

线粒体氧化磷酸化作用的研究

中国科学院上海生物化学研究所生物膜组

一、前言

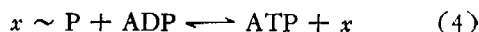
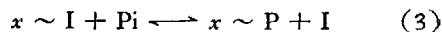
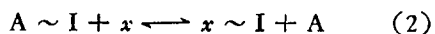
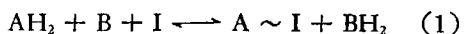
氧化磷酸化作用的研究一直是生物化学研究的一个重要方面。随着研究的深入,氧化磷酸化作用研究牵涉的面也愈来愈广泛,诸如线粒体内膜的构型变化、线粒体的需能离子传送、内膜的结构与重组、线粒体的发生与蛋白质生物合成,以及各种代谢物通过内膜的传送等,都与氧化磷酸化作用有着密切的关系。近年来由于实验技术的发展,氧化磷酸化研究的各个方面都取得了不少进展。本文将着重讨论氧化磷酸化的偶联机制及氧化磷酸化的重组。至于早期及一些其它方面的工作,可以参看有关书籍与综合性文章^[1-5]。

二、氧化磷酸化的作用机制

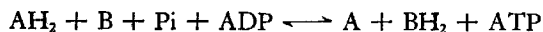
1946年Lipmann首先提出氧化磷酸化作用的化学偶联机制问题。近三十年来这个问题始终是研究氧化磷酸化作用的焦点。但是至今对此还有许多不同的看法,归纳起来有三种学说,即化学学说、构型学说与化学渗透学说。

(一) 化学学说

化学学说主要是参考了三磷酸甘油醛脱氢酶的脱氢氧化偶联磷酸化的机制,运用分步化学反应的概念而提出的。根据化学学说,电子(氢)传递时高能磷酸键的合成是由于化学能的直接转换:电子(氢)传递释出的化学能直接转入某种ATP(三磷酸腺苷)的前体(高能中间物)中,而后再生成ATP^[6-7]。虽然化学学说的不同支持者对化学偶联机制的细节还有不同看法,但大致可以描述如下:



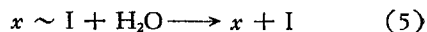
总反应是:



在上式中A与B是二个电子(氢)递体,I与x是二个假定的、迄今并未能分离出的偶联因子,~代表高能键,I与氧化型A生成A~I,也有人认为I是与还原型B生成BH₂~I^[7,8],这二者并无本质不同。氧化还原的能量即贮于A~I(BH₂~I)的高能键中,然后生成不含磷的高能中间物x~I,再转移成含磷的高能中间物x~P,最后生成ATP。

化学学说的概念在氧化磷酸化的作用机制的研究上占了十余年的统治地位,一直到60年代中,有关氧化磷酸化的现象与结果几乎都是用它来解释的。即使现在也还有一些实验结果支持这一学说。

1. 氧化磷酸化的部分反应、解联系剂与能量传递抑制剂的作用都可以用化学学说来解释 根据化学学说,ATP—ADP交换反应可用反应(4)来说明,³²Pi—ATP交换反应可用反应(3)加反应(4)来说明,根据寡霉素(Oligomycin)的作用可以认为寡霉素抑制反应(4),而解联系剂如DNP(2,4-二硝基苯酚)的作用在于使高能中间物x~I水解:



因此DNP激活的ATP酶反应可以认为即反应(4)(3)(5)的总和。这样根据化学学说也就能说明许多实验事实,诸如³²Pi—ATP交换反应由于关系到反应(4),因此需要有ADP存在才能进行;DNP的作用在于使x~I水解,因此不需要无机磷酸盐的存在就能表现;寡霉素抑制紧密偶联的线粒体的呼吸后,加DNP可

使呼吸速度恢复; $^{32}\text{P}\text{i}-\text{ATP}$ 交换反应、 $\text{ADP}-\text{ATP}$ 交换反应均被 DNP 与寡霉素抑制等等。根据化学学说也同样可以解释 $\text{H}_2\text{O}^{18}-\text{ATP}$ 交换反应与 $\text{H}_2\text{O}^{18}-\text{P}\text{i}$ 交换反应。

2. 从氧化磷酸化的模型实验来看, 化学偶联是可能的 三磷酸甘油醛脱氢酶催化底物脱氢氧化, 同时生成高能磷酸键, 是化学偶联氧化磷酸化的一个很好的例子。不少工作者利用模型实验说明线粒体内一些电子(氢)递体在氧化时是能够形成高能键的, 表 1 列举了一些例子。

表 1 氧化磷酸化作用的一些模型实验

体内生物意义	被氧化物质	生成高能键
菸酰胺核苷酸分子的一部分	腺嘌呤	由无机磷酸盐生成无机焦磷酸盐
	腺嘌呤核苷	
维生素 K 类似物	1, 4-二氢 N 甲基菸酰胺	无机磷转移到适宜受体上
	2 甲基 1, 4 萘醌醇	
	2 甲 1, 4 萘氢醌-1-醋酸	醋酸生成乙酸酐
含硫化合物	硫化四甲撑	二羧酸生成酸酐
细胞色素类似物	血绿蛋白色素	$\text{ADP}+\text{P}\text{i}$ 生成 ATP
体内天然物质	谷胱甘肽	$\text{ADP}+\text{P}\text{i}$ 生成 ATP
细胞色素类似物	亚铁血色素	生成高能磷酸键

谷胱甘肽被细胞色素 C 氧化时的磷酸化是一个很吸引人的模型。Painter 与 Hunter 发现谷胱甘肽在有氧化型谷胱甘肽存在下, 被细胞色素 C 氧化时使 AMP 与无机磷酸盐生成 ADP、与无机焦磷酸盐生成 ATP, 也可以使 ADP 与无机磷酸盐生成 ATP^[14]。这个系统的反应有一些特点与线粒体氧化磷酸化很相似: (1) 对 ADP 的亲合力比 AMP 大; (2) 解联系剂抑制偶联磷酸化; (3) 在有解联系剂存在条件下加入 ATP, ATP 即被水解。由于反应系统中电子供受体都是生物物质, 并且磷酸化的效率又特别高, 每还原一分子细胞色素 C 生成一分子 ATP, 即 $\text{P}/2\text{e} = 2$, 因此这个模型是很重要的, 另一方面, Painter 与 Hunter 的实验, 在一些实验室中未能得到重复^[15], 所以这个模型的确切意义是非常值得进一步探讨的。

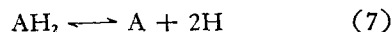
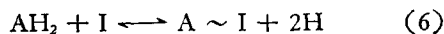
Wang 等发现亚铁血色素 (ferrohemochrome) 被空气氧化时可以生成高能磷酸键^[16]。这个反应虽然比较慢、磷酸化效率也不高, 但

Wang 根据模型试验预言线粒体电子(氢)递体的氧化还原电位会受能量的影响。不久 Wilson 与 Dutton 就发现了线粒体细胞色素 b 与 a_3 的氧化还原电位受外加 ATP 的影响^[17,18]。

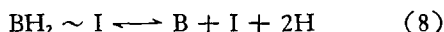
模型试验虽然提供了各种可能性, 但至今还不清楚线粒体氧化磷酸化过程中是否存在类似于某一种模型的机制, 根据模型实验设想的线粒体氧化磷酸化作用的详细机制尚有待于进一步的实验来证实。

3. A ~ I (或 $\text{BH}_2 \sim \text{I}$) 存在的证据 化学学说设想在氧化磷酸化作用过程中有 A ~ I 或 $\text{BH}_2 \sim \text{I}$ 的存在。近年来一些实验结果提示了它们存在的可能性。

(1) 电子(氢)递体的氧化还原电位受能量状态的影响 按照化学学说, 在能化状态下的反应 (6) 的中点电位将比在非能化状态下的反应 (7) 的中点电位为高。



另一方面, 如果生成的高能中间物不是 A ~ I 而是 $\text{BH}_2 \sim \text{I}$, 则在能化状态下的反应 (8) 的中点电位将比在非能化状态下的反应 (9) 的中点电位为低。



