



膜结构与物质传送的一些问题

中国科学院上海生物化学研究所生物膜组

一、导 言

膜是细胞的重要组分，它具有独特的细微结构和多种功能^[1]。真核细胞(如高等动物)的膜结构，除了包围整个细胞的膜，称为质膜外，还有包围各种细胞器的膜，如线粒体膜、内质网膜、溶酶体膜和核膜等等，称为细胞内膜^[2,3]。各种细胞器的特征功能，严格地取决于这些膜所具有的特殊结构与功能^[4]。真核细胞的膜结构约占细胞干重的 70—80 %^[5]，它的代谢速度也极快，代谢转换率高达每小时 100 %^[6]。原核细胞(如细菌)没有明确的细胞器，因而它只有细胞外面的一层质膜，而没有细胞内膜。原核细胞质膜的结构比较复杂并具有多种功能，其中许多功能在真核细胞中是由各种细胞内膜实行的。如真核细胞的呼吸链是在线粒体内膜上，而原核细胞呼吸链的一整套酶系就存在于它的质膜上^[7]。

近年来，由于研究膜的分离分析技术的发展，使膜的超微结构和膜的磷脂、蛋白的研究有了迅速的进展。对膜的结构及其功能的研究，提出了新的概念。膜不仅仅是包围细胞质的口袋，或区分各细胞器的隔膜，膜还提供了细胞空间内的支持骨架，使酶和其它的非催化物质(磷脂、蛋白)在膜上有秩序地排列和正确地定位。实际上，几乎细胞的每一种功能活动，都是与膜提供了一个空间固定的骨架，以保证进行有条不紊的、高效率的反应分不开的。如能量转换、遗传信息的转录、运动、分泌和排泄、神经兴奋、兴奋的传导等^[8]。膜上的大分子载体蛋白，能与离子、糖、氨基酸等低分子量的物质专一地结合，选择性地有控制地将物质传送到细胞内外^[9]。

遵照毛主席“洋为中用”的教导，本文将着重叙述近年来对于膜结构知识的新的认识，膜上的磷脂和蛋白的物化性质，以及离子和小分子物质通过膜的传送的机制研究。

二、膜的分子结构和模型

早在 30 年代，Daniell 等认为^[10]，膜是由蛋白质和脂质组成，蛋白覆盖在脂双层的外面，构成“三夹板”模型(图 1)。在相当长的时期内，

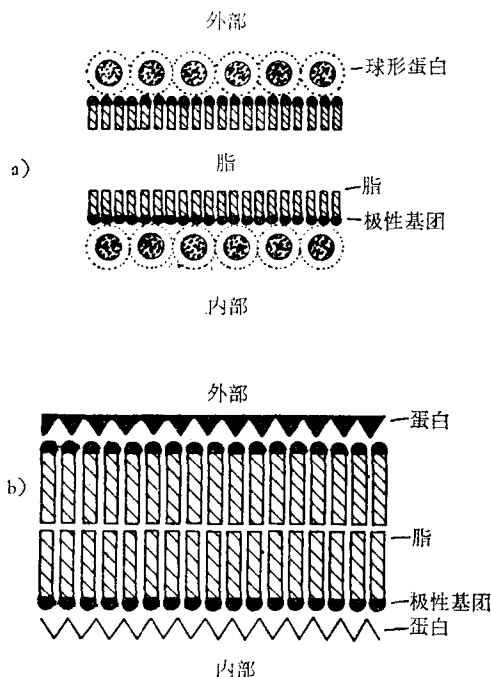


图 1 膜模型^[15]

不少实验证据，尤其是 50 年代电镜技术应用于生物膜结构的研究，都似乎支持这一对称的三层模型。Robertson 1959 年^[11]应用高锰酸钾或钼酸化学固定技术，观察了不同来源的生物膜，发现各种膜都具有 75—100 Å 厚的不对称的三层结构：二条约 20 Å 左右的暗带，中间夹一条

35 Å 宽未能染色的空间。抽去膜脂并不改变这一电子显微镜图谱。因此认为,暗带可能是表示蛋白,而中间未能染色的是脂质。在这一实验基础上,他提出“单位膜”^[12,13]的概念,各种膜都具有这一基本相同的三层结构,在膜中蛋白是伸展的β构型,它与脂双层分子的极性基团非共价地结合。“单位膜”认为各种不同功能的膜都具有严格相同的结构,这样一种机械的观点本身具有哲学上的缺陷。近年来,随着各种物理化学技术应用于生物膜的研究,以及对膜蛋白的深入研究,对“单位膜”的概念提出了严肃的疑问。

现代膜结构新的概念是建立在对细胞膜各种组分的深入研究的基础上的。由于各种膜的分离提纯,就有可能分析比较不同膜的化学成分。现在知道,膜主要由蛋白质和脂类构成,此外还有少量糖、核酸和水^[14,15]。蛋白质约占

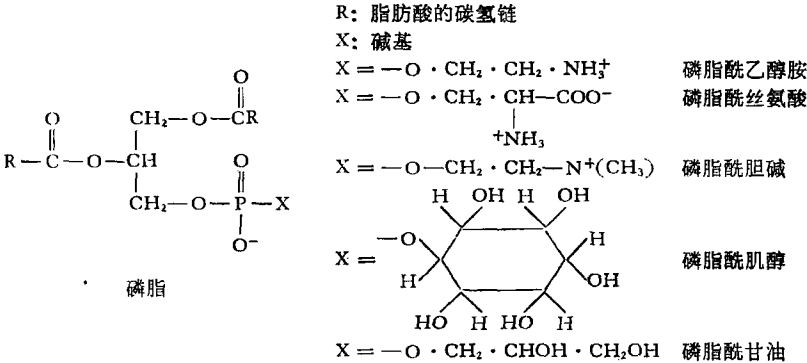
60—75%,脂质占25—40%,糖等占5%左右(表1)。不同的膜,蛋白与脂质的比例是不同

