

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 Willwy 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〕

届大会的报道来看,一方面对 ‘docking protein’ 的研究又进一步深入,它的分子量为 73KD,由几部分组成,嵌入膜内疏水部分的分子量为 14 KD,其余为暴露于细胞质内亲水部分。另一方面,除 ‘docking protein’外,还发现 Ribophorin I (分子量为 65KD) Ribophorin II (分子量为 63KD) 以及另外一种膜蛋白(分子量为 83KD) 它们也与 ‘docking protein’ 相似,参与了分泌蛋白的跨膜运送, Ribophorin I 与 II 都系跨膜分布的糖蛋白。

(2) 蛋白质通过线粒体膜的运送过程 这是本届大会生物膜研究领域比较引人注意的一个专题。线粒体虽含有遗传复制的全部装置,但自主性极为有限,因此组成线粒体的蛋白质绝大多数系由细胞核的 DNA 提供信息,并在细胞质中的核糖体内合成的,合成以后再通过线粒体膜运送至内部进行更新或组装。与上述分泌蛋白质跨膜运送的‘信号假说’不同,通过线粒体膜的蛋白质是在合成以后再进行运送的。经过多年研究,发现这种运送过程有如下的特征:(1) 通过线粒体内膜的蛋白质在运送之前大多数以前体形式存在。这种前体由‘成熟’形式的蛋白质和‘引肽’共同组成。当前体通过膜时,会被一种蛋白酶所水解,去除‘引肽’转变成‘成熟’形式的蛋白质。(2) 蛋白质通过线粒体内膜进行运送是一种需能过程。(3) 蛋白质通过线粒体膜进行运送看来在膜上都有相应的受体。从这次大会的报道来看,近年对‘引肽’的研究有较明显的进展,尤其对‘引肽’含有的信息作了较多的研究。一般‘引肽’都是亲水、碱性含 20—60 氨基酸残基,例如:细胞色素氧化酶亚单位 IV, F_1 -ATP 酶的 β 亚单位及细胞色素 c_1 的‘引肽’分别含有 25、15—20、61 氨基酸残基。瑞士 Schatz 实验室利用基因融合的技术将酵母线粒体细胞色素氧化酶亚单位 IV ‘引肽’的基因与从小鼠细胞质中提取二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 的基因进行融合,经过‘转译’可得联结有酵母线粒体细胞色素氧化酶亚单位 IV ‘引肽’(含 23 氨基酸残基)的 DHFR (含 187 氨基酸残基)前

体。这种前体在运送通过线粒体膜时,‘引肽’被水解,结果在酵母线粒体的基质中可发现 DHFR。这说明原来定位于小鼠细胞质中的 DHFR 通过细胞色素氧化酶亚单位 IV ‘引肽’的作用也能通过线粒体膜而被输送至‘引肽’原来引向的位置。有人用类似的技术方法,利用酵母线粒体 F_1 -ATP 酶的 β 亚单位的‘引肽’将大肠杆菌的半乳糖苷酶通过线粒体膜引向基质。

定位于线粒体膜内、外间的蛋白质(例如,细胞色素 b 、 c_1)的运送过程比较复杂。在此过程中运送的蛋白质前体需进行两步酶促水解反应才转变为‘成熟’形式。这些蛋白质所含的‘引肽’肽链比较长,例如,细胞色素 c_1 的‘引肽’共含有 61 个氨基酸残基,分为三段:7 个氨基酸残基(酸性)+19 个氨基酸残基(不带电荷)+35 个氨基酸残基(强碱性)。当带有‘引肽’的细胞色素 c_1 的前体通过线粒体膜进行运送时,伸入基质中的含 35 个氨基酸残基的片段首先被基质中的蛋白酶水解成为细胞色素 c_1 的‘中间形式’之后,引肽的其余部分被线粒体内膜的外侧的另一水解酶水解才成为‘成熟’形式。有人曾用上述基因融合方法,将从小鼠细胞质中分离的二氢叶酸脱氢酶 (DHFR) 基因与细胞色素 c_1 ‘引肽’中含 35 氨基酸残基片段的基因融合,经过‘转译’得到的杂合蛋白 (Hybrid protein) 通过线粒体膜进行运送时,只能将 DHFR 引至基质中,而不能定位于内、外膜之间。只有连接细胞色素 c_1 ‘引肽’的全部氨基酸残基的 DHFR 才能通过线粒体膜而被运送至细胞色素 c_1 定位处(即内、外膜之间)。这表明,细胞色素 c_1 含有肽链较长的‘引肽’中,每一片段似乎各有定向信息的含义。显然,这类研究的深入,将为生物工程的发展提供新思路,新技术,新方法。

