

特异的隐藻藻胆蛋白的性质及存在状态

陈敏, 杨多利, 李雪薇

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 隐藻藻胆蛋白继承自红藻, 但其蛋白和色素结构、组成、性质、在叶绿体中的存在部位等方面都与报道较多的红、蓝藻藻胆蛋白不同, 是藻胆蛋白中较为特异的一个进化分支。目前对隐藻藻胆蛋白的了解比红、蓝藻藻胆蛋白要少得多, 且各种报道之间存在差异甚至矛盾之处。本文从隐藻藻胆蛋白的生化特性、聚合形式和在类囊体膜腔中的存在状态等方面入手, 对目前已发现的隐藻藻胆蛋白的研究近况做了综述和分析, 并就存在的问题和解决方法做了讨论。

关键词: 隐藻; 藻胆蛋白; 生化特性; 聚合; 膜腔定位

中图分类号: Q946.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)04-0128-09

DOI: 10.11759/hyxx20160921001

藻胆蛋白(phyco bilinprotein, PBP)是由开链四吡咯结构色素与蛋白质共价结合形成的色素蛋白复合物, 在光合作用过程中承担着吸收和传递光能的重任, 是重要的捕光天线蛋白。同时不同藻胆蛋白具有各自独特的荧光特性和很高的荧光量子产率^[1], 因此, 在理论研究和应用方面都具有重要的意义。

目前发现的藻胆蛋白存在于红藻、蓝藻以及部分隐藻和甲藻 4 类光合藻类中。其中隐藻(cryptophytes)是由真核红藻经二次内共生产生的单细胞真核藻类^[2-3], 但其光合系统结构和组成特殊, 除了类囊体膜上存在着由叶绿素 Chla、Chlc 和膜蛋白组装形成的脂溶性光合系统外, 在部分种属中还含有水溶性的藻胆蛋白。与其他 3 种来源的藻胆蛋白不同, 隐藻藻胆蛋白不形成藻胆体, 存在部位也非附着于类囊体膜外表面, 而是在类囊体膜腔内部^[4], 是藻胆蛋白家族中十分特殊的一类^[5]。

对于红、蓝藻中的藻胆蛋白以及组装而成的藻胆体的结构、性质、功能等已有相当透彻的研究^[6-9]。相较而言, 对隐藻藻胆蛋白的了解要少得多, 尤其在隐藻藻胆蛋白的亚基组成、组装方式、细胞定位以及能量传递方式等方面, 还存在诸多不确定甚至矛盾之处, 而这些方面正是了解隐藻光合系统结构、功能和进化的重要基础。有关隐藻藻胆蛋白结构和能量传递等问题, 已在陈敏等^[10]一文中给予了综述。本文就隐藻藻胆蛋白的生化性质、聚合形式以及叶绿体内的定位等方面, 对目前发现的隐藻藻胆蛋白的研究近况做了综述和分析, 旨在为今后深入了解隐藻藻胆蛋白及其特殊的光合系统结构和功能研究

理清思路。

1 隐藻藻胆蛋白的种类和基本结构组成

目前已报道的隐藻藻胆蛋白共有 8 种^[10-11], 其中 3 种属于隐藻藻红蛋白(cryptophytic phycoerythrin, Cr-PE), 根据最大吸收不同被分别称作 PE545、PE555、PE566; 其余 5 种为隐藻藻蓝蛋白(cryptophytic phyco cyanin, Cr-PC), 分别为 PC570 (或 PC569)、PC577、PC612、PC630 和 PC645。在隐藻中没有发现别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)或藻红蓝蛋白(phycoerythro cyanin, PEC)。

隐藻藻胆蛋白至少含有两种 α 亚基和一种 β 亚基, 其中 α_1 亚基分子质量约 10 kDa; α_2 亚基大小只有红、蓝藻藻胆蛋白亚基的一半左右, 约 8~9 kDa; 而 β 亚基约为 18~20 kDa, 与红、蓝藻藻胆蛋白相似^[12-15]。隐藻藻胆蛋白通常以稳定的 $(\alpha_1\beta)(\alpha_2\beta)$ 异二聚体形式存在, 而非红、蓝藻的藻胆蛋白的三聚体 $(\alpha\beta)_3$ 或六聚体 $(\alpha\beta)_6$ 。但 2011 年 Zhang 等^[16]报道蓝隐藻(*Chroomonas placoidea*)的 PC645 可能存在一种分子质量为 15~18 kDa 的新的发光 β 亚基(命名为 β_2 , 而将已报道的 β 亚基称为 β_1), 只是目前还没有给出该亚基的全序列, 因而性质还有待于进一步的确定。

收稿日期: 2016-09-21; 修回日期: 2016-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40976083)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.40976083]

作者简介: 陈敏(1966-), 女, 广东阳江人, 教授, 主要从事藻类色素蛋白复合物研究, 电话: 0535-6902743-8005, E-mail: chemmclm@163.com

2 隐藻藻胆蛋白特性

隐藻藻胆蛋白是一类荧光蛋白,可能属于膜外周蛋白,也可能是游离的水溶性蛋白,或者两种形式都存在,目前不能确定。对其生化特性进行研究是了解藻胆蛋白结构和功能的基础,也是走向应用的重要前提条件。

2.1 光谱特性

藻胆蛋白含有各种共价结合的藻胆色素基,因而其吸收和荧光特性成为表征藻胆蛋白特性的重要指标。隐藻藻胆蛋白的开链四吡咯色素基与脱辅基蛋白之间一般以 1 个或 2 个硫醚键共价结合。目前在隐藻中发现有 7 种藻胆素^[10, 13, 17-23]。其中藻蓝胆素

