

植物多铜氧化酶及其亚家族成员 SKS 蛋白

张志仙 陈起振 曹家树*

(浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029)

摘要 多铜氧化酶包括抗坏血酸氧化酶、漆酶、血浆铜蓝蛋白等多种类型, 是植物体内非常重要的一类金属氧化酶, 并在植物多种生理过程中发挥着举足轻重的作用。SKS (The skewed5 simliar) 蛋白是多铜氧化酶家族中一类缺乏铜离子连接所必需的组氨酸残基的特殊成员, 由于缺失正常的多铜氧化酶活性中心, 可能在植物发育中被赋予了新的功能。本文就多铜氧化酶铜离子连接位点、底物选择、演化过程以及植物 SKS 家族基因的研究进行了阐述。

关键词 多铜氧化酶; 铜离子连接位点; 演化; SKS; 基因

多铜氧化酶(multicopper oxidase, MCO)广泛存在于动植物、细菌及真菌中, 包括抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase, AAO, EC1.10.3.3)、漆酶(laccase, EC1.10.3.2)、血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin, EC1.16.3.1)等多种类型。作为一种重要的金属氧化酶, MCO 在其单铜离子中心接受底物电子, 并将这些电子转移到多铜离子中心, 供给氧气结合, 最后生成水^[1]。在植物中, MCO 以多种形式作用于植物的生长、生殖、发育过程, 其中包括伤口愈合、木质素合成、色素合成、小孢子发育和花粉管生长等^[2-7]。近几年来, 植物MCO的研究取得了长足的进展, 特别是在其晶体结构、代谢过程、激素调节等方面^[1,3-5,8]。而作为MCO亚家族之一的SKS(the skewed5 simliar)蛋白家族, 也因为其多样的生物学功能及扑朔迷离的作用机制而成为了植物生物学研究中的一个热点^[9-17]。本文在此就植物MCO的特异铜离子连接位点、演化过程、生物学功能以及植物SKS蛋白家族等方面进行阐述。

1 MCO 的铜离子连接位点及对底物的选择

根据磁学和光谱学性质, MCO所包含的铜原子可以被分为三类: 第一类为T1Cu, 包括两个组氨酸残基、一个半胱氨酸和一个甲硫氨酸。前三个残基是其连接位点必需的, 而甲硫氨酸残基可以被其它的氨基酸取代, 如苯丙氨酸和亮氨酸。T1Cu是MCO呈特征性蓝色的原因, 它在紫外可见光谱约600 nm处有一个强烈的吸收峰值, 而在电子顺磁共振谱(electron paramagnetic resonance, EPR)上有一个小的

超精细劈裂^[1]。第二类为T2Cu, 包含两个组氨酸残基配体, 定位在三核铜离子簇的顶端。T2Cu只有在T1Cu强烈吸收峰存在时才会被检测到, 但是其EPR信号是正常的。第三类T3Cu一般是以成对形式存在的, 每个T3Cu包含三个组氨酸残基配体。由于组氨酸残基羟基与铜原子之间的连接, T3Cu在330 nm光谱处形成了一个特殊的电荷迁移带; 两个铜离子之间通过羟基连接桥形成强烈的反铁磁性耦合介质, T3Cu在EPR光谱下是检测不到的。T2Cu和T3Cu形成三核铜离子簇。几乎所有的MCO都包含四个铜原子: 1个T1Cu, 1个T2Cu和两个T3Cu, 底物电子通过底物转移到T1Cu, 然后通过Cys-His蛋白路径到达三核铜离子簇中心, 将氧气转化为水。

MCO的生物学底物十分广泛, 不管是金属离子还是有机物均可以成为其氧化的底物。不同的MCO对底物的种类也具有特异性, 可以根据其对底物的识别种类不同而将MCO分为两类: 像植物漆酶和AAO等, 主要氧化酚类等有机底物, 这些有机分子能够通过提供电子与酶微弱地发生结合; 而Fet3p和血浆铜蓝蛋白等MCO的主要氧化金属离子, 它们可以紧密地结合在底物连接位点。底物的结合过程主要发生在T1Cu, 因此底物的选择主要决定于其与这个位点的结合性能力。Sakurai等^[18]认为MCO对有机物质的特异性主要决定于有机底物连接位点形状和连接到T1Cu组氨酸残基的氨基酸与底物之间的互

