

嗜盐菌中的类视紫红质蛋白

石 秀 凡

胡 坤 生

(中国科学院昆明动物研究所)

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

本文简要综述了在嗜盐菌中发现的四种含视黄醛的膜蛋白: bR, hR, sR-I 和 sR-II; 着重介绍了对它们的结构和功能的研究状况, 同时展示了这四种蛋白质在结构和功能方面的相似之处。

关键词 细菌视紫红质, 氯视紫红质, 感觉视紫红质, 视黄醛, 嗜盐菌

视紫红质 (rhodopsin) 是人们发现的第一种含视黄醛的膜蛋白。它位于动物视觉器官的感光细胞中, 将接受的光讯号转变为电讯号。于发现视紫红质后约一世纪之久, 1971 年 Oesterhelt 和 Stoeckenius 研究极端嗜盐菌 (*Halobacterium halobium*) 时发现了另一种膜蛋白, 这种蛋白质也含视黄醛, 并对光照起反应, 从而被命名为细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, bR)。随后在嗜盐菌中又陆续发现了三种含视黄醛的膜蛋白。第一种称为氯视紫红质 (halorhodopsin, hR), 第二种称为慢视紫红质 (slow rhodopsin) 或感觉视紫红质-I (sensory rhodopsin I, sR-I), 第三种称为憎光视紫红质 (phoborhodopsin, pR) 或感觉视紫红质-II (sR-II)。嗜盐菌中的这四种含视黄醛的膜蛋白在结构和功能方面与视紫红质有众多相似之处, 故统称为类视紫红质蛋白, 它们是研究膜光生物物理学的理想材料, 现将主要研究进展状况及结果简要综述如下。

一、细菌视紫红质 (bR)

1. 结构

bR 是一个 248 肽的蛋白质, 分子量为 26 kD。bR 作为膜蛋白的一个显著特征是它在紫膜中的排列十分规则, 由图 1a 可见 bR 在紫膜

中成三聚体排布, 每个三聚体周围约有 30 个磷脂分子, 其中三个磷脂分子位于三聚体中央处。紫膜中的 bR 形成规则的二维晶体结构, 从而可借助电镜和电子衍射技术得到它的结构信息。1975 年 Henderson 和 Unwin 由 7 Å 分辨率的结果建立了 bR 的空间模型^[1,2] (图 1b), 1986 年又得到 3.5 Å 分辨率的结果^[3], 1988

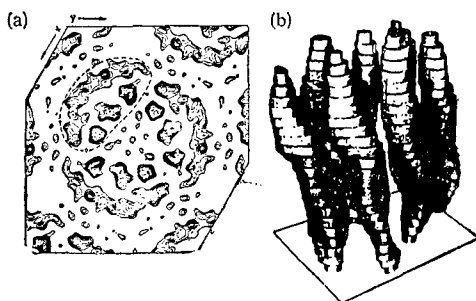


图 1

(a) 3.5 Å 分辨率的紫膜的电子衍射密度图

(b) 单个 bR 分子七段柱子的空间模型

年将分辨率又提高到 2.8 Å。电子密度图显示 bR 分子在膜中形成七段与膜平面垂直的柱子, 其中 B、C、D、E 四段一般认为是 α 螺旋结构, F 柱也倾向螺旋, A 和 G 柱则可能有 β 成分^[4]。这七段疏水柱嵌在紫膜中, 其间由亲水区相互连结。膜厚约 40 Å, 膜中每段柱子约由 24—28 个残基组成。视黄醛以质子化的 Schiff 碱形

