



论文

对氢键网络的干扰降低细胞色素 *b₆f* 复合体中 Chla 的光稳定性

芦亚菲^①, 曲娜^①, 陈晓波^{①*}, 王文达^②^① 河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018;^② 中国科学院植物研究所光生物学重点实验室, 北京 100093

* 联系人, E-mail: zzschenxiaobo@163.com

收稿日期: 2014-06-02; 接受日期: 2014-11-06

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CBA00900)资助项目

doi: 10.1360/N052014-00173

摘要 细胞色素 *b₆f* 蛋白复合体(Cyt *b₆f*)参与光合膜上电子传递和跨膜质子转移, 在体内以二体形式存在, 每个单体只结合 1 分子叶绿素 *a*(Chla). 该 Chla 性质独特, 光照条件下十分稳定, 是甲醇中游离 Chla 的 120~130 倍, 然而其光稳定性的机制仍未彻底阐明. Cyt *b₆f* 2.7 Å 的晶体结构显示, Chla 中心的 Mg 离子和 H₂O 分子配位, 并且该 H₂O 分子通过氢键与复合体亚基 IV 的氨基酸 G136 和 T137 相互作用. 本研究基于这一结构特点, 对上述 2 个氨基酸进行了定点突变, 以干扰、破坏氢键网络. 结果发现, 突变不仅导致蛋白与 Chla 结合能力下降, 而且显著降低了 Chla 的光稳定性, 这一结果表明, Cyt *b₆f* 中 Chla 相关的氢键网络对其稳定性具有重要的作用.

关键词叶绿素 *a*

光稳定性

氢键

定点突变

细胞色素 *b₆f* 蛋白复合体

在叶绿体类囊体膜上, 光系统 II (photosystem II, PS II)、细胞色素 *b₆f* 蛋白复合体(cytochrome *b₆f* complex, Cyt *b₆f*)与光系统 I 组成了光合电子传递链. Cyt *b₆f* 连接 2 个光系统之间的电子传递, 同时作为质子泵跨膜转运质子, 为 ATP 合酶合成 ATP 提供动力^[1]. 在体内, Cyt *b₆f* 以二体形式存在, 由 4 个大亚基 Cyt *f*, Cyt *b₆*, Rieske[Fe-S]蛋白和亚基 IV 以及 4 个小于 5 kD 的小亚基组成. 另外, Cyt *b₆f* 每个单体结合 1 分子叶绿素 *a*(chlorophyll *a*, Chla)和 1 分子类胡萝卜素(carotenoid, Car)^[2,3]. 由于 Cyt *b₆f* 中色素组成简单, 因此是研究色素和蛋白相互作用的理想材料^[4].

Cyt *b₆f* 中 Chla 的存在令人费解, 因为在光合作

用光反应阶段, 除了反应中心的 Chla, 其余大多数 Chla 的主要作用是捕获和传递光能, 而 Cyt *b₆f* 并不参与光能的捕获或传递. 另一方面, 光对植物伤害的一个主要原因是处于激发态的 Chl 分子不能及时耗散过剩激发能, 而把这部分能量传递给基态 O₂, 形成单线态氧(¹O₂^{*}), 破坏 Chl 分子和蛋白, 从而对机体产生伤害^[5]. 所以 Cyt *b₆f* 中这个“无功能”的 Chla 反而是个潜在的威胁, 必须采取一定的光保护(photoprotection)措施, 抑制 ¹O₂^{*} 的产生. 事实也确实如此, 研究表明, Cyt *b₆f* 中 Chla 处在精细的蛋白环境中, 光照条件下几乎不产生 ¹O₂^{*}, 其光稳定性比游离 Chla 高 130~140 倍^[6]. 然而, 目前 Cyt *b₆f* 中 Chla 光

引用格式: 芦亚菲, 曲娜, 陈晓波, 等. 对氢键网络的干扰降低细胞色素 *b₆f* 复合体中 Chla 的光稳定性. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 311–316

