



# 一个生物化学家 的求索

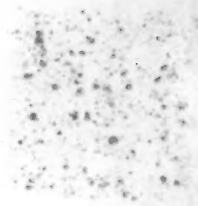
[美] F. 李普曼 著

科学出版社

中国科学院植物所图书馆



S0014740



2023

58.17304

268

# 一个生物化学家的求索

[美] F. 李普曼 著

周廷冲 孙曼霁 夏德意 译

石幼珊 校



科学出版社

1986

24275

中科院植物所图书馆



S0014740

## 内 容 简 介

本书作者是迈尔霍夫学派的老一辈生物化学家，他是生物化学发展的历史见证人之一。

全书共分两部分。第一部分以作者的科学活动为线索，用故事的形式叙述了生物化学史诗般发展的历史；第二部分是选载了作者的八篇论文。

本书可供初学生物化学的读者，医、工、农部门的广大工作人员，以及从事生物化学工作的科技人员参考。

Fritz Lipmann  
WANDERINGS OF  
A BIOCHEMIST

John Wiley & Sons, Inc. 1971.

### 一个生物化学家的求索

〔美〕F. 李普曼 著

周廷冲 孙曼弄 夏德意 译

石幼珊 校

责任编辑 高小琪

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1986年 4 月 第 一 版 开本：787×1092 1/32

1986年 4 月 第一次印刷 印张：8 1/8

印数：0001—3,500 字数：184,000

统一书号：13031 · 3158

本社书号：4719 · 13—10

定 价：1.50 元



## 序 言

我着手写这本书时想写的完全是另一个样子。原来打算走一条容易走的路，将我的论文按年月排列，其间用简短的注解连贯起来。我将我的文章加以挑选，最后选出来的篇幅很大。实质上，是想对这方面的生手传授一些经验。为此，我决定请我的学生看看我写出来的东西。约翰·希尔德布兰德 (John Hildebrand) 和克利斯·沃尔什 (Chris Walsh) 当时和里昂纳德·斯佩克特 (Leonard Spector) 一起研究的题目同我过去作过的辅酶A-乙酰磷酸的某些方面有些关联。我发现他们对生物化学的发展史有着令人惊异的兴趣，其所以令人惊异是因为大多数学生对生物化学史的记忆不超出5至10年。然而他们两人却认为我经历了史诗般的年代，他们不仅要知其然，更要知其所以然。

这样一来就难了，因为我就得学会写故事，我决定按照现在写成的样子重新改写我的原稿。第一部分是写学习与探索的年代，仿照歌德的《Wilhelm Meister 的学习时期和探索时期》，大多数篇幅写成了回忆录。书名中“wandering”一词的词义介乎德语和美语之间，意即求索或漫游，科学地说，就是兴之所至，随笔而写，不问导至何方。

正因为我愿意保留故事的特色，所以就没有在正文中插入参考文献，而把它们列于每章的末尾。

如果没有我们的秘书克里斯琴·吉莱斯皮 (Christian Gillespie) 小姐的敦促和全心全意的真诚帮助，这本书不可能问世。对此，我致以最真挚的谢意。

F. 李普曼

纽约市洛克菲勒大学，1970年7月

## 译者附记

生物化学对医学、工业和农业都是十分重要的一门学科，既有理论意义也有实用意义。不少初学者往往不知道生物化学发展的来龙去脉，对它缺乏历史唯物主义的认识，学习和实践时只能死记、硬背、抓不住重点。本书作者李普曼是德国法西斯铁蹄下迈尔霍夫学派幸存的老一辈生物化学家之一。他是生物化学史诗般发展的历史见证人，今年已经85岁高龄了。他在国际上享有很高的声誉，具有非凡的想象力，对新生事物敏感，为人热情，作风民主，愿意接受不同意见。他受过很好的科学训练，有着高超的指导工作的能力。在他的实验室中，人们思想活跃、相互尊重、志趣相投。

译者之一对此书很感兴趣，曾往北京各图书馆借阅未得。1980年11月忽接作者寄来此书。象这种传记性的科学著作出自一个伟大的生物化学家之手还是不多见的，读后发人深思，启示甚大。译者认为将此书译出，供我国从事生物化学工作者参考和借鉴是有意义的。

周廷冲 孙曼霁 夏德意

1984年10月

# 目 录

## 第一部分 传记 (偏重于科学方面的活动)

- 一、缓慢的开始 ( 1 )
  - (一) 习医年代 ( 1 )
  - (二) 舍医学而去 ( 2 )
  - (三) 决定攻读化学 ( 3 )
- 二、迈尔霍夫实验室 (1927—1930) ( 5 )
  - (一) 我在迈尔霍夫实验室的工作 ( 7 )
  - (二) 在无细胞发酵的研究上走过的弯路 ( 10 )
  - (三) 磷酸键能代谢功能的发现 ( 17 )
- 三、我的自述 ( 22 )
  - (一) 求职 ( 22 )
  - (二) 随同阿尔贝特·菲舍尔从事组织培养 ( 23 )
- 四、在洛克菲勒研究所 ( 25 )
  - 从磷蛋白中分离磷酸丝氨酸 ( 25 )
- 五、在哥本哈根 (1932—1939) ( 30 )
  - (一) 巴斯德效应 ( 30 )
  - (二) 丙酮酸氧化 ( 31 )
  - (三) 到美国去 ( 39 )
  - (四) 在杜·维格诺德实验室和迪安·伯克从事恶性肿瘤的研究工作 ( 40 )
  - (五) 简单的回顾 ( 41 )
- 六、在马萨诸塞总医院 (1941—1957) ( 44 )
  - (一) 从乙酰磷酸到辅酶A探求中的艰辛和失误 ( 47 )
  - (二) 在辅酶A中发现泛酸 ( 49 )

(三) 呼吸磷酸化反应的解偶联.....	( 55 )
(四) 结束辅酶A的工作.....	( 61 )
七、 氨甲酰磷酸酯.....	( 65 )
氨甲酰磷酸酯是酶促合成瓜氨酸中的氨甲酰供体.....	( 67 )
八、 硫酸盐的活化.....	( 75 )
九、 蛋白质合成.....	( 95 )
(一) 多肽合成中的一个模型.....	( 98 )
(二) 迁居洛克菲勒大学以后 (1957).....	( 100 )
(三) 蛋白质生物合成中多肽链的延长.....	( 108 )

## 第二部分 八篇论文

一、 B族维生素的生化功能.....	( 135 )
二、 代谢过程的模式.....	( 145 )
三、 生物合成的机理.....	( 157 )
四、 尝试以化学电位表达生物利用能量的公式.....	( 182 )
五、 分子技术学.....	( 193 )
六、 聚合反应中方向和机理间的关系.....	( 205 )
七、 从生物合成进化的现阶段设想过去.....	( 233 )
八、 知识的指数增长造成的不均衡性.....	( 250 )

# 第一部分

## 传记（偏重于科学方面的活动）

### 一、缓慢的开始

#### （一）习医年代

我开始是学医的，离开大学预科后，先在家乡坎特省（Kant）的柯尼斯堡（Koenigsberg）市读书，该市当时是德国最东部与俄国相邻的省份东普鲁士的首府，因为是靠俄国边界最大的城市，德国政府把这个大学办得比其他同样大小城市中的大学水平高一些。医学的年代在我的记忆中留有一定的感情色彩。医科学生们总把自己看作一个特殊的集团，他们所熟悉的机体内部活动，对大多数人来说是个禁地，我们为属于这个集团而颇感自豪。在临床工作期间，可以周游各地，而我就到了柏林，听著名的临床大医生们演讲。我在慕尼黑过的一个学期，学习空气很活跃，当时我的兄弟在那里攻读文学，我住在施瓦平（Schwabing）置身于我兄弟周围的艺术家和戏剧家之中。然而从职业角度上说，我从未超出医学的圈子。例如在慕尼黑，我连想都没有想过去听大化学家维尔斯塔特（Willstatter）的演讲。

我还要回柯尼斯堡，在考试前还有一段时间，按照惯例，暑期为准备期末考试，我在各科室作临床。我在精神病科过了一个暑假，时间虽短，但至今不忘。我在一个周围都

是精神失常的人的环境里过得很不自在，有一个人，患失去理性的抑郁症，执拗地想自杀。我和他作过长谈，他已几度想自杀，甚至在病房中还有此企图，要深入地了解这样一个有强迫观念的人问题的症结所在是何等地困难啊！此事长期印在我的脑子里。许多学校还规定要在妇产科实习两周。在此期间要住在门诊，当一个有经验医生的助手，在城里出诊接生。那个时候，医生多半是到病人家里去看病，而病人来医院就诊较少。有一次要我在相当简陋的条件下接生，我把手连臂伸入已张开的阴道里，抓住婴儿的腿把他拖了出来，这种情景仍历历在目。其他操作则由我那有经验的同伴去完成。在医学中，一个见习学生得到的生物学方面的教育对从事任何职业的人都是最好的准备。

## (二) 舍医学而去

考试刚结束，我就开始出现怀疑是否从医的念头。一个重要的原因是我不能适应它的商业性质：用金钱买得健康，为提供这一服务而接受病人的付款。但在柯尼斯堡市医院做了半年实习医生后，由于父母的一些医生朋友竭力劝说，我还是决定到病理学科学了一个时期，作为行医的准备。通过私人联系，一位在柏林贫民区腓特烈海因(Friedrichshein)一个大医院工作的著名病理学家路威·皮克(Ludwig Pick)接受我在他那里工作。我搬到那里，学了三个月病理学。每天早晨解剖尸体，下午看显微镜。我记得最清楚的是皮克的那惊人的诊断技术。但是干了三个月我就腻烦了。

正是这个时候，我初次跨入生物化学界，并决定报名选修了彼得·罗纳(Peter Rona)的一门三个月的特别课程。罗纳曾经同里奥诺·米夏埃利斯(Leonor Michaelis)合

作过，当我把这个决定告诉路威·皮克时，他大吃一惊，那时医生和生物化学之间联系极小，多数德国医学院校只把生物化学作为生理学的附加课程来讲授。

罗纳的课有点像生物化学的马拉松长跑，精选了一套最新的方法，可以学到如何测量pH以及浅近的胶体化学和电泳。我们要在一个简单的U形管内，使血红蛋白在电场内移动。我们花了不少时间学习测压计技术，用的仍是梨形巴克罗夫特 (Barcroft) 瓶，当时这种瓶还没有被瓦尔堡 (Warburg) 瓶所取代。对一个究竟生物化学是什么只有一点起码理解的医生来说，这是极好的训练。

在德国要得到医学博士学位，必须写一篇简短的论文。我的论文是在罗纳实验室里做的，因为我已经对当时很流行的胶体化学感兴趣了。

### (三) 决定攻读化学

走向生物化学的第二步是我高兴地接受了荷兰赠与的奖学金。那时正值德国通货猛烈膨胀，谁有机会离开那里都会求之不得。这项奖学金使我能进入在阿姆斯特丹 (Amsterdam) 的莱奎尔 (Laqueur) 的药理学实验室。我在那里四个月，做了我第一个以生物化学为题的实验。这是一个转折点，使我严肃认真地决定成为一个生物化学家。就是在这次短暂的接触中，我清楚地认识到学习化学的重要性。于是我决定回到我的家乡可以同父母住在一起。很幸运，汉斯·梅尔魏因 (Hans Meerwein) 这位真正的伟大的有机化学家，当时正在柯尼斯堡。现在，医学和化学的结合已很普遍，而在那时却是很不寻常的。因此，我就要花一点时间去说服梅尔魏因教授，允许我走一条捷径取得医学预科化学的学分。

这一段时期最难忘的感受是梅尔魏因教授的课程，我们作为研究生每年必须听这些讲演。它使我掌握了我原先已感到需要的有机化学的知识。

三年中，我学完了大部分必修课程，有点急不可待地准备去做真正的生物化学工作了。当时有两个实验室专业十分接近，这就是卡尔·诺伊贝格 (Carl Neuberg) 和奥托·迈尔霍夫两个班子，他们同时研究中间代谢领域中相似的题目，但是从不同的侧面进行。诺伊贝格从化学方面着手，而迈尔霍夫实验室则更多地倾向于从生物学方面，后者与我心中的愿望更为接近。1927年我被接受在该实验室里工作。

### 参 考 文 献

- [1] Über die Wirkung der Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration auf den Flockungsvorgang beim positiven und negativen Eisenhydroxydsol. With P. Rona, *Biochem. Z.* 147, 163 (1924).
- [2] Einfluss von intravenöser Glykogen- und Stärkeinspritzung auf den Blutzucker beim Kaninchen. With J. Planelles, *Biochem. Z.* 163, 406 (1925).



## 二、迈尔霍夫实验室 (1927—1930)

凯泽-威廉 (Kaiser-Wilhelm) 生物研究所包括迈尔霍夫实验室，是当时达勒姆 (Dahlem) 科学团体的一部分。生物楼里有各种各样的实验室。迈尔霍夫的实验室位于一楼，中间数层为遗传学家们所有，科伦斯 (Correns) 给我的印象是：留着蓬松的红灰色胡子，在后院他种的豌豆地里来回走动。后来我才知道他是孟德尔学说的重新发现者之一。还有戈尔德施米特、施特恩、曼戈尔德 (Goldschmidt, Stern, Mangold) 和哈特曼 (Hartmann) 是迈尔霍夫的好朋友，他们大多数后来都定居美国。研究所的顶楼，最高的一层是奥托·瓦尔堡的实验室。瓦尔堡当时已带有某种神秘色彩，我们对他无限崇拜，但很少和他见面，偶尔在黄昏时分，他下到下面几层楼来，我们会看到他一眼。他愿意同高级技术人员一起工作，所有这些人，都是从耶拿 (Jena) 的蔡斯 (Zeiss) 工厂附设的精密机械高等学校里训练出来的。他们中突出的是内格莱因 (Negelein) (后来得到了一个化学学位)，还有一个叫克里斯琴 (Christian)。这两个人对那里作出的伟大工作，尤其是后来在瓦尔堡搬到细胞生理学研究所新楼里所做的工作都起过作用。这个新楼是我离开迈尔霍夫后不久搬去的。他把少数具有较高学位的人留下和他工作了一段时间，这些人有汉斯·A. 克雷布斯 (Hans A. Krebs)、汉斯·格夫隆 (Hans Gaffron) 和后来的比歇尔 (Bücher) 以及一些外国访问学者。我在迈尔霍夫那里工作时，克雷布斯和格夫隆也正在那里工作，

他们和我以及楼上的人建立了联系。

生物楼仅是著名的达勒姆科学团体的一小部份，那里还有我们经常联系的诺伊贝格生物化学研究所以及奥托·哈恩 (Otto Hahn) 和莱斯·迈特纳 (Liese Meitner) 的化学所，哈恩和迈特纳后来发现了核裂变。此外还有哈贝尔 (Haber) 研究所，那里有邦赫费尔 (Bonhöffer)、卡尔曼 (Kalman) 和很多其他很有意思的人物。哈贝尔主要由氨的合成得名，他在这里处于支配地位，并以某种方式在这个综合实验楼中把化学与生物学结合起来。那种经常是包括生物学问题在内的讨论会，是大家会面的地方，他总是能紧紧地抓住一个问题的本质引起并领导展开讨论。

迈尔霍夫和瓦尔堡是对我后来影响最大的两个人。迈尔霍夫为人不易相处，我们往来并不密切，然而我日后所做的工作大多已在那时初具雏形了，我几乎可以说，后来的工作是从当时环境中衍化出来的。我在那里时，对磷酸化学最感兴趣，这是迈尔霍夫启发洛曼 (Lohmann) 去开展的研究，我从洛曼那里学会了磷酸衍生物的工作，他研究出一种极好的区别各种磷酸化合物的技术，即用各种方法释出磷酸，而主要以酸水解的不同速度来识别这些化合物。

迈尔霍夫是他的研究班子的精神支柱，起初我对他所热衷的、有时是难以控制的肌肉能量学有点畏缩，然而这对我后来的工作有着极深刻的影响。迈尔霍夫真不愧是瓦尔堡的学生。他开始时很倾向于作哲学的概括，但是和瓦尔堡短期的合作成为他工作的转折点，看来这合作使他相信解释生命现象最有希望的途径是用物理化学去探讨，瓦尔堡那种绝不调和与推测的极端严格的讲究实效的态度，从四楼传给了我们。他成为我们心目中的英雄。他执拗地坚持让实验说话并把解释和引伸限制到最小程度，这种作风成为我们这一代人

的工作准则。这种作风已收到成效，因为它奠定了使生物学发展成为一门确切的科学的基础，到现在使我们能慢慢地深入到更理论化的生物学中去。

我从来没有直接和瓦尔堡工作过，但是法国查普维尔 (Francois Chapeville) 的一句话使我十分感动。在巴黎一次光合作用的会议期间，查普维尔和他共进午餐时说起曾和我一起工作过，瓦尔堡对查普维尔说：“噢，那么你是我的孙子了。”

## (一) 我在迈尔霍夫实验室的工作

我到迈尔霍夫实验室去的时候，最突出的有两个问题，一个是研究糖酵解的机制，称为葡萄糖或动物组织内糖原的乳酸发酵。第二个是肌肉收缩时磷酸肌酸(Cr~P)的功能，Cr~P是当时新发现的物质。回想我第一组简单而又没有成功的实验就足以说明当时普遍地对糖酵解的中间途径以及高能磷酸酯作用的机制理解得多么模糊。

那时(1927—1930)在迈尔霍夫实验室里采用的是一种对糖酵解有活性也容易制备的蛙肌提取物，或更好的是家兔肌肉匀浆提取物，主要用来比较糖酵解与酵母的酒精发酵作用。在酒精发酵中，哈登(Harden)和罗宾逊(Robinson)已经发现了各种磷酸己糖的中间产物。迈尔霍夫从面包师的酵母自溶物里分离出糖酵解反应中葡萄糖的活化剂后，肌肉中的糖酵解和酵母的酒精发酵的类似性就更为明显了。肌肉提取物是用沙子和蒸馏水把肌匀浆放在冷却的研钵中轻轻研磨制得的。这种提取物中没有糖原，相比之下容易分解糖原，却不能酵解葡萄糖。但是那时的理解水平还达不到认识其中的原因，不知道这些提取物中有糖原磷酸化酶

而没有己糖激酶使葡萄糖磷酸化。然而，举例来说，酵母的提取物即常用的莱贝德夫 (Lebedev) 液汁是一种干酵母的和缓的自溶物，很容易酵解葡萄糖，这就促使迈尔霍夫到酵母自溶物中寻找葡萄糖“活化剂”。那时葡萄糖这种活化机理还是很神秘的。因此，我同瞎子摸鱼一样，第一次用酵母自溶物制剂作为葡萄糖活化剂注射给家兔，观察它有无和胰岛素相似的作用，这说明了当时对这方面多么无知。在这之前我告诉过迈尔霍夫我在莱奎尔实验室时，曾尝试用静脉注射淀粉或糖原，目的在看是否能缓解胰岛素低血糖症，因此我会测定血糖。幸而注射含己糖激酶的粗酵母制剂并未降低血糖，而注射外源蛋白引起的非特异性效应可能使血糖降低。

另一个瞎子摸鱼的事例是测定乙酰胆碱引起的蛙缝匠肌的无张力收缩是否会导致Cr~P的分解。那时埃格尔斯顿斯 (Egglestons) 已发现Cr~P，由于它对酸不稳定而被称为磷酸原 (Phosphagen)。它的化学的特征鉴定已由菲斯克 (Fiske) 和萨巴罗 (Subbarow) 十分出色地完成了。Cr~P相当大量地存在于骨骼肌肉中，但其功能还有待研究。迈尔霍夫实验室发现它水解时产生很大热量，约12—15千卡/克分子，这与肌肉收缩有关，然而，肌肉收缩的张力和产生乳酸的量的比例关系同上述实验并不吻合。迈尔霍夫测定正常的肌肉收缩在无氧条件下形成的乳酸，热当量为13千卡/克分子，因此作了无张力乙酰胆碱挛缩是否可能和Cr~P有关的试验。可是，我做的关于这种挛缩的实验并未证明它引起Cr~P的分解。

这些简短的尝试，使我懂得了如果不能得到预期结果也不要失望，这就引导我进行那种冒险性小一些、稳健一些的工作，即氟化物反应的效应。一般认为氟化物是糖酵解的标

准抑制剂，但是它的作用机制还不太清楚。我的研究无助于了解它的作用方式，但是我发现了肌肉提取物对磷酸酯的水解有某些抑制效应，于是开始对氟化物对肝酯酶的抑制效应有了兴趣。瓦尔堡对重金属在酶催化中的作用十分重视，引起我对公认的氟化物与高铁血红蛋白的相互作用进行再核实。实验的结果证明和我的酶抑制问题无关，但是实验本身使我感到很有意思。

我当时把所有这些工作写成三篇文章，合起来足够作我的博士论文了，但我还必须补一些指定的要求：学一些物理学和植物学，还要学一点哲学。在柏林，哲学是得到博士学位的第四个条件。这就使我有机会愉快地见到沃夫根·克勒（Wolfgang Koehler），我的学位主要评审人。我已记不清细节了，只记得我面对化学、物理和植物学三位权威评审人的分别提问，中间短暂停歇时显得疲乏不堪，这时他们对我的和蔼与同情给我留下很深的印象。除了好心的沃夫根·克勒以外，我记得的就只是希尔德布兰德（Hildebrand）对我的植物学考试了，那时他因研究一种与激素相似的可促进植物创伤愈合的物质而著名。当时我到他家中应考时，见他老态龙钟，身体不大好，但给人的印象很深，我模糊地记得，我们略为谈了谈他的创伤激素。所有这些紧张工作给我留下的记忆不是那些学习的内容，而是同这些给人深刻印象人物的接触。

经受了这艰苦的考试后，我开始了与卡尔·洛曼的有益的合作，这在某种程度上是我关于氟化物的经验的发展。从洛曼那里，我学到了磷酸酯化学，这是我后来广泛地运用了。总起来说，从这些研究中似乎可以看出肌肉提取物能把哈登-扬（Harden-Young）的二磷酸果糖（FDP）转化成当时认为的一种新酯。这种转化的证据是在孵温后磷酸酯键

对酸水解极为稳定。当时我们没有想到FDP需要断裂成两个3-碳片段，因而没有得到正确的解释。即从不稳定到稳定的磷酸酯的转化是由于FDP裂解为两个三碳糖单磷酸酯，然后经过歧化作用变为磷酸甘油酸及甘油磷酸。这两者对酸水解都是稳定的。

## (二) 在无细胞发酵的研究上走过的弯路

洛曼和我结束我们共同的工作不久，实验室迁到了海德堡。再也不去想我们做过的实验了。然而，三年以后，即1932年，在我和我的妻子第一次访问美国的归途中，我们途经伦敦访问了利斯特 (Lister) 研究所，那是发现哈登-扬酯的地方。哈登已经相当老了，身体也不太好，我只和他见了一面，时间很短，但是我很高兴见到了罗宾逊，人极好，温文尔雅、博学多识、洞察力很强。他直接了当地跟我谈到洛曼和我发表的关于这一新酯的性质的文章。记得我说我对发生的这种转化没有把握。现在回想起来，他们当时似乎比我们更加意识到这一转化的不寻常性质。

回顾这一段早期的经历，使我想起研究磷酸化反应和酒精发酵之间的关系那段发展缓慢的时期。这促使我回到在无细胞发酵中哈登对磷酸固定的惊人发现。那时我重读了他的精彩著作《酒精发酵》。他广泛地引用了上面提到的洛曼和我写的文章，使我颇为震动。读到哈登对我的文章的赞赏，我真正感到这是埃姆布登 (Embden) 及其同事关于酵解机理作出重要解释的一个转折点。

为了说清后来发生的事情背景，有必要追述一下在1930年我们的文章发表时，对发酵和酵解的理解水平。我很高兴有机会在此扼要重述阿瑟·哈登的著作《酒精发酵》

(Longman Group Ltd, 伦敦, 1932) 中有历史意义的序言。它给我的印象深刻, 对我的影响强烈。我将从他对待化学家伯齐利厄斯 (Berzelius)、利比希 (Liebig) 同一些后来有巴斯德参加的生物学家之间的争论说起:

“伯齐利厄斯〔在1836年〕本人也认为发酵是由于酵母通过催化力而发生的, 他认为这种催化力参与多种反应……〔并且〕, 至于酒精发酵, 利比格〔1839〕的主要论点可以扼要的总结一下。酒精发酵的结果, 使糖的全部碳原子均在酒精中再现, 并形成二氧化碳。这一变化是由一组称为酶的物质引起的……”

这些论点有力地反对了当时认为发酵不能脱离活体的概念, 发酵是从“突然的发现”中发展的。至少有三个学者〔卡格涅-拉图尔 (Cagniard-Latour), 1835—1838, 施旺 (Schwann), 1837, 和舒尔策 (Schulze), 1836〕几乎同时发现了当时还是十分神秘的发酵的原因, 认为是由于微生物存在而引起。在此之前, 哈登说过:

“迄今 (即1836年前), 那些致力于研究发酵的人们还没有怀疑过这些变化与化学家们所熟悉的很多其他反应有本质的不同。”

于是在化学家与生物学家间发生了一场争论, 起初不太激烈, 直至1857年前后, 巴斯德开始研究发酵, 他的研究使他得出以下结论 (1860年):

“发酵的化学作用, 本质上是一种与生命活动有关的现象, 随着生命活动的开始而开始, 随着生命的停止而停止。我的意见是, 如果没有细胞的组成发展繁殖, 或已形成的细胞的继续生存, 永远不会有酒精发酵, 这本专题报告中的结果在我看来是与利比希和伯齐利厄斯的观点完全相反的。若是问我糖降解化学作用包括什么内容及其发生的真正原因,

我将回答我一无所知。

那么我们是否应该说酵母用糖作饲料而产生酒精和碳酸呢？要不然我们是否还坚持酵母在其发育过程中产生一些具有胃蛋白酶性质的物质？这种胃蛋白酶样物质作用于糖，然后消失，因为在发酵液中没有发现过这种物质。对于这些假说我无法回答，我既不能承认也不能否定，只是希望约束自己，不使超出事实之外。而事实只告诉我，所有真正的发酵是与生理现象相关的。”

在生理化学家中，对于这个问题作化学的解释还是作生物学的解释争论仍然明显存在。三十年代后期和四十年代初期发生了一场形式多少有些不同的冲突。那时磷酸结合开始渗透到发酵的机理中去，并且使酒精发酵时碳原子的完全平衡受到“曲解”。这是由利比格提出，用以支持它的化学性质而非生物学性质的观点：



这一简单但将人引入歧途的方程没有注意到发酵产生能量以维持生命和生长的生理学方面的作用。1906年哈登发现磷酸酯是参与作用的基本物质。这一发现为深入研究发酵化学和产生维持活体所必需的能量之间的联系提出了新的方法。再引用一段哈登的话：“巴斯德的生理作用”对于利比希来说正是需要解释的现象。稍后，巴斯德几乎是在不知不觉中不坚持己见了，他在1875年预言道，发酵是生命无氧的结果，发酵使细胞能够利用含氧物质分解时所释放的能量。

现在我要离题说一下哈登关于布赫纳兄弟 (Buchners) 发现无细胞发酵的叙述。在这里使我高兴的是他注意了那偶然发生的事。

“近20年中事情没有一点进展，于是到了1897年，这个曾经引起那么多的讨论和猜想，为此做了那么多的实验的问



题，终于由爱德华·布赫纳 (Eduard Buchner) 作出了回答。他成功地从酵母中制备了一种液体，完全不含细胞，却能够使糖分解为 $\text{CO}_2$ 和酒精。”

1893年，汉斯·布赫纳和爱德华·布赫纳兄弟发现用沙子研磨可以粉碎微生物。他们在1896年用这个方法破碎酵母，想用酵母提取物作医药用，他们花了点时间，在助手马丁·哈恩 (Martin Hahn) 的帮助下研制出一种能把细胞及其碎片滤去的方法，得到了可靠的无细胞提取物。哈恩建议将匀浆和硅藻土混合，并用水压机挤出提取物。这种酵母汁起初用于动物实验，但很易变腐，在此关键之处我要引一段哈登的话：

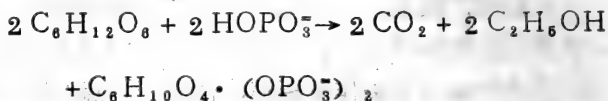
“普通抗菌剂不适用，于是用糖作为防腐剂。正是酵母汁对加入蔗糖后的显著作用引起了爱德华·布赫纳的注意，发现没有酵母细胞时，发酵仍继续进行。”

接着哈登又说：

“和很多发现一样，这个新现象的发现，明显地是偶然的，是旨在研究别的研究时的结果。幸运的是这件事落到一位具有天才的观察家的眼前，他的天才使他意识到其重要性并给予正确的解释。”

现在我们暂时放下哈登的引言来说说他的伟大发现，即磷酸盐参与葡萄糖转化至乙醇和 $\text{CO}_2$ 的化学反应。适才引用哈登的话，说明了布赫纳的发现是由于偶然观察，哈登自己的发现也一样。他观察到在酵母提取物中加入血清引起加入的葡萄糖的加快发酵。这一效应在除去血清蛋白后仍然发生，于是最后追溯到血清中存在的无生命的磷酸盐。这一发现在开始时可能引起失望，但是后来发现只要有磷酸盐存在，葡萄糖发酵就能迅速地进行，这就是对你丰厚的报偿了，在此迅速发酵期间，无机磷酸盐消失而有机键联结的磷

酸盐堆集起来。哈登和扬将此化合物鉴定为二磷酸己糖（哈登-扬酯）。在酵母提取物的快速发酵期，磷酸盐的固定正相当于发酵产生的醇和 $\text{CO}_2$ ：



在迅速发酵后，接着十分缓慢地产生 $\text{CO}_2$ 和醇，这是由于二磷酸己糖缓慢地释放出无机磷酸盐（ $\text{P}_i$ ）。若再加入 $\text{P}_i$ 则立即引起发酵的新爆发，其程度受 $\text{P}_i$ 加入量的限制。罗宾逊发现除二磷酸己糖外，还形成少量的一磷酸己糖。他把它鉴定为6'-磷酸葡萄糖（G-6-P）（罗宾逊酯）。而哈登-扬酯被鉴定为1',6'-二磷酸果糖FDP。纽贝格则用弱酸水解从FDP中分离得一新的单磷酸己糖，即6'-磷酸果糖（纽贝格酯）。早年，我们常在新的化合物上冠以发明者的名字。

1927年我到迈尔霍夫实验室时，这方面的研究大致就是这个水平。当时主要的疑难是为什么没有 $\text{P}_i$ 时，有FDP的积聚。虽然酒精发酵和乳酸发酵的最终产物和迈尔霍夫实验室内肌肉抽提物的实验相类似，表明有一个三碳前驱物的存在，但是哈登-扬早期就有了的酯要分裂为两个化合物的概念，几乎用了30年才完全成熟起来。

我这一叙述并不要求面面俱到，也不按年月先后。我的叙述很明显是主观性的，因为它将早期和晚期的个人看法揉合起来了。现在回过头来谈我和洛曼的研究，哈登对磷酸盐必然参与葡萄糖发酵的研究促使我们去解开这个谜。

洛曼已经意识到在氟抑制的兔肌肉抽提物内FDP的转化。FDP内的磷酸酯在正常情况下较易水解，成为对酸稳定的物质。这一对酸稳定的化合物称为“酯I”。我们共同

的研究工作表明氟不是必需的，而在某些蛙肌抽提物中 FDP 酵解至乳酸很少，没有氟也可以同样发生从容易水解的磷酸酯转化至难以水解的磷酸酯（表 1）。这一产物称为“酯 II”，基本上和“酯 I”相同。

表 1 冬蛙肌肉抽提物在 20℃ 孵温后，FDP 至酸稳定磷酸酯的转化<sup>a</sup>

孵温时间 (分钟)	结合的磷酸酯 (毫克 P <sub>1</sub> )	8 小时内酸水解的 磷酸酯 (毫克 P <sub>1</sub> )	被转化的磷酸酯 (毫克 P <sub>1</sub> ) (%)	
0	0.48	0.48	.....	
20	0.50	0.39	0.12	25
60	0.50	0.25	0.27	53
120	0.49	0.19	0.33	68

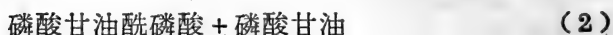
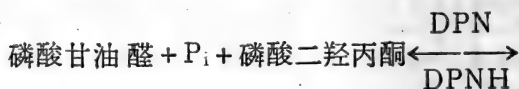
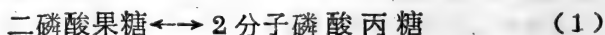
a. 取出样品并用 5% TCA 除去蛋白，上清液加 HCl 至 1 当量，在封闭管内泡在沸水中水解 8 小时。孵温后，按 FDP 在 8 小时完全水解，而形成的化合物只有 10% 计算从水解释放的磷酸（第三行）生成酸稳定产物的转化率（第四行）。第二行数据表示从灰化样品中得到的总结合磷酸无改变，即未发生 FDP 的发酵。

(引自 Lipmann and Lohmann, *Biochem. Z.*, 222, 389, 1930.)

我详细叙述这些结果是为了使大家在讨论我们错误的解释时知道当时的背景，那时我们认为这是 FDP 转化为难以水解的二磷酸己糖。洛曼用磷酸酯水解速率作为辨别新化合物的有力工具。但是在这件事例中我们被过于简单的解释引入了歧途。下面一段插曲表明我们当时对正确的解释是何等地盲目啊！

当我们完成这些研究时，雷格纳·尼尔森 (Ragnar Nilsson) 到我们实验室来访问，他刚刚完成了一项卓越的工作，虽然他当时并不意识到这一点。他用干酵母的悬液在氟

离子存在下和FDP及乙醛孵温，分离得到大量钡盐，鉴定为3'-磷酸甘油酸（PGA）钡盐。尼尔森和我站着对他那令人困惑的结果讨论了很久，但是我们当时完全看不到他把FDP加进乙醛中转化为PGA和乙醇的结果同我们的FDP转化为难以水解的酯的结果之间的紧密联系。我们看到了树木而看不见森林。埃姆布登及其同事用类似我们所用的条件重新研究FDP的转化，他们含糊地称之为乳酸、氟化物、或草酸盐对脱磷酸反应的“离子抑制”。他们将肌匀浆与FDP孵温后，从中分离出大量的结晶钡盐，鉴定为磷酸甘油酸钡盐。他们承认这一工作受到以前尼尔森分离PGA的启示。PGA对酸水解是稳定的。他们建议把在同样条件下得到的洛曼的酸稳定酯，作为两种磷酸化3-碳衍生物的混合物。这些衍生物是磷酸丙糖歧化反应的产物，即假定为FDP的裂解产物：



磷酸甘油酸和磷酸甘油对酸水解都是相当稳定的。

虽然在这些埃姆布登实验中，没有发现甘油磷酸，而且他们的实验也相当粗略，但他们具有足够的勇气和卓越的远见将实验结果综合起来，提出了FDP裂解后氧化还原现象的第一个有条理的图解。他们正确地看到产生了一个酮式磷酸丙糖和一个醛式磷酸丙糖。（2）和（3）式中，瓦尔堡和内格莱因发现的氧化还原和磷酸化之间的偶联没有包括在内。埃姆布登图解仍然将发酵和糖酵解作为无例外的氧化还

原事件看待。

### (三) 磷酸键能代谢功能的发现

在发酵和糖酵解中，ADP-ATP偶联体作为接受和提供 $\sim P$ 的辅助因子长期地被忽略了。首先，磷酸甘油醛的氧化是与 $P_i$ 转化为磷酸-3'-甘油酰 $\sim P$ 中高能羧基磷酸偶联的。磷酸甘油酸 $\sim P$ 将它的 $\sim P$ 通过ADP进入ATP库。再者，必须认识到磷酸甘油酸由于转化为磷酸烯醇式丙酮酸而具有潜在的高能磷酸键。高能烯醇 $\sim P$ 传递至ADP并进入ATP库，因此氢从磷酸丙糖 + DPNH +  $P_i$ 传递至丙酮酸或乙醛，可产生两个高能磷酸酯。这样发酵产生的 $\sim P$ 能量就并入了ATP库。

这些都是在我迁到哥本哈根后，三十年代发生的事。但是在三十年代中期，我对巴斯德效应发生了兴趣，我随便地开始了用磷酸化供体来诱导发酵的研究。我用一个光滑的铂电极测量了以亚甲蓝为媒介物的酵母制剂中氧化还原电位的降低，发现它与发酵的开始及发展速度相对应。这一实验证实了电子传递与磷酸反应间的交换，帮助我认识到代谢能量转换的美妙，也相对地简单。由于这些情况是亲身经历的，使我在记忆中远比出现在总结中的要生动得多。在这里我回顾一下生物能量学早期缓慢的，有时是曲折的演化过程。

我把葡萄糖发酵的流程图试绘成图1的样子，引自《代谢过程模式》一文，此文后来以全文重印，是以生物方法转化能量的最好的例子。从磷酸-3'-甘油醛 +  $P_i$ ，将 $P_i$ 转化为 $\sim P$ 并进入电子传递产生磷酸-3'-磷酸甘油酰 $\sim P$ ；在 $\sim P$ 传递至ADP后，接着是剩下的由磷酸-3'-至2'-甘油酸

及其脱水至磷酸烯醇式丙酮酸的平衡。这一值得注意的序列使葡萄糖酵解转化中的大部分能量生成大约四个 $\sim P$ 单位，相当于 $4 \times 10$ 千卡的脱水能量。

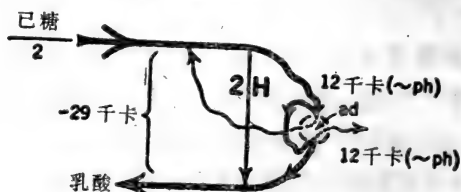


图1 乳酸发酵的流程图（引自《代谢过程模式》一文，在本书第二部分全文转载）

在无细胞糖酵解部分反应的工作中，我学会了抓住其生物学上的意义，这就是我日后所说的磷酸键的产生。我有了糖酵解可以起能量转换器作用的思想准备。

现在再回到我在迈尔霍夫实验室的经历。我和洛曼的合作完成后，隆德斯加特 (Lundsgaard) 对肌肉收缩时产生 $\alpha$ -乳酸的发现使得迈尔霍夫实验室为之震动。直到那时，人们才确信乳酸的产生和收缩机制之间有因果关系。这种看法似乎由于乳酸形成和肌张力产生有恒定的比例而可靠地被证实了。这里，产生的热和所做的机械功关系又相互对应。然而，隆德斯加特发现了碘乙酸中毒的肌肉虽然糖酵解已完全被阻断，不能形成乳酸，但仍可收缩。于是他寻找能量的来源，发现一种与 $Cr\sim P$ 的降解相类似的情况。如上所述，早先在迈尔霍夫实验室已发现 $Cr\sim P$ 中的 $P\sim N$ 键的水解可产生非常大量的热。然而它的降解，起初看来与肌肉收缩无关，但是，当糖酵解被阻断时， $Cr\sim P$ 的降解似乎可代替作能量供体，并且在它耗竭后，肌肉发生尸僵状的挛缩。当然，所有这些都不会形成任何乳酸。隆德斯加特正确地断

定，Cr~P的降解与收缩机理的关系与酸（或更确切地说乳酸）的产生更为密切。

这个消息在迈尔霍夫实验室里引起的骚动，今天看是难以理解的。原来的乳酸的概念已深入人心，但是由于Cr~P分解的功能，这一概念似乎要被推翻了，所以当我们知道那个神秘的艾纳尔·隆德斯加特要到迈尔霍夫实验室来评价Cr~P降解和肌张力之间的相互关系时，自然都十分激动。1930年实验室从柏林迁至海德堡（Heidelberg）不久，隆德斯加特就来到了。他高高的个子，头发金黄色，是个典型的斯堪的纳维亚人。在海德堡期间，我们在实验室内外都常常见面。1932年迁到哥本哈根时，我们之间已建立起友谊。

认识到糖酵解是产生输入到ATP的~P库的高能磷酸键的机理以后，糖酵解被阻断时出现Cr~P的降解就有了解释。原来它的~P是收缩能量的源泉。虽然当时没有立即认识到肌肉的Cr~P是~P的贮存库，在紧急情况下，可以补充到ATP库中去，但这一点很快就弄清楚了。洛曼不久发现了酶促Cr~P“裂解”取决于预先把~P传递至ADP中，接着便发生ATP的水解。ADP作为接受~P的辅助因子，将~P转化为ATP，在活肌肉内，ATP便用于收缩。在此，首次出现了一种利用磷酸键能的机理。

在迈尔霍夫实验室最后一年，我的兴趣和工作仅限于Cr~P和收缩现象之间的联系，这种联系我能在整体肌肉内检测到。迈尔霍夫建议我研究CO<sub>2</sub>对收缩和代谢的影响。当时已有关于存在着糖酵解的抑制的报告，由于pH相当低，不理想，这并不意外。为了刺激肌肉，我用检压计测量乳酸的形成，即从NaHCO<sub>3</sub>液内测量CO<sub>2</sub>的释放。我遇到的最大困难是将铂电极焊接到反应瓶内。但是从意外的结果中得

到了报偿。这些实验直接证明了肌收缩时Cr~P在体内的降解。按照CO<sub>2</sub>的不同浓度我观察到一个奇怪的双相反应顺序。在高CO<sub>2</sub>浓度，即低pH时，出现陡的明显的CO<sub>2</sub>吸收，接着是最后释放CO<sub>2</sub>。CO<sub>2</sub>吸收与早期Cr~P降解的程度相平行，当Cr~P浓度降低，乳酸形成后，便是CO<sub>2</sub>的释放。酸化的后期可能被碘乙酸所阻断。问题的关键是在低pH Cr~P降解引起碱化，碱化就掩盖和补偿了被抑制的糖酵解。比较各种pH条件下化学测定和检压计测定的结果可以显示出在预期的碱化和Cr~P的真正降解之间的确切关系。这是一个证明在完整肌肉内Cr~P分解的很受欢迎的方法。这项工作是我在离开迈尔霍夫之前不久做的，这工作引起了一定的注意。

在迈尔霍夫实验室的一段时期，是我在生物化学上的少年时期和成长时期。从弗洛伊德精神分析法的角度来说，所有我以后做的事，在这里已经下意识地画出轮廓了。这些东西在1930年和1940年间开始成熟，而以后就更加详尽地意识到了。

### 参 考 文 献

- [1] Versuche zum Mechanismus der Fluoridwirkung. *Biochem. Z.* 196, 3 (1928).
- [2] Weitere Versuche über den Mechanismus der Fluoridhemmung und die Dissoziationskurve des Fluor-Methämoglobins. *Biochem. Z.* 206, 171 (1929).
- [3] über die Umwandlung der Harden-Youngschen Hexosediphosphorsäure und die Bildung von Kohlenhydratphosphorsäureestern in Froschmuskelextract. With K. Lohmann, *Biochem. Z.* 222, 389 (1930).
- [4] Arthur Harden, *Alcoholic Fermentation*. (London, Longmans Green. 4th. ed., 1932.)
- [5] über Die Intermediären Vorgänge Bei der Glykolyse in der Muskulatur. G. Emden, H. J. Deuticke, and G. Kraft, *Klinische*



*Wochenschrift* 12, 213 (1933) .

- [ 6 ] Über den Tätigkeitsstoffwechsel des fluoridvergifteten Muskels.  
*Biochem. Z.* 227, 110 (1930) .
- [ 7 ] Über die Reaktionsänderung des tätigen Muskels. With O. Meyerhof, *Biochem. Z.* 227, 84 (1930) .

### 三、我的自述

#### (一) 求职

1927年我开始在迈尔霍夫实验室工作时，还是一个研究生，我很高兴他能让我在那里工作。只是到了最后一年和他在一起的时候，才付给我工资。工资不算高但已够用了，是德国Notgemeinschaft基金会资助的。但这一资助第二年就没有了，因此，我第一次面临寻找职业的问题。我想回到柏林，住到过去和我经常来往的弗雷达·霍尔(Freda Hall)附近。在此以前我们一直经常会面，使我回到柏林去的拉力很大。

找职业是一件未碰到过的麻烦事。我没有多大的声望，我当时没有，现在也还缺少给人以好印象的天分。此外，我发现1930年，德国的犹太人想在大学里找个位置已经存在很大障碍，即便是开明的教授也不愿意要我们当他们的教员，因为会给他们招来麻烦。回想起来，当时我倒幸亏没有找到这种工作。但机会终于来了，我听说我一位柯尼斯堡的老同学汉斯·拉舍(Hans Laser)要离开柏林-达勒姆城中的艾伯·菲舍尔组织培养实验室到迈尔霍夫那里去，而非舍尔则希望找个熟悉组织代谢的人和他合作。多年来，他在洛克菲勒大学和亚历克西斯·卡雷尔(Alexis Carrel)一起工作，成为有数的组织培养专家之一。他是丹麦人，当时在柏林-达勒姆工作，与迈尔霍夫过去所在的生物学实验室有着不经常的联系。瓦尔堡那时已对当时还很新的体外组织培养技

术感兴趣，他给了菲舍尔一套很好的实验室。他对组织代谢感兴趣是希望用它来测量组织的生长，用以代替常用的测量组织面积增大的方法。关于组织移植，我们用得最多的是胚胎心脏或软骨，常长成含有成纤维细胞的单细胞薄层。只有以面积测量法测出的极小部份的增大，是真正的生长，这主要是细胞的外向移栖，它确实反映细胞生长，但从数字上说有极大的放大。在那时，得到真正的生长数字的唯一途径是用组织法测量有丝分裂速度，但这是十分烦琐的。假若可以测量一个生长着的培养物的代谢，例如说用检压计去测量，并作为常规方法，那就很方便了，假设每个细胞在生长时有一适当恒定的代谢。

## (二) 随同阿尔贝特·菲舍尔从事组织培养

于是这就成了我第一个正式工作，在菲舍尔实验室里作助手。这是第一次要我去解决一个专题。实质上这是个应用题，用代谢功能来测量组织繁殖。但是这个问题使我接触到胚胎组织代谢的特殊性，因而也就接触到了有关生长的一般问题，包括正常的和异常的生长在内。瓦尔堡发现在肿瘤中的有氧糖酵解，这是个新问题，并发人深思。这只是我研究问题的外围，我必须设计一个简单方法去追踪培养物生长时的代谢。我过去曾经用过检压计电刺激肌肉，并决定在此也用相同的方法。今天在培养基内用抗生素，减少了细菌污染，使得组织培养容易了，但是在那时，这个简便的检压计方法却几乎是个不可逾越的障碍。

我在检压计瓶内培养出了成纤维细胞，并因发生了相当大量的有氧酵解即有乳酸形成，所以选择了在碳酸氢钠缓冲液内测量 $\text{CO}_2$ 释放的方法。这证明了乳酸的增加与生长成比

例。因此生长的代谢测量是可行的，但是作为常规方法不合适，因为太烦琐了。然而组织培养是个十分吸引人的天地，尤其是关于生长着的组织内有这样高的糖酵解能力应如何解释的问题。

我曾经对胚胎组织的生存能力及在无氧条件下的生长感到兴趣，这种特点在成年哺乳动物组织中一般是不具备的。温德（Wind）在瓦尔堡实验室已做过一些实验，而我则在最严格的条件下重复这些实验，用检压瓶在一个分开的小室内以黄磷把微量的氧气吸净。我确信这些成纤维细胞虽然生长缓慢，但在无氧条件下仍表现出明显的有丝分裂活力。这里我不打算讨论恶性肿瘤内糖酵解的作用，但高度恶性发展与无氧倾向代谢的活力平行发生的事实，无疑应引起密切注意。

### 参 考 文 献

- [1] Proliferationsgrösse von Gewebezellen in vitro and Stoffumsatz. With Albert Fischer, *Biochem. Z.* 244, 187 (1932).
- [2] Versuche zur Methodik der Messung des Zuwachses in vitro wachsender Gewebe durch Messung des Umsatzanstiegs. *Biochem. Z.* 244, 177 (1932).
- [8] Stoffwechselversuche an Gewebekulturen, insbesondere über die Rolle der Glykolyse im Stoffwechsel embryonaler Zellen. *Biochem. Z.* 261, 157 (1933).

## 四、在洛克菲勒研究所

### 从磷蛋白中分离磷酸丝氨酸

我同非舍尔一起工作了短短的一年，他便搬到哥本哈根了，那里为他修建了一座新实验室。等到研究所筹备就绪，他就邀请我到那里工作。与此同时，我得到洛克菲勒基金会奖学金，首次访问了美国。这期间，我在纽约洛克菲勒医学研究所（即今洛克菲勒大学）中的P. A. 莱文（P. A. Levene）实验室。在我离开之前，我和弗雷达·霍尔结婚了。

我来之前问过莱文我能否做磷蛋白中的磷酸键工作。莱文和阿尔斯贝尔格（Alsberg）发表过的文章提到从蛋黄中分离出一种卵黄磷酸（Vitellic acid），现命名为卵黄高磷蛋白（Phosvitin），其中含10—12%磷酸盐。我对磷蛋白的兴趣有两个方面：第一是磷蛋白在蛋黄和乳类食物中含量丰富，这是我曾研究过的生长组织所需的营养物；第二是我想磷酸可能同磷酸肌酸那样，是以高能N~P键的形式与蛋白结合的。幸亏我还不熟悉波斯特纳克（Posternak）的工作，他在那时已经提供了相当多的证据，证明在磷蛋白内磷酸是连结到丝氨酸中的。

1931年到达莱文实验室后，我第一次做自选的题目，不久我发现磷酸蛋白的特征并不在于有一个对酸不稳定而对碱稳定的N~P键。莱文和阿尔斯贝尔格从蛋黄中得到的卵黄磷酸以及其他磷蛋白却表明有相反的稳定性，即在碱中相当不稳定而在酸中稳定。我利用磷酸键对酸水解的相对稳定

性着手分离磷酸化氨基酸。磷酸化氨基酸在100℃用2当量HCl经20小时水解后，约有25%保持不变，并可以分离出相当纯的产品。原来这是丝氨酸的磷酸酯。有趣的是它被分离后对碱相当稳定。后来我常常回到磷蛋白的研究上来，其中的原因我在1966年和Y.马诺(Y. Mano)合写的论文引言中说明了：

“三十年代初期，作者之一弗·李普曼对磷蛋白内磷酸键的性质很感兴趣。在那时，这类化合物中只有少数几个为人所知，这就是那些在蛋黄和乳类中发现的，早期由其磷酸酯对碱的不稳定性鉴定出来的磷酸键。但是认识到丝氨酸的羟基作为磷酸酯的主要载体后，人们的注意力就特别集中到蛋白质中以酸性基团起酯化作用的丝氨酸羟基上了。现在已证明丝氨酸羟基在很多水解酶和转移酶包括磷酸酯酶中是酰基接受体，并且被酶学家公认为是酶功能以及酶调节的活性中心之一。这就使得蛋白结构内丝氨酸羟基耐人寻味的地方更大了。”

此外，已发现磷蛋白是组织中普遍存在的成分。这是在发现了所有对碱不稳定的蛋白磷酸都有很快的周转率以后认识到的。而这又导致在动物组织内检定出一种蛋白激酶，这种激酶传递三磷酸腺苷的磷酸基到组织蛋白上，生成对碱不稳定的磷酸酯。”

人们一直不知道在各种组织内普遍存在着磷蛋白，尤其不知道脑内存在对刺激起反应的磷蛋白，这些磷蛋白的功能直到最近才弄清楚。但是现在看来环AMP，萨瑟兰(Sutherland)称之为“激素的第二信使”，是通过刺激或多或少地具有受体特性的蛋白磷酸激酶以传递信息的，这明显地预示了在代谢调节中可逆性蛋白磷酸化反应的多样的和广泛的功能。四十年前，我选上了钻研这些磷蛋白中磷酸结合

的问题，现在发现是无意中挖到了一个金矿。

那时的洛克菲勒研究所是由西蒙·弗莱克斯纳 (Simno Flexner) 严格把持着的。在莱文实验室里我和格斯·迈耶 (Gus Meyer) 成为好朋友。他什么都替莱文做，从开车直到洗碗碟，真是打杂的。另外，在那里同事之间没有闲谈的习惯，那时，我的工作多少有点和实验室的一般倾向不符。莱文是乐意帮忙的，但他对我的工作真正感兴趣是在我用水解技术从他的卵黄磷酸中分离得到相当纯的磷酸丝氨酸样品以后。莱文是个趣味很高的有教养的人，但在实验室里这点不大感觉得出来。只是看到他整洁的头发，使人感到愉快。他当时情绪不大好。他坚实地奠定了核酸化学的基础，但并没有得到应有的承认，他的失望是可以理解的。

那时，夏季每人从六月到八月都离开洛克菲勒。里奥诺·米夏埃利斯对我很友好，在伍兹霍尔 (Woods Hole) 给我一席之地，使得我们可以在那里渡过夏天，能和迈可利斯接近使我难忘，也是我在美国过得最有意思的一段时间，那时可从纽约坐船到伍兹霍尔，我们都喜欢这种活动，我是第一次有机会会见科学界这么许多人士，他们每年夏天来此，或一游或演讲或仅仅露露面，我遇见的优秀人物其中有格斯曼·巴伦 (Guzman Baron) 及约翰·朗斯特朗 (John Runnstrom)，我们还愉快地初会了林德斯特朗-兰 (Linderström-Lang) 他正和摩根 (Morgan) 在加利福尼亚州过了一年，大模大样地坐了一辆摇摇晃晃的破汽车到达了伍兹霍尔，带来了很多大峡谷的风景画。他从东开车，穿过大峡谷到来，对峡谷十分神往。

在洛克菲勒的人群中，艾尔弗雷德 (Alfred) 和里巴·米尔斯基 (Reba Mirsky) 对我们很好，帮了许多忙。在我们从伍兹霍尔的归途中，在康涅狄格州 (Connecticut)

中部,他们请我们在他们租下的别墅玩了几天。欧洲人在纽约附近看到这样多基本上未开发和闲置的土地觉得很惊奇,使我们有一种美国十分广大辽阔的感觉。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Serine phosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. With P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* 98, 109 (1932) .
- [ 2 ] über die Bindung der Phosphorsäure in Phosphorproteinen. *Biochem. Z.* 262, 3, 9 (1933) .
- [ 3 ] Reversible phosphate transfer between yolk phosphoprotein and adenosine triphosphate. With M. Rabinowitz, *J. Biol. Chem.* 235, 1043 (1960) .
- [ 4 ] Characteristics of phosphoproteins (phosvitins) from a variety of fish roes. With Y. Mano, *J. Biol. Chem.* 241, 3822 (1966) .
- [ 5 ] The amino acid sequence of tetradecapeptide containing the reactive serine in *E. coli* alkaline phosphatase. With J. H. Schwartz and A. M. Crestfield, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 49, 722 (1963) .
- [ 6 ] The phosphorylation of alkaline phosphatase. J. H. Schwartz, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 49, 871 (1963) .
- [ 7 ] Studies on the phosphoproteins of brain; the intracellular localization in brain of a phosphoprotein involved in the metabolic response of cortical slices to electrical stimulation. P. J. Heald, *Biochem. J.* 73, 132 (1959) .
- [ 8 ] Relation of cyclic 3', 5' AMP to hormone action. E. H. Sutherland and R. W. Butcher. *Abstracts, 7th International Congress of Biochemistry*, Tokyo, 1967, p. 277.
- [ 9 ] An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. D. A. Walsh, D. P. Perkins, and E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 243, 3763 (1968) .
- [ 10 ] A phosphoprotein preparation from liver nuclei and its effects on the inhibition of RNA synthesis in histones. T. A. Langan, in *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis*, V. V. Koningsberger and L. Bosch, Eds. (New York; Elsevier 1967) p. 233.
- [ 11 ] Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin. T. A. Langan, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 64, 1276 (1969) .



- [12] The mechanism of activation by adenosine 3'5'-cyclic monophosphate of protein phosphokinase from rabbit reticulocytes. With M. Tao and M. Salas, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 67, 408 (1970).

1970年11月11日 星期一

张明生 (1970年11月11日) 星期一  
11月11日 星期一  
11月11日 星期一

张明生 (一)

## 五、在哥本哈根（1932—1939）

我在1932年秋天结束了美国之行，回到欧洲菲舍尔哥本哈根的新实验室。这个实验室是卡尔斯堡（Carlsberg）实验室群中新的一员，都是由卡尔斯堡基金会资助的，基金会的钱是著名的卡尔斯堡啤酒厂资助的。我搬进一个崭新的漂亮的实验室里，多少可以自作主张了。在啤酒厂附近那所旧而著名的卡尔斯堡实验室里，泽伦森（Sørensen）那时是化学部门的头头，而林德斯特朗-兰是他的第一助手。很幸运，我事先见过林德斯特朗-兰，加上隆德斯加特一家居住和工作的地点就在我实验室马路的对过，这在很大程度上帮助我们对这个新的国家适应下来。

### （一）巴斯德效应

在实验室里我先不声不响地继续我近时以来简单的磷蛋白的工作。我用同样的水解法，从酪蛋白中分离出磷酸丝氨酸。酪蛋白是当时已知的两种重要磷蛋白中的另一种。从那以后，我的组织培养工作进行得不顺手。然而我接触到成纤维细胞的代谢型式，看到它有非常强大的无氧糖酵解并伴随着旺盛的呼吸作用，又把我的兴趣引向巴斯德效应。巴斯德发现了一种兼性厌氧生物（如酵母），在空气中可抑制缺氧条件下旺盛的酒精发酵。这是第一个引人注意的调控反应，具有旺盛的缺氧糖酵解的组织如成纤维细胞、肌肉或脑，在氧存在时可阻遏这一能力。它以呼吸供应能量来代替相对花

费较大不上算的糖酵解能量供应。这种供应每克分子参与代谢的葡萄糖可以多产生10倍以上的有用能量。

以呼吸约束糖酵解，当时大都由动力学实验处理的，所引起的呼吸反应周期使糖酵解逆转。我当时头脑比较简单，想寻找氧对糖酵解酶的直接效应，所以企图以加进相当阳性效应的吡啶酚型氧化还原媒介物以阻遏提取物中的酒精发酵及有氧糖酵解。这些染料在无氧时很快被还原然后失去活性，但在有氧时，它们保持部分被氧化，并可逆地抑制发酵和糖酵解，可能是把重要的SH基氧化了，因此，此染料成为抑制发酵周期的媒介。在有氧条件下，由于抑制效应，发酵被阻遏的观点被证明是对的。但是这可能不是氧本身而是效率高的有氧磷酸化反应将ATP-ADP比率提高，抑制了某些糖酵解酶的活性。

## (二) 丙酮酸氧化

比较糖酵解和呼吸的情况指出了关键的物质是丙酮酸。丙酮酸在糖酵解中被还原为乳酸，但在呼吸时则被氧化为乙酸和 $\text{CO}_2$ 。彼得(Peter)关于鸽脑的重要研究已涉及到硫胺素。在硫胺素缺乏时，丙酮酸积聚，加入硫胺素可使组织切片恢复正常。作为开始这方面工作的人，我起头对缺硫胺素的脑制剂做了相同的试验，这种做法不错，但除了肯定原来的实验外并无所得。然而，熟悉了鸽子对以后的工作有好处，后来我研究乙酸盐活化时需要寻找有这些活性酶的肝，只有鸽肝制剂被证明含有强大的活化和传递乙酸到乙酰基接受体(如磺胺)上的能力。没有鸽肝，我不会分离出辅酶A来，当然这些都是后来的事了。

那时我很懊恼，因为呼吸系统和发酵相反，很不容易溶

液化，当时还不知道线粒体的性质，我在迈尔霍夫实验室得到的一个教训是：假如哺乳动物系统有困难，就应该用微生物，这使我想在细菌内寻找丙酮酸的氧化反应。我曾经在一个报告中提出在一种德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii acidificans*) 的丙酮粉混悬液中，有丙酮酸氧化能力，该菌是我从德国带来的。这一制剂看来有希望，于是我期待从中得到一个可溶性酶。不久我就学会了从德氏乳杆菌的干制剂中提取丙酮酸氧化系统，并第一次用之于进一步证明丙酮酸氧化和硫胺素之间的联系。与此同时，洛曼又证实了硫胺素的代谢活性型是焦磷酸硫胺素，因为它被鉴定为丙酮酸脱羧反应的辅酶。用略带碱性的磷酸缓冲液抽提可把酵母脱羧酶拆解为辅酶和酶蛋白。德氏乳杆菌的丙酮酸氧化酶也可用同样的操作使之失活，加入焦磷酸硫胺素又可使氧化复活。所以，可以想见焦磷酸硫胺素不仅是丙酮酸脱羧反应的辅酶而且也是丙酮酸氧化的辅酶。

瓦尔堡和克里斯琴不久前发表了用酸性硫酸铵对 D-氨基酸氧化酶进行的可逆性拆解。他们鉴定该辅酶为黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)。这一关于核苷酸结合的核黄素为酶的一部分的发现弄清了另一个 B 族维生素的辅酶功能。当把瓦尔堡-克里斯琴的酸性硫酸铵抽提操作法应用到德氏乳杆菌的丙酮酸氧化酶时，酶就失活。除硫胺素焦磷酸外，这一残余物需要从 D-氨基酸氧化酶分离出来的那种 FAD 才能再显活性。

这一经验使我熟悉了 B 族维生素成为辅酶结构的组成部分在代谢的特定期中的作用。后来我们又在乙酰基传递中发现了一种新的辅酶活性，这促使我们去寻找另一种维生素。那时，由于偶然发现了无机磷酸盐在乳酸杆菌酶的丙酮酸氧化中的功能，于是便提出了丙酮酸氧化和乙酸活化之间的化

学联系，这件事情发生在我为了采用瓦尔堡技术用检压计追踪亚甲蓝的还原，而必须用碳酸氢钠缓冲液代替常规应用磷酸缓冲液的实验中。出乎我意料之外，虽然亚甲蓝很容易在磷酸盐液内被还原，但这一系统在碳酸氢钠液中却几乎完全没有活性。这自然要将磷酸盐放回去，因为证明了它就是缺失的因子。这被解释为乙酰磷酸很可能是一个中间物。

### 丙酮酸氧化系统中的黄素成分

以前提出的，由一个黄素化合物参与德氏乳杆菌的丙酮酸氧化，由于采用类似瓦尔堡和克里斯琴的操作法 (Warburg and Christian *Biochem. Z.* 298: 150. 1938.) 从氨基酸氧化酶除去辅基 (黄素-腺嘌呤二核苷酸) 而得到了证实, (Lipmann; *Enzymologia*, 4, 65, 1937.)。从乳酸菌得到的磷酸提取物在 pH 3, 1—2 °C 重复地用 50% 硫酸铵沉淀, 经这样处理可得到一蛋白质部分, 如果只加焦磷酸硫胺素, 不能催化丙酮酸氧化, 但是如同时加入焦磷酸硫胺素 (维生素 B<sub>1</sub>) 和黄素-腺嘌呤二核苷酸, 就能催化丙酮酸氧化, FAD 是瓦尔堡教授赠送给我的。

在下列实验中, 1 毫升蛋白溶液相当于 0.1 克干菌, 在 0.1 摩尔丙酮酸存在条件下, 在空气中, 37 °C, 震荡 30 分钟:

焦磷酸硫胺素 (微克)	—	15	15
黄素-腺嘌呤二核苷酸 (微克)	20	—	20
消耗的氧 (毫升)	15	5	248

核黄素和“老”黄酶均无活性。

此工作是由埃拉·萨克斯·普洛茨 (Ella Sachs Plotz) 基金会资助的。

F. 李普曼

哥本哈根卡尔斯堡基金会生物学研究所 2 月 9 日。

选自《Nature》143: 436 (1939. 3. 11)

### 参 考 文 献

- [1] Pasteur Effect, in *Symposium on Respiratory Enzymes*. (Madison: University of Wisconsin Press, 1942), p. 48.
- [2] über den Umsatz der Brenztraubensäure und den Mechanismus der Vitamin B<sub>1</sub>-Wirkung. *Skand. Archiv. Physiol.* 76, 255 (1937).
- [3] An analysis of the pyruvic acid oxidation system. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 7, 248 (1939).

