

高等植物 ABA 醛氧化酶的研究进展

杨丽霞, 万小荣, 李 玲

(华南师范大学 生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 中国广东 广州 510631)

摘要: ABA 醛氧化酶催化 ABA 生物合成最后一步反应, 是 ABA 合成途径的重要步骤。拟南芥 *AO3* 基因编码由 1 332 个氨基酸组成的 $AO\delta$ 蛋白, 具有 ABA 醛氧化酶性质, 参与拟南芥叶片的 ABA 生物合成和调节, 其在钼辅因子硫化后才具有活性。 *AO3* 由 10 个外显子和 9 个内含子组成, 其 cDNA 全长含有 198 bp 5'-非翻译区域, 3 999 bp 开放阅读框架区域和 121 bp 3'-非翻译区域, 含有与 2 个铁硫中心和 5 个钼辅因子结合有关的基序, 均为醛氧化酶的保守序列。

关键词: 脱落酸; ABA 醛氧化酶; 钼辅因子

中图分类号: Q74 Q945

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S0-0090-06

Advances in Abscisic Aldehyde Oxidase in Higher Plants

YANG Li-xia¹, WAN Xiao-rong¹, LI Ling¹

(1. Guangdong Provincial Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China)

Abstract: Abscisic aldehyde oxidase catalyzes the final step in ABA biosynthesis pathway, which is one of the important steps in the pathway. *Arabidopsis AO3* gene encodes $AO\delta$ of 1 332 aa which is an abscisic aldehyde oxidase and involved in ABA biosynthesis and its regulation; abscisic aldehyde oxidase is activated when molybdenum cofactor is sulfurized and its distribution has organ specificity. The full-length *AO3* cDNA includes 10 exons and 9 introns and exhibits a 198 bp 5'-untranslated region, followed by a 3 999 bp ORF and a 121 bp 3'-untranslated sequence, and the protein contains the conserved sequence for two iron-sulfur centers and five motifs involved in Moco binding.

Key words: Abscisic acid; Abscisic aldehyde oxidase; molybdenum cofactor

(*Life Science Research*, 2004, 8(2): 090 ~ 095)

脱落酸 (Abscisic acid, 简称 ABA) 是一种应
激激素, 在植物抵抗外界环境胁迫时起着重要的

作用, 如热、盐、干旱、冷等环境条件及除草剂等都
能影响 ABA 在植物体内的水平^[1]。由于分子生物

收稿日期: 2004-04-05; 修回日期: 2004-05-10

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(03098)和广东省教育厅 2002 年“千百十工程”优秀人才培养基金(Q02090)资助

作者简介: 杨丽霞 (1981-), 女, 河南安阳人, 华南师范大学研究生; 万小荣 (1977-), 男, 江西南昌人, 华南师范大学研究生; 李玲 (1958-), 女, 湖南桂阳人, 华南师范大学教授, 博士生导师, 通讯作者, 从事植物生理和植物激素研究, Tel: +86-020-85211378, E-mail: lilab@senu.edu.cn.

学技术的发展,近年来,基本阐明了高等植物 ABA 生物合成途径,确认玉米黄质环氧化酶(zeaxanthin epoxidase, ZEP), 9-顺环类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NECD), 短链醇脱氢酶/还原酶(short-chain alcohol dehydrogenase/reductase, SDR)和 ABA 醛氧化酶(Abscisic aldehyde oxidase)^[2]催化的反应是 ABA 合成途径的重要步骤。对 ABA 生物合成最后一步的研究始于 20 世纪 70 年代,由 ABA 醛氧化酶将 ABA 醛氧化为 ABA^[3]。

