

新型固碳途径—3-羟基丙酸循环的研究进展

王洪杰 倪俊 张怡 张玲 辛越勇*

(杭州师范大学 生命与环境科学学院 浙江 杭州 310036)

摘要: 3-羟基丙酸循环是一种存在于嗜热光合绿丝菌中新型的 CO₂ 固定途径。此循环的特征代谢中间物为 3-羟基丙酸, 该化合物可用于合成许多重要的化工产品, 具有很高的工业价值。本文介绍了 3-羟基丙酸循环固碳途径的发现、反应机理的逐步阐明过程及最新的研究进展, 并对其理论意义和在绿色化工中的应用前景进行了探讨。

关键词: CO₂ 固定途径, 3-羟基丙酸循环, 嗜热光合绿丝菌, 多功能酶, 生物合成

The progress of studies on a unique carbon dioxide fixation pathway: 3-hydroxypropionate cycle

WANG Hong-Jie NI Jun ZHANG Yi ZHANG Ling XIN Yue-Yong*

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University,
Hangzhou, Zhejiang 310036, China)

Abstract: A novel carbon dioxide fixation pathway, 3-hydroxypropionate cycle, has been discovered in thermophilic filamentous photosynthetic bacteria such as *Chloroflexus aurantiacus*, which can grow in several conditions. The characteristic of this pathway is 3-hydroxypropionate as a metabolic intermediate, which can be used for synthesis of many valuable products in industry. In this minireview, the discovery of this unique biosynthetic process, the development of the reaction mechanism and the latest progress are introduced, especially the involvement of several multifunction enzymes. Besides theoretical significance, potential biotechnological applications of the 3-hydroxypropionate pathway are also discussed.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(No. Y4110386); 浙江省钱江人才计划项目(No. 2011R10032)

*通讯作者: Tel: 86-571-28866371; 信箱: xinyu@hotmail.com

收稿日期: 2012-04-26; 接受日期: 2012-08-07

Keywords: Carbon fixation, 3-Hydroxypropionate cycle, Thermophilic filamentous photosynthetic bacteria, Multifunction enzyme, Biosynthesis

生物界中几乎所有自养生物都是通过光合作用的固碳过程得到所需要的碳源。大气中 CO_2 的固定对于整个生物界来讲都是至关重要的, 被认为是地球上最重要的生命过程之一。目前已经发现了 6 种固定 CO_2 的途径^[1-4]。第 1 种是还原磷酸戊糖途径(又称卡尔文循环)^[5], 它主要存在于绿色植物、蓝细菌、绝大多数光合细菌和全部好氧的化能自养菌中; 第 2 种是还原柠檬酸循环^[6], 存在于少数光合紫色细菌和绿硫细菌中; 第 3 种是厌氧乙酰辅酶 A 途径^[7], 存在于产甲烷菌、硫酸盐还原菌和产乙酸菌等化能自养的厌氧细菌和古生菌中。第 4 种是近年才发现的 3-羟基丙酸循环途径^[8], 它存在于 *Chloroflexus aurantiacus* (*C. aurantiacus*) 等光合细菌中。这些细菌属于一类奇特的嗜热光合细菌, 对其 16S rRNA 的研究结果表明, 此类细菌与其他的自养细菌没有紧密的进化关系, 是细菌进化树中一个古老的分支, 同时这种自养机制在目前已知的其他类别细菌中也不存在, 这显示了细菌进化的多样性^[9]。另外最新还在泉古生菌中发现了两种途径, 一种是 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环^[10], 另一种是二羧酸/4-羟基丁酸循环^[11], 两者存在一些相同的反应步骤。

3-羟基丙酸循环途径作为一种新类型的自养固碳途径, 具有与其他固碳途径不同的鲜明特点: (1) 它是一个双循环偶联的代谢过程; (2) 途径中涉及 19 步反应, 但只需 13 种酶, 其中包括几个多功能酶, 这在其他的自养途径中并不常见; (3) 途径中的关键中间产物 3-羟基丙酸在生物代谢过程中的功能尚待阐明。3-羟基丙酸是一种无色无味的油状液体, 可以与水、醇、醚等多种有机溶剂互溶, 是近年来兴起的一种重要的化学中间体, 可以用来合成许多重要的化工产品,

如丙烯酸、丙二酸和 1,3-丙二醇等, 是世界上最具开发潜力的化工产品之一^[12]。目前的化学合成法不但成本高, 而且合成效率较低。许多科学家和大企业正在运用生物合成法来尝试生产, 但在已经研究过的十多种生物合成途径中, 只有光合细菌中存在的 3-羟基丙酸途径是唯一利用自养方式进行的, 具有不可比拟的优势^[13]。

1 3-羟基丙酸循环途径的发现及早期研究

美国科学家 Pierson 等在 1974 年发现第一种光合绿丝菌 *C. aurantiacus* 后, 科学家们逐渐发现这类光合细菌具有许多与众不同的性质^[14]。它们具有类似于高等植物和蓝细菌的 II 型光合反应中心, 然而外周捕光天线却类似于绿硫细菌(其反应中心为 I 型)所具有的称之为绿小体(Chlorosome)的色素聚集体, 蛋白质在其中的作用尚待阐明。随后 Krasilnikova 等研究发现, 这种嗜热光合菌的营养方式多种多样, 既可在厌氧条件下进行光合异养或光合自养, 也可在有氧条件下进行有机异养^[15]。

Holo 和 Sirevåg 发现 *C. aurantiacus* 的碳同位素分析结果偏小, 而且常见固碳途径开尔文循环的两个关键酶(二磷酸核酮糖羧化酶和磷酸核酮糖激酶)在 *C. aurantiacus* 的细胞提取物中也无法检测出来。由此可知 *C. aurantiacus* 不是通过开尔文循环来进行 CO_2 固定和同化的^[16]。另外还利用氟乙酸来研究 *C. aurantiacus* 是否利用还原 TCA 循环来进行固碳, 结果发现氟乙酸尽管导致了柠檬酸的积累和生长的停滞, 但其固碳反应仍然继续进行; 此外, 还原 TCA 循环的两种关键酶(α -酮戊二酸合酶和柠檬酸裂解酶)也未发现, 因此