### 丙酮酸脱氢反应和腺苷酸磷酸化的偶联

用德氏乳杆菌的干制剂，以焦磷酸硫胺素（焦磷酸维生素B<sub>1</sub>）为反应链的纽带，发现了氧化还原和磷酸化的一个新的偶联。当丙酮酸被脱氢时，加入的腺苷酸发生了磷酸化，并且如过去报道的那样<sup>[1]</sup>，焦磷酸硫胺素是催化丙酮酸脱氢反应酶的辅基。

某些细菌制剂的混悬液含有很少量腺苷酸焦磷酸酯酶，在丙酮酸和腺苷酸的存在下，在空气中震荡，则随着无机磷酸盐的消失而发生氧的消耗现象。

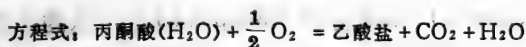
所产生的有机磷化合物可被 1 N HCl 经 7 分钟水解掉（参阅表 1 的第二行）。由于磷酸丙酮酸的测试为阴性，这就成为多磷酸腺苷合成的证据。

如在他处发表的那样<sup>[1]</sup>，用干菌时歧化反应很差，但是加入核黄素<sup>[2]</sup>，可促进反应。分析此现象表明歧化反应为发酵样反应。在这两个酶系统间，丙酮酸-丙酮酸脱氢酶为还原剂，丙酮酸-乳酸脱氢酶为氧化剂而黄素是氢的载体。在丙酮酸的有氧脱氢反应和无氧歧化反应中还原剂是相同的。然而氧化剂则不同，在第一种情况下为氧，而在第二种情况下

表 1

	开始值	0.125摩尔 丙酮酸	0.125摩尔 丙酮酸 — 0.03摩尔 腺苷酸	— 0.03摩尔 腺苷酸
无机P, 毫克	0.59	0.53	0.31	0.59
易水解P, 毫克(毫升)	0	0.062(42)	0.28(200)	0.01
O <sub>2</sub> , 毫升	—	490	474	58
P, $\frac{1}{2}$ O <sub>2</sub>	—	0.04	0.21	—

有氧实验, 约35毫克干菌, 混悬在0.05摩尔氯化钠-磷酸溶液中, 在37.5℃和空气震荡1小时。



### 为丙酮酸-乳酸脱氢酶。

表2的无氧实验表示歧化反应也产生磷酸化反应。

因为偶联在无氧及有氧情况下都能产生。它应不依赖于氢接受体, 但与以焦磷酸硫胺素为媒介的催化的脱氢反应过程密切相关。由此, 必须考虑到无机磷酸为丙酮酸脱氢反应系统<sup>[1]</sup>的不可缺少的成分。迈尔霍夫<sup>[2]</sup>以及尼达姆(Needham)<sup>[4]</sup>仔细分析了发酵的偶联反应, 发现吡啶核苷酸的功能和我们的反应<sup>[5]</sup>中的噻唑衍生物的功能是很相象的。

我认为硫胺素和腺苷酸系统之间的联系将被证明对了解硫胺素在活细胞内的代谢功能是十分重要的。磷酸化能量的一个新来源出现了, 在有氧条件下可以用这种来源, 在无氧条件下也有可能用这种来源。

这一来源可能为骨骼肌, 并且不止此, 还为心肌提供能量。众所周知, 心脏衰竭是缺乏维生素B<sub>1</sub><sup>[6]</sup>最明显的症

表 12

	0.125摩尔丙酮酸	0.125摩尔丙酮酸
开始值	0.03摩尔腺苷酸	0.03摩尔腺苷酸
	—	0.1毫克核黄素
无机P毫克	0.6	0.41
易被水解P毫克(毫升)	0	0.19(138)
CO <sub>2</sub> 毫升	—	172
P : CO <sub>2</sub>	—	0.8

无氧实验：同有氧实验，只是改用氮气。

方程式：丙酮酸 (H<sub>2</sub>O) + 丙酮酸 = 乙酸 + CO<sub>2</sub> + 乳酸

状。伯奇 (Birch) 和梅普森 (Mapson) [7] 认为，心脏没有能力处理游离腺苷酸是动物缺乏硫胺素而发生心动徐缓症的原因。还有，根据卡尔卡 (Kalckar) [8] 的报告，在肾脏和肝脏发生的氧化磷酸化反应可能部分地与硫胺素系统有联系。

我希望对埃拉·萨克斯·普洛茨基金会资助这一工作表示真诚的谢意，并感谢P. 奥斯特恩博士 (Dr. P. Ostern) 送给我腺苷酸。

F. 李普曼

哥本哈根卡尔斯堡基金会生物学研究所，1月7日。

### 参 考 文 献

- [1] Lipmann, *Enzymologia*, 4, 65 (1937).
- [2] Lipmann, Sixteenth Internat. Physiol. Congress, Zurich, 1938, *Ber.*, 2, 161.
- [3] Meyerhof, Ohlmeyer and Möhle, *Biochem. Z.*, 297, 90 (1938).
- [4] Needham and Lu, *Biochem. J.*, 32, 2040 (1938).
- [5] Lipmann and Perlmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, 60, 2575 (1938).
- [6] See review by Williams and Spiess, "Vitamin B<sub>1</sub>", New



York (1938)

[7] Birch and Mapson, *Nature*, 138, 27 (1936).

[8] Kalckar, *Nature*, 142, 871 (1938).

选自 (*Nature*) 143: 281 (1939. 2. 18)

### 在丙酮酸脱氢反应中磷酸盐的作用

在早期用德氏乳杆菌研究丙酮酸脱氢反应时<sup>[1]</sup>, 发现没有无机磷酸, 反应就不会发生, 磷酸盐浓度低时, 脱氢反应的速度与浓度成正比。这表明无机磷酸必定以这样或那样的方式参与反应。发现了丙酮酸脱氢反应能促进腺苷酸磷酸化反应<sup>[2]</sup>后, 这一观点进一步得到证实。只有在磷酸甘油醛脱氢反应中, 才观察到脱氢反应提供活性磷酸<sup>[3, 4]</sup>。最近内格莱因和布罗梅尔 (Brömel)<sup>[5]</sup>从这一脱氢反应中分离得到的主要产物是一个不稳定的双磷酸甘油酸, 他们推测是 1, 3-磷酸化合物或焦磷酸化合物, 更可能是前者。内格莱因和布罗梅尔这个值得注意的发现启发我去探索在丙酮酸脱氢至乙酸的过程中是否生成一个中间磷酸化合物。

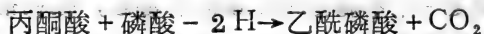
按卡梅雷尔 (Kammerer) 和卡里乌斯 (Carius)<sup>[6]</sup>法, 用三银磷酸盐和乙酰氯制备了乙酰磷酸。到目前为止, 我还没有花过力气分离所假设的中间体单-乙酰磷酸, 但是用过含有单、二和三-乙酰磷酸的混合物, 加上乙酸、氯化物及一些无机磷酸的溶液在德氏乳杆菌的干制剂实验中。溶液内的结合磷酸的平均稳定性粗略地相当于磷酸肌酸。结合磷酸的含量是用埃格尔斯顿早期测定磷酸肌酸的方法测定的。

在下列实验中, 采用了洛曼和延德拉西克 (Jendrassik) 的比色法, 乙酰磷酸象磷酸肌酸那样, 最后成为无机磷酸。每瓶用 44mg 干菌, 总容量为 1.25 毫升, 含 0.04 摩尔/升氟化物。混悬液在 37.5°C 氮气中震荡 60 分钟。

	0.75毫克乙酰-P	0.75毫克乙酰-P	0.75毫克乙酰-P
	4.0毫克腺苷酸	0.1毫克腺苷酸	—
无机和乙酰-P(毫克)	1.12	1.39	1.37
焦磷酸-P(毫克)	0.35	0.09	0.10

实验表明，与腺苷酸孵温后，加入的乙酰磷酸中大约30%的磷酸出现在焦磷酸部分，相当于加入的腺苷酸的大约25%已被磷酸化。

从这一实验和类似实验的结果，以及上述的更早的工作，可以认为丙酮酸的脱氢反应按下列公式进行：



乙酰磷酸(或腺苷酸) +  $\text{H}_2\text{O}$   $\rightarrow$  乙酸 + 磷酸(或腺苷多磷酸)

在丙酮酸代谢的研究中，长期令人迷惑不解的是：虽然发现丙酮酸的氧化降解要经过一个相当于乙酸的步骤，但外加乙酸在丙酮酸氧化系统中却是完全无活性的。乙酸磷酸中间体的形成提供了对“活性”乙酸以及对各种乙酰化过程的合理解释。这些乙酰化过程与丙酮酸和碳水化合物的氧化降解有关，例如氨基酸<sup>7</sup>和胆碱<sup>8</sup>的乙酰化过程便是。

更详细的报道将在冷泉港定量生物学专题论文集(Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology)第7卷登载。对埃拉·萨克斯·普洛茨基金会的资助，致以谢意。

弗·李普曼

纽约市康乃尔大学医学院生化研究所及哥本哈根卡尔斯堡基金会生物研究所，7月21日

## 参 考 文 献

- [1] Lipmann, *Enzymologia*, 4, 65 (1937).
- [2] Lipmann, *Nature*, 143, 281 (1939).
- [3] Meyerhof, Ohlmeyer, and Möhle, *Biochem. Z.*, 297, 90 (1938).
- [4] Needham and Lu, *Biochem. J.*, 32, 2040 (1938).
- [5] Negelein and Brömel, *Biochem. Z.*, 301, 135 (1939).
- [6] Kämmerer and Carius, *Ann.*, 131, 165 (1864).
- [7] du Vigneaud and Irish, *J. Biol. Chem.*, 122, 349 (1937-38).
- [8] Mann, Tennenbaum and Quastel, *Biochem. J.*, 32, 243 (1938).

引自《*Nature*》144: 381 (1939. 8. 28)

### (三) 到美国去

与此同时，岁月流逝，不觉已是1939年初。来自比邻希特勒德国的威胁愈来愈大了，我们还没有来得及察觉，纳粹已经进入丹麦。许多朋友力劝我们离开，因为他们眼看到灾难将要来临，他们的聪明见识，我们后来才理解到。在这样的困境中，我求助于过去在迈尔霍夫实验室的同事迪安·伯克 (Dean Burk)，我们过去就经常交往，周围是一片紧张的气氛。我问他对于我们到美国去有什么建议。刚巧，他正要暂时离开华盛顿国立卫生研究所到肿瘤研究所去，等待肿瘤所的落成。在此间期，纽约康乃尔医学院的杜·维格诺德实验室有一小部分为他准备好供他使用。伯克准备做癌瘤的实验，还缺两个人，我很幸运地成为其中的一个。林德斯特朗-兰在大西洋两岸有很多朋友，他真心实意地把我介绍给杜·维格诺德，这对我帮助很大。我希望将来我有机会对凯·林德斯特朗-兰表示敬意。他是科学界沉闷生活中真正引人注意的很有丰采的人物。

我们在七月初离开哥本哈根乘德罗廷霍姆 (Drottingholm) 号轮船去纽约。登岸不久就到冷泉港渡暑假，参加专题讨论会并应邀报告丙酮酸氧化问题。在那里我见到很多过去只闻其名的人。和科里 (Cori) 及尼达姆夫妇的亲密交往使我获益匪浅，但是欧洲的形势愈来愈坏，那里的英国人包括尼达姆夫妇在内，必须提早离开。现在回想起来，那时我们居然还有那么多的时间讨论生物化学真是奇怪的事。这两个月中我不论在科学方面或其他方面都学到不少东西。

#### (四) 在杜·维格诺德实验室和迪安·伯克从事恶性肿瘤的研究工作

过了这段过渡时期的好时光，我就搬到纽约，开始和伯克他们一起工作了。我们决定仔细考察一下那时人们广泛议论的凯格尔 (Koegl) 和埃克斯莱本 (Erxleben) 提出的设想，即癌组织含各种D-氨基酸。我建议可用瓦尔堡和克里斯蒂安琴的D-氨基酸氧化酶做实验，有希望得出各种D-氨基酸是否存在的结论。我们用癌组织水解液，并用氧化酶来检测氧消耗，得到了基本否定的结果，使我们否定了这一设想。

在这并非意外的否定的实验以后，用D-氨基酸氧化酶作为检定方法，却得到了令人振奋的肯定的结果。在此之前，当罗林·霍奇基斯 (Rollin Hotchkies) 在林德斯特朗-兰实验室工作时，我曾在丹麦见过他。我们在美国又见面了，他就在康乃尔医院 (Cornell) 对面的洛克菲勒大学。他那时正在做杜博斯 (Dubos) 的肽类抗生素，如短杆菌肽和短杆菌酪肽的化学鉴定工作，并已获得纯制品。在

讨论可以解释这些肽化合物的特殊性质的各种可能性时，我们想起来它们可能含有某些特殊的東西，可能是各类 D-氨基酸。我从他那里拿来一些水解物，和氧化酶一起放到检压计的瓶中。当看到瓦尔堡仪中负压迅速增加时，确实令人兴奋。因此证实了这些抗生素含有相当大量的 D-氨基酸。

1940年年中，在威斯康星州的麦迪逊 (Madison) 举行了一个值得纪念的关于中间代谢的专题讨论会，麦迪逊是当时这方面工作的最重要的研究中心。所有人都去了，我被邀去讲巴斯德反应。那时一方面我对巴斯德反应已没有兴趣，同时我对演讲没有经验，因为我忘了规定的时间，又因准备的讲稿太长，规定的时间到了，我还只讲了一半多一点，听众不耐烦起来，因为很明显我离讲完还早着呢。卡尔·诺伊贝格是那次会议的主席，不得不十分遗憾地打断了我的报告。这实在使我狼狈万分，对我后来找个象样的工作造成了很大困难。

## (五) 简单的回顾

那时 F. F. 诺德 (F. F. Nord) 正在起草一套内容相当新颖的丛书的第一卷，书名是《酶学的进展》(Advances in Enzymology)，这是这类书中的第一本，现在经常也有人仿效出版各种《进展》的书了。他要求我投稿，起初他想到的题目是巴斯德效应。但我很高兴他后来接受了我的建议，让我写磷酸键作为载体在能量转换和生物合成中的功能。开始我感到这是我对乙酰磷酸的经验的进一步发展。但那篇文章中提出的一些设想肯定是比我意识到的更为新鲜。很久以后，在一个气氛活跃的鸡尾酒会上，一位帮助我学英语的青年同事告诉我说，他读到那篇稿件时，简直不知

道我在说些什么。

我的文章发表后，引起了骚动。虽然起初可以说是属于一种不同反映的混合。谈到高能键时，遭到了强烈的、有时是猛烈的反对。我以“键能”去表达从一个键得到的电位能，抛开用惯了的消耗能量以形成键的说法。这就不知不觉地捅了马蜂窝。我对从一个键可以得到的自由能的量很感兴趣，并且想为这种能量能携带用于合成的潜在化学能的能力探索出一个定义。为了进一步阐明这一点，我建议用“基团电位”来代替，也许最好用水解反应的 $\Delta F$ 的绝对值来表达。

很多有机化学家生气极了，因为他们觉得这是对“键能”一词的误用。这种反对使我感到惊讶，因为我觉得有机合成和生物合成大量涉及基团活化和基团传运，所以我想我不得已创造出来的名词应该与有机合成有关。近来我很高兴看到我所创造的为了标明携带能量的化学键的( $\sim$ )符号，已经悄悄地进入到边缘的有机文献中了。但是专业物理化学家依然在反对。现时，在用高能磷酸键符号时都加上引号以表示同这种非正统的标记保持距离。而物理化学家则仍然敬而远之。他可能被迫要接受它，但是往往不愿意说出谁创造了这个符号。我从享有世界声誉的杜·维格诺德那里学到很多东西，有一次他告诉我：“你经常得留神你那个会员卡是否保管得好好的”。

在20年后发表的文章里，我对基团电位象氧化还原电位那样下一定义的可能性做了发挥，主要的是寻找一个概念去表达，可能的话，直接去测定基团电位，或称为基团势压。

### 参 考 文 献

- [1] The determination of the total D-amino acid content of human tumors and normal tissues by means of D-amino acid oxidase. With O.K.Behrens, E.A.Kabat, and D.Burk, *Science*

91, 21 (1940) .

- [ 2 ] The nonspecificity of amino acid configuration in malignant tissue hydrolysates. With O. K. Behrens, M. Cohn, and D. Burk, *Science* 92,32 (1940) .
- [ 8 ] The occurrence of D-amino acids in gramicidin and tyrocidine. With R.D.Hotchkiss and R.J.Dubos, *J.Biol.Chem.*141, 163 (1941) .
- [ 4 ] Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Advances in Enzymology* 1,99(1941).(Reprinted by Bobbs-Merrill, Reprint Series in the Life Sciences, No.B-184.)

## 六、在马萨诸塞总医院（1941—1957）

我不愿意用全部工作时间研究癌症工作，自然使伯克两年后到国立卫生研究院的肿瘤实验室时不愿带我一起走，于是我想要找一个好工作又遇到了困难，我已经不算年轻，虽然有了点名气，但是由于表现出某种自信心，往往给别人一个傲慢的印象。我的朋友根据我在麦迪逊专题讨论会上的表现判断得对，他们认为这对我找工作是极其不利的。结果我定居在一个相当奇怪的环境里——麻省总医院外科，并得到齐巴（CIBA）药厂奖学金的资助。这确实是我一生碰到的好运中的一个。我的顶头上司是奥利佛·科普（Oliver Cope），一个很好的人。他对内分泌学有兴趣，身边需要有个懂得代谢的人。这个实验室是医院里几个研究单位之一，我过去在医学方面的经历使我感到十分自如。爱德华·丘吉尔（Edward Churchill）领导的外科是一个很特别的部门，有很多地方可作实验室，其中有一个研究细菌学的班子，还有一个在亨利·比彻（Henry Beecher）领导下的麻醉学实验室。在那里奥利佛·科普给我一个地方研究代谢。

令我高兴的是我到达后，加利福尼亚大学一位已相当著名的微生物学家H. A. 巴克（H. A. Barker）博士表示愿意和我工作一年，这在当时情况下，就大大提高了我的身份。他从1942年至1943年和我一起工作，使人认为我的工作可能还有些价值。起初，巴克对在医院里又是在外科感到难于应付，但很快他就喜欢上了这个工作，并多少有点被医学问题



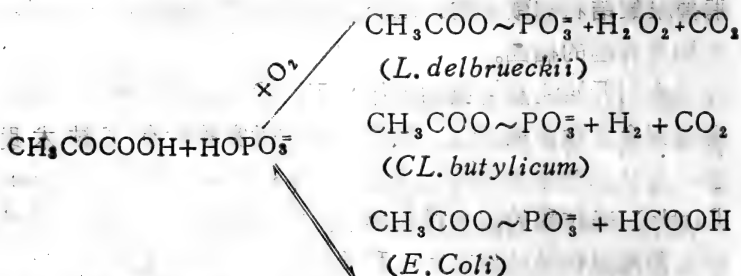
所吸引。富勒·奥尔布赖特 (Fuller Albright) 博士和他讨论过不易处理的尿酸肾结石能否用消化的方法去除。巴克对这个想法着了迷，他从土壤中分离出一种能消化尿酸和啃掉尿酸结石的微生物，这个方法不能用于实际，但却是一个相当有趣的插曲。

人们开始注意起我的工作来了，我从美国四州联合基金会得到愈来愈多的资助。我第一次在做实验时有了技术助手，并且十分幸运地得到康士坦斯·塔特尔 (Constance Tuttle) 来作我的技术员和秘书。在纽约从事与癌症有关的题目和能量转换的论文时，我始终没有忘记丙酮酸氧化系统。在那里我发现有希望证明存在一个新的中间产物，这是很令人兴奋的，这就是磷酸与乙酸间的酸酐。继续做这些实验有些不大顺手，我从哥本哈根带来了不少乳酸杆菌丙酮酸氧化酶，在纽约工作的第二年，我就设计出一个无机磷酸盐存在下测定乙酰磷酸的方法。用这个方法，可以肯定地证明乳酸杆菌丙酮酸氧化时的氧化产物确实是乙酰磷酸。在证实乙酰磷酸后，塔特尔对我早期的工作帮助甚大。

我很高兴看到其他实验室也和我们一起探讨乙酰磷酸的形成以及它在其他细菌中的反应：厄特 (Utter) 和沃克曼 (Werkman) 以大肠杆菌为材料，而凯普塞尔 (Koepsell) 和约翰逊 (Johnson) 则以梭状芽胞杆菌为实验材料。我接触微生物学是从德氏乳杆菌开始的，但是当时我对此菌几乎一无所知。沃克曼邀请我到艾姆斯 (Ames) 的衣阿华州立学院，在他的实验室工作几个月，这是好机会。哈兰·伍德 (Harland Wood) 已经不在那里，但是克兰皮茨 (Kram-pitz) 和厄特还在，这一段经历非常有意思。我真希望我能够重新体验这段生活的风趣。在那里我们用过时的质谱仪测定<sup>11</sup>C，为了开夜车我带去淡啤酒，这种大胆妄为的举止

可以认为有点放肆。

三种细菌对丙酮酸的发酵，均能导致乙酰磷酸的合成，可在下列方程中予以比较：



最初我们没有意识到反应的复杂性，尤其是最后一个反应，即所谓丙酮酸的磷酸解作用(Phosphoroclastic split)。在丙酮酸羧基和甲酸盐之间，交换甚快，表明反应是可逆的。另一方面，在酶催化下HCOOH是与H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>平衡的。这就促成了某种大胆的设想：以磷酸化反应和还原的交替来固定CO<sub>2</sub>。引用1950年关于CO<sub>2</sub>固定的评论：

“现在来看有一个事实很明显，即不论属于何种可能的机理，显然涉及了磷酸化反应和氢化反应一系列的交替步骤。因此，看来该是查询这些磷酸键的来源的时候了，它们可能以某种方式从光能衍生……”

数年后，艾伯特·弗伦克尔 (Albert Frenkel) 在我的实验室工作期间，在深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 的提取液中发现了光合磷酸化反应，当然，这使我们非常高兴。弗伦克尔的工作后来由盖勒 (Geller) 继续做，他首次观察到吩嗪硫酸甲酯对提取液的光合磷酸化反应起强烈的刺激作用。关于丙酮酸氧化的观察使我们相当清楚地认识到在光合还原作用中，磷酸化反应是个必需的基本步骤，而鲁本 (Ruben) 对此在更广泛的角度上早已意识到了。

## (一) 从乙酰磷酸到辅酶A探求中的

### 艰辛和失误

丙酮酸氧化产生了乙酸和磷酸的混合酸酐。这种混合酸酐的出现成为我考虑和进一步工作设想的主要动力。它是高能磷酸键在基团活化中起作用的第一个例子。到那时为止已发现这些键在能量转换中起着将 $\sim P$ 带至ADP的作用，并填充ATP库。在接受高能键方面，只有机械能的产生是ATP中的磷酰基的一种利用方式，但是我早已意识到 $\sim P$ 可被用于生物合成。于是这是一组磷酰基接受体的第一个代表，磷酰基电位可用在基团活化中。

在刚发现乙酰磷酸时，看来它很适合起活化乙酸的作用。代谢上活化的乙酸是最早设想为“活化”中间物中之一，但是没有作出化学鉴定。那时氘标记的乙酸在整体动物内已被常用于探讨乙酸的代谢命运。舍恩海默尔(Schoenheimer)用这个化合物在他开拓性的探讨中第一次勾画出生物合成的有效同位素化合物。而乙酰磷酸原来却是对细菌的专一的代谢中间物。我们现在知道它可被乙酰基转移酶转化为乙酰辅酶A，就是活化的乙酸。我们花了好几年的时间才充分认识到这一点，现在我们知道基团活化常常是两步反应。原来在细菌内乙酸活化的第一步是产生乙酰磷酸。这可以通过各种途径：氧化、丙酮酸或者核酮糖-5'-磷酸的磷酸裂解反应，或经酶催化的ATP对乙酸的磷酸化反应。

转而研究动物组织后，我们最早的文章表明，我们对乙酸第二次转移至最后的基团载体的理解是很缓慢的，即便在阐明了辅酶A就是乙酸载体后，对它的机制也还只有部分的理

解。那个时候人们不认识一个磷酸化衍生物难得进入有机缩合反应，而基团通常是传递至一个次级的、更专一的基团载体并保持高基团电位。大部分关于乙酸作为代谢前驱物的研究是用动物进行的。当我们用乙酰磷酸在动物系统内作为前驱物进行试验时，等待着我们的是深深的失望。为了试验，似乎可用一个简单系统研究乙酸活化对肝脏内芳香胺氨基的乙酰化。那时兴趣集中在磺胺药的这种乙酰化上，因为这一反应可消除它的抗生作用。有一个简单方法可以测定乙酰化的程度。此外，已经采用兔肝切片研究体外的乙酰反应。我们用大白鼠肝和兔肝发现乙酰基传递不能耐受匀浆化处理，而感到很失望。幸而我们在鸽肝匀浆中发现了很有活力的乙酰化系统。只要在匀浆的上清液中加入ATP作为能量的供体，活力就可以恢复。看来，我们已经发现了一个测试乙酰磷酸的好系统。

可是又出现了未曾料到的障碍，在这种肝提取物中以及一般动物组织提取中都普遍含有一种可以迅速地甚至爆发性地水解乙酰磷酸及其他酰化磷酸的酶。这种酶本身是有趣的，它是热稳定的，而且可以提纯，尤其是从肌肉里提纯。然而，我们没有花时间去认真研究它。我们真正感兴趣的是寻找活性乙酸。我们缓慢而且不情愿地得到了一个结论，即乙酰磷酸在这些组织提取物中不是一个乙酰基供体。这个结论令人沮丧，但是作为对我们的酬劳，我们在鸽肝里的ATP联结的乙酰基传递系统中很快地识别出一个热稳定辅因子。因为没有已知的辅酶可以代替它，我们希望在这里碰到一个新的辅酶。

在此有希望的关键时刻从四州联合基金会又得到新增的慷慨资助，可以有更多的同行前来工作。很幸运，先是内森·卡普兰(Nathan Kaplan)然后又有戴夫·诺维里

(Dave Novelli) 参加康·塔特尔和我的工作。我们于是决定着手分离这个新的辅酶。正在那时纳赫曼佐恩 (Nachmansohn) 和伯曼 (Berman) 已从脑制剂中证明了胆碱的ATP联系的乙酰化反应,同时也意识到有一个热稳定的辅因子。费尔德伯格 (Feldberg) 在英国也观察到同样的情况。费尔德伯格和纳赫曼佐恩的兴趣主要是在胆碱乙酰化反应的生理学方面,因此没有积极从事它们的辅因子的分离。我们首先确信肝内磺胺药的乙酰化反应和脑内胆碱的反应均由相同的辅因子所促成。于是我们集中力量研究这个辅酶的化学性质,它显然是乙酸活化的通用补充物。

## (二) 在辅酶A中发现泛酸

已经很明显, B族维生素如核黄素烟碱酰胺和硫胺素都具有专一的代谢功能,然而必须组成更复杂的辅酶,才能起作用。正因为没有一个含有B族维生素的已知辅酶能够代替我们的辅酶,所以我们希望或许可以找到一个代谢上尚未鉴定的B族维生素行使辅酶的功能。当我们把辅酶提纯到相当程度时,我们就将样品送到各地,包括两个药物公司的研究实验室,希望他们能告诉我们这一维生素的性质,但来自两个药物公司的回答是,在我们的制剂中没有检出任何已知的维生素。

尽管有这次失望和其他说不清的理由,我们预感到其中可能含有泛酸,于是决定送一个样品给发明这一维生素的罗杰·威廉斯 (Roger Williams)。他把它交给贝弗利·吉拉德博士 (Dr. Beverly Guirard)。很快我们就接到了十分激动人心的消息,他们的实验强烈地表明在辅酶样品中含有大量泛酸。用通常测定泛酸的细菌鉴定系统直接测定这一

辅酶时，几乎没有什么反应。但他们知道泛酸处在结合态，只有在经水解酶处理后才能被缺乏它的细菌所利用。经过酶水解并出现了肯定的反应后，吉拉德小姐接着观察泛酸成分之一，即易于单独鉴定的 $\beta$ -丙氨酸是否存在于我们的辅酶制剂之中。为此目的，辅酶经酸水解处理，在水解液中， $\beta$ -丙氨酸试验呈现强阳性。后来将辅酶与肝提取物孵温，使辅酶失活，其释出的泛酸，用细菌检定，很快就把泛酸确凿无疑地鉴定下来。

令人欣慰的支持泛酸为乙酰化反应辅酶的一部分的意见来自完全不同的一个地方。马乔里·史蒂文森 (Marjory Stevenson) 实验室对一种制备泡菜 (sauerkraut) 用的乳酸菌奇怪地产生大量乙酰胆碱感到兴趣，伊丽莎白·罗阿特 (Elizabeth Rowatt) 又刚刚发现了缺乏泛酸的乳酸菌 (*Lactobacillus Plantanum*) 丧失了胆碱乙酰化的能力。这些实验很好地得到互相印证。在这种情况下，我们发表了文章，并对此新辅酶命名为辅酶A (CoA)，意思是乙酰化反应的辅酶。

### 乙酰化反应的辅酶，一个泛酸的衍生物<sup>①</sup>

先生们：

普遍存在的一个新辅酶的作用在肝制剂芳香胺的乙酰化反应中第一次被观察到了<sup>[1]</sup>。随后又发现脑内胆碱类似的乙酰化反应系统也需要相同的辅酶<sup>2</sup>。无疑，它与费尔德伯格和曼因 (Mann)<sup>[3]</sup>，纳赫曼佐恩和伯曼<sup>4</sup>以及利普顿 (Lipton)<sup>[5]</sup>同时报道的胆碱乙酰化的激活剂是同一个东西。最近，采用不同于先前发表过的操作法<sup>[6]</sup>，我们获

① 这一工作是由四州联合基金会资助的。

得了这一辅酶的一种制剂比原来煮过的猪肝提取物的活性大700倍。这一制剂是为了彻底分析维生素的存在。没有发现已知的超过微量的B族维生素。然而,在检定前<sup>7</sup>用澄清酶-木瓜蛋白酶 (clarase-papain) 按常规法延长处理,则看到泛酸值慢慢地增加。所以,β-丙氨酸<sup>8</sup>是在酸水解液中测定的,得到的数值相当于辅酶中含有的10%的泛酸。合并用过去已发现的可使辅酶失活的两个酶<sup>9</sup>的结果是泛酸释放出来(表1)。

为了进一步肯定此辅酶是泛酸的衍生物,在一系列制剂中,对泛酸含量和辅酶活力作了比较(表2)。

每一单位的维生素含量是恒定的。这就进一步证明了泛酸是辅酶的一部分。

表 1

处 理	不 加	澄清酶+ 木瓜蛋白酶	碱性磷 酸酯酶	肝 酶	肝酶 + NaF	肝酶+ 磷酸酯酶	酸 水 解 (β-丙氨酸)
释放的 泛酸%	0	0.15	1.4	4.8	0.5	9.0	10.1

波士顿马萨诸塞总医院生物化学研究实验室: 弗里茨·李普曼, 奈登·卡普伦, G. 大卫·诺维里, 奥斯汀得克萨斯大学生物化学研究所: L. 康士坦斯·塔特尔, 贝弗利·吉拉特。1947年1月16日收到。

表 2

制剂编号	活性 单位/毫克	泛酸百分率		泛酸 微克数/单位活性
		酸水解后从β- 丙氨酸推算	酶处理后 直接检定	
105	9	1.1	0.7	0.78
100	10	1.0	1.0	1.00
72	26	2.0	1.8	0.69
101	32	2.0	1.8	0.56
102	60	4.2	3.7	0.62
99	65	4.7	4.4	0.68
103	100	6.5	6.5	0.65
A'	130	10.0	9.3	0.72
A	132	9.9	8.4	0.64

引自《*The Journal of Biological Chemistry*》167, 1947.

## 参 考 文 献

- [1] Lipmann, F., *Federation Proc.*, 4, 97(1945), *J. Biol. Chem.*, 160, 173 (1945).
- [2] Lipmann, F., and Kaplan, N. O., *J. Biol. Chem.*, 162, 743 (1946).
- [3] Feldberg, W., and Mann, T., *J. Physiol.*, 104, 411(1946).
- [4] Nachmansohn, D., and Berman, M., *J. Biol. Chem.*, 165, 551 (1946).
- [5] Lipton, M.A., *Federation Proc.*, 5, 145 (1946).
- [6] Lipmann, F., and Kaplan, N. O., *Federation Proc.*, 5, 145 (1946).
- [7] Pennington, D., Snell, E. E., and Williams, R. J., *J. Biol. Chem.*, 135, 213 (1940).
- [8] Schenck, J. R., and du Vigneaud, V., *J. Biol. Chem.*, 153, 501 (1944).



在辅酶A分离以前及确定它的功能(reen)等实验室已在  
中,我总想证明以磷酸化传递的活化作,953年联合会会议上  
生盲目性,阻挠我认识其间的正确联系。领域中,我们实  
酸是辅酶A的一个组成成分又是我的另一个同发现柠檬酸-  
辅酶A内存在一种维生素应该直接和功能有关是在探讨大  
理。虽然我们很早就观察到CoA的纯制品中含有用时发现  
为等克分子量的异常高浓度的SH基,但对它的袂外的一个  
引起注意。我清楚地记得在四十年代后期,CoA仍很复杂也  
时D. D. 伍兹(D. D. Woods)的一次来访。他问我酸及与  
酸以外,在CoA内还有什么。我回答说“只有腺苷酸  
对此他只说了一句“多么可惜。”他希望有更多东西的  
是正确的,而且我们也找到了,但我的回答表明我们没有  
意它。以后,斯内尔(Snell)的研究组发现CoA中的SH  
属于半胱胺而不是胱氨酸。而我们当时却错误地认为它是后  
者。然而,我们关于在我们的CoA制剂中存在着SH化合物的  
报道鼓励斯内尔等接受在*Lb. bulgaricus*因子中确有SH  
衍生物存在的想法,而这种因子很明显是CoA的前驱物。  
大约在此同时,也是由于我们发现CoA制剂中的SH基,促  
使吕南(Lynen)认识到这个SH基就是乙酸的化学接受  
体,他们聪明地去分离乙酰CoA而不是CoA本身,于是发  
发现了一种硫酯的基团载体功能。

在这工作的后期,我们研究了在动物或酵母制剂中与  
ATP联系的乙酸的活化形成乙酰CoA的机制。在这些制剂  
中乙酰磷酸不是中间产物。但是乙酰磷酸这个幽灵仍在我们  
当中徘徊。举例来说,在周廷冲(T. C. Chou)和我们的研  
究中,我们第一次从鸽肝制剂中分离出一个“ATP乙酸”  
反应,它需要CoA并和羟胺反应产生乙酰羟肟酸。我们正  
确地把它归诸于乙酰~CoA的形成,然而没有鉴别结合键

的性质。虽然平衡不太好，我们认为这个ATP-CoA-乙酸反应产生了ADP和 $P_i$ 。后来我们才逐渐地认识到产物是AMP和焦磷酸，而不是ADP和无机磷酸。当然，无机磷酸会更符合我们设想，即一个与酶结合的乙酰磷酸最后可传递至CoA。这样一个机理就会很象在细菌内乙酰基转移酶可以从乙酰磷酸把乙酰基交换给CoA并释出 $P_i$ 那样。然而，最后我们使自己相信了在酵母和动物组织中，乙酸传递至CoA确实产生了焦磷酸和腺苷酸，这在当时是供ATP联系的基团活化用的相当新的产物。

在此之后，由于各种原因，我们又一次错过了，没有找到这一活化反应的真正中间物乙酰腺苷酸，而被保罗·伯格（Paul Berg）发现了它。我们发现了不寻常的产物腺苷酸和 $PP_i$ 之后，却不能认识到它的机理，原因是我们没有意识到乙酸对蛋白质的异常强的结合力。在我们的检定中，我们认为已经过“详尽无遗的”透析，不需要为了得到ATP与CoA的反应而将乙酸加入到酶制剂中去了。正是这个错误，使我们设想CoA-焦磷酸为可能的中间物。

上述情况，归纳起来，教育我们，认识新事物是何等地困难，因为这是新事物，还教育我们，如果一个人有了先入为主的想法，就会把手脚捆缚起来。我们以为很运气，发现了一个含有新的维生素的辅酶，并以把注意力放在这个辅酶中的维生素上来而原谅自己，因此当我们已经清楚地意识到辅酶A是活化乙酸的载体，在寻找连接到辅酶的维生素部分的高能键时，仍然忽略了CoA内的SH功能，我们相当满足于发现腺苷酸以焦磷酸键连到辅酶的维生素部分，这是与DPN和黄素腺苷二核苷酸的普遍情况相符合的，我们多少有点期望维生素是直接参与起作用。

那时辅酶A联系的反应已成为很多实验室喜欢涉猎的领

域。奥丘阿 (Ochoa)、吕南和格林 (Green) 等实验室已在阐明其各种功能。很多这方面的结果在1953年联合会会议上汇集成一个代表性的专题论文集。在CoA领域中，我们实验室的最后贡献是和斯赖雷 (Srere) 共同发现柠檬酸-ATP-CoA裂解为乙酰辅酶A和草酰乙酸。这是在探讨大白鼠肝制剂中柠檬酸对脂肪酸合成的明显刺激作用时发现的。这一裂解反应尔后证明是乙酰辅酶A在线粒体外的一个重要来源。最近对它的酶催化机理做了研究，发现很复杂也很有趣。沃尔什和斯佩克特已证明它涉及磷酸化柠檬酸及与蛋白质结合的 $\sim P$ 和 $\sim CoA$ 。

### (三) 呼吸磷酸化反应的解偶联

虽然在研究CoA时期及以后一段时间里我的兴趣集中在 $\sim P$ 的利用上，但我仍然把生物能量转换的问题放在心上。有氧磷酸化反应问题在那时很不清楚，现在也还没有解决。再者，四十年代中由于注意到瓦尔堡的工作，即在生长组织中有缺氧能量的充足供应，于是有一种倾向，认为发酵或糖酵解所具有的现成的生产 $\sim P$ 的机理，可能是一个特殊的情况。对卡尔卡和贝利兹尔 (Belitzer) 发现的组织匀浆中有氧磷酸化的模糊了解，使人怀疑通过ATP产生 $\sim P$ 是否是能量供给的普遍形式。我迁居到波士顿后，又恢复了早先和伍兹霍尔实验室的联系。在那里我熟悉了无脊椎动物发育的工作，这引起了我对生长抑制剂的作用方式的兴趣。

当我在伍兹霍尔遇到克洛斯 (Clowes) 时，我已经被硝基酚的奇特作用迷住了，像克洛斯和克拉尔 (Krahl) 发现卤素酚一样，硝基酚可使生长停止，但刺激呼吸。因为我相信电子流能量必须被转化才能有用，所以若硝基酚能使氧化

还原反应至 $\sim P$ 电位的有氧转化解偶联，那么硝基酚作用的矛盾就可以理解了。我请W.F. 卢米斯 (Loomis) 做这工作，他是最早到麻省总医院参加我的实验室工作的人之一。他通过和格林早期的工作，对在组织匀浆中测量有氧磷酸化反应的方法是熟悉的。于是我们决定试验二硝基酚 (DNP) 对呼吸和磷酸化反应的解偶联作用，结果是肯定的。观察到这大家熟知的生长抑制剂明显地将磷酸化传递 (对此它起阻断作用) 与电子传递 (对此它起刺激作用) 拆解，对确定ATP是一个普遍的生物能量载体的设想有很大帮助。形式上说，呼吸刺激与解偶联的联系，最早暗示我们电子传递和 $\sim P$ 的发生存在着内在的可逆性。

DNP实验的成功促使我们试验其他生长抑制剂，如叠氮的解偶联作用又得到了肯定的结果。最后鲍勃·克兰 (Bob Crane) 观察了砷酸对有氧磷酸化反应的效应，发现它能与 $P_i$ 竞争并取消 $\sim P$ 的形成。然而砷酸的这种竞争性不如在其他酶反应中那么强。它被高浓度的磷酸盐所抵消。

证实了DNP可解除呼吸与磷酸化反应偶联，使我希望甲状腺素也有相同的作用。已经讲过，克拉尔和克洛斯发现碘酚和卤素酚一般具有硝基酚的作用。后来我们发现双碘酪氨酸丁酯是最强的解偶联剂之一。我们把这一系列实验中最早的几次以摘要的形式发表在《联合会汇编》中。我们报道了加入 $\sim P$ 受体 (如葡萄糖 + 己糖激酶) 刺激正常大白鼠肝匀浆的呼吸可以防止ATP积聚。相反，从患甲状腺毒症的大白鼠制备的相似制剂就不显示这种刺激作用。我们的解释是这种甲状腺毒症制剂只起了一种松散的偶联作用。它的呼吸作用实际上可能比正常的高一些，但是它不受外加磷酸盐受体的影响。这种磷酸盐受体通常可以大大地缓解在它不存在时被抑制了的呼吸。在这次联合会议上，拉迪

(Lardy) 可能用了较好的线粒体制剂，他报告在加入磷酸接受体后，对呼吸有更强的刺激作用。我们认为，这种相互依赖性表明磷酸化传递和电子流之间明显地存在着可逆性。这一高能磷酸键若不转给ADP则将向回反应，并使电子流逆转。

随后，有些研究人员如赫斯 (Hess)、马齐乌斯 (Martius) 尤其是拉迪，用甲状腺素直接使大白鼠肝的磷酸化反应与呼吸解除偶联。我们用我们的大白鼠很难取得这种结果，但是发现仓鼠线粒体对甲状腺素的反应较好。然而，为得到这些效应所需的条件不易重复。和 DNP 相反，甲状腺素效应可被增加镁浓度所抵消，而且这一效应变化无常。再说，甲状腺素有活性作用的浓度远远超过正常水平。这些都表明甲状腺素和硝基酚之间的一致不如我们希望那样直接。

在和杜托伊 (DuToit) 合作的实验中，我们检验了氨基酸并入切除了甲状腺的大白鼠肝切片的效应。手术前及手术后，给予生理剂量的甲状腺素使之正常化。对此系统，DNP可完全阻断氨基酸的并入。将无甲状腺和有甲状腺制剂作比较，发现无甲状腺制剂比正常组的合成蛋白质的能力弱。而有甲状腺制剂的蛋白质合成比无甲状腺制剂要旺盛得多。这一实验本来应该提醒我们，我们的解释至多部分可以成立，甲状腺激素通常是生物合成的促进剂而不是抑制剂。但甲状腺素刺激氨基酸并入的实验结果并没有在我们的思想中占突出地位，而是多少被放到一旁。这说明如果一个人的思想已确定向着另一个方向时，往往忽视了引到正确方向上的指针，这是多么令人遗憾的事。

但事实依然是患甲状腺毒症动物或人确实表明有能量的消耗。换言之，即在呼吸和能量利用之间有某种形式



图1 引自内分泌学教科书 H. Selye, *Acta Endocrinologica*, Université de Montréal, Montréal, Canada, 1947, p. 750.

的解偶联。这种观点不能解释正常条件下激素的作用，而这一奇妙的化学物质（甲状腺素分子）的作用仍有待于作完善的解释。以我们对激素作用的有限了解，在肝内由于甲状腺素引起的酶合成的净效应似乎与人们看到用皮质类固醇或雌激素作用效应之间有一种一致性，容易使人受骗。反之，这些垂体过量时所引起的总形象和病理学改变的样子看来完全不同，与甲状腺机能亢进也不同。请看图1中甲状腺机能亢进患者，她显然不能利用组织中亢进的专一性呼吸活性所

供给的能量，无疑她受到某种形式的能量解偶联。另一方面，在浓度过低和正常浓度的范围之间，多聚碘甲状腺原氨酸（Polyiodothyronines）可以纠正能量利用率的不足。在这一范围内，它们的作用表现很不相同，并且在分子水平上更加复杂。这使我们可以得出结论，过量激素在某种情况下其症状与从激素丧失至正常的转变过程中所表现的症状是不同的。

## 磷酸化反应和氧化之间的偶联的可逆性抑制

先生们:

克利夫顿Clifton<sup>[1]</sup>是最早证明二硝基酚DNP低浓度时可完全阻断合成反应而不干扰氧化作用的人之一。其他的研究工作者也证明了此药品抑制氮的同化<sup>[2]</sup>、生长和分化<sup>[3]</sup>及适应酶的形成<sup>[4]</sup>。此外,霍奇基斯<sup>[5]</sup>报道过DNP防止酵母细胞呼吸时摄入磷酸盐的初步数据。这些结果表明,DNP作用于细胞的主要机理是磷酸键产生与氧化反应的偶联。

表 1

和格林等人<sup>[6]</sup>的方法相同,所有样品含酶制剂1毫升,在KCl-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液中制成兔肾匀浆,离心并用新鲜缓冲液将沉淀物洗两次。然后加入0.1毫升酵母己糖激酶、0.0067摩尔/升MgCl<sub>2</sub>、0.013摩尔/升NaF、0.00067摩尔/升腺苷-5-磷酸、pH7.2的0.02摩尔/升磷酸缓冲液、0.0167摩尔/升果糖,以及0.01摩尔/升谷氨酸钠为底物。制备同样的对照杯,在实验开始时就从侧管斜注入酸以提供无机磷酸的起始水平。温度:25℃;气相:空气;时间:6分钟。

加入物	氧摄入量 (微摩尔)	磷酸盐摄入量 (微摩尔)	P:O比率
无	8.0	17.5	2.2
$1.8 \times 10^{-4}$ 摩尔/升DNP	7.9	1.3	0.2

在研究这一偶联机理时可观察到 $5 \times 10^{-5}$ 至 $2 \times 10^{-4}$ 摩尔/升DNP可防止磷酸化,而不影响氧化或只对氧化有轻微的刺激作用。

DNP的浓度低至 $5 \times 10^{-6}$ 摩尔/升时可显著降低P:O比率。此效应可以用新鲜缓冲液洗去DNP后,得到逆转。此外,还发现了DNP能够“替换”无机磷酸盐,后者为这

一系统的必需成分。看来,DNF对缺乏磷酸盐的系统有强烈的刺激作用,而完全的系统只反应出轻微的刺激(见表2)。

表 2

温度25℃, 气相: 空气, 时间: 30分钟

磷酸盐 (摩尔/升)	0	0	$2 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-2}$
DNP (摩尔/升)	0	$8 \times 10^{-5}$	0	$8 \times 10^{-5}$
O <sub>2</sub> (微摩尔/升)	5.1	17.9	18.6	21.0

这些结果表明 DNP 可逆地解开磷酸化反应和氧化的偶联, 这一效应也可以用阿的平 (mepacrine) 在 $10^{-3}$ 摩尔/升浓度时得到。虽然叠氮钠可以降低P:O值, 但它不能在这个系统内替换磷酸盐, 并且在浓度稍高时, 也是一个强大的呼吸抑制剂。DNP只在高浓度时才抑制呼吸。

W. F. 卢米斯; 弗里茨·李普曼

波士顿马萨诸塞总医院生物化学研究实验室和哈佛医学院生物化学系,  
1948年2月13日收到发表。

引自*The Journal of Biological Chemistry* 173 (2), 1948.

### 参 考 文 献

- [1] Clifton, C. E., in Nord, F. F., and Werkman, C. H., *Advances in enzymology and related subjects*, New York 6, 269 (1946)
- [2] Winzler, R. J., Burk, D., and du Vigneaud, V., *Arch. Biochem.*, 5, 25 (1944).
- [3] Clowes, G. H. A., and Krahl, M. E., *J. Gen. Physiol.*, 20, 145 (1936).
- [4] Spiegelman, S., *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 30, 315 (1947).
- [5] Hotchkiss, R. D., in Nord, F. F., and Werkman, C. H., *Advances in enzymology and related subjects*, New York, 4, 153 (1944).
- [6] Green, D. E., Loomis, W. F., and Auerbach, V. H., *J. Biol. Chem.*, 172, 389 (1948).
- [7] Fellow in the Medical Sciences, National Research Council.



#### (四) 结束辅酶A的工作

1953年底，很荣幸我发现辅酶A的工作得到斯德哥尔摩的承认。我是希望有这一天的，它的来临使我很快乐，十分感谢他们，因为这一工作尽管还有很多不完全的地方，他们仍然肯定其基本价值。然而获得诺贝尔奖金，尤其这是专发给CoA方面的工作的，使我感到这奖金对我与其说是个放松一下的机会不如说是一种责任。依我判断，要认识到我所发现的 $\sim P$ 作为生物能量量子，并把能量用于代谢功能及生物合成中，还有较大的距离。这曾经是CoA工作的动力，这一工作导致对缩合反应前基团活化机理的更深入的理解。

看来，CoA工作已到扫尾阶段，我已准备放下不干了。放下一项已经获得相当成功的工作，冒险进入一个未知的世界，需要下很大的决心，但是我希望在几个ATP联系的活化反应中找到一种不平常的中间物。氨甲酰磷酸类似乙酰磷酸引起了我的好奇心。瓜氨酸出现磷酸解作用可以解释为氨甲酰磷酸是氨甲酰的供体，这就是我们决定去寻找的这种中间物的第一个。在此同时，硫酸基活化反应对ATP的依赖性似乎指出可能有一个磷酸硫酸酐作为中间物。这是一个未知的酸酐类，为了希望找到它，我就去研究硫酸根的活化。我们从未把这些工作当中心，虽然它们对我们提出的比较成熟的问题给了相当满意的回答。关于它，我现在要单独加以叙述，然后再回过头来谈更具有连续性和吸引人的多肽合成的研究。

1952年，四州联合基金会改变了政策，从那时开始，我们的经济资助改由国家卫生研究院(NIH)供给，在我还未得到诺贝尔奖金之时，这项资助就已经很慷慨了。“科学基

金会”向我提供1961至1966年五年的经济资助，我们接受了，因为这给我们以更大的活动自由。然而，从1966年起，我们又回到NIH的工作上去了。我愿意再一次吐露一下我对国会从六十年代早期以来的态度改变使我产生的遗憾心情，并抄录我写给《科学》的一封信稿（Science, 140: 726, 1963 Copyright 1963 by the American Association for the Advancement of Science），文字略异于我们双方各自表达意见的一系列通信中：

“过去二十年，美国科学蓬勃发展，作为参与者之一，我愿意对政府执行委员会在题为《公共卫生部研究基金的管理》的报告中，所采取的消极态度作些评论。这个粗暴的报告完全忘记了，正是由于公共基金的分配，考虑周密才使美国科学能跃进到无可争辩的世界最高地位。

国家卫生研究院和国家科学基金会过去在他们的科学行政人员领导下，决定了一项赠予基金的政策，保证了判定给与基金时是公平而严格的。这就使基金分配对有天赋、有前途的男女青年以及那些已经显示他们的能力的人受惠。特别是对青年人给予基金资助和较高的薪金，不仅吸引了国内有天赋的人到科学领域里来，而且也把全世界有科学才能的人吸引到这个国家来。和很多其他国家相反，这里有机会在科学界得到一个位置，并获得从事独立研究工作的条件，而其他许多科学界的结构，却只使很少数的人能得到这种机会。

把这已得到可称为奇迹般成功的政府支出费斥为轻率地分配公共基金，实在令人难以理解。这种巨大的成功表明，尤其与其他公共开支相比浪费是何等的微小。国会里的议员给予科学家这种忘恩负义的对待，使我不由得不从马塞勒斯（Marcellus）的《普鲁塔奇（Plutarch）的生平》一书中

引用一段来结束此信。我承认引用此文时，意思有些夸大：

命中注定，当时阿基米德要专心致志用图解去算出某些问题，他把他的心思和眼力都集中到他设想的题目上，从来也没有注意到罗马人已经入侵，也没有注意到锡拉丘兹（Syracuse）城已经陷落。在他极端高度集中地研究和思考的时候，一个士兵出乎意料地来到他面前，命令他跟他到马塞勒斯去。他在证明出问题之前，拒绝照兵士说的去做，那个士兵大怒，抽出刀来，一下穿透了他的身体。”

### 参 考 文 献

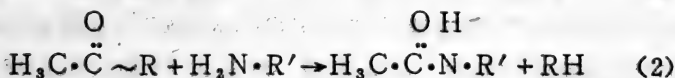
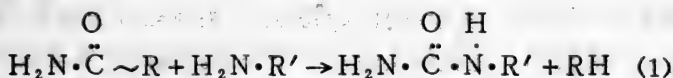
- [1] Enzymatic synthesis of acetyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 155, 55 (1944) .
- [2] Acetyl phosphate, chemistry, determination, and synthesis. With L. C. Tuttle, *J. Biol. Chem.* 153, 571 (1944) .
- [3] The detection of activated carboxyl groups with hydroxylamine as interceptor. With L. C. Tuttle, *J. Biol. Chem.* 161, 415 (1945).
- [4] Acetyl phosphate. *Advances in Enzymology* 6, 231 (1946) .
- [5] Light-induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. A. Frenkel, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5568 (1954) .
- [6] Photophosphorylation in extracts of *Rhodospirillum rubrum*. With D. M. Geller, *J. Biol. Chem.* 235, 2478 (1960) .
- [7] Development of the acetylation problem, a personal account. *Science* 120, 855 (1954) .
- [8] The Metabolic Function of Pantothenic Acid, in *The Vitamins*, Vol. 2, (New York, Academic, 1954) , p.598.
- [9] An enzymatic reaction between citrate, ATP and CoA. With P. A. Srere, *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4874 (1953) .
- [10] H. M. Kalckar, *Biological Phosphorylations. Development of Concepts*. (Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 1969)
- [11] Observations on respiration and phosphorylation with liver mitochondria of normal, hypo, and hyperthyroid rats. With H. Niemeyer, R. K. Crane and E. P. Kennedy, *Federation Proc.* 10, 229 (1951) .
- [12] The uncoupling of respiration and phosphorylation by thyroid hormones. With F. L. Hoch, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 40, 909

(1954) .

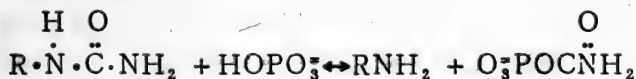
- 13] Magnesium antagonism of the uncoupling of oxidative phosphorylation by iodothyronines. With S.H.Mudd, and J. H. Park, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 41, 571 (1955) .
- [14] The effect of thyroidectomy on the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labeled DL-alanine in rat liver slices. With C. H. DuToit, *Abstract, Am. Chem. Soc. Div. Biol. Chem.* 1951, p.30C.

