

细胞色素 c_3 ——生物体内的电子载体

朱长喜

(中国科学院上海植物生理研究所)

五十年代初人们才认识到 c 型细胞色素不仅存在于好氧生物体内,也存在于光合细菌中。1954 年 Posgate^[1] 和 Ishimoto^[2] 几乎同时在各自的实验室内,从硫酸盐还原细菌中 (*Desulfovibrio*) 获得一类新型细胞色素 c , 称之为细胞色素 c_3 , 它与线粒体细胞色素 c 相比,具有以下显著特征: 1) 有较低的标准氧化还原电位,通常在 -210mV 左右; 2) 每分子细胞色素 c_3 至少含有两个血红素。随着研究的深入,人们相继在光合细菌和蓝绿细菌中也发现细胞色素 c_3 的存在^[3,4], 它的结构与细胞色素 c 有很大不同,在生理电子传递链上也行使不同的功能,特别是在细菌氢代谢过程中,起关键作用,因此近年来愈来愈引起人们的兴趣。

本文拟就细胞色素 c_3 在细菌氢代谢过程中的生理功能、化学结构、氧化还原电位以及某些波谱特性等方面研究的进展,作简单概述。

从美洲啡蟾雄性触角上取得的分子量为 280,000 的含硫受体蛋白大分子,在无氧条件下易和信息素分子形成络合物,并诱导出 30—33 毫伏的漂移电位。化学信息分子和受体蛋白间的电子转移引起电子分布的变化,这样就可能调节感觉细胞树突膜的极化程度。

迄今为止,嗅觉机理的理论研究还处于萌芽期。对气味分子和感觉细胞间的原始相互作用开始有所认识;对于雄蛾循信息素传来的方向飞往雌蛾处的巨大效应仍然还有许多问题没有解决;特别是当几个分子、几百个分子的信息素化合物被雄蛾的触角感受后,到底怎么会引

一、细胞色素 c_3 的生理功能

硫酸盐还原细菌含有富集量的细胞色素 c_3 , 虽然随其种族来源不同有所不同,但一般每克菌体内都含有 $10-20\text{n mol}$, 其他光合细菌和蓝绿细菌含量较少,因此硫酸盐还原细菌的细胞色素 c_3 首先被发现,并且对其生理功能以及其他特性也研究的比较深入。现已证明细胞色素 c_3 能作为电子载体参与这些细菌低电位的氧化还原反应^[4,5]。不同种硫酸盐还原细菌的纯化氢酶所催化的放氢反应,仅仅在细胞色素 c_3 存在,或者人工电子载体甲基紫精存在时,才能以较高的反应速率进行,而其他天然电子载体例如铁氧还蛋白,黄素蛋白,它们虽然也有较低的氧化还原电位,但不能参与氢酶的放氢反应。而且细胞色素 c_3 在氢气相下,能直接被氢酶还原,因此它是硫酸盐还原细菌氢酶的天

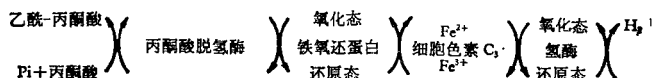
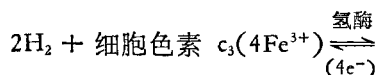
起整个有机体如此复杂的行为反应,至今还不十分清楚。

参 考 文 献

- [1] Schneider, D. Z. *Vgl. Physiol.* 40, 8—41, 1975.
- [2] Callahan, P. S. *J. Insect Morphol. and Embryol.* 4, 381—430, 1975.
- [3] 杜家纬:《现代通信》5, 14—15, 1981.
- [4] The Miami Herald, *Sunday, Dec.* 5(7B) 1982.
- [5] Wright R. H. *J. Theor. Biol.* 64, 473—502, 1977.
- [6] Wright, R. H. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 237, 129—141, 1974.
- [7] Kafka, W. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 237, 115—128, 1974.