然而,并非所有线粒体内、外膜间的蛋白质在跨膜运送时都经历上述的步骤。例如,细胞色素 c 在通过线粒体膜进行运送时,并不存在含‘引肽’的前体,因而也不进行两步酶水解。它的前体是脱血红素细胞色素 c (apocytochrome

c), 待跨越线粒体膜后再与线粒体内血红素结合形成细胞色素 c。线粒体外膜可能具有脱血红素细胞色素 c 的受体。至于前体究竟如何通过脂双层而进入线粒体的? 这是个很有趣的问题, 但迄今仍然难以提出令人信服的解释。有的实验室报道, 脱血红素细胞色素 c 跨线粒体膜进行运送时, 对膜脂有特异性要求。它与磷脂酰丝氨酸呈专一的结合, 在运送过程中脂双层很可能转变为非双层脂构型, 以便细胞色素 c 的前体得以通过。流动的脂双层也是脱血红素细胞色素 c 跨膜运送的一个重要条件。

2. 信息传递与三磷酸肌醇 (IP_3)

多年以来认为, 很多激素与膜受体结合后能活化膜的腺苷酸环化酶从而使 ATP 合成 cAMP, 后者作为第二信使使细胞内一系列酶激活从而产生生理效应。在这个过程中 GTP-结合蛋白质参与了重要作用。现知它有两种: 一种对腺苷酸环化酶具有刺激作用, 称为 N_s (或 G_s), 另一种对腺苷酸环化酶有抑制作用, 称为 N_i (或 G_i)。这两种蛋白质都由三种亚单位 (α 、 β 、 γ) 组成, N_s , N_i 的 α 亚单位的分子量分别为 45 和 41KD, 它们的 β 与 γ 亚单位据说可能是相同的。

近年来, 大量实验结果表明, 有些细胞接受外界兴奋剂(激素, 神经递质, 生长因子等)刺激后, 不是通过第二信使 cAMP 来传递信息的, 而是与膜的多磷酸肌醇磷脂的代谢密切相关。当细胞外信号与受体结合后, 促进了磷脂酰-4、5-二磷酸(PIP_2)的水解, 产生了甘油二酯(DG)和三磷酸肌醇(IP_3) (图1)。这两种产物可看做是引起细胞反应的第二信使。前者是通过活化蛋白激酶 c 来发挥作用的。后者是最近一二年才被确认为第二信使的。它能使肌质网内含的 Ca^{2+} 释放, 之后再通过细胞外 Ca^{2+} 的内运, 最后导致 Ca^{2+} 的增加。随后 Ca^{2+} 再直接或通过钙调蛋白间接地激活一些蛋白激酶产生效应。这样, Ca^{2+} 实际上不是第二信使, 而是第三信使。磷脂酰-4、5-二磷酸(PIP_2)是磷脂酰肌醇(PI)经过两步磷酸化($PI \rightarrow PIP \rightarrow PIP_2$)合成的产物。

DG 和 IP_3 犹如 cAMP 广泛地参与了各种细胞生理活动, 例如, 肌肉收缩, 分泌, 细胞分裂, 膜融合和受精等过程。

迄今为止, 发现很多组织经细胞外信号(激素、神经递质, 生长因子等)刺激后, 都能使磷酸二酯酶(PDE)活化, 从而促进 PIP_2 水解产生 IP_3 。部分例子见表1。

