

藻胆蛋白的研究概况 III . 蓝藻藻胆蛋白合成的分子机制及调控*

OUTLINES OF STUDIES ON PHYCOBILIPROTEINS(III) THE MOLECULAR MECHANISM AND REGULATION OF SYNTHESIS FOR PHYCOBILIPROTEINS FROM CYANOBACTERIA

马圣媛 王广策** 孙海宝 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

近 20 年来,尤其是蓝藻中的集胞藻 PCC 6803 的基因组全序列测定的完成,使得藻胆蛋白分子生物学的研究日渐深入,研究人员已经先后从一些蓝藻(包括蓝藻细胞内的蓝色小体)和红藻细胞中克隆了一些与合成藻胆蛋白相关的基因,并对这些基因的数量、位置以及表达调控进行了深入的研究。这些研究加深了我们对藻胆蛋白结构及其基因进化的认识,同时也有利于我们理解藻胆蛋白合成的不同水平的调控方式。本文就近年来蓝藻藻胆蛋白分子生物学的研究作一综述。

1 藻胆蛋白脱辅基蛋白基因的表达与调控

1.1 藻胆蛋白脱辅基蛋白基因的转录单元的结构

藻类基因组中与藻胆蛋白相关的转录单元,主要与藻胆蛋白脱辅基蛋白基因有关。这些转录单元的数目随着藻的类型而变,如蓝藻大约有 5~9 个,且这些转录单元内基因的定位也并非固定不变。Bryant 1991 年和 Grossman 1993 年总结了两种蓝藻藻胆体组分基因的组织转录模式如图 1。

1986 年 Conley 提出在所有被研究的藻类中,APC, PC 和 PE 的 α 和 β 亚基基因都以双顺反子的形式转录,用以保证细胞中这两种亚基的数量接近 1:1。这些亚基基因在转录单元中的排列方式非常保守,别藻蓝蛋白中 α^{APC} 基因总位于 β^{APC} 基因上游,而藻蓝蛋白中 α^{PC} 基因却位于 β^{PC} 基因的下游, α^{PE} 基因也位于 β^{PE} 基因的下游。在聚球藻 PCC 6301 中,PC 的 β^{PC} 和 α^{PC} 基因间隔 2.5 kb 的非编码区,然而这两个亚基的基

因彼此同向转录,在各种光照条件下转录水平十分接近。但 1986 年 Houmard 发现在藻类生长的其他条件下(除光照以外)其转录水平又显著不同,推测可能是由于 PC 基因上游增强子作用的结果,以增强藻对环境变化的适应能力。

1.2 藻细胞生长的条件对藻胆蛋白脱辅基蛋白基因表达的影响

在蓝藻中一些藻胆蛋白和连接多肽的基因有多个位点,基因多位点的存在可能有着重要的生理意义。例如,聚球藻 PCC 6301 的 CPC 有两个 $cpcBA$ 基因, $cpcB1A1$ 和 $cpcB2A2$;假鱼腥藻 PCC 7409 的 CPC 也存在着 $cpcB1A1$ 和 $cpcB2A2$ 两个基因;而眉藻 PCC 7601 中有 3 个不同的 CPC 基因。这种同一蛋白质有多个基因位点编码的现象,Mazel 和 Madiere 推测可能是生物适应环境条件变化,如光质(互补色适应)和营养条件(尤其是硫元素)的结果。

在一些原核藻细胞中,例如眉藻 PCC 7601 有 3 个不同的与 CPC 脱辅基蛋白合成有关的操纵子($cpc1$ 、 $cpc2$ 和 $cpc3$),分别含有编码 α^{CPC} 和 β^{CPC} 的基因。研究表明,互补色适应仅需其中的两个操纵子($cpc1$ 和