Wilson 与 Dutton 发现大鼠肝脏线粒体细胞色素 a 的氧化还原电位为 190 毫伏, 而细胞色素 a_3 的氧化还原电位为 395 毫伏。当加 ATP 后, a_3 的氧化还原电位就降到 300 毫伏, 因此说明有相当于 $\text{BH}_2 \sim \text{I}$ 的 $\text{a}_3^{3+} \sim$ 的存在^[17]。另一方面 Wilson 与 Dutton 还发现在非能化线粒体上有二种细胞色素 b, 氧化还原电位分别是一 55 毫伏与 35 毫伏, 但在能化线粒体上, 细胞色素 b 的氧化还原电位却分别是 245 毫伏与 35 毫伏^[18]。Chance 等把氧化还原电位受能量影响的那一部分细胞色素 b 称之为 b_T ^[19]。因此可以认为有相当于 A ~ I 的 $\text{b}_\text{T}^{3+} \sim$ 的存在。

(2) ATP 对细胞色素 b 吸收光谱的影响 1966 年 Chance 等发现鸽心线粒体或线粒体碎片在加 ATP 后细胞色素 b 的吸收光谱蓝移, 高

峰移至 555 毫微米^[20], 然而 Slater 等却发现加 ATP 后, 有磷酸化活力的线粒体碎片的细胞色素 b 光谱红移, 高峰移至 565 毫微米^[21]。现在知道 Chance 所指 555 毫微米高峰实际上是红移光谱的肩^[22]。

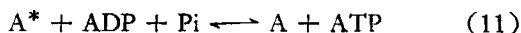
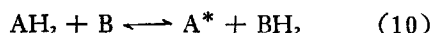
ATP 产生的细胞色素 b 吸收光谱红移的作用被解联系剂去除, 线粒体在有底物存在下加寡霉素也会产生同样的光谱红移, 这些都说明细胞色素 b 的吸收光谱红移可能代表着它的能化形式。

(3) 抗霉素 A (Antimycin A) 的作用与线粒体能量状态的关系 Slater 认为线粒体有二种细胞色素 b, 称之为 b_L 与 b (b_L 与 Chance 等所述 b_T 的关系可参阅资料^[22]), 而只有 b_L 能与抗霉素 A 结合。抗霉素 A 与 b_L 结合后即抑制呼吸, 与此同时还可以看到还原细胞色素 b 的吸收光谱红移 2 毫微米^[21]。Berdn 与 Slater 设想在线粒体中 b_L 有二种构型处于平衡状态, 一种是 T, 一种是 R。抗霉素 A 促进 R 构型的形成, 并优先与 R 构型结合。在非能化线粒体中 R 构型少, 因而抗霉素 A 的作用与抗霉素 A 的浓度呈 S 型曲线; 在能化线粒体中 R 构型多, 抗霉素 A 的作用即与它的浓度呈直线。根据计算, T 与 R 二种构型能量差约有 8 千卡/克分子, 因此, 根据抗霉素 A 的作用也说明可能有能化形式的细胞色素 b 的存在。然而也有人认为抗霉素 A 对呼吸抑制的作用与它的浓度所呈的 S 形曲线可以不用变构效应来解释^[23]。

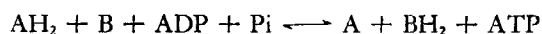
(二) 构型学说

1964 年 Boyer 首先提出伴随电子传递的蛋白构型变化可能是氧化磷酸化高能磷酸键生成的动力。他的设想立即受到 Green 的支持, 并且逐渐加以具体化。Green 认为有利于构型学说的证据有五点: (1) 电子(氢)传递时伴有线粒体内膜及电子传递复合物的构型变化; (2) 线粒体内膜构型变化的幅度很大, 如果这些变化不是能量的最初贮存形式, 则由此而消耗的自由能将会降低磷酸化效率, 而现在知道线粒体的磷酸化效率是很高的; (3) 生物膜上能量转换的特点就是有构型变化, 例如肌肉收缩; (4) 用双

功能试剂使线粒体部分交联可以不影响电子(氢)传递, 但由于阻止了构型变化而丧失偶联磷酸化的能力; (5) 构型变化的速度与电子(氢)传递链组分的转换率处于同一个数量级^[2]。如果用反应式来表示构型学说, 则:



总反应是:



在上式中, A^* 代表电子(氢)递体 A 的高能构型状态(也可写作 BH_2^* 代表还原型递体 B 的高能构型状态, 二者并无本质不同)。从上式也可以看出构型学说与化学学说很相似, 只不过构型学说认为氧化还原释出的能量不是首先贮于共价键中, 而是贮存于蛋白质肽链的折叠之中。因此, 也有一些工作者把构型学说看作是化学学说的变种。

构型学说的提出是受了肌肉收缩的启发, 一方面 ATP 会引起肌球蛋白构型变化产生肌肉收缩。另一方面伸长原先收缩的甘油化的肌纤维会导致 ATP 的生成。近年来一些实验表明线粒体内膜以及电子(氢)递体在不同能量状态或氧化还原状态下有不同的构型。

1. 电子显微镜观察 1966 年 Hackenbrock 发现小鼠肝线粒体在不同代谢状态下有不同的超微细结构。如图 1 (见本期封 3) 所示, 在状态 4 (关于不同代谢状态的划分可参见资料 1) 呈正常构型 (orthodox), 而当加入 ADP, 线粒体进入状态 3 后内膜开始发生折皱, 超微细结构就从正常转变成凝聚, 这种转变会被 DNP 抑制。当 ADP 被耗尽, 线粒体回到状态 4 以后, 就又从凝聚构型转变成正常构型, 这种转变不被 DNP 抑制, 但被呼吸链抑制剂抑制, 如果加入人工递体使电子(氢)绕过抑制剂的抑制点而传递, 就可以解除抑制。没有呼吸控制与磷酸化的线粒体就没有上述超微细结构的互变^[24]。

Green 认为线粒体内膜是由重复单位构成的, 每个重复单位含三个亚基, 即球状头、短柄与基片^[2]。现已知道球状头是一个 ATP 酶, 它是氧化磷酸化最终合成 ATP 的酶的一部分; 短

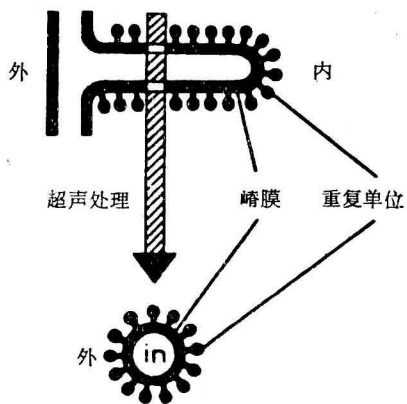


图2 线粒体内膜的重复单位及超声处理形成内翻外的过程(根据 Lee & Ernster^[30])

柄是一联接蛋白 (OSCP), ATP 酶通过短柄与基片结合后就获得了对寡霉素的敏感性; 基片内含电子传递链的片段, 基片彼此侧向连接就形成连续的内膜(图 2)。由于 Green 的实验室能把呼吸链拆分成四个复合物, 而每个复合物的大小与基片差不多, 他认为每个基片就是呼吸链的一个复合物^[2]。Green 在研究线粒体超微细结构与线粒体功能状态的关系时发现在不同条件下可有三种结构: (1) 在没有 ATP 或底物, 或外加 ADP 的条件下, 线粒体呈非能化构型, 这是凝聚的结构; (2) 在加入 ATP 或底物后形成能化构型; (3) 在加底物形成能化构型后再加无机磷酸盐, 形成能化缠曲构型。他认为线粒体内膜的这些构型变化是由重复单位的形状及亚基表面电荷与疏水区的分布所决定的。能化构型是由于短柄充分伸展, 此时球状头与基片距离最大, 而非能化构型是由于短柄收缩, 此时重复单位各亚基不易区分^[2](图 3)。Green 设想在氧化磷酸化过程中氧化还原释放的能量首先转变成重复单位的构型能量, 而后用来作各种功: 合成 ATP、离子传送、需能转氢等^[2](图 4), 他还认为内膜构型变化的速度与重复单位的构型变化是线粒体能量转换的最初过程的设想是相符合的。

Hatase 与 Oda 发现亚线粒体颗粒在被 ATP 与琥珀酸能化后, 在电子显微镜下不再能看到球状头与短柄, 而在能量散发后又可看到球状头与短柄^[25], 他们的实验结果正好与 Green 的

