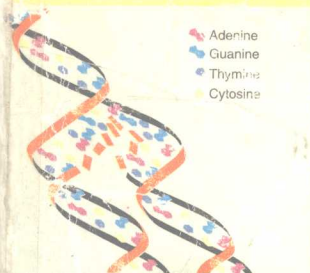


● 吴 平 陈昆松 主编

植物分子生理学进展

ADVANCES IN PLANT MOLECULAR PHYSIOLOGY



浙江大学出版社

植物分子生理学进展

ADVANCES IN PLANT MOLECULAR PHYSIOLOGY

吴 平 陈昆松 主编

浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物分子生理学进展 / 吴平, 陈昆松主编. — 杭州:
浙江大学出版社, 2000. 7

ISBN 7-308-02315-X

I. 植... II. ①吴... ②陈... III. 植物生理学: 分子生物学-学术会议-文集 IV. Q945-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 21254 号

责任编辑 王文文

出版发行 浙江大学出版社

(杭州浙大路 38 号 邮政编码 310027)

(E-mail: zupress@mail. hz. zj. cn)

排版 浙江大学出版社电脑排版中心

印刷 良渚印刷厂

开本 787mm×1092mm 16 开

印张 19

字数 493 千

版印次 2000 年 7 月第 1 版 2000 年 7 月第 1 次印刷

印数 001—580

书号 ISBN 7-308-02315-X/Q · 019

定价 38.00 元

序

生物技术和信息技术是 21 世纪知识经济的两大支柱产业。生物技术的飞速发展,因显示出巨大的商机而吸引了无数商家在该领域投入大量的资金,卓有成效地推动了它的研究与发展,从而使整个生物技术领域走上日新月异的发展轨道,已成为各国竞相研究和发展的重点和热点领域,国际竞争日趋激烈。

在植物生理学研究基础上,引入现代分子生物学技术成果和技术手段,为传统学科的发展注入了新的活力,并由此衍生出了“植物分子生理学”(Plant Molecular Physiology)学科新分支。吴平教授等紧跟国际植物科学研究前沿,受国家人事部委托,主持了由浙江省人事厅和浙江大学联合主办的国家“百千万人才工程”高级研讨计划——“植物分子生理学高级研讨班”。本次高研班特邀了中国科学院匡廷云院士、沈允钢院士以及来自新西兰国家研究院、美国纽约冷泉港生物技术中心、北京大学、清华大学、中国科学院遗传研究所、中国农业大学、山东农业大学和浙江大学等单位的知名专家学者作了专题报告,高研班取得了圆满成功。组织者把参加这次高研班特邀专家的报告和部分代表的交流论文汇编成书,正式出版,这无疑将对我国的植物科学发展起着积极的促进作用。

本书内容包括植物光合分子生理,植物发育分子生理,植物营养分子生理,植物逆境分子生理等研究进展,基本上反映了本学科研究的前沿领域。

据此,我很高兴向读者推荐本书,并希望广大读者在该领域不断探索,勇于创新,为我国的科学技术事业发展添砖加瓦。

浙江省人事厅厅长
陈仲方

目 录

第一部分 植物光合分子生理

光合作用的分子生理研究	沈允钢	(3)
核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶的分子生理学	蒋德安 陆 庆 翁晓燕	(7)
小麦光合效率的非气孔限制因素	樊小林 李生秀	(14)
水稻叶片生育过程中 Rubisco 活化酶的变化及其对 Rubisco 的调节	翁晓燕 陆 庆 蒋德安 奚海福	(19)

第二部分 植物发育分子生理

植物从营养生长向生殖生长的转变	曾广文	(27)
植物细胞信号转导	武维华	(37)
植物中的草酸代谢及其作用研究进展	彭新湘 李明启	(62)
蔗糖磷酸合成酶在高等植物蔗糖代谢中的作用	赵智中 张上隆 徐昌杰	(67)
采后果实成熟衰老的分子生理学机理及其调控	陈昆松 张上隆	(78)
种子耐脱水性的分子生物学基础	朱 诚 任晓米 曾广文	(100)
高等植物根系向重力性的分子生理学机理	张卫萍 吴 平	(106)
GOGAT 基因结构及其表达调控	郝海凌 吴 平	(115)
植物转录因子及转录调控	张 勇 张贵友 蒋五玲 刘 强	(128)
茉莉酸类物质对果实成熟衰老的分子生理学调控机理	许文平 陈昆松 张上隆	(133)
板栗内源激素与花性别分化	雷新涛 夏仁学 李国怀 马梦亭	(140)

第三部分 植物营养分子生理

分子标记技术在植物营养性状基因定位与生理机理研究中应用	吴 平	(149)
植物根构型适应低磷胁迫的分子生物学基础	严小龙 廖 红	(165)
果树铁素营养的分子生理机制研究	韩振海	(170)
利用 mRNA 差异显示技术分析缺铁胁迫下小麦根基因表达的差异	刘维仲 印莉萍 邱泽生 张福锁	(175)
小麦根高亲和力 NO_3^- -transporter 基因的克隆及其表达	温 波 印莉萍 米国华 邱泽生	(181)
玉米根对不同氮源的反应以及 (<i>zmAMT</i>) 的克隆与表达	杨 静 刘祥林 邱泽生 印莉萍	(189)
缺铁诱导玉米根 cDNA 文库的构建及铁胁迫相关基因的筛选	祁晓廷 印莉萍 刘祥林 邱泽生	(198)