式连在G柱的 Lys-216 末端的 N⁶ 上^[5]。全反视黄醛与膜平面约成 19°—28° 的角^[6]，距外膜表面约 6—9 Å。

2. 功能

嗜盐菌的主要能量来源是通过呼吸作用泵质子，形成跨膜的电化学离子梯度。当缺氧时呼吸作用变困难，菌即会在光照条件下合成bR，形成紫膜。bR的功能是作为光驱动的质子泵，吸收光能将 H^+ 由胞质中泵向胞质外，把光能转变成膜两侧的电化学势差而储存备用。这种电化学势差 $\Delta\mu H$ 包括膜两侧的电位差 $\Delta\phi$ 和 H^+ 浓度差 ΔpH 两部分。 $\Delta\mu H$ 中蕴藏的能量为：

$$\Delta\mu H = F\Delta\psi - 2.303RT\Delta\text{pH}$$

其中 F 为法拉第常数, R 为气体常数, T 为绝对温度。一个 H^+ 由膜内泵向膜外所产生的膜两侧自由能之差为:

$$\Delta p = e\Delta\psi - 2.303kT\Delta\text{pH}$$

其中 e 为正电子电荷, k 是波尔兹曼常数。 Δp 又称为质子驱动力。菌利用产生的电化学能驱

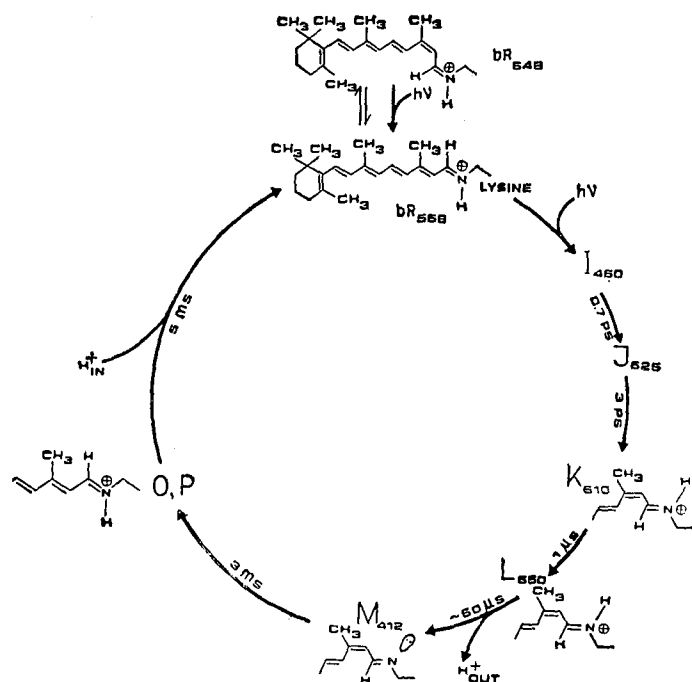


图2 bR的光化学循环

I_{460} , J_{622} , K_{610} , L_{550} , M_{412} , O , P 都是
光化学循环中的中间体

动诸如 ATP 合成等等的各种生命活动。

应用光谱技术、pH 测定、电位测定以及快速激光闪光等实验手段,对 bR 的光循环已了解得较清楚(图 2)。暗适应的 bR 约含等量的全反 (bR₅₆₃) 和 13-顺 (bR₅₄₈) 的视黄醛,光照后全部变为全反 bR₅₆₈。bR 吸收光后经中间产物 I、J 到 K,同时由全反变为 13-顺,历时在 10⁻¹² 秒级。在从 L₅₅₀ → M₄₁₂ 的过程中失去 Schiff 碱上的 H⁺,随后从环境中获得一个 H⁺ 经 10⁻³ 秒级回复到 bR₅₆₈。光循环的量子产率在 0.3—2H⁺/光循环之间,膜两侧最大电位差可达 300mV。