(phycocyanobilin, PCB)、藻红胆素(phycoerythrobilin, PEB)、藻尿胆素(phycourobilin, PUB)和 15, 16-二氢胆绿素(15, 16-dihydrobiliverdin, DBV)4 种同样存在于红、蓝藻中,而另外 3 种为隐藻所特有,其中胆绿素(mesobiliverdin, MBV, A_{\max} 697 nm)已有明确报道,但 CB618(有报道为 CB596, A_{\max} 618 nm 或 596 nm)、CB584(A_{\max} 584 nm)两种色素目前还有不确定之处。

由于通常藻胆蛋白处于溶液中时,其亚基性质、聚合状态甚至色素基状态均会受藻胆蛋白的种类、浓度、溶液离子强度、pH、温度等条件影响,因而呈现的光谱特性会有所变化。表 1 总结并列出了全部 8 种隐藻藻胆蛋白在特定 pH 条件下典型的吸收及荧光光谱特性。

表 1 隐藻藻胆蛋白光谱特性

Tab. 1 Spectroscopic properties of cryptomonad phycobiliproteins

藻胆蛋白	来源	典型最大吸收波长 (nm)	荧光发射波长(nm)		pH	参考文献
			室温	77K		
PE545	<i>Rhodomonassalina</i>	545、560*	585		6.0	[24]
	<i>Rhodomonas</i> CS24	545、567*	579	577	7.5	[25]
	<i>Rhodomonas lens</i>	530*、545、568*	582		6.0	[26]
PE555	<i>Hemiselmis</i> sp.	555	578~580		6.8	[27]
	<i>Hemiselmisbrunnescence</i>	554	578			[27]
	<i>Cryptomonas</i> IVF ₂	553、512*	577		7.0	[20]
PC570	<i>Chroomonasdaucooides</i>	569、630	650		7.0	[27]
PC577	<i>Hemiselmispacifica</i>	578、610*	641		6.5	[10]
	<i>Hemiselmispacifica</i>	577、614*				[28]
PE566	<i>Chroomonas</i> sp.	566	617		6.0	[24]
	<i>Cryptomonasrufescens</i>	565		625	7.4	[29]
PC612	<i>Hemiselmisvirescens</i>	575、612	634		6.0	[24]
	<i>Hemiselmisvirescens</i>	578、614	641			[27]
PC630	<i>Chroomonas</i> HP 9001	580、630			6.0	[30]
	<i>Gymnodinium</i> sp.	584、629	649		6.7	[31]
PC645	<i>Chroomonas</i> sp.	585、625*、645	660		6.0	[24]
	<i>Chroomonas</i> CCMP270	585、620*、645	662、735*	662		[32]
	<i>Chroomonasplacoidea</i>	580、625*、645	660		6.8	[15]

注: *表示肩峰

2.2 疏水特性

现有的研究表明,沉淀隐藻藻胆蛋白普遍需要很宽的硫酸铵饱和度范围^[12, 16, 25]。PC645 可在 60%~100%硫酸铵饱和度时被分步沉淀下来^[10, 15, 33],显然这些沉淀物的水溶性是不同的。说明隐藻藻胆蛋白在水溶液中可形成疏水特性不同的多种形式。只是这些不同形式的沉淀物并未表现出明显的光谱特性的差异^[15]。

由于一种隐藻通常只含有一种藻胆蛋白^[27],因此推测不同 PC645 沉淀物疏水性的差异有可能和蛋白的聚合程度不同有关,也可能与亚基比例或者种类不同有关。但目前有关隐藻藻胆蛋白的聚合度问题,尚没有相关的报道,因此这一推论是否正确还有待进一步实验证实。

2.3 构象稳定性

由于藻胆蛋白在可见光区和近紫外区都有明显

的特征吸收甚至荧光发射,其色基作为一个天然内标,与蛋白质之间的结合状态以及蛋白质所处的内部微环境的微小变化,都可以在其光谱性质上呈现出很灵敏的反映,因此成为研究蛋白质结构与功能关系的良好材料。

目前,借助 pH 变化、加入去污剂或者变性剂等,改变藻胆蛋白溶液环境,同步监测吸收、荧光或圆二色谱(CD 谱)等的变化,对多种隐藻藻胆蛋白的构象稳定性和柔性进行了分析。MacColl 等^[34]报道了温度变化对隐藻藻胆蛋白构象的影响,认为低温情况下更有利于隐藻藻胆蛋白的稳定:在 10~20℃, PE545 和 PC645 都保持二聚体状态,吸收谱、荧光谱和圆二色谱稳定;40~50℃时,藻胆蛋白形成单体和二聚体混合形式;50℃以上 PE545 光谱出现不可逆变化;60℃以上时 PC645 完全变性。隐藻 PC645 和 PE566 在 pH4 条件下或者加入 0.3 mol/L 以上浓度的 NaSCN 时,藻胆蛋白异二聚体可解聚为单体,但是吸收、荧光性质和二级结构都没有明显变化,只在 CD 谱的可见光区有所反映;当回复到 pH6 时,单体还可以恢复二聚体状态^[35]。李文军等^[36]以蓝隐藻(*C. placodea*) PC645 为材料的实验结果也表明,PC645 的构象在 3 mol/L 浓度的尿素中变性 24 h 基本保持稳定,光谱特性没有质的变化。除去尿素后,可在 2h 内基本复性。同时,PC645 在很宽的 pH 范围(pH 3.5~10)表现出构象与功能对环境变化的高度适应性^[36]:蛋白在 pH 3.5~7 时,吸收和荧光光谱都比较稳定,显示蛋白质构象和功能在此区域都保持正常;而在 pH 7~10 时光吸收依然保持平稳,说明亚基内部的色基的状态和疏水微环境都没有改变,但荧光传递效率降低,可能是由亚基表面局部构象变化、解离(四级结构变化)或者色素基团间的空间距离变化引起。