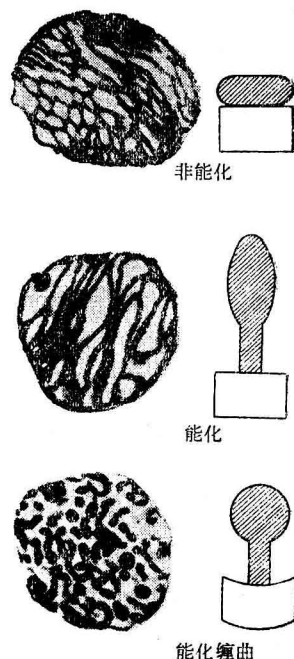


图3 线粒体超微细结构与重复单位的关系 (根据 Green^[23])

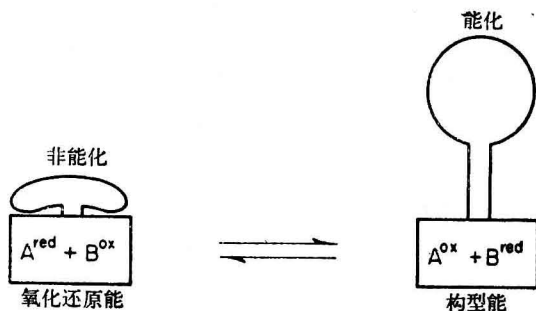


图4 化学能与构型能的能量转换 (根据 Green^[23])

图中 A 与 B 是二个电子 (氢) 递体, A^{red} 代表还原型 A, B^{ox} 代表氧化型 B。在复合物 I, A 代表脱氢酶, B 代表非血红素铁; 在复合物 III, A 代表细胞色素 b, B 代表细胞色素 C_1 ; 在复合物 IV, A 代表细胞色素 a, B 代表细胞色素 a_3 。

解说相反。Muscatello 等用电子显微镜观察了五种呼吸状态下负染的鼠肝线粒体的构型变化, 认为他们的实验结果不支持构型学说^[26]。另外, Weber 与 Blair 报道 ADP、dADP、ATP、dATP 等腺嘌呤核苷酸产生的线粒体构型变化可以与氧化磷酸化无关, 而只是反映这些腺嘌呤核苷酸与内膜上传送蛋白专一结合的结果^[27]。而 Blair 与 Munn 认为电子显微镜下所看到的线粒体构型变化的主要意义可能不在于

能量转换,而在于提供了代谢调节与控制的手段^[28]。因此,至今对于电子显微镜下观察到的构型变化的涵义还有不同的认识。

2. 荧光探查剂的利用 不少工作者利用探查剂(probe)来研究线粒体内膜在能化状态下的变化,其中使用最多的是荧光探查剂。例如1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS),它是一个带负电的分子,在水中荧光很弱,但在非极性溶剂中荧光很强,并且荧光高峰蓝移。它能与蛋白质结合,因而对于研究蛋白质的性质、结构及蛋白与小分子的相互作用很有价值。

当 ANS 与线粒体碎片结合时荧光增强 50 倍^[29],与此同时荧光高峰从 520 毫微米移到 470 毫微米,这说明了 ANS 在线粒体内膜上的结合点有很强的疏水性质。1969年 Azzi 等发现 ANS 与线粒体碎片结合后的荧光随线粒体碎片的能化状态的改变而改变。偶联的线粒体碎片在加 ATP 或激起电子传递后,因 ANS 与碎片的比例不同,ANS 荧光可再增加 20—100%,但荧光高峰并不进一步蓝移^[29]。加 ATP 而引起的荧光增加被寡霉素或解联系剂抑制或消除,而因电子传递所引起的荧光增加则被呼吸链抑制剂或解联系剂抑制或消除。当线粒体碎片从状态 5 转变成状态 3 时,细胞色素 a 的氧化速度远较 ANS 荧光增加速度来得快,因此一般认为 ANS 荧光变化反映的是膜的能量状态,而不是呼吸链电子(氢)递体的氧化还原^[29]。线粒体碎片能化时的荧光增加有赖于碎片偶联磷酸化的能力。Datta 与 Penefsky 发现线粒体碎片在加偶联因子恢复氧化磷酸化活力的同时也恢复了加 ATP 产生的 ANS 荧光增加。

当完整线粒体与 ANS 结合后再能化时,ANS 荧光反而下降。如果考虑到线粒体内膜的二侧不对称性及线粒体碎片是内翻外的颗粒^[30](图 2),这也就不难理解了。Azzi 认为 ANS 的荧光在能化时的变化是由于能化时线粒体内膜

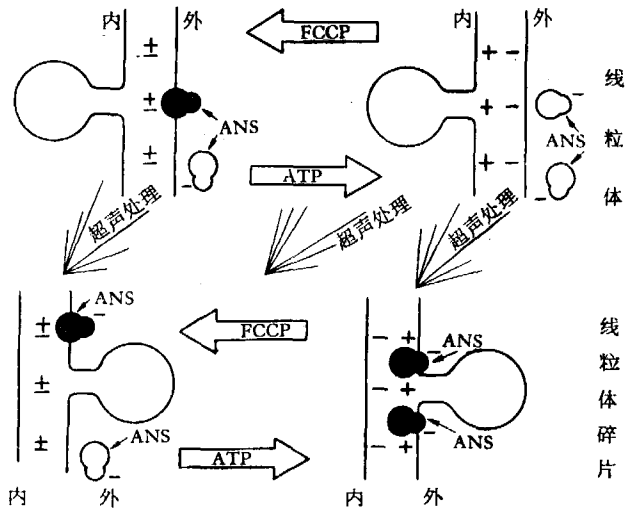


图 5 ANS 荧光与线粒体及线粒体碎片能化的关系 (根据 Azzi^[29])

FCCP 代表羰基-氰-对-三氟甲氧基苯腙(Carbonyl-cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone)

的电荷重新分布,因而影响带负电的 ANS 分子的结合(图 5),而不带电的荧光探查剂如 1-苯胺基-8-萘磺酰胺的荧光在线粒体能化时没有变化。Barrett-Bee 与 Radda 认为线粒体碎片在能化时 ANS 荧光的增加,既由于结合 ANS 的量增加,也由于量子产率增加^[31]。

对于 ANS 在膜上主要与膜蛋白结合,还是与磷脂结合的问题,尚有不同看法。Vanderkooi 与 Martonosi 根据 ANS 与磷脂团粒结合后荧光增强以及用磷酸脂酶作用及使膜蛋白变性等方法对 ANS 荧光的影响,认为磷脂起主要作用,而蛋白也起一定作用。Azzi 也认为 ANS 是与膜上磷脂结合。Wallach 等根据激发能可以从膜蛋白转移给膜结合的 ANS,认为一些甚至全部膜结合 ANS 是与膜蛋白结合,而 Datta 与 Penefsky 证明 ANS 能与线粒体内膜上的 ATP 酶结合。

Azzi 认为线粒体能化时 ANS 荧光的改变可以是内膜构型变化的结果,也可以是膜电位变化的结果。Radda 认为根据 ANS 荧光而观察到的膜的能化不是能量偶联的最初过程,而可能只代表能量偶联或需能离子运动所必须的膜的状态^[32]。除上述荧光探查剂外,近年来也有不少工作者用 pH 指示剂、顺磁标记化合物、

化学改性试剂,以及旋光色散来进行研究,结果都说明线粒体在不同能化状态下结构有所不同。

3. 电子(氢)递体在氧化还原时的构型变化

近年来对于电子(氢)递体,特别是细胞色素,在氧化还原时构型的变化有了比较多的了解: Baum 等报道复合物 III 经还原后就阻止了 b 与 c_1 的分开; Yong 与 King 发现细胞色素氧化酶在氧化与还原时旋光色散与圆二色性不同; Cabral 与 Love 发现氧化型细胞色素氧化酶的沉降常数与还原型的不同; Wakabayashi 等观察到细胞色素氧化酶的膜制剂在电子显微镜下,氧化型的结构显然与还原型的不同; Takano 等研究细胞色素 c 的 X 光衍射,发现氧化型细胞色素 c 的构型与还原型的有显著不同,因而提供了解释还原细胞色素 c 较为稳定的一些实验结果的基础。电子(氢)递体在氧化还原过程中的构型变化也是构型学说的一个重要内容。

