

Rubisco活化酶的分子生物学

张国 王玮 邹琦*

山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

Molecular Biology of Rubisco Activase

ZHANG Guo, WANG Wei, ZOU Qi*

College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018

提要 Rubisco 活化酶是广泛存在于光合生物中、调节 Rubisco 活性的酶, Rubisco 活化酶同时具有活化 Rubisco 和催化 ATP 水解的作用。它依赖 ATP 水解, 促使 RuBP 或其它磷酸糖类从 Rubisco 上解离下来, 以恢复 Rubisco 的活性。该文介绍 Rubisco 活化酶的分子特性、作用机制、光合作用调节及基因工程的最新研究进展。

关键词 Rubisco 活化酶; Rubisco; 光合作用; ATP; 基因工程

1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 是所有光合生物进行光合碳同化的关键酶, 它催化 RuBP 的羧化和加氧反应, 并调节二者之间的关系, 这两个反应的比值决定了植物的碳同化效率。已有研究表明, 虽然 Rubisco 含量约占叶片可溶性蛋白的一半^[1], 但它的催化效率却很低。近年来的研究证明, 钝化态 Rubisco 必须经过另一种酶的活化才能表现出其羧化/加氧活性, 这种酶就是 Rubisco 活化酶 (Rubisco activase, RCA)。Rubisco 的活化是决定叶片碳同化效率的关键因子, 因此 RCA 的生理、生化和分子生物学的研究也成为近年来光合作用研究的重要领域之一。

自从 Salvucci 等^[2]发现 RCA 以来, 人们采用 RCA 抗体研究发现, RCA 普遍存在于高等植物 (包括 C₃ 和 C₄ 植物)、绿藻、部分蓝细菌和古细菌之中, 这说明依赖于 RCA 的 Rubisco 活性调节机制广泛存在于光合生物中, 为体内 Rubisco 的活化机制研究展现了良好的前景。国内唐如航和李立人^[3]、韩鹰等^[4]曾分别对 RCA 的研究作过综述, 但近年来对它的研究特别在分子生物学方面进展很快, 为此, 我们着重就近几年 Rubisco 活化酶的分子生物学的研究进展作些介绍。

1 Rubisco 活化酶的分子特性

RCA 是一种核编码的可溶性叶绿体蛋白, 具有 ATPase 活性。RCA 通常由 a(45 kD)、b(41 kD) 两种亚基组成, 但不同植物亚基的种类和数量不同, 如拟南芥、菠菜^[5]、大麦^[6]、水稻^[7]、棉花^[8]、小麦^[9]等植物 RCA 均含有 a、b 两种亚基,

而有些植物如烟草^[10]、玉米^[11]和衣藻^[12] (*Chlamydomonas reinhardtii*) 则仅含一种 b 亚基。但无论同种植物或不同种植物的亚基之间, 其抗体都能发生交叉反应。

Shen 和 Ogren^[13]报道了菠菜 RCA 氨基酸序列和二级结构, RCA 前体多肽的 N 端含有 58 个氨基酸的转运肽, 当前体肽跨膜运输到叶绿体后, 转运肽立即在 Ser 和 Thr 丰富的区域被切除, 形成成熟的亚基, 它有 2 个 ATP 结合部位。对菠菜的 RCA 定点突变发现, Glu 取代 Glu₁₀₉ 位点的突变, 导致 b 亚基活化 Rubisco 的活性上升而 ATPase 活性下降, 说明 RCA 活化 Rubisco 的活性和 ATPase 活性并非紧密偶联; 用 Asp 替换 Glu₁₀₉ 也能增加活化 Rubisco 的活性, 但用其它氨基酸替换则导致活性下降, 说明酸性残基 (如 Glu 和 Asp) 在这一位点上能增加活化 Rubisco 的活性^[13, 14]。

