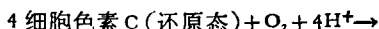


二、核磁共振在膜研究中的应用(下)

3. 细胞色素氧化酶

细胞色素氧化酶位于线粒体内膜上,是呼吸链的最后一个成员。它催化如下反应,从而控制了电子由还原态的细胞色素 C 向氧化态细胞色素 C 的传递:



细胞色素氧化酶的分子量约 156,000 道尔顿,大小约为 $50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA}$,形状象一颗牙齿。一般由七个亚基组成,不同来源的酶其亚基数目各不相同。最近对线粒体 DNA 的研究表明,其中三个最大的亚基在线粒体内部合成,而其余的亚基在细胞质内合成,然后再装配到一起。这是一个关系到膜组装机理的十分重要的问题。至于酶分子中各个亚基的比例,各个组分的作用、排列和性质都在研究中。

细胞色素 a (Cyt. a) 只是单纯起电子受体的作用。 Cu^{+2} 有一个和细胞色素 a 差不多的还原电位。由于这个酶分子具有血红素辅基等,故有特征明显的可见光谱(图 1)。

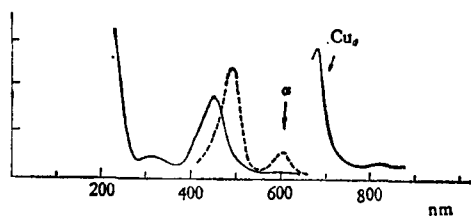


图 1 细胞色素氧化酶的吸收光谱(索瑞氏带)
——氧化 ----还原

血红素辅基具有很别致的结构,因而有一些独特的性质,例如,它的甲醛基和不饱和碳链可以在电子传递中起作用,可见光谱中的索瑞氏和 α 吸收带主要是由卟啉上 π 共轭体系的跃迁所造成的。卟啉环中铁离子以不同的价态存在。

磁圆二色性(MCD)研究表明铁离子的 d 壳层电子可以由于晶体场大小不同而处于两种自旋态。对 Fe^{+++} (d^5), $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$ 为高自旋态, $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\downarrow$ 为低自旋态;对 Fe^{++} (d^6) $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$ 为高自旋态, $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow\downarrow$ 为低自旋态。前三种电子组态都有顺磁性,后一种电子组态无顺磁性。经测定细胞色素 a 不论氧化

型还是还原型都是低自旋态,而细胞色素 a₃ 则都是高自旋态。

用电子自旋共振技术研究了 NO 对氧化型细胞色素氧化酶的作用。图 2 所示为氧化型细胞色素氧化酶-NO 复合物的 EPR 波谱。低自旋态细胞色素 a 或 Cu^{+2} 中心在加入 NO 之后,EPR 信号没有改变,但是观察到一个新的相应正交晶的高自旋态血红素辅基的 EPR 信号。因为细胞色素 a 的 EPR 信号保持不变,这个新的 EPR 信号只能属于细胞色素 a₃。这个正交晶的高自旋态血红素信号的 $g_x = 6.16$, $g_y = 5.82$, g_z 被 Cu^{+2} 的信号掩盖。高自旋态细胞色素 a₃ 的 EPR 信号随温度变化表明零场分裂参数 D 大约为 6 cm^{-1} 。NO 与细胞色素氧化酶的结合曲线表明,NO 的压力影响高

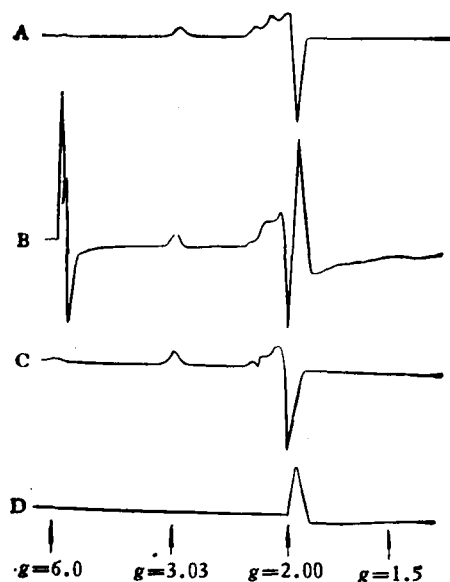


图 2 EPR 波谱

(A) 氧化型细胞色素氧化酶; (B) 723 mm Hg 的 NO + 氧化型细胞色素氧化酶; (C) 移走 NO; (D) NO + 缓冲液。在 $g = 3.03$, 2.21 和 1.5 处的信号属于细胞色素 a₃; 在 $g = 2.18$, 2.03 和 1.99 处的信号属于 Cu^{+2} 。

自旋态细胞色素氧化酶 a₃ EPR 信号的强度。将 NO 从样品中移走后,高自旋态细胞色素 a₃ 的 EPR 信号消失,说明 NO 结合到这个酶上的过程是可逆的。还发现,加入 NO 后,这个酶的光谱没有改变(图 3)。NO 对氧化型细胞色素氧化酶的可见光谱没有任何影响,说明没有出现 NO-血红素辅基相互作用。将这个结果