Lu Y F, Qu N, Chen X B, et al. Disturbing the hydrogen bond network decreases the photostability of the chlorophyll *a* in cytochrome *b₆f* from *Synechocystis* sp. PCC 6803. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 311–316, doi: 10.1360/N052014-00173

稳定性的机制尚未阐明。

已发表的 Cyt *b_{6f}* 2.7 Å 分辨率的晶体结构中, Chla 中心的 Mg 离子和 H₂O 分子形成配位键, 并且该 H₂O 可以通过氢键与亚基 IV 的 G136 和 T137 作用(图 1)^[1]。本研究基于这一结构特点, 以集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 为材料, 运用氨基酸定点突变方法探讨了 Cyt *b_{6f}* 中 Chla 高光稳定性机制, 结果发现, 对亚基 IV 上邻近 Chla 的氨基酸 G136A 和 T137A 定点突变, 干扰其与 Chla 形成的氢键网络, Chla 的光稳定性显著下降。因此, 该研究结果表明, Cyt *b_{6f}* 蛋白中的氢键网络在维持 Chla 的稳定性方面具有重要的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养条件

集胞藻 6803 藻种为本实验室保存。野生和突变集胞藻的培养参考文献[7]。

1.2 集胞藻 6803 定点突变株的构建

集胞藻 6803 *b_{6f}* 蛋白复合体亚基 IV 的定点突变株, 单突变 G136A、单突变 T137A 以及双突变 G136A/T137A 的构建参见文献[8]。

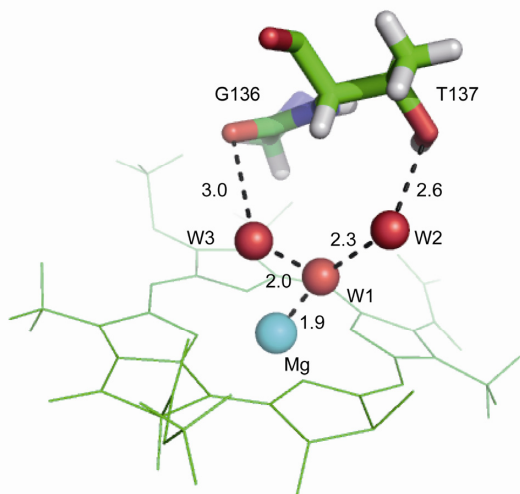


图 1 Cyt *b_{6f}* 复合体中与 Chla 分子相关的氢键网络^[1]

Cyt *b_{6f}* 复合体中 Chla 的 Mg 离子(青色)和 H₂O(W1, 红色)配位, W1 和另外 2 个 H₂O 分子 W2, W3 以及 G136 残基的羰基氧、T137 残基侧链的羟基构成氢键网络。虚线表示原子之间氢键的相互作用, 数字为氢键之间的距离, 单位为 Å

1.3 集胞藻 6803 Cyt *b_{6f}* 蛋白样品的制备

6000×g 离心 10 min 收集集胞藻细胞, 细胞破碎根据文献采用玻璃珠法^[7]。类囊体膜的制备参考文献^[9]。TSMK(20 mmol/L Tricine-NaOH, pH8.0; 0.2 mol/L 蔗糖; 3 mmol/L MgCl₂; 3 mmol/L KCl)溶液调整类囊体膜 Chla 浓度为 1.4~1.6 mg/mL, -80℃ 保存备用。