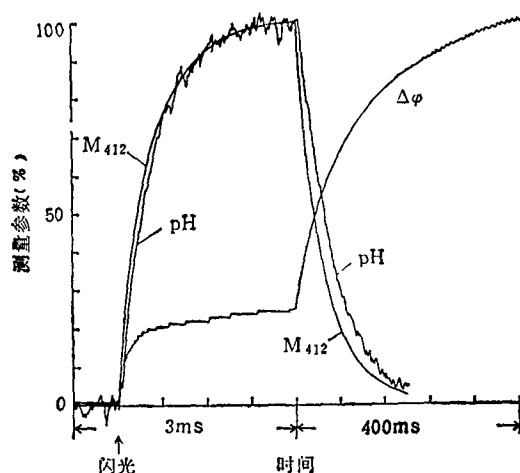


图3 中间产物 M_{412} , 膜两侧 ΔpH 和电位差 $\Delta\psi$ 的动力学

图 3 给出了光循环中间产物 M_{412} 的产生与膜两侧 ΔpH 及电位差 $\Delta\psi$ 间的关系^[7]。从中可清楚地看到 M_{412} 的产生和消失基本与 H^+ 的释放和吸收同步。在产生 M_{412} 和泵出 H^+ 的同时产生一电位差, 而当 M_{412} 消失和 H^+ 被吸收时又较慢地出现第二个电位差, 其幅度约为前者的四倍。

3. 结构与功能的关系

类视紫红质蛋白的生色团都是视黄醛。因此在研究bR的结构和功能关系的工作中,一个重要方面是研究视黄醛的结构与bR最大吸收峰间的关系及其对质子泵效率的影响。如今已人工合成了十多种视黄醛类似物供实验用,从中得到的较为肯定的结果有:(1)在质子泵过程

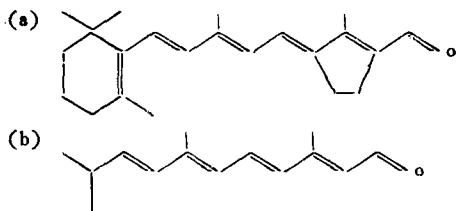


图4 人工合成的二种视黄醛类似物

中视黄醛由全反 $\rightarrow$ 13-顺的异构化不可缺。如图 4a 所示之类似物,相当于将视黄醛固定在全反构象,用它取代视黄醛导致最大吸收峰变为 576nm,光循环和质子泵均消失。(2) 紫罗酮环对质子泵似乎并不必需。用图 4b 所示之物取代视黄醛,光照后同样可见到中间产物M的形成和伴随的 pH 改变^[8,9]。(3) 视黄醛的共轭系统稍被破坏立即严重影响光谱红移效应^[10]。(4) 除去 13 位上的甲基导致质子泵效应和二个正电位差都完全消失^[11]。

研究 bR 的结构和功能关系中另一个重要方面的工作是,致力于 H^+ 通道的研究,希望阐明参与 H^+ 传递的残基及传递方式。研究手段包括残基的化学修饰和采用基因工程对 bR 进行定位点突变,然后测定突变产物的最大吸收峰及质子泵效率的变化。Khorana 实验室在这方面做了大量工作,文献[12,13]对此有简明的综述。当做代换 Trp-86, -137, -182 和 -189 $\rightarrow$ Phe 产生 20—70nm 的蓝移。Pro-186 $\rightarrow$ Leu (或 Val) 和 Thr-89 $\rightarrow$ Val 产生 70nm 蓝移。Asp-85 $\rightarrow$ Asn, Asp-212 $\rightarrow$ Glu 和 Arg-82 $\rightarrow$ Cys (或 Gln) 产生 30—35nm 红移。Tyr-185 $\rightarrow$ Phe 质子泵效率降为正常的 40%。Asp-85 $\rightarrow$ Asn 或 Asp-96 $\rightarrow$ Asn, 质子泵几乎完全消除。Asp-212 $\rightarrow$ Glu (或 Asn) 质子泵效率为正常的 10—20%。Asp-212 $\rightarrow$ Ala 导致对光不稳定同时质子泵完全消除。这些突变中最引人注意的是 Asp-212 $\rightarrow$ Glu, 该取代从化学角度看只是使残基 212 加长了一个 $-CH_2-$ 基团,却导致了显著的光谱红移和质子泵效率下降。它提示我们 Asp-212 在 bR 中的位置和构象对 bR 的功能至关重要。

一些关于 bR 质子泵机理的初步理论模型

相继出现。值得注意的一点是实验表明视黄醛受光照后由全反变为 13-顺的异构化在质子泵过程中起着关键作用,而理论计算指出这一异构化导致 Schiff 碱在 bR 中的位移却只有 3—4 Å。完善模型有待于对 bR 的结构和残基功能有进一步明确的了解。