第四部分 植物逆境分子生理

- √ 植物对水分胁迫的响应及其在旱作农业和抗旱育种中的应用…………… 邹 琦(207)
- DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用
- …… 刘 强 张贵友 蒋五玲 赵南明 Yamaguchi-Shinozaki, K Shinozaki, K(216)
- √ 植物耐盐耐旱分子机制及其基因工程…………… 张劲松 陈受宜(223)
- √ 植物抗逆性的获得与信号传导…………… 缪 颖 伍炳华 杨汉金 曾广文(244)
- √ 钙信使在植物适应非生物逆境中的作用研究进展…………… 宗 会 李明启(251)
- 植物抗低温胁迫的分子机理…………… 沈晓莹 吴 平(258)
- √ 水杨酸对小麦高盐毒害缓解作用的研究初探…………… 张士功 高吉寅 宋景芝(270)
- 氯化钙、抗坏血酸提高菜心抗旱性的研究 …………… 陈建勋 章崇玲 曾国平(276)

第五部分 其他

- √ 植物病毒卫星 RNA 作为外源基因表达载体及其展望
- …………… 陈集双 张耀洲 胡富强 冯明光(283)
- 鸡蛋花花叶病毒 28.5KD 移动蛋白基因的克隆与序列分析
- …………… 邓晓东 费小雯 刘志昕 胡新文 郑学勤(291)
- 反义 Hevein 基因载体构建及橡胶树遗传转化研究初报
- …………… 刘志昕 邓晓东 魏源文 王泽云 陈雄庭 吴翊蝶 郑学勤(293)

第一部分

植物光合分子生理

光合作用的分子生理研究

沈允钢

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘 要: 本文根据国内外光合作用的研究进展, 论述了当前光合作用的研究动向, 光合作用原初反应、电子传递、光合磷酸化和光合碳同化的分子机理与光合分子生理研究的应用前景。

关键词: 光合作用; 分子生理; 研究

最近在匈牙利举行的第十一届国际光合作用大会有两个鲜明的特点。一个是会议所设的 25 个专题中, 有一个称为分子生理, 这是新加的; 另一个是会议论文集的题名为: 光合作用——机理和效应。这样将两者并列, 也是史无前例的^[1]。此两大特点彼此有联系, 表明光合作用探讨正在把微观和宏观研究紧密结合起来。这符合科学发展的大趋势。诺贝尔奖金获得者、物理学家李政道今年 6 月在国家自然科学基金委员会国家杰出青年基金成立五周年庆祝会上所作的报告中说: “我认为到 21 世纪, 我们生物学界的同行会认识到, 只研究微观的基因不可能解决所有问题, 因为生命是宏观的, 所以 21 世纪生物学发展也需要把微观的基因和宏观的生命统一起来研究^[2]”。

1 分子生理研究的内容与意义

分析一下光合作用分子生理专题中的内容, 就可看出虽然该专题是新设的, 可是这方面的研究自 80 年代以来已逐渐兴起, 而且与此有关的工作在论文集的其他专题中也很多, 并不局限于列入此专题。这是由于有些分子水平的研究虽已与生理过程联系起来, 但因主要着重机理的探讨而列入到其他专题中去的缘故。

当前光合作用研究的动向大致可以归为三类: 一为深入探讨其机理的奥秘; 二为不同层次研究的整合; 三为开拓广阔的应用前景^[3]。分子生理是不同层次研究的整合中最活跃的一部分, 力求将光合机理分子水平的探讨和植物细胞至整体水平光合机构的运转和调节联系起来。这是对光合作用反应步骤、结构功能、分子生物学和生理特性有了相当程度的了解后的自然发展趋势, 也是人们试图把光合作用研究成果通向实际应用的重要途径。现在非常简要地综述一下这方面的研究进展和问题。

2 原初反应分子机理与生理效应的联系

首先从光合作用的原初反应谈起。30 年代中 Emerson 的闪光实验是很重要的生理研究,

使人们有了光合单位的概念,知道光合机构包含有天线色素、反应中心和一系列“暗”反应^[4]。50年代末,研究不同波长光对光合作用的影响,Emerson发现了双光增益效应,Blinks发现了光色瞬变效应,它们导致人们认识到光合作用中可能存在不止一种光反应。这些生理研究成果有力地推动了分子水平的探讨。经过大量的生物化学和生物物理研究,现在已证实光合机构中存在两种光系统,称之为光系统 I 和光系统 II,它们对光合作用都是必需的。人们已从叶绿体中分离出这两种蛋白复合体,并且对它们的多肽和色素组成及功能也有了不少的了解,但还未能彻底揭开其奥秘,人们正在继续大力探索。其中,分子生理研究是很重要的一个方面。例如,究竟在不同波长的光中这两种光系统如何协调,使光合作用可顺利进行呢?已知在光合机构中这两种光系统含量的比例是会随光照条件不一样而可有适应性变动的。当光的波长组成短期内有所改变时,两种光系统间可通过部分天线色素的转移来改变两种光系统的天线色素含量和两种光系统在类囊体膜上的相对移动而彼此靠拢或分开,以便调节激发能由光系统 II 向光系统 I 的满溢,使两种光系统的光反应能较均衡地发生,保证光合机构的顺利运转^[3]。