## 七、氨甲酰磷酸酯

相当一段时间里，氨甲酰基的传递就模模糊糊地对我有一种吸引力，这种传递形成一种脲酰衍生物，可能是从一个置换的氨基甲酸酯（1）那里来的，和乙酰基传递相似（2）：



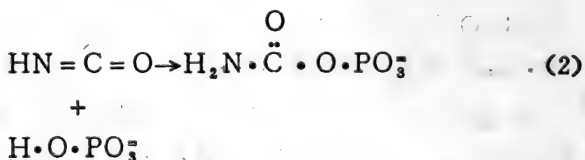
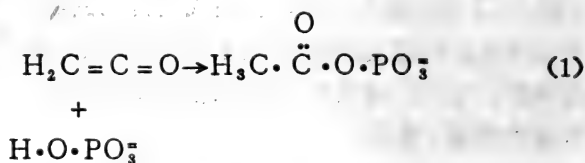
那时还买不到瓜氨酸，我费了大劲合成了这种化合物，殊不知它已经老早就在我的抽屉里等着。同时 P. P. 科恩 (P. P. Cohen) 和 S. 格里索利里 (S. Grisolia) 的工作早已表明 ATP 是能量的供体。促使我们自己试验的最后一个推动力是上面已经提到的在细菌提取物中瓜氨酸的磷酸解作用的报告。这些，使我相信肯定氨甲酰磷酸 (CAP) 就是那有活性的氨甲酸酯：



所以我们决定对瓜氨酸采用细菌合成法而不用看起来更为复杂的肝脏反应方法。玛丽·爱伦·琼斯 (Mary Ellen Jones) 刚刚完成了 ATP-CoA-乙酸反应的工作，于是我建议她试试制备粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 提取

物，它含有活跃的瓜氨酸磷酸解反应。我们希望找到一个不稳定磷酸化衍生物作为一个中间产物，尽量近似地证明CAP就是这个反应的产物。

实验证明磷酸化衍生物在酸中不稳定，它的积聚比乙酰磷酸少得多。我们放弃了CAP是中间物的想法，因为它太不稳定。在瓜氨酸磷酸解反应中，要制备大量这种不稳定的中间物是不容易的。我们感到有相当足够的证据证明CAP的存在，于是就和里昂纳德·斯佩克特讨论它的化学合成问题。他和保尔·察梅尼克 (Paul Zamecnik) 的亨廷顿 (Huntington) 实验室有联系。这个实验室就在麻省总医院的研究楼中，在我们实验室的下一层。这两个实验室交流活跃，互相是有好处的。里昂纳德·斯佩克特设计了一个非常容易合成CAP的方法，解决了我们的问题。认识到CAP和乙酰磷酸的相似点，他就寻找一种与本特利 (Bentley) (1)从乙烯酮 (CH<sub>2</sub>:CO) 和磷酸合成乙酰磷酸类似的合成方法。经过试验，他成功地用氰酸盐或更好是异氰酸和无机磷酸盐合成了CAP, (2) :



一旦CAP可以用合成方法获得，它在细菌以及哺乳动物系统内作为活性氨基甲酸酯就容易被证实了。由于错误的观点，

我们在乙酰磷酸问题上受到了那么长时间的挫折，发现氨基甲酸酯的磷酸衍生物确实是氨甲酰基的供体，这对我们是个安慰。

### 氨甲酰磷酸酯是酶促合成瓜氨酸中的氨甲酰供体<sup>(1)</sup>

引自美国化学会杂志第77卷819页 (1955)

先生们：近来尼维特 (Knivett) <sup>(2)</sup>、斯莱德 (Slade) <sup>(3,4)</sup>、科泽诺夫斯基 (Korzenovsky) 和韦克曼 (Werkman) <sup>(5,6)</sup>、施图贝格 (Stulberg) 和博耶 (Boyer) <sup>(7)</sup> 关于微生物提取物中瓜氨酸磷酸解反应的研究的工作，都大大促进了对此种反应机理的了解。看来现在有相当大的可能在此系统中证实有一个磷酸化中间物存在，此系统似乎与微生物提取物中丙酮酸的所谓磷酸裂解反应具有某些相同之处。为了鉴定一个磷酸化中间物，利用粪链球菌R的提取物，观察不到ATP<sup>(8)</sup>和鸟氨酸之间的反应。然而，如表1所示，将碳酸铵-氨基甲酸酯和ATP或用磷酸丙酮酸 + ADP则更好的平衡混合物孵温，就可以形成一个比较稳定的磷酸化中间物。这一化合物在菲斯克和塞巴罗磷酸盐试剂中只能慢慢分解，但是在0.01当量HCl中，在100℃加热1分钟便完全水解。此化合物可用此法测定之。

在瓜氨酸中，这一氨甲酰基的前驱物已经用合成法鉴定为氨甲酰磷酸。只要按下述方法将二氢磷酸盐和氰酸盐混合，氨甲酰磷酸酯极容易制备出：0.1摩尔磷酸二氢钾和0.1摩尔氰酸钾溶解在100毫升水中，将溶液加热至30℃，30分钟后在冰中冷却。将0.3摩尔氢氧化锂和0.2摩尔过氯酸配在83毫升水内，冰冷后慢慢加入上述冷却溶液中，最终pH 8.3，形成的沉淀物为过氯酸钾和磷酸锂。过滤除去之。滤

液含氨甲酰磷酸锂。慢慢加入大约相等容积的乙醇，则可把它沉淀出来。若重复用乙醇沉淀，即可得到纯度为90—95%的可用于酶试验的氨甲酰磷酸二锂。

表 1 从ATP生成氨甲酰磷酸酯

生成氨甲酰磷酸酯的完全孵温混合液含有：200微摩尔/升三（羟甲基）-氨甲烷缓冲液，pH8.5；5微摩尔/升MgCl<sub>2</sub>；25微摩尔/升KF；0.6微摩尔/升ADP，pH7.0；100微摩尔/升碳酸铵；5.1微摩尔/升磷酸烯醇式丙酮酸；10微摩尔/升L-鸟氨酸；0.01毫克结晶丙酮酸激酶；及0.5毫克/毫升粪链球菌提取物。终容积1毫升。各试管在30℃孵温30分钟。氨甲酰磷酸酯是依0.01当量HCl 100℃水解1分钟释出的磷计算的。瓜氨酸是按阿奇博尔德(Archibald)〔9〕法测定的。

	P <sub>i</sub> (微摩尔/毫升)	P <sub>u</sub> (微摩尔/毫升)	瓜氨酸 (微摩尔/毫升)
1. 不加酶	0.20	0.41*	0
2. 不加磷酸烯醇式丙酮酸	0.15	0.05	0
3. 不加Mg或鸟氨酸	0.32	0.46*	0
4. 不加鸟氨酸	0.45	1.30	0
5. 完全系统	5.50	0.10	5.1

a, 这一格表明我们的水解步骤能水解一小部分磷酸烯醇式丙酮酸。

合成的化合物在对酸水解以及在菲斯克-塞巴罗钼酸盐混合物相对稳定这两点是与酶催化形成的化合物相同的。用微生物酶将氨甲酰磷酸和鸟氨酸合成瓜氨酸的结果列于表2。可注意到在没有酶或有酶但不加鸟氨酸的条件下，有一小部分化合物自然分解了。根据过去研究人员观察，在有

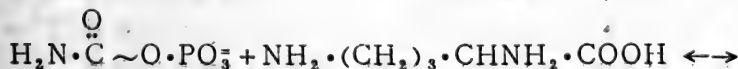
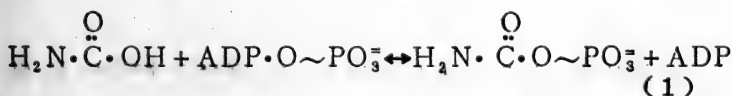


表 2 从氮甲酰磷酸酯合成瓜氨酸

氮甲酰磷酸系统的全部孵温混合物含有：200 微摩尔/升三（羟甲基）-氨基甲烷缓冲液，pH8.5；10 微摩尔/升鸟氨酸，pH8.0；5 微摩尔/升 MgCl<sub>2</sub>；0.2 微摩尔/升 CAP（含 0.8 微摩尔/升 正磷酸盐）；和含 0.1 毫克蛋白质的粪链球菌提取物，终容量 1 毫升。试管在 30℃ 孵温 30 分钟。

	P <sub>i</sub> (微摩尔/毫升)	CAP (微摩尔/毫升)	瓜氨酸 (微摩尔/毫升)
完全系统，零时	0.8	6.2	0
完全系统，经孵温	6.9	0	6.3
不加 Mg <sup>++</sup>	6.8	0	6.3
不加鸟氨酸	2.4	4.7	0
不加酶	2.3	4.5	0

ADP 存在时，瓜氨酸磷酸裂解并形成 ATP，其中间物应该是容易和 ADP 反应的。表 3 的实验证明了这一点，并显示为快速反应。因此我们认为瓜氨酸的合成步骤是：



反应 (1) 需要镁离子，但反应 (2) 不需要（参阅表 3 和表 2）。

表3 从氨基甲酰磷酸酯生成 ATP

全部孵温混合物含：200微摩尔/升三（羟甲基）-氨基甲烷缓冲液，pH 8.5；10微摩尔/升MgCl<sub>2</sub>；7.2微摩尔ADP pH7.0；8.58微摩尔/升的CAP（含1.3微摩尔/升无机磷酸和1.5微摩尔/升氨<sup>a</sup>），含0.5毫克蛋白质的粪链球菌提取物。终容量1毫升。试管在30℃孵温20分钟。差数代表零时去蛋白的完全系统与反应管之差。

	ATP		CAP	
	P <sub>i</sub>	P <sub>10</sub>	P <sub>u</sub>	NH <sub>3</sub> <sup>a</sup>
	(微摩尔/毫升)	(微摩尔/毫升)	(微摩尔/毫升)	(微摩尔/毫升)
完全系统	+0.30	+7.4	-7.35	+7.5
不加酶	+1.20	0	-1.64	0
不加ADP	+1.30	0	-1.32	.....
不加Mg <sup>2+</sup>	+0.86	+3.4	-4.54	+3.2

a: 氨的测定用康韦 (conway) 蒸馏法<sup>[10]</sup>，以饱和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>从溶液中释出NH<sub>3</sub>，数据反映已固定的氨基甲酸酯对碱的稳定性（参考文献(11)）。

线粒体实验说明在动物系统中CAP同样可把氨基甲酰供给鸟氨酸。氨基甲酰-鸟氨酸激酶显得更加稳定，并且远比以ATP开始的总反应更有活力。表4的实验中表示发生了一个从CAP的快传递反应，而同一提取物（表中没有列入），ATP却没有作用。用完整的线粒体时，ATP在60分钟内的活性只有CAP在10分钟内的活力的1/5。用相似的制备，格里索利亚和科恩<sup>[12]</sup>报道了瓜氨酸中氨基甲酰基有一个不稳定的前驱物。

表 4

加大白鼠肝脏线粒体的超声波提取物0.1毫升(0.9毫克蛋白),反应总量1毫升, pH7.5, 在37℃孵温30分钟, 其他条件同表2。

	$P_i$ (微摩尔/毫升)	CAP (微摩尔/毫升)	瓜氨酸 (微摩尔/毫升)
完全系统, 零分钟	1.0	4.2	0
完全系统, 经孵温	5.2	0	4.1
不加CAP, 经孵温	0.1	0	0

在微生物提取物中, 如果用门冬氨酸代替鸟氨酸作为氨甲酰接受体, 可观察到与氨甲酰磷酸的较慢的反应, 表明氨甲酰门冬氨酸的合成有类似的机理。由门冬氨酸, ATP及碳酸氨或一个不稳定的氨甲酰前驱物合成的这一化合物, 最近已在哺乳动物肝脏提取物中由洛温斯坦(Lowenstein)和科恩<sup>[13]</sup>及P. 赖夏德(P. Reichard)<sup>[14]</sup>作了描述。

## 参考文献及附注

- [1] 这一研究由国家卫生研究院的肿瘤研究所、公共卫生部及人寿保险医学研究基金会资助。
- [2] V.A.Knivett, *Biochem.J.*, 50, xxx(1952); 58, 480 (1954).
- [3] H.D.Slade and W.C.Slamp, *J.Bact.*, 64, 455 (1952).
- [4] H.D.Slade, *Arch.Biochem.Biophys.*, 42, 204 (1953).
- [5] M.Korzenovsky and C.H.Werkman, *ibid*, 41, 233 (1952).
- [6] M. Korzenovsky and C. H. Werkman, *Biochem. J.*, 57, 343 (1954).
- [7] M.P.Stulberg and P.D.Boyer, *This Journal*, 76, 5569 (1954).
- [8] 下列缩写为, ATP, 三磷酸腺苷; ADP, 二磷酸腺苷; CAP, 氨甲酰磷酸;  $P_i$ , 正磷酸盐;  $P_u$ , 不稳定磷酸盐;  $P_{10}$ , 10分钟内, 当量HCl 100℃水解的磷酸盐。
- [9] R.M.Archibald, *J. Biol.Chem.*, 156, 121 (1954).

- [10] R.B. Johnston, M.J. Mycek and J.S. Fruton, *J. Biol. Chem.*, 185, 629 (1950).
- [11] A. Jensen and C. Faurholt, *Acta Chem. Scand.*, 6, 385 (1952).
- [12] S. Grisolia and P.P. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 204, 763 (1953).
- [13] J. M. Lowenstein and P. P. Cohen, *This Journal*, 76, 5571 (1954).
- [14] P. Reichard, *Acta Chem. Scand.*, 8, 795 (1954)
- [15] 美国肿瘤学会研究员。

琼斯<sup>[15]</sup>, 斯佩克特, 李普曼

马萨诸塞州波士顿市马萨诸塞总医院生物化学研究实验室和亨廷顿纪念实验室, 哈佛医学院生物化学系 1954年12月30日收到

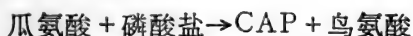
氨甲酰磷酸酯被认为是有生物活性的氨甲酰基供体。我们这一简短的总结表明它在氨甲酰基传递反应中起最重要的生物学上的作用: 瓜氨酸的合成, 导致精氨酸和氨甲酰门冬氨酸的合成, 即产生尿苷酸UMP和胞苷酸CMP的第一步。与它作为氨甲酰供体的一致性的直接的效应相反, CAP的生物合成已被证明为复杂的反应。为了说明, 这里引用琼斯和李普曼 (*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 6, 1194, 1960) 的一段评论:

“在哺乳动物组织和细菌内CAP合成的比较: 尿素合成是动物代谢中一个重要方面, 对它的兴趣引起了对动物组织里瓜氨酸合成的研究, 特别是对动物肝脏的研究比对刚才论及的细菌系统的研究更加深入细致。尿素是在肝中合成的, 格里索利亚和科恩<sup>1</sup>的工作提供了最早从ATP获得能量的证据。稍后, 在科恩的实验室, 发现这一反应取决于N-酰化的谷氨酸的存在, 如乙酰或氨甲酰谷氨酸<sup>2</sup>。在我们早先的报告中<sup>3,4</sup>已经指出乙酰谷氨酸不是我们的细菌系统中的组成成分。从ATP和氨基甲酸酯合成CAP的纯化的酶制剂不需要这个辅因子。然而, 很快就发现了在动物组织中

CAP也是瓜氨酸氨甲酰基的前驱物，并且从CAP将氨甲酰基传递至鸟氨酸时，不需要乙酰谷氨酸〔6〕。外加的催化剂和乙酰谷氨酸只是在动物系统中CAP合成时才起作用，因此这是一个更为复杂的反应。近来的工作表明〔6〕，这种反应要有两个ATP参加，不像在微生物系统中至少在粪链球菌中那样，由氨基甲酸酯和一个ATP就可直接合成CAP。

总之，现在一致公认在动物组织以及微生物系统内，在鸟氨酸和门冬氨酸的氨甲酰化反应中，CAP是其中间产物。早先讨论的很多曾经被称为化合物X的“活性氨基甲酸酯”，现在被证实就是CAP〔7〕。动物系统中的乙酰谷氨酸效应与微生物系统中的不同，主要限于合成CAP，而不是从CAP传递氨甲酰基。

CAP的生物合成：氰酸盐和磷酸盐自发缩合成CAP，看来是最容易合成高能磷酸载体的例子。在最近讨论生命起源时〔8〕，曾经想到需要自发形成一种带能量的磷酸化合物，假定在有机物存在前期，氰酸盐已经存在，那么也应该有磷酸盐以便形成CAP，虽然估计它只有相当低的浓度，有些微生物以它作能量来源的设想更加引人入胜，粪链球菌中瓜氨酸的磷酸解作用可以经过适应性过程而发展为能量来源的主要途径〔4、9-11〕：



看来在这种产生了适应性的生物中，瓜氨酸发酵可以维持生命和生长。它们靠CAP作为能量的唯一来源而生存着。

虽然这个设想看来有吸引力，但是仍然需要考虑。从代谢的角度来说，CAP只是核苷酸多磷酸系统的一种磷酰基供体，而不一定真正是一个好的主要能量来源，看来主要的供体更可能是在许多种不同有机体内发现的无机多磷酸盐。”

## 参 考 文 献

- [1] S.Grisolia and P.P.Cohen, *J.Biol.Chem.*191, 189 (1951) .
- [2] *Ibid.**J.Biol.Chem.*204, 753 (1953) .
- [3] M. E. Jones, L. Spector, and F. Lipmann, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 819 (1955).
- [4] M.Korzenovsky, in *A Symposium on Amino Acid Metabolism*, W. D. McElroy and B. Glass, Eds. (Baltimore, Johns Hopkins, 1955) P. 309.
- [5] M. E. Jones, L. Spector, and F. Lipmann, in *Proc. 3rd International Congress of Biochemistry*, Brussels, 1955, C. Liebecq, Ed. (New York, Academic, 1956) , p. 270.
- [6] R. L. Metzberg, M. Hall, M. Marshall, and P. P. Cohen, *J. Biol. Chem.* 229, 1019 (1957) .
- [7] R. O. Marshall, L. M. Hall, and P. P. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* 17. 279 (1955).
- [8] J. D. Bernal, in *Proc. 1st International Symposium on The Origin of Life on the Earth*. A. I. Oparin et al., Eds (London: Pergamon, 1959) , p. 38.
- [9] V. A. Knivett, *Biochem. J.*56; 602 (1954) .
- [10] E. L. Oginsky, in *A Symposium on Amino Acid Metabolism*, W. D. McElroy and B. Glass, Eds. (Baltimore, Johns Hopkins, 1955) , p. 300.
- [11] H. D. Slade, in *A Symposium on Amino Acid Metabolism*, W. D. McElroy and B. Glass, Eds. (Baltimore, Johns Hopkins, 1955) , p. 321.

## 八、硫酸盐的活化

德迈欧 (DeMeio) 的工作已清楚的证明了硫酸盐和 ATP 间的相互作用, 这又提出了一些专门问题。它所以吸引我, 还因为我想从这里学习一些普遍的离子转运的知识。直到现在我还不知道情况是否确实如此。从帕迪 (Pardee) 对硫酸盐转运的大量工作和他对一个硫酸盐载体蛋白的分离来看, 硫酸盐转运更像有机分子通过生物膜时的转运机制。

我们开始研究时, 感到奇怪的是在化学文献中找不到硫酸盐和磷酸盐的混合酸酐存在的任何迹象, 本来以为 ATP-硫酸盐反应会生成这种产物的。焦硫酸这种两分子硫酸间的酸酐在无机化学教科书中是提到过的。游离酸  $H_2S_2O_7$ , 很容易分解为  $SO_3 + H_2SO_4$ , 是一个强磺化剂。它的盐遇到水便立即水解。于是, 寻找这个活化硫酸盐很可能使我们得到一类新化合物。果然, 实验证明硫酸盐活化是以硫酸根置换 ATP 中的焦磷酸基而发生的, 产生比较稳定的腺苷-5'-磷酸硫酸 (APS)。羧基活化和硫酸根活化明显相似, 羧基必须磷酸化才能被还原, 所以硫酸盐需要脱水后才能被还原。我们的工作几乎完全集中在硫酸基的活化上, 因此也集中在硫酸根向酯键的传递上面。

第一个认真尝试分离硫酸-腺苷酸衍生物的是赫尔穆特·希尔兹 (Helmut Hilz)。他用层析法证实了这种结合产物的存在, 并且对最终解决这个问题作出了重大的贡献, 证实了在 ATP 和硫酸盐的酶促反应中有焦磷酸释出。希尔兹离开后, 菲尔·罗宾斯 (Phil Robbins) 接手研究这个问

题，经过两年，成功地阐明了它的机理。他用大白鼠肝脏制备了酶提取物，其中的ATP和硫酸相互作用得到一种产物，这就是腺苷酸-5'-磷酰硫酸，它含有在核糖3'位置上酯化的另一个磷酸。这个3'-磷酸腺苷酸-5'-磷酰硫酸简称PAPS，就是代谢上活性硫酸的载体。

为了试验我们新发现的活性硫酸的硫酸传递活性，我们有一段时间陷入了多糖化学的迷宫之中。大多数在生物学上具有重要意义的硫酸衍生物都属于这一类。作为首次尝试，我们设法证明一个硫酸基可从PAPS传递至硫酸软骨素，这是在软骨中可以找到的一种多糖。弗里奥、达勃拉莫 (Furio D'Abbramo) 和我成功地在鸡胚胎软骨提取物中的硫酸软骨素进行了部分生物合成。

除了ATP硫酸化酶外，罗宾斯还观察到一种ADP硫酸化酶，或称为APS磷酸化酶。它能在APS和无机磷酸之间催化反应以形成ADP： $AP\sim P + S \rightarrow AP\sim S + P$ 。当哈利·佩克 (Harry Peck) 在硫化菌的提取物中发现这一反应是氧化磷酸化反应中的一个步骤时，这个反应就变得很重要了。在这些细菌中有腺苷酸存在时，亚硫酸氧化可产生APS，APS又通过这一磷酸化酶将硫酸盐交换为磷酸盐而产生ADP，最后经歧化作用产生ATP。由于已经证明，这些细菌可以只靠连四硫酸盐 $M_2S_4O_6$ 为能量来源而生长，那么以多少已还原了的硫酸衍生物氧化产生高能磷酸盐的事实是饶有趣味的，因为这是一个无机底物的氧化与高能磷酸键的生成相偶联的机理。

我们实验室唯一研究硫酸盐还原的是弗兰科斯·查普维尔博士，他的研究是在数年前开始的。那时他对鸟的卵黄囊和爬虫类胚胎（可能在脊椎动物是独特的）中发现的硫酸盐还原这个独一无二的例子很感兴趣。但这些实验在最近才公



公开发表，因为他后来又转向另一重要工作，从事tRNA在板上安置氨基酸的作用研究。

后来发现卵黄中硫酸盐还原的过程和班杜尔斯基 (Bandurski) 对酵母在硫酸盐中还原的过程所描述的相同，PAPS是还原成亚硫酸盐所需的底物。有趣的是卵黄囊内PAPS合成所需的酶类在卵黄囊与胚胎中断联系后就消失了。显然，在基因组内存在着一种“化石”顺反子 (Cistron)，它在成年机体内从不显现。这在器官的发生和形式上肯定是普遍的现象，但是一个对此相当无知的生物化学家看到在胚胎附属器官中短暂地存在着酶，孵化后又归于消失，是很吃惊的。

我们所从事的硫酸盐活化以及它从“活化”硫酸盐传递到各种接受体的工作已在《科学》中有过综合的评论，在此摘引如下：

### 硫酸盐的生物学活化和传递<sup>①</sup>

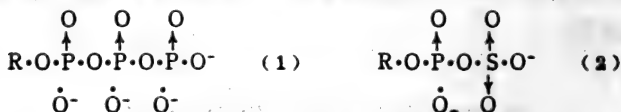
硫酸盐多数以酯键连结，相当普遍地存在于活的有机体内的多种多样的化合物之中。这些化合物中最重要的是硫酸化的粘多糖，如硫酸软骨素，即软骨的基质及在粘液组织中类似的粘多糖等。肝素也属于这类。它突出之点是含有大量的硫酸盐，部分地结合在其中一种组分氨基葡萄糖的氨基上。此外，在脑和其他组织中有一种硫酸化的脑苷脂类。另一方面，和硫酸盐结合是动物体内酚解毒的一种方法。酚类与硫酸盐的这种结合，主要是在肝及肠内。这种结合，多年

<sup>①</sup> 引自 *Science* 128 (3324), 575—580, Sept. 12, 1958. Copyright 1958 by the American Association for the Advancement of Science.

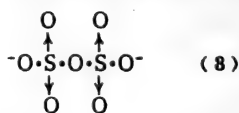
来用于研究硫酸盐的传递机制。

既然代谢中形成这么多的硫酸化物质，看来活化硫酸盐很可能有一个共同的代谢载体，在细胞的酶促系统中可作为一个通用的硫酸盐供体。这一点，当德梅欧<sup>1</sup>这位硫酸盐活化领域的开创者论述了在无细胞系统内ATP<sup>2</sup>可以成为硫酸盐活化能量的来源时就更加得到证实了。伯恩斯坦 (Bernstein) 和麦克吉夫雷 (McGilvery) 对硫酸盐活化发生的机制型式进一步作了阐明。所有这些用肝系统进行的工作都有力地表明与酚的结合是一个两阶段过程，第一步是硫酸盐的活化，分开进行的第二步才传递至酚。

所以在活化过程中，ATP的磷酸酐的能量显然传递到了硫酸盐，看来很可能是在硫酸盐和磷酸盐之间形成了一种混合酐。下列结构代表这一活化过程



然而，在文献中找不到这种混合酐的化学资料。焦硫酸盐是人们熟悉的化合物，但是对水很敏感，并且显然和有机酸酐一样是不稳定的。由于所有这些原因，硫酸盐活化在基团活



化上提出一个比较特殊的问题，它对我和我的同事有很大的吸引力。于是，大约三年前，我决定由我们亲手来澄清这个奥妙反应中的化学问题。

用图1中的图解作为叙述的开始会有帮助，它表明我们能证实的活化-传递过程的要点，我要特别强调的是活化过程和传递反应是严格分开的，我们现在知道（后面还要详细



所形成的化合物含有腺苷酸。这一初步鉴定是用放射性硫酸盐完成的。根据其他活化反应，尤其根据最近研究的乙酸活化反应进行类推，我们暂且认为硫酸盐活化是ATP和硫酸盐之间的反应，这个反应通过ATP的末端焦磷酸基的置换，导致硫酸盐和已置换的磷酸盐间产生我们猜想的酸酐。然而，有些数据不符合这种解释，在那一阶段我们谨慎地报道了我们观察到有一种腺苷硫酸衍生物生成的证据，但还不能确定它的结构。

在研究一个未知的“活性”化合物时，尤其是过去不知道有过这种化合物的化学同类物时，往往以为这种化合物是非常不稳定的。在这些预实验中，“活性”硫酸盐确实对强酸相当不稳定，进一步就需要纯化这些酶，并用中等制备量浓缩硫酸盐活化系统<sup>6)</sup>，因此罗宾斯成功地从ATP和硫酸盐制备了50微摩尔/升的活化硫酸盐样品，并尝试了道韦克斯(Dowex)层析。幸运的是磷酸硫酸键对酸比预期的稳定。它在中性或更高的pH中完全是稳定的，在低温下，可经受用相当浓的蚁酸来进行层析。活性硫酸盐可被道韦克斯-1(Dowex-1)牢固地结合，并有可能用4当量蚁酸-0.3摩尔/升蚁酸铵从柱子上除去所有其他腺苷衍生物。而后再用5当量蚁酸-1摩尔/升蚁酸铵洗脱剩留的活性硫酸盐，这样就可以得到一个相当均一的活性硫酸盐部分，然而干燥浓缩这一部分时，有一部分硫酸盐裂解，这一部分的分析结果列于表1。

从这些数据来看，出乎意料地，这个化合物中每一个腺嘌呤和戊糖含两个磷酸，一个磷酸是酸稳定的，另一个对当量HCl加热是不稳定的，但还不致于象原来以为的焦磷酸键那样不稳定。酸可以水解它，表示是一种2'-或3'-腺苷酸，尤其是此化合物的过碘化物反应阴性，更说明这一点，因腺苷-5'-磷酸常常得到阳性反应。要进一步鉴定，可用卡

表 1 活性硫酸盐部分的分析数据

腺苷用260毫微米光吸收测定，戊糖用Orcinol法，磷酸盐则用菲斯克和塞巴罗法测定。总磷酸盐用当量HCl水解后测定。用100℃当量HCl水解法测定12和30分钟时的磷酸盐量。3'-核苷酸酶可水解的磷酸盐用卡普伦法测定<sup>[21]</sup>。

成 分	量
腺 苷	1
戊 糖	0.95
磷酸盐, 总量	1.98
磷酸盐, 12分钟	0.53
磷酸盐, 30分钟	1.04
磷酸盐, 3'-核苷酸酶水解	0.85
硫酸盐, 酶法	0.2—0.85

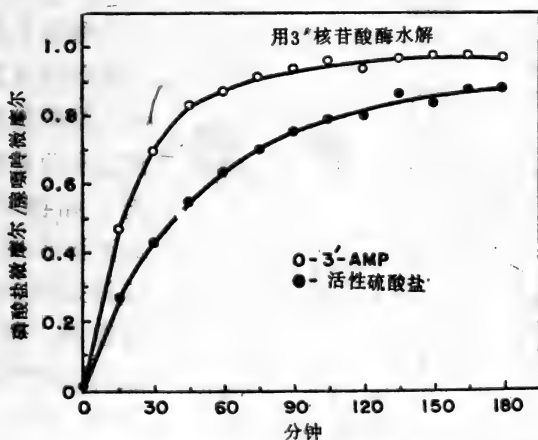


图 2 “活性”硫酸盐和8'-腺苷酸在3'-核苷酸酶作用下的水解曲线

普伦的 3'-核苷酸酶，此酶实际上可以从我们的“活性”硫酸盐中释放出一个全当量的磷酸盐。

在所有这些情况下，活性硫酸盐可以很方便地用酶催化转移到硝基酚的方法进行测定，结合后，硝基酚阴离子的颜色消失。

如前所述，在冰冻干燥时，部分硫酸盐裂解，这就说明为什么表 1 中硫酸盐的数据变化幅度相当大。较少的批量，能被迅速冰冻干燥，可以得到几乎相等的硫酸盐和腺苷。另一方面，没有硫酸盐的沉渣，其磷酸盐的比值与活性硫酸盐等同。图 2 用 3'-核苷酸酶处理的活性硫酸盐水解曲线和 3'-腺苷酸作了比较，活性硫酸盐的水解要比单磷酸盐慢。一般而论，3'-腺苷酸是此酶水解最快的底物，而其它取代物的反应较慢。

3'-核苷酸酶作用前后的“活化”<sup>35</sup>S-硫酸

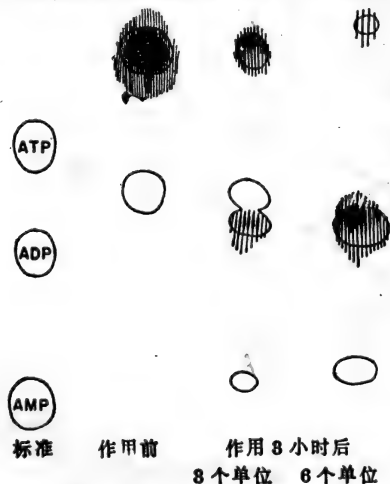


图 3 在 pH 5.9 柠檬酸缓冲液中的纸上电泳放射图谱。圆圈为紫外淬灭区，栅线区及黑色区为放射性斑点（参见文献 [6] 中的图 6）。

分子中硫酸盐的位置主要是由放射性硫酸盐确定的。活性硫酸盐和无硫酸盐沉渣的混合物经 3'-核苷酸酶处理后，硫酸盐和腺苷酸仍在一起。如图 3 的纸电泳图谱所示，紫外线淬灭和放射性痕迹重叠。若与足够量的核苷酸酶一起孵温，PAPS 上部的斑点几乎完全消失，并出现一个新

点，可鉴定为腺苷-5'-磷酸硫酸盐 (APS)。另一方面，在下面出现了一个点，是不含硫酸盐的沉渣，PAP的水解产物腺苷-5'-磷酸盐 (AMP)。腺苷-5'-磷酸硫酸盐可用与按巴德利 (Baddiley) 等<sup>[8]</sup>方法合成的化合物比较而鉴定。活性硫酸盐的结构和一些性质可以从图 4 得到解释，从图中可看出磷酸硫酸键对盐酸相当敏感，在 37°C 中大约半小时，0.1 当量 HCl 就可以使硫酸盐全部断裂。这些化合物有紫外吸收能力，与腺苷酸吸收能力不能区分。这就排除了硫酸盐和腺嘌呤的氨基联结的可能性，因为在所有情况下这一氨基的阻断可引起紫外吸收位移到可见光区。

再进一步鉴定时，我们认为磷酸硫酸键的水解应释放一个次级磷酸盐，用电极在水解前向 pH 5 和 8 之间进行滴定，证实确是如此。所有这些证据使我们肯定所研究的化合物成分如图中所示。这一成分现在已由巴德利等<sup>[9]</sup>经化学合成

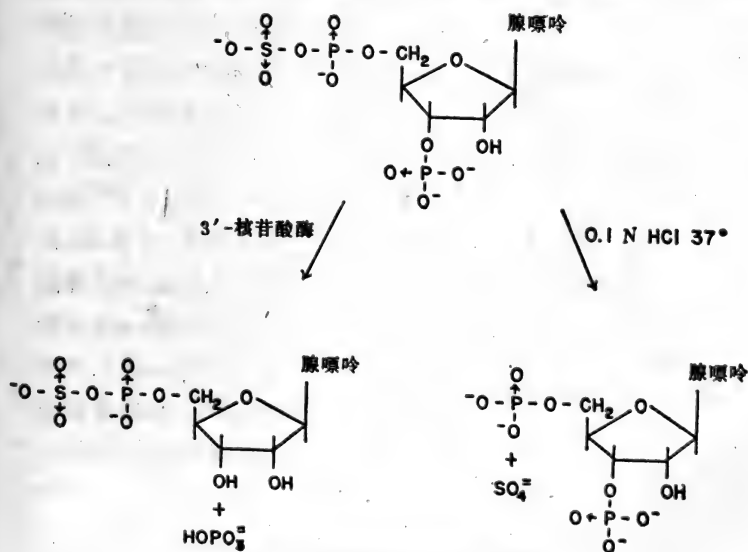


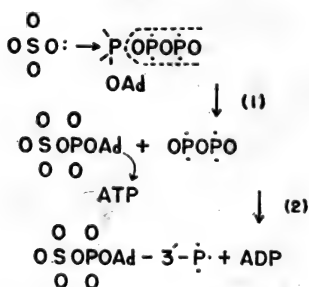
图 4 活性硫酸盐及其水解产物

所证实。

### 活性硫酸盐生物合成中的两步磷反应

在活性硫酸盐中，意外地出现了两个独立而又联系着的磷酸盐，现在已经证明，这立即就表明了很可能有一个两相合成反应。起初，我们猜想<sup>(7)</sup>ATP中焦磷酸置换而形成的腺苷-5'-磷酸硫酸可能是活性硫酸盐。现在来看，这仅是图5中反应顺序的第一步，然后再经第二步磷酸激酶类型的反应加以完成，即把第二个ATP末端的磷酸转移到APS的3'-位置上。起始反应是硫酸化酶(Sulfurylase)催化的。它催化硫酸基中的一个氧原子去撞击腺苷-5'-三磷酸的近端磷原子，以硫酸基将焦磷酸置换出来。这样初步形成的APS作为酶反应中的硫酸基供体是完全无活性的。

#### 硫酸盐的活化



总反应：



图5 反应(1)：硫酸化酶催化反应，即以硫酸基将ATP的焦磷酸基置换出来，产生APS。反应(2)：APS磷酸激酶催化反应，即以ATP的末端磷酸将APS磷酸化。

认识到所写出的反应，从能量的角度看确实更有利于逆反应是最重要的。换言之，APS的硫酸化电位要比ATP中的焦磷酸化电位高得多。我们认为这种能量状况是进一步磷酸化的原因。第二个高能磷酸盐的能量就是这样被用来推动反应向前，经过3'-磷酸化将反应产物“遮蔽”

起来。即使这样，总的能量平衡仍不太有利，能量相当高的



磷酸硫酸键通过相当普遍存在的焦磷酸酯酶将起始反应的产物焦磷酸除去后而得到进一步的稳定。

在验证这一机制中，班杜尔斯基等<sup>[10]</sup>的独立工作是相当重要的。这些研究人员发现酵母中的硫酸盐活化系统可以分为两个没有活性的部分，只是在重组后才有活性。当我们注意到班杜尔斯基等的工作时，我们为了阐明其机制改用了酵母系统，它比我们过去一直在用的肝系统好些。我们证实了班杜尔斯基的工作，把酵母系统分为两部分，并证明其为 (i) 硫酸化酶和 (ii) APS 激酶。

表 2 酵母酶 的 分 离

采用国家贝克斯 (Bakers) 酵母，提取物主要按琼斯等<sup>[12]</sup>方法制备。从 APS 形成 ATP，用焦磷酸盐的消失测定，或用己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化的 ATP 形成来测定。PAPS 的形成是以传递至硝基酚或 PAP 检定来追踪的。PAP 的检定取决于硫酸基从硝基酚至酚的转移中 PAP 的催化活力。硝基酚形成的速度是以贝克曼 (Beckman) DU 分光光度计在 400 毫微米测量的。APS 和  $P_i$  之间的反应是用层析法检验 ADP 的形成及  $P_i$  的消失来测量的。

部 分	ATP-硫酸化酶	APS-激酶
	(APS + PP → ATP) -PP, (微摩尔/毫克小时)	(APS + ATP → PAPS) PAPS (微摩尔/毫克小时)
透析提取物 I	2.1	
NaCl 沉淀物 I	10.1	0.55
17—23% EtOH II	22.1	3.5
pH 5.4 沉淀物 III	85.0	0.6
上清液 + 10% EtOH IV	0.5	4.1
40—50% $(NH_4)_2SO_4$ V	0	12.5

如表 2 所示硫酸化酶可用合成的 APS 以其逆反应测定。从酵母制备的硫酸化酶，如图 6 所示可经吉恩 426

### ATP硫酸化酶的电泳

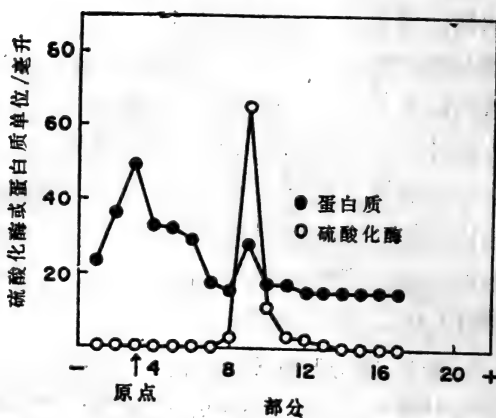


图6 吉恩426 (Geon 426) (古德里奇, Goodrich) 柱电泳 (参见图8)。

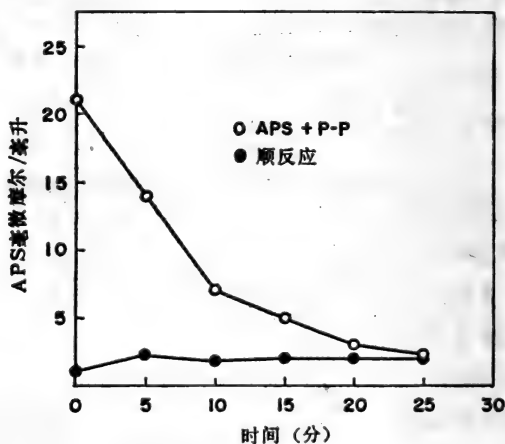


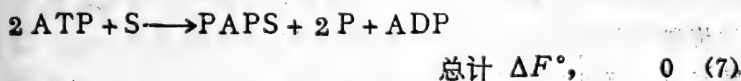
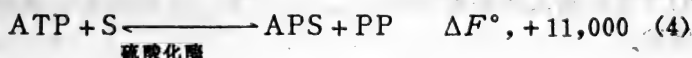
图7 平衡实验, ATP-硫酸化酶。

(Geon 426) 电泳, 使之相当高度地纯化。用这样纯化的酶作平衡实验, 如图7所示, 在顺反应中可以形成量虽小却

肯定有的APS。在pH 8时,反应的平衡常数约为 $10^{-8}$ ,所以



$\Delta F^\circ$  等于11,000卡,但是APS对APS激酶有高度亲和力,在最低可测量的浓度 $5 \times 10^{-6}$ 摩尔/升时产生最高反应速度。酶催化形成的量,在“生理”条件下,可能是相同的数量级,因此形成的小量产物可以立刻被APS-磷酸激酶磷酸化,并从平衡中除去,这就驱使反应向PAPS的合成方向前进。在焦磷酸酯酶的帮助下,又将硫酸化酶反应的另一产物焦磷酸除去。为了固定更高的基团电位(如磷酸硫酸键)而利用两个或更多高能磷酸盐,具有很有趣的普遍意义。附加的能量可将起初形成的、从热力学上看很不稳定的化合物拖过能峰:



能量数据只是粗略估计,给一个总 $\Delta F^\circ$ 的印象。在pH 8时 $\text{H}^+$ 的形成,如同文献<sup>[11]</sup>中对己糖激酶的计算那样,总 $\Delta F^\circ$ 是大致平衡的。

### 活性硫酸基向不同接受体的传递

硫酸活化问题的解决,为研究硫酸盐的代谢利用开辟了一条更好的途径,从某种意义上说逼迫我们进入了代谢的新领域。我们实验室的工作人员对这个领域是比较陌生的。我们

研究了一些甾体代谢,但是更认真的是研究多糖合成,以及尔后的一些脂质化学。在这些实验中,一般不用分离的PAPS,而是用酵母〔5〕或肝〔6〕的富集酶促发生系统而引入PAPS。为了验证,当时用分离的PAPS检查了各种接受体的反应。

除了酚和甾体的结合外,我们现在仍然处在进一步探索时期,几乎完全只用 $S^{35}$ 作为向导。我们为了合成硫酸软骨素,从胚胎软骨制备了无细胞制剂,为了合成硫酸脑苷脂,从大白鼠肝和脑制备了无细胞制剂,但是很多必需的细节仍然不清楚。

为了牢牢掌握研究方向,我想再提到图1。从图中可以看到解决了涉及活性硫酸盐产生的图左方和中间部分后,我们现在要进入的是图右所示几乎未接触过的硫酸盐利用的新领域。

### 甾体和酚类的结合

这一反应已由德梅欧〔12〕以及英国的罗伊(Roy)〔13〕研究过。我们曾用罗伊的方法来测量硫酸化甾体。京都大学的能势善嗣在我的实验室里,将纯化的肝制剂主要用电泳方法将酚类和多环接受体分子结合所需的各种酶进行分离。从图8〔14〕可见,用此法可得到三个酶部分:一个是与二氢雄甾酮及其他 $3'$ - $\beta$ 羟基甾体结合的酶,另一个是与雌甾酮结合的酶,它与普通的酚-硫酸激酶(Phenol-Sulfokinase)不同;最后一个酶经约翰·D. 格雷戈里〔15〕更详细地研究了,似乎使许多种不同的取代酚都能接受硫酸基。二氢雄甾酮硫酸激酶也能与含有 $3'$ - $\beta$ -羟基的异雄甾酮及黄体酮反应,因此它似乎是 $3'$ - $\beta$ -羟基甾体硫酸激酶。

应该提到的是在硝基苯酰硫酸中,经格雷戈里〔15〕证明,其硫酸基的基团电位不到2000卡,比PAPS低,已用酚

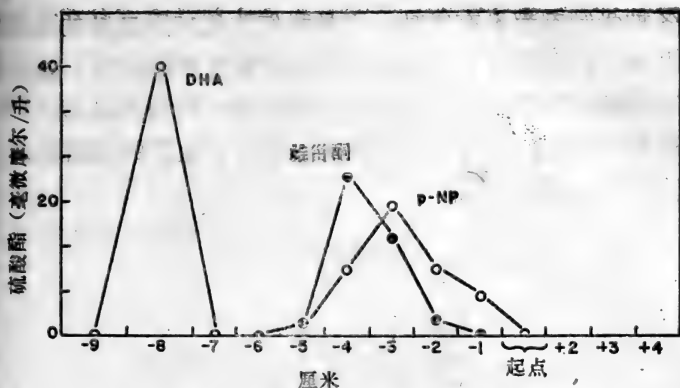


图8 在吉恩426 (古德里奇) 柱床内大白鼠酶的电泳

硫代激酶研究了以PAP为媒介的、从硝基酚将硫酸基传递至酚的过程。埃加米(Egami)和他的同事也证明硝基苯酰硫酸酯可在一个被硫酸酯酶催化的、不依赖于PAP的反应中作为硫酸基供体。这就使人想起在磷酸酯酶<sup>[17]</sup>作用下, 硝基苯酰磷酸酯非专一性地供给磷酸的强大活性。

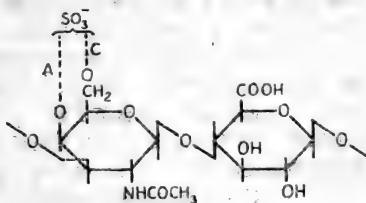


图9 硫酸软骨素的重复单位

### 硫酸软骨素的合成

为了牢牢掌握研究方向, 硫酸软骨素的结构用图9表示。尽管其他的研究人员无论在体内或切片实验中用不同的骨制剂都可以将放射性硫酸并入硫酸软骨素, 但是我们尝试

了各种骨制剂都没有成功。于是我们改用15天日龄的小鸡胚胎软骨，从中得到了有相当活性的非颗粒性提取物。图10表明这种提取物生成活性硫酸盐，伴随有小量的前驱物APS，在这个实验中，先用吡啶洗脱孵温液中活性炭的吸附物，然后放在纸上进行电泳。

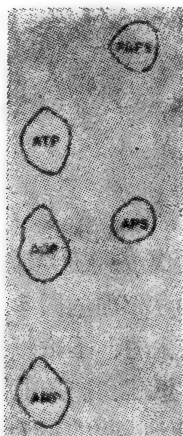


图10 与 $S^{35}O_4^{2-}$ 孵温的软骨提取物在纸电泳图上的放射性自显影。两个胚胎的软骨在3ml盐水磷酸盐溶液中匀浆化，而后加入12微摩尔 $Mg^{++}$ ，10微摩尔Na-ATP、1.5微摩尔UTP，2微摩尔谷氨酰胺，2.7毫升酶和2毫升 $S^{35}O_4^{2-}$ （100微居无载体）。总容量为5.3毫升。混合物在37℃，孵温2小时。标识物在同一电泳条上展开，借紫外猝灭在1号及2号电泳图上鉴别，并以圆周线表出。8号图是孵温液中活性炭吸附物吡啶洗脱液在柠檬酸缓冲液（pH5.9）中的纸电泳图上的放射自显影。（原文如此——译者）。

硫酸软骨素是以普通的沉淀方法从含醋酸盐的溶液加酒精或十六烷基三甲基铵盐（CTMA）分离出来的。适度的冲洗可以除去放射性硫酸盐及其他化合物。图11表示放射性正好与硫酸软骨素完全重叠。纸电泳用磷酸缓冲液为电泳液，硫酸软骨素用甲苯胺蓝染色。表3和4（摘自文献18）表示对此反应机制的初步研究。从表3可以看出， $PAP^{35}S$ 的硫

酸基被传递到硫酸软骨素上。如以UTP代替ATP,活化程度稍好,可看到尿苷酸参与了合成反应,然而在其他实验中,UTP往往是抑制性的。表4表示用这些提取物从无机硫酸盐合成硫酸软骨素时,ATP和 $Mg^{++}$ 是必需的。如果用分离的PAPS,情况也一样,证实了多糖的重新合成。在这些提取物中硫酸软骨素再合成的进一步证据是放射性乙酸盐的并入。

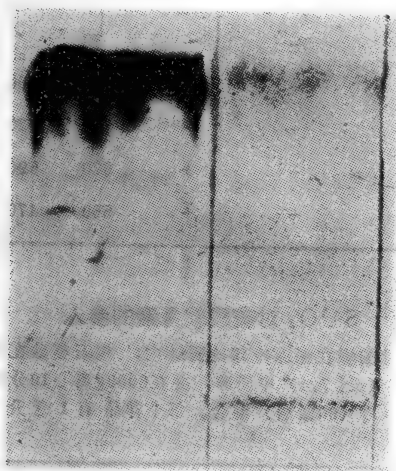


图11 小鸡胚胎软骨提取物与 $^{35}S$ 硫酸盐孵温后得到的硫酸软骨素的纸电泳图。甲苯胺蓝染色和放射自显影的比较。甲苯胺蓝颜色(右)拍照不如放射自显影(左)清楚,但是用这两个方法所得的痕迹相同则是清楚的。

还有许多工作要做。多糖领域是化学的一大分支。我必须承认我们不打算成为研究多糖的化学家,然而,我们还要对这类反应花一些时间作些研究,因为我们在做硫酸基活化的过程中我们不得不研究这个问题。由于同样的理由,我们也闯进了同样复杂的脂肪合成领域。欧文·戈德堡现在正在

表 3<sup>1</sup> 硫酸根从 PAPS<sup>35</sup>S 至硫酸软骨素的传递

如前各实验，三个小鸡胚胎制备的酶制剂，用6.5毫升盐水-磷酸溶液提取并离心。上清液和0.25毫升 PAPS<sup>35</sup>混合，取1毫升立刻加热（零时）。每管总量为1.35毫升，其中有1毫升酶和15,000个脉冲计数。用乙酸钠和8倍容量的酒精得到沉淀，用80%酒精洗涤10次。

孵温 (37℃) (小时)	PAPS <sup>35</sup>	ATP 1 微摩尔	UTP 1 微摩尔	每分钟 计数率	Δ	并入 (%)
0	+	-	-	80		
2	+	-	-	340	260	1.7
2	+	+	-	600	520	3.4
2	+	-	+	670	590	4
2	+	+	+	550	470	3

表 4 S<sup>35</sup>O<sub>4</sub> 对硫酸软骨素的参入

三个鸡胚胫骨和股骨的髌在深冻冷却的研钵内，用石英砂在6毫升盐水和0.01摩尔/升磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中研碎，并在6000g离心10分钟。上清液和1.2毫升不含载体的 S<sup>35</sup>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> (60微居) 混合。每个样品有1毫升酶-S<sup>35</sup>混合物。终容量为1.35毫升。

样品号	孵温 (37℃) (小时)	ATP 5 微摩尔	Mg 6 微摩尔	谷氨酰胺 1 微摩尔	UTP 1 微摩尔	每分钟 计数	参入 (%)
1	0	-	-	-	-	60	
2	2	-	-	-	-	60	
3	2	+	-	-	-	405	
4	2	+	+	-	-	4760	0.6
5	2	+	+	+	-	5390	0.7
6	2	+	+	+	+	2007	0.28



研究试管内硫酸盐对脂肪的参入。他已经得到在肝提取物和脑匀浆中形成一种脑硫脂的初步证据。这种脑硫脂类似布里克斯 (Blix) 的硫酸脑苷脂 (Cerebroside Sulfate)<sup>(10)</sup>, 如图12所示。这个问题之所以吸引我, 主要是因为根据现有

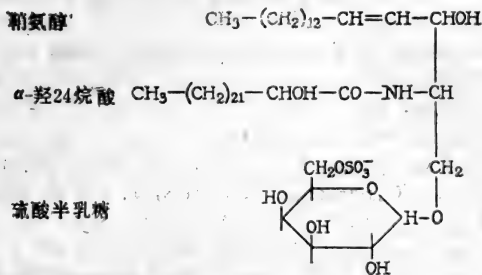


图12 硫酸脑苷脂的结构。(按布里克斯 (19))

经验, 我们可能可以在这里看到有一种半乳糖硫酸衍生物直接传递至N-(脂) 酰基鞘氨醇 (Ceramide)。这将比硫酸软骨素合成的代谢途径更为简单, 而硫酸软骨素合成因为有一个多聚化问题所以十分复杂。但同时又使这个问题更值得注意。

最后, 我想再次强调这一事实, 即我们正在做的是硫酸基传递的工作, 首次详细阐明了一个核心为活化分子的过程。此过程是将活化型的硫酸基引入, 然后被相当多的独立的接受体酶将硫酸基接过来。这些酶我们称为硫代激酶。这是生物合成中相当普遍的图式的重复, 这种图式已在乙酰基的活化和传递<sup>(10)</sup>中及磷酸基的活化和传递中明确地描述过了。看来, 可以应用到很多其他基团传递的例子中去。

### 参考文献及附注

- (1) R. H. DeMeio, M. Wizerkaniuk, E. Fabriani, *J. Biol. Chem.* 203 257 (1953) .

- 2) The following abbreviations have been used in this article, ADP, adenosinediphosphate, AMP, adenosine monophosphate, APS, adenosine-5'-phosphosulfate, ATP, adenosine triphosphate, Co-A, coenzyme A, P, inorganic phosphate, PAP, 3', 5'-diphosphate, PAPS, adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (active sulfate), PP, pyrophosphate, S, sulfate, UTP, uridine triphosphate.
- [ 3 ] S. Bernstein and R. W. McGilvery, *J. Biol. Chem.* 199, 745 (1952).
- [ 4 ] P. W. Robbins and F. Lipmann, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2652 (1956).
- [ 5 ] —, *ibid.* 78, 6409 (1956).
- [ 6 ] —, *J. Biol. Chem.* 229, 837 (1957).
- [ 7 ] H. Hilz and F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 41, 880 (1955).
- [ 8 ] J. Baddiley, J. G. Buchanan, R. Letters, *J. Chem. Soc.* 1957, 1067 (1957).
- [ 9 ] —, *Proc. Chem. Soc (London)* 1957, 147 (1957).
- [ 10 ] L. G. Wilson and R. S. Bandurski, *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 503 (1956); R. S. Bandurski, L. G. Wilson, C. L. Squires, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6408 (1956).
- [ 11 ] E. A. Robbins and P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* 224, 121 (1957).
- [ 12 ] R. H. DeMeio, M. Wizerkanuik, I. Schreiberman, *ibid.* 213, 439 (1955).
- [ 13 ] A. B. Roy, *Biochem. J.* 63, 294 (1956).
- [ 14 ] Y. Nose and F. Lipmann, *J. Biol. Chem.*, 233, 1348 (1958).
- [ 15 ] J. D. Gregory and F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* 229, 1081 (1957).
- [ 16 ] S. Suzuki, N. Takahashi, F. Egami, *Biochim. et Biophys. Acta* 24, 444 (1957).
- [ 17 ] B. Axelrod, *Advances in Enzymol.* 17, 159 (1956).
- [ 18 ] F. D'Abramo and F. Lipmann, *Biochim. et Biophys. Acta* 25, 211 (1957).
- [ 19 ] G. Blix, *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's* 219, 82 (1933).
- [ 20 ] F. Lipmann, *Science* 120, 855 (1954); —, in *Metabolism of the Nervous System*, D. Richter, Ed., Pergamon, London, 1957, P. 329.
- [ 21 ] T. P. Wang, L. Shuster, N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* 206, 299 (1954). We are indebted to Dr. Kaplan for a sample of 3'-nucleotidase.
- [ 22 ] M. E. Jones et al, *Biochim. et Biophys. Acta* 12, 141 (1953).
- 参见 I. H. Goldberg, *Enzymatic Sulfurylation Mechanisms*, Ph. D. Dissertation, The Rockefeller University, 1960, and *J. Lipid Res.* 2, 103 (1961).

## 九、蛋白质合成

我在1941年讨论到磷酸键能的产生和利用时，提出了一个粗略的图解，我认为氨基酸羧基的磷酸化作用是肽合成激活中的一个步骤。后来，在探索活性乙酸酯的性质时，我利用芳香胺的乙酰化作用作为模型，反应产物乙酰芳香胺是一个含肽键的化合物，而正是这样一种作为肽合成模型的乙酰化作用，使我和蛋白质合成这个总题目有了更为密切的接触。

那时为了证明在特定条件下蛋白水解酶能使肽缩合，曾作过很大努力（图1）。尽管没有得到直接的证据，但是在1951年一次十分活跃的讨论会上，当林德斯特朗-兰支持我早些时候提出的见解，即这是羧基活化而不是蛋白水解逆反应时，我受到了很大的鼓励。对有关这方面机理的初步理解可以从1949年联合会议上提出的一篇综述中看到。在那篇文章里我总结了依赖于ATP分解的肽键合成中的各种反应。例如，已发现谷氨酰胺和谷胱甘肽合成与ATP有联系。通过比较肾匀浆中需氧磷酸化作用的抑制和丙氨酸对肝组织片的参入作用，提供了蛋白质合成依赖于磷酸键产生的直接证据，给人以深刻印象（图2）。那时我曾简单地认为，如果我们了解了氨基酸激活的机理，蛋白质合成就或多或少可以解决一些了。我用了很长时间才认识到，与其他大多数制造蛋白质的生物合成相比较，这不过是个开端。然而这个开端却仍然是在转到产生特定的氨基酸顺序这样较大的问题以前必须要了解的一步。

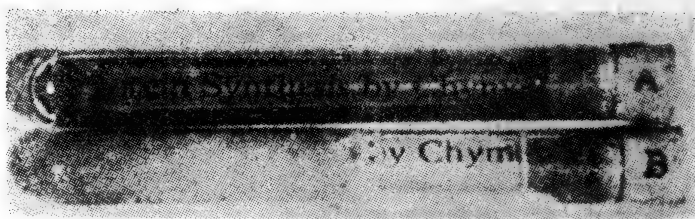


图1 卵清蛋白肽消化液中蛋白样物质。A.无糜蛋白酶。B.与糜蛋白酶一起孵温45分钟后形成了固态凝胶。〔引自Journal of the American Chemical Society, Vol.73,1288(1951)〕

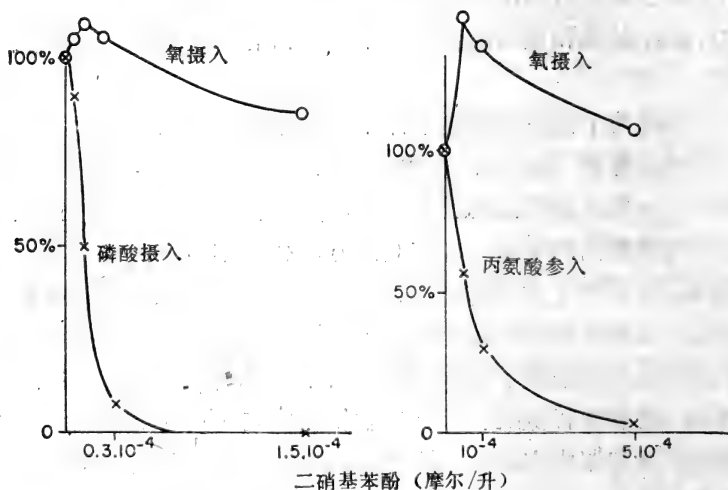
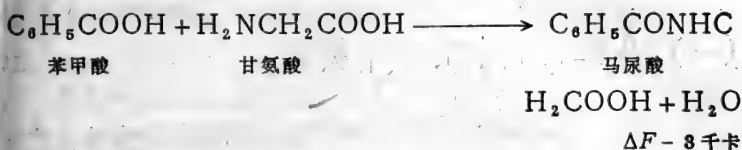


图2 二硝基苯酚的抑制作用。二硝基苯酚对磷酸化作用及蛋白质合成的抑制作用的比较。磷酸化的抑制作用按卢米斯和李普曼叙述的方法用肾匀浆测定。蛋白质的合成用肝切片测定。复制的数据取自弗朗茨 (Frantz) 等的论文。为更好地进行比较,数据均用正常的氧摄入、磷酸化作用和丙氨酸参与的百分数表示。〔引自Mechanism of Peptide Bond Formation, *Federation Proc.* 8, 597 (1949).〕

原来讨论得最多的肽合成反应模式之一是马尿酸的合成。这种合成在肝脏内迅速发生。布尔索克 (Borsook) 的

计算表明这种反应需要 3 千卡热量。



钱特雷 (Chantrenne) 指出：在马尿酸的合成过程中，苯甲酸对甘氨酸的激活作用是一种和 ATP-CoA 有关的反应，就象磺胺乙酰化作用中乙酸的激活作用一样。这是需要能量的一个有力的证明。

在吕南发现乙酸借硫酯连接到 CoA 上以后，有些讨论中认为氨基酸硫酯有可能是蛋白质合成的一个中间体。直到 1954 年我们才认真考虑开始做有关蛋白质合成的工作。那时乙酸激活中焦磷酸的分解是一项惊人的新发现，当沃纳马斯 (Werner Maas) 用微生物使泛解酸 (Pantoic acid) 和  $\beta$ -丙氨酸间用肽键连接起来合成泛酸，发现了 ATP 中焦磷酸分解的另一个例子时，这引起了我们极大的注意。

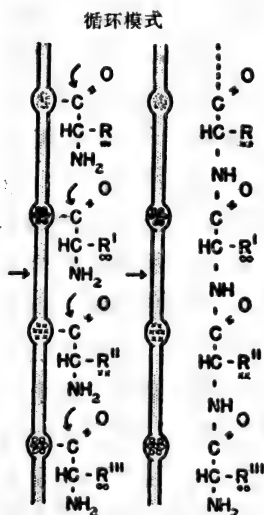
与 CoA 有关的乙酸激活作用和肽键合成中泛解酸的激活作用之间的相似性，促使我们拟就一个相当大胆的肽的合成计划，这个计划基于下列的错误见解：在 ATP 的焦磷酸分解过程中，焦磷酸基团可能有一个与酶结合的中间步骤。我无法抗拒把这种模型包括在内的诱惑，尽管细节上有错误，但上述模型确实展现出肽合成顺序某些特点的前景，这里提供的模型原来和我们最近发现的短杆菌肽 S 的生物合成机理密切相关。这种抗菌素多肽是在蛋白质模板上产生的。在介绍了摘引自我的论文<sup>①</sup>（载于《酶的作用机理》一书）中的模型之

① 论文题目和出处：On the mechanism of some ATP-linked reactions and certain aspects of protein synthesis. In *The Mechanism of Enzyme Action* (W. D. McElroy and B. Glass), Eds., p. 599, Johns Hopkins, Baltimore, 1954.

