



水生植物 RuBisCO 基因的趋同演化*

曹阳, 贺雄雷, 王建国

中山大学生命科学院, 广东 广州 510275

摘要: 植物碳固定, 作为碳循环中的核心环节, 对全球粮食产量与气候变迁具有深远影响。在此过程中, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBisCO)的作用举足轻重。其催化速率与特异性间存在微妙的平衡: 特异性降低, 催化速率上升, 但副反应中的有毒副产物亦随之增多, 从而影响整体效率。然而, 水生植物却拥有独特的CO₂富集机制, 有效减少了副反应的影响, 为酶创造了优越的工作环境。本文以高等水生植物入水事件为切入点, 深入研究了其核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基蛋白的趋同进化。旨在寻找与入水事件紧密相关的趋同进化位点, 并探究CO₂富集机制下该酶理化性质的变化, 为酶的优化提供新思路。收集了泽泻目、唇形目、虎耳草目、水韭目、山茱萸目和金鱼藻目等6个目共48个物种的酶蛋白质序列信息, 并确定了6次关键的入水事件。采用PCOC分析方法, 整合了这6次入水事件的数据, 深入剖析了水生植物的进化趋势。分析结果显示, 水生植物中可能存在一个关键的趋同进化位点, 位于蛋白质序列的第328号位置, 紧邻酶的活性中心。推测该位点的替换可能增强了反应底物进入活性中心区域的灵活性, 使CO₂更易进入, 从而提升了酶的催化速率。这一发现为后续的酶改进突变实验指明了方向, 提供了坚实的理论依据。研究成果不仅有助于优化该酶的催化效率和适应性, 也为深入研究植物碳固定机制提供了新的视角。

关键词: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶; 高等水生植物入水事件; CO₂富集机制; 趋同进化

中图分类号: Q33 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2024)06-0161-10

Convergent evolution of RuBisCO genes in aquatic plants

CAO Yang, HE Xionglei, WANG Jianguo

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: The fixation of carbon in plants is a crucial step in the carbon cycle, significantly impacting global food production and climate change. Within this process, the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase enzyme plays a pivotal role. There exists a delicate balance between the enzyme's catalytic rate and its specificity: as the specificity decreases, the catalytic rate rises, but this is accompanied by an increase in toxic by-products from side reactions, ultimately affecting overall efficiency. However, aquatic plants possess a unique mechanism for carbon dioxide enrichment, effectively minimizing the impact of side reactions and creating a more favorable environment for the enzyme. Using the submergence events of higher aquatic plants as a starting point, we comprehensively studied the convergent evolution of the large subunit protein of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO) in these plants. Our aim was to identify convergent evolutionary sites related to submergence events and explore changes in the enzyme's physicochemical properties following the emergence of the carbon dioxide enrichment mechanism, providing new insights for optimizing the enzyme. We collected protein sequence information for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from 48 species belonging to

* 收稿日期: 2024-06-07 录用日期: 2024-08-09 网络首发日期: 2024-09-26

作者简介: 曹阳(1994年生), 男; 研究方向: 进化生物学; E-mail: caoy88@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 王建国(1992年生), 男; 研究方向: 进化生物学; E-mail: wangjg36@mail.sysu.edu.cn

全文阅读



ZR20240195

six orders: Alismatales, Lamiales, Saxifragales, Hydrocharitales, Cornales, and Ceratophyllales, and identified six submergence events. Employing the PCOC analysis method, we integrated data from these six submergence events to investigate common evolutionary trends in aquatic plants. Our analysis revealed the potential existence of a convergent evolutionary site in aquatic plants, located at position 328 in the protein sequence, adjacent to the enzyme's active center. We hypothesize that substitutions at this site may enhance the flexibility of controlling the entry of reaction substrates into the active center, thereby facilitating the entry of carbon dioxide and increasing the enzyme's catalytic rate. The discovery of this convergent evolutionary site provides a research direction and theoretical basis for subsequent enzyme improvement and mutation experiments. Our findings will contribute to further optimizing the catalytic efficiency and adaptability of this enzyme.

Key words: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase; submergence events of higher aquatic plants; carbon dioxide enrichment mechanism; convergent evolution