RCA 本身虽然不是 ATPase, 但具有 ATPase 活性。这是因为 RCA 的两种亚基结构均含 “P-环” 序列 (phosphate-binding loop, G-X-X-X-X-G-K-S/T), P-环是许多 ATPase 具有的核苷酸结合序列, 它能维持酶和 ATP 上的 α -、 β - 和 γ - 磷酸基团形成的氢键, 稳定 ATP 水解过程的中间状态, 因此 RCA 活化 Rubisco 依赖于 ATP 而为 ADP 抑制^[15]。在菠菜 RCA “P-环” 处对 Lys₁₆₉ 进行定点诱变, 得到的突变体与 ATP 的结合能力不及野生型的

收稿 2004-01-19 修定 2004-05-08

资助 国家重点基础研究发展规划项目 (G1998010100)。

* 通讯作者 (E-mail: zouqi@sda.u. edu. cn, Tel: 0538-8241581)。

50%, 结果是突变体 RCA 的总活性下降, 这说明 Lys_{169} 对于维持 RCA 活性具有重要作用; 菠菜 RCA N 端的 Trp_{11} 和随后的 Lys 残基缺失时, 活性几乎完全丧失, 这些残基定位在酶的表面, RCA 有可能在这一区域与 Rubisco 相互作用^[14]。

植物体内 RCA 的 α 、 β 亚基都具活性, 但只有 α 亚基受硫氧还蛋白 f (Trx-f) 的调节^[16, 17]。 α 亚基的 C- 末端具有 2 个 Cys 残基而 β 亚基没有, 当 2 个 Cys 残基结合形成二硫键 (—S—S—) 时, ADP 对 α 亚基的抑制作用比未形成二硫键时增强。而 Trx-f 含有调节氧化还原活性的二硫键/巯基, 它能够还原 α 亚基的二硫键: 还原态 Trx-f 与 α 亚基中二硫键的一个 Cys 残基形成混和二硫键, 然后 Trx-f 活化区域中的另一个巯基进攻这个二硫键, Trx-f 自身形成二硫键而 α 亚基被还原, 这样就减少了 α 亚基对 ADP 抑制作用的敏感性, 从而导致 α 亚基的活性增加^[16~18]。

RCA 只在绿色组织中表达, 如苹果的叶^[19]、水稻的叶和茎^[20]、拟南芥绿色的叶、茎、花和角果^[21]都表达 RCA, 但根和黄化苗^[21]中均不表达, 这与 Rubisco 仅在绿色组织中特异性表达一致。Martinez 等^[22]发现, 在高产玉米种群中 Rubisco 活性高的原因是由于其 RCA 蛋白含量高。Jiang 等^[23]研究发现超级稻等高产品种(系)有高的 Rubisco 和 RCA 活性, 这说明作物产量与 RCA 的含量和活性有一定的相关性。

2 Rubisco 活化酶对 Rubisco 的活化

目前, 关于 RCA 如何活化 Rubisco 的详细机制尚不清楚, Portis^[24]、Salvucci 和 Loo^[25]、Jensen^[26]曾分别提出过不同的模型对此进行解释, 其中以 Jensen 的模型更为详尽和具体。图 1 便是 Jensen 等提出的 RCA 作用模式: 图中上部的方框表示 Rubisco, 下部的圆饼和带缺口的正方形分别代表钝化态和活化态的 RCA。

已知 CO_2 除了作为 Rubisco 的底物之外, 还具有 Rubisco 激活剂的功能。Rubisco 只有先与作为激活剂的 CO_2 形成氨基甲酰化 Rubisco 后, 才能催化羧化/加氧反应; 此外, Rubisco 在与另一个底物 RuBP 结合之前, 还必须与 Mg^{2+} 结合, 才能被完全活化(图 1 步骤 1)。该反应还可以自发地逆转, 即氨基甲酰化的 Rubisco 能自发脱掉 CO_2 (去氨基甲酰化) 和 Mg^{2+} , 重新转变为非活化态(步骤 2)。