二、氯视紫红质 (hR), 感觉视紫红质-I (sR-I) 和感觉视紫红质-II (sR-II)

hR、sR-I 和 sR-II 是位于嗜盐菌红膜中的三种含视黄醛的蛋白。每个菌约有二万个 hR 分子,为 bR 含量的 1/100。sR-I 和 sR-II 的含量更少,在 5000 个/菌数量级。因含量低,这三种蛋白发现得较晚,研究也远不如 bR 详细。

1. hR

hR 的分子量与 bR 很接近,为 27kD。一级序列中有 30% 与 bR 同源,和 bR 一样跨膜七次^[14,15],视黄醛亦以质子化 Schiff 碱的形式连于 hR 上。

1977 年 Matsuno-Yagi 和 Mukohata^[16] 首次指出 *H. halobium* 中存在 hR。当时认为 hR 是光驱动的由内向外的 Na^+ 泵。1982 年 Schobert 和 Lanyi^[17] 发现 hR 的功能实际上是受光照后将 Cl^- 由膜外泵入膜胞质内。其间视黄醛也同样经历由全反 $\rightarrow$ 13-顺的异构化变化。

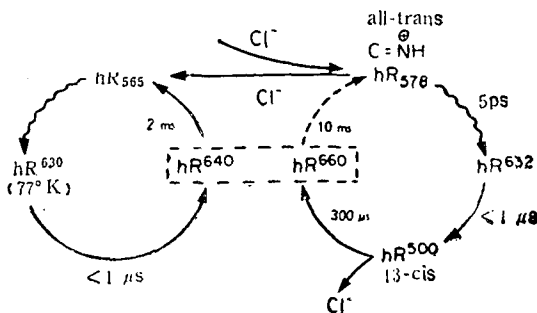


图5 hR 的光化学循环

hR⁶³², hR⁵⁰⁰, hR⁶⁶⁰, hR⁶⁴⁰, hR⁶³⁰ 表示光化学循环的中间体

图5画出了 hR 的光循环。右边是 Cl^- 存在时的循环,左边是没有 Cl^- 时的情况。其中

hR^{660} 和 hR^{640} 本质上可能是一种东西。

2. sR-I 和 sR-II

嗜盐菌具有光感受系统, 它们趋向长波长光 (580nm), 背离短波长光 (370nm)。这样可使菌免受蓝光及近紫外光的辐射损伤, 同时运动到对其光能转换器最有效的光照环境中。首先实验发现当视黄醛的合成被抑制时, 菌的趋光性就消失, 如用视黄醛类似物取代视黄醛, 作用光谱的波长亦随之改变^[18], 因而推测这种光感受器必定包含视黄醛色素。1982 年在缺乏 bR 和 hR 的 *H. halobium* 突变株 FIX 中发现了这种光感受蛋白, 它的最大吸收峰在 590nm, 受红光照后蓝移到 370nm, 产生趋向红光的效应 (图 6)。若接着再受蓝光照, 中间产物 sR_{370} 即转变为 sR_{510} (此时发出背离蓝光的讯号), 然后回复到原初的 sR_{590} 。 sR_{370} 在黑暗中回复到 sR_{590} 的过程大为减慢, 全部光循环约一秒, 比 bR 和 hR 约慢 100 倍, 因而这种光感觉视紫红质 (sensory rhodopsin) 又被称之为慢视紫红质 (slow rhodopsin), 简称都为 $sR^{[19]}$ 。