* 国家自然科学基金资助项目 30170499 号。

** 联系人。

第一作者:马圣媛,出生于 1975 年,硕士。电话:0532-2898574

收稿日期:2001-03-26;修回日期:2001-09-20

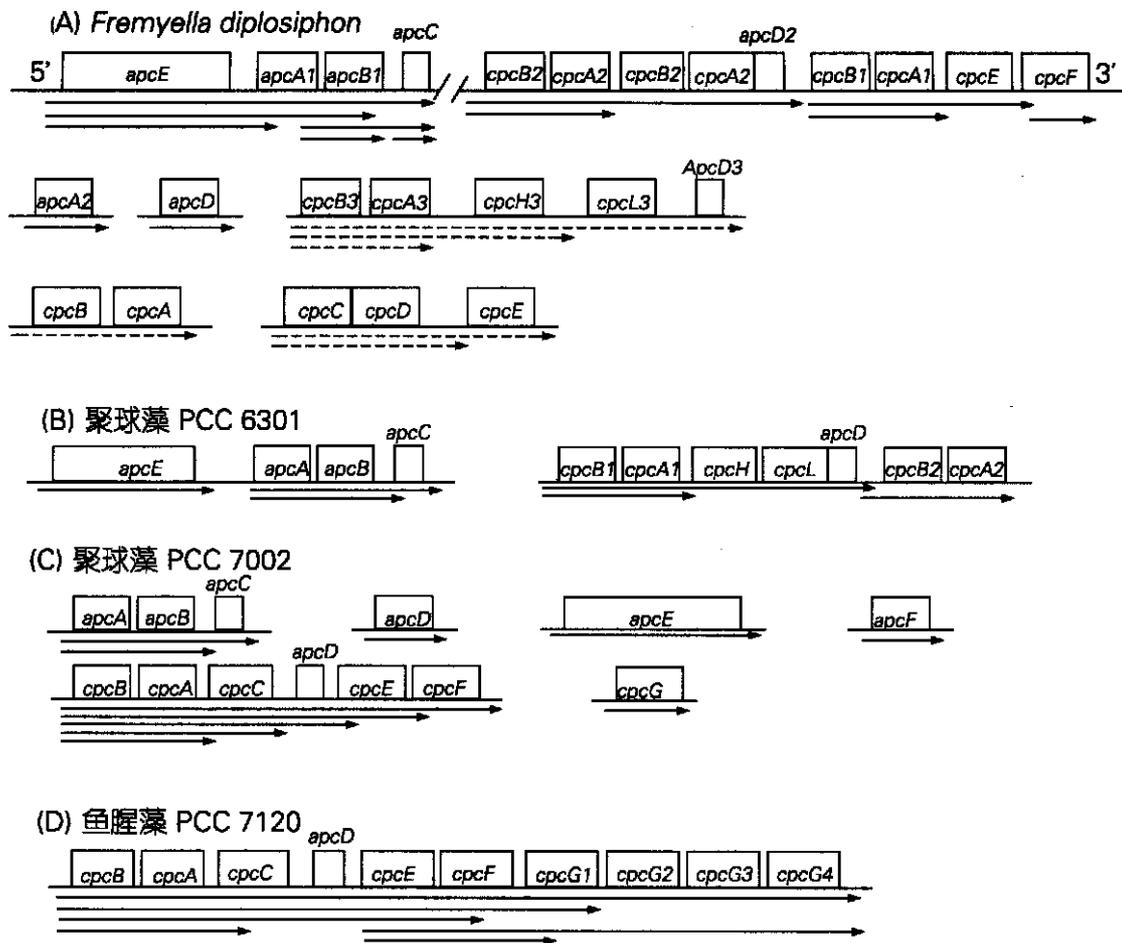


图1 编码藻胆体蛋白组分的基因和基因簇的物理图谱

(A) *Fremyella diplosiphon*; (B) 聚球藻 PCC 6301; (C) 聚球藻 PCC 7002; (D) 鱼腥藻 PCC 7120.

cpc2)。在绿光下 *cpc1* 操纵子组成型表达 CPC1, 且与负责编码另一种藻胆蛋白 CPE 的 *cpe* 操纵子协同翻译; 在红光下 *cpc2* 操纵子与 *cpc1* 操纵子一起表达编码 CPC2。到目前为止, 在眉藻 PCC 7601 细胞中, CPC 三聚体 ($\alpha\beta$) 的 α 和 β 亚基是否来源于同一个操纵子尚不太清楚。有实验证明不同来源的亚基完全可以组合为有正常功能的藻胆蛋白分子。例如 Tracey Plank 在 1995 年发现藻蓝蛋白 β 亚基缺失突变株集胞藻 PCC 68034R 中的 *cpcB* 基因突变, 不能产生 β 亚基, 但如在该突变株引入外源的 β 亚基基因并使其表达, 则可以在细胞中产生正常的藻蓝蛋白。Gulielmi 和 Bryant 在念珠藻 MAC 细胞中, 也发现 CPC 三聚体的 α 和 β 亚基是来源于不同的操纵子。1989 年 Mzel 和 Marier 在眉藻 PCC 7601 细胞中, 发现与 CPC 合成有关的另一个操纵子 *cpc3* 仅在生长环境缺乏硫元素时