集胞藻 Cyt *b_{6f}* 蛋白样品的制备主要参照 Cramer 研究组^[9]的方法并进行改进。Cramer 研究组提取方法主要由 3 步组成: (i) 去垢剂 *n*-Octyl β-D-glucopyranoside(β-OG)和胆酸钠选择性抽提类囊体膜, 离心后得到含有 Cyt *b_{6f}* 的上清液; (ii) 疏水柱 propyl-agarose 进一步纯化; (iii) 蔗糖密度梯度离心得到最终样品。本研究在(ii), (iii)步骤之间加一步 Q-HP(G E Healthcare, 瑞典)阴离子交换柱, 该步简述如下: Q-HP 离子交换柱直径为 1 cm, 体积为 10 mL; 双蒸水洗柱 3~4 个柱体积, 平衡液 TNEU(30 mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 50 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 0.05% *n*-undecyl β-D-maltoside(UDM))平衡 2 个柱体积。进样后, 用含有 0.2 mol/L NaCl 的 TNEU 溶液洗至基线稳定; 0.2~0.33 mol/L 盐浓度连续洗脱 7 个柱体积; 收集 0.25~0.28 mol/L 盐浓度区间的洗脱液, 该部分洗脱液中含有 Cyt *b_{6f}* 蛋白样品。用截留分子量 30 kD 的超滤管(Amicon Ultra-15, Merck Millipore, 爱尔兰)浓缩, 进行下一步蔗糖密度梯度离心。

1.4 SDS-PAGE 检测

Cyt *b_{6f}* 多肽组分的检测参照 Laemmli^[10]的方法进行, 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶为 4%。

1.5 吸收光谱与氧化还原差光谱的测定

Cyt *b_{6f}* 的吸收光谱用岛津 UV2450 型双光束分光光度计(日本)测定, 扫描间隔为 0.1 nm。样品定量依据 Cyt *f* 的氧化还原差谱, 测定时用铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)使 Cyt *f* 氧化, 用抗坏血酸使 Cyt *f* 还原, 计算时 Cyt *f* 消光系数采用 18 (mmol/L)⁻¹ cm⁻¹^[11]。

1.6 Chla 的光破坏处理

光破坏实验参考文献[12]略有改动。Cyt *b_{6f}* 中 Chla 的含量都调成统一的吸光值 ΔA_(670-700 nm)=0.036。样品在搅拌条件下, 光强为 0.7×10³ μmol m⁻² s⁻¹ 的白光(经过 12 cm 的 1%硫酸铜溶液过滤以消除热效应)

进行连续照射处理. 在不同光照时间后, 以 $\Delta A_{(668-700\text{ nm})}$ 的变化来计算光破坏后残余 Chla 的百分含量.

2 结果

2.1 集胞藻 Cyt *b₆f* 制剂的蔗糖密度梯度离心和 SDS-PAGE 电泳图谱

参考 Cramer 研究组^[9]的方法并加以改进. 从集胞藻 6803 中分离得到了 Cyt *b₆f* 蛋白制剂, 离心管中红褐色条带为双突变 Cyt *b₆f* 样品(图 2A), 其他 3 个样品超离后外观上与双突变没有区别, 故图谱结果不再给出. 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 表明, 本研究分离纯化的集胞藻 Cyt *b₆f* 蛋白制剂大亚基主要由 3 个蛋白亚基组成, 按照迁移率增大的顺序为 Cyt *f*, Cyt *b₆* 及亚基 IV (图 2B). 文献报道从集胞藻中分离的 Cyt *b₆f* 样品为单体, Cyt *b₆f* 由二体转变为单体时, 往往伴随着 Rieske[Fe-S]蛋白的丢失^[4,13]. 因此本研究得到的 Cyt *b₆f* 制剂也是单体, 但这并不影响对样品中 Chla 性质的研究, 因为 Chla 结合在亚基 IV 上, 二体转变为单体时, 并不影响 Chla 的性质, 已有多篇文献报道了利用 Cyt *b₆f* 单体对 Chla 开展类似研究的工作^[4,13].

