



蓝藻藻胆体的体外组装研究进展

马建飞^{①②}, 林瀚智^{③*}, 秦松^{①*}

中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003;

中国科学院大学, 北京 100049;

Environmental Biophysics and Molecular Ecology Program, Department of Marine and Coastal Sciences, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08901, USA

* 联系人, E-mails: lin@marine.rutgers.edu; sqin@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-02-06; 接受日期: 2016-04-12; 网络版发表日期: 2016-09-13

国家高技术研究发展计划(批准号: 2014AA093505)、国家自然科学基金(批准号: 41276164)、中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDA11020403)和国家海洋局海洋公益性行业项目(批准号: 201205027-2)资助

摘要 光合作用的第一步是高效地捕获和传递光能. 藻胆体位于蓝藻和红藻细胞的类囊体膜外朝向基质一侧, 结构上主要由藻胆蛋白和连接蛋白构成, 且功能上以不低于98%的效率捕获和传递光能至PS II. 3种类型的藻胆蛋白单体的结构类似, 由于含有不同数目和种类的色素分子以及藻胆蛋白结构的细微差别导致光能最大吸收波长不同. 藻胆蛋白以不同寡聚形式, 加上连接蛋白的作用, 依靠氢键和极性相互作用, 自发组装为高度有序的完整藻胆体结构. 科学家尝试体外合成和组装藻胆体, 但目前只达到三聚体形式, 六聚体及更高级组装远未解决. 本文主要从生物组合合成的角度, 综述了体外从头合成和组装完整藻胆体的历程和进展, 并展望了迄今完成的最高级别的重组别藻蓝蛋白三聚体的应用.

关键词 捕光复合物, 藻胆体, 组合生物合成, rAPC, 体外组装

光合作用从光能高效捕获开始, 再传递给其特定的结构——反应中心, 在其中进行电荷分离, 从而组成了光反应的3个步骤. 光化学反应有两个基本的原则, 一就是用于化学反应的这部分光要被吸收, 第二就是每次每个光子影响一个分子(Stark-Einstein law)^[1]. 为了有效地捕获光能, 有氧光合生物进化出不同形式的捕光复合物(light harvesting complex antennas), 这些捕光复合物由各种光合色素通过共价或分子间弱相互作用的形式与蛋白质骨架组织起来. 光合作用色素大体包括四类, 一类是开链的吡咯环,

如藻胆色素; 另三类是闭合的吡咯环结构及其衍生物, 包括叶绿素c, 叶绿素a和b, 以及胡萝卜素. 这类捕光复合物镶嵌在类囊体膜上, 在二维空间上限制了每个复合物的大小, 因此多以多低聚物的形态存在(如高等植物的光系统和的捕光复合物)^[2,3], 另一类型为非膜内周的捕光蛋白复合物, 为主要存在于蓝藻、红藻中的藻胆体(phycobilisome)^[4].

1 天然藻胆体的结构研究进展和困难

藻胆体是由藻胆蛋白(phycobiliprotein)和起到连

引用格式: 马建飞, 林瀚智, 秦松. 蓝藻藻胆体的体外组装研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1054-1061

Ma J F, Lin H Z, Qin S. Advances in Cyanobacterial phycobilisome assembling *in vitro*. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1054-1061, doi: 10.1360/N052016-00067

接作用的连接多肽(linker)组成. 与高等植物捕光色素复合物不同, 藻胆体主要吸收可见光在黄绿光区的光源来驱动光合作用^[5], 并且藻胆体通过利用在不同结构单元上组成型或者异构变化(补色机制(complementary chromatic mechanism, CCM^[6]))实现了非常宽并且可以随外界光环境快速发生变化的吸收光谱. 所有的藻胆体都是由两个亚基(α 和 β)组成的异二聚体为基本的建构单元, 称之为单体(monomer). 单体接着通过一系列的自组装过程形成三聚体盘状结构($\alpha\beta$)₃, 这个三聚体直径大约在 11 nm, 内部有一些直径在 1.5~5 nm 之间的孔穴, 厚度约为 3 nm; 三聚体接着形成六聚体($\alpha\beta$)₆. 双圆盘结构, 最后形成藻胆体的两个主要的亚结构单元, 核(core)和杆(rod). 这两类亚结构单元形成方向不同的垛堞式的排列. 一个藻胆体的分子量至少在 7200 kD 左右(取三核六杆的藻胆体为例)^[7], 如果考虑到杆的数量、长度随环境光质变化(前述 CCM 机制)以及连接多肽的分子量, 计算结果还要更高, 因此, 从研究对象的分子量以及空间大小出发, 相较结构生物学研究中 X 射线晶体学和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术, 透射电子显微镜技术更适宜作为观察其整体结构特征的有力工具^[8-10]. 最常见的藻胆体结构是广泛存在于淡水和海洋蓝藻以及部分红藻里的半圆盘形的三核六杆的结构. 其他半圆盘状的藻胆体还有二核或者五核的结构, 同时结合不同数量的杆. 除半圆盘外, 还包括块状(仅在海洋大型红藻发现)、束状(原始蓝藻)、半椭球状以及杆状的藻胆体结构(图 1 和表 1). 但由于藻胆体在透射电镜观察制样时容易在气-液界面形成优势取向, 目前是透射电子显微镜技术对藻胆体进行三维重构以期获得高分辨率结果过程中亟待解决的一个瓶颈问题^[7].

