

叶绿体 H⁺-ATP 酶在平板脂双层上 重组及其质子传导的研究

卫瑾 何向东

马学海 施玉梁

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032) (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 从菠菜 (*Spinacia oleracea* Mill.) 叶中分离获得 H⁺-ATP 酶 (CF₀-CF₁) 复合体。将 CF₀-CF₁ 重组于平板脂双层上, 在电压钳位下, 研究 CF₀~CF₁ 的质子传导性能, 观察到: (1) 当 CF₀-CF₁ 重组于平板脂双层上后, 平板膜电阻由 10~20 GΩ 立即下降到 1 GΩ 左右。(2) 溶液中蛋白质 (CF₀-CF₁) 浓度在 2 mg/L 下可记录到单通道电流的涨落, 单位电导约在 5~10 pS。(3) 通道电流随膜两侧 ΔpH 变化而改变, 在 ΔpH 为 2~4 时, 膜电流随 ΔpH 增加而增大, 在 ΔpH 为 4.5 时膜电流呈现回落。(4) 质子传导抑制剂 Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) 显示出迅速地且不可逆地阻断通道电流。(5) 无金属离子的溶液中, 跨膜 (BLM) 的 ΔpH 为 3 时, 在 0~+150 mV 钳位下, 镁离子比钙离子所引起的 CF₀-CF₁ 的通道电流要大得多。以上结果不仅表明 CF₀-CF₁ 已成功地组装于人工膜上, 而且也显示出镁离子直接参与了质子传导过程。

关键词 H⁺-ATP 酶复合体, 质子传导, 电位钳, 平板脂双层

PROTON-CONDUCTIVITY OF CF₀-CF₁ RECONSTRUCTED INTO PLANAR LIPID BILAYER

Wei Jin and He Xiang-dong

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Ma Xue-hai and Shi Yu-liang

(Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract The proton conductable ATP synthase (CF₀-CF₁) is the key enzyme of energy conversion in the membrane of bacteria, mitochondria and chloroplast. In spite of a large body of studies, the structure and molecular mechanism of ATP synthases are still elusive. In order to learn the mechanism of ATP synthases, the authors used voltage-clamp technique to study the effect of different conditions on the proton conductance of F₀-F₁ into planar lipid bilayer membrane. The results obtained were as follows: (1) When CF₀-CF₁ was reconstructed into planar lipid bilayer membrane, the resistance decreased by 10 times. (2) Channel-like current was recorded at the low concentration of CF₀-CF₁ (protein 2 mg/L) in the solution. (3) In metal ion-free solution, the channel currents changed with the trans-membrane proton gradient (ΔpH). Under holding potential from 0 to +150 mV, the stimulation of ΔpH on channel current increased with a rise in the ΔpH from 2 to 4, the stimulation of 4.5 ΔpH on channel current was weaker than that of ΔpH 4.0. (4) The proton conductance inhibitor, dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), showed a rapid and irreversible inhibition effect on the channel current. (5) In metal ion-free solution (10 mmol/L Tris-HCl), when the ΔpH across the black lipid membrane (BLM) maintained at 3.0, the addition of Mg²⁺ caused a larger

channel current of CF_0 - CF_1 than the addition of Ca^{2+} , with holding potential from 0 to +150 mV. The results indicated that reconstruction of CF_0 - CF_1 was successful and Mg^{2+} was directly involved in the proton conductance pathways.

Key words H^+ -ATPase complex, Proton conduction, Voltage-clamp, Planar lipid bilayer

叶绿体类囊体膜上的 H^+ -ATP 酶(CF_0 - CF_1)复合体由起催化和调节作用的 CF_1 和起质子通道作用的 CF_0 组成。光合电子传递偶联产生的质子电化学势差 $\Delta\mu H^+$ (包括质子浓度差 ΔpH 和电位差 $\Delta\psi$), 在经 CF_0 向膜外传导质子的同时可被 H^+ -ATP 酶复合体用于 ATP 的形成, 而膜上 ATP 酶在水解 ATP 的同时也可向膜内转移质子建立跨膜的 ΔpH ^[1]。但至今对质子电化学势差如何偶联形成 ATP 的机制至今尚不清楚。过去我们用荧光探针、能量抑制剂研究质子动力势与 H^+ -ATP 酶功能之间的关系, 了解到质子传导在能量转换中的作用^[2,3]。同时也认识到复杂的膜结构对问题的探讨带来了困难; 如 DCCD(dicyclohexylcarbodiimide)在膜上也有作用部位, 从而干扰了对 CF_0 - CF_1 的观察。故用以上的手段不可能直接监测到 CF_0 - CF_1 质子传导的过程。近年来磷脂双层-通道的重装技术的进展可以把离子通道置于一个相对简单的系统中, 在易于控制的膜内外条件下, 直接监测到离子的传导。在动物生理研究领域中已应用该方法测定离子传导的性能^[4]。目前国际上已有研究者引用这种技术研究线粒体、叶绿体中的能量转换过程^[5]。本文也采用这种技术单独分析 CF_0 - CF_1 的质子传导和质子电化学梯度、离子与能量传导抑制剂的关系。