在自然环境中,太阳光的强度经常会发生大幅度的变化。人们一直在注意研究光合机构对光强变化的响应特性。它在弱光下和强光下的情况很不相同。弱光下,光是限制因素,一般着重了解的是它利用量子的效率。强光下主要是分析它的限速步骤和处理多余光能的方式,因为当光合机构接受到的光能超过它的限速步骤“开足马力”所可利用的程度时,这多余的光能会对光合机构产生破坏作用。人们已知道,植物中有三类减轻这种不良反应的途径。一类是将多余的光能无害化耗散,人们经常提到的耗散方式是通过叶黄素循环,但洪双松等在大豆等植物中发现 D₁ 蛋白可逆失活在起重要作用^[3];第二类是能去除产生破坏反应的物质,Mano 等表明通过抗坏血酸过氧化物酶催化去除过氧化氢很重要^[1];第三类是可很快修复被破坏的部分,其中最突出的是光系统 II 反应中心的 D₁ 蛋白周转速率很快。Morrison 等用 35S-甲硫氨酸标记 D₁ 蛋白的方法测定其周转速率,观察到它和光合碳同化的能力有正相关^[1]。

3 电子传递分子机理与生理效应的联系

在正常的情况下,光能传到光系统的反应中心后产生光化学反应,引起电荷分离,推动在类囊体膜上发生一系列定向电子传递,最终导致水的氧化和辅酶 II 的还原,还原的辅酶 II 为光合碳同化反应提供必要的能源。对光合电子传递研究是从 Hill 等在 30 年代的工作开始的。他们发现离体叶绿体可在光下使水氧化和将一些物质还原。如今,人们对此一系列电子传递的过程已大体了解,但仍有一些关键问题尚未阐明(参看[3])。关于细胞色素 b/f 蛋白复合体的结构功能便是其中之一。它不仅是将两种光系统间的电子传递联系起来的蛋白复合体,它还可自光系统 I 还原端接受电子进行循环电子传递。光合电子传递过程中,反应速度最慢的步骤即还原质醌的氧化也在这蛋白复合体中完成。人们对它的结构功能正在进行深入细致的研究,包括从分子生理方面的探讨。Caemmerer 等用反义 RNA 技术使转基因烟草植株内的细胞色素蛋白复合体的 Rieske 铁硫蛋白合成受抑制。这使得细胞色素蛋白复合体含量显著减少。测定该植物的光合作用,其二氧化碳同化速率降低,看来这是由于电子传递不足引起的,因为核酮糖二磷酸羧化酶的含量未变^[1]。

光系统 I 还原端的电子传递非常复杂。在一般情况下,电子最终交给辅酶 II,用于使光合碳循环运转。但有的情况下,铁氧还蛋白接受的电子可不传给辅酶 II,而直接用于亚硝酸盐等的同化。此外,它还可以将电子传到细胞色素蛋白复合体,形成循环电子传递等。这么多电子

传递去向之间究竟是如何调节的,至今尚知道很少。李德耀等观察到雨天菠菜叶片的光合效率降低,叶济宇等进一步研究发现,这是由于叶绿体处于低渗膨胀状态,使铁氧蛋白和铁氧蛋白辅酶 II 还原酶的连接受到影响,使辅酶 II 不能顺利还原,但铁氧还蛋白传电子给亚硝酸盐的反应仍可照常进行^[3]。