2 三聚体的研究背景

重组藻胆体基本组成单元藻胆蛋白的第一步是色基的合成. 例如, 应用最为成熟的藻蓝胆素(phycobilin, PCB)合成途径: 因为大肠杆菌(*Escherichia coli*)体内存在血红素(Heme)这一合成 PCB 的前体, 因此通过基因重组的方式, 使 Heme 氧化酶 *Hol*^[18]和依赖铁氧还蛋白的 PCB 氧化还原酶 *pcyA*^[19]这两个酶的编码基因在 *E. coli* 内表达, 就能大量生物组合合成色基 PCB. 而其他 3 种色基

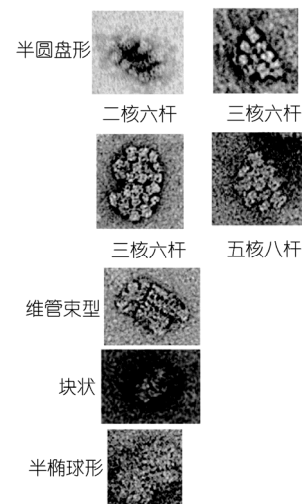


图 1 透射电子显微镜下负染藻胆体的二维结构^[7]

表 1 已知藻胆体类型

藻胆体类型	代表物种	参考文献
半圆盘形		
三核六杆	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	[11]
三核六杆	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	未发表资料
二核六杆	<i>Synechococcus</i> 6301	[12]
五核八杆	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	[13]
维管束型	<i>Gloeobacter violaceus</i>	[14]
块状	<i>Griffithsia pacifica</i>	[15]
半椭球形	<i>Porphyridium cruentum</i>	[16]
杆状	<i>Acaryochloris marina</i>	[17]

藻红胆素(phycoerythrin, PEB)^[20], 藻尿胆素(phycourobilin, PUB)和藻紫胆素(phycoviolobin, PVB)的合成途径, 以及在裂合酶作用下的四者的相互转化途径^[21]也已经被解析出来.

第二步则是脱辅基藻胆蛋白和连接蛋白的合成. 脱辅基藻蓝蛋白 *cpcAB*, 别藻蓝蛋白 *apcAB*, 藻红蛋白 *cpeAB* 或藻红蓝蛋白 *pecAB* 等编码基因表达别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)、藻蓝蛋白(phyocyanin, PC)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)的 α 和 β 亚基. 根据化学计量学的证据, 每个藻胆蛋白六聚物需要一个连接蛋白维持高级结构^[22], 介导藻胆蛋白高级有序地排列为藻胆体, 以及维持藻胆体和类囊体膜之间的相互作用; 据此猜测, 4 种连接蛋白的部分编码基因表达并参与到完整藻胆体的体外高级组装过程.

第三步是色基以自发或是在不同裂合酶的催化作用下, 以共价(或非共价)方式结合不同脱辅基藻胆蛋

白的不同位点, 形成完整藻胆蛋白. 没有藻红蛋白的蓝藻中, 三类裂合酶存在下, 足够完成色素结合到脱辅基藻胆蛋白的不同位点: 除了 APC α 的 Cys⁸⁴ 位点结合 PCB 是自催化催化的; *cpcE/F* 类裂合酶催化 PCB 结合 PC α 的 Cys⁸⁴ 位点, *cpcT* 类裂合酶催化 PCB 结合 PC β 的 Cys¹⁵³ 位点, 剩余两个位点 PC β 的 Cys⁸⁴, APC β 的 Cys⁸⁴ 结合 PCB 由 *cpcU/S* 类裂合酶催化完成.