收稿日期: 2010-08-05 接受日期: 2010-10-15

国家自然科学基金(No.30871715)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

作,而对金属离子的特异连接需要的是一个合适的配体组合以及一种能连接亚铜离子并释放铜离子的空间安排能力。

2 MCO的演化

MCO是由2个、3个或者6个重复的与杯蛋白单结构域具有高度同源性的结构域组成的,这类杯蛋白包含一个T1Cu位点,也被称为蓝铜连接域(blue copper binding domain, BCB domain)。除BCB位点之外,MCO还具有处于结构域之间的铜离子连接位点(interdomain copper binding site, IDCB site),呈三角形形状,包含一个T2Cu和两个T3Cu以及八个组氨酸残基。关于MCO演化有各种各样的假说^[19-22]。有人认为MCO之间是相互转变来的,血浆铜蓝蛋白中间三域减少形成漆酶等三域MCO;或者漆酶等三域MCO复制形成六域的血浆铜蓝蛋白^[20]。现在,比较公认的演化过程是最初一个结构域复制,同时也伴随着BCB位点的复制。T2Cu和T3Cu铜离子连接位点先后形成,共同组成了一个IDCB位点,而此时MCO已经演化为两域MCO-A,它包含2个BCB位点和一个IDCB位点。紧接着,第一结构域中的BCB位点

缺失,形成2dMCO-B。此时一个单独结构域插入形成AAO、漆酶等三域MCO,而2dMCO-B经过两次的复制形成了血浆铜蓝蛋白等六域MCO^[21](图1)。此前两域MCO-A和MCO-B均以假设的形式被提出,但是最近越来越多的研究发现生物体内的确有两域MCO的存在^[22,23],这也进一步说明了这种演化假说的可信性。

3 MCO的生物学功能

MCO参与植物生命活动的各种过程,包括从生长发育到生殖阶段,从色素合成到逆境胁迫的调节等等。在植物体内,作为MCO的两大类型,AAO和漆酶,分别以不同的作用方式发挥着其不可替代的作用。

AAO是高等植物中普遍存在的一个氧化还原酶,它主要通过单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA),将抗坏血酸(ascorbate, AA)氧化为脱氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid, DHA),同时将氧气还原为水而在植物体内作用^[4,7]。AAO参与植物体内多种物质代谢过程,如调控植物花期^[24]、植株体内氧气的代谢平衡^[7,25]、细胞伸长、果实成熟、衰老等。目