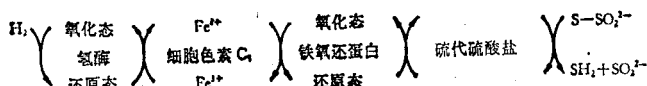
[本文于 1985 年 2 月 26 日收到]

然电子受体^[6]。此氢酶系统命名为氢：细胞色素 c_3 氧化还原酶 [EC 1 · 12 · 2 · 1]。氢酶催化的放氢反应是可逆的,其反应式如下:



细胞色素 c_3 也参与导致硫酸盐还原为硫化物的反应,这一电子传递链包括硝酸盐还原酶、

同时,细胞色素 c_3 是在丙酮酸裂解放出氢气反应体系的电子传递成员,其他电子载体还有铁氧还蛋白,黄素蛋白等,其电子传递途径如下式所示:



铁氧还蛋白。它们的电子传递途径如下式所示:

我们从紫色非硫光合细菌 *Rhodospseudomonas capsulata* 分离纯化获得细胞色素 c_3 ^[7],并对它作为电子载体,参与光合细菌膜结合态氢酶的放氢反应动力学进行了研究^[8]。我们也进一步观察到膜结合态氢酶催化放氢反应对电子载体细胞色素 c_3 具有专一性,其他天然电子载体——铁氧还蛋白几乎不能作为电子载体参与此氢酶的放氢反应;细胞色素 c_3 也能被氢气——氢酶体系直接还原,因此认为光合细菌与硫酸盐还原细菌相似,细胞色素 c_3 可以作为光合细菌 *Rps. capsulata* 氢酶的天然电子受体^[9]。

我们也发现细胞色素 c_3 参与 *Rps. capsulata* 载色体的光合磷酸化,以氢作为电子供体时的光合磷酸化能被细胞色素 c_3 大大促进;若

有 PMS 存在时,光合磷酸化活性更明显增加(图1)。而铁氧还蛋白在同样的条件下,没有促进作用,甚至有抑制作用。这一结果从另一方面说明细胞色素 c_3 作为天然电子载体,参与 *Rps. capsulata* 的氢代谢(未发表结果)。

二、细胞色素 c_3 的结构

用不同菌种纯化的细胞色素 c_3 的分子量大都为 13,000 道尔顿左右,由大约 110 个氨基酸组成,其中甘氨酸、丙氨酸等含量较多。而光合细菌样品的氨基酸组分则不同,它具有较多的异亮氨酸、缬氨酸。硫酸盐还原细菌几乎不含有这两种氨基酸^[7]。

不同种族的硫酸盐还原细菌的细胞色素 c_3 其一级结构几乎都已经弄清楚。图2列出了脱硫脱硫弧菌 (*D. desulfuricans* Norway, 简称 *D. d. Norway*), 巨大脱硫弧菌 (*D. gigas*), 普通脱硫弧菌 (*D. vulgaris*), 脱硫脱硫弧菌 (*D. desulfuricans*), 需盐脱硫弧菌 (*D. salaxigens*) 等细胞色素 c_3 氨基酸顺序分析结果,它们的氨基酸顺序排列有一定的规律性,组氨酸和半胱氨酸在顺序排列中都有确定的位置。

