

C₄ 光合作用关键酶 PEPC 的反应机制

赵艳 陈丽梅*, 李昆志 (昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南昆明650224)

摘要 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 在 C₄ 和 CAM 植物的光合作用中起着非常重要的作用。综述了该酶的催化反应机制及其调控方面的研究进展。

关键词 光合作用; PEPC; 空间结构; 大肠杆菌; 玉米; 天冬氨酸

中图分类号 Q945.11 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2006) 23 - 6113 - 02

Molecular Catalytic Mechanism of Major Enzyme Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C₄ Photosynthesis

ZHAO Yan et al (Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) plays important roles in the photosynthesis of C₄ and Grassulacean acid metabolism (CAM) plants. Recently, remarkable research advances in this enzyme have been accomplished. In this review the research progresses in PEPC were described.

Key words Photosynthesis; Three-dimensional structure; E. coli; Corn; Aspartate

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶是一类裂解酶, 简称 PEPC 或 PEPCase。该酶广泛存在于高等植物、藻类、光合细菌、蓝细菌以及大多数非光合细菌中。早在 1953 年, Bandurski 和 Greiner 就利用菠菜叶中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶将 CO₂ 和磷酸烯醇式丙酮酸合成草酰乙酸。此后, 从小麦种子、自养的硫杆菌、花生胚芽和大肠杆菌中分离得到磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。但在酵母、真菌和动物中却缺少这种酶^[1]。

通过特有的光合途径, C₄ 植物将 CO₂ 固定为四碳的中间产物, 如草酰乙酸 (OAA)。这个反应的关键步骤是磷酸烯醇式丙酮酸在 Mn²⁺ 或 Mg²⁺ 存在的情况下, 羧化为草酰乙酸, 然后草酰乙酸再转化为苹果酸, 同时释放出 CO₂ 和丙酮酸, 丙酮酸再转化为磷酸烯醇式丙酮酸。这个反应是在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的作用下完成的, 在 C₄ 光合途径的所有酶中, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶是最重要的酶之一。因此, PEPC 历来都是科学家研究的热点^[2,3]。最近, 利用 X 衍射和点突变的方法, 对大肠杆菌和玉米 PEPC 的空间结构进行了详细研究^[4,5], 该研究结果使酶活性反应调节的分子机制得以完善。

1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的反应机制

所有已知的 PEPC 均是四聚体, 4 个相同亚基的分子量为 95 ~ 110 kDa。1984 年, 通过对大肠杆菌 *ppc* 基因的克隆, PEPC 的 1 级结构首次被报道^[2]。目前已公布了 50 ~ 60 条植物和细菌的 PEPC 全序列, 包括同一有机体的不同单体, 同时还有 500 多条不完全序列。虽然有大量不同来源的 PEPC, 但除了 N 端有调节磷酸化的基团外, 来源于不同生物的 PEPC 其反应机制本质上是相同的^[5]。

经动力学分析可把 PEPC 催化的反应剖析成几个微型可逆的步骤, “三步反应机制”目前是最合理的^[2,3]。PEPC 催化一个按顺序进行的反应, 它偏爱的反应物顺序依次是二价阳离子、PEP、HCO₃⁻ [6]。Mn²⁺ 或 Mg²⁺ 是 PEP 及其烯醇化物和酶的活性位点相连接的媒介。与丙酮酸激酶 (PK) 和丙酮酸磷酸激酶 (PPDK) 一样, PEPC 有 1 个 PEP 结合区^[7]。根据大肠杆菌

PEPC 复合物和玉米 PEPC 的三维结构, 综合各方面的试验结果提出 PEPC 的羧化反应分子机制^[5] (图 1)。

PEPC 羧化反应的第一步, 是 PEP 结合到已经带有二价阳离子的酶上, 同时通过碳酸氢盐的亲核攻击使 HCO₃⁻ 与 PEP 的磷酸基团结合形成羧基磷酸和丙酮酸的烯醇化物。为了减少磷原子的负电性, 在底物接近的过程中, Arg396、Arg699 和 Arg713 形成的带正电的口袋可驱散磷酸基团所带的负电荷, 从而使 HCO₃⁻ 更容易结合到 PEP 的磷酸基团上^[8]。此时 HCO₃⁻ 上的羧基离丙酮酸烯醇化物的碳原子还比较远, 因此酶的构象必须发生变化, 才能使两者更近。实现这一目的最有效的办法就是 HCO₃⁻ 的羧基去质子化, His177 正好执行了这一功能^[9]。第二步, 伴随丙酮酸烯醇化物的亲核攻击, HCO₃⁻ 被分解产生与酶结合的 CO₂, 同时 PEP 的磷酸基团被分解为无机磷酸。CO₂ 与结合在金属阳离子上的烯醇化物的第 3 碳原子反应生成 OAA^[2]。第三步, 烯醇化物的羧化发生在 Trp248, Leu504 和 Met538 等疏水性残基构成的疏水区口袋中, 这个口袋的疏水性环境可以稳定从羧基磷酸释放的 CO₂^[5]。在反应机制的第三步中, CO₂ 必须转移到烯醇化物的 C₃ 上以便进行亲核攻击, 这需要 CO₂ 的移动^[2,5], His177 和 Arg647 周围的空洞使这种移动成为可能, 这表明 Arg647 直接参与了反应的第二步和第三步^[5]。

