

细菌的血红蛋白研究

赵 险 峰

(军事医学科学院五所三室,北京)

在人和动物体的血液中存在大量的血红蛋白。这些蛋白质行使着向组织运输和贮存氧的功能。同样,在植物体内也有这种蛋白质,如豆血红蛋白(Leg Hb)^[1,2,3,4]。它的光吸收特性与动物血红蛋白的几乎完全相同,功能是为植物贮存和传递分子氧。在生物进化过程中,细菌是动植物的祖先,也含有这种生命的必需成份。科学家们相继在根瘤菌(*Rhizobium*)和透明颤菌(*Vitreoscilla*)^[5,6]中发现了细菌的血红蛋白。这些蛋白质既与上述两种蛋白质有共同点,又有它独自的特点。本文就细菌血红蛋白研究的一些情况简单作一介绍。

(一) 回顾

1969年,澳大利亚科学家 Appleby 在研究根瘤菌的细胞色素时^[7],发现了一个分子量比细胞色素 C(MW = 13,000) 将近大一倍(MW = 20,000—25,000)的“色素”,其 CO 差数光谱的波峰在 417 nm、540 nm 和 569 nm,波谷在 434 nm 和 556 nm,与豆血红蛋白的 CO 差数光谱类似。其绝对光谱也与 Leg Hb 相似,然而使它与抗豆血红蛋白的兔抗血清作用时,没有任何免疫反应出现。因而它与豆血红蛋白显然不相关,是一种新的血红蛋白。因此它被称为“根瘤菌血红蛋白”(Rhizobium Hemoglobin)。

1966年,美国科学家 Webster 在研究细菌的呼吸链时^[7],从透明颤菌的菌体中提取出了两种色素。其中一种色素成分在液氮差数光谱中出现两个 α 带和两个索里特氏带(Soret band)(细胞色素的特征带),因此色素中象是含有两个血红素基团。后来证明,原血红素是

其辅基,可被缓慢地自行氧化^[8]。自行氧化这个性质与末端氧化酶类似,而含有原血红素辅基这一点与细胞色素氧化酶又是不同的。由于此色素的光吸收带与其它细菌中的细胞色素 O 的光吸收带相似,而且细胞色素 O 分子中也含有一个原血红素辅基^[9],所以 Webster 认为它就是透明颤菌的“细胞色素 O”^[10]。通过进一步研究,发现纯化的“细胞色素 O”(以“Cyt O”表示)可以催化 NADH 还原未经纯化的“Cyt O”^[11]。在此反应中测到的第一个产物是一个光谱与含氧血红蛋白的光谱相似的中间产物。反应过程中虽然有过氧化氢的生成^[12],但是“Cyt O”分子中的血红素铁始终是 Fe^{2+} ^[13],可与氧稳定地结合,却不被氧化成 Fe^{3+} 。这一点是与一般的细胞色素不同的,一般的细胞色素与氧反应生成氧化型细胞色素(Fe^{3+})。在呼吸着的细菌中与氧结合的“Cyt O”是最稳定的^[14]。Tyree 和 Webster 又研究了“Cyt O”的分子量、亚基数目和其亚基间相互作用的情况。还测出了它与氧反应的克分子比例,及其可能的氧化物的分子式^[15,17]。Choc 和 Webster 通过红外光谱研究了它的氧合中间体和羰基的类型^[16]。后来, Demaio 和 Webster 从透明颤菌中发现了另一个色素^[17],它的很多性质也与细胞色素 O 相似,但与先发现的“Cyt O”是不同的。为了区别,作者把它叫做 Cyt O'。Orü 和 Webster 又研究了氧合的“Cyt O”的光解离和重聚的动力学^[18],认为它在携带和贮存氧中可能扮演一个角色。直到 Wakabayashi

本文承蒙石成华同志审阅,特此致谢。

和 Webster 等测定了它的氨基酸序列^[19],发现它与动植物的血红蛋白具有很大的同源性,才正式确认它就是透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 的血红蛋白(以下简称 VHb)。

