

生物学研究概说

# 生物的能量贮存

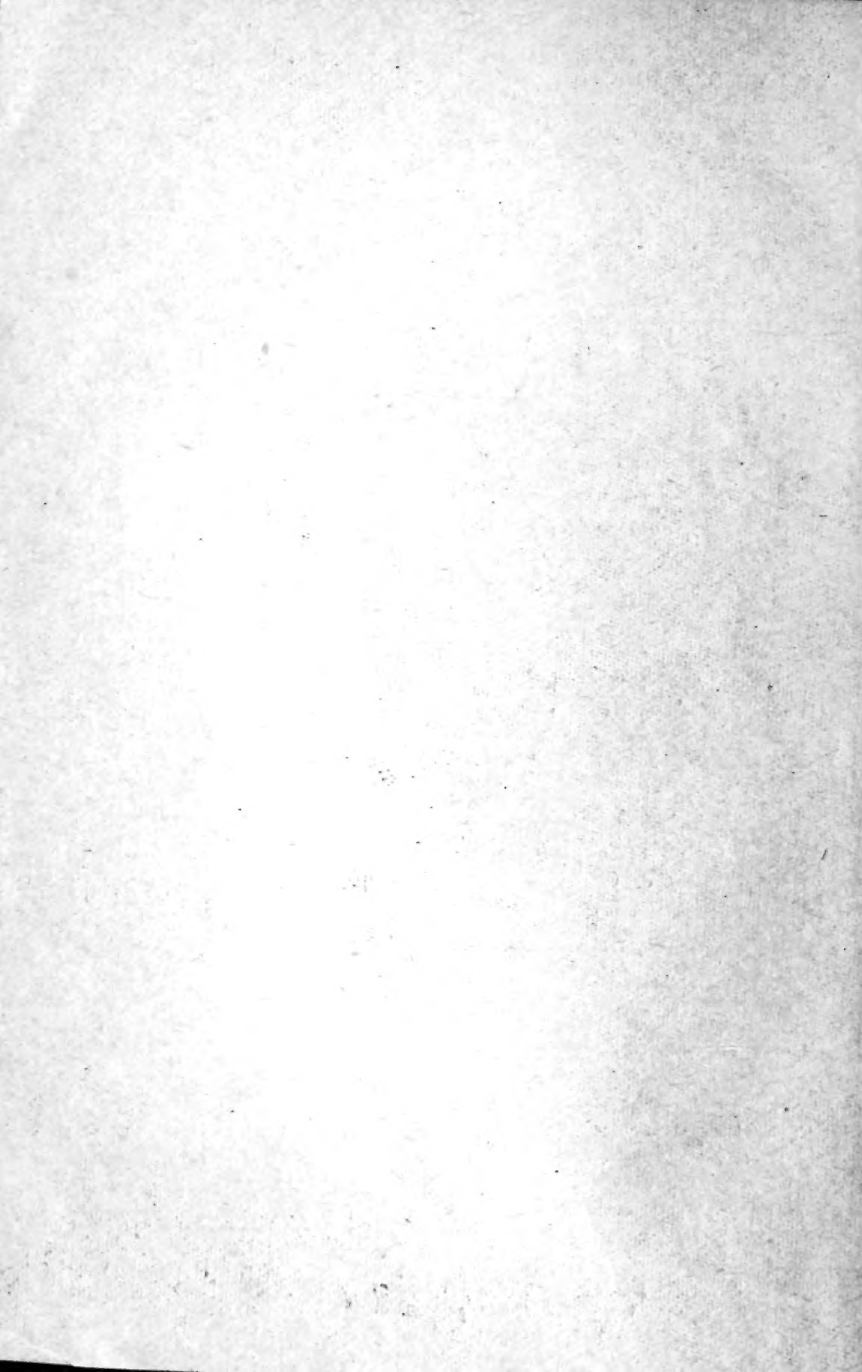
[英] C. W. 琼斯 著

17111  
8

科学出版社







58.1711  
598

· 生物学研究概说 ·

# 生物的能量贮存

[英] C. W. 琼斯 著

李立人 译

邱国雄 校



科学出版社

1980

中科院植物所图书馆



S0011827

22473

## 内 容 简 介

本书以氧化磷酸化反应为主要例子，扼要地介绍了生物能量贮存的主要特征和可能的机理。本书的前面几章叙述生物体系中能流的本质和在活细胞中进行的各种类型的能量贮存过程，着重阐述了与之相连接的氧化-还原反应的概念，这类反应使电子和氢在传递过程中，逐级释放能量，并使它转换成为可供各种生物功能包括各种生理生化反应所利用的能量贮存的形式。后面几章则讨论生物膜在能量贮存中的作用，它们的定向性质和作用机理。

本书对于从事生物力学、生物膜和细胞代谢等方面的研究工作，是一本适宜的入门书，对大专院校的生物化学、生物物理和植物生理等专业的教师及高年级学生和研究生也是一本有用的参考书。

C. W. Jones

*Outline Studies in Biology*

BIOLOGICAL ENERGY CONSERVATION

Chapman and Hall 1976

· 生物学研究概说 ·

生物的 能量 贮存

[英] C. W. 琼斯 著

李立人 译

邱国雄 校

\*

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

\*

1980年9月第一版 开本：787×1092 1/32

1980年9月第一次印刷 印张：3 1/4

印数：0001—3,980 字数：70,000

统一书号：13031·1336

本社书号：1855·13—10

定价：0.55 元

# 目 录

<b>1. 生物力能学导言</b> .....	1
1.1 生物能的换能 .....	1
1.2 三磷酸腺苷(ATP) .....	4
1.3 磷酰基的转移反应 .....	6
1.4 焦磷酸的裂解 .....	8
1.5 底物水平磷酸化 .....	8
1.6 电子传递中的一些氧化-还原反应 .....	9
1.7 呼吸作用 .....	12
<b>2. 呼吸链的组份</b> .....	15
2.1 烟酰胺核苷酸脱氢酶 .....	15
2.2 呼吸链的一些脱氢酶 .....	16
2.2.1 黄素蛋白 .....	16
2.2.2 铁-硫蛋白 .....	18
2.2.3 NADH 脱氢酶 .....	19
2.2.4 琥珀酸脱氢酶 .....	21
2.3 烟酰胺核苷酸转氢酶 .....	22
2.4 泛醌 .....	23
2.5 细胞色素 .....	24
2.5.1 b-型细胞色素 .....	27
2.5.2 c-型细胞色素 .....	27
2.5.3 a-型细胞色素 .....	28
2.6 分光光度测定的研究结果 .....	31
2.6.1 吸收光谱 .....	31
2.6.2 氧化-还原作用动力学 .....	33

2.7 电子传递 .....	34
<b>3. 偶联膜的机构和功能 .....</b>	<b>37</b>
3.1 线粒体的结构与功能 .....	38
3.2 能量贮存系统的机构 .....	40
3.2.1 呼吸链复合物 .....	40
3.2.2 ATP 酶复合物的形态和性质 .....	41
3.2.3 呼吸链组份的不对称性排列 .....	44
3.2.4 偶联膜的重组 .....	46
3.3 溶质通过偶联膜的运输 .....	47
3.3.1 阴离子 .....	48
3.3.2 阳离子 .....	50
<b>4. 供能态 .....</b>	<b>51</b>
4.1 能量偶联部位 .....	52
4.2 呼吸控制 .....	53
4.3 交叉点 .....	55
4.4 解偶联剂 .....	56
4.5 磷酸化作用的抑制剂 .....	57
4.6 逆转的电子传递 .....	58
4.7 供能态的概念 .....	60
<b>5. 氧化磷酸化反应的机理 .....</b>	<b>61</b>
5.1 化学学说 .....	61
5.1.1 供能的呼吸链载体 .....	62
5.1.2 联系能量的反应 .....	63
5.2 化学渗透学说 .....	64
5.2.1 运输质子的呼吸链 .....	65
5.2.2 偶联膜的离子不透性 .....	68
5.2.3 交换扩散系统 .....	68
5.2.4 运输质子的 ATP 酶 .....	69
5.2.5 联系能量的反应 .....	71



5.3 构象学说 .....	72
5.4 化学学说、化学渗透学说还是构象学说? .....	75
<b>6. 细菌系统 .....</b>	<b>78</b>
6.1 呼吸作用 .....	79
6.2 氧化磷酸化作用 .....	81
6.3 供能态的利用 .....	83
6.4 无机的电子供体和受体的利用 .....	85
6.4.1 无机的呼吸作用 .....	86
6.4.2 化能矿质营养细菌(化能合成作用) .....	87
6.5 紫色膜的能量贮存 .....	89
<b>7. 后记 .....</b>	<b>91</b>
<b>建议进一步阅读的书刊.....</b>	<b>94</b>



# 1. 生物力能学导言

## 1.1 生物能的换能

地球上最终的能源是太阳的电磁辐射。高等植物和藻类利用电磁辐射的可见部分和近红外部分，来推动二氧化碳的还原同化，同时放出分子氧 ( $O_2$ )。



许多细菌也能进行类似的自养(自我喂饲)过程，但不放出氧气，而是用其他无机的或有机的还原剂，例如  $H_2S$ ，苹果酸等来代替水。



这种依赖光的碳水化合物合成反应被称为光合作用。

把还原当量从还原态的供体 ( $H_2O$ ,  $H_2S$ ) 转移到氧化态的受体，是所有光合系统的共同特征。这种转移先是以比较复杂的有机分子作为氧化态的受体，如  $NAD^+$  或  $NADP^+$  (第 2 章)，而最终的受体则是  $CO_2$ 。这种一连串多步骤的反应在一个或不止一个点上受到光能的强化(图 1.1)，因此，把这种传递反应称为光合电子传递(虽然它也有涉及电子、氢原子和氢化物离子的转移)。太阳能先是被特殊适应的吸收光的色素(叶绿素和胡萝卜素)捕集，然后再转化为一种生物学上普遍的能量形式，即三磷酸腺苷(ATP)。这种转换的过程是电子传递的直接结果，这个反应被称为光合磷酸化作用。形成的 ATP 则被用来推动各种各样需能的细胞反应，例如，细胞

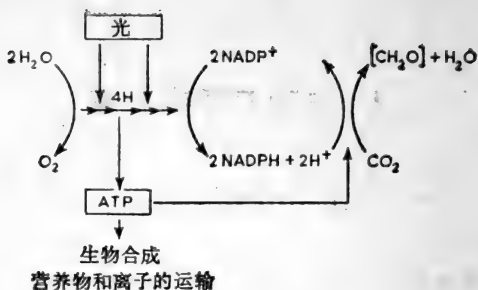


图 1.1 简化的光合作用图解

物质的还原方式生物合成(合成代谢),营养物运输,维持离子平衡等。

植物光合作用的最终产物(细胞物质和分子氧)后来被异养有机体(非自我喂饲)的代谢和能量转换系统所利用。因此,异养有机体也利用太阳能,只不过是间接而已。它们先把碳水化合物,脂肪和蛋白质裂解成单体,然后重新分配,形成各种较小的、更为氧化的碳骨架,以及提高另一些分子的还原程度(例如  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADPH}$ )。这个过程(分解代谢)可导致少量能量的释放,这些能量可通过底物水平磷酸化偶联而形成  $\text{ATP}$ 。

底物水平磷酸化是一种较简单的二步或三步的反应过程,并且是大多数厌氧生物所采用的唯一能量贮存机理。分解代谢中所形成的  $\text{NAD(P)H}$ , 大部分是用于还原某些氧化的碳骨架,把它同化为特异的细胞大分子,小部分  $\text{NAD(P)H}$  是在合成低分子量的废弃物中被氧化掉,例如在酵母的酒精合成中、或在动物组织和某些细菌的乳酸合成中被氧化。这种以有机代谢物作为起始还原剂 ( $\text{AH}_2$ ) 和最终氧化剂 ( $\text{E}$ ) 的氧化还原反应(图 1.2) 被称为发酵作用。

底物水平磷酸化的能量贮存，只代表需氧性生物总能量贮存能力的一小部分，因为所得到的NADH还可以通过一系列的复杂反应被分子氧(一种强的氧化剂)氧化。这一过程(呼吸作用或氧化过程的电子传递)可释放出大量的能，这些能量又可以通过氧化磷酸化作用(或呼吸链磷酸化,图 1.3)储存于ATP中。氧化磷酸化的效率比底物水平磷酸化更高；葡萄糖在动物组织中的氧化,就是一个很好的例子。

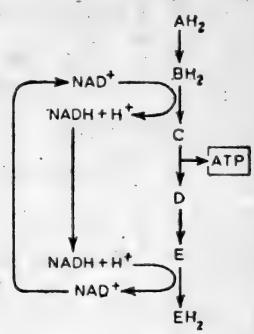


图 1.2 一种假设的发酵途径

在有氧情况下，一个克分子的葡萄糖完全氧化为二氧化碳和

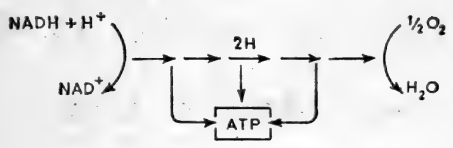


图 1.3 简化的氧化磷酸化图解

水，可净得 38 个克分子的 ATP。而在缺氧时(例如在剧烈运动的肌肉中)，葡萄糖被不完全地氧化为二个克分子的乳酸(糖酵解或同型发酵)，只同时净产生二个克分子的 ATP。值得注意的是，氧化代谢的最终产物——二氧化碳和水，就是光合作用的主要底物。因此，呼吸作用和光合作用构成了碳、氢、氧循环的重要部分。

有少数几种细菌还改进了它们的厌氧的能量贮存能力；它们除了进行底物水平磷酸化之外，还有一种不用分子氧而是用另外一些种类的氧化剂，来进行氧化反应的呼吸作用(厌氧性呼吸作用)。所用的氧化剂包括有氮的氧化物(例如  $NO_3^-$ ，

$\text{NO}_2^-$  和  $\text{N}_2\text{O}$ ) 和硫的氧化物 (例如  $\text{SO}_2^-$  和  $\text{SO}_3^-$ ) 或有机氧化剂如延胡索酸。总的来说,这类氧化剂与分子氧相比,是较弱的电子受体,因此,它们的 ATP 产量比从氧化磷酸化得到的要少。然而,这些系统在能量贮存效率上显示一个十分重大的改进,它超过了简单的厌氧性发酵的效率。

一类更为特殊的细菌——**无机化能自养菌**,能利用分子氧或更为少见的利用无机氧化剂(例如  $\text{NO}_3^-$ ),来氧化各种无机还原剂(例如  $\text{H}_2$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ )。这些不同类型的呼吸系统,根据其有关的供体和受体的确切性质,而产生不同数量的 ATP。这些细菌的大部分象高等植物和某些光合细菌一样,都是自养的,因此必须把它们的大部分 ATP,转用于推动二氧化碳的还原同化。它们把营养物转变为细胞物质的效率是十分低的,但是它们这种不寻常的利用无机物质的能力,使它们能在剧烈竞争的环境中,占有一个安全的隐蔽所。

## 1.2 三磷酸腺苷 (ATP)

以上所述各种生物能量守恒系统的共同特征,就是它们能以形成 ATP 来储存能量。ATP 首先是由 Fiske 和 Subbarow 于 1929 年,从哺乳动物的肌肉提取液中分离出来,并且在几年之后,确定了它的结构(图 1.4)。

在 pH7 时,ATP 的三磷酸侧链的 4 个羟基中,有 3 个羟基是完全解离的 ( $\text{pK} = 2.1$ ),第 4 个也是离解占优势的 ( $\text{pK}_2 = 6.8$ )。因此,在生理的条件下,这个分子带有很强的负电荷 ( $\text{ATP}^{4-}$ ),并易于和二价阳离子,例如  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  结合。

可是对 ATP 的化学性质,曾经有许多错误观念,特别是受到生物化学家的误解。把 ATP 看成是高能分子或者含有

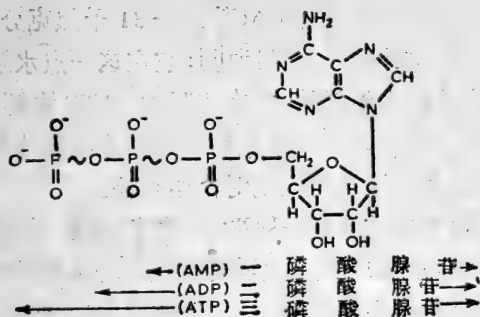
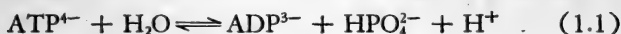


图 1.4 ATP 的结构

高能磷酸键(常用符号~表示)的概念是不正确的。产生这些错误观念的原因,是当 ATP 在 pH 7 进行水解反应时,它的表



观平衡常数 ( $K'$ ) 相当高,这是因为它的反应受较高 pH 的促进,以及由于它的主要产物 ( $\text{ADP}^{3-}$  和  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), 都带有负电荷的共振杂化键的关系,这就是说,它们所含的自由能,比原来预想的要少。在平衡时,

$$\Delta G^{\circ'} = -2.303RT \log K'$$

这里  $\Delta G^{\circ'}$  是水解时改变的标准自由能(千焦克分子<sup>-1</sup>),  $R$  是气体常数(8.314 焦克分子<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  是绝对温度(K)。因此,在 298K(25℃) 时观察到的  $K'$  为  $3.5 \times 10^5$  的数值,这相当于 ATP 的  $\Delta G^{\circ}$  有 -31 千焦克分子<sup>-1</sup>( $\equiv -7.4$  千卡克分子<sup>-1</sup>); 负值的意思是指能量从系统中释放出来。在下面我们将看到,这只是一个中等大小的数值,而且当然与反应时的 pH 值有关,因为它的产物之一就是质子。

因此 ATP 水解所释放的能量大小,在反映产物和 ATP 分子总结构的本质上多于反映末端磷酸键的化学本身。这对 ADP 来说也是这样;当它水解为 AMP 和  $\text{HPO}_4^{2-}$  时,也伴随有

中等大小的自由能的变化 ( $\Delta G^{\circ} = -31$  千焦克分子<sup>-1</sup>)。因此 ATP 分子中的符号 (~) 仅说明, 它在这一点水解时会引起中等到较大的自由能释放。在实际中, ATP 水解为 ADP 和无机磷酸的过程中, 单纯以热的形式释放能量的情况是很少发生的; 如果发生这种情况则对代谢有害。

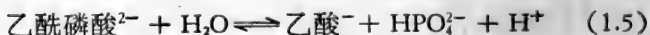
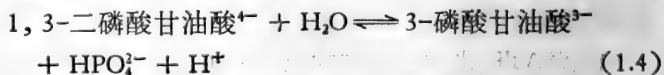
由于 ATP 的水解是一种释能(放能)反应, 因此, 从 ADP 和无机磷酸合成 ATP 时, 也需要吸收同等数量的能量, 这也就是说, 这个反应在标准条件下, 是吸收 +31 千焦克分子<sup>-1</sup> 能量的吸能反应。因此把生物学的氧化-还原反应中, 释放的自由能用于合成 ATP, 看来这是一种合适的能量贮存的办法。但是, 这种办法只是在底物水平的磷酸化反应中, 才是一种较为简单的储能过程。

### 1.3 磷酰基的转移反应

醇式磷酸盐的水解(例如 AMP<sup>2-</sup> 或葡萄糖-6-磷酸<sup>2-</sup>)至少产生一个不带电荷的产物, 并且不产生质子。



因此, 这种水解仅是较弱的放能反应 ( $\Delta G^{\circ} \leq -17$  千焦克分子<sup>-1</sup>), 并与 pH 无关。但是如果这分子是一个羧酸和一个正磷酸的较不稳定的混合酸酐, 水解时则情况完全不同(例如 1,3-二磷酸甘油酸或乙酰磷酸), 它们产生十分稳定的带负电荷的产物和一个质子。



因此这些反应是很强的放能反应 ( $\Delta G^{\circ} \geq 41$  千焦克分子<sup>-1</sup>),



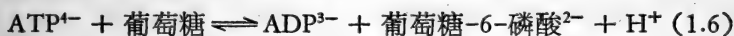
并且和 pH 有关。

根据有机磷酸化合物的水解所释放的自由能大小，可以把它们排成一张类别表(表 1.1)。在这个表中，ATP 的位置挨在中间，在其上面是混合的磷酸酐，而在其下面的则是醇式磷酸盐。

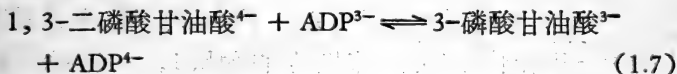
表 1.1 有机磷酸化合物的  $\Delta G^\circ$  值

有机磷酸化合物	$\Delta G^\circ$ (千焦克分子 <sup>-1</sup> )
1, 3-二磷酸甘油酸	-49.3
乙酰磷酸	-43.9
ATP( $\rightleftharpoons$ ADP + P <sub>i</sub> )	-31.0
葡萄糖-6-磷酸	-13.8
一磷酸腺苷(AMP)	-8.4

ATP-ADP 系统在生物学中所起的作用，与在这个表中占中间的位置完全吻合，这就是它向其他有机磷酸化合物提供一个占一中心位置的磷酰基( $-\text{PO}_3^{2-}$ )供体-受体系统。因此，ATP 能提供一个磷酰基给葡萄糖(在己糖激酶存在时)，因为在表中葡萄糖-6-磷酸是在 ATP 之下。



反之，ADP 能从 1, 3-二磷酸甘油酸接受一个磷酰基(在磷酸甘油酸激酶存在时)，因为在表中 ATP 是在 1, 3-二磷酸甘油酸之下。

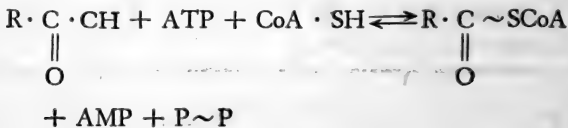


应该指出：在这二类反应中，都没有有机磷水解的实际反应发生。然而，由于热力学仅关心反应的始末状态，而不考虑实际的反应机理。这些反应的  $\Delta G^\circ$  值，可以分别由水解反应和脱水反应的各自  $\Delta G^\circ$  的总和来计算得到。因此，从热力学来看，反应(1.6)可看作是反应(1.1)和(1.3)的逆过程的

总和，而反应(1.7)则是反应(1.4)和(1.1)的逆过程的总和。必须着重指出的是，这两个总反应进行时，净自由能略有释出以保证反应平衡移向右边。

## 1.4 焦磷酸的裂解

有时候，能量的转移是以 ATP 裂解为 AMP 和焦磷酸(P~P)方式进行的，例如在活化脂肪酸时，ATP 就是这样裂解的，它释出的能量则被储存于共价的硫酯(C~S)键中。

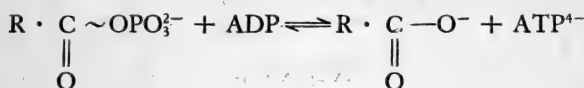
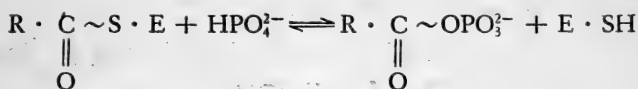
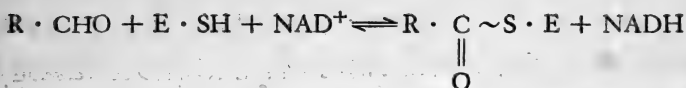


产物 P~P 然后再水解为二个分子的正磷酸，同时以热的形式放出自由能，这使初始活化反应的平衡有利于形成脂肪酰辅酶 A。在蛋白质生物合成时焦磷酸的裂解反应还伴随氨基酸的活化，因而使这些反应实质上也不可逆。