1 材料和方法

1.1 叶绿体 H^+ -ATP 酶(CF_0 - CF_1)复合体制备

从菠菜 (*Spinacia oleracea* Mill.) 叶中提取。根据 Pick^[6] 方法略作修改: (1) 为去除 RuBP 羧化酶原用 300 mL NaCl 洗涤介质洗叶绿体 1 次, 改为 600 mL NaCl 洗涤介质 3 次。(2) 在最后提取过程中省略了辛基葡萄糖苷。

1.2 脂质体的制备

从油脂厂获得粗的大豆磷脂, 经提纯后使用, 在 80 mmol/L 的 Tricine (pH 8.0) 缓冲液中充氮条件下超声处理获得脂质体。

1.3 H^+ -ATP 酶复合体在脂质体上的重建

将制备的脂质体与 H^+ -ATP 酶复合体按实验需要的比例混合, 以保温法进行重组^[7]。在膜上 H^+ -ATP 酶复合体具有很高的 Mg^{2+} -ATP 酶活力^[8], 而 H^+ -ATP 酶从膜上分离后, 其 Mg^{2+} -ATP 酶活力降低。 H^+ -ATP 酶一旦组装上脂质体后, 其活力可明显提高。本实验中观察到脂质体上的 H^+ -ATP 酶的 Mg^{2+} -ATP 酶活力比离膜的 Mg^+ -ATP 酶活力提高 4 倍。表明 H^+ -ATP 酶已组装于脂质体上。把组装有 H^+ -ATP 酶的脂质体放置于 4 °C 下备用。

1.4 Mg^+ -ATP 酶活力测定

参照 Anthon 和 Jagendorf^[9] 的方法。

1.5 H^+ -ATP 酶在平板脂双层组成及 H^+ -ATP 酶在平板脂双层上的参入和通道特性

由中央带一个小孔的中隔分成各为 3 mL 的小室, 中隔的小孔可将两室沟通。小孔用 25% 大豆磷脂、15% 胆固醇的正葵烷溶液涂抹, 小孔上形成平板脂双层, 同时也组成了双室系统。将一对电极分别插入两小室, 可以做电压钳位, 记录膜电流。然后将组装有

H^+ -ATP酶的脂质体加入到一小室中,当脂质体与平板脂双层膜融合后 H^+ -ATP 酶参入到平板脂双层上,膜电阻立即下降 10 倍左右。稳定后,经运算放大器反馈电路输入电压进行钳位,同时记录通道电流,电压钳制范围在 ± 150 mV,电路、装置、电量测定方法参照施玉梁等^[4]的方法。

1.6 双室槽内缓冲液配制

实验 1、2 缓冲液成分为 Tricine (NaOH) 10 mmol/L (pH 7.4)、NaCl 120 mmol/L。实验 3 缓冲液成分,对称的两槽中 Tris-HCl 10 mmol/L (pH 7.4)、KCl 10 mmol/L、MgCl₂ 1 mmol/L。实验 4 中两室槽内 pH 不同,远侧槽中 Tris-HCl 10 mmol/L (pH 8.5) 不变。而近侧槽内 Tris-HCl 10 mmol/L pH 由 8.5 变至 4.0。实验 5 缓冲液组分同实验(3)。在远侧槽内加入 DCCD 使之浓度为 50 μ mol/L。实验 6 缓冲液成分为 Tris-HCl 10 mmol/L (Δ pH 3.0),加入或不加 1 mmol/L CaCl₂ 或 MgCl₂ 1 mmol/L。

