

微型述评

细菌视紫红质的质子传输机理

王丽萍 李宝芳* 江 龙

(中国科学院化学研究所, 分子科学中心, 北京 100080)

摘要 细菌视紫红质 (bR) 是嗜盐菌紫膜中的唯一蛋白质成分, 具有质子泵、电荷分离和光致变色功能. bR 分子中的发色团视黄醛通过质子化席夫碱以共价键与 Lys216 相连. bR 分子受可见光照射后, 视黄醛发生从全-反到 13-顺式构型的异构化, 导致席夫碱的去质子化, 继之以可极化基团位置的改变. 力场的变化引起包括蛋白质三级结构在内的诸多变化, 这些变化促进并保证了质子从细胞质侧向细胞外侧的定向传输.

关键词 细菌视紫红质, 质子传输, 视黄醛, 异构化, M 态

学科分类号 Q682

细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, bR) 是嗜盐菌紫膜中的唯一蛋白质成分, 具有质子泵、电荷分离和光致变色功能, 自 60 年代末被发现以来, 引起了科学家们的极大兴趣. 人们对 bR 的结构、功能及其相互关系进行了详细研究. bR 分子由 248 个氨基酸组成, 每个 bR 分子都含有一个被称为视黄醛的发色团, 细菌视紫红质的多种重要功能都与视黄醛结构密不可分. bR 分子受可见光照射后, 视黄醛的构型发生变化, 多肽利用视黄醛捕获的光能作为动力, 将一个质子从细胞内侧推向细胞外侧, 这就是 bR 所具有的光驱动质子泵功能. 研究表明 bR 是靠电化学势传输氢离子的, 这种靠电化学势传输离子的过程是所有生命形式中最基本的过程, 而 bR 是已知最简单的有质子泵功能的生物分子, 因此科学家们对 bR 的质子泵功能给予了极大的关注. 30 多年的研究不仅推动了生物化学、生物物理学和结构生物学等先进技术的发展, 而且取得了巨大的成就. 到目前为止, 在高分辨条件下, 可以较为直观地给出质子传输的全过程. 最近, Nature 等杂志上发表的有关 bR 的文章^[1-5]从分子水平上揭示了质子传输的机理.

1 蛋白质的结构

bR 中的 248 个氨基酸组成了基本上垂直于细胞膜表面的七个跨膜 α 螺旋肽链, 依次为 A、B、C、D、E、F、G. bR 分子的 C 端在细胞质侧 (内侧), N 端在细胞外侧. 在 0.35 nm 及 0.3 nm 分辨率下, 紫膜二维结晶的低温电镜表明细胞质侧和细胞

外侧的螺旋肽链之间都有短的孔穴 (loop)^[1].

全反式视黄醛存在于螺旋之间与膜平面近似平行的区域. 视黄醛的一端通过质子化席夫碱结构连接于 G 螺旋 Lys216 残基的氮原子上, 另一端嵌入蛋白质的深处. 在 C 螺旋上, 从细胞质侧至细胞外侧的方向上依次排列着 Asp96、Asp85、Arg82 等重要残基. 质子受体 Asp85 和质子给体 Asp96 分别从两个方向侧翼包围视黄醛; Asp85 在视黄醛瞬间最易接近的区域, 而 Asp96 在距视黄醛约 1.2 nm 处. 细胞外侧区域含有一些亲水性残基, 而细胞内侧则缺少这样的残基. 在 0.29 nm 至 0.155 nm 分辨率下, 三维晶体的 X 射线衍射表明细胞外侧区域存在为数众多的水分子, 这些水分子与极性侧链一起构成一个三维氢键网络; 而在细胞内侧区域, 只有很少的结合水. 水分子的氢键网络和极性残基将 C 螺旋与 G 螺旋相连接^[2].

在基态的结构中, 水分子扩展的氢键网络和极性残基将 C 螺旋与 G 螺旋相连接. 蛋白质的活性位置在 Lys216 附近. 席夫碱、Asp85、Asp96 及水分子等在质子传输中起着重要作用.

2 视黄醛的异构化和蛋白质三级结构的变化

质子泵功能与光循环过程总是成对出现. 光适应的 bR 中视黄醛为全反式构型. 当 bR 分子吸收光能后, 视黄醛首先发生从全反到 13-顺的光致异

* 通讯联系人. 中国科学院感光化学研究所, 北京 100101.