## 1.5 底物水平磷酸化

我们在第 1.3 节曾看到：ATP 的合成也可以依靠从高能有机磷酸盐转移磷酰基来推动，例如从 1, 3-二磷酸甘油酸或乙酰磷酸转移一个磷酰基给 ADP。这样，凡是能使这种相对不稳定分子形成的任何代谢反应系列都存在着一一种可在底物水平上进行磷酸化的潜在能源。

在动物和微生物的糖酵解时，1, 3-二磷酸甘油酸可从 3-磷酸甘油醛(R·CHO)的氧化而形成，如以下所示：



3-磷酸甘油醛脱氢酶 (E · SH) 的初始反应是与 NAD<sup>+</sup> 结合, 然后再催化 R · CHO 的氧化。这种反应所释出的能量就被储存于酶结合的硫酯中 (C~S; ΔG<sup>0'</sup> = -43.1 千焦克分子<sup>-1</sup>), 其余的能量再储存于以后的磷酸取代反应中, 产生 1, 3-二磷酸甘油酸 (C~O; ΔG<sup>0'</sup> = -49.3 千焦克分子<sup>-1</sup>)。1, 3-二磷酸甘油酸最后在磷酸甘油酸激酶的作用下, 通过磷酰基的转移而引起 ATP 的合成。

在许多厌氧细菌的厌氧生长过程中, 丙酮酸通过乙酰磷酸而氧化成乙酸, 是一个重要的能量贮存过程。这是一个更为复杂的过程, 包括形成酶结合的硫酯、乙酰辅酶 A、乙酰磷酸, 以及然后才形成 ATP。

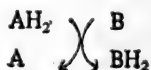
这些反应的显著特点, 是氧化-还原反应发生在磷酰基转移至 ADP 之前, 并且这两过程是先有一个非磷酸化的高能中间产物, 而后又有一个磷酸化的高能中间产物来连接的。总起来看, 这两个反应都是有少量热释放的放热反应。同时也必须指出, 整个系列的能量转移反应都是被水溶性的酶所催化, 通过形成共价的, 易于分离的中间产物而完成的。

## 1.6 电子传递中的一些氧化-还原反应

有一种更重要的特征是一切生物能量贮存类型所共有

的。这个特征在上一节底物水平磷酸化中已谈到过，它特别与光合磷酸化和氧化磷酸化的电子传递系统有关。这就是有氧化-还原反应参与的磷酸化反应。

任何氧化反应必定有一个还原反应同时发生。因此，在  $AH_2$  氧化为 A 时，B 就被还原为  $BH_2$ 。



这种 4 个组分的系统是由 2 个氧化-还原对偶  $AH_2/A$  和  $BH_2/B$  构成，其中任一对都可接受或提供  $2H(2H^+ + 2e^-)$ ；其他种类的氧化还原对偶也可以传递氢化物离子 ( $H^- \equiv H^+ + 2e^-$ )，或者就是单单传递一个或二个电子。如果一个对偶 ( $AH_2/A$ ) 在供给还原当量的倾向上比另一对偶 ( $BH_2/B$ ) 更强时，那么就会有净还原等当量从还原对偶 ( $AH_2/A$ ) 的更还原的组分，转移到氧化对偶 (B) 的更氧化的组分。

这种供给或接受还原当量的倾向，可与一标准氧化-还原对偶(即标准电极，如氢电极或甘汞电极)参考而给出定量数值。在温度 ( $25^\circ C$ )，浓度 ( $AH_2 = [A]$ ) 和 pH (7.0，否则另作说明) 的标准条件下，测得以毫伏表示的电位值，称之为标准氧化-还原电位 ( $E'_0$ )。在非标准条件下测得的氧化-还原电位值，则以符号  $E_h$  值代表之。由于  $NADH + H^+/NAD^+$  和  $H_2O/1/2O_2$  2 个对偶的  $E'_0$  值分别为  $-320$  和  $+820$  毫伏，所以呼吸时，有 2 个 H 是从  $NADH(+H^+)$  转移到氧，而不是从水转移到  $NAD^+$ ，即向增加氧化-还原正电位值的方向转移。

这个反应的标准自由能的变化 ( $\Delta G^0$ ) 与氧化偶联和还原偶联的标准氧化-还原电位之差值大小 ( $\Delta E'_0$ ) 有关，它们的关系可用下面简单的方程式表示：

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E'_0$$

这里  $n$  为传递的电子数目 (2),  $F$  为法拉第常数 (96,649 千焦伏<sup>-1</sup>克当量<sup>-1</sup>)。因此, 当  $\text{NADH} (+\text{H}^+)$  被分子氧 ( $E'_0 = 1,140$  毫伏) 氧化时, 标准自由能的变化量为  $-219$  千焦克分子<sup>-1</sup>。要使反应逆转, 就得向系统供给能量, 因为这时的  $\Delta G'^0$  值是正的 (第 4、5、6 章)。

光合作用就是这种逆反应的很好的例子。在这个情况中, 还原当量必须从氧化-还原电位高的对偶 ( $\text{H}_2\text{O}/\frac{1}{2}\text{O}_2$ ) 转移到氧化-还原电位低的对偶 ( $\text{NADPH} + \text{H}^+/\text{NADP}^+$ ), 即向需能的方向转移。克服这一问题的办法, 是向供能系统注入太阳辐射能 (图 1.5)。太阳辐射引起两个光反应系统叶绿素的电荷分离, 从而产生 2 个电子供体 ( $\text{X}^-$  和  $\text{Z}^-$ ) 和 2 个电子受体 ( $\text{Y}^+$  和  $\text{W}^+$ )。  $\text{W}^+$  是一种强氧化剂, 易于从水接受还原当量, 同时释放出分子氧。  $\text{X}^-$  是一种强还原剂, 易于提供还原当量给  $\text{NADP}^+$ 。弱还原剂  $\text{Z}^-$  被弱氧化剂  $\text{Y}^+$  的氧化, 是一种中等程度的释能反应, 它可以与从  $\text{ADP}$  和无机磷合成  $\text{ATP}$  的反应相联接。电子从  $\text{Z}^-$  转移到  $\text{Y}^+$ , 经过一系列彼此衔接

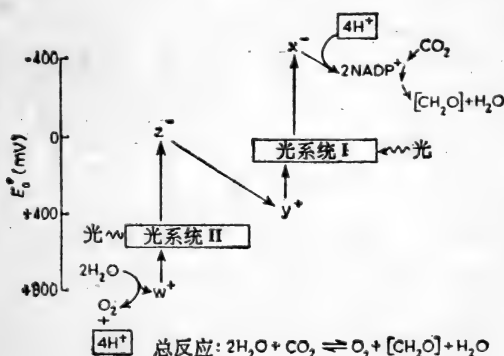


图 1.5 光合作用的氧化-还原简图

的氧化-还原反应, 这些反应与呼吸系统中相应的段十分相

似。

和底物水平的磷酸化不同，在光合磷酸化和氧化磷酸化反应过程中，测不到高能的有机磷酸化合物存在，这两个反应都是与膜结构有联系的现象。膜的作用是建立起一个疏水的而不是水相占优势的环境，这种环境对氧化还原组分施加严格的区域性限制，从而使这两种磷酸化系统，都表现有一种高度的空间组织结构。此外，膜的小囊泡性质意味着这2种能量贮存系统，必须有运输系统伴随来保证底物和辅因子的供给与移走的收支平衡；并与细胞对ATP的需求相协调。

因此，电子传递和磷酸化系统的性质和机构，基本上是调和一致的，这种调和一致性不能为它们许多(相对的)细微的差异所掩盖。为此，我们将在本书中集中主要的篇幅，讨论呼吸和氧化磷酸化作用，而对光合作用只是讨论那些与生物能量转化机理的基本知识明显有关的问题。

## 1.7 呼吸作用

认为呼吸作用是结合在膜上的有高度组织次序的氧化还原载体(呼吸链)所催化的这个普遍接受的概念，主要是在本世纪二十和三十年代，Wieland、Warburg 和 Keilin 的工作所得的结果。

Wieland 从有机化学的例子推理，认为还原底物的氧化是通过脱氢酶的作用，将氢原子移去的结果，然后氢原子再自发地把分子氧还原成水。然而，另一位杰出的学者 Warburg 则认为细胞中的氧化反应，是先由呼吸酶(“呼吸作用的酶”或现在称之为细胞色素氧化酶)活化氧分子起始的。Keilin 在 1925 年对细胞色素系统的重新发现，指出了两者之间的联系。

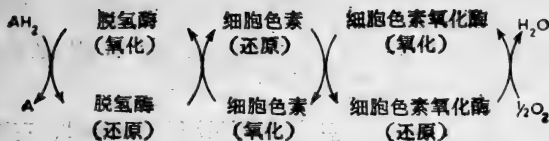


图 1.6 呼吸作用的早期观点

(图 1.6), 而大大调和了这二种相反的观点。

把呼吸作用看成为一系列衔接的氧化-还原反应的这种早期观点, 后来又为 Warburg、Theorell 和其他学者在三十年代早期, 发现烟酰胺核苷酸 ( $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$ ) 和黄素核苷酸 (FMN 和 FAD), 以及证明这些氧化-还原化合物与脱氢酶活性有关而得到充实。Keilin 和 Hartree 在 1939 年, 对每个细胞色素成员的排列程序的经典性证据, 以及在时间上晚得多的泛醌和铁-硫 (Fe-S) 蛋白的发现, 证实了这种观点, 同时也大大增加了总过程的复杂性。

由于所有这些氧化-还原组分的  $E'_0$  值都是间隔很近地排列在  $-320$  至  $+375$  毫伏之间, 因此还原当量从  $\text{NADH}$  至分子氧之间, 实际上是通过一系列小的氧化-还原电位阶梯而传递的 (图 1.7)。这样, 总反应过程中可利用的大量自由能

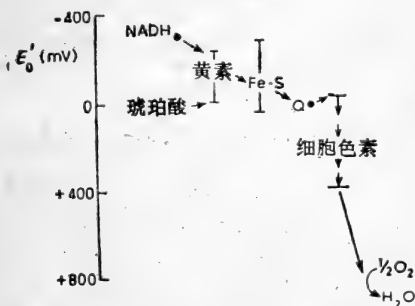


图 1.7 呼吸作用中的氧化-还原关系

( $\Delta G^{\circ} = 219$  千焦克分子 $^{-1}$ ) 就能小量分批地释放。因此也就能最有效地用于从 ADP 和无机磷酸合成 ATP 这个需能反应 ( $\Delta G^{\circ} = +31$  千焦克分子 $^{-1}$ )。

NADH( $+H^+$ ) 的形成主要是依靠消耗糖酵解、三羧酸循环或脂肪酸氧化循环的中间产物 (例如 3-磷酸甘油酸、丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、苹果酸或  $\beta$ -羟酰辅酶 A) 在分解代谢中, 通过与  $NAD^+$  联结的脱氢酶的作用而完成的。其他分解代谢的还原产物如琥珀酸、 $\alpha$ -磷酸甘油酸或脂肪酰辅酶 A 的氧化则相反, 并不是通过  $NAD^+$  进行的, 因为它们组成的氧化-还原对偶的  $E_0'$  值, 大大高于  $-320$  毫伏 (例如  $E_0'$  琥珀酸/延胡索酸 =  $+30$  毫伏)。然而这些底物可以被呼吸链通过高电位的黄素相联系的脱氢酶直接氧化。因此, 琥珀酸被分子氧 ( $\Delta G^{\circ} = -152$  千焦克分子 $^{-1}$ ) 氧化时, 释放的能量也就比  $NADH + H^+$  的氧化要小得多, 并且形成 ATP 量也成比例地降低 (第 4 章)。

电子传递呼吸链的命名是与相应的电子供体和受体对等的。因此, 催化分子氧的氧化  $NADH + H^+$  或琥珀酸的呼吸载体, 分别被总括地称为 **NADH 氧化酶** 和 **琥珀酸氧化酶**。同样, 催化琥珀酸还原细胞色素 c 的呼吸链片段被称为 **琥珀酸-细胞色素 c 还原酶**, 而还原态细胞色素 c 被分子氧的氧化, 则是细胞色素氧化酶催化的。 **NADH 脱氢酶** 和 **琥珀酸脱氢酶** 这种传统的术语, 通常是被用来描述由泛醌或人工电子受体 NADH 或琥珀酸的起始氧化的反应。



## 2. 呼吸链的组份

呼吸链是一种膜结合的多组份的酶复合体，它催化还原底物受分子氧氧化的反应。在本书的这个阶段，依次地来考察呼吸链中每个组份的分子性质和氧化还原性质，去充分地了解呼吸链能量贮存的复杂本质是恰当的。

### 2.1 烟酰胺核苷酸脱氢酶

参与在细胞氧化-还原反应中的那些烟酰胺（吡啶）核苷酸脱氢酶，都是含有  $\text{NAD}^+$ （烟酰胺嘌呤二核苷酸；原来叫辅酶 I，辅酶或  $\text{DPN}^+$ ）或  $\text{NADP}^+$  的（烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸盐；原来叫辅酶 II 或  $\text{TPN}^+$ ）可溶性酶。这些核苷酸起着辅酶的作用，即它们对酶的活性是必不可少的，但是又易于从蛋白离解下来而即失去酶活性。 $\text{NADP}^+$  与  $\text{NAD}^+$  不同之处，是在嘌呤核糖分子的 C-2 上的羟基为一个磷酸基团所取代（图 2.1）。

这二种辅酶的氧化-还原性质都是由于烟酰胺的一个部位（图 2.2），能接受一个氢化物离子（ $\text{H}^- \equiv \text{H}^+ + 2e^-$ ）的性质所造成的。因此，例如在苹果酸通过苹果酸脱氢酶氧化为草酰乙酸时， $\text{NAD}^+$  接受一个  $\text{H}^-$ ，而另一个质子或者散失

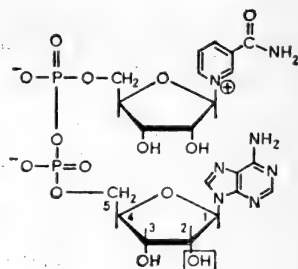


图 2.1  $\text{NAD}^+$  的结构

于周围介质中，或者结合在带负电荷的磷酸基团上。辅酶的还原形式应正确地写成  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ，然而在实际上  $\text{H}^+$  常被省略（也有写成  $\text{NAD(P)H}_2$  的）。

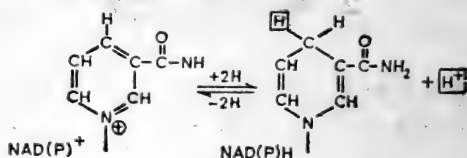


图 2.2 烟酰胺的氧化-还原性质

$\text{NAD(P)}^+$  和  $\text{NAD(P)H}_2$  具有明显不同的吸收光谱。因此，通过检测 340 毫微米的变化，可以很容易地看到它们的氧化-还原反应的动力学过程。 $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  和  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  偶联的标准氧化还原电位非常接近，分别为  $-320$  和  $-324$  毫伏，它们与脱辅基蛋白结合时，这个电位值一般也不发生显著的改变。

## 2.2 呼吸链的一些脱氢酶

从  $\text{NADH}$  往下的氧化反应以及琥珀酸、 $\alpha$ -磷酸甘油酸、脂肪酰辅酶 A 等的起始氧化，都是通过专一的结合在膜上组成一部分呼吸链的脱氢酶进行的。这些复合的脱氢酶含有一个黄素作为其主要的氧化-还原组份，但常与一个或一个以上的铁-硫蛋白相结合（早先它们因此而被称为金属黄素蛋白，但最近用了铁-硫黄素蛋白的名称）。虽然在体内这些氧化-还原载体的相互关系还很不清楚，然而单个的黄素和铁-硫组份的性质和功能已知道得相当透澈了。

### 2.2.1 黄素蛋白

这些酶是由酶蛋白或者加上 FMN（黄素单核苷酸；核黄

素-5-磷酸),或者加上 FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸,图 2.3)而组成。这二种黄素都与蛋白质结合得很紧密,因此它们是起着辅基而不是辅酶的作用。这二种辅基的三环结构的异咯嗪核的氧化-还原性质,使它们都可运载二个还原当量 ( $2H \equiv 2H^+ + 2e^-$ ),然而,在体内,它们是来回变化于氧化型和半醌型之间,或半醌型和还原型之间,因而很可能仅运载一个当量(图 2.4)。

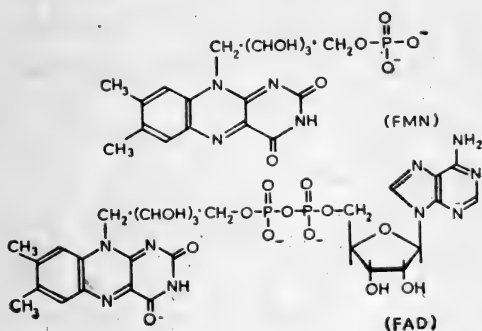


图 2.3 FMN 和 FAD 的结构

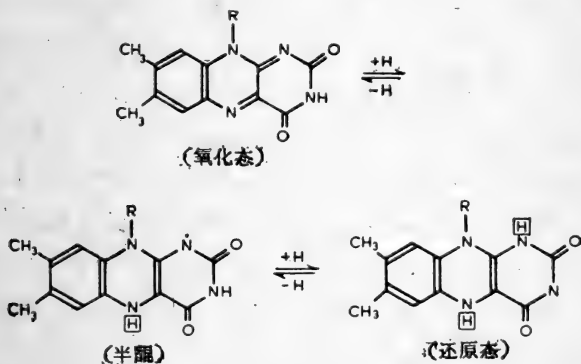


图 2.4 黄素的氧化-还原性质

在氧化型中,大部分种类的黄素蛋白显示有明晰的黄色,这反映它们的吸收光谱靠近 450 毫微米处;在还原时,这一吸收光谱消失,蛋白变成无色。

FMNH<sub>2</sub>/FMN 和 FADH<sub>2</sub>/FAD 对偶的标准氧化-还原电位,分别为 -190 和 -210 毫伏,但当这种黄素与脱辅基蛋白结合时,这数值常会变得很不相同。说实在,已知黄素蛋白在体内有宽阔的氧化-还原电位,这使它们在它们的呼吸链功能中,极易适应变化的需要。因此,在还原的硫辛酸 ( $E'_0 = -290$  毫伏) 氧化时,在链的一端,硫辛基脱氢酶把还原当量交给 NAD<sup>+</sup>,而在另一端,则琥珀酸脱氢酶在至少零毫伏的氧化-还原电位下起作用。

### 2.2.2 铁-硫蛋白

铁-硫 (Fe-S) 蛋白(也可称为非血红素铁蛋白)已知在许多电子传递系统中起作用。自从 Mortenson 1962 年首次分离出梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*) 的含铁氧化-还原素以来,又有好多种这类氧化还原载体被纯化。它们大多数是分子量较低的含有等量铁和“易变硫”的蛋白。

菠菜的含铁氧化-还原素是这类蛋白中最简单的一种。它所含的 2 个铁原子是被夹持在由 2 个易变硫原子(S<sup>\*</sup>)和 4 个半胱氨酸分子所构成的晶格中,因此属于 2Fe-2S<sup>\*</sup> 蛋白类(图 2.5)。之所以把分子中的硫称为易变硫,是由于它们和半胱氨酸的硫原子不同,在酸性条件下,它易于以 H<sub>2</sub>S 的形式释出,同时失去氧化-还原活性。另有一些种类的铁-硫蛋白含有多倍数的 2Fe-2S<sup>\*</sup> 系统;例如光合细菌和某些哺乳动物的呼吸系统的高电位 (HiPIP) 的 4Fe-4S<sup>\*</sup> 蛋白以及厌氧细菌的 8Fe-8S<sup>\*</sup> 含铁氧化-还原素。

所有铁-硫蛋白都吸收 450—500 毫微米之间的光谱,而

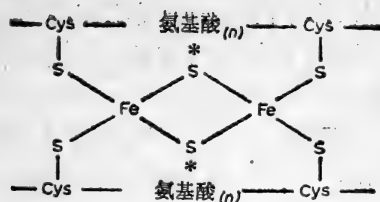


图 2.5 2Fe-2S\* 的氧化-还原中心 (Cys. 为半胱氨酸)

且和烟酰胺核苷酸和黄素一样,当还原时,吸收减少。还原滴定显示: 2Fe-2S\* 和 4Fe-4S\* 蛋白仅运载一个电子,而 8Fe-8S\* 能运载 2 个电子。还原作用的确切机理还不清楚。虽然 4Fe-4S\* Hipip 蛋白的还原引起电子对的产生(即成为一种抗磁性物质),然而大多数铁-硫蛋白的还原是产生一个不成对的电子(顺磁性的)。因此,这些组份的氧化-还原动力学过程,极易用电子顺磁共振(EPR)波谱检测顺磁性的出现或消失来跟踪。在所有已知的铁-硫蛋白中,没有一种能运载质子。

这些载体的标准氧化还原电位,都在从 -430 毫伏(大多数的含铁氧化还原素)到 +350 毫伏(某些 Hipip 蛋白)范围中,因而使它们能在很多种氧化-还原反应中起作用。

在高等生物的呼吸系统中,至少有一种不与任何原初的黄素蛋白脱氢酶相联系的高电位的铁-硫蛋白存在。这种蛋白就是 Hipip ( $E_0' > 150$  毫伏) 4Fe-4S\* 蛋白,它位于呼吸链的泛醌-细胞色素 c 还原酶片段中的某个地方。

### 2.2.3 NADH 脱氢酶

实践证明,NADH脱氢酶是最难提纯的呼吸链组份之一。用磷脂酶 A 处理,可从膜上提出一种可溶的但较易变的“高分子量”形式的这种酶,一般认为这种状态的酶比其他任何纯化

的制剂更接近于体内状态，每克分子蛋白（分子量 550,000）含 16—18 克分子的铁（带有稍微更易变的硫）和一克分子的 FMN。它也受杀粉蝶素 (piercidin) A 和受杀虫剂和毒鱼药物——鱼藤酮的抑制。这两种抑制剂都与酶的靠近把还原当量转移给下一个呼吸链组份——泛醌区域的特定部位结合。

哺乳动物的呼吸膜在液氮（5K）温度下的顺磁共振波谱，显示出至少有 4 个，可能有多达 7 个属于 NADH 脱氢酶的不同的铁-硫中心。它们的存在可以用对呼吸链的一系列不同  $E_h$  值处加以毒害，再检测它们各自的顺磁共振讯号的出现与否而测知。在信号最高值的一半处的  $E_h$ ，就是这个特定铁-硫中心的  $E'_0$ 。这些实验结果清楚地表明在 N-1、N-3、N-4 ( $E'_0 \leq -245$  毫伏) 及 N-2 ( $E'_0 = -20$  毫伏) 中心之间有很大的差异。因为这些波谱的研究表明，FMN 可能是在靠近低电位中心群处起作用，而 ATP 使 FMN 的还原与 N-2 中心的氧化同时发生，这样看来相当肯定电子在跨越一个幅度 (FMN、N-1、N-3、N-4)  $\rightarrow$  N-2 的传递，导致释放足够的能量以推动 ATP 合成。这个观点也可能受到以下观察结果的增强，即 N-2 中心的  $E'_0$  以及可能 N-1 的一部分当有 ATP 存在时，有显著的改变（见第 5 章）。鱼藤酮和杀粉蝶素 A 的作用部位可能靠近 N-2 处。

