

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

王广策 邓 田 曾呈奎:

## 藻胆蛋白的研究概况( II) ——藻胆蛋白的结构及其光谱特性\*

### STRUCTURE AND SPECTRAL PROPERTIES OF PHYCOBILIPROTEINS

#### 1 藻胆蛋白的一级结构与特异位点的修饰

目前,已经对一些藻胆蛋白的一级结构进行了测定。测定的方法有两种,一种是直接测定,另一种是测定相应基因的核苷酸序列再反推其氨基酸序列。通过对一级结构的比较分析,发现藻胆蛋白在某些位点处的氨基酸残基相当保守,并且认为这些位点在保证色基的构象以及蛋白质分子稳定性方面具有重要的意义。在一级结构分析中,还发现了一个相当有意义的现象,即在所有已测定的藻胆蛋白分子中,其 $\beta$ 亚基的72位均为经过修饰的 $\gamma$ -N 甲酰天冬酰胺残基,这是经蛋白质的转译后修饰而产生的,而且不论是原核藻类还是真核藻类的藻胆蛋白,均有这种现象的存在。经过深入研究分析,认为藻胆蛋白 $\beta$ -72位天冬酰胺甲基化作用的功能如下:

(1) 对藻胆蛋白提供一种保护机制,即在容易接触极性基团的位置上防止氨基酸残基的去酰胺基。一般认为,蛋白质分子的天冬酰胺和谷氨酰胺的去酰胺化作用会加速蛋白质的周转使蛋白质分子容易被降解,而且在生物的个体发育中蛋白质分子的脱酰胺化作

用会控制生物发育的某些过程。有研究表明酰胺基经过甲酰化作用后的蛋白质对酸水解的抗性要比未甲酰化的蛋白质高16~18倍,因此藻胆蛋白这类古老的蛋白质分子在进化中获得了这种甲酰化作用,从而得以保存下来。

(2) 与 $\beta$ -84位上的色基相互作用,使其吸收光谱红移。*Agmenellum quadmplicatum* 和 *Mastigocladus laminosus* 的藻蓝蛋白晶体结构解析结果表明 $\beta$ -72位的 $\gamma$ -N 甲酰化天冬酰胺残基的侧链与 $\beta$ -84位的色基的B环间的距离小于2Å,这说明它可能扰动 $\beta$ -84色基使之吸收光谱红移。已知藻红蓝蛋白 $\beta$ -84色基是“荧光型”,因此,它吸收光谱的红移有利于分子间的能量传递。

(3) 有利于藻胆体内定向能量传递。比较野生型 *Synechococcus* sp. PCC7494 和不能在藻胆蛋白 $\beta$ -72位甲酰化的突变型藻株,发现野生型和突变型的藻胆蛋白在表达量以及热稳定性方面均十分相似,但突变株的藻胆体在体内和体外不能进行能量传递。分离的藻胆体如果其藻胆蛋白非甲酰化或甲酰化不完全,则藻胆体显示较强的藻蓝蛋白或异藻蓝蛋白的荧光。因而这种藻胆体与野生型的相比有

较低的荧光量子产率。研究还发现,突变株产生的藻胆蛋白可以用分离的野生型 *Synechococcus* sp. PCC6301 株的甲基化酶处理,使之在体外甲酰化,并恢复天然态藻胆蛋白的特点。这些结果表明 $\beta$ -72位的甲酰化能增加能量向终端受体色基传递的效率。

#### 2 藻胆蛋白高级结构与色基的光谱特征

目前对藻胆蛋白高级结构的认识主要来源于x射线衍射法解析藻胆蛋白晶体结构。现在,已解析的藻胆蛋白包括:*Anabaena caribialis* 的六聚体C藻蓝蛋白、*Mastigocladus laminosus* 的三聚体C藻蓝蛋白、*Agmenellum quadruplicatum* 的六聚体C藻蓝蛋白、*Fremyella diplosiphon* 的六聚体C藻蓝蛋白、*M. laminosus* 的三聚体藻红蓝蛋白、*Porphyridium sor-didum* 的六聚体B藻红蛋白、*Polysiphonia*