后，我再来详细地谈到这个问题。

## (一) 多肽合成中的一个模型

这里我们试图说明肽键合成的机理如何转化到多肽合成系统中去。这个建议部分以钱斯 (Britton Chance) 的下列观察为依据，钱斯观察到在细胞色素间电子传递过程中，电子转移的特殊顺序是通过各个细胞色素结构的固定化来实现的。根据钱斯的看法，电子转移速率太快，不可能同细胞色素分子作随机的、无规则的相遇，它们之间的相遇，只有细胞色素按顺序排列使电子沿直线直接转移才有可能实现。



同样可以设想，对氨基酸有专一性的激活点按所要求的顺序排列在结构上。举例来说，赖氨酸 ( $=R$ )，谷氨酸 ( $=R'$ )，门冬氨酸 ( $=R''$ ) 及甘氨酸 ( $=R'''$ ) 按此顺序连接。为达到激活作用，对  $R$ 、 $R'$  或  $R''$  和  $R'''$  绝对专一的各中心将在我们的结构上按此顺序建立起来……

图中的两个阶段代表了在蛋白质模板上的生物合成过程，我们最近发现上述模板在环十肽即短杆菌肽和短杆菌酪肽合成中起作用，在那里，氨基酸的羧基固定于多酶系统的硫酯键上。氨基酸先固定于氨酰基腺苷酸的多酶系统上，而后被ATP激活，然后把酰基转移到酶的SH基上，使在一个特定部位与硫酯相联。通过特殊机理，引起氨

氨基酸依规定的顺序由硫酯键缩合。聚合作用由N端向羧基端进行，就短杆菌肽S和短杆菌酪肽来说，通过环化释出而终止。

大约从1954年起，我们就经常考虑蛋白质的合成，但很大部分心思还集中在辅酶A和乙酸激活作用上，有某种障碍使我们不能积极研究蛋白质的合成问题。马斯在我们实验室里，霍格兰 (Mahlon Hoagland) 也在，当然，还有诺维里。但他们都被引到乙酰化作用和CoA合成方面去了。察梅尼克小组正好在马萨诸塞总医院研究大楼五层楼，我们的下一层。他们那时正在蛋白质合成方面活跃地工作着。霍格兰在六层楼工作了一年之后，回到了五层楼察梅尼克那里。他立即着手进行我们悬而未做的氨基酸激活作用的研究，发现了肝脏上清液中的氨基酸激活酶。这一发现，一开始使他兴奋得穿梭似地在五、六层楼之间上下走个不停。

霍格兰的实验证实了原来预料到的激活作用以及ATP分解为AMP和PP<sub>i</sub>有联系。为了检定，他首先使用形成羟脲酸的方法，然后又采用依赖氨基酸的ATP-PP<sub>i</sub>交换法。几乎同时，诺维里到西部预备大学去，并立即开始了有关氨基酸激活作用的研究。在那里，他和德莫斯 (DeMoss) 在许多细菌提取物中证实了氨基酸的激活作用。伯格曾发现乙酰腺苷酸在类似的ATP-CoA-乙酸反应中是一个中间体。他带了头，诺维里和德莫斯接着也合成了亮氨酰腺苷酸，并指出后者是亮氨酸激活作用的中间体。我们终于和戴维 (Earl Davie) 以及柯尼斯贝格尔一起奋起直追，大胆地投入了色氨酸激活酶的分离工作中。这项研究题目主要为了证明酶对单一氨基酸的专一性。

研究与ATP有关的色氨酸激活作用，大部分采用形成羟脲酸的方法来分析，因为羟脲酸极易起反应。最近赫希

(Hirsh) 和李普曼研究了某些其他激活酶的、缓慢得多的羟胺反应。早先我们从乙酸激活作用的经验了解到，在完全缺乏二级受体CoA的情况下，不能证明乙酰羟胺的形成。再说，用合成方法制备的氨酰基腺苷酸尽管能够“被迫”参与反应，但很快便对之发生怀疑，以后证实了这种类型的中间体是与酶紧密结合在一起，在溶液里并不以游离的形式出现。这种情况使得我们有时想，这里是否可以用羟胺作为一个人工受体呢？相当于CoA的天然受体依然找不到。但是，我们只是想想而已。在ATP有关的激活作用之后，那个天然受体的发现正是核苷酸顺序和多肽合成连接起来所缺少的环节。

我们在波士顿的最后几年，那时仍住在华盛顿的盖莫(George Gamow)是我们的常客。我们都喜欢他。他是一个杰出的人物。我们从他的来访中学到很多东西，现在我们很想念他。和许多理论物理学家一样，他被遗传学吸引住了。他是最先看出需要把核酸的4类核苷酸顺序和蛋白质的20个氨基酸顺序联系在一起的一批人中的一个。这样，他就成为密码之父，预言了三联密码的可能性最大。当时曾作过十分粗略的尝试来说明专一的核苷酸顺序可能与不同氨基酸相关的机理。我记得他来访时我们曾不很肯定地讨论过碱基顺序的分子表面结构以某种方式直接而且专一地和某些氨基酸相关联的可能性问题。

## (二) 迁居洛克菲勒大学以后 (1957)

以后我到了纽约，盖莫到了科罗拉多州，我们就失去了联系。但另外一位客人克里克(Francis Crick)却常来。有一次克里克来访，并在洛克菲勒大学共进午餐。我们第一次听



他讲起碱基配对原理是一种带普遍性的复制形式的可能性。他建议用一种短链多核苷酸作为带有氨基酸特殊反密码子的连接物 (adaptor) 和每个氨基酸结合在一起以准备合成蛋白质。这种连接物学说的多方面的含义只是后来才缓慢地被我们所理解。等到霍格兰等和霍利 (Holley) 分别指出核酸是氨基酸激活系统的组分, 上述学说就很快得到了支持。氨基酸通过激活酶和核酸连接在一起。霍格兰和察梅尼克证明有一种可溶性的RNA用于此目的, 它包含约70个核苷酸, 证实了克里克所预言的连接物, 不同的是它比想象的更大些。最初给他定名为sRNA, 但后来发现了其他可溶性RNA, 这个名称就废弃了, 代之以“转移RNA”或简称tRNA, 目前此名称已被普遍采用。

发现了这一个特殊载体转移RNA (tRNA), 就使氨基酸和乙酸激活作用得到了更好的对比。于是立即引出了RNA和氨基酸羧基之间的联系问题, 这种联系能保存从ATP转移来的能量。最初的想法是磷酸可能是一个二级接受体。然而, 初步实验表明, 氨酰基tRNA和羟胺(在酸性更大的pH条件下为这类基团电位的优良指示剂) 的反应性并不像人们所预期的那样和酸酐一样大。氨酰基腺苷酸在pH5和羟胺反应更加强烈, 并且对酸和碱也更敏感些。我们解决了这一难题, 用胰脏核糖核酸酶去消化氨酰基tRNA。这样就产生了腺苷-2'或3'氨基酸的混合物。显然氨基酸是在tRNA终端腺苷上酯化。察梅尼克实验室也分别发现了tRNA内有一个共同的 $A_pC_pC_p\cdots O$ -终端。

为了直接达到聚合作用, 我们从预先激活的氨基酸开始。在这些工作中, 我们多少有些意外地发现大肠杆菌tRNA通过该杆菌的酶负载着氨基酸, 成为参入大鼠肝脏核糖体氨基酸的很好的来源。这就是密码具有普遍意义的一个很好

的例子,为了更有说服力地证明这个原理,埃伦施泰因(G. von Ehrenstein)博士和我采用大肠杆菌的氨酰基-tRNA 作为兔血红蛋白合成的氨基酸供体,在施韦特(Schweet)网织红细胞系统里得到相当好的结果。下面摘引论文中的一段:

血红蛋白能够从微生物大肠杆菌衍生出来的氨酰基-sRNA进行合成的事实,使我们更加确信目前一般认为的代表氨基酸专一性的sRNA氨基酸密码有其普遍意义。最近一篇论文叙述了从大肠杆菌获得的另一个类似系统,将这个系统和上述系统的成分进行比较,就可看出需要GTP 和一个可溶性的酶部分,而两个系统均被嘌呤霉素所抑制。然而,与同类微生物系统相比,哺乳类系统对氯霉素的抵抗性是十分显著的。即使在0.01摩尔/升浓度中,我们也从来没有观察到氯霉素和一个哺乳类系统确实存在的反应。氯霉素和嘌呤霉素干预机理的差别已在大肠杆菌系统的实验里表现出来。这些事实提示我们,可能氯霉素在被嘌呤霉素阻断之前阻断了部分反应。我们开始感觉到,哺乳类系统和微生物系统间的差别必定表明微生物系统的一种特有的性质,可能是一种附加的性质,它在氨基酸聚合前发生。我们目前推想这种机理在所有细胞都是相同的。

### 参 考 文 献

- (1) K.U.Linderstrøm-Lang, *Proteins and Enzymes*, Stanford, Calif., (Stanford University Press, 1952 or Oxford University Press, London) .
- (2) The requirement for coenzyme A in the enzymatic synthesis of hippuric acid. H. Chantrenne, *J. Biol. Chem.* 189, 227 (1961) .
- (3) Synthesis of pantothenic acid by a pyrophosphate-liberating cleavage of ATP. W. Maas, *Federation Proc.* 12, 241 (1953) .
- (4) Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme-bound thioester intermediates. With W. Gevers and H. Kleinkauf. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 63, 1335 (1969) .

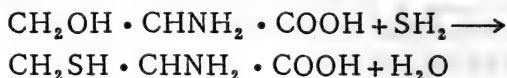
- 5) Gramicidin S and tyrocidine biosynthesis, a primitive process of sequential addition of amino acids on polyenzymes, in *Chemical Evolution and the Origin of Life* (R. Buvet and C. Ponnamperna, eds. North Holland Publishing Co.), in press.
- 6) The isolation of a tryptophan-activating enzyme from pancreas. With E. W. Davie and V. V. Koningsberger, *Arch Biochem. Biophys.* 65, 21 (1956).
- 7) Isolation of adenosine amino acid esters from a ribonuclease digest of soluble, liver ribonucleic acid. With H. G. Zachau and G. Acs, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 885 (1958).
- 8) The divergence in reactivity of aminoacyl-tRNA synthetases in *E. coli* with hydroxylamine. With D. I. Hirsh, *J. Biol. Chem.* 243, 5724 (1968).
- 9) Experiments on hemoglobin biosynthesis. With G. von Ehrenstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 47, 941 (1961).
- 10) Oxygen transfer to AMP in the enzymic synthesis of the hydroxamate of tryptophan. With M. B. Hoagland, P. Zamecnik, N. Sharon, M. P. Stulberg, and P. D. Boyer, *Biochim. Biophys. Acta* 26, 215 (1957).

在转而说到我们日益关注的上清液因素的功能之前，我愿意提一提我们努力去证明氨酰基-tRNA定位的专一性，只是因为要将其反密码子和mRNA上的密码子三联体配对。下面我摘引我1962年写的综述《肿瘤疾病的基本问题》中的一段内容：

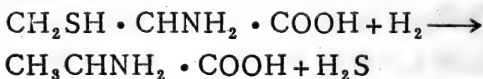
现在我回到最后一个题目。本泽尔(Seymour Benzer)博士感到目前的证据不足，因为在活化酶通过将氨基酸连接到它相应sRNA的末端的翻译步骤中，其专一性完全转移到多核苷酸链上了。为了确切地证明这一点，他建议设法将一个连接到sRNA上的氨基酸加以修饰。埃伦斯泰因博士在本泽尔实验室工作了一段时间后又回到我们那儿，他起了“信使”的作用。那以后，他去约翰斯霍普金斯大学，加上在我们实验室工作的查普维尔博士以及在本泽尔实验室工作的魏斯布罗姆(Weisblum)博士，我们之间就形成了一个三角联系，有些活动是在霍普金斯大学和埃伦斯泰因博士共同进

行的〔1〕。

查普维尔博士对含硫氨基酸的研究有丰富的经验〔2〕。在这个问题上，他对我们有很大帮助。首先，开始工作前能制成具有相当强度放射活性的半胱氨酸看来比较理想，因为买来的半胱氨酸的放射活性不高。他采用了施洛斯曼(Schlossmann)和林内恩报道的一种酵母酶〔3〕，把高放射活性的丝氨酸转化为具有相似放射活性的半胱氨酸。



半胱氨酸可用各种温和的方法加以修饰。最有意思的是带氢的拉尼(Raney)氏镍还原法，将半胱氨酸的巯基除去而植入氢以代替〔4〕，从而把含3碳链的半胱氨酸转化成含有3碳链的丙氨酸。



在贝塞斯达(Bethesda)，通过尼伦伯格(Nirenberg)的工作〔5〕，特别是奥丘阿(Ochoa)博士小组关于某些核苷酸组合的氨基酸相对专一性的观察，对此项工作帮助甚大。它证明聚尿苷酸-鸟苷酸(聚UG)对半胱氨酸和某些其他氨基酸是专一的，但不接受丙氨酸〔7,8〕。给我们提供了一个修饰过的半胱氨酰-sRNA的很好的试验系统。拉尼氏镍还原法最初不太稳定，但目前此方法工作得很好。与sRNA结合的半胱氨酸在室温下很容易转化为丙氨酸，一般产率为60—70%。拉尼氏镍在室温保温极短时间即可将游离半胱氨酸完全还原成丙氨酸。而连结在sRNA上的半胱氨酸产率就不那么高，这并不奇怪。能得到的最佳产率约为70%。这种制品与聚UG一起使用。表1列出这些实验的结果。

这里，我们必须介绍一种符号，以便识别RNA属于那

表1 来自拉尼氏镍-还原CySH-sRNA的丙氨酸  
对聚UG的参入作用 (每分次) [1]

镍处理	加 入 量			对TCA不溶部分的参入量	
	CySH-sRNA <sup>CySH</sup>	Ala-sRNA <sup>CySH</sup>	Ala-sRNA <sup>Ala</sup>	+UG	-UG
-	1800	...	...	508	162
+	650	840	...	527	67
-	...	...	2800	169	158

一种特定的氨基酸。用此种命名方法，如右上角写半胱氨酸的半胱氨酰-sRNA (CySH-sRNA<sup>CySH</sup>) 转化为右上角写的半胱氨酸的丙氨酰-sRNA (Ala-sRNA<sup>CySH</sup>)，表示丙氨酸位于对半胱氨酸有专一性的sRNA上。在表1中看到从Ala-sRNA<sup>CySH</sup>来的丙氨酸可以很好地参入到聚UG上，而从Ala-sRNA<sup>Ala</sup>来的却不能参入。用含65%Ala-sRNA<sup>CySH</sup>和35%CySH-sRNA<sup>CySH</sup>的混合物，加入与CySH-sRNA<sup>CySH</sup>等量的放射活性时，连结在对半胱氨酸有专一性的sRNA上的丙氨酸将和CySH-sRNA<sup>CySH</sup>一样参入到对半胱氨酸有专一性的聚UG上。表2显得更加清楚。这里，水解产物的分析是在把半胱氨酸氧化成磺基丙氨酸之后进行的，后者可得到更好的分离。表2的上部标明了用阳离子交换剂Dowex-50分离所得的结果。在那个部分磺基丙氨酸的酸度大，故能通过，但丙氨酸却留在上面。未经处理的CySH-sRNA<sup>CySH</sup>经过水解和氧化产生的磺基丙氨酸能全部通过。当CySH-sRNA<sup>CySH</sup>还原为Ala-sRNA<sup>CySH</sup>时，丙氨酸被接纳到多肽上，水解后被Dowex-50所拦留，其放射性与所用的Ala-sRNA<sup>CySH</sup>成正比。图1是电泳图的放射自显影图，其洗脱液的分析在表2下部。它更有力地表明，

表2 沉淀的氧化水解产物分析 (每分次) [1]

镍处理	加入量			参入量	
	CySH-sRNA <sup>CySH</sup>	Ala-sRNA <sup>CySH</sup>	总量	滤液:	洗脱物:
				磺基丙氨酸	丙氨酸
				Dowex-50	
-	9000	...	3050	2835	83
+	3500	6500	3290	990	2020
电泳图					
-	2870	...	520	225	3
+	660	1540	395	66	141

还原后的放射性出现在相当于丙氨酸的斑点上，而还原前，在丙氨酸区无放射性。观察两个部分，未还原样品和磺基丙氨酸一起在下部显示为一个放射性强的斑点，并稍向阴极移动。而还原样品中，磺基丙氨酸的斑点则弱得多，这里丙氨酸斑点与丙氨酸标识物吻合。

总之，还原后，半胱氨酸的标识物成比例地还原。失去的东西在这里以丙氨酸出现，说明其专一性确是完全转移到sRNA上了。如果sRNA带着错误的氨基酸，那么这个错误的氨基酸就以聚UG作为专一性的模板没法进入多肽。这证明了连接物学说，并使整个设想相当实际。我希望你们中至少有些人会相信这个我们称之为最小的系统能够合成蛋白质，并相信它一直有助于显示密码的普遍意义。我们希望用它来阐明肽链形成的过程。在下列问题上证明它是非常有用的，即显示转译酶确实毫不含糊地进行着翻译，而氨基酸排列过程中信息的载体就是sRNA。

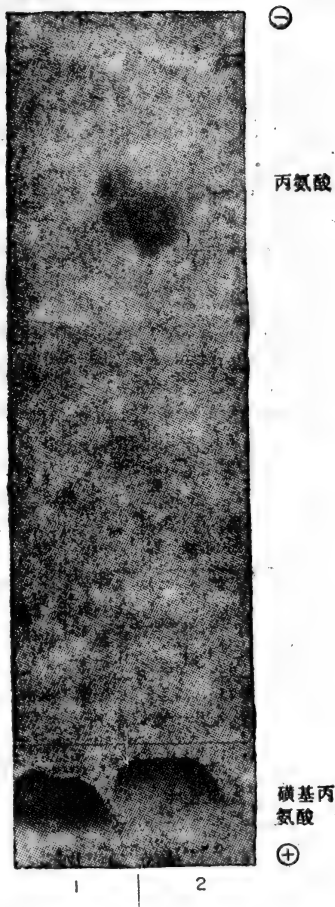


图1 转移到三氯醋酸 (TCA) 沉淀物中的放射性分析。每个样品都是表 2 上部道韦克斯滤液和洗脱液的混合物。样品在惠特曼 (Whatman) 3 毫米滤纸上进行电泳, pH1.85 (乙酸: 甲酸: 水 = 7.8: 2.5: 89.7), 70 伏/厘米, 60 分钟。电泳图钉在 X 线胶片上暴露 25 天。(1) 未经处理的  $^{14}\text{C}$ -CySH-sRNA<sup>CySH</sup>, (2) 拉尼镍处理的  $^{14}\text{C}$ -CySH-sRNA<sup>CySH</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] F.Chapeville, F.Lipmann, G.von Ehrenstein, B.Weisblum, W. J. Ray, Jr., and S. Benzer. On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 48, 1086—1092 (1962) .
- [2] F.Chapeville and P.Fromageot. Formation de sulfite, d'acide cysteique et de taurine a partir de sulfate par l'oeuf embryonne. *Biochim.Biophys.Acta* 26, 538—558 (1957) .
- [3] K.Schlossmann and F.Lynen. Biosynthese des Cysteins aus Serin und Schwefelwasserstoff. *Biochem.Z.* 328, 591—594 (1957) .
- [4] F.Chapeville. Oxidation of cysteine to cysteic acid on sRNA with retention of specificity in amino acid incorporation. (Abstract.) *Federation Proc.* 21, 414 (1962) .
- [5] R.Schröter. *Newer Methods of Preparative Organic Chemistry* (New York: Interscience, 1948) , p.72
- [6] M.W.Nirenberg and J.H.Matthaei. The dependence of cell-free protein synthesis in *E.coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 1588—1602 (1961) .
- [7] J.H.Matthaei, O.W.Jones, R.G. Martin, and M. W. Nirenberg. Characteristics and composition of RNA coding units. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 666—677 (1962) .
- [8] J.F.Speyer, P.Lengyel, C.Basilio, and S.Ochoa. Synthetic polynucleotides and the amino acid code, IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 441—448 (1962) .

从那时起,我们的工作就集中到多肽链延长过程中上清液因子和GTP的功能上了。我们的结果发表在《科学》杂志中那篇内容相当广泛的综述上。内容如下:

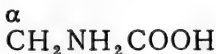
### (三) 蛋白质生物合成中多肽链的延长

一个蛋白质离开了合成装配线后呈现出来的三维结构,是由氨基酸顺序间的相互作用而引起的自发性折叠的结果。产生出来的基本上是一维结构的一串以肽键连结的氨基酸,



用此种方式转化为一种精确设计的、有催化活性的酶蛋白。这种一维结构的多肽是由信使RNA (mRNA) 中碱基三联体顺序精确地转译成肽的氨基酸而形成的〔1,2〕。

蛋白质是由不同数目的20种基本氨基酸缩合成多肽链所形成的。这20种氨基酸是此组氨基酸中最小的氨基酸甘氨酸的衍生物。



甘氨酸 $\alpha$ -碳原子上两个氢原子中的一个为各种不同的取代基所替代,使衍生物不对称,通常为L-构型。氨基酸之间靠其羧基和其相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基之间形成的肽链相连结。就此产生了骨架结构,如果伸展成带状物(图1),则在每个 $\alpha$ -碳原子的侧面携带取代基。这些取代基分类列于图2内。

蛋白质的三维特性主要取决于侧链间的力。多肽骨架由于这些附加物之间及与水之间的吸引力和排斥力而产生卷曲和折叠。当在X射线图象上再现时,多肽链看起来奇怪地被扭曲了〔3〕。从细菌到人类,组成蛋白质的氨基酸经过了可能有亿万年的进化〔4〕,在种类和数目上仍保持不变,这奇妙的20个氨基酸在特定的、折叠的、按严格顺序排列的多肽链结构内,产生出所有生物体分子工艺的基本部件。

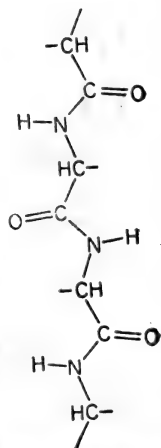


图1 多肽骨架延伸成一维结构的带状物。图2中列出的侧链从肽链中邻近CO基的C上露出来,以开放的短划表示。

### 氨基酸活化和聚合作用的研究

要了解聚合作用的机理,重要的是在连接反应中使用预

序号	氨基酸	侧链	序号	氨基酸	侧链
1	甘氨酸	-H	11	半胱氨酸	$-\text{CH}_2\text{SH}$
2	丙氨酸	$-\text{CH}_3$	12	甲硫氨酸	$-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{CH}_3$
3	缬氨酸	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	13	赖氨酸	$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
4	异亮氨酸	$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	14	精氨酸	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$
5	亮氨酸	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	15	组氨酸	$-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}=\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\overset{\text{H}}{\text{N}}$
6	脯氨酸*	$-\text{CH}_2\text{CH}_2$ $-\text{CH}_2$	16	色氨酸	$-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\text{C}}(\text{NH})-\text{C}_6\text{H}_5$
7	苯丙氨酸	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$			
8	丝氨酸	$-\text{CH}_2\text{OH}$	17	天冬氨酸	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$
9	苏氨酸	$-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	18	天冬酰胺	$-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$
10	酪氨酸	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	19	谷氨酸	$-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
			20	谷氨酰胺	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CONH}_2$

图2 侧链的特点被分成5类。第一类也是最大的一类,代表疏水类。其侧链的疏水性不应与游离氨基酸的疏水性作比较。封阻肽链的氨基和羧基必然明显地增加肽链的疏水性。它也将改变侧链功能基团的特性,例如许多水解酶丝氨酸的羟基。其它4类带有功能性的附加基团,其中许多是亲水性基团。以黑体字作标志,毋需解释。除了两个杂环碱(咪唑和吡咯)以及两个苯的衍生物外,所有侧链均为脂肪族的。蛋白质功能多方面的适应性必然来自介于电荷分布和疏水性、亲水性优势之间的协调平衡。具有酶功能的蛋白质看来大体上呈现一种球状结构,其亲水部位向外,而疏水部位向内卷曲。它还有为催化作用而巧妙安排的功能性侧链。

活化单位。因此在我们的研究工作中,氨酰基转移核糖核酸(tRNA's)被用作氨基酸的前体。氨基酸由对氨基酸有专一性的酶所活化。在初期的反应里,将ATP的末端焦磷酸基取代,形成氨酰基腺苷酸。然后氨基酸在同一个酶上被转移给RNA。因此,氨酰基tRNA合成酶有着双重的功能;

把氨基酸酯化连接到tRNA的3'终端，从而使氨基酸活化，以便形成肽键（图3）。在tRNA含70多个核苷酸链的中部，有一个反密码子三联体，它对所携带的氨基酸有专一性〔2〕。反密码子碱基三联体和mRNA内的密码三联体以氢键相联，从而把氨基酸依适当顺序放在不断生长的多肽链上。通过把氨基酸连接到对它们专一的tRNA上，氨酰基-tRNA合成酶的功能是把氨基酸专一性转译成碱基配对专

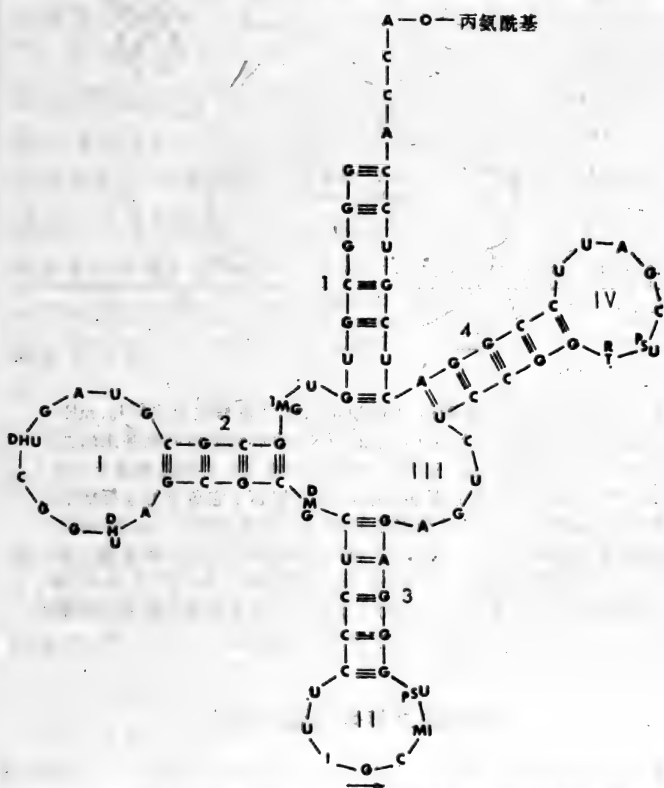


图8 酵母的丙氨酸-tRNA。三叶草样的结构，在顶部的O末端，腺苷以酯键连接于丙氨酸的羧基。底部环中含有丙氨酸的反密码子 I-G-C〔2〕。

一性〔5〕。把mRNA氨基酰-tRNA和补充反应物集合在一起的反应器是核糖体。细菌核糖体的分子量约为 $2 \times 10^6$ ，沉降系数为70S。它们由两个亚单位组成，沉降系数分别为30S和50S。图4概述了在带有mRNA的核糖体上聚合作用的进程〔6〕。

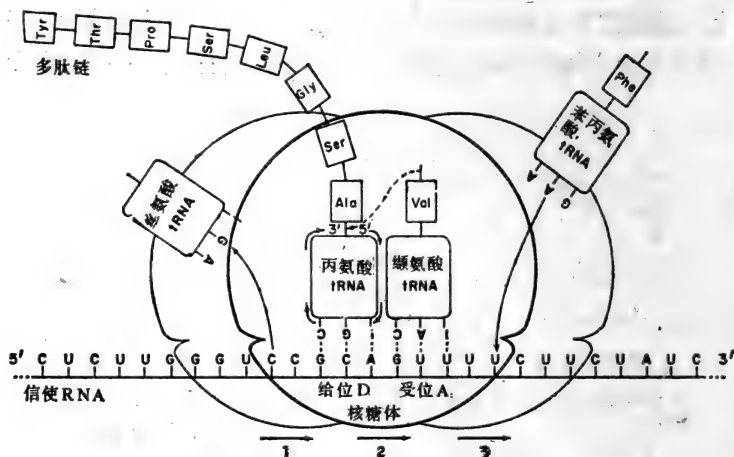


图4 这幅顺序加入氨基酸的简图按Crick的文献修改而成〔6〕。mRNA沿30S部件滑行，两个相互作用的tRNA的肽酰基和氨基末端结合到50S单位上，并通过反密码子-密码子的相互作用借氢键连于30S上的mRNA。图左显示出肽基转移后，tRNA摆脱了它负载的丝氨酸而离去。图中表明发生肽转移到新加进来的缬氨酸-tRNA上。在图右侧，随着苯丙氨酸-tRNA反密码子与mRNA上密码子的三联体相连接，肽链的延长过程继续进行。丙氨酸-tRNA周围的5'→3'箭头强调了tRNA上反密码子和mRNA上密码子之间结合的反平行性质。D部位为给位，A部位为受体。

### 大肠杆菌匀浆中肽链的延长

正常蛋白质的起动和终止都涉及各种各样特殊机理的复杂过程。用苯丙氨酸在聚尿苷酸上的聚合作用消除了这些复杂性后，我们把注意力集中到肽链的延长上，并从上清液部

分中分离出两个蛋白质T和G，它们是细菌延长的补充反应物。G部分是一个简单蛋白，而T则由两个亚部分T<sub>1</sub>和T<sub>2</sub>组成〔7〕。下面几段，我们将主要讨论这些蛋白质在肽链延长中的功能，以及它们和鸟苷三磷酸（GTP）的关系〔8〕，GTP的能量在蛋白质合成中的利用，越来越成为问题的核心，有必要进行广泛的讨论。

尼伦伯格和马太（Matthaei）发现了聚尿苷酸能作为合成聚苯丙氨酸的模板〔9〕，这使蛋白质合成的研究简单化了；有可能用一种人工合成聚合物合成只含一种氨基酸的特定的多肽链。我们现在知道了，为这个系统创造最佳条件，无意中挑选出链的延长这一环节。幸好延长反应的基本成分在聚苯丙氨酸和复杂蛋白质的合成中是相同的。这些成分是核糖体，从无颗粒上清液几个部分中分离出来的几种蛋白质，Mg<sup>++</sup>、K<sup>+</sup>或NH<sub>4</sub><sup>+</sup>离子，GTP以及一种巯基供体。在约10<sup>-2</sup>摩尔/升Mg<sup>++</sup>浓度时，不需要特殊的肽链起动因子，因为苯丙氨酰tRNA（Phe-tRNA）能够作为新链的起译子〔10,11〕。最后阶段即终止阶段也不需要，因为延长进展到接近把加入的Phe-tRNA耗竭时，并无肽链从tRNA释出〔12〕。

表1说明了补充因子和起动、延长、终止3个阶段的协调，简单地总结了制造蛋白质的整个过程。合成开始是mRNA被结合到一个30S核糖体亚单位上〔13〕，其起动因子甲酰蛋氨酰-tRNA（fMet-tRNA）连接到它的密码子AUG上〔2〕，同时50S亚单位加入到30S中。在此阶段，一套特殊的补充反应物即一些起动因子在起作用。用1摩尔/升NH<sub>4</sub>Cl把它们从核糖体分离出来〔14〕，虽然就确切的含意来说，它们并非核糖体的组分。人们认为磐前（Iwasaki）等人报道的F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>和F<sub>3</sub>部分〔15〕与雷维尔（Revel）等人报道的

A, C和B部分相类似<sup>[10, 17]</sup>。当试验 $f_2$ 噬菌体RNA时,  $F_2$ 部分在mRNA的结合中起作用<sup>[15]</sup>, 但聚尿苷酸的结合则似乎并不需要。 $F_1$ 、 $F_2$ 部分和GTP促进了细菌起动因子fMet-tRNA<sup>[18]</sup>和其他N-酰化tRNA<sup>[11]</sup>的结合。 $F_1$ 部分单独存在时无活性, 但可刺激 $F_2$ ; 而 $F_2$ 单独存在时则一般都显示出活性。看来在整个合成周期的起动阶段, 70S核糖体单位是由游离的30S和50S亚单位结合而成的<sup>[18]</sup>, 而在终止阶段之后, 又分离成亚单位<sup>[19]</sup>。起动阶段之后继之以延长阶段, 本文的中心就是讨论肽链延长阶段的。

表1 多肽链起动、延长及终止反应的细菌补充物  
(参考文献见正文)

因 子	来 源	功 能
<u>起动作用</u>		
$F_2$ (B)	核糖体洗液	使mRNA结合到核糖体(30S)上
$F_1$ - $F_2$ (A-C)及GTP	核糖体洗液	使N-阻断的氨酰基-tRNA结合到核糖体上
<u>延长周期</u>		
$\left. \begin{array}{l} T_1 \\ T_2 \end{array} \right\} T$	上清部分	使GTP和氨酰基-tRNA结合, 转移到核糖体上
肽基转移酶	核糖体50 S蛋白质	使肽酰基转移到氨酰基-tRNA上
G和GTP	上清部分	使肽酰基-tRNA移位, 从GTP上释出Pi
<u>终止作用</u>		
$R_1$ - $R_2$	上清部分	按照密码子UAA、UAG或UGA的信息, 从tRNA上释出合成完毕的多肽

当终止三联体UAA、UAG或UGA之一在肽酰基-tRNA的紧邻出现于mRNA时，延长停止<sup>[2]</sup>。最终产物释出，即从tRNA上水解下来，其方式尚未查明。终止与上清液内的因子有关，是加诺扎 (Ganoza) 早期的实验已指出过的<sup>[20]</sup>，当时她正在做合成的含高比例UAA三联体的尿苷酸和腺苷酸聚合体的工作。卡佩奇 (Capecchi) 用一个 $f_2$ 型大肠杆菌噬菌体的早熟终止变种作研究<sup>[21]</sup>，从延长因子中分离出一个释放因子R<sup>[22]</sup>。最近，尼伦伯格和他的同事们发现，在终止三联体及上清液因子R存在的条件下，当fMet-tRNA和载有AUG的核糖体连接时，fMet便释放出来<sup>[23]</sup>。他们把R分离成亚部分 $R_1$ 和 $R_2$ ， $R_1$ 和 $R_2$ 分别对UAA和UAG以及UAA和UGA有专一性。加诺扎近期的实验指出，似乎终止需要一个额外的补充反应物，它与核糖体紧密地结合<sup>[24]</sup>。

### 细菌延长因子的分离

内森斯 (Nathans) 和李普曼首先从大肠杆菌上清液中用DEAE-纤维素色谱法分离出一个单峰，含有用于聚合作用的全部高分子补充反应物<sup>[25]</sup>。这一阶段更有趣的结果之一是：当用内源性mRNA工作时，峰部分促进了连接在大肠杆菌tRNA部分的各种氨基酸的参入作用。这表明，在从氨酰基-tRNA形成多肽链的缩合期，这种过程对氨基酸并无专一性。

先前已出现过这样的迹象，即DEAE-纤维素峰可进一步细分<sup>[26]</sup>。艾伦迪 (Allende) 等目前采用聚尿苷酸引导的聚苯丙氨酸合成法，不用DEAE-纤维素，而用DEAE-Sephadex及0.2摩尔/升和0.3摩尔/升磷酸缓冲液逐步洗脱，分离出两种补充反应物部分 (图5)<sup>[27]</sup>。稳定部分A

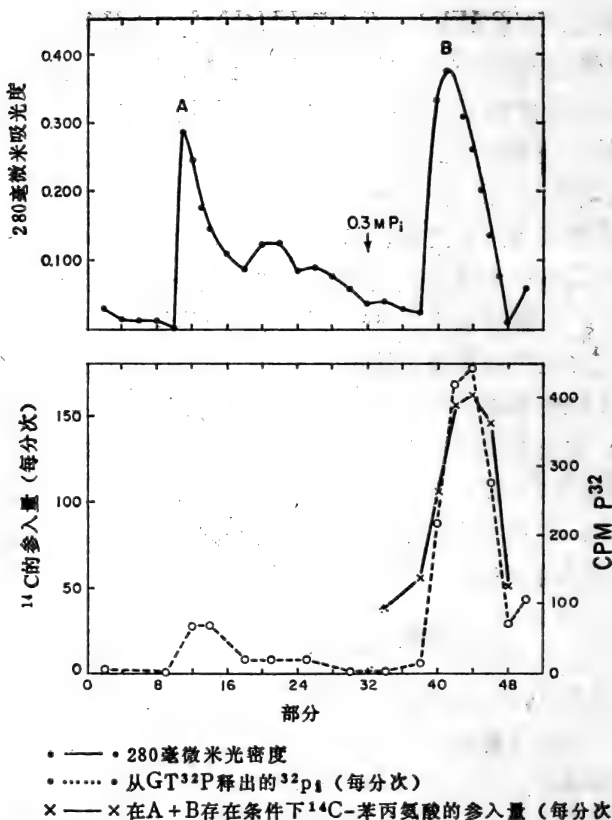


图5 核糖体相连的鸟苷三磷酸酶和B部分聚合活性的重叠<sup>[64]</sup>。实验用DEAE-Sephadex柱，并在A因子存在条件下进行参入测量。除聚尿苷酸、苯丙氨酰-tRNA和A因子省略外，鸟苷三磷酸酶活性在相似条件下测定。示踪物为GTP ( $r^{32}P$ )，用无机盐的产生作为酶活性的指标，图中的数值均用110每分次的核糖体空白修正过。

在低浓度时洗出，不稳定部分B在高浓度时洗出。B部分和鸟苷三磷酸酶相符。这一分离方法经西塚 (Nishizuka) 和李普曼<sup>[28]</sup>改进，仍用DEAE-Sephadex但借助于KCl梯度分离而不是逐步分离(图6)。出现了3个峰，最早出现



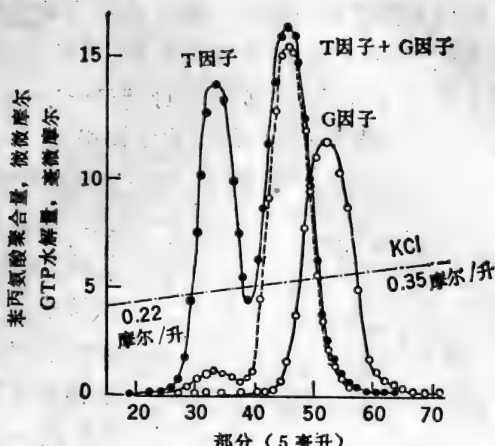


图6 用DEAE-Sephadex柱色谱法分离T因子和G因子。每个部分均取一部分，在标准条件下测量聚苯丙氨酸合成和鸟三磷酸酶的活性。·——·，在外加G因子条件下苯丙氨酸的聚合活性；·……·，无G因子条件下苯丙氨酸的聚合活性；·——·鸟苷三磷酸酶活性。详见参考文献[28]。

的峰含有和A相似的因子，现在称作T因子，第2个峰是两者的混合物，第3个峰是与B相似的因子，现在称作G因子。

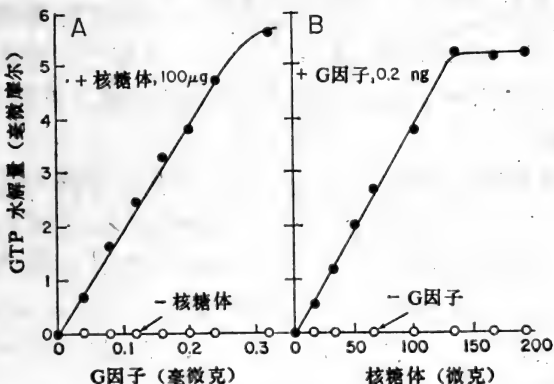


图7 用核糖体连接的鸟苷三磷酸酶测定G因子。A，用过量核糖体测定G因子。B，过量G因子对核糖体的作用[25]。

特殊的中间峰是两者的复合体，应引起更大的注意〔29〕。最后的部分为G因子，它在聚合过程中对T因子起补充作用，并与核糖体连接的鸟苷三磷酸酶相符〔26, 30, 31〕（图7）。与鸟苷三磷酸酶连接的B部分的不稳定性相比，G因子相当稳定〔27〕。另一方面，早期用KCl洗脱的T部分是很不稳定的，

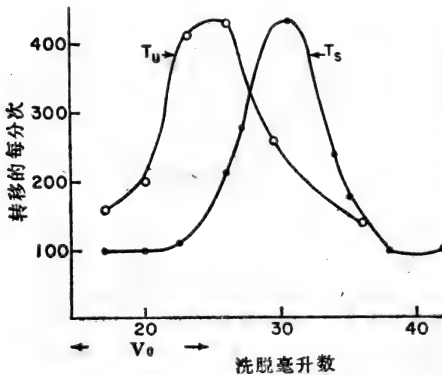


图8 Tu因子和Ts因子的葡聚糖G-200分段分离。·——·，Ts因子用蔗糖洗涤过的核糖体（每0.25毫升）反应混合物中含0.2毫克）来测定。·——·，在20微克G因子和40微克Ts因子存在条件下测定的Tu因子活性。详见参考文献〔6〕。

，但其他方面与稳定的A相似〔27〕。解决从后期至早期洗脱液的不稳定性这一难题就要把T因子（图8）进一步细分为不稳定的Tu和稳定的Ts〔7〕。将KCl梯度法〔28〕和逐步洗脱法〔30〕比较，表明只有在低浓度磷酸盐条件下洗脱下来的Ts因子才能得到稳定的A部分；而在高浓度

磷酸盐条件下，和Tu因子一起洗脱下来的G因子则获得不稳定的B部分。

西塚法最近表明可产生出近乎纯净的G因子〔32〕。卡齐罗（Kaziro）和井之上（Inoue）将此法稍加改进后就能够分离出一种均匀部分，从中可以获得晶态的G因子。在此以前，T因子复合体和G因子已由帕梅基亚尼（Parmeggiani）结晶出来〔33〕（图9）。到目前为止，帕梅基亚尼已获得片状和针状两种类型的T因子晶体。针状晶体可能包含不同比例的Tu和Ts因子〔33, 34〕。

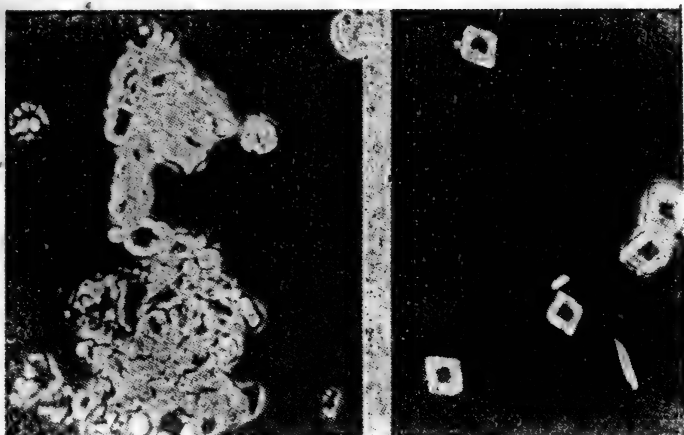


图9 帕梅基亚尼制备的G因子晶体(左)和T因子晶体(右)〔33〕。

在聚合过程中或GTP特异性地裂解为GDP和无机磷酸盐的过程中，G因子均和核糖体相补充〔30〕。这似乎表明G因子和来自GTP末端高能磷酸键的能量释放有功能上的联系。最初以为能量增强氨基酸羧基的活化作用。然而，连接一个肽键所需的能量显示出能充足地由氨基酸或肽羧基和tRNA的3'-末端腺苷间的高能酯键提供〔35, 36〕。因此，GTP的能量便很可能用于其它地方。

### 延 长 周 期

每个氨基酸的加成反应都经历一个可分为4个阶段的反应周期(图10)〔35〕。(1)起动阶段。一个肽酰基-tRNA占据了核糖体上的给位(肽酰基部位或图10中的D位)，而其受位(氨酰基部位或图10中的A位)是留空的。(2)被肽酰基-tRNA占据的密码子-反密码子给适合的氨酰基-tRNA发出信号，使之与其下一个留空的密码子结合。此结合被T+GTP因子所催化，并起动肽酰基的转移〔37〕。后者由核

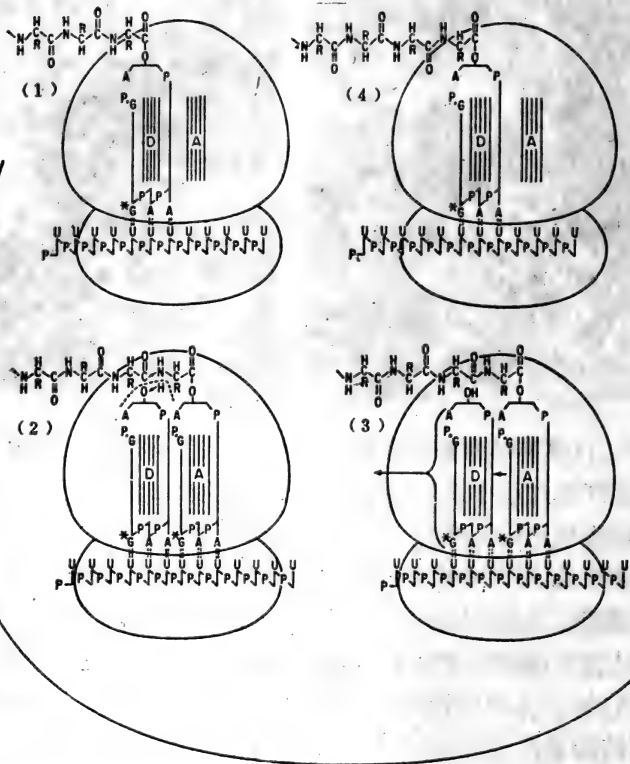


图10 肽的缩合周期。(1)在起始期(上左),一个肽酰基-tRNA刚刚转移到核糖体的给位上(D), (2)(下左),受位(A)被一个氨酰基-tRNA占据,这个氨酰基-tRNA的反密码子和mRNA上的、与肽酰基-tRNA占据的三联体相邻的密码子三联体相匹配。这种结合是T因子(Tu和Ts)+GTP的一种功能,它启动了转肽作用,把肽基由肽酰基-tRNA转到氨酰基-tRNA的游离氨基上,并释放出原与肽酰基-tRNA相联的tRNA。为了使给位留空,以便新延长的正处在受位上的肽酰基-tRNA移位,G因子+GTP,同时促进(3)中游离的tRNA的置换,把延长的肽酰基-tRNA向给位转移。随着移位在(4)中完成,肽酰基-tRNA在延伸了一个氨基酸之后回到起始部位(1),它把mRNA带向左侧一个密码子的长度,并在受位下露出一个新的密码子以便连接下一个氨酰基-tRNA。

糖体上的一种转移酶所催化。(3) 肽酰基转移后，无肽酰基附着的tRNA留在给位，而新延长的肽酰基-tRNA留在受位，两者均作好被移位的准备。(4) 最后阶段。肽酰基-tRNA和mRNA间的复合物已从受位转移到给位，同时游离的tRNA已从给位被取代。我们曾经论证过，为了这种移位，来自GTP的能量通过G因子被传递并用于携带此复合物向前移动一个密码子的距离<sup>[36, 37]</sup> [比较图10中的(1)和(4)]。赫克斯利(Huxley)讨论过这样一种运动，和肌肉收缩中肌动蛋白和肌球蛋白与ATP有关的部分的相互作用有些相似<sup>[38]</sup>。这种相似性提示我们<sup>[35]</sup>，由G因子催化的、与核糖体有关的GTP的裂解可能在移位中起作用。

### 转 肽 酶

人们常常设想转肽酶是由上清液提供的<sup>[39]</sup>。然而，门罗(Monro)等已证明，对于细菌系统，在肽合成过程中起催化作用的转肽酶是核糖体50S部件的组成蛋白质之一。他们试验把fMet从fMet-tRNA转移到使链终止的抗生素嘌呤霉素的氨基上，该抗生素是tRNA氨酰基-腺苷末端的类似物。这一反应模型对研究转肽过程非常有用，此观察表明肽基转移本质上与上清液因子或GTP无关。

转肽酶显然是装在与两个起反应的tRNA专一地连接着的核蛋白体50S亚单位上。肽酰基(或fMet)-tRNA与给位连接，氨酰基-tRNA与受位连接(图10)。所以为了处理肽基转移，酶必须集中在给位和受位之间，并极化成把肽羧基从给位转移到受位的氨基受体上的这种形式。同样，斯科格尔森(Skogerson)和莫尔戴夫(Moldave)最近提出在哺乳动物系统中，肽基转移是核糖体的一种功能<sup>[41]</sup>。

在整个核糖体氨基酸加成复合体内，肽酰基-tRNA和

氨基酸-tRNA均连于30S亚基处的mRNA上，这就进一步限制了两个tRNA定位的几何位置。我们讨论每个新氨基酸-tRNA的结合机理时，必须把这一点牢记在心，因为氨基酸-tRNA对肽合成起到协调作用并接着产生移位。图10中延长的示意图只是结合和移位到核糖体图象上的粗略投影。布赖彻尔 (Bretscher) [42]和斯皮林 (Spirin) [43]对移位已作出更为详尽有趣的、但主要是理论上的叙述。富勒 (Fuller) 和霍奇森 (Hodgson) 提出了两个相邻的tRNA与mRNA的密码子-反密码子相互作用，产生两个短小的双螺旋伸展物的详细分子模型。这些主张不应看成是已经确定的理论，而只是启迪人们解决复杂的几何学和动力学问题的良好开端。

### T因子和GTP以及氨基酸-tRNA的复合

斯韦特和他的同事描述了网质红细胞系统内的两个上清液因子TF-1和TF-2的特点[39]。研究表明，TF-1因子和氨基酸-tRNA与核糖体的结合有联系，这种结合是依赖于GTP的。然而，在大肠杆菌中，这种结合看来与GTP或上清液无关。因此，把氨基酸-tRNA结合到带有碱基三联体[45, 46]或多聚体的核糖体上[9, 47]以标识密码的实验均在无上清液因子或无GTP的条件下进行。然而，只是到了最近才认识到，在微生物系统中，不同阶段对GTP的需要却由于用高浓度的 $Mg^{++}$ 而搞得不清楚了。例如，所有为标识密码而做的结合实验均是在20毫摩尔/升或更高浓度的 $Mg^{++}$ 条件下进行的。只是在用低浓度 $Mg^{++}$  (4—5毫摩尔/升)时才需要GTP，在起动N-阻断的氨基酸-tRNA的结合测量中更为清楚[10, 11]。图11的例子说明了人工起动因子N-乙酰-苯丙氨酰 (N-Acetyl-Phe-tRNA)在低浓度和高

浓度 $Mg^{++}$ 条件下的结合情况<sup>[11]</sup>。在4毫摩尔/升 $Mg^{++}$ 条件下需要GTP和专一起动因子 $F_1$ 和 $F_2$ <sup>[14, 16]</sup>，而在10毫摩尔/升 $Mg^{++}$ 条件下则不需要。

艾伦迪和魏斯巴赫进一步追踪研究fMet-tRNA与 $F_1$ 和 $F_2$ <sup>[48, 49]</sup>结合到核糖体是否需要GTP，他们发现用来分离 $F_1$ 和 $F_2$ <sup>[14]</sup>的粗制核糖体洗液中含有一种蛋白质，能使GTP在微孔滤膜上滞留<sup>[50]</sup>。他们起初以为这是由 $f_2$ 因子和GTP形成的一种复合物造成的。然而通过Sephadex G-50凝胶过滤分析，戈登(Gordon)观察到GTP是和T因子(图12)结合在一起的<sup>[51]</sup>(T因子是艾伦迪和魏斯巴赫试验<sup>[50]</sup>中的一种污染物)。这种结合受到氨酰基-tRNA的强烈刺激(〔51〕中的图1)。与此同时，艾伦迪等证实了

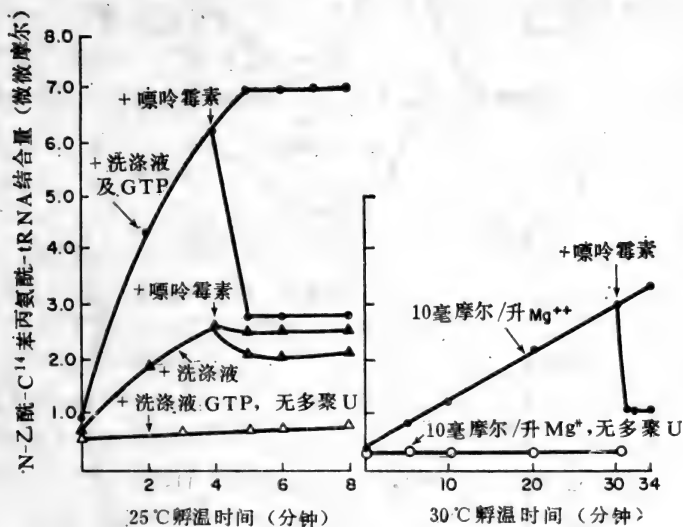


图11  $N$ -乙酰-Phe-tRNA与核糖体的结合，后者在低浓度或高浓度 $Mg^{++}$ 存在条件下以1摩尔/升 $NH_4Cl$ 洗涤；(左)4毫摩尔/升 $Mg^{++}$ ；(右)10毫摩尔/升 $Mg^{++}$ 。加于左侧的洗涤液含有斯坦利(Stanley)等的起动因子 $F_1$ 和 $F_2$ <sup>[14]</sup>。详见参考文献〔11〕。

与GTP结合的蛋白质是T因子，而不是F<sub>2</sub>因子<sup>[52]</sup>。戈登解释了用微孔滤膜技术研究氨酰基-tRNA对GTP与T因子的结合为什么无影响的<sup>[53]</sup>，他发现当3种成分一起加到微孔滤膜上时，大部分复合物通过滤膜出现在滤液中。这个三元复合物的形成可列出一个二步反应式：

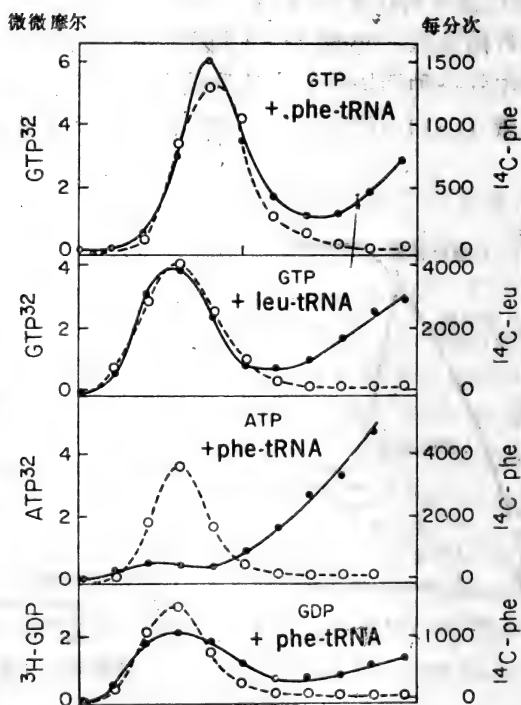


图12 用葡聚糖G-50过滤法测定T因子，GTP和氨酰基-tRNA之间形成的复合物<sup>[51]</sup>。



这种三元复合物含有化学计量学的GTP和氨酰基-tRNA<sup>[53, 54]</sup>。很明显，N-乙酰-Phe-tRNA<sup>[53, 54]</sup>和fMet-tRNA均不与T因子和GTP起反应。图13表示这个Phe-tRNA-T-GTP复合物和核糖体（上面的曲线）反应非常迅速，假如各成分一个一个地加进去，结合就缓慢得多（下面的曲线）。所以，可以认为是T因子把氨酰基-tRNA带到核糖体上的。

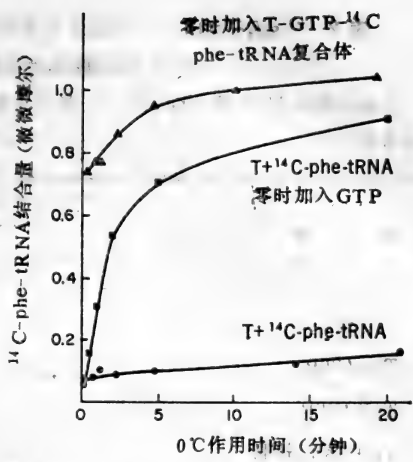


图13 来自T-GTP-Phe-tRNA复合体的Phe-tRNA与核糖体的瞬间结合反应<sup>[34]</sup>。

### 延长因子T和G的功能

在此期间，卢卡斯-伦纳德 (Lucas-Lenard) 和黑尼 (Haenni) 已开始研究GTP并附带研究T因子和G因子的功能<sup>34</sup>，他们采用来自Phe-tRNA的苯丙氨酸在聚尿苷酸上的聚合作用方法。他们发现用N-乙酰-Phe-tRNA作为起动机子去负载聚尿苷酸核糖体的方法优越性最大。N-乙酰-Phe-tRNA本质上是一种肽酰基类似物。用起动机子标志的在给定位上的核糖体复合体被分离出来，并用于把不同标志的Phe-tRNA结合到受位上。表2表明T因子的亚部分Tu和Ts与GTP联合作用<sup>[56]</sup>。

在这些实验里，发现了大部分结合着的Phe-tRNA立即占有N-乙酰-Phe-tRNA，形成二肽N-乙酰-Phe-Phe-tRNA（表3，行2），反应就此停止。在没有G因子的情

表2 Ts因子和Tu因子以及GTP对于<sup>3</sup>H-Phe-tRNA  
结合到核糖体上的影响

核糖体载有 *N*-乙酰-Phe-tRNA，微孔滤膜技术<sup>[45]</sup>用于测定 Phe-tRNA  
的结合量

加入物	Phe-tRNA (微微摩尔)
无	2.8
Ts+GTP	2.8
Tu+GTP	5.2
Tu+Ts+GTP	11.6

况下，虽加入过量的Phe-tRNA，却不形成三肽。下面说明在转肽过程中，GTP的相当复杂的功能。已证明，GTP的一个类似物5'-鸟苷亚甲双磷酸酯（连接β和γ-磷酸基的氧为CH<sub>2</sub>所取代），是一个很有趣的工具化合物<sup>[57]</sup>；它能取代在与F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>有关的、把fMet-tRNA结合到大肠杆菌核糖体的反应中的GTP<sup>[49]</sup>，它也能取代和T因子有关的Phe-tRNA结合反应中的GTP<sup>[56, 58]</sup>，不像GTP那样，并不形成肽（表3，行3）。但门罗等已证明转肽酶的活性并不取决于上清液或GTP<sup>[57]</sup>。因此，如果是GTP而不是它的类似物允许和Phe-tRNA形成肽键，那么GTP的功能必然专一地关系到在整个核糖体上和mRNA相连接的Phe-tRNA的排列<sup>[59]</sup>。一个不能供应高能磷酸键的GTP类似物对结合来说是足够了，但对多肽合成来说则不够。这种情况被解释为在后一反应中GTP被裂解。然而，由于像这样的转肽作用是在没有GTP的条件下进行的，我宁可等到结合、转肽和移位等作用之间的关系搞清楚后再作出解释。目前能得到的

**表 3** GTP和GMP-PCP在对为T因子所促进的<sup>3</sup>H-Phe-tRNA与核糖体结合的影响, 以及GTP和GMP-PCP对N-乙酰-Phe-Phe-tRNA形成的影响

预先结合了N-乙酰-<sup>14</sup>C-Phe-tRNA和T因子、GTP或GMP-PCP以及<sup>3</sup>H-Phe-tRNA一起孵温并离心。通过tRNA结合到核糖体沉淀上的产物, 用碱水解方法释放出来, 并用纸电泳法分析<sup>[56]</sup>。

加入物	结合的微微摩尔数		
	N-乙酰 Phe-tRNA ( <sup>14</sup> C)	N-乙酰 Phe-Phe-tRNA ( <sup>14</sup> C或 <sup>3</sup> H)	Phe-tRNA ( <sup>3</sup> H)
	无	7.6	0.4
+T+GTP	3.0	4.5	2.8
+T+GMP-PCP	7.0	0.5	4.8