(二) 细菌血红蛋白的性质

尽管根瘤菌血红蛋白的确认比透明颤菌的早,然而我们对后者的了解却远比前者多。下面我们用 VHb 分子的研究成果来揭示细菌血红蛋白的一般特点。

1. VHb 的分子结构: VHb 是一种水溶性蛋白质^[4],用凝胶分子排阻层析估测其分子量为 27,000,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和含有 6.25 M 尿素的聚丙烯酰胺凝胶电泳,均显示只有一条带(后一种电泳可使细胞色素解离而出现两条带),证明它是由两个完全相同的分子量为 13,000 的亚基所组成。每个分子含有两个 b 血红素^[19],其亚基是一个由 146 个氨基酸残基组成的多肽链在空间盘曲而成,计算其相对分子量为 15,775。其一级结构顺序^[19]如图 1。

VHb 与其它血红蛋白分子的一级结构具有很大的同源性(见表 1)。从表 1 中可见,VHb 和 LLb(羽扇豆血红蛋白)具有最大的同源性。除了表中所列的这些相同的氨基酸残基外,还有 20 对相似的残基,如 Glu/Asp, Ser/Thr, Leu/Ile/Val, Phe/Tyr。还有另外约 20 对氨基酸残基既非相似,又不相异。

2. VHb 的功能机制: VHb 存在于细菌的

Met-Leu-Asp-Gln-Gln-Thr-Ile-Asn-Ile-Ile-Lys-Ala-Thr-Val-Pro-Val-Leu-Lys-Glu-His-Gly-Val*-Thr*-Ile-Thr-Thr-Thr-Phe-Tyr*-Lys-Asn-Leu-Phe*-Ala-Lys-His*-Pro-Glu-Val-Arg-Pro-Leu-Phe-Asp-Met-Gly-Arg-Gln-Glu-Ser*-Leu-Glu-Gln-Pro-Lys-Ala-Leu*-Ala-Met-Thr-Val*-Leu-Ala-Ala*-Ala*-Gln-Asn-Ile-Glu-Asn-Leu-Pro-Ala-Ile-Leu-Pro-Ala-Val*-Lys-Lys-Ile*-Ala-Val-Lys-His-Cys-Gln-Ala-Gly-Val*-Ala-Ala-Ala-His-Tyr*-Pro-Ile-Val*-Gly-Gln-Glu*-Leu*-Leu-Gly-Ala-Ile*-Lys-Glu-Val-Leu-Gly-Asp-Ala-Ala-Thr-Asp-Asp-Ile-Leu-Asp-Ala-Trp-Gly-Lys-Ala*-Tyr*-Gly-Val-Ile*-Ala-Asp-Val-Phe*-Ile-Gln-Val-Glu-Ala-Asp-Leu-Tyr-Ala-Gln-Ala-Val-Glu

图 1 VHb 一级结构的氨基酸顺序图^[19]

*为保守的,埋在 VHb 分子内部的疏水的氨基酸残基

表 1 几种不同的血红蛋白分子中相同的氨基酸残基数

	HHb α	HHb β	SWMb	GHb	LLb
HHb β	60				
SWMb	38	33			
GHb	30	29	32		
LLb	23	23	26	23	
VHb	16	16	14	20	-34

注: HHb α : 人体血红蛋白 α 链 HHb β : 人体血红蛋白 β 链 SWMb: 抹香鲸肌红蛋白 GHb: 吻沙蚕血红蛋白 LLb: 羽扇豆血红蛋白 VHb: 根瘤菌血红蛋白

胞浆内,其含量与培养基中溶解氧的浓度有关^[19]。当氧的浓度降至大气中氧浓度的 10% 时,VHb 的含量增加大约 50 倍。有也有人报告^[6],随着培养基中氧浓度和营养的增加,细菌的血红素含量也增加。以上的结果看起来似乎矛盾,而我们一经分析就知道,无论是培养基中氧浓度降低,还是氧浓度和营养增加(细菌代谢相应增加),细菌都感到供氧不足,因此,其血红蛋白量也相应增加,才能满足代谢所需要的氧。

由于它可自行氧化^[7],曾经认为它可能具有末端氧化酶的功能,但是生理学实验未能找到这方面的证据。根据豆血红蛋白可以促进氧向末端氧化酶的传递^[20],有人推论,它可能也具有促进氧扩散的功能^[19]。

Webster 和 Oriei 认为^[21],有三种形式的 VHb——氧化型,还原型和氧合型,参与催化和循环过程。Tyree 和 Webster 曾提出^[15],还原型血红蛋白与氧结合时,形成的第一个产物是双体的氧合血红蛋白 $(b^b)^2O_2$ 。然后在氧的催化下,此化合物又转化为含氧型化合物 $(b^b)^2-O_2$,还有一部分含氧血红蛋白可进一步氧化成氧化血红蛋白 (b^b) 和过氧化物阴离子。而 Oriei 和 Webster 后来的研究认为^[18],VHb 可与氧直接结合,形成稳定的化合物,不需形成中间物。VHb 的亚基间也有相互作用,但只存在于还原型的血红蛋白中,而在氧化的血红蛋白中则没有这种相互作用。

