

# 植物乙醇酸氧化酶研究进展

王炜军 彭新湘 李明启

(华南农业大学生物技术学院, 广州, 510642)

**摘要** 乙醇酸氧化酶是植物光呼吸代谢的关键酶,近年有关该酶的分子结构、酶蛋白翻译后的转运与组装和该酶基因的表达与调控的研究取得了一些进展,该文将就这些方面作综述.

**关键词** 乙醇酸氧化酶;植物;研究进展

**中图分类号** Q 945.11

光合作用与人类生存和农业生产有着极其密切的关系,  $C_3$  植物由于同时进行光呼吸,使净光合速率降低了 25% ~ 50%,因此研究光呼吸代谢过程及其调控有重要意义.乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase, EC 1.3.1.1, 以下简称 GO)作为光呼吸代谢中的关键酶,人们对它已作了大量的研究,李明启(1988)对其作了详尽的综述,在此将对植物乙醇酸氧化酶研究的一些最新进展及存在问题作简要的概述.

## 1 乙醇酸氧化酶的分子结构

### 1.1 GO 的一级结构及活性中心的氨基酸组成

Volokita 等(1987)从菠菜中克隆了 GO 的 cDNA,其可译框架为 1 107 bp,共编码 369 个氨基酸残基,分子组成为 40 282,富含碱性氨基酸,这解释了该酶等电点较高的原因. Cederlund 等(1988)直接测定了菠菜 GO 肽链的氨基酸顺序,共为 369 个氨基酸残基,与 Volokita 等的结果完全一致,其中 C-端 3 个氨基酸残基为 A-R-L,与 flavocytochrome  $b_2$  相比,在氨基酸序列上具有 33% 的同源性;Ludt 等(1990)从兵豆(*Lens culinaris*)叶片中克隆了 GO cDNA,根据其核苷酸序列反推得了氨基酸序列,共 371 个氨基酸残基,分子组成为 40 833,与菠菜 GO 有极高的同源性,其 C-端氨基酸残基为:P-R-A-L-P-R-L;Tsugeki 等(1993)克隆到了南瓜子叶 GO 的 cDNA,共编码 367 个氨基酸,分子组成为 40 353,其中 C-端的 3 个氨基酸为 P-R-L.可见上述 3 种来源 GO 的 C-端氨基酸序列 3 个氨基酸残基中有 2 个是相同的,但均不同于过氧化物酶体中另一些蛋白的常见 C-端特征序列:S-K-L,而此序列是一个已被确认的能将蛋白定位于过氧化物酶体中的特征信号序列(Olsen et al, 1995).

对于 GO 的活性中心氨基酸组成亦有不少的研究. Choi 等(1988)发现精氨酸是兔肝 GO 催化活性的必需氨基酸,并可能在酶与底物的结合上起作用.彭新湘等(1989, 1990a, 1990b, 1991)以菜心结晶 GO 为材料,研究了其活性中心的氨基酸组成,发现 Y、H、K、R 为 GO 催化活性所必需. Lindqvist 等(1989)通过对菠菜 GO 的结晶学分析,认为 R-257、Y-24 和 Y-129 在底物的结合上起作用, H-254 与电荷的传递有关,而 K-230 则与 FMN 异咯嗪环上的 N(1)和 O(2)相

1998-10-26 收稿 王炜军,男,28岁,讲师,博士

\* 国家自然科学基金(39570070)资助项目

互作用. Macheroux 等(1993)运用蛋白质工程的手段将菠菜 GO 的 Y-129 点突变为 F, 而后研究突变酶的动力学特性, 结果表明: Y-129 上酚羟基的主要功能是稳定催化反应的过渡态. Stenberg 等(1995)用同样的手段分别将菠菜 GO 的 Y-24 点突变为 F, W-108 点突变为 S 来研究这 2 个氨基酸残基的功能, 结果表明: Y-24 更多的是参与底物的结合, 而 W-108 则在催化中起着重要作用, 并参与决定 GO 的底物专一性.

