

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

王广策 邓 田 曾呈奎:

藻胆蛋白的研究概况(I) *

——藻胆蛋白的种类与组成

OUTLINES OF STUDIES ON PHYCOBILIPROTEINS(I) -- KINDS AND COMPOSITION OF PHYCOBILIPROTEIN

藻胆蛋白主要存在于蓝藻、红藻、隐藻和少数一些甲藻中,其主要功能是作为光合作用的捕光色素复合体,在一些藻类中藻胆蛋白也可以作为储藏蛋白,以使藻类在氮源缺乏的季节得以生存。目前,对藻胆蛋白的基础研究方兴未艾,取得了一些重要的结果。同时由于发现藻胆蛋白有广泛的应用前景,因而备受人们的关注。本文就藻胆蛋白的种类及组成方面的研究概况作一综述。

1 藻胆蛋白的种类

已知的藻胆蛋白主要可以分为4大类,即藻红蛋白(Phycerythrin)、藻蓝蛋白(Phycocyanin)、藻红蓝蛋白(Phcoerycyanin)和异藻蓝蛋白(Allophycocyanin)。根据来源的不同,每大类又可以分为若干个小类,每一小类前面分别冠以B、C和R,这些字母是用来表示藻胆蛋白的来源。如果完全按照光谱类型来分类,藻胆蛋白则可以分为6大类,分别是:异藻蓝蛋白B(APB)、异藻蓝蛋白(AP)、藻蓝蛋白(PC)、藻红蓝蛋白(PEC)、藻红蛋白I(PE I)和蓝藻中含藻尿胆素的藻红蛋白II(PE II)^[1]。值得一提的是,根据吸收光谱的特点,R藻红蛋白也

可以分为3类,分别是双峰型R藻红蛋白(仅有498 nm和565 nm的吸收峰,535 nm为吸收肩峰),三峰型F型R藻红蛋白(有3个完全的吸收峰分别位于498 nm,535 nm和565 nm,而且498 nm的吸收峰低于565 nm和535 nm的吸收峰)和三峰型II-型R藻红蛋白(与I型R藻红蛋白类似,也有3个完全的吸收峰,但498 nm的吸收峰高于其他两个吸收峰^[1])。令人奇怪的是,R藻红蛋白往往是海水单细胞蓝藻中主要的藻胆蛋白,而从淡水或土壤中分离的单细胞蓝藻却很少含有R藻红蛋白^[1]。

2 藻胆蛋白的基本构建单位及在溶液中的存在形式

藻胆蛋白是一类寡聚体蛋白,基本构建单位是 α 和 β 亚基,亚基分子量在17 KD至22 KD之间。在B和R藻红蛋白中还存在少量的 γ 亚基,它的分子量较大,约为30 KD。每种亚基是由脱辅基蛋白(Apoprotein)和开链四吡咯结构的色基组成,色基通过硫醚键与脱辅基蛋白的半胱氨酸残基交联。目前已经测定了许多种藻胆蛋白 α 和 β

亚基的氨基酸全序列,但对所有红藻藻红蛋白 γ 亚基的氨基酸全序列尚未进行测定,仅测定了蓝藻*Synechococcus* sp. WH8020藻红蛋白的 γ 亚基的序列。

一般来说,藻胆蛋白的 α 亚基与 β 亚基形成稳定的单体($\alpha\beta$),再由单体聚合为多聚体 $(\alpha\beta)_n$ 。从蓝藻和红藻中分离的藻胆蛋白是三聚体 $(\alpha\beta)_3$ 或六聚体 $(\alpha\beta)_6$ 。藻胆蛋白在溶液中的状态往往与藻胆蛋白的种类、浓度、溶液的pH和离子强度等因素有关。例如C藻蓝蛋白在接近其等电点($pI = 5 \sim 5.5$)时,以六聚体 $(\alpha\beta)_6$ 为主要的存在形式,而在pH 6.8时,则以三聚体为主;在pH为5.4,离子强度为0.2,蛋白质浓度为0.6 mg/ml时,存在有六聚体与单体间的平衡 $(\alpha\beta)_6 \rightleftharpoons 6(\alpha\beta)$;在pH为6.8,蛋白浓度较低时,则存在着三聚体与单体间平衡 $(\alpha\beta)_3 \rightleftharpoons 3(\alpha\beta)$;而当蛋白质浓度很高时,即使是pH 6.8,体间平衡 $(\alpha\beta)_3 \rightleftharpoons 3(\alpha\beta)$;而当蛋白仍以六聚体与单体间的平衡占优势。而对于R藻红蛋白和B藻红