醛氧化酶(aldehyde oxidase, AO)是钼(molybdenum, Mo)单加氧酶和 Fe-S 黄素蛋白家族的成员之一^[4],涉及到多种化合物的代谢过程。动物 AO 是一种同源二聚体,含有两个完全相同的亚基,为 150 kD,有 4 个氧化中心,两个铁硫中心,一个黄素辅因子和一个钼辅因子(molybdenum cofactor, MoCo)^[5]。Huang 等^[6]已经从兔子、猪等动物中分离酶并鉴定出其特定的功能:如参与一些异源物的解毒,视黄酸合成等生理生化反应。研究者已证实燕麦胚芽鞘^[7]、马铃薯块茎^[8]、黄瓜

幼苗^[9]和豌豆幼苗^[10]中有 AO 活性,但对该酶的生理作用、基因结构与分子生物学功能的了解不清楚。近年来,植物体内 ABA 醛氧化酶引起广泛的关注,以期全面阐明 ABA 生物合成途径,了解 ABA 作用分子机理及对胁迫调节的功能。本文介绍 ABA 醛氧化酶新的研究进展。

1 ABA 醛氧化酶的特性

植物体内存在的 ABA 醛氧化酶最先在拟南芥叶片中发现^[11]。拟南芥 AO α 和 AO β 分别是 AO1 和 AO2 产物的同源二聚体, AO γ 是这两个基因产物的异源二聚体, AO δ 由 AO3 基因编码,具有 ABA 醛氧化酶性质^[11](图 1)。AO δ 不仅催化 ABA 醛氧化生成 ABA,也催化 3-吲哚醛氧化生成 IAA,两种底物的 K_m 值不同,ABA 醛为底物时 K_m 值为 0.51 μ mol/L,低于 3-吲哚醛氧化反应的 K_m 值,表明 AO δ 主要作用于 ABA 生物合成,用气-质联用仪(GC-MS)证实氧化产物是 ABA,此酶不能辨别 ABA 醛(+)和(-)对映体^[11]。



图 1 ABA 醛氧化酶催化反应

Fig. 1 The catalytic activity of Abscisic aldehyde oxidase

AO 必须在钼辅因子硫化后才具有活性。Sagi 等^[12]发现在番茄 *fla* 突变体的离体茎及野生型番茄提取物中,存在 AO 蛋白,经 Na₂S 硫化后激活钼辅因子。Xiong 等^[13]证实 LOS5/ABA3 编码钼辅因子硫化酶,其催化双氧形式的钼辅因子变成硫酸化的单氧形式,后者是 ABA 醛氧化酶活性所必须的。钼辅因子含有一个 Mo 原子与 S 原子配位,在组织中高度保守,参与氧化还原反应中氧原子的转移。干旱、ABA、NaCl 和 PEG 处理后 LOS5/ABA3 的转录水平迅速上升,冷害处理没有明显效果^[13]。

2 ABA 醛氧化酶基因

拟南芥醛氧化酶基因 AO3 (ABO16622) 的结构如图 2(A),由 10 个外显子和 9 个内含子组成,其 cDNA 全长含有 198 bp 5'-非翻译区域,3 999 bp 开放阅读框架(open reading frame, ORF)区域和 121 bp 3'-非翻译区域,编码蛋白质由 1 332 个氨基酸组成,分子质量为 146.665 kD,含有与 2 个铁硫中心和 5 个钼辅因子结合有关的基序,均为醛氧化酶的保守序列^[11]。Seo 等^[11]发现干旱胁迫可诱导拟南芥叶片中 AO3、AO4 表达。拟南芥 AO4 在脱水叶片中表达,但产物的功能仍然未知^[11]。