\* 国家自然科学基金资助项目 39700010号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第3677号。  
收稿日期:1998-09-24;  
修回日期:1999-08-24



*ueceolata* 的六聚体 R 藻红蛋白、*Porphyridium cuneatum* 的三聚体 b 藻红蛋白和 *Spirulina platensis* 的三聚体异藻蓝蛋白。高分辨率的藻胆蛋白晶体结构解析表明,所有的藻胆蛋白的晶体结构均十分相似,即  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基靠静电相互作用形成有部分重叠的“弯月”形单体 ( $\alpha\beta$ ), 3 个单体 ( $\alpha\beta$ ) 围绕中心轴形成一个具中央空洞的圆盘形三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>, 如果藻胆蛋白是六聚体形式 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>。则由两个圆盘形的三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 垛叠在一起形成。每个三聚体盘厚约为 30 Å, 圆盘的外径为 110 Å, 中央空洞的直径为 35 Å。  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基虽然含有不同数量的氨基酸残基, 而且一级结构不同, 但它们的二、三级结构却十分相似, 均是含有 9 个  $\alpha$ -螺旋, 每两个  $\alpha$ -螺旋之间有不规则转角相连, 亚基的三级结构与球蛋白十分相似。藻胆蛋白晶体结构的解析不仅需要每个构成晶胞的蛋白质分子具三重对称性, 而且需要每个蛋白质亚基也具有三重对称性。由于组成六聚体藻红蛋白 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> 中的  $\gamma$  亚基不具有三重对称性, 因而 X 射线衍射法很难确定它在晶体中的位置, Ficner 等在藻胆蛋白晶体的电子密度图中发现其中央空洞的电子密度高于四周, 因而推测  $\gamma$  亚基可能以无序状态存在于中央空洞中, 后来他们又比较了含  $\gamma$  亚基的 B 藻红蛋白和不含  $\gamma$  亚基的 b 藻红蛋白晶体的电子密度图, 发现 b 藻红蛋白中央空洞的电子密度与外周相同, 而 B 藻红蛋白中央空洞的电子密度却高于四周, 由此, 他们认为  $\gamma$  亚基一定存在于中央空洞中。然而我国学者常文瑞等在解析含  $\gamma$  亚基的多管藻

(*Polysiphonia ueceolata*) R 藻红蛋白晶体结构时, 发现中央空洞的电子密度与外周一样高。因而关于  $\gamma$  亚基的存在位置一直未有定论, 许多人都认为它极有可能存在于藻胆蛋白的中央空洞中, 但缺少直接的实验证据。

藻红蛋白  $\gamma$  亚基含量低, 分离困难, 因而到目前为止, 所有红藻藻红蛋白  $\gamma$  亚基的氨基酸序列均未见报道, 仅 Glazer 等报道了蓝藻 *Synechococcus* sp. WH8020 藻红蛋白 II (PE II)  $\gamma$  亚基的氨基酸序列, 发现此序列不具有三重对称性。  $\gamma$  亚基在藻红蛋白中的功能可能有两点: 一是吸收 490 ~ 500 nm 的光, 二是作为连接多肽使藻红蛋白以稳定的六聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> 的形式存在于溶液中。至于  $\gamma$  亚基在分子中如何起连接作用, Glazer 等人认为如果  $\gamma$  亚基存在于中央空洞中, 则它可能类似于“钉子”将两个三聚体盘“钉”在一起。藻胆蛋白晶体结构解析结果表明  $\beta$ -84 位的色基伸向中央空洞中, 三聚体盘 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 应有 3 个  $\beta$ -84 位的色基伸向中央空洞中, 因此位于中央空洞中的  $\gamma$  亚基应该影响  $\beta$ -84 位色基的光谱特性, 例如 *Porphyridiumsondidum* 的 RPC 在结合有连接蛋白时,  $\beta$ -84 色基的吸收峰红移 16 nm, 然而对比分析 b 藻红蛋白 (不含  $\gamma$  亚基) 和 B 藻红蛋白 (含  $\gamma$  亚基) 的光谱发现  $\beta$ -84 位上的色基以及周围氨基酸残基的环境并不受  $\gamma$  亚基的影响, 二者的主要差别是 B 藻红蛋白有 498 nm 的吸收肩峰, 而 b 藻红蛋白无此吸收肩峰。