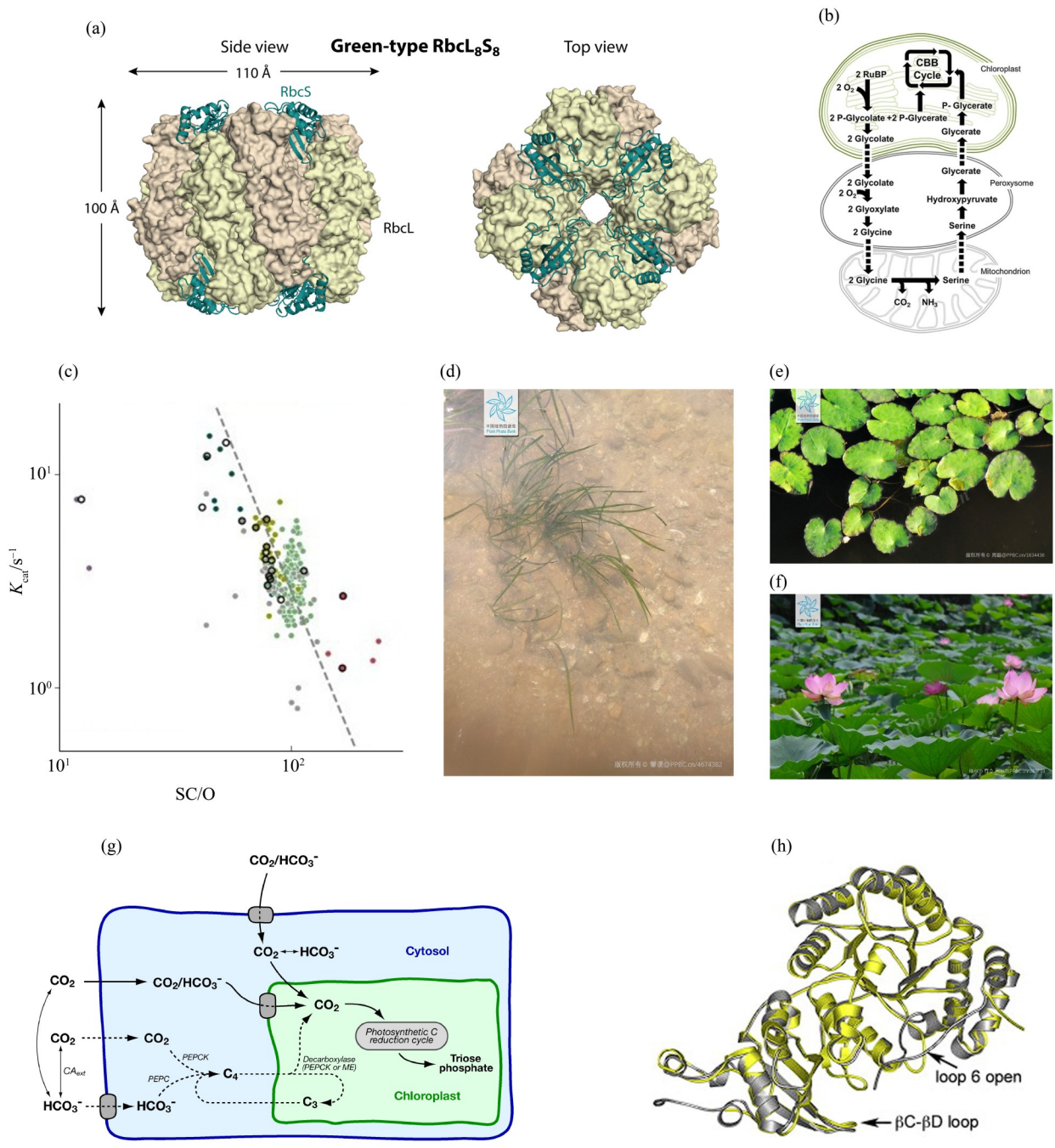
地球上绝大多数生命体依赖于碳固定, 每年碳固定的总量高达约 2 500 亿 t (Field et al., 1998)。碳固定将无机碳转化为生命体可利用的有机碳, 其中光合作用便是至关重要的碳固定途径。核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(简称 RuBisCO)是光合作用中的核心酶(图 1a)。作为暗反应阶段的限速酶(Feller et al., 2008), RuBisCO 利用光反应阶段的产物将气态 CO₂ 分子固定在有机多碳糖中。然而, 除了 CO₂, O₂ 也可作为反应底物参与该酶的催化反应, 导致副反应产生有毒产物, 消耗大量光反应阶段产生的能量, 严重影响整体碳固定的效率(Moroney et al., 2013)(图 1b)。此外, 尽管该酶的催化速率随特异性降低而提高(Flamholz et al., 2019), 但这种降低特异性的做法反而会增加副反应发生的概率, 降低整体工作效率(图 1c)。因此, 尽管在大多数情况下 RuBisCO 需要保持较高的特异性, 但这也限制了其工作效率, 进而影响了整体的碳固定速度。为提升 RuBisCO 的整体催化效率, 我们需寻求新的方法来突破其催化效率的限制。尽管 RuBisCO 高度保守, 但深入探究其起源、结构与功能等方面, 有望找到突破酶催化效率限制的新途径。

RuBisCO 的起源可追溯至约 35 亿年前(Iñiguez et al., 2020), 当时地球大气处于无氧状态, CO₂ 含量极高。在这样的环境下, 酶的工作条件优越, 丰富的 CO₂ 底物使其无需担忧 O₂ 参与产生的副反应对效率的影响。然而, 随着时间的演进和大气环境的变迁, CO₂ 含量逐渐降低, 而 O₂ 含量则逐渐上升, 成为当今大气的主要成分之一。这一环境转变对酶构成了挑战, 高 O₂ 含量引发了更多的副反应, 迫使酶逐渐提升特异性以应对这些影响。然而, 尽管特异性有所提高, 但受限于

多种因素, 酶在催化效率上仍显不足, 导致整体工作效率受到制约。

某些生物为适应环境演化出了 CO₂ 富集机制, 典型代表便是水生植物(Giordano et al., 2005; Khan et al., 2011; Klavnsen et al., 2011)(图 1d~f)。如图 1g 所示, 这些植物能够吸收水体中的 CO₂ 以及 HCO₃⁻ 等离子态 CO₂, 以 CO₂ 或 HCO₃⁻ 的形式储存于细胞内, 或利用 C4 途径暂时将 CO₂ 固定在四碳糖中。当 RuBisCO 工作时, 这些储存的 CO₂ 得以释放, 为酶营造一个 CO₂ 高含量的环境, 从而帮助酶尽可能摆脱限制, 适度提升工作效率(Capó-Bauçà et al., 2022; Larkum et al., 2017)。水生植物的起源并非单一进化事件的结果, 而是不同水生植物在各自的入水事件中逐渐演化而来, 涉及多个不同的植物科属种。由于所处区域环境、形态特征的差异, 这些水生植物的碳固定机制及 RuBisCO 性质也会有所不同。然而, 它们共同生活于水下环境, 因此在多个方面, 如 RuBisCO 的性质上, 也展现出相似之处。这种各自独立的物种在相似的选择压力下进化出相似性状表型的现象, 通常被称为趋同进化。

本研究旨在深入剖析高等水生植物中 RuBisCO 的适应性趋同进化机制。为此, 我们特别选取了水生植物的 RuBisCO 大亚基蛋白序列作为研究对象, 并致力于探寻与 RuBisCO 性质变化紧密相关的进化位点。通过这一研究, 我们期望能够揭示沉水水生植物在适应水下环境过程中, RuBisCO 的进化奥秘。通过深入探索这些进化位点, 我们不仅可以更加清晰地理解 RuBisCO 性质与 CO₂ 富集机制之间的内在联系, 还能为提升该酶的工作效率提供宝贵的启示和指导。



