

磷脂酰甘油对光系统 II 酪氨酸残基构象及微环境的影响*

阳振乐** 李良璧 许亦农 匡廷云

(中国科学院植物研究所光合作用研究中心, 北京 100093)

摘要 通过 Fourier 红外(FT-IR)光谱法研究了磷脂酰甘油(PG)与光系统 II (PS II) 相互作用的结构机制, 主要是 PG 对 PS II 酪氨酸残基结构的影响. 有结果显示, PG 会引起酪氨酸侧链酚基构象和微极性的改变, 表现为在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 之间芳环骨架的伸缩振动带向高频方向变化, 其吸收强度也相应增加; 在 $3\ 500\sim 3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 出现新的氢键吸收峰. 结果分析表明, PS II 蛋白中酪氨酸残基结构的变化源自于酪氨酸侧链苯酚的羟基与 PG 的甘油羟基之间氢键的形成.

关键词 光系统 II 磷脂酰甘油 酪氨酸残基 Fourier 红外光谱

在光合膜中, 磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG) 和磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)是两种较为常见的磷脂, 其中 PG 最为丰富, 占膜脂总量的 5%~15%, 而 PC 仅有 1%左右^[1].

事实表明, 与光合膜中存在着大量的糖脂(>70%)^[2]相比, 尽管 PG 的含量相对较少, 但在光合膜中仍存在着 PG 与蛋白质之间的特异结合, PG 起着不可替代的作用. Nußberger 等人^[3]通过对光系统 II (PS II)捕光色素蛋白复合体(LHC II)的研究表明, 除糖脂双半乳糖甘油二酯(digalactosyldiglyceride, DGDG)外, LHC II 还结合有 PG, PG 与 LHC II 的结合较为牢固. 将 LHC II 中的 PG 完全去除后, LHC II 的三体结构转变为单体形式, 该结果清楚地揭示了 PG 是维持 LHC II 的寡聚体结构所必需的. Siegenthaler 等人^[4]的结果表明在光合膜的内层膜中存在着一个与电子传递有关的 PG 区. Murata 等人^[5]仔细分析了光合系统中从类囊体到 PS II 反应中心各种功能单位的膜脂种类及其组成, 结果发现了 PG 与 PS II 核心复合物之间的特异结合, PG 与 PS II 反应中心 P680 的摩尔数之比为 4 : 1. Kruse 等人^[6]进一步认为 PG 的结合位点存在于 D₁ 蛋白, PG 分子的作用就在于使 D₁ 蛋白保持适宜的结构.

研究表明^[1], PG 会引起 PS II 中蛋白质二级结构的改变, 导致其 α -螺旋、 β -折叠组分的增加和无规卷曲结构的减少. 我们还通过紫外荧光^[7]观察到了 PG 对 PS II 蛋白中酪氨酸残基能量传递的影响, 认为是由于 PG 的作用使酪氨酸残基构象或周围的微环境受影响而致. 本研究试图通过 Fourier 红外(FT-IR)光谱方法来揭示由 PG 引起的 PS II 蛋白中酪氨酸残基细致的结

1999-08-18 收稿, 1999-12-17 收修改稿

* 国家自然科学基金重大资助项目(批准号: 39890390)和国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1998010100)

** E-mail: yangzhl@public.fhnet.cn.net

1) 阳振乐等, 未发表工作

构变化以及 PG 作用的位点.

1 材料与方 法

1.1 材 料

磷脂酰甘油(PG)分析纯(>99%)为 Sigma 公司产品. 菠菜(*Spinacia oleracea* L.)购自当地市场.

1.2 方 法

1.2.1 PS II 颗粒的制备 以菠菜为材料进行 PS II 颗粒的制备, 主要参照 Berthold 等人^[8]的方法加以分离、纯化, 但稍加改进:第 1 次用 Triton X-100 处理时改在 pH 6.0 介质中进行, 并省去第 2 次 Triton X-100 处理. 所得提取物用缓冲液(0.4 mol/L Sucrose, 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Mes-NaOH, pH6.5)洗 2~3 次, 并以此缓冲液悬浮备用. PS II 颗粒中的色素浓度按照 Arnon^[9]的方法测定. 红外光谱测定时, 将 PS II 颗粒用重水洗 1~2 次并以该重水为介质配成一定浓度的溶液.

