

专论与综述

质子在膜上传导和质子泵分子模型研究进展

李 庆 国

(复旦大学生物系, 上海)

提 要

本文介绍了 J. Nagle 等人提出的利用氢键网络作为质子通道的理论模型, 说明了这个模型的主要论点; 并介绍了在此理论引导下而产生的数种紫膜质子泵的分子模型。

质子传导和质子泵广泛存在于有机体膜上, 与生物能转换密切相关。质子传导通常是指质子沿能量梯度运行(质子被动输运), 因此在谈及质子传导时, 主要涉及质子运行的通道。在质子泵过程中, 质子是逆电位梯度运行的(质子主动输运), 它除了必须有转运质子的通道外, 还必须要有将光能或化学能转换为质子电化电位的过程。

已经知道许多膜结合酶或酶系都具有质子泵功能^[1], 如分布于线粒体膜、叶绿体膜和细胞质膜上的 H^+ -ATP 酶, 辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶, 细胞色素氧化酶, 叶绿体和光合细菌光合反应中心以及由紫膜上菌紫质(BR)分子所完成的质子泵功能等。在关于生物能学的几种基本理论中, 也都承认质子转运的重要性。如化学渗透学说要求质子必须跨膜输运(被称为非定域化质子), 而 Williams 学说则要求质子在膜上作一定距离运行(被称为定域化质子)。因此弄清质子转运和质子泵的分子机理将有助于解决生物能学中的一些基本课题, 包括 Mitchell 学说还是 Williams 学说更符合生物能转换规律的问题。

质子泵问题的研究已经在多种体系中广泛开展^[2,3]。近十余年来对于嗜盐菌紫膜的研究

尤为活跃。这是因为我们对于紫膜及膜上蛋白菌紫质(BR)结构和功能的了解比任何一种其它膜蛋白都多。BR 是我们目前所知的结构最简单的质子泵。

美国学者 J. Nagle 等人自 1978 年以来^[4], 发表了一系列文章, 提出了一个质子转运和质子泵的分子模型。他们借鉴了在固体化学和固体物理研究中所得到的质子传导规律, 提出有机体内可由氢键构成氢键网络作为质子链, 以保证快速、有效地传导质子, 并在膜蛋白活性部位控制下, 完成质子泵功能。这一理论对于在生物能学领域中, 进一步开展质子泵机理的研究有很大的影响。本文第一部分将介绍这一理论模型的主要思想。第二部分将介绍在这一理论引导下而产生的数种紫膜质子泵分子模型。

一、质子传导和质子泵理论模型

1. 生物膜上的质子通道

质子的跨膜输运可想像为用两种模型来完成。一种模型是: 一跨膜蛋白在膜一侧以特定部位接受一质子, 然后以一很大的构象变化将此质子运载至膜另一侧释放出来。另一模型是: 膜蛋白的活性部位与质子通道相联, 活性部位起着定向泵的作用, 使质子在通道内定向

运输。后一模型与前者相比,它要求蛋白的构象变化要小得多,活性部位也远比膜层厚度(40 Å)要薄。同时就紫膜的质子泵工作来说,人们并未发现有很大的构象变化,仅产生色素团和菌蛋白的局部构象变化。因此具有质子通道的模型应更为合理。

最简单的质子通道可理解为是一种存在于膜上的直径很大的水孔。水孔深入膜之深层并被体积水充满。由于这种井样的水孔很深,使得载有蛋白活性部位的膜层就变得很薄。这将使薄层膜所承受的电场强度变得很大。如膜电位为 100mV,薄层厚度为 5 Å,则场强可达 $2 \times 10^6 \text{V/cm}$,此值已接近于电介质击穿强度^[5]。为了使得膜上的活性部位稳定,其唯一的途径是使水孔变窄(如 10 Å),这样也就改变了水孔的性质。通常,膜上很窄的通道都是由蛋白的极性基团在脂与水的界面上形成的,这些极性基团必然与水分子形成氢键,这就使这一层水分子处于有序状态。与这一层水分子相邻的水层也是有序的。故存在于窄孔内的水和体积水的状态不一样,它很少流动,具有类似于冰样的结构。从固体物理和固体化学的研究中知道,这种以氢键形成的通道,仅能选择性地透过质子,而不能透过其它种离子。这一特点也就使得薄层膜上的场强不会超过击穿电压,并且膜两侧能具有贮存一定的电化电位的能力。