(三) 化学渗透学说

1961 年 Mitchell 提出了氧化磷酸化的化学渗透学说。他认为氧化磷酸化过程中 ATP 的生成是由于线粒体内膜上各向异性 ATP 酶的逆反应的结果^[33]。这个学说当时并没有引起足够的重视,也没有为大多数工作者所接受。1966 年 Mitchell 根据逐渐积累的氧化磷酸化的实验证据,特别是吸取了关于生物膜的知识,进一步充实了化学渗透学说的内容^[34],大大促进了关于氧化磷酸化的研究。到目前为止,化学渗透学说已成为氧化磷酸化作用机制的最重要的一个学说。

化学渗透学说的中心思想是:呼吸链在内膜上构成三个回路,通过链上电子与氢交替传递,使质子向内膜外侧定向移位,因此可以把呼吸链看作是一个质子泵,而由此产生的内膜内外侧之间的 pH 梯度与膜电位是合成 ATP 的原动力。

化学渗透学说对呼吸链的认识与一般有一些差别,这表现在:(1) NADH 是以质子化的 $NADH_2^+$ 形式与呼吸链作用;(2) NADH 脱氢酶中铁硫部分接受二个电子,而后 FMN 接受二

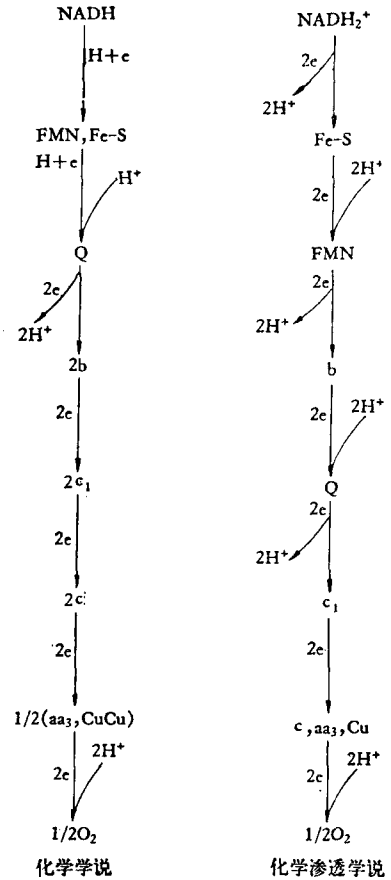


图 6 化学渗透学说对呼吸链的认识及其与化学学说的区别(根据 Slater^[12])

个氢原子;(3)辅酶 Q 的位置在细胞色素 b 与 c_1 之间(图 6)。根据化学渗透学说,呼吸链中有三处吸收质子,另有三处释出质子;吸收质子的电子(氢)递体位于内膜的内侧(FMN, 辅酶 Q, 细胞色素 aa_3),而释出质子的电子(氢)递体位于内膜的外侧(铁硫、细胞色素 b , c_1)。如果根据电子(氢)递体在膜上的分布将图 6 改绘成图 7,就更加清楚了。这样,通过电子(氢)传递,质子就从膜内移到膜外,产生了膜电位:膜外侧带正电,内侧带负电。

通过膜电位生成 ATP 的机制可用图 8 来表示, X^- 与 IO^- 是设想的中间物,它们由于膜电位的作用而来到膜的外表面,脱水而生成 $X-I$, $X-I$ 移向膜的内表面与 ADP 及无机磷酸盐反应,生成膜内侧的 ATP 与 $2H^+$ 以及膜上的 X^- 与 IO^- , 这样实际上就是质子横过膜的运动使

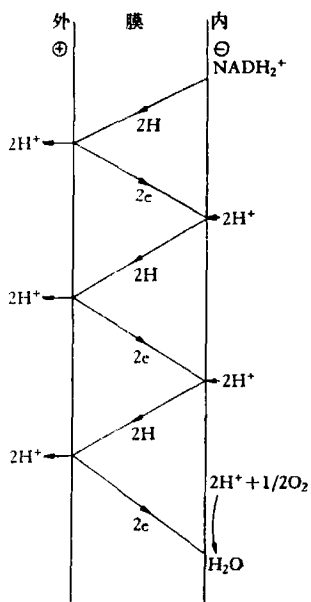


图7 电子(氢)传递时膜电位的形成
(根据 Slater^[22])

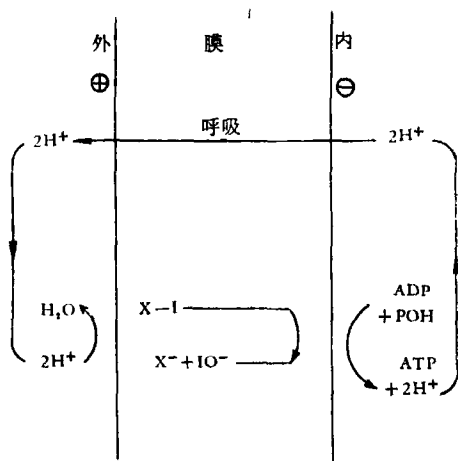


图8 化学渗透学说的 ATP 生成机制
(根据 Slater^[22])

电位差下降与 ATP 的合成相偶联。

1. 膜结构与氧化磷酸化的关系 化学渗透学说的最大特点是运用了膜的概念, 整个学说要求线粒体内膜有完整的小泡结构, 这样才能使膜的二侧截然分开, 才可能有膜电位的存在。如果发现没有小泡状膜结构的线粒体内膜也能进行氧化磷酸化, 那就立即排除了化学渗透学说的这种解释的可能性。过去以为线粒体碎片不再有完整的小泡^[1], 现在知道生物膜用机械或渗透压改变等方法破碎后, 碎片会自行关

闭形成小泡。近来有人报道, 当菠菜叶绿体超声碎片的丙酮提取物在水面上形成单分子层时就能进行光合磷酸化, ATP 生成的量子产率达到 0.1—1。这个结果似乎对化学渗透学说十分不利, 但是迄今从没有过线粒体氧化磷酸化的非小泡结构的系统。相反, 从重组的实验看来膜的小泡结构及膜上质子的定向移位却是氧化磷酸化所必须的^[35]。

2. 线粒体内膜上酶的定位 化学渗透学说要求吸收质子的电子(氢)递体位在内膜的内侧(也称基质侧或M侧), 而释出质子的电子(氢)递体位在内膜的外侧(也称C侧)。Lee 与 Ernster 提出线粒体超声碎片是线粒体内膜内翻外的小泡结构^[30], 这就提供了了解膜上酶定位的有利条件。正铁氰化钾不能通透线粒体内膜, Klingenberg 以及 Tyler 比较线粒体与线粒体超声碎片与正铁氰化钾作用的情况说明, 细胞色素 c 与 c_1 及 α -甘油磷酸脱氢酶在C侧, 而细胞色素 b 与 a 及琥珀酸脱氢酶在M侧。Racker 等利用细胞色素 c 及细胞色素氧化酶的抗体的作用以及化学改性试剂 ³⁵S-重氮苯磺酸的作用说明细胞色素 c 位于 c 侧而细胞色素氧化酶贯穿于整个内膜, 其中细胞色素 a 位在C侧而 a_3 位在M侧。表 2 列举了一些内膜上酶定位的实验结果, 从表 2 可见, 它们的定位是与化学渗透学说的要求相符合的。

3. 膜电位与 pH 梯度 Chance 与 Mela 发现溴酚蓝能与大鼠肝线粒体紧密结合, 他们根据溴酚蓝的光密度变化来了解线粒体膜质子浓度的变化。Mitchell 等指出, 虽然大多数溴酚蓝是与线粒体结合的, 但只有部分溴酚蓝能反映线粒体内的 pH, 而且在线粒体不同代谢状态下, 这部分的数量也不恒定^[36]。因此用溴酚蓝并不能正确地反映线粒体内的 pH。Addanki 等用 5, 5-二甲基-2, 4-噁唑烷二酮来测心肌线粒体内 pH 及线粒体内外 pH 差^[37]。他们发现在状态 4 时线粒体内 pH 约为 7.4—7.51, 线粒体外 pH 约为 6.96—7.00, 内外差仅 0.4—0.51, 而且不受解联剂的影响。这个结果好象不支持化学渗透学说。其实化学渗透学说并不要求必须有可测出

