

- 10 Ladik J, Seel M, Otto P *et al.* Chem Phys, 1986; **108**: 203
- 11 Bakhshi A K, Ladik J, Seel M *et al.* Chem Phys, 1986; **108**: 233
- 12 Bakhshi A, Otto P, Liegener M *et al.* Int J Quantum Chem, 1990; **38**: 573
- 13 叶元杰. 物理化学学报, 1991; **7**: 257
- 14 叶元杰. 高等学校化学学报, 1993; **14**: 812
- 15 Ye Y J, Ladik J. J Math Chem, 1993; **14**: 141
- 16 Ye Y J, Ladik J. Phys Rev, 1993; **B48**: 5120
- 17 Ye Y J. Int J Quantum Chem, 1994; **52**: 491
- 18 Odagaki T, Lax M. Phys Rev, 1982; **B26**: 6480
- 19 Ye Y J, Ladik J. Phys Rev, 1995; **B51**: 13091
- 20 Jiang Y, Ye Y J, Chen R S. Biophys Chem, 1996; **59**: 95
- 21 Gazdy B, Seel M, Ladik J. Chem Phys, 1984; **86**: 41
- 22 Ye Y J. J Math Chem, 1993; **14**: 121
- 23 Mott F N, Davis E A. Electronic process in non-crystalline materials. Oxford: Clarendon, 1971: 215
- 24 Blundel T, Dodson G, Hodgkin D. Adv Proc Chem, 1972; **26**: 279
- 25 Gammeltoft S. Physiol Rev, 1984; **64**: 1321
- 26 Baker E N. Phil Trans Royal Soc London, 1988; **319**: 369
- 27 Liang D C, Chang W, Wan Z. Biophys Chem, 1994; **50**: 63

The Hopping Mechanism of Conductivity in Proteins and Its Applications. Ye Yuanjie

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China).

Abstract The recent theoretical researches on the conductivity in proteins were reviewed. The investigations of the past decades were briefly introduced and commented. It was discussed that the approximations and numerical methods on the calculations on the electronic structures and theoretical conductivity of an entire molecule of proteins. The basic characteristics of the electronic structures and theoretical conductivity of proteins were concluded from the calculated results. Finally, an electronic channel model on the trans-membrane signal transformation by insulin and its receptor was presented from those results of insulins.

Key words protein, conductivity, hopping mechanism, trans-membrane signal transformation

菌紫质研究的新进展

蒋秋兴 胡坤生*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 菌紫质 (BR) 是嗜盐菌紫膜中的唯一蛋白质, 野生型的 BR 分子含有 248 个氨基酸残基, 其中一个视黄醛通过希夫碱基连结在第 216 位赖氨酸上, 它具有质子泵的功能. 光照下, BR 进行光循环, 光循环又与质子泵过程相关联. 菌紫质的结构和功能方面的研究已有很大进展, 但其光循环途径和质子泵的机理还不太清楚. 文章概述了近年来对菌紫质结构, 光循环和质子泵机理研究的进展, 尤其对争论较大的菌紫质光循环途径的四类模型作了较详细的介绍.

关键词 菌紫质, 结构, 光循环, 质子泵

自然界存在两大类利用光能的生物系统. 真核生物通过叶绿素感光并依赖经典的光合作用系统将光能转化成氧化还原势; 而古细菌则通过含有视黄醛生色团的有色蛋白将光能转变为电化能 (跨膜的质子梯度). 嗜盐菌是这类古细菌的典型, 其细胞膜蛋白 (菌紫质,

BR) 是迄今为止研究得最清楚的膜蛋白之一^[1].

主要是三方面的原因使 BR 研究在过去 20 多年里逐渐成为一个独立的领域. 首先, BR

* 通讯联系人.

收稿日期: 1995-10-11, 修回日期: 1996-01-09

相对比较简单（由一含 248 个氨基酸残基的多肽链和视黄醛按 1:1 组成），具有极佳的稳定性，结构功能研究较清楚，且极易大量高纯度地获得。其次，BR 的结构功能研究具有代表性。一方面，BR 是以 α 螺旋七次跨膜的一个蛋白质超家族的典型，其结构和功能对研究这些膜蛋白有借鉴和指导作用；另一方面，BR 是一种质子泵，搞清楚其质子跨膜转运的机制对其他离子跨膜转运蛋白的功能研究一定有所裨益。此外，菌紫质的高稳定性及其快速的光循环和光电响应，使之成为最有前途的可应用