直至 2013 年 *cpcT* 结晶研究工作之前^[23], 没有结构生物学的结构可以用于上述三类裂合酶功能验证; 该前提下通过比较基因组学找新基因, 再由组合生物合成和生化方式验证基因功能成为了最有效的手段. 受研究方法的限制, 蓝藻藻胆体的体外高级组装停留在距今 5~10 年的三聚体的阶段^[24], 至今都未有突破性的进展.

最早通过基因重组, 进行藻胆蛋白体外组装研究的, 是 holo-PEC α 亚基. 2000 年, 赵开弘课题组^[25]在 *Mastigocladus luminous* 的藻红蓝蛋白 (phycoerythrocyanin, PEC) 操纵元上发现的 *pecE/F* 基因共同催化 PCB 结合 *pecA* (同时首次发现该类裂合酶异构 PCB 为 PVB 的活性). 之后比较了裂合酶催化与自发结合形成 holo-PEC α 亚基的光活性的差异^[26], 以光谱证据证实 *pecE/F* 的裂合酶活性. 2002 年, 美国加州大学 Glazer 研究组^[27]表达了不带标签的 holo-PEC α 亚基, 比较证明赵开弘课题组上述带有 His₆ 标签的 holo-PEC α 亚基, 同 *PecE/F* 形成三元复合物这一反应机制.

holo-PEC β 亚基 Cys⁸⁴ 位点结合 PCB, 2007 年, 赵开弘教授课题组^[28]发现其被裂合酶 *cpeS1* 催化, 而且除 APC α 亚基和核膜连接蛋白 L_{CM} 等两个自催化之外, *cpeS1* 能催化其他所有脱辅基藻胆蛋白.

在藻红蛋白方面, 针对脱辅基 PE α 和 β 亚基结合 PEB 的研究还只是处于初步阶段^[29,30], 色素 PUB 或 PVB 与脱辅基蛋白如何结合的研究还没有进展.

结合 PCB 的 holo-PC α 亚基, 是 Glazer 研究组^[31]在 *E. coli* 体内通过 PAT 和 PCB 两个载体, 成功表达了包含 *cpcE/F* 裂合酶在内的 5 个基因, 并通过 His₆ 标签纯化得到的. 随后国内有研究团队对该蛋白表达进行改进, 例如, 赵开弘课题组^[32]2006 年将 5 个基因分别构建于 3 个载体, 表达的该蛋白由荧光光谱验证了裂合酶 *cpcE/F* 不存在时仍有 0.2% 的 holo-PC α 生成, 侧面计算了 *cpcE/F* 催化 PCB 结合脱辅基蛋白的效率. 本课题组于 2007 年通过将 5 个基因构建于

一个载体上, 获得了稳定遗传的表达菌株体系^[33]; 于 2009 年通过 His₆ 和 MBP 双标签获得了高可溶和更高稳定的蛋白表达^[34], 利于后期工程实践应用.

在 Cys⁸⁴ 和 Cys¹⁵³ 位点结合两个色素的 holo-PC β 亚基至今未见成功. PC β 亚基最早是赵开弘课题组, 2006 年首次证明 *cpcT* 类裂合酶特异催化 *Synechococcus* sp. PCC 7002 的 PC β 亚基 Cys¹⁵³ 位点结合 PCB^[35], 以及甲酸特定位点裂解^[35]之后产生了两条大小分别为 3.5 和 18.3 kD 的多肽; *Anabaena* sp. PCC7120 的该 *cpcT* 催化 PC β 亚基 Cys¹⁵⁴ 位点结合 PCB; 2007 年发现更为一般的裂合酶 *cpeS2* 也能催化 Cys⁸⁴ 结合 PCB. 2008 年, 美国 Schluchter 课题组^[36]发现 *cpcM* 催化 PC β 亚基 Asn⁷² 位点的 γ -N-甲基化的翻译后修饰.

