

自养细菌 RubisCO 分子生物学研究进展

刘振盛 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

在自养细菌中还原 CO_2 为有机碳有多种途径, 在这些途径中主要是还原磷酸戊糖途径 (又称卡尔文循环), 这个循环的第一步是 CO_2 的固定反应, 它是由核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (简称 RubisCO) 催化完成的。它催化核酮糖-1,5-二磷酸 (RuBP) 的羧化反应, 生成二分子的 3-磷酸甘油酸; 同时又催化 RuBP 的氧合反应生成一分子的 3-磷酸甘油酸和一分子的磷酸乙醇酸。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 CO_2 , 释放到空气中。因此, RubisCO 在这两种代谢途径中起着重要枢纽作用, 它调节着细胞碳的流向^[1]。特别是在植物中, 这两种代谢途径 (光合成与光呼吸) 的平衡严重影响作物的产量^[1], 光呼吸作用造成碳源的流失和能源的浪费, 因此可望通过定点突变等 DNA 重组技术改变羧化酶和加氧酶的比值, 来提高作物产量。为达到这一目的, 首先需对酶的结构、催化机制以及分子遗传等问题有所了解。在高等植物中 RubisCO 的大、小亚基基因分别存在于叶绿体和染色体上。在体外, 目前尚无法装配成有活性的全酶^[2]。因此对酶进行定点突变修饰遇到了障碍, 而在原核生物中这些问题已得到解决。自养细菌 RubisCO 大、小亚基基因位于一个操纵子上, 而且在结构上与高等植物的 RubisCO 有相似之处, 因此自养细菌为我们深入研究 RubisCO 基因结构、功能以及基因改造提供了一个很好的材料, 为今后改造真核生物的 RubisCO 提供理论及实践基础。本文对自养细菌的 RubisCO 研究进展加以叙述和讨论。

(一) 自养细菌 RubisCO 的特征

1. 结构的多样性: 在高等植物中 RubisCO 是由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成的 L_8S_8 结

构。而在自养细菌中 RubisCO 结构多种多样, 由单一的大亚基组成的多聚体如 L_2 , L_4 , L_6 , L_8 各种形式到大、小亚基组成的 L_6S_6 及 L_8S_8 复合的多聚体, 而且在同一种生物中可能存在着两种不同形式^[3,4]。在化能自养细菌中大多数是 L_8S_8 结构, 而在光合细菌中 RubisCO 结构变化较多, 如在深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中是由二个大亚基组成的二聚体 (L_2) 形式^[5]。在 *Rhodobacter sphaeroides* 中含有 L_8S_8 及 $\text{L}_4\text{-}_6$ 两种结构的 RubisCO, 这两种酶的免疫特性明显不同。 L_8S_8 类似于大部分原核生物, 而 $\text{L}_4\text{-}_6$ 与 *R. rubrum* 的 L_2 酶类似。光合细菌中含有多种形式的 RubisCO 可能与它们代谢的多样性有关, 为能在不同环境下生存提供强的适应能力。

2. 双重功能: 对各种来源的 RubisCO 的实验表明, 同一活化位点具有两种酶的活性, 即羧化酶和加氧酶 (氧化酶), 一个酶活性的修饰或改变同样影响另一个酶活性, 目前选择修饰还没有成功^[4]。近期研究表明这两种酶活性在调节上不同, 特别是在金属离子的需求上, 如羧化酶在 Mg^{2+} 存在时活性较高, 而加氧酶在 Mn^{2+} 存在时有更高的活性^[6]。各种实验表明, RubisCO 所具有的两种催化功能都位于大亚基上。小亚基虽然不直接参与催化作用, 但对于保持酶活性也是不可缺少的组分^[1]。

3. 激活与催化作用: RubisCO 含有催化位点和活化位点, 无论是高等植物还是自养细菌, 纯化的 RubisCO 在成为有催化能力的活化酶之前, 需要 CO_2 和 Mg^{2+} 激活, 形成酶- CO_2 - Mg^{2+} 三联体复合物。作为活化剂的 CO_2 和作为反应底物的 CO_2 不是同一分子; 前者结合在大亚基的活化部位, 与 ϵ -氨基形成甲酰化合物, 后者则结合在大亚基的催化部位^[1]。此外糖磷酸代谢物如 6-磷酸葡萄糖醇,

