

· 学科发展 ·

膜脂-膜蛋白相互作用研究及其在医学和农业上的应用

杨福愉 黄芬

(中国科学院生物物理研究所生物
大分子国家重点实验室)

[摘要] 膜脂-膜蛋白相互作用是生物膜研究的中心环节。我们分别从线粒体膜、支原体膜、叶绿体膜、红细胞膜及人工膜研究这一重要问题,并联系农业、医学实际研究植物抗冷性和细胞衰老的分子机制。通过五年的工作,发现膜脂能影响和调节线粒体 H^+ -ATP酶、莱氏衣原体ATP酶和叶绿体捕光色素复合体构象及活性;非双层脂、非双层脂结构对膜蛋白功能有明显影响;提出鉴定水稻抗冷性的有效指标,筛选出水稻育秧抗寒剂及中药抗衰老药物。

一、研究意义

生物膜的研究是当前分子生物学、细胞生物学十分活跃的研究领域之一。其基本任务是探讨生物膜的能量转换、信息识别与传递、物质转移和分配等基本生命现象的分子机理,并在阐明其原理的基础上,结合新兴技术,为改革与创立新兴工、农、医技术与产业开辟途径。

生物膜是由蛋白质、脂类以及碳水化合物等组成的超分子体系。研究生物膜的结构与功能不仅需要对膜脂、膜蛋白等单一组分进行研究,更重要的还应对构成生物膜各组分之间的相互关系进行探索。膜脂是生物膜的基本骨架,膜蛋白是膜功能的主要体现者,因此膜脂-膜蛋白相互作用的研究,可以说是生物膜结构与功能研究的一个中心环节。

近年来,随着学科相互渗透的加强,多种物理技术的不断改进和完善,生物膜研究持续迅速发展。在生物膜的结构方面,早在1972年Singer等提出的“流体镶嵌模型”,不但证实膜脂双分子层是生物膜的基本特征,而且证明膜脂和膜蛋白的运动和膜流动性的概念,为生物膜的结构奠定了理论基础。1979年,荷兰学者Verkleij等提出膜脂的多型性,即生物膜上脂质除以脂双层为其基本结构外,还有六角型I(H_1)、六角型II(H_2)等非脂双层结构,为生物膜结构的研究提出新课题。约占线粒体膜、叶绿体类囊体膜、莱氏衣原体膜等膜脂50%的非双层脂(如PE, MGDG)的生理意义,及其在一定条件下转变为非双层脂结构的重要性,日益引起人们的注意。最近,有人根据 H_1 相的PE为抗原可产生PE抗体的发现,提出脂多型性调节免疫抗原性的问题,因而脂多型性已成为生物膜结构研究的一个重要内容。

本文于1993年3月2日收到

在膜蛋白结构研究方面，随着分子遗传学有关技术及其手段的应用与改进，阐明一级结构的膜蛋白的数量迅速增长，这些膜蛋白在膜上定位分布 (Topology) 也较过去有较深入的研究。西德 Michel 由于使细菌光合反应中心的结晶获得成功，通过 X-射线晶体衍射技术，首次建立了分辨率 3.5 Å 的膜蛋白三维结构，从而获得 1988 年诺贝尔化学奖。

在生物膜功能方面，如物质运送，各种离子通道的一级结构及其作用的分子机制研究都有明显的进展。蛋白质跨膜运送是当前膜生物学研究的一个热点，尤其对导肽的研究更是方兴未艾。在信息传递方面，多种受体以及它们活化后的信息传递途径和第二信使的研究，都不断有新的发现和发展。

我国的生物膜的研究主要集中于线粒体呼吸链酶及氧化磷酸化、叶绿体光能转换机制等。70 年代以来，对质子腺三磷酶结构与功能， Mg^{2+} 离子对线粒体 H^+ -ATP 酶重组，支原体膜上 ATP 酶、膜与疾病、药物对生物膜的作用、生物膜与农作物抗冷性等等都进行了不少工作，为开展膜脂-膜蛋白相互作用奠定了基础。