APC α 亚基结合 PCB 是自催化这一结论, 最早是台湾的 Ping-Chiang Lyu 课题组^[37]2006 年, 在 *cpcE/F* 裂合酶催化 PCB 结合生成 *Spirulina* sp. 的 holo-APC α 亚基, 与自催化效果一致得出的. 国内有研究团队研究过基因重组的技术改进, 逐渐获得了更稳定遗传和高效的 APC α 亚基的表达. 例如, 本课题组 2008 年使用 pCDFDuet 一个表达载体, 实现了大肠杆菌体内 *cpcE/F* 在内的 5 个基因的共表达, 获得了 1 g/L 的 holo-APC α 亚基, 应用于多基因共表达能高产、省时和大规模实现^[38]; 2009 年实现 His₆ 标签下蛋白纯化的步骤^[39], 探索了对羟基、氢过氧自由基的抗氧化及在药物中的应用.

holo-APC β 亚基只在 *cpcU/S* 裂合酶的催化下, Cys⁸⁴ 位点上结合一个 PCB 色素. 最早是本课题组 2009 年用 pCDFDuet 一个表达载体上的两个表达框, 实现了 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 *ho1*, *pcyA*, *Spirulina* sp. 的 *apcB*, *Anabaena* sp. PCC7120 的 *cpeS* 等 5 个基因的共表达, 降低了大规模培养时多载体共表达质粒不稳定性风险, His₆ 标签简化了蛋白纯化步骤^[40]. 蛋白只有在表达的基础上, 才能有后续的应用开发. 2013 年, 本课题组通过 2 个表达载体共转化 *E. coli* 获得了验证了嗜热蓝藻 *Synechococcus elongatus* 和嗜温蓝藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 holo-APC β 亚基, 比较了前者热稳定性显著高于后者, 差异缘于关键的几个氨基酸位点^[41], 待后续验证.

在以上 holo-APC α 和 β 都成功合成的背景基础上, 本课题组 2010 年在藻胆体体外高级组装方面首

表2 迄今体外合成藻胆蛋白的成功案例^{a)}

No.	基因	基因来源	裂合酶	裂合酶来源	文献
APC α					
1	<i>apcA</i>	<i>Spirulina</i> sp.	自催化	—	[37]
2	<i>apcA</i>	<i>Spirulina</i> sp.	<i>cpcE/F</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803	[38]
3	<i>apcA</i>	—	自催化	—	[46]
4	<i>apcA</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803	自催化	—	[39]
APC β					
5	<i>apcB</i>	<i>Spirulina</i> sp.	<i>cpeS</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	[40]
6	<i>apcB</i>	<i>T. enlongates</i> BP-1	<i>cpcU/S</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803	[41]
APC Trimer					
7	<i>apc AB Cys</i> ⁸⁴	—	<i>cpeS1</i>	<i>Anabaena</i> PCC7120	[47]
8	<i>apc</i> Trimer	—	—	—	[24]
CPC α					
9	<i>cpcA</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	—	—	[48]
10	<i>cpcA</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803	<i>cpcE/F</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803	[31]
11	<i>cpcA</i>	—	—	—	[32]
12	<i>cpcA</i>	—	—	—	[33]
13	<i>cpcA apcA apcD</i>	—	—	—	[36]
14	—	—	—	—	[34]
CPC β					
15	<i>cpcB Cys</i> ¹⁵³	—	<i>cpcT</i>	<i>S. sp.</i> PCC 7002	[35]
16	<i>cpcB Cys</i> ⁸⁴	—	<i>cpeS2</i>	<i>Nostoc</i> PCC 7120	[28]
17	<i>cpcB Cys</i> ¹⁵⁴	—	<i>cpcT</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	[47]
18	<i>cpcB apcB apcF</i>	—	<i>cpcM</i>	—	[36]
19	<i>cpcB</i>	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	<i>slr2049</i>	<i>S. sp.</i> PCC 6803	[49]
20	<i>cpeS</i>	<i>Spirulina platensis</i> (sp.)	<i>slr2049</i> <i>sll0583</i>	—	[50]
PEC α					
21	<i>pecA</i>	—	—	<i>Mastigocladus luminous</i>	[25]
22	<i>pecA</i>	—	<i>pecE/F</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i> (<i>Fischerella</i>)	[26]
23	<i>pecA</i>	—	<i>pecE/F</i>	—	[27]
PEC β					
24	<i>pecB Cys</i> ⁸⁴	—	<i>cpeS1</i>	<i>Anabaena</i> PCC7120	[28]
PE $\alpha\beta$					
25	<i>cpeAB</i>	<i>S. sp.</i> 6701	—	—	[30]
26	<i>cpeAB</i>	<i>Polisiphonia boldii</i>	—	—	[29]
L _{CM}					
27	<i>apcE</i>	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301	自催化	—	[45]

a) *S. sp.*为 *Synechocystis* sp.的缩写

次突破. 包含 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 3 个基因 *apcB*, *cpcS-1*, *cpcU* 的 pCDFDuet-1 载体, 与包含 *apcA*, *ho1*, *pcyA* 的 pRSFDuet-1 载体共表达, 之后成功得到了与天然 APC 三聚体相似的重组 APC 三聚体 (rAPC trimer)^[24].