2.2 集胞藻 Cyt *b₆f* 野生和突变蛋白制剂的吸收光谱

图 3A 是从集胞藻分离纯化的野生(实线)和突变

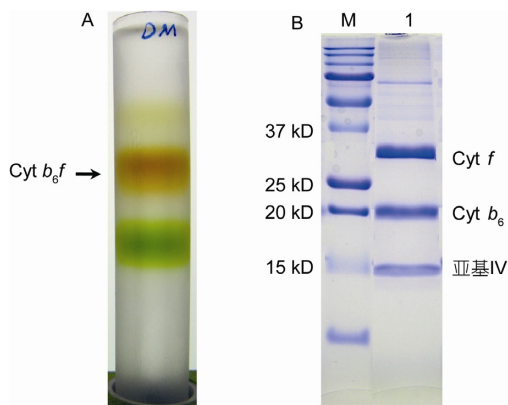


图 2 蔗糖密度梯度离心制备集胞藻 6803 Cyt *b₆f* 蛋白复合体及 SDS-PAGE 图谱

A: 箭头所示棕色条带为集胞藻 6803 Cyt *b₆f* 单体; B: 集胞藻 6803 Cyt *b₆f* 单体样品 SDS-PAGE. M: 蛋白分子量标准; 1: Cyt *b₆f* 单体样品

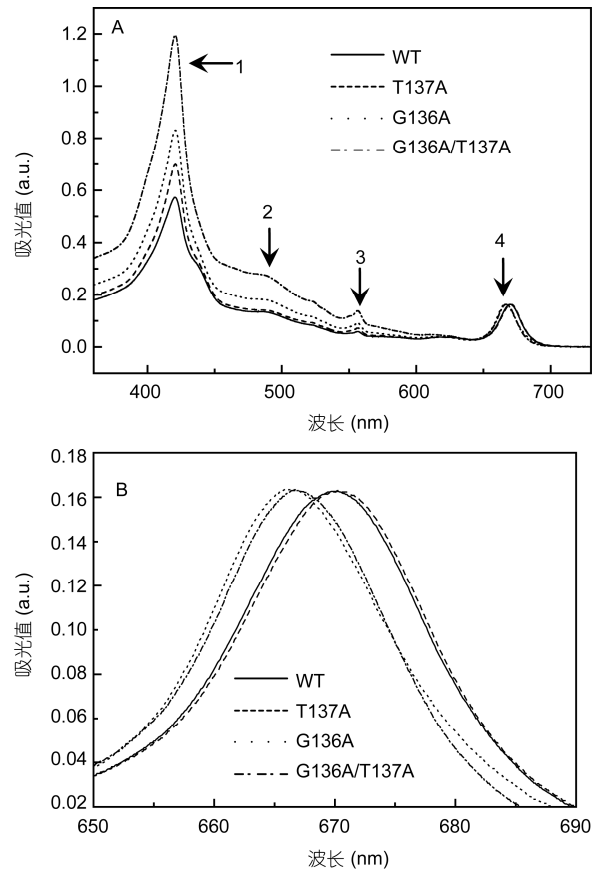


图 3 集胞藻 6803 野生和突变 Cyt *b₆f* 蛋白制剂的吸收光谱

A: 箭头所示峰 1, 血红素 heme 分子 Soret 带吸收; 峰 2, 类胡萝卜素吸收; 峰 3, Cyt *f* α -带吸收; 峰 4, Chla Q 带吸收; B: 集胞藻 6803 野生(WT)和 3 个突变体 Cyt *b₆f* 蛋白样品 Chla Q 带吸收峰位的差异. WT 的 Cyt *b₆f* 实线) Chla Q 带吸收峰位为 (669.7 ± 0.1) nm; 单突变 T137A 的 Cyt *b₆f* 峰位为 (670.2 ± 0.1) nm, 和野生型相比发生了 0.5 nm 的红移(虚线); 而单突变 G136A 的 Cyt *b₆f* 峰位为 (665.8 ± 0.1) nm(点线), 双突变的 Cyt *b₆f* 峰位为 (666.4 ± 0.1) nm(点划线), 分别发生了约 4 和 3 nm 的蓝移. 光谱在各自样品 Chla Q 带吸收峰位进行了归一化处理.

Cyt *b₆f* 样品的吸收光谱, 光谱在 Chla 红区的吸收峰位进行了标准化. 670 nm 附近的吸收峰是 Cyt *b₆f* 样品中 Chla 在红区的吸收; 556 nm 吸收峰表示有 Cyt *f* 的存在; 460~480 nm 处的一较弱的吸收峰是 Car 的特异吸收; 420 nm 区域的吸收主要是血红素(heme)分子在蓝区的吸收.

