叶黄素循环酶

阳成伟, 陈贻竹

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 依赖叶黄素循环的热耗散是一种主要防御光破坏的机制。参与叶黄素循环的酶是紫黄质脱环氧化酶和玉米黄质环氧化酶, 紫黄质脱环氧化酶已分离纯化, 其 cDNA 已被克隆, 其活性主要受跨类囊体膜的 pH 梯度和抗坏血酸浓度的调节; 玉米黄质环氧化酶还没有被分离出来, 但其 cDNA 也已被克隆; 其活性主要与 NADPH 的浓度、 O_2 及光等有关。

关键词: 叶黄素循环; 紫黄质脱环氧化酶; 玉米黄质环氧化酶

中图分类号: Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)03-0264-04

The enzyme of the Xanthophyll cycle

YANG Cheng-wei, CHEN Yi-zhu

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Xanthophyll cycle is concerned with their possible role in radiationless energy dissipation of excess light energy; Violaxanthin deepoxidase and zeaxanthin epoxidase are involved in xanthophyll cycle metabolism and the cDNA of Violaxanthin deepoxidase has cloned, its activity is mainly regulated by pH value and ascorbate concentration. The cDNA of zeaxanthin epoxidase has also cloned, its activity is related with NADPH concentration, pH value, O_2 and light *et al.*

Key words: xanthophyll cycle; violaxanthin deepoxidase; zeaxanthin epoxidase

植物光合机构中叶绿素吸收的光能通过光化学过程转化为稳定的化学能。然而, 大多数情况下植物接受的能量要超过其所能转化的能量, 如果过量的光能不及时耗散掉, 光合功能会降低, 甚至出现光氧化, 从而破坏光合机构。植物在进化过程中形成多种保护机制, 其中依赖叶黄素循环的非辐射能量耗散是一种有效且灵活的手段。关于叶黄素循环在防御光合机构光抑制和光破坏中的作用已成为光合作用研究的一个重要的研究领域。已有不少关于叶黄素循环方面的专论^[1~4], 但在这些文章中涉及到的大多是关于叶黄素循环参与非辐射能量

耗散的功能及机制, 而参与叶黄素循环代谢的两个关键酶的分子性质和调节研究现状尚未见综述, 本文仅就这方面的研究进展作一简要介绍。

叶黄素循环是由依赖光转化的 3 个组分: 玉米黄质(Z)、单环氧玉米黄质(A)和双环氧紫黄质(V), 通过环氧和脱环氧作用的循环机制。V 在紫黄质脱环氧化酶(VDE)的作用下脱环氧形成 A, 再进一步脱环氧形成 Z; Z 在玉米黄质环氧化酶(ZE)的作用下环氧化又可以形成 A, 再进一步环氧化形成 V。这两个反应在光和暗及两个酶催化下能同时发生。

收稿日期: 2001-09-25

作者简介: 阳成伟(1972-), 男, 湖南永州人, 博士研究生, 现从事环境和作物生理生化研究。

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(G1998010100)资助

1 紫黄质脱环氧化酶

1.1 分子特性

Hager 发现 VDE 是一种水溶性酶, 存在于高等植物中的类囊体腔内^[65]。后来 Hager 和 Yamamoto 及 Higashi 分别用凝胶过滤的方法得到分子量分别为 54 kDa 和 60 kDa 的 VDE^[66,71]。然而, Åkerlund 等在菠菜 (*Spinacia oleracea*) 中通过凝胶过滤层析结合离子交换层析和疏水作用层析, 分离到 VDE, 其分子量为 43 kDa^[83]。Havir 等用 SDS-PAGE 测得菠菜的 VDE 为单一的多肽链蛋白, 其分子量也为 43 kDa, 其等电点为 4.95^[89]。用单半乳糖甘油二脂 (monogalactosyldiacylglycerol; MGDG) 亲和沉淀法也得到相似的结果, 得到分子量为 43 kDa 的多肽, 其等电点为 5.4^[10]。

从 VDE 的 K_m 来看, 不同研究者用不同植物材料所测的结果不一样。Hager 以菠菜为材料, 测得 VDE 对 V 的 K_m 为 10.6 $\mu\text{mol/L}$ ^[11], 而 Grotz 等也得到相似的结果, VDE 对 V 和 A 的 K_m 分别为 11.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[12]。但在莴苣中测得 VDE 对 V 的 K_m 为 0.049 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.35 $\mu\text{mol/L}$ 。这说明不同植物中 VDE 对底物 V 和 Z 具有不同的亲和力^[7,10]。

