

- Natl Acad Sci USA, 1998, **95** (6): 2850~ 2855
- 10 Li J M, Hu P P, Shen X, *et al.* E2F4-RB and E2F4-P107 complexes suppress gene expression by transforming growth factor beta through E2F family sites. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (10): 4948~ 4953
- 11 Berezuts K E, Yu B, Morozov A, *et al.* Differential regulation of the pocket domain of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. Cell Growth Differ, 1997, **8** (12): 1277~ 1286
- 12 Dou Q P, An B, Antoku K, *et al.* Fas stimulation induces retinoblastoma protein dephosphorylation and proteolysis that is blocked by inhibitors of the ICE protease family. J Cell Biochem, 1997, **64** (4): 586~ 594
- 13 Corcoran M M, Rasool O, Liu Y, *et al.* Detailed molecular delineation of 13q14.3 loss in B cell chronic lymphocyte leukemia. Blood, 1998, **91** (4): 1382~ 1390
- 14 Sauerbrey A, Stammler G, Zintl F, *et al.* Expression of the retinoblastoma tumor suppressor gene (RB-1) in acute leukemia. Leuk Lymphoma, 1998, **28** (3~ 4): 275~ 283
- 15 Xu H J, Kuzumaki N, Kawakami Y, *et al.* Altered retinoblastoma protein expression in non-small-cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. Cancer, 1997, **79** (7): 1329~ 1337
- 16 Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi V, *et al.* Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small-cell lung cancer. Int J Cancer, 1998, **75** (2): 187~ 192
- 17 Yamamoto Y, Shimizu E, Masuda N, *et al.* Retinoblastoma protein status and chemosensitivity in non-small-cell lung cancers. Oncol Rep, 1998, **5** (2): 447~ 451
- 18 Burns L, Ueki K, Jhung S L, *et al.* Molecular genetic correlations of p16, cdk4, and Prb immunohistochemistry in glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol, 1998, **57** (2): 122~ 130
- 19 Fuego J, Gomez M C, Yung W K, *et al.* Suppression of human glioma growth by adenovirus mediated Rb gene transfer. Neurology, 1998, **50** (5): 1307~ 1315
- 20 Simeone D M M, Cascarelli A, Logselon C D. Adenoviral-mediated gene transfer of a constitutively active retinoblastoma gene inhibits human pancreatic tumor cell proliferation. Surgery, 1997, **122** (2): 428~ 433

Recent Progress in the Correlation Between Tumor Suppressor Gene Rb and Checkpoint Control in Cell Cycle. FAN Zu-Sen, AO Shi-Zhou (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Rb correlates with tumorigenesis closely, and is an important tumor suppressor gene. Rb protein forms a complicated feedback regulation pathway combined with p16, CDK4/6, cyclinD1 to control cell cycle. Rb is a central step in G1/S checkpoint control to determine cell cycle progression. Rb protein acts as an interface of interaction between nuclear and extracellular signals and is controlled by many extracellular factors which control cell growth and differentiation.

Key words Rb gene, cell cycle, checkpoint control, tumor

RubisCO 的研究进展

陈为钧¹⁾ 赵贵文

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

顾月华

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

摘要 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (RubisCO) 是调节光合和光呼吸, 决定净光合作用的一个关键酶; 也是植物可溶性蛋白质中含量最高的蛋白质。该酶广泛存在于植物及一些微生物体内。综述了近年来有关 RubisCO 的一些研究进展。包括 RubisCO 的基本性质、结构与功能、酶基因工程、酶活性调节及其活化酶等。

关键词 RubisCO, 结构, 特性, 活性调节, 活化酶

学科分类号 Q55

1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (ribulose 1, 5-bisphosphosphate carboxylase/oxygenase, E. C. 4. 1. 1. 39, 简称 RubisCO) 是光合碳同化作用的关键酶。据估计它每年约固定 5×10^{14} kg 的 CO₂。该酶催化光合作用的 CO₂ 固定的第一步

反应, 使 CO₂ 和二磷酸核酮糖 (RuBP) 转变成两个分子的 3-磷酸甘油酸; 同时也催化光呼吸过程的第一步反应, 即催化 O₂ 和 RuBP 产生一分子磷

