanine or cytosine nucleotides. *J Biol Chem*, 286 (2): 1400–1408
- Nie Z, Hu C, Liu H, Tan Q, Sun X (2014). Differential expression of molybdenum transport and assimilation genes between two win-

- ter wheat cultivars (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol Biochem*, 82: 27–33
- Ori N, Eshed Y, Pinto P, Paran I, Zamir D, Fluhr R (1997). TAO1, a representative of the molybdenum cofactor containing hydroxylases from tomato. *J Biol Chem*, 272 (2): 1019–1025
- Pérez-Vecinte R, Alamillo JM, Cárdenas J, Pineda M (1992). Purification and substrate inactivation of xanthine dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*, 1117 (2): 159–166
- Pitterle DM, Johnson JL, Rajagopalan KV (1993). *In vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor: role of protein-bound sulfur in formation of the dithiolene. *J Biol Chem*, 268 (18): 13506–13509
- Rajagopalan KV (1996). Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: Neidhardt FC (ed). *Escherichia coli and Salmonella*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 674–679
- Reiss J (2000). Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum Genet*, 106 (2): 157–163
- Reiss J, Christensen E, Kurlmann G, Zobot MT, Dorche C (1998). Genomic structure and mutational spectrum of the bicistronic *MOCSI* gene defective in molybdenum cofactor deficiency type A. *Hum Genet*, 103 (6): 639–644
- Reschke S, Sigfridsson KGV, Kaufmann P, Leidel N, Horn S, Gast K, Schulzke C, Haumann M, Leimkühler S (2013). Identification of a bis-molybdopterin intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 288: 29736–29745
- Schindelin H (2005). Evolutionary origin of the activation step during ubiquitin-dependent protein degradation. In: Mayer RJ, Ciechanover A, Rechsteiner M (eds). *Protein Degradation: Ubiquitin and the Chemistry of Life*. Vol 1. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 21–43
- Schwarz G (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci*, 62 (23): 2792–2810
- Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW (2009). Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, 460 (7257): 839–847
- Schwarz G, Schulze J, Bittner F, Eilers T, Kuper J, Bollmann G, Nerlich A, Brinkmann H, Mendel RR (2000). The molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell*, 12: 2455–2471
- Sekimoto H, Seo M, Dohmae N, Takio K, Kamiya Y, Koshiba T (1997). Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J Biol Chem*, 272 (24): 15280–15285
- Sekimoto H, Seo M, Kawakami N, Komano T, Desloire S, Liotenberg S, Marion-Poll A, Caboche M, Kamiya Y, Koshiba T (1998). Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 39 (4): 433–442
- Seo M, Aoki H, Koiwai H, Kamiya Y, Nambara E, Koshiba T (2004). Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (*AAO*) gene family revealed a major role of *AAO3* in ABA biosynthesis in seeds. *Plant Cell Physiol*, 45 (11): 1694–1703
- Shanmugam KT, Stewart V, Gunsalus RP, Boxer DH, Cole JA, Chippaux M, DeMoss JA, Giordano G, Lin ECC, Rajagopalan KV (1992). Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 6 (22): 3452–3454
- Shibagaki N, Grossman AR (2004). Probing the function of STAS domains of the *Arabidopsis* sulfate transporters. *J Biol Chem*, 279 (29): 30791–30799
- Shibagaki N, Grossman AR (2006). The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *J Biol Chem*, 281 (32): 22964–22973
- Shibagaki N, Grossman AR (2010). Binding of cysteine synthase to the STAS domain of sulfate transporter and its regulatory consequences. *J Biol Chem*, 285 (32): 25094–25102
- Sparacino-Watkins C, Stolz J F, Basu P (2014a). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem Soc Rev*, 43 (2): 676–706
- Sparacino-Watkins CE, Tejero J, Sun B, Gauthier MC, Thomas J, Raggireddy V, Merchant BA, Wang J, Azarov I, Basu P, et al (2014b). Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *J Biol Chem*, 289 (15): 10345–10358
- Srivastava S, Pathak M, Pandey H, Tripathi S, Garg R, Misra-Bhattacharya S, Arora A (2016). Molecular characterization of novel immunodominant molybdenum cofactor biosynthesis protein C1 (*Rv3111*) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*, 1860 (4): 694–707
- Steinke DR, Majak W, Sorensen TS, Parvez M (2008). Chelation of molybdenum in *Medicago sativa* (Alfalfa) grown on reclaimed mine tailings. *J Agric Food Chem*, 56 (13): 5437–5442
- Stout PR, Meagher WR (1948). Studies of the molybdenum nutrition of plants with radioactive molybdenum. *Science*, 108 (2809): 471–473
- Stout PR, Meagher WR, Pearson GA, Johnson CM (1951). Molybdenum nutrition of crop plants. *Plant Soil*, 3 (1): 51–87
- Sun SB, Luo JK, Xu GH, Hu J, Chen W, Shen QR (2006). Cloning and characterization of nitrate reductase gene in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*). *Plant Nutr Fert Sci*, 12 (4): 592–596 (in Chinese) [孙淑斌, 罗金葵, 徐国华, 胡江, 陈巍, 沈其荣(2006) 小白菜硝酸还原酶基因的克隆与初步鉴定. *植物营养与肥料学报*, 12 (4): 592–596]
- Sun XC, Hu CX (2005). Molybdoenzymes and molybdenum nutrition in higher plants. *Plant Physiol Commum*, 41 (3): 395–399 (in Chinese) [孙学成, 胡承孝 (2005). 高等植物含钼酶与钼营养. *植物生理学通讯*, 41 (3): 395–399]
- Tejada-Jiménez M, Chamizo-Ampudia A, Galván A, Fernández E, Llamas Á (2013). Molybdenum metabolism in plants. *Metallomics*, 5 (9): 1191–1203
- Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E (2011). Algae and humans share a molybdate transporter. *Proc Nati Acad Sci USA*, 108 (16): 6420–6425
- Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E, Llamas Á (2009). Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. *Curr Opin Plant Biol*, 12 (3): 358–363
- Tejada-Jiménez M, Llamas Á, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E (2007). A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proc Nati Acad Sci USA*, 104 (50): 20126–20130