C. aurantiacus 也不是通过还原 TCA 循环进行碳的固定。随后他们又发现 *C. aurantiacus* 光合自养时分泌 3-羟基丙酸: 当细胞生长在丙酸盐中时分泌的量最大(可达 0.35 mmol/L), 进行自养生长时分泌的量较少(1.5 μ mol/L)。通过同位素标记和核磁共振技术, 他们研究了 *C. aurantiacus* 在自养生长状态下的乙酸代谢过程, 并用氟乙酸进行替代实验, 结果发现自养生长条件下 *C. aurantiacus* 利用乙酸产生的中间代谢物中有 3-羟基丙酸, 而氟化钾的添加会使 3-羟基丙酸进一步积累。他们认为存在一种以 CO_2 为底物生成乙酰辅酶 A 的代谢新途径, 并且推测 3-羟基丙酸或相关化合物是 *C. aurantiacus* 自养固定 CO_2 的中间产物^[17]。

1993 年 Strauss 和 Fuchs 等通过碳同位素标记、光谱分析、高效液相色谱、气相色谱法等多种实验方法对 *C. aurantiacus* 细胞抽提物进行了酶活的测定, 检测出了所有涉及的酶, 从而确定了一种新型 CO_2 固定方式的存在, 命名为 3-羟基丙酸循环^[18]。这个循环的羧化反应是利用乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 分别作为第一、二个 CO_2 受体分子, 并最终固定两分子的 CO_2 , 在产生乙醛酸的同时, 再生乙酰辅酶 A。在这种自养途径中催化 CO_2 同化的两种关键酶(乙酰辅酶 A 羧化酶和丙酰辅酶 A 羧化酶)都是已知的生物素依赖酶。根据实验结果, 他们提出了初步的 3-羟基丙酸固碳途径的单循环线路(图 1): (1)乙酰辅酶 A 羧化酶(EC 6.4.1.2)催化第一个 CO_2 固定反应, 生成丙二酸单酰辅酶 A; (2)丙二酸半醛脱氢酶(EC 1.2.1.18)还原丙二酸单酰辅酶 A 形成丙二酸半醛; (3)3-羟基丙酸脱氢酶(EC 1.1.1.-)还原丙二酸半醛生成 3-羟基丙酸; (4)3-羟基丙酰辅酶 A 连接酶(EC 6.2.1.-)激活 3-羟基丙酸变成 3-羟基丙酰辅酶 A; (5)丙烯酰辅酶 A 水合酶(EC 4.2.1.-)是一种烯酰辅酶 A 水合酶, 使 3-羟基丙酰辅酶 A 脱水变成

丙烯酰辅酶 A; (6)丙烯酰辅酶 A 还原酶(EC 1.3.1.-)是一种酰基辅酶 A 脱氢酶, 使丙烯酰辅酶 A 还原变成丙酰辅酶 A; (7)丙酰辅酶 A 羧化酶(EC 6.4.1.3)催化第二个 CO_2 分子的固定, 产物为甲基丙二酸单酰辅酶 A; (8)甲基丙二酸单酰辅酶 A 异构酶(EC 5.1.99.1)和(9)甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶(EC 5.4.99.2)使甲基丙二酸单酰辅酶 A 异构化生成琥珀酰辅酶 A; (10)琥珀酰辅酶 A: 苹果酰辅酶 A 转移酶(EC 2.8.3.-)使辅酶 A 从琥珀酰转移到苹果酸, 生成苹果酰辅酶 A; (11)琥珀酸脱氢酶(EC 1.3.99.1)使琥珀酸氧化成延胡索酸; (12)延胡索酸水合酶(EC 4.2.1.2)生成苹果酸, 然后苹果酸被辅酶 A 转移酶所激活; (13)苹果酰辅酶 A 裂解酶(EC 4.1.3.24)使苹果酰辅酶 A 发生裂解反应, 生成初始的 CO_2 受体乙酰辅酶 A, 并生成乙醛酸作为 CO_2 固定的终产物^[19]。

2 单循环中几个关键酶的研究及存在的问题

在细胞水平对 3-羟基丙酸循环固碳途径的认识逐步深入, 但其中涉及的蛋白质的性质和催化反应机理仍不十分清楚。2002 年 Alber 和 Fuchs 证明 3-羟基丙酸还原生成丙酰辅酶 A 的反应是由丙酰辅酶 A 合酶催化的^[20]。根据当时具有的两个不完整 *C. aurantiacus* 基因重叠群数据库, 他们完成了对编码丙酰辅酶 A 合酶基因(*pcs*)的鉴定。丙酰辅酶 A 合酶是一个 201 kD 大小的融合蛋白质, 由辅酶 A 连接酶、烯酰辅酶 A 水合酶及烯酰辅酶 A 还原酶组成三功能酶, 分别属于酸硫基连接酶(EC 6.2.1.-, 连接形成碳硫键)、碳氧裂解酶(EC 4.2.1.-, 水裂解酶)及作用于供体为 CH-CH 基团的氧化还原酶(EC 1.3.1.-, NADP^+ 作为受体)。其性质见表 1。