1.2.2 PS II 颗粒与 PG 复合物(PS II-PG)的制备 将 PG 溶解在适量的氯仿中, 然后用氮气吹干, 加入一定量的重水后超声处理 15 min 以上. 将 PS II 颗粒按照一定的比例加入到上述溶液中, 暗中冰浴下静置半小时左右.

1.2.3 红外光谱测定 将 1 mg/mL 左右的样品滴加在 CaF₂ 窗片上, 通过抽真空使样品成一层薄膜, 然后在 Magna-550 光谱仪(Nicolet, Series II)上进行红外光谱的测定. 将所得图谱平滑处理后进行二级求导, 根据二级导数图谱的负峰以确定子峰的数量及其峰位, 通过 Gauss 解析对图谱进行曲线拟合和解谱计算.

2 结果与讨论

图 1 是 PS II 颗粒和 PG 在 1 800~1 500 cm⁻¹ 频率区间的红外吸收光谱图. 从中可以看出, 在

该频率范围内主要存在着 3 个谱带: (1) 1 780~1 710 cm⁻¹ 处的吸收峰是 PS II 颗粒中脂、色素的 C=O 或 PG 中酯键 C=O 的伸缩振动峰^[10,11], 在 1 739 cm⁻¹ 左右的位置有一吸收峰, 在该波段不涉及蛋白质的任何结构; (2) 1 700~1 600 cm⁻¹ 处的吸收带是蛋白质的酰胺 I 带^[12], 该带 80% 是来自 C=O 键上的面内伸缩振动, 同时也和 C=O 附近的 C—N 伸缩振动和 N—H 弯曲振动有关, 酰胺 I 带主要在 1 656 cm⁻¹ 处有较强的吸收; (3) 1 600~1 500 cm⁻¹ 范围的振动带是蛋白质的酰胺 II 带^[13],

主要是 60% 的 N—H 面内弯曲振动和 40% 的 C—N 伸缩振动, 最大吸收在 1 547 cm⁻¹ 左右. 此外, 大约在 1 516 cm⁻¹ 的地方也有一弱的肩峰, 被认为是属于蛋白质酪氨酸(Tyr)残基的吸收峰, 主要来自于酪氨酸基团中苯环的伸缩振动和弯曲振动^[14].

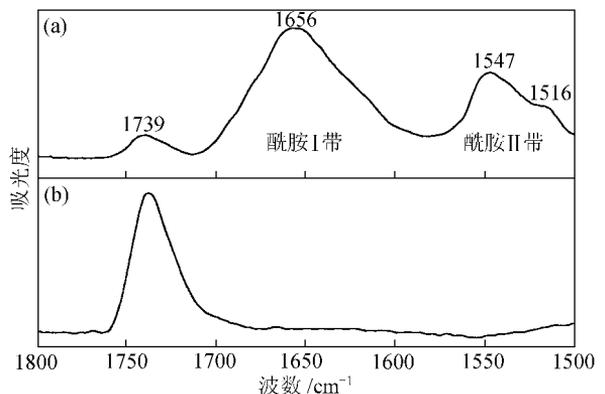


图 1 PS II (a)和 PG(b)在 1 800 ~ 1 500 cm⁻¹ 波段的红外光谱

本研究主要考虑 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 频率范围的吸收, 这是因为在该波段内有酪氨酸残基的特征吸收^[14]且 PG 的吸收较弱(见图 1), 能较好地反映出由 PG 引起的蛋白质中酪氨酸残基的结构变化。