2 PEPC 催化反应的调控机制

PEPC 单体存在 2 种构象: R 构象和 T 构象, 大多数 PEPC 都是变构酶。一般而言, 酶的变构规律就是 T 构象和 R 构象上的一些结构的位移。构象变化受很多催化剂和抑制剂的调节, 这些催化剂和抑制剂是物种特异性的^[1,2]。衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的 PEPC 能够被 Gu 和磷酸二羟丙酮激活, 而被 Gu 抑制^[10]。高等植物的 PEPC 被 6-磷酸葡萄糖激活, 被苹果酸^[11-13]、天冬氨酸^[11,13]、丙酮酸^[11] 和草酰乙酸^[12] 抑制。

当不存在底物和催化剂时, PEPC 以 T 构象二聚体 (T₂) 或四聚体 (T₄) 的形式存在, T 构象二聚体和四聚体之间存在浓度依赖的构象变化, 该变化是这个酶促反应的限速步骤。T₄ 与杂合四聚体 (R₁T₃) 也存在浓度依赖的构象变化, R₁T₃ 中的 R 亚基可以结合底物和催化剂。当一个底物分子结合到 R 亚基上以后, 就发生了如图 2 所示的反应。强的配合基能够延缓从 R 构象转变为 T 构象, 因此增加了 T₄。随着酶促反应的不断发生, 以及底物的增加, T₄ 最终转变为高活性的快速反应状态

基金项目 云南省自然科学基金资助项目 (2004C0006R); 云南省中青年学术与技术带头人培养基金和昆明理工大学人才培养基金联合资助项目。

作者简介 赵艳 (1982 -), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 研究方向: 遗传育种及基因工程。* 通讯作者, 教授。