连接蛋白同藻胆蛋白不一样的地方是, 除核膜连接蛋白 L_{CM} 需要结合 1 个色素 PCB、且具有自催化特性^[42]外, 核连接蛋白 L_C、核杆连接蛋白 L_{RC} 和杆连接蛋白 L_R 不需要裂合酶催化结合色素. 关于六聚

体的组装至今仍未成功: () 色素对于藻胆蛋白高级结构维持很重要的^[43], 而结合有双色素的 PC β 亚基未重组成功; () PC 三聚体组装为六聚体可能需要杆连接蛋白 L_R 的辅助, 而 L_R 的编码基因 *cpcC* 和 *cpcD* 没有重组成功, 也没有天然提取出来的与 PC 六聚体共同结晶的连接蛋白结构予以佐证; 已知唯一共同结晶的结构是天然提取的 APC 三聚体与核连接蛋白 L_C 的共晶体, 和其他重组连接蛋白结构(例如, 发生状态转换时, 与 PSI 接触的藻胆体的连接蛋白

AP-B 的晶体结构 $[(ApcD/ApcB)]_3(\alpha\beta)^{[44]}$). *Synechococcus* sp. PCC 6301 的 L_{CM}^{99} 的部分编码基因 *apcE* 已被重组出来^[45]; 若全长 L_{CM} 重组成功, 则对藻胆体的二圆柱、三圆柱或五圆柱核的组装及在类囊体膜的上的排布起推动作用(表 2).

3 重组别藻蓝蛋白三聚体的应用

重组别藻蓝蛋白三聚体的成功获得, 基础研究层面为体外重组完整藻胆体的远大前景踏出了第一步, 应用层面探讨了其(以及进而重组完整藻胆体)在粮食、能源与生物医药等领域的巨大潜力.

基础研究层面, 藻类体内的叶绿素结合蛋白合成途径与藻胆体合成途径的可能联系和干扰, 使得开展机制研究的单因素实验变得困难. 大肠杆菌 *E. coli* 作为原核模式生物, 生长迅速且外源基因在体内表达机制已成熟. 将蓝藻中的藻胆蛋白合成途径相关基因转化至大肠杆菌体内进行体外重组表达, 有助于阐明在藻类体内全合成藻胆蛋白的途径; 由于藻体长势慢、天然提取的藻胆蛋白产量不能满足工农医等产业需求; 因此通过生物组合合成技术, 获得结构功能与天然藻胆蛋白一致^[51]的重组藻胆蛋白.

应用层面, 粮食与能源方面, 蓝藻和红藻的藻胆体高效捕光和传能至光合反应中心, 功能和系统发育证据^[52]证明其为生物适应水下弱光环境所保留. 现代社会的能量产业正经历着第 3 次革命, 清洁高效的一次能源——太阳能的利用效率越来越受到重视, 人工模拟光合作用(artificial photosynthesis)的概念^[53]应运而生. 而粮食危机一直存在, 尤其是世界人口增长, 随之导致耕地面积缩小, 高原等未开垦的、光合效率较低的地区的利用被提上日程^[54]; 逐渐加重的水污染使得水底的光质变化, 从而导致潮间带等的栽培作物光合效率降低. 藻胆体可以吸收叶绿素所不能吸收的绿光, 拓宽了吸收光谱范围并增加了光能传递

效率, 从而提高了光合效率^[4]. 将藻胆体生物合成途径全部基因研究透彻后, 通过体外重组的方式获得表达该蛋白的植物, 栽培在缺乏红光而蓝绿光丰富的高原地区和污染严重的水域, 提高光合作用效率, 利国利民. 而且本课题组^[55]2013 年将重组别藻蓝蛋白三聚体应用作敏化剂, 组装后获得了具有较高的光电转换效率的染料敏化太阳能电池.