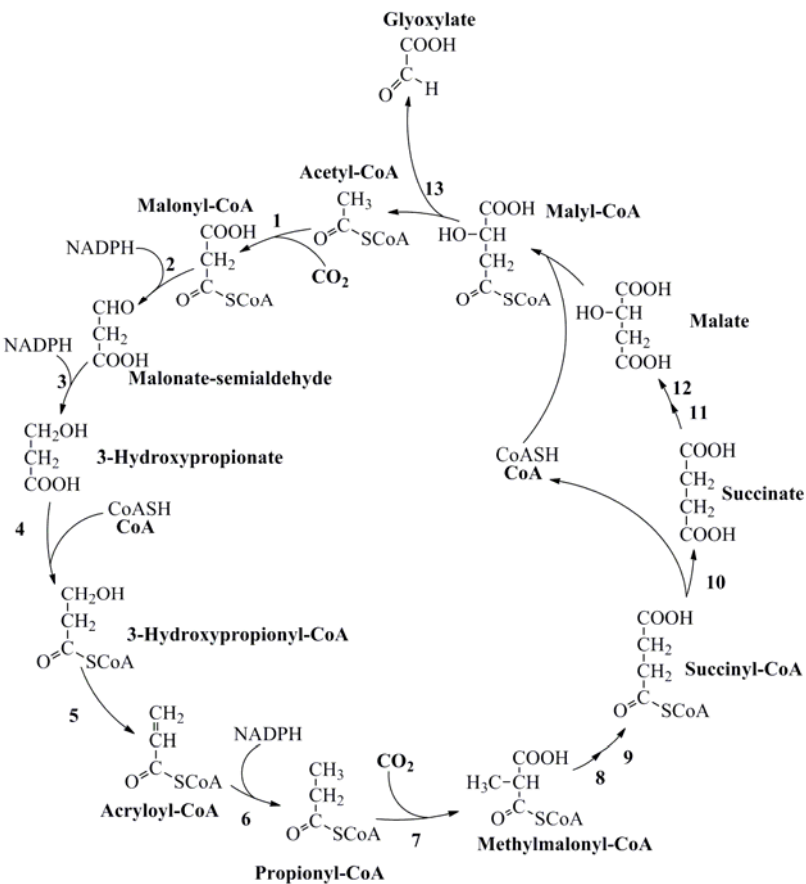


图 1 光合细菌 *C. aurantiacus* 中的 CO₂ 固定途径 3-羟基丙酸单循环

Fig. 1 Proposed 3-hydroxypropionate cycle of CO₂ fixation in the phototrophic bacterium *C. aurantiacus*

注：图中数字表示的酶的名称详见正文。

Note: The numbers refer to the enzymes which are mentioned in the text.

表 1 丙酰辅酶 A 合酶的分子和催化相关性质

Table 1 Molecular and catalytic properties of the enzyme propionyl-CoA synthase from *C. aurantiacus*

特性	Property
底物	Substrates
共催化剂	Cocatalysts
产物	Products
比活性	Specific activity
表观米氏常数	Apparent <i>K</i> _m
最优 pH	Optimum pH
复合物分子量	Native molecular mass
亚基分子量	Subunit molecular mass
复合物组成	Complex composition
催化数目	Catalytic number
特异性	Specificity
阳离子的影响	Influence of cations

Hügler 和 Fuchs 等还通过对 3-羟基丙酸的具体形成步骤进行了研究,纯化得到了丙二酸单酰辅酶 A 还原酶^[21]。这是一种同时具有乙醇和乙酰脱氢酶双活性的多功能酶,分子量为 300 kD,由 2 个 145 kD 的亚基组成同源二聚体。该酶属于 EC 1.1.1 和 EC 1.2.1 酶类, Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 促进其活性,催化丙二酸单酰辅酶 A 还原为 3-羟基丙酸。该反应需要 2 分子的 NADPH, 丙二酸半醛是其中间产物。由于丙二酸单酰辅酶 A 还原酶尚未在其他微生物已知的代谢途径中出现过,又具有超强的稳定性,因此可作为 3-羟基丙酸途径的特征酶,用来验证 3-羟基丙酸途径的存在与否。Herter 和 Fuchs 等发现乙酰辅酶 A 在这种新型固碳途径中转变为苹果酸^[22]。苹果酸在诱导产生的辅酶 A 转移酶的催化下以琥珀酰辅酶 A 作为辅酶 A 供体转变成苹果酰辅酶 A, 然后苹果酰辅酶 A 再在苹果酰辅酶 A 裂解酶催化下裂解为循环初始的底物乙酰辅酶 A, 并产生出该循环的产物乙醛酸。对乙醛酸的去向问题, 此项研究也排除了过去认为的乙醛酸通过甘氨酸进行同化代谢的可能性。

虽然单循环方式可以解释 CO_2 的固定过程, 但固定产物乙醛酸的代谢机制却不得而知。由于其他 CO_2 固定途径的终产物一般都是磷酸甘油酸或乙酰辅酶 A 等生物代谢的中间产物, 而乙醛酸却不属于主要的碳流, 需要添补反应使之转变成可以被其他代谢途径所利用的中间物质。在自养生长的 *C. aurantiacus* 细胞中, 乙醛酸结合乙酰辅酶 A 形成苹果酸或苹果酰辅酶 A 可能是无法进行的, 因为苹果酰辅酶 A 裂解为乙酰辅酶 A 和乙醛酸是体内的反应方向。

3 双循环的提出和研究进展

由于单循环的反应机理不能完全解释 3-羟基丙酸固碳途径的关键问题。Herter 和 Fuchs 提出了双循环的反应机制来解答这些难题^[23]。已知

C. aurantiacus 可以利用丙酮酸来进行添补反应, 但在细胞提取液中又几乎检测不到丙酮酸合酶的活性, 所以无法确定丙酮酸是如何产生的^[24]。在这一研究中, 他们推测丙酮酸应该来源于 3-羟基丙酸循环中的某一中间产物或者来自乙醛酸的同化反应。据此假设, 利用碳同位素标记的方法, 将乙醛酸和 $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 丙酰辅酶 A 添加到 *C. aurantiacus* 细胞提取液中进行培养, 产物中发现有赤式- β - $[1,2,2'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 甲基苹果酸和 $[1,2,2'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 柠苹酸。使用部分纯化的蛋白组分进行试验也产生出了赤- β - $[1,2,2'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 甲基苹果酰辅酶 A 和 $[1,2,2'\text{-}^{13}\text{C}_3]$ 中康酰辅酶 A。 *C. aurantiacus* 细胞提取物同样可以实现由琥珀酰辅酶 A 催化的柠苹酸转变成丙酮酸和乙酰辅酶 A 的反应。上述实验结果表明, 苹果酰辅酶 A 裂解形成的乙醛酸是通过与丙酰辅酶 A 缩合, 从而形成赤式- β -甲基苹果酰辅酶 A, 进而转变成乙酰辅酶 A 和丙酮酸。整个反应可以重新形成 3-羟基丙酸循环的丙酰辅酶 A 的前体物质——乙酰辅酶 A。因此, *C. aurantiacus* 中整个自养 CO_2 的固定就是由 3-羟基丙酸循环和甲基苹果酰辅酶 A 循环来共同完成的。此双循环 CO_2 固定反应的最终产物正是作为合成代谢反应通用物质的丙酮酸(图 2)。