¹⁾中国科学技术大学化学系和生命科学学院联合培养的 97 级博士生。

收稿日期: 1998-08-03, 修回日期: 1998-12-20

酸甘油酸和一分子磷酸乙醇酸。因此该酶是调节光合和光呼吸，从而决定净光合的一个关键酶。此外，RubisCO 是植物可溶性蛋白中含量最高的蛋白质，占 50% 左右，它是植物体内的一种重要的储藏蛋白。因此，RubisCO 的研究无论在理论上还是实际上都具有重要的意义。本文就近年来有关研究进展作一介绍。

1 基本性质

1.1 酶的热稳定性

具有一定的热稳定性，不同植物其纯化的 RubisCO 热稳定性不一样，水稻 RubisCO 在 50℃ 保温 7 min 达最大酶活力，随后活力迅速下降，到 30 min 酶活力下降到 40%；烟草 RubisCO 在 50℃ 保温 20 min 达最大活力，到 30 min 时活力还维持在 98% 左右；菠菜 RubisCO^[1] 通过氨甲酰化后在 60℃ 的 10 mmol/L DTT 处理 1 h 其活力还能维持 50%。

1.2 酶的动力学性质

C₃ 型植物 RuBP 羧化酶的 K_m (CO₂) 值变化不大；而与 CO₂ 固定速率有关的 V_{max} 则有明显差异；在品种间甚至属内种间酶的动力学常数并无显著性差异。如栽培稻籼型、粳型及籼粳杂交品种酶的动力学常数并无差异。这从酶学上反映出光合遗传的稳定性^[2]。不同类型的植物，其 K_m (CO₂) 值差异较大，如水稻 RuBP 羧化酶 K_m (CO₂) 一般为 12 μmol/L，而喜温红藻 (Cyanidiophyceae) 的 K_m (CO₂) 仅为 6~7 μmol/L，这种喜温红藻^[3] 被认为是目前发现其 K_m (CO₂) 值最小的。

1.3 酶的羧化、氧化比值 (Ω)

对一定的酶来说，RubisCO 的羧化作用和氧化作用比值 (Ω) 是一个常数。该 Ω 值决定于空气中 CO₂、O₂ 的浓度相对比值。不同来源的 RubisCO 其差异悬殊， Ω 值从仅有大亚基的细菌 RubisCO 的 9 到含有大小亚基的高等植物 RubisCO 的 90~95。一般 RubisCO 的 Ω 值超过 100 表示作物易存活并在干旱和强光、低 CO₂ 下生长更好。最近发现^[3] 一种具有固定 CO₂ 能力极强的喜温红藻的 Ω 值达 238，是高等植物的 2.4~2.5 倍。发现如此高 Ω 值的酶为改进高等作物的 RubisCO 具有重要的意义。

虽然 RubisCO 的动力学性质稳定， Ω 值为常数，但人们还是在从 RubisCO 的亚基解离和重组^[4]、采用定位突变^[5] 等方法，试图在亚基水平

及基因水平上改造 RubisCO 的动力学性质及 Ω 值来提高植物的固定 CO₂ 能力和光合效率。

2 RubisCO 结构与功能

大多数真核和原核生物 RubisCO 由 8 个大亚基 (50~60 ku) 和 8 个小亚基 (12~18 ku) 组成 (L₈S₈)。其三维结构早已由 Andersson 等^[6] 提出了较为明确的结构模型。

RubisCO 的大亚基 (L) 由 N、B 和 C 三个结构域组成，N 结构域从 N 端开始包括 137 个氨基酸残基，并含有 5 股 β 折叠。B、C 结构域主要由 α 螺旋组成，而且，C 端结构域有一个 α/β 桶状结构，包括 8 个平行的 α 螺旋和 8 个 β 折叠以及连接这二者的 8 个环。一个 L 的羧基末端 α/β 桶状区域与另一个 L 的氨基末端区域构成活性中心^[7]，并有 Mg²⁺ 参与，它和酶的三个氨基酸残基发生作用，即带有氨甲酰基的 Lys191 和侧链 Asp193 及 Glu194^[8]。小亚基 (S) 远离活性中心，它具有调控 RubisCO 加氧酶活性的作用。