已知细胞色素 c_3 为血红素铁蛋白。纯化的细胞色素 c_3 的化学分析和光谱分析结果表明,每克分子样品内含有四个血红素。这个活

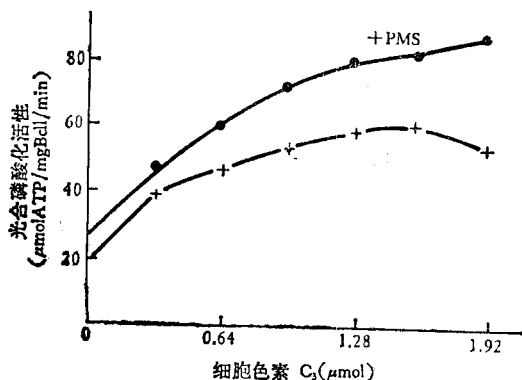


图1 氢支持的光合磷酸化活性与细胞色素 c_3 的相互作用

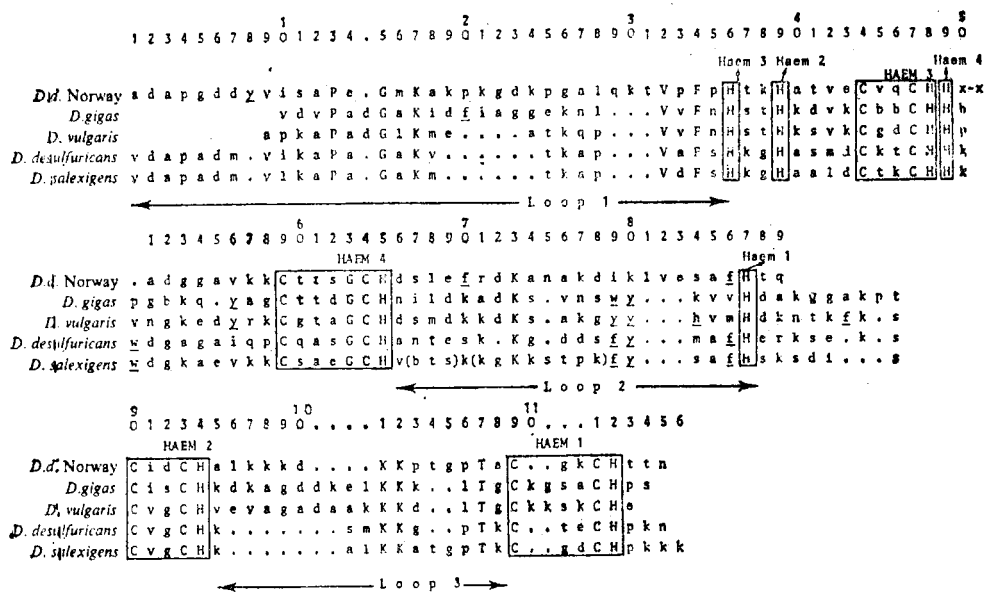


图2 硫酸盐还原细菌细胞色素 c_3 的氨基酸顺序^[10]

每个字母在所有顺序排列中表示同一种氨基酸;血红素与肽链连结位置用线圈起来。

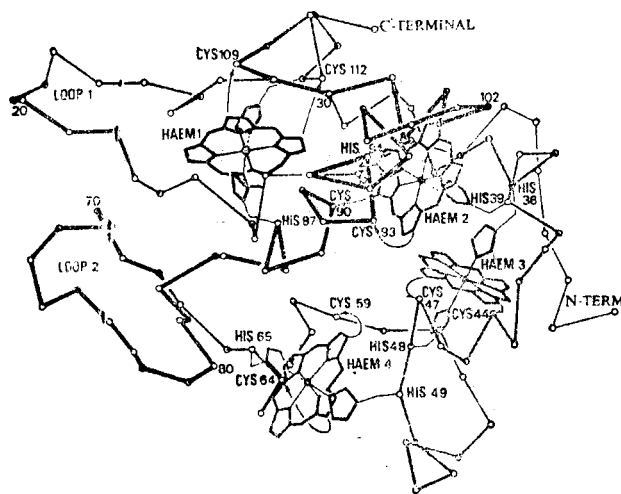


图3 *D. desulfuricans* Norway 细胞色素 c_3 的空间结构以及血红素在分子的排列位置^[19]

表1 *D. desulfuricans* Norway 细胞色素 c_3 血红素铁的距离(上右)和血红素之间的角度^[5]

血红素	距离 (nm)			
	1	2	3	4
1	—	1.63	1.81	1.28
2	71	—	1.24	1.62
3	22	89	—	1.13
4	80	64	82	—
角度(°)				

性中心如何与肽链相联结,使得它有如此特殊功能的问题,促进了对其空间结构的研究。现在已测定了对 *D. desulfuricans*, *Norway* 和 *D. vulgaris* 两个细胞色素 c_3 的三维空间结构,很相似(如图3所示)。细胞色素 c_3 分子的外缘尺寸大约为 $3.3 \times 3.9 \times 3.4 \text{ nm}$;四个血红素在分子内的相对位置为:血红素1接近垂直于血红素4,血红素1和2分别垂直于3和4,血红素1和3接近平行;血红素-血红素相距 $11.3 \text{ \AA}$ 至 $18.1 \text{ \AA}$,血红素-血红素之间的角度为 $22^\circ - 90^\circ$,详见表1。需指出是四个血红素官能团都暴露在分子表面,这是细胞色素 c_3 具有一些特殊性质的基础。