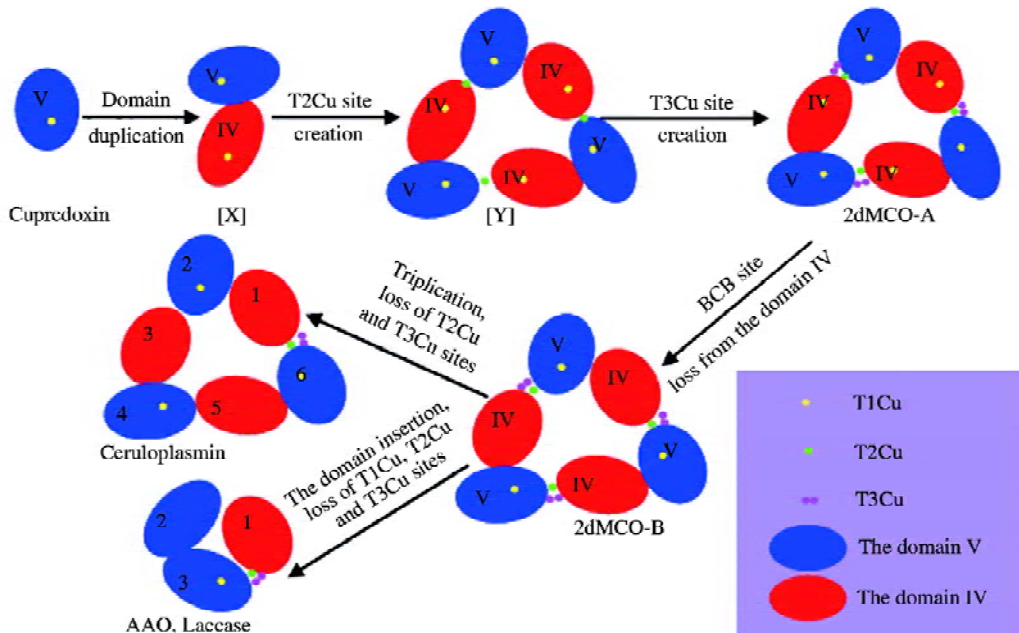


图1 MCO生物演化过程图谱

箭头方向代表假设的演化方向,IV和V两组分别表示两类结构域,[X]、[Y]为假设蛋白。本图依据文献^[21]修改。

Fig.1 Schematic presentation of evolution of the MCO

Arrows indicated the postulated evolutionary pathways, while IV and V represented the different types of the domains, [X] and [Y] are hypothetical proteins. This figure was modified from the paper^[21].

前, AAO 活性的变化在小麦、水稻、烟草、白菜等植物中得到广泛研究, 但其详细的作用机理尚不太清楚^[26]。

AAO 在黄瓜生长的组织、甜瓜果实成熟过程中 mRNA 表达量均呈上调趋势; 在花和果实中表达的 AAO 基因 *CmA01* 也作用于胚珠的生长^[7]。这些直接证据指明了 AAO 在细胞生长中的作用。处于植株快速扩张组织中的 AAO 可能通过引起细胞壁固性减弱, 增加细胞壁的延展性, 从而最终调控生长。现有理论认为, AAO 反应产生的 DHA 与细胞壁蛋白赖氨酸和组氨酸残基反应, 以阻止这些氨基酸残基与半纤维素结构蛋白和聚半乳糖醛酸盐的连接, 从而增加细胞壁的延伸能力。其次, DHA 是草酸的前体物质之一, 而草酸可以通过形成草酸钙晶体以转移细胞壁的钙离子, 从而使细胞壁聚半乳糖醛酸盐链与疏松壁间的钙桥数量减少而有利于根、茎、花粉管的顶端生长^[3-5,27]。AAO 还可能通过生长素调控细胞生长。在南瓜 AAO 基因的上游启动子区域发现的一个生长素响应元件^[28]是这种假设的一个有力证据。

AAO 受到多种因素的调节。伤害、热胁迫等可以引起 AAO 表达量上升, 使植物开启防御反应限制生长以提高抵抗力。而不同环境或者激素对 AAO 活性的调控则是一个更为复杂的过程, 如 JA 处理可以引起 *CmA04* 转录子的大量积累, 而 SA 可以导致相反的情况, 但是调控机理仍不太明了。有报道认为光可以调节 AAO 的表达^[29], 但甜瓜 *CmA04* mRNA 在光和黑暗中均有积累, 说明并不是完全依赖光的^[7]。而铜对 AAO 的表达调控可作用在转录和翻译两个阶段, 低水平的铜处理可能刺激 AAO 翻译, 而高水平铜可能影响 AAO 基因 mRNA 的转录^[7,30]。

AAO 与植物的生长发育、繁殖、衰老、伤害与环境胁迫、果实储藏等过程均有联系, 因此在分子水平上进一步深入理解该过程的分子调控机制, 为作物高产、抗逆等提供科学依据和技术支持, 具有重要的生物学理论意义和农业应用价值。

漆酶是最简单但最大量的 MCO, 存在于高等植物、昆虫、细菌、真菌等中。虽然漆酶最早在植物中发现, 但是对漆酶的研究却主要是在真菌上。植物漆酶的氨基酸序列同源性差异很大, 但是其催化位点却是非常保守的, 很多基于序列相似性的漆酶及聚类分析都很好说明了这一点^[31,32]。漆酶的生物学功能在不同种类的生物体中也有所不同, 而在植物