NADPH₂ 也可促进酶的活化作用, 与酶形成四联体复合物, 进一步稳定了酶的结构^[4]。尽管对羧化作用的机制已有充分的了解, 但对氧化作用的认识却仍然很贫乏。如果羧化作用与氧化作用是密切结合在一起, 那就无法改变其中的一种作用, 而不致影响另一种作用。

4. 羧基化小体: 在许多以 CO₂ 为主要碳源生长的自养细菌体内发现了一种含有羧化酶、多角形的内含体^[4], 直径约为 120nm, 外有一单层膜包围, 这种多角体称之为羧基化小体。如那不勒斯硫杆菌 (*Thiobacillus neapolitanus*) 在 CO₂ 限量培养时, 羧基化小体大量出现, 可达总 RubisCO 的 80%^[7], 表明羧基化小体可能是以某种方式调节着细菌的碳源代谢。Beudeker 等^[8], 在羧基化小体制备物中检测到了 9 种卡尔文循环酶和一些多肽链, 表明 CO₂ 固定的部分反应可能在羧基化小体上进行, 作为专门的 CO₂ 固定“器官”, 增加了 CO₂ 固定效率, 以满足细菌在不同生长情况下代谢的需要。

(二) RubisCO 的基因结构和基因表达

1. RubisCO 的基因结构, 迄今为止发现的自养细菌 RubisCO 的大、小亚基因 (*rbcL*, *rbcS*) 都位于同一操纵子上, 并共同被转录^[4], *rbcL* 和 *rbcS* 一般都定位于细菌染色体上。然而在真养产碱细菌 (*Alcaligenes eutrophus*) H₁₆ 菌株中, 除了在染色体上有一个 *rbcL* 和 *rbcS* 拷贝外, 在质粒上也发现了 *rbcL* 和 *rbcS* 基因序列^[9]。无质粒菌株仍然保留着固定 CO₂ 的能力, 显然质粒编码的功能对 CO₂ 的固定并不是绝对需要的。此外, 在 *R. sphaeroides* 中^[10], 还发现了与 CO₂ 固定有关基因, 如磷酸核酮糖激酶基因 (*prk*) 和 1,6-二磷酸果糖酶基因 (*fbp*), 与 RubisCO 基因组成基因簇, 而且在同一方向转录。在 *R. sphaeroides* 中含有 L₈S₈ 和 L₄₋₆ 两种类型的 RubisCO 基因, 此外与 CO₂ 固定的有关基因也有二类 (图 1), 这些与 CO₂ 固定的有关基因形成基因簇, 有利于促进酶合成的协同表达, 而且保证了大、小亚基精确的装配。

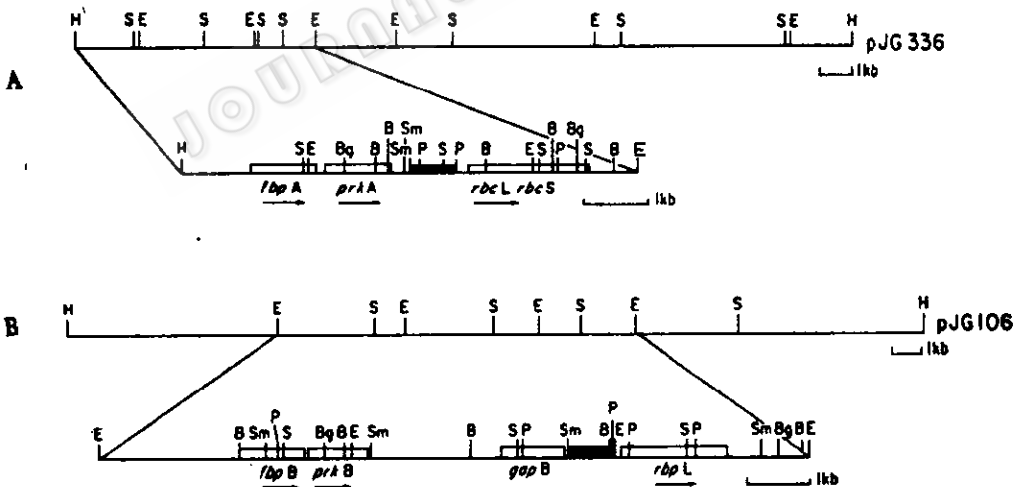


图 1 CO₂ 固定基因簇及限制性内切酶图谱 A 和 B 分别表示 *R. sphaeroides* 的 L₈S₈ 类型 (*rbcL*-*rbcS*) 和 L₄₋₆(*rbpL*) RubisCO 基因以及及与 CO₂ 固定有关的相应基因: 未知功能的同源区; → 转录方向限制内切酶位点: H:Hind

