

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00045

植物抗坏血酸过氧化物酶的表达调控以及对非生物胁迫的耐受作用

李泽琴, 李静晓, 张根发

北京师范大学生命科学院, 北京 100875

摘要: 抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)属于 I 型血红素过氧化物酶, 它催化 H_2O_2 依赖的 L-抗坏血酸氧化作用, 对抗坏血酸表现出高度的专一性。植物 APX 基因家族由 4 个亚家族组成, 分别为细胞质、叶绿体、线粒体和过氧化物酶体基因亚家族, 每个亚家族中又含有不同的 APX 同工酶。作为植物抗坏血酸-谷胱甘肽循环中的一个关键组分, APX 在细胞 H_2O_2 代谢过程中起着至关重要的作用。研究表明植物 APX 是氧化还原信号系统中调节细胞水平 H_2O_2 非常重要的一种酶, APX 同工酶的表达机制非常复杂, 细胞质 APX 受多种信号调节表达, 两种叶绿体 APX 通过选择性剪接进行组织特异性调节。通过调控产生的 APX 可调节细胞中的氧化还原信号, 进而提高植物对非生物胁迫的耐受性。文章综述了植物 APX 的催化机制、表达调控机理以及响应植物非生物逆境胁迫的重要作用。

关键词: 抗坏血酸过氧化物酶(APX); 环境胁迫; 活性氧(ROS); 基因表达调控; 分子机理

Expression regulation of plant ascorbate peroxidase and its tolerance to abiotic stresses

LI Ze-Qin, LI Jing-Xiao, ZHANG Gen-Fa

College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: Ascorbate peroxidase (APX), a type I heme peroxidase, catalyzes oxidation of ascorbic acid. It possesses a high degree of specificity to ascorbic acid. APX gene cluster consists of four sub-clusters: the gene clusters of cytosol, chloroplast, mitochondria, and peroxidase. As a key component of hydrogen peroxide detoxification system, the ascorbate-glutathione cycle, APX plays a vital role in the metabolism of H_2O_2 of plant cells. Studies showed that APX is one of the most important enzymes, which modulate the cellular H_2O_2 level in redox signaling system. The expression mechanisms of APX isoenzymes are quite complex. Briefly, cytosolic APX is regulated by a variety of signals; two chloroplastic APX isoenzymes are tissue-dependently regulated by alternative splicing. Generated APXs could regulate redox signaling in cells, which further boosts plants tolerance to abiotic stresses. This review focuses on recent advances concerning catalytic prop-

收稿日期: 2012-07-09; 修回日期: 2012-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31070289, 31270365)资助

作者简介: 李泽琴, 博士研究生, 专业方向: 植物抗逆分子遗传。E-mail: zeqin1988.happy@163.com

通讯作者: 张根发, 博士, 教授, 研究方向: 植物抗逆分子遗传。E-mail: gfzh@bnu.edu.cn

网络出版时间: 2012-12-20 8:46:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121220.0846.001.html>

erties, physiological function, and gene expressing regulation and abio-stress responding mechanism of APX.

Keywords: ascorbate peroxidase (APX); abiotic-stress; reactive oxygen species (ROS); gene expression and regulation; molecular mechanism

生物或非生物胁迫会使植物产生过多的活性氧物质,造成细胞膜和细胞器不同程度的损伤^[1,2]。植物在细胞器中形成的多种同工酶或非酶的抗氧化防御系统,保证了细胞中的活性氧能够维持在正常水平。这个体系包括:清除超氧自由基的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和清除过氧化氢的过氧化物酶(Peroxidase, POD)等。过氧化物酶是一类广泛存在于动物、植物和微生物中的活性物质,其功能主要是催化过氧化氢和其他过氧化物对各种有机物和无机物的氧化作用。植物中主要有 3 类过氧化物酶,即谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)、APX和过氧化氢酶(Catalase, CAT),其中,APX与 H_2O_2 的亲合力最强^[3]。

APX是非常重要的一种过氧化物酶,植物APX基因家族由 4 个亚家族组成,分别是细胞质、叶绿体、线粒体和过氧化物酶体基因亚家族^[4]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)APX家族有 8 个基因^[2,5,6],它们编码的蛋白质有 3 个位于细胞质(APX1、APX2 和 APX6),2 个位于叶绿体(存在于叶绿体基质的 sAPX 和结合在类囊体膜上的 tAPX),还有 3 个存在于过氧化物酶体(APX3、APX4 和 APX5)。水稻(*Oryza sativa*)APX家族也有 8 个成员,2 个在细胞质、2 个在过氧化物酶体、3 个在叶绿体,另一个结合在线粒体上^[7,8]。其它植物如菠菜(*Spinacia oleracea* L.)^[9]、豇豆(*Vigna unguiculata*)^[10]由于全基因组序列未知,所以只发现了部分 APX。已有许多研究表明,植物 APX 在响应逆境胁迫中具有重要的作用。本文综述了植物 APX 的酶学特征、关键催化部位,特别是基因表达调控的分子机制,以及对植物非生物逆境胁迫响应的途径和生理功能,揭示了该类酶在多种非生物逆境胁迫应答调控网络中的重要作用。