3. VHb 的光谱分析: 在 O_2 和 NADH 存在的情况下,VHb 在 4°C 的红外光谱研究显示^[22],其可见的 Soret $\lambda_{max, nm}(s_m M)$ 值为 577

(11.2); 543(145); 415(112)。其结合氧的 IR 带总是与 Fe^{2+} 和氧基之间的键 ($Fe-O-O$) 相关。这一点与 $HbAO_2$ 和 MbO_2 的光谱类似, 然而在光谱的频率, 带的宽度和强度方面又与后两者不同。结合 $^{16}O_2$ 或 $^{18}O_2$ 后^[46], 其红外光谱都只有一条, 而氧合血红蛋白 A 和氧合肌红蛋白的光谱带却有多条。这说明 O_2 是与氧化酶结合的。另外, 其还原型与 CO 结合后, 其 ν_{CO} 值比氧合血红蛋白 A 和氧合肌红蛋白的 ν_{CO} 值高, 而与细胞色素 C 氧化酶的羰基的 ν_{CO} 几乎相同。以上的光谱特点显示它既象血红蛋白, 又象细胞色素氧化酶。这反映了血红蛋白的进化过程。

Webster 和 Hackett 还做了还原 VHb 的差数光谱^[7]。其特征是很宽的 α 带, 在 $-190^\circ C$ 时, 这些 α 带又混杂在一起, 而 β 带却明显可见, 形成肩峰。这是第一次在原血红素蛋白中观察到的此种类型的光谱。

(三) 结论

细菌中血红蛋白的发现是很有意义的。它说明血红蛋白分子不是高等生物所特有的。细菌血红蛋白除具有动植物血红蛋白的一般性质外, 还具有一些与细胞色素相同的性质。这就为血红蛋白和细胞色素来自同一个祖先蛋白的观点提供了证据, 这对研究生物的进化和发育都很有价值。

参 考 文 献

[1]: Burris RH & Wilson PW: *Biochem J*, 51: 90—96,

- 1952.
- [2] Kasugai S, et al: *J Agric Chem Soc*, 19: 765, 1943.
- [3] Kubo H: *Acta Physiochim, Tokyo* 11: 195, 1939.
- [4] Little HN & Burris RH: *J Ameri Chem Soc*, 69: 838, 1947.
- [5] Appleby CA: *Biochim Biophys Acta* 172: 88—102, 1969.
- [6] Lamba P & Webster DA: *J Bacteriol* 142: 169—173, 1980.
- [7] Webster DA & Hackett DP: *J Biol Chem* 241: 3308—3315, 1966.
- [8] Tyree B & Webster DA: *J Biol Chem* 253: 6988—6991, 1977.
- [9] Taniguchi S & Kamen MD: *Biochim Biophys Acta* 96: 395—428, 1965.
- [10] Webster DA & Hackett DP: *Carnegie Inst Wash Year Book* 63: 483—485, 1964.
- [11] Webster DA & Lui Y: *J Biol Chem* 249: 4257—4260, 1974.
- [12] Webster DA: *J Biol Chem* 250: 4955—4958, 1975.
- [13] Lui CY & Webster DA: *J Biol Chem* 249: 4261—4266, 1974.
- [14] Webster DA & Orii Y: *J Biol Chem* 252: 1834—1836, 1976.
- [15] Tyree B & Webster DA: *J Biol Chem* 254: 176—179, 1978.
- [16] Choc MG & Webster DA: *J Biol Chem* 257: 865—869, 1981.
- [17] Demaio RA & Webster DA: *J Biol Chem* 258: 13768—13771, 1982.
- [18] Orii Y & Webster DA: *J Biol Chem* 261: 3544—3547, 1986.
- [19] Wakabayashi S, et al.: *Nature* 322 (6078): 481—486, 1986.
- [20] Wittenberg JA, et al.: *J Biol Chem* 249: 4057—4066, 1974.
- [21] Webster DA & Orii Y: *J Bacteriol* 135: 62—67, 1978.
- [22] Choc MG & Caughey WS: *Fed Pro* 37: 1325, 1978.