在 NADH 脱氢酶中，存在有多倍的铁-硫蛋白，似乎是一个广泛存在的现象，因为从牛肉、鸽心、也还有从产蛋白假丝酵母 (*Candida utilis*) 得到的制剂中，都测到有实际相等的顺磁共振数据。Garland 和他的共同工作者用缺铁培养的产蛋白假丝酵母 [*Candida (Torulopsis) utilis*] 菌种所做的漂亮的工作，肯定了在这呼吸链片段中，铁对能量偶联是必需的。

## 2.2.4 琥珀酸脱氢酶

要把琥珀酸脱氢酶一样地从呼吸膜提取出来,而仍保持其体内的性质,已证明和 NADH 脱氢酶是很困难的。早期所用的大多数提取方法是很剧烈的,而且得到的是不够均一的可溶制剂。然而,最近 Davis 和 Hatefi 介绍了一种用无序试剂来破坏膜的较温和的方法,得到了有活性的、接近均一的、分子量 (97,000) 较低的酶。它可以再通过冰冻和融化,而被分成 2 个无活性的亚单位。其中一个亚单位是分子量为 70,000 的铁-硫黄素蛋白;每克分子蛋白含有一克分子 FAD 以及铁和易变硫各 4 个克分子。另一个亚单位是一种分子量为 27,000 的铁-硫蛋白,也含有铁和易变硫各 4 个克分子,但不含黄素。由于在呼吸时, FAD 经历着氧化-还原的变化,这就很清楚,大亚单位是酶的催化活性所必需的;但小亚单位的功能究竟是催化还是调节尚不能判定。

虽然大多数黄素蛋白的黄素是通过带负电荷的磷酸基,以离子键与蛋白结合的,然而氨基酸的顺序分析指出,这个酶的 FAD 是通过组氨酸残基 ( $\text{His} \cdot \text{N}-\text{CH}_2 \cdot \text{R}$ ) 与脱辅基蛋白共价结合的。共价结合的优点是能提高  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  对偶的标准氧化还原电位,它把游离态的  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  对偶的标准氧化-还原电位 (-210 毫伏),提高到接近琥珀酸/延胡索酸对偶的标准氧化-还原电位 (+30 毫伏)。这样,让酶以非常有利于向前的方向起作用 (即向着琥珀酸氧化为延胡索酸的方向)。令人奇怪的是,在某些用延胡索酸代替分子氧作为末端电子受体的厌氧细菌中,它们的脱氢酶的主要功能,是把延胡索酸还原成琥珀酸,在这类酶中黄素与酶是以非共价结合的。这现象支持了上面对共价结合有利点的解释。

最近,琥珀酸脱氢酶的铁-硫组份的低温顺磁共振测定,

表明它至少存在有 3 种不同的中心。S-3 中心 ( $E'_0 = +60$  毫伏) 是一种 Hipip 蛋白, 可能与低分子量亚单位的  $4\text{Fe-}4\text{S}^*$  中心等同的。S-1 和 S-2 中心 ( $E'_0 = +15$  和  $-260$  毫伏) 是属于  $2\text{Fe-}2\text{S}^*$  含铁氧化还原素类型, 并且可能是与较大的、含黄素的亚单位在一起的。因此, 电子从琥珀酸转移到泛醌可能是循着 (FAD, S-1)  $\rightarrow$  S-3 的次序传递的; S-2 的氧化-还原电位可能太低, 不足以使它具有向前方向催化的活性。

### 2.3 烟酰胺核苷酸转氢酶

烟酰胺核苷酸转氢酶催化  $\text{NAD}^+(\text{NADH})$  和  $\text{NADPH}(\text{NADP}^+)$  之间的还原当量可逆传递:  $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NADPH} + \text{NAD}^+$ 。

该酶存在于大多数动物和细菌的细胞里, 有时以溶解的形式存在, 但更通常的是与呼吸膜在一起的。已有几种细菌转氢酶被提纯, 它们也含有黄素和铁-硫的组份, 只是动物转氢酶的成分还很少了解。

转氢酶反应有着还原  $\text{NADP}^+$  的  $V_{\max}$  比还原  $\text{NAD}^+$  的低得多的特点。由于这两个对偶的  $E'_0$  值只差 4 毫伏, 因此它们的平衡常数 ( $K$ ) 非常接近。Ernster 及其同事的工作证明, 呼吸或 ATP 水解所释出的能量对转氢酶反应有强烈的影响 (第 4 章, 第 5 章)。对  $\text{NADPH}$  形成的速度和数量都有促进 (高  $V_{\max}$ ,  $K \gg 1$ ), 而逆反应则被十分强烈地抑制了。因此, 供以能量的状态有利于  $\text{NADH}$  还原  $\text{NADP}^+$  的耗能反应。而把还原当量从降解占主导的连接  $\text{NAD}^+$  的脱氢酶转向生物合成占主导的  $\text{NADPH}$ -氧化酶。

作为必然的结果, Schulachev 最近已证明, 如果采用高比值的  $(\text{NADPH})(\text{NAD}^+)/(\text{NADP}^+)(\text{NADPH})$ , 来提供反应



所需的  $\Delta E_h$ , 则 NADPH 可被  $\text{NAD}^+$  氧化而释放能量。这种高比值可通过一个低电位的连接  $\text{NADP}^+$  的还原剂(例如异柠檬酸)的氧化与电位较高的连接  $\text{NADH}$  的氧化剂(例如草酰乙酸或丙酮酸)的还原这两种反应之间的偶联来维持, 虽然, 在体内是否也存在有这样的系统起着能量贮存的作用是很成问题的。

## 2.4 泛 醌

呼吸链中唯一完全属于脂质的氧化-还原载体——泛醌(或称辅酶 Q), 是在 1957 年为 Morton 和 Crane 分别独立发现的。它很容易从各种需氧性生物中, 用有机溶剂提取, 也很易用吸附色谱方法纯化。泛醌是由一个取代的 1, 4-苯醌环在 C-2 上, 加一个聚异戊二烯的长侧链(图 2.6)。后者根据来源不同而含 6—12 个异戊二烯单位; 在动物系统中, 泛醌的侧链是 10 个异戊二烯组成, 因此, 这个同系物就以 Q-10 表示。

这个载体之所以有氧化-还原性质, 是由于醌环接受  $2\text{H}$  后, 可以通过可能存在的半醌中间产物而形成醌醇的能力(图 2.7)。

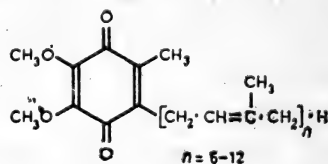


图 2.6 泛醌的结构

泛醌的主要吸收光谱和呼吸链的其他组份不同, 是在紫外区域。当被还原成醌醇时, 272 毫微米处的主要吸收光带强度降低, 并且位移到接近 290 毫微米。因此, 这个载体在原位的氧化-还原动力学变化过程, 可以用光谱光度计来跟踪。Chance 和 Redfean 于 1961 年首先做到了这种在技术上很困难的操作, 观察到  $\text{NADH}$  或

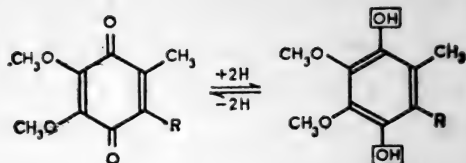


图 2.7 泛醌的氧化-还原性质

琥珀酸还原这个醌，以及这个醌醇又被分子氧重新氧化的反应。

接着下来的关于泛醌的氧化-还原反应的动力学，是否快到足以使它作为一个主要的氧化-还原载体的问题有了争论。这个问题后来被 Klingenberg 解决了，他确凿地证明，泛醌集合了从各种呼吸链脱氢酶得来的还原当量，再把它们通到末端细胞色素系统。泛醌的这种功能与它在原位( $\approx 0$  毫伏)的标准氧化-还原电位，以及与其他呼吸载体相比有较高的克分子浓度，这两个现象是完全相符合的。Sacowska、Ernster 以及其他用提取-重新活化的实验，对泛醌的这种作用提供了有力的证据，他们的实验是用非极性的有机溶剂，温和地提取冰冻干燥的呼吸膜中的醌(同时失去 NADH 和琥珀酸氧化酶活性)；然后以正确的浓度，回加到缺陷了醌的膜上去(同时重现这些活性)。

在生物膜的电子转移现象中，有亲脂的醌参与似乎是一种普遍的现象；泛醌的近缘(质体醌)在植物的光合作用中起作用，而在某些细菌的呼吸系统中，也有取代的甲基萘醌代替了泛醌的位置(第 6 章)。

## 2.5 细胞色素

细胞色素是 MacMunn 在 1884 年对生物组织薄片作分光

镜观察时发现的。然而，它的四条带状光谱与肌红蛋白的光谱混淆在一起，并且在他与 Hoppe-Seyler 激烈地讨论之后，这个发现就被遗忘了。到 1925 年，Keilin 又重新发现了这个现象：他报道某些昆虫飞翔的肌肉显示有 4 条带状光谱特征。把肌肉用还原剂或氧化剂处理而使光谱发生明显的增加或减少的变化。用原始的显微分光镜作进一步研究后明确其中的 3 个带 (a、b 和 c)，是分别处于  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ - 三种类型细胞色素的  $\alpha$ -带，而第 4 条带 (d) 是由这些细胞色素的  $\beta$ -带合并表现。在光谱的蓝光端有强烈吸收的，这被认为是它们的重叠的  $\gamma$ -带或索瑞带(图 2.8)造成的。

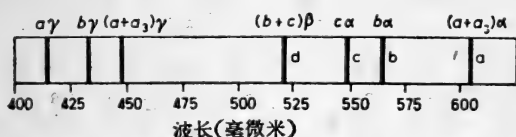


图 2.8 细胞色素的光谱带

后来主要是 Wasburg 从研究一氧化碳抑制呼吸作用的光敏化作用所得的结果，表明 a 型细胞色素是细胞色素 a 和  $a_3$  组合成的，因为  $a_3$  与分子氧反应，并且在结构上与物理上，和细胞色素 a 密切有关，这二种细胞色素一起被称为细胞色素氧化酶。1940 年 Yakushiji 和 Okunuki (药师寺和奥贯) 首先区分出细胞色素  $c_1$ ，并用硫酸铵分级分离法，使细胞色素  $c_1$  与其光谱相邻近的细胞色素 c 分开。近年来，用高级的分光光度计法和电位测定方法，对 b-型细胞色素的分析，表明至少存在有 2 种主要的组份，即  $b_K$  (根据 Keilin;  $E'_0$  不随  $\pm$ ATP 而变) 和  $b_T$  (推测中的换能;  $E'_0$  随  $\pm$ ATP 而变)。

所有细胞色素都是由脱辅基蛋白加辅基(血红素)组成的结合蛋白。后者是由卟啉(4 个吡咯环通过亚甲基桥接)加上

一个带, 有一个不成对电子因而在亚铁 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 与高铁 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 之间来回变化的中心铁原子组成。各种细胞色素的差别, 主要是血红素部分 (图 2.9) 的 2、4、5、8 碳原子的取代基不同。这些取代基对于各种细胞色素各种波长的最大值和标准氧化还原电位有很大影响。

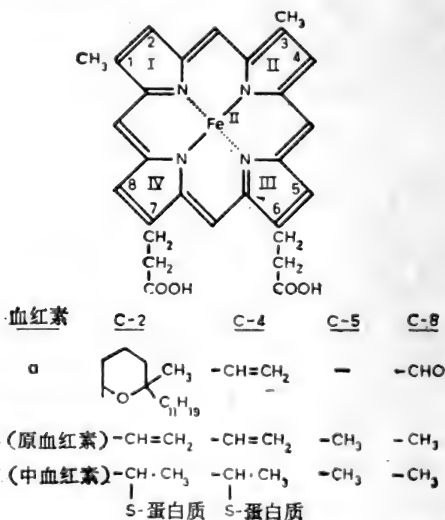
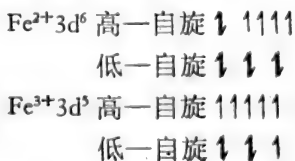
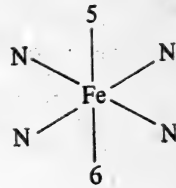


图 2.9 血红素的结构

由于细胞色素的氧化还原行为反映了铁的性质, 因此需要概述一下铁的化学。铁是一种电子结构  $3d^6 4s^2$  的过渡元素。因此,  $\text{Fe}^{2+}(3d^6)$  和  $\text{Fe}^{3+}(3d^5)$  可以存在有如以下所示的高自旋或低自旋的形式。



在大多数细胞色素中,依照氧化-还原情况,而以  $Fe^{+3}$  或  $Fe^{+2}$  形式的低-自旋的状态存在。因此有 6 个轨道仍旧是空的(2 个在 3d, 1 个在 4s, 3 个在 4p),并且铁能与 6 个配位基结合为一个八面体的配位复合物。4 个吡咯氮的孤独电子对显然是适宜起这种作用的,并使中心铁原子大致保持在卟啉环的平面内。配位 5 和 6 可用于结合脱辅基蛋白中的合适的原子。在高自旋的和有 5 个配位的细胞色素  $a_3$  中其游离的位置被弱的配基,如水、氧和一氧化碳所占据;当与一个氧分子结合时,细胞色素便转变为低自旋状态。



### 2.5.1 b-型细胞色素

b-型细胞色素是与呼吸膜牢固地结合的,它们在那里除了已知的氧化-还原活性外,还可能有重要的结构上的作用。因为细胞色素  $b_T(b_{565})$  的氧化-还原电位在 ATP 存在时,有大幅度的增加(从 -30 至 +240 毫伏),以及要使这种细胞色素全部还原,即使在厌氧条件下,也需要有 ATP 的存在。因此,可能  $b_T$  在能量贮存中,起着直接的作用(见第 5 章)。但是  $b_K(b_{562})$  这种细胞色素的标准氧化-还原电位,却不受 ATP (+65 毫伏)的影响,因而它可能主要是作为一种简单的氧化-还原载体起作用的。

### 2.5.2 c-型细胞色素

细胞色素 c 是呼吸链细胞色素中迄今所知最易提纯的一种,因为它是与呼吸膜松弛地结合的,又易溶于水。分析结果表明: 它的标准氧化还原电位为 +254 毫伏,分子量为 12,600 (104 个氨基酸)。血红素基团(血红素 c; 中血红素)

是既有共价键(通过硫酯键从吡咯环 I 和 II 的 C-2 和 C-4 的乙基分别与半胱氨酸-14 和半胱氨酸-17 键合), 又有配价键(通过组氨酸-18 的咪唑-N 和甲硫氨酸-80 的硫分别作为第 15 和第 16 配位基与中心铁原子结合), 与一条多肽键结合的。Dickerson 及其同事做的卓越的  $2.8 \text{ \AA}$  X 射线衍射分析表明, 血红素是从侧方插入蛋白质内部的疏水键中, 仅把它的吡咯环 I 和 IV 的一部份暴露在外。分子的表面高度带电荷并显示有明显的酸性和碱性区域, 在球蛋白中这种表面, 电荷的分离现象是很少见的, 这也许是和细胞色素 c 必须识别并以有序的方式和邻近分子结合有关(例如细胞色素  $c_1$  和  $aa_3$ , 其他的膜蛋白和磷脂)。

细胞色素  $c_1$  ( $E'_0 = +220$  毫伏) 似乎与呼吸膜牢固地结合的, 但能用胆酸盐提取, 而得到一种细胞色素  $bc_1$  的颗粒。细胞色素  $c_1$  的完全提纯迄今尚未完成, 但用部份提纯的制剂, 估计分子量为每个铁原子占 37,000 以上。

### 2.5.3 a-型细胞色素

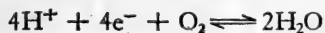
细胞色素氧化酶 ( $aa_3$ ) 是牢固地结合在呼吸膜上的, 但用去垢剂使它溶化之后可以被提纯。提纯的酶的最小分子量为 250,000, 并且每克分子蛋白含有 2 克分子血红素 a(a 加  $a_3$ ), 2 克分子铜以及多达 100 克分子的磷脂, 它至少有 6 条多肽链组成。虽然, 细胞色素 a ( $E'_0 = +230$  毫伏) 和  $a_3$  ( $E'_0 = +375$  毫伏) 在物理上彼此从未被分开过, 并且也不以有完全独立的功能出现, 一般认为它们是独立的细胞色素。二个铜原子 ( $Cu_a$  和  $Cu_b$ ) 显示有 +280 毫伏的  $E'_0$  值, 而且象细胞色素类物质一样, 也可作为单电子的氧化-还原载体 ( $Cu^+ \rightleftharpoons Cu^{2+}$ ) 起作用。

由于还原的细胞色素  $a_3$  提供电子给分子氧, 因此可把它

着作为呼吸链的末端酶。一氧化碳抑制这个反应，它与氧竞争二价铁离子上的结合位置。1932年 Warburg 首先证明 CO-抑制的呼吸作用可被光解除；光解离  $\text{Fe}^{2+}\text{CO}$  复合物从而使酶解除出来而与氧起反应。当以这种抑制反应的光解除作用（以呼吸活性的增加为指标）作为解除光波长的函数作图时，得到的光化学作用光谱与  $a_3(\text{Fe}^{2+})\text{CO}$ -复合物的吸收光谱非常相似，因此肯定了细胞色素  $a_3$  起着呼吸链末端成负的作用。这就是现在判定一个未知的细胞色素，是否起末端氧化酶作用的经典方法。

叠氮 ( $\text{N}_3^-$ ) 与氰化物 ( $\text{CN}^-$ ) 与一氧化碳不同，对呼吸作用的抑制，都是通过与氧化型细胞色素  $a_3$  优先结合而造成的。这就是氰化物毒害的原因。细胞色素 a 无论是还原态或氧化态，都不与氧或以上所述的任何抑制剂发生明显的反应。

呼吸作用的最后一步，是转移 4 个还原当量 ( $4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ) 给一个氧分子，



这个反应中的电子，明显地来自细胞色素系统，而质子则是从周围介质中取得，它是在转移醌的还原当量（载氢体）给细胞色素 b（电子载体）时，被排斥在周围液体中的。由于细胞色素氧化酶是由 4 个单电子载体（a、 $2\text{Cu}$ 、 $a_3$ ）所组成，它是很理想地适宜于催化这个反应。Nicholls 提出过二种机理，即顺序的机理（其中 4 个载体在细胞色素 c 和氧之间，以每次传递一个电子的传递起作用），和半协调的机理（其中这些载体同时被还原，因此构成一个 4-电子的壑）。这些情况可用图 2.10 来概括。

要辨别这二种可能性，必须对细胞色素氧化酶的作用方式，作详细的动力学分析。然而这样的分析结果也很难解释，因为二个细胞色素互相改变着对方的化学的和光谱的性质，

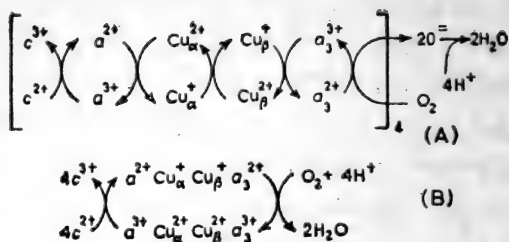


图 2.10 细胞色素氧化酶的反应机理  
(A) 顺序性的; (B) 半协调式的。

虽然还不清楚这种变化是直接发生的(通过血红素-血红素的相互作用), 还是间接发生的(通过一种细胞色素的氧化还原反应诱导发生的构象变化引起另一种细胞色素行为的改变)。血红素-铜之间相互作用的可能性, 使问题更进一步复杂化。目前的证据并不完全倾向一种机理而完全排斥另一种机理。然而, Williams 提出了有说服力的理论上的论证, 即把氧看作是一个电子的反应物, 而不是 4-电子反应物。并且对细胞色素  $a_3$  还原氧的反应, 提出了一个引人注目的反应顺序, 在这个反应顺序中特别强调了众所周知的铁参加多-电子的反应的能力(图 2.11)。由于细胞色素氧化酶的  $a$ 、 $a_3$  和铜的部分

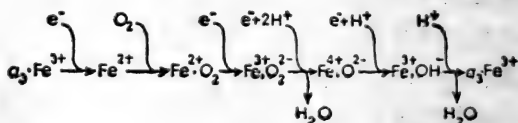


图 2.11 呼吸作用的最后阶段 (引自 Williams, 1973)

的标准氧化还原电位仅在大约 145 毫伏幅度范围之内, 因此可以肯定地说, 在这种水平的能量贮存作用很可能与中点电位极高的  $a_3$  氧复合物有关, 例如  $a_3Fe^{3+}O_2^-$  ( $E'_0 \geq +700$  毫



伏)。因此,每还原 1 分子氧时,在部位 III (见第 4 章)合成 2 分子 ATP 所需的能量,可能是用还原的细胞色素  $a$  和或铜( $\Delta E' \cong 400$  毫伏)来还原,在形成  $a_3Fe^{3+}O_2^-$  的过程中释放出来的。它们的初始储存的能量形式将在第 5 章中讨论。

## 2.6 分光光度测定的研究结果

### 2.6.1 吸收光谱

呼吸链的大多数氧化-还原组份在氧化态和还原态时,都显示有略微不同的光谱吸收特性。这种性质是非常有用的,因为它可以使各种载体的氧化-还原状态,用分光光度法来分

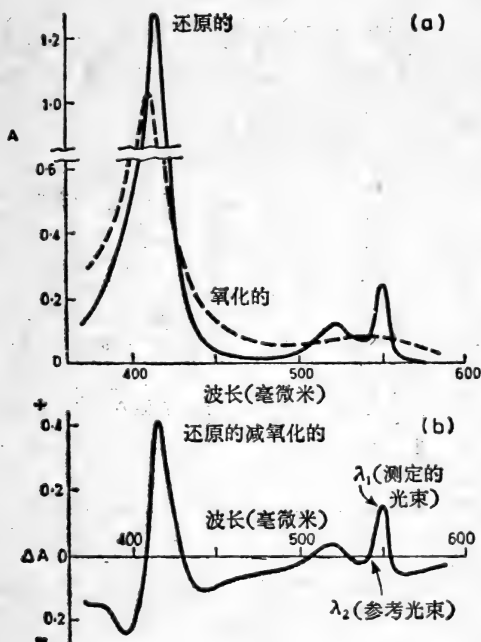


图 2.12 细胞色素 c 的吸收光谱

析。最简单的典型实验是利用双光束分光光度计，它是一束光谱可变的测定光束，分开通过含有待测溶液和参比溶剂的二个样品杯，从而产生出溶质的绝对吸收光谱。例如，当把还原态和氧化态的细胞色素作比较时，就很容易看到它们吸收光谱上的微小差异（图 2.12a）。如果把还原态的  $c(\text{Fe}^{2+})$  与氧化态的  $c(\text{Fe}^{3+})$  的光谱利用分光光度彼此相消的方法来测定，则这种差异就更为明显。所得到的光谱就是还原态减去氧化态的差示光谱（图 2.12b）。与基线交叉的吸收光谱波长处称为等消光点。有时，一些材料不可能测定它的绝对吸收光谱时，例如在细菌细胞或完整线粒体的悬浮液中，这种测定差示光谱的技术对于测定这种低浓度的氧化还原载体是特别有用的。

被琥珀酸还原的电子传递系统的吸收光谱减去被氧氧化的电子传递系统的吸收光谱得到的差示光谱，反映了呼吸链氧化-还原载体的全部组成（图 2.13）。

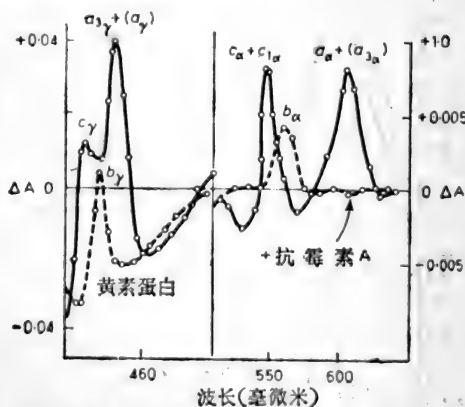


图 2.13 哺乳动物呼吸链的还原态减去氧化态的差示光谱

(引自 Chance, 1956)