Friedmann 和 Fuchs 等在综合前期研究的基础上提出了更加详细的双循环图(图 3)^[25]。在第一个循环中, 乙酰辅酶 A 先被催化成丙二酰辅酶 A, 接着再以 3-羟基丙酸作为游离的中间产物转变成丙酰辅酶 A。丙酰辅酶 A 被催化成甲基丙二酰辅酶 A, 然后又转变成琥珀酰辅酶 A。琥珀酰辅酶 A 在琥珀酰辅酶 A:L-苹果酸辅酶 A 转移酶的作用下激活了 L-苹果酸, 形成 L-苹果酰辅酶 A 和琥珀酸。琥珀酸通过膜结合的黄素蛋白复合体氧化成 L-苹果酸。L-苹果酰辅酶 A 在 L-苹果酰辅酶 A/ β -甲基苹果酰辅酶 A 裂解酶的催化下发生裂解反应, 再生了反应起始物乙酰辅酶 A, 并且

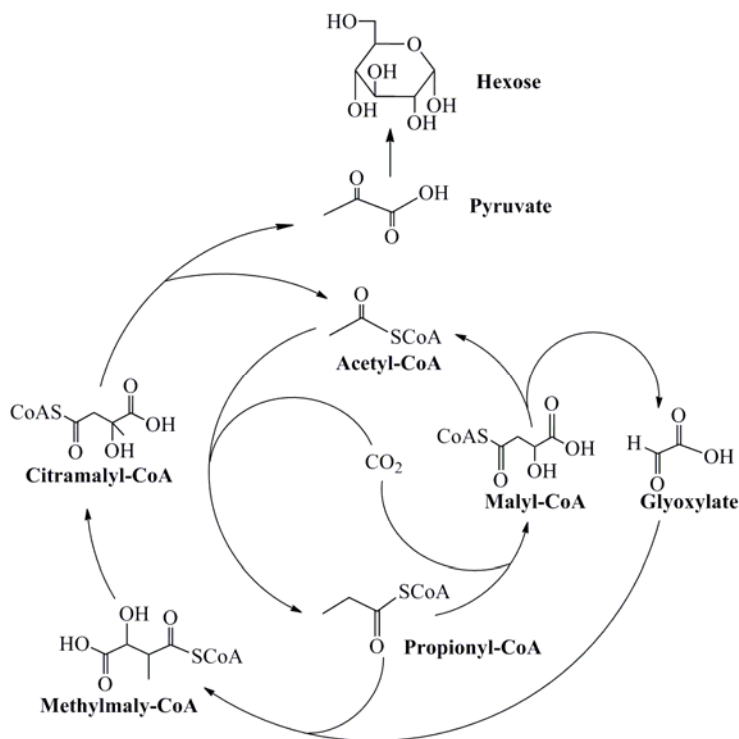


图2 Herter 和 Fuchs 提出的 *C. aurantiacus* 中 3-羟基丙酸固碳途径双循环图
Fig. 2 Hypothetical bicyclic pathway for autotrophic CO₂ fixation in *C. aurantiacus*

释放出乙醛酸作为初级固定产物。第二个循环进行乙醛酸的同化过程。乙醛酸结合丙酰辅酶 A 在 L-苹果酰辅酶 A/β-甲基苹果酰辅酶 A 裂解酶的催化下形成 β-甲基苹果酰辅酶 A。β-甲基苹果酰辅酶 A 在细胞提取物中还可以被转换为中康酰辅酶 A 和柠草酸, 但这个过程具体如何进行当时还不清楚。最后柠草酸在琥珀酰辅酶 A 参与的情况下转化成乙酰辅酶 A 和丙酮酸。

Fuchs 等还发现一种辅酶 A 转移酶利用琥珀酰辅酶 A 作为辅酶 A 的供体, 以及一种裂解酶能够催化柠草酰辅酶 A 裂解为乙酰辅酶 A 和丙酮酸^[26]。*C. aurantiacus* 基因组的分析确定了一个编码该辅酶 A 转移酶的基因。这个基因在大肠杆菌异源表达后显示其编码的是琥珀酰辅酶 A:D-柠草酰辅酶 A 转移酶, 催化 D-柠草酸+琥珀酰辅酶 A→D-柠草酰辅酶 A+琥珀酸。研究后发现它属于

辅酶 A 转移酶超家族的第 III 类, 活性位点上具有天冬氨酸残基。这个同源二聚体的酶由两个 44 kD 的亚基组成, 对琥珀酰辅酶 A 作为辅酶 A 的供体具有特异性, 但是也允许以 D-苹果酸和亚甲基丁二酸替代 D-柠草酸。这个辅酶 A 转移酶和裂解酶催化了乙醛酸同化的最后两步反应。2007 年 Klatt 等通过比较基因组学的方法, 利用碳同位素探测技术发现了 *C. aurantiacus* 的远亲 *Roseiflexus* spp.也是利用 3-羟基丙酸循环途径固定 CO₂ 的^[27]。

2009 年 Zarzycki 和 Fuchs 等通过精巧的实验阐明了乙醛酸同化反应中尚未清晰的步骤, 而且纯化和鉴定了所有特征酶, 最终完成了生物界第 4 种固碳途径的确立, 研究成果发表在美国科学院院刊上^[28]。在第二个循环中, 乙醛酸结合来自第一个循环的丙酰辅酶 A 反应形成 β-甲基苹果