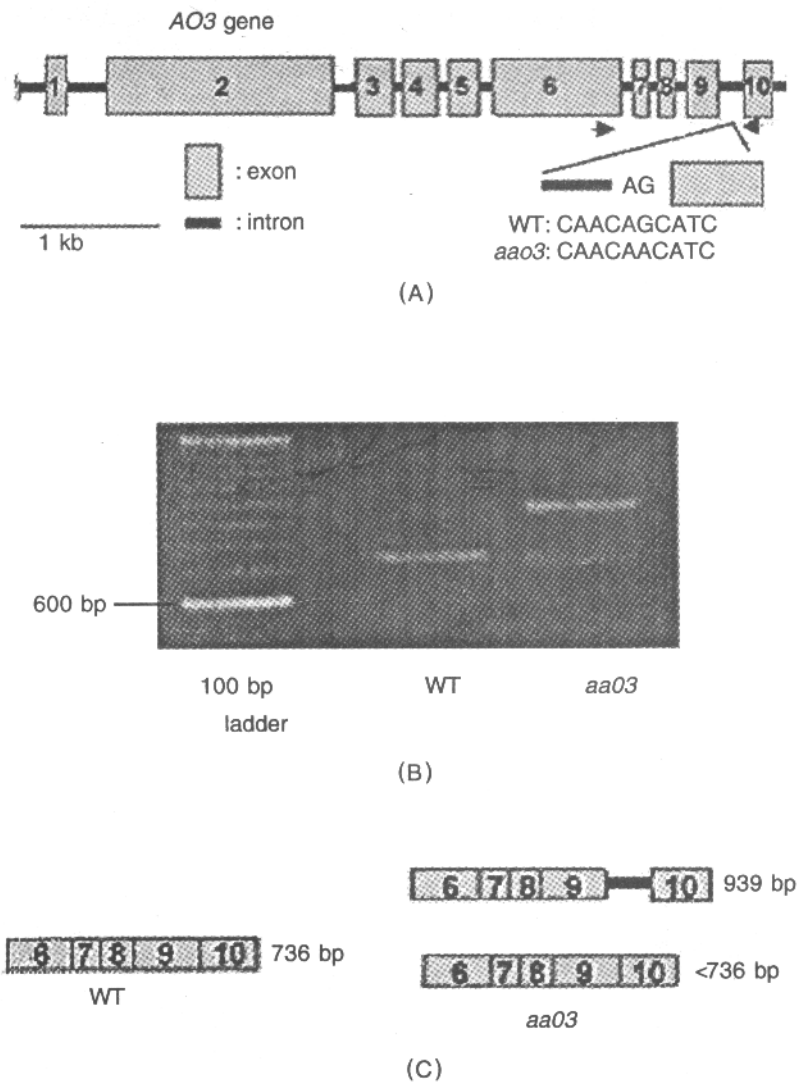


图2 拟南芥 *AO3* 和 *aao3* 的结构和表达^[14]

(A) 拟南芥 *AO3* 基因结构和第9个内含子末端突变位置. 箭头表示野生型和 *aao3* 作 RT-PCR 设计引物的位置, WT 表示野生型 (B) 用总 RNA 作 RT-PCR, 引物如 (A) 所示 (C) 解释从野生型和 *aao3* 中检测到的 RT-PCR 结果.

Fig. 2 Structure and expression of *AO3* and *aao3* in *Arabidopsis*

(A) Structure of the *AO3* gene and location of the mutation at the end of the ninth intron. Arrows indicate the position where primers for RT PCR were designed. WT, wild type; (B) RT-PCR fragments obtained from cDNAs synthesized from total RNA prepared from rosette leaves using primers represented in (A); (C) Illustration of RT-PCR fragments detected in wild type and *aao3*.

拟南芥 *AO* mRNA 分布具有器官特异性. 拟南芥 8 d 龄整株幼苗和 2 个月龄成熟植株的根、莲座叶 (rosette leaves)、茎、花和长角果分别用 4 种 cDNA 探针 (*AO1*、*AO2*、*AO3* 和 *AO4*) 通过 Northern 印迹法分析 *AO* 转录水平, 检测到与 cD-

NA 开放阅读框相符合的 4.5 kb 的 RNA^[11] (表 1). *AO* 基因的器官特异性表达表明 *AO* 基因编码的 *AO* 在拟南芥中起不同作用. *AO3* 基因编码产物 *AO δ* , 其活性在叶片中高, 与叶片是 ABA 生物合成主要部位相符合.