曲线的这些正向弯曲可看作为单个的细胞色素（因为还

原态的细胞色素比氧化态细胞色素吸收更强烈),而合并的负向弯曲可看作为是 Fe-S 黄素蛋白(因为还原黄素的强烈吸收小于氧化的黄素)。值得注意的是,在这个特殊的制剂中,b-型的细胞色素在很大程度上,被c-型和a-型细胞色素的强烈吸收所掩盖。但是,在加入抗霉素A后b-型细胞色素的吸收光带就立即变得明显,而其他那些细胞色素实质上消失了。这是由于抗霉素A抑制b-型细胞色素和细胞色素c之间的电子传递所引起的。在阻截处的底物一侧的所有氧化-还原组份保持全部还原,而在氧化一侧的则重新氧化(因为电子不断流到氧而不再从琥珀酸流入)。这种现象被认为是一个交叉点,并且通常可用它来测定呼吸链抑制剂的作用部位、呼吸-载体的顺序以及间接地用来测定能量偶联部位的可能的可能的位置(第4章)。

## 2.6.2 氧化-还原作用动力学

氧化-还原作用动力学的测量也能得到有关各个氧化-还原载体的性质和作用的有价值的资料。由于这些实验一般仅用很少的样品,吸收的变化也相应地微弱,因此双光束分光光度计就为更灵敏的双波长分光光度计代替。这种仪器利用二束略微不同的单色光,交替地通过单个比色杯( $\lambda_1$ 和 $\lambda_2$ ;见图2.12b)。由于波长非常靠近并且只用一个样品,因此浊度变化假象所造成的误差被减低到极小。

细胞色素c在原位的氧化-还原的动力学变化,显示于图2.14。在完整线粒体中加入琥珀酸后,氧的吸收很快达到一个最大和恒定的速度,而细胞色素c仅部分地被还原(即总量中只有一个小百分数是在 $Fe^{2+}$ 的状态,其余的仍为 $Fe^{3+}$ )。这种部分还原现象反映了细胞色素c从其最近的供体(细胞色素 $c_1$ )接受电子并把它们递给最近的受体(细胞

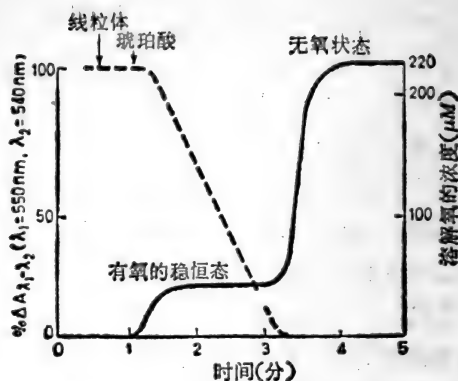


图 2.14 原位细胞色素 c 的氧化-还原作用的动力学变化  
( $\mu\text{M}$  为微克分子浓度)

色素 a) 的能力。由于还原的程度和氧的吸收速度二者是恒定的,这个细胞色素可以说是处在有氧稳定态,只是当溶解的氧浓度降低到对呼吸作用速度起限制作用时,细胞色素 c 才变成完全还原态而进入缺氧状态。由于在有氧的稳定态时,细胞色素 c 还原的百分率是受该组份还原和重新氧化的相对速率所决定的,因此它独特地反映了这种细胞色素在呼吸链中的地位。从表 2.1 可清楚地看到这一点,当链的氧的末端有氧时,各个氧化-还原载体还原作用的百分率降低。

表 2.1 有氧的还原作用恒态

	还原作用的%			
	F <sub>p</sub>	b (全部)	c (+c <sub>1</sub> )	a
琥珀酸	40	25	19	4
+ 抗霉素 A	100	≤100	0	0

## 2.7 电子传递

根据以上所描述的氧化-还原电位的数值,氧化-还原作

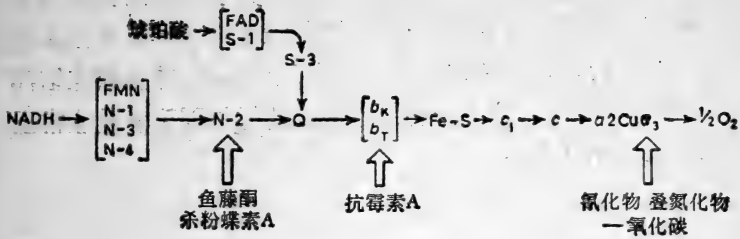


图 2.15 线粒体的呼吸链

用的动力学,抑制剂的研究以及提取-重组活化实验的结果来分析,呼吸链载体一般认为是如图 2.15 所示的顺序起作用的。

Williams 最近指出: 金属的 (Fe, Cu) 和非金属的(烟酰胺、黄素、醌)氧化-还原中心的存在,可能对呼吸链的功能有重要意义。金属参与单-电子的(或单-电子传递二次)传递和氧原子的传递;它们一般不参与氢原子的传递。铁作为一种过渡金属,是易于表现多种氧化状态,因此能在广阔的氧化-还原电位内起作用(参看带有细胞色素 a<sub>3</sub> 的 N-1 铁硫中心)。由于它能有效地连接还原碳的供体和分子氧(或被某些细菌用的氮和硫的氧化物)之间的氧化-还原空隙,因此它是呼吸电子传递系统理想的金属组份。由于铁-蛋白氧化-还原组份呈现低的活化能,因此,从力能学上的考虑,电子在它们之间的传递,以及使它具有特定方向都比较容易。

相反,有机的氧化-还原中心有相对固定的氧化-还原电位,并且一般还参与速度较慢的氢原子的传递 (2H 或 H<sup>-</sup>)。烟酰胺和黄素极易与活化的氢反应(例如乳酸或苹果酸的一CHOH 基和琥珀酸或脂肪酰辅酶 A 的一CH<sub>2</sub> · CH<sub>2</sub> · CO—结构),但不与氢或无机氧化物反应。

有这二种类型的氧化-还原载体群的存在,对于呼吸链的

能量贮存作用有着重要的意义。首先,由于邻接的供体和受体的氧化-还原电位匹配得很好,因此能使电子得以发生快速的传递。其次,这种传递导致质子在几个金属-非金属连结部分的排斥或吸收,这是一种对于能量传导机理可能是非常重要的现象(第5章)。

### 3. 偶联膜的机构和功能

在第2章中,我们已经了解到,构成呼吸作用(或光合电子传递)的氧化-还原反应,是在严格规定的顺序中进行的。从这一方面来说,它们类似于糖酵解或三羧酸循环的多酶途径。然而与后者不同的是电子传递和导致ATP合成的反应,完全是结合在膜上的。例如,光合能量贮存作用是在叶绿体的类囊体膜中和光合细菌的载色体或其内膜中发生的;氧化磷酸化反应是在需氧性真核生物的线粒体内膜中,以及细菌的原生质膜中发生的。由于这些膜通常使各种氧化-还原系统与ATP的合成偶联,因此这种膜常称为偶联膜。

显然,这些偶联膜的功能之一,是使各个氧化-还原载体和偶联酶组织起来,以致使它们形成有效的和很容易调节的能量转换单位。此外,偶联膜本身还可能对能量转换机理起着-一个内在的作用,因为在缺乏膜结构时,能量转换就不能进行,而且如果膜的完整性受到破坏时就严重减低;目前偶联膜的这种内在作用的确切本质,还是争论得很多的课题(第5章)。最后,偶联膜通常作为细胞的一种主要的渗透性障碍,它严格控制着某些溶质进入和移出它所包围的小区隔。因此,偶联膜通过调节某种物质或辅助因素的供给,粗略地控制其本身的活性,同时也借以保护本身免除渗透不平衡的可能有害的影响。这些功能虽然所有偶联膜中都具有,但仅在真核生物的线粒体中,才得到深入的研究。

### 3.1 线粒体的结构与功能

线粒体是一切动植物组织、也是一切需氧性生长的酵母和原生动物的进行氧化磷酸化反应的场所。在动物组织中，它们通常在需要 ATP 最多的地方、或氧化作用底物供应最富集的地方最为丰富。肝、胰、表皮细胞、脑、肌肉等由于它们有大量的生物合成、分泌或化学机械能的活动，而特别富有线粒体。脂肪滴也常有大量能氧化它所提供的脂肪酸的线粒体所包围。

虽然早在十九世纪中叶，就已在显微镜中观察到线粒体存在，但一直到 1948 年 Hogeboom、Schneider 和 Palade，才成功地将这些完整细胞器分离。其窍门就是在加有缓冲的蔗糖等渗液中和缓地破碎，因而防止了这些脆弱结构的解体。然后，将汁液再进行不同速度的离心，以便将线粒体和未破碎的细胞核，微粒体和可溶性物质分开。这种技术以后又被略微改进(图 3.1)，并且能够被用来分离大量完整的、具备有呼吸作用和各种与能量有联系的功能的线粒体。

线粒体形状和体积方面的差别是很大的(它们因此而有其线和粒之名，希文 *mito* = 线; *chondros* = 颗粒)。这些差

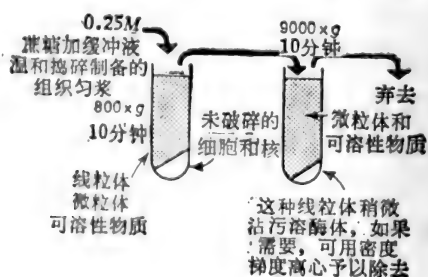


图 3.1 完整线粒体的分离



别是与线粒体的来源有关，也与检查时的代谢状况有关。从鼠肝获得的典型的腊肠型线粒体有大约 2—3 微米长，0.5—1 微米阔。负染色的线粒体横切面的高分辨率的电镜照片，清楚地显示出有双层膜结构的存在(图 3.2)。这是由一层包围在外面的外膜和一层高度内凹的内层膜组成，内层膜的折叠称为嵴(线粒体的)。这两层膜造成二个完全分开的小区隔，即膜之间的空间(膜间腔)和被内膜包含的空间(基质)。

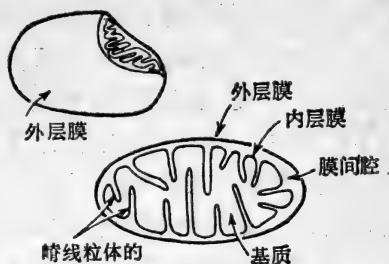


图 3.2 线粒体的结构  
(引自 Lehninger, 1970)

外层膜厚 60—70 Å，平滑而没有折叠。它几乎无弹性，而且小到一定程度的分子如盐、腺嘌呤和烟酰胺核苷酸、糖和辅酶 A 都能自由透过它。通过与去垢剂(例如毛地黄苷)短时间的接触，可将这种外膜与线粒体的其余部份分开。对这外膜的分析表明；虽然这外膜制剂中还可能包含有来自内质网膜的沾染物，在膜上可测到有几种酶和氧化-还原载体。这些组分不参与氧化磷酸化作用，但可能参与在导致羟基化作用(例如甾体化合物的羟基化作用)的电子传递中。

与外层膜不同，在内(起偶联作用的)膜的内表面上，显示有亚结构的证据(第 3.2.2 项)，并对不同的溶质的渗透性显示很大程度的变化。它对不带电荷的小分子如水、氧、一氧化碳或氨的扩散没有障碍，但对带电荷分子的透过包括质子和小的离子有很大的限制，这些分子的移动是通过特殊的运输系统来进行的。在细胞的基质(matrix)和细胞质的小区隔之间，起透过性障碍作用的不是多孔的外层膜而是内层膜。这

种 60—70 Å 厚的膜借助其高度折叠的性质提供了很大的表面积,并且容纳了呼吸链以及参与 ATP 合成的酶。

无论是内层膜或外层膜都含有高浓度的磷脂,一般认为磷脂可形成尾尾相对的双层膜,膜的蛋白质组分就包埋在这种双层膜中。这些蛋白质大多数是疏水的,因此比较难于提取,较少数量的亲水蛋白则位于膜表面附近,因而较容易把它们提取出来(例如内层膜上的细胞色素 c)。

膜之间的空间宽度通常为 60—80 Å, 并含有少量的酶;主要是那些参与腺嘌呤核苷酸相互转换的酶。另一方面,基质是极其粘稠的并且富含蛋白质,这里是三羧酸循环的酶(琥珀酸脱氢酶和  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶除外,这两种酶是在内层膜上的)和脂肪酸氧化螺旋的所在处。正是这些无定向的和降解的中心代谢途径,向紧密接触的呼吸系统,提供大量可氧化的底物 NADH。

## 3.2 能量贮存系统的机构

线粒体内层膜呼吸链组分的性质,以及它们将还原当量从底物转移到分子氧的序列,已在第 2 章中描述过了。现在有必要讨论一下这些组分在膜内的更深一层的机构,以考察这些利用氧化-还原能量,来催化 ATP 合成的酶的性质,以及去了解这二个相互依赖的过程,在功能上和形态上是如何关联的。

### 3.2.1 呼吸链复合物

在 1960 年代中,主要通过 Green 及其同事的工作,才逐渐明白线粒体呼吸链可较容易地分为大小极易变动的 6 个组分,即 4 个大颗粒复合物以及遍醌和细胞色素 c (表 3.1)。复

合物 I(NADH-Q 还原酶)和 II(琥珀酸-Q 还原酶)含有黄素和 NADH 脱氢酶和琥珀酸脱氢酶的多倍铁-硫蛋白。复合物 III(QH<sub>2</sub>-细胞色素 c 还原酶)含有 b-型细胞色素(带着抗霉素结合部位), 细胞色素 c 和高电位的铁硫蛋白(可能有多种)。复合物 IV(细胞色素氧化酶)含有细胞色素 a、a<sub>3</sub> 和二个含铜中心, 这种复合物的量至少有其他复合物的 2 倍之多, 这个含量与其作为非速度限制的末端呼吸链片断的作用相符合。泛醌似乎是在复合物 I(或 II)和 III 之间, 而细胞色素 c 则在复合物 III 和 IV 之间转移还原当量。此外, 复合物也含有相当量的磷脂, 这种磷脂有助于维持膜的完整性和结构。Green 已把纯化的复合物按正确的比例混合, 而重组出一个有功能的呼吸链(见第 3.2.4 项)。

表 3.1 呼吸链复合物

复合物	分子量	克分子比	内含物
I	550,000	<1	FMN, 4-7(?) Fe-S
II	97,000	1	FAD 3(?) Fe-S
III	230,000	1	bT, bk, c <sub>1</sub> , Fe-S
IV	250,000	2	a, a <sub>3</sub> , 2Cu
泛醌	860	16	
细胞色素 c	12,600	2	

### 3.2.2 ATP 酶复合物的形态和性质

Fernández-Merán 在 1964 年报告, 负染色的线粒体内层膜上有重复的结构存在(内层膜亚单位)。这些结构仅存在于膜的面向基质的一侧(M-侧)而反面的一侧和外层膜上都完全不存在。极其高倍放大的显微图显示每一个这种结构有大致球状的头或称之为内层膜球(直径 80—100 Å) 和一个柄(60—70 Å 长)组成, 柄是将头连接在内层膜上(图 3.3)。最

近实验指出,在活体中,柄可以埋在偶联膜中,这样头就连在膜的表面,而不是凸出在基质的小区隔中。

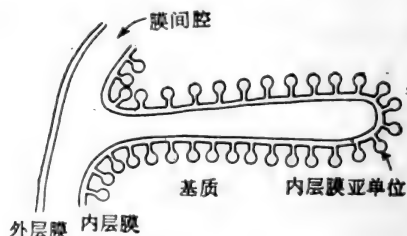


图 3.3 内层膜的形态

当完整线粒体用超声波处理时,它们便破碎,而内层膜碎片则重新形成被称为亚线粒体颗粒的小泡。如果用细心制备的方法,这些颗粒便保持它们把呼吸高效率地偶联于ATP合

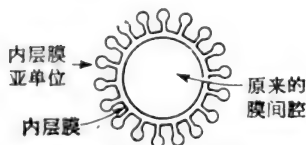


图 3.4 亚线粒体颗粒

成的能力。在电镜下可看到这种小泡仍保留着内层膜的亚单位,然而它们现在却位于小泡的外表面;内表面倒是平滑的(图 3.4)。因此这些颗粒可看成是母株线粒体的“内表外

翻”。Racker 用声波处理的亚线粒体颗粒,显示出如用尿素处理,取下头部就可得到一个 ATP 水解活性很高的可溶性酶(ATP酶;  $F_1$ )。残缺的膜虽然仍然表现有实质上的电子传递性质,但不再能催化 ATP 的合成。当把 ATP 水解酶回加给膜后,后者又再呈现为亚线粒体颗粒,并显示氧化磷酸化功能。

从这些卓越的实验可明显地看出,内层膜亚单位正是那些把呼吸链的氧化-还原能量转导成 ATP 水解能的偶联因子的所在位置。

$F_1$  (一种亲水蛋白)和  $F_0$  (一种疏水脂蛋白复合物)是二种主要的偶联因子,它们一起组成可被  $Mg^{2+}$  活化的,可逆的 ATP 酶复合物。后者或者把 ATP 水解为 ADP 和无机磷酸根(这种活性在完整线粒体正常情况下是隐性的),或者耗费呼吸链氧化还原反应所释放的能量而催化一个逆向反应。在后面这种情况下,常把酶复合物称为 ATP 合成酶。这两反应都可被抗菌素寡霉素和金轮枝菌素 (aurovertin),以及为二环己基碳化二酰亚胺 (DCCD) 所抑制。

ATP 酶复合物中  $F_1$  的作用,是原发地与活化的腺嘌呤核苷酸和无机磷酸结合。该酶分子量约为 360,000, 包含有 5 个不同的亚单位,有  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  等 5 种结构。另一个亚单位有 ATP 酶抑制剂的性质,并可能与能量转换的调节有关(表 3.2),根据所采用的提纯方法不同,它可能附着也可能不附着于  $F_1$ 。纯化的  $F_1$  对寡霉素和 DCCD 不敏感,而且显示出较特别的冷钝化性;这冷钝化性在  $F_1$  结合到呼吸膜上后就消失。当一个膜的组分与膜分开后,显示有性质改变的这种现象,被称为异位效应 (allotopy)。

表 3.2 ATP 酶 (ATP 合成酶) 复合物的性质

偶联因子	分子量
$F_1$	360,000
亚单位: $\alpha$	53,000
$\beta$	50,000
$\gamma$	25,000
$\delta$	12,500
$\epsilon$	7,500
ATP 酶抑制剂	10,500
$F_0$	100—150,000
(包括 OSCP 和 DSCP)	(18,000 10,000)

$F_0$  不显示任何一种已知的酶活性，它是由几种疏水蛋白和脂蛋白所组成，其中包括有对寡霉素敏感的赋予蛋白 (OSCP, oligomycin sensitivity conferring protein) 和对 DCCD 敏感的赋予蛋白 (DSCP, DCCD, sensitivity conferring protein)。OSCP 连结  $F_1$  和  $F_0$ ，因此相当于 ATP 酶复合物的柄，而 DSCP 是位于偶联膜上的，并可能与质子运输通过  $F_0$  的通道的维护有关 (见第 5.2.4 项)。

在内层膜的氧化磷酸化系统内，每个  $F_1$  分子大约有一个抗霉素结合的部位 (复合物 III) 和一个寡霉素结合的部位 (即 OSCP)。由于每一个呼吸链单位只包含一个复合物 III 分子，因此，电子从底物至氧的整个传递间距所释放的能量，都被单独 ATP 酶复合物的动作所截用 (图 3.5)。

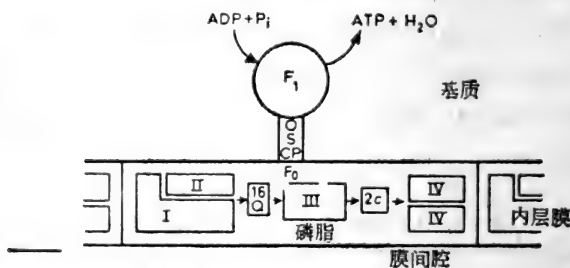


图 3.5 呼吸链能量贮存单位的图解表示 (引自 Slater, 1972)

### 3.2.3 呼吸链组份的不对称性排列

就 ATP 酶复合物所在位置来说，偶联膜显示不对称性的概念，已有大量实验证据的明显支持；但电子传递复合物及其组成的氧化-还原载体在膜上的分布又怎样呢？

这是一个相当难研究的问题，因为载体在偶联膜里侧占多数 (虽然有些载体可能略微突出其表面)。因此，对裸露的膜作直接电镜观察是无效的。然而，靠着利用不能穿过偶联

膜的呼吸链抑制剂已经解决了这一问题。在完整的线粒体中, 这些试剂只对那些位于内层膜外侧的它们所能结合的氧化-还原载体施加以影响。如果这些载体位于膜的反面(基质侧或M-侧), 那么只有膜的极性被逆转后, 即在超声波处理得到的亚线粒体颗粒中, 抑制剂才会有效。

Kacker 利用细胞色素 c 的抗体首创了这种技术, 细胞色素 c 是最易从亲水的氧化-还原载体中提纯, 因而也最易用来生产抗体。人们发现这抗体很容易抑制完整线粒体的呼吸作用, 因此表明内层膜的外表面有细胞色素 c 的存在(外层膜与内层膜不同, 不阻碍这些分子的通过)。这一结论也从抗体不影响亚线粒体颗粒的呼吸活性的现象而得到支持。最后, 当有抗体存在条件下, 制备这些亚线粒体颗粒时, 这样, 抗体就陷入小泡内部, 呼吸作用重新又被抑制。这些实验清楚指出: 细胞色素 c 存在于偶联膜上 ATP 酶的对侧, 因此, 这一侧与 M-侧相对应而被称为 C-侧。后来用细胞色素  $c_1$  的抗体实验得到了相同的结果, 因此这种氧化还原载体也是位于 C-侧。相反,  $F_1$  的抗体已证明 ATP 酶的位置, 是在膜的 M-侧与早期用电子显微镜观察到的结果相符。

二个主要的脱氢酶都是显露在膜的 M-侧, 即与供给它们底物的三羧酸循环和脂肪酸螺旋的酶紧密接触。大西 (Onishi) 最近报告铁的螯合剂磺化浴铜灵 (bathophenanthroline sulpho-nate), 来淬灭亚线粒体颗粒中复合物 II 的 S-3 铁硫蛋白的 EPR (顺磁共振) 信号, 但对线粒体则否, 因此就把这种载体放在膜的 M-侧。用相似的方法, 复合物 III 的高电位铁硫蛋白被指定是在膜的 C-侧。

在一个完全不同类型的实验中, 硅钨酸曾被用来进行选择地只除去偶联膜一侧的组分。所得的结果肯定了 ATP 酶和琥珀酸脱氢酶的位置在 M-侧。

关于细胞色素氧化酶的位置问题最初是有争议的。组织化学把它定位在 C-侧,但是从叠氮对呼吸作用的抑制能力只在它被积聚的地方更有效的情况来看,它的位置是在 M-侧。从最近已提出的重要证据来看,这二个结论都是正确的。这个酶被认为是“插通”偶联膜的,这样细胞色素 a 就与 C-侧的细胞色素 c 靠近,而细胞色素 a<sub>3</sub> 与 M-侧的分子氧起反应。因此,从呼吸作用的最后阶段看来,就是与电子从偶联膜的 C-侧向内转移到 M-侧关联的(图 3.6)。