诊断试剂和医药层面, 重组别藻蓝蛋白三聚体等藻胆蛋白因为具有较大的荧光 Stokes 位移且产量高, 可用于开发更高特性的荧光探针, 用于特定疾病的产业化诊断^[56,57]. 本课题组^[58]2008 年总结过天然藻胆蛋白当时已被证实的以下 5 个方面药理活性: () 藻胆色素的清除自由基和抗氧化特性; () 藻胆蛋白抑制肿瘤细胞的抗癌活性和临床药用价值; () 藻胆蛋白的抗病毒活性; () 促进动物血细胞再生, 增强免疫系统; () 合适波长的光激发下产生单线态氧和其他的氧自由基, 以特异性杀伤肿瘤细胞的光致细胞毒效应.

4 结语

别藻蓝蛋白三聚体的体外组装的实现, 极大地推动了蓝藻藻胆体的体外组装研究的进程, 但之后数年间六聚体及体外高级组装为完整藻胆体的进展十分缓慢. 究其原因主要是基础理论还未取得突破, 包括连接蛋白结构还未解析, 致使对其在藻胆体高级组装中的作用了解匮乏, 以及藻胆体在体内的合成与精确调控的机理等还不明晰. 随着通过结构生物学手段对连接蛋白作用机制的深入研究, 加上组合生物合成技术对理论研究成果的技术支持, 使得体外组合合成功能藻胆体的高效生产技术成为可能.

蓝藻藻胆体的体外组装如果实现, 不仅在基础理论层面揭示了体内藻胆体合成与精确调控的机理, 同时可以应用在粮食、能源与生物医药等行业上, 可以预期, 将起到革命性的推动作用.

参考文献

- 1 Falkowski P, Raven J A. Aquatic Photosynthesis. 2nd ed. Princeton: Princeton University Press, 2007
- 2 Liu Z, Yan H, Wang K, et al. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. Nature, 2004, 428: 287–292
- 3 Qin X, Suga M, Kuang T, et al. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. Science, 2015, 348: 989–995

- 4 Glazer A N. Light harvesting by phycobilisomes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1985, 14: 47–77
- 5 Larkum A D. Light-harvesting systems in algae. In: Larkum A D, Douglas S, Raven J, eds. *Photosynthesis in Algae*. Berlin: Springer Netherlands, 2003. 277–304
- 6 Kehoe D M, Gutu A. Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 127–150
- 7 林瀚智. 藻胆体结构多样性研究及黄海绿潮早期形成过程分析. 博士学位论文. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012
- 8 Yi Z W, Huang H, Kuang T Y, et al., Three-dimensional architecture of phycobilisomes from *Nostoc flagelliforme* revealed by single particle electron microscopy. *Febs Lett*, 2005, 579: 3569–3573
- 9 Cheng Y, Grigorieff N, Penczek P A, et al. A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*, 2015, 161: 438–449
- 10 Chang L, Liu X, Li Y, et al. Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell Res*, 2015, 25: 726–737
- 11 Elmorjani K, Thomas J C, Sebban P. Phycobilisomes of wild-type and pigment mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch Microbiol*, 1986, 146: 186–191
- 12 Yamanaka G, Glazer A N. Dynamic aspects of phycobilisome structure—phycobilisome turnover during nitrogen starvation in *Synechococcus* Sp. *Arch Microbiol*, 1980, 124: 39–47
- 13 Glauser M, Bryant D A, Frank G, et al. Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* Sp. PCC-7120. *Eur J Biochem*, 1992, 205: 907–915
- 14 Guglielmi G, Cohenbazire G, Bryant D A. The structure of gloeobacter-violaceus and its phycobilisomes. *Arch Microbiol*, 1981, 129: 181–189
- 15 Gantt E, Lipschultz C A. Structure and phycobiliprotein composition of phycobilisomes from *Griffithsia pacifica* (Rhodophyceae). *J Phycol*, 1980, 16: 394–398
- 16 Gantt E, Lipschul C A. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. 1. isolation. *J Cell Biol*, 1972, 54: 313–324
- 17 Marquardt J, Senger H, Miyashita H, et al. Isolation and characterization of biliprotein aggregates from *Acaryochloris marina*, a *Prochloron*-like prokaryote containing mainly chlorophyll *d*. *FEBS Lett*, 1997, 410: 428–432
- 18 Gambetta G A, Lagarias J C. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10566–10571
- 19 Landgraf F T, Forreiter C, Hurtado Picó A, et al. Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *Febs Lett*, 2001, 508: 459–462
- 20 Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, et al. The *Arabidopsis* *HY2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell*, 2001, 13: 425–436
- 21 Tu J M, Zhou M, Haessner R, et al., Toward a mechanism for biliprotein lyases: revisiting nucleophilic addition to phycocyanobilin. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5399–5401
- 22 Liu L N, Chen X L, Zhang Y Z, et al. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1708: 133–142
- 23 Zhou W, Ding W L, Zeng X L, et al. Structure and mechanism of the phycobiliprotein lyase CpcT. *J Biol Chem*, 2014, 289: 26677–26689
- 24 Liu S, Chen Y, Lu Y, et al. Biosynthesis of fluorescent cyanobacterial allophycocyanin trimer in *Escherichia coli*. *Photosynth Res*, 2010, 105: 135–142
- 25 Zhao K H, Deng M G, Zheng M, et al. Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. *Febs Lett*, 2000, 469: 9–13
- 26 Storf M, Parbel A, Meyer M, et al. Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/PecF, a lyase-isomerase for the photoactive 3¹-Cys-alpha 84-phycoviolobin chromophore of phycoerythrocyanin. *Biochemistry*, 2001, 40: 12444–12456
- 27 Tooley A J, Glazer A N. Biosynthesis of the cyanobacterial light-harvesting polypeptide phycoerythrocyanin holo-alpha subunit in a heterologous host. *J Bacteriol*, 2002, 184: 4666–4671
- 28 Zhao K H, Su P, Tu J M, et al. Phycobilin:cystein-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14300–14305
- 29 Isailovic D, Sultana I, Phillips G J, et al. Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. *Anal Biochem*, 2006, 358: 38–50
- 30 de Marsac N T, Castets A, Cohen-Bazire G. Wavelength modulation of phycoerythrin synthesis in *Synechocystis* sp. 6701. *J Bacteriol*, 1980, 142: 310–314
- 31 Tooley A J, Cai Y P A, Glazer A N. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo-alpha subunit in a heterologous