III;S:Sal I; E:EcoR I; Bg:Bgl II; B:BamH I; Sm:Sma I; P:Pst I; X:Xho I

2. 结构基因氨基酸序列和一级结构比较: 到目前为止, 从已测序的真核植物及原核藻类,

蓝细菌等光合生物来看, RubisCO 大亚基是非常保守的, 氨基酸序列的同源性通常在 80% 以

上^[11]。化能自养细菌与光合生物大亚基基因产物相比, 同源性较低, 如真养产碱细菌只有 57.6%^[4], 另外一个结构特性的深红红螺菌 RubisCO, 它与已测定的植物 RubisCO 大亚基基因相比, 同源性低于 30%^[12]。从目前已测定的 RubisCO 基因来看, 不管它们基因的同源性差别有多大, 但是位于大亚基活性中心附近的氨基酸如 Lys-329, Lys-191 和 Lys-166, 又表现出了序列的保守性^[11], 原核生物和真核生物在 RubisCO 结构形式上的差异, 有利于我们鉴定出有重要催化功能的, 共同的氨基酸结构, 为合理定点突变提供依据。

小亚基的序列变化较大, 甚至在相近的高等植物中也如此, 然而在蓝细菌、藻类及高等植物小亚基序列中有三个区又表现出相当大的同源性^[13], 这些同源性可能与小亚基促进催化活性等功能至关重要。

3. RubisCO 结构基因在 *E. coli* 中表达:

rbcl 基因是首次从玉米和衣藻的叶绿体 DNA 中分离到的, 但是在体外尚不能表达出有活性的蛋白^[4]。1984 年 Somerville^[14] 等克隆了深红红螺菌 RubisCO 大亚基基因 (rbpL), 并且在 *E. coli* 中, 在 Lac 启动子后表达出活性的二聚体 (L₂)。同年, Tabita^[15] 等又以深红红螺菌大亚基基因为探针, 克隆出了 *R. sphaeroides* 的 RubisCO L₄₋₆ 的 rbpL 基因。

蓝细菌如 *Anacystis nidulans* 的 rbcL 和 rbcS 基因发现是共转录的, 而且被一个短的 93bp 的序列分开, 当基因克隆到 pUC9 表达载体时, 大、小亚基在 *E. coli* 中合成, 而且纯化的重组蛋白比活性特别高, 比 *A. nidulans* 粗提物高 10 倍^[16]。另外, 二个蓝细菌的 RubisCO 基因也能够在 *E. coli* 中表达^[17,18]。到目前为止, 在化能自养细菌中, 真养产碱细菌^[19] 和氧化亚铁硫杆菌^[20] 分别克隆到了 RubisCO 基因。值得注意的是, RubisCO 酶活性不高, 可能是由于酶诱导的时间不够。此外, 重组 RubisCO 成功表达依赖于克隆的受体菌株及质粒载体的选择。

4. RubisCO 结构基因在 *R. sphaeroides*

RubisCO 缺失突变株中的表达: *R. sphaeroides* 是一个紫色非硫光合细菌, 合成 L₄₋₆ 和 L_{8S8} 两种类型的 RubisCO, 要使其成为 RubisCO 基因表达的受体菌, 必须消除其固定 CO₂ 能力。Falcure 等^[21] 构建成了不能合成 L₄₋₆ 和 L_{8S8} 双缺失突变株。他们首先将克隆在 *E. coli* 质粒载体上的 rbcL-rbcS (L_{8S8}) 基因用 SalI 酶切, 由于在 rbcL-rbcS 基因内存在着两个 SalI 切点, rbcL-rbcS 部分基因被切除了, 同时插入编码 Km^r 的 SalI 片段, 再将这个缺失 rbcL-rbcS 及插入 Km^r 的基因片段亚克隆到寄主范围小的可转移的载体 pSUP202 上, 通过 *E. coli* SM-10 将这个缺失 - 插入片段接合转移到 *R. sphaeroides* 中, 与 *R. sphaeroides* 中染色体上正常的 rbcL-rbcS 基因进行同源重组, 取代了 *R. sphaeroides* 的 rbcL-rbcS 基因, 成为 rbcL-rbcS 部分缺失突变株, 不能合成正常的、有活性的 L_{8S8} 酶 (图 2^[21])。