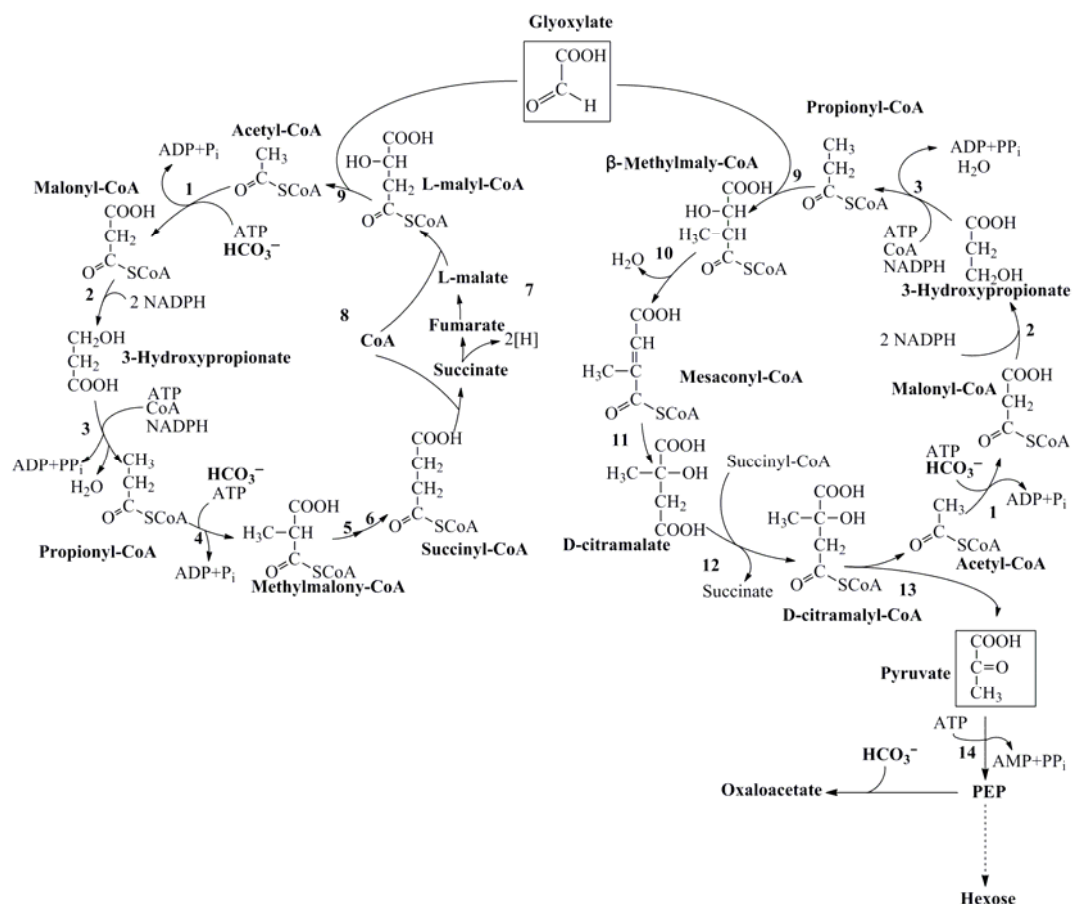


图3 Friedmann 和 Fuchs 提出的 *C. aurantiacus* 中 3-羟基丙酸固碳途径的双循环图

Fig. 3 Proposed bicyclic autotrophic CO₂ assimilation pathway of *C. aurantiacus*

注: 在第一个循环中, 两分子以碳酸氢根形式存在的二氧化碳被固定, 形成初级产物乙醛酸. 在第二个循环中, 乙醛酸和丙酰辅酶 A 缩合形成 β-甲基苹果酰辅酶 A, 最后形成丙酮酸, 并且再生出乙酰辅酶 A. 其中涉及的酶有: 1: 乙酰辅酶 A 羧化酶; 2: 丙二酰辅酶 A 还原酶; 3: 丙酰辅酶 A 合成酶; 4: 丙酰辅酶 A 羧化酶; 5: 甲基丙二酰辅酶 A 异构酶; 6: 甲基丙二酰辅酶 A 变位酶; 7: 柠檬酸循环酶(琥珀酸脱氢酶和富马酸水合酶); 8: 琥珀酰辅酶 A:L-苹果酸辅酶 A 转移酶; 9: L-苹果酰辅酶 A 裂解酶/赤式-β-甲基苹果酰辅酶 A 裂合酶; 10: 推测的 β-甲基苹果酰辅酶 A 脱水酶; 11: 假象的中康酰辅酶 A 转移酶; 12: 琥珀酰辅酶 A:D-柠草酰辅酶 A 转移酶; 13: D-柠草酰辅酶 A 裂合酶; 14: 丙酮酸磷酸双激酶和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化酶.

Note: In the first cycle, two molecules of bicarbonate are assimilated to form glyoxylate as the primary fixation product. In the second cycle, glyoxylate and propionyl-CoA are condensed to β-methylmalyl-CoA, which is converted to acetyl-CoA and pyruvate. Propionyl-CoA is regenerated from acetyl-CoA and CO₂ with enzymes of the first cycle. 1: Acetyl-CoA carboxylase; 2: Malonyl-CoA reductase; 3: Propionyl-CoA synthase; 4: Propionyl-CoA carboxylase; 5: Methylmalonyl-CoA epimerase; 6: Methylmalonyl-CoA mutase; 7: Citric acid cycle enzymes (succinate dehydrogenase and fumarate hydratase); 8: Succinyl-CoA:L-malate CoA transferase; 9: L-malyl-CoA lyase/erythro-β-methylmalyl-CoA lyase; 10: Proposed β-methylmalyl-CoA dehydratase; 11: Postulated mesaconyl-CoA-transforming enzymes; 12: Succinyl-CoA:D-citramalate CoA transferase; 13: D-citramalyl-CoA lyase; 14: Pyruvate phosphate dikinase and phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase.

酰辅酶 A. 接着, 脱水形成 C1-中康酰辅酶 A. 在首次发现的一种辅酶 A 转移酶的催化下发生分子内辅酶 A 的转移, 使 C1-中康酰辅酶 A 变成 C4-中康酰辅酶 A, 然后在烯酰辅酶 A 水合酶的催化

下变成(S)-柠草酰辅酶 A, 最后(S)-柠草酰辅酶 A 发生裂解而生成乙酰辅酶 A 和丙酮酸. 催化这步反应的酶是一种三功能酶, 还催化裂解(S)-苹果酰辅酶 A 形成 β-甲基苹果酰辅酶 A. 这样, 在仅

仅3种酶的参与下,通过一种简洁而经济的方式解决了乙醛酸和丙酰辅酶A的歧化反应这个谜题。总之,整个3-羟基丙酸双循环途径包括19步反应,却只有13种酶参与催化,吸收3分子的碳酸盐生成1分子丙酮酸。第一个循环开始于乙酰辅酶A,分几个步骤固定2分子 CO_2 形成1分子乙醛酸;第二个循环中,乙醛酸加上丙酰辅酶A发生歧化反