利用结晶学分析菠菜 RubisCO 显示 L/S 交界处有广泛的联系，S 与两个相邻的 L 相互作用，第三个 L 与这两个 L 中之一形成二聚物。对应的 S 与一个的 α 螺旋 7 和相邻 L 的 α 螺旋 8 相结合，这两个螺旋紧贴活性中心。并且 L 通过 S 传导向相邻 L 催化位点移动。

Taylor 等^[9] 对菠菜 RubisCO 及其底物 RuBP 复合物的三维结构进行研究，用 Ca²⁺ 取代 Mg²⁺ 作为金属离子激活剂，发现 RuBP 与 RubisCO 复合物在活化和未活化状态下结构不同。在未活化状态下，底物通过诱导催化亚基可移动环区的运动使催化中心孤立；而活化状态其催化中心部分开放。并证实在反应过程中关键步骤是有一个氢键网络使催化中心结构稳定，认为氨甲酰化 Lys201 在活化和催化过程中起重要作用。

不同来源的 RubisCO 的二级结构有差异。如水稻和烟草 RubisCO 钝化时表面巯基数均为 24 个/mol，活化后水稻为 32 个/mol，烟草为 16 个/mol。此外，根据 CD 光谱推算，菠菜中 RubisCO 和水稻中 RubisCO 的 α 螺旋含量均比烟草中 RubisCO 高 55% 左右。

3 RubisCO 组装及重组

RubisCO 的 L 为叶绿体基因组 (rbcL) 编码并在叶绿体中合成，S 为细胞核基因组 (rbcS) 编

码, 在细胞质中合成. 合成 S 前体通过叶绿体膜运输进入叶绿体间质, 装配前, S 被切掉一段氨基末端肽链, L 被切掉一段肽链并进行乙酰化后由 RubisCO 亚基结合蛋白 (BP) 作用下组装成有活性全酶. 从豌豆中分离的 BP^[10], 在 200~250 nm 处约 39% 的有 α 螺旋结构的光谱特征, 它是一种热稳定性蛋白.

利用固定化 RubisCO 的 L、S 解离重组技术^[4], 进行水稻和烟草 RubisCO L、S 之间杂交, 发现水稻 RubisCO 的 L 同烟草 RubisCO 的 S 杂交后, 其加氧酶活性提高, Ω 值下降; 而水稻 RubisCO 的 S 同烟草 RubisCO 的 L 杂交后结果相反. 利用豌豆^[11] Rbcs3A 基因在一种 35S 启动子的控制下翻译编码一小亚基 (S), 并用这种 S 去组装, 全酶活性降低. 说明采用 RubisCO 大小亚基重组对改造 RubisCO 功能具有一定作用.

4 RubisCO 基因工程

4.1 定位突变

对于 RubisCO 的基因工程方面研究颇多, 主要是进行定位突变. 目的是观察突变结果是否能改变 Ω 值和固定 CO₂ 能力. 最近有人^[12] 利用深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 的 RubisCO 大亚基上活性中心的 Ile164 进行定位突变后, 其 Ile164Thr 和 Ile164Asn 两种突变酶的 K_{cat}/K_m (RuBP) 分别比原酶低 40 倍和 900 倍, K_m (RuBP) 增大而羧化能力下降. 在非活性中心上的氨基酸残基突变, 同样改变其活性, 如菠菜^[5] RubisCO L 上的 Leu290 用 Phe 取代, 其 Ω 值下降, 而 Val262 用 Leu 取代, Ala222 用 The 取代可提高 Ω 值和恢复固定 CO₂ 能力. 因为这三个残基均在 α/β 桶状活性中心的底部, 其残基改变会影响大小亚基相互作用, 从而影响全酶活性.

4.2 转基因技术

已利用转基因技术培育出降低 RubisCO 蛋白量的烟草及 C₄ 植物黄花菊^[13] (*Flaveria bidentis*), 这些转基因后降低 RubisCO 含量的植物, 不仅提供了一个新的实验体系, 以评价 RubisCO 本身对控制叶片光合作用和植株生长的作用效果, 而且在水稻中得到应用^[14], 当水稻中含有 65% 天然 RubisCO 的量时, 在饱和 CO₂ 和强光照下可提高光合作用中 N 的利用效率.