和上面的EPR资料结合起来,表明形成了细胞色素 a_3^{2+} - $\text{Cu}a^{2+}$ -NO 复合物。

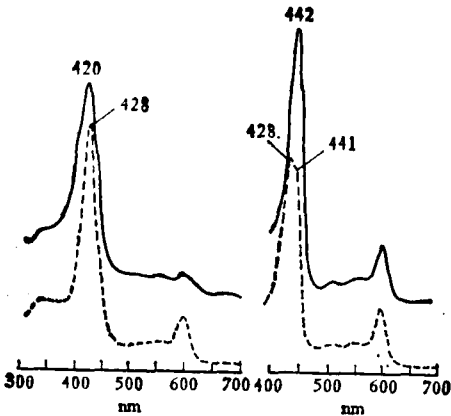


图3 细胞色素氧化酶在有和无NO和N₂时的可见光谱
(左:氧化型 右:还原型)

将 N₂ 加入氧化型酶-NO 复合物对光谱产生很大影响(图3)。由图可知,索瑞氏带向低能移了8nm,而且明显变窄,α带增强两倍。N₂ 和NO合起来的作用是还原细胞色素 a_3^{2+} , 其还原方式可能是:

细胞色素 a_3^{2+} + N₂ + NO → 细胞色素 a_3^{2+} + N₂O + N₂ 这个方程式表明 N₂O 是产物,我们已经用质谱的方法检测出来了。

上述细胞色素 a_3^{2+} -NO 复合物的形成并没有改变低自旋态细胞色素 a_3^{2+} 或 Cu^a 中心的 EPR 波谱(图4)。象预期的那样,加入 N₂ 之后,在细胞色素 a_3^{2+} -Cu^a₃²⁺-NO 复合物上观察到的高自旋血红素辅基的 EPR 信号消失了。在这个细胞色素 a_3^{2+} -NO 复合物上没有观察到典型的 NO-亚铁血红素的 EPR 信号,而是在接近 $g = 2$ 和 $g = 4.34$ 处出现了新的 EPR 信号,而且具有三重态的特征。观察到 $\Delta M_s = 2$ 的跃迁呈现出四条超精细分裂,其 $|A_{||}| = 9.7$ 高斯。 $|A_{||}|$ 这个值是类型2铜离子的标志。假设三重信号是起源于细胞色素 a_3^{2+} -NO 位置上的未成对电子和 Cu^a₃²⁺ 上电子的偶合。我们还发现,在有 N₂ 存在时,NO 和酶的结合过程变成不可逆的了。而且当把 O₂ 加到样品上以后,EPR 和光谱都没有发生改变。这说明 O₂ 不能从这个复合物里取代 NO。

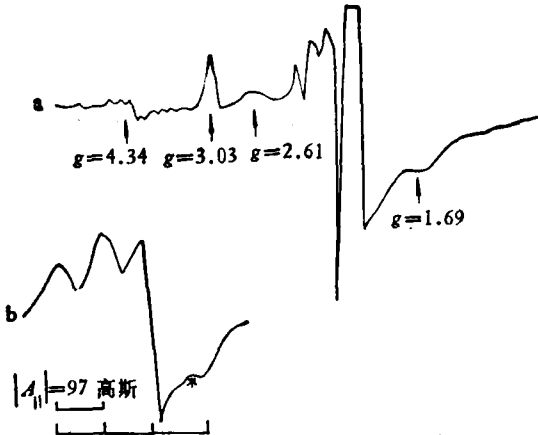


图4 氧化型细胞色素氧化酶加NO和N₂的EPR波谱
b是a中 $g = 4.34$ 处谱线的放大。*标记处不是三重线的一部分,而是Fe的信号

还用共振激光拉曼谱研究了酶。用600nm激发的氧化型和还原型细胞色素氧化酶的共振拉曼谱,包括一些强的低频带($< 500\text{cm}^{-1}$)。当输入激发波长在这些蛋白质的特征吸收带600nm时,类型1的铜蛋白表现出类似的低频共振吸收带。已知当类型1铜还原后,使得在共振拉曼波谱上的600nm吸收带和低频吸收带消失。然而细胞色素氧化酶在还原后,其低频带的共振拉曼信号没有消失。因此,用600nm激发得到的细胞色素氧化酶的共振拉曼谱可能全部来源于血红素辅基。

利用同位素标记方法,确定了组氨酸是血红素辅基a₃中铁的配位体。血红素辅基a₃中的铁可以通过其配位体与另一个金属中心发生作用。配位体和组氨酸的排列有两种可能(图5)。其中以第二种可能性(B)较大。这由上面的以NO为配位体的EPR波谱可以验证。

一般相信,半胱氨酸是“可见”铜的一个配位体。如果这个“可见”铜中心是可以接近的话,则硫氢基试剂如 Ag⁺ 和 P-HMB 预期将破坏这些铜位置的完整性。将 P-HMB 加到细胞色素氧化酶里,“可见”铜中心的 EPR 波谱和酶活性都没有改变。但是用 Ag⁺ 透析就出现了象类型2铜的 EPR 波谱(图6),而且酶活性明显下降。这就说明 Ag⁺ 结合的硫氢基对 P-HMB