表 1 细胞膜的化学组成^[14]

膜	蛋白%	脂%	糖%
髓鞘质膜	18	79	3
血小板	33—42	58—51	7.5
小鼠肝细胞	46	54	2—4
人红血球	49	43	8
阿米巴	54	52	4
大鼠肝细胞	58	42	(5—10)
L 细胞	60	40	(5—10)
Hela 细胞	60	40	2.4
大鼠肝细胞核膜	59	35	2.9
牛视网膜杆状细胞	51	49	4
线粒体外膜	52	48	2.4
内质网系膜	67	33	
线粒体内膜	76	24	(1—2)
革兰氏阳性菌	75	25	
类菌质体 (mycoplasma)	58	37	1.5

表 2 生物膜脂质的化学成分^[16]

脂 类 %	动 物				细 菌			
	髓 鞘	红血球	线粒体	微粒体	固氮菌	大肠杆菌	根 癌 病 土壤杆菌	巨大芽孢 杆 菌
胆固醇	25	25	5	6	0	0	0	0
磷脂								
磷脂酰乙醇胺	14	20	28	17	100	100	90	45
磷脂酰丝氨酸	7	11	0	0	0	0	0	0
磷脂酰胆碱	11	23	48	64	0	0	10	0
磷脂酰肌醇	0	2	8	11	0	0	0	0
磷脂酰甘油	0	0	1	2	0	0	0	45
心磷脂 (cardiolipin)	0	0	11	0	0	0	0	0
(神经)鞘类脂质								
(神经)鞘磷脂	6	18	0	0	0	0	0	0
(神经)鞘脂 (ceramide)	1	0	0	0	0	0	0	0
脑苷	25	0	0	0	0	0	0	0
其它	11	1	0	0	0	0	0	0



的。功能较复杂的膜,如细菌质膜和线粒体内膜,蛋白质含量较高;而包在神经细胞外主要起绝缘作用的髓鞘仅含 18% 的蛋白质。)

从表 2 看来^[16],磷脂是构成各种膜脂的主要成分。磷脂是一个两性分子,每一分子都由磷脂酰碱基的极性部分和脂肪酸碳氢链的非极性部分所构成。将磷脂悬浮于水溶液中,经过适当处理(如声波)后,磷脂分子群集在一起,形成一个个管状或封闭的小泡状的脂质体^[17]。磷脂的极性基团指向水,而其非极性的脂肪酸碳氢链聚集在一起与水隔离,在水中处于热力学最稳定状态。用 X 光衍射技术研究脂质体和生物膜中磷脂的排列证明,生物膜中的磷脂是平行的双分子层排列,极性头排在双层的外表面,脂肪酸碳氢链向着内部。)

蛋白质按其与膜脂相互作用的不同方式,可将其分为两类^[18,19]。一类称为外周蛋白;另一类称为固有蛋白。

外周蛋白 这类蛋白的特征是能溶解于水,它们通过较弱的非共价键(主要是静电作用)结合于膜的表面。某些温和的处理,例如改变环境的离子强度或 pH,加入金属螯合剂等,就能使它们从膜上溶解下来^[20]。结合在线粒体膜上的细胞色素 c、己糖激酶、髓鞘的碱性蛋白等都属于这一类(图 2)。

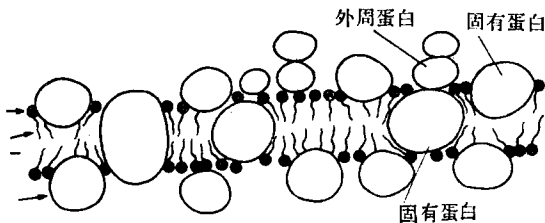


图 2

固有蛋白 这类蛋白的特征是水不溶的。它们插入到脂双层中,有的甚至贯穿整个膜的脂双层,与磷脂的非极性基团发生疏水反应(图 3)。只有用去污剂,有机溶剂抽提等较激烈的处理,才能把它从膜上“溶解”下来^[20,21],但是一旦从溶液中除去有机溶剂或去污剂,已“溶解”的固有蛋白又会迅速聚合起来。

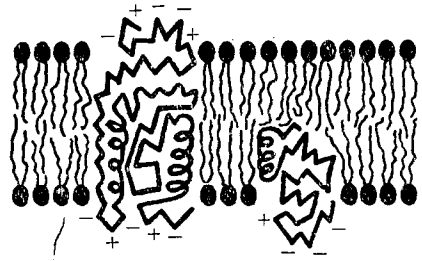


图 3 膜结构中脂-球蛋白的镶嵌模型^[18]

Bretscher^[22] 设计了一种不能穿透膜的放射性蛋白试剂,将它与完整红血球细胞(仅细胞膜的外表面的膜蛋白能与试剂反应)和除去血红蛋白的红血球空泡(膜的内、外两表面都能与试剂反应)反应,结果表明,红血球膜两边的蛋白质分布是不对称的,膜上的一个含量较高的糖蛋白(其分子量约十万)横贯了膜的整个脂双层。Steck^[23] 用蛋白水解酶消化红血球膜的实验,也获得相似的结论。

Branton^[24] 利用电子显微镜新的技术“冰冻腐蚀”观察了膜的内部结构。同样也证明了膜蛋白插入到了膜中。“冰冻腐蚀”以物理学的方法克服了化学固定脱水方法可能引起的人为矫作的现象^[25,12]。利用低温使疏水键大大减弱,因此切面总是沿着膜的脂双层疏水区中间劈开。这样从电镜中观察到的膜内部切面上散布着大量的 50 Å—85 Å 的颗粒。实验证明,颗粒的本质主要是蛋白质。

旋光色散和圆二色性光谱测定膜蛋白说明^[26,12],蛋白肽链中有相当大量的 α 螺旋构型,而没有 β 折叠。光谱观察进一步指出,蛋白质的 α 螺旋与脂质的疏水区之间有很强的相互作用。因而支持了膜蛋白是球形的,而不是以前假设的膜蛋白是覆盖在脂表面的伸展的 β 构型。

