

加光照,引起 CHO 细胞染色体的突变和移位。他把 HPD 的光敏作用,与紫外线和 X 射线的效应作了比较,认为这三种因素对 DNA 的损伤有类似之处。Dubbelman 进一步观察到,HPD 的光敏作用,引起了 DNA 与蛋白质或酶的交联^[16]。

总之,目前已经认识到,DNA 是 HPD 光敏作用不可忽视的靶分子。

3. 其他靶分子

除了生物膜和 DNA 外,有些学者认为,蛋白质、抗体、抗原和溶酶体,也是 HPD 光敏作用的靶子^[17]。他们根据各自的实验,对光敏机制作了探讨。

细胞内微量金属离子的作用,也引起了学者们的研究兴趣。实验表明, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 等金属离子,有促进光敏损伤的作用。

此外,各临床单位和研究机构都很重视光照系统的改善和光辐射剂量学的研究。显然,无论是为提高治疗效果,还是弄清 HPD 光敏机制,改善光源并准确地标定光照剂量,都是十分必要的。

参 考 文 献

[1] Hausmann, W.: *Biochem. Z.*, **30**, 276, 1911.

- [2] Kessel, D. and Dougherty, T. J. (Eds.): *Porphyrin Photosensitization*, Plenum Press, New York, 1983.
- [3] Bonnet, R. et al.: *ibid.*, p. 241.
- [4] Emiliani, C. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **37**, 487, 1983.
- [5] Ito, T.: *Studia Biophys.* **36**, 297, 1983.
- [6] Moan, J. et al.: *Porphyrin Photosensitization* (Eds. Kessel, D. and Dougherty, T. J.), pp. 165, Plenum Press, New York, 1983.
- [7] Dougherty T. J.: *Photochem. Photobiol.*, **38**, 377, 1983.
- [8] Bellnier, D. A. et al.: *ibid.*, **36**, 43, 1982.
- [9] Henderson, B. W. et al.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **160**, 129, 1983.
- [10] Cadby, P. A. et al.: *ibid.*, **160**, 251, 1983.
- [11] Moan, J. et al.: *ibid.*, **160**, 165, 1983.
- [12] Pryor, W. A.: *Free Radicals in Biology*, Vol. 2, pp. 85, Academic Press, New York, 1976.
- [13] Felix, C. C. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **37**, 141, 1983.
- [14] Rossi, E. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **34**, 447, 1981.
- [15] Dougherty, T. J. et al.: *Cancer, Principles and Practices of Oncology* (Ed. V. DeVita), pp. 1836, Lippincott, Philadelphia, 1982.
- [16] Dubbelman, T. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 47, 1982.
- [17] Mew, D. et al.: *J. Immunol.*, **130**, 1473, 1983.

[本文于 1984 年 4 月 27 日收到]

嗜盐菌紫膜的质子泵功能

李 庆 国

(复旦大学生物系, 上海)

嗜盐菌生活在 NaCl 含量接近饱和的自然环境中。在缺氧和充分光照条件下,它的细胞膜能长出紫色的膜斑,称为紫膜,镶嵌在整个细胞膜上。在合适条件下,紫膜面积可占整个细胞膜表面的一半。紫膜上仅含有一种蛋白,叫细菌视紫质(bR, bacteriorhodopsin)。bR 上的色素团——视黄醛(与哺乳动物视色素同一种色素团)通过质子化的席夫碱基与蛋白中赖氨酸的 ϵ -氨基相连。bR 分子在膜上排列极其

有序,三个分子以三重轴对称形成三聚体,并形成标准的六边形二维晶格。bR 分子是一种跨膜蛋白,每一个分子形成 7 个垂直于膜平面的 α 螺旋,其 N 端在膜外侧,而 C 端在细胞质内侧。bR 有特征吸收光谱;光照时,它的吸收最大值发生一系列变化,称为光循环。在光循环过程中,细胞在紫膜外表面一侧泵出质子,并在细胞膜内侧吸收质子。这样产生的质子跨膜电位能直接促进细胞的一些代谢过程,特别