表 1 拟南芥 AOs mRNA 在植株中分布的器官特异性
Table 1 Organ distribution of AOs mRNA in *Arabidopsis*

	幼苗	根	叶	茎	花	长角果
A01	++	++				++
A02	+	+				
A03		+	++			
A04						++

注: + 表示 AO 在此器官中表达量一般; ++ 表示 AO 在此器官中表达量较高

Notes: + represents AO is expressed in the tissue; ++ represents AO is highly expressed in the tissue

3 ABA 醛氧化酶功能

对 ABA 醛氧化酶及其功能的了解, 主要来自 AO 突变体的研究结果 (表 2)。醛氧化酶脱辅基蛋白质突变或钼辅因子合成的缺失导致酶活性丧失。拟南芥 *aba3*^[13] 和 *aao3*^[14]、烟草 *aba1*^[15]、

番茄 *flacca* 和 *sitiens*^[3] 皆缺乏醛氧化酶活性, 除 *sitiens* 和 *aao3* 外, 均由钼辅因子合成缺失所致。推测番茄突变体 *sitiens*^[3] 和拟南芥 *aao3*^[14] 是因为 ABA 醛特异的醛氧化酶结构基因发生突变。但是, 与 *sitiens* 相应的基因尚未克隆。

表 2 ABA 醛氧化酶基因突变体
Table 2 Abscisic aldehyde oxidase gene mutants

突变体	物种	酶	文献
<i>flc</i>	番茄	钼辅因子硫化酶	[16]
<i>aba3 / los5 / gin5</i>	拟南芥	钼辅因子硫化酶	[13]
<i>sit</i>	番茄	醛氧化酶	[17]
<i>aba1</i>	烟草	钼辅因子硫化酶	[15]
<i>nar2A</i>	大麦	钼辅因子合成	[18]
<i>aao3</i>	拟南芥	ABA 醛氧化酶	[14]

在 *aao3* 突变体叶片中 ABA 水平只是野生型的 1/3, 水分胁迫后 ABA 增长水平远远低于野生型莲座叶的水平。*aao3* 植株的长角果和干种子中 ABA 总量减少 (约为野生型的一半) 低于莲座叶中 ABA 水平减少量^[14], 在莲座叶中检测不到 AO δ 活性, 后来实验证明突变发生在 *AO3* 基因的第 9 个内含子末端, 由 G 替换为 A (图 2(A))。Seo 等^[14] 用野生型和 *aao3* 突变体的总 RNA 作 RT-PCR 结果如图 2(B)。

Seo 等^[14] 证实 *AO3* 基因产物 AO δ 是一种醛氧化酶, 在拟南芥莲座叶中起作用。将拟南芥 *AO3* 基因导入 *aao3* 突变体植株中, 结果使突变体 (*c-aao3*) 具 AO δ 活性, 切除根部 1 h 后, *c-aao3* 突变体的萎蔫表型与野生型相同, 该实验结果为证实 ABA 醛氧化酶参与 ABA 的生物合

成提供证据。

番茄 ABA 醛氧化酶可能由 *Sitiens* (*Sit*⁻)^[17] 基因编码。与 *flacca* (*flc*) 和 *notabilis* (*not*) 突变体相比, *Sitiens* (*Sit*⁻) 突变体过度失水表现出更明显的 ABA 缺乏症^[17]。*Sit* 与 *aao3* 突变体在种子休眠方面不同, *aao3* 种子休眠, 而 *sit* 突变体种子不发生休眠^[2]。番茄 *sit* 突变体这种表型, 可能是因为 *Sit*⁻ 编码的醛氧化酶可能负责所有器官中 ABA 生物合成。