膜固有蛋白的疏水特性,使它在许多性质方面与一般的水溶性蛋白不同。实验指出^[14],固有蛋白含有较多的非极性氨基酸。这些氨基酸的疏水残基与脂双层的非极性区相互作用使蛋白固着在膜中。Strittmatter^[27] 用去污剂溶解了大鼠肝微粒体的细胞色素 b_5 ,发现其 N 端上的 44 个氨基酸中约有 60% 氨基酸是疏水的。这一疏水的 N 端肽链对于细胞色素 b_5 结合于

微粒体是十分重要的,并使细胞色素 b_5 具有疏水的特性。当用胰蛋白酶消化细胞色素 b_5 时,会释放出一个水溶性的有细胞色素 b_5 活性的部分,以及一个较小的水不溶的产物。因而指出,膜蛋白可能具有两性分子的特性。它的疏水质除了由于含有较多的疏水氨基酸外,还可能由于亲水氨基酸和疏水氨基酸在蛋白链中的不对称分布而引起的。

Frye^[28] 研究融合细胞的抗原在膜上的分布时发现,蛋白在脂双层母体中还能水平移动。总结上述实验, Singer 在 1972 年提出了一个“流动镶嵌”^[18]模型(图 4)。这模型表明,膜蛋白在膜的内外两侧的分布是不对称的,疏水的膜蛋白插入不连续的脂双层中,并能在脂双层的一定水平上移动。

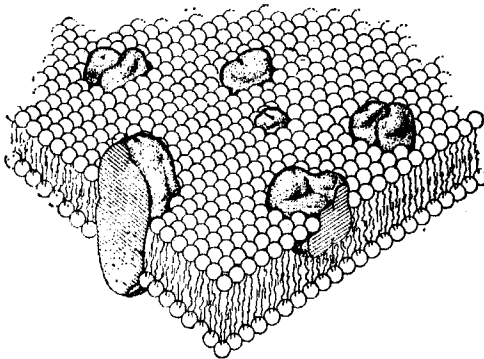


图 4 流动镶嵌模型^[18]

60 年代末,提出了一个与上述的脂双层模型基本不同的膜结构的概念。称为“亚基”学说。它认为膜的结构母体不是双分子脂层,而是大分子的脂蛋白亚基互相作用排列而成。每一个脂蛋白亚基既是结构的又是功能的实体。Sjöstrand^[17] 用超薄切片电镜技术观察到线粒体和光滑内质网膜上具有球形亚基颗粒。Benedetti 等用负染色技术,在大鼠肝细胞质膜上也观察到同样的球形亚基。Green^[16, 19] 等用胆酸盐处理线粒体内膜,获得均一的具有电子传递功能的脂蛋白复合物。当透析除去胆酸盐,这些脂蛋白亚基相互发生疏水反应,重新形成具有电子传递活性的膜结构。尽管“亚基”学说的证据还不够充分,但它是不可忽略的。

随着实验技术的进展与研究的深入,人们对膜的认识也不断深化。由于生物体中膜功能的多样性,很可能不同的膜具有不同的结构。例如从许多实验来看,髓鞘是最简单的双层磷脂结构,而线粒体内膜则形成脂蛋白亚基的可能性就较大。因此,企图以一种模型来概括生物体中具有各种不同功能的膜结构,是比较困难的。

三、物质是怎么通过膜的?

根据现代流行的膜模型概念,生物膜的基本结构是疏水的膜蛋白与不连续的脂双层的镶嵌结构。因此,膜显然是水溶性物质,如金属离子、糖、氨基酸……等通透的一个“屏障”。但在正常细胞中,这些水溶性的小分子物质却能以很高的速度穿透过膜,并在细胞内积累,而形成细胞内外的浓度梯度。如人的红血球中的钾离子浓度比细胞外的浓度高出一百倍,而钠离子浓度正好相反,细胞内的浓度比细胞外低一百倍^[29],大肠杆菌当它用乳糖作为碳源时,细胞内乳糖的浓度要比周围环境高出五百倍^[1]。保持这样的浓度差异对细胞的正常活动是绝对必要的,甚至微微改变浓度差异,就会引起细胞的死亡。对传送系统进行广泛而深入的研究指出,在膜中存在着大分子的载体蛋白^[2, 9],或称传送蛋白,它们能与极性的小分子专一结合而促进小分子物质通过膜传送。生物膜中存在许多这类传送蛋白,各自都具有专一的功能。其中有些蛋白是有催化活性的,有些则是没有催化活

表 3 一些膜传送蛋白的性质^[19]

来 源	被传送的底物	蛋 白 特 征		
		分子量 ($\times 10^{-4}$)	每个蛋白 与底物 结合点	结 晶
小鸡十二指肠	Ca^{++}	2.8	1	—
牛 脑	Na^+, K^+	67	1	—
伤寒杆菌	SO_4^{--}	3.2	1	+
大肠杆菌	β -半乳糖苷	3.1	—	—
”	亮 氨 酸	3.6	1	+
”	半 乳 糖	3.5	1	—
”	磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)	0.9	1	—

性的“哑吧”蛋白。最近已分离并纯化了某些传送系统中的传送蛋白^[14]，它们的分子量大约都在 30,000 左右(表 3)^[9]。

选择性的通透性是细胞膜的一个特性。通过选择性的通透性，细胞能接受或拒绝、保留或排出某种物质。物质通过细胞膜的传送有四种不同的方式^[30]：

1. 被动传送 就如溶质通过透析袋的扩散一样。杂乱运动的溶质分子通过细胞膜中含水的孔，而并不与膜上的分子发生反应。扩散速度决定于膜两边的浓度梯度及溶质分子大小，电荷性质等。