表2 线粒体内膜上酶的定位

名 称	位置	定 位 根 据
琥珀酸脱氢酶	M侧	琥珀酸必须通过完整线粒体内膜才能被氧化 琥珀酸脱氢酶易于从线粒体碎片提取与重组合
NADH脱氢酶	M侧	比较线粒体与碎片和正铁氰化钾的作用 完整线粒体不能氧化外源 NADH
酵母 NADH脱氢酶	M侧与C侧	有二种 NADH 脱氢酶分别位于 内 膜 二 侧
细胞色素 C	C侧	完整线粒体易于抽提与重组,而线粒体碎片必须加去垢剂才能抽提与重组 比较线粒体与碎片和正铁氰化钾的作用 细胞色素 C 抗体的应用 化学改性试剂的作用
细胞色素 C ₁	C侧	比较线粒体与碎片和正铁氰化钾的作用
细胞色素氧化酶	M侧与C侧	细胞色素氧化酶抗体的应用 化学改性试剂的作用
	M侧	叠氮只有被线粒体积聚才抑制线粒体细胞色素氧化酶 比较线粒体与碎片和正铁氰化钾的作用
α -甘油磷酸脱氢酶	M侧	比较线粒体与碎片和正铁氰化钾的作用

的 pH 差,因为质子浓度梯度可以转变成电化学电位而仍然保留着质子移动力^[4]。Tupper 与 Tedeschi 用微电极来研究线粒体的膜电位,他们发现在状态 4 时线粒体内带正电,但电位差只有 10 毫伏,而且 DNP 与氰化钾对这个电位差没有明显的影响。然而由于用微电极来测定不可避免地要引起线粒体膜的损伤,并且 Tupper 与 Tedeschi 也不知道电极究竟插在线粒体的什么部位,因此不能够用这个实验来说明膜电位在线粒体氧化磷酸化中不起作用。Mitchell 与 Moyle 用间接方法来测膜电位与 pH 梯度^[38],他们根据大鼠肝脏线粒体在加缬霉素 (Valinomycin) 后膜二侧 K^+ 的分布来估计膜电位,根据线粒体内外的缓冲能力及用 TritonX-100 溶解线粒体膜后的 pH 变化来估计 pH 梯度。他们发现,在状态 4 时质子移动力以膜电位为主, pH 梯度小于 1;而在状态 6 时质子移动力以 pH 梯度为主。由于总的质子移动力

$$\Delta P = \Delta \psi - 59 \Delta pH \quad (12)$$

在上式中, ΔP 为总的质子移动力, $\Delta \psi$ 为膜电位,膜外侧为正, ΔpH 为 pH 梯度,膜外侧

pH 较低,故 ΔpH 一般为负值。从上式可见总的质子移动力与膜电位与 pH 梯度均直接有关。Mitchell 与 Moyle 测出线粒体在 25℃, pH 7 时,若以 β -羟基丁酸作为底物,在状态 4 下总的质子移动力有 230 毫伏,符合化学渗透学说所要求的 210—270 毫伏,而在状态 3,总的质子移动力比状态 4 下降 30 毫伏^[38]。Utsumi 等研究不同能量状态下线粒体的 pH 梯度,发现 pH 梯度的大小与 ATP 生成的水平之间有密切的关系,ATP 生成时导致 pH 梯度减小,而加解联系剂也使 pH 梯度减小。近来 Jasaitis 等制备含细胞色素氧化酶或 ATP 酶的脂肪小体,他们的结果说明细胞色素 c 氧化或 ATP 水解都能产生膜电位^[39]。

1966 年 Reid 等证明外加的 pH 梯度与电化学电位可以使大鼠肝脏线粒体合成 ATP。以后 Cockrell 等的实验也表明膜电位可能参与线粒体的 ATP 合成。近来 Thayer 与 Hinkle 报告线粒体碎片在 pH 梯度与膜电位的联合作用下,每毫克蛋白可以生成 2—3 毫微克分子的 ATP;但若单用 pH 梯度,ATP 产率只有上述的 30%;若单用膜电位,ATP 产率只有 20%。他们认为在上述实验条件下 ATP 合成的初速度相当于有氧时氧化磷酸化生成 ATP 的速度,因而有力地支持了化学渗透学说^[40]。

4. 解联系剂的作用 化学渗透学说认为线粒体内膜是质子的不良导体,解联系剂的作用并不在于它们是某一酶反应的抑制剂,而在于它们能增加内膜对质子的通透性,使内膜成为质子导体。按照化学渗透学说,解联系剂通过质子化的及解离的阴离子这二种形式反复穿过内膜,因而使呼吸产生的质子梯度归于消失(见图 9)。已知的解联系剂大多是有机脂溶弱酸。Hopfer 等发现 2, 4-二硝基苯酚、双香豆素等解联系剂能专一地、大大地增加双层磷脂膜对质子的传导,他们认为解联系剂的这个作用足以说明它们对氧化磷酸化的解联作用。Libeiman 等比较了大量解联系剂的解联作用与它们对双层磷脂膜离子通透的影响,发现二者之间有很好的关系^[41]。Cunarro 与 Weiner 也发现解联系

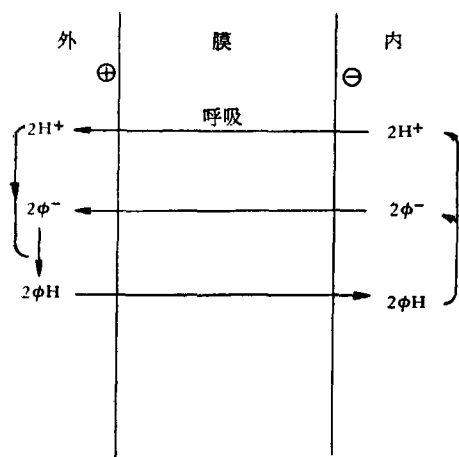


图9 解联系剂的作用机制(根据 Slater^[22])
φ 代表解联系剂

剂促进大鼠肝线粒体状态 4 的呼吸能力与促进质子传送能力之间有密切的定量关系。然而 Ting 等却认为解联系剂的解联作用与它们对双层磷脂膜离子通透的影响,二者之间并没有简单的关系。Bakker 等指出,虽然解联系剂的解联作用与它们对双层磷脂膜离子通透的影响之间没有良好的关系,但却与它们对脂肪团粒的离子通透的影响之间有良好的关系,这可能与膜的组分也有关系^[42]。因此,综上所述,用化学渗透学说来解释解联系剂的作用比较合理。

(四) 氧化磷酸化作用机制小结

氧化磷酸化的作用机制问题是所有关于氧化磷酸化研究的会合点。以上讨论的三种学说,它们之间的本质差异不在于线粒体内膜有没有高能中间物、构型变化、或 pH 梯度与膜电位,而在于电子(氢)传递释出的能量的最初贮存形式是什么?是共价键的化学能,还是表现于构型变化的次级键的总和,或者是内膜的电化学电位。现已知道线粒体可以利用这个能量的最初贮存形式来做各种功(图 10)。因此也可以认为这三种学说的不同在于对线粒体能量转换的因果关系看法不同,例如化学学说认为 pH 梯度与膜电位的生成

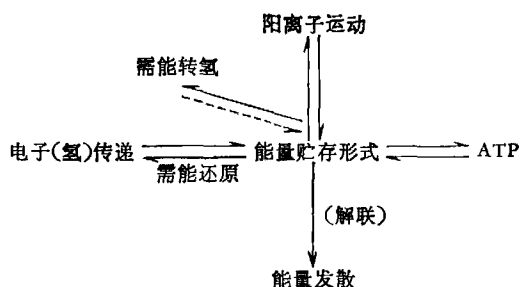


图 10 线粒体内膜的能量转换
(根据 Slater^[22])

是继发于需能离子(质子)传送的,而化学渗透学说认为共价键的生成是膜电位作用的结果。

要设计出一个实验来明确支持或否定某一个学说是相当困难的,因为支持这一学说的实验结果也往往会被另一个学说的支持者作为有利于自己的解释。例如根据化学学说可以认为氧化磷酸化需要完整的小泡结构是因为如果小泡结构有损伤,则通过需能离子传送与离子不断漏出就会产生能量的消散^[43]。再如根据化学渗透学说可以认为在线粒体不同代谢状态下电子(氢)递体的氧化还原电位的不同是由于膜电位对电子的吸引作用影响氧化还原反应的平衡的结果。

虽然现在看来化学渗透学说获得的支持比较多一些^[15],但它还远非完善,它的一些重要内容,例如电子与质子在呼吸链上交替传递,至今也还没有被证实。因此今后还需要进一步深入地研究,才能对氧化磷酸化的机制有一个比较全面的认识。