大麦和烟草钼辅因子缺乏型突变体缺乏 AO 和 XDH 活性, 几乎完全丧失合成 ABA 的能力^[18]。番茄 *flacca* 突变体缺乏醛氧化酶和黄嘌呤脱氢酶活性, 仍存在硝酸还原酶活性^[19], 表明钼辅因子合成基因的表达不受影响。拟南芥 *aba3* 突变体^[13] 将第 3 个硫原子插入到 AO 和 XDH 钼中心能

力减弱. 烟草 *aba1* 和番茄 *flacca* 突变体产生钼辅因子的能力可能不受损, 但 M_o 单加酶的硫化作用受影响^[4].

脱水迅速诱导拟南芥莲座叶 *AO3* 基因表达, 证实 ABA 醛氧化酶的功能. 而 *AO3* mRNA 在完整叶片中也大量表达^[11]. 即使在非胁迫叶片中, *AO3* 也参与 ABA 生物合成. *AO3* 拟南芥突变体 *aa03* 叶片中, ABA 水平低于野生型, 水分胁迫后

ABA 浓度的增加也受影响^[20]. 表明 *AO3* 参与拟南芥叶片的 ABA 生物合成和调节.

很多植物在水分缺乏条件下内源 ABA 水平增加^[21]. 离体拟南芥叶片 ABA 浓度增加5倍^[22]. 2个月龄的拟南芥植株莲座叶脱水 0、3、6、9 h 迅速诱导 *AO3* 表达(图 3). 根中 *AO3* 表达与水分胁迫没有关系, 拟南芥 *AO3* 蛋白水平并不随转录水平变化^[11].

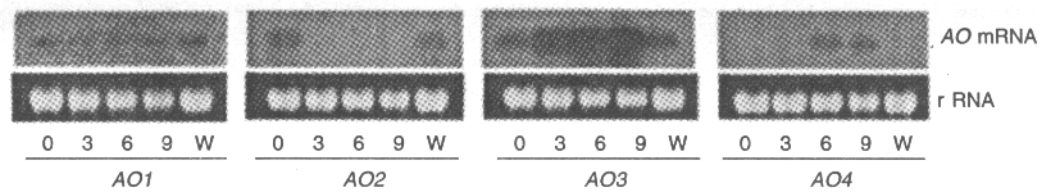


图 3 水分胁迫后 *AO* 基因在拟南芥叶片中的表达^[11]

从离体 0、3、6、9 h 以及正常水分条件的拟南芥叶片中提取总 RNA.

Fig. 3 *AO* gene expression in *Arabidopsis* leaves after water stress

Total RNA was prepared from detached rosette leaves(0, 3, 6, 9 h after dehydration) and from a wet control (w).

4 结语

多年来 ABA 生物合成关键酶 *ZEP*、*NCED* 研究较多, 但 ABA 醛氧化酶研究缓慢. ABA 醛氧化酶为多基因家族, 对其功能的鉴定较为复杂. 目前确认拟南芥 *AO3* 是 ABA 醛氧化酶, 主要在叶片中起作用; 推测 *AO4* 可能也具有 ABA 醛氧化酶功能, 但它是否和 *AO3* 一样表达具有器官特异性仍不清楚. 其它类型的 ABA 醛氧化酶是否参与 ABA 生物合成还有待进一步研究. 由于有关 ABA 醛氧化酶作用的证据主要来自拟南芥、番茄等模式植物, 尚无农作物的研究, 本实验室正从花生中克隆 ABA 醛氧化酶基因, 进行分子生物学分析, 建立花生转化系统, 获取高水平 ABA 转基因植株, 深入探讨 ABA 提高花生抗旱性的分子机制.