P<sub>i</sub>释放与整个聚合作用的最适比值为1:1<sup>[28]</sup>。然而, 在这些实验里, P<sub>i</sub>释放的本底相当高, 我们正在准备再次核对。

### G因子的功能

在前面几个实验里, 只用T因子和GTP, 加一次苯丙氨酸后延长过程就停止下来。把嘌呤霉素加入N-乙酰-Phe-Phe-tRNA, 并不引起二肽的释放(表4)<sup>[59]</sup>, 虽然预先结合的起动因子N-乙酰-Phe-tRNA很容易以N-乙酰-Phe-嘌呤霉素的形式被释放出来(图11)。二肽酰-tRNA只是在与G因子和GTP接触后才发生反应。再说, 表4表明在G因子有关的反应中, 同类物不能取代GTP。这个同类物若与GTP同时加入, 则可抑制移位作用; 它也抑制氨基酸的聚合。

转肽作用只暴露给T因子和GTP后〔图10(3)〕, 留下

表 4 嘌呤霉素释出 *N*-乙酰-Phe-Phe

载有 5.4 微微摩尔的 *N*-乙酰- $^{14}\text{C}$ -Phe- $^3\text{H}$ -Phe-tRNA 的核糖体用离心法分离, 并在上述条件下孵温。嘌呤霉素产物用乙酸乙酯提取<sup>[59]</sup>。

加入物	<i>N</i> -乙酰-Phe-Phe-嘌呤霉素 释出的微微摩尔数( $^{14}\text{C}$ 或 $^3\text{H}$ )
嘌呤霉素	1.8
G+GTP+嘌呤霉素	5.4
G+GTP+核链胞酸+嘌呤霉素	2.0
G+GMP-PCP+嘌呤霉素	1.8
G+GTP+GMP-PCP+嘌呤霉素	4.1

来的核糖体在给位上有一个游离 tRNA, 在受位上则有一个新延长的肽酰基-tRNA。最近, 卢卡斯-伦纳德和黑尼已证明: 游离的 tRNA 从给位上除去是与 G 因子和 GTP 促进的从受位到给位的肽酰基-tRNA 的移位紧密联系在一起的<sup>[34]</sup>。为此目的, 将氘标记的 tRNA 从在含  $^3\text{H}$ -尿嘧啶的培养基中生长的, 对尿嘧啶有依赖性的大肠杆菌中分离出来。*N*-乙酰- $^{14}\text{C}$ -Phe- $^3\text{H}$ -tRNA 从这种 tRNA 制备而得, 而带有 *N*-乙酰- $^{14}\text{C}$ -Phe- $^3\text{H}$ -tRNA 的核糖体与 T 因子及 GTP 一起孵温, 通过转肽作用形成  $^{12}\text{C}$ -Phe-tRNA, 如表 3 所示。发现分离出来的核糖体同时带有  $^3\text{H}$ -tRNA 和 *N*-乙酰- $^{14}\text{C}$ -Phe- $^{12}\text{C}$ -Phe-tRNA, 后者与嘌呤霉素无反应性。将这些带有上述基团的核糖体与 G 因子及 GTP 一起孵温, 同时释出化学计量的  $^3\text{H}$ -tRNA 和  $^{14}\text{C}$ -二肽酰嘌呤霉素。

这些结果支持了下列设想: G 因子和 GTP 在移位中的作用并将游离 tRNA 推离核糖体。肽形成后, *N*-乙酰-Phe-Phe-tRNA 不能与嘌呤霉素起反应的解释是这样的: 此阶段

的二肽酰-tRNA是在受位上，在那里当Phe-tRNA接受来自其tRNA的N-乙酰-Phe时才能形成二肽（图10）。然后，为了把二肽酰-tRNA转移到给位上，需要G因子和GTP。在给位上，二肽酰-tRNA处于一个适宜的位置，以便于核糖体的转肽酶相衔接，并和嘌呤霉素的或氨酰基-tRNA的氨基相连。为了证明后者，做了继续延长至三肽酰-tRNA的试验〔56〕。表5数据证实肽酰基只是在与G因子和GTP反应后才能转移到一个新的氨酰基-tRNA上。这个实验还表明，这种被修饰过的核糖体复合物在加入Phe-tRNA-T-GTP以前可以被分离出来。

表5 把Phe-tRNA加入到载有N-乙酰-Phe-Phe-tRNA的核糖体，形成N-乙酰Phe-Phe-Phe-tRNA

经表内所列方法处理后，将核糖体离心并与T因子、GTP及<sup>3</sup>H-Phe-tRNA一起孵温。

核糖体的处理	形成的N-乙酰-Phe-Phe-Phe-tRNA	
	( <sup>3</sup> H)	(微微摩尔)
无	0.5	
G+GTP	3.8	
G+GTP+核链胞酸	1.3	

厄尔布(Erbe)和莱德(Leder)得出了相似的结论〔60〕。他们合成了两个聚核苷酸AUG(U)<sub>3</sub>和AUG(U)<sub>2</sub>，两者均以fMet密码子开始，接着是一个或两个U<sub>3</sub>顺序，这样它们便可分别允许一个或两个苯丙氨酸加成。厄尔布和莱德〔60〕如图14所示，在只有AUG(U)<sub>3</sub>存在的条件下，加入T因子和GTP，不管有没有G因子都可形成一个二肽，即fMet-Phe。同样，在AUG(U)<sub>2</sub>存在条件下，只加入T因

子和GTP也可形成一个二肽，同时有微量的三肽形成。然而，当加入G因子时，大部分二肽转化为三肽fMet-Phe-Phe。此实验极好地表示出，为了把在AUG(U)<sub>6</sub>中第2个U<sub>3</sub>三联体暴露出来以便附着并连接第二个Phe-tRNA，需要G因子的转位。

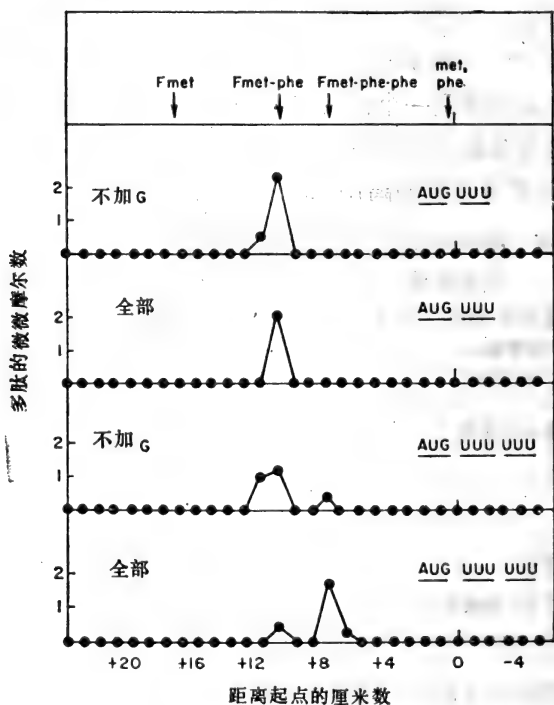


图14 由fMet-tRNA、Phe-tRNA、T因子和GTP混合物，加入或不加入G因子，在与核糖体相结合的AUG(U)<sub>6</sub>和AUG(U)<sub>6</sub>形成的肽产物的电泳分析。〔经厄尔布和莱德许可复制<sup>[60]</sup>〕。

为了鉴别和G因子有关的反应，由戈弗雷森 (Godtfredsen) <sup>[61]</sup> 分离并描述为具有甾类化合物特性的抗生素梭链孢酸 (fusidic acid) 最有用。首先田中 (Tanaka)

等〔61〕观察到它对G因子的专一性，他发现褐霉素既抑制聚合作用又抑制和G有关的鸟苷三磷酸酶。黑尼和卢卡斯-伦纳德〔60〕曾用核链胞酸去证实G因子在移位中的作用（表4和表5）。

## 结 论

延长因子T ( $T_u$ 和 $T_s$ ) 与G的鉴定使我们有可能系统地分析它们的功能。我们至少大体上开始了解细菌系统里肽链延长的机理，真核细胞内的过程看来基本上是相同的，因为从功能上来讲阿林豪斯 (Arlinghaus) 等的TF-1 和TF-2 两个因子〔60〕似乎和T因子与G因子相当〔41, 63〕。

肽链延长机理无疑是在同一核糖体上进行的。通过重复地把一个新的氨酰基-tRNA接合到mRNA上，发生转肽作用，又发生了新延长的氨酰基-tRNA的移位，肽链就长成了，而核糖体则沿着mRNA链移动，最后在出现终止信号时被释放出来。tRNA周期贯穿此系统，它们在肽链延长后通过转肽作用而被释出；再被氨基酸所负载，然后它们与T因子和GTP形成复合体，这个复合体将它们带回到与核糖体结合的mRNA上。新核糖体连续加成到mRNA上，形成一个聚核糖体，这在产生的过程中并不是一种内在的连续，而是作为一种同时生产几个复制品的手段。核糖体多少是独立地在同一模板 (mRNA) 上移动着，逐步完成蛋白质的复制，各个蛋白质的复制是分别在核糖体上开始的（表4和表5）。

## 参 考 文 献 及 附 注

- [1] Abbreviations are: A, adenosine; C, cytidine; G, guanosine; U, uridine; \*G, 2'-O-methyl-guanosine; GDP, guanosine diphosphate; GMP-PCP, 5'-guanylyl methylene-diphospho-

nate; RT, ribothymidine; DHU, 4, 5-dihydrouridine; DMG, N<sup>2</sup>-dimethylguanosine; 1-MG, 1-methylguanosine; I, inosine; 1-MI, 1-methyl-inosine; PSU, pseudouridine; DEAE, diethyl-aminoethyl; Ala, alanine; Gly, glycine; Leu, leucine; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Tyr, tyrosine; Val, valine.

- 2] More detailed information on many of the topics discussed may be found in *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 1 (1966)
- [3] J. C. Kendrew, *Science* 139, 1259 (1963) .
- [4] E. S. Barghoorn and J. W. Schopf, *ibid.* 152, 758 (1966) ; J. W. Schopf, K. W. Kvenvolden, E. S. Barghoorn, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 639 (1968).
- [5] F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, Jr., S. Benzer, *ibid.* 48, 1086 (1962) .
- [6] F. H. C. Crick, *Sci. Amer.* 215, 55 (1966) .
- [7] J. Lucas-Lenard and F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 55, 1562 (1966) .
- [8] E. B. Keller and P. C. Zamecnik, *J. Biol. Chem.* 221, 45 (1956).
- [9] M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 47, 1588 (1961) .
- [10] T. Nakamoto and D. Kolakofsky, *ibid.* 55, 606 (1966).
- [11] J. Lucas-Lenard and F. Lipmann, *ibid.* 57, 1050 (1967) .
- [12] W. Gilbert, *J. Mol. Biol.* 6, 389 (1963) .
- [13] C. Guthrie and M. Nomura, *Nature* 219, 232 (1968) .
- [14] W. M. Stanley, M. Salas, A. J. Wahba, S. Ochoa, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 56, 290 (1966) .
- [15] K. Iwasaki, S. Sabol, A. J. Wahba, S. Ochoa, *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 542 (1968) .
- [16] M. Revel and F. Gros, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 25, 124 (1966) .
- [17] M. Revel, J. C. Lelong, G. Brawerman, F. Gros, *Nature* 219, 1016 (1968) .
- [18] M. Salas, M. B. Hille, J. A. Last, A. J. Wahba, S. Ochoa, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 387 (1967) .
- [19] R. O. Kaempfer, M. Meselson, H. J. Raskas, *J. Mol. Biol.* 31, 277 (1968) .
- [20] M. C. Ganoza, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 273 (1966) .
- [21] G. W. Notani, D. L. Engelhardt, W. Konigsberg, N. D. Zinder, *J. Mol. Biol.* 12, 439 (1965) .



- [22] M. R. Capecchi, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 1144 (1967).
- [23] C. T. Caskey, R. Tompkins, E. Scolnick, T. Caryk, M. Nirenberg, *Science* 162, 135 (1968); E. Scolnick, R. Tompkins, T. Caskey, M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 61, 768 (1968).
- [24] M. C. Ganoza, personal communication.
- [25] D. Nathans and F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 47, 497 (1961).
- [26] F. Lipmann, in *Basic Problems in Neoplastic Disease*, A. Gellhorn and E. Hirschberg, Eds (Elsevier, Amsterdam, 1962), p. 131.
- [27] J. E. Allende, R. Monroe, F. Eipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 51, 1211 (1964).
- [28] Y. Nishizuka and F. Lipmann, *ibid.* 55, 212 (1966).
- [29] V. W. Hollis, Jr., and A. V. Furano, *J. Biol. Chem.* 243, 4926 (1968).
- [30] D. Nathans, G. von Ehrenstein, R. Monroe, F. Lipmann, *Fed. Proc.* 21, 127 (1962).
- [31] T. W. Conway and F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52, 1462 (1964).
- [32] Y. Kaziro and N. Inoue, *J. Biochem. (Tokyo)* 64, 423 (1968).
- [33] A. Parmeggiani, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 30, 613 (1968); personal communication.
- [34] J. Lucas-Lenard and A-L. Haenni, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 59, 554 (1968).
- [35] Y. Nishizuka and F. Lipmann, *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 344 (1966).
- [36] F. Lipmann, in *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis*, V. V. Konigsberger and L. Bosch, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1967), p.177.
- [37] R. E. Monroe, B. E. H. Maden, R. R. Traut, in *Genetic Elements*, D. Shugar, Ed. (Academic Press, London, 1967), p. 179.
- [38] H. E. Huxley, *Harvey Lect. Series* 60, 85 (1966).
- [39] R. Arlinghaus, J. Shaeffer, R. Schweet, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 51, 1291 (1964).
- [40] R. E. Monroe and K. A. Marcker, *J. Mol. Biol.* 25, 347 (1967); R. E. Monroe, *ibid.* 26, 147 (1967); R. E. Monroe, J. Cerna, K. A. Marcker, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 61, 1042 (1968).
- [41] L. Skogerson and K. Moldave, *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 497 (1968).

- [42] S. Bretscher, *Nature* 218, 675 (1968) .
- [43] A. S. Spirin, *Curr. Mod. Biol.* 2, 115 (1968) .
- [44] W. Fuller and A. Hodgson, *Nature* 215, 817 (1967) .
- [45] M. Nirenberg and P. Leder, *Science* 145, 1399 (1964) ;
- [46] H. G. Khorana, *Biochem. J.* 109, 709 (1968) .
- [47] P. Lengyel, J. F. Speyer, S. Ochoa, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 47, 1936 (1961) .
- [48] T. Ohta, S. Sarkar, R. E. Thach, *ibid.* 58, 1638 (1967) .
- [49] J. S. Anderson, M. S. Bretscher, B. F. C. Clark, K. A. Marcker, *Nature* 215, 490 (1967) .
- [50] J. E. Allende and H. Weissbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 82 (1967) .
- [51] J. Gordon, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 58, 1574 (1967) .
- [52] J. E. Allende, N. W. Seeds, T. W. Conway, H. Weissbach, *ibid.*, p.1566.
- [53] J. Gordon, *ibid.* 59, 179 (1968) , and unpublished experiments.
- [54] J. M. Ravel, R. L. Shorey, W. Shive *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 68 (1967) .
- [55] Y. Ono, A. Skoultchi, A. Klein, P. Lengyel, *Nature* 220, 1304 (1968) .
- [56] A-L. Haenni and J. Lucas-Lenard, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 61, 1363 (1968) .
- [57] J. W. B. Hershey and R. E. Monro, *J. Mol. Biol.* 18, 68 (1966) .
- [58] R. Ertel, N. Brot, B. Redfield, J. E. Allende, H. Weissbach, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 861 (1968) .
- [59] P. Leder and H. Burzryn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 233 (1966) .
- [60] R. W. Erbe and P. Leder, *ibid.* 31, 798 (1968) .
- [61] W. O. Godtfredsen and S. Vangedal, *Tetrahedron* 18, 1029 (1962) ; W. O. Godtfredsen, S. Jahnsen, H. Lorck, K. Rohold, L. Tybring, *Nature* 193, 987 (1962) .
- [62] N. Tanaka, T. Kinoshita, M. Masukawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 278 (1968) .
- [63] L. Felicetti and F. Lipmann, *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 548 (1968) .
- [64] T. Nakamoto, T. W. Conway, J. E. Allende, G. J. Spyrides, F. Lipmann, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 227 (1963) .

## 第二部分

### 八篇论文

#### 一、B族维生素的生化功能<sup>①</sup>

F. 李普曼

医生总是喜欢开维生素处方，于是许许多多的人服用维生素。但要知道为什么需要它们，机体又是怎样利用它们的，却要懂得许多复杂的生化问题。本世纪初，人们已清楚地认识到许多疾病是由于缺乏营养引起的，与辅助的食物有关。它们存在的量极少，被称为维生素 (Vitamins)。原来它们是一些奇妙的化学物质，具有意料不到的代谢功能，为了探索它们的奥秘，我花过很大的力气。由于维生素的需要量很小，很明显，它们不是一般意义上的食物。缺乏某一种维生素引起的疾病是某些地区的地方病，开始常被认为是传染病，以后才发现这种病是由于在那些特殊地区奇怪的进食习惯引起的。

我将以脚气病为例开始说起。脚气病是一种过去在菲律宾群岛和日本蔓延，危害很大的疾病，那些国家以米饭为主食。脚气病无例外地发生在稻米经过精细加工的地区。人们就怀疑到疾病的发生可能和去除糙米的胚和外层有关。艾克曼 (Eijkman) 首先指出食用米糠可以治疗脚气病<sup>[1]</sup>。芬

① 转载自下列文献: *Perspectives in Biology and Medicine*, Vol. 13, No. 1, Autumn 1969. ©1969 by the University of Chicago.

克 (Casimir Funk) 富于想象力, 认识到这些食物辅助因素的重要性, 他是最早从稻米皮和酵母中提取治疗脚气病物质的人中的一个。他指出这种物质具有含氮有机碱的特点, 所以称它为维生胺 (Vitamin)<sup>[2]</sup>, 虽然不是所有的维生素都是含氮有机碱, 但我们沿用了这个名称。

在能治疗脚气病的维生素用化学方法鉴定出来以后, 又把它重新命名为硫胺素, 意思是含硫的维生素。然而人们仍经常地把它称为维生素B<sub>1</sub>, 因为它是第一个被鉴定出来的水溶性B族维生素。字母A已被用来命名能治疗夜盲症的脂溶性维生素了。维生素B<sub>1</sub>又被称为抗神经炎的维生素, 因为缺乏B<sub>1</sub>的症状主要是在神经系统出现的。B族维生素的编号仍在继续中, 最新的是B<sub>12</sub>, 那是一种能治疗恶性贫血的含钴维生素。

### 作为辅酶一部分的B族维生素

B族维生素治疗疾病的用量很小, 不可能有任何营养价值。这就引起了令人不解的问题: 它们有什么用处? 为什么高级生物或许多品系的微生物都需要这些微量的食物补充品呢?

在用化学方法把它们鉴定出来后, 它们的结构表现出一种其他食物中所没有的复杂性。后来, 在三十年代中期, 瓦尔堡开始用化学方法去鉴定那些被称为辅酶的化合物, 它们是在酶反应中对热稳定的辅助因子。在瓦尔堡实验室里首先用化学方法鉴定出来的是在红细胞内葡萄糖-6-磷酸氧化过程中起作用的两个辅酶。这一氧化过程需要两种酶的协同作用, 一种为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 另一种为能和氧起反应的黄素酶。两种酶均含有对热稳定的辅酶, 脱氢酶中的辅酶很

容易从蛋白质上移除。但黄酶里的有色物质则需要用强酸性的硫酸铵处理才能分离出来〔3〕。这个黄绿色发荧光的染料证明是核黄素(最初称为Lactoflavin)的单磷酸盐,是大鼠的一种生长因子。它在一个辅酶内被发现后不久,即从卵清蛋白中被分离出来〔4〕。1935年,瓦尔堡、克里斯蒂安和格里塞(Griese)〔5〕鉴定了脱氢酶

中的这个热稳定因子,它是烟酸的衍生物,具有相当复杂的结构,瓦尔堡称之为三磷酸吡啶核苷酸(TPN)。与它密切相关的二磷酸吡啶核苷酸(DPN)是无细胞酒精发酵过程中对热稳定的一个辅助因子(图1),也在瓦尔堡的实验室里被分离出来,这同哈登〔6〕在1909年发现的第一个辅酶 cozymase 是同一个东西。

在瓦尔堡发现含有烟酸的辅酶两年之后,人们才认识到烟酸在医学上的重要性。1937年,埃尔维耶姆(Elvehjem)等宣布了一项惊人的发现,即缺乏烟酸是糙皮病的原因〔7〕。长期以来人们都知道这种使人虚弱的病是南欧的一种地方

病。在那里,玉米是主食。二十年代,以玉米为主食的北美洲南部地区爆发了一次严重的糙皮病,又重新引起了对这种

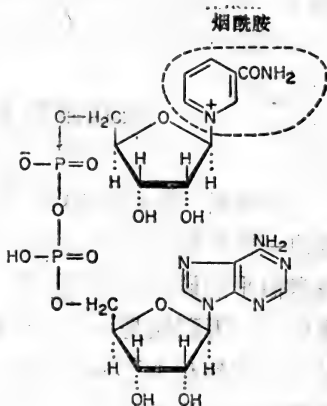


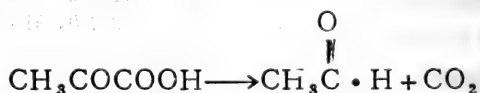
图1 二磷酸吡啶核苷酸(DPN)。由虚线圈起来的烟(碱)酰胺是维生素部分。它的氮原子连于5'-磷酸核糖的1'-位上,后者又借助于焦磷酸桥连于腺苷酸上。三磷酸吡啶核苷酸(TPN)在腺苷酸的核糖的2'-位置上又有一个磷酸进行酯化。当在氢转移作用时,烟酰胺部分可逆地接受了位于季氮对位上的氢。因此吡啶的苯型结构被转变为醌型结构,同时失去氮的正电荷。

病的注意。认为糙皮病是一种传染病的观点依旧相当顽固，直到烟酸的疗效得到肯定，才摈弃了这一错误的看法。

我不厌其烦地叙述瓦尔堡这项工作的始末，是因为它使我们意外地发现了维生素的作用机理。这次关于营养学和中间代谢化学的会议给我的印象很深，使我长时期有兴趣于此。

### 我在维生素领域的工作

彼得斯 (Rudolph Peters) 发现了维生素具有代谢功能的一种早期迹象<sup>[8]</sup>。在三十年代初，他指出动物缺乏硫胺素似乎妨碍糖的氧化作用。因为他发现有大量丙酮酸的蓄积，而丙酮酸是一种 3 个碳的中间代谢物，正常情况下是会迅速氧化为乙酸盐和  $\text{CO}_2$  的。当他研究缺乏硫胺素的鸽子脑组织切片的呼吸时，发现体外加入硫胺素能“治愈”丙酮酸的蓄积。我对这些观察结果感兴趣起来，因为丙酮酸氧化看来是碳水化合物代谢的关键反应，那时我正在研究碳水化合物的代谢问题。我重复了彼得斯的硫胺素体外作用的实验<sup>[9]</sup>，急于把丙酮酸氧化酶溶液化，以便更好地进行研究。这个问题需要研究清楚，因为洛曼已指出，硫胺素的焦磷酸酯是酵母羧化酶的辅酶<sup>[10]</sup>。这个酶对酒精发酵的部分反应起催化作用，丙酮酸不通过氧化就被分解为乙醛和  $\text{CO}_2$ 。



虽然动物组织内无羧化酶，但一种羧化酶类型的反应同一个适当的氢受体偶联，应该相当于丙酮酸的氧化作用。因此硫

胺素焦磷酸酯（图 2）非常可能就是脑组织和其他组织中丙酮酸氧化酶的辅酶。我想从脑提取物中分离出这样一个酶，但没有成功。所以我就在细菌中寻找，终于在一种乳杆菌 *Lactobacillus acidificans longissimus* 提取物中发现了一种可溶性丙酮酸氧化酶。

这种乳杆菌酶确实满足了我的期望<sup>[11]</sup>。它把丙酮酸氧化为乙酸和CO<sub>2</sub>，同时相当于两个B族维生素的两个辅酶可

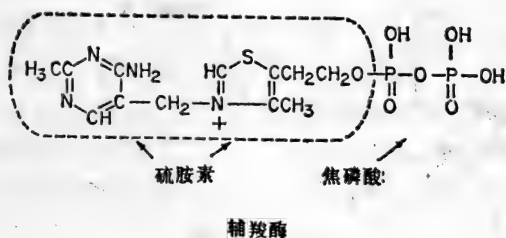


图 2 硫胺素与辅酶。用虚线圈起来的部分是维生素。在辅酶中（见正文），其侧链被焦磷酸酯化。分子的活力中心是噻唑环左上角的极活泼的 C·H 基团。

以用酸性硫酸铵分解法分离出来：（1）硫胺素焦磷酸酯及（2）黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）。后一种维生素衍生物本来已由瓦尔堡和克里斯蒂安鉴定为D-氨基酸氧化酶的氧化辅酶<sup>[12]</sup>，即“黄”酶的一种更为复杂的翻版（图 3）。丙酮酸氧化显示出对无机磷酸盐的意料不到的依赖性，反应产物是乙酰磷酸而不是乙酸<sup>[13]</sup>。人们发现在许多生物合成反应中，乙酸是二碳化合物的前体，而乙酰磷酸则似乎是“活泼”乙酸的有希望的竞争者。但结果令人失望。乙酰磷酸是细菌代谢中的一个特殊中间体，而在动物组织中并不能起到乙酰供体的作用。

细菌代谢中有活性的乙酸，在动物中却无活性，这一发现

使我感到奇怪。于是，我开始更认真地在动物组织提取物中寻找乙酸激活作用。看来有相当丰富的乙酰化作用的芳香胺是一种方便的测试系统，例如磺胺（SAM）乙酰化。这就是一种所谓的解毒作用，是肝脏的功能之一。用三磷酸腺苷

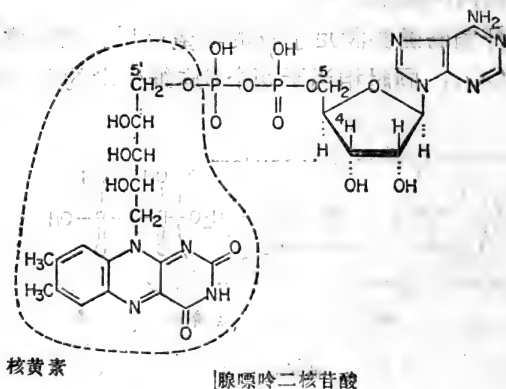


图8 核黄素与黄素腺嘌呤二核苷酸。用虚线圈起来的部分是维生素。这个辅酶在酶学中称作黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD），像DPN一样由一个焦磷酸桥与腺苷酸交联在一起。在酶促作用里，底部的黄素碱基可逆地受到氢化。最初发现的黄素含有核黄素单磷酸，称为黄素单核苷酸（FMN）。

（ATP）作为能量的供体时，鸽肝提取物起到把乙酰基非常迅速地转移给SAM的催化作用，可能先发生和ATP有联系的乙酸激活。但是，没有ATP，乙酰磷酸则不能作为乙酰基的供体。事隔不久，我观察到透析和老化处理能使酶复合体失活，而用煮沸过的新鲜肝的提取物就能容易地使它重新活化<sup>(14)</sup>。这样，我就发现对乙酸的激活和转乙酰作用需要一个辅酶。

于是立即对当时所有已知的辅酶制品进行了试验。它们均无活性，我抱着希望猜测这是一种新的辅酶。它的普遍性



表明在它既存在于酵母和细菌中，又存在于所有的组织里。前此，纳赫曼佐恩和伯曼已单独观察到胆碱乙酰化作用的一种辅助因子<sup>[16]</sup>。我们称之为CoA (A表示Acetylation) 的纯化的辅酶，对胆碱和SAM的乙酰化都起辅助作用。我们对这种辅酶可能包含一种维生素开始抱有希望，努力将它纯化。纯化的辅因子果然证明含有大量泛酸<sup>[6]</sup>，它是由威廉斯<sup>[17]</sup>发现的一种B族维生素。另外，我们还观察到辅酶中存在一种巯基衍生物。

在1950年测定了CoA的大体的化学组分。除泛酸外，它还含有5'-腺苷酸、两个额外的磷酸以及一个巯基衍生物，最初我们错误地把这个衍生物当作半胱氨酸。最后，发现CoA含有1摩尔腺苷5'，3'-二磷酸，由一个焦磷酸作桥把5'-核糖和泛酸的4'-羟基相连，泛酸的羧基又以肽键与

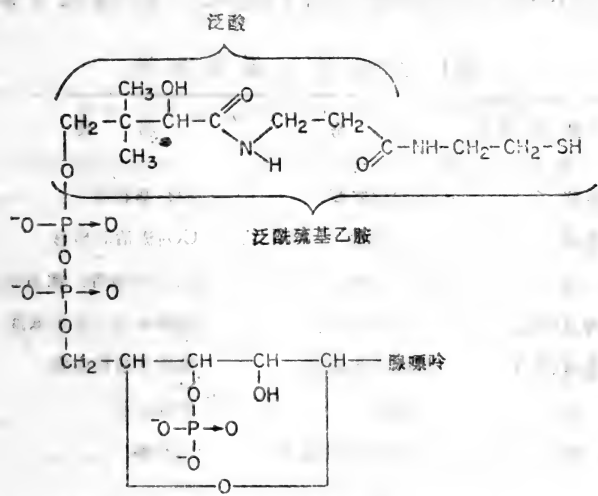


图4 辅酶A。正文讨论了它的化学性质。称为“保加利亚因子”的泛酰巯基乙胺 (Pantetheine) 是用肽链连接到巯基乙醇胺上的泛酸，它是某种特定微生物保加利亚乳酸杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 的生长因素。

硫代乙醇胺相连接(图4)<sup>[18]</sup>。林内恩和赖歇特(Reichert)首先认识到巯基的重要性<sup>[19]</sup>，他们指出乙酰-CoA的乙酰基是以硫酯键连接到分子中硫代乙醇胺部分上的。我们能证明从ATP、CoA及乙酸可产生乙酰-CoA、腺苷酸单磷酸(AMP)和焦磷酸<sup>[20]</sup>。

因为在大量乙酰转移反应中CoA是基团的载体，所以它立即引起了人们更多的注意；它让我们和许多其他实验室忙了好久。

### B族维生素的一般功能

现在人们能作这样的概括：B族维生素起着装入辅酶的载体分子的作用，在功能上它们与相应的酶蛋白有关连。表1表示它们一些为人们所熟知的作用。每一种B族维生素在一

表1 维生素的酶促功能

维生素	辅酶	功能
吡哆醇	磷酸吡哆醛	NH <sub>2</sub> 基转移
生物素	酶结合的	CO <sub>2</sub> 激活和转移
叶酸	四氢叶酸	C <sub>1</sub> (甲酸等) 激活和转移
钴胺素(B <sub>12</sub> )	腺苷酸衍生物	脱氢作用、分子重排
硫胺素(B <sub>1</sub> )	硫胺素焦磷酸	激活巯基衍生物
泛酸	辅酶A	酰基转移
烟酸	二和三磷酸吡啶核苷酸	氢转移
核黄素(B <sub>2</sub> )	黄素单核苷酸及黄素腺嘌呤二核苷酸	电子转移

类酶促反应的催化过程中与各种酶蛋白协调一致。一般地说，生物把“未加工的”维生素装入到相应辅酶的相当复杂的结构中。图5的模型图解表示了作为辅酶一部分的B族维生素的功能，而辅酶又是全酶的一部分。人们发现，往往在基团转移中需要一个B族维生素为代表的特殊设计的有机化合物。



一个酶的剖析

图5 含维生素的辅助因子和酶蛋白结合的模型

含维生素的辅酶存在于最低等的微生物中；因此，这些特殊的、具有复杂结构的有机分子是所有生物的生物合成工厂中必不可少的部分。维生素在代谢机构中的作用，可以比之为精致的手表中的钻石，在生命进化过程中，这些代谢工具必定是很早就已经存在了。

### 参 考 文 献

- [1] C.Eljkman. Virchow Arch. Pathol. Anat., 149: 187, 1897.
- [2] C.Funk, Die Vitamine. Wiesbaden, Bergmann, 1912.
- [3] O. Warburg and W. Christian. Naturwissenschaften, 20: 980, 1932.
- [4] P.Gyorgy and R.Kuhn. Klin.Wochensch., 12: 1241, 1933.
- [5] O.Warburg, W.Christian, and A.Griese. Biochem.Z., 282: 157,

1935.

- [6] A.Harden. Alcoholic fermentation. London and New York, Longmans Green, 1932.
- [7] C.A.Elvehjem, R.I.Madden, F.M.Strong, and D.W.Woolley. J. Amer.Chem.Soc., 59: 1767, 1937.
- [8] R.Peters. Biochem.J., 30: 2206, 1936.
- [9] F.Lipmann. Skandinavisches Arch.Physiol., 76: 255, 1937.
- [10] K.Lohmann and P. Schuster. Biochem. Z., 294: 188, 1937.
- [11] F.Lipmann. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 7: 248, 1939.
- [12] O.Warburg and W.Christian. Biochem. Z., 298: 150, 1938.
- [13] F.Lipmann. J.Biol.Chem., 134: 463, 1940.
- [14] —. Ibid., 160: 173, 1945.
- [15] D.Nachmansohn and M.Berman. J.Biol. Chem., 165: 551, 1946.
- [16] F.Lipmann, N.O.Kaplan, G.D.Novelli, L.C.Tuttle, and B.M. Guirard. J. Biol. Chem., 167: 869, 1947.
- [17] R.Williams. Biol.Rev., 16: 49, 1941.
- [18] F. Lipmann. Bacteriol. Rev., 17: 1, 1953.
- [19] F.Lynen and E.Reichert. Angew. Chem., 63: 47, 1951.
- [20] F.Lipmann, M.E.Jones, S. Black, and R. M. Flynn. J.Cell. Comp. Physiol., 41 (Suppl. 1), 109, 1953.

## 二、代谢过程的模式<sup>①</sup>

F·李普曼

波士顿，马萨诸塞总医院化学研究员，哈佛医学院生物化学和外科研究员

人们早就知道一个活细胞存在着持续不断的代谢过程，这意味着维持生命需要大量的能量。然而，关于在反应中所需要的不间断的能量如何起作用的问题，不论过去还是现在都还只有模糊的认识。只是最近通过较全面的化学解析，颇为意外地发现，在展现的反应序列中有大量含有特殊键的磷酸物质时，对这个问题的认识才出现了一线曙光。理解了细胞内处理这些磷酸中间体的方式，就有可能清楚地看到磷酸周期与能量转换和能量运输间的联系。在所有被研究过的细胞中，都发现有一个能量分布的化学网络，即腺苷酸系统。它能以特殊的高能磷酸键形式携带标准量的能量，约为1摩尔碳水化合物全部燃烧所释放能量的1/50。于是，得出了这样的看法：分解代谢在相当大的程度上把食物的潜在能量（势能）转化为直接能利用的磷酸键能量<sup>[7]</sup>，然后通过高能磷酸键交替地附着和释放，分解代谢和合成代谢交织在一起形成一种大部分为可逆反应的连续统一体。

这个关于代谢装置问题的新评价迄今一直重重掩盖，无人知晓，现在已开始对我们在代谢化学问题的总的看法上发生影响了。我们对能量转换是代谢过程的首要问题认识得愈深刻，我们就愈加不得不按照代谢步骤的本来面目——犹如工艺装置来看待它们。具体地说，生物解决能量转换问题的

<sup>①</sup> 转载自 *Currents in Biochemical Research*, D. E. Green, Ed. Interscience Publishers, New York, 1946.

方式与人类采用的技术方法是大不相同的。但是不管在生物还是在人，能量转换的最终目的是产生一种可被利用的能。我们日常生活对电流、煤气管和各式发动机愈来愈大的依赖和我们身体细胞对食物和氧气的依赖，看来确实基本相似。在上述两个例子里，要维持一个结构装置或有机体，均需供应能量，虽然大部分能量最终都以热的形式散失掉了。

一个活细胞在很多方面可比得上一个化学工厂。从一个工程技术专家的立足点来看，化工厂的设计是以各种技术原理为基础的〔5〕。只有工艺流程本身保留化学的性质，其技术实施则全部受到物理机械装置的影响。这种以机械操作为主的单位工艺流程表明，生物体内的化学和人实施的化学过程之间有明显差别，因为在活细胞中无论工艺流程的设计还是流程的实施，都是以化学原理为基础的。细胞化学的原料不是在一个个独立的小室内连续操作加工的，细胞化学本身包含着一系列和谐而又连续的、由大批催化剂在分子水平进行的反应步骤，并且同处在一种反应液中。这种加工类型的不同，容易把两种过程的基本相似点掩盖了。

大部分代谢过程是按化学工程师所称的“流程”来分类的〔6〕，所谓流程就是原料可以源源不断地、不受阻碍地进入一个反应系统。工艺流程以工艺流程图为依据，图上标明路线，沿着这条路线，化合物被传送到一连串的操作过程中去。

“一个理想的流程是以工艺过程中任何一点上的流量、温度以及组分的稳定状态为特征的。”这个特征同样也适用于几乎任何一种代谢过程。

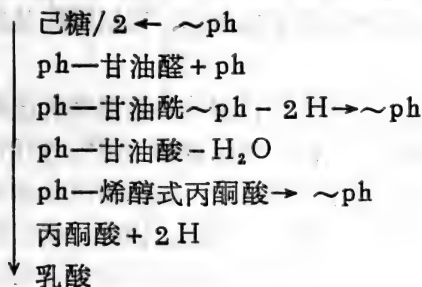
## 发 酵 过 程 的 各 种 特 点

我们所居住环境的物理机械性质影响并限制了我们的思

想。为了理解几乎所有生物都无例外地依赖于化学动力，我们必须克服一定的精神上的约束。尤其像发电过程，我们习惯把它和高度机械化的机器相联系，尽管发电也和我们的身体一样，大部分动力最后都来自碳和氢的燃烧。对生化能量转换的理解还有一种额外的、更偶然的障碍。对发酵过程——我们正在收集这方面的基本事实——人们的兴趣已长期集中在制造方面，如制造酒精和其他有价值的物质。但从生物学的观点来看，一种发酵过程或呼吸过程的目的是用于产生动力，其最终产物的性质只不过是次要和从属的罢了。

在碳水化合物较为简单的厌氧利用形式里，例如乳酸和酒精的发酵，反应顺序图的绘制目前已经完成。但仍需要一些时间才能对它们的模式和设计有充分的了解。然而，生命和许许多多不同生物的增殖都无例外地靠发酵进行能量转换而维持下来，这种能量转换常常以简单的有机化合物和含氮化合物作为起始物质。因此，由发酵的化学动力学衍生出来的原理具有相当的普遍性。

示意图 I 表明的是最简单的发酵过程，它显示出葡萄糖转化为乳酸和磷酸键能。为了强调过程的特点，在图解中把现在已相当熟悉的中间体省略了，流程图代表反应的顺序：



$\sim\text{ph}$ 、 $-\text{ph}$ 及 $\text{ph}$ 分别代表高能磷酸键（12千卡）磷酸酯键（3千卡）及无机磷酸〔7〕

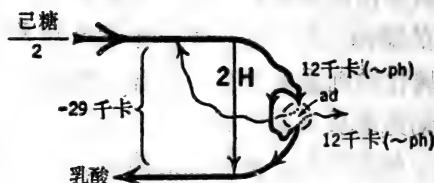


示意图 I 乳酸发酵过程模式图

流程路线代表一个己糖分子运行到达惰性最终产物乳酸的催化通路的空间设计，似乎在两端引入磷酸基团促进了六碳链中部的早期裂解。这种磷酸化作用能量消耗相当大，刚好吸收了产生出来的一半能量，这样就使净产能量减少50%左右。流程实施过程中将最终产生能量的一部分进行早期消耗是一个显著的特征。正是这种诱导能量的需要使发酵过程自动催化。人们常作出使人误解的说明，说在发酵过程中，半个己糖分子使另半个分子氧化，认为可能是一种歧化过程。其实是一个氢供体在卸下磷酸键能以后就被转换成一个氢受体。这种加工方式在流程线的特殊形态中表现出来，在所有的发酵过程中，流程线都有逆向反应。在初期消耗能量启动这一过程，并接受前一阶段分子流程线所释放的一对氢原子而发生的这种逆向过程，可以看作是厌氧代谢普遍的和主要的特征。

从工艺学上来讲，厌氧型代谢的实施过程有许多缺点。最大的缺点是效率低。可能产生能量的上限约为10%，而燃烧的潜能90%留在废物中未被利用。积聚的废物通常带强酸性性质，引出了一个更严重的技术问题。因此，我们发现在高等生物系统中需氧型代谢占优势。我们偶尔也会在高等生物中碰到发展完善的厌氧能量转换系统，它总是位于发育的场所或处于发育的阶段，这里由于结构上的或局部解剖学上的



原因，氧的供应不足或不稳定。如在胚胎、癌组织、胎盘的某些部分、视网膜的某些部分以及肌肉等组织中就是这样。厌氧能量的供应具有更大的独立性<sup>[8]</sup>。

## 呼吸过程的特征

引入氧作为氢的接受体，大大地增加了产能过程的复杂性。我们目前对此问题的理解时而这样，时而那样，远不如对较简单的厌氧发酵那样，有完善的理解。这里曾试图将现有数据整理成一个有条理的流程图，同时指出流程中哪些环

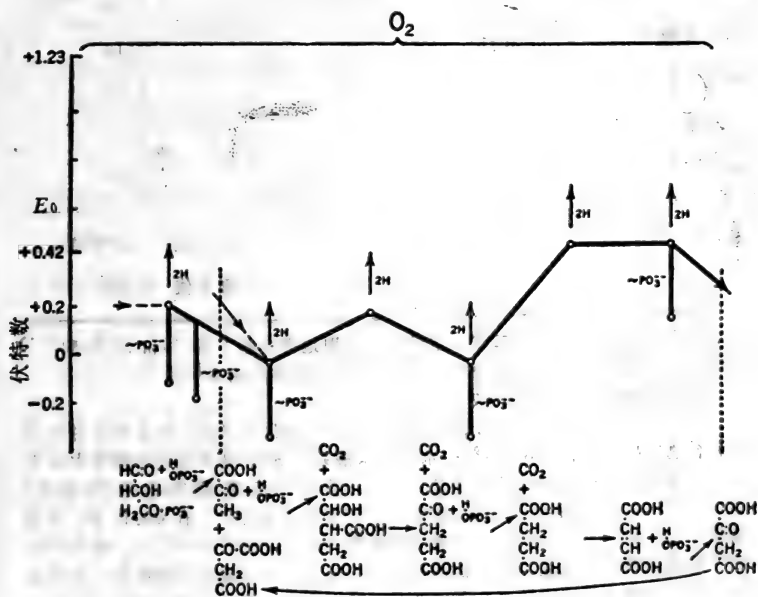


图1 柠檬酸循环

虚线标出了经常重复的过程单位。每一周期（由缩合到草酰乙酸的再生）氧化一个碳水化合物水平的二碳单位。二碳单位以乙酰基的形式贯入此系统。

节仍缺少资料。

如图1,当底物分子的进行性分解代谢以流程图中的方式投入到一种能量-时间协调系统中时,某些有代表性的特征出现了。图解的细节指的是半个葡萄糖单位通过柠檬酸周期而降解。从6个连续脱氢步骤上方的面积总和计算此过

氢供体 <sup>a</sup>	氧化-还原单位(伏特数) <sup>b</sup>		氧和水系统间的绝对电位差 (伏特数) <sup>c</sup>
	水系统 <sup>d</sup>	磷酸系统 <sup>e</sup>	
磷酸甘油醛	-0.1	0.2	1.33
丙酮酸	-0.35	-0.05	1.58
异柠檬酸	0.13	—	1.10
酮戊二酸	-0.35	-0.05	1.58
琥珀酸	0.43	—	0.80
延胡索酸-苹果酸	0.25	0.55	0.98
总数			7.37伏特
理论值			7.46 <sup>d</sup>

a.对异柠檬酸和酮戊二酸,这里暂时分别地用羧基丁酸<sup>[4]</sup>和丙酮酸<sup>[11]</sup>电位表示。至于氧化-还原电位的其他值,参看格林的论文<sup>[4]</sup>。

b.参考电位:氢电极pH7。

c.水系统和磷酸系统指的是水合的和相应磷酸化的双键,例如磷酸甘油醛的水合物和磷酸甘油醛磷酸<sup>[9]</sup>。水系和磷酸系间氧化-还原电位的差别大致恒定,并等于高能磷酸键的伏特当量。最近计算出乙酰磷酸的键能约为15千卡<sup>[10,12]</sup>,大体上相当于0.3伏。此值适用于主要与键的产生有关的计算。平均能稍低,为12千卡或0.25伏,该值最好用于周转计算。在有些情况下,确实起反应的脱氢系统多少武断地被推测为磷酸型,连接线通过磷酸系统画出。在这些情况下,图中垂直线连接了水和磷酸系统的电位点,表示能量转化。连接电位的线段上面的宽空白区表示其大部分能量仍未能说明(参见图2)。

d.由半个分子葡萄糖的燃烧热343千卡计算,相当粗略的近似电位和燃烧热之间的一致性是值得注意的。如果要准确些,应把磷酸丙酮酸非氧化磷酸键的电位值0.25伏加到氧化-还原电位总值中去。

程，可得总能量为  $6 \times 57 = 342$  千卡，此值实际上和碳水化合物燃烧的理论产值一致。中间体的脱氢电位几乎对称性地在氢电位周围摆动。

和目前的常规相反，把 pH 7 的氢电位当作参考电位，它与呼吸氢供体的“平均”电位相符。以常规的方式标绘氧化-还原电位， $E_0'$  作为该系统在 pH 7 时的正常电位和大气中的氢气在 pH 0 时的电位之差。也就是作为一条无意义的零位线，人为地通过琥珀酸/延胡索酸的电位，后两者的电位略低于 pH 7 时氢和氧的电位间的中点。

遗憾的是，按照已确立的氧化还原规则，所有绘出图的数值，愈靠近氧就愈低，以这样的方式来描绘一个呼吸过程，意义是不明确的。当表内列出的电位为最大正值时，呼吸过程中化学电位愈靠近氧则愈低，最终随氧的减少而消失，那时所列出的电位达到最正值。

作为流程模式的特点，分别出现了两个主要流程线。代表底物分解代谢的线滑行在一个近似等电位的通路上，氢与它成直角，这是在脱氢的途中释放给氧的。至今，在底物分解代谢领域中已取得了最大的进展，已能画出切实可行的图解。然而像柠檬酸循环那样的图解，并未提供供氢期以外呼吸性能量转变的化学通路的信息。底物通路所能提供的信息仅仅限于来自负载着位能、可马上利用的、被释出的电子。这样，我们就能从图中了解到氧和 6 个脱氢步骤中每一个步骤间的电位差别。6 个脱氢步骤可归结为 1 个丙糖的全部氧化过程，其平均值非常接近氢氧电位的数值。换句话说，碳水化合物在总体上类似于二氧化碳和分子氢的混合物所起的反应。



大体上，把呼吸过程看作是同一单位过程的重复系列是

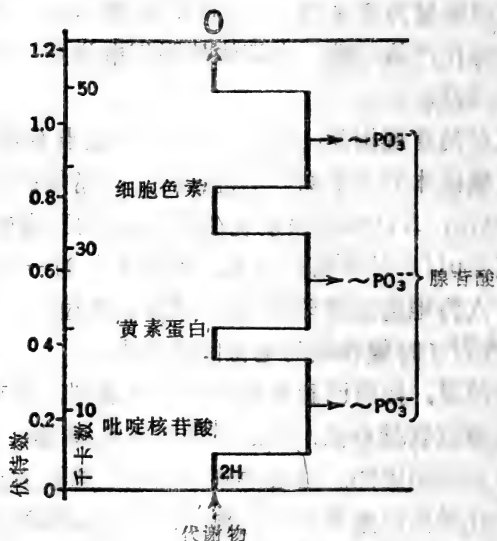


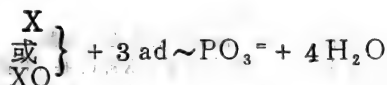
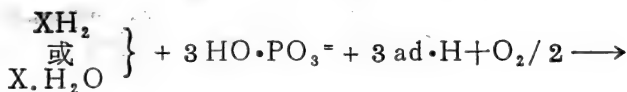
图2 电子电位转换成磷酸键能  
 此图说明在图1中底物流程线上方空隙处的能量亏空。采取适用于本章示意图I描述的那种迂回周期形式，可获得更加详尽的图象。

合理的。这样的单位本质上是一个氧-氢电池。此单位进一步分解，如图2所示，它不仅可以代表碳水化合物的呼吸作用，而且还可以代表其他底物的呼吸作用。

以空间尺度绘制电位梯度图形，使我们在图上近似地定出那些预期电子电位在那里转换为磷酸键能的区域。将氧耗和由此产生的磷酸化作用作粗略比较<sup>[1, 8, 15]</sup>，知道把一对氢电子由底物转运到氧可能产生3个高能磷酸键。高能磷酸键的每个键平均含12千卡，这等于一个双电子系统的0.25伏的幅度。氧和一对平均底物氢原子之间可利用电位是1.2伏，这个电位跨度理论上可容纳1.2/0.25（约4.8）或4个高能键。此计算固定了产生电位的上限，并显示出实验值恰好在

此限度内。

在图 2 的特定图解中，只是通过从电位梯度中连续切掉 3 个 0.25 伏部分，就对实验中 3 个磷酸键的产生作出合理的说明。这样的绘图毫不含糊地引出了如下的结论，在 +0.1、+0.5 和 +0.9 伏左右电位水平上，以 pH 7 的氢电极为参考，氢电子对连续 3 次可被化学方法截断，这些化学方法在催化条件下把几个 0.25 伏的部分转换为高能磷酸键。这就把氢转移的过程分解为 3 个较小的单位；在这里我们碰到的或许是为呼吸能量转移而设计的催化系统的最小单位。应该把这 3 个，或许是 4 个，装入到氢电子通路中的转换器看成是生物的真正能量发生器。极为重要的是，这些转换器系统看来基本上不依赖于特殊的氢供体，这种对底物没有依赖性的催化剂对转换所起的作用，可以说明磷酸键是如何在越来越多样的氧化作用中产生的。例如在硫杆菌属中的硫的氧化作用<sup>[16]</sup>，氢氧反应<sup>[3]</sup>以及脂肪酸氧化作用<sup>[13]</sup>。归结起来，我们可以说磷酸键的产生，不管氢供体的类型如何，都可用下列反应式表示：



$$\text{平均} \Delta F_0, (3 \times 12) - 57 = -21 \text{ 千卡} \quad (2)$$

反应式 (2) 表示磷酸和腺苷酸的参与常常是一般氢转移催化作用的反映，而不是脱氢作用的特殊例子。

转换器催化剂作用在 0 和 +1.2 伏范围内的 3 个 0.25 伏的间距，其化学性质留待进一步研究。我们知道的羧基化合物，在最低的电位水平部分地具有转换器的功能<sup>[9]</sup>，下列的

概括或许可说明有类似之处：催化剂应使磷酸分子有机会加到一个双键上。从加成产物中除去一对电子以产生高能磷酸键。这一步骤没有或几乎没有能量的丢失。腺苷酸的氢交换到磷酸基上要给细胞提供12千卡，其残留产物可再次氢化。此阶段包含偿还所提供的12千卡(0.25伏)，最终必然再次产生双键。按推测，约0.1伏的电位水平可分配到1个羰基双键上。其后约0.5伏的水平对于1个C:C双键可能是适宜的。最后，抗坏血酸类型的双键出现时，可能具有高电位水平。示意图 II 中 C:C 双键，用示意的方式随意画出所述类型转换单位的轮廓。

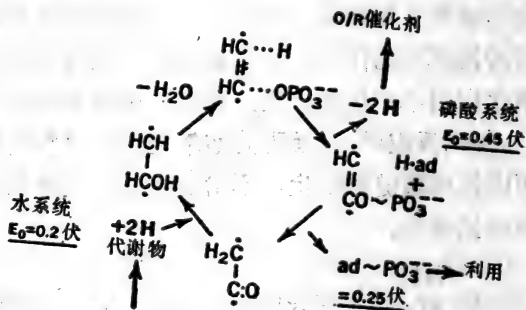


示意图 I

电子电位转换成磷酸键能的催化转换器。

稍加修饰即可适用于任何 C:X 型的双键，X 可以是 O 或 NH。此系统的主要特点是交替地把水和磷酸加到双键上。从底部开始顺时针方向转动，我们可以把循环过程分为 4 个步骤。第一步，借水系统的氢化作用，每摩尔转换器至少负载 0.25 伏。第二步，还原了的水系统通过交换反应变为磷酸系统。第三步，在关键的反应里，磷酸系统的脱氢作用将电子位能转换成磷酸键能，而电子位能损失不多。第四步，相当于 0.25 伏的键卸给腺苷酸，使此系统恢复到原来的状态。

示意图 III 是呼吸的简要图解。在空间投影图中，两个能场占据两个方向，第 3 个能场则分配给最初代谢产物的等电位

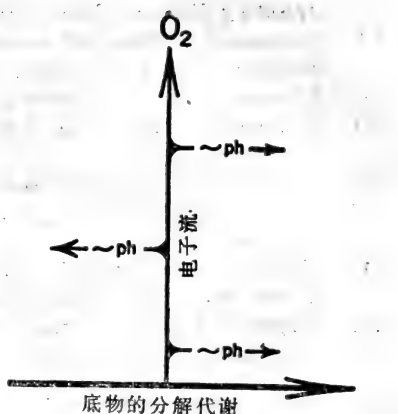
流。实际上,这些电场和磷酸化电位场并不是均匀的,而是通过氢和磷酸转移的化学专一性得到沟通,而酶的专一性则以连接插头的方式起作用。

这篇论文的主题是为了提醒人们,当生物体的化学连续性被割裂后,我们面临的重大任务是把这些断片重新组

合成一个整体。“与其说是一连串的个别状态或分割开的断片,倒不如说是一种转变,与其说是一个个连续的位置或停顿点,倒不如说是一种运动。为了懂得这种连续状态。我们必须把自己的立足点放在这种转变的运动上,从中更直接地来考虑问题〔2〕。”

### 参 考 文 献

- 1 Belitzer, V.A., and Pshikova, E.T., *Biokhimiya*, 4, 518 (1939).
- 〔2〕 Bergson, H.L., *Creative Evolution*. Modern Library, New York, 1944.
- 〔3〕 Gaffron, H., *J.Gen.Physiol.*, 26, 241 (1942).
- 〔4〕 Green, D.E., *Mechanisms of Biological Oxidations*. Cambridge, Univ.Press, London, 1940.
- 〔5〕 Hougen, O. A. and. Watson, K. M., *Chemical Process Principles*. Wiley, New York, 1943.
- 〔6〕 Kalckar, H., *Biochem.J.*, 33, 631 (1939).
- 〔7〕 Lipmann, F., in *Advances in Enzymology*, Vol. I. Interscience, New York, 1941, p.99.
- 〔8〕 Lipmann, F., "Pasteur effect" in *A Symposium on Re-*



示意图Ⅱ  
呼吸能量周转的流程简图。

*spiratory Enzymes*. Univ. Wisconsin Press, Madison, 1942.

- [9] Lipmann, F., "Biological oxidations and reductions," *Ann. Rev. Biochem.*, 7, 1 (1943).
- [10] Lipmann, F., *J. Biol. Chem.*, 155, 55 (1944).
- [11] Lipmann, F., and Tuttle, L.C. *J. Biol. Chem.*, 154, 725 (1944).
- [12] Meyerhof, O., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 45, 357 (1944).
- 13 Muñoz, J. M., and Leloir, L. F., *J. Biol. Chem.*, 147, 355 (1942).
- [14] Noble, E., *Purposive Evolution*. Holt, New York, 1929.
- [15] Ochoa, S., *J. Biol. Chem.*, 151, 493 (1943) ; 155, 87 (1944).
- [16] Vogler, K.G., and Umbreit, W.W., *J. Gen. Physiol.*, 26, 157 (1942).



### 三、生物合成的机理<sup>①</sup>

F. 李普曼

马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院生物化学教授，马萨诸塞总医院生物化学研究实验室主任

看来，在生物合成领域内用进展的例子难以说明这一问题简单的。不久以前，生物合成机理在我们这里还显得极其复杂。其间对代谢能量周转途径的进一步了解却大大地有助于打开这扇大门。认识到活的机体在代谢合成中倾向于利用一种标准型的化学能（磷酸键能）<sup>[1]</sup>，极大地减少了这种复杂性。标准能源的利用预示这些过程有着某些一致性。

细胞组成成分千差万别，要弄清所有这些化合物的合成过程看来是一项极其繁重的任务。但是，假如我们开始把注意力集中在原始环节上的话，我们就会发现不同类别化合物间的联系是非常相似的。在细胞物质无穷无尽地反复制造的过程中，我们发现基团间不断地排除水分子。在这些经过分子间脱水的缩合反应中，最常见的反应物就是羧基。较普遍的是通过羧基的活化生成酯键和肽键。这些键形成时输入的能量在脂肪、蛋白质或其他地方都非常相似，大约为3000卡<sup>[2]</sup>。

如上所述，在代谢机制中，磷酸键是用作贮存和转移能量的一种方式。可利用的能量首先加工成每个约含15,000卡的

① 转载自The Harvey Lectures, Series XLIV, 1948—1949, Copyright 1950, Courtesy of Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill.