- Teschner J, Lachmann N, Schulze J, Geisler M, Selbach K, Santamaria-Araujo J, Balk J, Mendel RR, Bittner F (2010). A novel role for *Arabidopsis* mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell*, 22 (2): 468–480
- Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T (2007). An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (47): 18807–18812
- Wahl B, Reichmann D, Niks D, Krompholz N, Havemeyer A, Clement B, Messerschmidt T, Rothkegel M, Biester H, Hille R, et al (2010). Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J Biol Chem*, 285 (48): 37847–37859
- Wang XL, Yu YS, Yang Y, Li J, Liu CY, Lu RH, Yu MD (2014). Cloning and expression analysis of nitrate reductase gene (*MaNR*) of *Morus L.* *Sci Agr Sin*, 47 (12): 2465–2475 (in Chinese with English abstract) [王茜龄, 余亚圣, 杨艳, 李军, 刘长英, 吕蕊花, 余茂德(2014). 桑树硝酸还原酶基因 *MaNR* 的克隆及其表达分析. *中国农业科学*, 47 (12): 2465–2475]
- Wu FF, Shen ZL, Cai YP, Lin Y, Gao JS (2015). Screening and phenotypic analysis of Mo-sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 51 (2): 171–177 (in Chinese with English abstract) [巫飞飞, 沈知临, 蔡永萍, 林毅, 高俊山(2015). 拟南芥 Mo 敏感突变株的筛选和表型分析. *植物生理学报*, 51 (2): 171–177]
- Wuebbens MM, Rajagopalan KV (2003). Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J Biol Chem*, 278 (16): 14523–14532
- Xia JC (2015). Uptake and transport of boron in plants. *Plant Physiol J*, 51 (9): 1381–1386 (in Chinese with English abstract) [夏金蝉 (2015). 植物对硼元素的吸收与转运. *植物生理学报*, 51 (9): 1381–1386]
- Yanagisawa S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Sci*, 229: 167–171
- Yang R, Qiu WH, Wang ZH, Wang XY (2012). Effects of nitrate reductase inhibitor  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  on nitrate accumulation in oilseed rape. *Plant Physiol J*, 48 (1): 51–56 (in Chinese with English abstract) [杨荣, 邱炜红, 王朝辉, 王小英(2012). 硝酸还原酶抑制剂钨酸钠对油菜硝态氮积累的影响. *植物生理学报*, 48 (1): 51–56]
- Yesbergenova Z, Yang G, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M (2005). The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant J*, 42 (6): 862–876
- Yokoyama K, Leimkühler S (2015). The role of FeS clusters for molybdenum cofactor biosynthesis and molybdoenzymes in bacteria. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*, 1853 (6): 1335–1349
- Yu M, Hu CX, Sun XC, Wang YH (2010). Influences of Mo on nitrate reductase, glutamine synthetase and nitrogen accumulation and utilization in Mo-efficient and Mo-inefficient winter wheat cultivars. *Agr Sci China*, 9 (3): 355–361
- Yu M, Wang YH (1999). Molybdenum in plants. *Chin Bull Bot*, 16 (5): 547–554 (in Chinese with English abstract) [喻敏, 王运华. 高等植物中的钼. *植物学通报*, 16 (5): 547–554]
- Zarepour M, Kaspari K, Stagge S, Rethmeier R, Mendel RR, Bittner F (2010). Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Mol Biol*, 72 (3): 301–310
- Zhang Y, Rump S, Gladyshev VN (2011). Comparative genomics and evolution of molybdenum utilization. *Coord Chem Rev*, 255 (9): 1206–1217
- Zhou Z, He H, Ma L, Yu X, Mi Q, Pang J, Tang G, Liu B (2015). Overexpression of a *gmCnx1* gene enhanced activity of nitrate reductase and aldehyde oxidase, and boosted mosaic virus resistance in soybean. *PLoS ONE*, 10 (4): e0124273

## Advances in molybdenum uptake and translocation, molybdenum cofactors and molybdenum enzymes in plants

LIU Li, GAO Dong-Sheng\*

*State Key Laboratory of Crop Biology; Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency; College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China*

**Abstract:** Molybdenum (Mo) is an essential element for plant growth and development. Mo is bioavailable after binding to protein or pterin to form Mo cofactor. In nature, there are two kinds of Mo cofactors, iron-molybdenum cofactor (FeMoco) and pterin-based molybdenum cofactor (MPT/Moco). Two transporter systems for assimilating molybdenum exist in plants. One is the specific transporter, such as MOT1 and MOT2. The other is the co-transporter, such as phosphate transporter and sulfate transporter. A new Mo enzyme, mitochondrial amidoxime reducing component (mARC), was found in recent researches. This paper reviews the progresses of domestic and abroad researches about the synthesis process of Mo cofactors, transporters and enzymes in plants, and the focus of future Mo research.

**Key words:** molybdenum; molybdenum transporter; molybdenum cofactor; molybdenum enzyme; mitochondrial amidoxime reducing component

---

Received 2015-12-22 Accepted 2016-03-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31372050), and the Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province on Fruit Industry: Cultivation and Facility Equipment (Grant No. SDAIT-03-022-05).

\*Corresponding author (E-mail: dsgao@sdau.edu.cn).