

甲醇为探针研究活性光系统 II 次级电子给体 Tyr_Z 与底物水分子作用机制

鲍涵, 张纯喜*, 任亚男, 赵井泉

中国科学院化学研究所分子科学中心光化学实验室, 北京 100190

* 联系人, E-mail: chunxizhang@iccas.ac.cn

2009-04-01 收稿, 2009-10-22 接受

中国科学院和国家自然科学基金资助项目(批准号: 20403024, 30570423, 20973186)

摘要 光系统 II (PS II) 次级电子给体 Tyr_Z 担负调控原初电荷分离和水的催化氧化功能. 目前有两类 Tyr_Z 调控机理模型被提出: 一类是 Tyr_Z 通过与底物水分子直接作用调控水氧化; 另一类是 Tyr_Z 处于疏水环境中, 不与底物水分子直接作用, 而是借助与 His190 之间氢键强度的变化调控水氧化. 本文利用低温电子顺磁共振技术研究与水分子类似的甲醇分子对活性 PS II 中 Tyr_Z 氧化还原特性的影响, 发现当 Mn 簇处于 S₂ 和 S₀ 态时, 甲醇分子的存在能够明显促进 Tyr_Z 的低温氧化和 Tyr_Z[•] 的低温还原. 理论计算显示: (1) 当甲醇分子与 Tyr 直接作用时会导致 Tyr 氧化变难; (2) 伴随环境极性降低, Tyr 的氧化变得容易. 综合这些结果, 我们推测在活性 PS II 中甲醇分子不与 Tyr_Z 直接作用, 甲醇对 Tyr_Z 的低温氧化及 Tyr_Z[•] 的低温还原的促进作用可能是由于甲醇分子替换 PS II 内部的水分子, 降低了 Tyr_Z-His190 周围环境的极性, 使 Tyr_Z 与 His190 之间的氢键强度增加所致. 鉴于甲醇分子与水的类似性, 以上结果支持我们最近提出的活性 PS II 中 Tyr_Z 不与水分子直接作用的观点.

关键词

光系统 II
次级电子给体 Tyr_Z
甲醇分子
底物水
电子顺磁共振

光系统 II (PS II) 是自然界唯一能利用光能将水氧化的生物体系^[1,2]. PS II 反应中心在光激发下发生原初电荷分离, 产生高氧化性的 P₆₈₀⁺⁺^[3,4]. P₆₈₀⁺⁺ 推动水在 Mn 簇上的催化氧化. 水的氧化涉及 Mn 簇的 5 种状态^[5,6], 即 S_n (n = 0~4), 其中, S₀ 态是起始态, S₁ 态是黑暗稳定态, S₂ 和 S₃ 态是高氧化态.

次级电子给体 D₁-Tyr161(Tyr_Z) 位于 Mn 簇和 P₆₈₀ 之间, 它与 D₁-His190 形成氢键. Tyr_Z 被 P₆₈₀⁺⁺ 氧化后将质子传递给 His190, 自身形成 Tyr_Z[•] 中性自由基^[7]. Tyr_Z[•] 进而调控水在 Mn 簇上的催化氧化. 长期以来, 对 Tyr_Z 的特性及其调控机制的研究一直是 PS II 研究的热点和难点^[7]. 由于在具有放氧活性的 PS II 样品中, Tyr_Z[•] 的寿命短且缺乏特征的光谱特性, 所以

前人普遍使用 Mn 簇部分或全部缺失无放氧活性的 PS II 样品研究 Tyr_Z, 并在此基础上提出 Tyr_Z 通过与底物水分子直接相互作用来调控水氧化的机理^[7,8]. 2003 年以来, 人们利用电子顺磁共振(EPR)在液氮温度下从活性 PS II 样品中观测到 Tyr_Z 的氧化和 Tyr_Z[•] 的还原^[9~11]. 这一发现为在活性 PS II 样品中直接研究 Tyr_Z[•] 提供了可能. 我们利用这一方法并结合酸碱滴定, 在活性 PS II 样品中观察到 Tyr_Z 的低温氧化和 Tyr_Z[•] 的低温还原均不受环境介质的酸度影响^[12]. 最近, 我们提出了 Tyr_Z 调控水氧化的新模型^[13], 该模型预测 Tyr_Z 不与水分子直接作用, 而是通过改变与 His190 之间的氢键强度来调控水氧化, 并推测在 S₀ 态和 S₁ 态时 Tyr_Z 与 His190 之间存在强氢键, 而在 S₂

英文版见: Bao H, Zhang C X, Ren Y N, et al. Methanol as a probe to investigate the relationship between the secondary electron donor Tyr_Z and the substrate water molecules in active photosystem II. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-0047-0

态和 S₃ 态时这个氢键的强度会减弱^[13].