4 光合磷酸化分子机理与生理效应的联系

光合磷酸化是 Arnon 等在 50 年代发现的,他们观察到,离体叶绿体在光下可使腺二磷和磷酸盐合成腺三磷,并了解到此反应和电子传递相耦联。Mitchell 对耦联机理提出了化学渗透假说并得到证实,因而在 1978 年获诺贝尔奖。经许多实验室的研究,现知光合磷酸化的过程为在类囊体膜上进行定向光合电子传递时伴随着在膜两侧有电位差和质子浓度梯度形成。它们合称为质子动力势,可提供能量与耦联因子,使它可催化腺三磷(ATP)的合成,此 ATP 和光合电子传递形成的还原辅酶 II 一样,都是进行光合碳同化所必需的能源。耦联因子又名 H^+ -ATP 合成酶,它是一个结构很复杂的蛋白复合体,由嵌在类囊体膜上的 CF_0 和突出在类囊体膜表面的 CF_1 两部分组成, CF_0 起质子通道作用,催化合成 ATP 的部位在 CF_1 上(参看[3])。关于质子动力势如何通过耦联因子而用于合成 ATP 的机理,Boyer 等提出的构象变化学说有大量支持证据,因而在 1997 年得到了诺贝尔奖(参看 Junge 文[1])。可是,光合磷酸化和电子传递的准量关系至今仍未搞清楚,所以光合作用利用光能的最大量子效率究竟是多少仍未能确切肯定。这牵涉到伴随光合定向电子传递从类囊体膜外侧向内侧转移的质子数和耦联因子利用质子动力势合成 ATP 的效率。各实验室测得的结果常不一致。我们观察到质子在 CF_1 中常有一部分无效漏失,这是使光合磷酸化和电子传递准量关系难于确切测定的重要原因。我们发现有一些耦联效率改善剂,包括叶绿体内存在的有机酸、细胞分裂素以及外加的金霉素等一些抗菌素,处理叶绿体可减少无效漏失而提高耦联效率。它们的作用机理是通过影响 CF_1 的 β 亚基或 γ 亚基变构而减少质子漏失的。我们曾经用金霉素处理小麦叶片,结果其光合磷酸化的耦联效率提高,光合速率也增加了。这些实验和其他实验表明,光合磷酸化形成的 ATP 的供应常常也是进行光合作用的限制因素^[3]。最近,又证明了亚硫酸氢钠处理小麦叶片可提高光合作用也是通过促进光合磷酸化所引起的,它很可能也是作用于蛋白复合体,其具体作用部位尚待进一步研究。

5 光合碳同化分子机理与生理效应的联系

Calvin 等在 50 年代用 $^{14}CO_2$ 示踪碳同化过程,阐明了光合碳循环,在 1962 年获诺贝尔奖。在光合碳同化中,分子生理研究的问题很多。Calvin 了解到 CO_2 首先经核酮糖 1,5-双磷酸(RuBP)羧化酶催化,固定于形成的磷酸甘油酸(PGA)中。将该酶分离纯化出来对它的生化特性进行测定,得到的结果表明,它对 CO_2 的亲合力太低,远不能说明活体内 CO_2 浓度对光合作用的生理效应。人们对这个问题的进一步研究发现,光合机构由黑暗转入光照环境时,会发生一系列调节过程,使 RuBP 羧化酶的活性大大提高。接着,人们又知道了它是一个双功能酶(因而改称 RuBP 羧化/加氧酶, Rubisco),在有氧条件下,它还能催化氧气与 RuBP 反应,形成一个 PGA 和一个磷酸乙醇酸,而后者是光呼吸的底物。光呼吸使光合作用同化形成的有机物有相当一部分又氧化成 CO_2 ,因此许多实验室在进行分子生理研究,企图变动 Rubisco 的特性而

改善光合与光呼吸的比例。Andrews 等在会议中的报告题目就是“Rubisco 在体内和离体条件下的催化作用^[1]”。最近,有人发现红藻 *Galdieria partita* 中此酶的羧化/加氧比很高,Sugawara 等正在研究它的结构^[1],这也许更会促进人们对此酶的分子生理探讨。

与光合碳同化密切相关,Hatch 和 Slack 了解到有些热带起源的植物中,存在着四碳双羧酸途径。它实质上是一个利用 ATP 开动的 CO₂ 浓缩泵,使叶片内部维管束鞘细胞中的 CO₂ 浓度升高,这可以增加光合速率和减少光呼吸。此途径的关键酶是磷酸烯醇型丙酮酸羧化酶,很多人在研究此酶的调节特性并试图将此酶引入三碳植物中^[3]。Parvathi 等观察到此酶在光下对 HCO₃⁻ 的亲合力显著增加^[1]。

一般认为在光合碳循环中,蔗糖磷酸合成酶活力低,是蔗糖合成和光合速率的限制因素。人们观察到以累积淀粉为主的大豆叶片中淀粉含量与此酶活力呈负相关。Ono 等将玉米的蔗糖磷酸合成酶的 cDNA 引入主要累积蔗糖的水稻叶片中,使之过量表达,结果也是如此^[1]。

6 分子生理研究的应用前景

将光合作用分子机理探讨和生理效应联系起来研究,不仅有助于阐明光合作用的奥秘,而且为寻找合适措施来改善光合机构的运转和效率开辟了重要途径。

首先可为高光效育种提供关键指标。提高光合效率与增产的关系是大家都知道的。第一次绿色革命是以培育矮秆直立叶品种为重要指标来提高群体光能利用率和经济系数而获得增产的。有人提出第二次绿色革命的核心将是提高作物个体的光合作用效率,这是有相当道理的。在水肥供应得到保证的条件下,株型较好的作物品种要进一步获得高产,当然需要提高个体的光合效率。可是要了解其限制因素和机理及有关调控基因并不像株型选择那样直观和简单,迫切需要光合分子生理的研究来提供线索。

了解影响作物光合效率的限制因素和分子机理,不仅有助于高光效育种,还可以通过栽培管理来改善作物光合机构在田间的运转状况和效率。现在报刊上常提到的利用遥感(RS)、地理信息系统(GIS)、全球定位(GPS)技术而构成的精确农业已成为一个新的热点。其实它还处于初级阶段,因为遥感所获得的信息还不够。如果光合分子生理研究使作物光合机构在田间的运转状况和限制因素的信息也能通过遥感而获得,则可使注重分别加以动态管理的精确农业跨上一个新台阶。