rbpL (L₄₋₆) 缺失突变株的构建也采用了类似的方法, 将克隆在 *E. coli* 质粒载体上的 rbpL 基因, 用 Tpr 基因 (三甲氧苄二氨嘧啶) 取代部分 rbpL 基因片段, 再将这个插入一缺失的片段亚克隆到 pSUP202 上, 通过 *E. coli* SM-10, 将这个亚克隆的重组质粒接合转移到 rbcL-rbcS 缺失的 *R. sphaeroides* 中, 重组质粒上的 rbpL 缺失 - 插入片段与 *R. sphaeroides* 染色体上等位的 rbpL 基因进行了同源交换, 这样就构建成了 rbcL-rbcS 和 rbpL 双缺失的突变株。遗传交换通过 Southern 杂交分析证实。免疫测定证实了 *R. sphaeroides*, 缺失突变株不能合成 L_{8S8} 和 L₄₋₆ 酶。利用 rbcL-rbcS 和 rbpL 缺失突变, 保证了构建突变株的完全稳定性。

为了研究 RubisCO 缺失的 *R. sphaeroides* 在不同的 RubisCO 基因表达时光合生长的情况, 他们又构建了一个表达载体, 将深红红螺菌 RubisCO rbpL 基因上游区含有启动子的片段克隆到广泛寄主的载体 pRK404 上, 命名为 pRKRP-1, 通过这个载体将球形红杆菌及外源的 RubisCO 基因引入到 RubisCO 缺失的 *R. sphaeroides* 中, 它们表达出的活性比野生型 *R.*

sphaeroides 高 1—2 倍。这可能是由于质粒的剂量效应所致。*R. sphaeroides* RubisCO 缺失菌株以及深红螺菌启动子的表达载体系统对

于研究突变的 RubisCO 蛋白的特性是非常有用的。

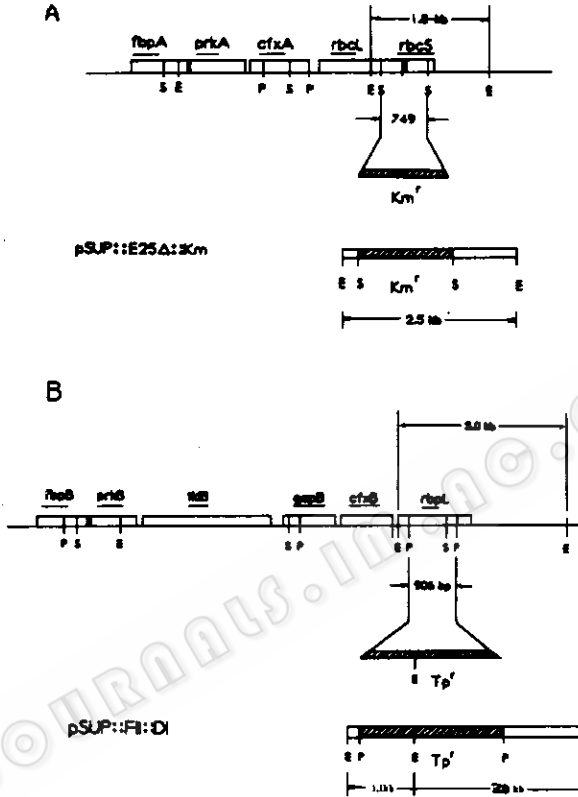


图 2 *R. sphaeroides* 二氧化碳固定基因区图谱

- (A) 为 L_8S_8 类型的二氧化碳固定基因簇。rbcL—rbcS 部分基因被 Km^r 基因取代。pSUP::E25Δ::Km 为 pSUP202 衍生质粒，含有缺失—插入 (Km^r) 的 rbcL—rbcS 基因片段，此质粒用于构建 RubisCO(L_8S_8) 缺失突变株。
- (B) 为 L_4-6 类型的二氧化碳固定基因簇。rbcL 部分基因被 Tp^r 基因取代。pSUP::F11::D1 为 pSUP202 衍生质粒，含有缺失—插入 (Tp^r) 的 rbcL 基因片段，此质粒用于构建 RubisCO(L_4-6) 缺失突变株。