才表达 CPC3; 而 Grossman 在 1993 年进一步发现, *cpc1*, *cpc2* 和 *cpe* 操纵子完全关闭, 细胞中形成藻胆体所需的连接多肽与 PC 和 PE 一同合成。

1994 年 Casey 研究证明, *Fremyella diplosiphon* 参与互补色适应的基因有 *cpcB2A2*, *cpcBA* 和 *cpcCDE* 三个操纵子。在 *cpcB2A2* 操纵子中, -76 到 -37 的序列对 *cpcB2A2* 的表达是必需的; 而 -76 到 +25 的区域是红光诱导的作用区, -162 到 -122 和 -37 到 25 的两段序列是调控蛋白的两个结合位点, 来自红光和绿光下生长的细胞粗提物蛋白都可与第一个位点反应, 但只有来自红光下生长的细胞蛋白抽提物才能与后一个位点反应, 这说明临近转录起始点的结合位点对互补色适应是非常重要的。

在眉藻 PCC 7601, 假鱼腥藻 PCC 7409 和集胞藻 PCC 6701 中, 负责编码 CPE 的操纵子 *cpcBA* 不含连接

多肽基因。Federspiel 和 Scott 1992 年发现眉藻 PCC 7601 中 3 个 PE 连接多肽基因以独立的操纵子 *cpcCDE* 存在,且细胞仅在绿光下生长才表达。与之相比, Wilbanks 和 Glazer 在 1993 年发现 *mpeC* 基因编码 PE II 双功能连接多肽,即 γ 亚基,则位于同一转录单元中,它无色适应现象,但极其适应绿光下生长。

藻胆蛋白除了作为光合作用捕光色素蛋白外,还可以作为藻细胞内蛋白的储藏库,即在环境条件合适时大量合成藻胆蛋白,而当环境条件缺乏合成蛋白质所需的氮和硫元素时则分解藻胆蛋白,提供氨基酸以合成其他细胞生存所必需的蛋白质^[1-3]。而当藻胆蛋白被分解以后,藻细胞的颜色变淡,这种现象在 1994 年 Collier 称之为漂白现象。然而,一些藻细胞突变体在生长环境中缺乏氮或者硫时不会发生漂白现象,也就是藻胆蛋白不会降解。例如一种集胞藻 PCC 7942 的非漂白突变体就是由于非漂白基因 *nblA* 的表达而产生的^[5]。集胞藻 PCC 7942 在氮或硫缺乏的条件下生长时, *nblA* 基因大量表达;而当氮或硫营养充足时 *nblA* 基因几乎不表达。这种 *nblA* 基因编码 59 个氨基酸的多肽,与 *nblA* 相似的序列在集胞藻 PCC 6803 的基因组和红藻的质体基因组中都发现了与 *nblA* 基因类似的序列。最近分离了集胞藻 PCC 7942 的另一种非漂白突变体,并发现是由于 *nblR* 基因突变所致。这种 *nblR* 编码转录调控蛋白,调节 *nblA* 启动子的活动^[5]。Nadia Dolganov 等又从集胞藻 PCC 7942 非漂白突变体中克隆了 *nblB* 基因,编码的多肽与 PC 的 α 亚基的 PCB 裂合酶相似,是调节藻胆蛋白降解系统的组成成分^[6]。在 *nblB* 突变体中,氮硫缺乏条件下生长的细胞中藻胆体数量急剧下降,

但组成藻胆体的不同藻胆蛋白亚基的比例与正常条件下生长的细胞相同。同时发现 *nblB* 基因对维持营养充足生长时的藻胆体和叶绿素的比例也很重要。

2 藻胆蛋白色基的生物合成途径

藻胆蛋白色基以及叶绿素生物合成的前体物质都是氨基乙酰丙酸,经过数步反应至原卟啉 IX 时发生分叉。如果反应液中含有 Mg^{2+} 螯合酶,反应的终产物是叶绿素;如果反应体系中主要是 Fe^{2+} 螯合酶催化,反应则向藻胆素形成的方向进行。从色基的生物合成途径可以看出,前体物质到终产物要经过数十步的反应,每一步反应均需至少一种酶的催化。因此要在大肠杆菌或者酵母细胞中用前体物质氨基乙酰丙酸合成藻胆素,决不是转移一个或两个基因就能完成,而是要转移至少数十个基因。即便如此,在大肠

