钙离子对光系统 Ⅱ二级结构的影响及其与光抑制的关系

施 桦 杨昆云④ 熊 玲④ 匡廷云④ 赵南明 *
(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;
④中国科学院植物研究所, 北京 100093. * 联系人)

摘要 许多实验表明钙离子在光系统 Ⅱ的放氧过程中起着重要作用. 报道了因钙离子丧失引起的光系统 Ⅱ的二级结构变化. 结果显示钙离子的丧失可导致部分 α_螺旋结构向转角和折叠结构的转变, 但补加钙离子后, 只有转角结构能够得到恢复. 还研究了因钙离子丧失导致的供体侧抑制时, 光系统 Ⅱ在光抑制过程的构象变化. 发现在短时间光照时(10 min 以内), 去钙样品与对照样品的构象变化差异很大, 但随着光照时间的加长, 两者的变化趋于接近.

关键词 光系统 Ⅱ 光抑制 钙离子 二级结构

植物的光系统 Ⅱ(Photosystem Ⅱ) 可以氧化水分子并放出氧气, 这个过程需要 1 个与反应中心相连的锰簇及 3 个膜外周蛋白(分子量分别为 33, 24, 17 ku) 的参与. 但大量实验证据表明, 光系统 Ⅱ中的钙离子参与了供体侧的许多过程, 特别是放氧过程[1]. 在光系统 Ⅱ中去除钙离子可使其放氧活性下降 80%; 钙离子也可以使因 24 和 17 ku 蛋白丧失而下降的放氧活性得到恢复[2]. 总之, 钙离子与光系统 Ⅱ的放氧能力密切相关. 但到目前为止, 有关钙离子在光系统 Ⅱ中的结合位点及其在放氧过程中的作用还很不清楚, 因此进一步研究钙离子在光系统 Ⅱ中的结合状态很有必要.

在对光系统 Ⅱ的光抑制研究中, 发现存在两种光抑制机制, 即供体侧和受体侧的光抑制. 其中受体侧的光抑制是由于电子受体(可能是 Q_A) 被过分还原, 造成 $P680^+ / Pheo^-$ 聚集, 从而导致 $^3P680$ 及 $^1O_2$ 的产生[3]; 而供体侧光抑制则是由于 $P680^+$ 无法立刻被供体侧还原而导致 $P680^+$ 的寿命加长引起的损伤[3]. 可以引起供体侧光抑制的因素很多, 其中光系统 Ⅱ中钙离子的丧失是其中之一. 但钙离子的丧失是如何导致供体侧光抑制, 以及此时供体侧光抑制在结构与功能方面的表现还未见较详细的报道.

本实验室曾报道了强光光抑制下光系统 Ⅱ膜复合物的蛋白二级结构变化[4], 但这种强光光抑制一般认为以受体侧光抑制为主. 供体侧光抑制往往在较弱的光强及较短的光照时间内即有可能发生[3], 因此在实际中其发生的可能性相对较大. 弄清其作用机理也就更具普遍意义. 在光抑制的研究中, 供体侧光抑制所表现的现象常常被受体侧光抑制所掩盖, 因此很难得到其确切的信息. 本文从去除钙离子出发, 研究光系统 Ⅱ中钙离子的丧失及重新加入后对蛋白构象的影响, 从而得到有关钙离子结合位点的蛋白构象环境信息, 对弄清钙离子在光系统 Ⅱ的具体结合位点将有很大帮助. 在这个基础上, 本文进一步研究在供体侧受阻的情况下光系统 Ⅱ的光抑制过程中蛋白的二级结构变化. 通过与对照样品的比较, 对供体侧光抑制过程的发生、发展特别是其中的蛋白构象变化有了更深刻的了解.

1 材料与方法

光系统 Ⅱ膜复合物(photosystem Ⅱ membrane) 是从市售新鲜菠菜中按 Chapman 等人的

方法制得[5]. 样品用 SMN 缓冲液(0.5 mol/L sucrose, 10 mmol/L NaCl, 40 mmol/L Mes_NaOH, pH6.0)洗1次,并以约1.0 mg[Chl]/mL 的浓度悬浮于此溶液中,保存于液氮中备用.

去钙的光系统Ⅱ膜复合物是按 Ono 和 Inoue 的方法[6]以低 pH 值(pH3)处理制得. 相对于用高盐浓度(1~2 mol/L NaCl)处理去钙的方法,这种方法可以保留24和17 ku这2个外周蛋白[7],因此可以减少对蛋白构成与结构的干扰. 钙的重新加入是在冰水浴下向去钙样品中加入一定浓度的 $CaCl_2$ 溶液,并保温30 min后完成的.