1 植物 APX 的酶学机制

APX 属于 I 型血红素过氧化物酶,它催化 H_2O_2 依赖的 L-抗坏血酸氧化作用^[11]。它的催化机制由 3

步组成,氧化态复合物 的形成及其随后经过两次连续电子转移被底物(抗坏血酸)还原^[11]。APX 对抗坏血酸表现出高度的专一性,曾一度认为抗坏血酸是 APX 惟一的电子供体。后来发现它也具有 型过氧化物酶的特征,可氧化一些芳香族有机物,在某些情况下,其催化速率跟抗坏血酸相当^[12]。最近的两项研究发现^[13,14],APX 有两个底物结合位点,一个与抗坏血酸结合,一个与芳香族有机物结合。通过对 APX-抗坏血酸结合复合物^[8]的结构研究发现,带负电荷的底物通过静电作用与 APX 的 γ -血红素边缘(图 1)带正电荷的氨基酸残基相互作用。该复合物包含 3 个氢键:抗坏血酸的 2-OH 和 3-OH 与 Arg172 之间;2-OH 与去质子化的血红素 6-丙酸之间;6-OH 与 Lys30 之间。这个结构可以帮助我们理解为什么 APX 在形成复合物 I 时未利用 Trp179^[15],因为抗坏血酸和亚铁血红素通过血红素 6-丙酸直接耦合,完全绕过 Trp179。APX 的另一个位点与芳香族底物结合,不过其具体位点还不清楚。通过晶体结构分析^[13]发现了 APX 与水杨脲酸(Salicylhydroxamic acid, SHA)

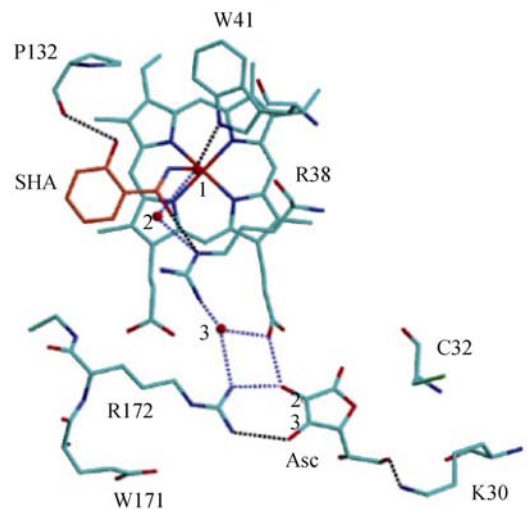


图 1 抗坏血酸(Asc)和水杨脲酸(SHA)与 APX 的结合位点结构示意图 (Macdonald 等^[16])

黑色虚线:氢键;蓝色虚线:质子从抗坏血酸到血红素铁的转移途径;红色小球:参与质子转移的水分子。

的复合物, SHA 是 APX 的一个抑制物, 从这个结构可以看出 SHA 结合在靠近血红素的一个碳原子上。这两个结构的发现首次为质子可能经过分散的水分子和 Arg38 从抗坏血酸传递到血红素提供了信息。

为了研究抗坏血酸结合位点单个氨基酸残基的作用, Macdonald等^[16]构建了Lys30 和Arg172 的突变体, 这些突变体对芳香族化合物的氧化作用无任何影响, 说明APX的这两个底物结合位点独立起作用, 互不影响。抗坏血酸氧化动力学数据表明, Lys30 突变对酶与抗坏血酸的结合能力几乎没影响, Arg172 则不然。这些结果表明Arg172 对APX与抗坏血酸的结合起着重要的控制作用, 而Lys30 则无明显作用。Tiffany等^[17]也有类似的发现, 用天冬氨酰残基取代Arg172 后, 无法形成完整的复合物I。还有研究发现, 豌豆(*Pisum sativum* L.)细胞质抗坏血酸过氧化物酶的一个远端组氨酸残基His42 对APX的催化作用具有很大影响, 它也是复合物I形成的关键因子。

2 植物 APX 基因表达调控的分子机理

2.1 APX 基因的转录调控

有关高等植物中活性氧清除酶的大量研究表明, 在环境胁迫下, APX的活性随着许多蛋白活性的增加而增加, 如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶^[18]、热转录因子、热激蛋白等^[19,20]。所有APX中, 细胞质APX(cAPX)对环境的响应最高。当经受强光、干旱、热和甲基紫等胁迫时, 大豆(*Glycine max*)和菠菜叶cAPX的转录水平明显增加^[21]。最近的转录组分析也证实了cAPX对环境因子敏感的说法^[22]。

拟南芥cAPX的表达和调节机制研究得比较清楚, 在强光胁迫的早期, 编码cAPX的同源基因APX1 和APX2 受H₂O₂ 和光合电子传递(Photosynthetic electron transport, PET)系统中氧化还原变化的诱导表达量快速增加^[23]。在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中也观察到了相同的现象^[23]。在植物受到机械损伤时, APX2 的表达也受H₂O₂ 和PET系统中氧化还原变化的诱导^[24]。过表达tAPX或过氧化氢酶的转基因烟草耐受光氧化胁迫的能力增强, 同时积累的H₂O₂ 的量下降^[25], 说明烟草暴露于强光下 1 h之内cAPX的表达受到快速诱导而转录中止。这些结果预示着应答

强光胁迫初期cAPX的表达由PET源的信号诱导, 之后才由叶绿体中积累的H₂O₂ 诱导。

尽管对cAPX表达的H₂O₂ 信号通路知之甚少, 其受热激转录因子(Heat shock factors, HSFs)调节的现象却得到了部分解释。活化区缺失的Hsf21(由HsfA4a编码)转基因拟南芥即使处于诱导H₂O₂ 产生的强光条件下(250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)其APX1 mRNA的积累仍受到抑制^[26]。Nishizawa等^[27]曾报道在HsfA2 过表达的拟南芥中观察到了APX2 基因的表达, 而把HsfA2 敲除后, 即使在强光(800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)和高热(40 $^{\circ}\text{C}$)综合胁迫条件下或用H₂O₂ 处理, APX2 也几乎不表达。此外, HsfA2 过表达和缺失的植物中APX1 的转录也无明显区别。过表达HSF3(由HsfA1a编码)的拟南芥受热胁迫(37 $^{\circ}\text{C}$)后APX1 和APX2 的表达都增高^[5]。这些结果表明H₂O₂ 信号通路和HSFs复杂交错、共同协调控制cAPX的表达。不过, 最近的研究发现, 在植物经受高热和氧化胁迫后HSFs的激活需要H₂O₂ 参与, 在热胁迫早期, 植物中的H₂O₂ 激活HSFs, HSFs再促进APX转录^[28]。此外, 用外源H₂O₂ 处理植物后, HsfA2 的转录增加^[27], 这些表明在胁迫条件下HSFs对H₂O₂ 的早期感知起着非常重要的作用。