杆菌或者酵母细胞的体系中也未必就能表达合成为类似天然构象的藻胆素^[2]。

Schluchter 和 Glazer 在集胞藻 PCC 6803 中克隆到胆绿素还原酶基因 *bvdR*,和小鼠及人的胆绿素还原酶基因相似性为 20%~22%。该酶是血红素断裂的最初产物,可将胆绿素 IX a 还原为 15,16-二氢胆绿素 IX a,与哺乳动物中将胆绿素 IX a 转换为胆红素的胆绿素还原酶极为相似。这是有关蓝藻胆绿素还原酶和细菌中胆红素形成的首次报道^[7]。他们发现在 *bvdR* 突变体中,产生的 PCB 仅为正常情况下的 1/6,而且没有完整的藻胆体形成,主要表现在没有发现 CPC,而含 APC 的核心结构约为正常生长时的 84%。可见 *bvdR* 基因的抑制失活没有阻止 PCB 和藻胆蛋白的生成,推测可能是胆绿素无法转化为胆红素导致了胆绿素的大量累积,而 Kutty 和 Fairchild 等人分别在 1981 年和 1994 年发现胆绿素和脱辅基的 PC 和 PE 亚基在体外有很高的亲和力,但结合是非共价的。虽然 PCB 和胆绿素与脱辅基 PC 亚基的亲和力并没有量化,但如果 PCB 和脱辅基 APC 亚基的结合力强于 PC 的,就可以解释这个实验现象了。

3 藻胆色素裂合酶基因——*cpcE* 和 *cpcF* 基因

目前已经在几种蓝藻,聚球藻 PCC 7002,眉藻 PCC 7601,鱼腥藻 PCC 7120,假鱼腥藻 PCC 7409 和层理鞭枝藻中克隆了 *cpcE* 和 *cpcF* 基因,并完成了这些基因的序列测定。这两个基因位于 *cpc* 操纵子中,分别编码藻胆色素裂合酶。1992 年, Zhou 和 Swanson 等人在研究聚球藻 PCC 7002 的突变分析表明, *cpcE* 和 *cpcF* 基因的插入突变会导致藻胆素 PCB 无法连接到 CPC 的 α 亚基上。1992 年 Fairchild 发现在 *E. coli* 中表达 *cpcE* 和 *cpcF* 基因,可得到表达产物 CpcE 和 CpcF,将这两种表达产物组合在一起形成 CPC 的 α 亚基藻胆素裂合酶,此酶的活性形式是异二聚体 (CpcE:CpcF=1:1)。这种酶可以催化 PCB 共价结合至 α^{PC} 脱辅基蛋白上,也可以催化 PCB 由 α^{PC} 上解离,还可以催化 PCB 在不同的 CPC α 亚基之间交换,即由一种含有 PCB 的 α^{PC} 上的 PCB 转移至另一种不含 PCB 的 α^{PC} 脱辅基蛋白上。有趣的是,这种裂合酶还可催化藻胆素 PEB 共价结合到不含 PCB 的 PC 的 α 亚基上。但是 1994 年, Fairchild 和 Glazer 发现,如果在催化体系中既含有 PEB 又含有 PCB,则该酶催化 PCB 与 PC 的 α 亚基,而不是 PEB 与 α 亚基的共价结合。

1992 年 Swanson 发现鱼腥藻 PCC 7120 中,与 *cpcE* 和 *cpcF* 同源的基因 *pcE* 和 *pcF* (原名 ORF173) 位于

pecBAC 操纵子的下游。推测 PecE 蛋白有 253 个氨基酸,与 CpcE 蛋白的平均相似性为 47%;而 PecF 蛋白预测 173 个氨基酸,与 CpcF 蛋白大约 27%的同源性。通过对 *pecE* 和 *pecF* 插入突变体和 *pecEF* 部分缺失突变体的研究,进一步证实了 PecE 与 PecF 和 CpcE 与 CpcF 的功能相似,*pecE* 和 *pecF* 基因编码 PEC α 亚基裂合酶,催化藻紫胆素 PXB 连至 α PEC 亚基上。

1993 年 de Lori m i e r 在聚球藻 WH 8020 和 WH 8103 中发现与 *cpcE* 和 *cpcF* 相似的基因 *ηpE* 和 *ηpF*, 定位于 *ηpB ηpA* 操纵子下游。*ηpE* 基因编码一段 265 个氨基酸的多肽,与 CpcE 大约 40%同源性,与鱼腥藻 PCC 7120 的 PecE 蛋白有 34%相似性。*ηpF* 基因编码一段 210 个氨基酸的多肽 RpcF,与 CpcF 蛋白大约 37%相似,与鱼腥藻 PCC 7120 的 PecF 有 28%相似。RpcF 和 RpeE 组成裂合酶,用以催化 PEB 共价结合到 RPG II 的 α 亚基,而且这种裂合酶对 PEB 的连接特异性要远远高于 PCB。