2 实验 结果

2.1 H^+ -ATP 酶(CF₀-CF₁)参入脂双层膜和电阻变化

将缓冲液充入各为 3 mL 的双室槽中,在电极接好后,于显微镜下用沾有膜液的毛刷抹小孔,形成人工膜脂。在小孔被覆盖的瞬间,可观察到膜电阻骤然升高。随着膜逐渐变薄,脂双层形成,膜电阻稳定在 10~20 G Ω 的水平上,即使在 ± 150 mV 范围内,仍有恒定的膜电阻,即电流与电压关系成一直线的脂双层(图 1A)。然后将 CF₀-CF₁ 蛋白复合体加入到被称为远侧槽的小室中,搅拌稳定后,当看到膜电阻下降到 1~2 G Ω ,表明 CF₀-CF₁ 已参入到平板脂双层上,并可以看到 ± 150 mV 钳位下膜电流明显地增大(图 1B)。

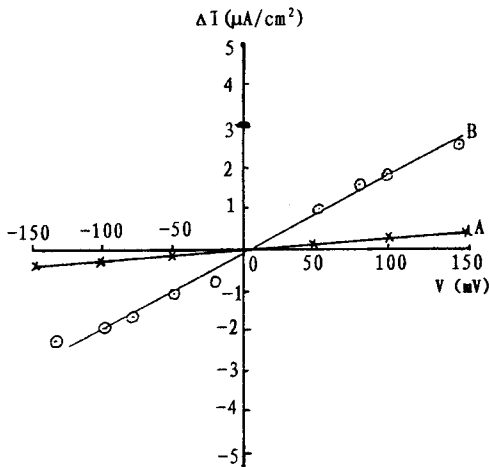


图 1 脂双层的电流-电压关系

A. 未加 ATP 合成酶(CF₀-CF₁)复合体; B. 加入 CF₀-CF₁ 复合体。

Fig. 1 Current-voltage characteristics of lipid membrane in the absence (A) and presence (B) of ATP synthase (CF₀-CF₁)

2.2 单通道电流记录

在脂双层膜两侧 pH 为 7.4 时以及存在 10 mmol/L K⁺ 和 1 mmol/L Mg²⁺ 时,以小于 2 mg/L 蛋白量加入远侧槽中,可记录到单通道样的电流涨落。在 450 mV 钳位下单通道开放电流幅值约为 0.5 pA,开放时间为 100 ms 级(图 2),估算通道电导为 5~10 bS。

2.3 膜两侧质子梯度对质子传导的影响

CF₀-CF₁ 蛋白复合体由基部亲脂性的疏水蛋白 CF₀ 和头部亲水性的 CF₁ 组成。把 CF₀-CF₁ 复合体加入到双室系统的一室(称为远侧槽)中,一旦 CF₀-CF₁ 参入到双室系统的平板脂双层上,由于 CF₀ 的亲脂性质,基部的 CF₀ 必然是钳入到脂双层上与双室系统的另一室(称近侧槽)溶液相邻,而头部亲水性的 CF₁ 暴露于膜表面上与远侧槽的水溶液相接触。将远侧槽水溶液的 pH 固定在 8.5,使近侧槽中的

pH 由 8.5 变化至 4.0,即造成膜两侧 pH 梯度(Δ pH)从 0→4.5 变化。在 Δ pH 各为 0、2、

3、4、4.5 时分别测定膜电流随电压的变化。从图 3 可见，当 ΔpH 为 0 时，正反相电压变化引起膜电流的变化较小，为经过 0 点的对称直线，当 ΔpH 为 2~4 时，电压引起膜电流变化的幅度较 ΔpH 为 0 时有较明显地增大，且在正向电压变化时更为明显，在 ΔpH 为 2~4 的范围内，电压引起膜电流变化的幅度随 ΔpH 的增加而增大，当 ΔpH 为 4.5 时，电压引起膜电流变化的幅度又明显回落。特别是在零电压时，当 ΔpH 在 2 以上还能测到膜电流。这种膜电流完全是由于跨膜的质子梯度造成，而且当 ΔpH 在 2~4 范围内它随着 ΔpH 的增加而增大，以上这些结果表明了在人工膜上 $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ 的质子通透性能。