Tel: 010-64888175, E-mail: bfl@ipc.ac.cn

收稿日期: 2001-01-05, 接受日期: 2001-02-23

构化, 形成 K 态; 然后通过热弛豫, 经历含有 13-顺视黄醛构型的 L、M、N 等中间态的转变, 最后返回到具有全反式视黄醛构型的基态 B 态, 完成

一个光循环. 光循环的部分中间态及其与简化的质子传输途径的关系如图 1 所示^[4].

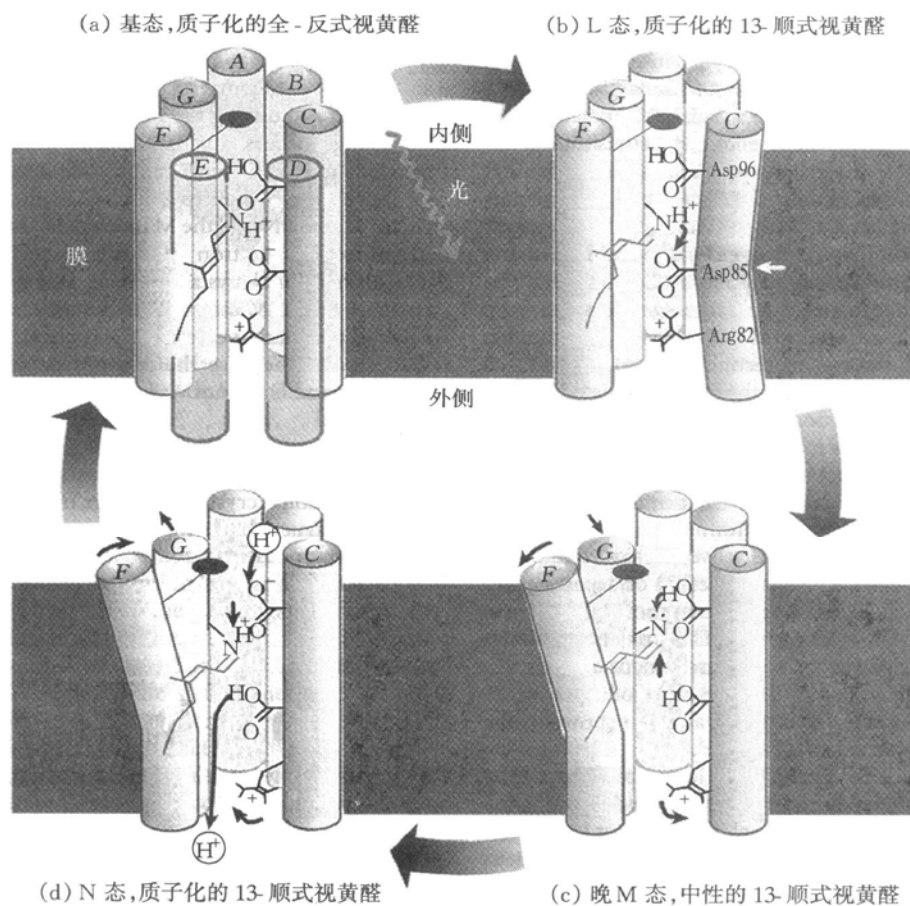


Fig. 1 Molecular mechanism of proton (H^+) pumping in bacteriorhodopsin

图 1 bR 的质子泵功能示意图

发色团的光致异构化是质子泵机理的最初过程. 蛋白质三级结构的变化对质子传输起到了促进作用. bR 分子受可见光照射后, 视黄醛在一个皮秒内 (K 态) 发生构型转变. 在 13-顺式状态, 视黄醛的一端沿着双键扭曲, 引起此部分成分相对于蛋白质骨架之间的运动, 结果使连接于氮原子上的质子处于一个能量上不利的环境, 从而触发了蛋白质的结构调整及质子向 Asp85 的传输.