## 1.2 GO 的二级、三级结构

Lindqvist 等(1979, 1980, 1985, 1989)、Lindqvist(1989)和 Lindqvist 等(1991)用 X-射线衍射法对菠菜 GO 的晶体结构进行了一系列的研究. 发现共 369 个氨基酸残基的菠菜 GO 肽链卷曲形成了: 14 股  $\alpha$ -螺旋、8 个  $\beta$ -折叠片、8 个  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠片之间的连接环(loop)、1 个  $\beta$ -发夹环( $\beta$ -hairpin loop)、5 个  $3_{10}$ -螺旋( $\gamma$ -螺旋)等二级结构单元. 其中由 8 股  $\alpha$ -螺旋、8 个  $\beta$ -折叠片及它们间的连接环所组成的  $\alpha/\beta$  桶是 GO 亚基的主要特征结构, 与磷酸丙糖异构酶相似. 在  $\alpha/\beta$  桶结构中, 由疏水残基组成(末端除外)的  $\beta$ -折叠片形成了亚基的内核, 而紧挨并包围着内核的则是 8 股  $\alpha$ -螺旋, 它们暴露于溶剂中( $\alpha$ -螺旋 F 例外); 桶中的连接环可分为 2 类, 第 1 类是从  $\alpha$ -螺旋走向  $\beta$ -折叠片, 这些环由 3~6 个(平均 4 个)氨基酸残基组成, 它们保证了桶型结构的稳定性. 第 2 类是从  $\beta$ -折叠片走向  $\alpha$ -螺旋, 通常较长, 其中 7 个由 4~13 个(平均 8 个)氨基酸残基组成, 而例外的 1 个环是位于第 4  $\beta$ -折叠片和第 4  $\alpha$ -螺旋间, 由 57 个氨基酸残基组成. 所有组成活性中心的氨基酸残基均位于第 2 类环中. 除组成  $\alpha/\beta$  桶的氨基酸残基外, 其余的氨基酸残基主要分布在 2 个区域中: 一是 N-端的 70 个氨基酸残基, 另一个是位于第 4  $\beta$ -折叠片与第 4  $\alpha$ -螺旋间的 45 个氨基酸残基组成的部分肽段. 而大多数的非桶型结构是位于  $\beta$ -折叠片 C-端的外侧, 并在桶的那一端形成“盖子”结构, 遮住了活性中心的一部分.

在上述结构中, 辅基 FMN 在  $\beta$ -折叠片的羧基端与桶型结构结合, 结合部位呈漏斗状, 由连接环组成. FMN 靠氢键与酶蛋白相连, 参与形成这些氢键的氨基酸残基位于环区域或  $\beta$ -折叠片的 C-端. FMN 的核糖醇基被埋入桶结构内.

## 1.3 GO 的四级结构

有关 GO 的全酶分子组成和所含亚基数的研究结果, 相互间差异较大, 分子组成约在 48 500~700 000 间, 亚基数从 1 个到 16 个不等. 如 Frigerio 等(1958)在纯化的菠菜叶片 GO 的超离心中发现有 2 个分子组成为 140 000 和 270 000 的组分存在, 分别对应于四聚体和八聚体; Kerr 等(1975)将纯化的豌豆叶片 GO 经 Sephadex G-75 胶过滤后, 得到 2 个组分: 一个具相对高的酶活性, 其分子组成为 88 000, 而另一个活性较低, 分子组成为 48 500 左右; Behrends 等(1982)在纯化初期用凝胶过滤法测得黄瓜子叶 GO 的全酶分子组成是 700 000, 为十六聚体, 用沉降离心法测得最后步骤的纯化酶的全酶分子组成却为 180 000, 是四聚体; Nishimura 等(1983)用蔗糖密度梯度离心法测得南瓜子叶 GO 的分子组成在 280 000~320 000 间, 为八聚体; Hall 等(1985)用凝胶过滤和蔗糖密度梯度离心法测定了几种植物叶片 GO 在纯化初期的分子组成, 其中  $C_3$  植物: 小麦、大麦、菠菜、豌豆、烟草和 1 种  $C_4$  草本植物 *Panicum maximum* 的叶片 GO 的分子组成在 160 000~180 000 间, 大约为四聚体,  $C_4$  植物: 玉米、甘蔗其叶片 GO 的分子组成为 290 000~310 000, 大约为八聚体; Emes 等(1982)发现不同的氮素营养会影响浮萍 (*Lemna minor* L.) GO 的分子组成. 对于这种全酶分子组成报道的不一致, 一些研究者推测可能是 GO 的聚合态在纯化过程中不稳定(Behrends et al, 1982), 或在不同的纯化阶段存在不同的

聚合态,或者不同来源的 GO 本身就存在着差异(Hall et al, 1985).Lindqvist 等(1985, 1989)和 Lindqvist(1989)通过结晶学研究,认为菠菜 GO 在晶体状态时,具严格 422 型对称的亚基排布,含 8 个亚基,形成一个边长约为 10 nm 的立方体,在分子中间则有 1 个  $d$  约为 2.0 ~ 2.5 nm 的孔,同时他们还指出了亚基间的一些相互作用力如氢键、离子键、水桥(water bridge)等。