光破坏实验使用的是低压石英卤素灯(12 V, 50 W),经适当聚焦照射于样品表面,样品与光源之间用水层滤去大部分热量,并保持样品温度为室温. 对照与去钙样品采取的是完全平行的实验路线.

光系统Ⅱ放氧活性的测量是用中国科学院上海植物生理所研制的放氧仪测定的. 所有用于放氧测量的样品均为新鲜制得并未经过液氮冷冻. 样品的绝对放氧能力约为300~500 μmol O_2/h [mg Chl]. 经去钙处理的样品的放氧能力以对照样品的百分比表示(对照样品为100%).

红外光谱的测量及数据处理的方法详见文献[4]. 在曲线拟合的方法上作了改进:由于光系统Ⅱ膜复合物在组成上的复杂性,因此酰胺iv带的拟合中,考虑了色素和脂的 C=O 伸缩振动峰(1 741, 1 725和1 704 cm^{-1})及酰胺Ⅱ带的部分振动峰(1 595 和1 582 cm^{-1})对酰胺iv带的影响. 实践证明,这种考虑是必要和合理的.

2 结果与讨论

去钙及补加钙的光系统Ⅱ膜复合物酰胺iv带的变化如图1所示. 由图可知,去钙样品的酰胺iv带有一定变化,表现在高波数端(1 660~1 700 cm^{-1})的谱带发生展宽. 说明光系统Ⅱ膜复合物在去钙后,蛋白的二级结构发生了变化. 在此去钙样品中补加一定浓度的钙离子可以使上述展宽的谱带恢复至对照样品的水平. 值得注意的是,在对照样品中补加钙离子并不能使其酰胺iv带发生变化(见图1). 说明钙离子本身不能改变蛋白酰胺iv带的形状,只是在与去钙的光系统Ⅱ样品作用后,部分溶液中的钙离子重组在原来的钙结合位点,使因为去钙

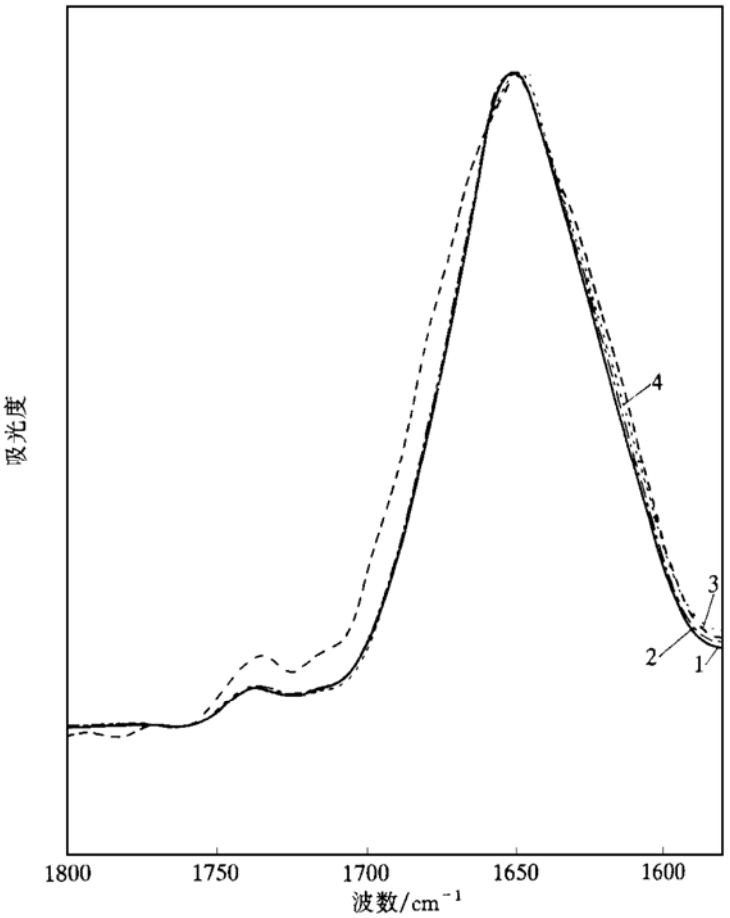

图1 去钙及补加钙离子后光系统Ⅱ膜复合物的红外光谱酰胺iv带变化

1——对照, 2——对照+ Ca^{2+}, 3——去钙, 4——补加 Ca^{2+}

导致的二级结构变化得到恢复, 表现在红外光谱上即为蛋白酰胺 iv带的恢复. 这在下面的放氧活性检测中也能得到证实.