蛋白质中的酪氨酸属于芳香族氨基酸, 故酪氨酸在红外光谱上会表现出芳香族化合物的特征吸收, 较有意义的是在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 之间存在的苯环骨架的振动. 对于苯环而言, 在约 $1\ 600$ 和 $1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处有两个较为稳定的吸收峰, 但有时也可因取代情况不同而发生位移^[15]. 例如当苯环与具有孤电子对的基团共轭时, $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 会分裂为 $1\ 600$ 和 $1\ 580\ \text{cm}^{-1}$ 两条谱带且强度增加. 对位取代会使 $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 向高频位移, 而取代基是供电子基团时也会使 $1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰移至 $1\ 510\ \text{cm}^{-1}$ 左右的位置. 由于蛋白质中酪氨酸残基还存在其他基团, 故在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 之间还表现出其他的特征吸收^[16~18].

通过对 PS II 红外光谱的解谱分析表明, 在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 频率之间至少存在 7 个吸收谱带. 在图 2 的二级导数谱图中显示了这 7 个子峰的吸收峰位, 从图中不难清楚地看出其中苯环的特征吸收. 前已述及, $1\ 612$ 和 $1\ 583\ \text{cm}^{-1}$ 是属于酚环的骨架振动 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 而 $1\ 514\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰是来自于环的伸缩和弯曲振动 ($\delta_{\text{C}=\text{C}-\text{H}}$), $1\ 595\ \text{cm}^{-1}$ 处弱的吸收带据认为也是属于环的 C=C 伸缩振动^[19]. COO^- 的反对称伸缩振动在 $1\ 569\ \text{cm}^{-1}$ 处有一吸收峰, 而 $1\ 548$ 和 $1\ 533\ \text{cm}^{-1}$ 两处的吸收都是来自 $-\text{NH}_3^+$ 的对称弯曲振动^[20].

图 3 是与 PG 作用后的 PS II 颗粒的红外吸收光谱图. 解谱后也有 7 个子峰, 但没有产生新的吸收峰, 也没有旧峰的消失, 但有些子峰的吸收峰位有所改变, 且发生位移的子峰主要是酚环的特征吸收. 例如, $1\ 612$, $1\ 583$ 和 $1\ 514\ \text{cm}^{-1}$ 3 处的伸缩振动带分别变化至 $1\ 615$, $1\ 585$ 和 $1\ 516\ \text{cm}^{-1}$, 分别蓝移了 3, 2 和 $2\ \text{cm}^{-1}$. 酚环特征吸收的位移被认为是酚环构象发生改变的反映^[21]. 另外, 从图 4 的归一化图谱可以看出, 经与 PG 作用后, $1\ 612$, $1\ 583$ 和 $1\ 514\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收强度都有所增加. 振动带强度的变化表明了酚环的微极性受到了影响, 这是因为振动带的强度与振动基团偶极矩变化的平方成正比, 而偶极矩与介质的介电常数有关^[22], 吸收带的强度随介质极性的增加而增加。

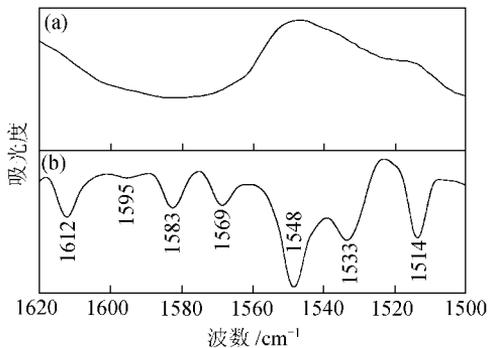


图 2 PS II 在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 频率范围内的红外光谱及其二级导数谱
(a) 红外谱; (b) 二级导数谱

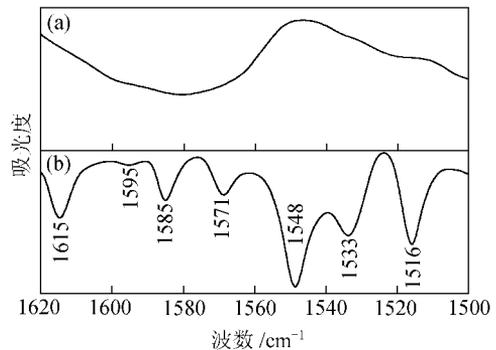


图 3 PS II-PG 复合物在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 频率范围内的红外光谱及其二级导数谱
(a) 红外谱; (b) 二级导数谱