最近, 几个研究小组报道了 PS II 的晶体结构^[14-16], 但由于分辨率低和 X 射线对 Mn 簇及其环境的破坏^[17], 目前人们尚无法辨别底物水分子的结合位置. 此外, 鉴于与 PS II 类似的紫细菌反应中心^[18]和光系统 I^[19]的蛋白内部均存在大量处于结合状态的水分子, 人们推测 PS II 内部也会存在大量的非底物水分子^[20], 这些非底物水分子不仅参与维持蛋白结构, 而且可通过参与底物(H₂O)和产物(O₂, H⁺)的运输等影响水的催化氧化^[21]. 底物水分子和非底物水分子的共同存在, 导致一般情况下无法通过改变水的含量直接获得底物水与 Tyr_Z 作用的信息. 考虑到甲醇分子与水分子的体积、极性以及与金属离子的配位能力均相近, 人们常通过引入甲醇分子来间接研究底物水的作用^[22,23]. 最近, 有人依据晶体结构数据提出甲醇分子有可能进入蛋白内部并与 Tyr_Z 直接相互作用, 并推测水分子与甲醇分子一样也能够与 Tyr_Z 直接作用^[21]. 但目前, 还没有直接的实验数据表明活性 PS II 中甲醇分子与 Tyr_Z 能否直接作用.

本文以甲醇作为探针, 利用此前发展的在活性 PS II 中研究 Tyr_Z 的方法^[9-11]探测甲醇存在下 Tyr_Z 低温氧化和 Tyr_Z[•]低温还原的特性, 并结合理论计算研究 Tyr_Z 与水分子的作用方式以探讨前人^[8,20,21,24]和我们^[13]所提出的 Tyr_Z 调控水氧化模型的合理性.

1 实验

菠菜 PS II 放氧颗粒样品的制备参见文献[25]. 最终样品溶于含 400 mmol/L 蔗糖, 15 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L MES (2-(N-吗啉)乙磺酸), pH = 6.5 的缓冲液中, 并置于 -80°C 下冷冻保存. 所得样品的放氧活性经 Clark 型氧电极测定为 600~800 μmol O₂ (mg Chl)⁻¹·h⁻¹.

S₁ 态 PS II 样品的制备参照文献[26]; S₀ 态 PS II 样品的制备参照文献[9]中羟胺还原方法, 按羟胺/PS II = 5:1(摩尔比)的比例处理 S₁ 态 PS II 获得, 样品中含 1 mmol/L PPBQ(苯基对苯醌)和 6%(体积比)甲醇; S₂ 态 PS II 样品的制备参照文献[26], 将含 1 mmol/L DQ(四甲基对苯醌)的 S₁ 态 PS II 样品于 200 K 用可见光照射 10 min 后迅速转移到 0 °C 暗适应 30s, 最后快速依次冷冻至 200 K 和 77 K. 这些 PS II 样品均避光保存在 77 K.

EPR 谱和有关动力学数据在配有 Oxford ESR

900 液氮杜瓦和 ITC-503 温度控制器的 Bruker E500 电子顺磁共振仪上采集, 并选用高灵敏度谐振腔(型号: 4122SHQE)进行测试. EPR 样品均在 200 K 用氮气置换去除氧气. 10 K 下 PS II 中电子转移中间体的原位可见光诱导实验依照文献[25,26]进行. 具体 EPR 测试条件见图注.

理论计算参照文献[12], 采用 Gaussian 2003 程序的密度泛函中的 B3LYP/6-31G(D)基组对模型进行构型优化, 并将所得构型用于溶剂效应的计算, 溶剂效应计算采用 Onsager 模型(SCRF=Dipole).