为了更好地了解APX在非生物逆境胁迫中的作用, 许多学者对APX的转录调节进行了研究。Storozhenko等^[29]发现拟南芥APX1 启动子上存在一个热激顺式作用元件, 体外实验发现它可被番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller)的热激响应因子识别, 参与植物体热激诱导的基因表达。在光或热等非生物胁迫下, 植物体H₂O₂ 含量增加, 被H₂O₂ 活化的HSFs与基因启动子区的热响应元件(Heat shock element, HSE)结合启动APX基因表达^[27,30](图2)。最新的研究结果发现, 拟南芥的脱水响应元件结合因子(DRE-binding factors, DREBs)可调节植物响应环境胁迫。过表达DREB2C的转基因植物对氧化胁迫的耐受性明显高于野生型, 一些APX基因的转录活性和蛋白活性也增加; 另外, 过表达植物的H₂O₂ 含量明显低于野生型。凝胶电泳迁移分析和短暂激活检测发现, APX2 的表达受热激转录因子A3(HsfA3)调控, 而HsfA3 的转录水平又受DREB2C调控^[20]。基于目前所取得的研究结果, 我们可知APX的表达受以下一些信号通路调节: 植物经受非生物逆境胁迫

后, *DREB5* 表达量增加, 进而促进 *HSF5* 表达与活化, 活化的 *HSF5* 与基因启动子区的 HSE 结合启动 *APX* 基因表达; 植物经受非生物逆境胁迫后, 体内 NADPH 氧化酶、SOD 活性增加, PET 系统也发生氧化还原变化, 这些均可促进 H_2O_2 产生, H_2O_2 活化 *HSF5* 后进一步启动 *APX* 基因表达; 此外, 植物细胞内的一氧化氮(NO)也可以促进 H_2O_2 产生, 间接诱导 *APX* 转录, 它还能通过调节 cGMP、 Ca^{2+} 含量从而调节 *APX* 表达(图 2)。

2.2 *APX* 转录后的选择性剪接

基因的初始转录物 RNA 需要经过剪接、末端添加核苷酸、修饰、RNA 编辑等加工形式方可产生成熟的 mRNA, *APX* mRNA 的产生也不例外。植物中的叶绿体 *APX* 基因可以分为两组。第一组只由一个基因组成但其编码两种酶, 而第二组由两个不同的基因组成, 分别编码一种酶。前一组包括菠菜、烟草、南瓜(*Cucurbita moschata* Duch. ex Lam.)、石榴(*Punica granatum* Linn.)等的基因, 两种 *APXs* 由同一个基因转录后选择性剪接、翻译产生。后一组包括拟南芥、水稻、番茄等的叶绿体 *APX* 基因, 它们的表达分别受各自的基因调节。

叶绿体 *APX* 的选择性剪接机制已在菠菜中作了详细研究(图 3A)。这个基因被命名为 *APXII*, 它由 13 个外显子和 12 个内含子组成。倒数第二个外显子

exon12 由末端氨基酸、终止密码子和 3'端非翻译区组成, *sAPX* mRNA 可能还包括一个 poly A 信号结构[31,32]。最后一个外显子, exon13, 包含疏水区相应的序列和 *tAPX* mRNA 完整的 3'非翻译区。由于选择性聚腺苷酸化和剪接, 可产生 4 种成熟的 mRNA, 1 种 *tAPX*(*tAPX*-I)和 3 种 *sAPX* (*sAPX*-I, -II, -III)[33]。*APXII* 组成型表达, 且在根组织中也有可能发生。不过, *sAPX* mRNA 和 *tAPX*-I mRNA 在叶和根中的比率却相差甚大(表 1)。在叶中, 二者比率相近; 在根中, *sAPX*-III mRNA 的量大大增加而 *tAPX*-I mRNA 的量却减少[34]。这些结果清晰地表明选择性剪接在组织依赖的 *sAPX* 和 *tAPX* 的表达调控中起着关键作用。在非光合组织和培养的烟草 BY-2 细胞中可检测到 *sAPX* 蛋白, 不过其生理功能尚不明确[34,35]。

由 *APXII* 转录的 pre-mRNA 上的一个顺式作用元件的鉴定为组织依赖型 *sAPX* 和 *tAPX* mRNA 的选择性剪接分子机制的阐述提供了有力依据。这个顺式元件被命名为剪接调节元件(Splicing regulatory element, SRE), 它是 intron12 受体位点上游的一段序列, 通过保守序列的同源搜索、SRE 变异分析和 RNA 凝胶移位检测而被鉴定[34]。SRE 由至少 8 个富集腺嘌呤和尿嘧啶的重要核苷酸组成。RNA 凝胶移位分析表明与 SRE 相互作用的蛋白因子存在于叶片核提取物中, 根中没有。基于目前获得的这些研究

