

# 原核生物 Rubisco 的研究进展

吕红<sup>1,2</sup> 周集体<sup>1</sup> 王竞<sup>1</sup> 安利佳<sup>2</sup>

(大连理工大学环境科学与工程学院 大连 116012)<sup>1</sup>

(大连理工大学化工学院生物工程系 大连 116012)<sup>2</sup>

**摘要:** 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 是卡尔文循环中的关键酶, 该酶广泛存在于植物和一些原核生物中。由于在结构上, 原核生物中 Rubisco 与植物有相似之处, 因此人们对原核生物中的 Rubisco 进行了大量研究, 就原核生物 Rubisco 的结构、基因调节、装配等方面的最新进展作一综述。

**关键词:** Rubisco, 结构, 调节, 装配, 突变

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0082-04

1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 是卡尔文循环中的关键酶, 该酶催化卡尔文循环中的第一步  $\text{CO}_2$  固定反应, 即催化 1, 5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 的羧化后应, 生成两分子的 3-磷酸甘油酸, 同时又催化 RuBP 的氧合反应, 生成 1 分子的 3-磷酸甘油酸和 1 分子的磷酸乙醇酸。羧化反应和氧合反应所产生的 3-磷酸甘油酸参与卡尔文循环, 而氧合反应产生的磷酸乙醇酸被氧化分解成  $\text{CO}_2$ , 释放到空气中。可见, Rubisco 在这两种代谢当中起着重要的枢纽作用, 它调节着细胞中碳的流向。特别是在植物当中, 它影响了  $\text{CO}_2$  的固定效率和作物的产量, 并且它是植物可溶性蛋白中含量最高的蛋白质, 因此, 对于 Rubisco 的研究既有理论意义又有应用价值。

由于原核生物的结构简单, 生存环境广泛, 并且基因操作容易, 尤其是自养细菌, 其 Rubisco 大小亚基基因位于同一个操纵子上 (在高等植物中, Rubisco 大, 小亚基基因分别位于叶绿体和染色体上), 并且在结构上与高等植物的 Rubisco 有相似之处, 因此人们对其进行了较为详细的研究。本文就近年来关于原核生物 Rubisco 的基因结构, 功能以及活性调节等方面的研究进展作一综述。

## 1 Rubisco 的结构

一般将 Rubisco 分为两种类型 (见表 1): Form I Rubisco 和 form II Rubisco。Form I Rubisco 是由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成的  $\text{L}_8\text{S}_8$  结构, 分子量约为 550kD, 广泛存在于植物和一些原核生物中。Tabita 等<sup>[1]</sup> 通过对不同来源的 form I Rubisco 基因的分离和测序, 又将其分为 4 种: I A、I B、I C 和 I D; form II Rubisco 仅由大亚基组成的  $\text{L}_x$  结构, 分子量范围为 110-450KD, 最初是在深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中发现的, 并且该菌仅含有 form II Rubisco。但它同样可以催化 RuBP 羧化和加氧反应, 这表明 Rubisco 的活性部位是在大亚基上。然而除了与催化相关的保守氨基酸残基如 Lys-329、Lys-191 和 Lys-166 等外, 所有 form II 的亚基氨基酸序列基本上不同于 form I 的大亚基。

1990 年, Altekar 等<sup>[2]</sup> 在嗜盐古菌中发现了类似 Rubisco 的序列。此后在其它古菌中

也发现了这种 Rubisco 结构, 其生理作用目前仍不清楚。Bult 等<sup>[3]</sup>报道在嗜热古菌 *Methanococcus jannaschii* 中, Rubisco 的序列很大程度上不同于  $L_8S_8$  和  $L_{(2)n}$ 。Kitano 等<sup>[4]</sup>对 *Thermococcus kodakaraensis* 菌中的 Rubisco 进行结构分析也表明, 它是由大亚基组成的  $(L_2)_5$  十聚体结构, 这种结构的 Rubisco 与来自 spinach 中的 form I Rubisco 同源性仅有 36%, 与来自 *R. rubrum* 菌中的 form II Rubisco 同源性也只有 30%。因此被认为是第 3 种 Rubisco (见表 1)。进一步研究发现, 在光合细菌如