在眉藻 PCC 7601,假鱼腥藻 PCC 7409 和聚球藻 WH 8020 中,从 PE 基因附近发现了一些与蓝藻 *cpcE* 和 *cpcF* 基因同源的阅读框架。在前两种蓝藻中的 *cpcBA* 操纵子下游探测到开放阅读框架 *orfZ*。聚球藻 WH 8020 中,这些阅读框架分别编码含有 202 和 205 个氨基酸的蛋白,这些蛋白与 CpcE 家族成员及紧密相关的 *cpcZ* 基因产物(位于 *mpeBAC* 和 *cpcBA* 操纵子之间)有明显的同源性;还有两个基因 *mpeU* 和 *mpeV*, 分别编码 297 和 301 个残基的蛋白,也是 CpcE 蛋白家族成员。据推测,由这些基因和开放阅读框架编码的蛋白很可能与亚基的色基化有关。

4 小结藻胆蛋白的合成调节

总之,藻胆蛋白合成的调节是一个复杂的调控体系,是自身基因组和周围环境因子相互作用的结果。藻胆蛋白是由脱辅基蛋白和色基共价交联而成的,这两者的合成分别受到分子水平上相关的调控基因的调节,如上面所描述的与脱辅基蛋白合成有关的操纵子和调控基因的调节,与色基合成相关的酶系统的调节,还有参与色基连接到蛋白上的色基裂合酶的基因调节。Toole 和 Plank 等人发现蓝藻中,如果藻胆蛋白亚基上与色基连接的位点发生突变(通常是 *cpcBA* 操纵子中的编码 Cys 的密码子变为 Ala 的密码子),色基就无法与藻胆蛋白亚基连接, α 和 β 亚基无法组装为异二聚体,所以色基和脱辅基蛋白的结合可能促进亚基的折叠和稳固异二聚体内相邻亚基区域的连接,从而有利于两个亚基之间的相互作用^[8]。

另外,藻胆蛋白的合成还受各种环境因素的影响,其中光因子对藻胆蛋白合成的影响研究起步较早,而且比较深入。Bryant 和 Conley 在 1986 年的研究中表明,红光诱导的 PC 基因的转录特性和表达产物的氨基酸序列和细胞内的组成性表达的 PC 基因产物有着很大的不同。用利福霉素(转录抑制剂)进行的实验表明,光质主要在转录水平调节蛋白合成,也有可能是在转录后和翻译后环节调节藻胆蛋白水平。藻胆蛋白光调节的引发事件可能与光接受器有关。Schöfer 在 1986 年提出,PE 和 PC 合成的光诱导可以相互逆转,而触发这一现象的光受体可能也是一种藻胆蛋白,现在已知是 APC,它可为 650 ~ 660 nm 的红光和 540 ~ 550 nm 的绿光所逆转。可见藻类的光调节藻胆蛋白系统与高等植物的光敏色素作用系统十分相似,这在植物系统进化上具有重要的意义^[4]。除光质外,高浓度的 CO₂、较高温度、低光强、高 PSII/PSI 比率以及丰富的氮素、硫素和其它营养元素也有利于细胞内藻胆蛋白的合成和积累。

参考文献

- 1 王广策、曾呈奎。藻胆蛋白功能的研究,生命科学,1998,10(6):312~315
- 2 王广策。藻胆蛋白研究概况。见:范晓、张士瑾等编著。海洋生物技术新进展。北京:海洋出版社,1999。196~221
- 3 王广策、邓田、曾呈奎。藻胆蛋白的研究(I),海洋科学,2000,24(2):22~25
- 4 王广策、邓田、曾呈奎。藻胆蛋白的研究(II),海洋科学,2000,24(3):19~22
- 5 Schwaz R., and Grossman A. R. . A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions, *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95: 11 008 ~ 11 013
- 6 Nadia Dolganov and Grossman A. R. . A Polypeptide with Similarity to Phycocyanin Subunit Phycocyanobilin Lyase Involved in Degradation of Phycobilisomes, *Journal of Bacteriology*, 1999. 181(2): 610 ~ 617
- 7 Schluchter W. M. and Glazer A. N. . Characterization of Cyanobacterial Biliverdin Reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(21): 13 562 ~ 13 569
- 8 Toole .C. M., Plank . T. L., Grossman . A. R., et al. . Bilin deletions and subunit stability in cyanobacterial light harvesting proteins, *Molecular Microbiology*, 1998, 30(3): 475 ~ 486 (本文编辑:张培新)