

DOI: 10.13376/j.cbils/2022126

文章编号: 1004-0374(2022)09-1135-10

植物漆酶及其在植物生长发育中的作用

白永生, 周嘉杰, 唐玉林*

(深圳大学生命与海洋科学学院, 广东省植物表观遗传学重点实验室, 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 深圳大学龙华生物产业创新研究院, 深圳 518060)

摘要: 漆酶 (laccase) 是一类含有铜离子的多酚氧化酶, 广泛存在于细菌、真菌、昆虫和植物等生物中, 作用底物多样, 可在有氧的情况下催化底物发生氧化还原。植物漆酶蛋白家族成员众多, 功能多样, 主要以催化木质素单体聚合的方式, 参与植物次生细胞壁形成, 对植物的生长发育具有重要作用。近年来植物漆酶及其生物学功能备受关注, 本综述从植物漆酶蛋白家族成员的种类、基因表达调控、蛋白质结构特征、生化反应机制, 以及生物学功能等方面, 详细介绍植物漆酶家族的研究进展, 为深入研究植物漆酶的功能、作用机制及其应用提供信息。

关键词: 植物漆酶; 木质素; 细胞壁; 转录调控; 生长发育

中图分类号: Q946.5 **文献标志码:** A

Plant laccases and their roles in plant growth and development

BAI Yong-Sheng, ZHOU Jia-Jie, TANG Yu-Lin*

(College of Life Sciences and Oceanography, Guangdong Provincial Key Laboratory for Plant Epigenetics, Shenzhen Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecological Environment, Longhua Institute of Biological Industry Innovation, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Laccases are phenol oxidases with copper ions, and widely present in various species such as bacteria, fungi, insects, and plants. Laccases can act on multiple substrates, and catalyze the redox of substrates under aerobic conditions. The plant laccase family has many members and diverse functions, mainly catalyzing the polymerization of lignin monomers and participating in the formation of secondary cell walls, and it plays a vital role in plant growth and development. Plant laccases and their biological functions have attracted much attention in recent years. In this review, we detail the research progress of the plant laccases family from the aspects of the gene expression regulation, protein structure characteristics, biochemical reaction mechanism, and biological function, thereby providing information for further study on the plant laccase function, mechanism, and application.

Key words: plant laccases; lignin; cell wall; transcriptional regulation; growth and development

漆酶 (laccase, p -二元酚氧化酶, EC 1.10.3.2, LAC) 又名漆酚氧化酶, 因最早在日本漆树 (*Rhus venicifera*) 的分泌物中发现得名^[1], 是一类含有 4 个铜离子的多酚氧化酶, 属于铜蓝氧化酶家族, 广泛存在于真菌、细菌、植物及昆虫等生物中^[2]。UniProtKB (www.uniprot.org/) 中记录的不同物种中的漆酶蛋白质序列多达 7 300 余个, 其中 1 026 个来源于细菌, 6 258 个来源于真核生物, 16 个来源于古核生物, 长度为 200~800 个氨基酸 (amino acid,

AA)。现阶段对于真菌漆酶功能及应用的研究较为深入^[3], 但对植物漆酶的研究相对较少。

植物漆酶属于多基因家族蛋白, 在日本漆树 (*R. venicifera*)^[1]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[4]、水

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-07-02

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2020A1515010-309); 深圳市可持续发展科技项目(KCXFZ2020122-1173211033)

*通信作者: E-mail: yltang@szu.edu.cn

稻 (*Oryza sativa*)^[5]、棉花 (*Gossypium*)^[6]、櫻桃 (*Prunus avium*)^[7]、梨 (*Pyrus bretschneideri*)^[8]、杨树 (*Populus trichocarpa*)^[9]、柑橘 (*Citrus sinensis*)^[10]、荔枝 (*Litchi chinensis*)^[11]、大豆 (*Glycine max*) 和玉米 (*Zea mays*)^[12] 等物种中的研究发现, 漆酶对植物的生长发育具有重要的调节作用。漆酶在植物木质素合成^[13]、色素沉着^[14]、茉莉酸和类黄酮积累^[15]、次生细胞壁生物合成^[13]、果实中石细胞的形成^[8]等生理生化过程中起着重要的调节作用; 此外, 漆酶还可调控植物的凯氏带形成^[16], 对农作物的产量和质量, 如水稻产量^[17]、棉花纤维品质^[15]等产生影响。近年来, 有关漆酶的生化功能、结构分析、催化机理以及应用等方面的研究都取得了重要进展, 漆酶的功能挖掘已成为研究热点。本文从植物漆酶的分类与表达调控、蛋白质的结构和特征、一般生化功能, 以及对植物生长发育的作用等方面进行综述, 有利于研究者们全面了解植物漆酶, 并为植物漆酶基因生物学功能的深入研究和应用提供基础参考, 为提高农作物产品的质量提供思路。