中, 漆酶与木质素的合成、创伤修复、抗病、抗逆及色素合成有关^[2,6,33]。

木质素是植物细胞壁结构组分之一。它是通过非水解 C-C 键和 C-O 键将苯丙酸单元连接起来而形成的一种复杂的多酚高分子物质。漆酶在植物不同发育阶段均有表达, 特别是在木质部或者正在木质化的木质部细胞壁中表达较高。漆酶具有催化木质素前体聚合的功能, 因此被认为其主要在木质素合成中起作用。但是, McCaig 等^[34]研究拟南芥漆酶基因表达时, 发现在一些不含木质素的结构中漆酶也有表达, 提出并不是所有的漆酶都作用于木质化过程, 它还与金属离子代谢有关。

漆酶已经在很多方面有重要的产业应用, 比如洗涤剂、漂白剂、有机合成等。随着分子生物学的进一步发展, 对植物漆酶的功能及应用将更加深入。

4 缺乏 BCB 位点的 MCO 家族 -SKS 基因家族

植物多铜氧化酶基因家族中存在一类特别的亚家族 -SKS 蛋白家族。它们的氨基酸序列与 MCO 有大约 25%~30% 的相似性, 但成员之间高度相似; 均属于定位在细胞质膜上的糖基化蛋白; 可能作用于细胞的伸长; 只包含多铜氧化酶中保守的 T2Cu 连接位点而缺乏其他类型铜离子连接所需的组氨酸残基。现已在拟南芥中发现了 SKS 蛋白家族 SKU5 和 SKS1-SKS18 共 19 个成员, 在油菜、烟草、玉米、报春花等植物中也均发现了该类蛋白。SKS 家族基因编码的蛋白质在植物根生长方向、叶脉形式、花粉发育、花粉管伸长、激素调节等生物学过程中均具有作用, 但是整个 SKS 基因家族的研究只集中在少数基因上^[9-14]。

Albani 等^[9]从甘蓝型油菜中克隆得到了一个花粉特异基因 *BP10*, 编码一个 62 kDa 的蛋白。它与黄瓜、南瓜中的 AAO 氨基酸序列具有 30% 的相似性, 但是却没有 AAO 保守的酶活性中心, 属于典型的 SKS 蛋白。*BP10* 在雌蕊、花瓣、萼片、种子、角果中均不表达, 仅在花粉中有特异表达, 其 mRNA 首先在单核期开始表达, 并快速上升, 到双核花粉时期表达量最高, 随后在成熟的三核花粉中又有所降低。

烟草 *NTP303* 及其家族成员 *NTP101*、*NTP201*、*NTP302*、*NTP805* 也是典型的 SKS 基因。*NTP303* 是一个花粉特异晚期基因, 编码 69 kDa 的糖基化蛋

白, 主要在生殖细胞和营养细胞、花粉和花粉管中的精细胞等周围的营养质膜中有较高的表达, 而在生殖细胞和精细胞的质膜中却没有表达^[15,16]。*NTP303* mRNA在小孢子发育双核早期开始表达, 并持续大量表达直到花粉成熟、水合, 花粉管开始萌发之后, 到花粉管生长5 h时表达量达到最大, 随后又有所下降; 但其在蛋白水平上则在花粉水合并开始萌发之后开始大量表达^[16,17]。早期研究表明花粉萌发和花粉管初期生长所需的RNA已经存在于植物成熟的花粉中, 而后期的花粉管生长则依赖于新合成的RNA^[34]。*NTP303*的mRNA及蛋白表达规律显示该基因产物可能是作用于后期授粉受精过程的。用反义RNA技术将*NTP303*及其家族成员共同沉默之后对转基因植株生长生殖发育研究的实验结果也验证了这一推论^[11]。基因沉默后发现在转基因植株体内花粉管的生长速度减慢且不能通过花柱到达胚珠, 说明*NTP303*在花粉管生长中具有重要的作用。