参考文献 (References):

- [1] GROSSMANN K, SCHELTRUP F, KWIATKOWSKI J, *et al.* Induction of abscisic acid is a common effect of auxin herbicides in susceptible plants[J]. *J Plant Physiol*, 1996, 149: 475-478.
- [2] 陶均, 李玲. 高等植物脱落酸生物合成的酶调控[J]. *植物学通报*, 2002, 19(6): 675-683.
- [3] TAYLOR I B, LINFORTH RST, AL-NAIEB R J, *et al.* The

wilty tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA[J]. *Plant, Cell and Environment*, 1988, 11: 739-745.

- [4] OMAROV R T, AKABA Shuichi, *et al.* Aldehyde oxidase in roots, leaves and seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50: 63-69.
- [5] BARBER M J, COUGHLAN M P, RAJAGOPALAN K V, *et al.* Properties of the prosthetic groups of rabbit liver aldehyde oxidase: a comparison of molybdenum hydroxylase enzymes[J]. *Biochemistry*, 1982, 21: 3561-3568.
- [6] HUANG D Y, ICHIKAWA Y. Two different enzymes are primarily responsible for retinoic acid synthesis in rabbit liver cytosol[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205: 1278-1283.
- [7] RAJAGOPAL R. Metabolism of indole-3-acetaldehyde. III. Some characteristics of aldehyde oxidase of *Avena* coleoptiles [J]. *Physiology Plantarum*, 1971, 24: 272-281.
- [8] ROTHE G M. Aldehyde oxidase isoenzymes (EC 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*) [J]. *Plant Cell Physiology*, 1974, 15: 493-499.
- [9] BOWER P J, BROWN H M, PURVES W K. Cucumber seedling indole acetaldehyde oxidase[J]. *Plant Physiology*, 1978, 61: 107-110.
- [10] MIYATA S, SUZUKI Y, KAMISAKA S, *et al.* Indole-3-acetaldehyde oxidase of pea seedlings[J]. *Physiologia Plantarum*, 1981, 51: 402-406.
- [11] SEO M, KOIWAI H, AKABA S, *et al.* Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2000,

- 23(4): 481-488.
- [12] SAGI M, FLUHR R, LIPS H S. Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a *flacca* tomato mutant with deficient abscisic and wilty phenotype[J]. Plant Physiology, 1999, 120: 571-577.
- [13] XIONG L, ISHITANI M, LEE H, *et al.* The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression[J]. Plant Cell 2001, 13: 2063-2083.
- [14] SEO M, PEETERS A J M, KOIWAI H, *et al.* The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 12908-12913.
- [15] AKABA S, LEYDECKER M T, MOUREAUX T, *et al.* Aldehyde oxidase in wild type and *aba1* mutant leaves of *Nicotiana glauca* [J]. Plant Cell Physiology, 1998, 39: 1281-1286.
- [16] SAGI M, SCAZZOCCHIO C, FLUHR R. The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the *flacca* phenotype in tomato plants[J]. Plant J, 2002, 31: 305-317.
- [17] OKAMOTO M, MIN X, SEO M, *et al.* Complementation of a tomato ABA-deficient *sitiens* mutant by an *Arabidopsis* aldehyde oxidase gene, *AAO3*[J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43: S42.
- [18] WALKER-SIMMONS M, KUDRNA D A, WARNER R L. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley[J]. Plant Physiology, 1989, 90: 728-733.
- [19] MARIN E, MARION-POLL A. Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities[J]. Plant Physiol Biochem, 1997, 35: 369-372.
- [20] SEO M, PEETERS A J M, KOIWAI H, *et al.* Characterization of an abscisic aldehyde oxidase mutant, *ao3*, of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiology, 2000, 41: S198.
- [21] ZEEVAART J A D, CREELMAN R A. Metabolism and physiology of abscisic acid [J]. Annu Rev Plant Physiology, Plant Mol Biol, 1988, 39: 439-473.
- [22] ROCK C D, HEATH T G, ZEEVAART J A D. 2-trans-abscisic acid biosynthesis and metabolism of ABA-aldehyde and xanthoxin in wild type and the *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Exp Bot, 1992, 43: 249-256.