1 植物漆酶蛋白家族

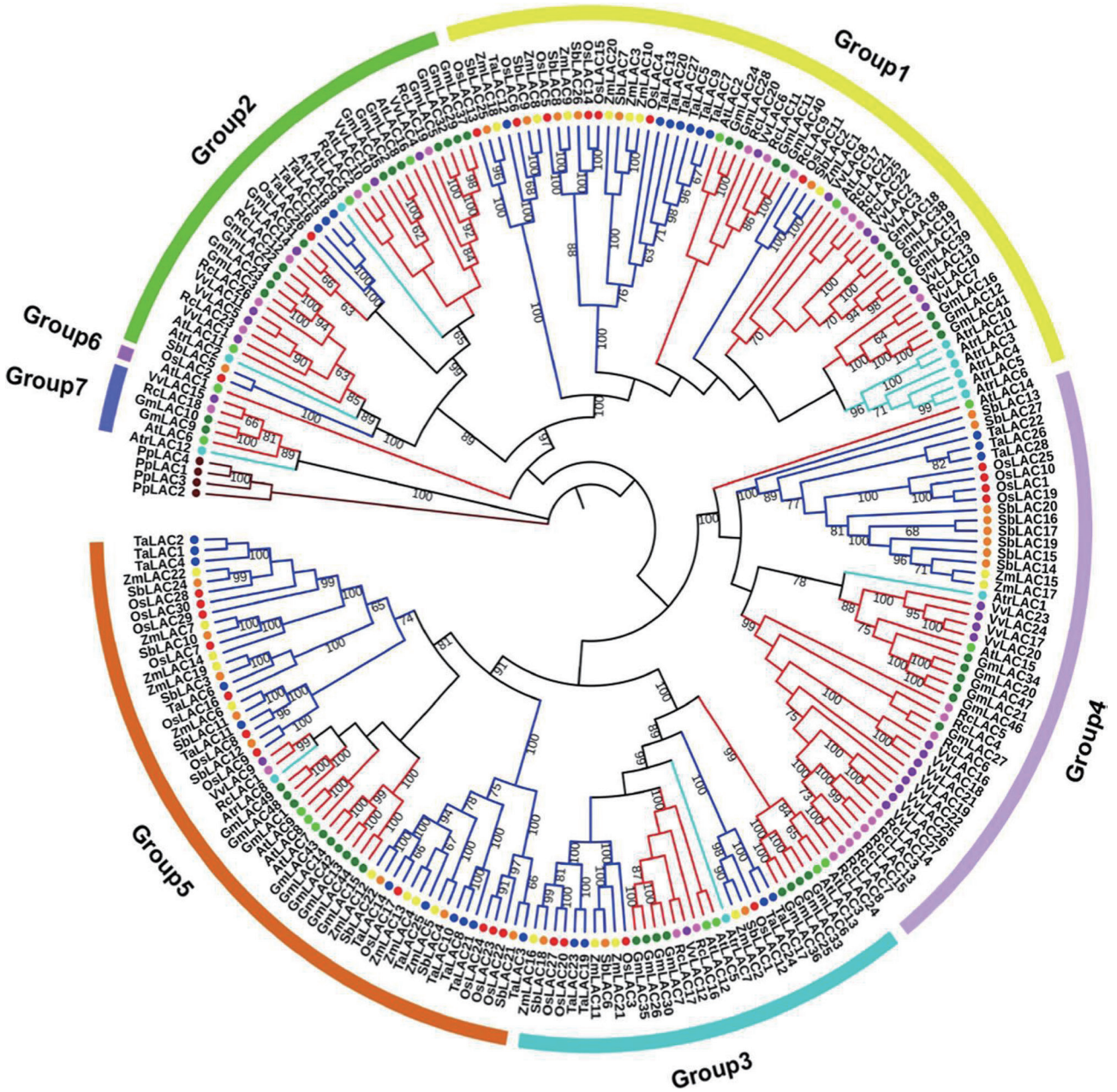
不同植物中的漆酶家族成员数量、种类等差异较大, 但功能上有相似性。因此, 构建植物漆酶家族进化树, 可以了解植物漆酶之间的进化关系, 掌握不同植物漆酶特点及不同植物漆酶的相似性等, 便于根据已知漆酶功能推测待研究植物漆酶的功能。Liu 等^[12]利用 10 个植物物种的 239 个漆酶的氨基酸序列构建了系统发育树, 并将来自高等植物的漆酶分为 7 个不同的组, 较全面地展示了植物中漆酶的同源性和起源。结果发现, 在树根处出现了一个单系分支的 4 个苔藓 PpLACs, 游离于其他不同植物来源的漆酶组别之外, 这可能是低等植物苔藓中最早出现的有别于高等植物的漆酶 (图 1)。对原始的被子植物无油樟漆酶 (*Amborella trichopoda* LAC, AtrLAC) 分析发现, 12 个 AtrLACs 分散在不同的 6 个组中, 其中 6 个 AtrLACs 在组 1, 2 个在组 2, 组 3~5 和组 7 各有 1 个 AtrLAC, 可见在裸子植物和被子植物出现分化时, 漆酶已经出现了较大程度的分化。另外, 在第 2 组的拟南芥 AtLAC4 和 AtLAC11 被证实和植物木质素的合成有关^[18-19], 推测同属于该组中的其他物种来源的漆酶可能也具有类似的功能, 其他不同组别间的漆酶的功能是否具有组别间的差异或相似性尚待研究。

2 植物漆酶基因的表达调控

对植物漆酶上游启动子序列进行分析, 有利于了解植物漆酶基因家族成员的表达调控。以拟南芥漆酶 (*AtLACs*) 家族成员为例, 利用在线预测网站 PlantCARE (bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) 和 NEW PLACE (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace) 对 *AtLACs* 起始密码子上游约 2 000 bp 的序列进行分析。结果 (表 1) 发现, 该区域除了包含真核生物的基本转录元件 TATA-box、CG-box 等外, 还存在着许多感知环境变化相关的顺式作用元件, 如响应干旱和高盐诱导的 MYB、响应脱落酸的 ABRE、响应光变化的 TCT-motif、响应温度变化的 TGACG-motif 以及响应铜变化的 CURECORECR 等等。一些研究显示, *LACs* 基因可响应环境胁迫而发生表达水平的改变^[5], 调控植物的生长发育。MYB 是一个成员众多、功能多样的含有保守性结合 MYB 结构域的转录因子家族, 植物中的 *R2R3-MYB* 基因家族在植物生长发育以及响应生物或非生物胁迫的调控网络中发挥关键作用^[20]。研究证明, 拟南芥 *AtMYB58/63* 可通过结合 *AtLAC4* 启动子中的 MYB 顺式作用元件, 促进 *AtLAC4* 的表达, 从而促进纤维或导管木质素合成, 影响次生细胞壁的形成^[21]。