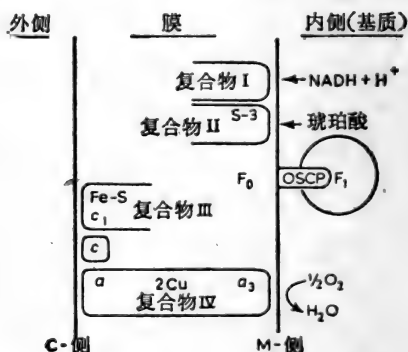


图 3.6 呼吸链的已知不对称性的图解表示

现在普遍认为,就 ATP 酶复合物和某些氧化-还原载体来说,偶联膜是不对称的。在下述的例子中,可以设想,至少有一个以 M-侧为起点,又以它为终点的穿过膜的环。这种成环状的呼吸系统的概念,至少对一种流行的氧化磷酸化机理假设,有着重要的意义(第 5 章);因此,完成对呼吸膜详细的局部解剖学上的分析,是一件相当重要的事情。

### 3.2.4 偶联膜的重组

研究多酶序列作用机理的经典方法之一,是纯化每个单



个组分,然后以正确的比例,将这些组分混和在一起,来试探重新组成具有活性的系统。这方法被 Racker 在 1969 年,应用于呼吸系统得到一些成功,当时他能够用纯化的或部分纯化的氧化-还原组分和磷脂来重组琥珀酸氧化酶。这系统对于抗霉素和氰化物表现有预期的敏感性,所显示的比活性与亚线粒体颗粒中的琥珀酸氧化酶的活性相当,但即使大量增补偶联因子时,也不能催化氧化磷酸化作用。以后又重组成的 NADH 氧化酶,证明也有同样的欠缺。

根据事后的认识,理解到之所以得不到能量偶联的原因,显然是对氧化-还原载体和偶联因子在重组成的膜中的定向结构,没有给予足够注意所造成的。这一点此后已被部分纠正;复合物 I、III 和 IV 都已成功地重组出除了它们正常的氧化-还原活性外,还表现有某些能量偶联的证据。例如,当复合物 IV 与磷脂和对寡霉素敏感的 ATP 酶复合物结合时,所得的小泡表现显著的 ATP 合成功能,并伴随有电子从人工底物到氧的转移。ATP 酶正确地被定位于小泡的外侧,就象亚线粒体颗粒一样,这个系统对那些已知能影响能量偶联的各种各样试剂,都显示有预期的敏感性。

显然,我们现在正接近在体外完全重组一个完整的能量偶联的呼吸链阶段。只有在完成这一步之后,我们才对偶联膜的机构熟悉到足以明白它在氧化磷酸化机理中所起的作用。

### 3.3 溶质通过偶联膜的运输

由于本书的主要任务是描述能量转换的本质,至于有关偶联膜运输溶质的能力,仅是在能量守恒作用或能量利用,有直接关系的问题时,才加以讨论。呼吸链的持续不断的活动,有

赖于有适当的可氧化底物（例如 NADH，琥珀酸）、末端氧化剂（分子氧）和合适的辅因子（例如 ADP 和无机磷酸）的存在。由于偶联膜对气体扩散不产生障碍，因此分子氧能在膜的 M-侧，无阻碍地接近细胞色素  $a_3$ 。而且，NADH 和琥珀酸都是在基质部分进行的中间代谢途径所产生。因此这些底物的氧化作用，与细胞质中产生的 NADH 不同，它们无需事先的转运。

要使糖酵解时，产生的 NADH 能够被呼吸链氧化，它显然必须要通过偶联膜向内运输。由于偶联膜对外在的 NAD(P)H (或 NAD(P)<sup>+</sup>) 是不渗透的，运输要间接地通过代谢穿梭途径进行，例如磷酸甘油梭或苹果酸梭(图 3.7)。

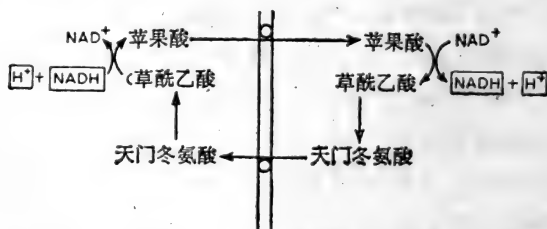


图 3.7 苹果酸梭

虽然质子电化学电位差的确切形成机理还是正在热烈争论的问题(第 5 章),但是已有大量证据表明,呼吸作用可以导致偶联膜两侧的质子电位差。因此,带电荷分子输送过内膜的机理,必定要与这种跨膜 pH 差相适合,也许这个输送机理的发生,也是有赖于它的。

### 3.3.1 阴离子

Chappell 及其同事在六十年代后期卓越的工作证明,在二羧酸和三羧酸的运转过程中,磷酸根通过线粒体内膜的运转是其关键。在生理 pH 的条件下,磷酸根 ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) 似乎是

以 1 与 2 之比与羟基离子交换, 而进入基质小区隔。这种强制性的电中性的交换扩散系统被称为磷酸-羟基反向转移。磷酸根的移动显然是原发事件, 因为苹果酸的进入, 紧跟在这种阴离子的外出之后(图 3.8 a)。同样, 紧跟在苹果酸外出之后, 发生柠檬酸、异柠檬酸或顺乌头酸经过一个反向转移系统进入以及  $\alpha$ -酮戊二酸经过另一个系统的进入。

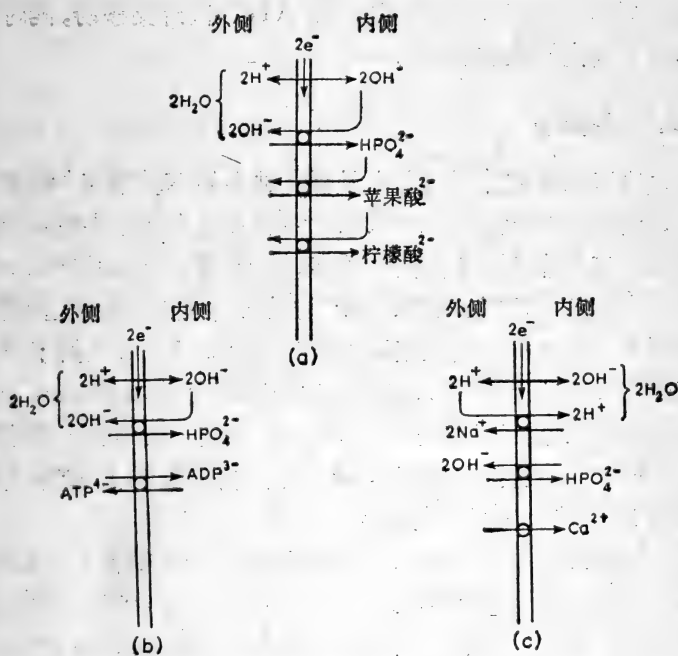


图 3.8 穿越线粒体内膜的离子运转(引自 Lehninger, 1974)

因为线粒体的主要功能是向细胞质供应 ATP, 所以运输腺嘌呤核苷酸 ADP 和 ATP, 而不运输 AMP 的能力是内层膜的主要性质。有大量的, 特别是来自 Klingenberg 实验室的证据说明,  $ATP^{4-}$  的运输是以 1 比 1 与 ADP 交换进行的(经过腺

嘌呤核苷酸移位酶),因而使线粒体内腺嘌呤核苷酸贮库的维持恒定。这种  $ATP^{4-}$ — $ATP^{3-}$  的反向转移系统是产电荷的 (electrogenic, electroactive), 因为二个组分的电荷不是相等的。因此,它们进出基质小区隔的移动,是对跨膜电位差响应而发生(负电荷内侧),这电位差是由呼吸作用所产生,并且以随即的阴离子移动来维持的(例如磷酸根和羧酸根)。因此,带负电荷的内环境排斥  $ATP^{4-}$ , 使  $ATP^{4-}$  向外侧移动,同时使  $ADP^{3-}$  向内流入(图 3.8b)。

### 3.3.2 阳离子

完整的线粒体对沿着电子梯度进入的  $Na^+$  和  $K^+$  略有渗漏,这将使内外电位差下降,因此它们必须能排斥这些多余的离子。这是靠着一个高活性的  $Na^+$ - $H^+$  的反向转移(图 3.8c) 和一个活性较低得多的  $K^+$ - $H^+$  的反向转移的动作来达到的,这两种转移之间的活性差别,使在间质小区隔中,维持了一个高的  $K/Na$  比例。加入离子载体的抗菌素 (ionophorous antibiotics) 如缬氨霉素或尼日利亚菌素,可使一价阳离子的移动大大增加。这种抗菌素能溶解于膜中,并分别催化  $K^+$  单向转移和  $K^+$ - $H^+$  反向转移的反应。

某些二价阳离子如  $Ca^{2+}$  (但不是  $Mg^{2+}$ ) 很容易被积聚。 $Ca^{2+}$  的吸收是通过电荷推动的 (electroactive)  $Ca^{2+}$  单向转移系统(即没有直接与其他离子的交换)进行。像  $ATP^{4-}$  的外出一样,  $Ca^{2+}$  的进入,要被带负电荷的基质小区隔促进(图 3.8c)。这二过程被看作为需能的事件,因为它们电荷梯度显著地使暴跌。

## 4. 供 能 态

三十年代后期, Kalckar 和 Belitser 首次观察到剁碎的动物组织, 具有在呼吸氧化各种底物的同时, 发生 ADP 和无机磷酸根酯化反应的能力(氧化磷酸化反应)。后来从测量磷酸根消失, 或  $\text{ATP}^{32}$  的形成才明白, 在氧化磷酸化反应中, 酯化的磷酸根的数量(克分子)与消耗的氧的数量(克原子)存在着化学数量关系。这种化学计算称为 P/O 比。它的大小是底物经历氧化过程的特征。1951 年 Lehninger 已经证明, 通过  $\text{NAD}^+$  氧化的底物(例如  $\beta$ -羟基丁酸、苹果酸)氧化时, 所得到的 P/O 比接近于 3, 而通过黄素氧化的底物(例如琥珀酸), 其 P/O 值降低至接近于 2。

简要地了解一下氧化磷酸化反应的热力学, 就很容易解释这些现象。当分子氧 ( $E'_0$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\frac{1}{2}\text{O}_2 = +820$  毫伏) 氧化琥珀酸时 ( $E'_0$ , 琥珀酸/延胡索酸 = +30 毫伏), 相当于有一个 790 毫伏的  $\Delta E_0$ , 这相当于  $-152$  千焦克分子<sup>-1</sup> 的自由能变化。就是说, 这大约仅相当 NADH 氧化时释出能量 ( $-219$  千焦克分子<sup>-1</sup>; 第 1 章) 的 2/3。

假定在标准条件下, 合成 ATP 所需的自由能为  $+31$  千焦克分子<sup>-1</sup>, 这两种氧化作用都有大约 41% 的偶联效率; 其余的能量均以热散失。这种效率与人造机器如蒸汽机或发电机相比, 是大大超过了的, 并且与光合磷酸化作用的能量贮存作用效率相似。

然而, 也有许多例子, 它们的氧化磷酸化效率特别低, 因而使这些呼吸作用有大量放热的特征。例如, 在老鼠棕色脂

肪的线粒体中,以及在水芋的肉穗花序中就是这样。前面的例子代表了有抵抗致死威胁的寒潮的机理,而后者似乎是为吸引昆虫来协助授粉提供一种手段。许多细菌的系统也显示出低 P/O 比值,但这些系统只是在偶然的情况下,才给予有机体以任何生理上的好处(第 6 章)。

## 4.1 能量偶联部位

1954 年 Lehninger 和 Lardy 分别报告了完整线粒体的呼吸链中各个能量偶联部位的位置。所用的技术就是测量各种不同氧化-还原电位的供体和受体存在时测量 P/O (或 P/2e<sup>-</sup>) 比值,这样就把呼吸链有效地分隔成功能上的片段(表 4.1)。

表 4.1 能量偶联部位

供 体	受 体	抑 制 剂	P/O(P/2e <sup>-</sup> )
$\beta$ -羟基丁酸	O <sub>2</sub>	—	3
琥珀酸	O <sub>2</sub>	—	2
抗坏血酸 + c(Fe <sup>2+</sup> )	O <sub>2</sub>	—	1
$\beta$ -羟基丁酸	c(Fe <sup>3+</sup> )	KCN	2
琥珀酸	c(Fe <sup>3+</sup> )	KCN	1

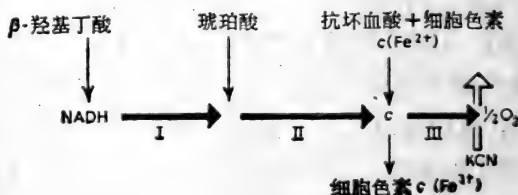


图 4.1 能量偶联部位

由于这类实验的结果,可以断定在 NADH 和分子氧之间,有 3 个如图 4.1 所示的能量偶联部位(位置 I、II 和 III)。

如果用仔细控制的底物浓度，可以用实验方法证明在转氢酶 ( $\text{NADPH} \rightarrow \text{NAD}^+$ ) 的水平上有第四个部位 (0 部位)，但由于这个反应的  $\Delta E'_0$  很低，因此这个部位可能对体内的能量贮存作用，没有什么重要性。

## 4.2 呼吸控制

1956 年 Chance 和 Williams 报告，在有过量的底物、氧和无机磷酸根存在时，完整线粒体的呼吸活性是受着 ADP 的可利用量有效地控制着的。这一过程被称为呼吸控制。缺乏磷受体 (ADP) 时，呼吸速率是低的 (图 4.2)，而这种线粒体的状态被认为是处于受控状态 (或状态 4)。ADP 加入后呼吸速率剧烈增加 (活化态或状态 3)，并且在 ADP 几乎完全酯化之前，一直保持着快速的呼吸，此后，呼吸速率再次降至状态 4。反应混合物在底物或氧二者任一发生亏缺之前，一直可看到这种 ADP 诱导现象的多次反复。这一类实验清楚指出，在完整线粒体中，呼吸作用和能量贮存 (ATP 合成) 是紧密偶联的；前者被后者的需求量所控制。因此，底物和氧的消耗，受线粒体对 ATP 的需求所决定。这样，在正常条件下，就不发生不必要的呼吸作用。

现已清楚，状态 3→状态 4 的转变，并不是 ADP 浓度的直接效应造成磷酸化系统浓度的动力学受影响，而是 ADP 对磷酸势 (phosphate potential) 间接效应所造成的。磷酸势反映呼吸链，为引起 ATP 合成所必须作的功 ( $\Delta G$ )。因为

$$\Delta G = \Delta G^{\circ'} + 2.303RT \log \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]}$$

磷酸势明显随  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}][\text{P}_i]$  的比值而变化。Slater 最近测量了催化状态 4 呼吸的鼠肝线粒体的磷酸势，得到其值为

67.4 千焦克分子<sup>-1</sup>。这几乎与呼吸链所能产生的最高理论值 73.04 千焦克分子<sup>-1</sup> (219/3) 相等。因此可以推论呼吸作用和磷酸化作用在状态 4 是热力学平衡的, 而且呼吸作用的速率最终受磷酸势托压 (back-pressure) 的控制。

许多细菌的呼吸系统以及叶绿体中的光合电子传递, 也已证明都有相似类型的控制。在细菌的呼吸系统中, 一些初始的脱氢酶经常处于受周围能量电荷 (energy charge) 的直接动力学控制中。这一概念被 Atkinson 引用来描述细胞的能量状态, 并认为是等于

$$\frac{1}{2} \left( \frac{[\text{ADP}] + 2[\text{ATP}]}{[\text{AMP}] + [\text{ADP}] + [\text{ATP}]} \right)$$

这个数值可以从 0 变化到 1.0, 但通常是在 0.8 左右。看来它通过对组成代谢和分解代谢两者的呼吸关键酶的作用, 而在代谢中, 起着—个十分重要的控制作用, 但通常对呼吸作用仅有很小实质上的影响。

有证据显示, 线粒体呼吸链的琥珀酸脱氢酶也可以受各种氧化-还原和能量信号的直接控制, 而活化或钝化。这些信号包括琥珀酸本身, 草酰乙酸、ATP 和泛醌。这种高度特化的控制系统的目的, 显然是为了保证当细胞需要最大量 ATP 合成时, 呼吸链优先氧化 NADH (即二种主要底物中的含量最富、能量利用最有效的一种)。

几种其他重要的参数也可以从图 4.2 所描述的实验曲线中计算出。其中首要的是 ADP/O 的比值, 在数值上当然与 P/O 或 P/2e<sup>-</sup> 的比值相等。由于呼吸作用和磷酸化作用密切偶联, 因此状态 3 呼吸的程度, 是取决于可用的酯化反应的 ADP 量。从这一实验可以看到, 加入 0.5 微克分子的 ADP, 增加了快速吸收 0.245 微克原子氧(底物, 琥珀酸); ADP/O = 0.50/0.245 = 2.08。



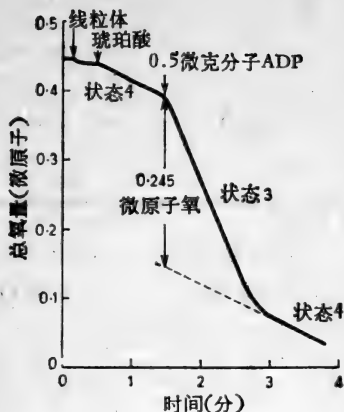


图 4.2 呼吸控制  
(微原子可改称微克原子——译者注)

也可以从这图测出呼吸控制指数 (RCI), 这仅是状态 3/ 状态 4 呼吸速率的比例。RCI 值的高低与底物的性质和线粒体的来源有关。它很少超过 7—8, 并且是偶联膜完整性的一种粗略的指标。

### 4.3 交叉点

用双波长分光光度计对正在呼吸的线粒体进行测定, 显示氧化-还原载体的有氧稳态还原水平随呼吸状态而显著地变化, 例如细胞色素 a 的还原百分数, 在状态 3 时, 就比状态 4 时要高, 而细胞色素 c 则反过来(表 4.2)。因此, 受磷体的缺乏, 引起细胞色素 c 和 a 之间出现一个交叉点, 这提示部位 III 就是位于这一间隔中。然而, 由于这一结论在热力学的分析中仅得到部份支持, 一个状态 3 与状态 4 的交叉点也许只是能推断能量偶联位置的一个粗略的指导。

表 4.2 氧化-还原状态的比较

状 态	需氧性稳态(%还原)				
	NADH	FP	b(全部)	c(+c <sub>1</sub> )	a
3	53	20	16	6	4
4	99	40	35	14	0

实验条件下,在细胞色素 b 和 c 之间(部位 II)和在 NADH 和黄素蛋白之间(部位 I)也有看到状态 3→状态 4 的交叉点的报告,对这报告也持有相似的保留。交叉点也可靠加入 ATP 来诱导出现(例如在部位 I;第 2.2.3 项)。

#### 4.4 解 偶 联 剂

已知有些化合物加入于线粒体时,就会消除呼吸控制(图 4.3)和 ATP 的合成而促进 ATP 酶活性。这些化合物能使能量守恒作用不再与呼吸作用偶联,因而被称为解偶联剂 ( $\phi H$ )。

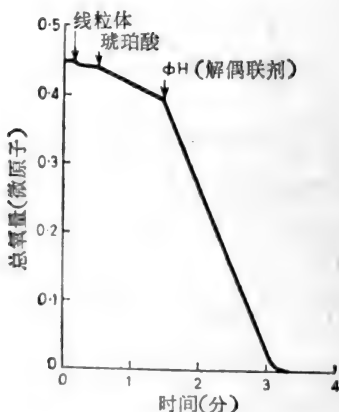


图 4.3 解联剂 ( $\phi H$ ) 的作用

已知有好几种类型的解偶联剂,但最简单的都是脂溶性的弱酸,例如 2,4-二硝基苯酚(DNP)和羰基氰化间-三氟苯腙(carbonyl cyanide m-trifluorophenyl hydrazone, FCCP; 图 4.4)。这些解偶联剂对这三个磷酸化部位,都有相似程度的影响,而且无需 ADP 和无机磷的存在。因此在呼吸作用和 ATP 合成的最后阶段之间,可能存在着一一种非磷酸化的易于被亲脂性阴离子( $\phi^-$ )破坏的供能态。这种看法得到下列观察的支

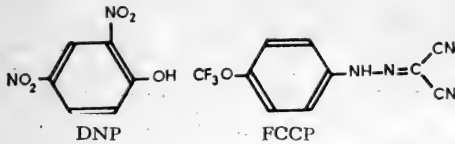


图 4.4 DNP 和 FCCP 的结构

持,即加入一种解偶联剂,可使在正常情况下完整线粒体的低 ATP 酶活性促进好几倍。在光合磷酸化和细菌的呼吸作用中;也可得出相似的结论。前者独特地被  $\text{NH}_4^+$  解联,这种现象反映出类囊体膜的极性,与完整线粒体和细菌的偶联膜的相反现象(参阅第 3、5 章和第 6 章)。

#### 4.5 磷酸化作用的抑制剂

与 DNP 和 FCCP 的作用不同,抗菌素寡霉素和金轮枝霉素通过直接影响可逆的 ATP 酶复合物而抑制 ATP 的合成。这些化合物因此而被归属为磷酸化抑制剂。由于在完整线粒体中呼吸作用和磷酸化作用是紧密偶联着的,因此这些化合物使状态 3 的呼吸回复到状态 4 的抑制作用(图 4.5)。特别有趣的是将解联剂加入到受寡霉素抑制的线粒体中时,立即引起这种抑制作用的解除,并使呼吸作用增加至正常解联的速率。解联剂的这种克服寡霉素抑制作用的能力,对了解氧

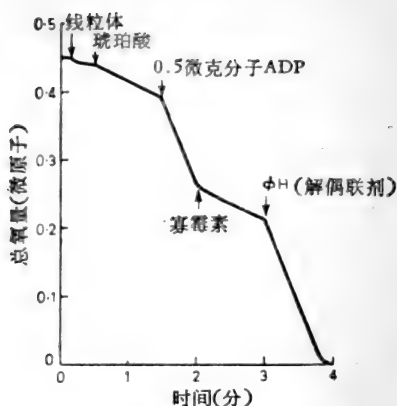


图 4.5 磷酸化抑制剂的作用

化磷酸化机理有着重要的意义，因为它标明前者的作用点比后者更靠近呼吸链。解偶联剂促进的 ATP 酶活性被寡霉素的加入，而强烈地抑制的现象支持了以上的观点。

#### 4.6 逆转的电子传递

由于呼吸作用和磷酸化反应，是在热力学的平衡中，这就有可能依靠 ATP 的水解而使完整的线粒体逆转它们的电子传递方向。这个理论在 1960 年分别为 Chance 和 Klingenberg 所证实，他们做到了依靠 ATP 的推动，来使线粒体催化琥珀酸还原 NAD 的反应(图 4.6)。这种反应在能量上是非常高效的，每还原一分子  $\text{NAD}^+$  只水解一个分子的 ATP。由于这个反应的最适进行，是在无氧条件下，或正当呼吸链在细胞色素 b 的氧侧被抑制之时，因此它常被认为是厌氧条件下逆转的电子传递。当有解偶联剂或磷酸化抑制剂存在时，这种  $\text{NAD}^+$  的还原反应就被消除。