近来 Green 与 Ji 提出了一个线粒体结构与功能的“电机化学模型”^[44](图 11)。在这个模型中,他们把线粒体能量转换的单位称之为“超分子”。他们设想由于电子传递使超分子极

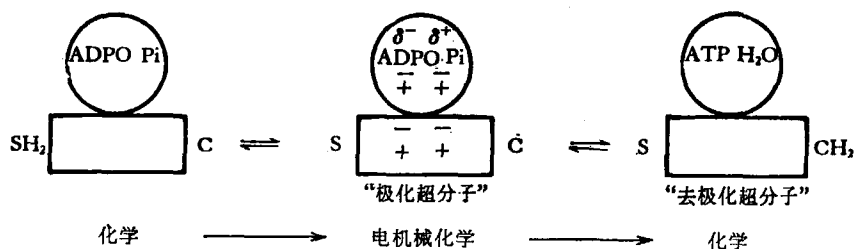
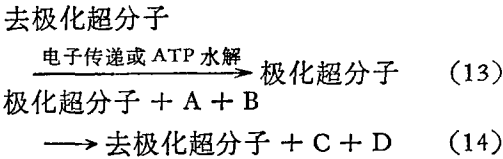


图 11 氧化磷酸化的电机化学模型(根据 Green^[44])

化,而后去极化,就生成 ATP。这可由下式表示:



在上式中, A + B 生成 C + D 相当于一个吸能的化学反应。Green 与 Ji 设想在电子传递复合物中由于底物氧化, 电子与质子分开而产生了电场, 这个电场诱导 ATP 酶的构型发生改变, 而后, 由于生成共价键的化学反应使 ATP 酶的构型获得松弛。在这个模型中, 能量是通过电场效应来转移的, 因此, 可以完全无需中间物的存在。Green 与 Ji 认为他们的这个模型不仅说明了能量的贮存形式(极化超分子), 而且也说明了需能与放能反应之间偶联的分子机制。他们还认为这种电机械化学机制也能够说明一些生化过程, 诸如光合作用、肌肉收缩、神经传导, 以及需 ATP 的激酶反应等等。然而, 这个模型虽然能够解释氧化磷酸化的一些实验现象, 但它的一些根据, 例如模型所要求的在细胞色素中产生电荷分离, 也就是说要求在细胞色素水平有氢的传递, 这在目前看来是不大可能的。这个模型的意义也有待于进一步的实验来考查。

三、氧化磷酸化的重组合

近年来氧化磷酸化重组合的工作取得了显著的进展, 这对于了解线粒体内膜的结构及氧化磷酸化的作用机制起了十分重要的作用^[45]。过去氧化磷酸化重组合的工作大多是用偶联因子与因缺乏这些偶联因子而丧失磷酸化活力的线粒体碎片重组合成有磷酸化能力的线粒体碎片^[4]。近年来利用呼吸链的各个组分: 磷脂、疏水蛋白及偶联因子来重组合成具有氧化磷酸化活力的小囊泡取得成功^[35,46,47], 使重组合的工作达到了新的水平。

(一) 用丧失磷酸化能力的线粒体碎片的重组合

1958 年 Pullman 等用玻璃珠振荡使牛心线

粒体破碎, 所得到的丧失磷酸化能力的线粒体碎片在加入清液部分的偶联因子 F₁ 后能恢复磷酸化活力。此后, 不同工作者制备了许多种丧失磷酸化活力的线粒体碎片, 获得了好几种偶联因子^[4,45,48]。通过几年来的研究与比较, 对于不同工作者的偶联因子的异同也比较清楚了^[4]。表 3 与表 4 列举了一些丧失磷酸化活力的线粒体碎片与偶联因子的制备方法 与 性质。所谓偶联因子是指线粒体内膜上的可抽提蛋白, 它可以使线粒体碎片由于缺乏偶联因子而丧失的磷酸化活力得到恢复。偶联因子的作用, 可以起催化作用, 可以起结构作用, 也可以起调节作用, 仅仅起到对付线粒体内天然解

表 3 丧失磷酸化能力的线粒体碎片制剂
(根据 Racker^[43])

制剂名称	制 备 方 法	恢复磷酸化活力 所需偶联因子
N 颗粒	线粒体在诺氏振荡器中振荡	F ₁
亚线粒体颗粒 (SMP)	线粒体在中性 pH 下经超声处理	F ₁ , F ₂
A 颗粒	线粒体在 pH 9.2 经超声处理	F ₁ , F ₃ , F ₂
ASU 颗粒	A 颗粒通过 Sephadex 柱后用尿素处理	F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄
TU 颗粒	SMP 用胰蛋白酶与尿素处理	颗粒使加入的 F ₁ 对寡霉素敏感
TUA 颗粒	TU 颗粒用氨处理	颗粒加 OSCP 后使加入的 F ₁ 对寡霉素敏感

表 4 偶联因子的制备与性质

名 称	制 备 方 法	性 质
F ₁ (或 A 因子)	线粒体在诺氏振荡器中破碎	不含脂, 冷不稳定, 有 ATP 酶活力, 分子量 28.4 万
F ₂ (或 B 因子)	线粒体丙酮粉用碱抽提	对碘敏感, 分子量约 3 万
F ₃	线粒体超声抽提液经 pH 5.4 沉淀后之清液	促进矽钨酸处理线粒体颗粒的磷酸化
F ₄	线粒体用 0.4 N 氢氧化铵与 0.2 N 氯化钾抽提	活性部分是 OSCP
F ₅	线粒体用尿素-磷酸抽提	促进矽钨酸处理线粒体颗粒的磷酸化
F ₆	从粗琥珀酸脱氢酶制剂中抽提	热稳定偶联因子
F _C (或 F _{C1})	F ₄ 用硫酸铵沉淀与凝胶吸附	部分提纯的 OSCP
F _{C2}	TUA 颗粒用 KSCN 抽提	热稳定偶联因子
OSCP	从 F ₄ 提纯	本身无酶活力, 分子量 1.8 万

联系剂的作用。在已知的偶联因子中, F_1 与 OSCP 已经提纯, 作用比较明确, 并且能把它们与线粒体内膜的超微细结构联系起来, 其它一些偶联因子的性质与作用尚有待于进一步的研究。

F_1 是一球状蛋白, 分子量 28.4 万, 由五种亚基组成, 亚基分子量分别是 54,000, 50,000, 33,000, 17,300 与 5,700。分子量为 5,700 的亚基能专一地抑制 F_1 的 ATP 酶活力, 这个亚基也就是通常所指的“ATP 酶抑制剂”, 它是个碱性蛋白, 往往通过生成二硫键而形成二聚体。 F_1 对冷不稳定, 这与它在 10°C 以下解离成亚基有关^[45]。在内膜负染电子显微镜下可以看到 F_1 就是内膜内侧突出的球状头, 它通过疏水键与离子键和内膜连接, 它所催化的 ATP 酶反应实际上就是氧化磷酸化生成 ATP 的逆反应。线粒体碎片去除 F_1 后, 就丧失氧化磷酸化活力, 而与 F_1 重组后就恢复了磷酸化活力。 F_1 的 ATP 酶活力不被寡霉素抑制, 但当 F_1 与线粒体内膜结合后, 它的 ATP 酶活力就会被寡霉素抑制。关于 F_1 与 ATP 酶抑制剂的相互作用, 它与 OSCP 生成复合物, 以及氧化磷酸化能量传递抑制剂 Aurovertin 对 F_1 构型的影响等, 近来都有不少探讨, 相信今后 F_1 的蛋白质一级结构的阐明将会有助于对 ATP 合成机制的了解。

OSCP 是一个小蛋白, 分子量仅 18,000, 它本身没有催化活力, 但使 F_1 在有内膜制剂存在下对寡霉素敏感, 因此也往往把 F_1 , OSCP 与内膜中的一个组分看作是一个 ATP 酶复合物的三个组成部分^[49]。在电子显微镜下, 它相当于内膜内侧的短柄。提取的 OSCP 在低离子强度与中性 pH 下会产生凝集。从比较生化来看, 虽然酵母的 F_1 可以与去 F_1 的牛心线粒体碎片重组而恢复碎片的磷酸化活力, 但酵母的 OSCP 却不能代替牛心的 OSCP。