Nagle 等人^[4]认为,在膜蛋白中可由极性氨基酸侧链如 ser、thr、tyr、glu、asp、gln、asn、lys、arg 和 his 等的极性基团在膜上形成一个亲水环境的氢键网络(HBC),这种网络中也可能有一定的水分子参加。由于每一氢键长度约为 2.5—3 Å,故约需 20 个氢键的线性排列才能形成一个跨膜的氢键链。这种氢键链又被称为质子链(proton wire),因为它有类似于一根金属导线传导电子那样来传导质子的性质。图 1 是这种质子链的图示。

现在虽然还无法用 X 衍射直接观测这种氢键链的存在,但一些事实说明,这种氢键链是有可能存在的。例如从 BR 的构象来说,它与球蛋白有很大的区别。在它的双脂膜接触的外

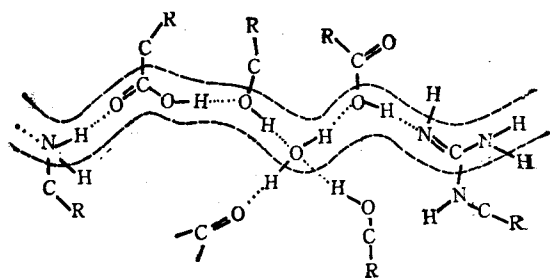


图 1 由膜蛋白极性氨基酸侧链和一些水分子形成的氢键链

R 为肽链骨架上的氨基酸残基,质子通道用虚线圈出。

部,含有大量的疏水残基,而在蛋白内部则含有很多的极性残基。这就为在蛋白内部由极性侧链形成氢键链提供了基础。此外 BR 在紫膜上具有晶体结构,不具有在液体中的那种流动性,从而为在 BR 内部形成类似于冰样的氢键固体提供了条件。Merz 等^[6]考虑了 BR 的立体构型,提出了在七条 α 螺旋中,由来自 4 条 α 螺旋的六个 tyr 在 BR 分子内部形成局部氢键链的模型。

2. 氢键链传导质子的过程

氢键链传导质子的过程是从一些氢键晶体的电导和介电特性的研究中得到的。冰是氢键晶体的典型例子,它组成扩展的三维空间氢键网络。除冰外还存在一些具有一维空间的氢键物质,如 $\text{LiN}_2\text{H}_3\text{SO}_4$ (硫酸胍锂), PbHPO_4 和咪唑等。这类物质的氢键沿同一方向排列,而且质子沿氢键方向的传播速率是在垂直与此方向的 10^3 倍^[7]。

在氢键链中质子的传导有特殊机制。首先,质子的传导一定要在氢键体系内完成。如果想像质子按照图 2A 中所示,以最简单的方式从一个极性基团直接跳至另一个极性基团,这是绝对不可能的。因为裸露的电荷不但进入蛋白内很困难,而且在蛋白内的跳跃需要很大的活化能,从而无法实现。质子在氢键链中的转运是通过两种互相交替的机制,即跳跃/翻转来实现。图 2B 和 C 是这两种机制的说明。首先一过剩质子(图 2B)在通道的左端出现,形成 $-\text{OH}_2^+$ 正离子。这在晶体学上被称为正离子

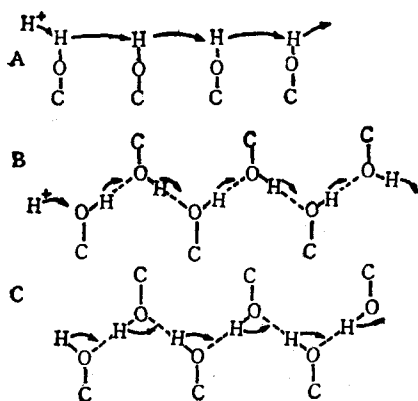


图2 质子传导机制图示

A: 在蛋白内不大可能实现的机制; B: 一个质子自左末端进入, 形成了一个正离子缺陷, 然后按箭头所示向右传播; C: 一个负的L断层在最右端形成, 并依箭头所示向左传播。

缺陷(也有可能形成负离子缺陷, 即在基团上缺少质子)。然后这种离子缺陷以相邻质子的相继跳跃(如图2B中箭头所示)向右传播。所谓跳跃, 即是指质子原在氢键的左侧, 经跳跃后变为在氢键的右侧。图2B中的氢键链经过跳跃后, 所有质子的位置都向右移动了一个基团, 而最右端的质子则跳入溶液中, 氢键链处于图2C状态。