的生物分子^[2]。近年来，以 BR 为基质的高级非线性光电材料、全息记录介质、神经网络、化学探测器、耐高温的光致色变材料和人造视网膜的研究，展示了 BR 广阔的应用前景^[3]。同时，应用的需要又为 BR 结构和功能研究注入了强劲的动力。

本文将概要介绍近年来 BR 结构和功能（包括光循环和质子泵）的研究进展。

1 BR 的结构

对 BR 结构的研究目前主要有两个方面：

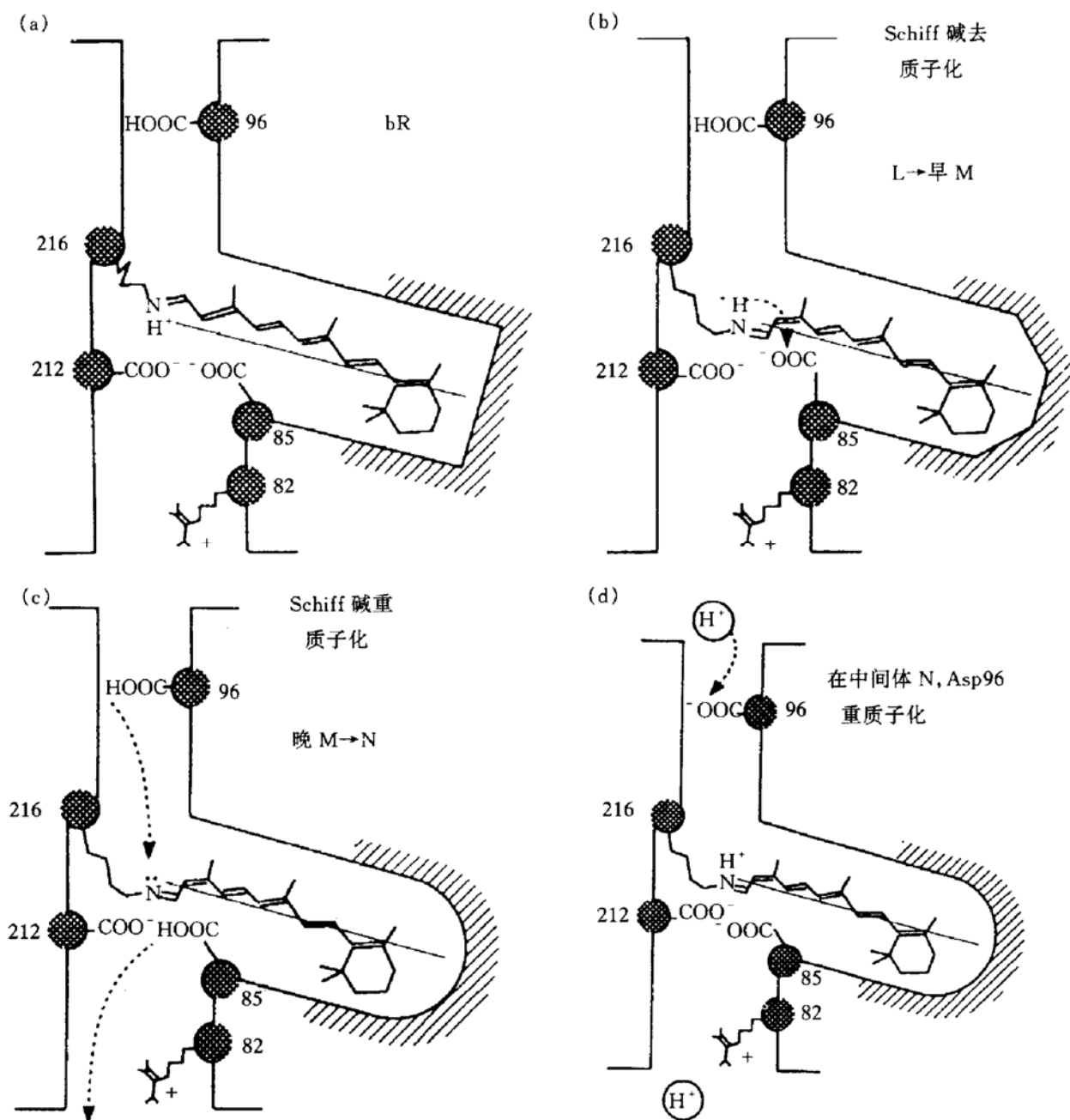


图 1 菌紫质一次光循环中质子传递的四个阶段^[4]