2 结果与讨论

前人研究显示, Tyr_Z 的特性强烈依赖于 PS II 给体侧 Mn 簇的状态^[7], 为研究 Tyr_Z 在活性 PS II 中的调控机制, 必须保证 Mn 簇结构的完整性. 检验 Mn 簇完整性最有效的方法是用 EPR 探测 S₂ 态 Mn 簇产生的 g = 2.0(16 重峰)和 g = 4.1 信号以及体系中游离的 Mn²⁺ 的 6 重峰信号^[27]. 如果给体侧 Mn 簇发生破坏, 就难以产生 S₂ 态 Mn 簇的特征信号, 并会导致 Mn²⁺ 的形成^[27]. 在我们的样品中可以看到清晰的 S₂ 态 Mn 簇的特征 EPR 信号, 但未观察到任何 Mn²⁺ 的 6 重峰信号(图 1), 这充分说明样品中 Mn 簇保持完好.

甲醇对 PS II 放氧活性的影响如图 2 所示. 没有甲醇时, 样品的放氧活性为 600~800 μmol O₂ (mg Chl)⁻¹·h⁻¹, 这一活性明显高于早期研究报道的同类样品的放氧活性(300~500 μmol O₂ (mg Chl)⁻¹·h⁻¹)^[28]. 当体系中含有少量甲醇时(低于 10%), PS II 的放氧活性不但没有受到抑制, 而且还略有上升; 当甲醇含量超过 10%, PS II 的放氧活性明显下降. 值得注意的

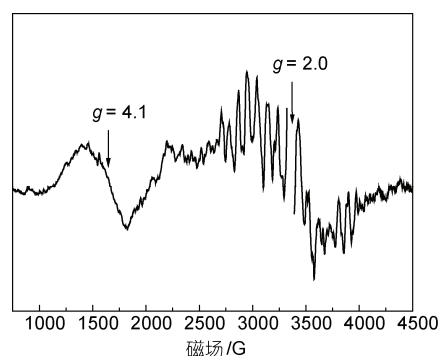


图 1 S₂ 态 Mn 簇的 EPR 信号

EPR 条件: 温度, 10 K; 微波频率, 9.38 GHz; 微波功率, 101 mW; 调制频率, 100 kHz; 调制幅度, 18 G

是,当甲醇浓度为6%时,PS II的放氧活性达到最大值.所以,以下实验中我们均选择这一浓度(6%)来研究甲醇效应.

前人研究发现,少量甲醇(1%~5%)存在能够对Mn簇的EPR信号产生明显影响^[22,23],但目前尚不清楚甲醇是否对Tyr_Z氧化-还原特性产生影响.为此,我们研究了6%甲醇存在时S₀态和S₂态PS II样品中Tyr_Z低温氧化产生的S₀Tyr_Z[•]和S₂Tyr_Z[•]EPR信号^[10,11,29]及其衰减动力学.此前,人们已经在不含甲醇的活性样品中观测到了低温诱导产生的S₀Tyr_Z[•]信号,并发现其半衰期为180~200 s^[10,11],而在相同条件下却没有在S₂态的PS II中观测到S₂Tyr_Z[•]信号^[10].

如图3所示,S₀态PS II样品经低温(10 K)照光诱导后产生了一个宽度约为230 G的对称信号(峰位置, $g = 2.07$; 谷位置, $g = 1.93$),该信号与此前^[9]报道的S₀Tyr_Z[•]信号一致.该信号的出现说明,甲醇存在时Tyr_Z在液氮温度下也可以发生氧化.我们对该信号的动力学进行了研究,结果显示其半衰期约为56 s(见图3插图),比文献中报道的没有甲醇存在时观测到的S₀Tyr_Z[•]信号的衰减速度^[10,11]快了近4倍.由此可见,甲醇的存在促进了S₀态样品中Tyr_Z[•]的低温还原.