表1 经激素、神经递质、生长因子等刺激后能促进 PIP_2 水解形成 IP_3 的组织、细胞

组织、细胞	兴 奋 剂
兔虹膜平滑肌	乙酰胆碱
脑	乙酰胆碱
胰腺	乙酰胆碱, 雨蛙肽 (caerulein)
肝	后叶加压素 (vasopressin)
	血管紧张肽 (angiotension)
	血小板激活因子 (PAF)
	肾上腺素
血小板	凝血酶, PAF
交感神经节	后叶加压素
肾上腺皮质	血管紧张肽
HL-60白血病细胞	f-甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸
光感受器	光子
海胆卵	精子

IP_3 的研究十分活跃, 也是本次会议生物膜研究比较引人注目的领域之一。

值得注意的是, 细胞分化和肌醇磷脂的转化可能有联系。某些致癌因子可能由于增加多磷酸肌醇磷脂含量而起作用, src, ros 是与致癌作用有关的基因, 它们的表达产物(蛋白激酶)会使磷脂酰肌醇进行磷酸化而增加多磷酸肌醇磷脂的含量。

IP_3 与 DG 都具有第二信使的作用, 故又称双信使。当细胞接受外界信息刺激时, 它们共同协调对外信息作出反应。在某些靶细胞的质膜存在着两套信息的转换系统: 一是 IP_3 与 DG 的双信使系统, 另一则是 cAMP 的系统。这两个体系的相互关系迄今了解很少, 有人报道, cAMP 似有拮抗双信使系统的功能。

无论 IP_3 与 DG 的双信使系统还是 cAMP 系统都有 GTP-结合蛋白质参与。看来 GTP-结合蛋白质在细胞外信息与受体相结合的识别过程和催化生成第二信使 (cAMP, IP_3 , DG

等)的酶系统之间起着—个偶联的作用。产生 IP_3 与 DG 系统的 GTP-结合蛋白质(图 1)是否与产生 cAMP 系统的 GTP-结合蛋白质(即 N_s , N_i) 相同? 这一问题目前正在研究中。看来对生物膜信息转换具有重要作用的 GTP-结合蛋白质的研究, 在今后一个时期内将成为一个兴趣比较集中的‘热点’。

3. 非双层脂结构

有关生物膜结构研究的进展在这次大会上反映得并不明显, 对于非双层脂结构的研究似

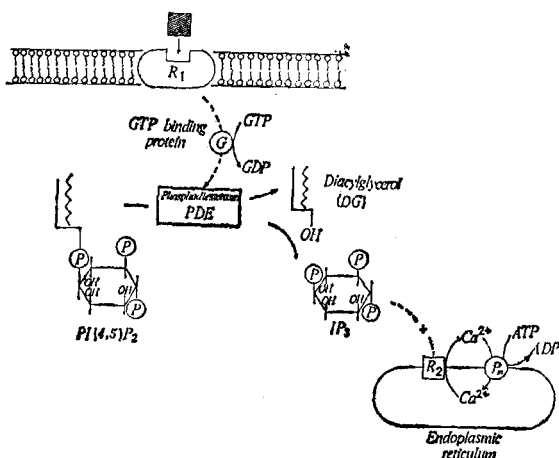


图 1 细胞接受外界信息后 IP_3 的形成及其使内质网释放 Ca^{2+} 的模式图

R_1 : 细胞膜兴奋剂受体
G: GTP-binding protein 鸟三磷-结合蛋白质
DG: 甘油二酯
 $PI(4,5)P_2$: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸
 IP_3 : 三磷酸肌醇
Endoplasmic reticulum 内质网
 R_2 : 内质网膜 IP_3 受体
 P_m : 钙泵
Phosphodiesterase, PDE: 磷酸二酯酶
GTP-结合蛋白质激活 PDE 使 $PI(4,5)P_2$ 水解成 DG 与 IP_3 , 都系在膜上进行。图中将它们移至膜外仅仅是便于图解清晰。