应生成乙酰辅酶A和丙酮酸,这个过程中没有任何的氧化还原反应(图4)。

至此,自然界中第4种固碳途径所涉及的所有酶都被证实。而酶活性在不同生长条件下的调控方式的研究和此类细菌的模式物种全基因组序列的测定也都提供了重要的证据^[29],得以真正确立这种新型 CO_2 的固定途径。

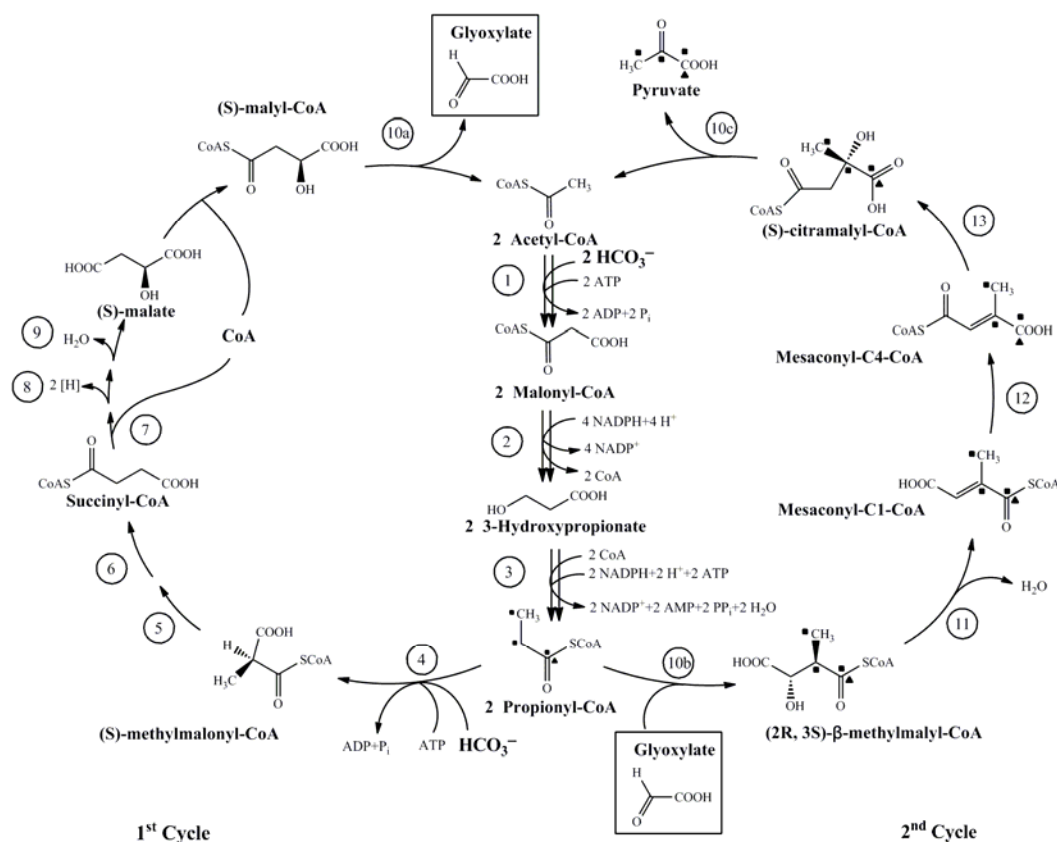


图4 自然界第4种 CO_2 固定途径3-羟基丙酸双循环图

Fig. 4 The complete 3-hydroxypropionate cycle, being the fourth pathway of CO_2 fixation in nature

注: 图中带圈的数字代表催化各步反应的酶, 名称见正文。 ^{14}C 同位素标记用▲表示, ^{13}C 同位素标记用■表示。需要特别指出的是从β-甲基苹果酰辅酶A转变成(S)-柠檬酰辅酶A的过程中要求辅酶A在分子内移动位置, 催化此反应(反应第12步)的酶就是首次发现的中康酰辅酶A分子内转移酶^[28]。

Note: 1: Acetyl-CoA carboxylase; 2: Malonyl-CoA reductase; 3: Propionyl-CoA synthase; 4: Propionyl-CoA carboxylase; 5: Methylmalonyl-CoA epimerase; 6: Methylmalonyl-CoA mutase; 7: Succinyl-CoA:(S)-malate-CoA transferase; 8: Succinate dehydrogenase; 9: Fumarate hydratase; 10a, b, c: (S)-malyl-CoA/β-methylmalyl-CoA/(S)-citramalyl-CoA (MMC) lyase; 11: Mesoacetyl-CoA C1-CoA hydratase (β-methylmalyl-CoA dehydratase); 12: Mesoacetyl-CoA C1-C4 CoA transferase; 13: Mesoacetyl-CoA C4-CoA hydratase. Carbon-labeling patterns during the interconversion of propionyl-CoA plus glyoxylate to pyruvate plus acetyl-CoA via C5 compounds are shown. ^{14}C carbon atoms derived from $[1-^{14}\text{C}]$ propionyl-CoA are marked by ▲, and ^{13}C carbon atoms derived from $[1,2,3-^{13}\text{C}]$ propionyl-CoA are marked by ■. Note that the cleavage of citramalyl-CoA requires that the CoA moiety be shifted finally from the "right" carboxyl group of β-methylmalyl-CoA to the "left" carboxyl group of citramalyl-CoA. This shifting is accomplished by an intramolecular CoA transfer (reaction 12).