基态 BR (光适应或暗适应状态) 的结构或光适应 BR 光循环中间体相对基态 BR 的结构变化。

野生型 BR 以三体为单位在膜中形成二维晶格。自从 Henderson 等的开创性工作以来, 电子衍射方法一直是研究 BR 结构的主要手段。Henderson 等^[4]利用超低温电子显微镜获得了较高分辨率的基态 BR 的结构图像, 分析了生色团周围 21 个氨基酸残基的位置及与视黄醛的空间关系, 确定了构成质子通道的 26 个氨基酸残基的相对位置, 并提出质子转运的主要过程及 Schiff 碱基在泵出和摄入质子状态的构象 (图 1)。他们的结果还提示质子通道胞质侧的一半是窄而疏水的, 另一半则是开放且亲水的, 质子转运是一系列残基侧链基团 pK_a 变化的结果。

由于时间分辨技术和低温捕捉光循环中间体的实现, 对中间体的结构研究得以迅速发展。电子衍射、X 射线衍射以及中子衍射技术的研究表明中间体 M 与基态 BR 有明显差异。主要表现在细胞膜内侧螺旋 F 和 G 附近的结构变化。对通过定点突变引入半胱氨酸后连接自旋标记的 BR 进行时间分辨电子顺磁共振研究, 更进一步证实 M 的衰减伴随着螺旋 C-D 和 E-F 间的连结肽段的构象变化 (在膜内侧)。这些结果提示 Schiff 碱基的重质子化和质子摄取过程伴随着 BR 构象的显著变化, 即 Asp96 附近微环境的显著变化, 从而使质子通道胞质侧一半的疏水性降低。

2 BR 的功能

菌紫质是一种光驱动的质子泵, 其功能研究主要集中于研究光循环过程的动力学和热力学以及偶联的质子转运过程的分子机理。这里就这两方面介绍近年来的研究成果。

2.1 BR 的光循环

几乎自研究伊始, 对 BR 光循环途径就存在不同看法。从最早 Lozier 等通过测定中间体出现的先后次序提出线性单向的四中间体机制^[5], 先后提出了协同模型, 平行模型和分支

(旁路) 模型四种光循环模型。由于动力学过程自身的复杂性以及通过动力学数据拟合确定光循环途径所面临的种种困难, 四类光循环模型一直就在争论中演变。近年来, 不少实验结果又为四类模型提供了一些新的证据。如 BR 光循环中出现“Q”态, 并能保持长寿命^[6]。下面介绍四种光循环模型的基本内容。

2.1.1 线性途径: Nagle 等 (1982 年) 对动力学模型进行理论分析后指出单向线性模型和单向简单分支模型均不能合理解释各中间体的动力学特征。Paradi 等 (1984 年) 的结果表明在循环中引入逆向反应则可以解释中间体的复杂行为, 中间体 N 被确认, Xie 等 (1987 年) 提出对循环的动力学过程进行全局分析 (global analysis) 的理论, Zimanyi 等 (1989 年) 引入光学光谱多通道分析器 (optical spectroscopic multichannel analyzer) 进行较宽波长范围内的动力学模拟。这样, 线性可逆模型就逐渐发展起来。Varo 等 (1991 年) 对光循环过程的微分方程进行数值计算, 分析了中间体 K、L、M、N 和 O 的自由能及中间体相互转变的热力学和动力学参数, 提出 $BR \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow M_1 \leftrightarrow M_2 \leftrightarrow N \leftrightarrow O \rightarrow BR$ 的线性模型。为了解释不同 pH 下质子泵的不同机制, Lanyi^[7] 又将此模型稍作修改 (图 2)。该模型认为, 中间态 K、L 和 M_1 的自由能相近, $M_1 \rightarrow M_2$ 及 $O \rightarrow BR$ 过程中自由能下降较多, M_2 、N 和 O 的自由能亦相近; $M_1 \rightarrow M_2$ 是几乎不可逆的开关步骤, 反映了 Schiff 碱基的取向变化; 质子释放经由一靠近膜表面的未知基团 X ($pK_a = 5.8$)。Mathies 等^[8]利用时间分辨的共振拉曼光谱和 Gerwert 等^[9]用傅氏变换红外光谱 (FTIR) 分析中间体的生色团及蛋白骨架和侧链基团的构象变化, 也提出了类似的线性模型, 其中 Mathies 等^[10]的 C-T 模型是基于蛋白构象变化的。最近, Lozier 等利用全局拟合方法分析了多个波长及主要中间体的变化参数, 认为线性模型在描述质子转移方面是不够的, 并提出至少存在两种不同质子化状态的 L、M 和 N 才能很好地解释循环的动力学过程

及质子转运. 如此, 线性模型就成了一个网络模型. Gergely 及其同事^[11]通过研究不同 pH 下 D96N BR 突变体的中间体 K、L 和 M 的动力学及光致电信号继续支持线性模型, 并在模型中增加两个相互平衡的 L 中间态. 此外, 利用暗适应时 D85A BR 突变体三种平衡状态 (分别类似中间体 L、M 和 O) 的转变关系及特征, Turner 等 (1993 年) 也提出支持线性可逆模型的证据.