## 2 植物 GO 翻译后的转运与组装

### 2.1 GO 翻译后的转运及组装

GO 定位于细胞内的过氧化物酶体中,该细胞器由单层膜所包裹且内不含核酸,因此存在于过氧化物酶体中的蛋白必须由核基因编码,它们大多在细胞质的游离多聚核糖体上合成,而后再被转运到过氧化物酶体中(Subramani, 1993; Olsen et al, 1995),GO 也不例外。Gerdes 等(1982)用 L-[<sup>35</sup>S]-Met 喂饲转绿的黄瓜子叶,用以观察 GO 的合成过程,发现标记的 GO 首先在细胞质中出现,当细胞质中的 GO 大量标记时,才在微体内出现标记的 GO;细胞质中标记的 GO 主要为单体,而微体中的 GO 则主要为寡聚体。同时他们对比了 3 种来源 GO 的亚基分子组成:过氧化物酶体中成熟的天然 GO、存在于细胞质中未被转运的 GO 和体外翻译的 GO 的亚基分子组成,发现它们的分子组成大小并无区别,Volokita 等(1987)在菠菜 GO 中也得到了类似的结果,这说明在 GO 亚基的新生肽链中不存在需要剪切的前导序列,这与其它的一些过氧化物酶体蛋白相似(Olsen et al, 1995),因此决定其被正确地分拣和投送到过氧化物酶体中的定位信号序列(peroxisomal targeting signals, 简称 PTS),一定存在于亚基自身的成熟肽链中。Volokita(1991)采用转基因植物来研究 GO 的转运,发现 GO 的 C-端六肽(RAVARL)能将葡糖酸醛酶定位到过氧化物酶体中,尽管转运效率极有限,因此推测在其 C-端的六肽(RAVARL)中可能含有定位信号序列;Homg 等(1995)用体外运送系统来研究 GO 向乙醛酸循环体转运的情况,结果表明该转运是一个依赖于温度并需要 ATP 的过程,同时他们还观察了 3 个突变蛋白的转运情况,发现缺失 N-端 59 个氨基酸残基和 C-端 53 个氨基酸残基的突变蛋白均能同样进行转运,而用 C-端 20 个氨基酸残基与二氢叶酸还原酶连接的融合蛋白却不能进行正常的转运。因此他们认为:不管 C-端的氨基酸序列所起的作用如何,可能还存在其它的定位信号序列(PTS)。蛋白质翻译后的成熟是一个极其复杂的过程,而转运又只是其中的一个环节,但其涉及到的因子却很多,除了上面提到的定位信号序列、温度和能量的要求外,还要求有:定位信号的受体、跨膜运送过程中可能涉及的一些分子伴侣等,所有这些都可能是今后的研究方向。

当 GO 蛋白被转运到过氧化物酶体中后,随后的就是如何被组装成具正常活性的生物大分子。Heupel 等(1994)通过对菠菜过氧化物酶体动力学特性的研究,认为 GO 与过氧化氢酶(CAT)、谷氨酸:乙醛酸氨基转移酶(GGAT)等一起在膜上形成了一个多酶复合体,这样既提高了催化效率,又使得 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、乙醛酸等细胞毒性物质不致于泄漏。

## 3 GO 的基因表达及其调控

### 3.1 GO 基因的克隆

Volokita 等(1987)根据菠菜 GO 的部分氨基酸顺序人工合成了寡聚核苷酸探针,从而在菠菜的 cDNA 文库中克隆到了 GO cDNA,并进行了序列分析,发现其总长度为 1 526 bp,其中可译框架为 1 107 bp;Ludt 等(1990)从兵豆中得到了 GO 的 cDNA 克隆,其序列与菠菜 GO cDNA 相

比较,具86%的同源性.Tsugeki等(1993)用免疫化学法从cDNA的表达文库中克隆到了南瓜子叶GO的cDNA,长度为1440 bp,编码367个氨基酸残基.

### 3.2 GO基因的异源表达

高效的异源表达是对GO进行深入研究的前提,Macheroux等(1991)在啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表达并得到具活性的菠菜GO,随后他们采用T7 RNA聚合酶启动子在大肠杆菌中高效表达了菠菜GO基因(Macheroux et al,1992),表达量可达可溶蛋白的1%,效率为啤酒酵母系统的15倍,而且表达出来的酶与天然菠菜GO相比,在物理化学特性上完全一致.而Macheroux等(1993)、Stenbery等(1995)之所以能够运用定点突变技术对GO活性中心的氨基酸残基进行深入的研究,正是由于凭借了这个高效的表达系统.Park等(1993)同样在啤酒酵母中表达了菠菜GO基因,并且所得酶其物理化学特性与天然酶相同.