2. 促进扩散 在促进扩散中，被传送的物质（也称底物）与膜中的载体蛋白发生可逆结合。载体蛋白（或它与底物的络合物）在膜内外两面摆动。它在任何一面都可结合或释放底物。载体蛋白（或它与底物的络合物）摆动所需要的能量来自热能，或由于结合或释放底物时蛋白分子的微小形变，并不与能量代谢相偶联。

Stein 详细地研究了人红血球膜对葡萄糖的促进扩散^[31]。发现葡萄糖传送的初速度与膜外的葡萄糖浓度成正比，当膜外葡萄糖达到一定浓度时，传送速度就不再增加，葡萄糖的类似物能竞争性地抑制葡萄糖的传送；一般的蛋白质化学变性试剂都能抑制传送。在这基础上，他提出了一个葡萄糖促进扩散的模式图(图 5)。如图 5 所示，载体蛋白象一只穿过膜的插头，并以正

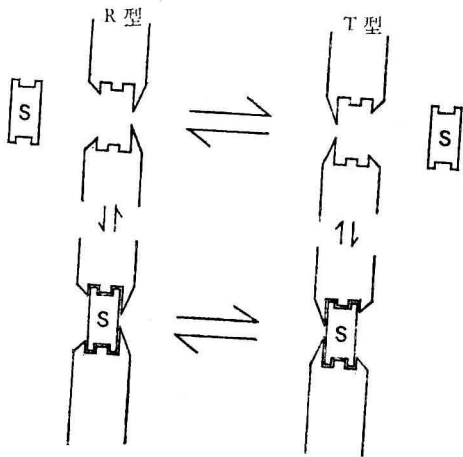


图 5 糖的促进扩散^[31]

型(R)和反型(T)两种构型互相转换。当膜的外边存在底物 S 时，S 就与 R 型载体结合，形成 RS，RS 与 TS 之间是处于动态平衡的，TS 与 S 也处于动态平衡。化学平衡结果，S 就从膜外传到了膜内，直至两边 S 浓度相等为止。Stein 运用平衡透析法标记并纯化了葡萄糖的这个载体蛋白，其分子量为 45,000。通过推算，知道每个蛋白每秒钟可传送 180 个葡萄糖分子。

3. 主动传送 即细胞对抗一个电化学梯度而积累溶质的过程。一般认为，它需要能量和一个传送蛋白。图 6 表示了一个主动传送的模式。载体蛋白上有一个与专一底物结合的部位。(1) 当载体蛋白与 S 结合时，蛋白改变构型。(2) 载体蛋白开始旋转，结合部位就转至膜的內表面。(3) S 在內表面可以释放，这时载体蛋白恢复原来构型而不再能旋转。(4) 如果供给能量则蛋白形成一个新的能旋转的构型。(5) 但这样的构型是不稳定的，它又重新回到原来的构型。这样重复循环，使细胞内积累了高浓度的 S。如果在传送过程中阻断能量供应，则主动传送就与上述促进扩散一样，膜内的高浓度的 S 将向相反方向传送至膜外，直至 S 在膜内外浓度相等为止。

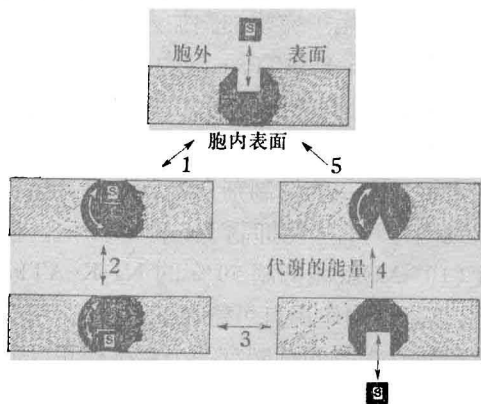


图 6 主动传送模式图^[1]

4. 基团转位 它是另一种需能的传送方式。被传送的分子在膜上发生共价键的化学变化。这一反应的结果就使分子通过了膜。有一种基团转位是通过磷酸化反应，称为“向量磷酸化”作用。

下面举例说明主动传送和基团转位的机

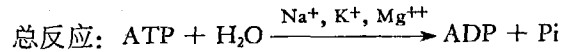
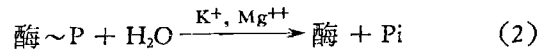
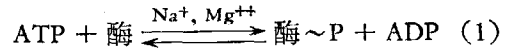
制。

钠钾离子(Na-K)的主动传送——钠泵 有关主动传送在分子水平上的解释, 尽管做了大量的工作, 但仍未能真正得到。目前研究得最广泛深入的, 要算钠钾传送系统。

几乎所有的活细胞都保持较高的钾含量和较低的钠含量(与细胞外的浓度相比)。“钠泵”的作用, 就是把钾离子从细胞外传送到细胞内, 而把钠离子从细胞内压出来, 在膜内外建立一个浓度梯度^[29]。当存在阻断能量代谢的抑制剂时, 这种阳离子的梯度就被迅速破坏; 而加入腺三磷(ATP), 则又重新建立起这种阳离子梯度, 因此“钠泵”的能源是 ATP。

经研究指出, 钠泵就是结合于膜的钠钾激活的腺三磷酶系(Na-K-ATPase)^[32]。因为凡是具有传送钠钾离子功能的膜(一般是质膜和内质网系膜)都具有 Na-K-ATPase 的活性。Na-K-ATPase 的专一性抑制剂乌本苷(aouabain)也是钠钾传送的专一而强有力的抑制剂。虽然不同动物的不同组织中“钠泵”的活性是不同的, 但是阳离子通过细胞膜的流量与 Na-K-ATPase 活性的比值却是恒定的: 每水解一个分子的 ATP, 就有三个钠离子流出细胞, 2—2.5 个钾离子进入细胞。由于完整细胞加入底物 ATP 时, 所能测到的 Na-K-ATPase 活力只占细胞匀浆活力的 1%, 因而推测酶与 ATP 的结合点是在细胞膜的内侧, 只有进入细胞内的 ATP 才能被酶促水解。专一的抑制剂乌本苷, 只有当它存在于细胞外时, 才能抑制 Na-K-ATPase, 极低浓度(10^{-7} M)就能抑制 50% 的 Na-K-ATPase。因此, 乌本苷的作用点可能在细胞膜的外侧^[33]。钾离子对乌本苷的抑制有一个对抗作用, 因而推测钾离子的作用点与乌本苷的抑制点是一致的, 在膜的外侧。