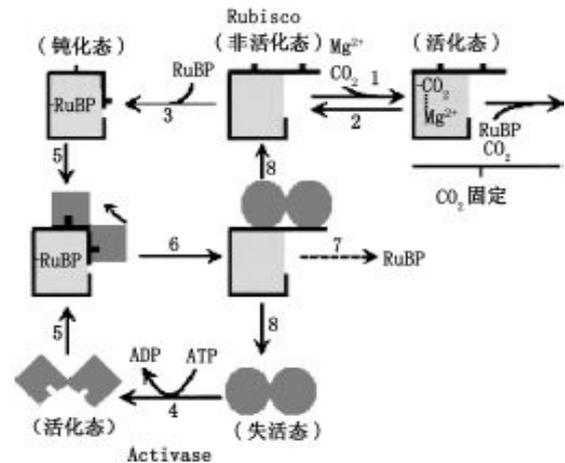


图 1 活化酶催化钝化态 Rubisco 转化成活化态 Rubisco^[26]

然而, 问题在于非活化态的 Rubisco 还能够与 RuBP 结合, 改变其构象, 形成钝化态的终端复合物(步骤 3), 这种复合物即不能再被 CO_2 和 Mg^{2+} 所活化。RCA 的作用在于与这种钝化的终端复合物结合(步骤 5), 改变其构象, 使 Rubisco 与 RuBP 的结合变松弛(步骤 6), 并将 RuBP 从 Rubisco 活化区域解离下来(步骤 7), 空出 Rubisco 中的 CO_2 和 Mg^{2+} 结合位点, RCA 则转变为非活化状态(步骤 8)。这样, Rubisco 便可以重新被 CO_2 和 Mg^{2+} 激活, 催化 RuBP 的羧化/加氧反应(步骤 1)。至于 RCA 本身的活化, 则需要与 ATP 的水解相偶联, 以提供变构所需的能量(步骤 4), 这就是 RCA 自身具有 ATPase 活性的原因。也正因为如此, RCA 的活性与叶绿体的能荷有密切关系, 当叶片从黑暗中转移到光照下以后, 随着光合磷酸化的进行和 ATP 的增加, RCA 和 Rubisco 活性有一个逐渐诱导提高的过程。

Crafts-Brandner 和 Salvucci^[27]指出高温下 Rubisco 失活速率加快发生在步骤 2、3, ATP 水解(步骤 4)和(或)RCA 与钝化态复合物相互作用(步骤 5 和 6)而影响 Rubisco 活化的速率。叶细胞能荷的变化与 Rubisco 活性密切相关^[28]。缺乏 ATP 时, RCA 的 ATPase 活性和活化 Rubisco 活性均丧失^[29], 这表明催化 ATP 的水解是 RCA 的一个不可缺少的重要性质。ATP 水解发生的具体过程和意义尚需进一步研究。

3 Rubisco 活化酶、Rubisco 与光合作用的关系

不同环境条件特别是逆境条件下, 作物的光

合速率常会下降, Rubisco活性下降是引起光合下降的非气孔因素之一。

3.1 温度和CO₂ 离体Rubisco保持最高活性的温度大于50℃, 离体RCA的ATPase活性最适温为42℃, 但叶内Rubisco活性在叶温超过35℃时就会下降。Crafts-Brandner和Salvucci^[27]研究认为温度升高到35~40℃, Rubisco活性下降是由于Rubisco失活的速率超过RCA的活化能力, 也有可能影响了RCA和Rubisco的结合过程, 但决不是由于RCA的活性下降; 当温度达到并超过42℃时, RCA的活性下降, 并促进Rubisco的活性下降。

RCA结构发生微小变化就会影响与Rubisco的有效结合。当温度升高到35~40℃时, 植物叶片中RCA从Rubisco活化区域解离出来, 亚基之间相互作用消失, Rubisco活性下降但可以恢复; Western-blot分析表明, 当温度高于42℃时, RCA展开成单体, 这些单体自身或与其它叶绿体蛋白结合成高分子量的不可溶的聚合体, 这时Rubisco的活性下降加速且不能逆转; 豌豆和菠菜拟南芥2种亚基热稳定性和聚集方式相同^[30]。