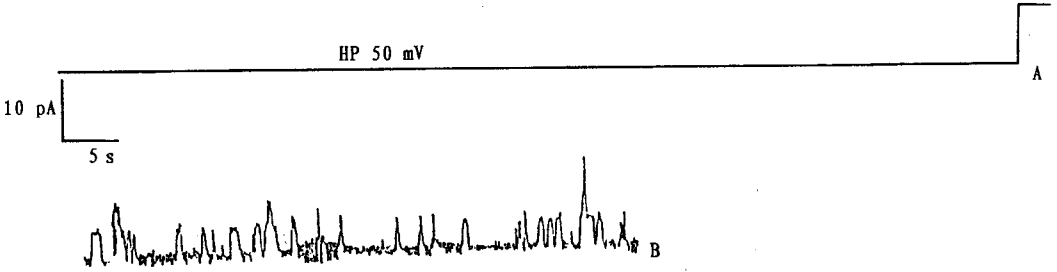


图 2 在对称的 pH 7.4 溶液(含有 10 mmol/L KCl 和 1 mmol/L MgCl₂)，在 50 mV 电压下 $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ 通道纪录

A. 未组装 $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ ；B. 组装上 $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ 。

Fig.2 Records of $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ channels in a symmetrical pH 7.4 solution containing 10 mmol/L KCl and 1 mmol/L MgCl₂ at 50 mV voltage

A. No assembled $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ ；B. Assembled $\text{CF}_0\text{-CF}_1$.

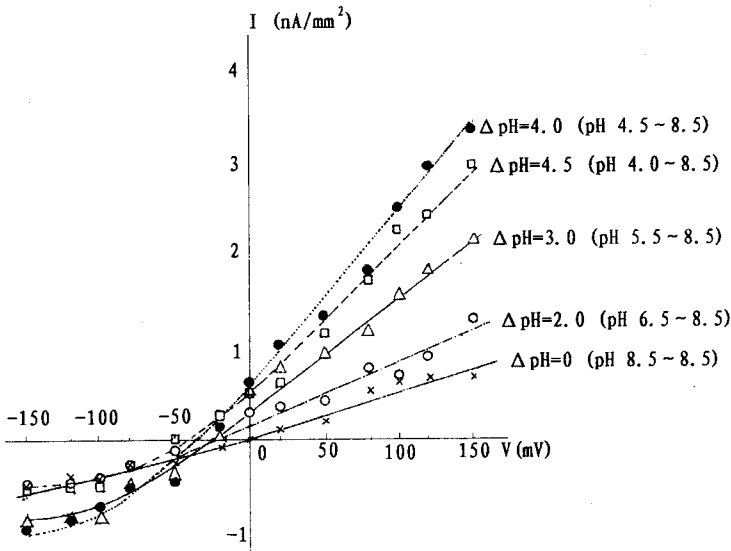


图 3 在无金属离子溶液中，不同的钳位电压(-150 ~ +150 mV)下， ΔpH 对 $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ 通道电流的影响

Fig.3 Effect of ΔpH on current of $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ channels at different holding voltage (-150 ~ +150 mV) in metal ion-free solution

2.4 DCCD 对通道电流的影响

CF_0 横跨于类囊体膜，具有疏水性，在能量转换中起质子通道作用，囊内的质子通过

此通道跨膜传给 CF_1 , 用于 ATP 形成。 CF_0 主要由三种亚单位组成, 分别为亚单位 I、II、III, 其中亚单位 III 是膜结合部分 CF_0 的主要成分, 是疏水性极强的膜蛋白, 以六聚体形式形成有活性的质子通道, 而 I、II 亚单位与 CF_1 结合调节活性作用^[10]。实验证明 DCCD 是作用于亚单位 III 的谷氨酸的残基上, 从而阻断质子传导。在槽内加入质子传导抑制剂 DCCD 后, 在给定的电压下, 仍有通道电流发生, 但在 5 s 之后, 电流很快地被阻断, 说明在人工膜上的 CF_0 - CF_1 的质子传导过程也能被 DCCD 抑制(图 4)。

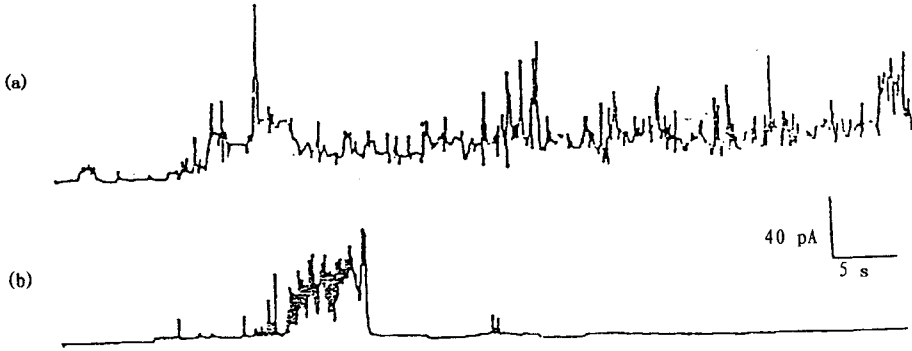


图 4 DCCD 对 CF_0 - CF_1 通道电流涨落的影响

Fig. 4 Effect of dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) on current fluctuation of CF_0 - CF_1 channels in pH 7.4 solution containing 10 mmol/L KCl and 1 mmol/L $MgCl_2$ at +50 mV
(a) Control (- DCCD); (b) + DCCD.