(a) RuBisCO 的结构(Bracher et al.,2017); (b) RuBisCO 的代谢通路及副反应(Zelitch et al.,2009); (c) RuBisCO 的效率和特异性呈现负相关(Flamholz et al.,2019); (d) 沉水植物示例,植物根茎叶全部沉于水下, CO₂吸收依赖水体环境; (e) 浮水植物示例, 叶片浮于水面, 可从空气以及水体中吸收 CO₂; (f) 挺水植物示例, 部分根茎位于水面下, 叶片位于水面上, 吸收 CO₂的方式与浮水植物相似; (g) 水生植物可以利用水中的 CO₂以及碳酸氢根, CO₂可以通过气体扩散进入细胞内部也可以通过表面离子泵进入细胞, 碳酸氢根通过离子泵进入细胞内重新转换为 CO₂, CO₂可经由一系列反应转化为四碳化合物。经过这一过程 CO₂被富集于细胞内部, 在需要 CO₂时, 4C 化合物重新转换为 3C 化合物释放 CO₂供水生植物使用(Giordano et al.,2005); (h) RuBisCO 的大亚基(Bracher et al.,2017); 带“”标识的图片均来自中国植物图像志; 1 Å = 0.1 nm。

图1 高等水生植物中 RuBisCO 简介

Fig. 1 Overview of RuBisCO in higher aquatic plants

1 材料与方法

1.1 材料

本研究将水生植物限定为沉水水生植物,以便更精确地探讨其适应水下环境的机制。水生植物根据形态特征可分为沉水植物、挺水植物与浮水植物,如图 1d~f 所示。挺水植物与浮水植物的叶片位于水面上,它们主要通过空气吸收 CO_2 ,与陆生植物的吸收方式相似。然而,沉水植物的情况有所不同,其大部分组织位于水面下方,因此依赖水下环境进行 CO_2 的吸收,这与本研究的背景高度契合。为深入探究水生植物 RuBisCO 的进化过程,我们将选取亲缘关系较近的陆生植物作为对照,模拟水生植物起源前的祖先植物。在序列选择上,将重点关注 RuBisCO 的大亚基蛋白序列(图 1h),这些序列信息将从 Uniprot 数据库中获取。植物 RuBisCO 主要由大亚基和小亚基的多聚体构成,其中与催化反应直接相关的活性中心位于两个大亚基彼此构成的二聚体中心部位 (Andersson et al., 2008)。大亚基中包含了与催化性质密切相关的结构区域,而小亚基则主要起到稳固多聚体的作用 (Spreitzer, 2003)。为确保研究的准确性和可靠性,我们将大亚基蛋白序列的长度限定为大于 475 个氨基酸残基数,当序列长度达到这一标准时,将包含足够的信息以进行深入分析。

1.2 方法

1.2.1 序列多重比对及构建系统发育树 本研究将水生植物与陆生植物依据各自的入水事件分为水生组和陆生组,以便进行深入对比。在序列分析中,我们将采用 Clustalo 工具进行序列的多重比对 (Sievers et al., 2018),以揭示不同组别之间的序列差异。比对完成后,我们将利用 iqtree2 软件 (Minh et al., 2020) 构建系统发育树,进而构建代表此次入水事件的水生与陆生祖先序列,以探究水生植物在进化过程中与陆生植物的差异与联系。

对于多次入水事件的祖先序列,我们将统一整合并再次进行序列多重比对,以全面揭示水生植物在不同入水事件中的进化轨迹。为了提高趋同进化分析的精确度,我们将根据分析需求,利用 ProtParCon 工具 (Yuan et al., 2019) 对序列中的插入与缺失进行裁剪,确保分析结果的准确性与可靠性。

1.2.2 趋同进化分析方法 趋同进化分析旨在探究特定蛋白序列在趋同进化过程中是否呈现出相

似的、具有共同趋势的突变替换。趋同进化位点可细分为两类:类型一与起源同步发生,而类型二则在趋同进化物种起源后才显现。

在趋同进化分析中,我们采用 PCOC 模型 (Rey et al., 2018),该模型融合了 PC 模型与 OC 模型的优势,利用蛋白序列的多重比对结果与系统发育树,精准预测具有趋同进化性质的位点。其中,OC 模型对类型一的前景趋同进化位点尤为敏感,而 PC 模型则能更精确地识别类型二的前景趋同进化位点。PC 模型强调分化后的趋同进化物种与原先状态相比,替换未必单一,而是符合蛋白质基序的概念。

PC 模型利用贝叶斯模型,计算每个位点 i 关于 M_0 模型的似然度 $P(s_i | M_0)$,关于 M_1 模型的似然度 $P(s_i | M_1)$,计算关于 M_1 模型后验概率 $P(M_1 | s_i) = P(s_i | M_1) / (P(s_i | M_1) + P(s_i | M_0))$ 。最终后验概率大于 0.9 则判定该位点为阳性趋同进化位点。

OC 模型则侧重于每次趋同进化中,物种分化形成时至少产生一个替换位点。它认为一个位点在已存在的分支上至少发生一次替换事件,即有条件地存在至少一个替换的事件。为计算 OC 模型下的可能性,需考虑在马可夫模型下,分支长度 T 上至少发生一次更改(替换)的概率。 X 表示遵循该模型的过程, $X(t)$ 为时刻 t 的状态, Q 为模型的生成器(可以使用任何常用的序列演化模型),在时间 T 内以 i 为索引的行和 j 为索引的列的转移矩阵为

$$M(T) = \left(\left(P(X(T) = j | X(0) = i) \right)_{i,j} \right).$$

用 τ 表示第一次变化的(随机)时间。假设在分支上至少有一个变化意味着 $\tau < T$ 。所以条件依赖于 $\tau < T$ 的转移矩阵为

$$M_c(T) = \left(\left(P(X(T) = j | \tau < T, X(0) = i) \right)_{i,j} \right).$$

如果同时考虑状态 i 与状态 j , 则

$$P(X(T) = j | \tau < T, X(0) = i) = \frac{P(X(T) = j, \tau < T | X(0) = i)}{P(\tau < T | X(0) = i)}.$$

