

PS II 外周蛋白在光能传递及转化中的作用*

余 辉 匡廷云** 李良璧 唐崇钦 汤佩松

(中国科学院植物研究所光合作用研究中心, 北京 100093)

摘要 研究了 18, 24 和 33 ku 3 个外周蛋白对光系统 II 的影响. 观测到去除 3 个外周蛋白, 光系统 II 颗粒的 2, 6-二氯酚靛酚光还原活性下降, 并可由外加 1, 5-二苯卡巴肼予以恢复, 表明光系统 II 氧化侧受影响. 荧光诱导动力学分析表明, 去除 3 个外周蛋白, 荧光上升速率下降, 可变荧光减小, 光系统 II 原初光能转换效率降低. 此外, 还观察到去除 3 个外周蛋白对光系统 II 颗粒的吸收光谱、荧光光谱有明显的影响. 讨论了 3 个外周蛋白对维持和保护类囊体膜功能完整性的重要作用.

关键词 外周蛋白 光还原 光能转化 Chla 荧光诱导动力学

光系统 II (PS II) 颗粒由许多内周蛋白和 3 个分子量分别为 18, 24 和 33 ku 的外周蛋白组成^[1]. 有证据表明, 位于高等植物 PS II 类囊体膜囊腔内侧的 3 个外周蛋白能够影响水氧化系统的特性^[2]. 33 ku 蛋白在所有的放氧生物中都存在, 18 和 24 ku 外周蛋白目前发现仅存在于高等植物和绿藻中, 蓝藻 (cyanobacteria) 中还没发现过^[3]. 现已知, 在催化水的氧化反应过程中, 3 个外周蛋白并不起关键作用^[4]. 外加非生理浓度的 Cl^- 和 Ca^{2+} , 仅含内周蛋白的 PS II 样品仍然可以放氧, 因此, Verma 等人认为, 外周蛋白的生理功能之一可能是增强这些辅助无机离子在生理浓度条件下 PS II 的放氧作用, 在水的光氧化过程中 3 个外周蛋白仅有结构和调节的作用而不是催化的作用^[3, 4]. 尽管 3 个外周蛋白在 PS II 中的功能作用有过许多报道, 但大都集中在与放氧有关的研究. 3 个外周蛋白对高等植物 PS II 光能的吸收及光能转化的影响则未见报道. 我们对此进行了研究.

1 材料与方法

(1) PS II 颗粒 (PP) 制备采用市售新鲜菠菜按文献 [5] 的方法进行. 制备的 PS II 颗粒用 SMN 介质 (0.4 mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L Mes, 0.015 mol/L NaCl, pH = 6.5) 悬浮. 去除 3 个可溶性蛋白前, PS II 颗粒样品改用 A 液 (0.3 mol/L 蔗糖, 0.01 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Mes, pH = 6.5) 悬浮, 然后按文献 [6] 方法用 NaCl 洗涤 PS II 颗粒, 获得缺 18, 24 ku 蛋白的 PS II 颗粒 (-1 824 PP), 接着按文献 [6, 7] 的方法再分别用尿素和 CaCl_2 洗涤 -1 824 PP, 分别获得两种部分缺 33 ku 蛋白的 PS II 颗粒 (-33 UPP 和 -33 CPP). 制备分离上述样品时均在弱光和 0 ~ 4℃ 下进行.

1998-06-23 收稿, 1998-10-28 收修改稿

* 国家自然科学基金重大资助项目 (批准号: 39890390)

** 联系人

(2) PS II 颗粒多肽组分分析按文献[8]用 SDS-PAGE 技术进行, 15% 的分离胶加入 6 mol/L 尿素以提高分辨率. 电泳前, 样品的叶绿素浓度均调为一致, 电泳上样量为 50 μ L. 电泳后, 凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 7% 乙酸脱色.

(3) 吸收光谱的测定用 Contron UV-943 双波长双光束分光光度计于室温及避光条件下进行, 扫描速度 100 nm/min, 分辨率 0.5 nm.

(4) 荧光光谱的测定用 Hitachi F-4500 型分光光度计分别于室温和低温 (77 K) 下进行, 激发光波长为 436 nm (480 nm 波长激发的结果与 436 nm 波长激发的结果相似).

