

蓝细菌 CO₂ 浓缩机制的研究概况*REVIEW OF THE CO₂ CONCENTRATING MECHANISM IN
CYANOBACTERIA付翔¹ 韩博平^{1,2} 林秋奇¹(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)(² 暨南大学水生生态科学研究所 广州 510632)中图分类号 P714⁺.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)04-0013-05

藻类普遍具有一种能提高细胞内的 CO₂ 浓度,从而使光合作用能够顺利进行的生理机制,称为 CO₂ 浓缩机制(CO₂ concentrating mechanism, CCM)。CCM 是藻类对低 CO₂ 环境的一种适应方式。CCM 生物的一个主要生理特征为:植物细胞对 CO₂ 表现出很高的表观亲和力,即低浓度的 CO₂ 就能满足其进行光合作用的需要;而其体内催化 CO₂ 固定的限速酶, Rubisco(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶),对 CO₂ 的亲和力却很低,需要较高的 CO₂ 浓度才能获得正常的反应速度^[1]。由于 CCM 具有显著的生态学意义,因而一直是藻类生理生态学研究的重点之一。近 10 年来,各种分子生物学和分子遗传学技术的应用,有力促进了这一领域的研究,并取得了一系列重要的进展。

蓝细菌(Cyanobacteria)是典型的 CCM 生物。其结构简单,因而成为研究 CCM 的良好模式生物。目前对蓝细菌 CCM 的研究也是最详尽的。由于全球 CO₂ 的上升,CCM 及有关问题备受关注。本文旨在对蓝细菌 CCM 的运行机制及最近这一领域中所取得的一些进展作一概述。

1 蓝细菌的 CCM 运行机制

1.1 生理背景

蓝细菌浓缩 CO₂ 的能力极强,Kaplan 等 1980 的实验发现多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)能将细胞内的无机碳(inorganic carbon, Ci)浓度提高到外界的

1 000 倍以上,其表观 CO₂ 半饱和常数($K_{1/2,CO_2}$)可低于 1 $\mu\text{mol/L}$,而其 Rubisco 的 K_m,CO_2 约为 250 $\mu\text{mol/L}$ 。如此之高的浓缩效率通过怎样的途径实现?要使 Ci 在细胞内积累,必须满足以下条件:1) 一个主动运输系统,将细胞外 Ci 转运到细胞内;2) 一个防止 CO₂ 向细胞外扩散的屏障;3) 能量供应。其中最难做到的是第二条。CO₂ 是非极性的小分子,极易透过质膜,高浓度的细胞内 CO₂ 向外渗透所形成的溢出通量将远远超过转运系统所能达到的输入通量。由于 Rubisco 只能以 CO₂ 为底物,又必须有高浓度的内部 CO₂ 才能进行正常的光合作用(平均 $K_m,CO_2 > 150 \mu\text{mol/L}$)。一种假设是蓝细菌的细胞膜确有其特殊性,对 CO₂ 的通透性极低而使之不能渗出。然而计算表明,要使细胞内 CO₂ 的平衡浓度提高到 Rubisco 的 K_m 值,细胞膜对 CO₂ 的渗透系数约为 $10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ^[2]。这就产生了两个问题:1) 一般的生物膜对 CO₂ 的渗透系数约为 $10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$,如何解释这两种膜之间的巨大差异? 2) O₂ 分子与 CO₂ 分子有相近的分子量和极性,因而有与 CO₂ 相近的

* 国家自然科学基金 39900022 号和中国科学院百人计划 131 号资助。

第一作者:付翔,出生于 1976 年,博士,研究方向:海洋生物。E-mail: Fuxiangde@21cn.com

收稿日期:2001-04-07;修回日期:2001-10-20

渗透系数,质膜对 CO_2 的阻抗意味着光合作用中放出的 O_2 也将细胞内积累,平衡时细胞内的氧分压将达到约两个大气压,同时高氧也会对细胞产生毒性并加速光氧化反应。蓝细菌如何解决其放氧问题?