进一步, $\tau \geq T$ 意味着在此分支上没有发生任何改变,此时从状态 i 开始, $P(\tau \geq T | X(0) = i) = e^{-q_i T}$; 同理,此时存在 $P(\tau < T | X(0) = i) = 1 - e^{-q_i T}$ 。考虑分子,如果 $i \neq j$, 当 $X(0) = i$ 且 $X(T) = j$, 在这个分支上存在一次替换事件; 也就是说, $\tau < T$ 时, 则存在

$$P(X(T) = j, \tau < T | X(0) = i) =$$

$$P(X(T) = j | X(0) = i) = \mathbf{M}(T)_{ij}.$$

最终可以得出 OC 模型的评判后验概率, 后验概率越接近 1 说明该位点越为可信的 OC 模型判定的类型 1 趋同进化位点。

PCOC 分析的结果会提供多个预测参数。其中, 与 Indel_prop 相关的两个参数指示了该位点发生缺失或插入的可能性。由于本研究已对多序列比对数据进行了预处理, 这两个参数应为 0, 即不存在缺失或插入的情况。此外, PCOC_V1 是 OC 模型与 PC 模型联合使用的期望值, PC_V1 是 PC 模型的期望值, OC_V1 是 OC 模型的期望值。这 3 个期望值越接近 1, 表明分析得到的趋同进化位点越可靠。

1.2.3 酶性质预测 为了验证预测得到的趋同进化位点与酶性质变化之间的关联性, 我们面临着诸多挑战。酶参数的测量结果受到多种复杂因素的影响, 包括不同的测量方法以及催化环境模拟的细微差异, 这使得酶参数的比较变得异常棘手。此外, 水生植物与陆生植物之间的酶参数信息不仅存在差异, 而且可供参考的数量也相当有限, 仅有少数可靠的酶参数信息可供我们使用。

鉴于此, 我们决定采用基于 RuBisCO 大亚基蛋白序列信息来推测酶参数的机器学习模型 (Iqbal et al., 2023)。在模型训练过程中, 我们使用了 165 种与催化速率紧密相关的 K_{cat} 值, 以及 170 种与特异性相关的 SC/O 值, 并同时收集了相应的 RuBisCO 大亚基蛋白序列信息。其中, K_{cat} 值的增加意味着 RuBisCO 的催化速率提升, 而 SC/O 值的增加则反映了 RuBisCO 特异性的增强。在训练初期, 我们运用特定的机器学习模型, 将 RuBisCO 大亚基蛋白序列转化为二进制数字向量, 实现序列信息的数字化表示。鉴于数据量有限, 我们最终采用了高斯分布回归模型对酶参数信息进行预测, 以期更准确地揭示趋同进化位点与酶性质变化之间的潜在联系。

2 结果

2.1 确认多次入水事件

本研究在高等植物的 6 个目中, 共发现了 6 次独立的入水事件, 这些事件分别发生在泽泻目、唇形目、虎耳草目、水韭目以及山茱萸目等。其中, 泽泻目尤为引人注目, 作为目前最大的水生植物目, 它囊括了所有海洋水生植物、大部分淡