(5) 叶绿素瞬态荧光动力学曲线的测定用本中心组装的动力学荧光计 PFM-101^[9] 进行. 光强: $116 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, 采样数据 (样品 5 000 个数, 1.2 ms/点) 经自动平均, 方差分析和用各曲线自己的固定荧光 F_0 均一化后得到一条平均的动力学曲线和平均的荧光参数. DCIP 光还原活性的测定按文献[5]的方法进行. 叶绿素浓度及 Chla/b 比值的测定按 Arnon 的方法^[10] 进行.

2 结果

2.1 4 种不同 PS II 颗粒的多肽组成分析

4 种不同 PS II 颗粒多肽组成的 SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示, 图中的结果表明, 用 1 mol/L NaCl 处理 PS II 颗粒 (PP), 可完全去除 18 和 24 ku 蛋白; 用 Urea 或 CaCl_2 接着处理已去除 18 和 24 ku 蛋白后的 PS II 颗粒 (-1 824 PP), 可去除大部分 33 ku 蛋白, 其中用 CaCl_2 处理去除 33 ku 蛋白的效果比使用 Urea 更佳.

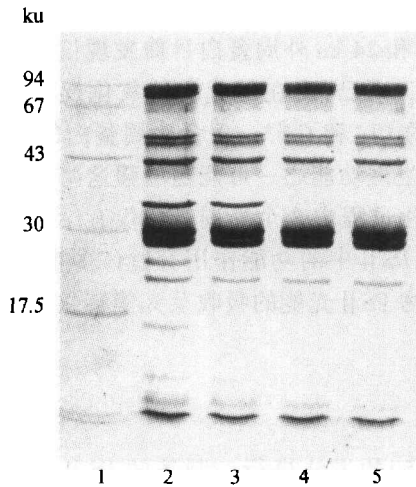


图 1 4 种 PS II 颗粒 SDS-PAGE 照片

1——标准分子量蛋白, 2——PP, 3——-1 824 PP,
4——-33 UPP, 5——-33 CPP

更大, 吸收峰红移也增大, 两者蓝区吸收峰均红移 1.5 nm, 红区吸收峰 -33 CPP 红移 (1.5 nm) 比 -33 UPP 红移 (0.5 nm) 更明显.

4 种 PS II 颗粒吸收光谱红区四阶导数光谱图如图 2(b) 所示. 图中可见, PS II 颗粒红区 678 nm 处的吸收主要由两种不同存在状态的叶绿素分子所贡献, 一种是反应中心色素 P680, 即原初电子供体, 其吸收峰为 680 nm, 另一种是吸收峰为 670 nm 的叶绿素 a, 其功能仍不十分

2.2 比较 4 种不同 PS II 颗粒的 Chla/b 比值

4 种 PS II 颗粒的叶绿素 Chla/b 比值分别列于表 1. 表中的数据表明, 分离提纯的 PS II 颗粒的 Chla/b 比值为 2.0, 与 Kuwabara 等人^[5] 的报道一致. t 检验显示了 4 种 PS II 颗粒 Chla/b 比值差异极不显著. 这说明上述 3 种制备方法基本上不会对样品的 Chla/b 比值造成影响.

2.3 光谱分析

2.3.1 吸收光谱 4 种 PS II 颗粒在室温下的吸收光谱如图 2(a) 所示, PS II 颗粒红区吸收峰为 678.0 nm, 蓝区为 435.5 nm; -1 824 PP 吸收光谱的光吸收强度下降, 吸收峰在蓝区红移 1.0 nm, 红区红移 0.5 nm; -33 UPP 和 -33 CPP 吸收光谱光吸收强度下降

