

植物 Rubisco 活性中心的模拟分析

熊晓然, 陈蔚梅*, 冯胜彦, 郭明雄, 艾建宇, 吴斌

(武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072)

摘要 通过对与不同配基结合的植物 Rubisco 复合物结构的重叠比较分析,发现 Rubisco 的活性差异是由其中一段 Loop6 环序列所造成的;金属离子与活性中心的结合会造成活性中心巨大的构象变化.进一步用 SwissPDBViewer 软件模拟不同配基的植物 Rubisco 活性中心与此 Loop 环的氢键相互作用.结果表明,有 3 个 Lys 残基 Lys201、Lys334、Lys175 与 Rubisco 是否处于活性状态密切相关,这些残基的结构变化对分子设计可能有重要的参考价值.

关键词 Rubisco,活性中心,模拟分析

中图分类号 Q55,Q33

Simulation on Botanic Rubisco Active Center

XIONG Xiao-ran, CHEN Wei-mei*, FENG Sheng-yan, GUO Ming-xiong, AI Jian-yu, WU Bin

(School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Through superposition of Rubisco combined with different ligands, it was found that loop6 in the C domain led to a difference between activated Rubisco and non-activated one and that the metal ion binding induced a large structural change in active center. The positional relation and hydrogen-bond interaction between the residues in active site and this loop region of Rubisco combined with different ligands were simulated through SwissPDBViewer. The results showed that three Lys residues—Lys201, Lys334 and Lys175, were related to the activity of Rubisco. The structural changes in these residues will give instruction to molecular design.

Key words Rubisco, active center, simulation

核酮糖 1,5 二磷酸羧化酶-加氧酶(ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco, EC4.1.1.39),催化光合作用中 CO₂ 固定过程(calvin)循环的第一步反应.即催化气态的 CO₂ 分子共价结合到底物 RuBP(核酮糖-1,5-二磷酸, ribulose 1,5-bisphosphate)上,导致气态 CO₂ 固定为 3-磷酸甘油酸(3-phosphate-D-glycerate, 3-PGA).同时,在 O₂ 存在的条件下,会发生一个竞争性的副反应,即 O₂ 与 RuBP 的结合^[1].因此, Rubisco 处于光合碳还原和光合碳氧化二个方向相反但又相互连锁的循环交叉点上,它对净光合率起着决定性的影响,是光合碳同化的关键酶.

Rubisco 广泛存在于高等植物及几乎所有的原核光合生物中.根据其一级和四级结构的不同,一般认为 Rubisco 分为两型:I型是高等植物和大部分原核光合生物的 Rubisco 蛋白,由 8 个大亚基(分子量为 56 kD)和 8 个小亚基(分子量为 14 kD)组成

(L₈S₈),呈四方对称; II型是紫色非硫光合细菌中的 Rubisco,只由两个大亚基组成(L₂).最近, Kitano 等在 *Thermococcus kodakaraensis* (TK) 中发现第 III型 Rubisco 蛋白,也只由大亚基构成,不含小亚基,呈(L₂)₅结构^[2].

III型 Rubisco 的氨基酸序列与 I型、II型 Rubisco 的序列同源性很低,分别只有 36%和 30%,I型和 II型之间也只有 28%同源.但是单体和二聚体的结构却很保守^[2]. Rubisco 起催化作用的大亚基包括两个功能域,N端区域(残基 1~137)由 5 个折叠组成,C端区域的中心结构模式则是包括 8 个平

收稿日期:2002-09-24,接受日期:2002-11-18

*联系人:Tel:(027)87682191,E-mail:syfung@whu.edu.cn

熊晓然,女,1977年10月生,硕士

Received:September 24,2002;Accepted:November 18,2002

* Corresponding author Tel::(027)87682191

E-mail:syfung@whu.edu.cn

行的折叠和 8 个螺旋构成的桶, 折叠和螺旋之间均由 Loop 环连接. 桶的核心除了两末端的折叠外, 都是疏水残基. 活性中心呈漏斗状, 它主要由这 8 个 Loop 环以及另一个亚基 N 结构域的 2 个环所提供的大量电荷和极性基团所组成, 并有金属离子参与^[3].