乎有明显增加。一般认为在膜融合、内吞、外排或膜脂翻转运动等过程中可能会出现这种结构。荷兰 Kruijff 实验室认为细胞色素 c 前体——脱血红素细胞色素 c 在通过线粒体膜进行运送时, 膜脂双层结构可能转变成非双层结构。此外, 他们认为线粒体内膜心磷脂 (Cardiolipin) 含量约占膜脂总量 50%, 叶绿体膜的单半乳糖苷二酰基甘油 (MGDG) 的含量也超过膜脂总

量的 50%。这两种膜脂在体外受 Ca^{2+} 的引发都很易形成非双层脂结构。他们还发现一种抗癌药 ADM 与线粒体的心磷脂结合后在体外就不再易被 Ca^{2+} 引发形成非双层脂结构。这种抗癌药具有较大毒性, 能明显破坏线粒体的正常功能, 因此他们推论, 线粒体膜或叶绿体膜具有形成非双层脂结构的物质基础, 在一定条件下, 很可能呈现非双层脂结构以完成某种功能。

在这次会议上加拿大蒙特利尔大学生化系一个实验室已将非双层脂结构体现在生物膜的模型中, 但是目前对其存在的广泛性仍然缺少足够的实验证据。

4. 生物膜与能量转换

(1) 嗜盐菌的细菌视紫质 (Bacteriorhodopsin) 的研究

最早研究嗜盐菌的美国 Stoekenius 与西德 Oesterhelt 分别在会上作了综述报告, 从他们的介绍内容来看, 嗜盐菌的研究重点已从细菌视紫质 (Bacteriorhodopsin, BR) 移至盐视紫质 (Halorhodopsin, HR) 这种膜蛋白与 Cl^- 的运送有关(图 2), 但含量远比 BR 要少。此外, 还有一种膜蛋白称为感觉视紫质 (Sensory rhodopsin, SR), 它也能接受光的刺激, 并与鞭毛运动密切有关, 对 SR 的研究似乎刚刚起步, 它

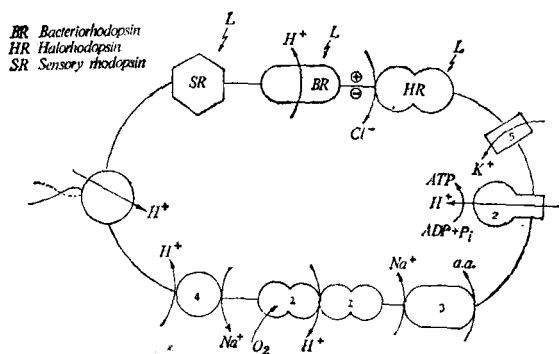


图 2 嗜盐菌细胞膜功能蛋白分布模式图

BR 细菌视紫质, HR 盐视紫质,
SR 感觉视紫质, L 光,
a.a. 氨基酸, $\oplus\ominus$ 电荷
1. 电子传递链, 2. H^+ -ATP 复合体,
3. Na^+ 与氨基酸伴随运送体系,
4. Na^+ 与 H^+ 对向运送体系,
5. K^+ 运送体系

的含量也很少。从图2可以看出,嗜盐菌的细胞质膜除分布有BR, HR, SR外,尚有催化氧化磷酸化的电子传递链(1)和 H^+ -ATP酶复合体(2), Na^+ 与氨基酸伴随运送体系(3), Na^+ 与 H^+ 对向运送体系(4), K^+ 运送体系(5)等等。这反映对嗜盐菌细胞膜的功能的了解又有了深化。很有趣的是BR, HR, SR的分子量甚为接近,分别为26,000, 25,000与25,000—26,000。它们生色团chromophore的最大吸收分别为570nm, 578nm和587nm。