McCubbin等^[13]在研究报春花形态发育阶段的基因表达差异时发现了一个与*SKS13*相似的基因*T35*。该基因mRNA在成熟花粉和叶片中表达量相差不大, 但在4 mm和8 mm的花蕾中表达结果显示短花柱花明显高于长花柱花, 更加有趣的是该基因在短花柱的柱头不表达, 而在长花柱的柱头却是表达的。这一特别的表达特征合理的解释是,*T35*基因产物在短花柱中可能作用于花粉体积的增大过程, 而在长花柱柱头中主要是促进乳突的突起。由此可见,*T35*可能也是作用于细胞壁扩张的。

玉米*CBP1*编码一个定位在质膜上的大约62 kDa的锚定蛋白, 其N端有一个大约20 bp的信号肽残基, 而C端包含一个约31个氨基酸的GPI(glycosylphosphatidylinositol)锚定位点, 成熟蛋白包括557个氨基酸^[14]。*CBP1*与*SKU5*具有65%的氨基酸序列相似, 而与其它SKS家族成员氨基酸序列相似性大约在有43%~63%之间。正常的MCO有4个铜离子连接位点和10个与铜离子连接的组氨酸残基, 而在*CBP1*中只有在第464个氨基酸位置处有一个组氨酸残基, 当然这个组氨酸残基也是整个SKS家族所共有的。这种组氨酸残基的替换导致了大多数铜离子结合位点丢失, 进而导致铜离子连接位点金属特异性的改变。

已有研究认为细胞伸长可能具备两类由生长素介导的方式, 一种依赖ABP1, 另一种依赖细胞外的

Ca²⁺^[35]。而玉米*CBP1*与ABP1蛋白C端多肽交联, 推测其可能通过与ABP1的直接作用而被生长素所调控。

Sedbrook等^[10]最先从拟南芥中得到了SKS家族成员基因*SKU5*。*SKU5*全长为3.3 Kb, 包含9个外显子, 开放阅读框长1 764 bp, 预期编码一个定位在细胞质膜和细胞壁上的大小为66 kDa的糖蛋白, 其结构类似于多铜氧化酶中的AAO和漆酶。虽然*SKU5*与这两种酶相似, 但是它缺乏T1Cu和T3Cu所需的组氨酸残基。*SKU5*在拟南芥各部分组织中均有表达, 而在根尖分生组织和末梢伸长组织中表达量最大。*sku5*在琼脂糖上生长时, 根和下胚轴与野生型相比较短15%, 根偏离了正常的向下生长并且与黄化的下胚轴都显示出逆时针的轴向旋转, 打乱了根系的正常向下生长。

像*SKU5*、*NTP303*等这样的GPI锚定蛋白, 可能参与细胞及组织极性生长, 而其突变体可能在固醇组分、GPI合成、磷脂信号上有缺陷^[36]。

Jacobs等^[12]从拟南芥中得到了另一个SKS家族成员*SKS6*。*SKS6*与植物漆酶结构高度相似, 但是它依旧缺乏漆酶铜离子连接位点所需要的组氨酸残基。*SKS6*启动子有选择地表达在种子组织的一些部位, 包括保卫细胞、根皮质细胞以及叶片边缘的水孔细胞; 也在花发育后期的花原基、胚珠、种子及角果的离层带表达。用ABA等激素处理导致*SKS6*表达量上调。这一切说明*SKS6*在排水孔处、生长素合成位点、化学物质循环的养分和激素代谢方面具有作用。

对T-DNA插入型突变体*sku6-1*研究发现其根茎花的表型都与野生型没有区别, 唯一的区别在于子叶: 在野生型植株子叶上, 以中间叶脉为中心, 四个环状结构对称分布, 而大部分突变体植株子叶只有2到3个环状的结构; 另外, 野生型植株子叶尖端的突起也比突变体明显, 而这个结构可能起到保护子叶或者具有排水孔的作用。*sku6-1*子叶叶脉表型的缺陷说明*SKS6*在植物导管系统发育中占有相当重要的作用。早有研究认为生长素是调控植物导管发育和形式的影响因子, *sku6-1*变异表型说明*SKS6*也可能参与生长素的反应或者调控。