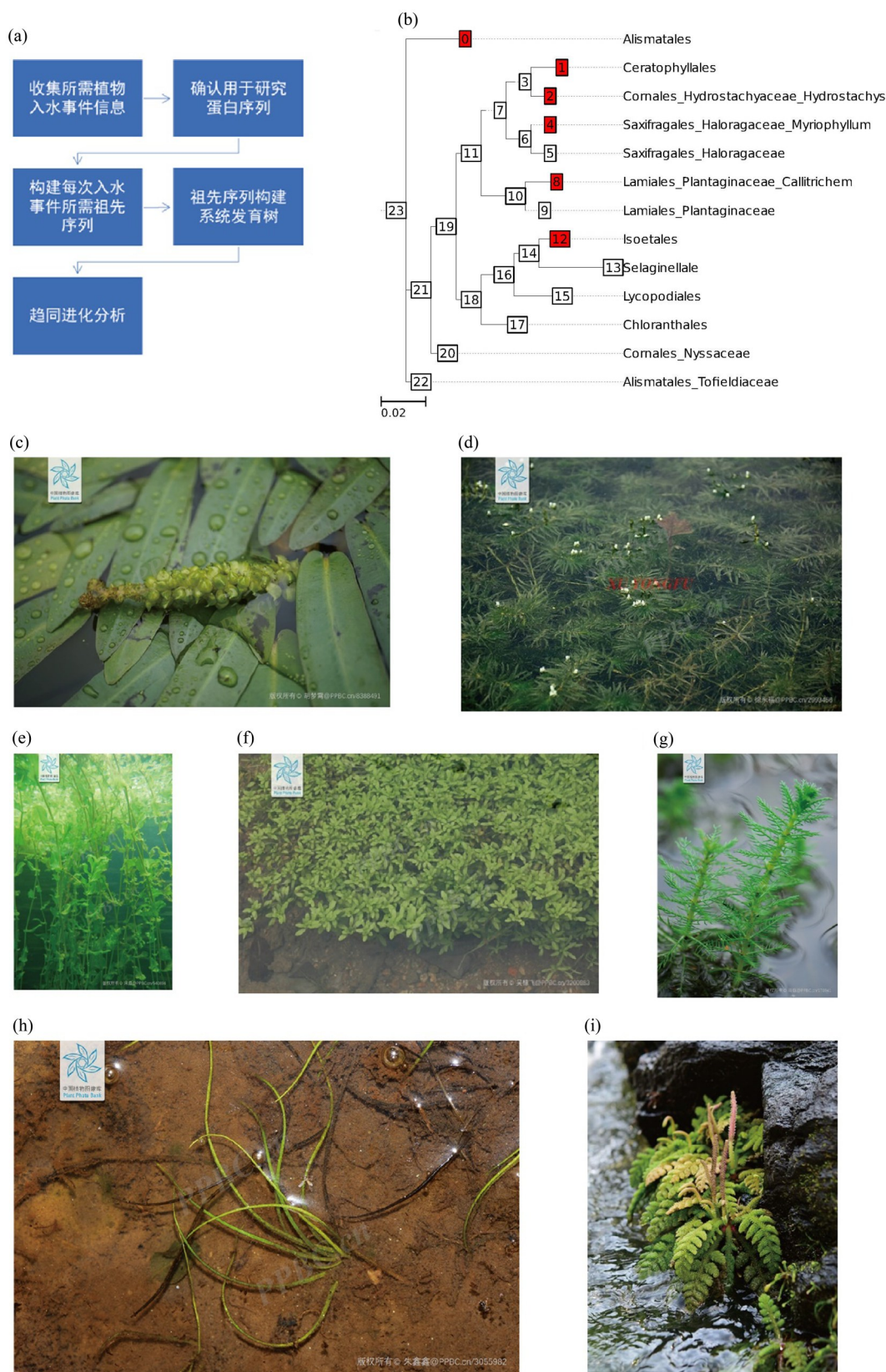
水水生植物以及少量陆生植物。在泽泻目中, 确认的沉水水生植物科有水藻科、丝粉藻科、水鳖科、大叶藻科、川蔓草科、海神草科和眼子菜科等。鉴于泽泻目的独特性, 我们选择了其下的陆生植物科岩菖蒲科以及金粟兰目作为对照。唇形目中, 水生植物主要分布于车前科的水马齿属, 为了进行对比研究, 我们选取了车前科的其他属物种作为陆生对照。同样, 虎耳草目中也记录了一次独立的入水事件, 发生在小二仙草科下。其中, 狐尾藻属作为小二仙草科下的沉水水生植物属, 我们选择了同科的其他陆生植物作为对照。此外, 石松纲下的水韭目也被确认为沉水水生植物目, 这次入水事件的研究中, 我们选取了同纲下的卷柏目与石松目的陆生植物作为对照。山茱萸目下的水穗草科是沉水水生植物科, 对于这次入水事件, 我们则选取了山茱萸目下的其他陆生植物科作为对照。值得注意的是, 金鱼藻目也被确认为水生植物, 但由于其符合条件的数据较为有限, 不足以单独作为一次入水事件来构建共同祖先序列和共同系统发育树 (图 2a)。尽管如此, 我们仍尝试将其纳入分析中, 以期获得更全面的研究结果。如图 2b 所示, 这些入水事件及其对照关系在图中得到了清晰的展示。代表性植物如图 2c, i 所示。

2.2 祖先序列多重比对结果

我们首先针对每次入水事件进行序列比对, 以获得每次入水事件对应的水生植物和陆生植物的祖先序列 (图 3a~g); 然后, 将多次入水事件的水生与陆生植物祖先序列进行了整合, 并进行了多重序列比对。比对结果表明, 水生植物的 RuBisCO 大亚基蛋白序列在进化过程中保持了一定的保守性, 其中大部分位点呈现一致性。然而, 我们也观察到部分突变位点集中出现在活性中心位点附近 (图 4a)。这些位点的突变可能与酶的性质变化密切相关, 因此我们推测它们可能是影响酶活性的关键位点。在后续的研究中, 我们将重点关注这些区域, 预测可能存在的趋同进化位点, 以进一步揭示水生植物 RuBisCO 的进化机制。

2.3 趋同进化分析结果

根据 PCOC 分析的结果, 如图 4 所示, 我们发现了可能的趋同进化位点——328 号位点 (裁剪后 318 号位点)。在水生植物中, 该位点的氨基酸由丙氨酸转变为丝氨酸。进一步查阅表 1, 可以看到, OC 模型预测该位点的后验概率接近 0.99, 而