收稿日期 2006-09-07

(*T₄), *T₄ 能够十分缓慢地变为 T₄, 最终分解为 T₂。当底物消耗完以后, *T₄ 的活性可能继续存在, 添加新的底物可以

继续反应; 或者完全没有了活性, 因为无催化剂的底物饱和曲线是 S 型的。

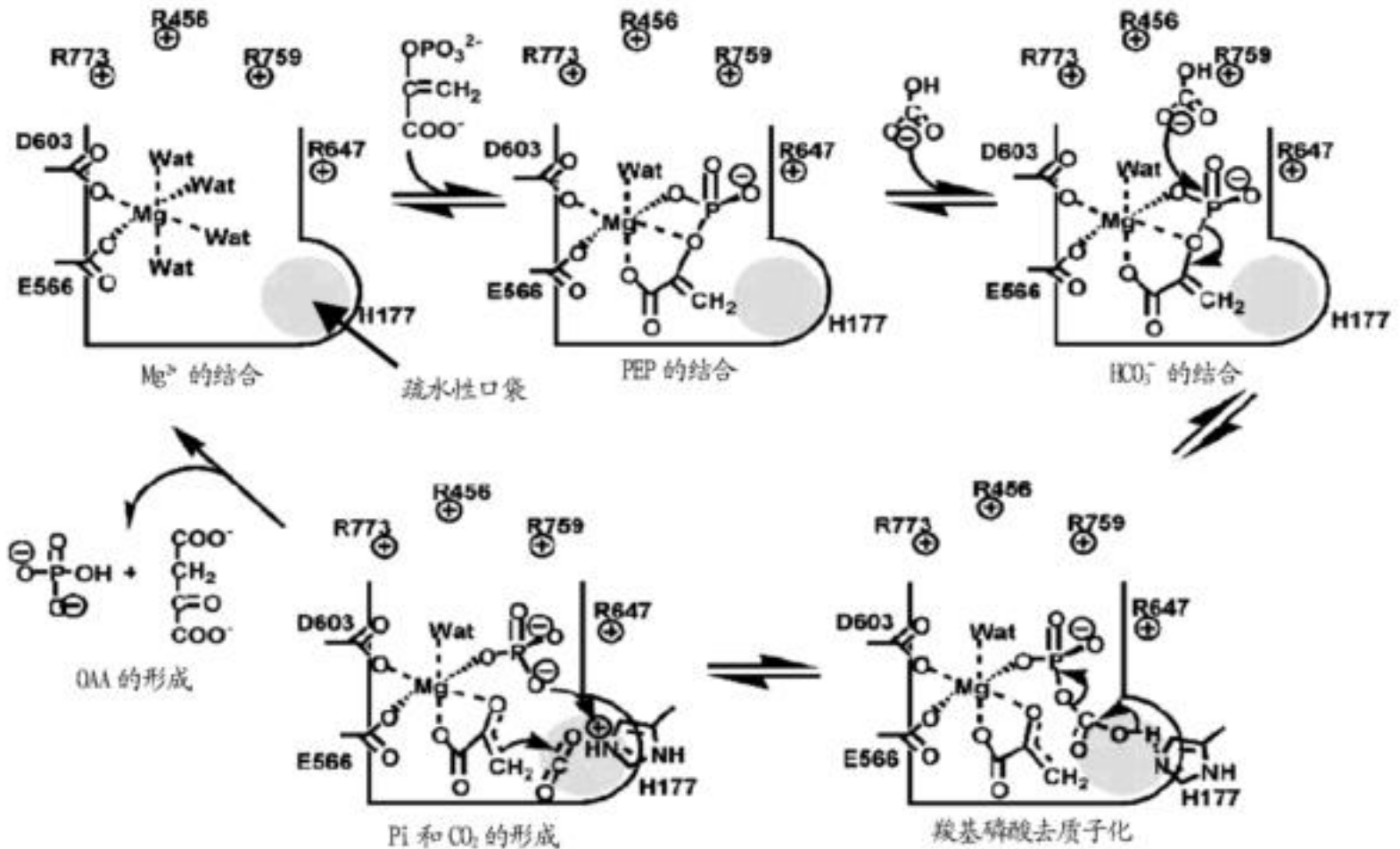


图1 PEPC 的羧化反应机制^[9]

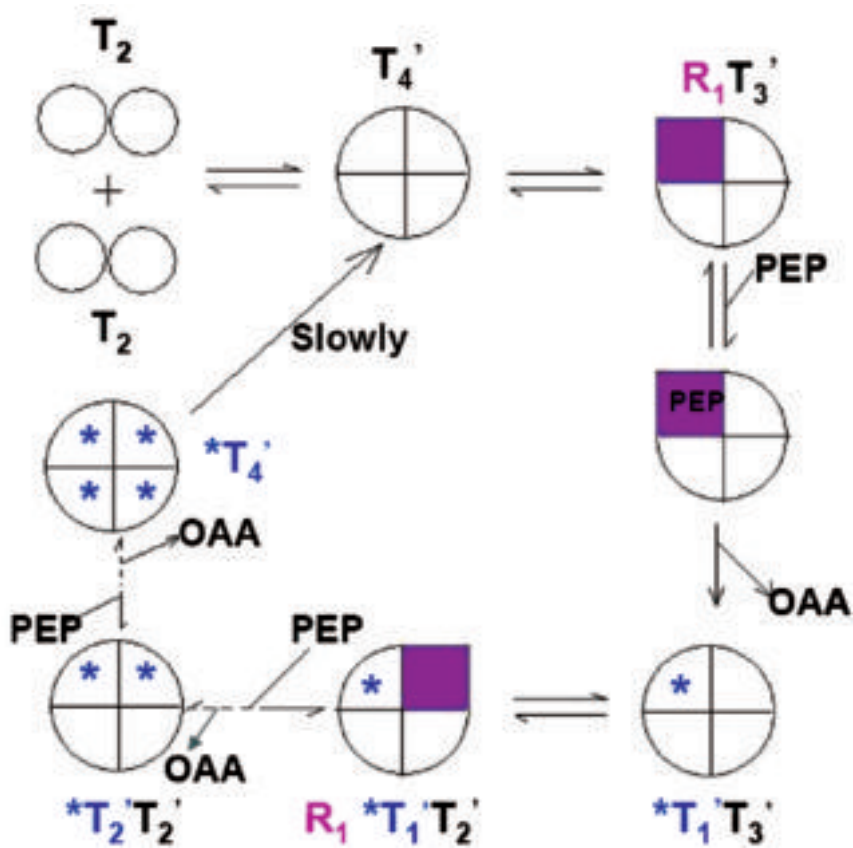


图2 PEPC 催化反应的变构调控机制^[14]

绝大多数PEPC 服从构象变化规律, 但是细菌、藻类和高等植物的代谢调节是多种多样的。此外, 维管植物PEPC 的构象还受N端保守的丝氨酸的磷酸化作用影响^[5]。

3 天冬氨酸的变构抑制机制

L-天冬氨酸几乎是所有PEPC 催化活性的变构抑制剂^[1], 在PEPC 中4个完全保守的氨基酸 Arg647、Lys835、Arg894 和 Asn968 直接参与天冬氨酸的结合^[3,4]。PEPC 的活性部位可能是 GRGGXXGR894GG 支撑的 Arg 894 长弹性臂拉开的区域^[4], Arg 894 被 Ser 替换导致PEPC 催化形成 OAA 的活性全部丧失^[5]。精氨酸 Arg-894 可以为抑制效应物分子所捕获, L-天冬氨酸与催化作用必须的 Arg 894 形成盐桥, 从而抑制PEPC 催化活性。