前人研究^[10]显示,当没有甲醇时,S₂态PS II样品中的Tyr_Z在低温(10 K)下不发生氧化,其氧化只发生在较高温度下(77~190 K),其寿命约为240 s^[29].图4显示的是含有甲醇的PS II样品经10 K光诱导产生的EPR信号.它包含一宽度为160 G的(峰位置, $g = 2.05$; 谷位置, $g = 1.95$)对称信号和若干弱的多重峰信号.该信号与在高温下观测到的S₂Tyr_Z[•]EPR信号一致^[29].这说明甲醇的加入使Tyr_Z低温氧化由不发

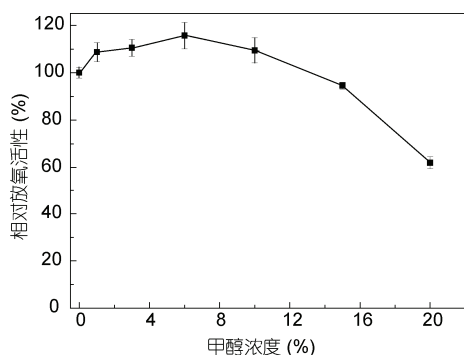


图2 甲醇浓度对PS II放氧活性的影响

数据点为三次平行实验测定结果平均,并以不含甲醇时的活性定义为100%归一获得,误差是三次平行测试的标准方差

生变为可以发生.很显然,甲醇的存在促进了S₂态Tyr_Z的低温氧化.进一步研究该信号的衰减动力学(对应于Tyr_Z[•]的还原),我们发现S₂Tyr_Z[•]EPR信号在黑暗中的衰减速率的半衰期约为80 s(如图4插图).这一寿命比无甲醇存在时S₂Tyr_Z[•]EPR信号在液氮温度下的半衰期(约240 s)^[29]明显缩短.由此可见,甲醇的存在不仅促进了S₂态Tyr_Z的低温氧化,而且也加快了Tyr_Z[•]的低温还原.

由以上可知,甲醇的存在能够明显促进S₂和S₀态样品中Tyr_Z的低温氧化和Tyr_Z[•]的低温还原.为探讨甲醇分子对Tyr_Z的低温氧化-还原的影响机制,我们借助密度泛函方法对Tyr_Z-His190体系进行了理论研究.

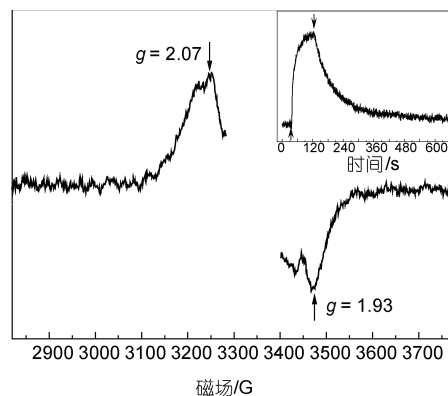


图3 含6%甲醇的S₀态PS II样品经10 K光诱导产生的S₀Tyr_Z[•]EPR信号及其衰减过程

插图是S₀Tyr_Z[•]EPR信号的衰减动力学曲线,跟踪的位置是3240 G($g = 2.07$),插图中的“↑”和“↓”分别表示光源的打开和关闭.EPR条件:微波功率,1 mW;其他条件与图1相同

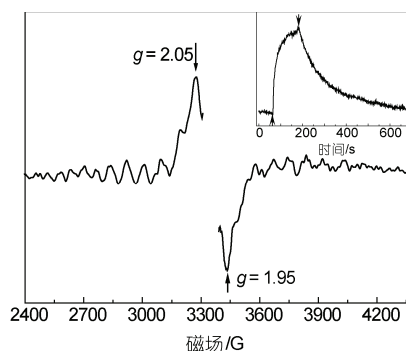


图4 含6%甲醇的S₂态PS II样品经10 K光诱导产生的S₂Tyr_Z[•]EPR信号及其衰减过程

插图是S₂Tyr_Z[•]EPR信号的衰减动力学曲线,跟踪的位置是3270 G($g = 2.05$),插图中的“↑”和“↓”分别表示光源的打开和关闭.EPR条件与图1相同