参考文献:

- [1] Garab G (ed). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999
- [2] 李政道. 科学, 1999, 51(4): 3~6
- [3] 沈允钢, 施教耐, 许大全. 动态光合作用. 北京: 科学出版社, 1998
- [4] Wild A, Ball R. *Photosynthetic Unit and Photosystems*. Backhuys Pu, 1997

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/ 加氧酶活化酶的分子生理学*

蒋德安 陆庆 翁晓燕

(浙江大学生命科学学院,杭州 310029)

摘要:本文综述作者和近年来国内外对核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶的研究结果,着重论述了该酶在植物光合和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化过程中的作用,酶的生化特性、基因结构和表达及基因突变对该酶造成的后果。

关键词:核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶;功能;基因;表达;突变

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶的英文全称为 Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase,缩写为 RCA。Somerville 等^[1]在拟南芥中发现了一个由核基因控制的突变体,不能在大气下生存,只能在很高的 CO₂ 浓度下生长,Salvucci 等^[2]证实这种突变体缺少 41KD 和 45KD 的两条叶绿体可溶性蛋白。此后,RCA 的研究引起了人们的广泛兴趣^[3~8]。已发现 RCA 普遍存在于高等植物、绿藻和部分蓝细菌中。

1 RCA 与植物光合作用的关系

对拟南芥、烟草、大豆等^[9~12]植物的 RCA 反义突变体研究表明,突变体使核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)活化程度下降并引起光合速率的明显降低。玉米高产品系光合速率高,是由于 Rubisco 活性高及 RCA 含量高,把这一品系的 RCA 加到低产品系抽提液中,可以使后者 Rubisco 活性增加,因而认为玉米灌浆期 RCA 水平调节 Rubisco 活性,再调节光合速率^[5]。Uchida 等^[13]发现水稻 RCA 含量与羧化效率几乎成直线,Fukayma 等^[14]报告稻叶一生最高放 O₂ 量与 RCA 含量一致,与稻叶一生 RCA/Rubisco 含量之比呈指数关系。我们在研究水稻光合速率、Rubisco 及 RCA 活力的关系时表明,在剑叶衰老过程中 RCA 的活力和含量与净 Rubisco 活力呈极显著直线正相关(图 1)^[15],且证实 RCA 在调节水稻体内 Rubisco 活力日变化中有重要作用。在黄化突变体中,RCA 含量和活性在叶片完全转绿前就已较高。而 Foyer 等^[16]在小麦的粗提液中发现无 RCA 活性,但随着纯化程度的提高,提取液 RCA 活性提高。

* 国家自然科学基金资助 No. 39970440

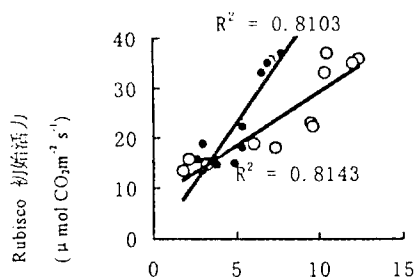


图1 水稻剑叶衰老期间 Rubisco 初始活力与 RCA 活力(•)和含量(o)的关系

2 植物体内 Rubisco 的钝化过程及 RCA 对 Rubisco 的活化

已知 Rubisco 只有在先与 CO_2 和 Mg^{2+} 结合后,才能催化羧化或加氧反应,该 CO_2 不同于底物的 CO_2 ,不直接参与反应,而是作为活化因子存在。该 CO_2 与 Rubisco 大亚基中的 Lys-201 结合后再与 Mg^{2+} 结合(Hartman 等 1994),使 Rubisco 成为 ECM 的活化态。现已发现 Rubisco 不仅在黑暗条件下易脱去 Mg^{2+} 和 CO_2 而钝化,也易被许多叶绿体的代谢产物如 RuBP、CA1P、Xu5P 所钝化^[3,4,6],其钝化过程如图 2 所示,这些钝化态统称为 E 或 ECM 糖磷酸酯。