是能量代谢,例如 ATP 的合成,以及某些离子和氨基酸的耗能越膜转运等。

六十年代中期,有人第一次作过紫膜的形态描述,此后,关于紫膜的研究工作进展很快^[1,2]。本文主要介绍近几年紫膜的质子泵功能研究的一些新进展。

一、嗜盐菌的三类视紫质色素及 质子流的越膜运动

嗜盐菌 (*Halobacterium halobium*) 除其紫膜上含有 bR 外,细胞膜上还含有其他种类视紫质色素。质子流的越膜运动也远比人们想像的复杂。

最近人们从嗜盐菌细胞膜上又分离到一种称做嗜盐视红质(hR, halorhodopsin)的色素,它的最大吸收为 578nm,照光后也有一个光循环,周期是十几毫秒。hR 是一种光趋动的氯离子泵^[3],照光时 Cl^- 进入细胞内,并伴随有质子流入。关于氯离子泵的生理功能目前不太清楚。在一种不含 bR,也不含 hR 的嗜盐菌突变种中,人们发现它们仍具有趋光反应。进一步的研究表明,这种趋光反应是由膜上第三种类视紫质色素——慢视紫质(SR, Slow Rhodopsin)贡献的^[4]。SR 的最大吸收为 587 nm,室温下也有一光循环,周期较慢,约为一秒左右。SR 仅是一种光感受器,无离子泵作用,在一般的细胞中,三种色素的含量以 bR 为主。

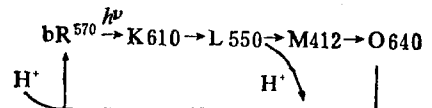
由一般细胞形成的封闭细胞囊(用超声处理细胞,内容物流出,然后自行愈合而成)中,bR 经光照建立起质子浓度梯度后,能触发其他离子例如 K^+ 和 Na^+ 的越膜运动; K^+ 在细胞内聚集, Na^+ 运至膜外,所以质子梯度可能转换为 K^+ 和 Na^+ 浓度梯度。如关灭光源后,质子梯度半衰期小于 20 秒,而 Na^+ 梯度的半衰期是 2—5 分。目前了解比较多的是由质子动力驱动的 Na^+/H^+ 反向体的内外交换。即 H^+ 自膜外进入膜内,同时伴随 Na^+ 转运至膜外,结果是形成跨膜的 Na^+ 梯度。它能驱使膜上耗能的物质转运过程,如某些氨基酸像谷氨酸的输运等。由于在此反向体的交换过程中, H^+ 迅速流入细

胞内,致使介质出现碱化。这可以解释活细胞在照光时,介质先碱化然后才有酸化的现象。由于存在多种质子流的越膜运动,所以研究紫膜 bR 的质子泵功能时,必须采用不同方法,以便区分不同类型的质子运动。

二、细菌视紫质的光循环

细菌视紫质(bR)分子有两种异构体,即全反型 bR^t 和 13-顺式 $\text{bR}^{13\text{-cis}}$ 。在暗适应的 bR 中(最大吸收 560nm)50% 为全反型,另一半为 13-顺式。照光时,这 50% 的 $\text{bR}^{13\text{-cis}}$ 将产生一个光循环,结果产生光适应的 bR (其最大吸收为 570nm)即为 100% 的 bR^t 构型。关于 $\text{bR}^{13\text{-cis}}$ 的光循环,目前了解的不多,它如何在光循环中转变为光适应型也不清楚。但有一点是可以肯定的,即在此光循环中,没有去质子化席夫碱基所产生的蓝移产物(即 M 中间体,它在 bR^t 的光循环中是很有特征的),也无质子泵出。这一点说明了席夫碱基的去质子化(即 M 产物)在质子泵功能中的重要作用。

在 bR^t 的光循环中,最早提出的模型是几个中间体以线性的不分支的方式相继产生,即:



现在陆续又发现了一些新的中间体,但多数人仍然承认 K, L, M, O 是光循环中几个主要的中间体。

光循环的原发反应,很可能和视色素中的视紫红质一样,是光引起的异构化反应。已经有一些证据可以证明这一点,如果保存在低温下的 M 产物,可以提取出 13-顺式的视黄醛,拉曼光谱也看出 M 有 13-cis 的视黄醛构象,在 L 产物中也能提取出 13-顺式视黄醛。

用时间分辨的共振拉曼光谱方法,测得的席夫碱基去质子化的峰(1622cm^{-1})比属于 M 的伸展振动(1576cm^{-1})上升快,由此可以推断,去质子化在 M 形成以前就发生了。这说明在 L 和 M 之间,仍有某一中间产物,它虽不是 M,但已去质子化了。这是许多人一直想要找到的中间