已知去钙可使光系统 Ⅱ膜复合物的放氧活性下降, 在本实验中去钙样品的放氧活性仅为对照样品的约 20%. 但在去钙样品中逐步添加钙离子后, 可使其放氧活性恢复至对照样品的 80%(钙离子浓度为 5 mmol/ L 时, 图 2), 这也从另一个角度证明在去钙样品补加钙离子可使其重新结合至光系统 Ⅱ的钙结合位点上.

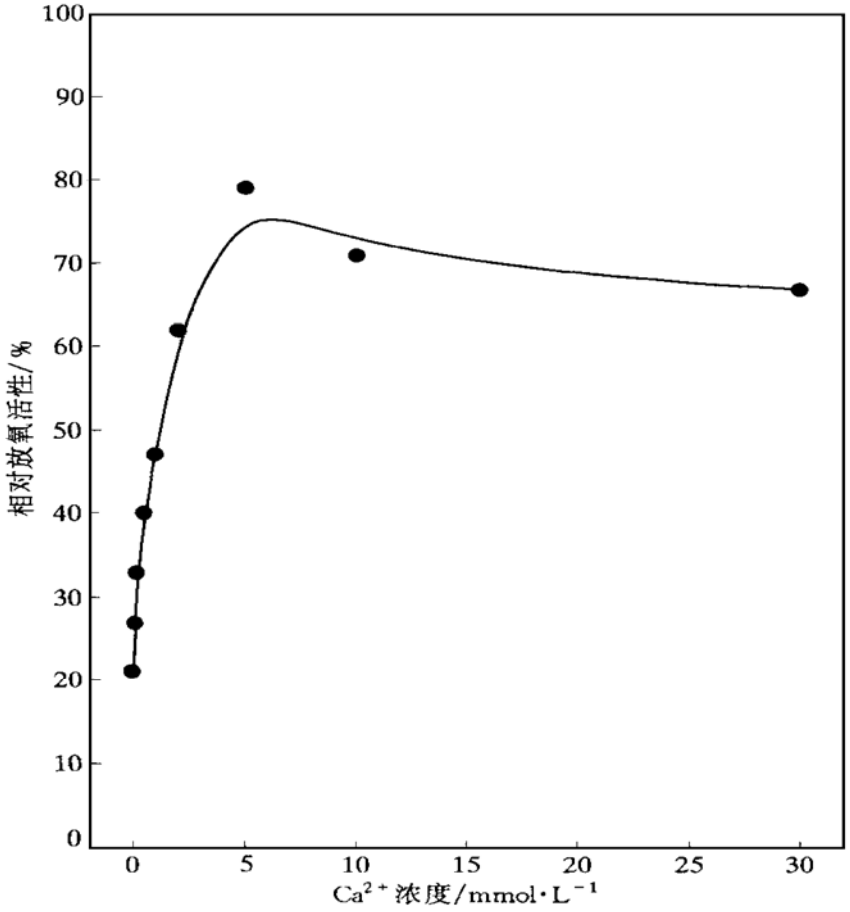

图 2　去钙的光系统 Ⅱ膜复合物在补加钙离子的过程中放氧活性的恢复

根据图 1 的谱带解叠, 可以计算出蛋白二级结构的含量数值(见表 1). 去钙后的光系统 Ⅱ膜复合物中, α_螺旋的含量下降, 其他 3 种二级结构组分的含量均有不同程度的上升, 尤其是转角成分. 在补加钙离子后, 转角和无规卷曲的含量基本上能恢复到对照水平, 但折叠成分的含量变化不大.

表 1　去钙及补加钙离子后光系统 Ⅱ膜复合物的蛋白二级结构含量变化

样品	α_螺旋/ %	β_折叠/ %	转角/ %	无规卷曲/ %
对照	37. 5	25. 0	18. 8	18. 7
对照+ Ca^{2+}	37. 0	25. 1	18. 6	19. 3
去钙	33. 8	26. 1	20. 8	19. 3
去钙+ Ca^{2+}	36. 3	26. 0	18. 9	18. 8

在对照及去钙的光系统 Ⅱ膜复合物同时进行相同的光破坏实验后, 两者的二级结构呈现

既相似又有区别的变化(如图 3 所示). 经过最长至 40 min 的光照, 对照及去钙的样品均表现出 α_螺旋的减少, 且最终的 α_螺旋含量相近(约 28%). 但两者的区别在于对照样品在光照 5 ~ 10 min 的范围内螺旋含量下降最快, 而去钙样品却在光照 1~ 5 min 内下降最快. 在光照 10 min 以后, 两者 α_螺旋的含量呈现几乎相同的变化. 对于其他 3 种二级结构成分来说, 对照与去钙样品的变化趋势也基本相同, 差别只是在于两者在光破坏前的二级结构含量有所不同.