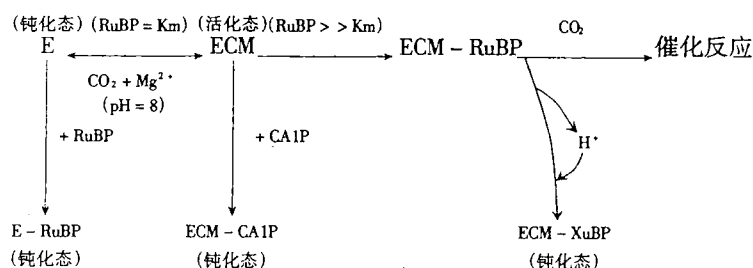


图2 Rubisco 在植物体内的活化态和各种主要钝化态之间的关系

由此可见,在反应过程中或低光强下,Rubisco 钝化失活,RCA 需不断催化 E-糖磷酸酯和 ECM-糖磷酸酯的解离,使 Rubisco 活化,并促进 E 在生理 CO_2 浓度下变为 ECM 活化状态^[3,4,6]。缺少 RCA 的拟南芥突变体和 RCA 反义 RNA 转基因烟草中无 RCA 活性,导致 Rubisco 在体内的不活化^[2]。研究表明钝化的酶(E)在无 RCA 存在情况下,被低浓度的 RuBP 钝化后形成的 E-RuBP 固定 CO_2 的能力很低,加 RCA 后 6 分钟活力可达到活化态酶(ECM 形式)的活力水平,活化过程中所加 RCA 量与 E-RuBP 的活化间有线性关系,即随 RCA 量的增加 E-RuBP 的活化增加^[12,17],上述研究都充分说明 RCA 在催化 Rubisco 中的功能。RCA 在活化 Rubisco 时必须依赖 ATP 水解产生的能量,无 ATP 时钝化的酶很快失活^[8,17]。其他三磷酸核苷酸不能替代 ATP 的作用,ADP 是 RCA 的专一性强抑制剂^[17]。但在体外无 E-RuBP 的条件下,RCA 仍具有 ATP 酶的活性。

目前 RCA 的催化机理尚不清楚,Portis^[4]和 Salvucci 等^[6]分别提出了不同的模型。根据 Portis 假定,Rubisco 被 RCA 活化的过程如图 3 所示^[4]:Rubisco 与 RCA 结合,引起变构并使 Rubisco 释放糖磷酸酯,Rubisco 与 RCA 分离,ATP 被 RCA 水解(但 ATP 的水解也可能在前

三步)。在无 Rubisco 情况下,RCA 有 ATP 水解能力。尽管难以获得 RCA 与 Rubisco 结合的直接证据,但 Yokota 等^[18]已使 Rubisco 大亚基与 RCA 发生交联,Buchen-Osmond 等^[19]通过电镜观察到 Rubisco-RCA 可见复合物,Wang 等^[20]发现在 Rubisco 与 RCA 之间存在两组植物间基团互作。以菠菜为代表的一组 RCA 可以有效地活化小麦、玉米等非茄科植物甚至光合细菌的 Rubisco,而菠菜的 RCA 对茄科植物只有很低的活化效果,茄科植物的 RCA 在科内可相互活化,但对非茄科植物也只有很低的活化效果。这种差异表明茄科和非茄科植物 Rubisco 与 RCA 蛋白质在互作区结构的明显不同。如茄科植物 Rubisco 中有 10 个非茄科植物没有的氨基酸(如 Lys²², Lys⁹⁶, Lys³⁶⁰, Lys³⁶³, Asp³¹⁶, Glu³⁶⁴, Asn¹⁶⁶, Asn³²⁶和 Phe³²²是茄科所特有的),烟草中 RCA 的 C-末端用菠菜的 C-末端替换,替换后烟草 RCA 就可活化菠菜 Rubisco。Schreuder 等^[21]发现在茄科和非茄科植物上 Rubisco 大亚基与 RCA 结合部位有 6 个氨基酸不同。

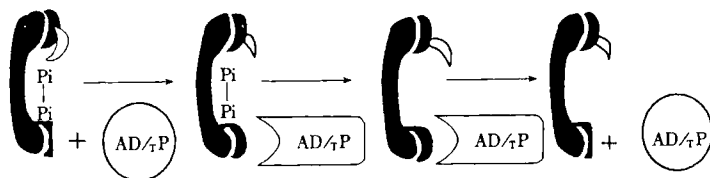


图 3 Rubisco 被 RCA 再活化的可能程序

3 RCA 的基因结构与基因表达

3.1 RCA 基因结构

大多数植物中,RCA 有两条多肽 41kD 和 45kD。但在不同种中,两者的比例不同,41kD 存在于所有植物中,但玉米无 45kD,我们也探明在水稻中主要为 41kD 多肽^[12]。菠菜中 41kD 和 45kD 的多肽都具有催化 Rubisco 活化的能力,所不同的是催化动力学有差异,前者为普通动力学而后者为 S 型。表明研究在菠菜和拟南芥中,RCA 只有一个基因拷贝,转录后前体断裂成 2 条 1.9kb 的 mRNA,分别产生两种 RCA 多肽。拟南芥的无 RCA 突变体则断裂成 1.7kb 和 2.1kb 的二条 mRNA^[22]或内含子 3 中 5' 连接处 G 突变成了 A,产生 3 种畸变的(0.5、1.8 和 2.0kb)mRNA 积累^[23]。Watillon 等^[24]报告苹果 cDNA 编码 437 个氨基酸的 RCA 前体。苹果、菠菜、大麦和拟南芥的 RCA 前体氨基酸序列同源性大于 75%。RCA 前体在叶绿体内切去前 58 个氨基酸后成为成熟的 RCA,苹果、菠菜和拟南芥有 80% 的相同序列。水稻与菠菜、大麦和拟南芥相比,3' 端少 32 个氨基酸,转运肽区段同源性仅为 30%,但成熟区同源性高达 78.5%(图 4)。