1.2 羧化体模型

1987年,Reinhold等提出了以羧化体为中心的CCM模型,对上述矛盾提供了较为圆满的解释。

羧化体(carboxysome)是蓝细菌和其它光合细菌中常见的一种多边形的小体,直径约为细胞直径的1/10,长期以来它一直被认为是一种物质储藏器官,但后来Codd等1984年发现其中几乎含有细胞内所有的Rubisco。据此,Reinhold等提出下述CCM运行模式:

(1)位于质膜上的主动运输系统,将细胞外无机碳(Ci)转运到细胞内。无论Ci泵以何种形式的Ci为底物(CO_2 或 HCO_3^-),释放到细胞内的是 HCO_3^- 。

(2)Ci在细胞质内主要以 HCO_3^- 的形式存在,细胞质内无催化 CO_2 和 HCO_3^- 之间转化的碳酐酶(carbonic anhydrase, CA),由于 HCO_3^- 和 CO_2 之间自发转化的速度很慢,二者处于不平衡状态,因而以 CO_2 形式泄漏出细胞的Ci大大减少。因为 HCO_3^- 是离子,质膜对其通透性低,可以积累到很高的浓度。

(3) CO_2 的扩散阻力位于羧化体而不是质膜,CA和Rubisco全部位于羧化体内,CA在此催化 HCO_3^- 和 CO_2 之间的相互转化达到平衡,由高浓度的 HCO_3^- 形成高浓度的 CO_2 供Rubisco利用。 CO_2 在从羧化体中心向外扩散的途中,不断地被Rubisco固定而最终难以逸出;也有可能羧化体具有对 CO_2 高渗透阻力的外壳而将其封闭在内。

模型的图示见图1。此模型非常成功地解决了 CO_2 渗透屏障的问题,同时也为羧化体的存在提供了功能上的解释。随后,Price等1989年的实验证明,细胞质中确实有大量的 HCO_3^- 存在,若人工诱导CA在细胞质内超量表达,则会导致 CO_2 的大量泄露而无法实现Ci的积累;1992年,又证明羧化体中有CA活性;同时也发现有羧化体异常的蓝细菌突变株也无法正常运行CCM。从而为上述模型做出了强有力的佐证。目前这一学说已被广泛接受,并作为蓝细菌CCM的基本框架确立下来。

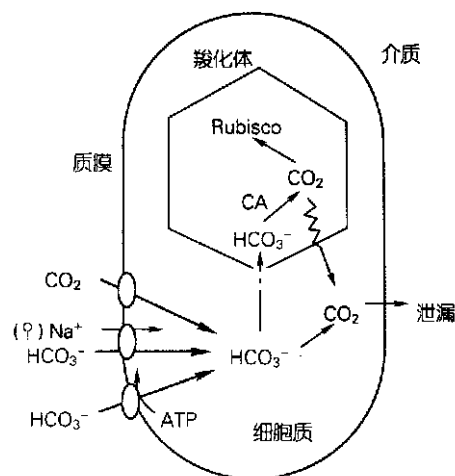


图1 蓝细菌 CO_2 浓缩机制(CCM)的图示模型

所示过程的说明见正文,其中需要能量的过程以较粗的箭头表示(改自Price等,1998)。

1.3 转运系统及其能量供应

1.3.1 转运系统的组成 Ci从外界环境到细胞内部的传送是CCM的重要组成部分,也是CCM研究中的热点问题。转运系统利用的是 CO_2 和 HCO_3^- 中的一种还是都能利用?如果都能利用,两种Ci是由同一个Ci泵转运的,还是分别由不同的泵转运?随着大量实验证据的获得,近年来形成的比较一致的看法是,多数蓝细菌对环境中的 CO_2 和 HCO_3^- 都能主动吸收,并且细胞膜上同时有多种Ci泵存在^[3]。Miller等1984年发现当环境中 Na^+ 浓度在 mmol/L 级以上时,细胞对 CO_2 和 HCO_3^- 都能主动吸收;而当 Na^+ 浓度在 $\mu\text{mol/L}$ 到 mmol/L 级之间时,则只有 CO_2 的吸收,即 HCO_3^- 的转运是 Na^+ 依赖的。对 Na^+ 水平的不同需求表明 CO_2 和 HCO_3^- 的运输机理不同,从而证明 CO_2 泵和 HCO_3^- 泵可能是各自独立存在的。Espie等于1987年又发现当细胞处于 CO_2 极低的环境中时($20 \times 10^{-6} \sim 50 \times 10^{-6}$,大气中约为 350×10^{-6}),能够诱导出一种非 Na^+ 依赖的 HCO_3^- 泵,它对 HCO_3^- 有较高的亲和力^[4,5]。