Rubisco 活性高低直接影响植物的净光合产量. 因此, 对 Rubisco 结构和功能的研究是高等植物基因工程的主要内容. Rubisco 还是分子伴侣研究中的常用模型底物. 无论是 I 型还是 II 型 Rubisco 在装配时都需要 GroE₇ 和 GroE₄ 的协助. 我们已经通过大肠杆菌分子伴侣 GroE 系统晶体结构数据分析了 GroE₇ 和 GroE₄ 的相互作用关系以及核酸结合口袋能量的传递^[4]. 本文试图在前人工作的基础上, 利用 Brookhaven 蛋白质数据库 PDB 提供的一组关于 Rubisco 与不同配基结合的晶体结构数据, 从 Rubisco 活性中心残基原子的氢键特征、溶剂可及性以及三维结构的变化等来描述不同配基对 Rubisco 特性的影响.

1 材料和方法

Brookhaven PDB 数据库一共给出了 24 个 Rubisco 晶体结构数据, 分属于以上提到的三种类型 Rubisco. 我们选取其中最具有代表性的结构^[2-8]进行了分析 (Table 1). 其中 2-CABP (2-carboxyarabinitol 1, 5-bisphosphate)、XuBP (xylulose 1, 5-bisphosphate) 是在反应过程中形成的中间类似物, 是 Rubisco 的潜在抑制剂. RuBP 是 Rubisco 的作用底物, 在反应中, Rubisco 必须处于活性状态才能催化底物 RuBP 的羧化和氧化反应.

Table 1 The source of materials and their PDB ID and structure character

Rubisco type	Source	PDB ID	Structure character
Spinach		1RBO ^[5]	Inhibitor 2-CABP
		1RCO ^[5]	Inhibitor XuBP
		1RCX ^[6]	Substrate RuBP
		1RXO ^[6]	Substrate RuBP, Ca ²⁺
R-rubrum		8RUC ^[7]	Mg ²⁺ , 2-CABP
		5RUB ^[3]	No ligands
		9RUB ^[8]	Mg ²⁺ , CO ₂ , substrate RuBP
Thermococcus Kodakarcinsis		1RBA ^[9]	Mutation Asp193→Asn193
		1GEH ^[2]	SO ₄ ²⁻

本文根据 PDB 提供的原子坐标数据, 对相关结构进行了重叠比较分析, 根据重叠比较的结果, 利用

SwissPDBViewer 软件^[10] (Swiss-PdbViewer 与位于瑞士生物信息研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) 的自动同源模拟服务器相连, 能进行蛋白质同源序列比较、蛋白质活性中心对比以及其它一些与蛋白质结构相关的比较, 其优点在于能同时进行多个蛋白分子的模拟分析) 对多种 Rubisco 活性中心的三维结构及氢键作用进行了模拟, 并在此基础上对活性中心残基的距离 (distance)、接触面积 (contact surface area)、溶剂可及表面 (solvent accessible surface, SAS) 等参数进行了分析.

2 结果

2.1 不同配基 Rubisco 的重叠分析

我们分别对以上多种结构进行了重叠分析. 其中 Fig. 1 (见 496 页彩版) 代表 II 型 Rubisco 1RBO (与抑制剂 2-CABP 结合, 无活性) 与 1RXO (与底物 RuBP、Ca²⁺ 结合, 有活性) C 端区域的重叠结果; Fig. 2 (见 496 页彩版) 代表 I 型 Rubisco 1RBO 与 8RUC (与抑制剂 2-CABP、Mg²⁺ 结合) C 端区域的重叠结果. 氨基酸残基位置均方根偏差 R. M. S. Deviation 随残基序号变化曲线图分别见 Fig. 3、Fig. 4.

从 Fig. 3 可以看到, 1RBO 和 1RXO 整体结构相似, 只有残基 332~338 发生了显著的变化. 这几个残基构成了 II 型 Rubisco C 端区域的环状结构 Loop6^[6]. 因此, 对于 Rubisco 而言, Loop6 环的变化与 Rubisco 是否处于活性状态密切相关. 而 Rubisco 必须处于活化状态才能催化底物 RuBP 的羧化和氧化反应.