此外, 植物漆酶同样被复杂的转录后调控机制调控。miRNA 是一类长度在 20~24 nt 的单链非编码的微小 RNA (microRNA), 可通过互补结合靶基因的方式, 对靶基因进行沉默或抑制, 以达到转录后调控^[22]。大量实验表明, 植物 miR397^[23]、miR408^[24] 及 miR857^[25] 等均靶向植物漆酶基因的 mRNA, 对其转录后水平进行负调控。例如, Jones-Rhoades 等^[26]利用 5'RACE 实验证明了拟南芥 miR397 可靶向 *AtLAC2*、*AtLAC4*、*AtLAC17*。在拟南芥中过表达 miR397 可显著降低 *AtLAC2*、*AtLAC4*、*AtLAC17* 的表达量以及木质素含量, 进一步证实拟南芥 miR397 对 *AtLAC* 的转录后调控作用^[27-28]; 菜心在受到镉胁迫时 miR397 表达上调, 而其对应的靶基因 *LAC11*、*LAC4*、*LAC17* 的转录水平则一定程度下调^[29]。

综上所述, 植物漆酶的启动子上存在多种转录因子的结合位点, 已证实转录因子 MYB 家族的部分成员可以调控植物漆酶的表达, 而 miRNA 则可对其转录后水平进行调控。但植物漆酶家族成员众多, 相关研究相对缺乏, 在植物漆酶转录及转录后



At, *Arabidopsis thaliana*; Atr, *Amborella trichopoda*; Gm, *Glycine max*; Os, *Oryza sativa*; Pp, *P. patens*; Rc, *Ricinus communis*; Sb, *Sorghum bicolor*; Ta, *Triticum aestivum*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*

图1 基于10种植物的239个漆酶蛋白构建的植物漆酶蛋白家族的系统发育树^[12]

水平的调节因子还有待进一步发现和证实。

3 植物漆酶蛋白结构

3.1 一级结构

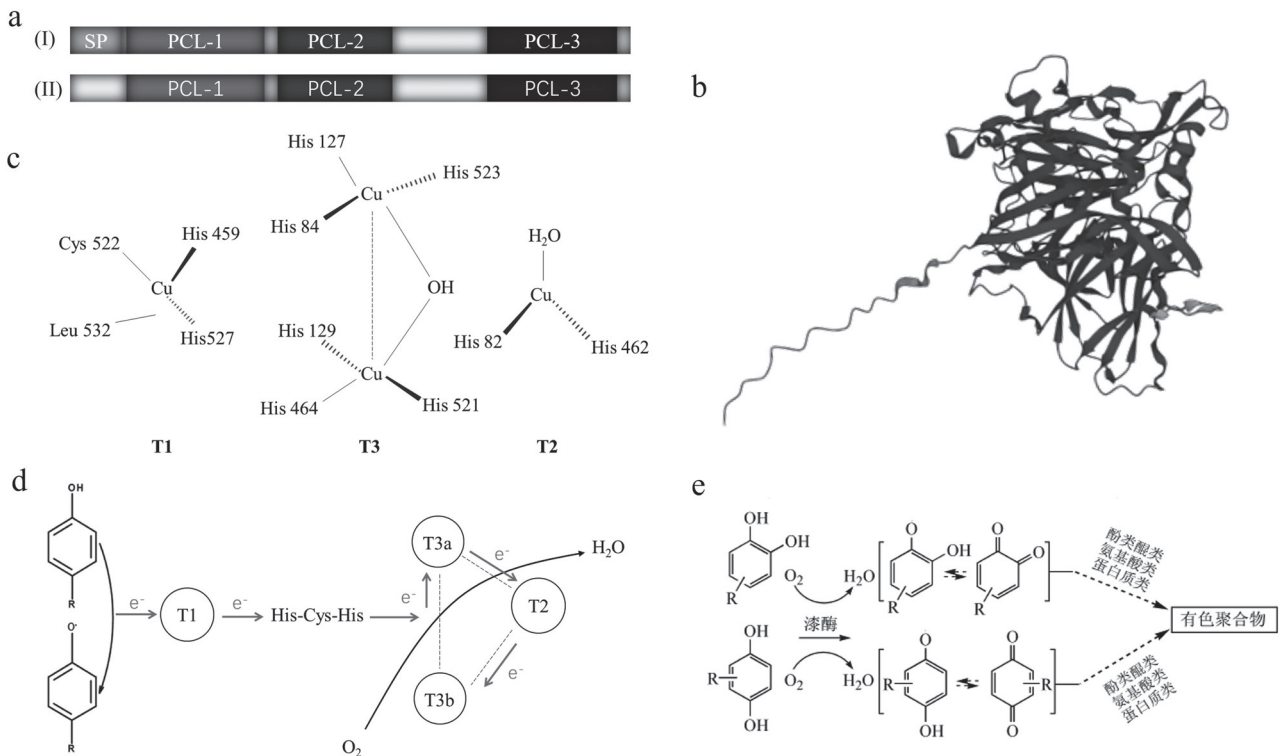
植物漆酶同其他物种来源的漆酶, 在一级结构上具有相似的特征^[30]。不同来源的植物漆酶在氨基酸序列上差异较大, 但它们在特殊结构域氨基酸序列上具有一定的保守性, 如 Wang 等^[31]对部分植物、昆虫、细菌和真菌漆酶的氨基酸序列比对分析发现,

铜离子结合位点处的氨基酸在不同物种之间相对保守: 即 10 个组氨酸、1 个半胱氨酸和 1 个作为轴向配体的蛋氨酸、亮氨酸或苯丙氨酸, 在种类和间距上都高度保守。

植物漆酶一级结构一般由 500-600 个 AA 组成^[2,31], 具有三个质体蓝素类似结构域序列 (plastocyanin-like, PCL), 即铜离子结合的杯型铜蛋白 (cupredoxin-like) 结构域^[32], 这三个结构域也是漆酶蛋白的特征结构域, 分为 PCL-1、PCL-2、PCL-3 模型 (图 2a)。