隐藻属于深水藻类,藻胆蛋白对 10~20℃低温的适应与隐藻所处的生长环境有关。而 PC645 在酸性条件下比碱性时更稳定,则与隐藻藻胆蛋白所处的特殊生理环境有关。隐藻藻胆蛋白处于类囊体腔内,不像红、蓝藻藻胆蛋白附着在类囊体膜的外表面,与叶绿体基质相接触。在光合作用的光反应过程中,光驱动电子传递的结果使叶绿体基质 pH 升高,而类囊体腔则逐步酸化,所以对于隐藻藻胆蛋白而言,在酸性条件下维持结构稳定性是保证其功能的前提。

2.4 亚基等电点与表面电荷特性

藻胆蛋白亚基的等电点及酸碱性可反映其表面电荷的数量和分布,后者直接影响到亚基之间组装

方式和相互作用面。红、蓝藻藻胆蛋白的亚基通常为中性或微酸性的, pI 大多在 5.5~7 之间^[12],由碱性的连接多肽(pI 为 8~9)通过静电引力等连接组装成为结构精细的超分子复合物^[7, 37]。而隐藻藻胆蛋白的亚基等电点分布则跨度较大^[38]。氨基酸序列分析^[12]和核酸序列推测^[39]均证实隐藻藻胆蛋白的 β 亚基与红、蓝藻藻胆蛋白 α 、 β 亚基的氨基酸序列相似性^[40],且其 pI 值也分布在微酸性区(pI 5.7~6.0)^[15];但两个 α 亚基均含有大量的带电氨基酸^[13], PC645 的两个 α 亚基的 pI 值分别为 9.1 和 7.1^[15],说明其亚基表面电荷分布存在巨大差异。其中强碱性的 α_1 亚基(pI 9.1)大小约 10kDa 极为特别,等电点与红、蓝藻连接多肽相似,甚至更偏于碱性,它的存在可使酸性的 β 亚基与其产生强烈的电荷相互作用,帮助稳定($\alpha\beta$)单体的结构。以上等电点特性研究表明,静电引力在隐藻藻胆蛋白亚基相互作用方面很可能起到至关重要的作用,其中 α_1 亚基的作用更为突出,此结论在 PE545 晶体结构分析中得到了证实^[32, 41]。

2.5 隐藻藻胆蛋白的组装

2.5.1 异二聚体内部的亚基组装

目前对隐藻藻胆蛋白亚基组装的信息主要来自两个方面,一是晶体结构解析,二是圆二色谱研究。结果显示,隐藻藻胆蛋白的异二聚体状态是极为稳定的四级结构形式,通常不解离为游离的($\alpha\beta$)单体或 α 、 β 亚基形式^[34-35, 42]。据报道,隐藻藻胆蛋白的单体可以所谓开放式和闭合式两种方式组装成异二聚体空间结构^[42]。开放式的 PE555 和 PC612 异二聚体内部每个单体的亚基接触面积平均为 618 \AA^2 和 511 \AA^2 ,而闭合式的 PE545 和 PC645 更是达到了 1060 \AA^2 和 1230 \AA^2 ,说明亚基之间的结合相当牢固^[41-43]。此外,异二聚体中的两个($\alpha\beta$)单体之间的结合可能主要依靠 α 亚基,而 β 亚基的脱辅基蛋白之间几乎没有接触^[41]。但由于两个 α 亚基 pI 值明显不同,尤其是 α_1 亚基的脱辅基蛋白仅比 α_2 多 10 个氨基酸残基,但等电点相差 2 个 pH 单位,因此碱性较强的 α_1 与近中性的 α_2 在藻胆蛋白四级结构形成和稳定过程中可能承担着不完全相同的任务。此外,与已报道的 β_1 亚基(pI 6.0)相比,新发现的 β_2 亚基等电点更低(pI < 5.7)^[15],所以推测,异二聚体内部的 2 个 β 亚基在结构和功能上有可能也是不相同的。

2.5.2 隐藻藻胆蛋白的聚合

隐藻中没有发现 APC 或 PEC,而且每种隐藻只含有一种类型的藻胆蛋白,因此隐藻藻胆蛋白不可

能组装形成和红、蓝藻胆蛋白类似的复杂的藻胆体结构。目前对隐藻藻胆蛋白的研究多集中于异二聚体或更小的单体形式，几乎未有隐藻藻胆蛋白聚合或者组装的报道。至于是否存在类似藻胆体中的连接多肽，也没有明确的结论。Lichtlé 等^[29]从隐藻 (*C. rufescens*) 中分离到的富含 PE 超离心组分中含有两种高分子质量无色多肽(97 和 87 kDa)，由于分子质量与藻胆体的末端发射体 L_{CM} 相似，当时曾猜测是某种帮助 PE 锚定于膜上的连接多肽，只是此后不再有明确相关实验报道过类似多肽的存在。