高能磷酸键，并分配至ATP-ADP系统，可能还有其他系统，其广泛适用性的关键或关键之一是高能磷酸键的酸酐性质。这使得ATP有可能成为所有这些能排出水的缩合反应的通用试剂。这一概括的说法在有羧基参与的反应中，可以更准确地加以描述。最初的反应是在羧基和磷酸之间形成酸酐。由于观察到它还往往在形成更大的碳结构的碳碳缩合反应<sup>[8]</sup>中出现，这种羧基活化作用作为最初反应的适用范围增加了。试用图1将磷酸键能在蛋白质及脂肪合成中的作用加以说明：<sup>[1]</sup>

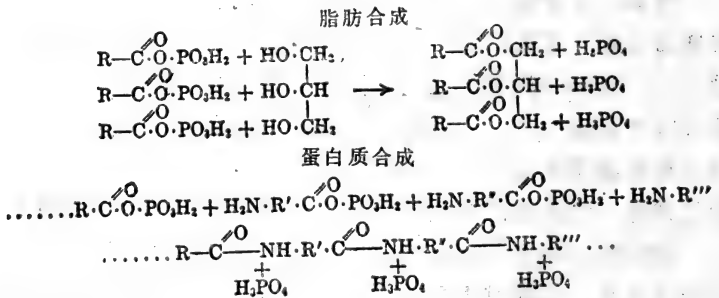


图1 脂肪及蛋白质合成的图解(1941)。

我在研究碳水化合物的部分反应即丙酮酸氧化时，碰巧是从羧基的活化问题上开始<sup>[4,5]</sup>。在某些微生物系统中，发现了一个乙酰磷酸化合物，即乙酸和磷酸的酸酐<sup>[6,7]</sup>。我们先观察到在丙酮酸氧化时产生可传递给腺苷酸的高能磷酸键，最后着手于乙酰磷酸的分离<sup>[8,9]</sup>。这项研究那时比较重要，因为它代表一个人们所熟知的机理，借助这一机理，呼吸反应产生高能磷酸键。这个发现预示了在能量代谢中磷酸键形成的普遍性。

起初，以为这是我们原来在发酵反应中观察到的另一种

磷酸化合物。然而比向高能磷酸库提供磷酸更为重要的是，乙酰磷酸有可能将其有机部分用于生物合成。像罗马二面神珍妮斯 (Janus) 的头一样，这个分子看来能在两个方面起作用。

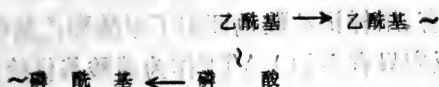


图 2

表1列出一个老的实验作为磷酸酯转移反应的文献。说明磷酸基从乙酰磷酸转移给AMP形成ATP。早年的实验<sup>[9]</sup>表明了乙酸和AMP系统之间反应的可逆性。这种磷酸基的转移极广泛地存在于许多微生物中<sup>[9,10,11]</sup>，后来还在肝提取液中观察到<sup>[12]</sup>。但是，当我们开始去解决这个更有兴趣的乙酰基供给的问题时，遇到了相当大的困难。

表 1 与乙酰基结合的磷酸向腺苷酸的转移<sup>[9]</sup>

所有数据均为微摩尔数。乙酸磷酸酯人工合成品的加入量为15微摩尔，只在N<sub>2</sub>环境中孵温。

孵温时间	腺苷酸加入量	P <sub>7</sub>	P <sub>3.0</sub>	P <sub>1</sub>
开始时		2.1	15.0	4.0
60分钟后	15.6	8.0	2.9	10.0
60分钟后	0	2.1	6.9	12.1

P<sub>7</sub>表示当量HCl, 100℃水解7分钟时的P<sub>1</sub>释出量。

P<sub>3.0</sub>为用李普曼及塔特尔第一法<sup>[8]</sup>测定的乙酰磷的量。

P<sub>1</sub>表示无机磷。

用乙酰磷酸酯进行了大量的探索试验都没有发表，因为全都是阴性结果。乙酰乙酸的合成及柠檬酸的合成在组织匀

浆中进行,但结果也是阴性。较为鼓舞人的结果是从与所谓磷酸裂解反应可逆性有关的细菌系统中得到的,于是研究了丙酮酸裂解成乙酰磷酸和甲酸或二氧化碳和氢的反应。特别是,用碳标记的甲酸很容易地就由甲酸和一个乙酰前体合成了丙酮酸<sup>[13]</sup>。再有,用标记乙酸也证实了甲酸和乙酸的重结合反应,但是此反应只有在加入ATP作为磷酸基供给体时才能较大量地发生(表2),而外加人工合成的乙酰磷酸看来并不影响丙酮酸的再合成。

表2 乙酸和甲酸缩合成丙酮酸时对ATP的依赖性

<sup>13</sup>C-乙酸, <sup>13</sup>C百分超为5.6,在有或无ATP的条件下与丙酮酸及甲酸在大肠杆菌提取液中孵温。

丙酮酸羧基中 <sup>13</sup> C的百分超	ATP
0.03	—
0.15	+
0.24	+

那时我对乙酰基的活化已经非常有兴趣了,为了得到这方面的更多的知识,我就转而研究芳香胺的乙酰化作用。从分析角度来看,这是一个很合适的系统,因为有一个很敏感的方法可用来测定氨苯磺胺类化合物。经过艰苦的摸索和一些失败之后,终于发现鸽肝匀浆和提取液在乙酰化反应中有异乎寻常的活性<sup>[15]</sup>。但将人工合成的乙酰磷酸加入此系统中作为乙酰供体,却显不出活性来。由于在这种组织提取液中有一个高活性的乙酰磷酸酯酶<sup>[16]</sup>,可以迅速地分解乙酰磷酸,这一结果就显得不清楚了。但如果匀浆的活性很大,至少就可以发生一定程度的乙酰反应。然而这个结果再次证实,人工合成的乙酰磷酸无活性。同样,在脑匀浆中用乙酰磷酸使

胆碱乙酰化的试验结果也是阴性的。

而当时，纳赫曼佐恩早已在研究神经活动过程中胆碱的乙酰化反应，他那时不大注意乙酰磷酸，而遵循着一般的概念认为在乙酰化反应中磷酸键应该起作用<sup>[17,18]</sup>。他把乙酸和ATP一起加到脑提取液中，发现出现了旺盛的乙酰化反应。当他把乙酸和ATP加到芳香胺的乙酰化反应系统中去时，乙酰化反应也进行得非常好<sup>[18]</sup>。表3显示了有ATP及作为乙酰基供体的乙酰时肝匀浆中氨苯磺胺的乙酰化反

表3 通过ATP的无氧结合<sup>[18]</sup>

将1毫升匀浆样品与0.03摩尔/升碳酸氢钠在瓦勃氏瓶中充以通过灼热的氧化铜的含5%CO<sub>2</sub>的N<sub>2</sub>, 37℃条件下孵温。所有瓶中含终浓度0.02摩尔/升乙酸，反应开始时加入90微克氨苯磺胺及氟化钠。从两个侧管中注入等量的ATP，第一个侧管中的ATP在反应开始时注入瓶中，第二个侧管在反应15分钟后注入。全部孵温时间为30分钟。

实验号	NaF (摩尔)	ATP (毫克P <sub>i</sub> )		氨苯磺胺结合量 (微克)	备注
		加入量	剩余量		
1	0.08	0.32	0.16	49	新鲜匀浆
	0.08	0	0	9	
	0.02	0.32	0.09	37	
	0.02	0	0	5	
2	0.02	0.32	0.08	57	同批匀浆 冻结过夜
8	0.02	0	0	15	不同批匀浆
	0.02	0.32	0	28	

应<sup>①</sup>。

## 乙酰化反应的辅酶

在用鸽肝提取液研究氨苯磺胺的乙酰化反应时，意外地

表4 透析或自溶导致的乙酰化系统的可逆性失活<sup>[15]</sup>

将处理过或未处理过的鸽肝提取液置于开口的细试管中，37℃水浴中孵温。管中含1毫升提取液，反应总体积为2毫升。氯化镁和乙酸钠浓度0.02摩尔/升。提取液与激活剂加在一起，在与水浴中温度达到平衡后，加入含0.32毫克磷的ATP、88微克氨苯磺胺及终浓度为0.05摩尔/升的氯化物以开始反应。

提取液的处理	煮过的组织滤液 (校正至湿重克数)	氨苯磺胺结合量 (微克)	孵温时间 (分钟)
未处理	—	69	65
7℃保存16小时	—	7	40
	0.2克大鼠肝	58	
7℃透析16小时	—	0	65
	0.2克大鼠肝	42	
未处理	—	59	50
	—	0	
7°—10℃保存16小时	0.4克大鼠肝	28	50
	0.4克鸽胸肌	14	

① ATP加乙酸出现活性的情况中，乙酰磷酸都明显地无活性，这在一段时间里常使我们去考虑，ATP-乙酸的反应产物在某些方面不同于人工合成的乙酰磷酸的可能性。但是，多次想证明ATP-乙酸反应产物不同于乙酰磷酸的尝试都失败了。在不同的细菌提取液，特别是大肠杆菌的提取液中，这种产物大量地生成。分离此种产物最后总是获得一个与人工合成的乙酰磷酸不能区别的化合物。

现在看来<sup>[20, 42]</sup>，假如把某些微生物的蛋白部分加进动物组织提取液里，人工合成的乙酰磷酸将把乙酰基供给氨苯磺胺的乙酰化反应及其他以辅酶A为媒介的反应。引起活化的因子看来与催化一个依赖于CoA的乙酰磷酸和无机磷的酶平衡反应的成分是一样的<sup>[19, 21]</sup>。这种平衡似乎只可能通过一个催化剂的媒介，暂时地将乙酰基结合成高能键。负载着乙酰基的CoA-酶复合物很可能是直接的乙酰基供体。

解决了利用代谢中的乙酸这个难题。看来有一个辅酶参与这个过程<sup>[15]</sup>。经过透析或久置后，酶溶液失去乙酰化的能力，而在加入煮过的提取液后，活性又得以恢复（表4）。没有一个已知的辅酶可以代替这个因子，因此便试图对这个显然是新的辅酶进行分离。

在纯化过程中，发现这个新的辅酶，即辅酶A，是泛酸的一种衍生物<sup>[22]</sup>。使胆碱乙酰化反应活化的也是这个辅酶<sup>[23]</sup>。与此同时，纳赫曼佐恩及贝尔曼(Behrman)<sup>[24]</sup>，费尔德伯格及曼茵<sup>[25]</sup>也观察到胆碱乙酰化反应需要一个激活剂。我们发现他们的激活剂就是辅酶A。一个纯化的辅酶

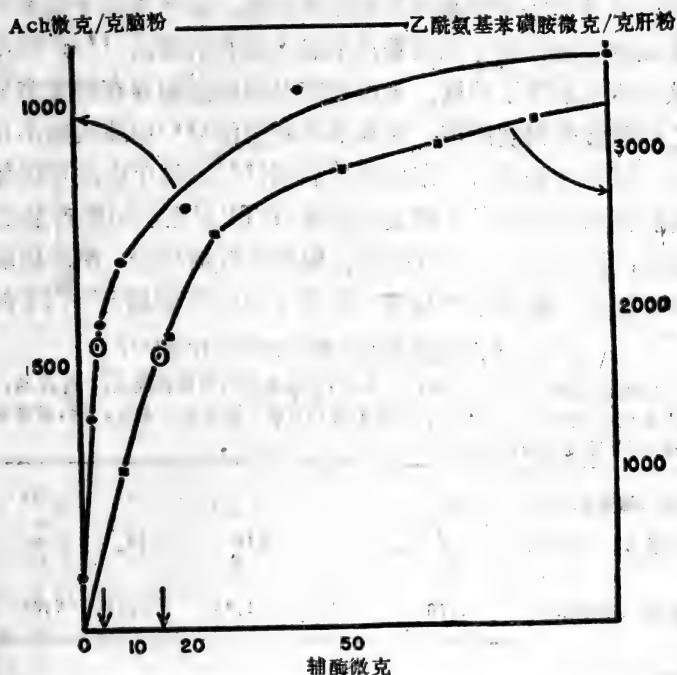


图8 同批纯化的辅酶制品对久置鸽脑提取液中胆碱的乙酰化反应及久置的鸽肝提取液中氨基苯磺胺乙酰化反应激活效应的比较。

制品对脑组织中胆碱的乙酰化反应和对肝组织中氨苯磺的乙酰化反应有同等的效力，这一结果用图 3 表示。

### 羟胺作为活化羧基的捕获剂

在乙酰基的研究过程中，羟胺与活化羧基的特殊反应用得相当多，在这里我愿意对这个非常有用的反应加进几句评论。塔特尔和我<sup>[26]</sup>在研究乙酰磷酸时曾观察到，加入羟胺后，磷酸几乎立刻在非酶反应中释出并形成羟脲酸。羟脲酸在酸性溶液中与铁生成人所共知的深紫颜色，可以用于乙酰磷酸或其他任何酰基磷酸的定量测定。由于用这个简易的酰基测定方法代替了以前繁琐的磷酸差异沉淀法<sup>[17]</sup>，这个领域的研究加快了进展。无机磷或其他磷酸酯存在时常常影响乙酰磷酸的精确测定，而在这个新方法<sup>[26]</sup>中该问题不存在了。而且羟胺可以用作酰基捕获剂<sup>[27]</sup>。这个办法可以显示鸽肝提取液中有一个原发的乙酸-ATP反应，可能产生乙酰磷酸，而后立即被羟胺捕获。假若没有捕获剂，鸽肝提取液中便没有乙酰磷酸的集聚<sup>①</sup>。表 5 表明了依赖于 ATP 的

表 5 鸽肝提取液中乙酸的磷酸化作用<sup>[27]</sup>

1 克鸽肝丙酮干粉加 10 毫升 0.02 摩尔/升碳酸氢钠溶液提取之，离心后，取其上清液 0.5 毫升加于试管中。37℃ 孵温 60 分钟。总体积 1 毫升。A 样品含 0.02 摩尔/升经过中和的盐酸羟胺。

乙酸 (毫摩尔)	10	3	1	—	10
活动性 ATP (毫摩尔)	10	10	10	10	—
羟脲酸 (毫摩尔)	1.76	1.77	1.35	0.90	0.38

① 现在发现组织提取液中促进利用乙酰磷酸的微生物酶<sup>[28]</sup>，反过来也催化鸽肝提取液中有 ATP 及乙酸存在时乙酰磷酸的积聚。



羟脂肪酸生成反应。在这个酶系统中，乙酸的高亲和力值得注意。最在意义的是辅酶A参与了乙酸的活化。

图4更清楚地表明辅酶A对羟脂肪酸生成的作用，并将此作用与同一提取液中氨苯磺胺的乙酰化作用做了比较。

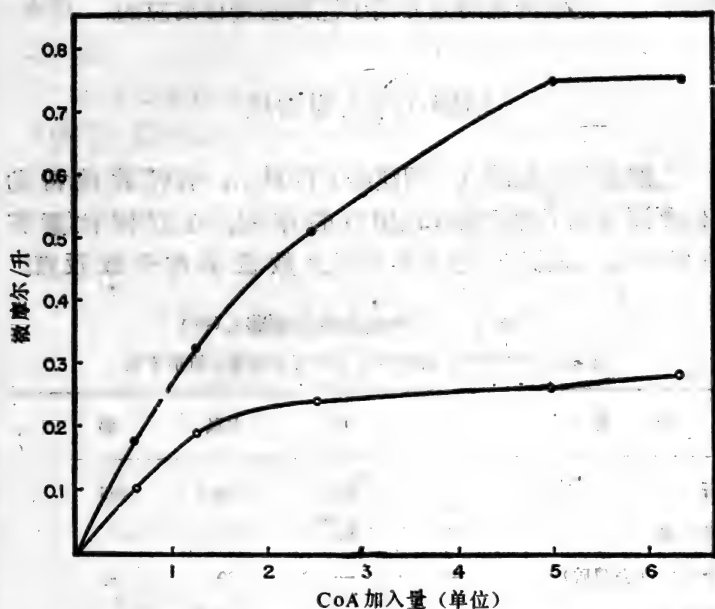


图4 同一鸽肝提取液中，辅酶A对乙酸借ATP生成羟脂肪酸及氨苯磺胺乙酰化反应的影响。

- 形成的羟脂肪酸
- 乙酰化的氨苯磺胺

最近，在谷氨酰胺的合成研究中，羟胺显示出作为活化羧基捕获剂的更广泛的用途。像乙酰化反应一样，谷氨酰胺合成也是一种依赖于ATP的反应。斯佩克 (Speck) [28] 的鸽肝提取液的实验同我们的乙酰化实验以及埃利奥特 (Elliott) [29] 的脑提取液实验相似的结果证明了这一点。由于可以用羟胺代替氨并可用比色法测定所生成的谷氨酰羟

脲酸，就有条件进行这个反应的研究了。氨苯磺胺的乙酰化反应和谷氨酰化反应在酶反应机理上的相似性并不太令人感到意外，因为在这两个例子中都涉及肽键的形成<sup>[3]</sup>。但是直到现在还不能证实辅酶A参与谷氨酰胺的合成。可能是因为这个含有泛酸的辅酶是专用于乙酰基转移反应的。

### 辅酶A的主要功能

乙酸活化与辅酶A（即泛酸）的联系，有成效地帮助我们更深入地了解乙酸在代谢中的作用。通过同位素实验<sup>[43,44]</sup>，表明这个分子参与了为数极多的合成反应。

表 6 动物组织中的辅酶A<sup>[30]</sup>

所有数据均为每克新鲜组织中含有的辅酶A的单位数

器 官	人	兔	大鼠	鸽
肝	—	112	132	105
肾上腺	—	65	91	—
肾上腺（去髓质）	—	—	79	—
肾	—	50	74	—
脑	—	40(皮层)	28	40
心	—	26	42	45
睾丸	—	26	—	—
小肠	—	—	26	—
胸腺	—	—	20	—
骨骼肌	—	6	—	—
血浆	0	—	—	—
红血球	8—4	—	—	—

另一方面，所有细胞中大量存在着辅酶A<sup>[80]</sup>（表6），可与细胞内泛酸相等同<sup>[81]</sup>，说明此辅酶在代谢中具有重要的功能。它在乙酰化反应中的功能（这种功能曾有助于对它的识别）可能只是一个次要的侧面，但对这一反应的研究已经表明，在有二碳化合物残基参与的各种反应中，有一个共同的前体。

**乙酰乙酸的合成** 碳与碳通过羧基活化而相连的第一个例子，即丙酮酸的合成在前面已经讨论过了。如下式所示，乙酰乙酸的合成像丙酮酸合成那样，是一种不损失能量的分子间的去磷酸化反应，磷酸键中的能量用于二碳的联接，并释出无机磷酸<sup>①</sup>。

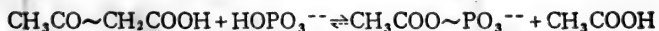
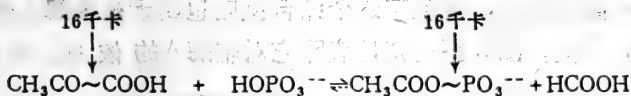


图5 丙酮酸及乙酰乙酸的磷酸裂解及其相应酮酸的可逆合成的比较。在逆方向中的虚线箭头表示磷酸裂解反应的逆行，很可能不是通过直接的可逆反应。

早年对由两个乙酸分子连结成一个乙酰乙酸所需的能量做过一个粗略的计算<sup>[16]</sup>，约为16,000卡，非常接近于酰基磷酸键可被利用的能量。

最近苏达克（Soodak）和我<sup>3</sup>证实确实发生了这种反

① 后来用<sup>14</sup>C标记羧基的乙酰磷酸<sup>[20]</sup>，在有过量无活性乙酸存在的条件下所做的各次实验表明，此图解是不完全的。鸽肝制剂与微生物克氏梭菌（*Clostridium kluyveri*）酶（作为乙酰磷酸利用时的媒介物）合用。在催化合成中，乙酰磷酸羧基<sup>14</sup>C在乙酰乙酸的羧基和羧基上同等地出现，乙酰磷酸的双标记必然意味着有两个分子的乙酰磷酸参与了乙酰乙酸的合成。磷酸平衡实验进一步证明，每一个分子乙酰乙酸的缩合伴随着两个分子乙酰磷酸的分解。

**表7 肝提取液中乙酸缩合为乙酰乙酸的酶促反应**

每个样品用1毫升40—70%饱和度硫酸铵所沉淀的部分纯化制品,相当180毫克干肝粉。总反应体积3毫升,其中含0.01摩尔/升半胱氨酸、0.1摩尔/升碳酸氢钠及其他所标明的添加物。38℃孵温2小时。

	0.02摩尔/升乙酸		同 左	同 左	同 左
	0.01摩尔/升 ATP		但无CoA	但无ATP	但无乙酸
	40单位CoA/毫升				
乙酰乙酸(微摩尔)	3.2	3.3	0.1	0.2	0.3

应。同样是在提供了许多合成酶系统的鸽肝提取液中,加入了ATP和乙酸便生成乙酰乙酸。这一实验见于表7,特别令人高兴的是,发现了这个缩合反应也属于被辅酶A催化的反应一类。图6更清楚地表明它对辅酶A的依赖。在此同

从乙酸合成乙酰乙酸鸽肝制剂 + CoA.

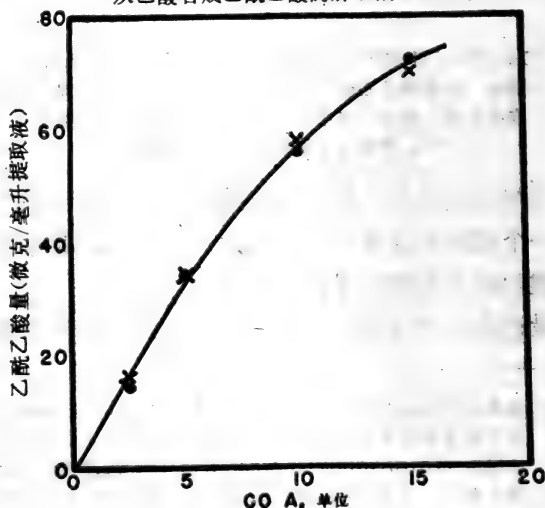


图6 鸽肝提取液中乙酰乙酸的合成对CoA的依赖性。(本实验使用40—70%饱和度的硫酸铵沉淀的蛋白部分。)

时，斯塔特曼 (Stadtman) 及巴克 (Barker) [22] 在脂肪酸合成的研究中发现了它的可逆反应，即在 *Clostridium kluyverii* 提取液中，由乙酰乙酸通过酸裂解生成乙酰磷酸和乙酸的反应。

乙酰乙酸的缩合反应值得注意，因为它代表着一种相当基本的代谢反应。在许多实例中，好像乙酸作为组成更大的分子结构的部件时，先进行此种类似的缩合反应。在图 7

中，我们试图把注意力集中到两个乙酸之间“头尾”反应的一些突出的特点上：头即羧基，在初步反应中被高能磷酸化合物活化，携带其保留的能量，贮存在  $-\text{CONH}_2-$  键中。值得注

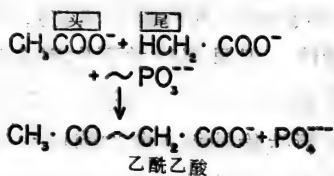


图 7

意的是  $-\text{CONH}_2-$  和  $-\text{CO}\sim\text{OPO}_3$  的键能相当。现在还不十分清楚另一乙酸的甲基，即尾部，是否也像在柠檬酸合成中那样需要活化。

区别乙酸头及尾的活化已经证明对乙酸缩合反应进行分类非常有用。在这个基础上，我们可以区分三

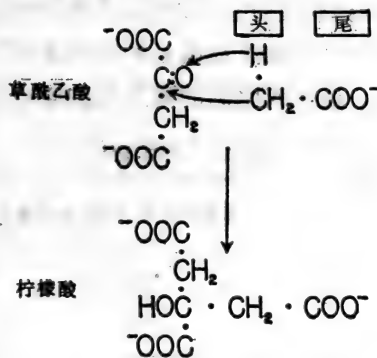


图 8

种类型的反应 [1]：一种头型反应，如在氨基、芳香胺 [18]、组织胺 [20] 以及胆碱 [24, 25] 的单纯乙酰化反应中所遇到的那样；一种头尾型反应，如在乙酰乙酸缩合反应 [26] 中遇到的

那样，还有一种就是单纯的尾型反应，像在柠檬酸合成中那样。后者示意于图 8。在所有这三种类型的反应中共同的因素是辅酶A的参加。

**柠檬酸的合成** 柠檬酸合成属于这类反应的证据，在一段时间里是间接地从缺乏泛酸的生物有机体实验中得来的。很早以前，蒂格 (Teague) 和威廉斯<sup>[84]</sup>猜想糖代谢中有此维生素的参加。后来多尔夫曼 (Dorfmann) 等<sup>[85]</sup>及希尔斯 (Hills)<sup>[86]</sup>的实验证明摩氏变形菌 (*Proteus morgani*) 的丙酮酸氧化过程中有泛酸参加，更支持了这种看法。但是那时关于作用点的问题还不能进一步确定下来，而且在一段时间内这个发现还多少成了一桩有趣的奇闻。泛酸衍生物辅酶A参加酶催化的乙酰化反应以及此辅酶的广泛分布，促使我们去寻找乙酰活化作用的共同因素，以便把丙酮酸引入柠檬酸循环。希尔斯的工作对这种解释已有所启示。

诺维里和我<sup>[87]</sup>首先采用多尔夫曼的生物体，希望找到辅酶A含量和丙酮酸氧化之间所期望的那种关系。实验结果见表 8。奥尔森 (Olson) 及卡普伦<sup>[88]</sup>用肝切片证实并发展了这些观察结果，发现在丙酮酸利用率和辅酶A水平之间有着惊人的平行关系。他们在泛酸缺乏及恢复的不同条件下做出的实验结果概括于图 9。这条成比例的直线指向原点意

表 8 外加泛酸对呼吸及辅酶A含量影响的比较<sup>[87]</sup>

	Qo <sub>2</sub>	辅酶A含量(单位/克干重)。
加丙酮酸	5.9	130
加丙酮酸及泛酸	10.2	520

味着没有辅酶A的存在，肝脏也就没有丙酮酸的代谢。但是

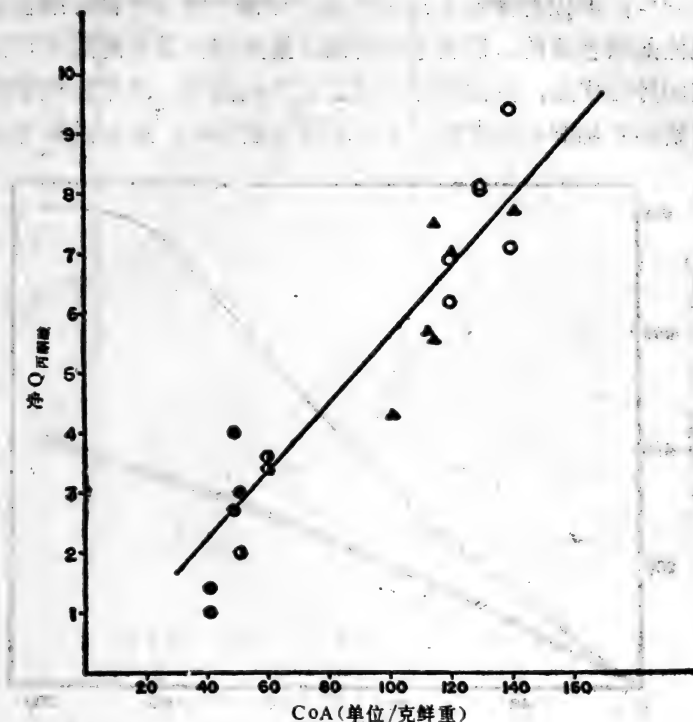


图9 鸭肝切片中丙酮酸的利用对CoA含量的依赖性

下列符号代表不同组的鸭子，

●——食物中缺乏泛酸，

▲——食物中缺乏泛酸，在观察前1—2小时腹腔注射10毫克泛酸钙/100克体重，

⊙——食物中缺乏泛酸，在试管内外加泛酸，

○——正常对照，随意进食。

从这两个例子中，进一步精确地确定其作用点起初遇到了困难。

因此我们把注意力转向具有明显的乙酸代谢的生物有机体上，即选择一个能使乙酸代谢相当快的酵母株<sup>[39]</sup>。以前采用同位素标记乙酸已经证明酵母的乙酸代谢经过柠檬酸循

环〔40〕，所以用酵母来进一步证明辅酶A参与柠檬酸缩合的说法是很合适的。制备了含辅酶A量多和含量少的两个可比较的酵母样品，并试验它们代谢乙酸的能力，结果发现呼吸率紧随着辅酶A的水平上下而增减（图10）。更有说服力的

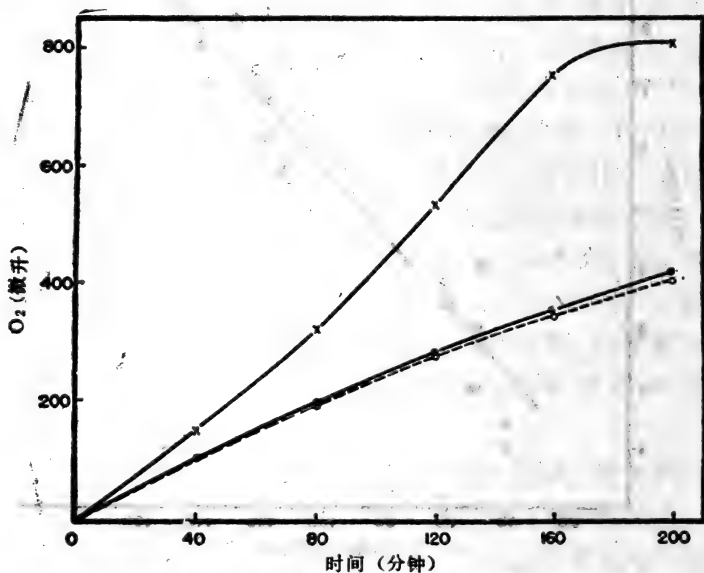


图10 CoA对酵母中乙酸氧化的作用。（实验条件与表14同）

×—× 先与泛酸解温

·—· 先与烟酸解温

··· 先与硫胺素解温

是乙酸的呼吸反应对辅酶A的需要可以用以乙醇为底物的实验显示出来。实验对呼吸和乙酸的积聚同时进行追踪。从图11中可看到，在实验的前一段，有足够的辅酶A时，只是暂时有少量的乙酸积聚，而在缺少辅酶的酵母中，虽然呼吸受到抑制，但乙酸仍然持续地增多，乙醇的氧化停止在乙酸阶段。



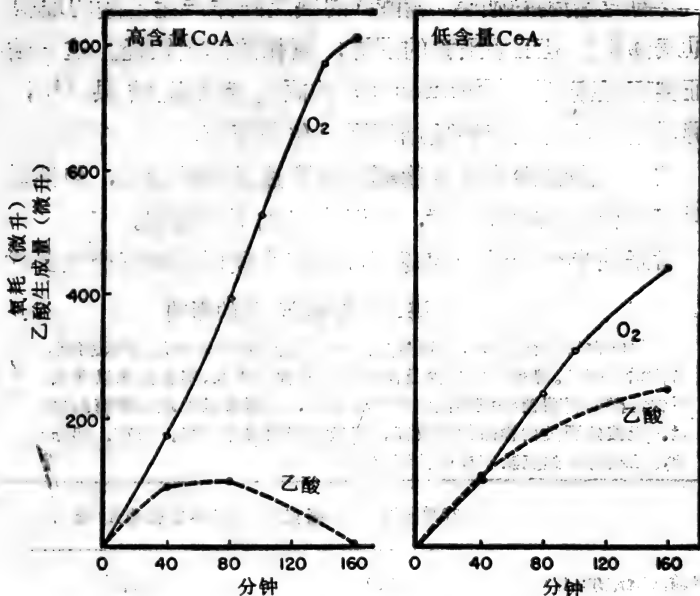


图11 CoA对酵母中乙醇氧化的作用。  
以乙醇为底物，比较CoA对氧消耗和乙酸堆积的作用。用苏  
达克及李普曼的乙酸酶促微量测定法 (*Fed. Proc.*, 7 :  
190, 1948) 跟踪乙酸的生成。

葡萄糖

↓ 烟酸  
酶

丙酮酸

↓ 硫胺素  
酶

乙酸 + CO<sub>2</sub>

↓ 泛酸  
酶

柠檬酸循环

图12 参与早期糖代谢的维生素示意图。

以葡萄糖为底物时，辅酶A的缺乏同样产生乙酸的堆积（见表9）。但正如预料的那样，氧耗的抑制较轻。这一结果证实了温豪斯（Weinhouse）的同位素试验结果<sup>[40]</sup>，即酵母通过乙酸及柠檬酸循环而氧化葡萄糖。

估计泛酸在碳水化合物氧化主要途径中的功能，包括其他具有同样功能的维生素，可以得出如下的概貌。

看来使半个分子的葡萄糖进入柠檬酸循环的三个主要代

表9 辅酶A对葡萄糖呼吸的影响

每管含4.2毫升酵母，5微摩尔/升磷酸二氢钾及5微摩尔/升葡萄糖，总体积8毫升。酵母原在有少量泛酸存在条件下生长，实验前先以含或不含泛酸的葡萄糖磷酸盐液处理1小时，数据表示处理后辅酶的含量。泛酸处理过的样品含量较高。实验在华勃瓶中进行。37℃、80分钟，乙酸用苏达克及李普曼法测定。

	370单位辅酶A/毫克	135单位辅酶A/毫克
氧耗(微摩尔/升)	-15.9	-11.7
乙酸堆积(微摩尔/升)	0	+2.5

谢步骤中的每一个步骤都必须精心制作一个专一性的催化剂。第一次脱氢反应用吡啶核苷酸，第一次脱羧和第二次脱氢的偶联用脱羧辅酶，而二碳单位与草酰乙酸的缩合则用辅酶A<sup>①</sup>。

① 在这个讲演之后，我们关于辅酶A参加柠檬酸合成的间接证据已经在分离的酶系统实验中得到证实。斯特恩（Stern）和奥丘阿<sup>[41]</sup>使用我们以前从鸽肝提取液中制备的硫酸铵沉淀部分<sup>[3]</sup>进行了由草酰乙酸、乙酸及ATP合成柠檬酸的实验。他们发现只有在加入辅酶A的条件下才显出较高的活性。显然，他们的实验表明初步的缩合反应生成的产物是柠檬酸，而不是异柠檬酸或者顺乌头酸。

同一时期，我们实验室的诺维里<sup>[42]</sup>用酵母及大肠杆菌的提取液得到了类似的结果。有点意外的是发现在大肠杆菌提取液中，人工合成的乙酰磷酸作为乙酰基的前体，要比ATP加乙酸优越得多。此反应依赖于辅酶A的存在。

表10 乙酰磷酸合成柠檬酸的实验<sup>[42]</sup>

总反应体积2.5毫升,其中含1毫升经过透析的大肠杆菌提取液;各管中均含0.025摩尔/升草酰乙酸, pH8.0, 30℃孵温1小时。所加诸成分的终浓度如下: 乙酸, 0.05摩尔/升; ATP, 0.02摩尔/升; 乙酰磷酸锂, 0.004摩尔/升; 辅酶A, 17单位。

加入成分			柠檬酸合成量(微摩尔/升/毫升提取液)
乙酸	ATP	—	0.23
—	ATP	CoA	0.50
乙酸	ATP	CoA	1.32
乙酰磷酸		—	0.25
乙酰磷酸		CoA	4.0
乙酰磷酸 + 乙酸		CoA	3.9

现已证明鸽肝提取物以细菌酶补充后, 从乙酰磷酸-草酰乙酸也能合成柠檬酸<sup>[42]</sup>。

## 提 要

上一节中阐述了乙酸根离子从基础水平经过活化生成乙酰供体的机理。这种活化是通过与ATP反应而发生的, 这个反应使乙酰残基的能量提高到15,000卡。图13表示了乙酰磷酸同各种其他化合物之间的关系, 其中乙酰基参与代谢。

我们看到乙酰基可以在高能量水平上被带来带去, 也可以降低到一个酯或者一个肽键的低能量水平。在后一种情况下, 原来的乙酰化合物中大量的能量都被降解。这些乙酰基的能量水平与以前叙述过的磷酸基能量水平<sup>[1]</sup>相似, 这点是很重要的。不同形式的高能乙酰基相当于高能的磷酸酯。与乙酰基相连的酯或氨基也处于像低能量磷酸酯那样水平,

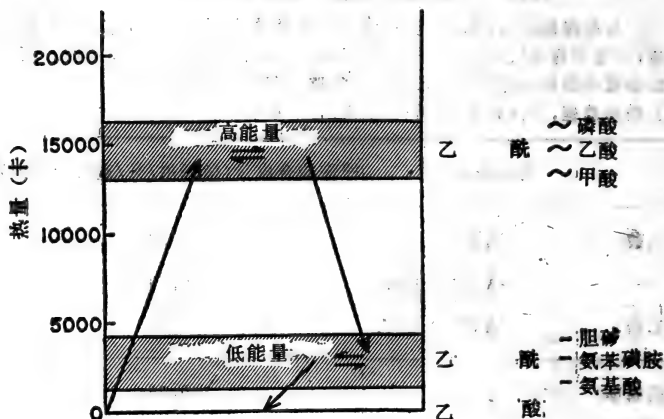


图13 乙酰基的电位。

在这个基团电位表中，乙酸及无机磷酸的离子分别代表各自的基础水平。

乙酰基在乙酰磷酸、乙酰乙酸及丙酮酸之间转移而产生能量的可能性，通过乙酰磷酸或ATP加乙酸合成丙酮酸或乙酰乙酸而被证实。有相当多的证据，特别是同位素实验的证据<sup>[43, 44]</sup>说明从丙酮酸及乙酰乙酸可以发生直接的乙酰化作用。因此，要考虑没有磷酸酯的参与，乙酰基就可从这些酮酸转移的可能性。蔗糖和葡萄糖-1-磷酸作为活性葡萄糖来源时的互换能力可以看作有机化学键之间直接交换基团的一个例子<sup>[45]</sup>。乙酰基和无机磷酸之间的交换示踪实验<sup>[19]</sup>也证明有这种交换发生。这种交换的速度在德氏乳杆菌、丁基梭菌 (*Clostridium butylicum*) 及大肠杆菌的提取液中快慢不一。在丁基梭菌中很快，几分钟内即交换完全。这种交换虽然只在粗提取液中初步研究过，但表明可在没有加入能携带磷酸进入代谢周期的接受体的条件下发生，也不因外加上述接受体而受到影响。

与杜道罗夫(Doudoroff)、巴克和哈西德(Hassid)〔48〕的推论一致,可以假定这种交换有一个乙酰化的酶产生,它是与乙酰~磷酸,乙酰~乙酸或乙酰~甲酸(丙酮酸)反应时衍生出来的中间产物,它们都同样可将~乙酰基交给酶。这样,与蛋白质或辅酶反应后,乙酰基仍保留着过剩能量的事实,就可以解释进一步反应时丙酮酸和乙酰乙酸的乙酰基为什么可以直接被利用。研究辅酶A具有乙酰载体的功能的问题是一件相当有诱惑力的事①。这个乙酰转移系统将帮助我们从目前关于乙酸和乙酸前体相当混乱的同位素实验数据条理化起来〔44〕。

很可能辅酶A在所有涉及到乙酸或高能乙酰基合成大分子的反应中都起作用。图14列举了从C<sub>2</sub>残基引伸出来的两

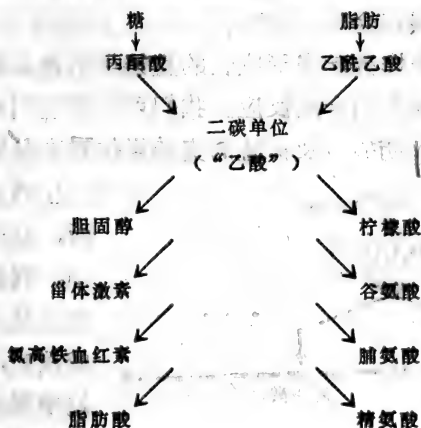
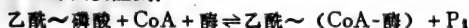


图14 二碳单位衍生出来的合成产物

① 这一解释已得到了实验的进一步证明。观察到乙酰基结合的磷酸和无机磷酸之间的交换是在与辅酶A有关的酶系统的参与下进行的〔21〕。

下面即其反应式:



乙酰辅酶A-酶复合物目前看来是所谓的活性C<sub>2</sub>残基最近似的化学结构。

个主要代谢途径。我们认为，我们对这两个途径中的一些初发反应已经知道得相当多，如乙酰乙酸和柠檬酸型的缩合反应。在卟啉及嘌呤中二碳单位的原始联系尚待研究清楚，但这里所报道的更有趣的结果之一是我们在较大的含碳结构分子的生物合成领域中，看来已获得较稳固的立足点。尤其是因为在此以前完成了的仅仅是小分子化合物的酶促合成的研究工作。

我们懂得了两个乙酰基是怎样连接成乙酰乙酸的，而斯塔特曼和巴克<sup>[46]</sup>用克氏梭菌 (*Cl. kluyveri*) 制品，进一步发现了乙酰磷酸与己酸六碳链的氢之间的酶促合成反应。因此假定硬脂酸、软脂酸及其他脂肪酸的长链是许多乙酰基连接起来再通过还原作用而生成的说法是合理的。这告诉了我们直的碳链合成的机理。

相同的分子排列起来形成长的直链虽然是基本的，但却也是相当原始的生物合成反应。我们可以把它叫做单向合成。但是直链脂肪酸以及折叠的支链甾体看来是来源于同样的

的乙酰原件。然而，在甾体例子中，我们接触到的至少是一个双向合成反应，问题自然就变得更为复杂（柠檬酸的合成可以看作是一个乙酰侧链接到一个直的碳链上的简单例子）。

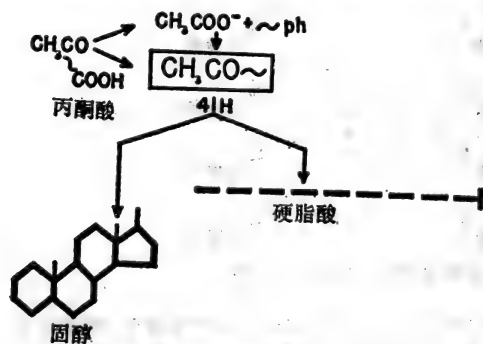


图15

甾体化合物和脂肪酸的并列，清楚地显示了这种必然进入甾体合成的添加式的结构形成方式（图15）。这里我们

研究的是一个最重要的生物合成问题，即由相同的或相似的单位形成特定的二维或三维结构的问题。

我们不仅把注意力特别集中到产生结构的问题上，而且也集中到同一结构持续地再生成的问题上。看来有一种发展趋势，即假定有一个空间模型或模板作为结构再生的模子。一些超级结构可能以这种方式加在已经形成的结构上。现有的经验(虽然复杂性较低或只有中等水平)对空间或模板样排列的说法并不见得有利，反而认为它们是一个一个地连接组装而成的结构，可能先生成直链而后再出现分支<sup>[47]</sup>和交联。我们认为更可能是大分子的结构多数像是编织成的，而不是压模成的，类似完成图样生产和再生产的人工程序一样。

我发现在相距很远的神经生理学领域中也出现了类似的型式，使我感到有些奇怪。艾德里安(Adrian)关于神经传导的著作中<sup>[48]</sup>，有一个关于视觉结构识别问题的有价值的论述。书中也探求在眼-脑联合中是否有时间或空间的机制起作用：以三角形为例，对此结构的识别将包括(1)落在脑的某个部位的一个模式或空间影象，(2)眼睛围绕三角形周围运动的动态过程。目前的研究结果看来更多倾向于借运动识别结构的动态的或时间的机制。这种情况说明研究中的普遍重叠现象，在迄今相隔甚远的生物学科中提出了非常相似的、解决方式也相同的各种问题。

### 参 考 文 献

- (1) LIPMANN, F., *Advances in Enzymology*, 1,99, 1941.
- (2) LIPMANN, F., *Federation Proc.*, 9, (in press).
- (8) SOODAK, M. and LIPMANN, F., *J. Biol. Chem.*, 175:999, 1948.
- (4) LIPMANN, F., *Skandinav. Arch. f. Physiol.*, 76:266, 1937.

- [5] LIPMANN, F.: *Enzymologia*, 4,65, 1937.
- [6] LIPMANN, F.: *Nature*, 144,381, 1939.
- [7] LIPMANN, F.: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biol.*, 7:248, 1939.
- [8] LIPMANN, F. and TUTTLE, L. C.: *J. Biol. Chem.*, 153,571, 1944.
- [9] LIPMANN, F.: *J. Biol. Chem.*, 155,55, 1944.
- [10] KOEPEL, H. J.; JOHNSON, M. J.; and, MEEK, J. S.: *J. Biol. Chem.*, 154,535, 1944.
- [11] UTTER, M. F. and WEBERMAN, C. H.: *Arch. Biochem.*, 5, 413,1944.
- [12] KAPLAN, N. O. and LIPMANN, F.: *Federation Proc.*, 7:163 1948
- [13] UTTER, M. F.; LIPMANN, F.; and, WEBERMAN, C. H.: *J. Biol. Chem.*, 158,521, 1945.
- [14] STRECKER, H. and WOOD, H. G.: *Federation Proc.*, 8,257, 1949.
- [15] LIPMANN, F.: *J. Biol. Chem.*, 160,173, 1945.
- [16] LIPMANN, F.: *Advances in Enzymology*, 6,231, 1946.
- [17] NACHMANSOHN, W. and MACHADO, A. L.: *J. Neurophysiol.*, 6,397, 1943.
- [18] NACHMANSOHN, D. and JOHN, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 158, 157, 1945.
- [19] LIPMANN, F. and TUTTLE, L. C.: *J. Biol. Chem.*, 158,505, 1945.
- [20] CHOU, T. C.; NOVELLI, G. D.; STADTMAN, E. R.; and, LIPMANN, F.: *Federation Proc.*, 9, 1950.
- [21] STADTMAN, E. R.: *Federation Proc.*, 9, 1950.
- [22] LIPMANN, F.; KAPLAN, N. O.; NOVELLI, G. D.; TUTTLE, L. C.; and, GUIRARD, B. M.: *J. Biol. Chem.*, 167, 869, 1947.
- [23] LIPMANN, F. and KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, 162, 743, 1946.
- [24] NACHMANSOHN, D. and BERMAN, M.: *J. Biol. Chem.*, 165, 551, 1946.
- [25] FELDBERG, W. and MANN, T.: *J. Physiol.*, 104, 411, 1946.
- [26] LIPMANN, F. and TUTTLE, L. C.: *J. Biol. Chem.*, 159, 21, 1945.
- [27] LIPMANN, F. and TUTTLE, L. C.: *J. Biol. Chem.*, 161, 415, 1945.
- [28] SPECK, J. F.: *J. Biol. Chem.*, 168, 403, 1947.



- [29] ELLIOTT, W. H.: *Biochem. J.*, 42: 5, 1948.
- [30] KAPLAN, N. O. and LIPMANN, F.: *J. Biol. Chem.*, 174: 37, 1948.
- [31] NOVELLI, G. D.; KAPLAN, N. O.; and LIPMANN, F.: *J. Biol. Chem.*, 177: 97, 1949.
- [32] STADTMAN, E. R. and BARKER, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 174: 1039, 1948.
- [33] ROSENTHAL, S. M.; MILLIGAN, R. C.; and, TABOR, H.: Private communication.
- [34] TEAGUE, P. C. and WILLIAMS, R. J.: *J. Gen. Physiol.*, 25: 777, 1942.
- [35] DORFMAN, A.; BERKMAN, S.; and, KOBER, S. A.: *J. Biol. Chem.*, 144: 393, 1942.
- [36] HILLS, G. M.: *Biochem. J.*, 37: 418, 1943.
- [37] NOVELLI, G. D. and LIPMANN, F.: *Arch. Biochem.*, 14: 23, 1947.
- [38] OLSON, R. E. and KAPLAN, N. O.: *J. Biol. Chem.*, 175: 515, 1948.
- [39] NOVELLI, G. D. and LIPMANN, F.: *J. Biol. Chem.*, 171: 833, 1947.  
NOVELLI, G. D. and LIPMANN, F.: *Federation Proc.*, 7: 177, 1948.
- [40] WEINHOUSE, S. and MILLINGTON, R. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 69: 3089, 1947.
- [41] STERN, T. R. and OCHOA, S.: *J. Biol. Chem.*, 178: 491, 1949.
- [42] NOVELLI, G. D. and LIPMANN, F.: *J. Biol. Chem.*, 182: 213, 1950.
- [43] BLOCH, C.: *Physiol. Rev.*, 27: 574, 1947.
- [44] GUBIN, S. and CRANDALL, D. I.: *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biol.*, 13: 118, 1948.
- [45] DOUDOROFF, M.; BARKER, H. A.; and, HASSID, W. Z.: *J. Biol. Chem.*, 168: 725, 1947.
- [46] STADTMAN, E. R. and BARKER, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 180: 1117, 1949.
- [47] CORI, G. T. and CORI, C. F.: *J. Biol. Chem.*, 151: 57, 1943.
- [48] ADRIAN, E. D.: *The Physical Background of Perception*, Oxford, Clarendon Press, 1947.

## 四、尝试以化学电位表达生物

### 利用能量的公式<sup>①</sup>

F. 李普曼

纽约州纽约市洛克菲勒研究院

化学和生物学的定义正在越来越趋于一致。在这种情况下，命名学有时需要对一些沿用的共同概念做一些相互适应的调整。细胞化学是非常特殊的技术学的一部分，这个领域往往和纯化学相离很远。因此“高能”键这个术语和符号~<sup>[1]</sup>在生物学上就是指细胞代谢中的能量单位。这些术语和符号被具有生物学头脑的化学家们广泛采用，正说明在细胞化学文献中需要有这样的表达方式。

同时在引伸及规范高能键所负载的能量的定义时，也引进了基团电位这个术语<sup>[1]</sup>，因为采用电位量度来描述能量代谢中的某些时相比较合适<sup>②</sup>。我常常感到，假如能使用一个电极测量基团单位，我们对细胞代谢中能量周转机制的了

① 转载自 *Molecular Biology*, D. Nachmansohn, Ed. Copyright 1960. Academic press, Inc., New York.

② 我情愿用我原来建议用的术语即基团电位，而不用最近克洛茨 (Klotz)<sup>[2]</sup>建议采用的基团转移电位。起初我建议测量基团电位用以表示一个化学键中可利用的能量或者形成一个化学键所需要的能量。这与水解反应中自由能的变化数量相等而符号相反。现在在这个问题上我改变看法，愿意遵循习惯用法，并把基团电位和水解时释出的自由能的变化等同起来。我感到 $\Delta F$ 为负值时，实际上获得一个正值的涵义。因此，我毫不犹豫地来用较高和较低基团电位的说法，它似乎意味着负性多一些或负性少一些。

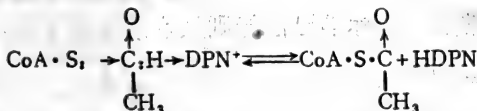
解就会变得容易一些。譬如ATP的磷酸基电位或乙酰辅酶A的乙酰基电位，如同测量氧化还原(O/R)电位那样。在呼吸和磷酸化的偶联机制中，我们确实将O/R电位和磷酸基电位相互转换。而在研究转换机制时，以电压量度表示磷酸基电位往往更加方便<sup>[3]</sup>，记住在二电子系统中①，10千卡磷酸基电位约等于0.2伏是有用的。

基团电位和电子电位间的互换性看来与偶联反应学说有关。这一点已经由克雷布斯及科恩伯格(Kornberg)说明<sup>[6]</sup>，这种相互转换对从不同水平O/R到基团电位的转换的场所应该有所限制。一旦转换成基团电位，能量就偏离氧化还原阶梯的按比例效应，而产生一种结果，就其转换而论我喜欢称之为对不同氧化还原水平的攀登。这就可说明一般涵义，即在大多数情况下，解偶联剂是全或无试剂，在饱和浓度时，将在整个阶梯中消去偶联。这还需要更彻底的研究，但显示了将电位量度引伸到细胞代谢整个能量领域中的优越性。

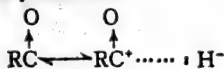
① 借助氢和基团电位的交换而引进来的基团取代了底物中的氢。下面是一个反应例子<sup>[4]</sup>，



若用下式表示，则更加清楚：



因此看来引进的基团供给酰基以基团电位、给出氢离子，氢作为一个单位转移给DPN。这是我们从维尼斯伦德(Vennesland)及韦斯特海默(Westheimer)的工作中知道的<sup>[5]</sup>。我认为此式表示在偶联机制中，从“解离作用”中衍生出一个酰基(acylium)来：



也解释了来自双电子转移的乙酰、磷酸或其他基团电位的衍生作用。

我曾打算用电压量度来表示全部的基团电位<sup>①</sup>，现在我仍然认为在生物学家的头脑里，假如采用这一量度方法，对于细胞代谢所有时相里占优势能位的基团电位的作用，将会更加易于理解。但是因为它是一个虚构的量度单位没有实验的等量物，所以保留“卡”的量度单位看来较为明智。细胞能位常常是一个基团电位，在被利用的时候，一般从磷酸基电位衍生而来。我认为假如对这一点更加注意，将有助于了解细胞的能量。

### ATP磷酸基电位的某些特性

反应电极不能利用使人感到惋惜，其中一个突出的原因是目前在测量基团电位上有困难。根据定义，一个基团电位是对某种结合中的一个基团的活化程度的量度，以区别于我们称作基态或游离的化合物。在我们这个特殊的例子中，指无机磷酸(P)。基团活化的量度可以从它向基态的转化而求出，在我们的例子中，即ATP末端的磷酸通过水解转化成无机磷酸。当然基团电位愈高，水解过程中释出的能量就愈多，或者在脱水逆反应中所需的能量也愈多。仅有的可利用的基团电位的数值几乎都从测量水解和脱水的化学平衡中得来，即水解常数。而标准自由能则从水解常数求得：

$$\Delta F^{\circ} = -RT \times \ln K, \quad K = \frac{\text{ADP} \times \text{P}}{\text{ATP}} \quad (1)$$

在非标准情况下求 $\Delta F$ <sup>(2)</sup>，下列推导将包括这种情况中

① 这里的许多论点都是狄克逊(Dixon)在他的出色的小册子《多酶系统》<sup>[7]</sup>中提出的。我感到对他的讨论未能引起太多的重视，部分地是由于他所建议的磷酸基的量度方法不方便，是从rH量度借用过来的。这个量一度曾被门斯费尔·克拉克(Mansfield Clark)试用过，但后来又废而不用了。

最重要的方面。它引进一个简化了的依赖于pH的函数，并按30℃折算：

$$\Delta F = F^\circ - 1400 \log \frac{[ATP]}{[ADP]} + 1400 \log [P] - 1400 \log \left( 1 + \frac{K^*}{[H^+]} \right) \quad (2)$$

我发现下述事实很有意义，但据我所知，它并不那么受到人们的重视。这就是系统中可能衍生出的能量主要取决于ATP/ADP比率，或磷酸化——去磷酸化商值。正如O/R电位取决于O/R比率，或者氢离子电位取决于缓冲商一样。图1中的曲线显示了典型的S形性质，中点为标准

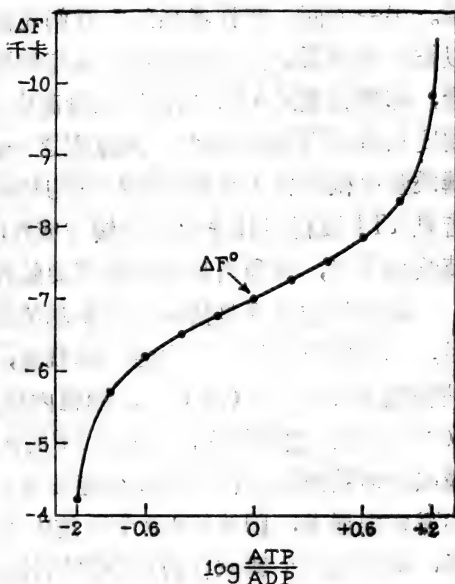


图1 自由能对ATP/ADP比率的依赖性。假定 $\Delta F^\circ$ 为7千卡，用方程式(2)的中间项进行计算。由(1)直接推导(2)时，此项为 $+1400 \log (ADP/ATP)$ 。采用 $-1400 \log (ATP/ADP)$ 的形式是因为它较好地说明了磷酸基电位的概念。

电位，表示磷酸化合物及去磷酸化合物的量相等。这条曲线可以看作是用一个磷酸基电位远高于ATP/ADP的磷酸基供体对ADP的电位滴定曲线。假如有一个磷酸基电极的话，那么这个滴定曲线的中点将给出ATP/ADP系统的

标准电位。十分明显，这里对磷酸化系统的描述也将适用于乙酰化系统或任何其他类似的系统。

图1中可见ATP/ADP比率为1:100及100:1时的差别有5.4千卡之多。恒态下的正常细胞里，磷酸键的生成及其利用间的良好平衡用ATP/ADP接近1的恒定比率表示出来〔8〕。换句话说，磷酸基电位被很好地“缓冲保护”着。另一方面，在许多系统中我们还需要均匀地供给磷酸基以推动合成反应。在生物合成反应的研究中有一个共同的经验，即催化量的ATP与供给大量高电位的磷酸基供体合用要比只有ATP时好得多。其原因之一是ATP/ADP比率及磷酸基电位在馈入系统存在时均匀地保持在较高的水平上。若是ATP被利用并进行性地转变成ADP，使得磷酸基电位持续地下降，被利用时的梯度将要陡得多。

由于标准电压是指磷酸酯摩尔浓度，故在任何低浓度时，都需要更多的能量去活化磷酸基，每个对数浓度单位多消耗热量1.4千卡（30℃）。细胞内磷酸酯浓度在 $10^{-2}$ — $10^{-3}$ 摩尔/升数量级内，增加ATP的 $\Delta F^\circ$ 约2.8—4.2千卡。磷酸酯对磷酸基电位的浓度效应在氧化磷酸化及糖酵解过程中必定很显著，因为P是这个系统中的一个组成部分。但是，磷酸在两个磷酸化衍生物之间转移时，它就抵消了。

艾伯特（Alberty）等〔9〕对ATP水解时 $\Delta F^\circ$ 对pH的依赖性做了极详尽的讨论，可得到如下的简化函数。当ATP水解时，ATP末端 $pK_2 6.5$ 改变为无机磷酸 $pK_2 6.8$ ，出现两个酸的函数，相当于ADP末端 $pK_2 6.3$ 及无机磷酸 $pK_3 11.8$ ，后者在生理学上可以忽略不计。这些都十分接近于 $pK$ 平均值为6.5的酸的函数，并引入方程式（2）的最末项中。图2经计算表明了pH的依赖性。

在pH7.5，磷酸酯浓度 $10^{-2}$ 摩尔/升时，磷酸基电位的

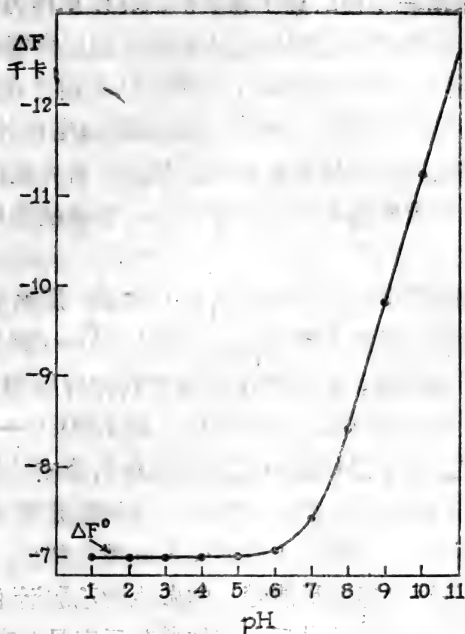


图2 ATP水解反应自由能对pH的依赖性。  
无机磷酸 $pK_{26.8}$ ，用方程式(2)的最末项  
进行计算。

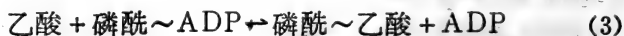
平均 $\Delta F$ 约为-11千卡，约比ATP/ADP系统的标准电位大-4千卡，最新的计算表明ATP/ADP的电位约为-7千卡<sup>[10]</sup>。

### 基团电位的定位

生物能的转换在ATP磷酰基电位为能量供体的基团活化例子中表明得很清楚。几乎每天我们都会感到这个能量供体的多样功能给我们带来的方便。因为细胞的酶装置有了它就明显地容易把磷酰基转化成其他基团电位，从而进行基团

活化。如果用一个羧酸离子频繁的活化作用作为例证，就会很容易认识这种活化过程的基本特性。通过高能磷酸酯而进行的能量转化涉及二磷酸酸酐中的 $P \cdot O \cdot P$ 转化成羧酸-磷酸混合酸酐的 $C \cdot O \cdot P$ 同时，ATP的高磷酰基电位转化成乙酰磷酰化物的同样高的磷酰基电位。然而，首先是由于磷酰基电位“转化”成酰基电位使能量复位，才能使能量的转化真正有用。

把能量的初步定位用符号( $\sim$ )表示，那么引起羧基活化的第一个酶促反应步骤的特点就是从 $PO \sim P$ 经酶催化到 $CO \sim P$ 的能量转化。然而为了使这种转化有用处，混合酸酐就必须作为活化的酰基参与反应，要不然 $CO \sim P$ 就必须变成 $CO \sim P$ 。由于从转磷酰反应的催化剂变成转酰基的催化剂，使分子能量重点产生了位移。这可能是两个不同的酶，或者是同一个酶蛋白上有两个不同催化部位。为了强调这一点，我将举已经解释清楚了了的微生物乙酸活化过程为例。此活化过程中转磷酰反应和转酰基反应是分离的，每个都有一个单独的酶在起作用。第一步被一个激酶所催化，使ATP末端磷酰基转移<sup>[11, 12]</sup>。此激酶催化下面的可逆反应：



这时这个激酶反应还只是获得一个潜在的活性乙酸。ADP现在的末端磷酸，即磷酰基原来的邻居，失去了能量通路，而且通过新产生的 $CO \sim P$ ，乙酸变成了磷酰基的新邻居和未来的电位接受分子，但在磷酸转移酶系统中它还不是实际上的电位接受分子。当有乙酰基转移反应催化剂<sup>[13]</sup>时，将催化如下反应：



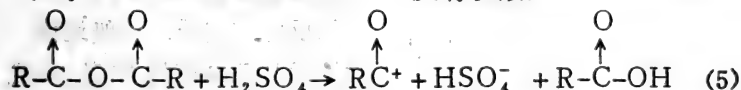
乙酰基的电位变得可以交换了。乙酰基转移酶作用在 $C \sim OP$



键，并促进乙酰磷酸及还原型辅酶A (CoASH) 间的乙酰基转移，从而获得乙酰基电位。在此第二步反应中，完成了能量的转移，也完成了磷酰基向酰基电位的转变。

综合上述情况，在一系列活化及转移反应中将要引进的基团明显地变了性质，即由被动转为主动，或者说由底物变成了试剂。在我们的例子中，第一步，乙酸是底物和能量受体，而ATP的磷酰基是试剂和能量供体。第二步，第一步中的磷酸乙酸变成了试剂乙酰磷酸。总的效应是乙酸转变成活化乙酸。

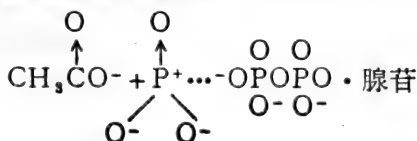
到此，我们详述了一种生物学能量转移过程，使用了~这样一个不确切的符号来表示最初的能量位置。如英戈尔德 (Ingold) 所述<sup>[14]</sup>，看来，乙酸或类似的酸酐溶于含有硫酸的无水溶剂中时所发生的普通反应，可以给此类基团活化的化学含义提供一个更加精确的定义。电导测定显示，酸酐与硫酸一起溶于溶剂时，生成完全离子化的酰基硫酸氢酯 (acylium monosulfate) <sup>[15]</sup>及有机酸：

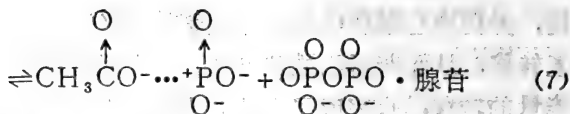


这种含酰基离子 (acylium ion) 的溶液，是一种非常强的酰化剂，由此可将一个酸酐以酰基酰酯 (acylium acylate) 的形式表述为：

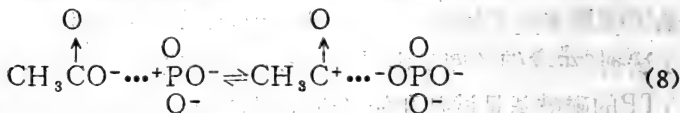


于是，我们提议用乙酸酯与ATP末端磷酰基离子的反应来表述乙酸酯向乙酰基的转化，即乙酸的活化：





这时混合酸酐围绕中心氧原子摆动：



磷酸基转移酶可使分子以磷酸酯供体的形式明显地稳定在左侧，而酰基转移反应使之以酰基供体的形式稳定在右侧。

给活性乙酸酯，或更广泛地说给作为酰基的活化酰基酯、作为磷酸酯的活性磷酸酯以及作为硫酸酯的活性硫酸酯下定义是很吸引人的事，这对一个带部分正电荷或具有潜在离子化倾向的基团电位作了更确切的叙述。在活化和转移这两个反应步骤中，起催化作用的酶亦将能在活化反应中对磷酸酯的交换以及酰基转移的利用中起催化作用。

我们认为，磷酸酯转移的活化反应的实质，一般地说，是具有电位的酰基的生成。如果把带正电荷的酰基或磷酸酯看作反应物，那么反应类型将是亲电子型的，而不是往常认为的那样是亲核型的。不管怎样，必须把这种反应描述为一种推-拉反应，因为总有酶催化剂参与这种反应，对供体分子直接施加强大的力量，或者更明确地说施加电子拉力。

## 结 论

将ATP定义为磷酸酯供体可以对这种能量转移系列有更清晰的理解，但对ATP参与了第一步以后所发生的反应我们还很不清楚，而这对使磷酸基电位转化成渗透功和机械

功是非常需要的。然而，最近关于具有类似生物合成机制的肌肉收缩的描述给人以希望，具体地说就是磷酸基转移到收缩蛋白上<sup>[16]</sup>。近来利维(Levy)和科什兰(Koshland)<sup>[17]</sup>的关于ATP与肌球蛋白反应后接着发生了磷酸基与水分子<sup>18</sup>O的交换实验，是这一描述的第一个令人鼓舞的实验证据。但情况并不简单，因为许多试图显示在收缩蛋白与ATP间发生磷酸基交换的实验都失败了。

在渗透功的研究中，试图证明与磷酸基转移机制有联系的尝试更糟糕了，仅仅从解偶联剂(如二硝基酚)浓度效应的破坏作用中看到一点这种联系的可能。关于渗透功与ATP磷酸基电位的偶联，任何轻易作出的化学解释至今都不能令人满意，需要找到新的办法。但是，尽管能量传递的连续性没有找到，而最初的能量从ATP磷酸基释出几乎是肯定的。只要能更好地了解这个能量，最终就会为解决目前这个看来是棘手的问题铺平道路。

### 参 考 文 献

- [1] Lipmann, F. *Advances in Enzymol.*, 1, 99 (1941).
- [2] Klotz, I. M. "Some Principles of Energetics in Biochemical Reactions." Academic Press, New York, 1957.
- [3] Lipmann, F. *In "Currents of Biochemical Research"* (D. E. Green, ed.), p. 137. Interscience, New York, 1946.
- [4] Burton, R. M., and Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* 202, 873 (1953).
- [5] Vennesland, B., and Westheimer, F. H. *In "The Mechanism of Enzyme Action,"* p. 357. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1954.
- [6] Krebs, H. A., and Kornberg, H. L. "Energy Transformations in Living Matter." Springer, Berlin, 1957.
- [7] Dixon, M. "Multi-Enzyme Systems." Cambridge Univ. Press, London and New York, 1949.
- [8] Lynen, F., Hartmann, G., Netter, K. F., and Schuegraf, A. *Ciba Foundation Symposium, Regulation Cell Metabolism,*

d.256 (1959) .