集胞藻野生和突变 Cyt *b₆f* 的吸收光谱主要有两方面差别. (i) 和野生相比, 3 个突变 Cyt *b₆f* 样品血红素 heme 的吸收(420 nm)强度相对增加, 420 nm 吸收强度从大到小依次为双突变 G136A/T137A(点划线)>G136A(点线)>T137A(虚线)>WT(实线). 由于一个 Cyt *b₆f* 单体分子结合 4 个血红素分子, 因此 420

nm 吸收值的大小可以表示 Cyt *b₆f* 蛋白的量, 而光谱在 Chl_a 的红区吸收峰(约 670 nm)处进行了归一化, 所以样品在 420 nm 吸收值越大, 说明结合等量 Chl_a 分子则需要更多蛋白的量. 换言之, 420 nm 处的吸收值越大, 样品结合 Chl_a 的量越少. 这说明和野生相比, 突变样品结合 Chl_a 的能力下降, 这可能是因为邻近 Chl_a 的氨基酸突变影响了蛋白微环境, 降低了蛋白与 Chl_a 的结合能力.

除此之外, 发现突变后蛋白样品在红区吸收峰位也发生了变化(图 3B). 野生型样品 Chl_a 在红区的吸收为(669.7±0.1) nm(实线), 单突变 T137A 发生了约 0.5 nm 的红移, 红移到(670.2±0.1) nm(虚线); 而单突变 G136A 则发生了较大幅度的蓝移, 吸收峰位为(665.8±0.1) nm(点线), 蓝移将近 4 nm; 双突变 G136A/T137A 峰位为(666.4±0.1) nm(点画线), 蓝移程度略小于单突变 G136A, 这显然是 2 个单突变共同影响的结果, 因为单突变 G136A 使 Chl_a 吸收发生蓝移, 而单突变 T137A 使 Chl_a 发生略微的红移. 从吸收谱峰位变化的程度判断, 单突变 G136A 对 Chl_a 的影响要大于单突变 T137A, 前者使峰位蓝移约 4 nm, 而后者使峰位红移约 0.5 nm. Peterman 等人^[13]也曾经从野生集胞藻 6803 中分离出 Cyt *b₆f* 单体样品, 并且对样品的吸收光谱特点、荧光产率、荧光寿命等进行了详细的研究. 在其发表的文献中, 没有给出电泳图谱, 但和其给出的吸收光谱比较, 本研究使用的 Cyt *b₆f* 样品纯度要高于 Peterman 的样品纯度.

2.3 Chl_a 光破坏的研究

图 4 是对集胞藻野生和 3 个突变 Cyt *b₆f* 样品光破坏研究结果. 在强光照射 10 min 后, 野生型 Chl_a 的含量下降为最初含量的约 95%, 即有约 5% 的 Chl_a 被强光破坏; 而在相同条件下, 3 个突变样品 Chl_a 的含量为最初含量的约 90% 或者以下, 即有至少约 10% 的 Chl_a 被强光破坏. 强光照射 30 min 后, 野生样品和 3 个突变样品残留 Chl_a 的含量差别变得显著, 野生样品中 Chl_a 残留量最高, 为最初的约 84%. 而 3 个突变样品 Chl_a 的残留量则显著下降, 其中 T137A 样品为最初的约 74%; G136A 为初始的约 67.6%; 双突变 Chl_a 残留量最少, 只有约 55.6%, 显然, 突变样品 Chl_a 比野生样品 Chl_a 更容易被破坏, 这一结果表明, 复合体亚基 IV 的氨基酸残基 G136 和 T137 对维持