藻胆蛋白的聚集状态对色基光谱特点的影响程度随着藻胆蛋白种类的不同而不同。在 C 藻蓝蛋

白中, 单体 ( $\alpha\beta$ ) 和三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 的吸收光谱无显著的区别 (最大吸收峰约位于 620 nm), 而且异藻蓝蛋白单体的吸收光谱与 C 藻蓝蛋白单体的吸收光谱非常相似, 吸收峰也大约位于 620 nm, 然而异藻蓝蛋白三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 的吸收峰却位于 650 nm。产生这一现象的原因可能是相邻色基间的激子相互作用以及色基构象的改变所致, 具体来说就是在三聚体中  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的相互作用使色基处于特定的蛋白质环境, 而且这种蛋白质环境与单体 ( $\alpha\beta$ ) 的显然不同, 所以异藻蓝蛋白三聚体 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> 和单体 ( $\alpha\beta$ ) 的吸收光谱不同。

在 C 藻蓝蛋白分子中有 3 个保守的天冬氨酸残基 Asp $\alpha$ -87、Asp $\beta$ -87 和 Asp $\beta$ -39, 它们分别与 3 个色基  $\alpha$ -84、 $\beta$ -84 和  $\beta$ -155 相互作用 ( $\alpha$ -84 \* Asp  $\alpha$ 87,  $\beta$ -84 \* Asp  $\beta$ -87 和  $\beta$ -155 \* Asp  $\beta$ 39), 使色基呈拱形构型, 这种相互作用依赖于藻胆蛋白精细的高级结构, 而且这种作用在其他藻蓝蛋白如紫球藻 (*Porphyridium cuneatum*) 的 R 藻蓝蛋白 I 中也存在。所以藻胆蛋白精细的高级结构决定色基的构象, 而色基的构象又决定色基的光谱特征。色基在游离态或者在藻胆蛋白变性时吸收光谱、荧光光谱、激发态的寿命以及光化学特性等与天然态的藻胆蛋白显然不同。天然态藻胆蛋白色基有较长的激发态寿命 (大约超过 1 ns) 以便有充裕的时间将其激发能传至下一个色基。当藻胆蛋白变性或色基处于游离态时, 其激发态寿命极短, 只有 100 ps, 其原因是激发态的能量可以通过自身无辐射驰豫的方式散失, 而藻胆蛋白在天然态时, 色基的无辐



射弛豫机制受阻。在藻胆蛋白色基的吸收光谱中有两个吸收区域,分别位于 300~400 nm(UV) 和 500~700 nm(VIS)。它们吸收值的比值 AVIS/AUV 的大小取决于色基的构象。在天然态时,此比值大于 4;藻胆蛋白变性使色基呈大环螺旋构象时,比值小于 1。