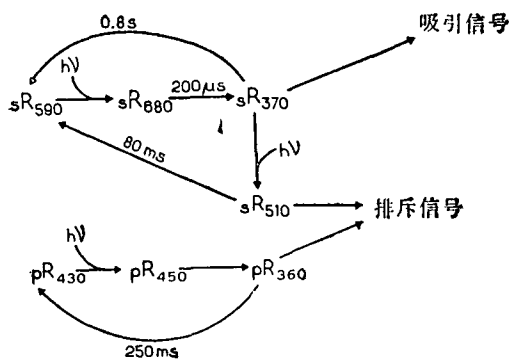


图 6 sR (sR-I) 和 pR (sR-II) 的光化学循环

sR 的功能是在微弱的红光照射下, 使菌趋向红光而背离蓝光运动。随后实验又发现, 在一定条件下, 菌无趋红光效应但仍具背离蓝光的运动。进一步的研究表明, 嗜盐菌确实有第四种含视黄醛的蛋白质, 其最大吸收峰在 480nm, 光循环见图 6。这种蛋白能使菌背离蓝光运动, 因而被称为憎光视紫红质 (phoborhodopsin, pR), 或感觉视紫红质-II (sensory rhodopsin

II), 而将先前发现的 SR 称为 sR-I, 以示区别。

降低环境中的氧含量可促使嗜盐菌合成 bR、hR 和 sR-I 三种蛋白质, SR-II 是菌中唯一的能在氧含量丰富条件下合成的含视黄醛的蛋白。上述四种蛋白质在吸收光后视黄醛都经历由全反到 13-顺的异构化变化^[20]。不同的是至今未能测出 sR 受光照后膜电位的变化。推测控制菌驱光运动的可能是光照中间产物 sR_{370} 的浓度。在这一点上, sR 可能与视觉过程中的视紫红质相似, 后者是通过光照中间产物 metarhodopsin-II 来产生讯号。

视紫红质和上述四种类视紫红质蛋白的基本共同点在于它们都以视黄醛作为生色团, 在结构上也有惊人的相似性。如牛视紫红质有 348 个残基, 比 bR 整整多 100 个, 一级序列与 bR 也颇不相似, 但它却与 bR 一样形成跨膜的七段柱子, 其中视黄醛亦以 Schiff 碱的形式连结在第七根柱子中的 Lys 的 N^+ 上。这种在进化关系上相距甚远而结构和功能方面却极相似的现象在生物学中不乏其例, 引人深思。

参 考 文 献

- 1 Henderson R, Unwin P N T. *Nature*, 1975; 257: 29
- 2 Unwin P N T, Henderson R. *J Mol Biol*, 1975; 94: 425
- 3 Henderson R et al. *Ultramicroscopy*, 1986; 19: 147
- 4 Jap B K et al. *Biophys J*, 1983; 43: 81
- 5 King G I et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 4726
- 6 Hess B et al. In: Martonosi N A ed, *Membrane and transport*, New York, London: Plenum press, 1982: 309
- 7 Drachev L A et al. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 1985; 281: 176
- 8 Crouch R K et al. *J Am Chem Soc*, 1984; 106: 8325
- 9 Zingoni J et al. *Biochemistry*, 1986; 25: 2022
- 10 Spudich J et al. *Biophys*, 1986; 49: 497
- 11 Khorana H G et al. *Chemica Scripta*, 1987; 27B: 137
- 12 Gartner W et al. *Biochemistry*, 1983; 22: 2637
- 13 Khorana H G. *J Biol Chem*, 1988; 263: 7439
- 14 Oesterhelt D. 13th Int Biochim Congr Abstr, 1985: 626
- 15 Oesterhelt D. 17th FEBS Meet Abstr, Berlin (west): 1986: 33
- 16 Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. *Biochim Biophys Res Commun*, 1977; 78: 237

(下转第176页)

方法^[20]。他们用 B-Spline 函数来表示 DNA 超螺旋的空间轨迹。这种方法的优点是可以将超螺旋的形变能以及链间的范德华作用能表示为坐标的显函数。求解能量最低构象的步骤如下：从一个随机的超螺旋构象出发，在某一给定温度下用 Monte Carlo 方法模拟 DNA 分子的热运动；通过逐渐降低模拟的温度，超螺旋构象最终被冻结在整体构象的能量最小值点上。这种极小化方法又称为“模拟退火” (Simulated Annealing)。图 4 是在计算机模拟过程