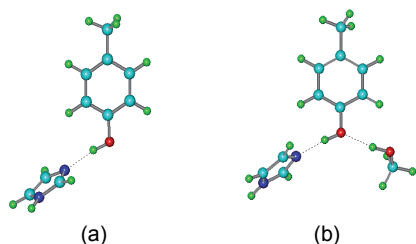


图5 His-Tyr(a)和 His-Tyr-CH₃OH(b)的理论计算模型

图5是计算模型,其中对甲基苯酚和咪唑环分别用来模拟 Tyr_Z和 His190. 计算结果显示,当甲醇分子与甲基苯酚直接以氢键作用时,体系的最高占有轨道(HOMO)的能级比无甲醇时明显下降(下降 0.2759 eV). 这说明甲醇分子与 Tyr 直接作用会使 Tyr 的氧化变得困难,这与我们实验观测到的甲醇分子促进 Tyr_Z 低温氧化的结果明显矛盾. 这里需要指出的是 Ho 和 Styring^[21]提出的 Tyr_Z直接与甲醇作用的观点的依据是 X 衍射晶体结构数据,但最近扩展 X 射线吸收精细结构(EXAFS)研究显示, X 射线对 Mn 簇及其蛋白环境(包括 Tyr_Z)具有显著的破坏作用,导致 X 射线结构数据无法反映活性样品的真实结构^[17]. 依据我们的实验和理论计算结果,我们推测 Tyr_Z 不太可能与甲醇分子直接相互作用.

由于甲醇和水的介电常数分别为 32.63 和 78.39,如果甲醇分子替换部分蛋白内部的水分子,必然导致蛋白内部的极性降低. 为此,我们进一步研究环境极性(对应于理论计算的不同介电常数)对 Tyr-His 体系中 Tyr 的 HOMO 轨道能级的影响(见图 6). 从图 6 可以看出,随环境极性的降低(对应介电常数降低),Tyr 的 HOMO 轨道能级升高,从而导致 Tyr 的氧化变得容易,这一趋势与我们的实验观测相一致.

一般情况下,伴随环境极性的降低,氢键的强度

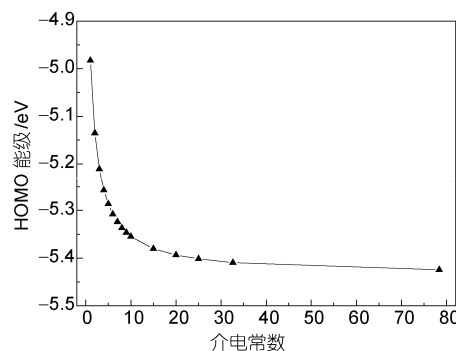


图6 Tyr-His 模型的 HOMO 能量对环境介电常数的依赖性

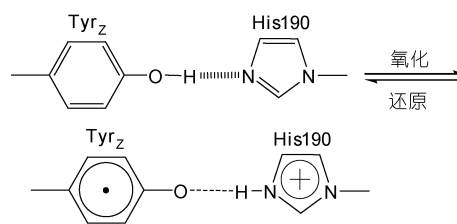


图7 Tyr_Z 的氧化和还原示意图

就会增强^[30]. 由于 Tyr_Z 的氧化和 Tyr_Z[•] 的还原均伴随质子在氢键中的转移(如图 7 所示)^[7], Tyr_Z 和 His190 之间氢键强度的增强必然会促进 Tyr_Z 的氧化和 Tyr_Z[•] 的还原.

综上所述,实验观察到的甲醇对 S₂ 和 S₀ 态 Tyr_Z 低温氧化和 Tyr_Z[•] 低温还原的促进作用可能是甲醇分子替换了 PS II 内部的水分子,导致 Tyr_Z-His190 微环境的极性降低,使它们之间的氢键增强所致;而不太可能是由于甲醇分子与 Tyr_Z 直接作用所形成的. 鉴于甲醇和水分子的相似性,我们认为这些结果不支持前人提出的 Tyr_Z 与甲醇或水直接作用的观点^[8,20,21,24],而符合我们最近提出的 Tyr_Z 只与 His190 作用而不与底物水分子作用的调控模型^[13].

致谢 感谢公行道教授和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在科研仪器方面提供的支持.