那末质子在氢键链上的跳跃是如何实现的呢? 在一对称的氢键体系中: $B^+H \cdots B \rightleftharpoons B \cdots H^+B$, 质子有很大的活动性, 它可停留在两个位置上, 即存在有两个最低的质子位能值。在一定的活化能作用下, 质子可从一个最低位能位置跃入另一个最低位能位置^[8]。故跳跃过程可简单地理解为热活化过程或是量子力学中的隧道效应^[7]。在氢键晶体的自然状态中, 缺陷的运动带有统计性质, 受热力学第二定律所控制, 故没有宏观的方向性。但在生物能学中, 这种缺陷的运动则是定向的。例如质子在膜电位作用下顺能量梯度运行, 或者是在蛋白的特定状态控制之下, 缺陷逆能量梯度运行, 贮存了质子电化电位。

在氢键链处于图2C所示状态时, 由于自身的极性, 将停止沿原来方向运送任何离子。它必须恢复至原来状态方能输运下一个质子。

这种恢复过程是通过某一基团的“翻转”, 从而产生称之为“键缺陷”的效应来达到的。在图2C中, 由最右端羟基基团的翻转, 使它原参与形成的氢键中, 不存在任何质子。这在结晶学上叫做L断层(fault), 也即是键缺陷。键缺陷以相邻羟基的相继翻转从右向左传播。这同一效应也可理解为是由于最左端的羟基开始翻转(图2C), 使一个氢键上出现了两个质子(被称为D断层)并向右传播的结果。当氢键链经过键缺陷传播后, 恢复至图2B状态, 就又能传播质子了。键缺陷的传播等同于自右向左输运负电荷。这样使一个完整的电荷分为两部分输运: 离子缺陷电荷和键缺陷电荷。电荷的分部输运使活化能大大降低, 从而使离子在不太高的活化能要求下, 不断地进入膜内。这一电荷分化过程在低介电常数的膜中更为重要。

在氢键链上质子输运的速率能否满足生物能学的要求, 这是一个至关重要的问题。已经知道BR光循环周期为10—100毫秒, 而在线粒体ATPase中质子传导的半周期为10—700毫秒。故质子跨膜运输所需时间不应超过毫秒范围。若假定在生物膜中离子缺陷和键缺陷的迁移率和在冰中一样, 膜层厚度为50 Å, 则计算说明, 离子缺陷和键缺陷仅在几个微秒内^[9]就能完成跨膜输运。这至少意味着质子传导速率绝不是限制质子泵速率的重要因子。

3. 氢键链的不对称性

氢键链的不对称性在完成质子泵功能中是非常重要的。图3是一种不对称氢键链的模型。图3A中所有质子均在氢键左侧, 而在图3B上所有质子均在氢键右侧。质子停留在氢键上的两种不同部位, 相应于两种不同的质子构型^[6]。这种不同能量的产生可理解为是由于分子间相互作用的结果。如由于蛋白的不同状态形成不同的氢键角COH(图3), 在某一角度时对于形成氢键更为有利, 从而具有更低的质子位能。或者是存在一带正电荷的基团, 它在质子停留的两个位置状态中, 具有不同的静电斥力, 从而使某一质子构型具有较低的位能。这两种状态能差的大小, 可以从完全对称状态

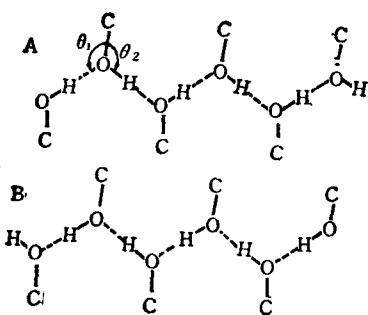


图3 具有不同 COH 键角 $\theta_1 \neq \theta_2$ 的不对称氢键链
状态A和状态B具有不同能量

能差为零,到能差很大接近于全部氢键能 ~ 6 kcal/M。在氢键晶体冰中,其能差为 0.6kcal/键,若是组成 20 个跨膜的氢键链时,能差可达 12kcal,相当于 500mV 的质子电化电位。这种能量差可以驱动质子沿链运动。或者是在质子运动过程中,产生了这种构型能的变化,则也就实现了将能量转化为质子电化电位在膜上贮存的过程。