4 展望

自20世纪60年代以来, 人们一直试图利用 C₄ 光合特

性来改进 C₃ 植物的光合效率。传统的杂交育种手段至今尚未取得令人满意的结果, 其杂种 F₁ 和 F₂ 代的光合效率均比任何一个亲本都低。生物技术的发展为利用基因工程手段培育高光效作物提供了一条行之有效的途径^[16]。近来, 利用植物基因工程技术已将多个编码 C₄ 酶的基因引入不同的 C₃ 植物中, 产生出多种“C₄ 转基因的 C₃ 植物”。将 C₄ 植物的光合基因导入 C₃ 植物以增大 C₃ 植物光合能力的研究已初步证明具有可能性^[17]。但多数还未成功地把在 C₃ 植物内的 C₄ 光合酶的活性提高到与 C₄ 植物同样的水平, 只是把在 C₄ 光合酶(大多是玉米)的 cDNA 连接在 C₃ 植物叶肉细胞能高表达的启动子(CaM35S 启动子、Cab 启动子等)的融合基因导入 C₃ 植物。

近20年来, 引起人们关注较多的 C₄ 途径关键酶首先是磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。PEPC 存在于所有能进行光合作用的有机体中, 包括高等植物、绿藻、蓝细菌和光合细菌。PEPC 的最新进展已经到了一个结构生物学的时代。从它的三维结构可知, 大多数重要残基定位的数据在分子上已被证明, 同时也提出了它们的功能。其次, 其他残基的酶学功能和变构调控也已阐明。这些突破性进展必将带来植物高光效基因工程育种的巨大变化, 为人类亟待解决的粮食危机提供契机。

参考文献

- [1] O'LEARY M H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 297 - 315.
- [2] CHOLLET R, VIDAL J, O'LEARY M H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 273 - 298.
- [3] IZU K, MAISUMURA H, FURUMOTO T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a rework of structural biology [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 69 - 84.
- [4] KAI Y, MAISUMURA H, INOUE T, et al. Three-dimensional structure of ph

(下转第6118页)

(上接第6114 页)

osphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 823 - 828.

[5] MAISUMURA H, XIE Y, SHRAKATA S, et al. Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of E. coli phosphoenolpyruvate carboxylases [J]. Structure, 2002, 10: 1721 - 1730.

[6] JANCI W, O'LEARY MH, CLELAND WW. A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Zea mays [J]. J Biochem, 1992, 31: 6421 - 6426.

[7] IZU K, MAISUDA Y, KAMESHITA I, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase of Escherichia coli. Inhibition by various analogs and homologs of phosphoenolpyruvate [J]. J Bio Chem (Tokyo), 1983, 94: 1789 - 1795.

[8] WESTHEIMER F H. Why nature chose phosphates [J]. Science, 1987, 235: 1173 - 1178.

[9] TERADA K, IZU K. Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase. His138 is essential for the second partial reaction [J]. Eur J Biochem, 1991, 202: 797 - 803.

[10] RIVOAL J, FLAXTON WC, TURHIND H. Characterization of high and low molecular-mass isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase from Chlamydomonas reinhardtii: kinetic, structural and immunological evidence suggest

that the green algal enzyme is distinct from the prokaryotic and higher plant enzyme [J]. Biochem Journal, 1998, 331: 201 - 209.

[11] MARES J, BARTHOVA J, LEBLOVA S. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from green leaves of maize [J]. Collect Czech Chem Commun, 1979, 44: 1835 - 1840.

[12] WALKER G H, EDWARDS G E. Tautomerization of oxaloacetate and inhibition of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. Phytochemistry, 1991, 30: 751 - 756.

[13] TOVAR-MENDEZ A, MUJICA-JIMENEZ C, MUNOZ-CLARES R A. Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. Plant Physiol, 2000, 123: 149 - 160.

[14] WOHL R C, MARKUS G. Phosphoenolpyruvate carboxylase of Escherichia coli purification and some properties [J]. J Bio Chem, 1972, 247: 5785 - 5792.

[15] YANO M, TERADA K, UMLI K, et al. Catalytic role of an arginine residue in the highly conserved and unique sequence of phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. J Bio Chem (Tokyo), 1995, 117: 1196 - 1200.

[16] 李卫华, 郝乃斌, 戈巧英, 等. C₃ 植物中 C₄ 途径的研究进展 [J]. 植物学通报, 1999, 16(2): 97 - 106.

[17] 侯爱菊, 徐德昌. 植物高光效基因工程育种 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(9): 19 - 23.