体。

由于M的形成和衰减都是具有两个时间常数的动力学过程^[5],因而M产物的前体L也必定是两个,研究不同温度时pH对L向M转换的影响时,证实了这一设想^[6]。在光循环中,L能以逆反应形成bR,此过程与L→M的反应相互竞争。可以推想,转变为bR与转变为M的两种L产物,应有某种差别。后来,实验证实易于向M转化的L产物中含有解离的酪氨酸。

除了在中间体L上有分支途径外,在M上也有分支^[7]。利用双脉冲法,先给一橙色光脉冲引起光循环后,接着用一个被M产物所吸收的蓝光脉冲辐照样品,可以发现形成一瞬态产物M³⁹⁰,它能热弛豫至bR。此现象称为“蓝光效应”,它使M产物减少,也使质子泵效率降低。

利用脉冲光解法分析了M产物中的两种衰减组份,即M^f(M^{*})和M^s(M^{**})的衰减与O产物之间的关系,一般的规律是M^f的衰减与O的增长相配合;而M^s的衰减与O的衰减相配合^[8]。由此可以推论,在光循环中M^s与O处于平衡状态。

已有证据说明,M是去质子化的,它的光谱相对bR有很大的蓝移,这是席夫碱基去质子化的特征。氧化的溶液对M形成有较大的影响,而对其他中间体如L,K,O等则影响较小。共振拉曼光谱研究发现,M产物的频率和光谱均类似于去质子化席夫碱基。去质子化的M产物在光循环中应有其特殊地位,如果承认光循环与质子泵功能间的紧密关系,则可以假定,被泵出的质子来源于质子化席夫碱基,但这一假定与许多事实不符合。

三、质子泵的定量研究及其与光循环的关系

在质子泵功能的研究中,人们首先试图决定质子泵的量子效率,即决定比值 $Q_{H^+} = \text{泵出质子数}/\text{吸收光子数}$ 。 Q_{H^+} 值对计算光能转换效率是有用的,但对探讨质子泵的机理帮助较小。多数人采用光循环量子效率这一物理量。首

先测得由光引起的在400nm处的吸收变化,由此求得M的产率(用克分子数表示),然后测定在同样条件下泵出的质子克分子数,并换算出对应于每一克分子M产物所转移的质子克分子数,即比值 $S_{H^+} = [H^+]/[M]$ 。M的量子效率一般为0.25—0.3^[9],如果实验测得 S_{H^+} ,亦可换算得到 Q_{H^+} 。在通常情况下,M的产率不随pH或离子强度而变化,故 S_{H^+} 的变化基本上反映了质子泵量子效率的变化。

已经在活细胞的样品中测得 S_{H^+} ,这种活细胞样品的紫膜具有天然状态的完整取向,质子在膜上非特异性“漏出”较少。细胞预先经过(如N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCCD)处理,以便封锁质子被动流入的通道。实际测定表明,在活细胞中 S_{H^+} 是介质pH的函数,在酸性条件下较高,碱性时较低,中性点在中性pH附近^[10]。例如pH从6.0变到8.0时, S_{H^+} 从2.1降为0.9。这些数据说明,在合适条件下, S_{H^+} 可大于1近于2,不为整数,这一结果出乎人们意料。

在细胞囊胞或在含有bR的脂质体中,其结果近似于在活细胞中。

紫膜悬浮液是研究得最多的体系。因为它是开放体系,其质子泵效率的测定必然受到膜表面质子释放和接受速率的影响。用pH电极测定发现,低pH时,悬浮液表现为接受质子,当pH是5或者大于5时,表现为释放质子,这些特点类似于光循环中间体O。利用染料做指示剂,已经测得在近于生理pH的环境中的 S_{H^+} 值。此值也是入射光强和介质离子强度的函数。一般是低强度光辐照和高离子强度时效率较高。如KCl为10mM时, S_{H^+} 是0.64,而KCl是500mM时, S_{H^+} 是1.8。这些数据也说明, S_{H^+} 可在1与2之间变化,有时也不为整数。

S_{H^+} 可以为2,说明在合适条件下,在一个光循环中bR分子可以泵出两个质子。这一点与泵出的质子是来源于质子化的席夫碱基不符,由此便提出了质子泵与光循环之间究竟如何耦联的问题。