表1 拟南芥漆酶启动子顺式作用元件分析

名称	ABRE	CG-box	TCT-motif	TGACG-motif	MYB	CURECORECR
<i>AtLAC1</i>	4	4	1	1	5	7
<i>AtLAC2</i>	3	3	3	2	1	4
<i>AtLAC3</i>	1	2	0	1	1	6
<i>AtLAC4</i>	0	0	2	0	5	7
<i>AtLAC5</i>	2	1	0	0	3	3
<i>AtLAC6</i>	3	4	2	2	3	1
<i>AtLAC7</i>	6	4	0	1	2	5
<i>AtLAC8</i>	2	3	2	0	5	3
<i>AtLAC9</i>	2	2	0	3	5	3
<i>AtLAC10</i>	3	4	0	3	5	2
<i>AtLAC11</i>	3	3	1	0	4	4
<i>AtLAC12</i>	1	1	2	0	3	1
<i>AtLAC13</i>	1	2	3	6	2	1
<i>AtLAC14</i>	1	1	1	0	4	0
<i>AtLAC15</i>	5	4	2	2	2	2
<i>AtLAC16</i>	2	3	1	1	5	2
<i>AtLAC17</i>	10	5	4	1	1	9



a: 植物漆酶蛋白一级结构模型(SP, 信号肽; PCL, 质体蓝素); b: *AtLAC4*结构预测3D结构示意图(www.alphafold.ebi.ac.uk/entry/O81081); c: *AtLAC4*活性中心铜离子结构(改变自Wang等^[31]); d: 漆酶一般催化机理^[2-3, 38-39]; e: 漆酶氧化酚类化合物聚合的可能机理^[40]。

图2 漆酶蛋白结构及催化机理模型

利用蛋白质结构预测网站 UniProt (www.uniprot.org/) 对拟南芥、水稻、玉米、大豆等部分常见植物漆酶的一级结构进行预测, 发现这些序列呈高度保守状态。PCL-1 长度约 120 个 AA, PCL-2 长度约 155

个 AA, 这两个结构域之间一般存在 10 个 AA 的间隔区域; PCL-3 长度约 135 个 AA, PCL-3 与 PCL-2 间的距离在物种间有所差别。此外, 大多数植物漆酶 N 端都含有一个信号肽 (图 2a I), 推测这些漆酶

主要分泌到并定位于细胞壁, 起到调控木质素合成等作用^[31, 33]; 也有少数植物漆酶不含信号肽(图 2a II), 如 OsLAC11/16 和 OsLAC16、BnaLAC20、ZmLAC-15-3/25-0 等, 它们非常可能在胞内参与氧化还原反应。

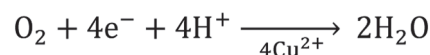
3.2 高级结构

具有活性的植物漆酶也是先由一级结构形成 α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲等二级结构, 再由共价键连接形成二聚体或者四聚体的高级结构^[32], 以拟南芥 AtLAC4 为例, 通过 alphafold 网站 (www.alphafold.ebi.ac.uk/) 可获取其高级结构预测模型, 见图 2b。植物漆酶是分子量在 60~130 kDa, 且高度糖基化 (22%~45%) 的糖蛋白^[31, 33], 糖基的存在不仅提高了漆酶的稳定性, 也使不同来源的漆酶蛋白分子量有较大差异, 且很有可能是植物漆酶家族成员行使不同功能的主要原因之一。此外, 高度的糖基化亦增加了对植物漆酶纯化的难度。目前, Xie 等^[34] 通过异源表达 ZmLAC3, 并利用 EndoH 脱去 ZmLAC3 上的糖基, 检测出 ZmLAC3 同其他物种中的漆酶在高级结构上具有同样的核心结构, 即含有保护金属离子与调节反应活性的 3 个杯型蛋白结构域, 并与 4 个铜离子构成铜离子活性中心。该铜离子活性中心是漆酶发挥氧化还原功能的主要场所。根据氧化还原电势、光谱及磁性等特征, 可以将 4 个铜离子分为 3 种类型: I 型或蓝型铜 (T1)、II 型或通常型铜 (T2)、III 型或耦合的双核型铜 (T3)^[35]。图 2c 是参考 Wang 等^[31] 的方法绘制拟南芥 AtLAC4 活性中心铜离子结构示意图。T1 只含有 1 个铜离子, 为顺磁性的单电子受体, 该铜离子与 Cys 之间的共价配位键在 610 nm 处有特异性的蓝色吸收带 (也称作蓝铜)。T2 含有 1 个铜离子, 为顺磁性的单电子受体, 该铜离子不稳定, 且铜离子中心具有四方形的几何结构。T3 具有 2 个铜离子 (分别为 T3a、T3b), 呈反磁性的双电子受体, 因一个羟基耦合了 2 个 III 型铜原子, 导致电子顺磁共振效应消失, 并在 330 nm 处有一个弱的特异吸收带^[36]。一般 T1 中心相对独立, 与 Cys、Met 的 S 及 2 个 His 中的 N 配位, 形成扭曲的四面体结构, 距离 T2-T3 中心大约 1.3 nm。T2 和 T3 主要与 His 连接构成三核铜簇 (trinuclear coppercenter, TNC)^[2, 37]。

4 植物漆酶的催化机理及酶学性质

植物漆酶催化不同的底物发生反应时也会有不

同的机理。对富含电子的底物 (如苯酚类、芳香胺等)^[41] 进行催化时, 一般按如下反应式进行:



漆酶在催化氧化反应时的一般过程: (1) 对底物的作用: 酶的 T1 首先与底物结合, 底物将 4 个电子转移到 T1 的 Cu 上; (2) 电子在酶中的传递: 当 T1 被还原后, 电子将通过 Cu-Cys-His 的途径传递给 TNC; (3) 氧分子对酶的还原: 在 TNC 中 T3(a) 首先接到电子, 随后再转移给 T2, 最后 T3(b) 通过 T1 和 T3 之间的 Cys-His 途径将 O_2 还原, 并在 T2 处释放 2 个水分子^[34, 38, 42-43] (图 2d)。根据植物漆酶结构特征可以推测, 植物漆酶的氧化还原反应是对底物进行氧化后形成底物自由基, 同时生成 H_2O 。