*Chlorobium tepidum* 中, 也有类似古菌 Rubisco 的序列, 该基因已从基因组 DNA 中分离出来, 以便进行详细的研究, 阐明其功能。

2 Rubisco 的基因结构和基因调节

在自养细菌中, form I Rubisco 的大小亚基基因 (*cbbLS*) 和卡尔文循环 (CBB) 中其它酶的结构基因位于同一个操纵子上, 这些酶包括磷酸核酮糖激酶 (*cbbP*), 醛缩酶 (*cbbA*), 转酮醇酶 (*cbbT*), 磷酸甘油酸激酶 (*cbbK*) 等。Form II Rubisco 基因 (*cbbM*) 也同这些酶基因位于同一个操纵子上。这些基因形成基因簇, 由正向转录调节因子 CbbR 来控制, 其基因 *cbbR* 位于上述 *cbb* 基因簇的上游。

在蓝细菌中, 由于 form I Rubisco 基因所在的操纵子上不含卡尔文循环中其它酶的结构基因, 而将其大小亚基基因称作 *rbcL* 和 *rbcS*, 这与植物中的基因结构相类似。此外, 研究发现<sup>[5]</sup>在 *Synechocystis* 菌中 *rbc* 操纵子上含有 *rbcX* 基因, 该基因编码的蛋白可能影响 Rubisco 的折叠。Li 等<sup>[6]</sup>报道在 *Anabaena* 菌中 *rbc* 操纵子的下游, 发现编码 Rubisco 活化酶的基因: *rcs* 基因。Rubisco 活化酶不仅具有活化 Rubisco 的活性, 而且具有 ATP 水解酶活性。在 ATP 水解过程中, Rubisco 活化酶能够促使各种磷酸糖抑制物从 Rubisco 上解离下来, 恢复 Rubisco 的活性。对 *Synechocystis* 菌进行基因组测序表明, 在蓝细菌中也有类似 *cbbR* 的基因, 但在调节 *rbc* 操纵子方面的作用还有待进一步研究。

近来研究表明, 除 CbbR 外, 有另外的调节系统来调节 Rubisco 基因的转录。Qian 等<sup>[7]</sup>在 *Rb. sphaeroides* 菌中发现了由 RegA 和 RegB (或 PrrA 和 PrrB) 组成的信号转导系统, 该系统在调节 *cbb* 基因转录的过程中起了重要的作用。进一步研究表明 CbbR 和 RegA 蛋白通常结合在 *cbb* 上的特定序列来调节转录。Dubbst 等<sup>[8]</sup>报道在 *Rb. sphaeroides* 菌中, CbbR 和 RegA 是结合在 *cbb<sub>I</sub>* (formI) 的启动子区域来调节转录, CbbR 与 *cbbI* 的

表 1 不同来源的 Rubisco 及其羧化/氧化值

Rubisco 类型	生物	羧化/氧化 (Ω)
Form I A	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	25
	<i>Hydrogenovibrio marinus</i>	25
	<i>Chromatium vinosum</i>	40
	<i>Thiobacillus denitrificans I</i>	45
	Vent symbiont	30
Form I B	Cyanobacteria	35 ~ 40
	Green algae *	60
	Plants *	80
Form I C	Purple bacteria class	45 ~ 75
Form I D	Marine nongreen algae *	100 ~ 240
Form II	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	15
	<i>Rhodobacter sphaeroides II</i>	10
	<i>Thiobacillus denitrificans II</i>	10
Form III	<i>Methanococcus jannaschii</i>	
	<i>Archaeoglobus fulgidus I</i>	
	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	
	<i>Chlorobium tepidum</i>	