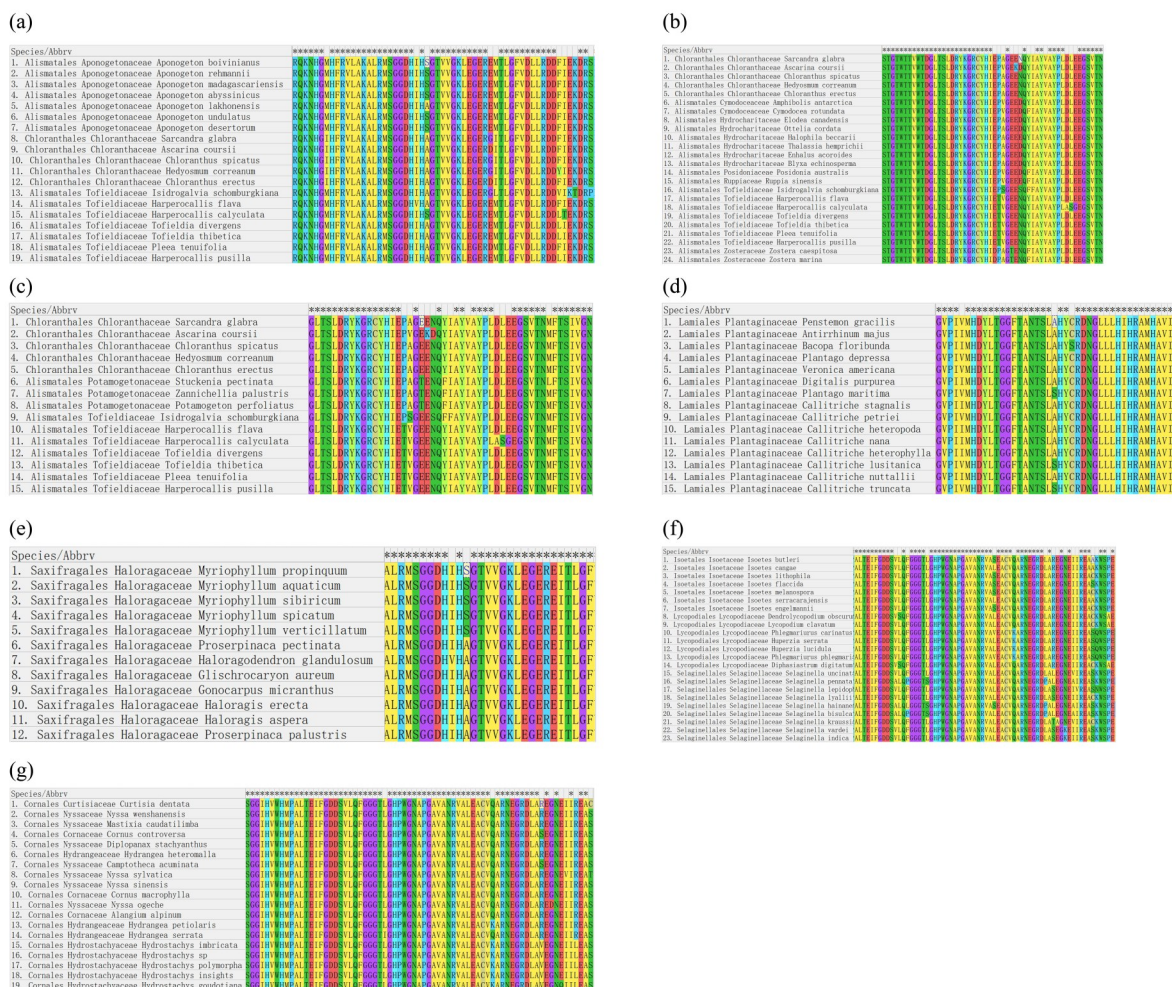
(a) 整体研究分析思路; (b) 用于研究的各次入水事件水生植物共同祖先序列与陆生植物共同祖先序列构建的系统发育树, 图中标红部分为水生植物共同祖先序列; (c~i) 入水事件水生植物示例, 依次为: 水薹科(泽泻目)、水鳖科(泽泻目)、眼子菜科(泽泻目)、水马齿属(车前科)、狐尾藻属(小二仙草科)、水韭目、水穗草科(山茱萸目); 图片 i 由叶建飞拍摄; 带“”标识的图片均来自中国植物图像志。

图 2 入水事件祖先序列系统发育树构建

Fig. 2 Phylogenetic tree construction of ancestral sequences of water entry events



(a~g) 对应图 2c~i 每次入水事件的水生植物和陆生植物的序列比对结果。

图 3 入水事件序列比对结果

Fig. 3 Sequence alignment results of water entry events

PC 模型预测的后验概率为 0.5。当使用 PCOC 综合模型进行预测时, 其概率约为 0.96。这些综合模型的预测结果强烈指向一个结论: 该位点很可能属于类型一的趋同进化位点, 即它是在水生植物起源时就产生的。值得注意的是, 这一位点位于活

性中心附近的 6 号环区结构中, 该结构对于反应底物进入活性中心的速率起着关键作用。因此, 我们推测该位点的突变可能改变了该区域的结构性质, 进而影响了酶的活性。