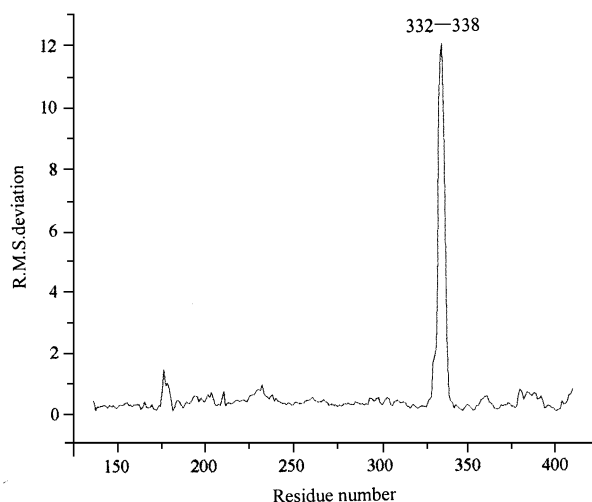


Fig. 3 R. M. S. deviation (Å) of corresponding backbone atoms used to compare the structures of the C-domain in 1RBO and 1RXO

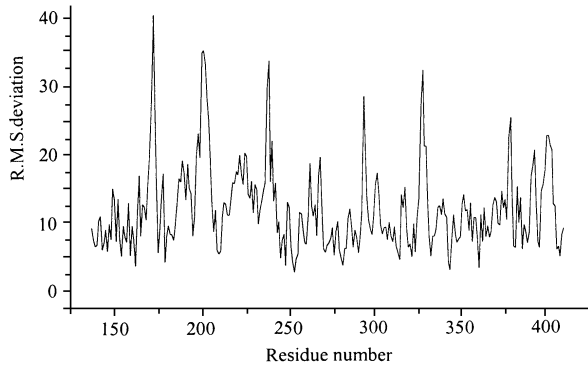


Fig. 4 R. M. S. deviation (\AA) of corresponding backbone atoms used to compare the structures of the C-domain in 1RBO and 8RUC
The unit of Y axis is 10^{-3} nm

型 Rubisco 1RBO 与 8RUC 都结合了抑制剂 2-CABP, 它们之间的差异在于是否有金属离子. 从 Fig. 4 可以发现, 其中变化较大的区域包括: 残基 171 ~ 174, 200 ~ 204, 238 ~ 239, 293 ~ 295, 327 ~ 330, 378 ~ 380, 401 ~ 405. 而我们通过 SwissPDBViewer 模拟得到的结果, 1RBO 与 8RUC 活性位点的残基包括 Thr173、Lys175、Lys177、Asp203、Glu204、His294、Arg295、Ala296、His298、His327、Gly329、Lys334、Leu335、Ser379、Gly380、Gly381、Ile382、Gln401、Phe402、Gly403、Gly404. 我们发现, 活性位点都位于或者接近变化较大的区域, 即 1RBO 与 8RUC 由于金属离子的差别, 虽然整体结构仍然类似, 但是活性中心却发生了很大的变化.

2.2 型 Rubisco 活性中心残基的氢键作用及突变分析

根据重叠比较的结果, 我们利用 SwissPDBviewer 对 型 Rubisco 活性中心以及上述提到的环状区域 Loop6 之间的氢键相互作用进行了模拟, 如 Fig. 5 ~ 8 所示. 结果表明: 位于 Loop6 上的残基 Lys334 与位于活性中心的残基 Lys201、Lys175 这 3 个 Lys 残基对 Rubisco 的活性状态起关键作用.

(1) 活性中心的 3 个甘氨酸 Gly404、Gly403、Gly381 在 5 种形式的 型 Rubisco 中的构象和氢键作用模式完全一致, 均与底物或抑制剂上的磷酸根形成氢键, 残基 His298 与残基 Arg295 形成的氢键作用在 5 种形式的 Rubisco 中也是一致的, 因此与 Rubisco 的活性状态无关.

(2) 残基 Lys201 在活性和非活性 Rubisco 中的形式是不一样的, 在活性状态下, 残基 Lys201 与 CO_2 结合, 成为氨基甲酰化合物 KCX201, 后者则与二价金属离子结合, 从而稳定这种氨基甲酰化合物的构

象. 而在非活性状态下, Lys201 则未与 CO_2 和金属离子结合, 因此 Lys201 是决定 Rubisco 活性的关键残基, 这与 Taylor 等人实验的结果是一致的^[6]. 另外, 从 Fig. 5 ~ 8 中我们可以看到, 残基 Lys201 的位置为了适应金属离子的结合也发生了明显的改变, 在 1RXO 和 8RUC 中的位置要明显低于其他几种形式的 Rubisco.