* 国家自然科学基金资助项目
9700010号。
收稿日期:1998-07-20;
修回日期:1999-10-10



蛋白来说, 在一个很宽的 pH 范围内均是以很稳定的六聚体($\alpha\beta$)₆形式存在, 其原因可能是 γ 亚基将两个三聚体“盘”铆在一起。一般来说, 大部分的异藻蓝蛋白是以三聚体的形式存在, 然而 *Cyanidium cat-danum* 的异藻蓝蛋白分子量却显示它主要是以六聚体的形式存在 [2]。

3 藻胆蛋白的色基——藻胆素

1928 年 Lemberg 首次证明藻胆蛋白是由脱辅基蛋白和四吡咯结构的色基所组成。Ó hEocha 1958 年用 12 N 盐酸酸解藻胆蛋白得到了色基, 1966 年他又用甲醇回流的办法分离到了色基; Schram 和 Kroes 1971 年用 HBr 处理藻胆蛋白也得到了游离的色基, 他们称之为“藻胆素 (Phycobilin)”, 并且发现 C 藻蓝蛋白仅含有一种色基, 即藻蓝胆素 (Phycocyanobilin, PCB)。Ó carma 1964 年在 R 藻红蛋白中除发现有藻红胆素外, 还发现另外一种藻胆素, 它的吸收峰位于 495 nm 处, 在室温下用浓盐酸处理很难将其从脱辅基蛋白中去除, 以后这种色基被命名为“藻尿胆素 (Phycourobilin, PUB)”。以上所述色基的结构相继被确定。Bryant 等在 1976 年从藻红蓝蛋白 α 亚基中发现了第 4 种色基“Phycobilivudin”, 它的结构于 1987 年由 Bishop 等人确定。至此, 在藻胆蛋白中总共发现 4 种色基, 分别为: 藻红胆素 (Phycerythrobilin, PEB)、PCB、PUB 和 Phycobilivudin (PXB)。这 4 种藻胆素是同分异构体, 它们的差异表现在双键位置的不同。

据报道, 红藻 *Cyanidium cat-*

danum 细胞中藻胆素的合成途径为: 亚铁原卟啉(血红素) → 胆绿素 IXa → 15, 16-二氢胆绿素 IXa → 3(Z) 藻红胆素 → 3(Z) 藻蓝胆素 → 3(E) 藻蓝胆素。Beale 和 Cornejo 1991 年在 *C. caldanum* 培养基中添加四吡咯色基的前体物质 δ 氨基乙酰丙酸, 发现细胞中有藻蓝胆素的积, 并且它会自动地在体内或体外形成类似于光敏素色基的光活化加成物。据此, 他们认为 3(E) 藻蓝胆素可能是体内脱辅基蛋白结合的初始形式。

藻胆蛋白分子共价结合的色基数目较多, 而且一个分子可以结合种类不同的色基, 例如 R 藻红蛋白共价结合 25 个藻红胆素, 9 个藻尿胆素; 三聚体的藻红蓝蛋白可以共价结合 3 个 Phycobilivudin 和 6 个藻蓝胆素。一个藻胆蛋白的所有色基在功能上可以分为两种类型, 一种是能吸收能量并相应地产生荧光的“荧光型”色基(f); 另一种称为“敏化型”色基(s), 它能吸收能量并将吸收的能量快速高效地传递给“荧光型”色基, 自身不能产生荧光。

4 色基与脱辅基蛋白间的共价结合

现已用氨基酸序列分析的方法研究了脱辅基蛋白与色基结合的位置, 并且发现所有的色基均是和多肽链中的半胱氨酸残基以硫醚键共价结合, 结合的方式分别是通过色基的 A 环或者 D 环单键相连, 也有的色基 A 环和 D 环同时与脱辅基蛋白相连。半胱氨酸残基的存在是色基与脱辅基蛋白共价交联的必要条件, 但不是充分条件, 例如蓝藻 *Synechococcus* 6301 的藻