表 1 PCOC 分析结果

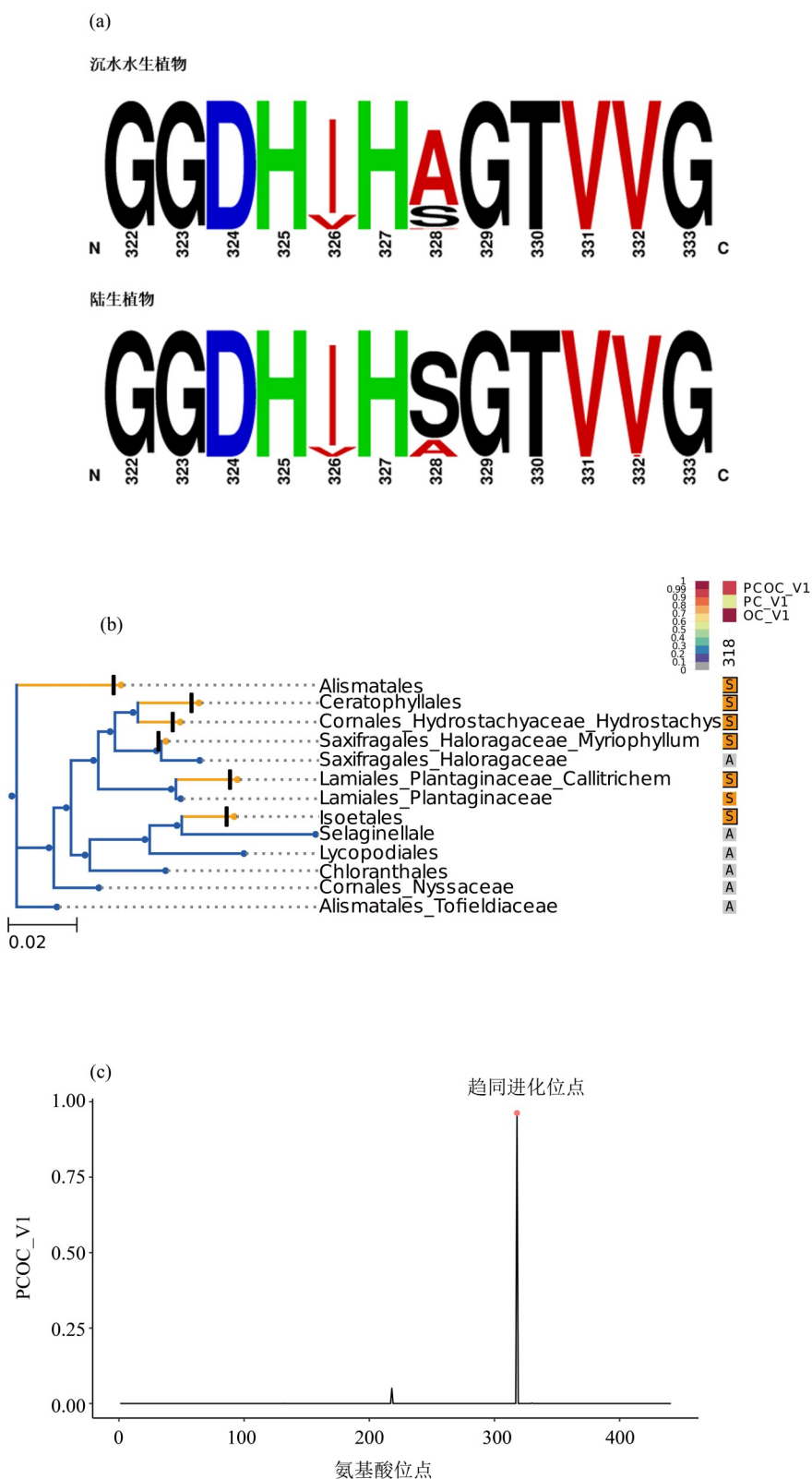
Table 1 PCOC analysis results

Sites	Indel_prop	Indel_prop (ConvLeaves)	PCOC_V1	PC_V1	OC_V1
318	0	0	0.962 589	0.5	0.992 729

2.4 趋同进化位点对酶性质的影响

本研究采用先进的机器学习模型, 对陆生与水生植物的 RuBisCO 大亚基蛋白序列进行了酶性质预测, 旨在深入探究入水事件趋同进化过程中酶性质的变化。我们成功预测了 103 条序列对应的酶性质信息, 并基于 328 号位置的氨基酸残基将其

分为丝氨酸组和丙氨酸组。进一步观察两组中酶参数 K_{cat} 和 SC/O 的差异, 以明确该趋同进化位点对酶性质的潜在影响。如图 5 所示, 经过详细比较, 我们发现在丝氨酸组中, RuBisCO 的催化速率 K_{cat} 略高于丙氨酸组。尽管丝氨酸组的 SC/O 值略低于丙氨酸组, 但两组之间的差异并不显著。



(a) 328号趋同位点附近的基序情况；(b) 基于系统发育树的突变位点处氨基酸展示, 该位点在水生植物组中为丝氨酸, 陆生植物组中为丙氨酸；(c) 为蛋白序列各位点PCOC模型预测后验概率值, 横坐标为该蛋白对应的每个氨基酸位点, 纵坐标为预测概率值。

图4 PCOC趋同进化分析结果
 Fig. 4 PCOC convergent evolution analysis results

这可能是由于 RuBisCO 的保守性较高, 亲缘关系相近的 RuBisCO 在酶性质上不会表现出较大的差异。

综合上述预测结果, 我们可以推测, 水生植物中 328 号位点由丙氨酸替换为丝氨酸后, 酶的结构可能发生了细微的调整, 从而使 RuBisCO 能够适当提高催化速率, 优化整体的碳固定工作效率。这一发现为我们深入理解水生植物趋同进化过程中酶性质的变化提供了重要线索。

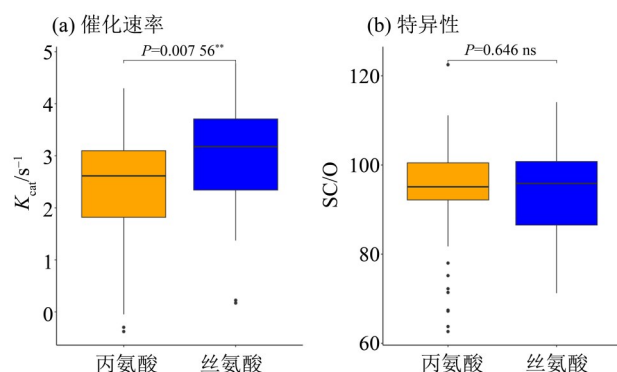


图5 趋同进化位点(328号位点)氨基酸差异对酶性质的影响

Fig. 5 Effects of amino acid differences at convergent evolutionary sites (site 328) on enzyme properties

3 讨论

RuBisCO, 作为光合作用中的核心限速酶, 其催化效率深刻影响着植物的碳固定能力。尽管该酶拥有悠久的进化历程, 但其催化效率仍相对偏低, 因此改进 RuBisCO 一直是科研领域的重点探索方向。然而, RuBisCO 的催化速率与特异性之间存在微妙的平衡, 提高催化速率往往伴随着特异性的降低, 导致氧气更多地参与副反应, 进而削弱整体催化效率。

在本研究中, 我们收集了来自 6 个目、12 个属、共计 48 种沉水水生植物的 RuBisCO 大亚基蛋白质序列。经过深入分析, 我们确定了一个显著的趋同进化位点, 即位于蛋白质序列第 328 位的氨基酸, 结构上则对应于 6 号环区。这一趋同进化位点的存在表明, 在不同的环境选择压力下, RuBisCO 能够在多样化的水生环境中进化出相似的特性, 以适应这些特定环境。基于 RuBisCO 大亚基序列的酶性质预测结果显示, 当该位点突变为丝氨酸时, 催化速率会有所提升, 而特异性则略有下降。尽管这些结果并非基于实际的酶性质