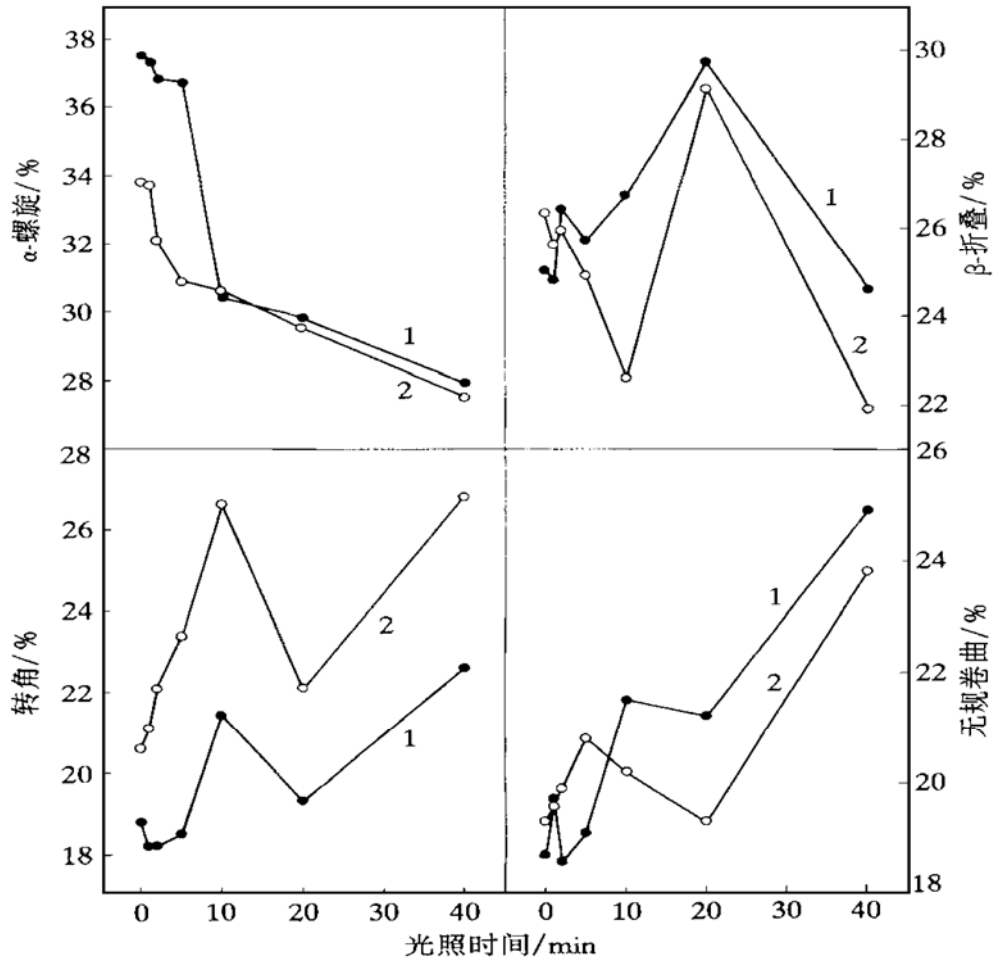

图 3 正常及去钙的光系统 ㊂膜复合物在光抑制过程中的蛋白二级结构含量变化

1 ——对照, 2 ——去钙

通常的光系统 ㊂含有 2~ 3 个钙离子结合位点, 其中 1 个为紧密结合位点, 另外 1~ 2 个为松散结合位点[8](也有另一说法为只有单一钙结合位点[9]). 本文所采用的低 pH 值法只能去除松散结合位点上的钙离子. 而这种去钙方法本身表明该位点上的钙离子极有可能与氨基酸残基侧链上的羧基基团相连[10]. 由于这种方法几乎不影响光系统 ㊂的蛋白组成, 所以用这种方法去除钙离子后的蛋白二级结构变化应主要反映钙结合位点周围的构象变化.