3 隐藻藻胆蛋白在类囊体腔中的存在状态

隐藻藻胆蛋白与红、蓝藻藻胆蛋白最突出的差别是隐藻藻胆蛋白存在部位是类囊体腔内部，有人曾怀疑这一现象是否因隐藻的类囊体在进化过程中内外翻转造成的。但 Spear-Bernstein 等^[44]使用电镜观察经冰冻撕裂及蚀刻处理的隐藻 *R. lens* 类囊体膜，证实其膜上光合系统的排布与其他藻类及绿色植物完全相同，膜没有翻转的痕迹。长期以来，藻胆蛋白在隐藻类囊体膜腔内的实际存在状况颇受关注，但目前得到的结果不一而足，无法定论。

目前对隐藻藻胆蛋白定位研究主要针对含有 PE545 的隐藻类型，含有其他藻胆蛋白类型的未见有报道。Ludwig 等^[45]采用免疫显微标记法对隐藻 *R. lens* 的类囊体膜的观察结果显示，PE545 是紧密结合在类囊体膜的内表面上，在膜腔中偶尔会观察到有棒状结构出现；Lichtlé 等^[46]早期以 *Cryptomonas rufescens* 的生化分离和光谱学研究结果为依据提出的简要模型(图 1)认为，PE545 是以某种方式组装并横跨膜腔内部，边缘只与光合系统(PS)II 天线接触，该模型实际上暗示了藻胆蛋白应有聚合或组装形式存在；但后期采用免疫显微观察后又提出，在 *C. rufescens* 类囊体膜腔内的 PE545 有两种形式，一是与膜结合的，另一类以游离状态散布在膜腔中^[47]；Spear-Bernstein 等^[48-49]也报道隐藻藻胆蛋白大部分是散布于膜腔内，有少部分与膜结合；1992 年 Vesik 等^[50]采用了多种方法，包括生化分离、固定化及免疫细胞化学方法等试图对 PE545 进行定位，但他们得出的结论是，上述方法均无法确定 PE545 是与膜结合还是散布在膜腔中；2006 年 Doust 等^[32]和 Wit 等^[51]在对隐藻 PE545 晶体结构研究基础上，结合活体细胞的稳态和时间分辨光谱以及圆二色谱等光谱学研究结果^[22, 25, 32, 41, 51]，

提出了一个新的模型，如图 2 所示。由于 PE545 晶体呈斜方形^[41, 51]，因而该模型认为 PE545 可能是以斜方形状态游离、密集地填充于类囊体腔中，并暗示 PE545 异二聚体是最小的、独立的存在单元。首次提出 PE545 彼此之间以及 PE545 与类囊体膜之间都没有倾向性的结合关系，因为根据他们的计算，PE545 与膜的结合对于实现 PE545 与膜上叶绿素蛋白复合物之间有效的能量传递来说不是必需的。

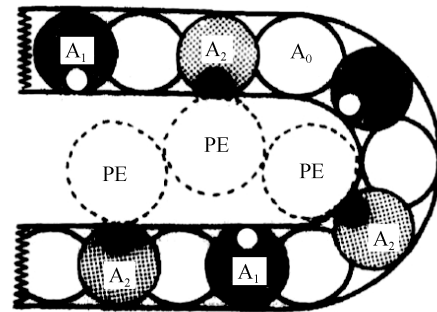


图 1 藻胆蛋白与 *C. rufescens* 类囊体膜叶绿素蛋白相互作用简图^[46]

Fig. 2 Schematic interpretation of the phycobiliprotein and chlorophyll antennae in the thylakoid of *Cryptomonas rufescens*^[46]

(A₁ 和 A₂: PS I 和 PS II 的叶绿素天线)
(A₁ and A₂: chlorophyll antennae of PSI and PS II)

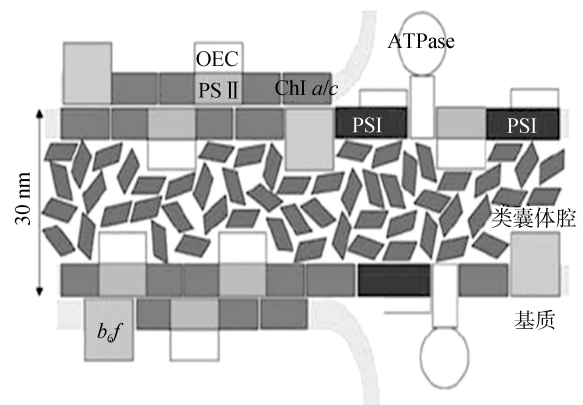


图 2 隐藻光合系统结构模型^[32]

Fig. 2 Scaled model of photosynthesis systems in cryptophytic algae^[32]

(类囊体腔中斜方体为 PE545; OEC: 放氧复合物; b_6f : 细胞色素 b_6f 复合物)
[Rhombic forms inside the lumen are PE545, oxygen-evolving complex (OEC), and cytochrome b_6f complex (b_6f)]

归纳以上研究结果，对于隐藻藻胆蛋白在类囊体膜腔中的定位的关键是与膜是否有接触，两类观点各有实验结果支持。Hiller 等^[22]的圆二色谱研究结果认为藻胆蛋白在膜腔内是非定向排列的，暗示其处于游离状态；Doust 等^[25]提出游离 PE545 能量传递

模式来解释其最新的隐藻光合系统结构模型,支持膜不接触观点。提出离散的藻胆蛋白可在非接触情况下以 Förster 共振方式有效地将吸收的能量在彼此之间传递,并最终传递给位于类囊体膜上的 Chla^[25]。只是根据该模型进行计算,其能量传递速率较之活体状态慢得多^[32, 52]。