三、细胞色素 c_3 的氧化还原电位

具有较低的氧化还原电位是细胞色素 c_3 的一个重要特征,这也是它在生物体内行使低电位的氧化还原反应电子传递功能的基础^[1,5]。用化学滴定的循环伏安图法,测得的其标准氧化还原电位通常在一 210 mV 左右。光合细菌 *Rps. capsulata* 细胞色素 c_3 的标准氧化还原电位为

-365mV, 这是至今发现的具有最低氧化还原电位的样品^[7]。Inokuchi^[5] 采用严格的分步滴定研究硫酸盐还原细菌细胞色素 c_3 时,发现它的四个血红素各自具有不同的氧化还原电位,它们分别为-226mV, -278mV, -298mV 和 -339mV, 其平均值为-287mV; 用同法测得细胞色素 c 的氧化还原电位则为 +250mV (图4),四个血红素电位值不同,可能是由于它们在分子表面的位置不同所致。Cammach^[11] 应用 E. S. R 波谱方法观察 *D. desulfuricans norway* 细胞色素 c_3 , 也发现四个血红素具有不同的氧化还原电位。细胞色素 c_3 的电化学性质可参考文献[12]。

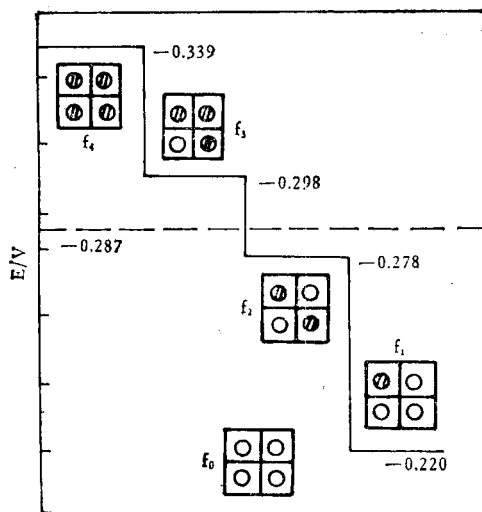


图4 *Desulfovibrio* 细胞色素 c_3 的氧化还原电位^[5]

四、细胞色素 c_3 的光谱性质

细胞色素 c_3 的吸收光谱与哺乳动物和细菌的血红素蛋白 c 型细胞色素 c 的吸收光谱很相似,而单血红素和多个血红素 c 型细胞色素之间的光谱不同,所以含有四个血红素的细胞色素 c_3 又有它的特征吸收光谱。它在 β 峰值处有最大的 Soret 吸收;不像细胞色素 c 在超紫外区域有最大吸收,而在 350nm 有最大吸收。无论是以硼氢化物或酶学方法将其还原,在 277nm 处有特征光谱,这时 350nm (δ 区带)移至 323nm。光谱随氧化还原状态的变化与 c

型血红素蛋白有不同(表2),因此通常借助光谱变化检测细胞色素 c_3 , 并据此判定制备物的纯度。样品的纯度指数是以还原态 α 峰的高度(光吸收)对氧化态 280nm 高度的比值;最高的样品纯度指数可达 3.0。

表2 细胞色素 c_3 的吸收光谱性质^[6]

	峰类型	峰 值 (nm)	吸收率 (mM)
氧化态	α - β	530	37
	γ	410	460
	δ	350	86
	蛋白	280	37
还原态	α	552	110
	β	524	57
	γ	419	688
	δ	323	126

处于还原态时, γ 峰形与一般 c 型细胞色素 c 也有很大差异,它最大半峰宽度为 10nm,仅为酵母细胞色素(25nm)的 60%,这可能是它处于还原态时,分子内部血红素-血红素的相互作用的结果。当它失去本身的生物化学特征,例如以任何方式作为氢酶的电子载体,它的 γ 半峰宽度明显加宽;它与 CO 作用形成复合物时的半峰宽度为 19.4nm;在吡啶溶液中的 γ 半峰宽度为 30nm^[6]。