去钙后, 光系统 ㊂中的螺旋成分转为为转角、折叠和无规卷曲成分, 表明钙结合位点周围的部分螺旋构象需要依靠钙离子的结合来维持. 可能是通过钙离子与氨基酸侧链羧基上的氧原子间的作用力, 维持光系统 ㊂中的钙结合蛋白(可能是 D1, 或是 D2, CP43, CP47) 与外周蛋白间的结合, 并形成局部适合水裂解的微环境. 去除钙离子后, 螺旋成分向其他二级结构成分(特别是转角) 转化, 说明部分疏水环境被破坏, 可能意味着外周蛋白与钙结合蛋白间的接触减弱. 补加钙离子后, 大部分构象环境得到恢复. 但变为折叠成分的那部分结构几乎没有恢复.

在供体侧受到抑制的情况下(在本文是去钙处理),光系统 Ⅱ在光抑制过程的前 10 min 内的蛋白二级结构变化表现出与对照样品不同的规律,但随着光照时间的加长,两者的变化趋于相同. 这一现象支持了以下论点,即受体侧的光抑制主要发生在强光及长时间光照的情况下. 基于这个观点,我们可以认为去钙样品在光照的前 5 min 的变化主要来源于供体侧光抑制,这样就可以得到以往很难获得的供体侧光抑制的结构变化信息.

供体侧光抑制的构象变化主要表现在 α 螺旋含量的下降和转角含量的上升. β 折叠和无规卷曲的含量几乎没有变化. 这表明供体侧,即钙结合位点周围的蛋白构象环境的破坏可能主要表现在螺旋到转角的转化,而不涉及 β_折叠的变化. 在光照 5~ 20 min 的时间范围内,受体侧光抑制逐渐增强,其构象变化的主要特点是 α_螺旋结构和部分转角结构向 β_折叠结构的转变. 说明光系统 Ⅱ的部分疏水环境在向亲水环境转化,这可能包括部分螺旋结构从膜内移向膜表面,甚至可能有小部分 D1 蛋白裂解片段进入水溶液. 在光照 20~ 40 min 时,光抑制程度进一步加强,以及部分热效应的作用,导致折叠结构向无规卷曲转变,从而使蛋白的二级结构破坏进一步加剧,直至大量 D1 蛋白裂解片段的产生.

通过本文的实验,使我们对光系统 Ⅱ钙离子结合位点周围的构象环境,特别是钙离子丧失后的蛋白构象变化有了较详细的了解. 对光系统 Ⅱ供体侧的光抑制造成的蛋白二级结构变化也首次加以了阐述. 而所有这些结构变化都与光系统 Ⅱ的功能,特别是放氧活性有着密切的联系. 今后我们将进一步对钙离子与蛋白的结合方式,以及钙离子是否与锰簇间有着直接相互作用等问题进行研究,以期更深入地认识钙离子在光系统 Ⅱ放氧机制中的作用.

参 考 文 献

1 Debus R J. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. Biochim Biophys Acta, 1992, 1 102: 269
2 Ghanotakis D F, Babcock G, Yocum C F. Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem Ⅱ preparations. FEBS Lett, 1984, 167: 127
3 Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem Ⅱ: Inactivation, protein damage and turnover. Biochim Biophys Acta, 1993, 1 143: 113
4 施 桦, 杨昆云, 唐崇钦, 等. 强光光抑制引起的光系统 Ⅱ膜复合物蛋白二级结构的变化. 自然科学进展, 1997, 7: 449
5 Chapman D J, Gounaris K, Barber J. Electron_transport properties of the isolated D1_D2_Cytochrom b559 Photosystem Ⅱ reaction center. Biochim Biophys Acta, 1988, 933: 423
6 Ono T, Inoue Y. Discrete extraction of the Ca atomfunctional for O_2 evolution in higher plant photosystem Ⅱ by simple low pH treatment. FEBS Lett, 1988, 227: 147
7 Shen J R, Inoue Y. Low pH_induced dissociation of three extrinsic proteins from O_2_evolving photosystem Ⅱ: Plant Cell Physiol, 1991, 33: 453
8 Shen J R, Satoh K, Katoh S. Calcium content of oxygen_evolving photosystem Ⅱ preparations from higher plants. effects of NaCl treatment. Biochim Biophys Acta, 1988, 933: 358
9 Enami I, Kamino K, Shen J R, et al. Isolation and characterization of photosystem Ⅱ complexes which lack light_harvesting chlorophyll *a*/*b* proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach. Biochim Biophys Acta, 1989, 977: 33
10 Ono T A, Inoue Y. Roles of Ca^{2+} in O_2 evolution in higher plant photosystem Ⅱ: effects of replacement of Ca^{2+} site by other cations. Arch Biochem Biophys, 1989, 275: 440

(1997-12-24 收稿, 1998-03-26 收修改稿)