- host. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 10560–10565
- 32 Teng Y, Zhou M, Chen F, et al. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo-alpha subunit in *Escherichia coli*. J Wuhan Bot Res, 2006, 24: 387–391
- 33 Guan X, Qin S, Su Z, et al. Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo-alpha-phycoyanin in *Escherichia coli* by using one expression vector. Appl Biochem Biotechnol, 2007, 142: 52–59
- 34 Liu S, Chen H, Qin S, et al. Highly soluble and stable recombinant holo-phycoyanin alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. Biochem Eng J, 2009, 48: 58–64
- 35 Shen G, Saunée N A, Williams S R, et al. Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in *Synechococcus sp.* PCC 7002. J Biol Chem, 2006, 281: 17768–17778
- 36 Miller C A, Leonard H S, Pinsky I G, et al. Biogenesis of phycobiliproteins. III. CpcM is the asparagine methyltransferase for phycobiliprotein beta-subunits in cyanobacteria. J Biol Chem, 2008, 283: 19293–19300
- 37 Hu I C, Lee T R, Lin H F, et al. Biosynthesis of fluorescent allophycoyanin alpha-subunits by autocatalytic bilin attachment. Biochemistry, 2006, 45: 7092–7099
- 38 Yang Y, Ge B, Guan X, et al. Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo-alpha-allophycoyanin in *Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 2008, 30: 1001–1004
- 39 Zhang W, Guan X, Yang Y, et al. Biosynthesis of fluorescent allophycoyanin alpha-subunits by autocatalysis in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem, 2009, 52: 135–140
- 40 Ge B, Sun H, Feng Y, et al. Functional biosynthesis of an allophycoyan beta subunit in *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng, 2009, 107: 246–249
- 41 Chen H, Lin H, Li F, et al. Biosynthesis of a stable allophycoyanin beta subunit in metabolically engineered *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng, 2013, 115: 485–489
- 42 Wu SH, Lagarias J C. Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. Biochemistry, 2000, 39: 13487–13495
- 43 Toole C M, Plank T L, Grossman A R, et al. Bilin deletions and subunit stability in cyanobacterial light-harvesting proteins. Mol Microbiol, 1998, 30: 475–486
- 44 Peng P P, Dong L L, Sun Y F, et al. The structure of allophycoyanin B from *Synechocystis* PCC 6803 reveals the structural basis for the extreme redshift of the terminal emitter in phycobilisomes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, 70: 2558–2569
- 45 Capuano V, Braux A S, Tandeau de Marsac N, et al. The “anchor polypeptide” of cyanobacterial phycobilisomes. Molecular characterization of the *Synechococcus Sp.* Pcc-6301 *apce* gene. J Biol Chem, 1991, 266: 7239–7247
- 46 Zhu J P, Chi Y, Wang X, et al. Biosynthesis of allophycoyanin ApcA₂ *in vivo*. J Huazhong Univ Sci Technol, 2009, 37: 128–132
- 47 Zhao K H, Zhang J, Tu J M, et al. Lyase activities of CpcS- and CpcT-like proteins from Nostoc PCC7120 and sequential reconstitution of binding sites of phycoerythrocyanin and phycocyanin beta-subunits. J Biol Chem, 2007, 282: 34093–34103
- 48 Fairchild C D, Glazer A N. Oligomeric structure, enzyme-kinetics, and substrate-specificity of the phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. J Biol Chem, 1994, 269: 8686–8694
- 49 Chen Q, Chen S L, Song Q S, et al. Molecular characterization of a novel gene from *Synechocystis sp.* PCC 6803. Gene, 2011, 488: 57–61
- 50 Guan X Y, Zhang W J, Chin X Y, et al., Combinational biosynthesis and characterization of a fluorescent 82 beta-phycoyanin of *Spirulina platensis*. Chin Sci Bull, 2012, 57: 3294–3299
- 51 Khosla C, Zawada R J X. Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. Trends Biotechnol, 1996, 14: 335–341
- 52 Apt K E, Collier J L, Grossman A R. Evolution of the phycobiliproteins. J Mol Biol, 1995, 248: 79–96
- 53 Barber J. Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. Chem Soc Rev, 2009, 38: 185–196
- 54 韩发, 贵桂英. 青藏高原地区的光质对高原春小麦生长发育、光合速率和干物质含量影响的研究. 生态学报, 1987, 4: 207–313
- 55 Pu Y, Zhu G L, Ge B S, et al. Photocurrent generation by recombinant allophycoyanin trimer multilayer on TiO₂ electrode. Chin Chem Lett, 2013, 24: 163–166
- 56 焦绪栋, 秦松. 生产具有荧光活性和链霉亲和素标记的藻蓝蛋白类荧光蛋白质的方法及应用. 中华人民共和国专利, 201410550315
- 57 焦绪栋, 秦松. 一种生产链霉亲和素标记的藻蓝蛋白类荧光蛋白质的方法及应用. 中华人民共和国专利, 201410549291
- 58 关翔宇. 藻蓝蛋白组合生物合成及蓝藻连接多肽生物进化研究. 博士学位论文. 青岛: 中国海洋大学, 2008