4 最新研究进展与尚未解决的问题

在微生物世界中,是否只有以 *C. aurantiacus* 为代表的这类光合细菌中存在 3-羟基丙酸循环这种新颖的 CO₂ 固定方式呢?在生物进化过程中这种途径有什么重要的意义呢?诸如此类的问题促使许多科学家在其他生物中展开了研究。在 2000 年前后 Chuakrut、Ishii、Hugler 和 Fuchs 等就分别发现嗜酸热的 *Acidianus brierleyi*、硫化叶菌科的 *Metallosphaera sedula* 这些古生菌都利用经过修饰的 3-羟基丙酸循环固定 CO₂ 进行自养生长,还分别分离到该循环的关键酶酰基辅酶 A 羧化酶。乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 都可以作为底物,其中 *Metallosphaera sedula* 中 3 个亚基分别为 57 kD 生物素羧化酶大亚基(α)和 57 kD 羧基转移酶大亚基(γ)以及 18.6 kD 生物素载体蛋白小亚基(β),形成一个($\alpha\beta\gamma$)₄ 的全酶;而在 *Acidianus brierleyi* 中,该酶的亚基结构为 $\alpha_4\beta_4\gamma_4$ 。通过基因克隆发现,编码这 3 种亚基的基因是相互紧邻的,这与以 *C. aurantiacus* 为代表的光合细菌中的情况截然不同^[30-32]。

最新的研究发现,许多自养的细菌、古生菌和以 *C. aurantiacus* 为代表的光合细菌一样常常生长在营养贫瘠的水环境中,为了生存它们利用微量的有机化合物和溶解在水中的 CO₂ 作为碳素的来源,进行一种混合营养生长。2011 年 Zarzycki 等发现许多微生物就利用了全部或者部分 3-羟基丙酸双循环固碳途径来吸收环境中可供利用的各种有机小分子物质^[33]。

事实上,在有关 3-羟基丙酸循环目前的认识中还有许多问题使得这种奇特的固碳途径在未来的一段时间内仍将作为研究的热点。例如:琥珀酰辅酶 A:(R)-柠苳酸辅酶 A 转移酶和(R)-柠苳酸辅酶 A 裂解酶是如何区别柠苳酸的立体构型;它们在自养条件下催化活性上调的作用机理等。

乙酰辅酶 A 羧化酶既作为 3-羟基丙酸循环的主要羧化酶,也是脂质生物合成初始酶类,细胞如何调控这两种代谢途径目前仍然未知。Xin 等从 *C. aurantiacus* 的光合膜中分离纯化了与催化 3-羟基丙酸循环中琥珀酸转变有关的黄素复合体,但发现催化反应的方向是从延胡索酸合成琥珀酸的,并且还涉及光合作用电子传递和氧化还原反应^[34]。此外,丙酰辅酶 A 羧化反应是否也是由一种双功能酶进行催化,这也仍旧未知,但是在古生菌中的 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环中正是这样进行反应的^[35]。

为此,今后的研究主要分以下几个方面:

(1) 酶的催化机理及其热稳定的分子机理。3-羟基丙酸循环途径中涉及的大多数酶都是具有多功能的复合酶,如 L-苹果酰辅酶 A 裂合酶兼有 β -甲基苹果酰辅酶 A 裂解酶活性;苹果酰辅酶 A 还原酶具有苹果酰辅酶 A 还原酶活性和 3-羟基丙酸脱氢酶活性;丙酰辅酶 A 合成酶则是兼有 3-羟基丙酰辅酶 A 裂解酶、3-羟基丙酰辅酶 A 脱水酶(烯酰辅酶 A 水合酶)和丙烯酰辅酶 A 还原酶(烯酰辅酶 A 还原酶)三重活性。这些酶不单参与 3-羟基丙酸双循环固碳反应,同时还参与到其他生命活动中。因此,生物体是如何分配这些酶的能效而使其不顾此失彼呢?另外,进行 3-羟基丙酸途径固碳的生物一般都生活在高温之中,因此该途径中的酶类是如何保持其热稳定性的,将作为我们今后研究的一个重要方向。

(2) 编码关键酶的基因及其调控。乙酰辅酶 A 羧化酶为生物素结合蛋白,不同生物中的组成大体相似,都是由 α 、 β 和 γ 3 个亚基组成,形成 $\alpha_4\beta_4\gamma_4$ 结构^[36]。但编码亚基的基因差异很大,而且相互作用方式也不同,进一步的研究工作将分析各个亚基基因的转录模式和调控机制。而丙酰辅酶 A 也是生物素结合蛋白,目前对其亚基组成、基因鉴定和转录表达都还是空白。随着越来越多

微生物的全基因组序列的测定和注解, 进行全基因组的构成、相关基因的表达和调控等研究将促进对这种固碳途径的深入了解, 这是正在进行的工作重点。

(3) 3-羟基丙酸双循环固碳途径的进化过程。这个特异的固碳途径是如何形成和完善的呢? 该途径中涉及的许多酶都可以在有氧条件下发挥功能, 但是为什么没有在进化过程中被其他光合生物所采用呢? 最新的研究表明^[28], 各种广泛分布的海洋光合细菌中存在 3-羟基丙酸循环的基因, 可能有利于这些生物同化各种有机小分子营养物质, 也可以代谢在这些生物中普遍存在的渗透保护剂二甲基磺化丙酸。更多生物的全基因组测序的完成将会有助于解开这种新型固碳途径的进化历程^[29]。

5 应用前景与展望

目前化石能源的大量使用造成了 CO₂ 的大量排放是造成温室效应的主要原因, 并且 CO₂ 作为最廉价最丰富的碳资源广泛存在于自然界中, 以 *C. aurantiacus* 为代表的光合细菌和一些古生菌中发现的 3-羟基丙酸双循环固碳途径作为一种新的 CO₂ 固定途径, 对其深入的研究将有助于人们更加全面地认识地球上的碳循环过程, 更加深刻的理解 CO₂ 固定的机制, 有助于人类更好地利用自然界中的碳资源。3-羟基丙酸双循环作为一种碳固定途径丰富了自然界中的碳循环, 而且可以同时吸收和同化许多环境中生物和非生物产生的多种有机酸等物质, 可以用于日益恶化的环境污染问题的解决^[37]。目前国内外还没有直接利用 3-羟基丙酸循环途径来进行工业生产的报道, 只有个别综述中提出可以利用这种光合作用驱动的生物合成方式, 这比现在利用转基因生物工程菌转化甘油等化合物合成 3-羟基丙酸等化工产品更加有效和经济, 而且还有助于环境净化。

3-羟基丙酸双循环所涉及的酶中有许多是多功能酶, 因此可以利用其多功能酶构建体外循环生产生物材料。而且该循环所涉及的酶几乎都具有热稳定性的优点, 方便生长蛋白质三维晶体或构建固定化酶, 用于解析结构和阐明分子机理, 我们也正在向这个方向开展广泛而深入的研究, 以期促进未来绿色化工生产^[38]。