植物漆酶的活性同其他酶一样, 在进行催化反应时会受到温度、pH、等电点 (PI) 等的影响。植物漆酶作用的 pH 一般为 5~7, PI 为 5.0~9.6^[33], 其催化反应的最适 pH 值也与作用底物有关。此外, 植物漆酶催化底物的种类及催化效率还取决于 T1 型铜的氧化还原电势, T1 型铜的氧化还原电势越高, 催化效率也越高, 而植物漆酶 T1 的电势一般较低 (约 0.43 V)^[33, 42], 催化的底物范围有限, 催化效率相对较低。一般情况下, 含有类似于邻、对二酚的结构底物能够被植物漆酶所催化, 如酚类、芳胺类和羧酸类等及其衍生物^[41]。当底物被漆酶氧化失去电子后就会形成自由基, 这些自由基非常的不稳定, 进而发生一系列非酶促反应, 如重排、二聚、烷基-芳基断裂、侧链和芳环的断裂等, 导致底物聚合或者解聚^[44]。植物漆酶同样是从酚或邻苯二酚、对苯二酚 (胺) 类物中转移一个电子, 形成底物自由基, 底物自由基再发生 C-C 偶联、C-O 偶联、O-O 偶联生成二聚体、三聚体, 乃至多聚体 (图 2e)。

这类反应或许也是植物漆酶催化木质素聚合或解聚, 进而影响次生细胞壁的生长发育, 以及对植物伤口愈合起作用的方式^[18, 45], 如 AtLAC4、AtLAC17 等参与木质素单体的聚合^[46], 而 AtLAC2 却参与木质素的解聚作用^[47]。尽管 Xie 等^[34] 研究并提出了 ZmLAC3 对芥子醇和松柏醇的结合模式, 但是对植物漆酶的酶学特征及与底物作用方式的研究依然有待拓展和深入, 对漆酶如何调控植物生长发育的分子机制的认识还不充分。

5 植物漆酶在植物生长发育中的生物学功能

5.1 植物漆酶的生化功能

相较于被广泛认识和应用的真菌、细菌等漆酶的功能^[43],人们对植物漆酶的功能认识还相对局限。目前认为,植物漆酶主要是参与木质素的合成过程。木质素一般是由三种单醇类化合物(对香豆醇、松柏醇和芥子醇)聚合而成,沉积于各种组织和细胞中,主要存在于纤维、放射状薄壁组织、叶脉和维管束鞘细胞的次生细胞壁中^[48-49],是细胞壁的重要组成材料,具有维持植株机械韧性、抗倒伏和抵御外界不良刺激的作用,是植物从水生到陆生长所必需。因此,漆酶在细胞壁组分及结构形成中起重要作用。除此之外,植物漆酶还可以对酚类和类黄酮类化合物等进行底物氧化,生成酚类化合物自由基和合成多黄酮类化合物,影响植物的生长发育^[10, 31, 33]。

5.2 植物漆酶对细胞壁发育的影响

漆酶通过调控木质素合成而影响细胞壁的发育。在拟南芥中,AtLAC2、AtLAC4、AtLAC17被认为参与到木质素的合成过程,以此对植物的生长发育起调控的作用^[18-19, 27]。拟南芥*lac17*突变体中木质素含量明显下降,甘蔗的*SofLAC*在*AtLAC17*启动子下表达时,可以恢复拟南芥*lac17*突变株的木质素的含量^[50];过表达*AtLAC4*不仅可增加拟南芥的木质素含量,还会导致次生壁加厚、植株变小和莲座叶叶柄变短^[51];但在过表达*AtLAC2*的拟南芥中,木质素含量却明显减少,植物出现植株矮小、叶片变小、根长变短等表型^[47, 52],而拟南芥*lac2*突变体的根长与野生型没有差异^[14]。Berthet等^[13]发现拟南芥*lac4/17*双突变体植株在连续光照的条件下株高显著降低,次生细胞壁明显变薄,而单突变体则未发生明显的表型变化。对拟南芥*lac4/11/17*三突变体植株检测发现,植株木质素含量下降,且出现生长停滞、根直径较窄及维管发育停滞等现象^[19],说明漆酶基因家族各成员之间的功能相似或有适度冗余,单一基因的缺失并不会造成明显的表型改变。此外,在拟南芥中异源过表达*PpLAC1*^[8]和*MsLAC1*^[53]可以增加木质素含量,进而增加次级细胞壁厚度。Qin等^[54]研究发现,在杨树中过表达*PtoLAC14*通过优先氧化松柏醇形成G木质素单体,影响木质素含量,改变细胞壁结构。Xie等^[34]通过体外结晶的方式也证明了ZmLAC3对芥子醇特异性的结合大于松柏醇。尽管发现不同来源的植物漆

酶可通过氧化聚合单木醇形成木质素,或者某些植物漆酶对特定单木醇合成或聚合具有特异性,但是具体机制仍然有待进一步探究。

5.3 植物漆酶对凯氏带形成的影响

漆酶通过影响木质素的合成而影响凯氏带的发育。凯氏带是内皮层细胞的初生细胞壁外与相邻细胞相连的一个纽带,在植物根系内皮层细胞的生长发育中具有重要的作用^[55]。Zhuang等^[16]的研究表明,AtLAC3优先在内皮层细胞中表达积累,随后跨过细胞膜到达早期发育过程中木质素结构域与细胞壁之间的界面,并对木质素进行沉积,随着木质素结构域的扩大,AtLAC3被逐渐推到融合的凯氏带区域的边界,最终AtLAC3位于连续木质素带两侧的边界上。但Rojas-Murcia等^[56]的研究结果却显示,可能参与凯氏带构建的9个拟南芥漆酶基因(*lac1/3/5/7/8/9/12/13/16*)突变后形成的突变株,其环状凯氏带的形成并没有受到影响,反而是另外5种过氧化物酶的突变影响了凯氏带的形成,并伴随着有大量活性氧积累的现象。Zhao等^[19]的研究也发现,尽管*Atlac4/11/17*三基因突变会影响根部的木质素的沉积,但不会影响到凯氏带的功能。出现这样的差异性结果,可能是由于植物漆酶和过氧化物酶在木质素单体氧化和聚合过程中具有一定的互补作用,可进行部分功能替代,但仍需进一步的实验证据以明确内皮层细胞的初生细胞壁与凯氏带形成的机制。