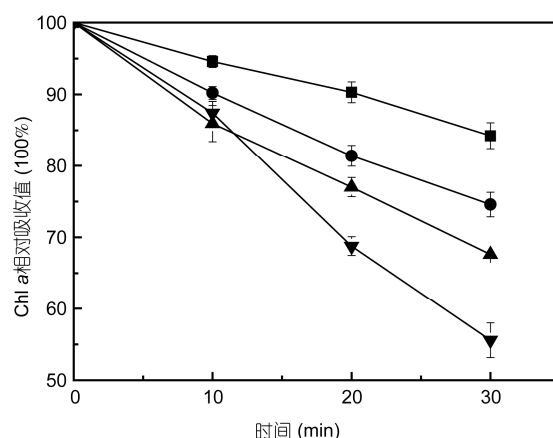


图 4 不同 Cyt *b₆f* 蛋白样品中 Chl_a 光破坏比较

■: WT-Cyt *b₆f* 样品; ●: 单突变 T137A- Cyt *b₆f*; ▲: 单突变 G136A-Cyt *b₆f*; ▼: 双突变 G136A/T137A- Cyt *b₆f*; 数据用±SD, *n*≥4

Chl_a 的光稳定性具有重要作用, 并且 G136 的作用要大于 T137.

3 讨论

光保护(photoprotection)机制是光合作用研究中十分重要的领域. 植物利用光能进行光合作用的同时, 也要采取多种光保护机制, 以避免过剩的激发能对自身的伤害. 对光保护机制的研究一直以来主要集中在光系统 II 中, 然而由于光系统 II 复合体结构复杂, 例如, 蓝细菌 *T. vulcanus* 的光系统 II 单体就结合了 35 个 Chl_a 分子, 因此难以通过分子生物学手段深入研究光保护机制的细节^[14,15]. 而 Cyt *b₆f* 复合体每个单体只结合 1 分 Chl_a, 并且该 Chl_a 在光照条件下很稳定, 因此可以通过分子生物学方法, 与其他研究手段结合起来, 揭示其光稳定性的机制, 这对于从单分子水平上理解光合作用过程中光保护机制的细节具有重要的参考价值^[4].

本研究, 对集胞藻 6803 Cyt *b₆f* 的亚基 IV 上邻近 Chl_a 分子的 G136 和 T137 进行定点突变后, 发现蛋白结合 Chl_a 的能力降低(图 3A), 同时 Chl_a 分子的光稳定性下降(图 4). 对于前一个结果, 可以从晶体结构中得到解释, 晶体结构显示, Chl_a 的 Mg 离子与 H₂O 配位, 而这个 H₂O 通过氢键与亚基 IV 的 G136 和 T137 相互作用(图 1). T137A 突变, 除去了能够形成氢键的-OH 基团; G136A 突变使氨基酸侧链由-H 改变为-CH₃, 而该侧链恰好位于 G136 和 Chl_a 大环平面

之间(图 1), 侧链基团变大产生的空间位阻效应, 可能影响了氢键网络的稳定, 干扰 Chla 中心 Mg 离子和 H₂O(图 1 中 W1)配位, 因此突变这 2 个氨基酸会降低蛋白与 Chla 的结合能力. 至于突变后 Chla 光稳定性降低, 一种可能的机制是, 突变后干扰了氢键网络, 改变了 Chla 周边的微环境, 使 O₂ 更容易接近 Chla 分子, 最终导致 ¹O₂^{*} 的产量增加, 致使突变样品中

Chla 更易被 ¹O₂^{*} 破坏. 这一机制的一个典型的例子是水溶性 Chla 蛋白(water-soluble chlorophyll-binding protein, WSCP). 研究表明, 该蛋白中 Chla 分子表现较高的光稳定性. 根据蛋白晶体结构, 研究者认为, 其 Chla 稳定的原因是蛋白中 Chla 分子处于疏水的蛋白微环境中, 避免了激发态 Chla 分子与 O₂ 分子的接触, 因此减少了 ¹O₂^{*} 的产生^[16,17].