明确,或许是天线色素,或许是次级电子供体^[11]。去除 3 个外周蛋白后,680 nm 处的吸收峰强度逐渐降低并产生红移,670 nm 处的吸收峰没有变化。

表 1 4 种不同的 PS II 颗粒 Chl a/b 比值的比较^{a)}

样品	PP	-1 824 PP	-33 UPP	-33 CPP
Chl a/b ^{a)}	2.040 2	2.011 5	2.021 3	1.973 9
<i>t</i>		0.478 2	0.350 6	1.045 7

a) Chl a/b 比值为 6 组数据的平均值, *t* 值为样品与 PP 之比

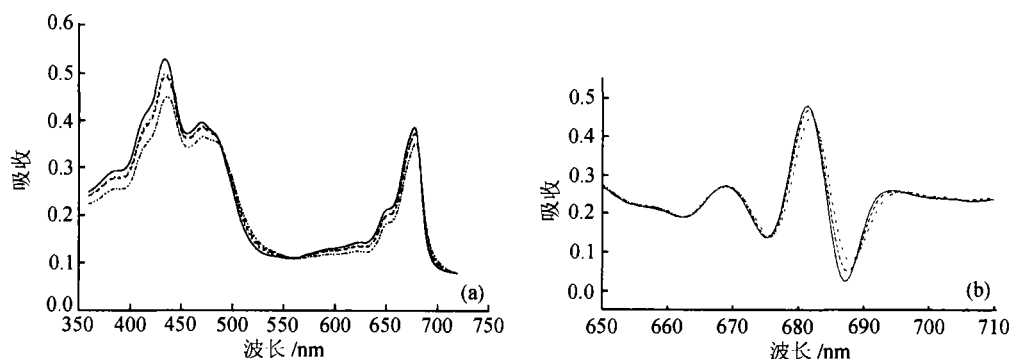


图 2 4 种 PS II 颗粒室温吸收光谱(a)和红区四阶导数光谱图(b)

——为 PP, ····为 -1 824 PP, - - - - 为 -33 UPP, - · - · 为 -33 CPP

2.3.2 荧光光谱 室温和低温(77 K)下用 436 nm 波长光激发 4 种不同的 PS II 颗粒,其荧光发射峰的峰位都在 682 nm 处。但与对照(PP)相比,去除 3 个外周蛋白后,3 种不同 PS II 颗粒荧光发射峰的强度(荧光相对产量)逐渐下降(图 3)。

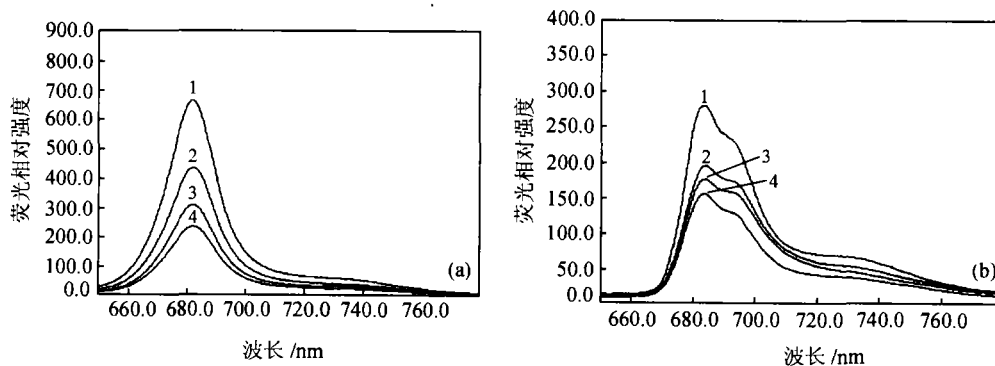


图 3 4 种颗粒室温(a)和低温 77 K(b)荧光发射光谱图

1——PP, 2——-1 824 PP, 3——-33 UPP, 4——-33 CPP

2.4 叶绿素荧光诱导动力学

从图 4 所示的 4 种 PS II 颗粒叶绿素荧光诱导动力学曲线可以看出,随着 3 个外周蛋白的去除,可变荧光(F_v)迅速减小,荧光上升速率减慢。由于 F_v 随时间的变化与 PS II 电子受体 Q_A 的氧化还原状态有关^[12],去除 3 个外周蛋白后 F_v 的变化说明,来自 PS II 反应中心的电子

可能减少了. 同时,反映 PS II 原初光能转化效率的 F_v/F_m 值显著减小(表 2).