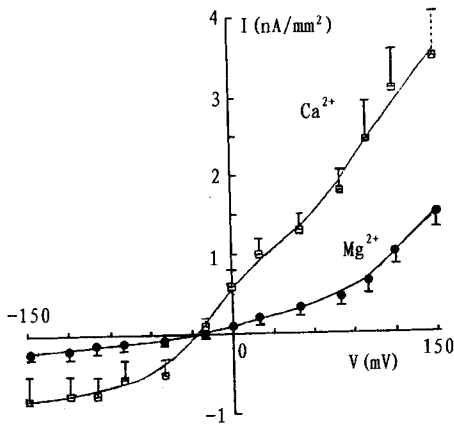


图 5 在无金属离子的溶液中(Tris-HCl 10 mmol/L)跨膜(BLM)的 ΔpH 为 3 时, 电压 (-150 ~ +150 mV) 钳位下, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 CF_0 - CF_1 通道电流的影响

Fig. 5 Effect of Mg^{2+} or Ca^{2+} on current of CF_0 - CF_1 channel at different holding voltage (-150 ~ +150 mV), in metal ion-free solution (10 mmol/L Tris-HCl), the ΔpH across the black lipid membrane (BLM) maintained at 3.0

2.5 钙、镁离子对参有 CF_0 - CF_1 脂双层的电流-电压关系的影响

CF_0 - CF_1 蛋白复合体又称 H^+ -ATP 酶, CF_1 是 H^+ -ATP 酶中起催化作用的部分, 形态上是突出膜外的球状水溶性蛋白。它具有催化合成与水解 ATP 的功能, 该功能进行时伴随有质子传导过程。已经知道, 无论膜上 H^+ -ATP 酶是处于合成或水解 ATP 的任一状态, Mg^{2+} 的存在是绝对必需的。当 CF_1 离膜后, CF_1 的催化功能与质子传导过程无关, 而 CF_1 的水解 ATP 功能的呈现需要 Ca^{2+} 的存在。因此 CF_0 - CF_1 的质子传导功能对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 是否也有这种不同的需求呢? 为此我们进一步观察了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 CF_0 - CF_1 的质子传导的影响。图 5 可见, 当反应槽中无金属离子存在和跨膜的 ΔpH 为 3 时, 在 0 ~ +150 mV 钳位下, Mg^{2+} 比 Ca^{2+} 所引起的 CF_0 - CF_1 的通道电流要大得多。表明只有 Mg^{2+} 对质子传导功能有作用。

3 讨 论

从实验 1 中观察到 CF_0 - CF_1 对于人工脂膜电流随电压变化的影响(图 3), 以及记录到在给定的电压下它所形成的单通道样的膜电流的涨落(图 2), 这些结果表明 $CF_0 \sim CF_1$ 已成功地组装于人工膜上, 显示出离子通道的性能。从实验 3 中看到当无其它阳离子存在时参有 CF_0 - CF_1 人工脂膜由电压引起电流变化(或称电导 I/V)可随膜两侧质子浓度差(ΔpH)而改变(图 3)。这表明 CF_0 - CF_1 具有质子通透的性能, 并说明 CF_0 - CF_1 的质子传导随质子浓度差增加而增大是有一定限度的, 其质子通透率估算为 10^{16} 个质子/s, 与一般的离子通道的效率相当。当质子传导抑制剂 DCCD 存在时, 膜电流很快地被阻断(图 4)。从而说明人工膜上的 CF_0 - CF_1 的质子传导过程与在天然膜上一样受 DCCD 的抑制。在线粒体或叶绿体中分别提取 F_0 或 CF_0 和 F_1 或 CF_1 , 再在人工膜上组装后往往不能显示出对 DCCD 的敏感性, 甚至于最为典型的 F_0 上有专一作用部位的定名为寡霉素敏感性蛋白(OSCP)的寡霉素的作用效应也不能呈现出来^[5]。我们认为这是由于他们采用了分别提取 F_0 、 F_1 的方法, 在提取过程中失落 F_0 、 F_1 交界处的小分子蛋白 OSCP 所致。最近黄有国和 Saroj Joshi^① 在 F_0 - F_1 的组装过程中加入 OSCP 蛋白, 不仅大大增加了寡霉素的敏感性, 而且对 DCCD 的敏感性也显示出来了, 尽管 DCCD 在 F_0 上的作用部位不在 OSCP 上。鉴于本文是采用将 CF_0 - CF_1 完整地提取下来后组装于人工膜上, 从而避免了在 CF_0 与 CF_1 交界处小分子蛋白的失落, 故而在人工膜上组装后的 CF_0 - CF_1 仍可显示出对 DCCD 的敏感性。因此为探讨人工膜上 CF_0 - CF_1 的功能, 应用本文提取 F_0 - F_1 的方法更为合适。