二、紫膜质子泵分子模型

现在我们以嗜盐菌紫膜为例,来说明质子在氢键链上传导的基本原理在质子泵过程中的应用。这里虽然谈的是紫膜质子泵,但对于其它质子泵体系,它们所遵从的物理化学原理应是一致的。

在紫膜质子泵研究工作中,某些实验事实尚未取得完全一致的结果,例如对紫膜吸收光子后的原发反应就存在有三种看法:认为原发反应是质子转移,认为是色素团视黄醛的异构化反应以及认为原发反应是菌蛋白的构象变化等。此外现在已知紫膜在一光循环中,在生理 pH 和有盐介质中,可以泵出两个质子。这些事实使得人们设计了不同的工作模型。这里介绍 Nagle 在 1981 年^[9]设计的两种模型。

1. 整合注入式模型 (Integral Injector Model)

在通常的氢键晶体,如冰中,自发地产生离子缺陷或键缺陷的速率是很低的。因此要求在膜上的质子链中,必须首先注入离子缺陷。本

模型的主要思想是,膜蛋白活性部位在吸收光能被激活后,通过特定机制向氢键链注入离子缺陷,然后由于氢键链的不对称性,质子将在链上定向运动。离子缺陷的产生可理解为是活性部位在接受光能后产生 pK 变化,从而使质子发生位移。所以质子转移是本模型所依赖的原发反应。

图 4 是注入式模型的图示^[10]。X 为活性部位,它将氢键链分为两个部分:左支链为从细胞内表面延伸至活性部位;而右支链为从活性部位延伸至细胞外介质。假定氢键链由 BR 内

- A Y-H...Y-H...Y-H...XH...Z-H...Z-H...Z-H...Z-H
第一步: A 进入 B
B Y-H...Y-H...Y-H...X...HZ...H-Z...H-Z...H-Z
第二步: B 进入 C
C Y-H...Y-H...Y-H...X Z-H...Z-H...Z-H...Z-H
第三步: C 进入 D
D Y...H-Y...H-Y...H-X Z-H...Z-H...Z-H...Z-H
第四步: D 进入 A

图4 整合注入式模型的四个步骤
(说明见正文)

极性侧链组成,按照不对称氢键链的特点, YH...YH...YH 为低能量状态,而 HY...HY...HY 为高能量状态。X 吸收光能被激活后引起它的 pK 值降低,故与它结合的质子将沿氢键链与它右边的 ZH 结合,从而形成 H^+ZH 正离子。所以 X 可看作为电荷注入器。由于氢键链的不对称性,X 仅能向它的右邻注入电荷。形成的正离子缺陷以相邻质子的相继跳跃向右传播,直至右末端的质子泵至膜外。这一过程中质子构型能是从低能态变为高能态,质子逆能量梯度运行,使进入溶液中的质子具有很高的自由能。处于高能状态下的氢键链将从最右端输入 L 断层,即键缺陷,其特征是 H-Z 基团翻转为 Z-H 基团。由于相邻基团的相继翻转,使缺陷向左传播,这一过程是由降低质子构型能来驱动的。现在体系进入 C 状态,X 必须重新得到质子。它将得到左边的质子,因为左邻质子离它最近。当 X 得到这个质子后,它就向它的左邻输入了一个负离子,此负离子缺陷向左移动。当负离子移至左末端时,体系进入 D 状态,并在左末端输入 D 断层,它向右传播。此过

程等同于 HX 基团翻转形成 L 键缺陷后,向左传播。最后结果是在最左端从溶液中接受了一个质子,而在最右端泵出一个质子。体系恢复至状态 A,一个循环完成。

在此模型中,氢键链与活性单元 X 偶联在一起,完成了质子泵功能。那末活性单元 X 是什么呢?能否把它等同于席夫碱基中的 N 原子呢?实际上这是不可能的,因为 N 与质子是共价结合的,同时又分别以二价和一价各与一个碳结合,故已无自由轨道来形成氢键了。一种看法认为 X 可以是一羧基,它直接参与形成氢键链,如图 5 所示,羧基成为席夫碱基去质子化