现一般认为天然态藻胆蛋白分子中,蛋白质组分的功能主要有:(1) 它们为色基提供了合适的环境,使色基保持特定的构象并防止色基的大幅度运动;(2) 它们具有特定的氨基酸残基使色基保持质子化状态,色基的质子化状态可以抑制色基激发态时无辐射弛豫散失能量;(3) 藻胆蛋白聚集态的形成有利于色基间以及色基与脱辅基蛋白间的相互作用,这两种作用影响着色基的光谱特征。C 藻蓝蛋白的每个单体( $\alpha\beta$ ) 有 3 个藻蓝胆素,分别位于  $\alpha$ -84、 $\beta$ -84 和  $\beta$ -155。这 3 个色基的化学结构相同,但由于蛋白环境的不同,因而有不同的吸收光谱,吸收峰分别位于 598 nm( $\beta$ -155)、618 nm( $\alpha$ -84) 和 624 nm( $\beta$ -84)。异藻蓝蛋白的单体( $\alpha\beta$ ) 只含有两个色基,分别位于  $\alpha$ -84 和  $\beta$ -84。尽管这些色基与 C 藻蓝蛋白的色基相同,均为藻蓝胆素,但相对于 C 藻蓝蛋白来说,异藻蓝蛋白色基吸收峰红移 40 nm。这些结果表明相同的色基结合在不同的藻胆蛋白、同一藻胆蛋白的不同亚基或者同一亚基的不同位点,其光谱的特征均不同。究其原因,是色基所处的蛋白质环境不同所致。如上所述,脱辅基蛋白的特点决定着色基的构象,反过来,色基的结构也影响脱辅基蛋白的结构,进而影响和控制着整个藻胆蛋白分子的聚集态,例如色基的还原

和光致漂白作用可以使藻胆蛋白不能形成高于二聚体的聚集态,还原的色基再氧化可以使藻胆蛋白重新聚合成起始状态。这说明藻胆蛋白是自定义的,而且是色基蛋白质系统的最佳状态。现已广泛认为完整的色基结构是决定藻胆蛋白四级结构的重要因素。

在藻胆蛋白分子内及分子间,色基间的传能方式一般认为有两种,如果色基间的距离超过 20 Å,传能机制是 Förster 的无辐射共振传能,但如果色基间的距离小于 20 Å,则传能机制为激子偶联(Exciton coupling)。激子偶联机制认为两个色基间的距离一旦小于 20 Å,则色基间的相互作用变得非常强,很难分清激发态是属于哪一个色基的,好象两个色基在一起成为一个“超级色基”。现在能量传递机制研究得较为透彻的三种藻胆蛋白,分别是异藻蓝蛋白, C 藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白。研究的方法主要有两种:一种是实验的方法,主要应用时间分辨荧光技术和瞬间吸收技术,研究色基间的能量传递过程;另一种方法则是以藻胆蛋白晶体结构的知识作为基础,用理论计算的方法研究传能过程。但用这两种方法所得到的结果不太相符,推测其原因可能是:一般理论计算往往基于 Förster 的无辐射共振传能的原理,而实际上,在藻胆蛋白的三聚体或者六聚体中, $\alpha$ -84 和  $\beta$ -84 色基中心间的距离接近 20 Å,在这样近的距离内,传能机制是激子偶联,因而用 Förster 的理论来计算就不太合适了。然而用 Förster 理论来计算藻胆蛋白单体色基间的传能往往与实验数据相符。在三聚体或六聚体中,色基间的传能,也许既存在 Förster 的传能机制也存在激

子偶联机制,色基的激发能可能还有少部分是通过自身的无辐射弛豫的方法散失,如果这个观点是正确的话,把藻胆蛋白的色基分为“s”型或“r”型两种类型就没有意义了,因而色基间的传能机制就变得非常复杂。

### 3 藻胆蛋白分子的进化

根据免疫学特性的不同,藻胆蛋白进化形成了 4 个藻胆蛋白家族,分别是藻蓝蛋白家族、藻红蛋白家族、异藻蓝蛋白家族和将藻胆体核心与类囊体膜结合在一起的连接蛋白(LCM)家族,每个家族内的各个成员间能发生免疫交叉反应,但不同家族的成员间则不能发生免疫交叉反应,家族内每个成员的光谱特征密切相关。这说明祖先藻胆蛋白分子的分化是一个非常古老的事件,自此以后,藻胆蛋白分子表面的抗原决定簇变化非常缓慢。异藻蓝蛋白和 C 藻蓝蛋白虽然都共价结合藻蓝胆素,但却不发生免疫交叉反应,这说明了色基在很大程度上是被包埋在藻胆蛋白分子的内部,藻胆蛋白晶体结构研究也证明了这一点。藻胆蛋白的另一大类——藻红蓝蛋白的免疫学特征与藻蓝蛋白非常相似,而与藻红蛋白则差距较大,因此 Ducret 等认为应该将藻红蓝蛋白列为藻蓝蛋白家族中的一个亚族。