蓝蛋白 4 个半胱氨酸残基中有 3 个结合着藻蓝胆素, 另一个处于自由态^[3]。

4.1 色基与脱辅基蛋白在体外的结合

用甲醇回流的方法可以从藻胆蛋白分子中分离得到色基, 但用这种方法所得到的色基往往在其与脱辅基蛋白半胱氨酸残基相连的 C3' 位处形成乙叉基取代物。用基因工程的方法在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中表达出藻胆蛋白脱辅基蛋白亚基, 并且将其分离纯化, 然后再与色基 C3' 位的乙叉基取代物混合温育, 可以得到脱辅基蛋白和色基的非酶加合物^[3]。

天然的 C 藻蓝蛋白在 α -84、 β -84 和 β -155 位上均共价结合藻蓝胆素(PCB)。在体外, C 藻蓝蛋白的脱辅基蛋白可以和藻蓝胆素和藻红胆素在 α -84 和 β -84 上形成非酶加合物, 但却不能在 β -155 位形成加合物。其中藻蓝胆素参与形成的非酶加合物色基的形式为中胆绿素, 而藻红胆素参与的则主要为 15, 16-二氢胆绿素。与在体内酶促反应形成的加合物相比, 体外反应主要产生在 A 环的 C2 和 C3 间形成双键的氧化型加合物。

天然 C 藻红蛋白的 α 亚基在 α -82 和 α -139 位分别结合藻红胆素。在体外非酶促反应中, 藻红胆素在 α -82 位主要形成 15, 16-二氢胆绿素加合物, 在 α -139 位则形成尿胆素加合物, 只有极少量的藻红胆素与 α -82 位和 α -139 位上的半胱氨酸残基形成天然加合物。在天然藻红蓝蛋白 α 亚基 59 位上有一处于自由态的半胱氨酸残基, 当用脱辅基蛋白与藻红胆素进行体外非酶促反应, 在 α -59 上很难形成加合



物^[4]。

体外的研究结果表明脱辅基蛋白上有色基的非共价结合位点,色基不能完全专一地选择结合位点,而且脱辅基蛋白缺乏辨别色基的能力,因而在体外快速非酶促共价结合反应中,极少有色基能与脱辅基蛋白结合产生天然的构象。所以一般认为体内脱辅基蛋白与色基间的结合反应是酶促催化的^[3]。

4.2 藻胆蛋白 α 亚基的色基裂合酶

目前,只对藻胆蛋白 α 亚基的色基裂合酶进行了研究。这种色基裂合酶既能使色基共价结合至脱辅基蛋白上,也能从藻胆蛋白的亚基上将色基切割下来,已研究的藻胆蛋白包括藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白等。

4.2.1 藻蓝蛋白 α 亚基的藻蓝胆素裂合酶 藻蓝蛋白 α 亚基藻蓝胆素和藻红蓝蛋白 α 亚基 Phycobiliviolin 裂合酶的发现起因于对 C 藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白操纵子的研究。藻蓝蛋白的操纵子包括有两个阅读框架, *cpcF* 和 *cpcE*。在 *Synechococcus* sp. PCC7002 中任意阅读框架的插入突变,都会产生相同表现型的突变株。相对于野生型来说,这种突变株产生极少的藻蓝蛋白,而且所产生的藻蓝蛋白缺少 α -84 位上的藻蓝胆素,但是这种藻蓝蛋白 α -84 位色基结合位点都完全可以在体外与藻蓝胆素反应。在这种突变株中,藻蓝蛋白 β 亚基上的藻蓝胆素和异藻蓝蛋白上的色基均不受影响。对 *cpcE* 和 *cpcF* 基因的表达产物 *CpcE* 和 *CpcF* 多肽的催化活性进行研究,发现只有这两种多肽都存在时才能行使