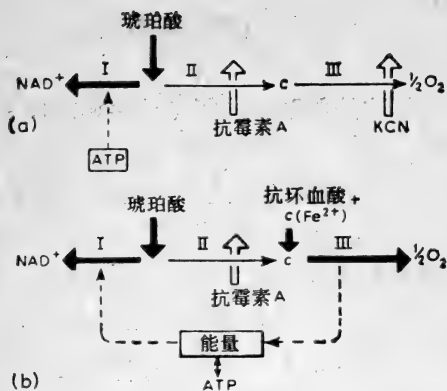


图 4.6 逆转的电子传递 (a) 厌氧的; (b) 需氧的。

然而，利用在部位 II 或 III 的向前电子传递而获得的能量，来推动部位 I 电子传递的逆转也是可能的。这种需氧性的，逆转的电子传递过程也被解联剂所抑制，但磷酸化抑制剂通常对它略有促进。转氢酶在利用  $\text{NADH}$  还原  $\text{NADP}^+$  的反应中，支持了一种需能的、逆转的电子传递过程，也是一个相似的实例。

最近利用极高的磷酸势下的 ATP 作为能源，已经成功地做到线粒体呼吸的完全逆转（即从水到  $\text{NAD}^+$  的电子传递同时释放分子氧）。

因此线粒体中逆转的电子传递，反映了氧化作用和磷酸化作用之间的一种紧密的、可逆的偶联，但也可能是没有什么生理意义的。然而，许多化能自养细菌依靠高电位的、无机电子供体还原  $\text{NAD}^+$  的能力，对于它的自养的生活方式是非常重要的（第 6 章）。

## 4.7 供能态的概念

从前面描述的偶联膜的能量贮存和能量利用的性质已可清楚地看到，氧化-还原系统和 ATP 合成酶之间的能量转移是完全可逆的，而且必须通过一个共同的、非磷酸化的供能态而发生(图 4.7)。实验证据指出，供能态可被解联剂破坏或消除，但不被离呼吸链似乎较远的地方起作用的磷酸化抑制剂所破坏或消除。这种供能态可能依靠呼吸作用、光合电子传递或 ATP 水解，作为最终能源来推动体内许多与膜结构有关的功能(例如可逆的电子传递、离子或营养物运输)。

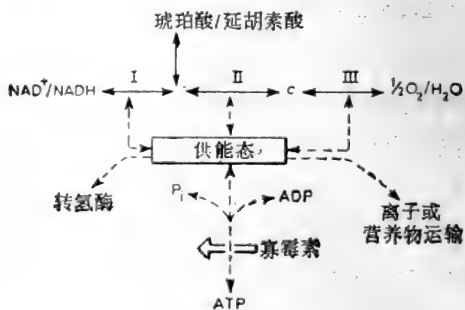


图 4.7 供能态

## 5. 氧化磷酸化反应的机理

确凿鉴定原初供能态是当代生物化学的主要问题之一。几个有关呼吸链和光合能量贮存作用机理的主要学说交织在这个问题的周围，它们是化学学说，化学渗透学说和构象学说。

### 5.1 化学学说

氧化磷酸化的化学学说是1953年首先由Slater根据已经了解清楚的底物水平磷酸化的机理(第1章)而提出的，底物水平磷酸化的机理是氧化-还原引导到ATP的合成，是通过非磷酸化的中间产物和磷酸化的中间产物一系列反应而完成的。化学学说包括了这些特点，并总括如下：



$AH_2$  和  $B$  是跨占有一个磷酸化部位的一段呼吸载体。 $I$  和  $X$  是性质未知的偶联因子的配基，但它能形成具有高水解自由能的酞键。学说的另一种提法，是在第一个方程式中以  $BH_2 \sim I$  代替  $A \sim I$ ，而其余的步骤都相同。

按照经典办法来证实这种假设需要鉴定和分离出  $A \sim I$

(或  $\text{BH}_2 \sim \text{I}$ ),  $\text{X} \sim \text{I}$  和  $\text{X} \sim \text{P}$ 。然而对  $\text{X} \sim \text{I}$  而言,这种要求可能很难做到,因为  $\text{X} \sim \text{I}$  的浓度非常低,并且在离开偶联膜的疏水的内环境之后很可能是不稳定的。此外,最近的实验证据指出:以上所示反应序列的最后二步实际上可能是同时发生的即在  $\text{X} \sim \text{I}$  裂解的同时即发生  $\text{ADP}$  和无机磷的酯化而没有  $\text{X} \sim \text{P}$  的中间产物形成。然而  $\text{A} \sim \text{I}$  (或  $\text{BH} \sim \text{I}$ ) 的形成是绝对必需的,因为它与呼吸链相联结,应该可以用吸收光谱或 EPR 光谱检测到它的存在。

### 5.1.1 供能的呼吸链载体

近二十年来曾提出过一些可能起着供能的呼吸载体作用的候选成员,但当仔细追究时,发现这许多成员都是不存在的。

然而, Wilson 和 Dutton 最近用非常精密的电位计和分光光度计,测量了呼吸链载体在原位上的氧化-还原电位,并且找出几个新的候选成员。它们是细胞色素  $b_T$  (部位 II), 细胞色素  $a_3$  (部位 III) 以及一个或更多的  $\text{Fe-S}$  蛋白(部位 I)。这些载体由于它们的  $E'_0$  值受偶联膜供能状态 ( $\pm \text{ATP}$ ) 的影响,而有所变动(表 5.1);其他的载体如细胞色素  $b_K$ 、 $c$  和  $a$  的  $E'_0$  值似乎是不变的。

表 5.1 在原位的呼吸链载体的  $E'_0$  值

载 体	$E'_0$ (毫伏) - ATP	$E'_0$ (毫伏) + ATP	$\Delta E'_0(\pm \text{ATP})$
$b_T$	-30	+240	+270
$a_3$	+375	+155	-220

由于供能对偶  $\text{AH}_2 + \text{I}/\text{A} \sim \text{I} + 2\text{H}$  的  $E'_0$  比  $\text{AH}_2/\text{A} + 2\text{H}$  的要高些(对  $\text{BH}_2 \sim \text{I}/\text{B} + \text{I} + 2\text{H}$  和  $\text{BH}_2/\text{B} + 2\text{H}$  也是这样),这就使  $b_T^+$  在部位 II 成为一种供能的复合物,而  $a_3^+$  可能在部位 III 占有相似的地位。然而,对这些载体所作的观察得到



的  $\Delta E'(\pm \text{ATP})$  值仅相当于有 21.3 和 25.9 千焦克分子<sup>-1</sup>的  $\Delta G^{\circ}$  值(对比合成 ATP 所需的能量为 31.0 千焦克分子<sup>-1</sup>),而且在植物线粒体中,还没有证据说明  $b_T$  形成供能的复合物。

### 5.1.2 联系能量的反应

按照化学学说最早的说法,解联反应是因解联剂阴离子( $\phi^-$ )对  $X \sim I$  的亲核反应而产生,它使  $X \sim I$  水解而产生  $X \cdot H$ ,  $I \cdot OH$  和热;这样就使以上所述的反应序列不可恢复地中断了。这种看法最近已有很大修改,而现在初步认为解联是由于解联剂阴离子的向内移动触发了水的需能裂解(成  $H^+$  和  $OH^-$ )所致(图 5.1)。

在部分破碎的线粒体或细菌膜中会出现比较低的氧化磷酸化效率,也就是发生部分的自然解联。这种现象被解释为偶联膜的物理性的破裂,使得水得以渗透到  $X \sim I$  形成的部位而使供能态的消失。

呼吸控制的化学观点就是在没有 ADP 存在时(状态 4)高的磷酸势引起内膜的  $X \sim I$  浓度的增加,这使前面几步部分反应的平衡,移向  $A \sim I$  积累,因而使电子传递实际上停止(状态 4)。残余的十分低的呼吸速度可能一部分是来自  $X \sim I$  缓慢的基础水解一部分是由于  $X \sim I$  作为离子运输或其他的线粒体反应的能源所造成的。加入 ADP(状态 3)后,磷酸势位降落,呼吸速度增加直至被电子传递系统的速度限制步骤限制时为止(可能是原初的脱氢酶)。

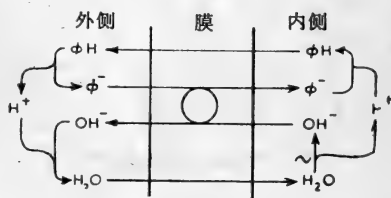


图 5.1 解联的化学观点  
(引自 Slater, 1971)

X ~ I 被认为是所有偶联部位共有的供能中间产物。这种或由 ATP 的水解或由前向的电子传递所产生的高浓度的内层膜 X ~ I, 可被用来使  $AH_2 \rightleftharpoons A \sim I$  平衡向左移动, 而推动逆向的电子传递。因此, 在部位 I 发生的氧化-还原反应, 是消耗所加入的电子供体如琥珀酸, 而向着最终有利于 NADH 形成的方向移动。有人认为需能的烟酰胺核苷酸转氢酶反应, 是通过类似的机理进行的。

就离子的运动来说, 化学学说可被看成是一种消耗 X ~ I, 来推动的膜内质子泵。它所产生的偶联膜两侧的质子 (里侧碱性) 电化学电位差, 被看成是其离子运动的推动力 (第 3 章)。

## 5.2 化学渗透学说

氧化磷酸化的化学渗透学说首先为 Mitchell 于 1961 年提出。这一学说立即被认为是与化学学说完全不同的另一种学说, 因为这个学说不需要有高能共价中间产物存在, 而使在 ATP 形成过程中, 找不到这种中间产物的事实得到合理的解释。Mitchell 认为通过电子的传递直接在偶联膜的两侧产生质子的电化学电位差, 然后这种电位差再被用来推动 ADP 和无机磷的脱水作用。这些概念以后主要为 Mitchell 及其同事 Jennifer Moyle 修改和补充, 使它现在不仅能用于氧化和光合磷酸化以及它们的各种分支反应, 而且也应用于更外围的与能量有联系的过程, 如营养的运输。

在目前的情况下, 化学渗透学说有四个主要假定, 即:

- (1) 一个各向异性的(定向的), 运输质子的氧化-还原系统;
- (2) 一个不透离子的偶联膜;

(3) 特异的交换扩散系统；

(4) 一个各向异性的、运输质子的、可逆的 ATP 酶。

### 5.2.1 运输质子的呼吸链

按照化学渗透学说，线粒体或细菌中的呼吸作用伴随着质子通过偶联膜向外的运输。这是根据以下观察，当一个小的氧脉冲通入缓冲十分微弱的厌氧性的悬浮液时，外部溶液显示迅速的酸化，然后接着由于质子通过膜的重新平衡，慢慢地碱化(图 5.2)。当质子的排出被其他离子的移动所补偿，以致建立不起电位差时(例如被  $\text{Ca}^{2+}$  进入补偿或者与  $\text{KCNS}$  一起预保温后，发生与  $\text{SCN}^-$  的共同退出)，它的排出量达最大并且与氧的吸收成化学数量关系。这种以  $\rightarrow\text{H}^+/\text{O}$  (克离子  $\text{H}^+$  · 克原子  $\text{O}^{-1}$ ) 表示的化学数量比值，也是底物氧化过程的特征。例如， $\beta$ -羟基丁酸(通过与  $\text{NAD}^+$  联结的)，琥珀酸(通过黄素联结的)和抗坏血酸-四甲基-p-苯二胺(通过细胞色素 c 联结的)的氧化作用，具有依次约为 6、4 和 2 的  $\rightarrow\text{H}^+/\text{O}$  值；对于通过  $\text{NADP}^+$  相联结的底物的氧化，其  $\rightarrow\text{H}^+/\text{O}$  值偶然也可能接近 8。

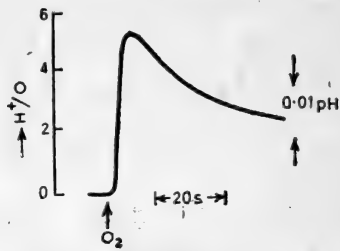


图 5.2 与呼吸膜联系的质子脉冲  
(引自 Mitchell 和 Moyle, 1967)

质子的逐出，是由于呼吸系统被安排成为好几个衔接的氧化-还原回路所造成的。每一个回路都由一个载氢体和一个电子载体两部分组成，并且每转移一对还原当量，就催化二个质子的外运(图 5.3)。线粒体和某些细菌的呼吸链包含有多达 4 个这种方式的运输质子的呼吸回路，而叶绿体和离体

质子的逐出，是由于呼吸系统被安排成为好几个衔接的氧化-还原回路所造成的。每一个回路都由一个载氢体和一个电子载体两部分组成，并且每转移一对还原当量，就催化二个质子的外运(图 5.3)。线粒体和某些细菌的呼吸链包含有多达 4 个这种方式的运输质子的呼吸回路，而叶绿体和离体

的细菌载色体的光合电子传递链则不同，它们的质子运输是向内方向的（ $F_1$  定位于这种膜的外表面），而且只有一个迴路。

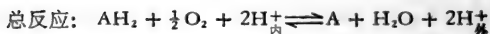
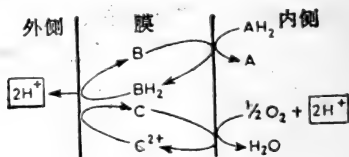


图 5.3 运输质子的氧化-还原迴路 (自 Mitchell, 1966)

显然,这种系统的重要条件是,呼吸载体必须位于膜的适当的一侧,并且有正确的顺序(图 5.4)。虽然对这些成员的局部解剖学的分析工作还未完成,但已有证据说明许多氧化-还原组份是符合这个图式位置的(第 3 章)。这个图式的主要弱点是迴路 O 中的两个载体,无论是电子载体还是 H 载体(e-O 和 H-O) 以及迴路 3 中的载氢体 (H-3), 都没有正面鉴定到过;也可能迴路 3 和迴路 2 都是 Q 贮库的一部分。

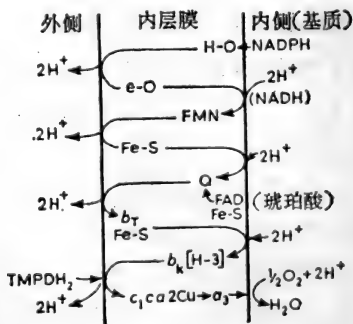


图 5.4 运输质子的呼吸链

这样,由于呼吸作用的结果,在膜的两侧建立起外侧为质子的电化学位差(质子推动力),它随后依靠向着膜内运输质子的可逆的 ATP 酶来推动 ATP 的合成。质子推动力(pmf 或  $\Delta p$ ) 明显地由二种组份构成,即渗透势能差或化学势能差( $\Delta pH$ ; 膜外侧酸性,故为负值)和电势能差或膜电位( $\Delta E$  或  $\Delta \phi$ )。这样

$$\Delta p = \Delta \phi - Z \Delta pH$$

这里  $Z = 2.303RT/F$  (在 300K 时  $\equiv 60$ )。有人证明,在有  $\sim 10$  毫克分子浓度磷酸存在时大约需要有一个 210 毫伏的 pmf, 来使 ATP/ADP 值维持在 1 附近(即推动 ATP 的合成)。最近已有实验证明,在状态 4、状态 3 和 ATP 水解情况下的 pmf 值,分别为 228、170 和 220 毫伏。

运送两个当量的质子通过偶联膜所做的功,等于  $2Z\Delta p$ , 同样;把一对还原当量转移,通过一个初始和最终载氢体的标准氧化-还原电位的差值为  $\Delta E'_0$  的质子运输回路所作的功,等于  $2Z\Delta E'_0$ , 平衡时这两组份相等,即

$$2Z\Delta p = 2Z\Delta E'_0$$

因此,  $\Delta p = \Delta E'_0$

由于 NADH 被分子氧氧化的  $\Delta E'_0$  是 1,140 毫伏,因此显然有充分的能量,使 3 个回路的每个都产生一个足以推动 ATP 合成的质子推动力。每合成一分子 ATP, ATP 合成酶就运回到  $2H^+$  ( $\rightarrow H^+/ATP = 2$ ), 因此对于通过  $NAD^+$  联结的底物氧化来说,其  $\rightarrow H^+/O$  的比值为 6, 即与所预期的 3 的 P/O 值相当。

然而,在通过  $NADP^+$  联结的底物氧化中,曾观察到  $\rightarrow H^+/O$  比值为 8, 对此虽然已清楚证明它有 4 个质子运输回路,但可能并不反映它真有 4 的 P/O 值。这可以从 NADPH 通过转氢酶(回路 O) 被  $NAD^+$  氧化时的  $\Delta E'_0$ , 仅有 4 毫伏来

看出,这个质子推动力 (pmf) 不足以推动 ATP 的合成。实际上, 由于呼吸系统的其余成员所产生的 pmf 有如此之大 ( $> 170$  毫伏), 以致转氢酶在体内发生, 同时伴随以消耗能量的逆方向进行的反应 ( $\text{NADH} \rightarrow \text{NADP}^+$ )。

### 5.2.2 偶联膜的离子不透性

运输质子的呼吸链的功能是产生一个足够大的跨膜 pmf (质子推动力), 从而通过运输质子的 ATP 酶推动 ATP 的合成, 这就必须要求偶联膜实际上不透过质子和其他离子为条件(除非通过专一的交换扩散系统)。如果不是这样, 那么 pmf 将为质子流的短路所消除, 或当阳离子沿着电位梯度进入时将会造成一个碱性很高的, 对渗透有破坏性的内区隔环境。这个要求已有实验证实是满足的; 线粒体, 叶绿体和细菌的偶联膜本身的实际质子传导性在生物系统中是属于最低的。这种低的传导性可能由于在偶联膜中存在有一个重要的, 非水的渗透障碍所造成的, 这种渗透障碍 Mitchell 称之为 M-相(不要与膜的 M-侧或间质侧相混淆)。

### 5.2.3 交换扩散系统

由于 ATP 的合成需要一个约 210 毫伏高的跨膜 pmf, 如果偶联膜两侧的这个膜电位差全部由 pH 差值来产生的话, 那就需有 3.5 的 pH 单位。因此, 如果外部的 pH 是 7.2, 那么基质(衬质)空间将是 10.7。这样大的碱性强度显然与酶的活性不相容忍, 而且也没有在实验中检测到。

因此, Mitchell 提出至少有一部份的 pmf, 是由膜电位组成, 这电位是通过特殊的交换扩散系统的作用, 即电中性的阳离子-质子反向转移(例如  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ ) 或阴离子-质子同相转移而产生的(相等于阴离子-羟基的反向转移; 第 3 章和第 6

章)。由于线粒体和细菌的这种交换扩散反应的速度比没有交换系统(例如,通过膜的渗漏)的离子透过速度快得多,这就有可能使大部份 pH 差用离子梯度来代替。因此膜电位就成为 pmf 的主要组份。然而,对叶绿体而言,由于这种膜的膜电位会被  $\text{Cl}^-$  进入所带的电荷消除,光诱导的 pH 差(内侧酸性)似乎是推动它的光合磷酸化反应的重要组份。根据这个想法出发,可以做到用人为办法,造成类囊体膜两侧(内侧酸性)的突变 pH 差,来推动 ATP 的暗合成。而这种类型的实验在线粒体上是不成功的。

#### 5.2.4 运输质子的 ATP 酶

现在有充分实验证明,各向异性的、可逆的完整线粒体的 ATP 酶,把 ATP 水解成 ADP 和无机磷酸盐的同时,伴随有 2 个质子的向外运输 ( $\rightarrow \text{H}^+/\text{ATP} = 2 \text{ 克离子 } \text{H}^+ \cdot \text{克分子 } \text{ATP}^{-1}$ )。反之,在超声波破碎制备的亚线粒体颗粒中,偶联膜的极性是反转的,质子是以同样的化学数量向内运输,即质子移动方向仍然从  $F_1$  所在的膜一边离开。这一规则对于完整细菌(它的  $F_1$  是在内侧的)和叶绿体的类囊体以及细菌的载色体( $F_1$  在外侧)也是同样适用的。

完整线粒体运输质子的 ATP 酶可用图 5.5 的图解,予以表示出来(注意在生理状态下或微碱的 pH 下,从 ATP 水解形成电离状态的 ADP 和无机磷酸需产生一个质子和运输二个质子通过膜)。从这一可逆反应总的方程式可清楚看出,高的跨膜的质子电化学电位差 ( $[\text{H}^+]_{\text{外}} \gg [\text{H}^+]_{\text{内}}$ ),使反应平衡向有利于 ATP 的合成方向推移。然而,困难在于确实地测定这种推动力是怎样施加在受化学的和局部解剖学影响下的反应组份上的。

Mitchell 最近提出了一个富有魅力的机理,很大程度地

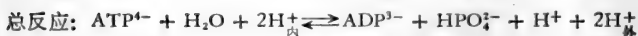
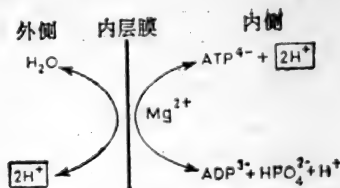


图 5.5 运输质子的 ATP 酶

解决了这个问题。ATP 水解的机理 (图 5.6) 并不需要共价的中间产物的参与,而是靠  $OH^-$  对 ATP 亲电的末端磷,进行亲核取代反应,并释放出无机磷酸根和 ADP。酶的活性部位是位于  $F_0$ - $F_1$  的界面上,因而易于从外侧接受  $H_2O$  ( $2H^+$  最终通过  $F_0$  中的通道逐出),并从内侧取得 ATP (ADP 和无机磷酸根最终从  $F_1$  中的通道离开,这种通道对于所需求的分子的离子化/质子化状态有专一性)。必须指出,ATP、ADP 和无机磷酸根都在内侧起反应 (正如  $F_1$  在完整线粒体中的位置上所要求的那样),并且  $2H^+$  的向外运输,伴随有  $O^{2-}$  从水转移到磷酸根的向内运输 (根据  $O^{18}$  的标记实验的证据)。

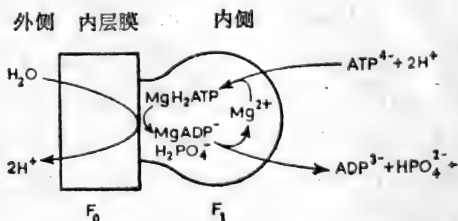


图 5.6 ATP 酶的反应

在发生氧化磷酸化反应时,可逆的 ATP 酶在 pmf 的推动力作用下,起着 ATP 合成酶的作用。 $H_2PO_4^-$  和  $Mg-ADP^-$  被电位梯度 ( $\Delta\psi$ ; 内侧负电) 推入酶的活性中心,而  $Mg-$



$H_2ATP$  被 pH 梯度 ( $-Z\Delta pH$ ; 内侧碱性) 拉出。这种简单的推-拉过程(在图 5.6 中两个反向的箭头), 伴随着 2 个质子沿着电化学电位差向内运输, 同时消除 pmf。

### 5.2.5 联系能量的反应

化学渗透学说引人入胜的要点之一, 是对经典的解联剂例如 DNP 和 FCCP 的作用提供了统一的解释。这些分子的亲脂的和弱酸性的性质, 使它们具有引导质子通过偶联膜的能力, 因而能消除由呼吸作用或 ATP 水解所建立起来的质子梯度。

虽然铵离子对线粒体或细菌的氧化磷酸化作用没有影响, 但它解联叶绿体的光合磷酸化反应的现象, 反映了这些偶联膜的极性不同。只有当铵离子加到如图 5.7 所示的  $F_1$  侧时(即碱性的一侧), 才发生解联作用。如铵离子加到酸的一侧时, 则必须加离子载体抗菌素(如缬霉素), 来克服偶联膜对  $NH_4^+$  的正常的不透过性, 它的解联作用才能发生。