最后我们测定了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对电压引起电流变化的影响中看到 Mg^{2+} 可大大地增加正向膜电流, 从而说明 Mg^{2+} 可增加质子从膜内向膜外流出, 而 Ca^{2+} 则没有这种作用, 这与天然膜上 H^+ -ATP 酶合成 ATP 需要 Mg^{2+} 的参与有相似之处, 也表明了 CF_0 的质子传导功能与 CF_1 的催化功能之间是紧密偶联的。过去对于 H^+ -ATP 酶催化功能的表达需要 Mg^{2+} 的参与有很多解释, 总之归结为 Mg 可以造成酶的构象变化从而增加了活化状态的酶量^[11]。但很少有人从质子传导方面去解释。即使 Shahak^[12] 也仅仅认为 Mg^{2+} 是调节了 CF_0 对质子亲和性。基于本文结果以及已知 H^+ -ATP 在膜上呈现的催化功能都与质子传导有关。因此我们认为 Mg^{2+} 是促使质子流动得以畅通进行从而导致 H^+ -ATP 酶催化功能的表达。当然在这方面还需进一步实验证实。

参 考 文 献

- 1 Strotmann H, Biokel-Sandkottor S. Structure, function and regulation of chloroplast ATPase. *Ann Rev Plant Physiol*, 1984. **35**: 97 ~ 120
- 2 卫瑾, 杜子云, 李有则. 寡霉素对叶绿体质子传导的作用. *植物生理学报*, 1984. **10**: 249 ~ 259
- 3 吴少龙, 李有则. 三苯基锡、二环己基碳二亚胺和寡霉素对叶绿体 CF_0 与 CF_1 功能联系的影响. *植物生理学报*, 1989. **15**: 125 ~ 131
- 4 施玉梁, 王文萍, 周亦昌. 金褐霉素(aureofusoin)在人工脂双层形成的离子通道. *生理学报*, 1991. **43**: 128 ~ 133
- 5 Sorgato M C, Moran O, Pinto V O. Further investigation on the highconductance ion channel of the inner membrane of mitochondria. *J Bioenerg Biomem*, 1989. **21**: 485 ~ 496
- 6 Pick U. Isolation of the ATPase complex (CF_0 - CF_1). In: Edelman M, Hallick R B, Chua N H eds., *Methods in Chloroplast*

① 黄有国, Saroj Joshi. 致寡霉素敏感性蛋白(OSCP)对线粒体 H^+ -ATP 酶的 DCCD 敏感性是必须的. 第五届全国生物膜学术讨论会论文摘要集, 1993. 86

Molecular Biology. Oxford: Elsevier, 1982. 873

- 7 程秋琛,李淑俊. 菠菜能量转化复合体的人工组装. 植物生理学报, 1986. 12:9~15
- 8 Winget G D, Kammer N, Racker E. Formation of ATP by the adenosine triphosphatase complex from spinach chloroplasts reconstituted together with bacteriorhodopsin. *Biochem Biophys Acta*, 1977. 460:490
- 9 Anthon G E, Jagendorf T F. Effect of methanol on spinach thylakoid ATPase. *Biochem Biophys Acta*, 1983. 723:358~365
- 10 Nelson N. Proton ATPase of chloroplast. *Curr Topics Bioenerg*, 1981. 11:1~33
- 11 杜子云,马正平,李有则. Mg^{2+} 在叶绿体膜上 H^+ -ATP 酶光活化中的作用. 生物化学与生物物理学报, 1988. 20:510~519
- 12 Shahak Y. Regulation of the chloroplast H^+ -ATPase by light, the involvement of Mg^{2+} ion. *Eur J Biochem*, 1986. 154:179~185