藻蓝蛋白 α 亚基藻蓝胆素裂合酶的功能,单个多肽没有这种催化活性^[4],并且 *CpcEF* 能引起藻蓝蛋白 α 亚基的荧光强度减弱并且强烈地影响其吸收光谱,但是对藻蓝蛋白 β 亚基却没有影响。令人惊讶的是 *CpcEF* 能使 *Synechococcus* sp. PCC7002 藻蓝蛋白或其 α 亚基的藻蓝胆素催化转移至 *Anabaena* sp. PCC7120 藻蓝蛋白 α 亚基上,而且供体藻蓝蛋白的荧光特性表明在 *CpcEF* 催化前藻蓝胆素是处于刚性伸展的构象,即供体藻蓝蛋白处于天然态。尽管 Smith 等人 1991 年发现在 25 °C 和 pH7.0 条件下,非共价结合的血色素色基能缓慢地从天然蛋白质中解离,这些天然蛋白质包括辣根过氧化物酶,细胞色素 C 过氧化物酶, Chloroperoxidase 和豆血红蛋白等。这些解离的色基会被过量的脱辅基肌红蛋白重新捕获并结合,这个实验结果表明了这些天然蛋白质的血色素结合口袋内进行着强烈的“呼吸”运动,然而藻蓝蛋白分子内共价结合的色基可以从天然蛋白质中自发地或者催化地转移或丢失,这种现象实在难以解释。*CpcEF* 的催化活性呈现简单的 Michaelis-Menten 动力学关系。*CpcEF* 还可以催化藻红胆素和脱辅基藻蓝蛋白 α 亚基之间的结合。但是如果在反应体系中既有藻蓝胆素又有藻红胆素,则 *CpcEF* 主要催化藻蓝胆素的结合,这说明了在体内 *CpcEF* 的催化活性有选择性。

4.2.2 藻红蓝蛋白 α 亚基的 PXB 裂合酶 藻红蓝蛋白的 β 亚基与 C 藻蓝蛋白相似, β -84 位和 β -155 位均共价结合藻蓝胆素,但是 α 亚基却不同,藻红蓝蛋白 α 亚基的 α -84 位共价结合 Phycobilivio-

lin(PXB),而 C 藻蓝蛋白在相同位置上却结合藻蓝胆素。在含有藻红蓝蛋白的 *Anabaena* sp. PCC7120 细胞中,编码藻红蓝蛋白的操纵子由 5 个基因组成, *pecB* 和 *pecA* 基因编码藻红蓝蛋白的 β 和 α 亚基, *pecC* 基因编码与藻红蓝蛋白有关的连接多肽, *pecE* 和 *pecF* 分别与 *cpcE* 和 *cpcF* 有高度的同源性,是编码裂合酶的基因。构建 3 种突变型 *pecE* (*pecE* 基因插入突变)、*pecF* (*pecF* 基因插入突变) 和 *pecEF* (*pecF* 和 *pecE* 基因同时缺失),发现这 3 种突变体细胞的藻胆体中没有完整的藻红蓝蛋白,而且相对于野生型细胞, *pecC* 基因所表达的连接多肽的量也较少,藻红蓝蛋白 β 亚基的量只有野生型的 30%,然而藻胆体的其他成分与野生型相比则相差无几。在突变株 *pecE* 和 *pecF* 中,很难检测到藻红蓝蛋白的 α 亚基的存在,但在突变株 *pecEF* 中,脱辅基 α 亚基和藻蓝胆素的加合物与 β 亚基的比例为 1:1。这个结果表明了当藻红蓝蛋白 α 亚基 Phycobiliviolin 裂合酶的两条多肽都缺失时,其他色基裂合酶可以将藻蓝胆素结合到脱辅基 α 亚基上^[4]。

C-藻蓝蛋白 α 亚基和 β 亚基在结合藻蓝胆素处的氨基酸序列同源性很高,但是不同来源的 C 藻蓝蛋白亚基的色基结合处的序列之间差别较大。这与一般蛋白质的转译后修饰不同,因为一般蛋白质被修饰处的氨基酸序列往往高度保守,以便某种修饰酶的识别与附着。如前所述,脱辅基蛋白与色基的结合依赖于对多肽结合位点和色基类型有选择性的色基裂合酶,而且藻胆蛋白的色基往往结合在分子内部,所以推测裂合酶的位点选择专一性可能与其对藻胆蛋白

的三维空间结构的识别有关。

参考文献

- 1 Rowan, K.S. . Photosynthetic Pigments of Algae . New York : Cambridge University Press , 1989 . 166 ~ 189
- 2 Glazer, A. N. . Photosynthetic Accessory

Proteins with Bilin Prosthetic Groups .
In: Hatch , M. D. and Boardman ,
N. K. eds . The Biochemistry of Plants .
New York : Academic Press .1981 .8 :
51 ~ 96

- 3 Glazer , A. N. Fairchild . C. D. *et al.* .
Photosynthesis . In : Mathis , P. ed .

From Light to Biosphere , Dordrecht/
Boston/ London : Kluwer Academic ,
1995 .1 :3 ~ 9

- 4 Jung . L. J. and Chan . C. F. *et al.* . *J .
Biol . Chem.*, 1995 , 270 :12 877 ~
12 884

(本文编辑 :张培新)