5 RubisCO 活性及调节

植物体内 RubisCO 只有经过活化后才具有催

化能力, 这一活化过程是 RubisCO 的氨甲酰化, 即 RubisCO 活性区的 Lys 残基与二价金属离子键合. 这种氨甲酰化过程受很多因子调节, 如 RuBP、CA1P 和某些 RuBP 羧化反应的副产物^[15]. 同时, 活化酶可调节 RubisCO 活化, 这种活化酶影响氨甲酰化的 RubisCO 催化转向比率以及 RubisCO 的氨甲酰化状态, 其作用机制还不清楚^[16]. 但已证实该酶调节某些阻碍 RubisCO 氨甲酰化或催化抑制因子的释放而维持 RubisCO 活力.

植物体内 RubisCO 活性及含量也受到环境因子的影响, 如光照、CO₂ 浓度、温度等. 有报道, 在长期适应高 CO₂ 的环境中生长的植物其 RubisCO 活性下降^[17], 如在开放的气体交换体系中, 提高细胞间的 CO₂ 分压, 适当降低温度, 经高 N 处理的水稻叶片光合速度下降, 此时, RubisCO 不是光合作用限制因子, 叶片中大量 RubisCO 处于无活性状态, 光合作用主要受到电子传递及叶绿体内合成 ATP 所需 Pi 的获得所限制; 降低辐照度, RubisCO 活性下降. 植物为了适应高 CO₂ 浓度、低温、低光照的环境, 致使 RubisCO 活性和含量均下降^[14]. 水分严重胁迫也导致酶活性和含量明显下降. 芦苇干旱胁迫引起酶活性降低, 但酶含量不变, 而盐生环境不引起活性降低, 但酶含量下降. 植物生育过程中其 RubisCO 活性变化较大, 在叶片老化过程中 RubisCO 活性和含量的降低快于光合速率、叶绿素含量和光合电子传递链活性的下降, 但 RuBP 羧化酶比活性在叶片一生中并没有显著变化, RubisCO 蛋白量的降低可能是 RubisCO 活性下降的原因.

6 RubisCO 活化酶

利用硫酸铵沉淀及柱层析等方法从烟草叶片中纯化了 RubisCO 的活化酶. 发现该酶由一种 42 ku 的亚基组成, 并证实该酶热稳定性远比 RubisCO 差. 菠菜 RubisCO 活化酶也证实其热稳定性差, 如 33℃ 处理 5 min 其活性失去 50%, 而 RubisCO 在 59.6℃ 处理 1 h 其活性才下降 50%.

从菠菜^[18] 中克隆复制出活化酶的 45 ku 和 41 ku 的多肽, 发现 45 ku 的活化酶促进 ATP 水解的最适温度为 45℃, 比 41 ku 活化酶高 13℃, 但二者均有效促进 ATP 水解和活化 RubisCO, 活化酶催化 ATP 水解, 促进 RuBP 和其他糖磷酸化合物从去除氨甲酰化的 RubisCO 活性区的释放, 一旦摆脱这些化合物, RubisCO 自发地与 CO₂ 进行

氨甲酰化而活化^[19]。进一步研究活化酶在活化 RubisCO 过程中, 是以大的聚合物的形式, 而不是以单体形式与 RubisCO 结合^[20]。

活化酶被认为是一种分子伴侣, 可能不属于传统型分类的酶范畴, 它帮助 RubisCO 折叠和聚合。但也有人认为活化酶作为分子伴侣还缺少证据^[1]。活化酶不论以何种身份出现, 但它都可通过使 RubisCO 氨甲酰化或使 RubisCO 保持氨甲酰化状态来调节 RubisCO 活性, 其作用机制还需深入研究。

目前, 有关 RubisCO 的研究虽然取得很多方面的进展, 但作为光合作用的关键酶, 尤其具有羧化和氧化双重功能的酶, 其许多性质和一些行为的分子作用机理还需进一步深入探讨, 例如: RubisCO 大小亚基组装及分子杂交、体内活化机制与活化酶相互作用关系, 环境调控, 基因工程对该酶的改造, 结构与功能等关系。