参考文献

- Hasan S S, Yamashita E, Cramer W A, et al. Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome *b₆f* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 4297–4302
- Kurusu G, Zhang H, Smith J L, et al. Structure of the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 2003, 302: 1009–1014
- Stroebel D, Choquet Y, Popot J L, et al. An atypical haem in the cytochrome *b₆f* complex. *Nature*, 2003, 426: 413–418
- Yan J, Dashdorj N, Cramer W A, et al. On the structural role of the aromatic residue environment of the chlorophyll *a* in the cytochrome *b₆f* complex. *Biochemistry*, 2008, 47: 3654–3661
- Bowers P G, Porter G. Quantum yields of triplet formation in solutions of chlorophyll. *Proc R Soc A*, 1967, 296: 435–441
- Dashdorj N, Zhang H, Kim H, et al. The single chlorophyll *a* molecule in the cytochrome *b₆f*: unusual optical properties protect the complex against singlet oxygen. *Biophys J*, 2005, 88: 4178–4187
- Vavilin D V. Methods for the isolation of functional photosystem II core particles from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Methods Mol Biol*, 2011, 684: 29–40
- 芦亚菲, 曲娜, 陈晓波, 等. 一种快速构建集胞藻 6803 *petBD* 必需基因定点突变株的方法. *水生生物学报*, 2014, 38: 957–961
- Baniulis D, Zhang H M, Cramer W A, et al. Purification and crystallization of the cyanobacterial cytochrome *b₆f* complex. *Methods Mol Biol*, 2011, 684: 65–77
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680–685
- Mao D Z, Yan J S, Zhai X J et al. A new method of purifying cytochrome *b₆f* protein complex. *Acta Bot Sin*, 1998, 40: 1022–1027
- Chen X B, Zhao X H, Zhu Y, et al. Hydrogen peroxide-induced chlorophyll *a* bleaching in the cytochrome *b₆f* complex: a simple and effective assay for stability of the complex in detergent solutions. *Photosynth Res*, 2006, 90: 205–214
- Peterman E J G, Wenk S O, Pullerits T, et al. Fluorescence and absorption spectroscopy of weakly fluorescent chlorophyll *a* in cytochrome *b₆f* of *Synechocystis* PCC 6803. *Biophys J*, 1998, 75: 389–398
- Umena Y, Kawakami K, Shen J R, et al. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 2011, 473: 55–60
- Ruban A V, Johnson M P, Duffy C D. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1817: 167–181
- Horigome D, Satoh H, Itoh N, et al. Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein. *J Biol Chem*, 2007, 282: 6525–6531
- Renger G, Pieper J, Theiss C, et al. Water soluble chlorophyll binding protein of higher plants: a most suitable model system for basic analyses of pigment-pigment and pigment-protein interactions in chlorophyll protein complexes. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 1462–1472

Disturbing the Hydrogen Bond Network Decreases the Photostability of the Chlorophyll *a* in Cytochrome *b₆f* from *Synechocystis* sp. PCC 6803

LU YaFei¹, QU Na¹, CHEN XiaoBo¹ & WANG WenDa²

¹ College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;

² Key Laboratory of Photobiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Cytochrome *b₆f* complex (Cyt *b₆f*) is one of the three thylakoid membrane complexes which compose the photosynthetic electron transport chain and it contains only one chlorophyll *a* (Chl*a*) per monomer. The Chl*a* in the complex is much stable (about 120~130 times) than the free Chl*a* in organic solvent under light. However, the mechanism of the high stability remains unclear. The crystal structure of Cyt *b₆f* at a 2.7 Å resolution shows that the magnesium ion of the Chl*a* is coordinated by a water molecular which forms hydrogen bonds with residues G136 and T137 of subunit IV. In the present study, the stability mechanism was studied through disturbing the hydrogen bond network via site-directed mutagenesis of G136 and Thr137 of subunit IV. The results showed that disturbing the hydrogen bond network decreased not only the affinity between the protein and Chl*a*, but also the stability of Chl*a* against photodamage, which strongly suggested the hydrogen bond network involved in the Chl*a* was important to maintain the high photostability of the Chl*a* in the complex.

chlorophyll *a*, photostability, hydrogen bond, site-directed mutagenesis, cytochrome *b₆f* complex

doi: 10.1360/N052014-00173