

# RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE (RUBISCO): CẤU TRÚC, PHÂN LOẠI VÀ ỨNG DỤNG TRONG XÂY DỰNG CÂY PHÁT SINH LOÀI

Hoàng Thành Chí<sup>(1)</sup>, Bùi Thị Kim Lý<sup>(1)</sup>

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 29/7/2022; Ngày phản biện 15/8/2022; Chấp nhận đăng 30/9/2022

Liên hệ Email: lybtk@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.06.345>

## Tóm tắt

*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) là phân tử phổ biến nhất trong thế giới tự nhiên. RuBisCO được biết đến nhiều vì là nhân tố quan trọng trong chu trình Calvin-Benson với khả năng xúc tác cố định CO<sub>2</sub>. Sự hiện diện của phân tử RuBisCO ở rất nhiều sinh vật với những cấu hình khác nhau cho thấy đây có thể là một trong những phân tử sơ khai ban đầu tồn tại ở sinh vật. Ngoài ra gen mã hóa RuBisCO cũng không tồn tại cố định tại một vị trí mà hiện diện tại nhiều nơi trong tế bào sinh vật như trong gen của lục lạp hay trong bộ gen của sinh vật và do đó cũng cho thấy sự đa dạng về phân bố của gen này. RuBisCO có thể là một trong những đơn gen tiềm năng có nhiều ứng dụng cho nghiên cứu phát sinh loài.*

**Từ khóa:** cấu trúc, cây phát sinh loài, phân loại

*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO*

## Abstract

### **THE STRUCTURE, CLASSIFICATION, AND APPLICATIONS OF RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE (RUBISCO) IN PHYLOGENY**

*One of the most abundant proteins on Earth is ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO). RuBisCO is a crucial enzyme for CO<sub>2</sub> fixation in the autotrophic Calvin-Benson cycle. Several structural and functional forms of RuBisCO exist. In addition, the localization, operon structure, and number of gene copies of RuBisCO vary between autotrophic organisms. Overall, it suggests that RuBisCO could be a candidate for phylogeny analysis due to the variety of organisms it contains.*

## 1. Đặt vấn đề

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) là một protein quan trọng tham gia vào chu trình cố định CO<sub>2</sub> (chu trình Calvin-Benson). RuBisCO xúc tác quá trình thêm một nguyên tử carbon từ CO<sub>2</sub> có trong không khí vào đường ribulose 1,5-

bisphosphate (đây là phân tử đường có năm nguyên tử carbon) để hình thành nên một chất trung gian có sáu nguyên tử carbon. Chất trung gian này mau chóng bị phân rã để hình thành nên hai phân tử 3-phosphoglycerate. Các sản phẩm này sau đó lại tiếp tục được biến đổi để tham gia tiếp vào chu trình Calvin-Benson. Sau ba chu trình cố định ba phân tử CO<sub>2</sub> vào ba phân tử đường ribulose 1,5-bisphosphate thì một phân tử phosphoglycerate được sản sinh và được sử dụng trong quá trình sinh tổng hợp của tế bào.

Ngoài khả năng cố định carbon, RuBisCO còn tham gia xúc tác phản ứng oxygenase với sự hiện diện của oxy. Phản ứng oxygenase này cắt ribulose bisphosphate thành phosphoglycolic và phosphoglyceric acids. Chính sự đa dụng của enzyme này trong phản ứng cố định carbon và phản ứng oxygenase mà nó được gọi tên như được nêu ở trên.

RuBisCO là một trong những protein phổ biến nhất và được tìm hiểu đầy đủ nhất trong số 11 enzyme tham gia vào chu trình Calvin-Benson. Cấu tạo của protein RuBisCO bao gồm hai loại tiểu phần gắn kết lại với nhau. Tiểu phần lớn có kích thước vào khoảng 55 kDa do gen *rbcL* ở lạp thể mã hóa. Tiểu phần nhỏ có kích thước nhỏ hơn khoảng 13 kDa và do gen trong nhân của tế bào mã hóa. Cấu trúc hoàn thiện của phân tử RuBisCO bao gồm 8 chuỗi lớn và 8 chuỗi nhỏ hợp thành và tạo thành phân tử có kích thước khoảng 540 kDa.