Li等^[11]研究了一个光脉冲所引起的质子

释放总量,以及M的两个组份 M^f 和 M^s 的产率与 pH 的依赖关系,他们发现 M^s 与质子泵效率有类似的 pH 依赖关系。在温度实验中,二者亦有相同的温度依赖关系,因此他们提出质子的越膜运输与 M^s 相耦联。

Ohno^[12] 等人研究了细胞囊胞体系中的“蓝光效应”,发现仅当蓝光脉冲在相应于 M^s 的衰减时间里被吸收,才具有降低 ΔpH 的效应;而在 M^f 衰减的时间里被吸收,无此效应。这一事实也证明了质子泵与 M^s 之间的耦联关系。

四、细菌视蛋白在质子泵中的作用

在一个光循环中可有两个质子被泵出,这一点否定了质子化席夫碱基上的质子被泵出的模型,因此许多人进一步研究细菌视蛋白是如何参与光循环的。多种方法研究证明,光循环中 L 向 M 的转化过程中, L 与 M 之间仍有特定的中间体存在。

用橙色光照在紫膜悬浮液上引起光循环时,在相应于细菌视蛋白的紫外荧光波段和紫外吸收波段上,也发现有周期性的光化学变化^[13],这些变化基本上与 M 的时间一致。其主要特征是有一个在 300 nm 附近的高峰和在 280 nm 附近的低谷。这种变化非常像酪氨酸解离时光谱变化特征。

在低温下(-40°C — -90°C)M 的形成与外界环境 pH 的变化有密切的关系^[14]。在碱性条件下, M 产物大大增加, pK 约为 10。这说明酪氨酸的解离对 M 产物的形成有很大的催化效应。在研究了 L 产物逆反应至 bR 以及 L 向 M 转化的两种途径后,有人提出有两种 L 产物的观点:一种是具有解离的酪氨酸,它很容易形成 M 产物;另一种 L 产物具有未解离的酪氨酸,轻易经逆反应回至 bR,这种反应易在中性和低温下进行。RoSenbach^[15] 等人用化学修饰法发现这个解离的酪氨酸是 Tyr. 26。Fukomoto 等人^[16] 研究了在一光循环中 $\Delta 297$ 增长与 pH 的关系,他们发现此种关系与 M 形成时其慢组份随 pH 的变化相一致,在高 pH 时, $\Delta 297$ 增长加快, pK 接近 10。

这一系列事实都说明某个酪氨酸的解离是质子化席夫碱基去质子化的前提。这一发现有力地支持了 Kalisky^[14] 等人提出的质子泵分子机理模型。该模型认为在一个光循环中可以有二个质子泵出膜外,其中一个质子来源于质子化的席夫碱基;另一个来源于酪氨酸的解离。这个模型还假定存在一些局部的“质子链”,即存在一些膜内的质子受体或供体,当酪氨酸和席夫碱基去质子化时它们首先被质子化,然后再将质子转移到介质中。这些基团也可能是使酪氨酸和席夫碱基重新质子化的质子供体,因为这些基团不直接暴露在溶剂中,他们较少可能直接将质子输至介质中,或者直接从介质中接受质子。这个模型还提出了一种新的质子泵机理,以前人们依据光的原发反应是异构化这一点,过份强调构象变化的作用,如席夫碱基从原藏于膜内部变为暴露在溶剂中(也可能伴有 pK 的改变),从而泵出质子。但对膜蛋白来说,耗能太大的构象变化是不大可能的。因此可以设想光引起某些滴定基团 pK 的变化是质子泵的主要机理。假定存在某一基团 AH,它的解离状态将作为酪氨酸或席夫碱基去质子化的受体,并从这个基团上将质子泵出膜外。在中性介质中,此基团若要保持解离状态,可假定其 pK 为 6。为了能在一光化反应中从席夫碱基或酪氨酸上夺取质子,则要求它对质子的亲和力必须大于后者。这就要求酪氨酸和席夫碱基在光化反应中大大降低它的 pK 值,例如酪氨酸从 pK 10 降为 5,席夫碱基从 pK 12 降为 5。这仅是一个工作模型,它成功地解释了一个光循环中可以有二个质子被泵出的事实,但仍有许多问题无法解答,如质子在膜上转运的具体途径,“质子链”的具体组成,酪氨酸或席夫碱基如何降低其 pK 值等。这个模型也无法解释,当仅有一个质子被泵出时,究竟来源于哪一个基团,并且要求什么样的条件。此外,也不清楚为什么在某些情况下,泵出的质子不为整数等。