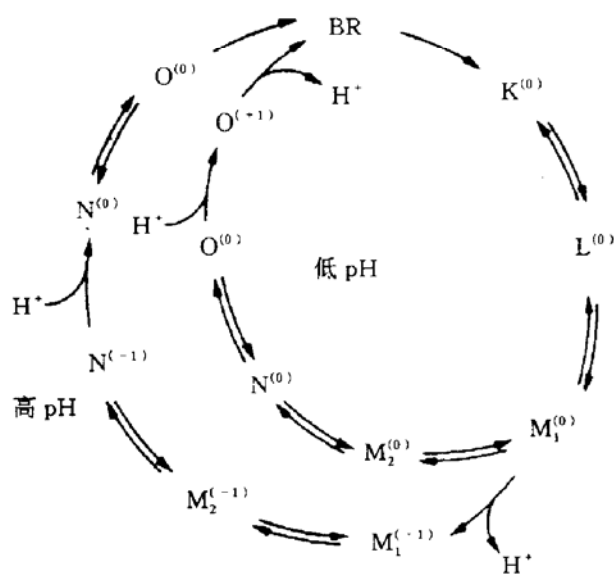


图 2 菌紫质光循环的一种模型^[7]

包括典型的中间体及其在循环中质子化状态的变化 (上标表示).

间存在协同作用最明显的证据来自圆二色谱^[11]所反映的激子相互作用. 至于协同效应在光循环中的作用一直没有得到足够的重视. 原因之一可能是破坏三体结构之后光循环的许多特征 (如 M 的双相衰减) 仍然存在. 最近, Dancshazy 等^[12]研究了不同光强对 M 快慢成分的相对含量的影响, 根据单值分解 (single value decomposition, SVD) 方法分析了光强对 M 动力学过程的滴定因子 (titrant) 作用, 并据 N 的衰减和 BR 恢复的慢相一致, 提出 BR 分子之间存在协同作用, M 的快慢衰减成分通过不同的循环途径回到 BR. 其中, M^f 经中间态 O 回到初态, M^s 直接回到 BR. 至于 N, 一种可能的看法是 M^f→N→BR 或 M^f→N→O→BR. 这样, 至少在后半程, 他们将协同模型与平行模型关联起来.

主要仍是三个研究小组在继续为平行途径寻找证据. Ebrey 及其同事认为 BR 以三种形式存在 (BR₆₀₅ [蓝膜], BR₅₆₈ 和 BR_{569.5} [碱性形式])^[13], 碱性形式的 BR 与 pK_a 约 8.3 的基团 (可能是酪氨酸 57, 酪氨酸 185, 精氨酸 82 或/和水分子单独或协同作用) 有关, 三种 BR 以三种不同的途径进行光循环, 且仅 BR₅₆₈ 有质子泵功能. El-Sayed 等通过检测超快的 BR 光激发态 (photoexcited state) I₄₆₀ 衰减的主成分寿命 (500~1300 fs) 的 pH 依赖性 (表观 pK_a 9~10), 认为基态 BR 至少有两种不同的类型 (species, substates or subspecies), 这些类型的光激发态有不同的衰减速率, 经历不同的光循环. Stockburger 小组^[14]则用时间分辨共振拉曼光谱技术更严格地研究了中间体 K₅₉₀, L₅₅₀, M₄₁₂, N₅₆₀ 和 O₆₄₀ 的特征, 并提出 M^f 和 M^s 分别来自 L→M^f→N (或 O)→BR 和 L→M^s→BR, M^s→BR 和 N→BR 的转变必须要从膜外相获得一个质子, 该质子催化 Schiff 碱基从 Asp85 得到质子, 并被泵到膜的另一侧. 这构成一与通常认为的质子转移过程相悖的机制, 对 Asp96、Asp212、Thr46 等关键氨基酸残基的作用确乏阐释, 是否可信尚待确定.