- [9] Alberty, R.A., Smith, R.M., and Bloch, R.M. *J. Biol. Chem.* 193, 425 (1951) .
- [10] Morales, M.F., Botts, J., Blum, J.J., and Hill, T. L. *Physiol. Revs.* 35, 475 (1955) .
- [11] Lipmann, F. *Advances in Enzymol.* 6, 231 (1946) .
- [12] Rose, I.A. In "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.) , Vol. 1, p.591. Academic Press, New York, 1955.
- [13] Stadtman, E.R., Novelli, G.D., and Lipmann, F. *J. Biol. Chem.* 191, 365 (1951) .
- [14] Ingold, C. K. "Structure and Mechanism in Organic Chemistry, " p.296. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 1953.
- [15] Gillespie, R. J. *J. Chem. Soc.* p.2997 (1950) .
- [16] Weber, H. H. "The Motility of Muscle and Cells. " Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 1958.
- [17] Levy, H. M., Koshland, D. E., Jr. *J. Biol. Chem.* 234, 1102 (1959) .

## 五、分子技术学<sup>①</sup>

F. 李普曼

纽约州纽约市洛克菲勒大学

我愿意从我开始从事生物化学工作的时候说起。那时人们对细胞结构有许多概念模糊的议论。瓦尔堡<sup>[27]</sup>在其早年关于呼吸作用的研究中提出一个预言性的假说，认为呼吸发生在胞浆和细胞颗粒之间的界面上。在克雷布斯和亨斯莱特(Henseleit)<sup>[9]</sup>关于尿素循环的经典性的论文里，有一段关于生物合成和结构关系的论述。他们发现肝提取物实际上是无活性的，因此作出结论，生物合成一定与细胞结构相联系。这种细胞结构就是线粒体，不参与尿素的合成。当人们开始了解能量的供给可以用ATP代替线粒体时，这个(尿素)循环就可以解析成一些能被可溶性酶<sup>[21]</sup>催化的反应序列。把这些酶放在一起，又可以获得整个反应。

最近，在全力研究多种酶的匀浆化和提取，结晶及特性鉴定之后，这些长的反应序列多已解决。从历史的角度上说，最重要的是从酵母中提取了酒精发酵的酶，以及从肌肉中提取糖酵解的酶。我想可以说酵母和肌肉的提取物基本上

---

① 转载自 *Organizational Biosynthesis*, H. I. Vogel, J. O. Lampen, and V. Bryson, Eds. Copyright 1967, Academic Press, Inc., New York.

是均匀的系统了，但令人惊讶的是这些酶任意碰撞就可以找到自己的底物，互相完成极为迅速的总体反应。然而，近年来对过分的匀浆化处理愈来愈不满意，应该认识到总要有个极限。越膜运转、多种大分子的合成以及复杂的生物合成途径都不是随机的过程，而必须依赖于细胞结构。近来用多种不同的词汇来表示这种结构，在这里插入一般简短的注解或许会对读者有所帮助（表1）。

表 1 与 结 构 有 关 的 用 词

随 机 的	结 构 的
均匀的	不均匀的
各向同性的	各向异性的，极性的
无向量的	向量的

解释一下我想说明的一点：有相当一段时间，我已经意识到，要了解氧化及磷酸化的偶联，对线粒体结构的进一步细分有助于对其中间反应过程的理解，但所知仍然有限。要把这些部分的反应组成一个整体，重要的是要认识到由于这个系统的各向异性（anisotropic）性质，它只能耐受有限的破坏<sup>[10, 20]</sup>，其技术操作取决于特别排列的大分子部件。

这里我想稍微离题说一点。我在《科学的美国人》杂志中看到许多工业广告里有“微型化”和“超微型化”的词汇。这表明人工技术学和活细胞的分子技术学有汇合的趋势。工程师们意识到他们还远不能制造一个像人脑那样精密的计算机，但他们有希望做到这点，值得羡慕。通过不时地

阅读他们的杂志，我看到他们把机器压缩得愈来愈小。我想举一个例子说明他们的开端是缓慢的。近代在电子学里发明了一种面积很小的印刷线路，比方说，只有邮票那么大，如图1所示。这就是我想到的近似于分子技术学水平的第一步。但在人工制造和生物体技术学之间仍存在着巨大的鸿沟。这种微型化距离埃( $\text{\AA}$ )的度量还很远，还只处在毫米水平。工程师们开始认识到形成这种鸿沟的原因之一是他们用五金器具工作，而机体则在含水系统中工作。

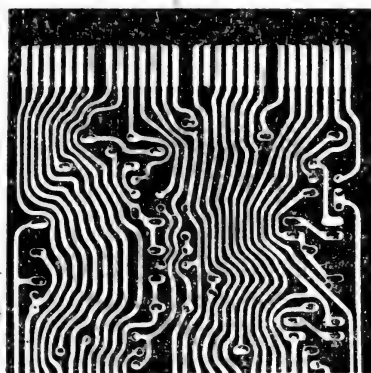


图1 印刷线路图<sup>[18]</sup>。

干系统和湿系统之间的差别在于后者专门从事于无限微型化过程。

现在回到主题上来，我将用几个重要例子来说明。概括地说，细胞内结构即非均一性反应系统的中心，可以分为两大类：一种是脂质和蛋白质融合在一起形成的膜样结构，另一种是主要由蛋白质组成的结构。后者包括核蛋白（如核糖体<sup>[20]</sup>及染色体）、与核糖体大小相似的蛋白颗粒（如脂肪酸合成的多酶系统<sup>[11]</sup>）和 $\alpha$ -酮酸氧化的多酶系统<sup>[13]</sup>。我想集中举一些膜类型的例子，因为我们对这种结构已经有了相当清楚的直观的资料。这结构的大小恰好在电镜分辨率以内，而正是电镜使我们了解到这些结构是如何在起作用的，因为我们借电镜看见了它们。但对一些小的颗粒如核糖体，这一点却还不容易做到。这也就是为什么我们未能先从结构的角度对其功能做出解释的原因。首先请看一张脂蛋白膜的

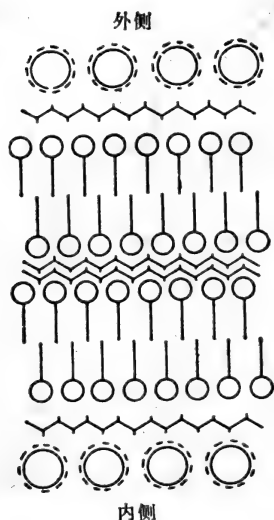


图2 在线粒体膜中两个磷脂双分子层和蛋白层的交错图<sup>[26]</sup>。

模式图(图2)。

这里可以看到两个磷脂双分子层，疏水的脂肪酸朝向膜内，而亲水的磷酸向着膜外，中间是蛋白层，夹在每侧有蛋白薄外衣的两个各向异性层中间。看这个膜的模式图时，必须分清膜内侧(下)和膜外侧(上)。图中所有蛋白质都象一些不清晰的肽链，使人产生彼此很相象的错觉。然而膜结构最重要的是其内侧和外侧的外衣及其中间的部分，都具有各自的特殊功能，这种差别产生了膜的极性。

我想说一个具体的例子。对曾经在我的实验室工作过的江桥(Ebashi)<sup>[3]</sup>博士所研究的骨骼肌松弛因子作一个分析。为了介绍肌肉的情况，我想先出示这张由一部蹩脚机器拍摄的、相当粗糙而且放大倍数也低的、家蝇飞翔肌的电镜照片(图3)。可以看到收缩纤维以及靠近它的向肌肉供给能量的肌粒(sarcosomes)。只能看到在这些线粒体内的模糊不清的结构，但现在这个问题已得到较好解决。沿着收缩纤维有帕拉德(Palade)<sup>[16]</sup>内质网(ER)，这是一个管状物形成的网状结构，不过在此图中看不出来。基利(Kielley)和迈耶霍夫<sup>[8]</sup>首先用超速离心方法分离出ER部分，发现它含有一个 $Mg^{++}$ -ATP酶，鉴别为是一种脂蛋白。江桥<sup>[3]</sup>后来发现这个部分含有松弛因子，伴随有一个与ATP有关的钙浓缩效应。他将这个因子悬浮在含有放射性钙的钙盐溶



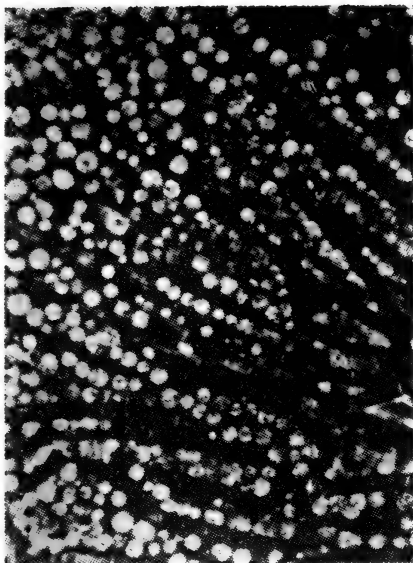


图8 家蝇飞翔肌的电子显微镜照片。



图4 含浓缩 $\text{Ca}^{++}$ 并具有松弛活性的家兔肌肉部分底层的电镜图<sup>[3]</sup>。V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub>表示小泡不同的切面。

液里，保温后离心，发现钙几乎全部浓缩在沉淀中。将沉淀做成切片，用电镜观察，见图4〔3〕。

我必须在此说明，这种管状物的匀浆有一个很对我们有利的特性，即可形成自我封闭的小泡〔10〕，很适用于功能方面的研究，因为它的内含物都封在里面了。图4中看到的小泡的剖面。有时可以看到双层的膜，反映了图2中的结构。这种小泡悬液的功能好像一个钙泵，因此它需要有完整的结构；用脱氧胆酸钠破坏脂质膜后， $Ca^{++}$ 的固定作用和松弛效应都消失了。江桥最初的兴趣是研究肌肉收缩后引起

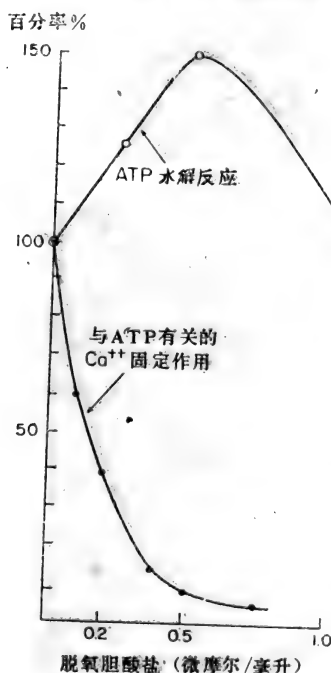


图5 脱氧胆酸盐对图4所示部分中的 $Ca^{++}$ 浓缩及ATP水解反应的影响。

纤维松弛的因素<sup>2</sup>；可能是由于钙的去除。他到我的实验室来的目的是要研究 $Ca^{++}$ 浓度和ATP水解的相互依赖关系。从图5可以看到经脱氧胆酸钠处理后，松弛活性及钙的固定作用都消失了。经过脱氧胆酸钠处理过的部分经电镜观察，发现像图4中的那些小泡结构不见了，只留下一个均匀的纤维层。另一方面，有意义的是在 $Ca^{++}$ 固定作用消失的同时，ATP酶的活性增高了。我们认为这意味着ATP从功能连接上解偶联了，因此其水解

加快。最后采用更高浓度的脱氧胆酸钠时，连ATP酶也消失

了。而四年前及

现在我说一说线粒体膜的问题，同时用费尔南德斯-莫兰 (Fernandez-Moran) 等人〔4〕所拍摄的、折叠到线粒体腔内的一个内嵴的高分辨率的电镜照片 (图6) 来说明它。这里可以看到门把手状的圆形结构与脂质膜相连，后来发现这个结构就是拉克厄 (Racker) 因子之一〔19, 20〕，即

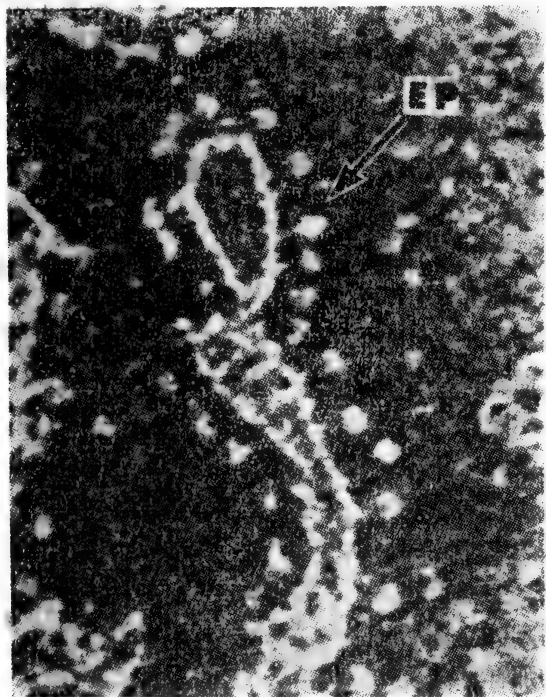


图6 牛心线粒体嵴的高倍放大电镜图〔4〕。EP代表基质颗粒

从线粒体分离出来的ATP酶。更确切地说，就是米奇尔 (Mitchell) 〔14〕用化学渗透学说解释氧化磷酸化作用中的各向异性可逆性ATP酶。这里，氧化磷酸化与电荷分离有

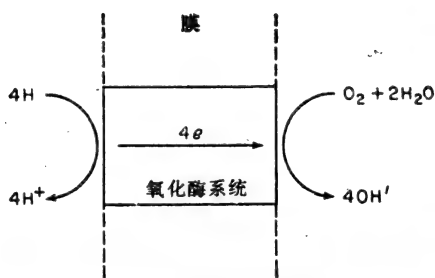


图7 呼吸导致电荷分离的模式图。电子穿越各向异性膜<sup>[12, 参见15]</sup>。

氢离子及氢氧离子被隔在膜的两侧。通过这一装置，把氧化还原电位转化成基团电位，最后转成磷酸基电位，呼吸作用产生的能量就可以被利用了<sup>[14]</sup>。

下面几张图是作为解释在能量转化中结构的作用例子。图8是我以前画的一张旧的简单示意图<sup>[6]</sup>。图中把交叉的电子流和基团的活化偶联起来，并认为它必定是可逆反应。要是反过来起作用，如上面所讨论过的那样，人们可看到~P驱动Ca<sup>++</sup>的浓缩泵。线粒体最重要的功能就会是将电子流转化为基团电位。米奇尔关于此点独出心裁的解释显示于图9，它启发了许多人的想象力。

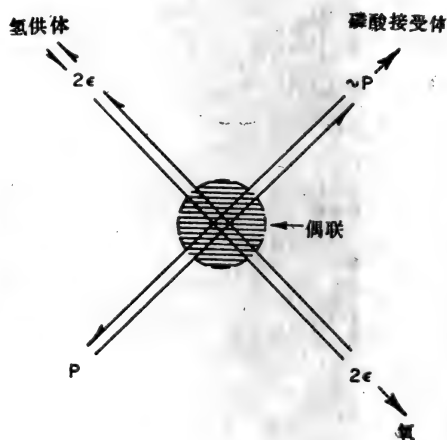


图8 偶联示意图

米奇尔<sup>[14]</sup>的这一张图可以说是第一个进展，在偶联机制的

研究中是一个值得欢迎的新转折，现在已经很好地被实验证实了〔7,24〕。我们可以从图的上半部分认出燃料库。下半部分它被一个“中和”装置，如图10所示，从无机磷酸上拉过来一个羟基（或许还通过一个中间产物〔14〕）与磷酸化反应偶联起来①。

最后，在转运蛋白质的例子里，我想回到膜的极化问题上。

许多机体都制造“出口”用的蛋白质。例如胰腺制造许多酶进入肠腔。雷德曼 (Redman) 等〔23〕研究胰腺淀粉酶分泌时，发现它会被直接合成进入分泌管。最近萨巴蒂尼 (Sabatini) 等〔25〕研究了一个类似的现象，即肝脏分泌

血浆蛋白的作用。彼得斯〔17〕早期的工作认为，主要在肝脏中合成的、被广泛详尽研究过〔1〕的白蛋白经过管道进入ER。这个转运机制已被萨巴蒂尼等〔25〕分析清楚了，他们在电镜下观察微粒体结构，发现如下的情况 (图

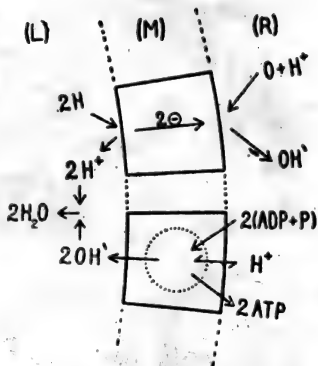


图9 米奇尔的呼吸电荷分离与磷酸化结合的示意图〔14〕。

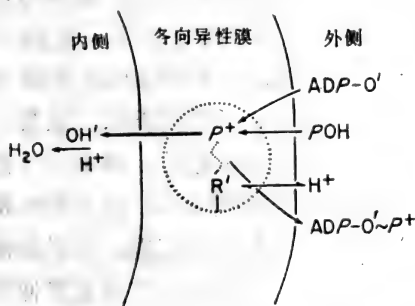


图10 米奇尔示意图 (图9) 下半部的放大。

① 最近的研究结果，特别是沃特纳布 (Watanabe) 和布罗迪 (Brodie)〔22〕的工作，表明有可能酚基先活化成酚精 (Phenolium)，而后再与无机磷酸相互作用。

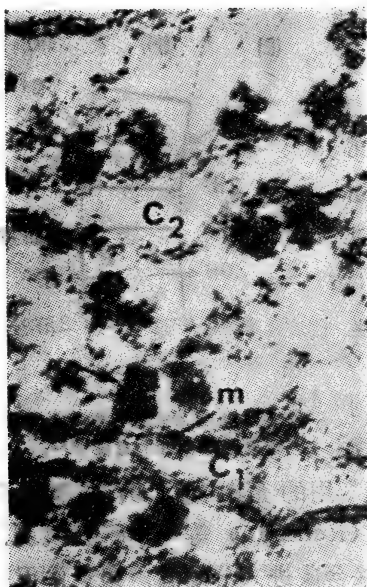


图11 肝细胞中携带附着核糖体的内质网电镜图<sup>[25]</sup>。

C<sub>1</sub>及C<sub>2</sub>分别为窄的及宽的嵴，m代表膜。图下方箭头表示位于膜上的核糖体的较大部分与其上端的较小部分之间的连接。

11)，可以看到管道膜的双层结构，上面附有许多核糖体。这些核糖体的定向很重要，往往是大的亚基连在膜上，而这个部位正是生长多肽链的地方<sup>[25]</sup>。

为了深入研究蛋白分泌的问题，雷德曼和萨巴蒂尼<sup>[22]</sup>用嘌呤霉素试验一个新生的多肽链是否可以在微粒体小泡中被检测出来。换句话说，就是要看一看蛋白质是否果真长入管道。他们采用含有自我封闭的管道片段的均匀的小泡，即封闭的ER片段与图4所示的类似，但带有

核糖体。这些小泡就是我们通常所谓的微粒体。当微粒体悬液与放射性氨基酸共同孵温合成新的肽链以后，加入嘌呤霉素使之释放，发现新生肽链并不释放到上清液里，而仍然被包在微粒体小泡中。这说明肽链的生长极化了，并直接伸向管内。我们实验室的盖诺扎博士和威廉斯博士用肝微粒体部分做过许多血浆蛋白的合成工作<sup>[5]</sup>。他们利用免疫电泳技术发现微粒体部分上保留着各种血浆蛋白。在预实验里，他们又利用免疫电泳方法，但用抗肝抗体而不用抗血浆蛋白抗体，发现这些抗体与存在于原浆上清液中的放射性标记蛋白

起反应，而不与存在于微粒体部分中的放射性标记蛋白起反应。这说明肝脏本身的蛋白质并不经管道进入ER。

上面我们举了细胞中几个简单的和较为复杂的极化系统的例子，把电镜图像转变为功能机制的示意图，我已作了简要的解释；这些系统的作用的详细机制还有待研究充实。我举这些例子的目的在于使你们认识到，要想圆满地说明机体的功能，有些地方必须停止采用匀浆技术，以保持极化状态，亦即保持结构的完整。

### 参 考 文 献

- [1] Campbell, P. N., and Kernot, B. A., *Biochem. J.*, 82, 262 (1962).
- [2] Ebashi, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 76, 410 (1958).
- [3] Ebashi, S., and Lipmann, F., *J. Cell Biol.*, 14, 389 (1962).
- [4] Fernandez-Moran, H., Oda, T., Blair, P. V., and Green, D. E., *J. Cell Biol.*, 22, 63 (1964).
- [5] Ganoza, M. C., Williams, C. A., and Lipmann, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 53, 619 (1965).
- [6] Hoch, F. L., and Lipmann, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 40, 909 (1954).
- [7] Jagendorf, A. T., and Uribe, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55, 170 (1966).
- [8] Kielley, W. W., and Meyerhof, O., *J. Biol. Chem.*, 183, 391 (1950).
- [9] Krebs, H. A., and Henseleit, K., *Z. Physiol. Chem.*, 210, 33 (1932).
- [10] Lehninger, "The Mitochondrion," Benjamin, New York, 1964.
- [11] Lipmann, F., Nishizuka, Y., Gordon, J., Lucas-Lenard, J., and Gottesman, M., this volume.
- [12] Lundegardh, H., *Arkiv Botan.*, 32A, 12, 1 (1945).
- [13] Lynen, F., this volume.
- [14] Mitchell, P., *Nature*, 191, 144 (1961); *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 41, 445 (1966).
- [15] Mitchell, P., *J. Gen. Microbiol.*, 29, 25 (1962).
- [16] Palade, G. E., and Siekevitz, P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 171 (1956).

- [17] Peters, T., Jr., *J.Histochem.Cytochem.*, 7, 224 (1959).
- [18] Piel, G., in "Science and the University," special publicat on of Brandeis University, 1966.
- [19] Racker, E., Tyler, D.D., Estabrook, R. W., Conover, T.E., Parsons, D.F., and Chance, B., in "Oxidases and Related Redox Systems, Vols.1 and 2," (T. E. King, H.S. Mason, and M. Morrison, eds.), p.1077. Wiley, New York, 1965.
- [20] Racker, E., "Mechanisms in Bioenergetics," Academic Press, New York, 1965.
- [21] Ratner, S., *Advan.Enzymol.*, 15, 319 (1954).
- [22] Redman, C. M., and Sabatini, D. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, 608 (1966).
- [23] Redman, C. M., Siekevitz, P., and Palade, G. E., *J.Biol. Chem.* 241, 1150 (1966).
- [24] Reid, R. A., Moyle, J., and Mitchell, P., *Nature*, 212, 257 (1966).
- [25] Sabatini, D.D., Tashiro, Y., and Palade, G. ., *J.Mol Biol.* 19, 503 (1966).
- [26] Sjöstrand, F., *Radiation Res., Suppl.*, 2, 349 (1960).
- [27] Warburg, O., *Ergeb.Physiol.*, 14, 253 (1914).
- [28] Watanabe, T., and Brodie, A.F., *Proc.Natl.Acad. Sci, U.S*, 56, 940 (1966).



## 六、聚合反应中方向和机理 间的关系<sup>①</sup>

F. 李普曼

美国纽约州纽约市洛克菲勒大学

### I. 引言

### II. 单位间的缩合反应

### III. 聚合的第一种方式：向尾端的延伸

#### A. 一般原理

#### B. 生物合成的几个例子

#### C. 有机合成的一例

### IV. 聚合的第二种方式：向头端的链的生长

#### A. 概况

#### B. 对 $\beta$ -酮酸合成的早期观察结果

#### C. 脂肪酸的合成

#### D. 蛋白质的合成

#### E. 萜的生物合成

#### F. 聚乙烯的化学合成

① 转载自, *Essays in Biochemistry*, vol. 4, P.N.Campbell and G.D.Greville, Eds. Academic Press, London, 1968. (Copyright The Biochemical Society)

缩写词, mRNA, 信使RNA, sRNA, 转运RNA(tRNA), 2'-OMeG, 2'-O-甲基鸟苷

## G. DNA双链的同方向复制

## V. 多方向的聚合作用

## VI. 结语

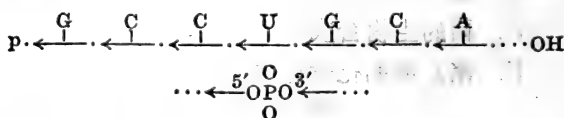
# I. 引言

在遗传的化学过程中，聚合物用来作为信息的载体，像摄影中的正负片那样借影象复制进行信息传递。因此，聚合作用和经核酸到蛋白质的信息转移显然是偶联的。图1为核酸和蛋白质共同特性的略图。多核苷酸链及多肽链均循其由左向右的生物合成方向画出。箭头尖端标出基团加到伸长的链上时其活性端的原来位置。核酸合成的最常见的方向是从5'-磷酸端向不带电荷的3'-羟基端，而蛋白质是从带正电荷的N端向带负电荷的C端合成的。因此，线性大分子借其亚基末端而定向，或叫极化。图1还显示在单调的骨架上，侧链里核酸或蛋白质特殊残基的专一性。在核酸中，4个碱基（两个嘧啶两个嘌呤）借助5'→3'桥连接的核糖或脱氧核糖而排列起来。而在蛋白质里，氨基酸侧链从多肽链CO-

核酸

5'-末端

3'-末端



蛋白质

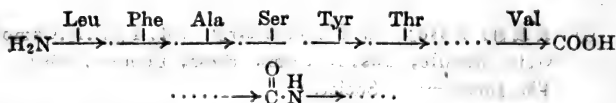


图1 生物记录。线性骨架上携带着重叠单位旁边的记号。

NH连接的骨架上伸展出来。两种类型化合物合成都是借助在核酸间的氢键引导，以一个接一个的添加方式进行的。核酸合成与蛋白质合成的中间联系如图2所示，箭头表示转录或翻译的方向。

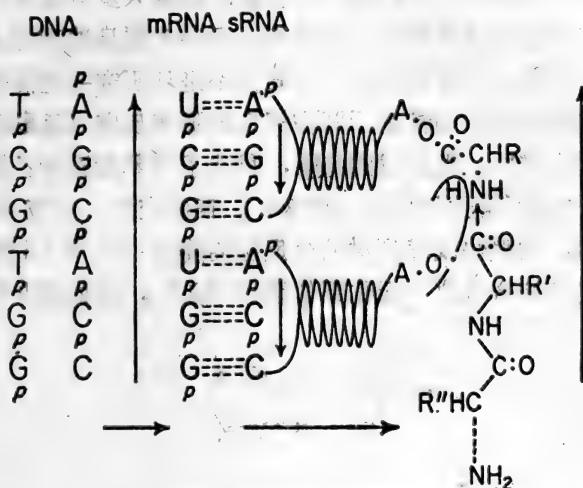


图2 密码的转录及表达。

假如借线性聚合作用传递信息，那么它一定要循正确的方向进行才能使信息的译文具有意义。这些明显地需要考虑的问题，吸引我去深入地研究机理和方向间的相互关系。链生长中决定方向的因子在同类的重复单位（如贮存的多糖）中及带有不同侧链的不同类重复骨架单位（如核酸及蛋白质）中都是一样的。链延伸的重复过程是千篇一律的，一般不受其侧链变化的影响。这种线性聚合的每一步通常都是两个紧接的单位间一个一个地添加起来的缩合过程。我们还会发现机体内的聚合作用和人工有机合成的原理是类似的。

在讨论方向性之前，先评论一下缩合反应的一般性质。我要从两个不相象的单位间的非重复性缩合反应开始说起，

继而谈到骨架合成的一般情况。

## II. 单位间的缩合反应

很快就出现一个有规律性的现象：即在大多数缩合反应中，两个缩合单位只有一个被活化，另一个则是被动的基团接受体。最初，关于缩合反应的知识都是从研究一些简单的缩合反应中得来，如常用于肝脏解毒的那些反应（乙酰化、马尿酸的合成）。根据我的经验，我选了氨苯磺胺的乙酰化反应〔1〕作为开端性的例子（图3）。在研究这一反应机制的过程中，我很快就感到对缩合反应需要有一个专门的命名。于是把缩合单位的活化部位称作“头”，假如是与同类

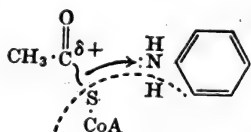


图3 缩合反应：芳香胺的乙酰化。

单位缩合的话，就把另一单位的被动部分称作“尾”。在醋酸和芳香胺的缩合反应中，羧基是“头”，即活化部位。在给定的头上加一个携能的单位便发生活化，于是头便带有一个基团电位，表现为一个部分的正电荷〔2〕，这个 $\delta^+$ 吸引接受体分子上的一对未共用的电子，接受体分子最后置换活化头上附加的那个携能单位（图3）。

为了适当地强调一下这种基团活化作用，我倾向于把这种类型的生物缩合作用用亲电子反应，而不用亲核取代反应来表达。活化基团是攻击的一方，它吸引一个氧原子、氮原子或碳原子上的一对未共用的电子。在我们这个特殊例子

中，最初的活化衍发于ATP的腺苷磷酸基。AMP~酰基在活化酶的作用下，通过CoA·S~对腺苷-P~的置换，转化为等电位的硫代酯。这个转化作用中最有意义的是腺苷-P<sup>δ+</sup>~C中P上的δ<sup>+</sup>转移到CoA·S~+C上去，从而把磷酸基电位转换成乙酰基电位〔\*〕。

当携能的附加物在接受分子专一的乙酰基转移酶的作用下最后被氨基置换后，硫代酯键的基团电位就用来构成肽键。图4列出能量递减的示意图。两个反应物间的脱水反应

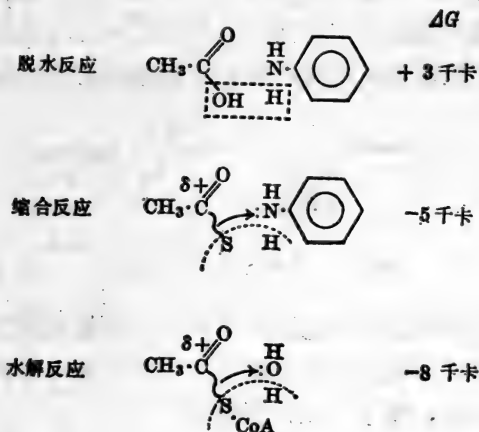


图4 芳香胺乙酰化时自由能的变化

是需能的，为使反应得以进行，能量经过几个活化步骤移植到羧基上。置换引起的缩合作用就利用这个能量去构成肽键。有大大过量的能量才能防止逆向反应，因为在细胞代谢的酶装置中，键的缩合和裂解是容易逆转的。我说这些只是为了说明输入过量的能量并没有浪费掉。

## II. 聚合的第一种方式：向尾端的延伸

### A. 一般原理

以缩合反应的起始过程为背景，我们现在进入线性聚合的讨论。在这个讨论中，连接在一起的单位是否相同，或者仅仅这些单位的骨架相同而侧链不同，都是无关紧要的。在这两种情况下，单位间的缩合过程是重复发生的，作用原理也一样。假如我把一个连接单位的活化反应的最常见类型以图 5 的形式概括起来，对问题的分析就会简单一些。一个能

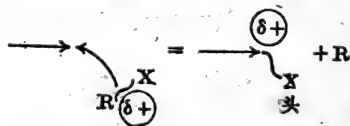
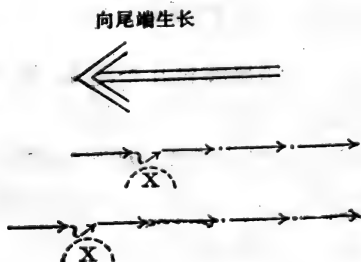


图 5 一个单位的活化，极化。

量的携带体与单位的头起反应并把一个携能的附加物添加上去。这多半会导致连接单位的极化，带有正电荷的单位的另一端，即尾部，变为被动的接受体。



【图 6 缩合反应中应用的活化作用，天然肽链的延长。

图 6 缩合反应中，一个带活化头的单位和一个带被动尾的单位均一一标出。在正性极化作用下，酸性部分成为亲电子性的，吸引接受体的尾。接受体的尾提供一对未共用的电子，

最常见的是氧或氮的电子对。由于缩合体反应需要在一个单位的头上添加能量，并将能量利用掉，所以携能单位的头非常方便地同一个生长链的尾端缩合，而自己的尾又作为下一次添加的接受体。我们将这称做链的向尾端的生长(图6)。新单位的头加在生长链最末一个单位的尾端，活化和缩合交替地进行下去，这就是生物过程中，也是有机化学合成中最简单又最常见的聚合类型。我提议称之为天然链的延伸。

## B. 生物合成的几个例子

糖原及淀粉的线性直链淀粉 (amylose) 区域在试管内

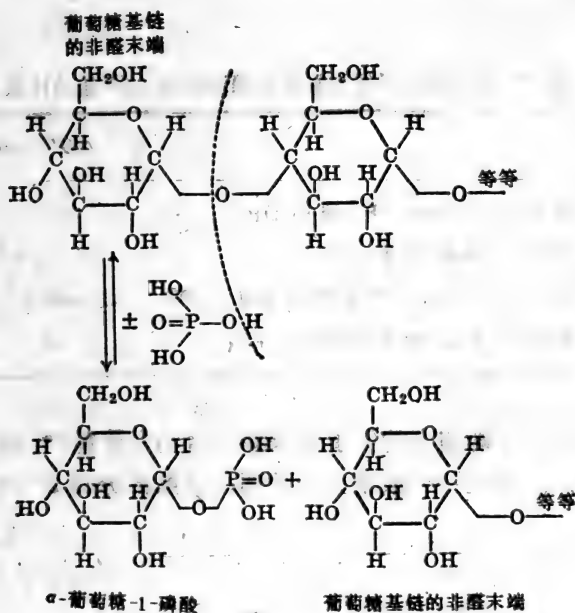


图7 直链淀粉链生长时单位之间的反应<sup>(3)</sup>。

的合成，是首先用磷酸化酶（EC 2.4.1.1）把葡萄糖-1-磷酸分子与最初的直链淀粉链的尾缩合起来得到的。活化的葡萄糖-1'-末端以1'→4'糖苷键与生长链最末一个葡萄糖残基缩合〔3〕（图7）。但是，实际上磷酸化酶只在磷酸浓度较低时才催化这一合成反应。在细胞环境中磷酸浓度太高，此酶使糖原由左向右进行磷酸解。在葡萄糖-1-二磷酸尿嘧啶（UDPG）〔4〕中，葡萄糖的基团电位比葡萄糖-1-磷酸的基团电位高，足以发生合成作用（表1）。这说明节能的裂解和耗能的合成之间的有时颇不稳定的平衡是如何被活化前体中的一个相当昂贵的能源过量所战胜。在  $UTP + Glc - 1 - P \rightarrow UDPG + PP_i$  反应中多投资了两个 $\sim P$ 。

表 1 合成酶 $\Delta G$ 值与相应的磷酸化酶 $\Delta G^*$ 值的比较

	$\Delta G^*$ (千卡)
葡萄糖-1-PPU + 果糖 $\rightarrow$ 蔗糖 + UDP	-1
葡萄糖-1-P + 果糖 $\rightarrow$ 蔗糖 + $P_i$	+2.3
葡萄糖-1-PPU + 糖原 $\rightarrow$ 葡萄糖酰糖原 + UDP	-3.5
葡萄糖-1-P + 糖原 $\rightarrow$ 葡萄糖酰糖原 + $P_i$	+0.7

另一个尾端缩合的例子是果糖聚合物左聚糖〔5〕的生成（图8）。这里一个蔗糖分子的葡萄糖酰部分在2'→1'键



图 8 从蔗糖合成果聚糖。〔5〕



处被链末端果糖的6'-羟基所置换。其缩合能由蔗糖分子中葡萄糖酰-1'及果糖-2'间的相对高能的氧桥供给。图9〔4〕列出了参与这些缩合反应的化合物的基团电位。

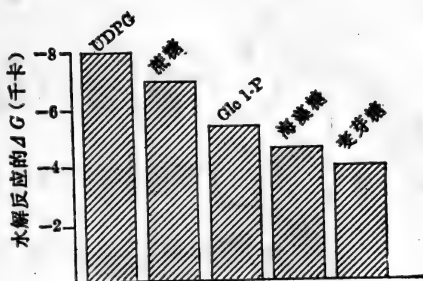


图9 供体水解的自由能〔4〕。

另一个尾端生长的例子是RNA的生物合成(图10)。待连接的核苷酸被5'-磷酸上的双重磷酸化作用所活化,

5'-磷酸加在生长链末端的3'-羟基上。氧原子上的未共用的电子对置换核苷三磷酸中的焦磷酸基团。连接单位和尾之间以这种方式生成一个磷酸桥。这一反应生成一个始终一样的骨架结构,核苷上携带着不同的侧链。为了把核酸合成作为尾端生长的一个例子集中研究,图10只把DNA转录给mRNA的酶反应中的缩合部分显示出来。

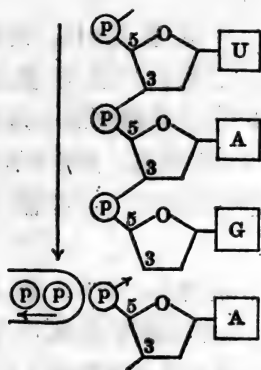


图10 mRNA的合成(无指导DNA)。

无引导的和任意的添加新核苷酸是受多核苷酸磷酸化酶(EC 2.7.7.8)的逆反应所催化。但是,这里一个核苷二磷酸可逆地与生长链的尾端起反应,释放 $P_i$ 〔6〕。一直给我印象很深的是多核苷酸磷酸化酶的可逆性意味着3'-磷酸酯键的基团电位一定处在一个很高的水平,与核苷二磷酸的磷

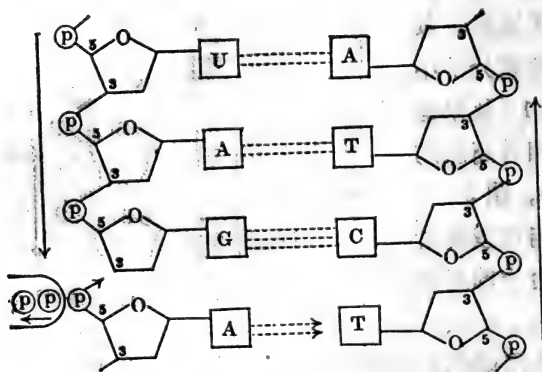


图11 DNA指导的mRNA合成。

酸电位差不多，水解反应的 $\Delta G$ 取决于 $P_i$ 浓度及pH，约在-7至-10千卡之间。这可能部分地由于附近存在羟基缘故。所以可以想象DNA中脱氧核糖3'位上的磷酸键的基团电位实际上还要低些，因为附近没有2'位羟基。由于DNA的热力学稳定性比RNA的热力学稳定性增加了，这可能是生物学中很重要的一个方面。

与易于逆行的多核苷酸磷酸化酶反应相反，DNA连系的RNA合成酶（部分显示于图10中）在尾端添加步骤中还有核苷三磷酸参加，并且当形成的 $PP_i$ 被无机焦磷酸酶（EC 3.6.1.1）除去以后，即成为不可逆反应，即便没有这个水解作用，反应的可逆性也很差。不可逆过程就是信息传递中采用的一种办法，在那里，添加的顺序受沃森-克里克（Watson-Crick）模式中模板多核苷酸的引导。专一性的氢键配对建立了反向平行的图象。图11还显示了起引导作用的DNA模板。碱基堆砌和氢键的联合加强了这一个十分精确的选择过程，至于到底是怎样加强的仍然是一个未解决问题。

## C. 有机合成的一例

图12是氨基酸借尾端延长产生化学聚合的一个例子。摘自卡恰尔斯基 (Katchalski) 的文章<sup>[7]</sup>，它表明了氨基酸的N-羧基酐的聚合作用。活化的羧基与生长链的尾端氨基连接起来，形成一个新肽。同时，环被打开，CO<sub>2</sub>释

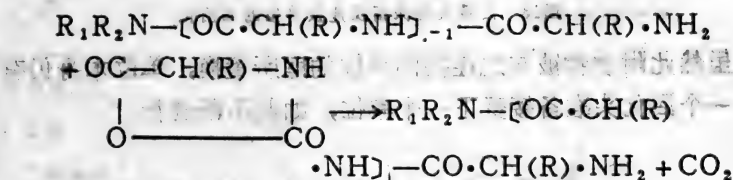


图12 由N-羧基α-氨基酸酐合成聚氨基酸<sup>[7]</sup>。

出，一个自由氨基游离出来使向尾端的延伸继续下去。

总之，尾端延长时，链从单位的头开始。例如RNA的合成是从一个5'-末端开始的，以尾或3'-末端告终（参见图2）。

## IV. 聚合的第二种方式向头端的链的生长

### A. 概况

在第一种延伸方式中，附加在正在添加的单位上的能量，在每次与生长链的尾端缩合时都用掉了。在第二种方式中，生长的方向是相反的，作为一种特殊安排的结果，在生长链的前沿总是保持有一个活化的末端：活化的链头只能与头端已携带活化附加物的单位的尾起反应。这种延伸方式的严格的特性见图13。图中在生长的一端，链总是有一个活化

的附加头，

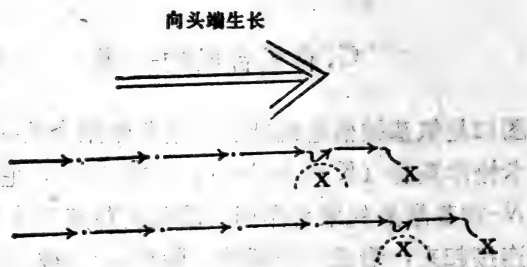


图13 活性头的保留及连接单位的预活化

虽然此附加物被与之连接的单位的尾所置换，单位本身仍有一个活化头准备接受下一个单位，如此不断进行。

### B. $\beta$ -酮酸合成的早期观察结果

我们在研究乙酸活化的过程中，首次认识到有第二种聚合方式。在此之前，苏达克<sup>[8]</sup>在鸽肝提取液里发现了乙酰乙酸的合成，我们当时认为是乙酸的乙酰化反应。那时爱尔兰·斯塔特曼和迈克·杜道罗夫和我一起波士顿，我们设计了一个实验<sup>[9]</sup>，想确定乙酰基接受体——乙酸到底有没有活化形式存在。我们将<sup>[14C]</sup>-乙酰磷酸、CoA及微生物的乙酰转移酶（EC 2.3.1.8）放在一起使之向我们假设的前体非标记乙酸提供<sup>[14C]</sup>-乙酰CoA。这个实验的结果列入表2。使我们惊讶的是乙酰乙酸的比活性是乙酰CoA的两倍，这意味着乙酰乙酸的两端，即供体端和受体端都带有放射性，都来自乙酰CoA。这说明乙酰乙酸不是由乙酰CoA加乙酸合成的，而是按照图14中的机制，由两个分子的乙酰CoA合成的。后来，林内恩实验室的工作<sup>[10]</sup>发现，这种缩合是由于随后发生的反应的能量拉力而导致的

## β-酮酸合成的一种特殊的变异。

表 2 过量非标记乙酸存在下鸽肝提取液由 $\text{CH}_3^{14}\text{COOPo}_4^-$ 合成乙酰乙酸的实验

实验孵温液中含0.14摩尔/升tris缓冲液(pH8.3)、63毫摩尔/升乙酸钠、19毫摩尔/升乙酰磷酸铝、1.6毫摩尔/升 $\text{MgCl}_2$ 、8毫摩尔/升半胱氨酸及60个单位的CoA (67单位/毫克)，其它条件与参考文献[9]中的表1相同

化 合 物	总 量 (微摩尔)	【 $^{14}\text{C}$ 】 含 量	
		总计数率 (每分次)	比放射性 (每分次/微摩尔)
孵温前:			
乙酸	227	0	0
乙酰磷酸	70	1,600,000	23,000
孵温70分钟后:			
乙酸	257 <sup>a</sup>	690,000 <sup>b</sup>	2900
乙酰磷酸	37	830,000	22,400
乙酰乙酸	1.5	53,000	35,200
乙酰乙酰胺基C	—	—	15,700
乙酰乙酰胺基C	—	—	19,500

a. 方法见斯塔特曼等[9]。

b. 最大值基于这样的假定，即乙酰磷酸消失而且乙酰乙酸不再生成乙酰磷酸。最大值换算成羧基标记的乙酸及无机磷酸。

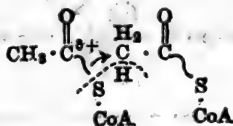


图14 “乙酸”的乙酰化。

## C. 脂肪酸的合成

图14中的反应类型有时用来解释脂肪酸链延伸中 $\beta$ -酮酸的缩合步骤，但其真正的机制还是通过研究 $\text{CO}_2$ 对脂肪酸生物合成的刺激作用<sup>[11, 12]</sup>才了解到的。寻找有 $\text{CO}_2$ 参与的反应机制使我们认识到，缩合到生长链头上的活化羧基上的单位不是乙酰硫代酯而是丙二酸单酰硫代酯，是借ATP及生物素参与的 $\text{CO}_2$ 添加作用，由乙酰基衍生而来。因此此 $\text{CO}_2$ 不出现在反应产物里，所以林内恩认为丙二酸单酰CoA是接受体<sup>[13]</sup>，这解释了在缩合反应中释放出来的 $\text{CO}_2$ 不参入的现象。看来硫酯键并无足够的能量供给碳—碳键的生成，而 $\text{CO}_2$ 的释放供给这一合成所需的额外能量。林内恩的示意图(图15)表明置换反应和脱羧反应是相互配合的。图

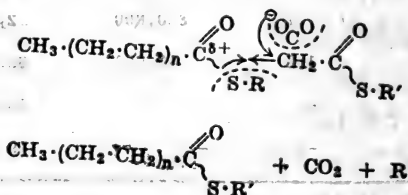


图15 脂肪酸的延长，附加尾的活化。

16显示了这个有附加尾端活化作用的、向头端的缩合反应。这



图16 附加尾的活化。

种活化类型的特点是在相当罕见一个末端出现过量的负电荷 $\delta^-$ 。它表示了一般的基团活化概念，即活化作用将一个过量电荷 $\delta^+$ 或 $\delta^-$ 给予一个基团。

## D. 蛋白质的合成

从比较生物化学的观点来看，颗粒参与的 $\beta$ -酮酸合成<sup>[14]</sup>和核糖体参与的多肽合成之间的平行关系给人以深刻印象。两个合成反应中基团的活化都是通过ATP的初始反应产生一个酰基腺苷酸而启动的。在脂肪酸活化反应中酰基随即从磷酸转给硫代酯，在氨基酸的活化反应中则转给连在sRNA腺苷O-端的核糖酯，而不需要酶的更换。硫酯的基团电位和高能氨酰基氧酯的基团电位是相似的，二者的能量都

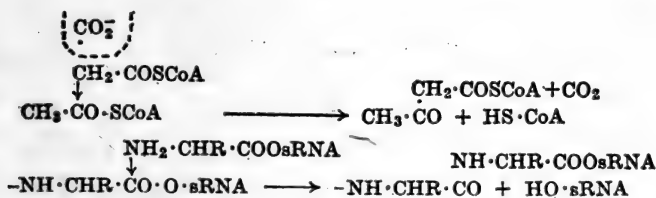


图17 脂肪酸合成（上式）与肽合成（下式）的比较。

相当于ATP中的磷酸键<sup>[15]</sup>。图17显示了 $\beta$ -酮酸合成和多肽合成的平行关系。

核糖体参与的多肽合成反应的有趣特征是它按向头端的缩合机制进行。一个肽链合成酶催化生长肽链的活化羧基端与加入的氨酰基-sRNA的氨基之间的缩合反应。多肽合成中的向头端延伸具有特殊重要的意义。携能的附加物sRNA还通过其反密码子的指引把要加上的氨基酸加在模板的正确

位置上(图18)。它把自己添加在携带生长链肽酰头的sRNA所占据的邻近密码——反密码的结合部位。因为每次缩合后,后加的氨基酸就变成链的新头,下一个氨酰基sRNA就同样地受其反密码子的引导,连接到邻近的部位。这一过程重复下去,直到完成蛋白质合成。这样,前面所述的mRNA三联体的顺序就一个一个地被翻译成氨基酸顺序,因为在每一个延伸步骤中氨基酸的进入都是与其sRNA能决定位置的反密码子相联系的,并安排在肽链头的旁边,其sRNA-mRNA反密码子-密码子复合体起着标志物的作用。这一过程在这里有意地作了简化。在核糖体-mRNA引导

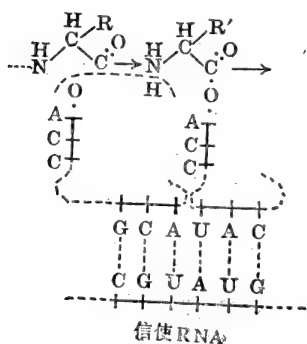


图18 模板上肽的序列合成。

的多肽合成中,肽酰-sRNA及即将加入的氨酰基-sRNA占据了专一的核糖体部位。因为在每次延伸步骤后的瞬间,新生成的肽酰-sRNA都位于“错误的”位置上,所以猜想紧接着必有一个移位步骤,此步骤看来与GTP的水解相联系。图19所示的这一延伸周期过程将在另一篇论文中详加讨论

论<sup>[16]</sup>。

多肽合成中一个相当不同的类型是谷胱甘肽的生物合成。在这里氨基酸的活化是借助于ATP→ADP的转变的,同时产生一个与酶相连的羧基磷酸酯。酶的专一性决定顺序的选择。第一个酶是二肽合成酶(EC 6.3.2.2),它将L-谷氨酸的γ-羧基和L-半胱氨酸的氨基连接起来。第二个酶是专一性三肽合成酶(EC6.3.2.3);它将二肽的半胱氨酸的羧基活化,使之与甘氨酸的氨基相连以完成谷胱甘肽的合成。



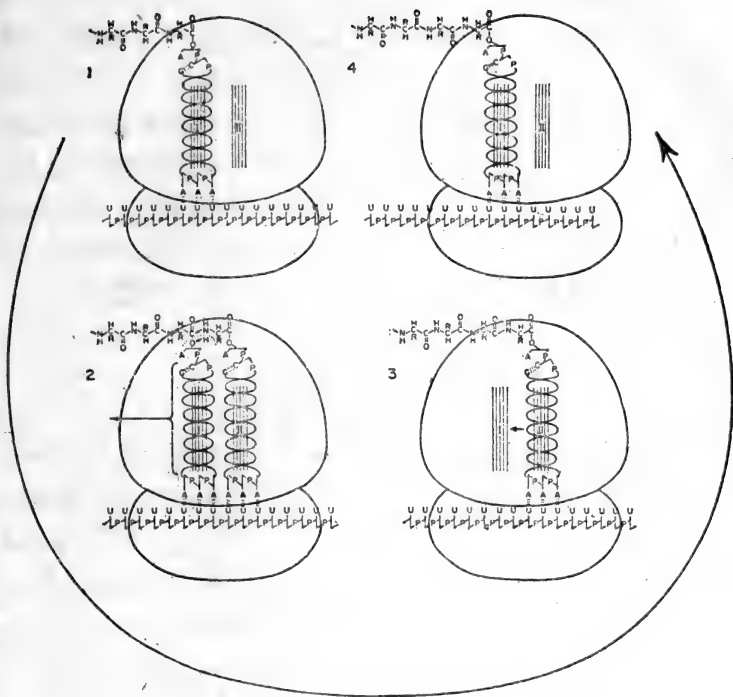


图19 多肽的缩合周期。起始相 1 (左上)中,一个肽酰-sRNA 刚转移至核糖体受位 I; 第 2 相(左下)给位 II 被一个氨基酰基-sRNA 占据,其反密码子与肽酰-sRNA 所占据的 mRNA 三联密码子紧挨着的那个三联密码子相匹配;第 3 相(右下)中,肽末端的活化羧基已经与氨基酰基-sRNA 上的游离氨基缩合。此缩合反应释出连接在前一末端的 sRNA,并使仍与 sRNA 相连的新氨基酸成为新的末端;第 3 相完毕时,肽酰 sRNA 在错误的位置 II 位上。第 4 相(右上)中,它被转移到 I 位。这样,第 4 相最终的位置就相当于第 1 相的起始位置,只是在肽酰-sRNA 从 II 位转回到 I 位的过程中, mRNA 向左移动一个三联体的长度。最近科拉那 (Khorana) [34] 实验室对酵母苯丙氨酰-sRNA 的序列分析表明反密码子为 2'OMeG-A-A, 而不是像此图中推测的那样是 A-A-A。(R, 核糖体)

这里生长着的肽链的末端羧基的活化在延伸后发生,但是链

的生长属于向头端的类型。

如斯特罗明格尔 (Strominger) 所述<sup>[18]</sup>, 脂肽合成是细菌细胞壁合成的一个阶段, 此合成遵循谷胱甘肽的多酶延伸途径。最有趣的是, 它从UDP-N-乙酰葡萄糖胺乳酸醚 (借ATP得以活化) 的羧基开始, 接受L-丙氨酸的氨基端, 尔后一个接一个地添加D-异谷氨酰胺、L-赖氨酸, 最后加上D-丙氨酰-D-丙氨酸组成一个单位。其详细过程了解得不如谷胱甘肽那样完全, 但链延伸的总轮廓看来是相似的。

### E. 萜的生物合成

林内恩实验室<sup>[19]</sup>研究的向头端延伸的例子给人以深刻的印象。此过程 (图20) 中的缩合酶也需要在新添加的单位上带有一个活化头, 以保证向头端的生长。这里无需把图20所示的添加单位尾端的重排详加叙述。但我想把注意力转向

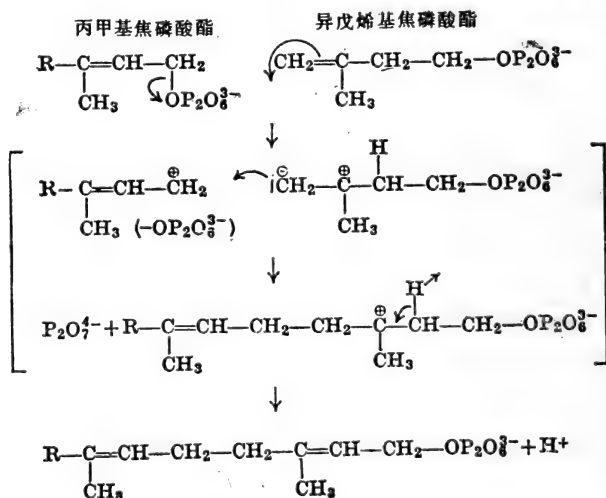
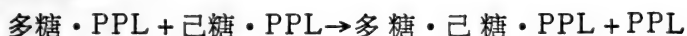