注: \* 表示植物, 其它为原核生物

启动子区域只有一个结合位点,而 *RegA* 与该区域有四个结合位点。为阐明调节机理,还需要提纯 CbbR 和 *RegA*,进行体外研究。

### 3 Rubisco 的折叠和装配

Ellis<sup>[9]</sup>在研究高等植物叶绿体中的 Rubisco 装配时发现,大亚基需要与 RBP (Rubisco 结合蛋白)结合,序列和结构分析表明 RBP 与 *E. coli* 的 GroEL 序列有 46% 的同源性且结构相似。此后又发现原核生物的  $L_2$  型和  $L_8S_8$  型 Rubisco 都能在大肠杆菌中合成并装配。在此基础上,许多研究者开始在 *E. coli* 中利用 GroE 系统来研究 Rubisco 的折叠和装配。

Coloubinaff 等人报道<sup>[10]</sup>无论是  $L_2$  型还是  $L_8S_8$  型 Rubisco 在 *E. coli* 中装配时都需要 GroES 和 GroEL 的协助。他们还发现分子伴侣 GroEL 可以促进  $L_2$  型 Rubisco 蛋白的体外重建,重建的 Rubisco 有活性,此过程同时需要 GroES 和  $Mg^{2+}$ , ATP 的参与。但在体外  $L_8S_8$  型 Rubisco 的装配还没有报道。

Checa 等<sup>[11]</sup>研究 *Chromatium vinosum* 的 Rubisco 在 *E. coli* 中表达时发现,在 Rubisco 组装过程中, DnaK, DnaJ 和 GrpE 等伴侣分子也起着非常重要的作用。此后他们又对 *Rb. sphaeroides* 菌的 Rubisco 开展了类似的研究,证实了这些伴侣分子的重要性。这些研究表明,体外  $L_8S_8$  型 Rubisco 的装配可能也需要上述伴侣分子的协助。此外,从 Rubisco 的基因结构中也可以看出,一些基因编码的蛋白影响 Rubisco 的折叠和装配,如 *rbcX* 基因编码的蛋白,位于 *cbbLS* 基因下游的 *cbbQ* 基因编码的蛋白等。

### 4 固定 CO<sub>2</sub> 的原核细胞器

许多化能自养细菌和所有蓝细菌中都含有多面形的内含体,这种含有羧化酶的多角形内含体称为羧基化小体。羧基化小体最初是从氧化硫细菌中分离出来的,并且含有大量的 Rubisco。研究表明,在蓝细菌中羧基化小体和碳酸酐酶在 CO<sub>2</sub> 浓缩过程中起到了关键作用,这一浓缩过程主要是运输 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 离子,将高浓度的 CO<sub>2</sub> 提供给 Rubisco 的活性位点。但在自养细菌中,还无法证实羧基化小体与碳酸酐酶之间的关系。

近年来,人们对羧基化小体的合成情况进行了研究。如果对 *Thiobacillus intermedius* 菌进行外加有机碳源培养,羧基化小体的合成就会受到抑制,如果让该菌在自养条件下生长,羧基化小体就会从新合成。另外 Baker 等<sup>[12]</sup>报道 form I 缺陷菌株 *T. neapolitanus* 仅在高浓度 CO<sub>2</sub> 水平下生长,并且没有合成羧基化小体,这表明 form I Rubisco 与羧基化小体的合成密切相关。该 form I 缺陷菌株能够生长,是因为在 form I 缺失时,它被诱导合成了 form II Rubisco。关于 Rubisco 与羧基化小体之间的关系还有待进一步研究。

### 5 Rubisco 的活性及调节

虽然 Rubisco 的结构具有多样性,但其催化过程是一致的。并且无论是高等植物还是一些原核生物, Rubisco 只有经过活化才具有活性。这一活化过程是 Rubisco 的氨甲酰化,即 Rubisco 活性区 Lys 残基的  $\epsilon$  氨基与 CO<sub>2</sub> 作用形成氨碳酸基团,然后与  $Mg^{2+}$  键合。Rubisco 反应平衡及动力学研究表明,  $\epsilon$  氨基的 CO<sub>2</sub> 化对形成有活力的  $L_8S_8$  结构的 Rubisco 有重要作用。参与激活 Rubisco 的 CO<sub>2</sub> 分子与作为底物的 CO<sub>2</sub> 分子不同,它们不被