五、细胞色素 c_3 的电子自旋共振 (ESR) 波谱

细胞色素 c_3 为血红素铁蛋白,其活性中心含有正铁离子($3d^5$, 高自旋 $S = 5/2$ 或低自旋 $S = 1/2$),所以具有顺磁特性^[3,4]。与 c 型细胞色素 c 不同,细胞色素 c_3 在 93°K 即可检测到宽而确定的电子自旋共振波谱 (ESR),其 g 值通常 $g_x = 2.86$, $g_y = 2.29$, $g_z = 1.61$, 平均值为 2.25。当用化学方法将其还原,其 ESR 波谱即完全消失。而哺乳细胞色素 c 仅在较低温度 (40°K) 才能观察到波谱信号。在较低温度 36°K, 25°K, 8.5°K 则能观察到细胞色素 c_3 的超精细结构,从而可判定其活性中心性质。

我们在 77°K 时,也观察到光合细菌 *Rps. capsulata* 细胞色素 c_3 的 ESR 波谱^[13];其自然

氧化态 ESR 波谱, 在高磁场显示出八面体低自旋正铁血红素(t_{2g}^6)斜方对称, 其三个 g 值分别为 $g_x = 2.581$, $g_y = 2.203$ 和 $g_z = 1.716$, 平均值为 2.166。除了这一簇 ESR 波谱外, 在低磁场 $g = 5.90$ 处还观察到高磁场弱得多的 ESR 波谱, 这可能是试样中含有少量高度畸变的弱八面体场高自旋正铁血红素 (t_{2g}^5, e_g^2)。当用连二亚硫酸钠将样品还原后, 高磁场区 ESR 波谱完全消失, 但在低磁场中的 ESR 谱波有所增强。这种变化表明, 低自旋正铁血红素这时已被还原为抗磁性的低自旋亚铁血红素 ($t_{2g}^6, S = 0$), 并且由于还原时蛋白发生构型变化, 少量低自旋正铁离子变成高自旋形式。应用 ESR 也可以研究细胞色素 c_3 的可逆氧化还原性质, 如图 5 所示, 当样品在无氧条件下用连二亚硫酸钠还原后, ESR 完全消失; 然后通氧气使其逐步氧化, 即可观察到细胞色素 c_3 随氧化程度提高而 ESR 波谱逐渐恢复; 充分氧化时, 其 ESR 波谱几乎与起始相同。同时碱性条件下的 ESR 波谱性质的研究也说明, 血红素正铁离子第六配位基(组氨酸)被氢氧化物所置换, 使血红素铁和蛋白配位基发生变化, 所有正铁离子均处于斜方畸变的强八面体场内, 这导致样品 ESR 波谱明显不同。

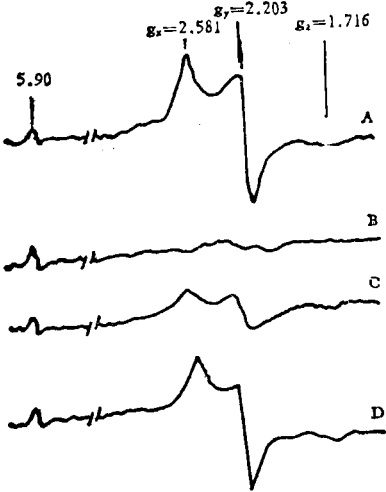


图 5 *Rps. capsulata* 细胞色素 c_3 的 ESR 波谱^[13]
A 氧化态, B 还原态, C 部分氧化态, D 充分氧化态

六、细胞色素 c_3 的穆斯堡尔效应

细胞色素 c_3 处于自然氧化态的穆氏谱在 $300^\circ, 77^\circ, 4.2^\circ\text{K}$ 均能测定出, 而还原态样品仅在 300°K 才能记录下来。表 3 列出的硫酸盐还原细菌 *D. vulgaris* 细胞色素 c_3 的穆斯堡尔谱效应, 它象真核生物细胞色素 c 一样, 在 300°K 和 77°K 具有相同的特征, 但在 4.2°K 时, 没有明显的磁超精细结构。这时血红素-血红素之间的相互作用比一般计算结果大 7 倍, 而且在一定条件下也可以观察到较强的还原弛豫现象。这些都说明相邻铁离子相对于磁矢量轴方位不是完全等值的。穆氏效应研究也证明铁离子之间的距离在 1.0nm 数量级范围内。这个数值与晶体衍射分析结果也是一致的。血红素铁离子之间的相互作用比一般具有两性性质物质的相互作用要强烈若干倍, 这些强烈的相互作用能够预示在细胞色素 c_3 分子内可产生带电荷载体的流动。