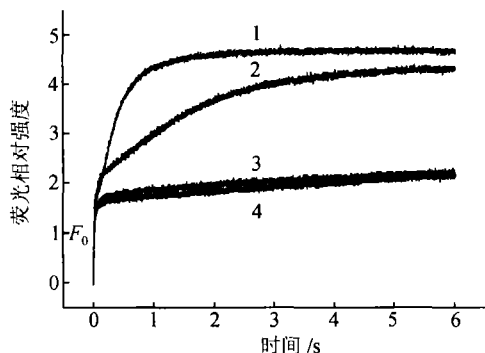


图 4 4 种颗粒的 Chl a 荧光诱导动力学曲线

1—PP, 2—-1824 PP, 3—-33 UPP, 4—-33 CPP

表 2 4 种不同的 PS II 颗粒 F_v/F_m 比值的比较

样品	F_v/F_m	F_v/F_m 保留的百分比
PP	0.800 ± 0.005	100
-1824 PP	0.760 ± 0.010	95
-33 UPP	0.590 ± 0.009	74
-33 CPP	0.570 ± 0.008	71

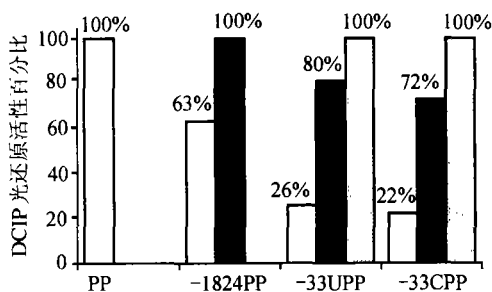


图 5 4 种 PS II 颗粒 DCIP 光还原活性比较

□—未加 DPC, ■—加入 $50 \mu\text{mol/L}$ DPC, ▨—加入 $70 \mu\text{mol/L}$ DPC

2.5 2,6-二氯酚靛酚(DCIP)光还原活性的比较

图 5 表示 4 种 PS II 颗粒以水为电子供体时的 DCIP 光还原活性,与对照(PP)相比, -1824 PP 光还原活性下降 37%, -33 UPP 下降 74%, -33 CPP 下降 78%. 外加低浓度($50 \mu\text{mol/L}$)的人工电子供体 1,5-二苯卡巴胂(DPC)后, -1824 PP 的 DCIP 光还原活性可以恢复到对照水平,而 -33 UPP 和 -33 CPP 的 DCIP 光还原活性仅得以部分恢复,外加更高浓度($70 \mu\text{mol/L}$)的 DPC, -33 UPP 和 -33 CPP 的 DCIP 光化学活性也能恢复到对照水平.

3 讨论

本文的实验结果表明,去除 3 个外周蛋白可对 PS II 光能的吸收和转化产生明显的影响. DCIP 光还原法检测表明,去除 3 个外周蛋白后 PS II 颗粒 DCIP 光还原活性下降可由外加人工电子供体 DPC 予以恢复,这说明去除 3 个外周蛋白后,PS II 氧化侧受损,水光解受抑制. Chl a 荧光诱导动力学检测进一步表明,去除 3 个外周蛋白,还影响 PS II 原初光能转化效率. 这些结果说明去除 3 个外周蛋白,水光解受抑制,有可能造成 $P680^+$ 及 Z^+ 积累,改变了供体侧(氧化侧)反应的动力学^[13],减缓了电子传递到 $P680^+$ 的速率,导致 $P680^+$ 和 Q_A^- 之间产生电荷重组, Q_A^- 浓度下降,荧光上升速率变慢, F_v 迅速减小^[14~16],原初光能转化效率(F_v/F_m)严重下降(图 5). 反应中心捕获的光能转化为化学能的效率降低.

许多研究表明,33 ku 蛋白与 PS II 上的许多内周蛋白包括 D1, D2, CP43, CP47, Cytb559 及 PsbI 编码的蛋白都直接相连^[3]. 18 和 24 ku 两个外周蛋白除了与 33 ku 蛋白相连外,还与外周天线 LHC II 相连^[17]. 从本文的实验结果可以看出,去除 3 个外周蛋白后,PS II 颗粒光吸收及