早期的结构调整从蛋白质的核心蔓延至外表面, 破坏了基态时稳定 C 螺旋的水分子的氢键网络^[2]. 在约 50 ms 内, 质子经由 Tyr89 或 Asp212 及结合的水分子 W710_{bR} 的微小运动而移向 Asp85, 形成 L 态. 在此过程中, C 螺旋的一个微小的弯曲使 Asp85 的侧链靠近氮原子, 对质子的转移起到了帮助的作用 (图 1b). 视黄醛及其中间态环境在 K 态和 L 态发生的变化允许质子从席夫碱向 Asp85

传输^[3]. 这个过程能够使 Asp85 和席夫碱中性化, 消除了它们之间的静电引力, 并促进 C 螺旋的松弛以减少几何形状的扭曲^[2].

视黄醛在变为去质子化态时伸直, 由于视黄醛的两端都固定了, 氮原子向细胞内侧运动 0.07 nm 至 0.1 nm, 从而推动 F 螺旋上一些大的残基. 通过杠杆作用, F 螺旋的上部在 M 态后期向外摆动约 0.35 nm; 同时, G 螺旋的上部略微向 F 螺旋的位置移动 (图 1c)^[4,5]. 在向 N 态的转变中, 视黄醛从 Asp96 处获得质子, 重新质子化并重新变弯曲. F 和 G 螺旋的运动打开了一个窄的通道, 经过这个通道 Asp96 得以重新质子化. 在 N 到 O 的转变中, Asp85 上的质子被转移至包括通道的细胞外侧水分子在内扩展的氢键网络. 带正电荷的 Arg82 侧链向二价基 Glu194/Glu204 方向移动, 对质子向细胞外侧的释放起到了推动作用. 质子可以直接从一个谷

氨酸残基或通过水分子网络而释放。最后, 视黄醛弛豫回全-反式构型, F 和 G 螺旋摆回原来的位置, 重新开始下一个质子泵及光循环过程^[4]。

3 M 态的结构变化

M 态是光循环中最重要的中间态, 也是唯一的视黄醛去质子化态。M 态可分为 M1 和 M2 态。在 M1 和 M2 之间, 席夫碱对质子的可接近性改变了。在光循环到达 M1 之前, 席夫碱与细胞外侧的基团相联系; M2 之后, 席夫碱只能从细胞质侧被 Asp96 重新质子化。在高分辨 (0.225 nm) 下, M2 结构的细胞质侧存在一个允许质子从给体 Asp96 传输到席夫碱的水分子网络, 在 Asp96 上方出现了一个扩大的空腔体系, 这使得该基团在光循环的后期通过脉动 (fluctuate) 的水分子更容易去质子化和重新质子化^[3]。

水合程度及质子传输期间电荷的重新分布对蛋白质的三级结构有很大影响。三级结构的变化包括: F 螺旋在 Trp189 至 Trp182 区域向细胞内表面大约 0.08 nm 的位移, 在 Val179 至 Val167 区域向外的扭曲 (tilt); G 螺旋从 Leu221 至 Arg227 区域的变窄, 接近 Ala215 至 Lys216 区域的张开和曲率的增加。在 bR 态 (B 态), F 和 G 螺旋通过水分子 W721_{bR} 桥连起来, 即 W721_{bR} 将 Trp182 的氮与 Ala215 的羰基相连。在 M 态中, 连接 F 和 G 螺旋的桥断裂了, W721_M 将已经上移的 Trp182 中的氮和 Thr178 的羟基相连, W721 不再与 Ala215 的羰基氧直接作用。尽管如此, 这个结构却使另一个水分子 W722_M 得以稳定化, 而且, W721 以及 Ala215 的羰基已经将 W722_M 定位于席夫碱重新质子化所需的最近位置。在 W721_M 和 Ala215 的羰基之间, W722_M 的更大的柔顺性有利于席夫碱重新质子化。

三级结构的变化以及侧链的重新定位扩大了细胞质侧区域内的孔穴。孔穴的上部与细胞质表面相连, 故扩大的孔穴对于席夫碱和 Asp96 的重新质子化很重要。在 Asp96 和 Lys216 之间的孔穴中, 三级结构的改变可促进新的氢键的形成。在 bR 态, Lys216 的羰基氧与 Gly220 氨基上的质子及水分子 W720_{bR} 形成螺旋氢键; 同时, W720_{bR} 同样通过氢键被 B 螺旋上 Thr46 的羰基氧所稳定。在 M 态, Thr46 螺旋氢键可能断裂, 而 W720 与 Lys216 的羰基氧的相互作用持续到 M2 态。正是这个作用使 13-顺式视黄醛通过 Lys216 侧链的构象变化表现出向外的弯曲力而作用于 G 螺旋的局部区域, 导致连