Crafts-Brandner和Salvucci^[27]认为高浓度CO₂下, 体内Rubisco活性下降原因不是由于其自身失活速率的增加, 而是CO₂浓度增高会导致ATP消耗增加、能荷下降, 从而引起RCA的活性下降。已有实验业已证明, 体外Rubisco和RCA的活性都受温度的影响, 但不受CO₂浓度的影响。

小麦叶片经38℃热胁迫后, RCA的表达量明显减少^[31], 经24h缓解后, 42kD亚基数量增加, 同时诱导产生一种新的41kD亚基。尽管C₄植物光合的最适温度比C₃植物高, 但玉米在叶温升高超过38℃时的反应与小麦相同^[9]。许多植物在热胁迫下会产生新的RCA亚基, 它和组成型RCA亚基的增加同时发生, 这有可能是光合碳同化的一种适应机制。

早期报道都支持RCA是一种分子伴侣(molecular chaperone)的看法, 但后来又遭到反对。不过, RCA虽然不能修复在体内热变性的Rubisco, 但它的许多特征(包括序列同源性、热胁迫导致原有亚基增加和诱导新亚基的产生等)^[9]都与分子伴侣相同。

3.2 光 光调节既有外部因子又有内部因子的影响,

光照度是一个重要的生态因子, Rubisco初始活性是影响光合速率的生理因子。

王焘等^[32]根据小麦光合日变化过程中Rubisco活性的变化规律, 认为光合午休过程中, 小麦光合磷酸化受阻而使ATP供应减少, 能荷降低, 从而抑制RCA对Rubisco的活化作用。翁晓燕等^[33]认为RCA对Rubisco初始活性的调节主要发生在每天早晚及光暗转换的初期, 此时钝化态Rubisco比较多。苹果、番茄、大麦和拟南芥中RCA都有明显的昼夜节奏。

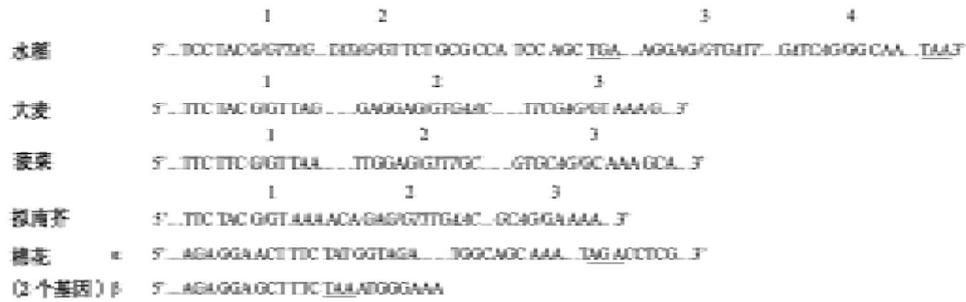
Rubisco的光调节是通过RCA起作用的。唐如航等^[20]的实验表明, 就基因转录受光诱导而言, RCA基因比Rubisco大小亚基基因敏感。Zhang等^[16, 17]和Motohashi等^[18]的实验结果表明, 光照度可能通过调节基质的氧化还原势, 改变Trx-f对 α 亚基的调节作用, 从而影响RCA的活性及Rubisco的活性。但在只有b亚基的烟草中Rubisco也受光调节, 这可能是其他蛋白参与的结果。

4 Rubisco活化酶的基因工程

活化酶基因工程的工作已经较深入, *rca*基因分离、表达、转化等主要工作都已经开展。现在人们已经克隆了菠菜、拟南芥^[5]、大麦^[6]、玉米、水稻^[7]、棉花^[8]等植物*rca*基因的cDNA, 并对转基因(主要是反义转化)植株的生理生化性状进行了研究。