5.4 植物漆酶对植物生殖发育的影响

研究发现,在模式植物拟南芥中,漆酶会调控生殖发育。过表达*AtLAC2*的拟南芥植株开花时间推迟,花序轴分枝变多^[52]; *Atlac5*突变体的种皮中G木质素单体和木质素合成下降,并使种子皮的通透性增加^[57]; *Atlac8*突变体植株出现早花^[14]; *Atlac4/11/17*三突变体拟南芥中还出现花药不开裂现象^[19];另外,突变体*Atlac15*(最早称作*tt10*)的种子颜色呈现黄色或淡黄色^[14, 58-59],类似于透明的种皮表型,而这种表型很可能是由于原花青素合成过程缺陷引起的^[59]。研究发现,*PtLAC3*、*BnTT10*和*ZmLAC3*分别在白杨树、甘蓝型油菜和玉米中发挥类似对酚类或类黄酮化合物的作用^[60-62]。有报道表明,AtLAC12可能参与到铁在根到冠之间的分配^[63],但是具体机制还不明确。过表达*miR408*使*AtLAC13*的表达水平下调后,转基因植株出现了包括花大小和角果长度显著增加等的形态变化,生物量和种子产量也均增加;过表达*AtLAC13*的植株则

出现了相反的表型^[64]。

漆酶通过影响生殖器官的发育影响水稻产量性状。Zhang 等^[17]的研究发现, 在水稻中过表达 *OsLAC* 会使水稻呈现致死或半不育症状, 少数转基因植株能产生成熟籽粒, 但籽粒大小也会明显小于野生型, 主穗长度及主、侧分枝数、穗粒数明显下降。进一步研究表明, 过表达 *OsLAC13* 会诱导过氧化氢的产生, 影响雄蕊维管细胞线粒体的数量和完整性, 但是雌蕊发育不受影响, 从而产生小圆锥花序、致死表型和半不育等不良性状, 导致种子数量减少, 影响结实率^[65]。Zhong 等^[66]对水稻的研究也发现, 抑制 *OsLAC14* 表达会使植株升高、茎部变粗、籽粒重量和长度增加, 茎和叶鞘中单个细胞的长度明显变长, 过表达则相反。Peng 等^[67]的发现亦证实了 *LACs* 在水稻籽粒发育中具有重要的调控作用。可见, 漆酶可通过对生殖器官发育的调控而对穗分支、雄蕊育性、果穗大小、籽粒大小和结实率等与种子产量形成相关的过程产生明显影响, 从而对作物产量产生影响。

在棉花中, 漆酶与棉花纤维的发育相关, 抑制棉花 *GhLAC1* 的表达能够促进棉花中表皮细胞分化为表皮纤维, 但棉纤维的长度变短, 可能是由于胚珠和纤维细胞中茉莉酸和类黄酮积累过多所致^[6, 15]。在白梨果实发育的早期, 白梨 *PbLAC1* 参与石细胞细胞壁中木质素的积累, 过多的石细胞往往会影响到果实的品质^[8]。在荔枝的果皮中, 漆酶参与类黄酮的聚合进而使果皮褐变^[11]。由此可见, 调控植物漆酶的表达将有利于提高农产品的质量。

综上所述, 同种植物中的不同漆酶成员或不同植物来源的同种漆酶对植物的生殖生长发挥不同的作用, 影响植物的产量和质量。进一步探究植物漆酶在植物中的功能与作用机制, 并合理调控应用将对提高农作物产量和质量具有重要的理论指导作用。

6 总结展望

植物漆酶属于蓝铜氧化还原蛋白家族, 通过对底物进行氧化和电子在酶中的传递, 产生底物自由基, 进而使得底物发生一系列非酶促反应, 参与植物细胞的生长发育调控。不同植物中漆酶蛋白数量和结构等有差异, 但整体上进化是保守的, 它们具有相似的结构域和保守的活性反应位点, 发挥相似的功能。目前已经明确 MYB 转录因子家族的部分成员以及 miRNA (miR397、miR408 及 miR857 等) 可以在转录水平和转录后水平上对植物漆酶的表达

进行调控。但对漆酶基因启动子分析的结果表明, 还有很多其他响应元件如 ABA 等的存在, 相关研究仍然有待深入。对蛋白质序列一级结构的分析表明, 绝大部分植物漆酶均含有信号肽序列, 表明植物漆酶可能主要是分泌性蛋白, 在细胞边界参与次生细胞壁的形成, 它们是否也参与凯氏带的形成还有待更深入研究。也有一些植物漆酶不具备信号肽, 如 *OsLAC11/16* 和 *OsLAC16*、*BnaLAC20*、*ZmLAC-15-3/25-0* 等, 这些成员或许在胞内参与其他生物学过程, 如对除草剂的解毒作用^[68]、色素沉着^[14]等, 其功能尚待研究。

目前认为, 植物漆酶主要以调控木质素单体聚合/解聚的方式影响植物组织的机械强度, 或者参与酚类和类黄酮类等化合物的聚合, 影响如色素沉着、伤口修复等进而调控植物的生长发育。由于众多的植物漆酶家族成员之间, 甚至与一些具有相似功能的蛋白如过氧化物酶等之间, 可能存在功能互补, 使得对漆酶功能的研究变得复杂; 再加上大部分植物难以进行转基因操作等因素, 致使对植物漆酶的研究难度增加。

植物漆酶还参与植物的逆境响应, 如协助植物抵抗酚酸类等有机污染^[69-70], 抵御病虫害的威胁^[12, 71], 防御重金属毒害^[5, 29, 72-75], 协调水分、盐及温度胁迫等^[5, 12, 47, 51, 76-80]。可见, 植物漆酶在植物抵御环境胁迫、调控植物生长发育的过程中发挥重要作用。探明植物漆酶的功能有助于进一步对漆酶利用并造福于人类, 如突变某些水稻漆酶可以增加产量, 适时调节棉花漆酶有利于改善棉花纤维质量, 明确漆酶在植物果实如荔枝等的褐变中的作用有利于水果的储存运输, 亦可利用植物漆酶对环境污染进行修复等。

尽管目前已鉴定出许多植物漆酶基因, 并对其表达及转录后调控、蛋白质空间结构及化学功能等有初步了解, 然而对植物漆酶表达调控机制、作用机理等仍然需要全面深入的研究, 以加深人们对植物漆酶的认识, 这将为植物漆酶的应用提供理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] Yoshida H. Chemistry of lacquer (urushi). J Chem Soc, 1883, 43: 472-86
- [2] Arregui L, Ayala M, Gomez-Gil X, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. Microb Cell Fact, 2019, 18: 200
- [3] Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties.