1.3.2 各种Ci泵的转运机理 Reinhold于1984年提出, HCO_3^- 泵的 Na^+ 依赖性可由 HCO_3^- - Na^+ 协同运输来解释,细胞膜两侧的 Na^+ 浓度梯度为 HCO_3^- 的跨膜运送提供能量。然而计算表明此梯度尚不足以支持观察到的 HCO_3^- 通量^[6],对 Na^+ 的

需要可能是因为它参与进行 HCO_3^- 吸收所必须的 pH 及电荷平衡的调节^[7]。此种 HCO_3^- 泵的转运机理目前尚不明确。

有观点认为非 Na^+ 依赖的 HCO_3^- 泵实际上是某种将 HCO_3^- 转化为 CO_2 再提供给 CO_2 泵的结构^[8]。但基因分析的结果表明,它很可能是一个变构蛋白,由 ATP 提供能量,通过其构象变化实现 HCO_3^- 的跨膜运送^[3,9]。

CO_2 泵可能具有类似 CA 的性质,因其转运过程中要将 CO_2 转化为 HCO_3^- 。Bedu 等 1992 年也确实从蓝细菌细胞膜上分离到具有 CA 活性的组分。Fridlyand 于 1996 年提出一个新颖的假说,认为这种组分实际上是位于质膜内侧的一种类 CA 体 (CA-like entity),它在有能量供应的条件下逆化学势梯度催化细胞质内的 CO_2 向 HCO_3^- 转化,造成细胞内 CO_2 浓度低于外界而使 CO_2 扩散进入细胞,其作用与直接转运外部 CO_2 的 CO_2 泵相当,但由于它在 CO_2 渗出细胞之前就将其重新转化为 HCO_3^- ,因而在能量上可能是更节省的^[10,11]。图 2 为二者之间差别的图解。

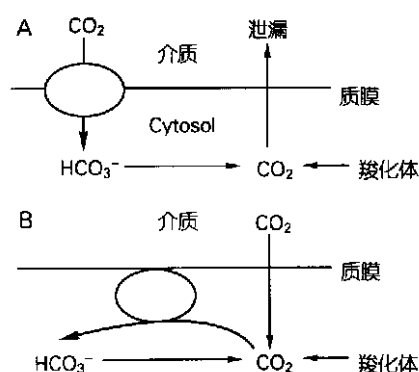


图 2 两种可能的 CO_2 吸收模式的比较

A. CO_2 泵直接将外界的 CO_2 转运到细胞内,同时转化为 HCO_3^- ; B. 位于质膜内侧的类 CA 体 (CA-like entity) 将细胞质中的 CO_2 转化为 HCO_3^- , 并引起外界 CO_2 向细胞内扩散。其中需要能量的过程以较粗的箭头表示。

1.3.3 转运的能量供应 Ci 的转运是一个主动运输的过程,必须有能量的供应才能进行。黑暗环境中细胞无法积累 Ci ,说明转运所需的能量来自光^[12]。Ogawa 等 1985 年所做的光合电子传导链抑制实验证明, Ci 转运不仅仅需要 ATP 的供应,光系

统 I 介导的循环磷酸化的活动也是必须的。它可能与 pH 的调节有关。基因分析也表明,循环磷酸化电子传导链中的 F-型 NADH 脱氢酶在 Ci 转运中起着至关重要的作用,并有可能在结构上与 Ci 泵紧密耦连^[9,13]。