通过克隆不同植物的*rca*基因, 人们认识到*rca*基因拷贝数和表达的复杂性(图2)。现在发现高等植物的*rca*基因表达方式主要有:(1)烟草、玉米^[9]和衣藻^[10]等的*rca*基因只表达 β 亚基, 如烟草至少有3个独立*rca*基因都表达 β 亚基^[10]。(2)菠菜、拟南芥和水稻等由1个*rca*基因通过可变剪接编码2个亚基, 但剪接方式不同。(3)大麦和棉花等有2个*rca*基因编码 α 、 β 两个亚基。大麦有前后衔接2条基因:*rcaA*和*rcaB*, *rcaA*基因通过可变剪接方式形成 α 和 β 亚基; 而*rcaB*基因直接表达 β 亚基, *rcaB*位于*rcaA*的上游1000bp处, 表达数量低且只在光合作用相对低部位表达; 棉花RCA有2个独立基因分别编码 α 和 β 亚基^[6]。另外, 小麦^[9]、玉米^[11]、菠菜^[31]和棉花^[34]等在热胁迫下也会产生新的RCA亚基。

Zhang等^[17]分别将RCA的 α 亚基或 β 亚基基

图2 几种植物 *rca* mRNA前体的不同剪接方式^[7]

下面画横线的字母为终止密码子, 剪去的序列用斜体字表示, 符号“/”表示剪接位置。水稻前体 mRNA 在 1~4 之间剪接形成 *rcaI* mRNA, 在 1~2 和 3~4 剪接形成 *rcaII* mRNA; 大麦、菠菜、拟南芥都是在 1~3 和 2~3 分别剪接形成 2 个亚基; 棉花由 2 个基因分别编码 2 个亚基。

因转入拟南芥突变体 (*rca*) 的结果表明, 只转 β 亚基或定点突变的 α 亚基 (1 个或 2 个 Cys 被 Ala 代替) 时, Rubisco 不受光调节, 转 α 亚基或两者都转的植株则受光调节, 这证明 Rubisco 的光调节是基于 RCA 的 α 亚基受到氧化调节。拟南芥、烟草^[35]、大豆^[36] 的转反义 *rca* 植株, RCA 水平和 Rubisco 活性均下降, 同时光合作用减弱, 而且烟草转反义 *rca* 基因在热胁迫 (42°C) 下与未经热胁迫的比较, 野生型光合作用几乎完全能恢复, 而转基因植株则恢复很少^[18]。

5 结束语

RCA 的研究工作已取得重大进展, 一方面, *rca* 基因克隆和表达、蛋白提纯和活性测定在一些植物中取得成功; 另一方面, RuBP 等磷酸糖和 RCA 与 Rubisco 的相互作用及环境因素对 RCA 活性影响的研究已相当深入。但仍有许多相关问题亟需解决: (1) *rca* 基因的可变剪接和表达两个亚基的生物学意义何在? (2) 体内 Rubisco 和 RCA 相互作用机制及与 ATP 水解的关系如何? (3) 环境因素影响 Rubisco 和 RCA 的机制等等。这些问题的研究都有助于我们更清楚地了解 RCA 的作用机制, 为更快提高 Rubisco 效率提供新的方法和策略。

参考文献

- Makino A, Mae T, Ohira K. Purification and storage of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from rice leaves. *Plant Cell Physiol*, 1983, 24:1169~1173
- Salvucci ME, Portis AR Jr, Ogren WL. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*. *Photosynth Res*, 1985, 7:193~201
- 唐如航, 李立人. Rubisco 活化酶的研究进展. *生命科学*, 1998, 10(4):159~166
- 韩鹰, 陈刚, 王忠. Rubisco 活化酶的研究进展. *植物学通报*, 2000, 17(4):306~311
- Werneke JK, Chatfield JM, Ogren WL. Alternative mRNA splicing generates the two ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Plant Cell*, 1989, 1:815~825
- Rundle SJ, Zielinski RE. Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in barley. *J Biol Chem*, 1991, 266: 4677~4685
- To KY, Suen DF, Chen SC. Molecular characterization of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice leaves. *Planta*, 1999, 209:66~76
- Salvucci ME, Van de loo FJ. Two isoforms of Rubisco activase in cotton, the products of separate genes not alternative splicing. *Planta*, 2003, 216:736~744
- Law RD, Crafts-Brandner SJ. High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 386(2):261~267
- Qian J, Rodermeil SR. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase cDNAs from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol*, 1993, 102:683~684
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1773~1780
- Roesler KR, Ogren WL. Primary structure of *Chlamydomonas reinhardtii* Rubisco activase and evidence for a single polypeptide. *Plant Physiol*, 1990, 94:1837~1841
- Shen JB, Ogren WL. Alteration of spinach ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in response to changing partial pressure O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*, 1992, 99:1201~1207
- Esau BD, Snyder GW, Portis AR Jr. Differential effects of N- and C-terminal deletions on two activities of Rubisco activase. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 326(1):100~105
- Kallis RP, Ewy RG, Portis AR Jr. Alteration of the adenine nucleotide response and increased Rubisco activation activity