(3) 在活性状态和非活性状态的 Rubisco 中, 位于 Loop6 环上的残基 Lys334 的位置发生了显著变化. 在活性状态下, 构成 Loop6 的残基 332-338 形成如图 1 所示的 C 型结构, 残基 Lys334 的主链下垂 (如箭头所示), 远离活性中心. 而在非活性状态下, Lys334 主链显著提升, 直指活性中心, 并与残基 Gly380 以及底物或抑制剂的磷酸根形成氢键, 残基 332-338 亦变成反 C 型, 靠近活性中心残基, 封闭了活性位点.

我们用软件 SwissPDBViewer 对 Lys334 残基进行了突变分析. 当用与 Lys 构象类似且同为碱性氨基酸的残基 Arg 替代 Lys 时, 在非活性状态的 Rubisco 中, Arg 末端的氨基并未深入到活性中心内部与底物或抑制剂形成氢键, 造成活性中心的这种闭锁状态, 甚至还朝外倾斜远离活性中心. 即残基 Lys334 与 Rubisco 是否处于活性状态密切相关.

(4) 活性中心残基 Lys175 在活性状态下, 氨基酸主链呈折叠状态, 其尾部的氨基与底物 C_2 上的氧形成氢键; 而在非活性状态下, Lys175 的整个主链则是完全伸展的, 且下垂与残基 Asp203 的羧基形成氢键作用. Rubisco 催化底物与 CO_2 反应生成 3-磷酸甘油酸时, 正是从 C_2 处断裂, 形成 2 分子的 3-磷酸甘油酸.

(5) 在活性状态下未参与氢键作用的残基 His327、Ser379、Asp203、Lys177 在非活性状态下均与底物或抑制剂的主链碳原子、氧原子或磷酸根形成了氢键, 尤其是残基 Lys177 与多个残基形成了氢键网络, 猜测这些增强的氢键作用与残基 332 ~ 338 从 C 型到反 C 型的转变有关.

2.3 型 Rubisco 活性中心残基的溶剂可及性等相关参数的分析

型 Rubisco 中, 1RCX 与 1RXO 仅有金属离子存在差异, 正是此差异造成了这两种 Rubisco 活性的差异. 我们比较了这两种结构底物的溶剂可及性的大小, 前者为 2.0\AA^2 , 后者为 94.0\AA^2 , 存在非常显著的差别, 这与以上模拟的结果类似. 因为在 1RCX 中, 活性位点被 Loop 环遮掩, 处于“closed”态, 所以

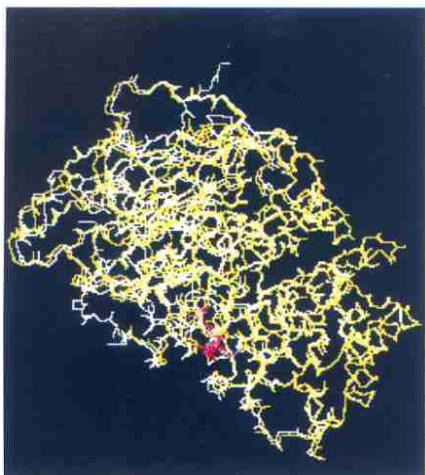


Fig. 1 Comparison of the C-domain in 1RBO and 1RXO
The atoms of 1RBO are in White and 1RXO are in Yellow. Superposition of the structures was carried out using the backbone atoms