VDE 的氨基酸组成已被测定, 其 cDNA 也已被克隆。Rockholm 等^[10]报导了 VDE 的氨基酸组成, 其中酸性氨基酸 Asp (包括 Asn) 和 Glu (包括 Gln) 在 VDE 氨基酸组成比例最大, 此可能是该酶呈酸性的原因。Bugos 和 Yamamoto^[13]从莴苣中得到了编码 VDE 的 cDNA 的克隆, 并在 *E. coli* 中表达。获得的蛋白质, 同高等植物中 VDE 呈相同的性质, 如能被 DTT 抑制; 该基因是一个核编码、单拷贝基因, 其 cDNA 编码一个 473 个氨基酸的多肽, 分子量为 54.4 kDa, 具有定位在类囊体腔中蛋白质的特性。他们通过剪切、加工, 得到一个成熟的 348 个氨基酸的多肽, 其分子量为 39.9 kDa, 在凝胶电泳上同 43 kDa 非常接近。用等电点理论计算的等电点值为 4.57, 而实验得到的等电点则为 5.4。该蛋白质有 3 个有趣的结构域: A) N-端具有一个半胱氨酸富集区 (该蛋白质中的 13 个半胱氨酸中的 11 个位于此区), 是 DTT 的抑制位点; B) 有一个 Lipocalin 信号, 可能是双环氧的紫黄质和 MGDG 的结合位点; C)

具有一个高电荷区。该蛋白质的信号序列为 126 个氨基酸。

1.2 紫黄质脱环氧化酶的调节

1.2.1 pH 值

Hager (1969) 曾报道^[5], VDE 在分离的叶绿体中最适 pH 值为 4.8, 而在分离的酶中最适 pH 值为 5.2。VDE 对类囊体膜内 pH 非常敏感, 在过量的光下由水光解产生大量的 H^+ 以及 PQ 库所输入的 H^+ 能大大降低类囊体腔内的 pH, 从而激发腔内 VDE 活性。用分离的豌豆叶绿体测定 505 nm 吸收值的变化表明, Z 的形成速率常数强烈地受到 pH (5.8~6.3) 的调节, pH 6 时具有质子协同性, pH 值大于 6.3 时 VDE 的活性为 0, 而低于 5.8 时具有较高活性^[14]。Bratt 等也得到了相近的结果, 依赖 pH 的 VDE 从类囊体膜上的释放, 发生在一个狭窄的 pH 范围内, 在 pH 6.6 时具有一个柔和点, 在 pH 4 时具有质子协同性^[5]。通过冷冻-融化循环处理表明, VDE 在 pH 值小于 6.5 时紧紧地结合在类囊体膜上, 而 pH 值高于 7.0 时, 游离在类囊体腔中^[16]。VDE 对类囊体膜内 pH 的这种敏感性, 可能与其具有高比例的带负电荷的谷氨酸 (Glu) 和天门冬氨酸 (Asp) 和包括 5 个组氨酸残基有关^[17]。

1.2.2 抗坏血酸 (Vc)

Siefermann 和 Yamamoto (1974) 发现抗坏血酸 (Vc) 在脱环氧化作用中起着重要的作用, 在离体的叶绿体中, 16 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vc 可使光驱动的脱环氧化作用达到饱和^[18]。叶绿体中 Vc 的浓度一般在 10~50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[19]; 而在胁迫的条件下 (如高光照、冷害等), Vc 的浓度增加。冷适应的菠菜浓度甚至提高至 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[20]。而 Gilmore 和 Yamamoto (1993) 提出 Vc 可以同玉米黄质及双环氧的紫黄质一样作为脱环氧化酶的共同底物, 增加 VDE 的活性^[21]。当将过氧化氢加到完整的叶绿体时, 抗坏血酸过氧化物酶通过消耗 Vc, 而抑制 VDE 活性^[22]。Bratt 等^[15] (1995) 实验表明 VDE 对 Vc 的 K_m 常数强烈地依赖 pH 值, 当 Vc 水平降低时, pH 值的最适值也转到更低的值。因此, Vc 的酸化形式是 VDE 催化 A 至 Z 反应的真正底物。因而, 他们提出一个模型, 在光照增强的情况下, 类囊体腔中 pH 值下降, 当 pH 值下降 6.6 时, VDE 紧密结合到类囊体腔膜上, 成为一种活化形式, 而当 pH 值下降至 6 时, ATP 合成开始, pH 值进一步降低, 酸化 Vc 的形式增加, 从而增加 VDE 的活性, 催化 V 转化成 Z 的