- FEMS Microbiol Rev, 2006, 30: 215-42
- [4] McCaig BC, Meagher RB, Dean JF. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2005, 221: 619-36
- [5] Liu Q, Luo L, Wang X, et al. Comprehensive analysis of rice laccase gene (*OsLAC*) family and ectopic expression of *OsLAC10* enhances tolerance to copper stress in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 209
- [6] Balasubramanian VK, Rai KM, Thu SW, et al. Genome-wide identification of multifunctional laccase gene family in cotton (*Gossypium spp.*); expression and biochemical analysis during fiber development. *Sci Rep*, 2016, 6: 34309
- [7] Berni R, Piasecki E, Legay S, et al. Identification of the laccase-like multicopper oxidase gene family of sweet cherry (*Prunus avium L.*) and expression analysis in six ancient Tuscan varieties. *Sci Rep*, 2019, 9: 3557
- [8] Cheng X, Li G, Ma C, et al. Comprehensive genome-wide analysis of the pear (*Pyrus bretschneideri*) laccase gene (*PbLAC*) family and functional identification of *PbLAC1* involved in lignin biosynthesis. *PLoS One*, 2019, 14: e0210892
- [9] Lu S, Li Q, Wei H, et al. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 10848-53
- [10] Xu X, Zhou Y, Wang B, et al. Genome-wide identification and characterization of laccase gene family in *Citrus sinensis*. *Gene*, 2019, 689: 114-23
- [11] Wei J, Zhang X, Zhong R, et al. Laccase-mediated flavonoid polymerization leads to the pericarp browning of litchi fruit. *J Agric Food Chem*, 2021, 69: 15218-30
- [12] Liu M, Dong H, Wang M, et al. Evolutionary divergence of function and expression of laccase genes in plants. *J Genet*, 2020, 99: 23
- [13] Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, et al. Disruption of *LACCASE4* and *17* results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell*, 2011, 23: 1124-37
- [14] Cai X, Davis EJ, Ballif J, et al. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2006, 57: 2563-9
- [15] Hu Q, Xiao S, Guan Q, et al. The laccase gene *GhLac1* modulates fiber initiation and elongation by coordinating jasmonic acid and flavonoid metabolism. *Crop J*, 2020, 8: 522-33
- [16] Zhuang Y, Zuo D, Tao Y, et al. Laccase3-based extracellular domain provides possible positional information for directing Casparian strip formation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 15400-2
- [17] Zhang YC, Yu Y, Wang CY, et al. Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 848-52
- [18] Turlapati PV, Kim KW, Davin LB, et al. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta*, 2011, 233: 439-70
- [19] Zhao Q, Nakashima J, Chen F, et al. Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 3976-87
- [20] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 573-81
- [21] Zhou J, Lee C, Zhong R, et al. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 248-66
- [22] Yu Y, Jia T, Chen X. The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytol*, 2017, 216: 1002-17
- [23] Huang S, Zhou J, Gao L, et al. Plant miR397 and its functions. *Funct Plant Biol*, 2021, 48: 361-70
- [24] Gao Y, Feng B, Gao C, et al. The evolution and functional roles of miR408 and its targets in plants. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 530
- [25] Zhao Y, Lin S, Qiu Z, et al. MicroRNA857 is involved in the regulation of secondary growth of vascular tissues in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2015, 169: 2539-52
- [26] Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 2004, 14: 787-99
- [27] Wang CY, Zhang S, Yu Y, et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 1132-42
- [28] Nguyen DQ, Brown CW, Pegler JL, et al. Molecular manipulation of microRNA397 abundance influences the development and salt stress response of *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7879
- [29] Liu Y, Liu S, Deng Y, et al. Genome-wide mRNA and small RNA transcriptome profiles uncover cultivar- and tissue-specific changes induced by cadmium in *Brassica parachinensis*. *Environ Exp Bot*, 2020, 180: 104207
- [30] Frascioni M, Favero G, Boer H, et al. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 899-908
- [31] Wang JH, Feng JJ, Jia WT, et al. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 145
- [32] Hakulinen N, Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 857-68
- [33] Janusz G, Pawlik A, Swiderska-Burek U, et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 966
- [34] Xie T, Liu Z, Wang G. Structural basis for monolignol oxidation by a maize laccase. *Nat Plants*, 2020, 6: 231-7
- [35] Mate DM, Alcalde M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 25-40
- [36] Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 2004, 35: 93-6