参考文献

- [1] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734–740.
- [2] Tabita FR. The hydroxypropionate pathway of CO₂ fixation: fait accompli[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(50): 21015–21016.
- [3] Gupta RS. Molecular signatures for the main phyla of photosynthetic bacteria and their subgroups[J]. Photosynthesis Research, 2010, 104(2/3): 357–372.
- [4] Berg IA. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 1925–1936.
- [5] Calvin M. The path of carbon in photosynthesis[J]. Science, 1962, 135(3507): 879–889.
- [6] Evans MC, Buchanan BB, Arnon DI. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1966, 55(4): 928–934.
- [7] Ljungdahl L, Wood HG. Total synthesis of acetate from CO₂. I. Comethylcobric acid and CO-(methyl)-5-methoxybenzimidizolylcobamide as intermediates with *Clostridium thermoaceticum*[J]. Biochemistry, 1965, 4: 2771–2780.
- [8] Fuchs G. Alternative pathways of autotrophic CO₂ fixation[A]//Schlegel HG, Bowien B. Autotrophic bacteria[M]. Madison: Science Technology Publishers, 1989: 365–382.
- [9] Castenholz RW, Pierson BK. Ecology of thermophilic anoxygenic phototrophs[A] //

- Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE. Anoxygenic photosynthetic bacteria[M]. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995: 87–103.
- [10] Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, et al. 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea[J]. Science, 2007, 318(5857): 1782–1786.
- [11] Huber H, Gallenberger M, Jahn U, et al. A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic archaeum *Ignicoccus hospitalis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(22): 7851–7856.
- [12] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass[R]. Energy Efficiency and Renewable Energy, US Department of Energy Washington D. C., 2004.
- [13] Jiang XL, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2009, 82(6): 995–1003.
- [14] Pierson BK, Castenholz RW. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov.[J]. Archives of Microbiology, 1974, 100(1): 5–24.
- [15] Krasilnikova EN, Keppen OI, Gorlenko VM, et al. Growth of *Chloroflexus aurantiacus* on media with different organic compounds and pathways of their metabolism[J]. Microbiology, 1986, 55: 325–329.
- [16] Holo H, Sirevåg R. Autotrophic growth and CO₂ fixation of *Chloroflexus aurantiacus*[J]. Archives of Microbiology, 1986, 145(2): 173–180.
- [17] Holo H. *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate[J]. Archives of Microbiology, 1989, 151(3): 252–256.
- [18] Eisenreich W, Strauss G, Bacher A, et al. Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 215: 619–632.
- [19] Strauss G, Fuchs G. Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 215(3): 633–643.
- [20] Alber BE, Fuchs G. Propionyl-coenzyme A synthase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(14): 12137–12143.
- [21] Hügler M, Menendez C, Schägger H, et al. Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(9): 2404–2410.
- [22] Herter S, Busch A, Fuchs G. L-Malyl-Coenzyme A lyase/β-methylmalyl-coenzyme A lyase from *Chloroflexus aurantiacus*, a bifunctional enzyme involved in autotrophic CO₂ fixation[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(21): 5999–6006.
- [23] Herter S, Fuchs G, Bacher A, et al. A bicyclic autotrophic CO₂ fixation pathway in *Chloroflexus aurantiacus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(23): 20277–20283.
- [24] Ivanovsky RN, Fal YI, Berg IA, et al. Evidence for the presence of the reductive pentose phosphate cycle in a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium, *Oscillochloris trichoides* strain DG-6[J]. Microbiology, 1999, 145(7): 1743–1748.
- [25] Friedmann S, Steindorf A, Alber BE, et al. Properties of succinyl-coenzyme A: L-malate coenzyme A transferase and its role in the autotrophic 3-hydroxypropionate cycle of *Chloroflexus aurantiacus*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(7): 2646–2655.
- [26] Friedmann S, Alber BE, Fuchs G. Properties of succinyl-coenzyme A: D-citramalate coenzyme A transferase and its role in the autotrophic 3-hydroxypropionate cycle of *Chloroflexus aurantiacus*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(18): 6460–6468.
- [27] Klatt CG, Bryant DA, Ward DM. Comparative genomics provides evidence for the 3-hydroxypropionate autotrophic pathway in filamentous anoxygenic phototrophic bacteria and

- in hot spring microbial mats[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(8): 2067–2078.
- [28] Zarzycki J, Brecht V, Muller M, et al. Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(50): 21317–21322.
- [29] Tang KH, Barry K, Blankenship RE, et al. Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 334.
- [30] Menendez C, Bauer Z, Huber H, et al. Presence of acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase and propionyl-CoA carboxylase in autotrophic *Crenarchaeota* and indication for operation of a 3-hydroxypropionate cycle in autotrophic carbon fixation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(4): 1088–1098.
- [31] Chuakrut S, Arai H, Ishii M, et al. Characterization of a bifunctional archaeal acyl coenzyme A carboxylase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(3): 938–947.
- [32] Hügler M, Huber H, Stetter KO, et al. Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota)[J]. *Archives of microbiology*, 2003, 179(3): 160–173.
- [33] Zarzycki J, Fuchs G. Coassimilation of organic substrates via the autotrophic 3-hydroxypropionate bi-cycle in *Chloroflexus aurantiacus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 6181–6188.
- [34] Xin YY, Lu YK, Fromme R, et al. Purification, characterization and crystallization of menaquinol: fumarate oxidoreductase from the green filamentous photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, 1787(2): 86–96.
- [35] Alber BE, Kung JW, Fuchs G. 3-Hydroxypropionyl-coenzyme a synthetase from *Metallosphaera sedula*, an enzyme involved in autotrophic CO₂ fixation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(4): 1383–1389.
- [36] Kuznetsov BB, Ivanovsky RN, Keppen OI, et al. Draft genome sequence of the anoxygenic filamentous phototrophic bacterium *Oscillochloris trichoides* subsp. DG-6[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(1): 321–322.
- [37] McKinlay JB, Harwood CS. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11669–11675.
- [38] Zhou Q, Shi ZY, Meng DC, et al. Production of 3-hydroxypropionate homopolymer and poly (3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(6): 777–785.