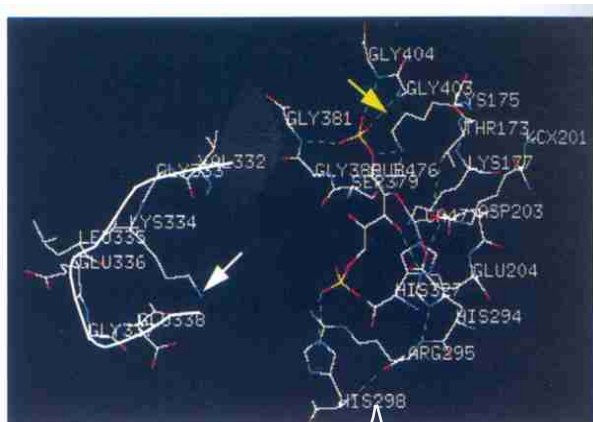


Fig. 5 The relation of the active site and Loop6 in 1RXO

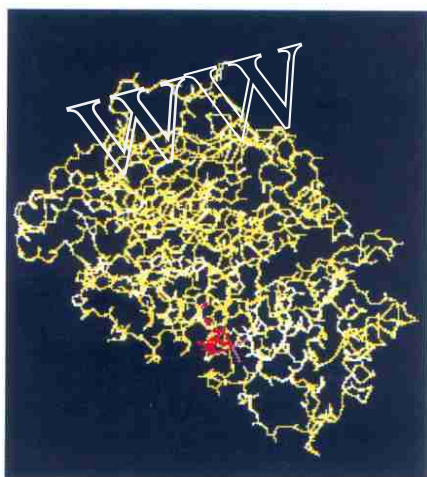


Fig. 2 Comparison of the C-domain in 1RBO and 8RUC
The atoms of 1RBO are in White and 8RUC are in Yellow. Superposition of the structures was carried out using the backbone atoms



Fig. 6 The relation of the active site and Loop6 in 8RUC

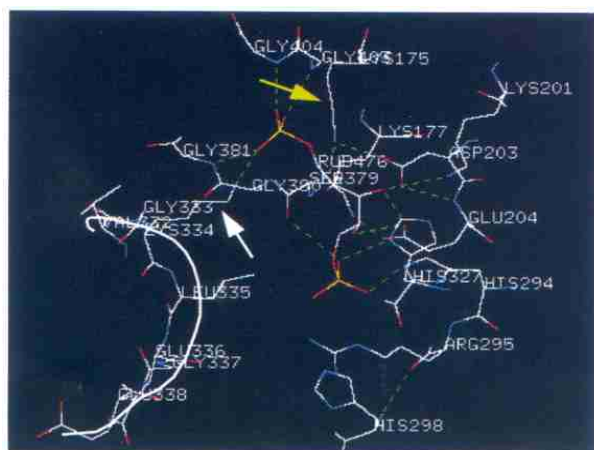


Fig. 7 The relation of the active site and Loop6 in 1RCX

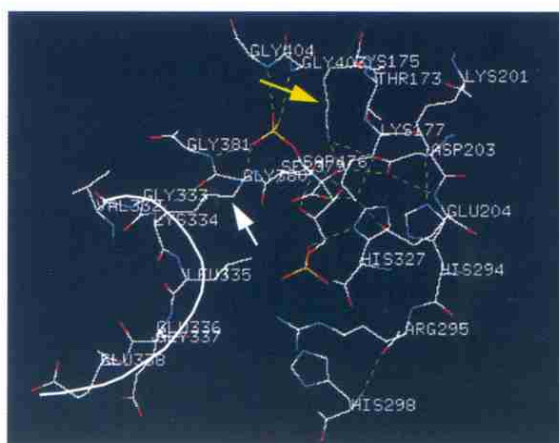


Fig. 8 The relation of the active site and Loop6 in 1RBO

位于活性中心的底物溶剂可及性很小.而在 1RXO 中,因为 Loop 环处于开放状态,对于外界来说是可及的,所以底物的溶剂可及性远大于前者.在另一有活性的 Rubisco 9RUB 中,底物处于开放状态,其溶剂可及性为 85.5 \AA^2 ,而在关闭状态的 1RCO 和 1RCX 中,其底物溶剂可及性分别为 2.1 \AA^2 、 2.0 \AA^2 .另外,金属离子在活性位点中都是完全被掩埋的,溶剂可及性均由 105.7 \AA^2 变为 0.