实验表明¹⁾, 由 PG 引起的蛋白质二级结构的改变是源自于 PG 的碳氢链与 PS II 蛋白的碳氢链之间的相互作用. 很显然, 本研究中酪氨酸残基的酚环构象的变化不能归之于 PG 碳氢链的作用, 因为很难想像在 PG 的疏水基团与酪氨酸残基的极性基团之间会有相互作用. 脂的作用部位有极性基团磷酸基和非极性基团碳氢链. Fragata 等人^[23]没有观测到 PG 中 PO_2^- 和甘油酯键 $C=O$ 受 PS II 蛋白的影响, 也没有对甘油基中羟基是否参与形成氢键做进一步的研究. 我们认为并不能排除极性基团中甘油基形成氢键的可能性, 而且很可能是这种氢键的形成导致了酪氨酸残基结构的改变.

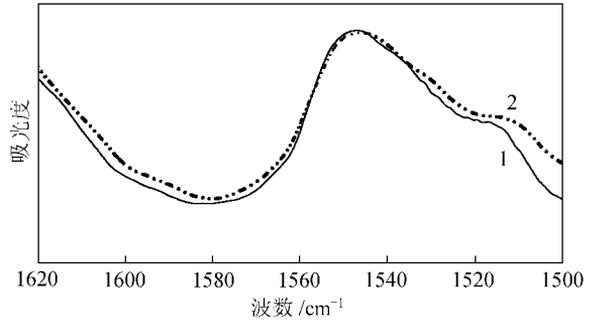


图 4 PG 对 PS II 红外吸收强度的影响(1 620 ~ 1 500 cm^{-1})
1 为 PS II; 2 为 PS II-PG

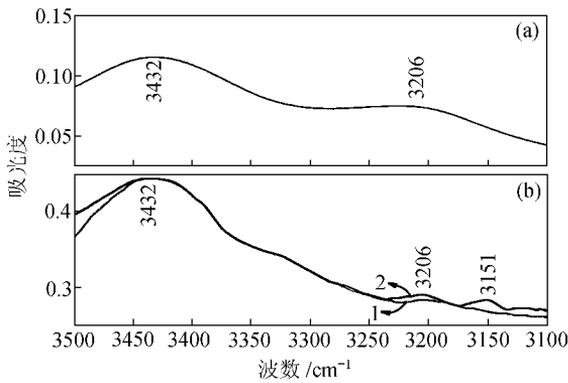


图 5 PG, PS II 以及 PS II ~ PG 在 3 500 ~ 3 100 cm^{-1} 间的红外光谱
(a) PG; (b) 1 为 PS II; 2 为 PS II ~ PG

前已述及, Fragata 等人^[23]没有观测到 PG 中 PO_2^- 和甘油酯键 $C=O$ 受 PS II 的影响, 因此可以认为 PG 与 PS II 之间氢键的形成涉及到 PG 极性基团中甘油基上的羟基.

对于酪氨酸残基而言, 由于 PG 的作用导致酚环构象的改变和酚环微极性的增加, 而极性的增加意味着分子偶极矩的增大. 氢键的形成也是引起酚基偶极矩增大的一个原因, 而在酚基中参与形成氢键的基团只有羟基. 因此, 在图 5 中 3 151 cm^{-1} 处出现的新吸收峰归结于苯酚的羟基与 PG 的甘油羟基之间所形成的氢键是合理的.

由此不难理解, 由于酪氨酸残基中苯酚的羟基与 PG 的甘油羟基之间氢键的形成, 导致了酪氨酸残基中酚环构象和微极性发生了改变, 而酪氨酸残基结构或微环境的变化, 又导致了在功能上酪氨酸残基能量传递的改变.