参考文献

- McEvoy J P, Brudvig G W. Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chem Rev*, 2006, 106: 4455—4483
- Barber J. Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 185—196
- Renger G, Holzwarth A R. Primary electron transfer. In: Wydrzynski T J, Satoh K, eds. *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*. Netherlands: Springer Publisher, 2005. 139—175
- Rappaport F, Diner B A. Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in photosystem II. *Coor Chem Rev*, 2008, 252: 259—272
- Dau H, Haumann M. The manganese complex of photosystem II in its reaction cycle—basic framework and possible realization at the

- atomic level. *Coor Chem Rev*, 2008, 252: 273—295
- 6 Sauer K, Yano J, Yachandra V K. X-ray spectroscopy of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Coor Chem Rev*, 2008, 252: 318—335
 - 7 Diner B A, Britt R D. The redox-active tyrosines Y_Z and Y_D. In: Wydrzynski T J, Satoh K, eds. *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*. Netherlands: Springer Publisher, 2005. 207—233
 - 8 Hoganson C W, Babcock G T. A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science*, 1997, 277: 1953—1956
 - 9 Nugent J H A, Muhiuddin I P, Evans M C W. Effect of hydroxylamine on photosystem II: Reinvestigation of electron paramagnetic resonance characteristics reveals possible S state intermediates. *Biochemistry*, 2003, 42: 5500—5507
 - 10 Zhang C, Styring S. Formation of split electron paramagnetic resonance signals in photosystem II suggests that tyrosine_Z can be photooxidized at 5 K in the S₀ and S₁ states of the oxygen-evolving complex. *Biochemistry*, 2003, 42: 8066—8076
 - 11 Zhang C, Boussac A, Rutherford A W. Low-temperature electron transfer in photosystem II: A tyrosyl radical and semiquinone charge pair. *Biochemistry*, 2004, 43: 13787—13795
 - 12 Zhang C. Interaction between tyrosine_Z and substrate water in active photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757: 781—786
 - 13 Zhang C. Low-barrier hydrogen bond plays key role in active photosystem II – a new model for photosynthetic water oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767: 493—499
 - 14 Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, et al. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Struct Mol Biol*, 2009, 16: 334—342
 - 15 Ferreira K N, Iverson T M, Maghlaoui K, et al. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 2004, 303: 1831—1838
 - 16 Kamiya N, Shen J R. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 98—103
 - 17 Yano J, Kern J, Irrgang K D, et al. X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102: 12047—12052
 - 18 Stowell M H B, McPhillips T M, Rees D C, et al. Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: Implications for mechanism of electron-proton transfer. *Science*, 1997, 276: 812—816
 - 19 Jordan P, Fromme P, Witt H T, et al. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution. *Nature*, 2001, 411: 909—917
 - 20 Sproviero E M, Gascon J A, McEvoy J P, et al. Quantum mechanics/molecular mechanics structural models of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 1—8
 - 21 Ho F M, Styring S. Access channels and methanol binding site to the CaMn₄ cluster in photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777: 140—153
 - 22 Åhrling K A, Evans M C W, Nugent J H A, et al. The two forms of the S₂ state multiline signal in photosystem II: Effect of methanol and ethanol. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1656: 66—77
 - 23 Force D A, Randall D W, Lorigan G A, et al. ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of photosystem II. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 13321—13333
 - 24 Rutherford A W, Boussac A. Water photolysis in biology. *Science*, 2004, 303: 1782—1784
 - 25 Bao H, Zhang C, Kawakami K, et al. Acceptor side effects on the electron transfer at cryogenic temperatures in intact photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777: 1109—1115
 - 26 Ren Y, Zhang C, Bao H, et al. Probing tyrosine Z oxidation in photosystem II core complex isolated from spinach by EPR at liquid helium temperatures. *Photosyn Res*, 2009, 99: 127—138
 - 27 Miller A F, Brudvig G W. A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of photosystem II membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1056: 1—18
 - 28 Berthold D A, Babcock G T, Yocum C F. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett*, 1981, 134: 231—234
 - 29 Ioannidis N, Zahariou G, Petrouleas V. Trapping of the S₂ to S₃ state intermediate of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biochemistry*, 2006, 45: 6252—6259
 - 30 Cleland W W, Frey P A, Gerlt J A. The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. *J Biol Chem*, 1998, 273: 25529—25532