接 Gly220 的氢键的混乱以及 Lys216 羰基的向外挠曲。

W720 的重新定位使得另外两个水分子 W723_M 和 W724_M 能够出现在 M2 态中。W724_M 与 Asp96 的 O_δ 和 Thr46 的 O_{γ1} 相互作用, 其中 Asp96 和 Thr46 在 bR 态中以氢键相连; W723_M 的位置由于与 W724_M、W720_M 和 Ala215 的羰基氧相互作用而固定。这些水分子与残基共同形成一个 Asp96 → W724_M → W723_M → O-Ala215 → W722_M → 席夫碱的质子传输链。由于 W722_M 较其最邻近的水分子不稳定, 水分子之间没有更多的势垒, 当质子到达 Ala215 羰基氧的区域时, 这个水分子可以脉动到席夫碱。可见, 席夫碱上方的氢键网络对席夫碱的重新质子化是必不可少的。

在 M2 态中, 有一个不平常的水分子 W740_M, 它被更憎水的残基所包围, 且其附近没有氢键, 与 Asp96 的距离为 0.535 nm。W740_M 的存在使得 M2 态能够形成较大的孔穴。这个孔穴有一个由某些残基的极性部分所形成的通向细胞质表面的窄的开口。分子这部分的更高柔曲性和部分的张开使得一个水分子能够随意扩散, 并被这个憎水孔穴所捕获。这样, 与 Asp96 的接触可以通过一个脉动的水分子而不是一个连续的水通道在毫秒范围内完成。W740_M 与 Asp96 的相互作用可降低 Asp96 的 pK_a, 通过这种方式启动 Asp96 的去质子化, 进而稳定这个基团的电荷状态。应该指出, Asp96 处在质子通道中性质不同的两个部分之间的关键位置。通道的一部分是包含直接朝向席夫碱的由水分子稳定的侧链; 另一个部分直接朝向细胞质表面, 被包围着脉动水分子的憎水氨基酸所限制。从细胞质表面到 Asp96 的通道不仅可以使 Asp96 重新质子化, 而且可以启动席夫碱的重新质子化。通道的两个部分对质子的不同传导性保证了质子向席夫碱的定向传输。

参 考 文 献

- 1 Lanyi J K. Progress toward an explicit mechanistic model for the light-driven pump, bacteriorhodopsin. *FEBS Letters*, 1999, **464** (3): 103~107
- 2 Royant A, Edman K, Ursby T, *et al.* Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Nature*, 2000, **406** (6796): 645~648
- 3 Sass H J, Buldt G, Gessenich R, *et al.* Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature*, 2000, **406** (6796): 649~652

-
- 4 Kuhlbrandt W. Bacteriorhodopsin - the movie. Nature, 2000, **406** (6796): 569~ 570 proton translocation by bacteriorhodopsin. Nature, 2000, **406** (6796): 653~ 657
- 5 Subramaniam S, Henderson R. Molecular mechanism of vectorial

Molecular Mechanism for Proton Translocation of Bacteriorhodopsin

WANG Li Ping, LI Bao-Fang^{*}, JIANG Long

(Center for Molecular Science, Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Bacteriorhodopsin (bR) is the sole protein in the purple membrane of *Halobacterium salinarum*, which functions as proton pump, charge separation and photochromism. The chromophore retinal is covalently attached to Lys 216 via a protonated Schiff base. Upon illumination, the all-*trans* to 13-*cis* isomerization of the retinal results in deprotonation of the Schiff base followed by alterations in protonatable groups within bacteriorhodopsin. The changed force field induces changes, even in the tertiary structure, which facilitate and warrant the vectorial proton translocation.

Key words bacteriorhodopsin, proton translocation, retinal, isomerization, M intermediate

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-64888175, E-mail: bfli@ipc.ac.cn

Received: January 5, 2001 Accepted: February 23, 2001