(二) 用电子(氢)递体、磷脂、疏水蛋白与偶联因子的重组

近来 Racker 实验室在利用从线粒体内膜提取的一些成分重组合成有磷酸化活力的小囊泡方面取得了显著的进展^[45-47]。

1. 重组催化 ^{32}P -ATP 交换的小泡^[50] 虽然把磷脂悬浮液用超声波处理, 或将蛋白质与磷脂一同透析, 很容易形成小泡结构, 但是由于磷酸化活力对结构的要求较高, 因此往往得不到有活力的小囊泡^[45]。Kagawa 与 Racker 用胆酸抽提与硫酸铵沉淀等方法得到不含磷脂与细胞色素的无定形的膜蛋白制剂。把这个膜蛋白与磷脂及偶联因子重组, 生成的小泡虽然没有电子(氢)传递活力, 但能催化 $^{32}\text{P}_i$ -ATP 交换及 ATP 驱动的质子移位, 而且当小泡与 ANS 结合后再加 ATP 时, ANS 的荧光也会增加。上述过程被解联系剂与能量传递抑制剂所抑制, 而小泡的 ATP 酶活力被能量传递抑制剂抑制, 被解联系剂促进。

Kagawa 等在进一步研究膜蛋白制剂时发现, 膜蛋白制剂在 pH 10 经琼脂糖柱层析可以得到二个组分, 分子量分别是 30 万与 6 万, 这二个组分都是重组有活力的小泡所必须的。另外, 重组时对磷脂也有一定的专一性, 磷脂酰胆碱与磷脂酰乙醇胺都是必须的, 二者之比以 1 比 3—4 为最好^[50]。

2. 重组第三段磷酸化^[35,46] 在线粒体中, 还原细胞色素 c 通过细胞色素氧化酶, 被氧化时有 ATP 生成, P/O 比值为 1。Racker 与 Kandrach 把提纯的细胞色素 c、细胞色素氧化酶、磷脂及从线粒体内膜抽提的疏水蛋白放在一起透析, 随着去垢剂逐渐被透析去除, 这些组分就共同形成了小泡结构。把这个小泡与 F_1 、OSCP、与其它偶联因子重组, 重组后的小泡在形态上就与线粒体内膜碎片小囊泡十分相似, 小泡上也有球状头与短柄。然而重组后的小泡此时只能催化维生素丙的氧化, 而不能偶联生成 ATP。Racker 认为这是因为小泡上的酶没有各向异性的特点, 在小泡的内外侧都有细胞色素 c, 这样就形不成质子的电化学电位。他们首先抽提掉小泡外侧的细胞色素 c, 并且用维生素丙还原吩噻二甲酯硫酸(PMS), 利用还原的 PMS 穿过小泡的膜来还原小泡内侧的细胞色素 c, 这样就使质子移位有了方向性, 结果也就有了 ATP 的生成, P/O 比值最高可达 0.5。

这个实验的结果对于化学渗透学说也是一个有力的支持。

3. 重组第一磷酸化^[47] Ragan 与 Racker 用复合物 I (NADH-辅酶 Q 还原酶) 和磷脂、疏水蛋白一起形成小泡结构。当小泡与 F_1 及 OSCP 保温后,在催化 NADH 被辅酶 Q_1 氧化时有 ATP 生成, P/O 比值可以达到 0.5。小泡的磷酸化活力受鱼藤酮、解联剂, 及 *rutamycin* 的抑制。重组第一磷酸化并不一定需要呼吸酶在小泡膜上定向排列, 因为只从膜的一侧供应 NADH 也就达到事实上的各向异性了。

重组第一与第三段磷酸化的方法十分相似, 说明了只要把非磷酸化的呼吸复合物渗入到由一定磷脂组分以及偶联因子所构成的小泡中去, 就能够使磷酸化活力出现。重组磷酸化活力的大小与重组的条件密切有关, 蛋白与磷脂的比例, 蛋白之间的比例, 胆酸盐与磷脂的比例, 以及各种磷脂之间的比例都会影响磷酸化的活力, 例如磷脂酰乙醇胺与磷脂酰胆碱的比例以 4 比 1 为最适^[46]。

用类似的方法来重组第二段磷酸化, 也能形成小泡结构, 但 ATP 的生成较少, 它的 P/O 比值还很低, 这方面的问题, 尚有待于进一步的研究。

从 Racker 实验室的重组的工作看来, 已有的偶联因子已属充分, 偶联因子中 F_1 与 OSCP 是重组所必须的, 而有的偶联因子则不一定必须。另一方面疏水蛋白也是重组所必须的, Racker 把疏水蛋白的作用看作是质子移位剂或质子通道, 因为在制备含寡霉素敏感的 ATP 酶的细胞色素氧化酶小泡时, 若不加疏水蛋白, 则呼吸活力远较含疏水蛋白的小泡为低。

近来 Yong 与 King 报告用细胞色素 c 与细胞色素氧化酶制备的细胞色素 c-细胞色素氧化酶复合物在催化维生素丙氧化时能偶联磷酸化, 这样一个不加磷脂、疏水蛋白与偶联因子的简单的重组系统, P/O 比值可以达到 0.4—0.6, 并且有明显的呼吸控制。Racker 与 Kandrach 声称 Yong 与 King 的实验未能被他们重

复^[46]。但是, 如果今后能够证实 Yong 与 King 的结果, 则对于氧化磷酸化的研究产生巨大的影响。

重组的研究对于了解线粒体在细胞内的生物发生也是一个很重要的方面。现已知道, 线粒体的大多数蛋白是由细胞核-细胞浆蛋白生物合成系统合成的, 而线粒体的 DNA 与蛋白合成系统只合成少数蛋白, 如疏水蛋白、细胞色素 b、 c_1 , 以及细胞色素氧化酶的一部分与 ATP 酶复合物的膜组分的一些亚基等。磷脂主要是在内质网系合成的。对于疏水蛋白如何先与磷脂结合, 各种蛋白成分又如何渗入到疏水蛋白与磷脂形成的膜上生成完整的线粒体内膜, 这个问题也已经成为研究氧化磷酸化作用的一个重要方面。

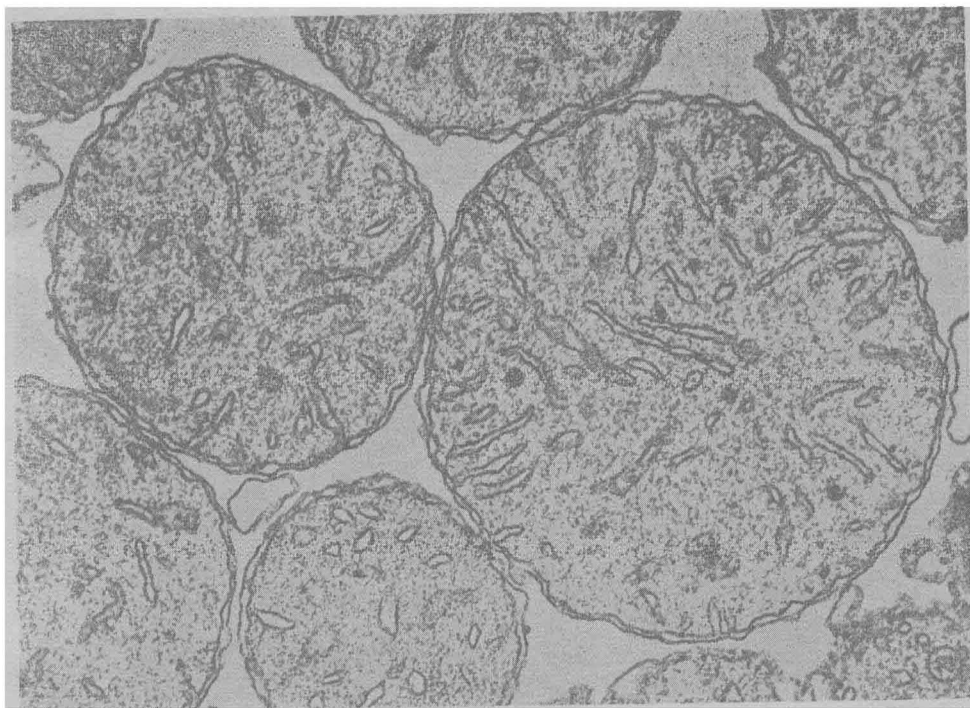
四、结 束 语

近年来氧化磷酸化作用研究的进展与生物膜的概念的运用是分不开的。但是, 由于氧化磷酸化作用的复杂性, 有的基本问题也还没有搞清楚, 例如呼吸链, 至今也还没有一个被人们普遍接受的图式。因此, 这方面的研究还有大量的工作要做, 需要生物化学, 生物物理, 物理化学等各个学科的工作者共同努力。氧化磷酸化作用在许多方面与光合磷酸化相似, 过去这两方面的研究一直是互相促进的, 相信今后这二个生物化学研究的重要领域的进展将会进一步说明这二者之间的内在联系。