更多的实验结果支持隐藻藻胆蛋白在结构上与膜组分处于结合状态的观点。电镜分析直接观察到至少有一部 PE545 是结合在类囊体膜的内表面的^[45-49]; Lichtlé 等^[29]曾经报道借助蔗糖密度梯度离心方法从 *C. rufescens* 中分离到一种活性的 PE-叶黄素-PS 复合物组分; Chen 等^[53]则采用等电聚焦电泳法从蓝隐藻(*C. placoidea*)中分离到一种特殊的 PC-Chla/c₂-蛋白复合物,并且该复合物中 PC645 吸收的能量可直接传递给复合物内的 Chla; Chen 等^[53]以及徐伟^[54]等均报道在充分洗涤的蓝隐藻(*C. placoidea*)类囊体膜上紧密结合有 PC645,后者与膜上的 Chla 之间存在能量传递关系。这些结果说明,隐藻藻胆蛋白在结构上是与膜上的 PS 或者 Chla/c-蛋白复合物直接相结合的,通过与膜组分接触实现能量传递。此外, Mirkovic 等^[55]借助光漂白荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)和共聚焦显微方法观测了 *R. CS24* 活体细胞中的 PE545 的扩散情况,发现该隐藻中大部分(73%)的天线蛋白在类囊体腔中是移动状态的,但是平均扩散系数比在水中理论扩散速率小两个数量级,与藻胆体的扩散能力相接近。进而提出 PE545 在膜腔中迁移时是受到了某种限制的,受限的原因可能与 PE545 与膜相互作用或者蛋白聚合有关。

4 隐藻藻胆蛋白性质和存在状态研究方面有待阐明的问题

目前对已发现的全部 8 种隐藻藻胆蛋白的生理生化特性研究,目前已取得了大量的研究成果。在结构与功能研究方面,虽都有涉及,但了解程度不一。其中 PE545(最高分辨率 1.63 Å)^[25, 41]、PE555(分辨率 1.8 Å)^[42]、PC577^[56]、PC612(分辨率 1.7 Å)^[42, 56]、PC630^[56]和 PC645(最高分辨率 1.35 Å)^[25, 42, 57]6 种已有晶体结构和空间结构解析的报道,而对 PE566、PE570 的了解则比较有限。此外,借助稳态和时间分辨光谱^[25, 41, 57-60]以及二维光子反射光谱技术^[56, 61-65]等研究手段对 PE545、PE555 和 PC577、PC612、PC630、PC645 异二聚体内部能量传递途径等方面也取得了一定的进展。但由于对隐藻藻胆蛋白的性质

和在类囊体腔内的存在状态等方面仍有诸多待解之处,因此必然影响到对整个光合系统结构和工作原理,尤其是与膜上脂溶性叶绿素蛋白复合物之间能量的传递方式等的认识,许多实验结论依然有待修正和补充。

目前有关隐藻藻胆蛋白特性、组装和在类囊体腔中存在状态方面的已取得的认识和争议之处主要有以下几个方面。

4.1 异二聚体的亚基种类及均一性问题

尽管目前一般认为,隐藻异二聚体形式只有 $(\alpha_1\beta)(\alpha_2\beta)$ 一种,但隐藻 PC645 中新的 β_2 亚基的发现,意味着隐藻异二聚体形式未必都是单一的形式。曾有报道称 PC645 在加入去污剂的情况下可形成三角形和斜方对称形两种非同型晶体,进而提出为隐藻藻胆蛋白的可能是不均一的观点^[66]。因此,隐藻藻胆蛋白异二聚体种类问题还有待确定,进一步的晶体解析以及基因结构分析将有助于问题的阐明。

4.2 隐藻藻胆蛋白的聚合和组装问题

目前对隐藻藻胆蛋白的研究,大多以游离的异二聚体或者更小的单体为对象,而对于异二聚体之间的进一步组装问题则尚无定论。尽管已经明确隐藻藻胆蛋白不形成藻胆体样结构,但对于其是否存在进一步组装之后的聚合形式,如果存在的话在什么条件下以何种方式聚合,聚合物是否像红、蓝藻藻胆蛋白那样存在连接多肽,亦或隐藻某个亚基(例如碱性的 α_1 亚基)是否起到与红、蓝藻连接多肽相似的作用等均有待实验证实。

Doust 等^[25, 51]认为隐藻藻胆蛋白亚基不倾向于进一步聚合;但也有报道提出隐藻藻胆蛋白存在多种不同的形式^[19];还可能存在聚合程度更高的藻胆蛋白复合物(实验室未报道结果);甚至有可能存在棒状结构^[45, 55]。因此,如何分离和获得可能存在的天然状态的藻胆蛋白复合物,以及对已取得的不同形式藻胆蛋白的深入比较,可能会对隐藻藻胆蛋白聚合或者组装问题的认识带来一些突破性信息。

4.3 类囊体膜内的定位及与类囊体膜的关系问题

隐藻藻胆蛋白在膜腔内的存在状态及其与膜上叶绿素蛋白之间的接触机制问题,是了解特异的隐藻光合系统结构和工作原理的关键。目前报道中隐藻藻胆蛋白与膜的接触关系总结起来主要分为以下