参 考 文 献

- Eckardt N A, Portis A R Jr. Heat denaturation profiles of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and RubisCO activase and the inability of RubisCO activase to restore activity of heat-denatured RubisCO. *Plant Physiol*, 1997, **113** (1): 243~248
- 魏锦城, 王仁雷, 程光宇 (Wei J C, Wang R L, Cheng G Y). 杂交稻核酮糖二磷酸羧化酶的动力学性质. *植物生理学报 (Acta Phytophysiol Sinica)*, 1994, **20** (1): 55~60
- Anwaruzaman U K, Miyachi S, Yokota A. Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red alga with a strong specificity for CO₂ fixation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **232** (2): 568~571
- 缪有刚, 李立人 (Miu Y G, Li L R). 水稻和烟草核酮糖 1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶大小亚基之间的分子杂交. *植物生理学报 (Acta Phytophysiol Sinica)*, 1996, **22** (1): 40~44
- Hong S, Spreitzer R J. Complementing substitutions at the bottom of the barrel influence catalysis and stability of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (17): 11114~11117
- Andersson I, Knight S, Schneider G, *et al.* Crystal structure of the active site of ribulose-bisphosphate Carboxylase. *Nature*, 1989, **337** (19): 229~234
- Andersson I. Large structures at high resolution: The 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. *J Mol Biol*, 1996, **259** (1): 160~174
- Lundqvist T, Schneide G. Crystal structure of activated ribulose 1, 5-bisphosphate Carboxylase Complexed with its substrate, ribulose-1, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1991, **266** (19): 12604~12611
- Taylor T, Andersson I. The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1, 5-bisphosphate. *J Mol Biol*, 1997, **265** (4): 432~444
- 赵若虹, 缪有刚, 李立人 (Zhao R H, Miu Y G, Li L R). 豌豆核酮糖 1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶亚基结合蛋白的纯化及特性. *植物生理学报 (Acta Phytophysiol Sinica)*, 1991, **17** (3): 251~258
- Getzoff T P, Zhu G H, Bohnert H J, *et al.* Chimeric arabidopsis thaliana ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase containing a pea small subunit protein is compromised in carbamylation. *Plant Physiol*, 1998, **116** (2): 695~702
- Patrick C, Day A G, Fersht A R, *et al.* Role of isoleucine 164 at the active site of Rubisco from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **232** (2): 482~486
- Furbank R T, Chitty J A, von Caemmerer S, *et al.* Antisense RNA inhibition of rbcS gene expression reduces RubisCO level and photosynthesis in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol*, 1996, **111** (3): 725~734
- Makino A, Shimada T, Takumi S, *et al.* Does decrease in ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase by antisense rbc S lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂ and light in rice plants? *Plant Physiol*, 1997, **114** (2): 483~491
- Zhu G, Jesen R G. Fallover of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Plant Physiol*, 1991, **97** (4): 1354~1358
- He Z, Von Caemmerer S, Hudson G S, *et al.* Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase deficiency delays senescence of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase but progressively impairs its catalysis during tobacco leaf development. *Plant Physiol*, 1997, **115** (4): 1569~1580
- Makino A, Nakano H, Mae T. Responses of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase, cytochrome F, and sucrose synthesis enzymes in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis. *Plant Physiol*, 1994, **105** (1): 173~179
- Crafts-Brandner S J, van de loo F J, Salvucci M E. The two forms of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase differ in sensitivity to elevated temperature. *Plant Physiol*, 1997, **114** (2): 439~444
- Lorimer G H, Miziorko H M. Carbamate formation in the amine group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulose-bisphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry*, 1980, **19** (6): 5321~5328
- Lilley R Mc C, Portis A R Jr. ATP hydrolysis activity and polymerization state of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase activase. *Plant Physiol*, 1997, **114** (2): 605~613

Advance of Ribulose 1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RubisCO). CHEN Wei-Jun, ZHAO Gui-Wen, GU Yue-Hua¹⁾ (*Department of Chemistry; ¹⁾College of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*).

Abstract Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) regulates photosynthesis and photorespiration. It is a key enzyme to control the net photosynthesis in plants. It is one of the most abundant soluble proteins in plant also. The enzyme generally exists in plant and some of microorganisms. Some advance in the research of RubisCO was reviewed, It contains the properties, the structure and the function, gene engineering, the activity regulation of RubisCO and its activase.

Key words RubisCO, structure, properties, activity regulation, activation enzyme