(三) RubisCO 结构基因的定点突变

深红螺菌 RubisCO 基因在 *E. coli* 中成功地表达及其基因的序列分析^[22]，对定位突变的研究起着重要的促进作用。目前主要是对深红螺菌进行了一些定位突变的研究。深红螺菌 RubisCO Lys-191 残基被认为参与酶的活化作用。用 Glu 取代 Asp-188 和 Lys-191，在 Glu-188 突变中^[23]，虽然保留了这个区的净负电荷。但是由于 $-CH_2-$ 基因插入到这一结构中，使离子正常的协同作用发生某些变化，酶的

活性有很小的改变；在 Glu-191 突变中^[24]，酶活性丧失，表明 Glu 不能代替 Lys 起到结合 Mg^{2+} 的作用。

此外，对催化位点及其附近的残基进行了定位突变。例如在深红螺菌中，Met-330 与一个重要的残基 Lys-329 相邻，将 Met-330 变成 Leu-330^[25]，致使重组酶的催化活性降低了 5 倍；而且对 CO_2 的亲性和大大降低；另外，一个重要残基是 Lys-166，分别用 Arg-166，Ser-166，His-166 取代 Lys-166^[26]，Arg-166

活性没有多大变化, Ser-166 为天然活性的 0.20%, His-166 的相对活性只有 2%。

如上所述, 定位突变在阐明酶的作用机理和必需的功能性基因方面取得了许多成果, 但是目前用定点突变进行基因改造均使酶的活性降低。要使羧化酶活性提高或羧化酶 / 加氧酶比值改变, 尚需进一步探究。随着不同种类自养细菌 RubisCO 基因克隆及序列分析信息的增加和 RubisCO 分子生物学研究的深入, 相信最终能发现一种高效的 RubisCO 结构。若能将这种结构的 RubisCO 应用到植物中去, 那么对农业生产将起着不可估量的作用。

参 考 文 献

- Miziorko H M et al.: *Annu. Rev. Biochem.*, **52**:507 — 538, 1983.
- Gatenby A A: *Eur. J. Biochem.*, **168**:227 — 231, 1987.
- Torres-Ruiz J A: *Arch. Microbiol.*, **142**:55 — 60, 1987.
- Tabita F R: *Microbiol. Rev.*, **52**:155 — 189, 1988.
- Tabita F R et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**: 3459 — 3464, 1974.
- Martin et al.: *FEMS Lett.*, **129**:39 — 43, 1981.
- Holthuijzen Y A et al.: *Arch. Microbiol.*, **144**: 398 — 404, 1986.
- Beudeker R F et al.: *Arch. Microbiol.*, **129**: 361 — 367, 1981.
- Klintworth R et al.: *J. Bacteriol.*, **164**:954 — 956, 1985.
- Gibson J L et al.: *J. Bacteriol.*, **170**:2153 — 2158, 1988.
- 徐勇, 吴光耀: 植物生理学通讯, **2**:5 — 11, 1988.
- Nargang F et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **193**: 220 — 227, 1984.
- Tabita F R: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6100 — 6103, 1985.
- Somerville C R: *Mol. Gen. Genet.*, **193**: 214 — 219, 1984.
- Quivey R G et al.: *Gene*, **34**:91 — 101, 1984.
- Gatenby A A et al.: *Nature*, **314**:617 — 620, 1984.
- Tiboni Q O et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **783**: 258 — 264, 1984.
- Vakeria D S et al.: *Arch. Microbiol.*, **145**: 228 — 233, 1986.
- Andersen K et al.: *J. Bacteriol.*, **169**:1997 — 2004, 1987.
- Kusana T et al.: *Current Microbiol.*, **22**:35 — 41, 1991.
- Falcone D L et al.: *J. Bacteriol.*, **173**:2099 — 2108, 1991.
- Nargang F, *Mol. Gen. Genet.*, **193**:220 — 224, 1984.
- Estelle M et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**:9523 — 9526, 1985.
- Terzaghi B E et al.: *Biochem. J.*, **235**:839 — 846, 1986.
- Hartman F C: *J. Biol. Chem.*, **262**:3496 — 3501, 1987.

(1992-3-15 收稿)