现已对多种藻胆蛋白亚基的氨基酸序列进行了测定,结果表明藻胆蛋白的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基间的同源性极高,而且同一家族成员间的同源性也很高,这些均表明藻胆蛋白的祖先基因复制并逐渐突变为家族藻胆蛋白祖先基因,家族藻胆蛋白祖先基因复制为两个拷贝,于是就形成了  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的基因。



藻胆体核和类囊体膜连接多肽 LCM 与异藻蓝蛋白的  $\alpha$  亚基在进化上是分开的。这种连接多肽可能代着藻胆蛋白的原始形式,因为它含有捕光天线系统所必需的一切要素,例如它含有与类囊体膜相互作用的区域,一般称为“环形区域”,正是由于这个环形区域的存在,使藻胆体能精确地与反应中心进行能量偶联;另外它还具有藻蓝胆素,估计是作为藻胆体的能量终端受体。连接多肽的起源以及它们对藻胆蛋白进化的影响目前尚不太清楚,这些连接多肽的结构也未得到测定。推测连接多肽与藻胆蛋白在进化上是同步的,从而保证它们在藻胆体中的协调功能。一个非常有意思的问题是,如果藻胆蛋白与连接多肽在进化上是同步的,那么二者的进化模式是否一致?

#### 4 藻胆蛋白的应用研究

目前藻胆蛋白的应用研究主

要集中以下几个方面:(1) 取代人工合成的染料,用作食品和化妆品的添加剂,以避免人工合成物对人体的伤害。(2) 可以作为药物。最近的一些研究表明,藻胆蛋白可以刺激人 B 淋巴细胞的增殖反应,提高机体的免疫力。另外还发现 R 藻红蛋白可以和胰岛素抗体产生特异的免疫反应,这表明 R 藻红蛋白的构象或结构的某些部位与胰岛素的构象或结构的某些部位与胰岛素有一定程度的相似,因而它也许对糖尿病有一定的疗效。(3) 作为荧光探针。藻胆蛋白在与其他蛋白如抗体等共价交联后荧光量子产额和发射光谱未发生变化,于是 Glazer 和 Stryer 认为藻胆蛋白可以作为荧光探针 (Phycofluor probes)。藻胆蛋白荧光探针的出现为荧光检测技术注入了新的活力,它克服了人工合成荧光素价格高、合成中产生有毒物质以及长期保存后同蛋白质结合能力减弱甚至消失等缺点。具体地说,它的优点如下:(1)

藻胆蛋白以溶液或固态保存都很稳定,在 pH4~11 之间,光谱无明显变化;(2) 色基多,对光的吸收能力强,荧光量子产额高,Glazer 等测定 B 藻红蛋白的荧光强度是荧光素的 14.5 倍;(3) 荧光位于橙红光区 (550 ~ 700 nm),背景荧光干扰少;(4) 斯托克位移大,普通的荧光素一般小于 30 nm,而藻胆蛋白则高达 80 nm 或更高;(5) 它的等电点在 4.7 ~ 5.3 之间,因此在生理溶液中,它带负电荷,而细胞表面通常也是带负电荷的,所以非特异性吸附的可能性极小;(6) 天然生物大分子不淬灭其荧光;(7) 藻胆蛋白表面具有较多的活性基团如 -SH 基, -NH<sub>2</sub> 基等,因此交联方便。正是由于藻胆蛋白的这些优点,目前已被广泛地用作荧光探针,并已有产品出售。🌻

(本文编辑:张培新)