Trong tự nhiên, các báo cáo cho thấy có nhiều dạng phân tử RuBisCO, hiện tại có bốn dạng phân tử chính đã được tìm thấy và được nghiên cứu chức năng. Nhìn chung, không phải tất cả các dạng RuBisCO đều mang cùng một chức năng. Vấn đề này sẽ được bàn luận ở phần sau. Sự đa dạng của RuBisCO cho phép chúng ta nghĩ đến đây là phân tử có vai trò quan trọng và được tiến hóa nhiều trong các sinh vật để giúp sinh vật phát triển. Chính vì thế nên chúng cũng có thể mang những dấu ấn di truyền khác nhau giữa các sinh vật để giúp các nhà khoa học sử dụng sự khác biệt này cho việc xây dựng sự phát sinh loài. Trong bài báo cáo này chúng tôi sẽ cùng thảo luận về tính khả dụng của gen mã hóa RuBisCO, cụ thể là gen mã hóa tiểu phần lớn của RuBisCO (*rbcL*) trong nghiên cứu di truyền tiến hóa phát sinh loài.

## 2. Các dạng cấu trúc của RuBisCO

Như đã nói ở trên, có bốn dạng RuBisCO đã được tìm hiểu đầy đủ về cấu trúc và chức năng. Sơ lược có thể thấy rằng, RuBisCO dạng I và II (Form I và Form II) tuy có khác nhau về cấu trúc và hoạt tính nhưng đều là những dạng chính tham gia vào chu trình Calvin-Benson. Dạng III của RuBisCO được tìm thấy ở cổ khuẩn (*archaea*) nhưng chức năng chưa được biết nhiều. Dạng IV của RuBisCO còn được biết với tên gọi là RuBisCO-like protein (protein giống RuBisCO). Ở dạng này, RuBisCO không có khả năng tham gia vào cố định CO<sub>2</sub> trong chu trình Calvin-Benson nhưng protein này có thể tham gia quá trình chuyển hóa huyết thanh để đáp ứng lại sự căng thẳng oxy hóa (oxidative stress).

### 2.1. Dạng một (I) của RuBisCO

Dạng I (RuBisCO Form I) là dạng phổ biến nhất của protein RuBisCO và là dạng chính ở sinh vật quang dưỡng. Cấu tạo chính của dạng này là tám tiểu phần lớn (L) kết

hợp với tám tiểu phần nhỏ (S) để hình thành nên phân tử RuBisCO có hoạt tính (dạng Hexadecamer  $L_8S_8$ ) với trọng lượng phân tử khoảng 550 kDa (Tabita, 1988). Tiểu phần lớn của RuBisCO là tiểu phần có hoạt tính xúc tác, trong khi đó tiểu phần nhỏ không có hoạt tính này. Tuy nhiên, các nghiên cứu cho thấy rằng hoạt tính xúc tác của tiểu phần lớn tăng cao hơn nhiều khi có tiểu phần nhỏ tham gia. Điều này có thể giải thích là do tiểu phần nhỏ đã gián tiếp làm cho cấu hình của trung tâm xúc tác của phân tử protein RuBisCO được thuận lợi hơn khi tiểu phần nhỏ hiện diện (Hansen và nnk., 1999; Kellogg và nnk., 1997). Tiểu phần nhỏ có rất nhiều khác biệt về trình tự nucleotide và trình tự amino acid giữa các sinh vật khác nhau. Trong khi đó tiểu phần lớn có rất ít thay đổi giữa các sinh vật và được xem là có sự bảo tồn cao giữa các sinh vật (Paoli và nnk., 1995). Chính yếu tố được bảo tồn cao của gen mã hóa tiểu phần lớn nên nó được ứng dụng làm dấu chỉ phân tử để định danh và xác định cây phát sinh loài trong nghiên cứu tiến hóa.

## 2.2. Dạng hai (II) của RuBisCO

Dạng II của RuBisCO có sự khác biệt hoàn toàn so với dạng I ở nhiều khía cạnh. Tiểu phần chính cấu tạo nên dạng II là sự đóng góp duy nhất của tiểu phần lớn ( $L_n$ ). Dạng I của RuBisCO có tám tiểu phần lớn kết hợp với tám tiểu phần nhỏ, tuy nhiên ở dạng II thì số lượng của tiểu phần lớn không cố định mà dao động từ hai đến tám tiểu phần tùy thuộc vào sinh vật. Đơn vị xúc tác cho hoạt động của RuBisCO ở dạng I và II khác nhau về mặt sinh hóa và cả về mặt miễn dịch học. Khi so sánh sự tương đồng trình tự, các nghiên cứu cho thấy dạng I và II chỉ có khoảng 25% đến 30% tương đồng về trình tự amino acid (Tabita, 1988). Tuy nhiên, cũng phải nhìn nhận rằng tuy sự tương đồng về trình tự chung không cao nhưng sự tương đồng về trình tự ở một số vùng quan trọng lại được bảo tồn. Các vùng bảo tồn này thường tập trung ở trung tâm xúc tác của phân tử RuBisCO (Schneider và nnk., 1990). Điều này một phần cũng giải thích cho sự đa dạng về cấu hình của phân tử RuBisCO nhưng vẫn đảm bảo được hoạt tính xúc tác của chúng là do sự bảo toàn của trung tâm xúc tác.