图20 萜链生物合成中链延长的机制。

活化过程中的极化作用。如图所示，它是缩合反应的必要条件，头端的碳原子通过与焦磷酸的酯键连接而极化，即带有正电荷，从而吸引参加进来的单个单位尾端上的负电荷，而后置换掉焦磷酸（一个好的离开基团）。波普雅克及康福思〔20〕已经研究清楚了 this 缩合反应的很有趣的立体化学细节，看来与此过程中添加的异戊二烯单位的预先活化有关，是对此类型缩合反应向头端生长过程的合理解释。

在此文付印时，作为P. 罗宾斯和我对这个题目讨论的结果，罗宾斯等〔36〕研究了沙门氏菌O-抗原的多糖的生物合成中链的生长方向。此多糖由重复的三糖单位组成。他们首先发现即将添加在还原端的己糖借与聚异戊二烯焦磷酸载体（PPL）连接而活化。现在他们又发现这种聚合作用是属于向头端生长型，而多数其他多糖的聚合却是向尾端生长型。在这个例子中，当新添加的单元置换生长着的多糖链末端的PPL时，这个单元必须首先被活化，同时PPL附加物要保留在链的头部。



## F. 聚乙烯的化学合成

齐格勒（Ziegler）〔21〕用锂催化的聚乙烯的合成是一个少见的链向头端生长的化学聚合反应的例子。在这个例子中，要添加的乙烯插入到生长链头部的锂原子和紧邻的碳原子之间（图21）。这一机理与机体内向头端生长的过程不同，其不同在于新添加的单元事先不被活化，而是被重排，使活化锂保持在链的头端。我想将这个有机合成的例子包括在内，以强调指出，在人工合成及生物合成中，这种双模式原则都是普遍适用的。



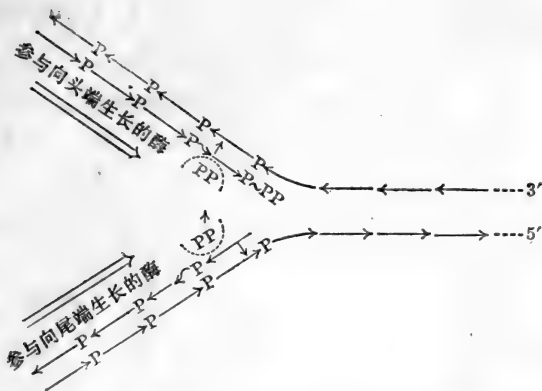


图23 DNA复制：反向平行极化条件下的平行延伸。

3'位置上而不是5'位置上。但到现在为止这个3'→5'的缩合反应仍然得不到证明。这个问题很吸引人，在理论上也是可行的，但是看来并不能实现。最近DNA连接酶的发现，又提出了一个新的关于把5'端连到3'端的理论，其中涉及一个由NAD<sup>[26, 27]</sup>或ATP<sup>[28]</sup>衍生而来的酶~AMP中间体。这种连接的分子机制的细节尚不清楚<sup>①</sup>，但酶~AMP可以无定向地进行连接。现在这个酶在第二条链的向头端延伸机理的讨论中已多少被非正式地引用了。我认为这个主张所根据的原理是这种缩合反应在方向性上是中性的。它可以将3'端连接到5'端，有时也可以用某种方式以相反的方式进行合成，即已知的由5'到3'端的向尾端缩合反应。

## V. 多方向的聚合作用

严格地说，我们上面论及的两种方式仅适用于线性聚合，

① 连接酶的反应机制已经弄清，酶结合的AMP~转给5'-磷酸，生成R 5'P~PA，而后~PA被3'羟基置换，将空隙填满(Lehman, Olivera and Anraku *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1968, Abstracts, p.10)。

主要是单方向的聚合过程。简单的分支反应部分地按照同样的规律；例如，一旦在一种独立的转移酶作用下从6'位上开始分支以后，糖原的分支就在同一糖原合成酶的作用下延伸。图24是这一分支过程的示意图〔29〕。

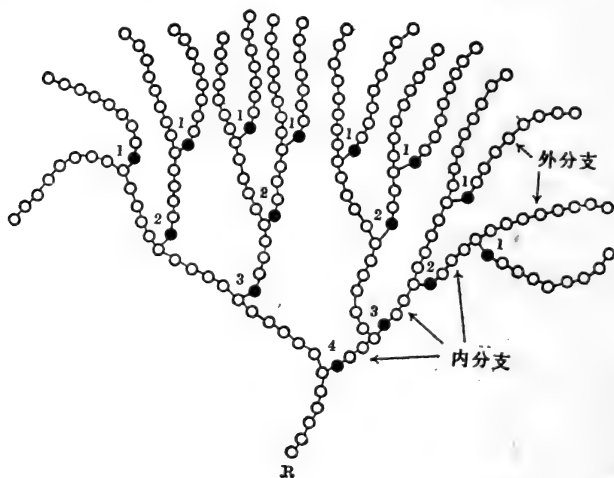


图24 糖原分子片段的模式图。共209个葡萄糖残基，分子量33,858。○， $\alpha$ -1,4连接的葡萄糖残基；●， $\alpha$ -1,6连接的葡萄糖残基；R，还原性末端基团。图中片段有4个层次的分支点（糖原至少有7个层次）。内分支的终端是相邻层次的分支点，外分支的终端是一个分支点及一个葡萄糖残基（末端基团）的非还原性末端〔29〕。

近来关于粘多糖蛋白的研究又了解到另一种不同的分支结构。蛋白质构成骨架，许多糖链的末端醛基从旁边连接到骨架上去，比如通过半缩醛链（hemiacetal links）与丝氨酸羟基连接对于最复杂的多方向生物合成了解得较详细的是细胞壁的合成〔32〕，图26是斯特明格尔〔32〕提出的结构，由不大寻常的分支机制及聚甘氨酸链交联而形成。这些链由甘

氨酰-sRNA 衍生而来，但因此过程不依赖于核糖体或模板，所以sRNA在此似乎只是行使一个携带能量的附加物的功能（见图25）<sup>[30]</sup>。这种结构的生物合成提出了很有趣的问题<sup>[31]</sup>。

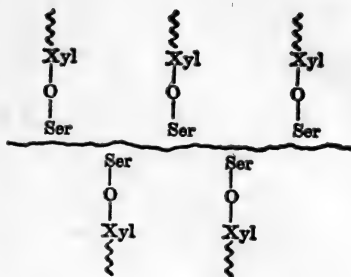


图25 多糖-蛋白质复合物的片段。

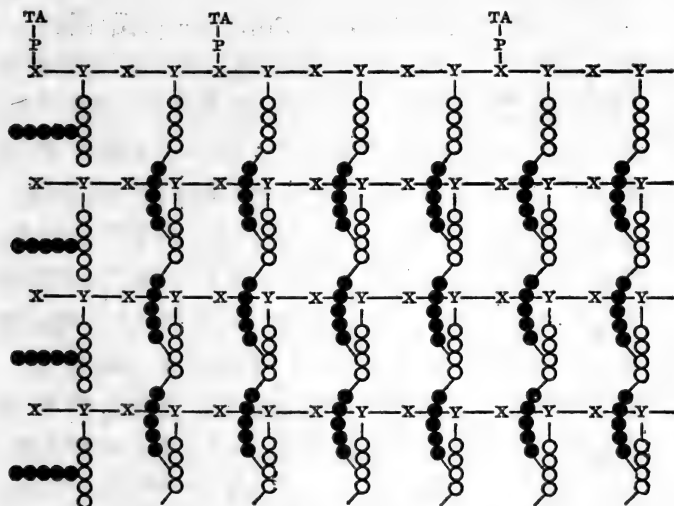


图26 金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖的结构。X (N-乙酰葡萄糖胺) 及Y (N-乙酰胞壁酸) 是肽聚糖中的两种糖。○，四肽的氨基酸，L-丙氨酰-D-异谷氨酰-L-赖氨酰-D-丙氨酸；●，连接肽聚糖的五甘氨酸桥。新生的肽聚糖单位带有五甘氨酸开链，如每一个链的左侧所示。TA-P 是细菌的磷壁酸抗原，通过一个磷酸二酯键与多糖相连。（引自斯特罗明格尔等<sup>[32]</sup>）

## VI. 结 语

我用几句关于生物信息传递的特性的话来结束此文。信息传递是一种需能反应，是一种转录，这种转录与沿模板进行并生产出线性链的缩合反应相偶联。它同我们的印刷机不一样，印刷机上的字母是不连接的，一般地印出有成千上万个互相分离的字母的一页页印刷品。而在一种骨架结构中带有信号侧链的分子的排列成行必须一个一个地加上去。这种活动在活细胞内进行得非常快，而且能把大量的信息填装在很小的空间里。为了说明这个问题，我列出一张图(图27)。这要感谢博伦姆(F. J. Bollum)博士，这是他在洛克菲勒大学做演讲时用的图。这张图把一种最小的携带信息的DNA-辛斯海默(Sinsheimer)噬菌体 $\phi$ -x-DNA的想像中的碱基顺序放大了。图中连续链弯曲是受书页篇幅限制的缘故。大肠杆菌染色体DNA链的信息这样列出来大约要用3000页，染色体的长度已在电镜中测量过<sup>[22]</sup>，所有这些信息都压缩在大约1.1毫米的线段里。信息从DNA转录到RNA时，把它分成更短的线段。一个mRNA分子约编码半打蛋白质。最后，mRNA的翻译产生单个的蛋白结构，这就是信息传递的最终结果。形象地说，它们就是生命机体的血肉和内脏。

遗传信息产物的形状如图28中(右侧)<sup>[33]</sup>放大的肌球蛋白空间模型所示。图27中线性密码信息的想像图和图28最终的三维产物之间的对比是非常鲜明的。当我第一次看到这个蛋白质模型时，它给我的印象好像是一幅抽象派的艺术作品。它使我不由得到纽约格根海姆(Guggenheim)博物馆去，在那里我看到勒卡基斯的一件雕塑品，我认为它与肌球蛋白颇为相似(图28左)。



P A C A T C G A C C T A G C C A T C C C A G C T A C C C G G A T A T T T A C C G A T C G A T C G A T C T G C T C C A C T C G G G A T C C A G T C A G G C C A C C T C T A C C T C G T C A C T C G C T C C A T C  
 A A C C G T T A C C G G T A C C G T G C A T C G C A C A C T C C A C C A T C C A T C C A T A G C G G T A C C T A G C G G T A C C T G T T A G A G A T C T C G A T C T  
 T G G T G C T C C C A T T T A C C C T G A T T C C C A C C C A A C C T T C C C A G C C C A T T T C G A C T G C T A C C G T A C C G T T C G G C G A T C C A T C G A C T A C T A T A T A G C T  
 A C T C G A C C C T A G C C C A A C A T C G G A T C T C G A T C C G C T A C A C C C A A T T A C C A G C C T T T C A C C A G C T A C T T C T T A G G A G A G A C C C A C A T C G A T  
 C A G G T A T T C C G G A C C C A C C T A C C T T A G C G A G C T A C C T A G C T T A G G A C C T A C C A C T T A C A C T G T G T C C A T C C G C G A G A T T A G C C T T A G A  
 A A A A G C C C T C A G A A T C G A T C G A T C C G C C C T G T G T G G G T G A T A T G A T T C G A T T C G A T C G B G C T A T T A T T C T T A T A G B G G C G C T T A T A G G G  
 A A G G A G C G G C G C A T T T A G C G G C A T T A T T A G C G C G C A T G A T C G A T C G A C A G C T G A T C G C T C G A C T C C C C C C C C C A G G A G G G G G A  
 C T A G C T C G A T T T A C T C C G G T A T T C G G A T T C C G G C T T G G T T C G A C C C A G C C G C T G A T T A G G C T A T T A T G C G C A T T A T T C G G A T C A T T T G G G A  
 C C T A A T T C G G A T T C G G A C A G A C A C T C G A C T T T T T T C G G A C C C A G C C G C T G A T A T G T A G G A T A G A T A G A T A G C G A C T T T C G A C G T A G T C G A G A  
 A A C C C A G G C A C A G G C G A T G C T A G C T A C A G A C G T T C T A C A G A G C G G C T G C G A T T A G G G T A T A T C B A T G T A G T A G G C T A G G C T A G G A  
 C G G A T C G A T A G A C T T C G G A T C G G A T T C G G A T T A G G C T A T A G G C T A G G C G A T T A G G C T A G G C G A T A T A T C G A G A G A G A T C G G A T T C G G A  
 C G A T A G A T A G C G A G C T A T A T C T C T T A T T C T C T T A T T C T C T A T T C T C T T A T T C T C T A T A A T T C  
 A G A B G C G C C C T G C T C G A T C G C T C G C T T C G G C T T C G A G A G A G C C G G T A T A T A T C T C T T A T T C T C T A T T C T A T T C T C T A A A T T C  
 A C A C A G A G A G C C G C T A T A T C T C T C G A T C G A T C G C T C G C T G A T A T A G C C A T A T A T A G A G A G A G A C C G C C  
 T C G G C T A G C C T G C G C A T C T A T A T C T A T A T A T C T A G C G C G A G C C G C T C G A G A G C G C C T C G A G A G C T C A T C T A C T C T C G C G C G C A T T A T  
 C G G A T C G G A G C C A G C C G C A T T A C G C C A T T A T C G A T C G C C T A T G C C T A G G A G A G C T C G A G A C T C G A G A G C T C G A G A G C T C T T C G G C G C G C A T T A T  
 C G C G C A T A G C C C T T G C T T T T T T T T T C T C G A G A G A G C G G C T C G A T A T A T A T A T G C C T A T A T A G C C T A T A G C C G C T C G A G C T C C C G G A T C G  
 C T C T C R A G G C T C G C C T A G G A G A G C T T C G G C A T A T C T T C G G C T T C G G C C C G C G A G A G C C T C G G C T C G A G C T A G C T C G C C G A T A G C T C G A G A C  
 A G G C C T T C T T C G G C G C G G A G A G A G C T A B C T G C G T C G A T A G C T C G A G C T C T C T C G A G C C G C C C C C G C G G G C A T A T C T C G G C T C G A G A G A G A G A  
 A G C C T A G A C A G C C G G T A G C T A G C C C A T C G A T A G C T A G C T A G C T A G C A C A C C A C C A G C C T T A G C C A C C A G C C T A G C C G A T T C G G A T T C G G A T  
 A G A G C T C G A T C G A T C G A T C G A T C G A T C G A G A G C T C T C T C G A G C T C T T C G A G C C G C C A C C A T T A A C G T G C T A G C T A G C T A G C T T A G C T A G C T  
 A A T T A G G A T T A G G A T T A G G A T A G G A T A G A C A G C A T A T A T A T A T C T C A C A C A G C C G C T A T A T G C T A G C T A G C T A G C T T C G G A T T G T A  
 A A T T A G G A C C A C C A A T T A G A C A Z C T C G C A Z G C T A G C T T A A A G G C C T T A G G A T C G A T C G G A T C G G G C T A G C T C C C G G C T A G C T C C C G G C G C T A T G C  
 A G C C T G A T C G A T C G C G C A A G C A T T C G A C C G G A T T C G A T G G C T A G C C G C T A G C C G C G C C G G A T C C G C G C T A G C C G C G C C A C A C A C A A C A A C A  
 A G A G A C A C A T C T C T C G A C A G A C A G C T C G C G G A T A G T A G C T G C G C T A G C T A G C T A G C T A G C T A G C T A G C T C G G C T C G G T C G C T C C G T  
 C G G C C C G C C C G G A T C G G C T C G T C G C T C C A C C A C A C T C C T C T C T C C C C T T T C T C C C C T C C C T A A A A C A C A C A C A T A C A C A T A C A C A T C T  
 T C A C T A C A C Z C A C C A C A C T C T C C A C C A C A T C T C C T C T C C C T C T T C T C C C C T C C C T A A A A A C A C A C A T A T A T C G G C T A A A T A T T A A A A A  
 A A G A G T C G C T A G C T A G C G C C G A T C G C T C G C T C G G C T C G A G C G C T C G C T A G T C G C T A T A T A T C G G C T A G C G C G C G C T A T A T A T A T A T C C C C - O H  
 A A A T A T A G A G A G C G C C T C G C C G C C T C G A G A G C T C T C G C G A T T A T C B G C T C G C C T C G C C G G G G G C C G G G G G C C T T T A T A T A T A T C C C C T T C C C - O H

图 27 最小携带信息的DNA (φ- $\lambda$ -DNA) 的理想碱基顺序。大肠杆菌的一根DNA链绘成的图需要如此大小的3000页。

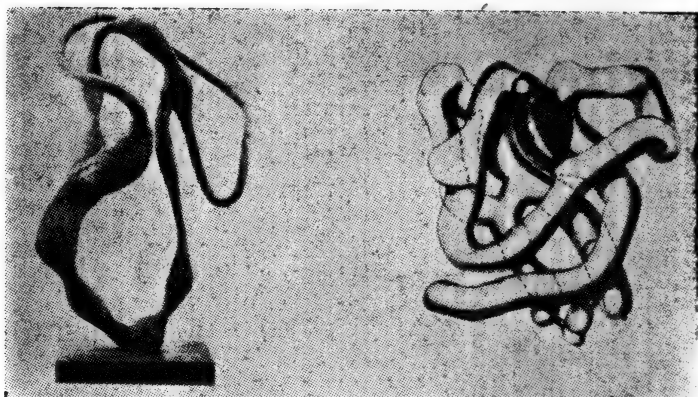


图28 左图舞蹈迈克尔·勒卡基斯 (Michael Lekakis)  
右图, 肌红蛋白模型。(约翰·肯德鲁(John Kendrew))<sup>[33]</sup>

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Chou, T.C. & Lipmann, F. (1952). Separation of acetyl transfer enzymes in pigeon-liver extract, *J. biol. Chem.* 196, 89—103.
- [ 2 ] Lipmann, F. (1960). Attempts toward a formulation of biological use of energy in terms of chemical potentials. In *Molecular Biology*, pp.37—47, Ed. by Nachmansohn, D. New York: Academic Press.
- [ 3 ] Cori, C. F. (1939). Enzymatic breakdown and synthesis of carbohydrate, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 7, 260—268.
- [ 4 ] Leloir, L. (1964). The biosynthesis of polysaccharides. *Proc. Plenary Sessions, 6th int. Congr. Biochem., New York (I.U.B. vol.33)*, pp.15—29.
- [ 5 ] Hestrin, S. (1959). Substrate specificity of chain propagation steps in saccharide synthesis. *J. cell. comp. Physiol.* 54, Suppl. 1, 127—137.
- [ 6 ] Grunberg-Manago, M. & Ochoa, S. (1955). Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. *J. Am. chem. Soc.* 77, 3165—3166.
- [ 7 ] Katchalski, E. (1964). Use of poly- $\alpha$ -amino acids in biological studies. In *New Perspectives in Biology*, pp.51—68. Ed. by Sela, M. Amsterdam, Elsevier.

- [ 8 ] Soodak, M. & Lipmann, F. (1948) . Enzymatic condensation of acetate to acetoacetate in liver extracts. *J. biol. Chem.* 175, 999—1000.
- [ 9 ] Stadtman, E. R. , Doudoroff, M. & Lipmann, F. (1951) . The mechanism of acetoacetate synthesis. *J. biol. Chem.* 191, 377—382.
- [10] Lynen, F. (1965) .Der Weg von der "aktivierten Essigsäure" zu den Terpenen und Fettsäuren. *Angew. Chem.* 77, 929—944.
- [11] Wakil, S. J. (1958) . A malonic acid derivative as an intermediate in fatty acid synthesis. *J. Am. chem. Soc.* 80, 6465.
- [12] Klein, H. P. (1957) . Som observations on a cell-free lipid synthesizing system from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 73, 530—537.
- [13] Lynen, F. (1959) . Participation of acyl-CoA in carbon chain biosynthesis. *J. cell. comp. Physiol.* 54, Suppl. 1, 33—49.
- [14] Lynen, F. (1967) . The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions. *Biochem. J.* 102, 381—400.
- [15] Webster, L.T. (1967) . Studies of the acetyl coenzyme A synthetase reaction. V. The requirement for monovalent and divalent cations in partial reactions involving enzyme-bound acetyl adenylate. *J. biol. Chem.* 242, 1232—1240.
- [16] Lipmann, F. (1967) . Peptide bond formation in protein biosynthesis. In *Regulation of Nucleic Acid and protein Biosynthesis*. pp. 177—186. Ed. by Koningsberger, V. V. & Bosch, L. Amsterdam, Elsevier.
- [17] Mooz, E. D. & Meister, A. (1967) . Tripeptide(glutathione) synthetase. Purification, properties, and mechanism of action. *Biochemistry*, 6, 1722—1734.
- [18] Strominger, J.L (1962) . Biosynthesis of bacterial cell walls. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 21, 134—143.
- [19] Lynen, F. (1961) . Studies on the biosynthesis of the terpenoid side chains of quinones. In *Ciba Fdn Symp. on Quinones in Electron Transport*, pp. 244—261. Ed. by Wolstenholme, G. E.W. & O'Connor, C. M. London: Churchill.
- [20] Popják, G. & Cornforth, J. W. (1966) . Substrate stereochemistry in squalene biosynthesis. *Biochem. J.* 101, 553—568.
- [21] Ziegler, K. (1964) . Folgen und Werdegang einer Erfindung. In *Les Prix Nobelen 1963*, pp. 165—184. Stockholm, Imprimerie Royale P. A. Norstedt & Söner.
- [22] Cairns, J. (1963) . The Chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 28, 43—46.

- [23] Sueoka, N. & Yoshikawa, H. (1963). Regulation of chromosomal replication in *Bacillus subtilis*. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 28, 47—54.
- [24] Mitra, S. & Kornberg, A. (1966). Enzymatic mechanism of DNA replication. *J. gen. Physiol.* 49, no. 6, part 2, 59—79.
- [25] Canellakis, E.S., Kammen, H. O. & Morales, D. R. (1965). Studies on the enzymic synthesis of thymidine-3'-triphosphate. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 53, 184—187.
- [26] Olivera, B. M. & Lehman, I. R. (1967). Diphosphopyridine nucleotide, a cofactor for the polynucleotide-joining enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 57 1700—1704.
- [27] Zimmerman, S. B., Little, J. W., Oshinsky, C.K. & Gellert, M. (1967). Enzymatic joining of DNA strands; a novel reaction of diphosphopyridine nucleotide. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 1841—1848.
- [28] Weiss, B., and Richardson, C. C. (1967). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 1021—1028.
- [29] Cori, G. T (1954). Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease. *Harvey Lect. Ser.* 48 (1952—1953), 145—171.
- [30] Marler, E. & Davidson, E. A. (1965). Structure of a polysaccharide protein complex. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 648—656.
- [31] Lipmann, F. (1966). Probleme in der Biosynthese der Chondroitinschwefelsäure. *Rheumatismus* 38, 1—9.
- [32] Strominger, J. L., Izaki, K., Matsuhashi, M. & Tipper, D. J. (1967). Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Fedn Proc. Fedn Am. Socs. exp. Biol.* 26, 9—22.
- [33] Kendrew, J. C. (1963). Myoglobin and the structure of proteins. *Science, N. Y.* 139, 1259—1266.
- [34] RajBhandary, U. L., Chang, S. H., Stuart, A., Faulkner, R. D., Hoskinson, R. M. & Khorana, H. G. (1967). Studies on polynucleotides, LXVIII. The primary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.* 57 751—758.
- [35] Robbins, P. W., Bray, D., Dankert, M., and Wright, A. (1967). Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science* 158, 1536—1542.

# 七、从生物合成进化的 现阶段设想过去<sup>①</sup>

F. 李普曼

纽约州纽约市洛克菲勒大学

引起我讨论这一问题的基本动力是我对遗传信息传递系统在有生命伊始就必不可少的这种说法感到不安。过去，似乎一切研究都集中在利用假设可能利用的能源上，如电的释放将不同来源的碳及氮合成核苷酸和氨基酸，从而又合成多核苷酸及多肽。依我的理解，这两类化合物对人有魅力，说明这样的假设，即它们在一开始就是很重要的。由于我对先有鸡而不是先有蛋的说法不满意，我便试图找到代替它的论点。我恐怕要说的也只是目前关于生命起源的大多数讨论中谈论到的那些自然哲学道理。但是我们必须尽力试一试。

## 1. 关于细菌的进化需要更多的数据

假如我们从有实验证实的限度内尽可能远地回顾过去，我们就会发现要从微生物生命开始。迄今人们很少接触到微生物的进化问题，主要原因是没有细菌化石，没有给我们留下可供研究其进化的材料。我们只有现在还活着的微生物，

<sup>①</sup> 转载自: *The Origins of Prebiological System and of Their Molecular Matrices*, S.W.Fox, Ed. Copyright 1965. Academic Press, Inc., New York.

以前曾有过什么，很不容易得到。我找过一些微生物进化图，发现最好的一幅是克卢弗尔（Kluyver）和范·尼尔（Van Niel）（1936）所提供的（图1）。这幅图基于这样的假设，在较复杂的微生物出现之前还有一个最原始的球

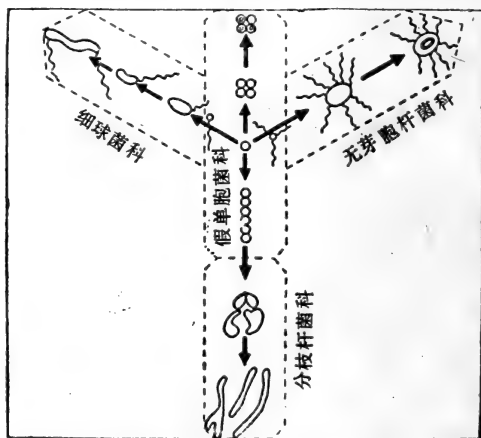


图1 细菌进化的假想图（引自克卢弗尔及范·尼尔，1936）。

菌。这些较复杂的微生物是由原始原球菌分支出来的。这种复杂的微生物长出细胞器等等。我所能看到的是球菌的代谢作用已经相当完备。一些微生物学家甚至不愿意谈及高级生物，因为从代谢作用的角度上说，微生物往往更有意思。微生物种类繁多，有一个代谢谱，这在高等生物中已经大部分没有了或只保留了其中的一部分。

生物进化中的微生物阶段是一个高峰，现在我们不得不及时地回过头去。正是在这个阶段里，大多数的代谢载体（一般称之为维生素）已经形成，我们有了从DNA向RNA然后向蛋白质的信息传递，这一阶段已为进一步发展做好了充分的准备，但这种原始的生物还没有真正达到形成个体的阶段。当人们看到按指数速度生长着的微生物培养基时，就可

以意识到它们不是真正意义上的个体。而是连续的复制过程，实际上人们不能把一个个个体区分出来，它是一条生长着的链。但这和我们当前的讨论没有多大的直接关系。在大多数微生物里还没有找到大的细胞内结构（这种结构首先出现于高等生物中），特别是在许多低等微生物中没有线粒体，唯一的结构是核糖体。微生物里负载着核糖体，是因为它们需要快速生长，即蛋白质合成。

现在，为着要勾画出进化的步骤，我愿意假定多核苷酸和蛋白质的形成是在晚期。让我们暂时离开这些，先考虑一下我们对复制机制的了解过程。我们最近对这方面的了解所以能这样快，是因为我们从中间代谢的研究中了解了生物合成及能量衍化中的能量利用方面的知识。从代谢方面说，复制机理相对地并不复杂。蛋白质的合成则是例外，因这种合成在供能方面虽然比较简单，但却需要将20种不同的氨基酸按一定顺序排列起来的复杂过程。所提供的产能代谢的化学作用更加复杂，如果我们首先考虑到这点是有利的。

## 2. 生物合成的两个原则

我们对代谢的了解产生了两个我认为是很重要的结果。一个是机体从起跑线开始合成其有机物质；从一些小的单位通过化学途径合成。第二是这些小单位借助于一个多用途的缩合剂ATP粘连在一起。我们尝试绘制一幅化学进化图， $\text{CO}_2$ 及 $\text{CO}_2 + \text{H}_2 = \text{甲酸}$ ，用来作为碳的起始物，通过还原作用缩合成较大的C-H-O衍生物。多糖可能是最早的聚合物之一，一个二碳单位乙酸便成为脂肪和脂质这一大类的前身，而后，氨又通过不同渠道参加进来，生成氨基酸，接着是核苷、核苷酸等复杂的化合物。将这些东西连结在一起需

要能量。自始至终，多数用于分子间脱水反应的缩合力都来自磷酸酐键，如ATP的磷酸酐键。在这里，磷酸键能的化学电位一般用于生物合成，也可供给其他需能反应如浓缩、收缩、神经的作用等等。现在人们自然已经熟知化学生物合成的机理，这也是我们在此将着重讨论的，因为在生物发展的早期阶段，我们主要是在研究化学生物合成的问题。

现在我们反过来简短地讨论一下生物获得缩合剂磷酸酐键的情况。我们发现生物借能量偶联机制得到缩合剂，最初得到的是电子转移电位，即一种氧化还原电位。然后，氧化还原电位又转化成基团电位。我建议用基团电位来测量由含能链衍化而来的自由能（图2）。在化学代谢作用的起始

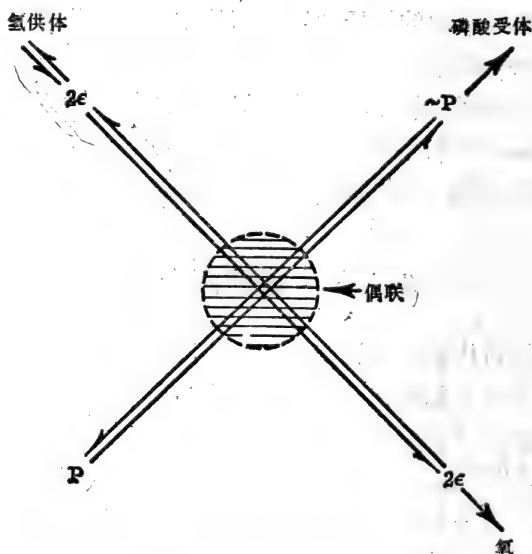


图2 电子传递和高能磷酸酯生成之间的可逆性偶联的交叉图解。栅状圆圈表示中间步骤的未知机制。（霍赫 (Hoch) 及李普曼, 1954)

进化阶段，可以不把氧而把正铁离子、硫酸根和氮看作是氢



的受体。必须看到某种偶联机制以更加复杂的形式在线粒体中发展起来。问题是要把电子流电位转化为磷酸键电位，把磷酸基团电位从无机磷水平提高到酸酐水平。

### 3. 化学偶联是生命起源的设想

现在我想假定两种化学能互换的偶联机制可能是生命发生的第一步。从最近发现的细菌进化中的光合作用，我断定这一类型的能量衍化是一个后来者。在此我们简要地叙述一下它的细节。看来无机焦磷酸在三磷酸腺苷之前早就作为一种能量载体出现在地球上的假设是可以接受的。

显然，如同活的有机物一样，地球也是一个所谓的热力学开放系统，因为它不断地吸收太阳的能量。可以看到地球上能量的循环是独立于生命之外而进行的，我建议把这种循环看作和生物能量转化相同的作用，或者看作是生物能量转化的前导。水的循环引起了我的注意，如图3所示，太阳的热通过蒸发作用把水，主要从海里提升到山顶或云层中。像在一个回流的冷凝管内一样，水在较冷的大气上层中冷凝后，又流到平原，回归大海。热能以这种方式

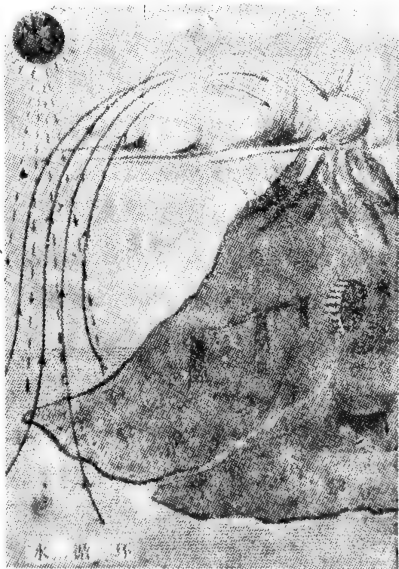


图3 水的循环。

通过水的蒸发上升而转化成机械能。这种能量广泛地用于水力发电就是能量偶联做功的一个很好的例子，即由热到机械功的能量循环。我们还看到，陆地上生命的发展依赖于这种水的循环。

现在我们来把这种无机循环和生物内能量的循环比较一下。最显著的特性见图4。这是我在1941年绘制的。我用一个代谢轮表示将外界可利用的能量转化为用于内部的系统，这种转化是通过把氧化还原电位转化为可供生物合成用的磷酸基团电位而完成的。假如和图3比较一下，就可以看到它们与生物外的物理能量转换循环（即产热的重力位能）之间的相似性。因此有理由假定，以某种方式，通过把地球上各种系统中存在的氧化还原电位，转化为对各种化

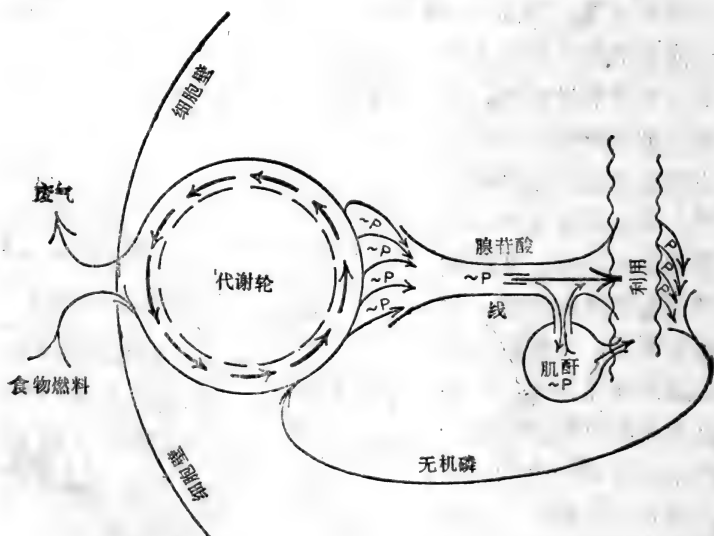


图4 产生~P流的代谢泵。~P由腺苷酸进出，腺苷酸好像电线，把电流传开。肌酐~P起着P-蓄积器的作用。

(李普曼, 1941)

学缩合反应都非常有用的磷酸键能，而形成一种化学能量的循环。例如，氢作为氧化还原的供体可以与硫酸根起反应，我们知道在微生物体内就是这样的。在微生物体内，这一反应用来产生磷酸键能；或者由氢或 $H_2S$ 与氧化高铁偶联，产生能量，但这只说明某些原始的可能性。

话说得稍微远一些，我发现洛文贝格 (Lovenberg) 等 1963 年发现的铁氧还原蛋白就是氢的活化的媒介，是较原始的催化剂之一，可能和这里所说的有些关系。这是一种小分子蛋白质，由 50 个氨基酸组成，但是含有迄今在一般蛋白质中已发现的 20 种氨基酸中的大约  $2/3$ ，它含有 7 摩尔的铁以巧妙的键相连，涉及等当量的松散结合的  $H_2S$ ，可能与蛋白质中 7 个分子的半胱氨酸相连。铁在起催化作用时，由  $Fe^{2+}$  变成  $Fe^{3+}$ 。从催化剂由原始变为复杂的角度来看，在这里找到一个由缺少许多种氨基酸的小的蛋白质分子构成的、由  $H_2S$  与铁离子松散相连的原始催化装置，这个发现是很重要的。这可能就是在后来代谢进化中大量使用的复杂的血卟啉的前身。同样复杂的镁卟啉（即叶绿素）不大可能出现在化学进化的早期。假如不是由于其他原因，这就意味着光合作用出现较晚，在厌氧梭状芽孢杆菌中高度发展了的化学合成出现于光合作用之前。我们必须记住，代谢进化要从原始阶段开始，我们今天看到的微生物世界仍然以厌氧代谢为主，和大多数动物不一样。许多在代谢上高度发展的微生物，如梭状芽孢杆菌，是绝对的厌氧生物，它们中间许多都没有血卟啉催化剂。

#### 4. 作为能量载体的焦磷酸

从磷酸方面来说，假定磷酸基团电位的产生可能起源于无机焦磷酸这种原始基团载体是有道理的。尤尼 (Juni) 等

于1948年在许多微生物以及一些较高级生物中，发现有大量的聚磷酸。一部分聚磷酸以不溶性偏磷酸的形式出现，可能是为了贮存；但更多的在代谢上更活泼的可溶性短链聚磷酸似乎也存在。这些聚磷酸进入代谢库的再循环是很难表示的。科恩伯格等在1956年证实，聚磷酸向三磷酸腺苷缓慢地再参入。他们断定聚磷酸中的磷酸基团电位比ATP中的低，但并不排除聚磷酸作为原始载体的可能性。哈兰德·伍德 (Harland Wood) 和他的同事秀和伍德 (Siu and Wood, 1962) 发现了一个非常有趣的反应，看来与此问题有关。如图5所示，他们发现无机磷酸可作为磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 高能磷酸键的接受分子。此转移反应与CO<sub>2</sub>的固定相偶联。相反，当磷酸由焦磷酸转移产生PEP时，就有CO<sub>2</sub>释出。较普遍的反应类型列在下面以资比较，在这里GDP是磷酸的接受分子，或反过来说，GTP是磷酸供体。伍德的反应是无机磷酸可能作为磷酸接受体以生成焦磷酸的一个

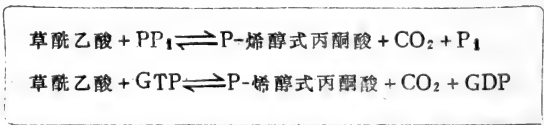


图5 焦磷酸酯在生物合成中的功用。(引自秀及伍德, 1962)

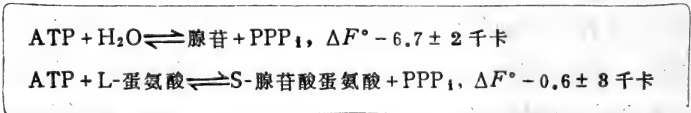


图6 三聚磷酸酯在生物合成中的功用。(引自马德及曼恩, 1963)

例子。相当重要的是，此反应是可逆的，焦磷酸作为高能磷酸供体参与反应。

另一个类似的绝妙的反应是哈维·马德和曼恩 (Harvey Mudd and Mann, 1963) 在研究活性蛋氨酸合成机制

时发现的。他证明了当ATP与蛋氨酸反应时，释出无机三磷酸酯，这也是一个可逆反应，见图6。这是一个很有趣的反应，在其中三磷酸置换掉蛋氨酸而与腺苷核糖5位碳原子粘连。另一个有着非常相似机理的例子是在巴克尔辅酶生成时 (Barker, 1961) ATP与维生素B<sub>12</sub>的反应。在这里通过三磷酸酯的置换，腺苷核糖5位碳原子与中心钴相连。

## 5. 微生物生命的进化

现在我们来讨论这个较为困难的问题，看看如何能在早期建立的能量循环与我们现在所看到的充分发展了的微生物之间架起一座桥梁。我们从生物发展后期的历史知道，每一个发展都是一步步进行的，因此，我正尝试着从生命系统发生以前的最初几个阶段开始，设计这样一个分步的代谢进化过程。我们的任务就是把每一步之间的空隙填上。首先，也是最困难的，是要提出生物在把自己的个体圈起来以前，亦即真正的成为一个生物体之前的那一段发展过程。在这以后，内部结构的发展看来是缓慢的。我已经简单说过，在已经有细胞壁包围的较原始的微生物中，我们看到的唯一的内部结构是相当简单的核蛋白体。我们推想它们在那个阶段可能是完全厌氧或者大部分厌氧的。熟悉磷酸化反应发展图的人会记得我们把磷酸化反应分为两种类型。第一种是发酵磷酸化反应，假定它在进化的早期就已发生。用实验室的行话，叫做“抽提的”磷酸化反应，因为它不依赖于复杂的细胞结构，而受底物的限制，并且有化学计量关系。容易给人以它是第二种氧化链磷酸化系统的祖先的印象，这种系统是在呼吸作用参入后才发展起来的，而现在则更加普遍，更加

有效率但也更加复杂了。在这一机理中，每一对氢原子通过一系列的氢载体从底物转运到氧，将产生 3 个或更多的磷酸基。发酵作用的机制要简单得多，但仍有一个问题，奥巴林 (Oparin) 很早就认识到了，那就是，我们如何获得催化剂？我们需要各种催化剂，我们必须找到具体多种形式的原始催化剂来促进上述的反应。我们已经考虑到一种无机类型的发酵作用，譬如把氢转移到硫酸根，或把  $H_2S$  转移到  $Fe^{++}$ 。人们可能还记得在这个反应里铁氧化还原蛋白是一个原始的催化剂。

## 6. 渐进的化学合成的演化

现在我们必须谈一谈复杂的多碳结构的发展。我从大体上推想，最早的碳链应该是一种糖的类型。己糖、戊糖以及二碳乙酸是许多发酵作用的底物和产物。因而推测脂肪酸的合成是一种较普通类型的合成脂肪酸的发酵作用，最常见的是丁酸类型。看来这些向我们显示出一个从糖到脂肪的代谢演化阶段。表 1 简单地概括并肯定了，氨基酸结构演化的方向是按照糖的发酵反应中所发展起来的方法学继发而来的。20 个氨基酸由上到下依化学复杂性顺序排列。这里还可以看到，虽然酮戊二酸及草酰乙酸一般认为是呼吸的中间产物，但似乎也在复杂的酵解作用中出现。看来许多氨基酸都或多或少地直接起源于糖和脂肪酸，通过起始的缩合反应，继而主要通过对  $\alpha$ -酮酸的转氨作用把氮固定上去。表 1 是分段描述的，但引用全表是要证实，较复杂的分子是由小片段只按几个基本的生物合成原理在发酵过程中演化而来。而不是要把这种分子演化说成是在酶出现以前就可能存在的向微生物前阶段发展的结果。

表 1 氨基酸的衍化 (现代演化阶段)<sup>a</sup>

序号	来 源	氨基酸	前驱物片段
1	碳水化合物	甘氨酸	C <sub>2</sub>
2		丙氨酸	C <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> + C <sub>1</sub>
3		丝氨酸	
4		半胱氨酸	
5		门冬氨酸	C <sub>3</sub> + C <sub>1</sub>
6		门冬酰胺	
7		苏氨酸	
8		甲硫氨酸	
9		苯丙氨酸 [(C <sub>4</sub> + C <sub>3</sub> ) - C <sub>1</sub> ] + C <sub>3</sub> = C <sub>6</sub> · C <sub>3</sub>	
10		酪氨酸	
11	碳水化合物 + 脂肪酸,	谷氨酸	(C <sub>4</sub> + C <sub>2</sub> ) - C <sub>1</sub> = C <sub>5</sub>
12		谷氨酰胺	
13		脯氨酸	
14		精氨酸	
15		赖氨酸	复合物
16	主要为脂肪酸	缬氨酸	复合物
17		异亮氨酸	
18		亮氨酸	
19	复合物	色氨酸	与核苷酸合成相似
20		组氨酸	

<sup>a</sup> 详见弗鲁顿(Fruton)及西蒙兹(Simmonds)(1958)

## 7. 嘌呤和嘧啶的生物合成

这一简要的评述是要说明以磷酸键能形式存在的化学电

位十分适用于复杂化学体系的构成这一课题。尽管不谈复杂的酶学，我们也能体会到往回设计这样一个示意图的困难。我们把着重点更多地放在诸组成分子的简单性及通过聚磷酸进行脱水反应的一致性上。

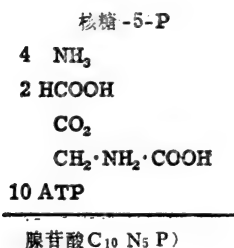


图7 嘌呤的生物合成。

如图7〔布坎南 (Buchanan, 1960)〕所示，嘌呤环是由小单位，如氨、一碳衍生物及唯一的二碳化合物甘氨酸组成的。核糖是基础，在此基础上生长出整个环系统来。我想指出的要点是这些小片段从10个~P中吸收能量后组合在一起的。使我不解的是为什么一定需要利用辐射能而不从一

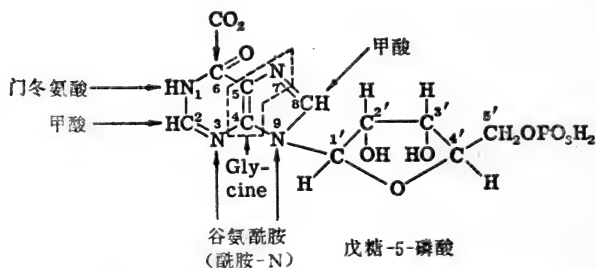


图8 嘌呤核苷酸原子的起源。(引自布坎南, 1960)

开始就想到用化学能来进行缩合反应。图8列出一个更详细的合成路线示意图，由左向右。

嘧啶的合成较详细地列入图9 (布坎南等, 1959)。其开始与嘌呤合成不同，这种差别很有意思。这里，门冬氨酸是核心，在其上生长出环的结构。门冬氨酸是合成“队伍”



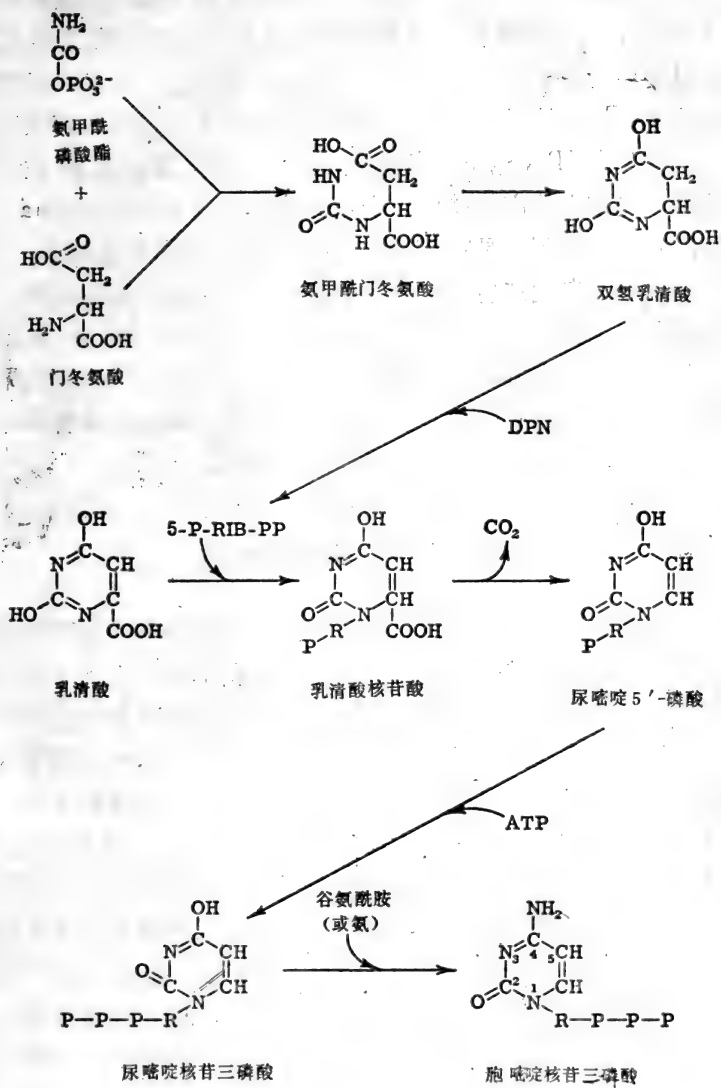


图9 嘧啶的酶促合成。

里的突出成员。这里加进去的唯一的小东西是氨甲酰磷酸酯（CMP），它缩合到门冬氨酸的氨基上去。氨甲酰门冬氨酸自发地闭合成六员环，生成乳清酸。自此以下，生成尿苷酸的途径就很清楚了。为了解释清楚，我应当在这里稍为谈几句有关CMP（琼斯和李普曼，1960）的情况，它曾被认为是最先存在的高能磷酸化合物的候选者（伯纳尔Bernal，1957）。这一判断是吸引人的，因为CMP可由氰化物及无机磷化合物自发地生成，并且看来是唯一可被生物利用的在低温条件下自发生成的高能化合物。但我认为CMP作为此类化合物的祖先并不很合适。前已指出，我倾向于以无机聚磷酸作原始的能量载体；在整个生物合成中磷酸酐键所具有惊人的、多方面的缩合能力是非同一般的。

## 8. 多肽合成演化的要点

我有意在这里略去催化剂这一重要问题而集中谈到组成问题。催化剂当然是需要的。但在目前我不想扩大到这个问题上去。多肽结构对催化剂的显明的适宜性使我想谈谈多肽合成的几个可能的原始阶段。考虑到可能有一个按序列形成的原始方法时，我们就应该想到细胞壁前体中多肽的合成。这种合成以非模板形式进行。斯特罗明格尔和他的小组（Ito and Strominger, 1960）证明了依次加入专一性酶，在没有模板的条件下，一个多肽上可以缩合多达6个氨基酸。这是没有RNA参加的一种信息传递。看来可以设想原始的多肽可以在没有复杂的信息传递系统的情况下合成。这一点可能是很重要的，即这是细胞壁合成的模式，并可能解释蛋白样物质最早的一种形状。多肽一旦合成以后，它们就会立即表现出作为催化剂的适宜性，特别是在与金属离

子，如前所述的铁氧化还原蛋白的结合中。

## 9. 信息传递的演化

现在许多人都认为信息传递可能不是最初从DNA开始。DNA实际上是后来才发展起来的。这样一个过程的提出是因为看到在RNA病毒里，RNA已足以携带信息了。确实RNA病毒的变异速度相当快，这对在发展的早期产生大量的变种很有利。从这里往回设想，可以想到最初仅仅一对有氢键相连的碱基（如腺嘌呤及尿嘧啶）作为开端可能就足够了。从表2可以看到，这么一对碱基，就可以组成8种三联

表2 相应于腺苷酸-尿苷酸对的氨基酸三联体<sup>a</sup>

序号	三联体	氨基酸
1	AAA	赖氨酸
2	AAU	
3	AUA	门冬酰胺
4	AUU	酪氨酸
5	UAA	异亮氨酸
6	UAU	
7	UUA	亮氨酸
8	UUU	苯丙氨酸

a. 可能的数目： $2^3 = 8$ 。

体。将尼伦伯格-奥丘阿的综合数据归纳成一个表（Jones and Nirenberg, 1962; Gardner *et al.*, 1962），可以发现8种结合中具有单一氨基酸意义的可归结为6组。可以有许许多多不同的化学侧链，而这些氨基酸又组成蛋白质。仅

仅选择UA就生成苯丙氨酸及酪氨酸中的两个酚基、亮氨酸及异亮氨酸中的两个疏水侧链、赖氨酸的一个碱性侧链和以门冬酰胺为代表的二羧酸类型。它是一个核心，可作为最初起催化作用的蛋白质。

## 10. 结 语

非连续性进化学说未必正确的感觉促使我作了上述探讨。导致我试图去发现一个从生物前，主要经过化学发展最后到达微生物阶段的连续性进化历程。现在已知的进化都似乎是从这一微生物阶段开始起步的。我试图重新塑造一个生物发展的模式，即进化必定是向前发展的，是从比较原始到比较复杂的状态有序地发展下去。回顾过去的发展需要提出一些假设，而这些假设是很难也许是不可能加以证实的。我想在代谢图里更仔细地寻找进化的几个原始阶段以期获得代谢的“活化石”，也许可能找到一些连系。我假定化学合成与电子转移的偶联发生在进化的早期，与地球上非生物的能量偶联机制（如水的循环）处于同期，这作为一个重要的前提。近来发现焦磷酸酯和三磷酸酯出现在可逆性能量转移反应中，支持了聚磷酸酯是原始的能量载体的看法。在蛋白质的演化过程中，这些原始的结构，如含铁的缺氨基酸品种的氢载体铁氧化还原蛋白可以作为代表。追溯得更远一些，以原始方式合成的细胞壁多肽可作为模板前早期的样本。本文主要借助现代的知识对比较模糊不清的过去的代谢进化过程尝试地作了描述。

## 参 考 文 献

- [1] Barker, H. A. (1961). *Federation Proc.* 20, 956.

- [ 2 ] Bernal, J.D. (1957) . *Origin Life Earth Rept. Intern. Symp. Moscow 1957* p.132.
- [ 3 ] Buchanan, J. M. (1960). In "The Nucleic Acids" (E. Chargaff and J.N.Davidson, eds.), Vol. III, p. 303. Academic Press, New York.
- [ 4 ] Buchanan, J.M., Hartman, S.C., Herrman, R.L., and Day, R. A. (1959) .*J.Cell.Comp.Physiol.*54, Supp.I 139.
- [ 5 ] Fruton, J.S., and Simmonds, S. (1958) . "General Biochemistry, " 2nd ed. Wiley, New York.
- [ 6 ] Gardner, R.S., Wahba, A.J., Basilio, C., Miller, R.S., Lengyel, P., and Speyer, J.F. (1962).*Proc.Natl.Acad.Sci., U. S.* 48,2087.
- [ 7 ] Hoch, F.L., and Lipmann F., (1954). *Proc.Nat. Acad. Sci. U.S.*40,909.
- [ 8 ] Ito, E., and Strominger, J.L. (1960) .*J.Biol.Chem.*235,PC 5.
- [ 9 ] Jones, M.E., and Lipmann, F. (1960) .*Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.*46, 1194.
- [10] Jones, O.W., and Nirenberg.M.W. (1962). *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.*48, 2115.
- [11] Juni, E., Kamen, M.D., Reiner, J.M., and Spiegelman, S. (1948). *Arch.Biochem.*18, 387.
- [12] Kluyver, A.J., and van Niel, C.B. (1936). *Zentr.Bakteriol. Abt.II*, 94, 369.
- [13] Kornberg, A., Kornberg, S.R., and Simms, E.S. (1956) . *Biochim.Biophys.Acta* 20, 215.
- [14] Lipmann, F. (1941) .*Advan.Enzymol.* 1, 99.
- [15] Lovenberg, W., Buchanan, B., and Rabinowicz, J.C. (1963) . *J.Biol.Chem.*238,3899.
- [16] Mudd, S.H., and Mann, J.D. (1963) .*J.Biol.Chem.* 238,2164.
- [17] Siu, P.M.L., and Wood, H.G. (1962).*J.Biol.Chem.*237,3044.

## 八、知识的指数增长造成的 不均衡性<sup>①</sup>

F. 李普曼

纽约州纽约市洛克菲勒研究院

〔此文系在1961年12月长岛大学由赖斯博士 (Dr.Lincoln Reis) 主持的“变化中的生活和人的概念” (Changing Concepts of Life and Man) 专题讨论会上的发言〕

最近我常常自问：我们对我们经受过来的变化程度言过其实了吗？即使对近来的变化无可否认有夸大之处，但我仍然发现随着自然科学的成就，这些变化确实无论在程度上或产生的影响上都以不同寻常的速度加快了。在我们面前呈现出一个按指数上升的曲线，“反应”飞快地进行着。当我们以科学的进展对时间作图时，就可以获得一条上升曲线，如图1上方所示。同时，如果更仔细地考察一下情况，就会发现它只画出了我们这个人主宰的世界全图的一部分。没有画出的部分是人与人之间的关系，或广义地说，是人的社会关系，这种关系并没有随着有一个相应的根本的变化。相反，贯穿整个历史过程，只是多少有一些不同程度的摆动，有时在一个方面或者另一方面摆动大些，但终归又回复到原来的模式。我们接受历史总的倾向是有某种成就的说法，我们现时还不愿对这种成就下最后的定论，但历史的变化至多也只

---

① 转载自 *Perspectives in Biology and Medicine*, Vol. V, No. 8, Spring 1962, Copyright 1962 by the University of Chicago, Chicago, Ill.

能说是与时间缓慢地成正比的，而不是按指数增加的，正如图1中下面的曲线所表明的那样。我认为两条分道扬镳的曲线鲜明地显示了我们时代的问题。

假如我们像生物学家那样观察人类与其环境之间的关系，就会发现从生物学进化的角度来看，人类作为一种生物种属，在6000年有史时期里，即使有变化也是极小的。并没有出现在很大规模上显著地影响整个人类种属活动的变化。相反地，通过人类与其自然环境间的相互作用，人作为理性动物在生物进化范围内所发展到的特殊地位却发生了深刻的变化。

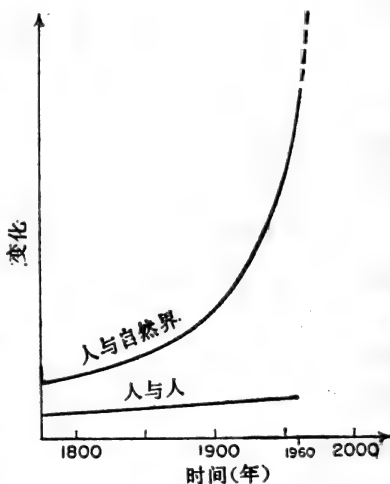


图1

人能够通过其能表达并记载于文字的能力，可以把学到的知识交流传递。这一点已被证明在我们对自然界的知识的发展上是最重要的。在自然科学的发展中，最近指数性的发展主要是由于经验知识的交流。假如前辈的知识技巧不传给后一代，自然科学这样的发展是不可能的。

这是因素之一，现在让我们看一看另一个我认为也是重要的因素。作为一个生物学家，现代常称为分子生物学家，我曾跟着生物科学的发展走过一大段路程。通过对维持机体生存的以及近几年来对生殖有关的化学及物理装置的分析，

我们逐渐认识到在细胞内存在着某些我愿称为生物技术学的东西，亦即生物在细胞水平上的问题同我们在外部的人工技术学中所遇到的问题是相似的。我们的集体变成了高等生物，其结构与功能的原理同我们最近在细胞学中所了解到的并无不同。

这种细胞内的或叫机体技术学在进化过程中发展很慢。对环境产生变异的方法是通过适者生存这样一个缓慢过程。但人类作为一种有思维能力的动物，学会了制造工具，极大地增强了解决问题的能力，而在不久以前，我们的器官一直是用这种能力工作的。一方面，一些辅助工具如显微镜、电镜、X线衍射仪器等使我们的眼睛能识别直到原子水平这样细微的影像；另一方面，那种可以称为解决空间问题的能力，通过运载工具制造工程的发展而增强了。这些运载工具以愈来愈快的速度带着我们周游世界并进入宇宙空间。这只是两个说明生物学家是如何看待人类与其环境的相互作用的例子。

实验和理论最近使我们有能力获得的能量达到一个不久前还不敢梦想的水平。也正是技术学上这一特殊的进展成为我们这一代面临的最紧迫的问题。现在能够为人利用的能量已经发展到地球外的能量级，例如太阳能。在能量利用问题上我们还只处在开始阶段，并很可能将大大提高现有水平。但这些能量确实已经能移山倒海，并达到了成为人类存在的致命威胁的程度。

产生这个问题的原因，我想已由上面两条曲线表明。曲线以一种方式反映了人类目前所处的困境。也反映了作为理性动物的人飞跃地超过作为社会动物的人的分裂状态。唯一补救的办法是调整下方的曲线，人与人间的社会的、感情的以及政治的关系需要进行调整，使之适合新的环境。这种环



境是由人类这种有思维能力的动物学会把自己和周围的自然环境溶为一体的非常精细的解决问题的能力所造成。

这就是愈疾良方，虽然我能够看到从哪里可以找到补救的办法，但要在一个短时期内就做出调整是一个极大的难题，现在摆在我们面前的问题是：我们能否在酿成无法挽回的大灾祸之前就挽回这一形势？

中科院植物所图书馆



S0014740

86.9.10.

西单书

书价

1.50

号

1104156

开票日期

86.9.9.

242750

58.17304  
268

一个生物化学家的求索

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
沈金志	86.10.13	董志刚	99.5.26
陈文祥	86.12.1		

分 类	编 号
登 记 号	

58.17304  
268

242750

### 读者注意

- 1 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
- 2 请在借书期限前送还以便他人阅读请赐予合作。

成1106-1

统一书号：13031·31

定 价： 1.50

本社书号：4719·13-1

科技新书目：117-23