五、研究及应用前景展望

紫膜是人们在自然界中得到的、能够具体

而细致地研究分子生物力学的最好模型。紫膜的质子泵功能是 Mitchell 能量耦联理论的强有力的证据。从哺乳动物细胞线粒体中提取的 ATPase, 将其与含有紫膜的脂质体相组合, 这个模型就具有光化磷酸化的功能。在紫膜中发现的 H^+/Na^+ 反向体越膜交换, 以及 Na^+ /氨基酸的同向越膜体系, 无疑是 Mitchell 化学渗透梯度在细胞能量转换过程中普遍作用的典型例子。

紫膜含有与哺乳动物视色素中相同的色素团, 而且它们的原发光化反应都是异构化反应。因此研究紫膜将给视色素的研究提供新的模型, 开辟新的远景。

紫膜蛋白是在结构方面知道得比较多的一种膜蛋白。与绿色素的光合作用体系相比, 紫膜结构简单的多, 这是到目前为止我们所知道的最简单的有机光能转换体系。

从原理上看, 紫膜的光能转换特性有可能为人类所利用, 以便使太阳能转化为电能, 光合作用在这个方面的应用本来是最有希望的, 但是人们在用 Chl.a 等光合色素做成的薄膜体系中, 发现其光能转换效率不理想, 仅为 0.21%, 而紫膜体系转换效率比较高, 可能更有发展前景^[17]。

紫膜的质子泵功能相当稳定, 可以数年里保持其色泽和功能。不少人已经将紫膜融合到人造脂膜上, 此时紫膜在膜上有一定取向, 照光时膜两边能产生光电位, 一般照明条件下, 单层膜可以产生 200—500mV 电位差。人们已经成功地将多层膜串联起来, 得到了更高的光电位。但目前离实际应用还相差很远。主要有两方面困难, 一是尚未找到合适的方法, 使得紫膜在膜上有完全一致的取向; 其次是找不到合适的支持体, 目前采用的人造脂膜, 随时间延长, 其机

械性能愈来愈差。

假设有一完全取向的紫膜, 其支持体的机械性能也很理想, 则可以估算它的光能转换效率。实际估算表明, 理想条件下, 紫膜电池的电流密度可达到 $10^{-3} Acm^{-2}$, 以温带地区太阳辐射为 1 瓦/cm² 计, 支持膜电阻为 $10^5 \Omega cm^2$, 则此时光能转换效率至少可达 1%。但现在实验室条件下转换效率仅可达 10^{-5} , 这表明潜力很大。另一方面, 紫膜电池的造价比现用的硅光电池便宜很多, 如果用生物学方法, 选育出高产率、高转换效率的菌株, 又因嗜盐菌大规模生产时, 成本非常低, 这样紫膜将有可能成为市场上有竞争力的有机光能转换材料。

参 考 文 献

- [1] Stockenius, W. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 587, 1982.
- [2] Ebrey, T.: «生物化学与生物物理进展», **4**, 8, 1982.
- [3] Schobert, B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306, 1982.
- [4] Spundich, J. et al.: *Biophys. J.*, **43**, 243, 1983.
- [5] Govindjee, R. et al.: *Biophys. J.*, **30**, 231, 1980.
- [6] Kalisky, O. et al.: *Photochem. and Photobiol.*, **35**, 109, 1982.
- [7] Kalisky, O. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **28**, 261, 1978.
- [8] Lozier, R. et al.: in «*Energetics and Structure of Halphylic Microorganisms*» (Ed. by S. Caplan et al.), 123, 1978.
- [9] Becher, B. et al.: *Biophys. J.*, **32**, 993, 1980.
- [10] Renard, M. et al.: *Biophys. J.*, **32**, 993, 1980.
- [11] Li, Q. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, in press, 81, 22, 7079, 1984.
- [12] Ohno, K. et al.: *Biophys. J.*, **43**(2), 251, 1983.
- [13] Hess, B. et al.: *FEBS Lett.*, **100** (2), 334, 1979.
- [14] Kalisky, O. et al.: *Biochemis.*, **20**, 649, 1981.
- [15] Rosenbach, V. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **36**, 197, 1982.
- [16] Fukomoto, J. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **39** (1), 75, 1984.
- [17] Singh, K. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 62, 1980.

[本文于 1984 年 7 月 30 日收到]