Shen 等^[25]提出的菠菜 RCA 的二级结构(图 5),两者都含有两个保守的 ATP 连结序列 A 和 B 区。其中 A 区与其他 ATP 结合蛋白同源,B 区则被认为可能与 Mg-ATP 复合体中的 Mg²⁺ 互作。

RCA DNA 点突变表明,Lys-111 位点突变将导致突变体完全失去 RCA 和 ATPase 活性,而 A 区中其他氨基酸突变则会对 RCA 和 ATPase 活性造成不同的影响。如 Met 取代 Lys¹⁰⁷对 ATP 结合影响较小但改变了催化效率,而以 Ala、Arg 取代则产生不溶性多肽。令人感兴趣的是以 Glu¹⁰⁹取代 Gln¹⁰⁹位点的突变,在 41KD 多肽上表现为 RCA 活性上升而 ATPase

	10	20	30	40
S Rca	M A T A V S T V G A	A T R A P L N L N G	S S A G A S V P T S	G F L G S S L K K H
A Rca	- - A - - - - -	I N - - - S - - -	- - - P V - A - A -	T - - - - V V T V
B Rca	- - S - F - - - -	P A S T A T - - -	- - - - -	- - - K K - - - Q
R Rca	- - A - - - S T Y G	A - - - - P	A S T P T N F L G K	K Q V T S A V N Y H
	50	↓ 60	70	80
S Rca	T N V R F P S S S R	T T S M T V K A A E	N E K N T D K W A H	L A K D F S D D Q L
A Rca	S R F - Q S N K I -	S F K V L A V K E D	K Q T () - R - R -	- - - T - - - -
B Rca	V T S A V N Y H G K	S S K A N R () - -	I D - N T - R - K G	- - Y - I - - - D
R Rca	G G K S S N I N R F	K V M A K E L D E G	K Q T D Q - R - K G	- - Y - I - - - Q
	90	100	110	120
S Rca	D I R R G K G M V D	S L F Q A P A D A G	T H V P I Q S S F E	Y E S Q G L R K Y D
A Rca	- - - - -	- - - - M - T -	- - H - - - - -	- - - - - Q - N
B Rca	- - T - - - I - -	- - - - - T G H -	- - E A V L - - Y -	- V - - - - - -
R Rca	- - T - - - F - -	- - - - - T G D -	- - E A V L - - Y -	- L - - - - - T - -
	130	140	150	160
S Rca	I D N M L G D L Y I	A P A F M D K L V V	H I T K N F L N L P	N I K I P L I L G V
A Rca	L - - - - D - - -	- - - - - T - - -	- - - - - T - - -	- - - - - S - - -
B Rca	F - - T M - G F - -	- - - - - - - - -	- L S - - - M T - -	- - - - - I - - -
R Rca	- - T M - G F - -	- - S - - - - - -	- - S - - - M T - -	- V - - - - - I - -
	170	180	190	200
S Rca	<u>W G G K G Q G K S</u> F	Q C E K V F A K L G	I N P I M M S A G E	L E S G N A G E P A
A Rca	R - - - - - - -	- - - - - N - - -	- - - - - - - - -	- - - - - V R - -
B Rca	- - - - - - - -	- - - - - M - T -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
R Rca	- - - - - - - -	- - - L - - - M -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -
	210	220	230	240
S Rca	K L I R Q R Y R E A	A D L I A K G K M C	A L F I N D L E P G	A G R M G G T T Q Y
A Rca	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - D A - -	- - M - - - - - -
B Rca	- - - - - - - -	- - M - K - - - -	- - - - - D A - -	- - G - - - - - -
R Rca	- - - - - - - -	- - I - K - - - -	- - - - - D A - -	- - - - - - - - -
	250	260	270	280
S Rca	T V N N Q M V N A T	L L N I A D N P T N	V Q L P G M Y N K Q	D N A R V P I I V T
A Rca	- - - - - - - -	- M - - - A - - -	- - - - - E - - -	E - P - - - - C -
B Rca	- - - - - - - -	- M - - - A - - -	- - - - - R - - -	E - P - - - - V -
R Rca	- - - - - - - -	- M - - - - - - -	- - - - - E - - -	E - P - - - - - -
	290	300	310	320
S Rca	G N D F S T L Y A P	L I R D G R M E K F	Y W A P T R E D R I	G V C T G I F K T D
A Rca	- - - - - G - - -	- - - - - - - - -	L T G - - - - - -	- - - W - - - R -
B Rca	- - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - D - - -	- - - K - - - Q -
R Rca	- - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - D - V -	- - - - - K - - -
	330	340	350	360
S Rca	K V P A E H V V K L	V D A F P G Q S I D	F F G A L R A R V Y	D D E V R K W V N S
A Rca	- I K D - D I - T -	- - Q - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - F - E -
B Rca	N - C D - S - - K I	- - T - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - G - - -
R Rca	N - - D - D I - - I	- - S - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - S D - -
	370	380	390	400
S Rca	V G V D N V G K K L	V N S K D G P P V F	E Q P E M T L Q K L	M E Y G N M L V Q E
A Rca	L - - - - - - -	- - - E - - - - -	- - - - - V - - -	- - - - - N - - -
B Rca	T - I E - I - - R -	- - - R - - - V T -	- - - K - - V E -	L - - - - - - - -
R Rca	T - - E - I - - R -	- - - R E - - - E -	- - - K - - I E -	I - - - Y - - - K -
	410	420	430	440
S Rca	Q E N V K R V Q L A	D Q Y M S S A A L G	D A N K D A I D R G	T F F G K A A Q Q V
A Rca	- - - - - - - -	E - - L - - - - -	- - - A - - - G -	- - - - - G - - -
B Rca	- D - - - - - - -	- T - - - Q - - -	- - - Q - - M K T -	S - Y - - - - - G
R Rca	- - - - - - - -	E Q - L - E - - -	- - - S - - M K T -	- - Y - S A P S S
	450	460	470	
S Rca	S L P V A Q G C T D	P E A K N Y D P T A	R S D D G S C T Y N	L
A Rca	N - - - P E - - -	- V - E - F - - -	- - - - - T - V -	-
B Rca	- - - G T - - - -	Q N - - - Y - - -	- - - - - L - T	F
R Rca				