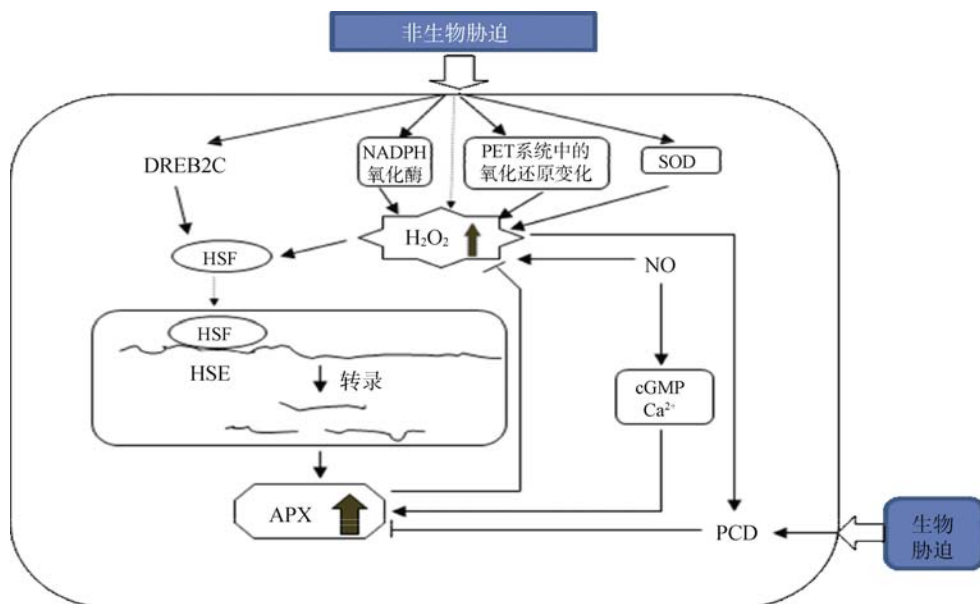


图 2 调控 *APX* 表达的信号网络图

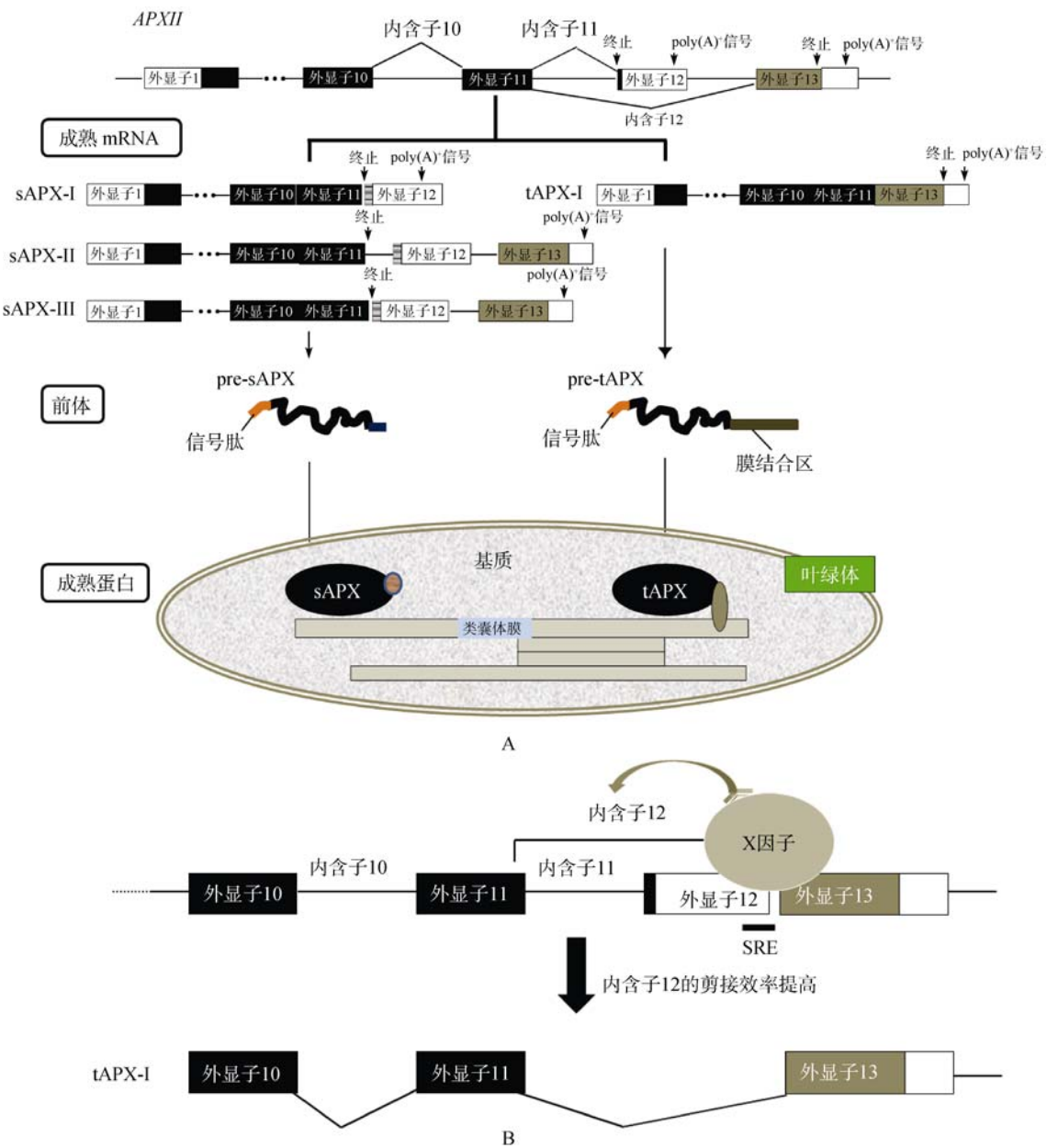


图 3 叶绿体APX选择性剪接调控模型(根据Ishikawa^[31,32]和Yoshimura^[33]改编)
A : *APXII* 基因通过选择性剪接形成 sAPX 和 tAPX 的示意图; B : 组织依赖型叶绿体 APX 通过选择性剪接生成的调控模型。X 因子是一个蛋白因子, 它与剪接调控元件 SRE 相互作用促进叶片中 tAPX-I 产生。