尽管许多结果都支持线性模型, 但是不少结果并不完全一致. 最明显的一点是质子转运与光循环偶联方面的分歧, Lanyi^[7]认为质子释放和摄取的次序依赖于膜外 pH, Mathies 等^[10]认为 M₄₁₂ 的形成伴随着质子向膜外运动而 N 的形成与质子摄取同步, Gerwert 等^[9]则认为 O 的生成伴随着质子摄取. 此外, 进行全局拟合分析时主要依据是拟合的优良, 主观性强. 而且, 有些结果不符合化学反应原理, 如 Varo 等的计算表明 M₂→N 和 N→M₂ 两个互逆的一级反应, 前者不依赖 pH 而后者却有极强的 pH 依赖性. 当然, 线性模型也不能合理解释支持其他模型的证据.

2.1.2 协同模型和平行模型: 天然 BR 分子

协同模型确认激发光强可以影响紫膜 BR 的光循环动力学^[13]. 至于协同作用在光激发态 BR 之间是否存在, 三种类型的 BR (Ebrey 等) 如何互相作用, 仍待继续研究. 而且, Stockburger 等^[14]提出的 BR 类型与 El-Sayed 等及 Ebrey 等提出的不同 BR 状态有无对应关系还不清楚. 可以肯定的是协同和平行模型中引入的参数较多, 解释线性模型的动力学模拟结果是可行的. 此外, 直观的看法是 BR 作为一个由数以千计的多种原子有规则堆积成的复杂系统, 似乎应该有复杂的状态分布和行为, 而不能一味追求简单性.

2.1.3 分支(旁路)模型: 早期的分支模型仅仅考虑了中间体 M 较复杂的动力学, 并将循环看成顺序的一级过程. 随着循环动力学分析的理论 and 实验技术的发展, 分支模型亦得到更有力的阐明. Nagle 等^[15]用数十种可能的模型拟合 Mathies 等^[8]的共振拉曼光谱结果, 认为在线性模型中须引入 L→N 旁路. Takei 等分析了高 pH 下部分脱水的紫膜干膜光静态中间体 M 的两种热衰减 (thermal decay) 成分 FTIR 谱的差异, 提出 $M_2 \rightarrow M_1$ 的蛋白构象变化能垒被绿光激发克服后, M_1 可通过 Schiff 碱基从 Asp85 获得质子返回基态. 这与 Varo 等观察到的脱水导致中间体 M 的衰减在无中间体 N 时通过 M 旁路相一致. Jiang 等^[16]通过研究蜂毒素对紫膜光循环中间体 M 的快慢衰减成分的一次循环产量和衰减速率的不同影响, 认为正常紫膜 M_{412f} 和 M_{412s} 不可能由可逆的 M 和 N 互变产生, 亦非来自长寿命的中间体 M, 并据此提出 M 支路的存在. Jiang 等不否认光循环的前半程存在平行路径的可能. 在这点上, 已经提出的分支途径都不能否认平行模型.

许多实验条件的改变均导致光循环的动力学或循环途径的改变. 说明 BR 分子的不少基团有不同的状态, 从而 BR 分子的光循环是多个基团协同作用的结果. 加之 BR 分子之间可能的相互作用, 其循环的路径具有多样性似是可以接受的.

2.2 BR 的质子泵功能

由于 BR 质子转运的代表性, 已有许多有关的综述. 在此只介绍目前的主要结论.

现已知道 BR 的质子转运有六个主要步骤^[10]. a. 光激发使 BR 生色团异构化, Schiff 碱基的位置变化弱化了与 Tyr185、Asp212、Arg82、Asp85 等的相互作用, 蛋白质构象出现扭曲力; b. Schiff 碱基将一个质子传递给去质子化状态的 Asp85, 细胞内侧螺旋 F 和 G 附近, C-D 和 E-F 间的连接肽发生构象变化, 改变了 Schiff 碱基的取向, 增强了质子通道细胞内侧一半的亲水性, 也因此提高了 Schiff 碱基的 pK_a ; c. 质子经过一未知基团释放到胞外侧; d. 蛋白质构象的扭曲力被松弛, 质子从质子化状态的 Asp96 传递给 Schiff 碱基 (可能亦通过未知基团, 包括需要一些水分子); e. Asp96 从胞内侧重新获取质子; f. 蛋白质驱动生色团由 13-顺再异构化为全反形式, BR 回复到基态. Dencher 等用连接与 BR 表面 Lys129 的荧光蛋白检测到质子从 BR 分子内释放到膜表面与 M 的生成同步, 用水溶性的荧光基团则显示质子从膜表面向液相扩散发生在 M 的衰减过程 (步骤 c), 而且, 利用 D85E 突变体的研究^[17]还提示 Asp85 和质子的摄取有反馈性影响, 即质子泵出和摄入的过程是相互偶联的 (尽管在时间上是有先后的). 关于光循环过程与质子转运过程的偶联可参考上述文献.