RuBisCO dạng II được phân lập lần đầu tiên từ vi khuẩn *Rhodospirillum rubrum* (Tabita và nnk., 1974) và sau đó được phân lập ở nhiều vi khuẩn khác. Một thời gian rất lâu, các nhà khoa học tin rằng RuBisCO dạng II là dạng biểu hiện duy nhất ở vi khuẩn *Rhodobacter*, nhưng những phát hiện sau đó cho thấy đây là dạng khá phổ biến vì được phát hiện trên nhiều vi sinh vật khác. Đặc biệt là gen mã hóa cho tiểu phần lớn cấu tạo nên RuBisCO nằm hoàn toàn trong bộ gen của nhiều vi khuẩn (ở thực vật, gen mã hóa tiểu phần lớn nằm trong lục thể).

## 2.3. Dạng ba (III) của RuBisCO

RuBisCO dạng III hay còn có tên RuBisCO cổ khuẩn (archaeal RuBisCO) là dạng được tìm thấy đầu tiên ở những sinh vật cổ ưa muối (Rajagopalan và nnk., 1994) và sau đó được tìm thấy ở cổ sinh vật ưa nhiệt (Hugler và nnk., 2003). Các nghiên cứu được tiến hành cho đến ngày nay đều cho thấy RuBisCO là enzyme xúc tác cho quá trình cố định  $CO_2$ . Tuy nhiên, ở cổ sinh vật mặc dù không sử dụng con đường cố định  $CO_2$  theo chu

trình Calvin-Benson nhưng các gen mã hóa cho RuBisCO vẫn được tìm thấy. Đáng chú ý là khi tiến hành nghiên cứu chức năng protein do gen mã hóa RuBisCO ở cổ sinh vật tạo ra thì đều cho thấy các protein này có đầy đủ các hoạt tính của RuBisCO (Ezaki và nnk., 1999; Watson và nnk., 1999).

Nghiên cứu cây phát sinh loài dựa trên trình tự amino acid cho thấy rằng RuBisCO dạng III được phân vào nhóm khác với dạng I và II. Ở dạng III, chỉ có tiểu phần lớn cấu tạo nên RuBisCO và gen mã hóa cho tiểu phần nhỏ không được tìm thấy ở bất kỳ đâu trong hệ gen của vi khuẩn cổ. Phân tích tính tương đồng về trình tự cho thấy RuBisCO dạng III có sự tương đồng 50% so với dạng I và II, nhưng vùng trình tự ở trung tâm xúc tác phản ứng lại được bảo tồn cao giữa cả ba dạng (Watson và nnk., 1999).

Nghiên cứu trên cổ vịnh vật về vai trò của RuBisCO vẫn chưa được xác định cụ thể. Ở một số sinh vật cổ có sự tồn tại của gần như các gen mã hóa cho các enzyme hay cơ chất cần thiết để sinh vật sử dụng cố định CO<sub>2</sub> trong chu trình Calvin-Benson. Tuy nhiên, việc thiếu đi một số gen mã hóa cho cơ chất cần thiết cho chu trình Calvin-Benson cho thấy vai trò của RuBisCO ở cổ vi khuẩn là rất đặc biệt và cần được nghiên cứu thêm (Finn và nnk., 2003). Nghiên cứu về mặt tiến hóa cho thấy RuBisCO được phát hiện ở cổ sinh vật, được xem như sinh vật cổ xưa nhất trên trái đất nên rất có thể đây là một trong những enzyme đầu tiên xuất hiện trong thời kỳ tiền oxy của quá trình tiến hóa.

#### **2.4. Dạng bốn (IV) của RuBisCO**

Phân tử RuBisCO dạng IV còn có tên là protein giống RuBisCO (RuBisCO-like proteins - RLP). Gen mã hóa cho RLP được tìm thấy khi các nhà khoa học giải mã bộ gen của vi khuẩn lưu huỳnh xanh *Chlorobaculum tepidum*, protein này có cấu trúc rất tương đồng với cấu trúc của RuBisCO nhưng lại không có khả năng cố định CO<sub>2</sub> như RuBisCO (Hanson và nnk., 2001)

RLP có sự đa dạng rất cao về cấu trúc. Phân tích sự tương đồng về trình tự amino acid giữa các RLP cho thấy sự dao động rất lớn từ 25% đến 60%. Sự đa dạng về trình tự của RLP một phần nào giải thích cho nhiều vai trò chức năng khác nhau mà RLP đảm nhận trong tự nhiên. Nói cách khác, tùy vào điều kiện tự nhiên mà sinh vật sinh sống sẽ quyết định chức năng cụ thể của RLP (Hanson và nnk., 2003).