### 3.3 GO基因表达的调控

随着技术的发展,人们期望从分子水平上去了解GO基因的表达状况.Gerdes等(1986,1988)通过Northern印迹法发现照光可使兵豆叶片和黄瓜子叶中GO的mRNA水平提高,并且15s的短时间照光就足以启动这种变化.Ludt等(1990)发现光照能激活兵豆黄化叶片的GO基因,使得GO mRNA水平明显提高,而后保持在一定水平,当叶片进入衰老后其含量又降到极低,而在根中则检测不出GO的mRNA.Park等(1992)以菠菜为材料,分析了各种器官中GO mRNA的丰度,其中以叶片为最高,茎中极微,而在根中则检测不出,这说明GO基因的转录具有一定的组织依赖性.同时发现黑暗处理后,叶片中的mRNA水平明显下降,而照光后又重新上升.Tsugeki等(1993)在黄瓜子叶的转绿过程中用免疫印迹和Northern印迹法分别分析GO酶蛋白含量和mRNA水平的变化,结果表明在此过程中两者含量均明显提高.Park等(1995)进一步分析光对菠菜GO基因表达的影响,发现GO受光诱导的模式类似于*rbcS*基因,而红光的诱导作用又可被远红光逆转.徐杰等(1996)观察到照光和底物处理可提高水稻叶片中GO mRNA水平及酶蛋白含量.这些结果都说明:光和底物在转录水平参与了GO基因表达的调控,而光敏色素可能在光信号的接收传递上起作用.

## 4 结语

随着植物GO研究的进一步深入,有关GO酶蛋白的转运、组装及其酶基因表达调控的分子机理将会得到进一步的阐明.从而为研究光呼吸代谢的生理功能及其调控的提供坚实基础.

### 参 考 文 献

- 李明启. 1988. 植物的乙醇酸氧化酶. 植物生理学通讯, (6): 67~71
- 徐 杰, 李明启, 施教耐. 1996. 光和底物对乙醇酸氧化酶的基因表达的诱导. 植物生理学报, 22(3): 315~319
- 彭新湘, 李明启. 1989. 乙醇酸氧化酶的纯化结晶和酪氨酸残基修饰对酶活性的影响. 植物生理学报, 15(3): 257~262
- 彭新湘, 李明启. 1990a. 组氨酸残基在乙醇酸氧化酶活性中心的作用. 植物生理学报, 16(2): 167~172
- 彭新湘, 李明启. 1990b. 赖氨酸残基在乙醇酸氧化酶催化活性中的作用. 生物化学与生物物理学报, 22(4): 391~395
- 彭新湘, 李明启. 1991. 乙醇酸氧化酶必需精氨酸残基的化学修饰. 植物生理学报, 17(3): 321~326