时环 DNA 的能量最低构象。通过上述处理方法建立了如图 5 所示的环 DNA 连环数差与超螺旋构象的定性关系：当 $\Delta Lk = 0$ 或 1 时，最稳定的构象是平面圆形(图 5b 和 c)；当 $\Delta Lk = 2$ 时，最稳定的构象是“8”字形(图 5d)；当 $\Delta Lk \geq 3$ 时，最稳定的构象是一系列返回式超螺旋结构(图 5e—g)，其螺旋圈数随 ΔLk 线性增加。上述结果与在电子显微镜下观察到的环 DNA 超螺旋构象是定性一致。这些结果证明了关于 DNA 超螺旋的弹性理论至少在一级近似下是正确的。

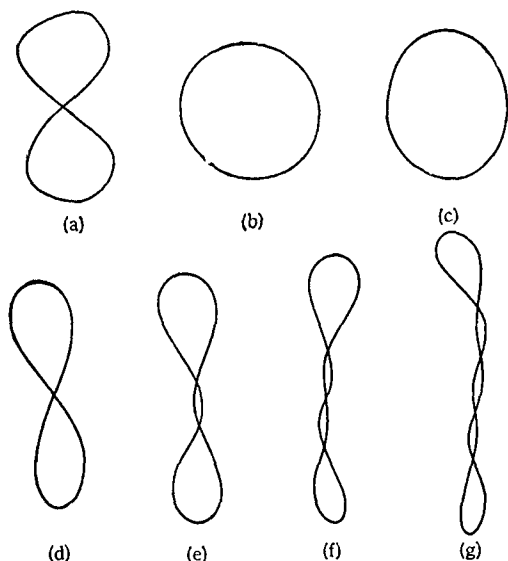


图 5 理论预见的在不同连环数差时 DNA 超螺旋的最稳定构象

(a) 为任意选择的起始构象，其余均为从(a)出发经过计算机模拟而得到的能量最低构象。(b)、(c)，(d)、(e)、(f)和(g)分别为 $\Delta Lk = 0, 1, 2, 3, 4$ 和 5 的情况

中，一个连环数差为 4 的环 DNA 从高温时的随机形状，随着温度的降低逐渐接近于返回式超螺旋构象的过程。最终的结构是 $\Delta Lk = 4$

参 考 文 献

- 1 Wang J C In: Semlyen J ed, *Cyclic Polymers*, Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1986: 320--360
- 2 Wu H -Y et al. *Cell*, 1988; 53: 433
- 3 Crick F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 2639
- 4 Pohl W. *Math Intelligencer*, 1980; 2: 20
- 5 White J, Bauer W J. *J Mol Biol*, 1986; 189: 324
- 6 Fuller F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971; 68: 815
- 7 Levitt M. *J Mol Biol*, 1983; 170: 723
- 8 Fuller F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 3557
- 9 Tanaka F, Takahashi H. *J Chem Phys*, 1986; 83: 6017
- 10 Vologodskii A et al. *Nature*, 1979; 280: 294
- 11 Hao M -H, Olson W K. *Biopolymers*, 1989; 28: 373
- 12 White J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 772
- 13 Levene S, Crothers D. *J Mol Biol*, 1986; 189: 73
- 14 Travers A et al. *Phil Trans R Soc Lond*, 1987; B317: 537
- 15 White J et al. *Science*, 1988; 241: 323
- 16 Benham C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 2397
- 17 Le Bret M. *Biopolymers*, 1984; 23: 1835
- 18 Benham C. *Biopolymers*, 1979; 18: 609
- 19 Tsura H, Wadati M. *Biopolymers*, 1986; 25: 2083
- 20 Hao M -H, Olson W K. *Macromolecules*, 1989; 22: 3292

[本文于1989年3月31日收到]

(上接第 197 页)

- 17 Lanyi J K, Schobert B. *Biochemistry*, 1983; 22: 2763
- 18 Stoeckenius W, Bogomolni R A. *Ann Rev Biochem*, 1982; 52: 587

- 19 Bogomolni R, Spudich J L. *Biophys J*, 1987; 52: 1071
- 20 Wolff E K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 7272

[本文于1989年4月14日收到]