当 Na-K-ATPase 与末端标记的 ^{32}P -ATP 保温, 同时有钠离子和镁离子存在时, ^{32}P 参入到 Na-K-ATPase 蛋白中去; 此时如再加入钾离子到这一反应系统中, 则酶蛋白中已参入的 ^{32}P 就迅速丧失。因此认为, Na-K-ATPase 水解腺三磷的作用至少分二步:



反应(1)是钠离子激活的磷酸化反应, 它对 ATP 是专一的。其它的核苷三磷酸, 将使反应速度大大降低。比较 ATP:ITP:GTP, 反应(1)的速度为 27:2:1。反应(2)是钾离子激活的脱磷酸化反应, 钾离子可以被其它的碱金属离子或氨离子所代替。由于钾离子能对抗乌本苷的抑制作用, 所以乌本苷的抑制点是在反应(2)。最近已证明, 所获得的磷酸化酶的中间物是谷氨酸 γ 磷酸酯^[33]。

二异丙基磷酰氟(DFP)不可逆抑制 Na-K-ATPase, ATP 能起底物保护作用。因此, 推测 DFP 对酶的作用点大概就是 ATP 与酶的结合点。钾离子存在时, DFP 对酶的抑制加强。这一点就设想可能是钾离子引起了酶的构型的某种变化, 因此增加了 DFP 与酶结合的能力。

Hokin 根据以上实验, 提出了一个钾钠离子传送的模式图(图 7)。

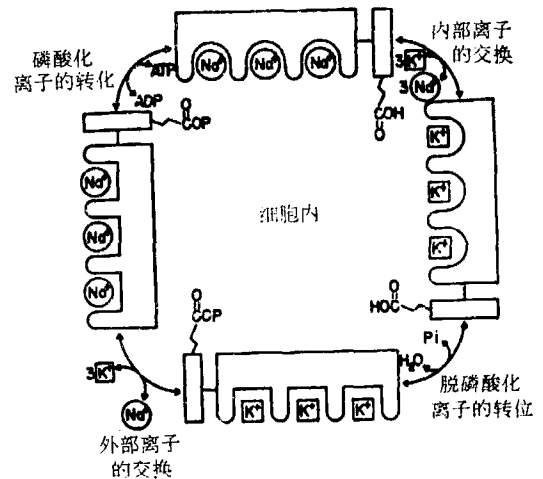


图 7 钠泵

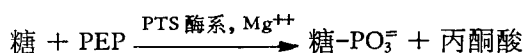
Na^+ 在膜内侧与 Na-K-ATPase 结合, 激活反应(1), 而使酶在膜内磷酸化, 同时磷酸化使构型 I 转变为构型 II。构型 II 与 Na^+ 的亲合力较低, 因此 Na^+ 在膜外侧被释放; 而构型 II 对 K^+ 的亲合力较高, 因此 K^+ 在膜外侧与酶结

合, K^+ 与酶的结合又激活了反应(2), 使酶在膜外侧脱磷酸化, 同时构型从 II 变回为 I。构型 I 对 K^+ 有较低的亲和力, 因此 K^+ 在膜内侧被释放; 构型 I 对 Na^+ 有较高的亲和力, 因此 Na^+ 又与酶结合。如此循环往复, 以致使细胞内钾离子浓度高出许多倍, 而钠离子浓度低了许多倍。

目前已从狗肾细胞质膜中分离提纯了 Na-K-ATPase^[34], 它是由二条多肽链组成(90,000 和 55,000)^[35]。Na-K-ATPase 是一个脂蛋白, 它包埋在脂双层当中。脂质(胆固醇)对于酶活性是绝对需要的^[36]。对于 Na-K-ATPase 作用的详细的生化机理以及它与膜结构的关系有待于进一步的研究。

糖在细菌中的传送 糖通过细菌质膜的传送机制, 近年来为许多研究者所注意, 也是在细菌传送系统中研究得最多的系统之一。这主要是由于: 一些糖的传送系统缺陷型变种细菌的产生, 尤其是对控制 β -半乳糖苷渗透酶合成的结构基因的遗传学研究; 对某些特定糖传送专一的传送蛋白的诱导合成; 一些能通过细菌膜传送, 但又不被细菌代谢的糖或糖苷类似物的设计; 细菌质膜的小空泡制备技术的建立。

Kundig 等发现^[37], 细菌的磷酸烯醇丙酮酸转磷酸化酶系(简称 PTS 酶系)能催化磷酸烯醇丙酮酸(PEP)的磷酸转移到糖上去。

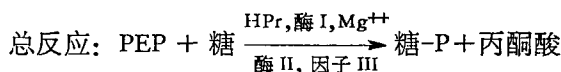
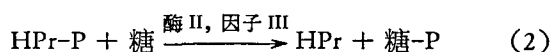
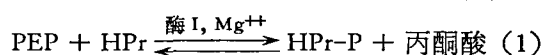


PEP 为磷供体, 糖为磷受体, 糖都是 D-构型的, 糖苷是吡喃型, 磷酸化的位置在糖的 6 位(除了果糖在 1 位)。Kaback^[38] 制备了大肠杆菌膜的封闭小泡, 研究它对葡萄糖苷的类似物甲基 α -D-吡喃葡萄糖苷(简称 α -MG)的吸收和磷酸化作用指出: 膜小泡对 α -MG 的磷酸化和吸收是依赖于培养液中存在高浓度的 PEP。其它的高能磷酸化合物对 α -MG 的吸收没有刺激。同样, 当存在 ^{32}P -PEP 时, 大肠杆菌的小泡也能吸收葡萄糖- ^{14}C , 吸收产物中 90% 以上证明是 ^{14}C -葡萄糖-6- ^{32}P 。随着培养时间增加, ^{32}P -PEP 浓度下降, 而 ^{14}C -葡萄糖-6- ^{32}P 等当量地增加。