SKS家族不包含多铜氧化酶的所有铜离子连接位点, 对于其功能的推断也层出不穷。有推测认为它们可以从附近的抗坏血酸氧化酶和漆酶中演化形

成铜离子连接位点^[10]。有人使用多巴苯醌氧化还原剂辅助因素来弥补没有其他铜离子从底物中转移电子的不足,这些辅助因素主要是自身氧化酪氨酸残基来形成次级氧化还原剂活性中心。SKS 家族也可能通过这种方式来行使多铜氧化酶的功能。更多研究认为SKS蛋白已经失去了原有的功能,而是作为一种新的蛋白作用于植物体内。Albani 等^[9]利用大肠杆菌重组表达系统研究发现能够影响AAO活性的物质却不能影响白菜BP10基因蛋白产物对细菌生长的抑制作用,而 CO₂ 却可以解除抑制,说明 BP10 可能具备与 AAO 不同的生物学功能,这个功能可以被 CO₂ 所调控。但是这些都只是推论,目前还没有明确的实验数据可以证明该类蛋白的新功能。

MCO 家族是一个种类繁多的家族,它是保证动植物生命活动的正常有序进行的重要的氧化酶之一。在高等植物中,尽管目前已经分离鉴定了多个 MCO 基因,对 MCO 的分子结构也有了清晰的了解,但现有实验证据还不足以阐述 MCO 在其发育、生殖过程中的生理功能,更不用说它作用的分子机制。SKS 家族是植物中存在的一类特殊的 MCO,在细菌中也有发现类似结构特征的蛋白。在对编码 SKS 蛋白的基因进行研究之后发现其可能已经不具备正常的 MCO 功能,而以一种新的方式作用于植物生长发育,但是这一领域的认识几乎是空白的,唯一确定的是,这种变异并不偶然的,对于植物机体来说,这种新型的 MCO 一定有着不可取代的生理功能,而这些都是需要我们今后更加深入探索的。

参考文献(References)

- Solomon EI, Augustine AJ, Yoon J. O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton T* 2008; 30: 3921-32.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies GA, Stewart D, *et al.* Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases a divergent gene family in poplar. *Eur J Biochem* 1999; 259(1-2): 485-95.
- Kato N, Esaka M. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta* 2000; 210(6): 1018-22.
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol* 2003; 132(3): 1631-41.
- Tullio MC, Liso R, Arrigoni O. Ascorbic acid oxidase: an enzyme in search of a role. *Biol plantarum* 2004; 48(2): 161-6.
- Polaina J, MacCabe AP. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Dordrecht: Springer 2007; 461-76.
- Sanmartin M, Pateraki R, Chatzopoulou F, Kanellis AK. Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress. *Planta* 2007; 225(4): 873-85.
- Quintanar L, Stoj C, Taylor AB, Alexander B, Taylor A, Hart PJ, *et al.* Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Acc Chem Res* 2007; 40(6): 445-52.
- Albani D, Sardana R, Laurian S, Robert LS, Altosaar L, Arnison PG, *et al.* A Brassica napus gene family which shows sequence similarity to ascorbate oxidase is expressed in developing pollen. Molecular characterization and analysis of promoter activity in transgenic tobacco plants. *Plant J* 1992; 2(3): 331-42.
- Sedbrook JC, Carroll KL, Hung KF, Masson PH, Somerville CR. The *Arabidopsis* *SKU5* gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell* 2002; 14(7): 1635-48.
- Groot P, Weterings K, Been M, Wittink F, Hulzink R, Custers J, *et al.* Silencing of the pollen-specific gene *NTP303* and its family members in tobacco affects *in vivo* pollen tube growth and results in male sterile plants. *Plant Mol Biol* 2004; 55(5): 715-26.
- Jacobs J, Roe JL. SKS6, a multicopper oxidase-like gene, participates in cotyledon vascular patterning during *Arabidopsis thaliana* development. *Planta* 2005; 222(4): 652-66.
- McCubbin AG, Lee C, Hetrick A. Identification of genes showing differential expression between morphs in developing flowers of *Primula vulgaris*. *Sex Plant Reprod* 2006; 19: 63-72.
- Shimomura S. Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: a photoaffinity crosslinking study. *Plant Mol Biol* 2006; 60(5): 663-77.
- Weterings K, Reijnen W, Aarssen R, Kortstee A, Spijkers J, Herpen M, *et al.* Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Mol Biol* 1992; 18(6): 1101-11.
- Wittink FRA, Knuiman B, Derksen J, Capkova V, Twell D, Schrauwen JAM, *et al.* The pollen-specific gene *Ntp303* encodes a 69 kDa glycoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall. *Sex Plant Reprod* 2000; 12: 276-84.
- Fidlerova A, Smykal P, Tup J, Capkova V. Glycoproteins 66 and 69 kDa of pollentube wall: properties and distribution in angiosperms. *J Plant Physiol* 2001; 158(11): 1367-74.
- Sakurai T, Kataoka K. Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(19-20): 2642-56.
- Ryden LG, Hunt LT. Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *J Mol*