表 1 菠菜不同组织中剪接变异体的相对表达水平 (根据 Yoshimura^[34]改编)

	叶(%)	茎(%)	根(%)
sAPX-I	21	21	19
sAPX-II	5	5	3
sAPX-III	32	56	73
tAPX-I	42	18	5

成果, Ishikawa^[31,32]和Yoshimura^[33]等总结出了组织依赖型叶绿体APX mRNA选择性剪接可能的调控机制, 如图 3B。SRE是首次发现的与组织特异型选择性剪接有关的植物顺式作用元件。叶片核蛋白因子与SRE的相互作用促使intron12 被剪切, tAPX-I mRNA形成tAPX。而在根中, 由于特异核蛋白因子的抑制作用, intron11 选择性剪切, 主要生成sAPX-

III mRNA。

最近的全基因组分析表明,拟南芥和水稻^[36]中大约 22%的前体mRNA会发生选择性剪接,且越来越多的证据表明选择性剪接在植物生长发育^[37]、开花^[38]和环境胁迫响应^[29]过程中起着重要的调节作用。叶绿体APX选择性剪接的发现将为亚细胞易位调控的生物学意义提供新思路。

2.3 APX 翻译后的活性调节

叶绿体抗坏血酸过氧化物酶在清除光合系统产生的H₂O₂过程中发挥着核心作用。高等植物的叶绿体含有两种APX同工酶,一种位于叶绿体基质,另一种结合在类囊体膜上^[18]。值得注意的是,当植物受到氧化胁迫如干旱或强光时会产生过量H₂O₂,这些H₂O₂会首先使叶绿体APX快速失活,而不被抗坏血酸还原^[18,24]。叶绿体APX失活,H₂O₂持续积累,最终导致细胞损伤。体外实验表明,在抗坏血酸缺失情况下,叶绿体APX在几分钟之内即会失活^[39,40]。尽管位于细胞质和微体的APX同工酶具有与叶绿体APX相似的氨基酸序列和结构,其耐受H₂O₂的能力远远高于叶绿体APX^[41]。

为了探讨叶绿体APX对H₂O₂敏感的原因,许多学者展开了研究。已有研究发现sAPX催化部位附近的一个独特的环状结构与sAPX的快速失活有关^[40],并进一步得知,当APX被H₂O₂失活后,sAPX催化部位的一个亚铁血红素与远端的一个色氨酸残基不可逆转地交联在一起。当把色氨酸突变为苯丙氨酸后,这种交联现象消失,APX半数失活时间从<10 s增加到 62 s。与H₂O₂耐受的过氧化物酶相比,APXs交联现象的快速形成表明其反应中间产物的一个自由基趋向于定位在远端色氨酸处,使得远端的Trp35 转变为阳性自由基,亚铁血红素很容易与其交联^[42]。运用自由基清除剂 2,2,6,6 -tetramethylpiperidiny1-1-oxy(TEMPO)和spin trap 5,5 -dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO),结合质谱分析发现Cys26和Cys126 也是自由基形成的位点^[43]。通过对sAPX三突变体的研究表明,Cys26、Trp35 和Cys126 之间的相互作用参与自由基从复合物 的卟啉转移到脱辅基蛋白以及H₂O₂介导的tsAPX失活过程^[44]。最近的一项研究发现,去除sAPX的一个由 16 个氨基酸残基组成的独特的环状结构时,其H₂O₂耐受性增强,

这应该在tAPX中也适用,因为它们氨基酸序列的核心区一致^[45]。

3 APX 对非生物胁迫的耐受作用

3.1 APX 在植物逆境响应中的信号调节作用

除了清除氧化胁迫下植物中过多的ROS,APX还可调节H₂O₂代谢。几乎不表达cAPX的转基因烟草细胞对环境胁迫如热和盐表现出比野生型更强的耐受性^[46],APX1/2 双突变的拟南芥植株对高浓度的铝胁迫也有相似的现象^[47],这可能是由一种特异蛋白激酶的活化、胁迫响应基因如热激蛋白(Heat shock protein, HSP)基因hsp的表达上调和细胞ROS积累量增加等共同作用的。Pnueli等^[48]也曾发现敲除细胞质APX(APX1)后,拟南芥中许多基因的表达上调,包括胁迫相关蛋白和转录因子等。此外,光胁迫下,APX1 敲除的植物中HSP基因的表达诱导明显高于野生型。这些明确说明cAPX在调节氧化还原基因表达过程中起着积极的作用,通过调节H₂O₂的浓度(细胞氧化还原状态)调节其活性或通过调节表达量使其有益于作为第二信使(图 4)。不过,由于细胞ROS长期积累对细胞有毒甚至会致死,因此,正如上文所述,APX表达增加对于减少ROS过量产生以致细胞毒性至关重要。

3.2 APX 可提高植物对非生物逆境胁迫的耐受性

植物所受的非生物逆境胁迫主要是活性氧造成的氧化胁迫。氧化胁迫是由ROS,如单线态的氧、超氧负离子、过氧化氢及羟自由基的形成导致的。在良好的环境下,植物通常将ROS维持在较低水平;而在周围环境不利的情况下(如盐渍、干旱、强光、高温、低温等),植物细胞代谢过程不协调可导致ROS水平升高,从而形成对细胞结构潜在的氧化胁迫威胁。而APX被认为是植物中清除过氧化氢非常重要的一种过氧化物酶,有关其对非生物逆境胁迫的响应,近几十年来有不少学者进行研究且取得了一定的进展。Renu等^[50]研究藜(*Veratrum nigrum* L.)的叶片和花序的离体叶绿体和线粒体在高温条件下的反应时发现,在开水中处理 30 min后,叶绿体和线粒体的APX仍有活性,APX的热稳定性可能与藜的耐热性有关。Hu等^[51]研究两种不同基因型的多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)对不同浓度盐胁迫的响