1.4 CCM 运转的调控

CCM 的运转效率随细胞生长的环境条件而变化^[14]。如前所述,当外界 Ci 缺乏时,会诱导高亲和力 HCO_3^- 泵的出现。实验表明此诱导过程进行得非常迅速,10 min 之内便能完成,因而很可能是质膜上已有结构的激活,而非新蛋白质组分的表达;其激活很可能是个磷酸化修饰过程,并有丝氨酸-苏氨酸族蛋白激酶的参与^[15]。低 Ci 环境中生长的蓝细菌还会出现 Rubisco 活性增强及羧化体数量增加的现象, CO_2 泵及 Na^+ 依赖性 HCO_3^- 泵亦表现出更高的活性,细胞的表现 Ci 亲和力可比在高 Ci 下生活时提高 20 倍以上。显然,CCM 的运转是受到良好调控的,然而,调控的具体过程及其触发机制仍是我们所知甚少的一个领域。

1.5 CCM 的相关基因

近 10 年中,分子遗传学手段广泛运用于 CCM 研究,极大改善了人们对 CCM 的认识。通过改变蓝细菌的基因组产生高 CO_2 需求 (high CO_2 requirement, HCR) 的突变株是其主要方法^[13,15]。CCM 是多基因控制的生理过程,任何一个环节出现错误都会导致其运转异常而需要较高的外界 CO_2 浓度才能进行其正常的光合作用。通过定点突变产生 HCR 突变株就成为分析鉴定 CCM 相关基因的强有力的手段。目前已从实验室常用的几个单细胞蓝细菌种中获得了许多 HCR 突变株,它们表现出来各种生理特点使人们对 CCM 所包含的过程有了更为深入的理解^[16]。其中集胞藻 *Synechocystis* PCC6803 的基因组测序已全部完成^[17],并从中鉴定出约 50 个 CCM 相关基因,从功能上可分为 4 类:1) 羧化体及相关功能;2) 调控功能;3) Ci 转运及相关功能;4) 能量供应。从其他藻种如聚球藻 *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002 中也分离出许多具有上述功能的基因,不同种之间同功基因的同源性很高,证明其 CCM 具有相同的起源^[3]。

2 CCM 的进化

蓝细菌是地球上最古老的生物,出现在距今约 3

亿年前。当时的大气环境中 CO_2 含量高且缺氧,可以想象,最初的 Rubisco 对 CO_2 的亲合力很低。然而,亿万年的光合作用改变了地球的大气组成,氧含量增加而 CO_2 含量减少,植物面临着 CO_2 浓度不能满足 Rubisco 需要的生存压力。自然选择的结果使各种植物朝着两个不同的方向进化。一是较晚出现的陆生高等植物,它们发展出具有高 CO_2 亲合力的 Rubisco,降低光合作用对 CO_2 浓度的要求;二是藻类等较为原始的水生植物,它们或多或少地保留了其祖先的 Rubisco 对 CO_2 亲合力低的特性,但同时发展出一种提高 Rubisco 周围 CO_2 浓度的机制,即 CCM,借此在细胞内造成类似于原始大气的内环境,起着光合反应的“前端”的作用。

3 其他生物类群的 CCM

除蓝细菌以外,CCM 也存在于各种真核微藻 (microalgae) 及大型藻类 (macrophyte) 之中^[1,18-20]。微藻 CCM 研究中所取得的一个重要进展是发现其叶绿体中的蛋白核 (pyrenoid, 又称淀粉核) 在组成及功能上都可能是与羧化体相类似的结构^[21],而在此之前,它也一直被认为是一种储藏器官。这意味着真核微藻 CCM 的原理与蓝细菌可能是基本相似的,然而由于叶绿体的存在使细胞内的分室增加,微藻的 CCM 的运行机制比蓝细菌更为复杂^[22,23],目前尚无公认的普遍模式。但似乎可以肯定的是,叶绿体本身已能够进行 Ci 的浓缩^[24]。

大型藻类的 CCM 机理与单细胞藻类有很大的差异。在进行 Ci 浓缩时,其细胞之间出现了功能上的分化,或单个细胞的不同侧面出现了极性的分化 (叶状体为单层细胞的藻类),其机理主要与利用水体中的 HCO_3^- 有关。很多大型藻类还具有类似于陆生 C_4 及 CAM 植物的代谢途径^[25]。在此不详述。