1) 阳振乐等, 未发表工作

综上所述, PG 会引起酪氨酸侧链酚基构象和微极性的改变, 表现为在 $1\ 620\sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 之间芳环骨架的伸缩振动带向高频方向变化, 其吸收强度也相应增加; 此外, 在 $3\ 500\sim 3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 之间还出现新的氢键吸收峰。酪氨酸侧链苯酚的羟基与 PG 的甘油羟基之间氢键的形成是蛋白质中酪氨酸残基结构变化的主要因素。

值得一提的是, PS II 蛋白中酪氨酸残基结构的变化也会使蛋白质骨架的局部结构受到影响, 比如引起蛋白质二级结构的改变等, 因此, PG 对 PS II 蛋白二级结构的影响¹⁾, 除了 PG 非极性基团碳氢链的作用外, PG 极性基团中甘油羟基氢键的形成也不能不说是一个影响因素。

参 考 文 献

- 1 Webb M S, Green B R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1 060: 133~158
- 2 Joyard J, Maréchal E, Miége C, et al. Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplast. In: Siegenthaler P A, Murata M, eds. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. 21~52
- 3 Nußberger S, Dörr K, Wang D N, et al. Lipid-protein interaction in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol*, 1993, 224: 347~356
- 4 Siegenthaler P A, Rawlyer A, Smutny J. The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localised in the inner monolayer of the thylakoid membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 975: 104~111
- 5 Murata M, Higashi S, Fujimura Y. Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1 019: 261~268
- 6 Kruse O, Schmid G H. The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem II particles of the cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. *Z Naturforsch*, 1995, 50c: 380~390
- 7 阳振乐, 李良璧, 许亦农, 等. 磷脂酰甘油对光系统II放氧活性的影响. *植物学报*, 2000, 42(3): 249~255
- 8 Berthold D A, Babcock G T, Yocum C F. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. *FEBS Lett*, 1981, 134: 231~234
- 9 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 14: 1~15
- 10 Katz J J, Diugherty R C, Boucher L J. Infrared and nuclear magnetic resonance of chlorophyll. In: Vemon L P, Seely G R, eds. *The Chlorophylls*. New York: Academic Press, 1966. 185~251
- 11 Jackson M, Mantsch H H. Biomembrane structure from FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Rev*, 1993, 15: 53~69
- 12 He W Z, Newell W R, Haris P I, et al. Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transformation infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1992, 31: 9 848~9 853
- 13 Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of protein by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 1986, 25: 469~487
- 14 MacDonald G M, Barry B A. Difference FTIR study of a novel biochemical preparation of photosystem II. *Biochemistry*, 1992, 31: 9 848~9 853
- 15 姚新生, 陈英杰, 徐绥绪, 等. *有机化合物波谱分析*. 北京: 人民卫生出版社, 1981
- 16 Amesz J, Hoff A J. *Biophysical Techniques in Photosynthesis*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996
- 17 Susi H, Byler D M. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods in Enzymology*, 1986, 130: 290~311
- 18 Chirgadze Y N, Fedorov O V, Trushina N P. Estimation of amino acid residue side chain absorption in the infrared spectra of

1) 阳振乐等. 未发表工作

- protein solutions in heavy water. *Biopolymers*, 1975, 14: 679-694
- 19 Wilson E B, Decius J C, Cross P C. *The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra*. New York: McGraw-Hill, 1955
 - 20 Venyaminov S Y, Kalnin N N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solution. I. Spectral parameters of amino acid residue absorptions. *Biopolymers*, 1990, 30: 1 243-1 257
 - 21 Colthup N B, Daly L H, Wiberley S E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd ed. Boston : Academic Press, 1990
 - 22 Paiter P C, Coleman M M, Koenig J L. *The Theory of Vibrational Spectroscopy and Its Applications to Polymeric Materials*. New York: Wiley-Interscience, 1962
 - 23 Fragata M, Nenonene E K, Maire V, et al. Structure of the phosphatidylglycerol -photosystem II complex studied by FT-IR spectroscopy. Mg(II) effect on the polar head group of phosphatidylglycerol. *J Mol Struct*, 1997, 405: 151-158