荧光光谱下降. 由于去除 3 个外周蛋白后会使其周围的拓扑结构发生改变, 并使 PS II 的内周蛋白组分跨膜螺旋构型发生变化^[3], 这种微环境的变化可能改变叶绿素分子在叶绿素-蛋白复合体内非共价结合状态及在类囊体膜上有序排列方式, 致使激子在天线系统内的传递出现非辐射猝灭, 影响能量从天线向反应中心迁移. 系统中微环境的变化, 也有可能造成叶绿素分子间距离改变, 激子在系统中的传递出现障碍, 影响了激发能向反应中心传递. 去除 3 个外周蛋白后其周围的拓扑结构改变, 也有可能产生新的激发能耗散的途径, 造成荧光猝灭. 此外, PS II 颗粒在 680 nm 处的光吸收出现红移, 说明上述变化有可能还影响了反应中心叶绿素分子的能级. 由于供试的 4 个样品都具有相同的叶绿素浓度, *t*-检验证明了去除 3 个外周蛋白并不造成 Chla/b 的变化. 因此, 去除 3 个外周蛋白对 PS II 光能吸收、转化的影响排除了可能与叶绿素浓度或 Chla/b 变化有关等因素.

我们的实验结果表明, 3 个外周蛋白在 PS II 上的功能比较复杂, 不仅与光合放氧有关, 甚至可能与维持和保护类囊体膜功能的完整, 包括电子传递、光能吸收及转化等有很大的关系. 3 个外周蛋白中 33 ku 蛋白显得更为重要^[4]. 我们的实验结果也证实, 33 ku 蛋白对 PS II 的电子传递, 光能吸收和转化的影响比 18 和 24 ku 两个外周蛋白大; 而且 33 ku 蛋白去除越多, 对 PS II 的影响也越大.

致谢 感谢张其德研究员、林世青研究员的热情指导. 本工作还得到卢荣禾博士、温晓刚博士以及陈耀东、魏捷、张群、冯丽洁、张宝田等同志的帮助, 在此深表感谢.

参 考 文 献

- 1 Murata N, Miyao M. Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem Sci*, 1985, 10: 122 ~ 124
- 2 Andersson B, Stryring S. Photosystem II — molecular organization, function, and acclimation. In: Lee CP ed. *Current Topics in Bioenergetics*. V16. San Diego: Academic Press, 1991. 1 ~ 81
- 3 Bricker T M, Ghanotakis D F. Introduction to oxygen evolution and the oxygen-evolving complex. In: Ort D R, Yocum C F, eds. *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. 113 ~ 136
- 4 Vermaas W F J, Stryring S, Schroder W P, et al. Photosynthetic water oxidation: The protein framework. *Photosynthesis Research*, 1993, 38: 249 ~ 263
- 5 Kuwabara T, Murata N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant Cell physiol*, 1982, 23(3): 533 ~ 539
- 6 Ono T, Inoue Y. Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O₂-evolving PS II particles by divalent salt-washing. *FEBS Lett*, 1983, 164: 255 ~ 260
- 7 Miyao M, Murata N. Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolving system and its replacement by chloride ions. *FEBS Lett*, 1984, 170: 350 ~ 354
- 8 余 辉, 卢荣禾, 唐崇钦, 等. 杂种稻 Le/Qi 及其亲本光合特性的比较研究. *生物物理学报*, 1997, 13(4): 671 ~ 676
- 9 温晓刚, 林世青, 匡廷云, 等. 植物 ms 级叶绿素荧光动力学数据采集和分析软件. *植物学通报*, 1997, 14(4): 51 ~ 54
- 10 Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1 ~ 15
- 11 Telfer A, He W-Z, Barber J, et al. Spectral resolution of more than one chlorophyll electron donor in the isolated photosystem II reaction center complex. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1017: 143 ~ 151
- 12 Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 313 ~ 349
- 13 Vermaas W. Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 457 ~ 481
- 14 Mayes S R, Cook K M, Self S J, et al. Deletion of the gene encoding the photosynthetic 33 kDa protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 does not inactivate water-splitting but increases vulnerability to photoinhibition. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1060: 1 ~ 12
- 15 Burnap R L, Sherman L A. Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 indicates that the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O₂ evolution. *Biochemistry*, 1991, 30: 440 ~ 446
- 16 Debus R J, Barry B A, Sithole I, et al. Directed mutagenesis indicates that the donor to P₆₈₀ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry*, 1988, 27(26): 9071 ~ 9074
- 17 Hansson O, Wydrzynski T. Current perception of photosystem II. *Photosynthesis Research*, 1990, 23: 131 ~ 162