几种：紧密结合在类囊体膜的内表面上；一部分与膜结合，其余游离或者散布在类囊体腔中；以某种方式结合并横跨膜腔内部，边缘与膜接触；均匀地填充于类囊体腔中，不需与膜结合。综合上述情况，我们提出了一个动态结合模型^[54]，即藻胆蛋白在类囊体腔中与膜的结合状态有可能是动态的，具有膜结合型和游离型两种状态，两者之间可借助小幅度的迁移实现互变，至于与膜结合与否可能与其所处的环境和功能状态有关。这一模型是否正确，将有待后续的实验检验。

由于隐藻藻胆蛋白没有如藻胆体那样体积较大、结构稳定、便于观察的组装后结构形式，同时在膜腔中还处于游离或迁移状态，因此一般的免疫电镜观测结果通常不理想或者比较片面，而针对离体的藻胆蛋白的研究又无法反应出活体状态下的真实情况^[32]，导致这方面研究结果始终没有足够说服力。因此，在完整叶绿体水平上引进荧光漂白技术观察藻胆蛋白的动态迁移，或者借助原子力显微(ATM)技术观测保持天然状态类囊体膜内表面形态，对于进一步了解隐藻藻胆蛋白在类囊体膜腔中的实际存在状态将会大有帮助。

参考文献:

- [1] MacColl R, Kapoor S, Montellese D R, et al. Bilin chromophores as reporters of unique protein conformations of phycocyanin 645[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(48): 15436-15439.
- [2] Grzebyk D, Schofield O, Vetriani C, et al. The mesozoic radiation of eukaryotic algae: the portable plastid hypothesis [J]. *J Phycol*, 2003, 39: 259-267.
- [3] Kim E, Lane C E, Curtis B A, et al. Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of *Hemiselmis andersenii* CCMP644 (Cryptophyceae) [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 215-219.
- [4] Gantt E, Edwards M R, Provasoli L. Chloroplast structure of the Cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces [J]. *J Cell Biol*, 1971, 48(2): 280-290.
- [5] Glazer A N, Wedemayer G J. Cryptomonad biliproteins - an evolutionary perspective [J]. *Photosynth Res*, 1995, 46(1-2): 93-105.
- [6] Chang L F, Liu X W, Li Y B, et al. Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II [J]. *Cell Res*, 2015, 25: 726-737.
- [7] Watanabe M, Semchonok A D, Webber-Birungic M T, et al. Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supercomplex of cyanobacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(7): 2512-2517.
- [8] Watanabe M, Ikeuchi M. Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex[J]. *Photosynth Res*, 2013, 116(2-3): 265-276.
- [9] Scholes G D, Fleming G R, Olaya-Castro A, et al. Lessons from nature about solar light harvesting[J]. *Nat Chem*, 2011, 3: 763-774.
- [10] 陈敏, 王宁, 杨多利, 等. 隐藻藻胆蛋白的结构与能量传递功能[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(12): 2070-2082.
- [11] Chen Min, Wang Ning, Yang Duoli, et al. The Structure and Energy Transfer of Phycobiliproteins in Cryptophytic Algae. [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(12): 2070-2082.
- [12] Overkamp K E, Langklotz S, Aras M, et al. Chromophore composition of the phycobiliprotein Cr-PC577 from the cryptophyte *Hemiselmis pacifica* [J]. *Photosynth Res*, 2014, 122(3): 293-304.
- [13] Sidler W, Kumpf B, Suter F, et al. Structural studies on cryptomonad biliprotein subunits. Two different alpha-subunits in *Chroomonas* phycocyanin-645 and *Cryptomonas* phycoerythrin-545[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1985, 366(3): 233-244.
- [14] Sidler W, Nutt H, Kumpf B, et al. The complete amino-acid sequence and the phylogenetic origin of phycocyanin-645 from the cryptophyten alga *Chroomonas* sp.[J]. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1990, 371(7): 537-547.
- [15] MacColl R, Guard-Friar D. Phycocyanin 645. The chromophore assay of phycocyanin 645 from the cryptomonad protozoa *Chroomonas* species[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(23): 14327-14329.
- [16] Overkamp K E, Gasper R, Kock K, et al. Insights into the biosynthesis and assembly of cryptophycean phycobiliprotein[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 26691-26707.
- [17] Zhang Y Y, Chen M, Cui H. Isolation and characterization of a new subunit of phycocyanin from *Chroomonas placoidea*[J]. *Chin Chem Lett*, 2011, 22(10): 1229-1232.
- [18] Wedemayer G J, Kidd D G, Glazer A N. Cryptomonad biliproteins: bilin types and locations[J]. *Photosynth Res*, 1996, 48: 163-170.
- [19] Wedemayer G J, Kidd D G, Wemmer D E, et al. Phycobilins of cryptophycean algae. Occurrence of dihydrobiliverdin and mesobiliverdin in cryptomonad biliproteins[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(11): 7315-7331.
- [20] Wedemayer G J, Wemmer D E, Glazer A N. Phycobilins of cryptophycean algae. Structures of novel bilins with acryloyl substituents from phycoerythrin 566[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 4731-4741.
- [21] Wemmer D E, Wedemayer G J, Glazer A N. Phycobilins of cryptophycean algae. Novel linkage of dihy-