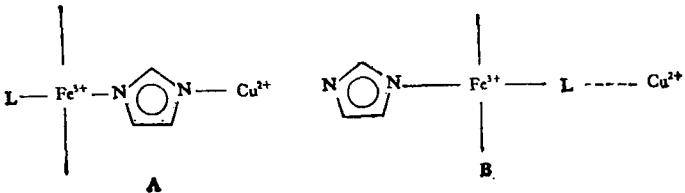


图5 细胞色素氧化酶分子中金属中心配位体组氨酸排布的可能性示意图

是不可接近的。当天然的“可见铜的 EPR 信号消失时，一个象类型 2Cu(I) 的 EPR 信号出现，而且在 $g_{\perp}$ 处呈现出超精细结构，它是三个氮原子引起的。这个结果表明在天然酶中，“可见”铜中心由两个或多个氮原子作为配位体。电子核双共振 (ENDOR) 和电

子自旋回波实验也支持这一结果。

根据以上结果，可以认为，在细胞色素氧化酶中没有所谓“兰铜”。当只有一个组氨酸残基时，是“兰铜”，而加入另一个组氨酸后，铜被还原。这时其“可见”铜中心的结构可能如图 7 所示。

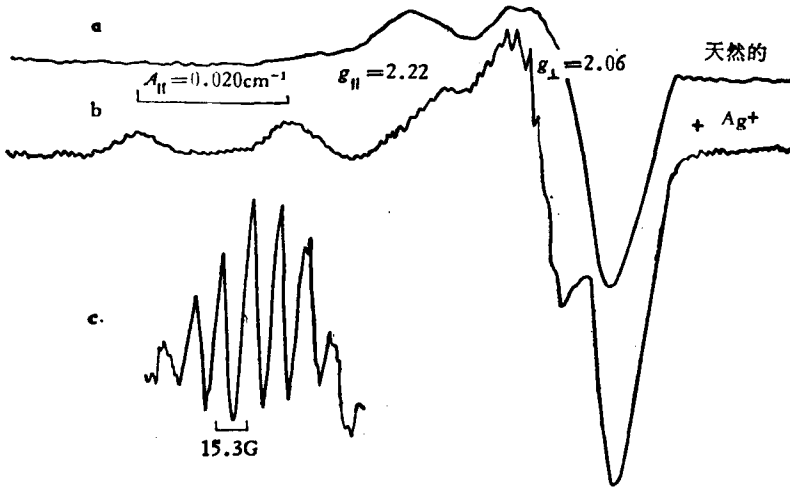


图 6

a. 天然细胞色素氧化酶和 b. 细胞色素氧化酶加上当量的 Ag^+ 的 EPR 波谱。c. 为 b 中 $g_{\perp}$ 处的 EPR 波谱的超精细结构

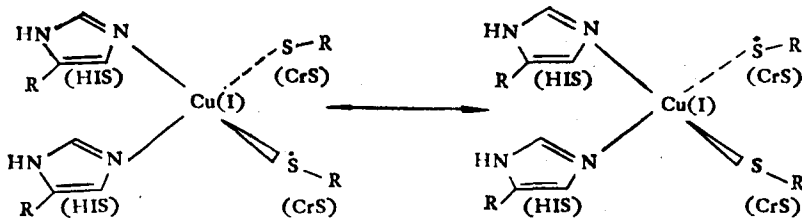


图 7 细胞色素氧化酶中“可见”铜中心的可能结构

[赵保路整理]

《水生生物学报》简介

本刊原名《水生生物学集刊》，1984 年出版至第 8 卷第 4 期。1985 年自第 9 卷开始改名为《水生生物学报》，季刊，国内外公开发行。

本刊是淡水生物学综合性学术刊物，主要登载以下诸方面的论文报告、研究简报和综述：淡水生物的生态、生理、生化、遗传、病理、毒理和分类区系；淡水生物的育种、培养、开发利用和病害防治；淡水生态及环境的评价和治理等。酌登有关新技术、新方法的应用，有关科研仪器的研制，重要书刊评介和学术会议简讯等。

读者对象主要为淡水生物学工作者，水产工作者，生态学和环境工作者，生理、生化、遗传、病理、毒理和分类工作者以及有关学科的大专院校师生。

订 购 办 法

一、本刊 1985 年起交由北京市邮局报刊发行局按直订方式发行，外埠读者请直接汇款向北京市邮局报刊发行局直订科订阅（外地邮局不办理订阅）；北京市区和郊区可在当地邮局订阅。二、本刊为季刊，于 3、6、9、12 月 15 日出版，每期定价 1.40 元。三、汇款时注意：（1）通过邮局汇款，勿寄现金或邮票。（2）单位姓名及地址书写清楚，并在汇款单附言栏内注明订阅刊号（82-329）、刊名（水生生物学报）、份数及期数。（3）汇款单请于 1984 年 12 月 31 日（订阅全年）以前寄北京市邮局报刊发行局直订科。