Ở các dạng khác của RuBisCO trung tâm xúc tác luôn được bảo tồn, có nghĩa là ít hoặc không có sự thay đổi trình tự amino acid tại đây. Nhưng với RLP thì trung tâm xúc tác lại có nhiều thay đổi. Trong số 19 vị trí amino acid ở trung tâm xúc tác thì có đến 10 sự thay đổi vị trí ở *Chlorobaculum*, 8 sự thay đổi ở *B. subtilis* và 4 sự thay đổi ở *A. fulgidus* (Hanson và nnk., 2001). Trung tâm xúc tác đóng vai trò là nơi nhận gắn kết chuyên biệt với một cơ chất nào đó, ví dụ ở RuBisCO là ribulose 1,5-bisphosphate nên với sự thay đổi nhiều amino acid trong trung tâm này thì RuBisCO không có khả năng để gắn ribulose 1,5-bisphosphate. Đây là nguyên nhân giải thích cho sự mất khả năng xúc tác cố định CO<sub>2</sub> của RuBisCO dạng IV. Những chức năng khác của RLP đang được nghiên cứu ở các sinh vật khác nhau.

### 3. Sắp xếp cấu trúc và vị trí của gen RuBisCO

Sự sắp xếp các gen mã hóa cho tiểu phần lớn và nhỏ của RuBisCO dạng I có sự khác nhau ở các sinh vật. Ở sinh vật thuộc ngành Proteobacteria, thường quan sát thấy có một cấu trúc operon trong đó bao gồm gen mã hóa tiểu phần lớn, tiểu phần nhỏ của RuBisCO và các gen mã hóa cho các enzyme liên quan khác trong con đường Calvin-Benson, cũng như các gen điều hòa liên quan khác. Để dễ phân biệt thì thường các gen liên quan trong operon này sẽ được gắn tiền tố *cbb* trước tên gen ví dụ tên gen của tiểu phần lớn là *cbbL*, tiểu phần nhỏ là *cbbS*. Ở vi khuẩn cyanobacteria và thực vật, hệ operon mã hóa cho RuBisCO dạng I không có chứa các gen cấu trúc mã hóa cho các enzyme của chu trình Calvin-Benson mà chỉ có duy nhất gen mã hóa cho tiểu phần lớn và nhỏ. Để phân biệt thì không có tiền tố trước tên gen. Tiểu phần lớn có tên *rbcL* và tiểu phần nhỏ có tên *rbcS*. Những gen mã hóa cho RuBisCO dạng II luôn được sắp xếp vào trong một operon nên có tên *cbbM* (Tabita và nnk., 1992).

### 4. Phát sinh loài dựa trên RuBisCO

Nghiên cứu phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự của một số gen được bảo tồn cao đã chứng minh có tính ứng dụng thực tiễn lớn. Một số gen thường được sử dụng như 16S, 23S rRNA, hay *tufA* của nhân tố kéo dài dịch mã EF-Tu, *atpB* mã hóa cho H<sup>+</sup>-ATPase subunit  $\beta$ , *rpoC1* mã hóa RNA polymerase subunit  $\beta'$ . Tuy nhiên, việc sử dụng các gen trên để xây dựng nghiên cứu phát sinh loài vẫn còn nhiều vấn đề cần giải đáp. Một ví dụ như được trình bày trong bài tổng hợp của Tuorova và cộng sự cho thấy rằng bằng cách sử dụng các trình tự gen nói trên đều cho thấy lạp thể có nguồn gốc từ vi khuẩn lam cyanobacteria và có thể có chung một tổ tiên. Tuy nhiên khi sử dụng trình tự RuBisCO thì kết quả lại không cho thấy sự tương đồng với các gen trên.