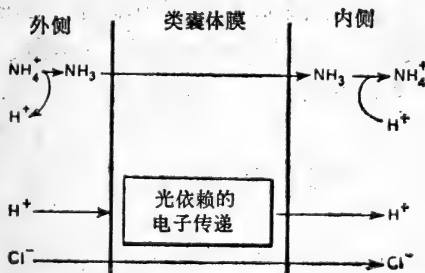


图 5.7  $NH_4^+$  对光合磷酸化作用的解联

按照化学渗透学说, 呼吸作用的速率是被偶联膜的质子的有效传导所控制的。在受控状态下(状态 4), 质子通过

ATP 合成酶的向内流动,是因磷酸受体(ADP)的亏缺而受到限制。由于膜对质子的透性很低,因此就产生了一个很高的跨膜 pmf (质子推动力),这个 pmf 对氧化-还原系统,施加反压力,以致使呼吸作用维持在一个很低的速率上。随着 ADP 的加入,ATP 合成酶又可自由地重新运输质子,pmf 下降了,因而反压被除去而呼吸作用增加到状态 3 的速率。当有解联剂存在时,膜对质子的传导性显著增加,而这时的呼吸作用速率就相似于或甚至大于状态 3 的速率。

化学渗透学说认为,电子逆转传递的推动力是靠呼吸作用(需氧性的逆转),或靠 ATP 水解(厌氧性的逆转)而产生的跨膜 pmf。因此,在例如 [琥珀酸] [NAD<sup>+</sup>]/[延胡索酸] [NADH] 比值高的情况下,二个对偶之间的氧化-还原电位差大大低于 pmf。这样 pmf 就引起质子通过迴路 1 向内重新运输,同时 NAD<sup>+</sup> 被琥珀酸还原,直至氧化还原电位差与 pmf 相等为止。对于 NADP<sup>+</sup> 被 NADH 通过迴路 0(转氢酶)的需能还原的反应,被认为有相似的机理。

离子通过偶联膜的移动,被认为也是通过如化学学说所描述的机理进行的,只是质子最初的排出,是由运输质子的 ATP 酶或呼吸链的活动直接造成的,而不是由于 X ~ I 水解间接推动质子泵的作用。

### 5.3 构象学说

氧化磷酸化作用的构象(或机械化学的)学说最先是 Boyer 于 1964 年提出的。学说原先认为呼吸作用释放的能量,最初以构象变化的形式,被储存于偶联膜的某种蛋白质组份中,以后再形成一种非磷酸的共价化合物;可能是一种硫酸酯(X ~ I)。因此该学说只是化学学说的一种变种,仅是它把重点放在

原初贮能变化中的酶原蛋白作用上,而不是辅基而已。然而,随着化学学说的衰落,能量偶联的构象观点最近已抛弃了共价的非磷酸化的中间产物的概念,而现在则认为能量从呼吸作用转移到 ATP 的合成,仅通过蛋白质的构象变化。

已有极好的实验证据来证明,当某些结合蛋白的辅基的氧化-还原态改变时,其酶原蛋白部分会发生构象变化。例如,当血红蛋白与氧结合,形成氧血红蛋白时,铁原子从高自旋改变为低自旋的同时,向后位移  $0.8 \text{ \AA}$  进入卟啉环的平面。这种移动引起与血红素结合的多肽链中一个小的构象变化,然后这种变化再通过链间的相互作用,传递给邻接的多肽链。因此铁原子的微小移动使蛋白质的四级结构发生重大的变形,这种移动很容易地反映出有  $40 \text{ 千焦克分子}^{-1}$  的自由能变化。

构型学说的最近看法认为氧化还原诱导的这种类型的构型变化发生在呼吸链复合物 I、III 和 IV 之内,并依次在偶联部位 I、II 和 III 构成了原初能量储存过程。每一种复合物都适合起这样一种角色,因为即使它们中最小的复合物,也含有几种不同的辅基以及许多排得很紧密的蛋白质肽链,并且可以笼统地把它看作是单一的多亚单位蛋白质。有不少实验证据支持了这种看法,有不少利用象抗霉素 A 或 1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)一类的荧光探针,它们结合在偶联膜上,以荧光的增加或减少来反映构象或疏水性质的变化。如抗霉素 A 与偶联膜结合的动力学是如此地受细胞色素  $b_r$  的氧化-还原状态的影响,以致可以推测细胞色素  $b_r$  在供能和末供能条件下,可能具有不同的构象状态,这就能得出上述已描述的这种载体的  $E'_0$  的变化。对细胞色素  $a_3$  的构象变化也曾有过报道。

就算适合的呼吸链复合物能显示电子传递诱导的构象变化,那么必定还需要有一种使这些构象变化传递给 ATP 酶,然后再转化为 ATP 合成的机理。关于这一方面,  $F_1$  的复杂

多链(多亚单位组成)的性质,正强烈地引人注意。用金轮枝菌素作为在原位  $F_1$  的一种专一的荧光探针所得到的证据证明,当偶联膜被活化时, $F_1$  发生构象变化。另外,有极好的证据证明, $F_1$  在光合磷酸化作用中的对应物—— $CF_1$ ,在类囊体膜被光照射供能后,发生十分剧烈的构象变化。

Slater 根据这种证据,最近提出了构象学说(图 5.8)的一种工作模型。它包含了 5 个反应的序列,从呼吸链复合物加上在低能态的  $F_1$  开始,共同催化有赖于电子传递的 ATP 合成而结束。ATP 从与  $F_1$  结合的状态下释出(不是 ATP 本身的合成),可能是主要的需能过程; $F_1$  的需能的构象变化,可能降低其对 ATP 的亲合性。

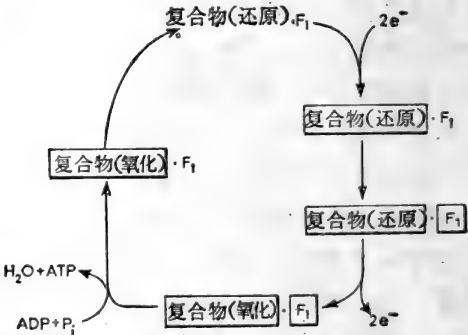


图 5.8 构象学说 (引自 Slater, 1972)  
有方框: 高能构象; 无方框: 低能构象。

构象学说受到 Green 及其同事的极力支持,他们的主要根据是线粒体横切面的电子显微图象。供能作用发生的同时,在嵴膜(构象变化的)中有很大的形态变化,这被解释为分子构型改变的总体表现。然而,因为有可透过的阴离子如醋酸离子或磷酸离子存在时,构象变化特别显著,因此构型变化很可能主要是由于 pH 或渗透不平衡的结果而引起的。而且,

除非在这些变化的时间(秒级),能够和呼吸过程中发生的变化事件的时间(微秒级)获得相符,否则构象变化直接反映能量贮存作用的构象变化机理的主张,仍然是极软弱的。

#### 5.4 化学学说、化学渗透学说还是构象学说?

氧化磷酸化作用的这三个主要学说,在实际作用中的相互比较,或者它们对呼吸链能量偶联的现象,提出令人信服的解释方面又怎样呢?

构象学说显然还处在相当初级的发展阶段。如果要使该学说成熟,它将无可推诿的要鉴定和精确定位那些发生在偶联膜的氧化-还原蛋白和偶联因子蛋白中的能量储存和能量传递的构象变化。这是一个实验上极为困难的问题。然而它确实给许多呼吸链组份(包括 ATP 酶复合物)的多亚单位的性质提供一个解释,并且恰当地解释了在某些  $F_1$  制剂中,有结合态的腺嘌呤核苷酸存在的现象。目前,不能认为该学说已很精确,而且是还没有得到证明的。

化学学说和化学渗透学说对原初能量储存过程的解释,有着两种明确区分的原理上的不同,即一种是形成  $X \sim I$  (通过  $A \sim I$  或  $BH \sim I$ ), 另一种是造成膜两侧的 pmf 的质子传输(图 5.9)。由于目前没有直接辨别这二者的可能性,因此不得不根据更推测性的证据来比较它们。

这二个学说有着许多常常可以互相补充的长处和短处。化学渗透学说要求有许多能量贮存作用的矢量因素,并且着重于偶联膜依靠它的组织机构的能力和物理结构在决定和控制它们所起的作用。因此,对为什么 ATP 酶和通过膜的一些氧化-还原载体的在膜上有不对称的分布,以及对为什么有多种多样电子载体和载氢体存在的问题,提供了令人信服理

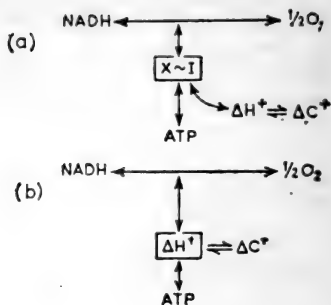


图 5.9 能量偶联的化学观点 (a) 和化学渗透观点 (b)

由。最重要的是它解释了高效率的能量贮存作用必须有完整的膜囊体的原因是因为膜的碎片或渗漏的囊体不能维持跨膜 pmf。化学理论则不同,它把偶联膜的作用主要看作是一种组织结构的作用,对其复杂程度的要求,比化学渗透学说的低得多,但是要维持  $X \sim I$  的稳定要比维持跨越阻挡层的电位差更需要有膜的疏水性质。

化学学说虽然由于最近从电位测量得到的支持  $A \sim I$ , 或  $BH_2 \sim I$  存在的证据而增强了说服力,但是化学渗透学说的倡导者反对这种解释,他们认为动物线粒体供能时发生的  $E_0'$  变化,正是反映了跨膜电位差,而辅基  $E_0'$  的变化也可能是由于脱辅基蛋白构象的变化而引起的。

化学渗透学说最引人注目的特点之一,是以极妙的方式解释了离子运输的本质,以及亲脂的弱酸之所以容易地影响解联的问题,而化学学说对这些现象转弯抹角地给予复杂的解释,它们主要是要靠  $X \sim I$  推动质子移动,或通过非特异的机理使水消散的能力来解释。

化学渗透学说的某些细节也不是无可挑剔的。例如,Williams 曾指出,最初的能量储存过程可能是在膜内的电荷分离,膜可以通过其多金属蛋白质(例如 Fe-S 蛋白,细胞色素

氧化酶), 而使它作为一个电容器起作用, 然后使能量作为膜两侧的电位差来储存。这在化学渗透学说中, 被看成是原初的过程。此外, 在状态 4 中, 观察到的 pmf 值比热力学分析所指出的要低, 这也是一个问题。对某些氧化-还原载体确切的定位和顺序也还有些困难, 并且所提出的 ATP 合成酶的机理也还没有得到证明。

然而, 人们不得不对这三个主要的学说作出以下的结论, 化学渗透学说对能量贮存作用, 提供了最令人信服的而且当然是最精确的解释。而且, 由于这个学说的基本概念最近已成功地应用于有距离关系的现象, 如营养的运输和细菌的运动。因此, 看来它对生物能量转换的几个领域, 似乎提供了引人注目的统一的观点。

#### 证据补注

为了试图合理解释对迴路 3(H-3) 鉴定不出载氢体的问题, Mitchell 最近提出了一个巧妙的机理, 在这机理中 Q 和 b-型细胞色素靠着它形成一质子推动的 Q 循环 (Mitchell, 1975, *FEBS Lett.*, **59**, 137—139)。这质子推动的 Q 循环催化  $4H^+$  向外运输时, 从 Fe-S (可能 N-2 或 S-3) 转移 2 个电子给细胞色素 c, 因此把迴路 2 和迴路 3 的前半部分合并成一个具有单个质子运输系统的呼吸链片段。

## 6. 细菌系统

细菌当然不含线粒体。它们的与氧化-还原相联系的能量贮存作用系统位于细胞的质膜上。革兰氏阳性细菌在等渗条件下，用溶菌酶很易溶去细胞壁，而放出完整的原生质体（即被对渗透压脆弱的质膜包围的细胞质）。溶菌酶在适宜条件下，也能用来分解革兰氏阴性细菌的细胞壁，所得到的原生质球，显示有双层膜结构，膜间有周质体的空间隔开。和线粒体的膜一样，外层膜对小分子的穿入几乎不存在或没有渗透障碍，而内层膜容纳氧化磷酸化系统，并且还有调节渗透的能力。在革兰氏阳性细菌中，这些作用是单层原生质膜担任的。

细菌的偶联膜性质与高等生物的偶联膜相似。例如，有结构上的侧面性的证据；ATP 酶与最初的脱氢酶被定位于内表面，而细胞色素 c（当存在时）则被定位于外表面。而且，除了通过交换扩散系统外，偶联膜不能透过质子和其他离子。然而，细菌的偶联膜与线粒体不同，它不含有腺嘌呤或烟酰胺核苷酸的运输系统，并且细菌的 ATP 酶对寡霉素不敏感。

细菌的呼吸系统与酵母类似，但不同于高等生物，它具有易受遗传型或表现型处理的敏感性，因而是很有实验价值的材料。前者已为 Gibson 及其同事们应用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 取得了一些成功，如利用缺陷 ATP 酶或一个或一个以上的呼吸载体（例如细胞色素或泛醌）的突变种，大大地有助于阐明这些组份在细胞能量贮存作用中的作用。例如，兼性厌氧微生物的缺陷泛醌的 (ubi-) 突变种，在厌氧条件下，能够利



用需氧条件时不能发酵利用的碳源进行发酵。因此可以得出结论,泛醌是呼吸系统的必需组份。可能分别在  $F_1$  和  $F_0$  有损害的 *UncA* 和 *UncB* 二种突变种,都仅在可产生底物水平磷酸化的碳源上需氧性地生长。这个水平磷酸化产生的 ATP,被用于生物合成,而呼吸作用产生的供能状态,显然是用于推动膜结合的、需能的反应。

缺乏铁-硫蛋白或硝酸还原酶(在缺铁,硫酸盐或钼条件下生长以后)表现型的产生,也证明是十分有用的。因此,在动植物线粒体或植物叶绿体中,通常不具有能量转换系统方面,细菌显然提供了新的机会。而且,仅就它们所具有的利用无机物作为电子供体或受体方面来看,它们也提供了新的呼吸系统。

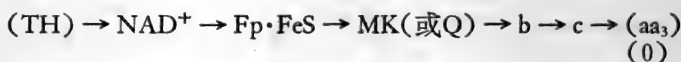
## 6.1 呼吸作用

细菌呼吸系统含有与高等生物相同的氧化-还原组份基本类型,即 NADH 的氧化作用也是通过铁-硫黄素蛋白、醌、细胞色素和细胞色素氧化酶进行的。差异仅在较细节的水平上才变得明显。这些差别主要是一种氧化-还原载体为另一种所代替(它们可能有,也可能没有相同的性质),或系统中缺陷一个或更多的氧化-还原载体所造成的。

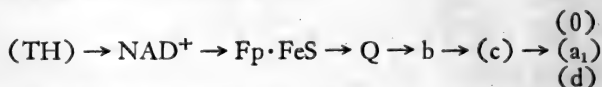
在许多细菌中,存在有以甲基萘醌代替泛醌的情况,这就是以相似组份替代的一个好的例子;二者都是亲脂性的聚异戊二烯类的醌,其作用是从最初的脱氢酶转移还原当量(2H)给末端的细胞色素系统。同样,细胞色素氧化酶  $aa_3$  常被以下一些组份所取代,如细胞色素氧化酶  $a_1$ (与  $aa_3$  密切相关)、 $o$ (能自动氧化的 b-型细胞色素)或  $d$ (原来叫  $a_2$ ;它的血红素是一个取代的二氢卟吩),或者被这些氧化酶的不同组合所

取代。细菌呼吸链中存在不同类型载体替代的例子,可以用进行厌氧呼吸时,细胞色素氧化酶可被好几种还原酶替代的现象(例如硝酸还原酶和亚硝酸还原酶)来代表。氧化-还原组份的被去除而造成缺陷的,主要应用于转氢酶或细胞色素c。

根据氧化-还原载体的组成,对环境变化的反应和对真核生物呼吸的经典抑制剂的普遍敏感性等的不同,细菌呼吸链可大致地分为二类:一类是与高等生物的线粒体系统相似(至少表面上是这样);另一类就是细菌所特有的。产碱杆菌(*Alcaligenes entrophus*)、副球菌(*Paracoccus denitrificans*)等的呼吸系统属于第一种范围,因此支持了这样一种假说,即认为线粒体可能是由于这种生物与原始寄主细胞间的共生关系进化而来的。它们的呼吸链基本上按下列基本式子而变化的数目有限的类型。



这里的括号是指可能发生缺陷或取代的组份。大多数革兰氏阴性异养生物[例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿色极毛杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)]都属于第二类,在这里我们看到主要是细胞色素氧化酶的替代。这些生物的呼吸链在下列基本列式上显示几乎无穷的变化。



细菌呼吸链组成中的这种差异,不仅发生在不同的种之间,而且也(偶然地)发生在不同生长条件下的同一个种内,特别是当这种不同生长条件是指末端电子受体可利用性的改变,或甚至是同一性的改变。例如,细菌对于低氧分压的典型反应,是增加细胞色素氧化酶的浓度(或许也增加不同氧化酶的种类),因此可使细胞能尽可能有效地利用有限的氧化剂供应。

量。末端氧化酶和还原酶的多样性是许多兼性微生物的特征，也是它们在可能改变的环境中，具有有效竞争能力的直接反映。当完全地去除氧气，而且又没有另一种替代的电子受体时，它们使呼吸链组份合成更少，并且在可能的情况下，转变为发酵生长的方式，在这种方式中，它们只靠底物水平磷酸化来转化能量。

## 6.2 氧化磷酸化作用

在完整细菌中，测量氧化磷酸化作用，比线粒体要难得多，这是因为细菌膜缺乏腺嘌呤核苷酸移位酶，因此使它的ATP酶（合成酶）得不到外源的ADP。给厌氧条件下的细菌馈以脉冲量的氧气，再检测内源ADP的酯化量，来测定它的P/O值的尝试，仅取得有限的成功。而且，把细菌制备成与超声波破碎线粒体，而得到的亚线粒体颗粒（ $F_1$ 在外侧）相似的亚细胞小泡的工作，至今未找到完善的分离条件，因而使所得膜制剂的P/O值很低。

因此，我们对细菌中的氧化磷酸化效率的知识，主要来自整个细胞 $\rightarrow H^+/O$ 比值和克分子生长量的间接测量。通过内源底物呼吸相联结的质子移位，其 $\rightarrow H^+/O$ 比值，根据所考察的物种不同，而在4与8之间。迴路1和2似乎是普遍存在的，而迴路0和3分别根据转氢酶和细胞色素c来断定。已间接证明ATP水解时，有质子向外位移，但由于细胞中没有腺嘌呤核苷酸移位酶存在，使 $\rightarrow H^+/ATP$ 比值的精确测定受到阻碍。然而，如果假设比值为2，那么细菌根据它们的呼吸链组成，似乎至少含有2个（可能多达4个）能量偶联部位。

克分子生长产量（克细胞克分子碳源 $^{-1}$ ）的测量，来自1960年代Elsden的工作，他证明细菌在厌氧生长时，它的产

量正比于底物水平磷酸化(克分子 ATP · 克分子碳源<sup>-1</sup>)的效率。底物水平磷酸化的效率可以从发酵方式而得到,因此,可以从 ATP 的利用率来计算细胞产量 ( $Y_{ATP}$ ; 克细胞, 克分子 ATP<sup>-1</sup>), 结果发现这样计算的产量在很多细菌中是相对恒定的。然而, 在这样的研究中, 不容许有用于维持用途的能量消耗(即用于除了生长以外的功能)。当有些细菌以后又在连续培养(不是分批培养)中生长时, 那么必须校正其维持所消耗的能量, 得到  $Y_{ATP}$  值为 12—14 克细胞 · 克分子 ATP<sup>-1</sup>。这一值现在可用于从有氧生长产量来计算 P/O 比值, 因为

$$Y_{O_2}^* = Y_{ATP}^* \cdot N$$

这里  $Y_{O_2}^*$  就是以分子氧为基础的有氧生长产量(克细胞 · 克分子  $O_2$ <sup>-1</sup>),  $N$  是 ATP 合成的总效率(即氧化磷酸化得到的加上底物水平磷酸化所得到的份额; 克分子 ATP · 克分子  $O_2$ <sup>-1</sup>)。如果对底物水平磷酸化和对单单为维持之需的耗氧量作了校正, 那么就能得到生长的 P/O 比值。这一类实验所得的结果表明, 在  $\rightarrow H^+/O$  比值为 4(迴路 1 和 2) 和 6(迴路 1、2 和 3) 的细菌中, P/O 比值大约依次为 2 和 3, 这样, 间接地证明了  $\rightarrow H^+/ATP$  比值为 2。因此, 合成细胞色素 c 的能力(即是能用适合的细胞色素氧化酶去组成迴路 3 的电子运载支路), 特别是对于在营养物质较少环境中生长的细菌, 有着巨大的生理上的好处。

已知有许多细菌的通常的直线型的氧化磷酸化系统在细胞色素 b 或 c 处分叉。主要的实例就是专性需氧的棕色固氮细菌 (*Azotobacter vinelandii*), 它有二个磷酸化效率不同的分支, 并且能被细菌有区别地应用来作为一种保护它的固氮机构, 免受分子氧毒害影响的一部分机理。

### 6.3 供能态的利用

关于细菌系统中供能态的性质和利用的大多数研究工作,已经转向化学渗透学说,因为整体细菌特别适合于这种类型的实验。

已测定过细菌的跨膜 pmf, 它大约有 180 毫伏(内侧负电),其中 120 毫伏是膜电位,其余的电位是由大约 1 个 pH 单位差值(外侧酸性)所造成。在需氧性细菌中(或利用除氧以外的其他氧化剂,如在利用硝酸盐的兼性厌氧细菌中),这电位是由与呼吸相连的质子移位所造成的,而在严格的厌氧细菌中,则是由于来自底物水平磷酸化的 ATP 水解的结果。正如高等生物中那样,这个 pmf 以后又可用来推动各种与结合在膜上的需能过程,例如转氢酶( $\text{NADH} \rightarrow \text{NADP}^+$ ), 电子传递的逆转(特别是在化能自养细菌中)以及代谢物或离子的运输等。

Kaback 已证明了营养物的吸收,是需能的过程,因为营养物在外界介质中,一般以低浓度存在的,因此在积累时,必须克服一个浓度梯度差。Mitchell 和 West (大肠杆菌 *E. coli*)、Harold (粪链球菌 *Streptococcus faecalis*) 和 Hamilton (金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*) 曾指出,氨基酸和某些糖的吸收似乎是 pmf 的 pH 组份和膜电位组份共同或单独 pH 组份推动的。在中性 pH 时,  $\beta$ -半乳糖苷(和几种其他的糖)和中性氨基酸的进入,是有一个质子( $\text{X} \cdot \text{H}^+$ )伴随着,因此是对 pmf 总值起响应而移动的。碱性氨基酸的移动,也是带电的,但是这些氨基酸是以阳离子( $\text{X}^+$ )状态,对膜电位起响应而运转的。反之,酸性氨基酸是与质子( $\text{X}^- \cdot \text{H}^+$ )结合,并且是对 pH 梯度起响应,而电中性地进入的。要注意的是,因为占

优势的 pmf 有排除阳离子的倾向,进入的物质都是呈中性状态 ( $X \cdot H^+$ ) 或正电荷状态 ( $X \cdot H^+$  或  $X^+$ ),即使游离的物质为阴离子时,也要转成中性或阳离子进入。对二羧酸或三羧酸吸收机理还了解很少,但可能这些酸也是以中性或阳离子状态被运转的,例如以琥珀酸 $^{2-} \cdot 2H^+$  状态。