- Evol 1993; 36(1): 41-66.
- 20 Murphy ME, Lindley PF, Adman ET. Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Sci* 1997; 6(4): 761-70.
 - 21 Nakamura K, Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(18): 2050-66.
 - 22 Nakamura K, Kawabata T, Yurab K, Go N. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Lett* 2003; 553(3): 239-44.
 - 23 Lawton TJ, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ, Rosenzweig AC. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase. *J Biol Chem* 2009; 284(15): 10174-80.
 - 24 Shen CH, Krishnamurthy R, Yeh KW. Decreased L-ascorbate content mediating bolting is mainly regulated by the galacturonate pathway in *Oncidium*. *Plant Cell Physiol* 2009; 50(5): 935-46.
 - 25 Tullio MC, Ciraci S, Liso R, Arrigoni O. Ascorbic acid oxidase is dynamically regulated by light and oxygen. A tool for oxygen management in plants? *J Plant Physiol* 2007; 164(1): 39-46.
 - 26 郭燕, 朱杰, 许自成, 张水成. 植物抗坏血酸氧化酶的研究进展. *植物生理科学* 2008; 24(3): 196-9.
 - 27 Lin LS, Varner JE. Expression of ascorbic acid oxidase in Zucchini Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol* 1991; 96(1): 159-65.
 - 28 Kisu Y, Harada Y, Goto M, Esaka M. Cloning of the pumpkin ascorbate oxidase gene and analysis of a cis-acting region involved in induction by auxin. *Plant Cell Physiol* 1997; 38(5): 631-7.
 - 29 Tabata K, Takaoka T, Esaka M. Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* 2002; 61(6): 631-5.
 - 30 Esaka M, Fujisawa K, Goto M, Kisu Y. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol* 1992; 100(1): 231-7.
 - 31 McCaig BC, Meagher RB, Dean JFD. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2005; 221(5): 619-36.
 - 32 Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J* 2006; 273(10): 2308-26.
 - 33 丛汉卿, 徐立, 信彩云, 李志英. 植物漆酶的研究进展. *安徽农业科学* 2009; 37(18): 8322-3.
 - 34 Pua EC, Davey MR. *Plant developmental biology - biotechnological perspectives*. Heidelberg: Springer, 2010, 245-82.
 - 35 Yamagami M, Haga K, Napier RM, Iino M. Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiol* 2004; 134(2): 735-47.
 - 36 Fischer U, Men S, Grebe M. Lipid function in plant cell polarity. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7(6): 670-6.

Process of Multicopper Oxidase and Its Subfamily Member SKS in Plant

Zhi-Xian Zhang, Qi-Zhen Chen, Jia-Shu Cao*

(Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Multicopper oxidase, which includes ascorbate oxidase, laccase, ceruloplasmin and so on, is a very important metal oxidase in plant and relates to kinds of physiological processes with non-substituted value. SKS family, a subfamily member of multicopper oxidase, doesn't have all the histidine residues which are necessary for copper binding sites. Owing to loss of the active center of multicopper oxidase enzyme, it might play a new function for plant development. This paper reviews the type of copper-binding sites, choice of substrates, the process of evolution of multicopper oxidase and the SKS family in plant.

Key words multicopper oxidase; copper-binding site; evolution; SKS; gene

Received: August 5, 2010 Accepted: October 15, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30871715)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn