

研究论文

捕光天线 LHC II 的膜脂组成及 PG 在 LHC II 聚集中的作用

冷 静, 李良璧, 陈 晖, 许亦农, 匡廷云

(中国科学院植物研究所光合作用研究中心, 北京 100093)

摘要: 用去垢剂增溶及高速离心的方法, 从菠菜类囊体膜中提取并纯化了光系统 II 的捕光天线 LHC II 异质三聚体。分析其膜脂组成和脂肪酸含量, 发现其中磷脂酰甘油(PG)的含量特别高, 是 PS II 的两倍, 而 PG 中含高达 31.1% 的反式十六碳一烯酸。采用特异作用于十六碳一烯酸链的磷脂酶 A₂(PLA₂) 消化 PG 和体外回加 PG 重组的方法证明, PLA₂ 消化 PG 会引起 LHC II 三聚体解聚为单体, 使叶绿素 *b*(Chl*b*) 的吸收峰(475 nm, 655 nm) 和荧光激发峰(480 nm) 下降非常明显, 而回加 PG 重组后, 部分 LHC II 单体又可重新聚集成三聚体。以上实验结果证明, PG 及其反式十六碳一烯酸不仅在 LHC II 三聚体的形成中具有重要作用, 而且还影响色素分子在 LHC II 三聚体中的结合状态以及叶绿素 *b* 到叶绿素 *a* 的正常能量传递。

关键词: PG; LHC II; 聚集; 色素

中图分类号: Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2002)04-0388-06

绿色植物类囊体膜(光合膜)的物理性质及生理功能在很大程度上依赖于脂和蛋白间的相互作用^[1]。已知光合膜上主要有四种膜脂^[2]: 单半乳糖基甘油二酯(MGDG)、双半乳糖基甘油二酯(DGDG)、硫代异鼠李糖甘油二酯(SQDG)和磷脂酰甘油(PG)。这些膜脂通过双分子层内部的疏水区与膜蛋白相互作用, 对光合膜的结构和功能都具有重要的意义。近年来, 有关上述膜脂与膜蛋白相互作用及其与光合功能关系的研究已经受到人们的高度重视^[3-5]。

光系统 II (PS II) 的捕光叶绿素 *a/b*- 蛋白复合物(LHC II) 是光合膜中含量最丰富的色素蛋白, 它结合类囊体中近 50% 的叶绿素(Chl)。LHC II 的主要作用是捕获光能并将光能传递到反应中心^[6]。除此之外, 它还具有调节激发能在两个光系统(PS I 和 PS II) 之间的分配以及维持类囊体膜垛叠的作用^[7,8]。LHC II 是一个由同源核基因(Lhcb1-6) 编码的蛋白家族, 在体内, 它主要以三聚体的形式存在^[9]。Trémolières 等^[10] 认为 LHC II 三聚体在体内的形成过程是: 其脱辅基蛋白(分子质量在 25-30ku 间) 由 Lhcb1-3 编码, 在胞质核糖体上先合成带有转运肽的蛋白质前体, 转入到叶绿体后切除转运肽, 加工成为成熟的蛋白质, 然后整合到类囊体膜

上, 与色素结合, 形成 LHC II 单体, 最后由不同的单体随机形成异质三聚体, 叶绿素、类胡萝卜素等色素分子和一些膜脂参与了这个过程。其中, 色素的参与是为蛋白质的正确折叠和装配所必需的, 而膜脂则可能涉及到 LHC II 单体的组装、三聚体的形成以及它在膜上三维结构的稳定等^[11,12], 但其具体的机理还不十分清楚。为此, 在本文中我们从菠菜叶绿体中分离、纯化出 LHC II 三聚体, 分析了其膜脂及脂肪酸的组成和含量, 并通过酶处理和加入膜脂重组的方法探讨了其中相对含量较高的 PG 及其反式十六碳一烯酸在 LHC II 三聚体构成中的重要作用, 同时分析了去掉 PG 对色素在 LHC II 中的结合状态及捕光功能的影响。

收稿日期: 2002-04-26

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(G1998010100), 国家自然科学基金(39890390)和中国科学院植物研究所光合作用基础研究开放实验室创新基金资助项目

作者简介: 冷静, 1975 年生, 博士研究生, 电话: (010) 62591431-6256, E-mail: lengj01@263.net

通讯作者: 李良璧, 研究员, 电话: (010)82594105,

E-mail: lbli@ns.ibcas.ac.cn.

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用菠菜(*Spinacea oleracea*)购自北京市场。用于分离膜脂的硅胶板(10 cm×10 cm)为青岛海洋化工厂的产品;用于分离、纯化 PS II 和 LHC II 的去垢剂正辛基吡喃葡萄糖(OGP)、处理样品用的磷脂酶 A₂(PLA₂)和测定脂肪酸所用的标准 17 碳脂肪酸均购自 Sigma 公司,其余化学试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PS II 颗粒和 LHC II 三聚体的分离与纯化

主要参照娄世庆等^[13]的方法,略有改动。将初次得到的 PS II 颗粒再经 0.8%的 Triton X-100 处理 15 min, 40 000×g 离心 10 min, 沉淀悬浮于缓冲液中; 35 mmol/L OGP 处理 15 min, 40 000×g 离心 90 min, 所得沉淀重悬于含 20 mmol/L Mes、0.4 mol/L 蔗糖和 10 mmol/L CaCl₂、pH6.0 的缓冲溶液里。所有操作均在黑暗和 4℃ 条件下进行,所得样品在-80℃ 保存备用。

1.2.2 LHC II 三聚体及其多肽组成的电泳分析

LHC II 三聚体的纯度参考 Schagger 等^[14]的方法,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行鉴定。样品上样前加入等体积的增溶液(含 750 mmol/L 氨基己酸、50 mmol/L BisTris、60 mmol/L OGP 和 0.1%的脱氧胆酸钠, pH7.0),浓缩胶和分离胶的浓度分别是 4%和 8%。上槽缓冲液含 50 mmol/L Tricine、15 mmol/L BisTris、0.05% Triton X-100 和 0.05%脱氧胆酸钠, pH7.0。下槽缓冲液为 50mmol/L BisTris, pH7.0。LHC II 中多肽组分的分析基本按 Laemmli^[15]的方法进行,采用 4%的浓缩胶和 15%的分离胶,分离胶中加入 6 mol/L 的尿素。胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.3 膜脂的提取和鉴定

依照 Xu 等^[16]的方法从纯化的色素蛋白复合物中分离得到膜脂。单脂的鉴定采用双向硅胶板薄层层析法。将小量体积的脂溶液轻轻地点在硅胶板的一角,作为起始点。第一向展开液用氯仿/甲醇/水(65:25:4, 体积比)的混合液,第二向是氯仿/甲醇/异丙醇/氨水(65:35:0.5:5, 体积比)的混合液。

1.2.4 脂肪酸分析

提取的脂先甲基化。在脂溶液中加入 1 ml 硫酸甲醇,同时加入 20 μl 17 碳脂肪酸作为内标,

85℃水浴 1 h。然后加入 1 ml 水和 1.5 ml 正戊烷,振荡混合后取正戊烷相(含甲基化的脂肪酸),氮气吹干,并溶于正己烷。取 1 μl 的脂肪酸甲脂溶液上气相色谱仪进行分析。

1.2.5 LHC II 三聚体的酶处理及其后的 PG 重组

样品悬浮于 22 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)中,加入 PLA₂ 至终浓度为 10 mg/L,色素浓度调至 1.4 g/L,室温下过夜处理。PG 与处理液的重组按 Nußberger 等^[11]的方法进行,将 PG 溶于氯仿,氮气吹干,再加入经 PLA₂ 处理的样品溶液,水浴超声 5 min。

1.2.6 吸收和荧光光谱分析

吸收光谱的测定采用 UVKON-943 双光束分光光度计在室温避光条件下进行。扫描速度 100 nm/min,分辨率 0.5 nm。低温(77 K)荧光发射光谱和激发光谱的测定采用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计进行。激发光波长分别为 436 nm 和 480 nm,激发狭缝和发射狭缝分别是 10 nm 和 5 nm。测定时,样品的 Chl 浓度调至 10 mg/L。Chl 浓度和 Chl *a/b* 值的确定按 Hartmut 的方法^[17]。

2 结果与讨论

2.1 LHC II 的纯度及膜脂分析

我们采用 OGP 增溶后高速离心的方法从菠菜类囊体膜中纯化得到了 LHC II。样品的稳定性和纯度通过非常温和的 Triton X-100 不变性电泳和 SDS 变性电泳来检测。由图 1 可见,我们提纯的 LHC II 复合物是三聚体,在非变性电泳胶上仅呈现

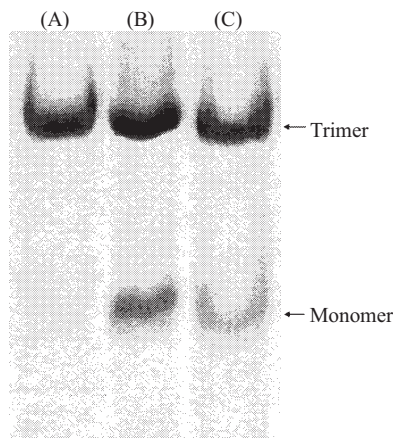


Fig.1 Native-PAGE of LHC II with different treatments. (A) Isolated LHC II trimer; (B) LHC II +10 mg/L PLA₂; (C) LHC II +10 mg/L PLA₂+0.04% PG

出一条带。纯化的 LHC II 三聚体由三条分子质量分别在 29 ku、28 ku 和 26 ku 的多肽组成，是一种异质三聚体(图 2)。此样品在 681nm 处有一尖而

高的荧光发射峰(见 2.3 节)，上述结果与 Ruban 等^[8]得到的三聚体是一致的。光合膜中的几种膜脂在不同膜区的分布是不均一的，如 ATP 酶结合较多的磷脂，而光系统 II 中含大量的糖脂。因此，分析不同膜区膜脂及其脂肪酸的组成，对于正确理解膜脂与膜蛋白的相互作用对光合膜结构与功能的影响是很有意义的。本文对纯化的 PS II 颗粒和 LHC II 三聚体的膜脂组成的分析结果表明，分离的 LHC II 三聚体和 PS II 颗粒的膜脂组成相似，但各单脂，尤其是 PG 的含量不同(表 1)。其中，PG 的含量在 PS II 颗粒中只占总脂的 10%，而在 LHC II 中为 21.1%，比 PS II 高出一倍。但在 LHC II 中 MGDG 和 DGDG 的含量较 PS II 为低。进一步分析 LHC II 中各单脂的脂肪酸组成(表 2)，发现 MGDG 和 DGDG 的不饱和程度最高，PG 次之，而 SQDG 最低。PG 中含有特有的反式十六碳一烯酸，而且含量很高(31.1%)。这表明 PS II 颗粒中的膜脂分布也是不均一的，存在着不同的膜脂微区，而大部分的 PG 都分布在富含 LHC II 的膜区。因此 PG 及其反式十六碳一烯酸在维持 LHC II 三聚体结构和功

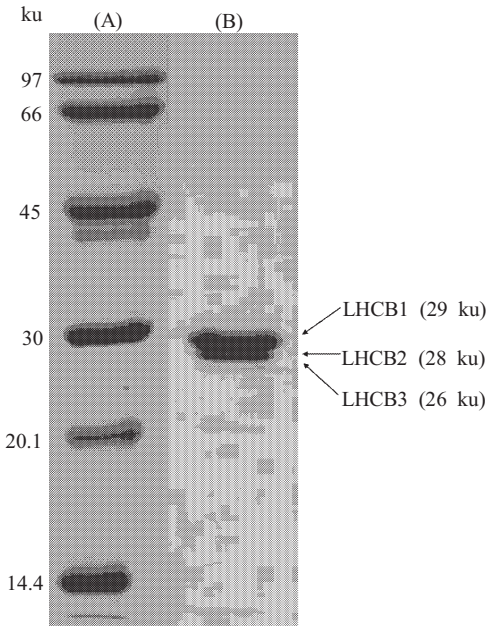


Fig.2 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of isolated LHC II. (A) Marker; (B) LHC II trimer

Table 1 Comparison of lipid classes between PS II and LHC II

	MGDG	DGDG	PG	SQDG
	% polar lipids			
PS II	50.2±5.8	31.4±2.7	10.4±1.3	8.0±0.4
LHC II	42.7±6.1	28.7±2.0	21.1±2.5	7.5±0.6

Table 2 Fatty acid composition of glycerolipids in LHC II

Fatty acid	16:0	16:1(trans)	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
	%						
MGDG	6.7±0.4		13.7±1.2	4.4±0.3	7.0±2.2	7.3±1.9	60.1±8.8
DGDG	8.8±0.4		2.2±0.1	4.0±0.5	6.2±1.6	4.6±1.2	77.6±10.1
PG	18.8±1.1	31.1±4.3		4.3±0.1	5.9±1.0	13.4±2.1	26.6±4.3
SQDG	33.7±6.0	3.8±1.3		6.5±1.1	8.1±1.4	11.6±2.0	36.7±5.2

能中的作用是不容忽视的。

2.2 PG 在 LHC II 三聚体构成中的作用

磷脂酶 A₂(PLA₂)是专一作用于 PG 分子 Sn-2 位的脂酶，而这个部位结合的通常都是十六碳一烯酸链，所以是研究 PG 及其十六碳一烯酸结构与功能的理想探针。用 PLA₂ 室温过夜处理 LHC II 三聚体，再对其进行非变性电泳分析，结果如图 1 所示。未经处理的对照只有一条属于三聚体的条带(图 1A)，而 PLA₂ 处理后，在这条带的下方出现了

一条新的条带(图 1B)。表明 PLA₂ 消化 PG 后，破坏了膜脂和色素蛋白复合物的相互作用，并导致三聚体部分解聚成了单体。为进一步证明这种解聚是由于 PG 被破坏造成的，我们再回加 PG 到此溶液中，发现大部分被解聚的单体又可重新聚集成三聚体(图 1C)。由于溶液中还存在 PLA₂，所以外加的 PG 不能使单体全部重聚集成三聚体。

研究表明，缺失反式十六碳一烯酸的 PG 突变体不能形成 LHC II 三聚体^[9]。体外表达得到的

LHC II 脱辅基蛋白与色素和 PG 重组可以形成三聚体^[20,21]。此外, 缺失 PG 的突变体中 LHC II 和叶绿素的含量都减少^[22]。我们在体外用 PLA₂ 处理 LHC II 后, 三聚体解聚成了单体, 而再加入 PG 又可使单体重新聚集, 这些结果进一步证明了 PG 及其反式十六碳一烯酸链在 LHC II 三聚体的形成中起着关键性的作用。可能是 PG 通过它的特异脂肪酸链和活体内色素蛋白复合物之间的静电作用力帮助蛋白正确定位, 从而使多肽链的三级结构能稳定存在于类囊体膜上。

2.3 PLA₂ 处理对 LHC II 光谱特性的影响

不仅 LHC II 的聚集与 PG 有直接关系, 消化 PG 后得到的 LHC II 单体与三聚体在光谱特性上也有明显差异。我们检测了解聚后的 LHC II 单体的室温吸收 (293 K) 和低温荧光 (77 K) 光谱, 并与三聚体作比较, 其结果分别列于图 3 和图 4。相对于三聚体而言, 单体在 475 nm (Chl *b*), 655 nm (Chl *b*) 和 675 nm (Chl *a*) 三个波长的吸收峰均有明显下降 (图 3), 这说明有部分叶绿素分子, 尤其是叶绿素 *b* 的结合状态发生了变化^[23]。图 4 所示为三聚体和单体的 77 K 荧光发射和激发光谱。三聚体中, 用叶绿素 *b* 分子 480 nm

的特征激发得到的荧光发射峰略高于用叶绿素 *a* 分子 436 nm 的特征激发得到的荧光发射峰 (图 4A)。而在单体中, 480 nm 激发得到的发射峰远低于 436 nm 激发的发射峰 (图 4B), 表明 PLA₂ 处理导致叶绿素 *b* 分子大量减少。荧光激发光谱中 (图 4C), 三聚体 480 nm (叶绿素 *b* 和胡萝卜素的复合峰) 的激发峰很强, 而单体则相反, 480 nm 的激发峰下降了许多, 这同 475 nm 吸收峰的下降是一致的, 同时单体中还出现了 470 nm (Chl *b*) 和 485 nm (Cars) 两个新的激发峰。可以看出, PLA₂ 处理使 LHC II 上结合的色素均受到了不同程度的影响, 而尤以叶绿素 *b* 最为明显。去掉 PG 上的反式十六碳一烯酸之后, LHC II 在 480 nm 处激发的荧光发射峰明显下降, 说明单体中从叶绿素 *b* 到叶绿素 *a* 的能量传递受到了很大的影响, 并且部分由胡萝卜素分子直接传递到叶绿素 *a* (表现为新的激发峰的出现)。这些结果表明 PG 亦有维持叶绿素结合状态及其光能传递功能的作用。

LHC II 光谱特性的变化可能有以下两个方面的原因: 一是 PG 与色素分子通过疏水作用力直接结合, 去掉 PG 后, 色素分子从三聚体上脱落下来; 另一方面也可能是由于 PG 被消化导致三聚体解聚后, LHC II 空间结构的变化引起色素结合状态的改变。我们测得单体和三聚体的远紫外 CD 光谱, 发现二级结构没有受到影响 (资料未列出), 表明叶绿素 *b* 分子光谱区的变化主要和 PLA₂ 消化 PG 直接相关, 但这还需要进一步的实验来证实, 目前此问题正在研究中。

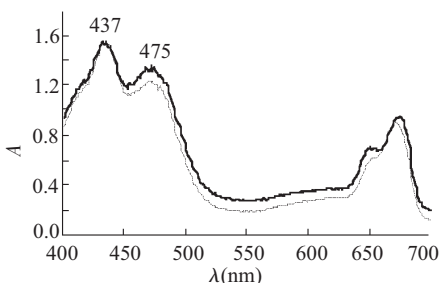


Fig.3 Absorption spectra of LHC II trimer and monomer. ---- Monomer — Trimer

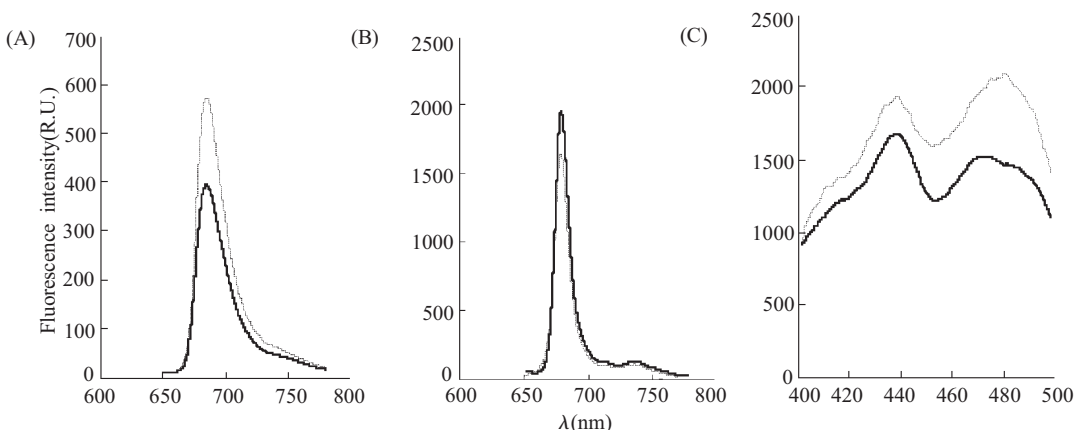


Fig.4 Fluorescence emission and excitation spectra of LHC II trimer and monomer. (A) Emission spectrum of monomer, ---- 436 nm — 480 nm; (B) Emission spectrum of trimer, ---- 436 nm — 480 nm; (C) Excitation spectra. ---- Trimer — Monomer

参考文献:

- [1] Nußberger S, Dörr K, Wang DN, et al. Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex[J]. *J Mol Biol*, 1993,234:347-356.
- [2] James AT, Nichols BW. Lipids of photosynthetic systems[J]. *Nature*, 1966,210:372-375.
- [3] Zaitsev SY, Kalabina NA, Herrmann B, et al. A comparative study of the photosystem II membrane proteins with natural lipids in monolayers[J]. *Materials Science and Engineering*, 1999,C8-9:519-522.
- [4] Trémolières A, Dainese P, Bassi R. Heterogenous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts [J]. *Eur J Biochem*, 1994,221:721-730.
- [5] Simidjiev I, Barzda V, Mustárdy, et al. Isolation of lamellar aggregates of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex of photosystem II with long-range chiral order and structural flexibility [J]. *Analytical Biochemistry*, 1997,250:169-175.
- [6] Van Grondelle R, Dekker JP, Gillbro T, et al. Mechanism of Δ pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membrane. I. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994,1187:1-65.
- [7] Ryrie IJ, Anderson JM, Goodchild DJ. The role of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex in chloroplast membrane stacking. Cation-induced aggregation of reconstituted proteoliposomes[J]. *Eur J Biochem*, 1980,107:345-354.
- [8] Mullet JE, Arntzen CJ. Simulation of grana stacking in a model membrane system mediated by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplast [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980,589:100-117.
- [9] Bassi R, Sandonà D, Croce R. Novel aspects of chlorophyll *a/b*-binding proteins[J]. *Physiol Plant*, 1997,100:769-779.
- [10] Trémolières A, Siegenthaler PA. Reconstitution of Photosynthetic structures and activities with lipids[A]. In: Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics[M]. 1998. 175-189.
- [11] Paulsen H, Finkenzeller B, Kühlein N. Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein[J]. *Eur J Biochem*, 1993,215:809-816.
- [12] Simidjiev I, Stoylova S, Amenitsch H, et al. Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins in vitro [J]. *PNAS*, 2000,97:1473-1476.
- [13] Lou SQ, Wang KB, Zhao FH, et al. A comparative study on PS II light harvesting chlorophyll *a/b* protein complexes between spinach and cucumber[J]. *Acta Bot Sin*, 1995,37:192-197(in Chinese).
- [14] Schägger H, van Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form[J]. *Analytical Biochemistry*, 1991,199:223-231.
- [15] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970,227:680-685.
- [16] Xu YN, Eichenberger W. Phosphatidylglycerol of *Ectocarpus fasciculatus*(Phaeophyceae): Analysis of molecular species by the use of dinitrobenzoyldiacylglycerol derivatives [J]. *Fett/Lipid*, 1999,101:104-108.
- [17] Hartmut KL. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthesis biomembrane [A]. In: Methods in Enzymology[M]. Academic Press Inc, 1987. 148.
- [18] Ruban AV, Horton P. Energy transfer and trapping in photosynthesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992,1102:30-38.
- [19] Dubertret G, Mirshahi A, Mirshahi M, et al. Evidence from in vivo manipulation of lipid composition in mutants that the Δ 3-trans-hexdecenoic acid-containing phosphatidylglycerol is involved in the biogenesis of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of chlamydomonas reinhardt II [J]. *Eur J Biochem*, 1994,226:473-482.
- [20] Hobe S, Prytulla S, Külbrandt W, et al. Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex[J]. *EMBO J*, 1994,13:3423-3429
- [21] Hobe S, Förster R, Kingler J, et al. N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes[J]. *Biochemistry*, 1995,43:10224-10228.
- [22] Sato N, Hagio M, Wada H, et al. Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes[J]. *Proc Natl Aca Sci USA*, 2000,97:10655-10660.
- [23] Robert C, Jennings GZ, Roberto B, et al. The relation between the minor chlorophyll spectral forms and fluorescence quenching in aggregated light harvesting chlorophyll *a/b* complex II [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1184:279-283.

THE MEMBRANE LIPID COMPOSITIONS IN SPINACH LHC II AND THE FUNCTION ROLE OF PG IN LHC II AGGREGATION

LENG Jing, LI Liang-bi, CHEN Hui, XU Yi-nong, KUANG Ting-yun

(Photosynthesis Research Center, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Light-harvesting complexes of photosystem II (LHC II) was isolated from spinach chloroplast by ultra centrifugation after non-ionic detergent treatment. Native and SDS denatured polyacrylamide gel electrophoresis analysis indicated that the complexes existed in heterotrimer form and consisted of three polypeptides with molecular mass of 29 ku, 28 ku and 26 ku respectively. Lipid and fatty acid compositions in complexes were determined. LHC II had the similar lipid compositions as PS II, but the content of phosphatidyl-DL-glycerol (PG) with unusual 16:1-trans-hexadecenoic acid as the predominant fatty acid chains in LHC II was much higher (21.1%) than that in PS II (10.4%). Treating the trimeric LHC II with phospholipase A₂(PLA₂) could induce the dissociation of the complexes. Reaggregation of monomer occurred after adding PG into dissociated LHC II, which suggested PG is directly involved in the trimer stabilization. In addition, The absorption band at 475 nm, 655 nm and the fluorescence excitation peak at 480 nm decreased obviously in monomer, indicating that the energy transfer from Chl *b* to Chl *a* in LHC II was effected after deletion of PG. It was concluded that PG not only played an important role in trimer formation but also effected the pigments binding and the energy transfer within the LHC II.

Key Words: PG; LHC II; Aggregation; Pigment