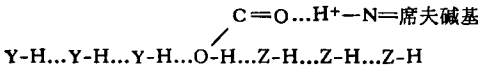


图 5 整合注入式模型中,用羧基作为 X 基团的图示
席夫碱基去质子化/重新质子化启动了图 4 中的
第一步和第三步

的传递体。由席夫碱基的去质子化启动了羧基上的质子沿氢键链传运。席夫碱基上的质子并不直接泵至膜外,而仅在光循环中作前后的往复运动。由于许多人已经发现 tyr 的解离过程参与了光循环,所以 Nagle 提出酪氨酸的羧基可作为 X 基团参与形成氢键链(图 6)。酪氨酸的 pK 可借一带电基团与其距离间的变化而得到调节。如一正电荷移近 tyr 时,将很容易使 tyr 去质子化。另外席夫碱基上的质子很可能与中性 arg 形成氢键,因此当席夫碱基去质子化时,就使一正电荷移向 tyr,从而向氢键链中

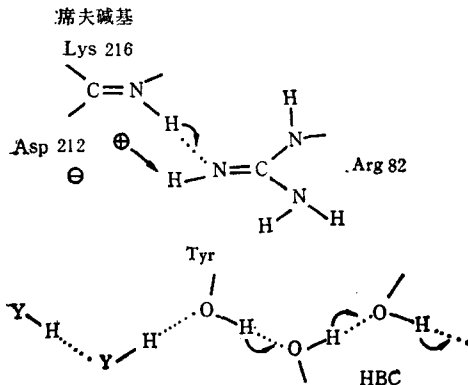


图 6 tyr 的羧基作为 X 基团,席夫碱基的去质子化将引起正电荷接近 tyr 从而注入离子

注入了离子(图 6)。

2. 开关模型 (Switch Model)

开关模型所依据的原发反应是色素团视黄醛在接受光子后发生的异构化变化。图 7 是这种模型的图示。N 代表席夫碱基,由色素团异构化反应而引起的构型变化,将使 N 的空间位置发生改变。N 与一标记为 Z 基团之间存在一间隙。 $\text{Y}\cdots\text{H}\cdots\text{N}$ 为不对称氢键,假定 $\text{Y}\cdots\text{HN}^+$ 的能量明显地高于 $\text{YH}^+\cdots\text{N}$ 的能量,这一点在 Y 和 N 的 pK 不同时就能发生。在图 7 A 的状态下,由于 $\text{Y}\cdots\text{HN}^+$ 高能键状态,使左支链在基态时就处于高的质子构型能状态 $\text{H}-\text{O}\cdots\text{HO}\cdots\text{HY}$ 。在受光激发后,视黄醛和 N 遭受构型变化,使 $\text{Y}\cdots\text{HN}^+$ 键断裂。链的左端可经键缺陷弛豫至低能态 $\text{OH}\cdots\text{OH}\cdots\text{YH}$

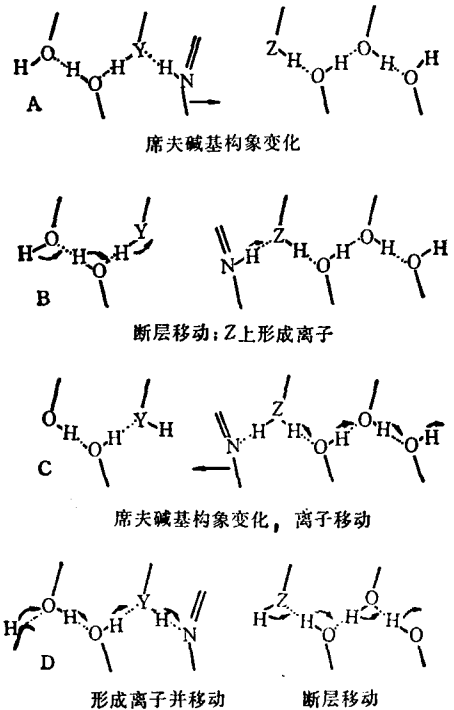


图 7 开关模型中的四个步骤

A. 体系的最低能量状态,右支链 COH 键角处于低能构型,而左支链保持高能构型。光引起的视黄醛构象变化,使 $\text{Y}\cdots\text{HN}^+$ 键断裂, N-H 移向右边。B. 左支链经键缺陷运动弛豫至低能构型,而在右支链 $\text{N}^+\text{H}\cdots\text{ZH}$ 氢键上,质子移向 Z 基团。C. 构型变化使席夫碱基回到原来位置, $\text{N}\cdots\text{H}^+\text{ZH}$ 键断裂。D. 右支链借键缺陷恢复至低能态,左支链上由于 YH 基团俘获 N 后,启动了负离子向左转运,完成了光循环。