- of *Arabidopsis* Rubisco activase by site-directed mutagenesis. *Plant Physiol*, 2000, 123:1077~1086
- 16 Zhang N, Portis AR Jr. Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Plant Biol*, 1999, 96:9438~9443
- 17 Zhang N, Kallis RP, Portis AR Jr et al. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:3330~3334
- 18 Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT et al. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20):11224~11229
- 19 Watillon B, Kettmann R, Boxus P et al. Developmental and circadian pattern of Rubisco activase mRNA accumulation in apple plants. *Plant Mol Biol*, 1993, 23:501~509
- 20 唐如航, 贾军伟, 李立人. 光和糖对水稻Rubisco活化酶基因表达的影响. *植物生理学报*, 1997, 23(4):337~341
- 21 Liu Z, Taub CC, McClung CR. Identification of an *Arabidopsis thaliana* ribulose-1,5-bisphosphate/carboxylase activase minimal promoter regulated by light and the circadian clock. *Plant Physiol*, 1996, 112:43~51
- 22 Martinez BE, Mollina GJ, Sanchez JE. Regulation of rubisco activity during grain-fill in maize: possible of role rubisco activase. *J Agr Sci*, 1997, 128:155~161
- 23 Jiang DA, Lu Q, Weng XY et al. Role of key enzymes for photosynthesis in the diurnal of photosynthetic rate in rice. *Acta Agron Sin*, 2001, 27(3):301~307
- 24 Portis AR Jr. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *J Exp Bot*, 1995, 46:1285~1291
- 25 Salvucci ME, Loo FJ. The mechanism of Rubisco activase: insight from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynth Res*, 1996, 47:1~11
- 26 Jensen RG. Activation of Rubisco regulation photosynthesis at high temperature and CO₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24):12937~12938
- 27 Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME. Rubisco activase constrains the photosynthetic of leaves at high temperature and CO₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24):13430~13435
- 28 Portis AR Jr. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43:415~437
- 29 唐如航, 贾军伟, 李立人. 烟草Rubisco活化酶的纯化和及其特征. *植物生理学报*, 1997, 23:89~94
- 30 Rockville MD. Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *vivo*. *Plant Physiol*, 2001, 127(3):1053~1064
- 31 Rokka A, Zhang L, Aro E-M. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J*, 2001, 25(4):463~471
- 32 王焘, 郑国生, 邹琦. 小麦光合午休过程中Rubisco活性的变化. *植物生理学通讯*, 1996, 32(4):257~260
- 33 翁晓燕, 路庆, 蒋德安. 水稻转绿型白化体突变系W₂₅转绿过程中Rubisco和Rubisco活化酶活性与光合速率的变化. *植物生理学报*, 2000, 26(3):213~218
- 34 Law RD, Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME. Heat stress induces the synthesis of a new form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in cotton leaves. *Planta*, 2001, 214:117~125
- 35 Sharkey TD, Badger MR, Andrews TJ et al. Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco activase. *Photosynth Res*, 2001, 67:147~156
- 36 Jiang CZ, Quick WP, Alred R. Antisense RNA inhibition of Rubisco activase expression. *Plant J*, 1994, 5:787~789