反应。

1.2.3 巯基化合物和 *o*-菲啶 巯基化合物和 *o*-菲啶抑制 VDE 的活性。用 V 做底物,当增加 DTT、巯基乙醇、半胱氨酸和 *o*-菲啶的浓度分别为 0.055、0.68、2.7 和 0.025 mmol·L⁻¹时,VDE 活性被抑制 50%^[9]。DTT 其抑制位点位于 VDE 的 N-端富集半胱氨酸区,它抑制二硫桥的形成^[13]。孟庆伟等(1998)用 5 mmol·L⁻¹的 DTT 水溶液处理小麦叶片,A+Z 的含量下降约 55.8%^[23]。

1.2.4 温度 VDE 活性也受环境温度的制约。在植物正常生长的温度范围内该酶的活性较强,而在低温或高温的胁迫条件下,则活性明显受抑制。Demmig-Adams 和 Winter^[21]观察到在 5 °C 时玉米黄质的形成明显减少,而且如果同时以高光强处理此限制作用明显加剧。

1.2.5 UV-B UV-B 光线也可对 VDE 活性产生抑制作用。由于随着地球平流层中臭氧层不断被破坏,UV-B 辐射逐渐增强,因此 VDE 对 UV-B 的敏感性也日益受到人们的重视。Pfündel 等曾多次研究了 UV-B 对 PSII 和 VDE 的抑制以及它们同可见光对 PSII 的光抑制作用所产生的协同效应^[25]。然而,UV-B 对 VDE 作用的具体机制还有待于进一步实验证实。

2 玉米黄质环氧化酶

2.1 分子特性

ZE 是一种双功能单加氧酶,定位在类囊体膜的基质面,能催化 Z 环氧化成 A 至 V 的反应。到目前为止,ZE 还没有被分离出来,但 Marin 等(1996)发现参与 ABA 生物合成的一个基因,相当于拟南芥的 *aba* 座位,并确定是编码 ZE 的基因^[26]。它们用谷物激活剂转座子通过转座子标签在 *Nicotiana glauca* 中分离到缺失 ABA 的突变体即为 *aba2*; *aba2*cDNA 编码一个输入叶绿体的 663 个氨基酸残基的多肽,如以 ATG 为起始密码子,这个 cDNA 包括 5' 端有 40 bp 未转译的序列、1989bp 编码区和 3' 端有 313 bp 未转译区与 58 bp 长的多聚 Poly(A) 尾巴。其等电点为 7.28,分子量为 72.5 kDa,有一个 ADP 结合折叠(包括一个富 Gly 区,能结合 NADP 或 FAD)和 FAD 结合域,在活体外,通过转录、翻译和叶绿体运输的研究,在此蛋白质被

加工成为一个 67 kDa 的成熟蛋白过程中,有 50 个氨基酸信号肽的切割,然而此实验还没有此成熟蛋白是定位在可溶性的叶绿体基质中,还是在同类囊体膜联系或整合在其上^[26]。Burbidge 等曾从番茄中也得到了 ZEcDNA 的 DNA 序列^[27]。

2.2 玉米黄质环氧化酶的调节

环氧化酶的活性与 NADPH 的浓度、pH 值、O₂ 及光等有关。O₂ 和 NADPH₂ 是 ZE 催化 Z 环氧化成 A 至 V 反应的协同底物。Yamamoto 和 Chichester 证实 V 和 A 中环氧基团均来自光合作用中产生的分子氧,在低浓度的氧下,环氧化酶的活性明显受抑^[28]。NADPH 影响环氧化酶的活性,在分离的类囊体中,Z 的环氧化在 0.04 mmol·L⁻¹NADPH 达到最大值的一半,而在 0.4 mmol·L⁻¹的 NADPH 下,环氧化酶活性达到饱和;叶绿体基质在光和黑暗的条件下,其 NADPH 浓度分别为 0.3 和 0.1 mmol·L⁻¹,因此 NADPH 在活体内不是一个限制因子^[29]。光也影响 ZE 的活性,Hager 报道,ZE 催化的环氧化反应在暗中发生,在微弱的光下这一过程受到促进^[30]。此外,Büch 发现 FAD 也是 ZE 的协同因子,能提高其催化活性^[31]。

参考文献:

- [1] 郭连旺,沈允钢. 高等院校植物光合机构避免强光破坏的保护机制[J]. 植物生理学通讯. 1996, 32(1): 1-8.
- [2] 李晓萍,陈贻竹,郭俊彦. 叶绿体 PSII 光能耗散机制研究[J]. 生物化学与生物物理学进展. 1996, 23(2): 145-149.
- [3] 董高峰,陈贻竹,蒋跃明. 植物叶黄素循环与非辐射能量耗散[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 141-144.
- [4] Horton P, Ruban A V, Walters G R. Regulation of light harvesting in green plants[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Biol.* . 1996, 47: 655-684.
- [5] Hager A. lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem chloroplast ten-kompartiment als Ursache der Enzymatischen violanthin zu zeaxanthin-Umwandlung: Beziehungen zur photophosphorylierung [J]. *Planta*, 1969, 89: 224-243.
- [6] Hager A. Die reversiblen, Lichtabhängigen xanthophyll umwandlungen im chloroplasten[J]. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* . 1975. 27-44.