测量数据, 但预测结果仍具备一定的参考价值。

为了更直观地验证该位点对酶性质的影响, 后续可开展 RuBisCO 的突变实验, 探究突变对酶结构的具体影响。在完成突变实验后, 还可进一步进行酶活性相关的实验, 以验证突变位点对酶活性的确切影响, 从而为本研究的分析和成果提供更为坚实的支持证据。

RuBisCO 性质的变化揭示了沉水水生植物与陆生植物在 CO₂ 利用方式上的差异。由于水下环境与空气环境迥异, 水中的 CO₂ 扩散系数远低于空气, 沉水水生植物无法像陆生植物那样有效地收集 CO₂。它们的叶片通常缺乏气孔结构, 并呈现线形, 这些形态学特征也反映了水生植物叶片功能的独特性。已有研究指出, 泽泻目海草中的某些物种具备利用水中碳酸氢盐的能力, 而其他研究也证实了不同水生植物之间存在多样化的 CO₂ 富集机制。

水下 CO₂ 的存在形式复杂多变, 受温度、离子强度和酸碱度等多种因素影响。水生植物生长在多样的水环境中, 包括温带和热带地区的湖泊、海洋和溪流等。此外, 一天中水的状态也会发生变化。还有研究发现, 部分沉水水生植物能够通过根部吸收淤泥中富集的 CO₂, 这可能导致不同地区和不同生存环境的沉水水生植物拥有不同的 CO₂ 富集机制。目前, 对沉水水生植物 CO₂ 富集机制的研究尚不够全面, 部分物种的富集机制仍不明朗。若能补充这方面的数据, 本研究将能更深入地揭示不同沉水水生植物中各异的 CO₂ 富集机制, 并理解其对应的 RuBisCO 进化变化, 为改进 RuBisCO 提供更多有价值的参考。

与沉水水生植物不同, 挺水水生植物与浮水水生植物的部分组织暴露在空气中, 因此可以在空气中进行 CO₂ 的吸收。但同时, 它们也拥有沉水水生植物的水下组织部分, 这使得其 RuBisCO 的工作环境可能与沉水植物有所不同。后续研究可进一步探索挺水植物与浮水植物的趋同进化现象, 揭示其 RuBisCO 是否具备独特的趋同进化性质, 从而丰富我们对 RuBisCO 结构与功能的认知。

综上所述, 本研究从进化学的角度为后续改进 RuBisCO 提供了新的思路。研究中发现的趋同进化位点为酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的突变研究提供了有力的理论依据。

参考文献:

- ANDERSSON I, BACKLUND A, 2008. Structure and function of Rubisco [J]. *Plant Physiol Biochem*, 46 (3) : 275–291.
- BRACHER A, WHITNEY S M, HARTL F U, et al, 2017. Biogenesis and metabolic maintenance of rubisco [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 68: 29–60.
- CAPÓ-BAUÇÀ S, IÑIGUEZ C, AGUILÓ-NICOLAU P, et al, 2022. Correlative adaptation between Rubisco and CO₂-concentrating mechanisms in seagrasses [J]. *Nat Plants*, 8(6): 706–716.
- FELLER U, ANDERS I, MAE T, 2008. Rubiscolytics: Fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated[J]. *J Exp Bot*, 59(7): 1615–1624.
- FIELD C B, BEHRENFELD M J, RANDERSON J T, et al, 1998. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components [J]. *Science*, 281 (5374): 237–240.
- FLAMHOLZ A I, PRYWES N, MORAN U, et al, 2019. Revisiting trade-offs between rubisco kinetic parameters [J]. *Biochemistry*, 58(31): 3365–3376.
- GIORDANO M, BEARDALL J, RAVEN J A, 2005. CO₂ concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 99–131.
- IÑIGUEZ C, CAPÓ-BAUÇÀ S, NIINEMETS Ü, et al, 2020. Evolutionary trends in RuBisCO kinetics and their co-evolution with CO₂ concentrating mechanisms [J]. *Plant J*, 101(4): 897–918.
- IQBAL W A, LISITSA A, KAPRALOV M V, 2023. Predicting plant Rubisco kinetics from RbcL sequence data using machine learning[J]. *J Exp Bot*, 74(2): 638–650.
- KHAN A I, DINH D M, SCHNEIDER D, et al, 2011. Negative epistasis between beneficial mutations in an evolving bacterial population [J]. *Science*, 332 (6034) : 1193–1196.
- KLAVSEN S K, MADSEN T V, MABERLY S C, 2011. Crassulacean acid metabolism in the context of other carbon-concentrating mechanisms in freshwater plants: A review[J]. *Photosynth Res*, 109(1/2/3): 269–279.
- LARKUM A W D, DAVEY P A, KUO J, et al, 2017. Carbon-concentrating mechanisms in seagrasses [J]. *J Exp Bot*, 68(14): 3773–3784.
- MINH B Q, SCHMIDT H A, CHERNOMOR O, et al, 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era [J]. *Mol Biol Evol*, 37(5): 1530–1534.
- MORONEY J V, JUNGnick N, DIMARIO R J, et al, 2013. Photorespiration and carbon concentrating mechanisms: Two adaptations to high O₂, low CO₂ conditions [J]. *Photosynth Res*, 117(1/2/3): 121–131.
- REY C, GUÉGUEN L, SÉMON M, et al, 2018. Accurate detection of convergent amino-acid evolution with PCOC [J]. *Mol Biol Evol*, 35(9): 2296–2306.
- SIEVERS F, HIGGINS D G, 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences [J]. *Protein Sci*, 27(1): 135–145.
- SPREITZER R J, 2003. Role of the small subunit in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 414(2): 141–149.
- YUAN F, NGUYEN H, GRAUR D, 2019. *ProtParCon*: A framework for processing molecular data and identifying parallel and convergent amino acid replacements [J]. *Genes*, 10(3): 181.
- ZELITCH I, SCHULTES N P, PETERSON R B, et al, 2009. High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air[J]. *Plant Physiol*, 149(1): 195–204.

(责任编辑 张 冰)