有关 BR 质子泵功能的许多问题仍有待进一步探讨. 例如, 许多光致生电性的测量结果如何纳入质子转运过程; 蛋白骨架和生色团的构象变化如何介导和调节质子传递; 不同条件下, 质子泵功能如何作相应的改变等等. 可以预期, 随着 BR 研究的深入, 将能阐明其质子转运的分子机理.

综上所述, BR 的结构和功能的研究对膜蛋白的研究有极大的启发性. 利用 BR 的结构已经初步确定了不少膜蛋白在膜中的构象. BR 与嗜盐菌感光蛋白 SR1 和 SR2 及氯离子泵 hR 的结构和功能的相似提示了一些膜蛋白结

构功能关系的一般规律。同时, BR 的质子转运机理的研究极大地丰富了我们对于离子跨膜过程的认识, 对许多离子通道和离子转运蛋白的研究具有指导意义。

参 考 文 献

- 1 Khorana H G. J Biol Chem, 1988; **263** (16): 7439
- 2 Vsevolodov N N, Dyukova J V. TIBTECH, 1994; **12** (3): 81
- 3 黄莹, 余涌, 胡坤生, 生物化学与生物物理进展, 1993; **20** (4): 263
- 4 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A *et al.* J Mol Biol, 1990; **213**: 899
- 5 Lozier R H, Bogomolni R A, Stoeckenius W. Biophys J, 1975; **15** (9): 955
- 6 Birge R. R. Scientific American, 1995; **272** (3): 90
- 7 Lanyi J K. Biochim Biophys Acta, 1993; **1183** (2): 241
- 8 Ames J B, Mathies R A. Biochemistry, 1990; **29**: 7181
- 9 Souvignier G, Gerwert K. Biophys J, 1992; **63**: 1393
- 10 Mathis R, Lin S W, Ames J *et al.* Ann Rev Biophys Biochem, 1991; **20**: 491
- 11 Cassim J Y. Biophys J, 1992; **63** (5): 1432
- 12 Dancshazy Zs, Tokaji Zs. Biophys J, 1993; **65**: 823
- 13 Kono M, Misra S, Ebrey T G. FEBS Lett, 1993; **331** (1~2): 31
- 14 Eisfield W, Pusch C, Stockburger M *et al.* Biochemistry, 1993; **32**: 7196
- 15 Nagle J F. Photochem Photobiology, 1991; **54** (6): 897
- 16 Jiang Q-X, Hu K-S, Shi H. Photochem Photobiol, 1994; **60** (2): 175
- 17 Heberle J, Oesterhilt D, Dencher N A. EMBOJ, 1993; **12** (10): 3721

New Progress in The Study of Bacteriorhodopsin. Jiang Qiuxing, Hu Kunsheng (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract Bacteriorhodopsin (BR) is the only protein in the purple membrane (PM) from *Halobacterium halobium*. Wild-type BR contains a single-chain polypeptide of 248 aminoacid residues and a retinal attached to Lys216 of the peptide via a schiff base, BR has the function of proton pump, Upon illumination, BR goes through a photocycle which is considered to be correlated with its proton pumping process. The good progress has been made in the study of the structure and function of BR, but the path of photocycle and mechanism of proton pump are still not clear. The progress of the structure, photocycle and proton pump of BR in recent years are briefly introduced. And the four models of the path of photocycle which are in great argument are discussed in detail.

Key words bacteriorhodopsin, structure, photocycle, proton pump

胰岛素蛋白质工程研究进展*

王琼庆 冯佑民

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 近年来, 胰岛素蛋白质工程研究进展很快, 主要介绍具有临床意义的速效长效和高效胰岛素研究概况, 包括分子设计基础, 生物活性和应用前景等。此外, 还讨论了胰岛素的受体结合部位及胰岛素与其受体相互作用的研究近况。

关键词 胰岛素蛋白质工程, 速效胰岛素, 长效胰岛素, 胰岛素受体

* 本文部分内容曾在蛋白质-病毒学术讨论会上报告, 1995年9月, 无锡。

收稿日期: 1995-10-29, 修回日期: 1996-04-22