微藻和大型藻类的 Rubisco 的 K_m, CO_2 通常比蓝细菌低,它们一般只在碳源短缺的情况下才会开动 CCM,而蓝细菌 CCM 无论在何种碳源条件下都处于活动状态,只有强度的差别^[3]。

4 CCM 的生态意义

在自然环境中,由于蓝细菌 Rubisco 的 K_m, CO_2 ($>150 \mu\text{mol/L}$) 与水体 CO_2 浓度 (与大气平衡时约 $15 \mu\text{mol/L}$) 之间存在巨大差距,CCM 的运转对于蓝细菌的生存是必不可少的。同时它也相当于一种内稳态机制,使生物体能够适应各种 CO_2 条件。蓝

菌对环境的极强适应力及其生态广布性都与 CCM 的作用密不可分。海水中 HCO_3^- 浓度高而稳定 (约 2 mmol/L), 利用 HCO_3^- 作为碳源的能力具有重要的适应意义。

从酶动力学的角度来看,在同一类酶中, K_m 值高的通常也具有较高的最大反应速度。因此蓝细菌依靠较少量的 Rubisco 已能满足光合作用的需要,在 Rubisco 上的氮素投入减少,从而在氮源缺乏的水体中更具竞争优势^[3,25]。实际上,在大洋区等贫营养的海区,蓝细菌等 pico 级的微生物成为最主要的初级生产者。

Rubisco 周围高浓度的 CO_2 能极大地抑制光呼吸,提高光合效率^[3]。实际上,在蓝细菌等 CCM 植物中,很难测到光呼吸。这一点和陆生的 C_4 及 CAM 植物很相似。

CCM 由光供能,其运转与否必将影响生物体利用光的效率。最近有实验表明,某些蓝细菌在 CCM 开动时,在细胞和其周围环境之间有非常显著的 Ci 循环现象,即 Ci 会大量地以 CO_2 的形式泄漏出细胞,但又马上被重新吸收。如此,转运中耗费的能量似乎被“浪费”了。对此现象的一种解释认为,在光照太强的情况下,CCM 可能同时也起着耗散多余能量,从而使光系统免受强光伤害的作用^[26]。

5 展望

目前有关蓝细菌 CCM 的知识大多都是在实验室内获得的,野外工作仍很缺乏。然而,生物体在实验室条件下表现出来的行为往往与在自然环境中的行为有很大的差异。因此,要完整地认识 CCM 的生态功能,仍有大量的野外工作要做。蓝细菌是大洋区的主要初级生产者,而 CCM 与其光合作用过程是密不可分的。阐明二者之间的关系有助于正确估计这些海区的初级生产力^[27]。

一个令人感兴趣的问题是,目前大气中 CO_2 的浓度不断上升,会对海洋初级生产带来多大的影响? CCM 存在于多数海洋初级生产者,由于它相当于一种内稳态机制,而使生物体对外界 CO_2 浓度的变化不甚敏感,因此,很多意见认为即使大气中 CO_2 浓度倍增,海洋初级生产也不会有明显的变化^[11]。也有人认为,并不是所有的海洋初级生产者都有 CCM,若它们依靠 CO_2 的扩散来获得碳源,则大气 CO_2 浓度的增高会刺激初级生产力的增长^[9,28]。