同化。

Rubisco 活化过程除受到  $\text{CO}_2$  的激活, 还受到很多因子的调节, 如在 *Rb. sphaeroides* 菌<sup>[2]</sup>中, Form I Rubisco 就受到 RuBP 或者是 RuBP 羧化反应的副产物磷酸化合物的抑制, 研究表明该菌中存在某种酶类来催化这些抑制因子, 使其释放。后来人们在高等植物和藻类的叶绿体中发现了 Rubisco 活化酶就具有这种作用。

## 6 Rubisco 结构的定位突变

对一定的 Rubisco 来说, 其羧化作用和氧化作用的比值 (即  $\Omega$ ) 是一个常数 (见表 1)。 $\Omega$  值能够反映 Rubisco 催化  $\text{CO}_2$  固定反应的效率, 因此人们希望通过采用定点突变的方法来改变  $\Omega$  值, 从而提高生物固定  $\text{CO}_2$  的能力。目前主要是对深红螺菌中的 Rubisco 进行了这方面的研究。对其催化位点 (如 Lys-166) 及其附近的残基 (如 Met-330) 进行定位突变<sup>[13]</sup>, 无论是用 Ser-166 和 His-166 取代 Lys-166, 还是用 Leu-330 取代 Met-330, 这些突变酶的活性都比原酶低很多。近来又有人<sup>[14]</sup>对其活性中心的 Ile-164 进行定位突变, 两种突变酶 Thr-164 和 Asn-164 的活性分别是原酶的 6% 和 1%。其原因可能是改变了 Ile-164 与  $\text{Mg}^{2+}$  的结合能力。到目前为止, 采用定位突变来提高酶活性还没有成功。

## 7 讨论

综上所述, 关于原核生物 Rubisco 的结构、基因调节和活性调节等方面的研究虽然取得许多进展, 但作为光合作用的关键酶, 其许多性质和一些分子作用机理还需要深入研究。目前人们正致力于通过基因改造等方法, 来提高羧化酶活性或羧化酶/加氧酶的比值, 从而提高生物固定  $\text{CO}_2$  的能力。

## 参 考 文 献

- [1] Tabita F R. In: Blankship R E, Madigan M T and Bauer C E (eds) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 885 ~ 914.
- [2] Altekar W, Rajagopalan R. *Arch Microbiol*, 1990, **153**: 169 ~ 174.
- [3] Bult C J, White O, Olsen G J, *et al.* *Science*, 1996, **273**: 1058 ~ 1073.
- [4] Kitano K, Maeda N, Fukui T, *et al.* *Structure*, 2001, **9**: 473 ~ 481.
- [5] Li L-A, Tabita F R. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 3793 ~ 3796.
- [6] Li L-A, Gibson J L, Tabita F R. *Plant Mol Biol*, 1993, **21**: 753 ~ 764.
- [7] Qian Y, Tabita F R. *Bacteriol J*, 1996, **178**: 12 ~ 18.
- [8] Dubbst J M, Bird T H, Bauer C E, *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 19224 ~ 19230.
- [9] Ellis R J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**: 687 ~ 692.
- [10] Goloubinoff P, Christeller J T, Gatenby A A, *et al.* *Nature*, 1989, **342**: 884 ~ 889.
- [11] Checa S K, Vial A M. *Eur J biochem*, 1997, **248**: 848 ~ 855.
- [12] Baker S H, Jin S, Aldrich H C, *et al.* *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4133 ~ 4139.
- [13] Hartman F C. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 3496 ~ 3501.
- [14] Patrick C, Day A G, Fersht A R, *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **232** (2): 482 ~ 486.