- [37] Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 1998, 5: 310-6
- [38] Solomon EI, Augustine AJ, Yoon J. O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans*, 2008, (30): 3921-32
- [39] Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 601-5
- [40] 靳蓉, 张飞龙. 漆酶的结构与催化反应机理. *中国生漆*, 2012, 31: 6-16
- [41] Munk L, Sitarz AK, Kalyani DC, et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 13-24
- [42] Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, et al. "Blue" laccases. *Biochemistry (Mosc)*, 2007, 72: 1136-50
- [43] Sun K, Li S, Si Y, et al. Advances in laccase-triggered anabolism for biotechnology applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41: 969-93
- [44] D'Acunzo F, Baiocco P, Fabbrini M, et al. The radical rate-determining step in the oxidation of benzyl alcohols by two N-OH-type mediators of laccase: the polar N-oxyl radical intermediate. *New J Chem*, 2002, 26: 1791-4
- [45] Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 2002, 60: 551-65
- [46] Schuetz M, Benske A, Smith RA, et al. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiol*, 2014, 166: 798-807
- [47] Khandal H, Singh AP, Chattopadhyay D. The *MicroRNA397b-LACCASE2* module regulates root lignification under water and phosphate deficiency. *Plant Physiol*, 2020, 182: 1387-403
- [48] Zhou C, Li Q, Chiang VL, et al. Chemical and spatial differentiation of syringyl and guaiacyl lignins in poplar wood via time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem*, 2011, 83: 7020-6
- [49] Yamamura M, Noda S, Hattori T, et al. Characterization of lignocellulose of *Erianthus arundinaceus* in relation to enzymatic saccharification efficiency. *Plant Biotechnol*, 2013, 30: 25-35
- [50] Cesarino I, Araujo P, Sampaio Mayer JL, et al. Expression of *SofLAC*, a new laccase in sugarcane, restores lignin content but not S:G ratio of *Arabidopsis lac17* mutant. *J Exp Bot*, 2013, 64: 1769-81
- [51] 张盛春, 鞠常亮, 王小菁. 拟南芥漆酶基因*AtLAC4*参与生长及非生物胁迫响应. *植物学报*, 2013, 47: 357-65
- [52] 张盛春, 张玉平, 王小菁. 拟南芥漆酶基因*AtLAC2*调控植物生长发育的研究. *植物生理学报*, 2012, 48: 597-604
- [53] He F, Machemer-Noonan K, Golfier P, et al. The *in vivo* impact of MsLAC1, a *Miscanthus* laccase isoform, on lignification and lignin composition contrasts with its *in vitro* substrate preference. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 552
- [54] Qin S, Fan C, Li X, et al. LACCASE14 is required for the deposition of guaiacyl lignin and affects cell wall digestibility in poplar. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 197
- [55] Geldner N. The endodermis. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 531-58
- [56] Rojas-Murcia N, Hematy K, Lee Y, et al. High-order mutants reveal an essential requirement for peroxidases but not laccases in Casparian strip lignification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 29166-77
- [57] Yonekura-Sakakibara K, Yamamura M, Matsuda F, et al. Seed-coat protective neolignans are produced by the dirigent protein *AtDPI1* and the laccase *AtLAC5* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2020, 33:129-152
- [58] Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, et al. *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 2005, 17: 2966-80
- [59] Debeaujon I, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122: 403-14
- [60] Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, et al. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol*, 2002, 129: 145-55
- [61] Zhang J, Zhang K, Lu K, et al. Gene silencing of *BnTT10* family genes causes retarded pigmentation and lignin reduction in the seed coat of *Brassica napus*. *PLoS One*, 2013, 8: e61247
- [62] Caparrós-Ruiz D, Fornalé S, Civardi L, et al. Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Sci*, 2006, 171: 217-25
- [63] Bernal M, Krämer U. Involvement of *Arabidopsis* multicopper oxidase-encoding *LACCASE12* in root-to-shoot iron partitioning: a novel example of copper-iron crosstalk. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 688318
- [64] Song Z, Zhang L, Wang Y, et al. Constitutive expression of miR408 improves biomass and seed yield in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2114
- [65] Yu Y, Li QF, Zhang JP, et al. *Laccase-13* regulates seed setting rate by affecting hydrogen peroxide dynamics and mitochondrial integrity in rice. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1324
- [66] Zhong J, He W, Peng Z, et al. A putative AGO protein, OsAGO17, positively regulates grain size and grain weight through OsmiR397b in rice. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 916-28
- [67] Peng T, Sun H, Qiao M, et al. Differentially expressed microRNA cohorts in seed development may contribute to poor grain filling of inferior spikelets in rice. *Plant Biol*, 2014, 14: 196
- [68] Huang MT, Lu YC, Zhang S, et al. Rice (*Oryza sativa*) laccases involved in modification and detoxification of herbicides atrazine and isoproturon residues in plants. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 6397-406
- [69] Wang GD, Li QJ, Luo B, et al. *Ex planta* phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 893-7
- [70] 赵先炎, 庞明利, 赵强, 等. 番茄漆酶基因*LeLAC^{miR397}*的克隆与表达分析. *园艺学报*, 2015, 42: 1285-98

- [71] Zhang Y, Wu L, Wang X, et al. The cotton laccase gene *GhLAC15* enhances Verticillium wilt resistance via an increase in defence-induced lignification and lignin components in the cell walls of plants. *Mol Plant Pathol*, 2019, 20: 309-22
- [72] Liang M, Haroldsen V, Cai X, et al. Expression of a putative laccase gene, *ZmLAC1*, in maize primary roots under stress. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 746-53
- [73] Huang JH, Zhang LY, Lin XJ, et al. *CsiLAC4* modulates boron flow in *Arabidopsis* and Citrus via high-boron-dependent lignification of cell walls. *New Phytol*, 2022, 233: 1257-73
- [74] Liu Q, Zheng L, He F, et al. Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots. *Plant Soil*, 2014, 387: 323-36
- [75] Gielen H, Remans T, Vangronsveld J, et al. Toxicity responses of Cu and Cd: the involvement of miRNAs and the transcription factor SPL7. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 145
- [76] Cho HY, Lee C, Hwang SG, et al. Overexpression of the *OsCh11* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic *Arabidopsis*. *Gene*, 2014, 552: 98-105
- [77] Ferreira TH, Gentile A, Vilela RD, et al. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum spp.*). *PLoS One*, 2012, 7: e46703
- [78] 刘彦英, 倪珊珊, 项蕾蕾, 等. 香蕉漆酶基因家族鉴定及低温胁迫下的表达分析. *园艺学报*, 2020, 47: 837-52
- [79] Arcuri MLC, Fialho LC, Vasconcellos Nunes-Laitz A, et al. Genome-wide identification of multifunctional laccase gene family in *Eucalyptus grandis*: potential targets for lignin engineering and stress tolerance. *Trees*, 2020, 34: 745-58
- [80] Ding X, Guo J, Zhang Q, et al. Heat-responsive miRNAs participate in the regulation of male fertility stability in soybean CMS-based F1 under high temperature stress. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 2446