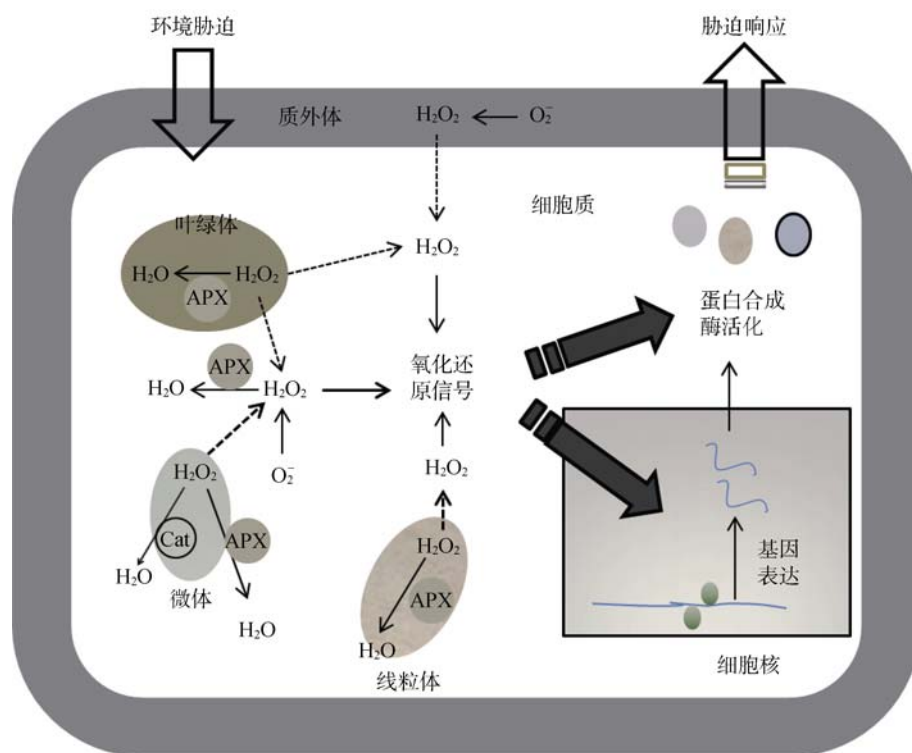


图 4 APX调节细胞氧化还原信号通路的图示(根据Ishikawa等^[49]修改)

应, 他们用 250 mmol/L 的 NaCl 分别处理盐耐受型和敏感型的黑麦草植株 12 d。结果表明, 盐耐受型的植物在处理 4 d 后, 叶片中 SOD 和 APX 的活性都非常高, 而盐敏感型的植物中 MDA、 H_2O_2 的量增加, CAT 等过氧化氢清除酶的活性远远低于对照组植株。Nounjan 等^[52]也有类似的发现, 盐胁迫处理水稻幼苗之后, 叶片中 SOD、APX、CAT 等酶的活性明显增加。这些都说明在非生物逆境胁迫下, APX 活性增加对植物抵抗不良环境起着积极的作用。

鉴于 APX 抗氧化胁迫的重要生理意义, 研究者尝试利用过表达 APX 的转基因植物提高非生物逆境胁迫的耐受性。过表达叶绿体 *tAPX* 的转基因烟草和拟南芥对强光所致的氧化胁迫和百草枯处理表现出显著的耐受性^[28,53,54]。与功能获得相反, 通过反义 RNA 或 T-DNA 插入使拟南芥叶绿体 APX 表达受抑制后植物对光氧化胁迫非常敏感^[55-57], 突变株中 H_2O_2 和氧化蛋白的积累量明显多于野生型植株; 此外, *sAPX/tAPX* 缺失后, 光氧化胁迫下 H_2O_2 响应基因的表达受到了明显抑制, 表明在这种胁迫下叶绿体 APX 对植物光合作用的保护和基因表达调控的重要性。

4 结 语

APX 在植物生长发育和逆境胁迫响应等生理过程中都发挥着非常重要的作用。尤其是植物受到逆境胁迫时, APX 可以快速清除细胞中产生的过量的 H_2O_2 , 使细胞免受活性氧毒害。近十年来, APX 的作用机理研究取得了较大进展。通过结构分析和对抗坏血酸结合位点单个氨基酸残基作用的研究, 我们对 APX 清除 H_2O_2 过程中的酶学机理更加清晰。植物 APX 表达调控分子机制的大量研究表明, APX 在转录水平、转录后加工水平以及翻译后的活性调节过程均需许多调控因子的参与; HSFs、DREBs、HSPs、 H_2O_2 等可促进 APX 转录, SRE 与 APX mRNA 的组织特异型选择性剪接有关, 而 sAPX 的一个独特的环状结构使其对 H_2O_2 非常敏感, H_2O_2 可使 APX 瞬间失活。因此 H_2O_2 在 APX 表达调控以及活性稳定方面起着至关重要的作用。上述研究结果使我们对 APX 催化底物的具体机制有了进一步的认识, 增进了人们对 APX 的生理功能和表达调控机理的理解。但在体内氧化还原信号通路中 APX 与 H_2O_2 以及其他相关因子(如 HSFs)之间的精确关系仍存在很

大空白, 后续研究可以针对该信号通路中的一些关键因子, 深入研究它们的功能和相互作用机制, 从而使我们对 APX 作用的信号网络系统的认识更加完善。

参考文献(References):