因而证明了 PTS 酶系催化了葡萄糖及与葡萄糖有关的糖苷的传送^[8], 而对高浓度 PEP 的需要, 推测 PEP 可能是要进入细胞膜内发挥作用的。

革兰氏阴性菌中, PTS 酶系包括三个蛋白组分: 酶 I、酶 II、及热稳定蛋白(称 HPr)。革兰氏阳性菌中还有第四种组分, 因子 III^[39]。

PTS 酶系以两步反应催化糖的磷酸化:



HPr 是一个热稳定的可溶性蛋白, 对各种糖具有相同的作用。已纯化获得了均一的制剂, 分子量为 9500。它作为一个磷载体, 起着传递磷酸盐的作用。反应(1)生成的 HPr-P 中的磷是连接在组氨酸咪唑基 N_1 位上。因为 PEP 的作用点可能在膜内表面, 因此推测酶 I 和 HPr 的作用点可能也是在膜的內表面。酶 I 也是可溶性的, 它对各种糖具有相同的功能, 也已纯化了 500 倍。酶 II 是结合于膜的蛋白, 一般的处理不易将它溶解下来。它具有严格的底物特异性。不同的酶 II 催化不同的糖磷酸化。酶 II 能被各种糖诱导产生。Kundig 从大肠杆菌膜上把对葡萄糖苷专一的酶 II 抽提并部分纯化, 发现酶 II 至少有两个蛋白组分(II-A, II-B)和对活力必需的磷脂酰甘油。因子 III 是诱导产生的蛋白, 对不同的糖是专一的, 已被部分纯化(分子量约 20,000), 它的功能还不清楚^[40]。

对一些传送糖的变种细菌的研究指出, 某些缺乏酶 I 或 HPr 的细菌变种, 如 *S-typhimurium* 的缺乏酶 I 的变种, 在 9 种糖上都不能生长^[41]。而缺乏对某种糖专一的酶 II 的变种, 如大肠杆菌的缺乏对 β -葡萄糖苷酶专一的酶 II 的变种, 不能在 β -葡萄糖苷上生长, 但仍能在其它的糖源上正常生长。也证明了 PTS 酶系与细菌的糖的传送是密切有关的。

Kaback 从细菌制备的封闭膜的小泡, 是经过较激烈的处理, 因而失去了膜中大部分的

酶 I 和 HPr^[38]。当存在 PEP 时,加入外源的 HPr 和酶 I,能刺激小泡对 α -MG 的吸收增加(但这一实验很难重复)。如在加入 HPr 和酶 I 的同时,加入氟化钠 (NaF) 则废除了 HPr 和酶 I 对小泡吸收 α -MG 的刺激作用,但外源 HPr 和酶 I 仍能刺激糖的磷酸化作用。NaF 存在时,酶促生成的 α -MG-P 并不进入小泡内,而被释放到细胞外的培养基中^[8,40]。因而推测酶 II、酶 I 和 HPr 的功能是形成一个催化磷酸化的复合物,但只有当这个复合物以一定的专一的方向形成时,才能完成糖的传送。NaF 是由于某种未知的原因,可能阻止了酶 II、酶 I 和 HPr 形成的复合物的正确定向。当不存在 NaF 时,加入外源的 HPr 和酶 I,也只有在某一特定的、目前还不能肯定的条件下,才能与酶 II 形成一个定向构型的复合物。而“定向”对于向量磷酸化是十分重要的。

由于复合物的构型几乎肯定是与膜的直接环境有关,因此,很可能 NaF 的存在或细菌生长条件的微小改变都可能使外源的 HPr 和酶 I 不能刺激这一“向量”磷酸化。这也就是实验较难重复的原因。膜中的条件发生变化,就影响了络合物的构型的定向,因而破坏了向量磷酸

化,膜的小泡就只能催化糖的磷酸化,而不能进行传送(图 8)^[8]。

图 8 示意了向量磷酸化反应。在图中酶 II 的一端有一个与酶 I 的结合点,另一端有一个与 HPr 的结合点。(1)当加入外源的 HPr 或酶 I 时,或当存在有抑制向量磷酸化反应的 NaF 时,酶 II 与酶 I、HPr 所生成的复合物的方向就向着膜的外表面。这样的复合物催化形成的磷酸化糖,就被释放到培养基中去。(2)在目前尚未了解的某一特定条件时,HPr、酶 I 与酶 II 所形成的复合物的构型的方向是向着膜的内表面的。因而结合于催化位置的糖在复合物的内表面被磷酸化,生成的磷酸化糖被释放到膜小泡的内部。这样就构成了糖的向量磷酸化,即糖通过膜的传送。

必须指出,培养基中加入磷酸化的糖(如 α -MG-P,葡萄糖-6-P)是不能被小泡吸收转位而进入膜内的。只有当游离的糖达到膜上的催化位置(传送蛋白)发生磷酸化反应,反应的结果才能使糖转位。

磷酸烯醇丙酮酸转磷酸化酶系(PTS 酶系)虽然十分重要,但它并不能适用于各种细菌对各种不同糖传送的普遍广泛的意义^[30]。虽然

在某些细菌中(如葡萄球菌)、PTS 酶系与许多糖的传送有关(葡萄糖、半乳糖、甘露糖、果糖、乳糖等等),但在另一些细菌中(如大肠杆菌、枯草杆菌)PTS 酶系只与葡萄糖或葡萄糖苷的向量磷酸化有关。