我们比较了 1RCX 与 1RXO 底物与活性中心各

残基之间的距离(底物的原子与残基的最短距离)、接触表面积和溶剂可及表面积(Table 2).从表中可以看出:1.从底物距活性中心各残基的距离来看,没有明显差异;2.从接触表面积来看,1RCX 的总接触面积要略大于 1RXO 的总接触面积,说明在无活性的酶中,酶与底物的结合要更紧密一些;3.从溶剂可及表面积来看,1RCX 的溶剂可及表面积要明显小于 1RXO 的溶剂可及性,这也说明前者被 Loop 环所遮掩,而后者呈开放状态.

Table 2 Distance, contact surface area and solvent accessible surface area between the substrate and active site in 1RCX and 1RXO

Residues in active site	1RCX distance (\AA)	1RCX contact surface area (\AA^2)	1RCX accessible surface area (\AA^2)	Residues in active site	1RXO distance (\AA)	1RXO contact surface area (\AA^2)	1RXO accessible surface area (\AA^2)
Thr173	3.4	16.4	0	Thr173	4.3	4.6	0
Lys175	3.2	31.2	0.4	Lys175	3.1	37.4	61.9
Lys177	4.3	4.2	1.8	Lys177	5.4	0.2	67.2
Lys201	3.2	17.2	0	Lys201	2.5	30.1	-
Gu204	2.8	19.6	0.3	Gu204	3.5	1.2	29.1
His294	3.2	30.1	0	His294	3.1	19.3	4.0
Arg295	3.2	35.9	6.5	Arg295	2.8	50.8	16.6
His298	4.0	8.0	18.7	His298	3.0	25.1	24.7
His327	2.6	64.7	0	His327	3.8	21.1	0
Gly329	4.3	10.9	3.8	Gly329	3.9	12.6	5.6
Ser379	3.3	45.6	1	Ser379	3.4	29.6	2.9
Ser380	4.0	12.8	0.4	Ser380	3.5	18.8	27.1
Gly381	3.0	20.6	0	Gly381	2.8	31.9	57.3
Ile382	5.2	1.6	0	Ile382	5.3	2.6	2.3
Gln401	4.2	5.2	0.4	Gln401	4.0	10.2	0
Phe402	4.0	1.2	0	Phe402	3.8	0.9	0
Gly403	2.9	22.9	0.4	Gly403	2.7	26.0	0
Gly404	2.7	26.9	0	Gly404	2.7	28.8	31.2
Gly405	4.8	0.2	0.5	Gly405	1.0	1.0	5.7

2.4 型 Rubisco 活性位点溶剂可及性分析

型 Rubisco 由两个大亚基构成,对于型 Rubisco 中有活性的 9RUB 和无活性的 5RUB 而言,我们在 Fig. 9 中比较了其活性位点残基的溶剂可及性.这些残基分别是位于一个亚基上的残基 Ile164、Lys166、Lys168、Lys191、Asp193、Gu194、His287、Arg288、His291、His321、Gly323、Thr324、Ile366、Ser368、Gly369、Thr391、Ala392、Gly393 和位于另一个亚基上的残基 Gu48、Asn111.

比较的结果,我们发现与前面 I 型 Rubisco 所不同的是,没有活性的 Rubisco 5RUB 活性位点的可及

性反而要大于有活性的 9RUB.即在型 Rubisco 中,Loop6 并没有像预想的那样掩盖住没有活性的酶的活性位点.这个结论与 Lundqvist 是一致的,他认为 5RUB 之所以处于非活性状态,是因为在 5RUB 中,Loop6 环远离了活性位点与晶体中其他相邻的分子形成了相互作用,而 Loop6 环恰恰包含了对催化活性起关键作用的保守残基 Lys329^[8].

3 讨论

从以上分析我们可以看到:(1) Rubisco 是否处于活性状态与活性中心及 Loop6 环的 3 个 Lys 残基

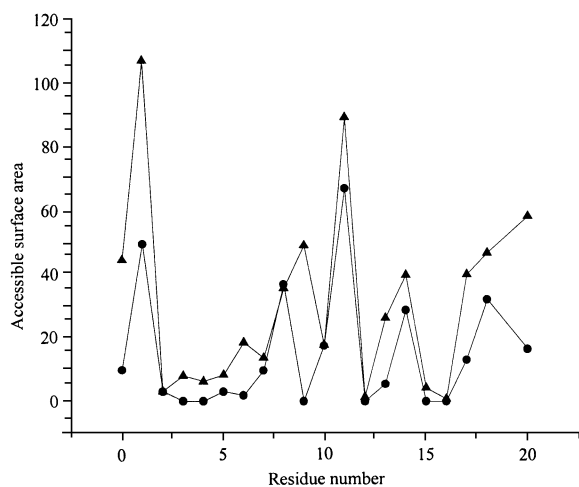


Fig. 9 Comparison of the solvent accessible surface area (\AA^2) between 5RUB and 9RUB
—5RUB; - -9RUB