- [1] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*, 2011, 16(6): 300–309. [DOI](#)
- [2] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(10): 490–498. [DOI](#)
- [3] 苗雨晨, 白玲, 苗琛, 陈珈, 宋纯鹏. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展. *植物学通报*, 2005, 22(3): 350–356. [DOI](#)
- [4] Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot*, 2002, 53(372): 1305–1319. [DOI](#)
- [5] Panchuk II, Volkov RA, Schoeffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 129(2): 838–853. [DOI](#)
- [6] Narendra S, Venkataramani S, Shen GX, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Korniyev D, Holaday AS, Zhang H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J Exp Bot*, 2006, 57(12): 3033–3042. [DOI](#)
- [7] Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Margis R, Margis-Pinheiro M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *J Mol Evol*, 2004, 59(6): 761–770. [DOI](#)
- [8] Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvão VC, Margis R, Margis-Pinheiro M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 2006, 224(2): 300–314. [DOI](#)
- [9] Yoshimura K, Ishikawa T, Nakamura Y, Tamoi M, Takeda T, Tada T, Nishimura K, Shigeoka S. Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of *spinach*. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 353(1): 55–63. [DOI](#)
- [10] D'arcy-Lameta A, Ferrari-Iliou R, Contour-Ansell D, Pham-Thi AT, Zuily-Fodil Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in *cowpea* leaves. *Ann Bot*, 2006, 97(1): 133–140. [DOI](#)
- [11] Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol*, 1992, 2(3): 388–393. [DOI](#)
- [12] Raven EL. Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? *Nat Prod Rep*, 2003, 20(4): 367–381. [DOI](#)
- [13] Sharp KH, Moody PCE, Brown KA, Raven EL. Crystal structure of the ascorbate peroxidase-salicylhydroxamic acid complex. *Biochemistry*, 2004, 43(27): 8644–8651. [DOI](#)
- [14] Sharp KH, Mewies M, Moody PCE, Raven EL. Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(4): 303–307. [DOI](#)
- [15] Lad L, Mewies M, Raven EL. Substrate binding and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase: Evidence for two ascorbate binding sites. *Biochemistry*, 2002, 41(46): 13774–13781. [DOI](#)
- [16] Macdonald IK, Badyal SK, Ghamsari L, Moody PCE, Raven EL. Interaction of ascorbate peroxidase with substrates: A mechanistic and structural analysis. *Biochemistry*, 2006, 45(25): 7808–7817. [DOI](#)
- [17] Barrows TP, Poulos TL. Role of electrostatics and salt bridges in stabilizing the compound I radical in ascorbate peroxidase. *Biochemistry*, 2005, 44(43): 14062–14068. [DOI](#)
- [18] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50(1): 601–639. [DOI](#)
- [19] Hwang JE, Lim CJ, Chen H, Je JY, Song C, Lim CO. Overexpression of *Arabidopsis* Dehydration-Responsive Element-Binding Protein 2C Confers Tolerance to Oxidative Stress. *Mol Cells*, 2012, 33(2): 135–140. [DOI](#)
- [20] Larkindale J, Vierling E. Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol*, 2008, 146(2): 748–761. [DOI](#)
- [21] Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S. Expression of *spinach* ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol*, 2000, 123(1): 223–233. [DOI](#)
- [22] Kim DW, Shibato J, Agrawal GK, Fujihara S, Iwahashi H, Kim DH, Shim LS, Rakwal R. Gene transcription in the leaves of *rice* undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.). *Mol Cells*, 2007, 24(1): 45–59. [DOI](#)

- [23] Yabuta Y, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(11): 1586–1594. [DOI](#)
- [24] Chang CCC, Ball L, Fryer MJ, Baker NR, Karpinski S, Mullineaux PM. Induction of *ASCORBATE PEROXIDASE 2* expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J*, 2004, 38(3): 499–511. [DOI](#)
- [25] Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J*, 2002, 32(6): 915–925. [DOI](#)
- [26] Davletova S, Rizhsky L, Liang HJ, Zhong SQ, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 268–281. [DOI](#)
- [27] Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J*, 2006, 48(4): 535–547. [DOI](#)
- [28] Tanabe N, Yoshimura K, Kimura A, Yabuta Y, Shigeoka S. Differential expression of alternatively spliced mRNAs of *Arabidopsis* SR protein homologs, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 1036–1049. [DOI](#)
- [29] Storozhenko S, De Pauw P, Van Montagu M, Inzé D, Kushnir S. The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* *APX1* gene promoter. *Plant Physiol*, 1998, 118(3): 1005–1014. [DOI](#)
- [30] Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schöeffl F. Heat stress-induced H_2O_2 is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2006, 61(4–5): 733–746. [DOI](#)
- [31] Ishikawa T, Sakai K, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S. cDNAs encoding *spinach* stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Lett*, 1996, 384(3): 289–293. [DOI](#)
- [32] Ishikawa T, Yoshimura K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S. Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem J*, 1997, 328(Pt3): 795–800. [DOI](#)
- [33] Yoshimura K, Yabuta Y, Tamoi M, Ishikawa T, Shigeoka S. Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast ascorbate peroxidase isoenzymes in *spinach* leaves. *Biochem J*, 1999, 338(Pt1): 41–48. [DOI](#)
- [34] Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S. Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40623–40632. [DOI](#)
- [35] Madhusudhan R, Ishikawa T, Sawa Y, Shigeoka S, Shibata H. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of *tobacco* BY-2 cells. *Physiol Plantarum*, 2003, 117(4): 550–557. [DOI](#)
- [36] Wang BB, Brendel V. Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 7175–7180. [DOI](#)
- [37] Savaldi-Goldstein S, Aviv D, Davydov O, Fluhr R. Alternative splicing modulation by a LAMMER kinase impinges on developmental and transcriptome expression. *Plant Cell*, 2003, 15(4): 926–938. [DOI](#)
- [38] Macknight R, Duroux M, Laurie R, Dijkwel P, Simpson G, Dean C. Functional significance of the alternative transcript processing of the *Arabidopsis* floral promoter *FCA*. *Plant Cell*, 2002, 14(4): 877–888. [DOI](#)
- [39] Miyake CA, Asada KI. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate: hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37(4): 423–430. [DOI](#)
- [40] Kitajima S, Tomizawa KI, Shigeoka S, Yokota A. An inserted loop region of stromal ascorbate peroxidase is involved in its hydrogen peroxide-mediated inactivation. *FEBS J*, 2006, 273(12): 2704–2710. [DOI](#)
- [41] Wada K, Tada T, Nakamura Y, Ishikawa T, Yabuta Y, Yoshimura K, Shigeoka S, Nishimura K. Crystal structure of chloroplastic ascorbate peroxidase from *tobacco* plants and structural insights into its instability. *J Biochem*, 2003, 134(2): 239–244. [DOI](#)
- [42] Kitajima S, Shimaoka T, Kurioka M, Yokota A. Irreversible cross-linking of heme to the distal tryptophan of stromal ascorbate peroxidase in response to rapid inactivation by H_2O_2 . *FEBS J*, 2007, 274(12): 3013–3020. [DOI](#)
- [43] Kitajima S, Kurioka M, Yoshimoto T, Shindo M, Kanaori K, Tajima K, Oda K. A cysteine residue near the propionate side chain of heme is the radical site in ascorbate peroxidase. *FEBS J*, 2008, 275(3): 470–480. [DOI](#)
- [44] Kitajima S, Kitamura M, Koja N. Triple mutation of Cys26, Trp35 and Cys126 in stromal ascorbate peroxidase