细菌是游离生活的生物,因此在对付潜在的危害和不断变化着的环境时,存在有如何才能保持内部离子组成恒定的问题。由于恒定态的 pmf 对于那些仅略微能透过细菌膜的各种阳离子的积累明显有利,因此必定要有把不需要的阳离子种类(例如  $Na^+$ ) 排斥出去的机理。已在好几种物种中,发现有十分活跃的  $Na^+ - H^+$  反向转移系统,这种系统利用预先移出的质子,在重新进入时排出  $Na^+$ 。另外也有  $K^+ - H^+$  反向转移系统的存在,但活跃程度要低得多,因为细菌也象高等的细胞一样,需要有比较高的内部  $K^+$  浓度,来维持蛋白质合成和糖酵解。因此看来营养物和离子通过细菌膜的移动,是受交换扩散或单向转移系统所控制的,正如化学渗透学说所预示的那样(图 6.1),单向转移系统是对 pmf 二个组份中的一个组份或二个组份同时起响应而发生作用的。

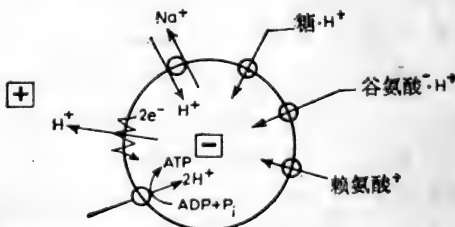
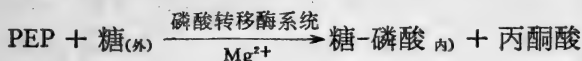


图 6.1 细菌中 pmf 的产生和利用 (引自 Henderson, 1974)

然而,兼性和专性的厌氧性微生物在吸收葡萄糖和某些其他糖类时则不同,它是通过磷酸转移酶系统来进行的。这

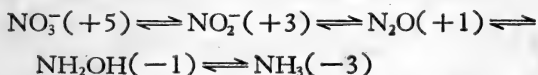
里所进行的机理可能是通过结合在膜上的磷酸化的蛋白的基团移位反应之一，磷酸化的蛋白是从烯醇式磷酸丙酮酸(PEP)转移磷酰基而形成的。总结起来如下：



该系统是 Roseman 在 1964 年发现的，它与高等细胞的己糖激酶系统并不类同，在高等细胞中，糖的运输是以游离状态进行的，然后以糖磷酸酯形式进入细胞。在 Roseman 系统中，磷酸解作用是在膜中发生的，并且是运输过程的主要步骤。

#### 6.4 无机的电子供体和受体的利用

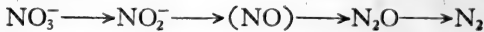
利用无机的电子供体和受体，作为呼吸底物的能力是细菌所特有的一种性质。能够被细菌利用的主要化合物，是氮和硫的氧化物，因为这些化合物有很大范围的化合价变化，并且很容易通过简单的成对电子转移而互变，例如



因此， $\text{NH}_3$  (或  $\text{NH}_2\text{OH}$ ) 和  $\text{NO}_2^-$  可作为在某些化能矿质营养(硝化作用)中有氧呼吸的电子供体，而  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  和  $\text{N}_2\text{O}$  在某些异养细菌(反硝化作用)中，则可作为厌氧呼吸时的电子受体。在反硝化作用的最后阶段中， $\text{N}_2\text{O}$  被还原为  $\text{N}_2$ ， $\text{N}_2$  再在固氮作用中还还原为  $\text{NH}_3$ 。因此，自然界氮循环的主要部份是与细菌的呼吸相联系而进行的。在硫循环中，硫的氧化物通过相似的与电子传递连结的过程，而发生同样的价键变化，但这些问题已不是本书的范围。

## 6.4.1 无机的呼吸作用

仅有少数几种兼性和专性的反硝化细菌具有利用氮的氧化物,作为呼吸作用的末端电子受体来进行厌氧生长的能力,前者(例如大肠杆菌 *Escherichia coli*) 仅把  $\text{NO}_3^-$  催化还原到  $\text{NO}_2^-$ (异养的硝酸还原作用或硝酸呼吸作用),并积累在它生长的介质中;后者(例如反消化副球菌 *Paracoccus denitrificans*, 铜绿色极毛杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*) 则催化  $\text{NO}_3^-$  彻底还原为气体的氮



其中  $\text{NO} (+2)$  似乎是作为  $\text{NO}_2^- (+3)$  和  $\text{N}_2\text{O} (+1)$  之间的一种短暂的,单电子反应的中间产物而出现的。

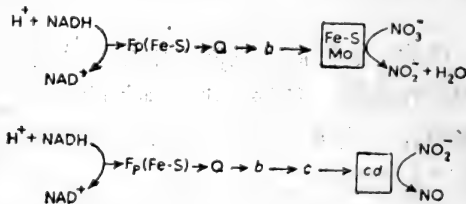


图 6.2 利用硝酸盐和亚硝酸盐的呼吸作用

对这一反应序列的最后二步了解得很少。但是,由于  $\text{N}_2\text{O}/\text{NO}$  对偶和  $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$  对偶的  $E'_0$  值,比  $\text{H}_2\text{O}/\frac{1}{2}\text{O}_2$  对偶的  $E'_0$  值要高得多,因此,把这两对偶呼吸成  $\text{NO}$  和  $\text{N}_2\text{O}$  应得到更高的  $\text{P}/2e$  比值;然而  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}/\text{NO}_2^-$  对偶的  $E'_0$  值(分别为  $+420$  和  $58$  毫伏)则要比  $\text{H}_2\text{O}/\frac{1}{2}\text{O}_2$  对偶的低得多,因此它们的氧化磷酸化反应的效率比进行有氧呼吸时要低。用这些电子受体进行呼吸时测得的  $\text{P}/2e$  比,  $\rightarrow \text{H}^+/2e$  比以及克分子生长量数据证明,在利用硝酸盐的呼吸中不存在部位 III 的能量储存,在利用亚硝酸盐的呼吸过程中可能也是这样



(图 6.2)。

硝酸还原酶和亚硝酸还原酶都已从呼吸膜溶下后提纯了。硝酸还原酶是一种高分子量的铁硫蛋白复合物，还含有少量的有功能的钼。亚硝酸还原酶是一种“双头的”cd 细胞色素，其中血红素 d 与亚硝酸反应迅速而与分子氧反应缓慢。因此，根据它们对底物氧化反应的性质可以推定这二种还原酶都是含金属的，而不是非金属的氧化还原酶。

#### 6.4.2 化能矿质营养细菌(化能合成作用)

阐明化能矿质营养细菌呼吸系统的氧化，它们的氧化程度较低的底物的机理是细菌力能学中最有趣也是最困难的问题之一。目前这些反应的图解是极其混乱的，并且仍然仅能得到这些反应的一个空洞的轮廓。

亚硝化毛杆菌 (*Nitrosomonas*) 氧化  $\text{NH}_3$ ，是先把它羟基化成为羟胺 ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) 开始的。羟胺可能是它的氧化磷酸化系统的真正的底物。以后，羟胺又被分子氧氧化为亚硝酸的反应，是一个由呼吸链的细胞色素成员媒介的 4-电子传递的反应 ( $2 \times 2e^-$ ) (图 6.3)。

这种反应可能通过先形成高度不稳定的中间产物，硝酰

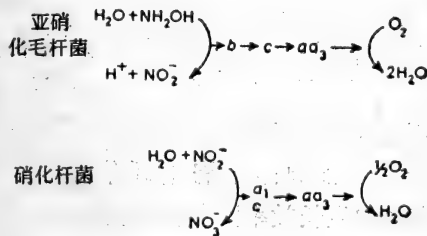


图 6.3 羟胺及亚硝酸的氧化作用

基 ( $\text{NO}_2^-$ ; +1),再紧接着发生还原反应而进行的。因为  $\text{NH}_2\text{OH}/\text{NO}_2^-$  对偶的  $E'_0$  值为 +66mv, 所以可能只在部位 II 和 III 处有 ATP 合成。

在硝化细菌中 (*Nitrobacter*), 亚硝酸氧化成为硝酸是一个放能更少的反应;  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  对偶的  $E'_0$  值是 +420 毫伏, 仅在部位 III 处合成 ATP。由于在  $\text{NO}_2^-$  起始氧化时, 它的能量要被细胞色素系统耗用掉, 因而净产额可能还要低些。

这二种细菌都是专性自养细菌, 因此要依靠消耗 NADH 来还原二氧化碳。由于  $\text{NADH} + \text{H}^+/\text{NAD}^+$  对偶的  $E'_0$  值, 比这两种氮化合物对偶的一种都低得多, 因此  $\text{NAD}^+$  的还原必须依靠耗能的电子逆向传递来进行的(图 6.4), 即电子从核黄素和醌组分即经过部位 I ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) 或部位 I 和 II ( $\text{NO}_2^-$ ) 的传递。

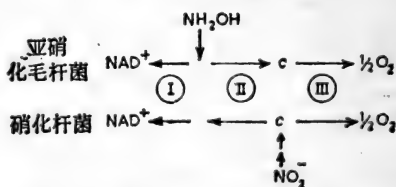


图 6.4 化能矿质营养细菌的逆向电子传递

在硫杆菌 (*Thiobacillus*) 和亚铁杆菌 (*Ferrobacillus*) 中, 分别存在着以消耗氧化程度较低的硫或铁化合物, 作为能源来还原  $\text{NAD}^+$  的另一种相似类型。而氢极毛杆菌 (*Hydrogenomonas*) 则不同, 因为  $\text{H}_2/2\text{H}^+$  对偶的  $E'_0$  有 -420 毫伏, 所以它利用氢气作为能源再无需消耗能量很容易地还原  $\text{NAD}^+$ 。这种生物的生长效率比其他任何自养生物要高得多, 也反映出这一点。

## 6.5 紫色膜的能量贮存

盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium*) 是一种专性的需氧性异养细菌。由于它要通过氧化磷酸化作用获得能量,因而偶联膜上含有非常完整的呼吸载体,以及可逆的ATP酶。与其他细菌一样,它的呼吸作用也是与向外方向的质子移位相联结的。

然而,当这种有机体在有光照条件的低氧浓度下生长时,它还合成一种紫色蛋白(细菌视紫红质),这种紫色蛋白在细胞质膜上以分开的小块出现。这种色素与动物的起视觉功能的视紫质相似。有这种色素存在的区域被称为紫色膜,它不含有叶绿素或任何其他通常的光合色素。

Stoeckenius 及其同事的卓越的工作已证明,紫色膜可起一种光耦合器的作用(即吸收的光能可用于推动需能的反应)。因此,用光照射完整细胞时会引起质子排出和 ATP 合成。细胞中残留的呼吸系统肯定没有在这反应中起作用,因为用纯化的磷脂和紫色膜(加上线粒体  $F_1$  和 OSCP) 制备成的小泡,也有催化需光的质子移位和 ATP 合成的能力。小泡膜的正反面与完整的细胞相反 ( $F_1$  在外侧),因此质子是向内移位的。

当用光照射离体的细菌视紫质时,发生可反复进行的褪色反应,与此同时伴有质子的先释放而后再吸收的变化。因此很可能色素分子在活体细胞的紫色膜上,是这样定向排列,以至使光诱导的,可逆的去质子反应成为一个矢量的过程,即在完整细胞中,质子是向外运输,而在重组成的小泡中,质子是向内运输的(图 6.5)。这样形成的质子梯度可再通过运输质子的、可逆的 ATP 酶(合成酶)来推动 ATP 的合成。盐生

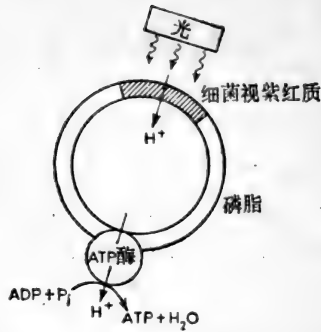


图 6.5 重组成的盐生盐杆菌 (*H. halobium*) 小泡中 ATP 合成的图解

盐杆菌 (*H. halobium*) 的紫色膜显然是迄今研究过的最简单的能量贮存系统，因为单独一种分子(细菌视紫红质)就能明显地作为一种有效的跨膜质子泵。因而它代替了光合链和呼吸链能量贮存作用所需的更复杂的氧化-还原回路。更重要的是，这种极简单的 ATP 合成系统为化学渗透机理，提供了令人信服的实验证据。

## 7. 后 记

可以这样来说,在过去的二十多年期间,生物能量转换的研究的大多数工作,都被引向氧化磷酸化反应和光合磷酸化反应。但是不应认为 these 问题是孤立地被研究着的。实际上,我们现在对于能量贮存的想法,所根据的许多概念常常来自那些关系很远或看起来是无甚关系的现象。例如,胃粘膜的泌酸 (oxyntic) 细胞排出质子和动物及植物细胞排出  $\text{Na}^+$  离子的这些现象,对化学渗透学说的发展起着中心的作用,它们都强烈显示膜的侧面性和矢量的代谢。同样,构象学说起初是从这样的概念来的,即肌肉收缩时所发生的 ATP 诱导蛋白质的构象变化,在氧化磷酸化或光合磷酸化反应时,可能反方向地起作用,即氧化-还原诱导的构象变化能推动 ATP 的合成。

所有这些过程都至少有一部分要依赖结合在膜上的能搬运阳离子的  $\text{Mg}^{2+}$ -(或  $\text{Ca}^{2+}$ -)ATP 酶。因此,酸的分泌和  $\text{Na}^+$  的排出,都是直接或间接地由于  $[\text{Na}^+ + \text{K}^+]$  活化的  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶(钠泵)矢量性的活动的结果。在红血球膜中,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶以 3:2 的比例,催化交换内部的  $\text{Na}^+$  和外界的  $\text{K}^+$ , 因此是靠着以 ATP 水解为代价,来维持细胞内的  $[\text{K}^+]$  高于  $[\text{Na}^+]$ 。这种反应的机理与呼吸链中的 ATP 酶不同,它明显需要一个  $\text{Na}^+$  结合的磷蛋白中间产物形成,这个中间产物然后再通过一个与  $\text{K}^+$  结合而水解的反应。这个钠泵受强心苷(乌本箭毒苷)的抑制。

这种被  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATP 酶维持的外界的高  $\text{Na}^+$  浓度以后,再被用来推动各种组织(例如胃,小肠)的上皮细胞对葡萄糖

(通过葡萄糖·Na<sup>+</sup>同向传输, symport)和氨基酸(通过X<sup>-</sup>·Na<sup>+</sup>或X·Na<sup>+</sup>同向传输)的主动吸收。因此从它与营养物运输的关系来说, 细胞膜的钠泵在功能上相似于能量偶联膜的质子泵(运输质子的ATP酶)。

肌肉的肌质内质网(sarcoplasmic reticulum)中有Ca<sup>2+</sup>激活的Mg<sup>2+</sup>-ATP酶(钙泵)存在, 在肌肉收缩后, 它可从肌原纤维的附近移去Ca<sup>2+</sup>离子。这种Ca<sup>2+</sup>的排除, 是收缩周期中的一个非常重要的过程, 因而这种被ATP-推动的泵的性质, 已是仔细研究的课题。这个课题最近由于利用了原先在重组成线粒体呼吸膜小泡中所使用的技术, 使用已知的脂肪组分加上纯化的ATP酶, 获得泵的重组成而达到顶点。最近正在进行与之相类似的钠泵重组成的工作。

在红色肌肉中, Ca<sup>2+</sup>的排除, 显然靠周围线粒体作用的帮助, 这些线粒体在供能条件下, 迅速积累Ca<sup>2+</sup>(这个反应显然优先于ATP的合成)。这个原来仅当作一个线粒体力能学上有兴趣的旁支反应, 因此而成为具有重大生理意义的过程。

最近能量贮存的研究工作出现的最重要的概念之一, 是非磷酸化的供能态概念。许多看法认为它就是横跨膜的pmf同义语的, 非磷酸化供能态可用于各种耗能的膜过程, 如逆向的电子传递或营养物的转运。实际上, 现在对于化能合成细菌, 细菌的转运系统和动植物组织中离子移动的控制的许多有趣观念, 都直接来自线粒体和叶绿体中供能态的发现。

最近的实验显示, 细菌的运动也可归于供能态现象的范畴。运动的细胞对那些能干扰跨膜pmf的药物反应, 是和这种观念符合的, 即它的推动力就是一种呼吸形成的或ATP所形成的膜电位(内侧负电)。细菌运动的确切的机理还很不清楚。有一种可能性是运动就是一种自身的电泳过程, 在这个过程中, 营养鞭毛作为一个巨大的离子孔, 外界阳离子沿着带

阳电荷鞭毛的表面,并通过位于鞭毛顶端的特殊单孔,重新进入有机体(图 7.1)。这样引起水流到后面,因此靠着“流体动力学的喷射推进”,使有机体向前推进。另一可能是离子可以在鞭毛基部重新进入,使基部环状结构的一个发生旋转,因此使

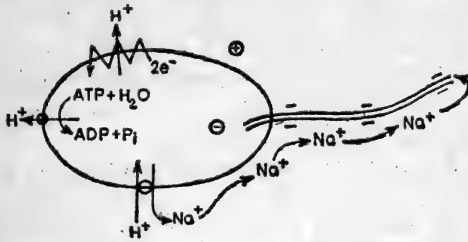


图 7.1 细菌的运动 (引自 Mitchell, 1972)

得鞭毛本身象船的螺旋桨一样旋转。

运动对于许多细菌有着很大的生理上的好处,因为它使细菌显示出趋药性(即向较高浓度的营养物移动)。趋药性的试剂(例如半乳糖)似乎初始是通过周质蛋白与细胞结合,从而将信息传递给鞭毛。这种触发供能态利用的信息的本质还不清楚,这对当代的膜和行为生物学研究提出了一个挑战性的问题。

现在我们对于如此各种各样电子传递现象,如氧合作用(这是内禀性的许多解毒机理和利用烃类化合物作为细菌营养物的反应所固有的),对细菌的发光或固氮机理的了解,也有许多是得自呼吸链的概念及有关的技术。同样,对于视觉和趋光性的化学机理的研究,也大量地依靠植物或细菌光合作用研究中所得到的技术和概念。

因此,在生物系统的各种能量贮存和能量利用过程中,经常可看到机理上、局部解剖学上和定向性上相类似的性质,这一点将愈来愈变得明确。至少在生物学的这个领域中,生命现象仍然有着一定的表观上的统一性。

## 建议进一步阅读的书刊

### 1. 一般教科书

Lehninger, A. L. (1970), *Biochemistry*. Worth Publishers.

Morris, J. G. (1968), *A Biologist's Physical Chemistry*. Edward Arnold.

### 2. 专门读物

Gregory, R. P. F. (1974), *Biochemistry of photosynthesis*. Wiley-Interscience.

Hall, D. O. and Rao, K. K. (1974), *Photosynthesis* (Institute of Biology's *Studies in Biology* series, No.37). Edward Arnold.

Whittingham, C. P. (1974), *The mechanism of Photosynthesis*. Edward Arnold.

Wainio, W. W. (1970), *The mammalian mitochondrial respiratory chain*. Academic Press.

A comprehensive analysis of mitochondrial energy conservation, now a little dated.

Keilin, D. (1966), *The history of cell respiration and cytochrome*. Cambridge University Press.

Barrett, J. and Lemberg, R. (1973), *Cytochromes*. Academic Press.

### 3. 参考文献

#### 第1章

Lipmann, F. (1941), *Adv. Enzymol.*, **1**, 99—162. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy.

Krebs, H. A. and Kornberg, H. L. (1957), *Energy transformations in living matter*. Springer-Verlag.

Broda, E. (1970), *Progress in Biophysics*, **21**, 145—208. The evolution of bioenergetic processes.

#### 第2章

Orme-Johnson, W. H. (1973), Iron-sulphur proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 159—204. Singer, T. P., Kearney, E. B. and Kenny, W. C. (1973), *Adv. Enzymol.*, **37**, 189—272. Succinate dehydrogenase.

Baltscheffsky, H. and Baltscheffsky, M. (1974), Electron transport phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 871—897.



- Keilin, D. (1925), *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, **98**, 312—339. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants.
- Williams, R. J. P. (1973), *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 1—27. Electron transfer and oxidative energy.
- Kroger, A. and Klingenberg, M. (1967), *Curr. Top. Bioenergetics*, **2**, 152—190. On the role of ubiquinone.

### 第 3 章

- Slater, E. C. (1972), in *Mitochondria: Biogenesis and Bioenergetics*. North Holland, pp. 133—146. Mechanism of energy conservation.
- Racker, E. (1970), *Essays in Biochemistry*, **6**, 1—22. The two faces of the inner mitochondrial membrane.
- Beechey, R. B. (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 466—471. Structural aspects of mitochondrial ATPase.
- Chappell, J. B. (1968), *Brit. Med. Bull.* **24**, 150—157. Systems used for the transport of substrates into mitochondria.
- Lehninger, A. L. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **71**, 1520—1524. Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria.
- Henderson, P. J. F. (1971), *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 393—428. Ion transport by energy-conserving membranes.

### 第 4 章

- Chance, B. and Williams, G. R. (1956), *Adv. Enzymol.*, **17**, 65—134. The respiratory chain and oxidative phosphorylation.

### 第 5 章

- Slater, E. C. (1953), *Nature*, **172**, 975—978. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain.
- Dutton, P. L. and Wilson, D. F. (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 165—212. Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bionergetics.
- Mitchell, P. (1966), *Biol. Revs.*, **41**, 445—502. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
- Mitchell, P. and Moyle, J. (1974), *Biochem. Soc. Special Pub.*, **4**, 91—111. The mechanism of proton translocation in reversible proton-translocating adenosine triphosphatases.
- Greville, G. D. (1969), *Curr. Top. Bioenergetics*, **3**, 1—78. A scrutiny of Mitchell's chemiosmotic hypothesis of respiratory and photosynthetic phosphorylation.
- Skulachev, V. P. (1971), *Curr. Top. Bioenergetics*, **4**, 127—190. Energy

transformations in the respiratory chain.

Slater, E. C. (1974), *Biochim. Biophys. Acta Library*, **13**, 1—20. Electron transfer and energy conservation.

### 第6章

White, D. C. and Sinclair, P. R. (1971), *Adv. Microbial Physiol.*, **5**, 173—211. Branched electron transfer systems in bacteria.

Cox, G. B. and Gibson, F. (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 1—25. Studies on electron transport and energy-linked reactions using mutants of *E. coli*.

Harold, F. M. (1972), *Bact. Revs.*, **36**, 172—230. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes.

Stouthamer, A. H. and Bettenhausen, C. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 53—70. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms.

Boos, W. (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 123—146. Bacterial transport.

Payne, W. J. (1973), *Bact. Revs.*, **37**, 409—452. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms.

Racker, E. and Stoerkenius, W. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 662—663. Reconstitution of purple membrane vesicles catalysing light driven proton uptake and ATP formation.

### 第7章

Mitchell, P. (1972), *FEBS letters*, **28**, 1—4. Self-electrophoretic locomotion in microorganisms: bacterial flagella as plant ionophores.

Adler, J. (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 341—356. Chemotaxis in bacteria.

收到期	1980. 9. 13
来源	马英群
书价	0.55
单据号	0139266
开票日期	1980. 9. 12

北京植物所



22473

58.17111

598

生物的能量贮存. 1980年

借者	借期	借者	借期
沈学良	80.12.24		
沈学良	86.12.17		
	87.1.19		

58.17111

598

22473

统一书号：13031·1336

定 价： 0.55 元

本社书号：1855·13-10

科技新书目：164-22