在大肠杆菌中,关于乳糖的传送机制一直进行了许多深入细致的研究,也是至今有关糖在细菌中传送争论得最激烈的问题。目前还未获得肯定一致的结论。

较早, Kennedy^[42]等在大肠杆菌中观察到, β -半乳糖苷传送系统中含有一个对巯基试剂 N-乙酰马来酰胺(NEM)敏感

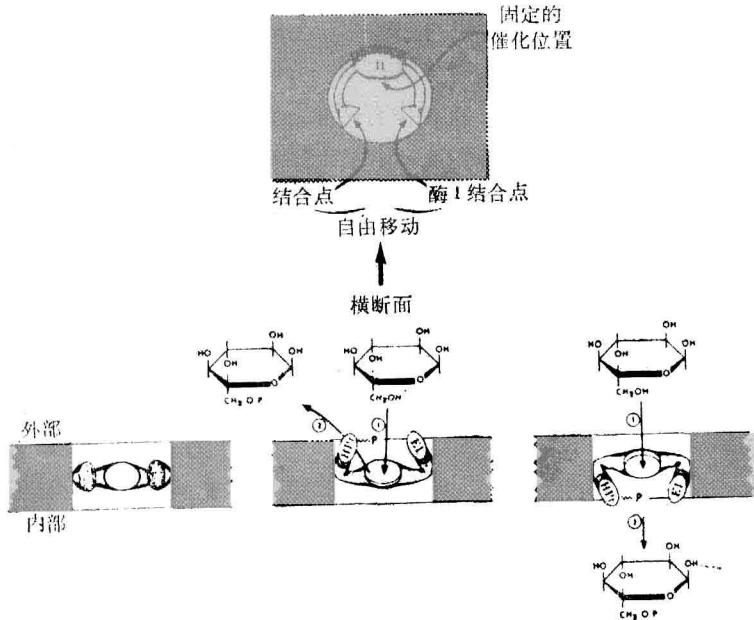


图 8 分离的细菌膜制剂对糖的向量(即传送)和非向量磷酸化的模型^[8]

的组分。NEM 与敏感组分的巯基作用,而抑制了 β -半乳糖苷的传送。 β -半乳糖苷的类似物,硫代半乳糖苷(TDG)对NEM的抑制有保护作用。因此,他们利用 TDG 保护,放射性 NEM 的亲标记技术选择性地标记了对 TDG 专一的蛋白。经抽提、纯化,指出这是结合在膜上的一个蛋白,并定名为M蛋白^[43],分子量为 31,000。可惜,这样获得的M蛋白已丧失了任何催化活性。

Kundig^[44] 等利用异丙基- β -硫代半乳糖苷诱导大肠杆菌产生硫代半乳糖苷“渗透酶”,使大肠杆菌能吸收积累乳糖的类似物:甲基- β -D-硫代半乳糖苷(TMG)。这样的大肠杆菌完整细胞,经过渗透压骤变的处理(将细胞从 0.5 M 蔗糖溶液中突然迅速地进入到 0.5mM 的 $MgCl_2$ 溶液中去^[45])使它释放出大部分的 HPr,则积累 TMG 的能力也就相应丧失了 50—80%。这时加入纯化了的 HPr,在某种条件下,积累 TMG 的能力又基本恢复。由于没有掌握外源 HPr 和 PTS 酶系重组时的某种条件,因而这实验重复较困难。因为 HPr 是 PTS 酶系的一个组分,因此他们认为大肠杆菌是通过 PTS 酶系积累 TMG 的。他们还推测,硫代半乳糖苷“渗透酶”就是 M 蛋白,也就是 PTS 酶系中的酶 II。但是难以解释的是,只有 TDG 和蜜二糖对 NEM 的抑制有保护作用,而真正的生理底物乳糖却没有保护作用。

Kaback 提出了大肠杆菌传送乳糖的另一条途径^[8,30,40]。他发现当加入 D-乳酸到大肠杆菌膜小泡外时,明显地刺激了小泡传送 β -半乳糖苷的能力。很短的时间内,细胞内乳糖的浓度就比细胞外高出 100 倍。即使 PTS 酶系缺陷的大肠杆菌变种小泡,只要有 D-乳酸存在,也能迅速地摄取乳糖。但是并未在小泡中检测到有磷酸化的乳糖存在。其它电子供体,如琥珀酸、DL- α -羟丁酸、NADH 都能在较低程度上刺激小泡吸收乳糖。缺氧强烈抑制偶联于 D-乳酸的乳糖传送达 95%。电子传递抑制剂及乳酸脱氢酶的专一的抑制剂也能阻断乳糖在膜小泡内的积累。这些化合物对乳糖传送的抑制,相

当于对 D-乳酸氧化的抑制,加入 ATP 并不能恢复乳糖的传送。总结这些观察,他认为大肠杆菌乳糖传送的能量并不是依靠高能磷酸化合物;乳糖的传送与电子传递系统相关;乳糖的传送较专一的与膜上的 D-乳酸脱氢酶有关。

在分离的膜制剂中,巯基试剂(对氯汞苯甲酸, N-乙酰马来酰胺)抑制 D-乳酸的氧化,但并不抑制 NADH 的氧化,也不抑制 D-乳酸-2,6 二氯酚靛酚还原酶及从膜上溶解下来的乳酸脱氢酶制剂。因而推测,巯基试剂对 D-乳酸氧化的抑制点,既不在 D-乳酸脱氢酶上,也不在细胞色素系统上,而可能是在 D-乳酸脱氢酶和细胞色素之间。

在这些实验的基础上, Kaback 假设膜上可能有一个载体蛋白,它作为电子传送的中间体,处于乳酸脱氢酶和细胞色素 b_1 之间,可逆地被氧化还原。氧化态的载体蛋白对膜外侧的乳糖有很高的亲和力,因此与乳糖在膜外侧结合。从 D-乳酸来的电子经过 D-乳酸脱氢酶,使氧化态的载体蛋白还原,同时引起蛋白构型的变化。构型变化的结果使载体蛋白对乳糖的亲和力明显下降,乳糖就在膜内侧被释放。接着还原态的载体蛋白被呼吸链的细胞色素 b_1 氧化。载体蛋白的构型又回复到与乳糖结合的有利的形式。这样反复循环,完成乳糖的传送。最近已部分纯化了这一载体蛋白。