- confers H₂O₂ tolerance comparable to that of the cytosolic isoform. *Biochem Bioph Res Co*, 2008, 372(4): 918–923. [DOI](#)
- [45] Kitajima S, Nii H, Kitamura M. Recombinant stromal APX defective in the unique loop region showed improved tolerance to hydrogen peroxide. *Biosci Biotech Bioch*, 2010, 74(7): 1501–1503. [DOI](#)
- [46] Ishikawa T, Morimoto Y, Madhusudhan R, Sawa Y, Shibata H, Yabuta Y, Nishizawa A, Shigeoka S. Acclimation to diverse environmental stresses caused by a suppression of cytosolic ascorbate peroxidase in *tobacco* BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(8): 1264–1271. [DOI](#)
- [47] Rosa SB, Caverzan A, Teixeira FK, Lazzarotto F, Silveira JAG, Ferreira-Silva SL, Abreu-Neto J, Margis R, Margis-Pinheiro M. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in *rice*. *Phytochemistry*, 2010, 71(5–6): 548–558. [DOI](#)
- [48] Pnueli L, Liang HJ, Rozenberg M, Mittler R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J*, 2003, 34(2): 187–203. [DOI](#)
- [49] Ishikawa T, Shigeoka S. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci Biotech Bioch*, 2008, 72(5): 1143–1154. [DOI](#)
- [50] Khanna-Chopra R, Jajoo A, Semwal VK. Chloroplasts and mitochondria have multiple heat tolerant isozymes of SOD and APX in leaf and inflorescence in *Chenopodium album*. *Biochem Bioph Res Co*, 2011, 412(4): 522–525. [DOI](#)
- [51] Hu LX, Li HY, Pang HC, Fu JM. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *J Plant Physiol*, 2012, 169(2): 146–156. [DOI](#)
- [52] Nounjan N, Nghia PT, Theerakulpisut P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of *rice* seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *J Plant Physiol*, 2012, 169(6): 596–604. [DOI](#)
- [53] Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J*, 2004, 38(6): 940–953. [DOI](#)
- [54] Pang CH, Li K, Wang BS. Overexpression of *SsCHLAPXs* confers protection against oxidative stress induced by high light in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, 2011, 143(4): 355–366. [DOI](#)
- [55] Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Campa M, Soave C, Murgia I. Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* enhances paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death. *Planta*, 2005, 221(6): 757–765. [DOI](#)
- [56] Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, Van Wijk KJ. *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(5): 627–644. [DOI](#)
- [57] Maruta T, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S. *Arabidopsis* chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(2): 190–200. [DOI](#)

•综合信息•

2013 年 35 卷第 1 期封面说明

植物的开花是受内外环境因素协同调节的重要发育事件，大量的转录因子参与其分子和细胞水平的调节。蛋白质是在细胞质中合成，然后运输到细胞核内发挥功能的，因而这些转录因子的核质运输是其功能的重要调节方式之一。核膜孔复合物是细胞质与细胞核之间物质交流的关键渠道，其组成成分的翻译后修饰调控核膜孔复合物的功能。蛋白质的 SUMO(Small ubiquitin modifier)化导致其结构和功能上的变化，从而成为近年来蛋白质翻译的研究热点。我们实验室筛选到一种可能受 SUMO 修饰的核膜孔复合物蛋白 SUA41(SUMO substrate in *Arabidopsis* 41)，对其编码基因的突变体表型分析看，该基因突变导致植物发育的多种变异，其中最明显的表型为早开花。与野生型相比，虽然 *sua41* 突变体在长日和短日下都表现为提前开花，但是这种早花表型还是可以对光周期产生响应；然而，突变体对低温反应不敏感。

SUA41 是一个组成型表达的基因，没有明显的时空表达和生物节律表达差异，在花中表达活性强。但是，低温明显抑制 *SUA41* 基因的表达；与开花温敏途径调节相关基因突变影响 *SUA41* 的表达；*sua41* 突变体中成花素 *FT* 等基因显著上调。本文说明核膜孔复合物可能通过调控成花素基因的表达参与植物的开花过程。封面图片说明 *SUA41* 是一个组成型表达的基因，在根、茎、叶、花等器官中都表达。详见本期第 93~100 页黄国文，韩玉珍，傅永福 “拟南芥 *SUA41* 基因的表达和功能分析”一文。