- [7] Yamamoto H, Higashi R M. Violaxanthin deepoxidase .lipid composition and substrate specificity[J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978. **190**: 514—522.
- [8] Åkerlund H E, Aridsson P O, Bratt C E, *et al.* Partial purification of the violaxanthin de-epoxidase - in photosynthesis from light to Biosphere(P. Mathis, ed.) Vol. IV [M]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. ISBN 0-7923-3860-X, 1995. 103—106.
- [9] Haver E A, Tausta S L, Peterson R B. Purification and properties of violaxanthin de-epoxidase from spinach[J]. *Plant Science*, 1997. **123**: 57—66.
- [10] Rockholm D C, Yamamoto H Y. Violaxanthin de-epoxidase: purification of a 43-kilodalton luminal protein from lettuce by lipid -affinity precipitation with monogalactosyl diacylglyceride [J]. *Plant Physiol.*, 1996. **110**: 679—703.
- [11] Hager A. The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast [A]. In: CZYGAN, E-C. (ed): pigments in plants [C]. New York: Fischer, Stuttgart, 1980. 57—79.
- [12] Grotz B, Molnar P, Stransky H, *et al.* Substrate specificity and functional aspects of violaxanthin-de-epoxidase, an enzyme of the xanthophyll cycle[J]. *J. Plant Physiol.*, 1999. **154**: 437—446.
- [13] Bugos R Y, Yamamoto H Y. Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia Coli*[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. **93**: 6 320—6 325.
- [14] Pfündel E E, Dilly R A. The pH dependent of violaxanthin deepoxidase in isolated pea chloroplast [J]. *Plant Physiol.*, 1993. **101**: 65—71.
- [15] Bratt C E, Arvidsson D O, Marie C, *et al.* Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration[J]. *Photosynth. Res.*, 1995. **45**: 169—175.
- [16] Hager A, Holocher K. Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin deepoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) decrease[J]. *Planta*, 1994. **192**: 581—589.
- [17] Arvidsson P O, Bratt C E, Carlsson M, *et al.* Purification and identification of the violaxanthin deepoxidase as a 43kDa protein[J]. *Photosyn. Res.*, 1996. **49**: 119—129.
- [18] Siefermann D, Yamamoto H Y. Light-induced deepoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplast III [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1974. **357**: 144—150.
- [19] Gillham D J, Dodge A D. Hydrogen-peroxide scavenging system within pea chloroplast [J]. *Planta*, 1986. **167**: 246—251.
- [20] Schöner S, Krause G H. Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light[J]. *Planta*, 1990. **180**: 383—389.
- [21] Gilmore A M, Yamamoto H Y. Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin independent quenching [J]. *Photosynth Res.*, 1993. **35**: 67—78.
- [22] Neubauer C, Yamamoto H Y. Membrane barrier and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin deepoxidase activity in intact chloroplast [J]. *Photosynth. Res.*, 1994. **39**: 137—147.
- [23] 孟庆伟, 赵世杰, 许长成, 等. 午间强光胁迫下叶黄素循环对小麦叶片光合机构的保护作用[J]. *作物学报*, 1998. **21**(6): 747—750.
- [24] Demmig-Adams B, Winter K. Zeaxanthin synthesis, energy dissipation and photoprotection of photosystem II at chilling temperature[J]. *Plant Physiol.*, 1987. **90**: 894—898.
- [25] Pfündel E, Pan R S, Dilly R A. Inhibition of violaxanthin deepoxidation by UV-B radiation in isolated chloroplasts and intact leaves [J]. *Plant Physiol.*, 1992. **98**: 1372—1380.
- [26] Marin E, Nussaume L, Quesada A, *et al.* Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana glauca*. A gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*[J]. *EMBO J.*, 1996. **15**: 2 331—2 342.
- [27] Burbidge A, Grieve T, Terry C, *et al.* Structure and expression of a cDNA encoding zeaxanthin epoxidase, isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) library [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1997. **48**(314): 1 749—1 750.
- [28] Yamamoto H Y, Chichester C O. Dark incorporation (下转第 276 页 Continue on page 276)