- drobiliverdin in a phycoerythrin 555 and a phycocyanin 645[J], J Biol Chem, 1993, 268(3): 1658-1669.
- [21] Hiller R G, Martin C D. Multiple forms of type I phycoerythrin from a *Chroomonas* sp. (Cryptophyceae) varying in subunit composition [J]. Biochim Biophys Acta, 1987, 923: 98-102.
- [22] Hiller R G, Scaramuzzi C D, Breton J. The organisation of photosynthetic pigments in a cryptophyte alga: a linear dichroism study [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1102(3): 360-364.
- [23] MacColl R, Guard-Friar D, Ryan T J, et al. The route of exciton migration in phycocyanin 612 [J]. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1988, 934(3): 275-281.
- [24] MacColl R, Guard-Friar D. Phycobiliproteins [M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987.
- [25] Doust A B, Marai C N J, Harrop S J, et al. Developing a structure-function model for the cryptophyte phycoerythrin 545 using ultrahigh resolution crystallography and ultrafast laser spectroscopy [J]. J Mol Biol, 2004, 344: 135-153.
- [26] Guard-Friar, MacColl R, Berns D S, et al. Picosecond fluorescence of cryptomonad biliproteins. Effects of excitation intensity and the fluorescence decay times of phycocyanin 612, phycocyanin 645, and phycoerythrin 545 [J]. Biophys J, 1985, 47(6): 787-793.
- [27] Hill D R A, Rowan K S. The biliproteins of the cryptophyceae [J]. Phycologia, 1989, 28 (4): 455-463.
- [28] Hoef-Emden K. Molecular phylogeny of phycocyanin-containing cryptophytes: evolution of biliproteins and geographical distribution [J]. J Phycol, 2008, 44(4): 985-993.
- [29] Lichtlé C, Duval J C, Lemoine Y. Comparative biochemical, functional and ultrastructural studies of photosystem particles from a Cryptophyceae: *Cryptomonas rufescens*; isolation of an active phycoerythrin particle[J]. Biochim Biophys Acta - Bioenergetics, 1987, 894(1): 76-90.
- [30] MacColl R, Eisele L E, Dhar M, et al. Bilin organization in cryptomonad biliproteins [J]. Biochemistry, 1999, 38(13): 4097-4105.
- [31] Rowan K S. Photosynthetic pigments of algae [M]. New York: Cambridge University Press, The United States of America, 1989.
- [32] Doust A B, Wilk K E, Curmi P M G, et al. The photo-physics of cryptophyte light-harvesting [J]. J Photochem Photobiol A: Chemistry, 2006, 184(1-2): 1-17.
- [33] 张允允, 陈敏. 蓝隐藻藻蓝蛋白的分离、纯化及性质研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2011, 24(4): 281-286.
- Zhang Yunyun, Chen Min. Isolation, purification and characterization of phycocyanin from *Chroomonasplaciodaea*. [J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2011, 24(4): 281-286.
- [34] MacColl R, Malak H, Gryczynski I, et al. Phycoerythrin 545: monomers, energy migration, bilin topography, and monomer/dimer equilibrium [J]. Biochemistry, 1998, 37(1): 417-423.
- [35] MacColl R, Malak H, Cipollo J, et al. Studies on the dissociation of cryptomonad biliproteins [J]. J Biol Chem. 1995, 270(46): 27555-27561.
- [36] 李文军, 陈敏. 蓝隐藻藻蓝蛋白结构与功能稳定性研究[J]. 海洋科学, 2013, 37(7): 33-40.
- Li Wenjun, Chen Min. Structural and Functional Stability of Phycocyanin from *Chroomonasplaciodaea*[J]. Marine Sciences, 2013, 37(7): 33-40.
- [37] Liu L N, Chen X L, Zhang Y Z, et al. Characterization, structure and function of linker peptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae; An overview [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1708: 113-142.
- [38] Morschel E, Wehrmeyer W. Cryptomonad biliprotein: phycocyanin-645 from a *Chroomonas* species [J]. Arch Microbiol, 1975, 105(2): 153-158.
- [39] Reith M, Douglas S. Localization of beta-phycoerythrin to the thylakoid lumen of *Cryptomonas phi* does not involve a signal peptide [J]. 1990, 15(4) : 585-592.
- [40] Zimmermann J G, Sheil M, Wrench P M, et al. Amino acid sequence of β -subunit of phycoerythrin from the cryptophyte algae *Chroomonas* CS 24 [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1120: 117-121.
- [41] Wilk K E, Harrop S J, Jankova L, et al. Evolution of a light-harvesting protein by addition of new subunits and rearrangement of conserved elements: crystal structure of a cryptophyte phycoerythrin at 1.63 Å resolution [J]. Proc Nat Acad Sci Usa, 1999, 96: 8901-8906.
- [42] Harrop S J, Wilk K E, Dinshaw R, et al. Single-residue insertion switches the quaternary structure and exciton states of cryptophyte light-harvesting proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (26): 2666-2675.
- [43] Spear-Bernstein L, Miller K R. Immunogold localization of the phycobiliprotein of a cryptophyte alga to the intrathylakoidal space [M]//Biggens J. Progress in Photosynthesis Research. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing, 1987: 309 -312.
- [44] Spear-Bernstein L, Miller K R. Are the photosynthetic membranes of cryptophyte algae inside out? [J]. Protoplasma, 1985, 129(1): 1-9.
- [45] Ludwig M, Gibbs S P. Localization of phycoerythrin at the luminal surface of the thylakoid membrane in *Rhodomonas lens* [J]. J Cell Biol, 1989, 108(3): 875-884.
- [46] Lichtlé C, Jupin H, Duval J C. Energy transfers from