状态(图 7B)。而席夫碱基 N 形成了氢键 $N^+H \cdots ZH$, 这一过程是耗散能量的, 此能量来自于色素团的构型变化能。

现在假定由于 N 和 Z 两基团的 pK 不同, 在氢键 $N^+H \cdots ZH$ 中质子移往 ZH 一边, 形成了 $N \cdots HZ^+H$ 。这一过程可假定是由于形成氢键的席夫碱基能使离子型的 HZ^+H 比 ZH 更稳定, 如由于 ZH 比 NH 更具碱性时, 就会产生此种结果, 故此过程是顺能量梯度运行的。

下一步是 N 基团经受反相的构型变化, 使 $N \cdots HZ^+H$ 氢键破坏, 此过程能量仍然由处于活性状态的视黄醛所提供。N 结合到 Y-H 基团上后, 右支链上经离子缺陷以及相继发生的键缺陷 (图 7D), 使右末端质子泵至溶液中, 并恢复到状态 A。而在左支链上, 由于 $Y^- \cdots HN^+$ 比 $YH \cdots N$ 有较低的能量, 故重新形成 HN^+ , 而在 Y 基团上形成的负离子则向左传播 (图 7D), 这样使左支链也恢复至状态 A; 但体系却从溶液中接受了一个质子。

由此模型可见, 由于视黄醛的构型变化, 促使 $Y^- \cdots HN^+$ 键的形成或破坏是能量转换过程中的关键步骤。当 $Y^- \cdots HN^+$ 氢键破裂时, 提供了左支链键缺陷传播的能量; 而 $Y^- \cdots HN^+$ 键的形成又促使左支链上发生离子缺陷的运动。在这个循环中, 使质子从左支链进入右支链, 并在右末端将质子泵出。

从这里列举的两个分子模型可以看出, 质子沿氢键链传播的这一物理化学原理, 是可以用来解释紫膜的质子泵工作过程。本文的目的不在于评论各种质子泵模型的优劣。实际上由

于膜上真实质子泵工作过程的复杂性, 我们对其仍然知道得很少, 现在仍然不可能提出一个完全合乎自然规律的模型。本文所介绍的原理正在推动质子泵机理的研究向更深的方向发展。愈来愈多的事实说明, 质子沿氢键链的传递可能是广泛存在的。例如人们在定向排列的紫膜干燥薄层中, 测量紫膜薄层的光电反应特性^[11], 发现光电反应信号在动力学上与光循环中各个中间体的光学信号一致, 这就从实验上证实了质子在膜上的传导速率是非常快的。最新的紫膜荧光特性研究^[12]说明, 在紫膜蛋白内存在一亲水的极性化区域, 这都有助于说明质子通道在膜蛋白内的存在。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉: 《生物化学与生物物理进展》, 1985, (2), 2.
- [2] Fillingame, R. H.: Ann. Rev. Biochem., 1980, 49, 1079.
- [3] Wistrom, M. et al.: Ann. Rev. Biochem., 1981, 50, 623.
- [4] Nagle, J. et al.: Proc. Natl. Aca. Sci., 1978, 75, 198.
- [5] Nagle, J. et al.: J. Memb. Biolog., 1983, 74, 1.
- [6] Merz, H. et al.: BBRC, 1981 101, 540.
- [7] Nagle, J. et al.: J. Chem. Phys., 1980, 72, 3959.
- [8] Zundel, G. et al.: in "Information and Energy Transduction in Biological Membranes", ed. by C. Bolis, A. Liss Inc. N-Y, 1984, 153—164.
- [9] Nagle, J. et al.: J. Chem. Phys., 1981 74, 1367.
- [10] Nagle, J. et al.: in "Information and Energy Transduction in Biological Membranes", ed. by C. Bolis, A. Liss Inc. N-Y 1984, 103—111.
- [11] Kesthelyi, L.: FEBS LETT., 1980, 109, 198.
- [12] Palmer, P. et al.: Photochem. and Photobiol., 1985, 42, 541.

[本文于 1987 年 2 月 16 日收到]