从对大肠杆菌乳糖传送机制的研究上,可以看到关于物质究竟是如何被传送的这一问题的,已经做了大量的工作,也说明了某些传送的生化机理。但是尚有许多不能解释的,看来似乎“互相矛盾”的现象有待进一步研究阐明。

生物膜结构的复杂性,功能的多样性,已吸引了许多生物学家、生物化学家、生物物理学家的注意。尽管六十年代以来,已运用最新技术和方法,对膜的结构与功能进行了研究,并积累了大量的数据,但是生物膜的秘密并没有被轻易地揭露。今天对于生物膜的认识与五十年代对“分子遗传学”的认识相仿,正处在重大的突破的前夕。

参 考 资 料

- [1] Fox, C. F.: *Sci. Amer.*, **226**, (2), 31, 1972.
- [2] Orten, J. M. & Neuhaus, O. T.: *Biochemistry*, C. V. Mosby Company, Saint Louis, 1970, p. 10.
- [3] Tonen, P. G. & Carr, K. E.: *Cell Structure, An Introduction to Biological Electron Microscopy*, Churchill Livingstone, Edinburgh & London, 1971.
- [4] Novikoff, A. B. & Holtzman, E.: *Cell and Organelles*, Holt, Rinehard & Winston Inc., New York, 1970.
- [5] O'Brien, J. S.: *J. Theoret. Biol.*, **15**, 307, 1967.
- [6] Gross, L.: *ibid.*, **15**, 298, 1967.
- [7] Robertis, E. D., Nowinski, W. W. & Saez, F. A.: *Cell Biology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1970, p. 3.
- [8] Kaback, H. R.: *Current Topics in Membrane and Transport*, Bronner, F. & Kleinzeller, A. eds., Acad. Press, New York, 1970, p. 35.
- [9] Pardee, A. B.: *Sci.* **162**, 632, 1968.
- [10] Danielli, J. F. & Davson, H.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**, 495, 1935.
- [11] Robertson, J. D.: *Progr. Biophys. Chem.* **10**, 343, 1960.
- [12] Branton, D.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**, 209, 1969.
- [13] Whittaker, M. A.: *Brit. Med. Bull.*, **24**, 101, 1968.
- [14] Guidotti, G.: *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 731, 1972.
- [15] Gross, W. G.: *Angew. Chemie* (International Edition in English), **10**, 388, 1971.
- [16] Wold, F.: *Macromolecules: Structure and Function*, 1971, p. 258.
- [17] Thompan, T. E. & Henn, F. A.: *Membrane of Mitochondria and Chloroplasts*, Racker, E. ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1970, p. 1.
- [18] Singer, S. T. & Nicolson, G. L.: *Sci.* **175**, 720, 1972.
- [19] Green, D. E. & Capaldi, R. A.: *FEBS Letter*, **25**, 205, 1972.
- [20] Razin, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 241, 1972.
- [21] Kagawa, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 297, 1972.
- [22] Bretscher, M. S.: *Nature New Biology*, **231**, 229, 1971.
- [23] Steck, T. L.: *Biochemistry*, **10**, 2617, 1971.
- [24] Branton, D.: *J. Cell. Biol.*, **45**, 598, 1970.
- [25] Zingsheim, H. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 339, 1972.
- [26] Wallach, F. H.: *Membrane proteins, Proceedings of a Symposium Sponsored by the New York Heart Association* (J. A. Churchill Ltd. London), 1969, p. 3.
- [27] Strittmatter, P., & Spatz, L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 1042, 1971.
- [28] Fryc, C. D., & Edidin, M.: *J. Cell. Sci.*, **7**, 319, 1970.
- [29] Bonting, S. L.: *Membranes and Ion Transport et. Bitter, E. E., (Wiley-Interscience, a division of J. Wiley & Sons Ltd. London et)*, VI, p. 365, 1970.
- [30] Kaback, H. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 367, 1972.
- [31] Stein, W. D.: *Brit. Med. Bull.*, **24**, 146, 1968.
- [32] Glynn, I. M., & Chir, B.: *Brit. Med. Bull.*, **24**, 165, 1968.
- [33] Hokin, L. E.: *J. Gen. Physiol.*, **54**, part 2, 327, 1968.
- [34] Skou, J. C.: *Physiol. Rev.*, **45**, 596, 1965.
- [35] Kyte, J.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 4157, 1971.
- [36] Oxender, D. L.: *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 777, 1972.
- [37] Kundig, W., Chosh, & Rosemans, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **52**, 1067, 1964.
- [38] Kaback, H. R.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3711, 1968.
- [39] Roseman, S.: *J. Gen. Physiol.*, **54**, part 2, 138, 1969.
- [40] Kaback, H. R.: *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 561, 1970.
- [41] Simoni, R. D., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **58**, 1963, 1967.
- [42] Fox, C. F. & Kennedy, E. P.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 891, 1965.
- [43] Kepes, A.: *Current Topics in Membranes and Transport* Bronner, F., & Kleinzeller., P101 New York, 1970.
- [44] Kundig, W., & Kundig, F. D.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 3243, 1966.
- [45] Hoppel, L. A.: *J. Gen. Physiol.*, **54**, part 2, P95, 1969.

(上接 25 页)

激素产生专一的作用。还有些没有得到解释的事情是时钟现象,就是说,有一天蛹化激素或性激素出现,使机体发生变化,然后经过预定的时间后又消失。要解答这些问题还需要有大量的

实验工作。

译自 *Angew. Chem. internat. Edit.*
11 1, 7—16 (1972). [*Angew. Chem.* **84** p. 41, (1971).]