- Photosystem II to Photosystem I in *Cryptomonas rufescens* (Cryptophyceae) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 591: 104-112.
- [47] Lichtlé C, McKay R M L, Gibbs S P. Immunogold localization of photosystem I and photosystem II light-harvesting complexes in Cryptomonad thylakoids [J]. *Biol Cell Acta*, 1992, 74: 187-194.
- [48] Spear-Bernstein L, Miller K R. Unique location of the phycobiliprotein light-harvesting pigment in the cryptophyceae [J]. *J Phycol*, 1989, 25: 412-419.
- [49] Spear-Bernstein L, Miller K R. Immunogold localization of the phycobiliprotein of a cryptophyte alga to the intrathylakoidal space [M]//Biggens J. *Progress in Photosynthesis Research*. The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing, 1987: 309-312.
- [50] Vesik M, Dwarthe D, Fowler S, et al. Freeze fracture immunocytochemistry of light-harvesting pigment complexes in a cryptophyte [J]. *Protoplasma*, 1992, 170: 166-176.
- [51] van der Weij-De Wit C D, Doust A B, Stokkum H M, et al. How Energy funnels from the phycoerythrin antenna complex to photosystem I and photosystem II in cryptophyte *Rhodomonas* CS24 Cells [J]. *J Phys Chem*, 2006, B 110, 25066-25073.
- [52] van der Weij-De Wit C D, Doust A B, van Stokkum I H M, et al. Phycocyanin sensitizes both photosystem I and photosystem II in cryptophyte *Chroomonas* CCMP270 cells [J]. *Biophys J*, 2008, 94: 2423-2433.
- [53] Chen M, Li S H, Sun L. A novel phycocyanin-Chl a/c₂-protein complex isolated from chloroplasts of *Chroomonas placoides* [J]. *Chin Chem Let*, 2007, 18: 1374-1378.
- [54] 徐伟, 梁源, 陈敏, 等. 隐藻藻蓝蛋白与类囊体膜的动态结合模型[J]. *海洋科学*, 2015, 39(4): 21-29.
Xu Wei, Liang Yuan, Chen Min. The dynamic combination model of cryptomonad phycocyanin and thylakoid [J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(4): 21-29.
- [55] Mirkovic T, Wilk K E, Curmi P M G, et al. Phycobiliprotein diffusion in chloroplasts of cryptophyte *Rhodomonas* CS24 [J]. *Photosynth Res*, 2009, 100(1): 7-17.
- [56] Arpin P C, Turner D B, McClure S D, et al. Spectroscopic studies of cryptophyte light harvesting proteins: vibrations and coherent oscillations [J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119(31): 10025-10034.
- [57] Mirkovic T, Doust A B, Kim J, et al. Ultrafast light harvesting dynamics in the cryptophyte phycocyanin 645 [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2007, 6(9): 964-975.
- [58] Marin A, Doust A B, Scholes G D, et al. Flow of excitation energy in the cryptophyte light-harvesting antenna phycocyanin 645 [J]. *Biophys J*, 2011, 101(4): 1004-1013.
- [59] Novoderezhkin V I, Doust A B, Curutchet C, et al. Excitation dynamics in phycoerythrin 545: modeling of steady-state spectra and transient absorption with modified redfield theory [J]. *Biophys J*, 2010, 99(2): 344-352.
- [60] Bruce D, Biggins J, Steiner T. Excitation energy transfer in the cryptophytes. Fluorescence excitation spectra and picosecond time-resolved emission spectra of intact algae at 77K [J]. *Photochem Photobiol*, 1986, 44(4): 425-554.
- [61] Huo P F, Coker D F. Theoretical study of coherent excitation energy transfer in cryptophyte phycocyanin 645 at physiological temperature [J]. *J Phys Chem Lett*, 2011, 5: 825-833.
- [62] Turner D B, Dinshaw R, Lee K K, et al. Quantitative investigations of quantum coherence for a light-harvesting protein at conditions simulating photosynthesis [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14 (14): 4857-4874.
- [63] Collini E, Wong C Y, Wilk K E, et al. Coherently wired light-harvesting in photosynthetic marine algae at ambient temperature [J]. *Nature*, 2010, 463: 644-647.
- [64] McClure S D, Turner D B, Arpin P C, et al. Coherent oscillations in the PC577 cryptophyte antenna occur in the excited electronic state [J]. *J Phys Chem B*, 2014, 118(5): 1296-1308.
- [65] Chenu A, Scholes G D. Coherence in energy transfer and photosynthesis [J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2015, 66: 69-96.
- [66] Morisset W, Wehrmeyer W, Schirmer T, et al. Crystallization and preliminary x-ray diffraction data of the cryptomonad biliprotein phycocyanin-645 from a *Chroomonas* spec [J]. *Archives of Microbiology*, 1984, 140(2-3): 202-205.

Characteristics and existential states of novel phycobiliproteins in cryptophyte algae

CHEN Min, YANG Duo-li, LI Xue-wei

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Sep. 21, 2016

Key words: cryptophyte; phycobiliprotein; biochemical characteristics; aggregation; location in the lumen

Abstract: Cryptophyte phycobiliproteins are derived from red algae, but they vary in their protein and phycobilin structures, composition, properties, and existential states within chloroplasts compared to phycobiliproteins derived from red and blue-green algae; therefore, they are considered as a unique evolutionary branch of phycobiliproteins. Currently, cryptophyte phycobiliproteins are considerably less understood than phycobiliproteins derived from red and blue algae; among reports, many differences and even contradictions appear. In this study, the present research status regarding biochemical characteristics, aggregation forms, and existential states in the thylakoid lumen of cryptophyte phycobiliproteins currently found are summarized and reviewed; current research of the unknown and solutions for future investigations are also discussed.

(本文编辑: 康亦兼)