对于蓝细菌 CCM 仍有许多生理细节有待进一步的研究。如 CCM 的调控机理,供能机理,羧化体的内部空间结构等,另外,光对 CCM 运转的影响也

是人们所做工作甚少的一个领域,它将是未来 CCM 研究发展的方向之一。

参考文献

- 1 Raven J A. Inorganic carbon assimilation by marine biota. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1996, 203: 39-47
- 2 Salon C, Mir N A, Canvin D T. Influx and efflux of inorganic carbon in *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Cell Environ*, 1996, 19: 260-274
- 3 Price G D, Stütemeyer D, Klughammer B, et al. The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Can J Bot*, 1998, 76: 973-1 002
- 4 Bonfil D J, Ronen Tarazi M, Stütemeyer D, et al. A putative HCO₃⁻ transporter in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *FEBS Letters*, 1998, 430: 236-240
- 5 Stütemeyer D, Klughammer B, Badger M R, et al. Fast induction of high affinity HCO₃⁻ transport in cyanobacteria. *Plant Physiol*, 1998, 116: 183-192
- 6 Ritchie R J. Driving forces for bicarbonate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (PCC7942). *Plant Physiol*, 1996, 112: 1 573-1 584
- 7 So A K C, Kassam A, Espie G S. Na⁺ dependent HCO₃⁻ transport in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Can J Bot*, 1998, 76: 1 084-1 091
- 8 Tyrrell P N, et al. Ethoxymethylamine differentially inhibits CO₂ uptake and Na⁺-independent and Na⁺-dependent HCO₃⁻ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. UTEX 625. *Plant Physiol*, 1996, 112: 79-88
- 9 Okamura M, Price G D, Badger M R, et al. The *cmpABCD* genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 encode a HCO₃⁻ transporter. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(Suppl): 30
- 10 Fridlyand L, Kaplan A, Reinhold L. Quantitative evaluation of the role of a putative CO₂-scavenging entity in the cyanobacteria CO₂-concentrating mechanism. *Biosystems*, 1996, 37: 229-238
- 11 Kaplan A, Reinhold L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 539-540
- 12 Li Q, Canvin D T. Energy sources for HCO₃⁻ and CO₂ transport in air-grown cells of *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1 125-1 132
- 13 Ohkawa H, Sonoda M, Katoh H, et al. The use of mutants in the analysis of the CO₂-concentrating mechanism in cyanobacteria. *Can J Bot*, 1998, 76: 1 035-1 042
- 14 Hassidim M, Keren N, Ohad I, et al. Acclimation of *Synechococcus* strain WH7808 to ambient CO₂ concentration and to elevated light intensity. *J Phycol*, 1997, 33: 811-817
- 15 吴天福,刘永定,宋立荣. 蓝藻高 CO₂ 需求突变株的研究进展. *水生生物学报*, 1999(1): 20
- 16 Ronen Tarazi M, Bonfil D J, Schatz D, et al. Cyanobacterial mutants impaired in bicarbonate uptake isolated with the aid of an inactivation library. *Can J Bot*, 1998, 76: 942-948
- 17 Kaneko T, Sato S, Kotani H, et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803.II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res*, 1996, 3: 109-136
- 18 Nimer N A, Merrett M J. The development of a CO₂-concentrating mechanism in *Emiliania huxleyi*. *New Phytol*, 1996, 133: 383-389
- 19 Nimer N A, Iglesias-Rodríguez M D, Merrett M J. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species. *J Phycol*, 1997, 33: 625-631
- 20 Tortell P D, Reinfelder J R, Morel F M. Active uptake of bicarbonate of diatoms. *Nature*, 1997, 390: 243-244
- 21 Morita E, Kuroiwa H, Kuroiwa T, et al. High localization of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the pyrenoids of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy. *J Phycol*, 1997, 33: 68-72
- 22 Fridlyand L. Models of CO₂ concentrating mechanism in microalgae taking in account cell and chloroplast structure. *Biosystems*, 1997, 44: 41-57
- 23 Raven J A. A direct role for thylakoid lumen acidification? *Plant Cell Environ*, 1997, 20: 147-154
- 24 Moroney J V, Chen Z Y. The role of the chloroplast in inorganic carbon uptake by eukaryotic algae. *Can J Bot*, 1998, 76: 1 025-1 034
- 25 崔继林. 光合作用与生产力. 江苏科学技术出版社, 2000. 125-142
- 26 Tchernov D, et al. A Sustained net CO₂ evolution during photosynthesis by marine microorganisms. *Current Bio*, 1997, 7: 723-728
- 27 Kaplan A, et al. The inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria: induction and ecological significance. *Can J Bot*, 1998, 76: 917-924
- 28 Hein M, Sand Jensen K. CO₂ increases oceanic primary production. *Nature*, 1997, 388: 526-527

(本文编辑:张培新)