图4 菠菜(S Rca)、拟南芥(A Rca)、大麦(B Rca)和水稻(R Rca)中 Rubisco 活化酶的氨基酸序列比较
(虚线表示与菠菜具有类似氨基酸,括号内表示该植物特有区域;箭头指信号肽断裂位置,下划线是
ATP 结合区域)

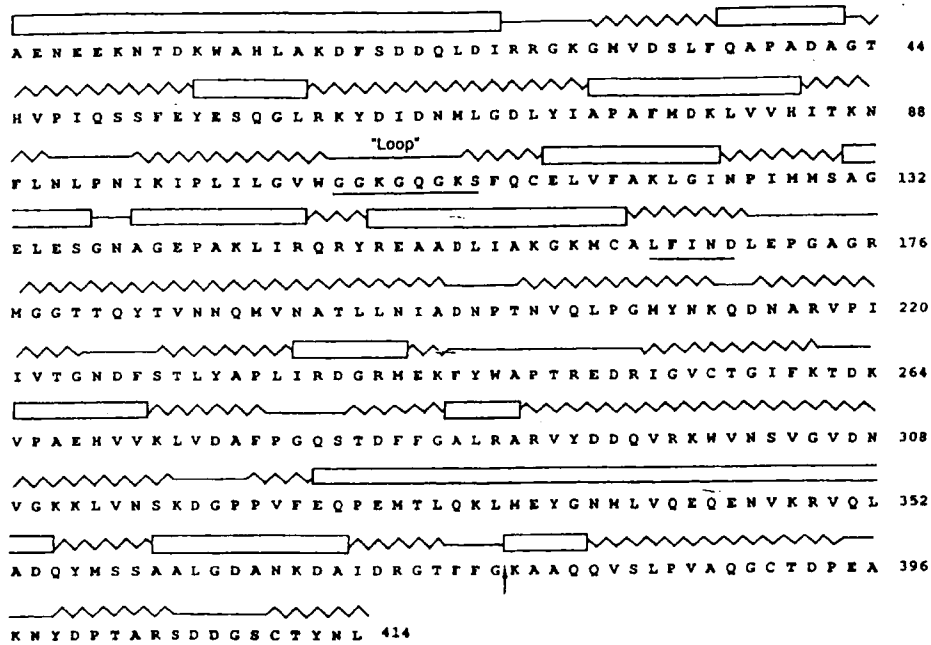


图5 菠菜 Rubisco 活化酶的二级结构

划线部位点 ATP 结合(105-112,105-169),□表示 α-螺旋, ~~~ 表示 β-折叠, —— 表示转折

活性下降,在 45kD 多肽上则突变体表现出与野生型相近的 RCA 活性,但 ATPase 活性下降,从而导致了 RCA/ATPase 活性比值上升。这意味着 RCA 和 ATPase 活性并非紧密偶联,以突变酶取代野生酶有可能改变植物光合效率。

表1 RCA 的 K¹⁰⁷、Q¹⁰⁹和 K²⁵⁶的突变对酶特性的影响

克 隆	分子量 kD	Rubisco 活力	ATP 酶活力	Rubisco/ATP
pPLEX1. 6-wt	41	1.43	0.72	2.0
pPLEX1. 6-M ¹⁰⁷	41	0.72	0.45	1.6
pPLEX1. 6-E ¹⁰⁹	41	3.33	0.65	5.1
pPLEX1. 6-A ¹⁰⁷	41	不溶性多肽	不溶性多肽	
pPLEX1. 6-R ¹⁰⁷	41	不溶性多肽	不溶性多肽	
pPLEX1. 6-K ¹⁰⁹	41	无酶活力	无酶活力	
pPLEX1. 9-wt	45	1.05	0.53	2.0
pPLEX1. 9-M ¹⁰⁷	45	0.36	0.31	1.2
pPLEX1. 9-E ¹⁰⁹	45	1.02	0.29	3.5
pPLEX1. 9-S ²⁵⁶	45	0.37	0.29	1.3