密切相关,由于 Lys334 的主链上升,与活性中心的残基形成氢键相互作用,使得活性中心处于闭锁状态,Rubisco 无活性。(2)金属离子与活性中心结合之后会造成活性中心巨大的构象改变。(3)从溶剂可及性的角度,我们证实了型、型 Rubisco 的活性位点与 Loop 环的关系是完全不同的,前者因为 Loop 环的靠近使活性中心闭锁从而失去活性,而后者则是因为对催化活性起关键作用残基的 Loop 环的远离而失去活性。

我们曾对 ConA 与糖的结合模式进行过分析^[11]。结果表明,ConA 的“Locked”态和“Unlocked”态与活性中心的一个残基 Arg228 有关,在 Unlocked 态的 ConA 中,Arg228 的侧链堵住了疏水活性位点的入口而使其失去结合糖的能力。本文对 Rubisco 活性中心的模拟以及对其活性机制的分析得到了类似的结果,活性中心这些关键残基的结构变化对分子设计可能有重要的参考价值。

参考文献 (References)

1 Curmi P M G, Cascio D, Sweet R M, Eisenberg D, Schreuder H.

- Crystal structure of the unactivated form of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tobacco refined at 2.0 \AA resolution. *J Biol Chem*, 1992, **267**(24): 16980 ~ 16989
- 2 Kitano K, Maeda N, Fukui T, Atomi H, Imanaka T, Miki K. Crystal structure of a novel-type archaeal Rubisco with pentagonal symmetry. *Structure*, 2001, **9**:473 ~ 481
- 3 Schneider G, Lindqvist Y. Crystallographic refinement and structure of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum* at 1.7 \AA resolution? *J Mol Biol*, 1990, **211**:989 ~ 1007
- 4 熊晓然,艾建宇,吴显辉,冯胜彦,陈蔚梅,郭明雄,吴斌. 分子伴侣 GroE 系统相互作用中结构与功能关系研究. 武汉大学学报(理学版) (Xiong Xiao-ran, Ai Jiann-yu, Wu Xian-hui, Feng Sheng-yan, Chen Wei-mei, Guo Ming-xiong, Wu Bin. Research on the relation of structure and function of molecular chaperone Gro E. *J Wuhan Univ (Nat Sci ed)*, 2002, **48**(6): 741 ~ 746
- 5 Taylor T C, Fothergill M D, Andersson I. A common structural basis for the inhibition of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase by 4-carboxyarabinitol 1, 5-bisphosphate and xylulose-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1996, **271**(51): 32894 ~ 32899
- 6 Taylor T C, Andersson I. The structure of the complex between Rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J Mol Biol*, 1997, **265**:432 ~ 444
- 7 Andersson I. Large structures at high resolution: the 1.6 \AA crystal structure of spinach ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol biphosphate. *J Mol Biol*, 1996, **259**:160 ~ 174
- 8 Lundqvist T, Schneider 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
- 9 Soderlind E, Schneider G, Gutteridge S. Substitution of ASP193 to ASN at the active site of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase results in conformational changes. *Eur J Biochem*, 1992, **206**:729 ~ 735
- 10 Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, **18**(15): 2714 ~ 2723
- 11 吴显辉,郭明雄,冯胜彦,陈蔚梅,艾建宇,吴斌,熊晓然. 伴刀豆球蛋白 A-糖复合物的模拟分析. 武汉植物研究 (Wu Xian-hui, Guo Ming-xiong, Feng Sheng-yan, Chen Wei-mei, Ai Jiann-yu, Wu Bin, Xiong Xiao-ran. Simulation analysis of concanavalin A-carbohydrate complexes. *J Wuhan Botan Res*, 2003, **21**(1): 66 ~ 72