Advances in *Cyanobacterial Phycobilisome Assembling in vitro*

MA JianFei^{1,2}, LIN HanZhi³ & QIN Song¹

1 Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 Environmental Biophysics and Molecular Ecology Program, Department of Marine and Coastal Sciences, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08901, USA

The initial process in photosynthesis is to harvest and transfer solar energy to photosynthetic reaction centers with high efficiency. Phycobilisome is one of the two main kinds of light harvesting complexes for oxygen photosynthesis (the other is LHC II, found mainly in green algae and vascular plants), which attaches to the cytoplasmic side of the thylakoid in cyanobacterial and red algal cells. It is usually composed of phycobiliproteins and linker proteins, and it functions to harvest and transfer energy to PS II. The three types of phycobiliproteins have similar structures but different absorption characters. This is because of the difference in numbers and locations of bilins on their apo-protein skeletons, as well as slight structural differences in protein scaffold. Phycobiliproteins self-assemble in cells into an intact phycobilisome, whose structure stability relies on hydrogen bonds, polar interactions, and the participation of linker proteins. Scientists have tried to synthesize and assemble phycobilisomes *in vitro* for decades, and have reached only the holo-allophycocyanin trimer until date, far from accomplishing the recombinant holo-phycocyanin hexamer and assembling of any higher structural units. In this review, we focus on the combinatorial biosynthesis process of phycobilisomes (mainly for phycobiliproteins) and summarize the history and recent progress of *de novo* synthesis of phycobilisome *in vitro*. Furthermore, we discuss the potential applications of recombinant allophycocyanin trimer and the intact phycobilisome.

light-harvesting complex, phycobilisome, combinatorial biosynthesis, recombinant allophycocyanin, assembling *in vitro*

doi: 10.1360/N052016-00067