- Behrends W, Rausch U, Löffler H G, et al. 1982. Purification of glycolate oxidase from greening cucumber cotyledons. *Planta*, 156: 566 ~ 571
- Cederlund E, Lindqvist Y, Soderlund G, et al. 1988. Primary structure of glycolate oxidase from spinach. *Eur J Biochem*, 173: 523 ~ 530
- Choi J D, Horiike K, Nozaki M. 1988. Essential arginyl residue(s) of glycolate oxidase from rat liver. *Korean Biochem J*, 21(3): 245 ~ 252
- Emes M J, Erismann K H. 1982. The influence of the nitrogen supply on the structure and activity of glycolate oxidase in *Lemna minor* L. *Plant Science Letter*, 27: 103 ~ 109
- Frigerio N A, Harbury H A. 1958. Preparation and some properties of crystalline glycollic acid oxidase of spinach. *J Biol Chem*, 231: 135 ~ 157
- Gerdes H H, Kindl H. 1982. Biosynthesis of a microbody matrix enzyme in greening cotyledons——glycolate oxidase synthesized *in vivo* and *in vitro*. *Planta*, 152: 572 ~ 578
- Gerdes H H, Kindl H. 1986. Partial purification and characterization of mRNAs encoding glycolate oxidase and catalase. *Planta*, 167: 166 ~ 174
- Gerdes H H, Kindl H. 1988. Gene response upon illumination in forming mRNA encoding peroxisomal glycolate oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 949: 195 ~ 205
- Hall N P, Reggiani R, Lea P J. 1985. Molecular weights of glycolate oxidase from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants determined during early stages of purification. *Phytochem*, 24(8): 1 645 ~ 1 648
- Heupel R, Heldt H W. 1994. Protein organization in the matrix of leaf peroxisomes——A multi-enzyme complex involved in photorespiratory metabolism. *Eur J Biochem*, 220(1): 165 ~ 172
- Homg J T, Beharl R E, Burke L E, et al. 1995. Investigation of energy requirement and targeting signal for the import of glycolate oxidase into glyoxysomes. *Eur J Biochem*, 230: 157 ~ 163
- Kerr M W, Groves D. 1975. Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochemistry*, 14: 359 ~ 362
- Lindqvist Y, Branden C I. 1979. Preliminary crystallographic data for glycolate oxidase from spinach. *J Biol Chem*, 254: 7 403 ~ 7 404
- Lindqvist Y, Branden C I. 1980. Structure of glycolate oxidase from spinach at a resolution of 5.5 Å. *J Mol Biol*, 143: 201 ~ 211
- Lindqvist Y, Branden C I. 1985. Structure of glycolate oxidase from spinach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 6 855 ~ 6 859
- Lindqvist Y, Branden C I. 1989. The active site of spinach glycolate oxidase. *J Biol Chem*, 264(6): 3 624 ~ 3 628
- Lindqvist Y. 1989. Refined structure of spinach glycolate oxidase at 2 Å Resolution. *J Mol Biol*, 209: 151 ~ 166
- Lindqvist Y, Branden C I, Mathews F S, et al. 1991. Spinach glycolate oxidase and yeast flavocytochrome b<sub>2</sub> are structurally homologous and evolutionary related enzymes with distinctly different function and FMN binding. *J Biol Chem*, 266: 3 198 ~ 3 207
- Ludt C, Kindl H. 1990. Characterization of a cDNA encoding *Lens culinaris* glycolate oxidase and developmental expression of glycolate oxidase mRNA in cotyledons and leaves. *Plant Physiol*, 94: 1 193 ~ 1 198
- Macheroux P, Massey V, Thiele D J, et al. 1991. Expression of spinach glycolate oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* purification and characterization. *Biochem*, 30: 4 612 ~ 4 619
- Macheroux P, Mulrooney S B, Milliams C H, et al. 1992. Direct expression of active spinach glycolate oxidase in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1 132: 11 ~ 16
- Macheroux P, Kieweg V, Massey V, et al. 1993. Role of tyrosine 129 in the active site of spinach glycolate oxidase.

- Eur J Biochem, 213: 1 047 ~ 1 054
- Nishimura M, Akhmedov Y D, Strzalka K, et al. 1983. Purification and characterization of glycolate oxidase from pumpkin cotyledons. Arch Biochem Biophys, 222: 397 ~ 402
- Olsen L J, Harada J J. 1995. Peroxisomes and their resemble in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 46: 123 ~ 146
- Park Y S, Choi J D; Cho N J. 1992. Expression of glycolate oxidase gene in spinach. Korean Biochem J. 25(3): 219 ~ 223
- Park Y S, Son E D; Chae D Y, et al. 1993. Biochemical characterization of spinach glycolate oxidase expressed in yeast. Korean Biochem J, 26(4): 323 ~ 327
- Park Y S, Jin Y H, Cho N J. 1995. Effect of light on spinach glycolate oxidase gene expression. J Biochem Mol Biol, 28(3): 271 ~ 274
- Stenbery K, Clausen T, Lindqvist Y, et al. 1995. Involvement of Tyr 24 and Trp 108 in substrate binding and substrate specificity of glycolate oxidase. Eur J Biochem, 228: 408 ~ 416
- Subramani S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. Annu Rev Cell Biol, 9: 445 ~ 478
- Tsugeki R, Hara-Nishimura K, Mori H, et al. 1993. Cloning and sequencing of cDNA for glycolate oxidase from pumpkin cotyledons and Northern blot analysis. Plant Cell Physiol, 34(1): 51 ~ 57
- Volokita M, Somerville C R. 1987. The primary structure of spinach glycolate oxidase deduced from the DNA sequence of a cDNA clone. J Biol. Chem, 262(33): 15 825 ~ 15 828
- Volokita M. 1991. The carboxy-terminal end of glycolate oxidase directs a foreign protein in tobacco leaf peroxisomes. Plant J, 1: 361 ~ 366

## Advances in the Study of Plant Glycolate Oxidase

Wang Weijun Peng Xinxiang Li Mingqi

(College of Biotech. , South China Agric. Univ. , Guangzhou, 510642)

**Abstract** Glycolate oxidase is a key enzyme for plant photorespiration. Recently, advances have been made in the understanding of it. This review is focusing on its mollecular structure, post-translational import and assembly, and the regulation of its gene expression is also reviewed.

**Key words** glycolate oxidase; plant; research advances

【责任编辑 李玲】