表 3 细胞色素 c_3 的穆斯堡尔效应^[6]

	温度 ($^\circ\text{K}$)	异构体位移* (mms^{-1})	四级分裂 (mms^{-1})
氧化态	300	0.18 ± 0.04	2.02 ± 0.04
	77	0.30 ± 0.04	2.04 ± 0.04
	4.2	0.28 ± 0.04	2.12 ± 0.04
还原态	300	0.35 ± 0.04	1.08 ± 0.04

* 相对于铁金属吸收体

七、细胞色素 c_3 的电传导

蛋白质能传导电荷, 例如线粒体呼吸电子传递体系中, 黄素蛋白或细胞色素能从有机底物传递电子到电子受体氧。在神经组织细胞中, 神经刺激借助于包括蛋白(例如乙酰胆碱受体)的电荷传递体系而传导。不管这些蛋白质的电子传递功能如何, 分离得到的简单蛋白分子都是绝缘体。但细胞色素 c_3 的电传导作用表现出很特异的性质, 如含有微量氢酶的无水细胞色素 c_3 薄膜, 有很高的导电性。Inokuchi^[5]研究了细胞色素 c_3 的导电性质与铁离子的存在形式, 生理温度及氢分压等因素的相互关系,

第十三届国际生化大会有关生物膜研究的一些信息

杨 福 愉

(中国科学院生物物理所, 北京)

第十三届国际生化大会于 1985 年 8 月 25 日至 30 日在荷兰阿姆斯特丹市举行。来自 62 个国家地区的 4000 多名生化工作者参加了大会，较三年前在澳大利亚帕思市召开的第十二届大会增加一倍多。从六个大会报告来看，与生物膜直接有关的有两个：1. 英国 Radda 的从线粒体到人——用核磁共振 (NMR) 研究细胞水平的生物能学；2. 美国 Koshland 的“对化学信号进行信息加工的元件”。这次大会展出科学板报共 2700 多份，其中与生物膜、生物能直接有关的约占 20%，这都反映生物膜研究仍然是一个非常活跃的领域。值得注意的是，DNA 重组和单克隆抗体技术也已广泛应用到生物膜的研究。

从这次大会来看，与三年前相比较生物膜研究在某些方面的进展是很明显的，下面仅就以下三个方面作一简要的介绍。

1. 蛋白质的跨膜运送

蛋白质跨膜运送的研究仍侧重于以下两点:

(1) 蛋白质跨膜运送的‘信号假说’ 70年代提出的这一假说认为,象分泌蛋白一类的蛋白质合成的‘转译’过程与它穿越膜的过程是同时进行的。合成开始是在‘自由’核糖体上进行的,编码蛋白质合成的结构基因内含一段‘信号序列’,通过‘转译’形成‘信号多肽’。它与粗型内质网膜的受体相识别从而使正在合成的多肽能穿越膜。后来,美国的 Blobel 与西德的 Meyer 等又发现在粗型内质网膜表面还有一种‘信号’识别蛋白(Signal recognition protein SRP),它们释放到细胞质以便识别正在合成分泌蛋白(或穿越膜的其它蛋白质)的核糖体。当 SRP 与这些含有‘信号多肽’的核糖体结合后,多肽合成暂时停止,随即将它们引向粗型内质网与膜上 SRP 的受体(称为‘docking protein’,‘停靠蛋白’)相结合,之后多肽合成又继续进行。从 13

结果表明亚铁血红素簇的集合体同时含有少量正铁血红素。它是一个很好的导体材料。这有可能提供一类新型有机金属的合成途径。

参 考 文 献

- [1] Postate, J. R.: *Biochem. J.*, xi-xii, 1954.
- [2] Ishimoto, M. et al.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **27**, 564, 1954.
- [3] DerVartanian, D. V. and LeGall, J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **346**, 79, 1974.
- [4] LeGall, J. et al.: *Iron-Sulfur Proteins* (Spiro, T. G. ed), 177, 1983, John Wiley and Sons, New York.
- [5] Inokuchi, I.: *Biomimet Chemistry: Proceedings of the 2nd International Kyoto Conference on New Aspect of Organic Chemistry*. 101, 1983, Kodan-

〔本文于 1984 年 12 月 24 日收到〕