Mặc dù trình tự ribosome được sử dụng rất phổ biến cho nghiên cứu phát sinh loài ở prokaryote, nhưng sự tiến hóa của gen ribosome (một gen đơn) có phản ánh toàn bộ quá trình tiến hóa của bộ gen không vẫn còn là nghi vấn. Trong điều kiện lý tưởng, việc so sánh toàn bộ bộ gen của sinh vật sẽ cho thấy được độ chính xác cao hơn trong nghiên cứu phát sinh loài so với khi tiến hành trên từng gen đơn. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có dữ liệu để tiến hành đánh giá trên toàn bộ bộ gen. Do đó, việc sử dụng nhiều gen đơn (không có quan hệ tương tác với nhau) để nghiên cứu sự phát sinh loài vẫn đang là một giải pháp cho đến ngày nay và trong đó gen RuBisCO với sự bảo tồn cao và hiện diện ở nhiều sinh vật được xem là một trong những ứng viên cho nghiên cứu phát sinh loài.

### 5. Kết luận

Sự hiện diện rộng rãi của RuBisCO trong tự nhiên ở nhiều sinh vật cũng như sự phân bố gen mã hóa RuBisCO được phân tán ở nhiều bào quan cho thấy rằng RuBisCO có thể đã có sự tiến hóa từ rất sớm từ các sinh vật cổ đại cho đến các sinh vật có tổ chức phức tạp như đã biết hiện nay. Gen mã hóa cho RuBisCO cũng được bảo tồn tốt và những nghiên cứu cho thấy rằng sử dụng gen mã hóa RuBisCO có nhiều ứng dụng trong phân

loại phát sinh loài dựa trên sinh học phân tử. Việc áp dụng phân loại dựa trên nhiều đơn gen khác nhau sẽ giúp cho nghiên cứu phát sinh loài ngày càng hoàn thiện hơn vì chúng giúp loại bỏ những hạn chế có thể có khi chỉ sử dụng một dấu chỉ sinh học duy nhất.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (1999). Presence of a structurally novel type ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biol Chem*, 274(8), 5078-5082. doi: 10.1074/jbc.274.8.5078
- [2] Finn, M. W., & Tabita, F. R. (2003). Synthesis of catalytically active form III ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in archaea. *J Bacteriol*, 185(10), 3049-3059. doi: 10.1128/JB.185.10.3049-3059.2003
- [3] Hansen, S., Vollan, V. B., Hough, E., & Andersen, K. (1999). The crystal structure of rubisco from *Alcaligenes eutrophus* reveals a novel central eight-stranded beta-barrel formed by beta-strands from four subunits. *J Mol Biol*, 288(4), 609-621. doi: 10.1006/jmbi.1999.2701
- [4] Hanson, T. E., & Tabita, F. R. (2001). A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(8), 4397-4402. doi: 10.1073/pnas.081610398
- [5] Hanson, T. E., & Tabita, F. R. (2003). Insights into the stress response and sulfur metabolism revealed by proteome analysis of a *Chlorobium tepidum* mutant lacking the Rubisco-like protein. *Photosynth Res*, 78(3), 231-248. doi: 10.1023/B:PRES.0000006829.41444.3d
- [6] Hugler, M., Huber, H., Stetter, K. O., & Fuchs, G. (2003). Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch Microbiol*, 179(3), 160-173. doi: 10.1007/s00203-002-0512-5
- [7] Kellogg, E., & Juliano, N. (1997). The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies. *Am J Bot*, 84(3), 413.
- [8] Paoli, G. C., Morgan, N. S., Tabita, F. R., & Shively, J. M. (1995). Expression of the *cbbLcbbS* and *cbbM* genes and distinct organization of the *cbb* Calvin cycle structural genes of *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol*, 164(6), 396-405.
- [9] Rajagopalan, R., & Altekari, W. (1994). Characterisation and purification of ribulose-bisphosphate carboxylase from heterotrophically grown halophilic archaeobacterium, *Haloferax mediterranei*. *Eur J Biochem*, 221(2), 863-869. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18801.x
- [10] Schneider, G., Lindqvist, Y., & Lundqvist, T. (1990). Crystallographic refinement and structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum* at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 211(4), 989-1008. doi: 10.1016/0022-2836(90)90088-4
- [11] Tabita, F. R. (1988). Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. *Microbiol Rev*, 52(2), 155-189. doi: 10.1128/mr.52.2.155-189.1988
- [12] Tabita, F. R., & McFadden, B. A. (1974). D-ribulose 1,5-diphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum*. I. Levels, purification, and effects of metallic ions. *J Biol Chem*, 249(11), 3453-3458.
- [13] Tabita, F. R., Gibson, J. L., Bowien, B., Dijkhuizen, L., & Meijer, W. G. (1992). Uniform designation for genes of the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate pathway of bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 78(2-3), 107-110. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05551.x
- [14] Watson, G. M., Yu, J. P., & Tabita, F. R. (1999). Unusual ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea. *J Bacteriol*, 181(5), 1569-1575. doi: 10.1128/JB.181.5.1569-1575.1999