原来在人工合成DNA方面做出显著成绩的美国Khorana近年来将DNA重组和合成技术应用于细菌视紫质和视紫质的研究,获得很有趣的成果引起到会代表的注意。他主要报道了BR的基因在大肠杆菌*E. coli*中表达的成功以及小牛视紫质基因的全合成。

(2) 能量转换机理的研究

因会后另有专门讨论氧化磷酸化的卫星会,在大会中似无更多新的内容,主要是仍然围绕Mitchell化学渗透假说的一些争议,对此笔者在本刊1985年第2期曾作过介绍,故不再赘述。

在生物能研究领域,会上还有二个报告是很有兴趣的,(1)美国Pedersen实验室报道已获得大鼠肝线粒体 F_1 -ATP酶直径为0.6mm的晶体,从而可以用X衍射方法进行它的晶体结构分析,他们将晶体的Pt, Au或Hg的重原子衍生物用同步辐射进行分析,已经获得分辨率为3.5 Å的结果。(2)英国Harris与瑞典Baltscheffsky合作从光合细菌*R. rubrum*细胞膜上的 H^+ -ATP酶的 F_1 中分得 β 亚单位。一般认为, F_1 含有五种亚单位,其中 β 亚单位是重要的催化活性中心,他们分离获得的 β 亚单位确有酶活,但只有 F_1 的0.1%。

国际化学及化工学习班简介

我是去年由联合国教科文组织(UNESCO)资助,在日本举办的化学及化学工程学习班(Postgraduate University Course in Chemistry and Chemical Engineering)学习回国的。因为不少同志对参加这个学习班有兴趣,现将有关情况以及申请参加手续介绍如后。

这个学习班从1965年开始,每年举办一届,每届从当年的10月1日起,至次年的9月止。每届招收14人,来自世界不同的国家,主要是发展中国家。到20届止已有45个不同国家的266个学员参加。笔者参加的是第20届(1984年10月—1985年9月)。

学习班的主要研究领域是:

a. 物理化学(化学动力学;光化学、放射化学;量子化学;晶体和分子结构;分子光谱;固相和表面化学)

b. 无机化学(溶液化学和配位化学)

c. 有机化学(有机物的合成和天然产物)

d. 分析化学(仪器分析和环境化学)

e. 生物化学(蛋白质和核酸、生理化学和微生物化学)

另外还有电化学、应用化学、多聚物化学等。申请者可从中选择相应的研究学科。

学习班使用英语。在最初三周有日语教师教一些简单的日语,为在日本生活提供方便。

学习班设在东京工业大学。这是日本的一座重点

大学。14名学员根据各自的研究科目分散在不同的实验室里。每人都有一位教授指导。另外,还请一些知名的教授进行专题讲座。此大学师资力量雄厚,设施完善,仪器设备先进,尤其在应用物理、化学手段研究生物大分子方面有独到之处。

学习结束,学员要递交实验工作总结,请三位同行教授审核,并作报告及答辩。合格者由该大学颁发毕业证书。

除了在实验室进行科研工作外,还组织学员外出参观。如笔者曾参观了一些大学的有关实验室,制造生化仪器的岛津公司;Cannon公司,及造酒和制药厂。

现将申请参加学习班的手续介绍如下:

招收对象 化学及其有关领域中的研究人员及教师,年龄在35岁以下,大学毕业后有一年以上的工作经验,精通英语,身体健康,有独立研究工作能力。

申请办法 每年3—4月直接向东京工业大学索取申请表。地址是: International Affairs Office Research Cooperation Division, Tokyo Institute of Technology 2-12-1, Ookayama, Meguro-ku Tokyo 152, Japan. 7月15日前将申请表、推荐信及必要的证明寄东京工业大学的UNESCO办公室,由评选委员会审定。是否被录取在8月15日左右可得通知。最近几年,每届有两名中国学员被录取。

[中国科学院生物物理所 董北]