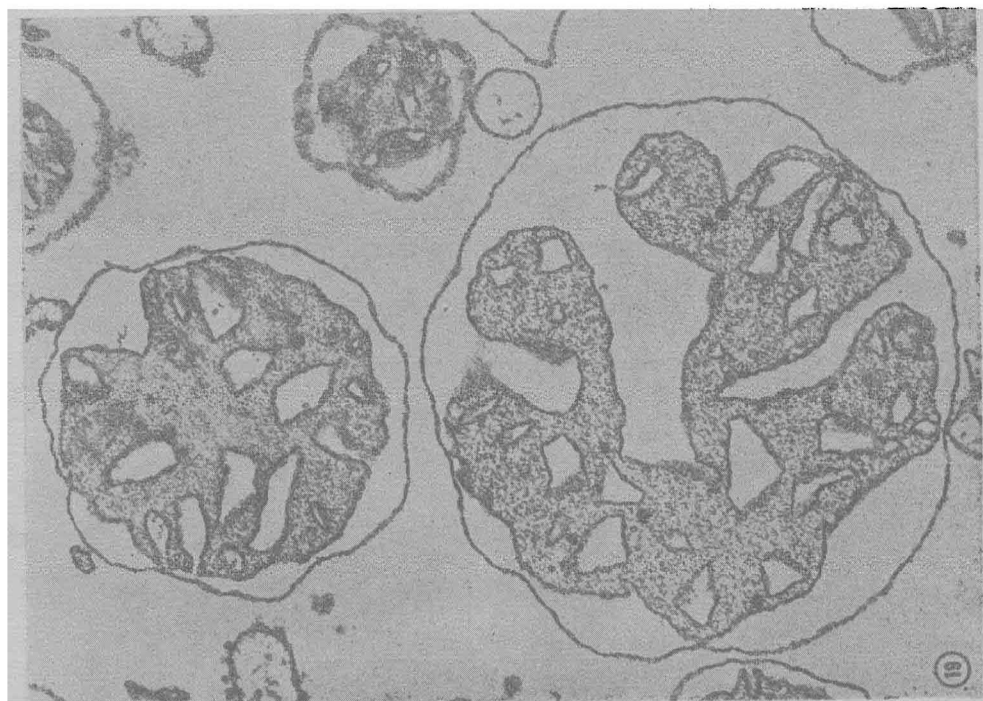
参 考 资 料

- [1] 伍钦荣: 生物化学与生物物理学报, 5, 325, 1965.
- [2] Green, D. E. & Baum, H.: *Energy and the Mitochondrion*, Academic Press, New York, 1970.
- [3] Pullman, M. E. & Schatz, G.: *Ann. Rev. Biochem.*, 36, 539, 1967.
- [4] Lardy, H. A. & Ferguson, S. M.: *ibid*, 38, 991, 1969.
- [5] van Dam, K. & Meyer, A. J.: *ibid*, 40, 115, 1971.
- [6] Slater, E. C.: *Nature*, 172, 975, 1953.
- [7] Chance, B. & Williams, G. R.: *Adv. Enzymol.*, 17, 65, 1956.
- [8] Ernster, L.: *Intracellular Respiration*, Phos-

- phorylating and Non-Phosphorylating Oxidation Reactions, Pergamon Press, London, p. 115, 1963.
- [9] Barltrop, J. A., Grubb, P. W. & Hesp, B.: *Nature*, **199**, 759, 1963.
- [10] Clark, V. M.: *Biochem. J.*, **86**, 7p, 1963.
- [11] Thanassi, J. W. & Cohen, L. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 389, 1969.
- [12] Higuchi, T. & Gensch, K. H.: *J. Amer. Chem. Soc.* **88**, 3874, 1966.
- [13] Brinigar, W. S. & Wang, J. H.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **52**, 699, 1964.
- [14] Painter, A. A. & Hunter, F. E. Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 387, 1970.
- [15] Racker, E. & Horstman, L. L.: *Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, Academic Press, New York, 1972.
- [16] Wang, J. H.: *Sci.*, **167**, 25, 1970.
- [17] Wilson, D. F. & Dutton, P. L.: *Archs. Biochem. Biophys.* **136**, 583, 1970.
- [18] Wilson, D. F. & Dutton, P. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 59, 1970.
- [19] Chance, B., Wilson, D. E., Dutton, P. L. & Erecinska, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **66**, 1175, 1970.
- [20] Chance, B., Lee, C. P. & Schoener, B.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 4574, 1966.
- [21] Slater, E. C. & Berden, J. A.: *Structure and Function of Oxidation-Reduction Enzymes*, Pergamon Press, Oxford, 291, 1972.
- [22] Slater, E. C.: *Quar. Rev. Biophys.*, **4**, 36, 1971.
- [23] Rieske, J. S. & Gupta, U. D.: *FEBS Lett.*, **20**, 316, 1972.
- [24] Hackenbrock, C. R.: *J. Cell Biol.*, **37**, 315, 1968.
- [25] Hatase, O. & Oda, T.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **71**, 759, 1972.
- [26] Muscatello, U., Guarriera-Bibyleva, V. & Buffa, P.: *J. Ultrastructure Res.*, **40**, 235, 1972.
- [27] Weber, N. E.: *J. Cell Biol.*, **55**, 457, 1972.
- [28] Blair, P. V. & Munn, E. A.: *ibid*, **49**, 727, 1972.
- [29] Azzi, A., *Probes and Membrane Function*, Academic Press, New York, 209, 1971.
- [30] Lee, C. P. & Ernster, L., *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 218, 1966.
- [31] Barrett-Bee, K. & Radda, G. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 211, 1972.
- [32] Radda, G. K.: *Current Topics in Bioenergetics*. Academic Press, New York, Vol. 4, 81, 1970.
- [33] Mitchell, P.: *Nature*, **191**, 144, 1961.
- [34] Mitchell, P.: *Biol. Rev.*, **41**, 445, 1966.
- [35] Racker, E. & Kandrach, A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 7069, 1971.
- [36] Mitchell, P., Moyle, J. & Smith, L.: *Eur. J. Biochem.*, **4**, 9, 1968.
- [37] Addanki, S., Cahill, F. D. & Sotos, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2337, 1968.
- [38] Mitchell, P. & Moyle, J.: *Eur. J. Biochem.* **7**, 471, 1969.
- [39] Jasaitis, A. A., Nemceek, I. B., Severina, I. I., Shulachev, V. P. & Smimova, S. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 485, 1972.
- [40] Thayer, W. S. & Hinkle, P. C.: *Fed. Proc.*, **32**, 669 Abs, 1973.
- [41] Libeiman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A. & Skulachev, V. P.: *Nature*, **222**, 1076, 1969.
- [42] Bakker, E. P., van den Heuvel, E. J., Wiechmann, A. H. C. A. & van Dam, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 78, 1973.
- [43] Racker, E., *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts*, van Nostrand Reinhold Co., New York, 127, 1970.
- [44] Green, D. E. & Ji, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**, 726, 1972.
- [45] Kagawa, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 297, 1972.
- [46] Racker, E. & Kandrach, A.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 5841, 1973.
- [47] Ragan, C. I. & Racker, E.: *ibid*, **248**, 2563, 1973.
- [48] 林其淮, 伍钦荣: *生物化学与生物物理学报*, **4**, 558, 1964.
- [49] Tzagoloff, A., Rubin, M. S. & Siera, M. F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 71, 1973.
- [50] Kagawa, Y., Kandrach, A. & Racker, E.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 676, 1973.



甲、凝聚构型。电子传递膜的空间折皱是不规则的,基质体积约为线粒体总体积的 50% (放大 110,000 $\times$)



乙、正常构型。电子传递膜的空间折皱组成峰,在从凝聚向正常构型转变时,基质的体积增加 100% (放大 110,000 $\times$)

图 1 不同代谢状态下线粒体的超微细结构(根据 Hackenbrock^[41])