二、重大项目立项经过

“六五”期间，生物膜的研究就已是国家科委和中国科学院支持的重点项目。1987 年，“膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用”正式列为国家自然科学基金重大项目，由中国科学院生物物理研究所、植物研究所，中国医学科学院基础医学研究所，清华大学生物科学与技术系和北京医科大学共同承担。杨福愉、黄芬为项目主持人，分七个子课题开展研究工作：

1. **二价金属离子与膜脂-膜蛋白相互作用** 深入研究 Mg^{2+} ，通过调节膜脂-膜蛋白相互作用，提高重建 H^+ -ATP 酶活性的作用机理；跨膜 Ca^{2+} 离子浓度梯差对 H^+ -ATP 酶， Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体酶活性及构象的影响；非双层脂对膜蛋白活性与构象影响等。

2. **支原体膜蛋白及膜脂分子性质的研究** 研究莱氏衣原体膜上的 Mg^{2+} -ATP 酶的分离及纯化，膜脂（特别是非双层脂）对重组 Mg^{2+} -ATP 酶活性及构象的影响，猪肺炎支原体膜蛋白与致病性的关系等。

3. **捕光色素蛋白在叶绿体类囊体膜上的横向迁移与膜脂关系** 研究叶绿体膜上捕光色素蛋白复合体在膜脂中横向迁移的机理，探讨横向迁移与膜脂和膜流动性的关系以及对激发能分配的影响。

4. **膜蛋白对脂多型性的影响及其生物学意义的研究** 探讨外源与内源蛋白对脂多型性转变的条件与规律，从线粒体内膜电子传递过程与层粘连蛋白受体与脂质体相互作用。

5. **老化红细胞膜脂、膜蛋白的变化及抗衰老药物的作用机制** 研究红细胞在衰老过程中膜脂、膜蛋白的结构变化及相互作用以及抗衰老药物的筛选。

6. **膜脂和膜蛋白的相互关系与植物抗寒性的研究** 从膜脂-膜蛋白的相互关系,探讨抗寒机理,寻找鉴定作物品种抗寒新指标,筛选提高作物抗寒的物质。

7. **脂与蛋白的相互作用的近代生物物理方法研究** 应用小角 X 光衍射、圆二色谱、激光拉曼、核磁共振以及 Mossbauer 等技术研究膜脂结构与膜蛋白构象。

三、研究工作进展

本项目在 1987—1991 年五年中,共发表论文 119 篇,其中在国际刊物发表 37 篇,在《中国科学》发表 3 篇,《科学通报》14 篇,学报 65 篇,大大超过预订目标。同时,还培养出青年科技人才 72 人。研究成果有的获国家或部级奖励,有的经过专家鉴定并已推广应用。现将比较突出的成果介绍于后:

1. 二价金属离子影响线粒体 H^+ -ATP 酶重建的研究

线粒体内膜 H^+ -ATP 酶是进行能量转换的关键“装置”。研究发现 Mg^{2+} 离子在 H^+ -ATP 酶重建于脂质体过程中具有重要作用,从而从膜脂-膜蛋白相互作用研究其作用机理,提出 Mg^{2+} 主要通过膜脂物理状态的改变间接影响重建 H^+ -ATP 酶活性的模型。之后,又运用多种生物化学和生物物理方法使模型得到进一步确证。除线粒体 H^+ -ATP 酶外, Mg^{2+} 对其它一些膜蛋白在脂质体的重建也有明显促进作用。该工作揭示 Mg^{2+} 及其它二价金属离子通过膜脂-膜蛋白的作用来影响调节蛋白质的功能是很重要的,引起国际同行重视。这项研究成果获 1989 年国家自然科学奖三等奖。

2. 莱氏衣原体膜脂及膜上 ATP 酶分子性质的研究

支原体是最小的原核微生物。莱氏衣原体是一种支原体,定位于它膜上的 ATP 酶是与膜紧密结合的内部蛋白。20 多年来无人能将这种具有活性的酶分离纯化。我们采用非离子去污剂提取膜蛋白,用梯度凝胶电泳分离具有活性的 ATP 酶,此酶有五个亚基。这项工作结果是与加拿大学者分别、独立地同时完成的,并为国际上认可。1987 年获中国科学院科技进步奖二等奖。

3. 色素蛋白质复合体的结构、功能及其调控

叶绿体膜上的各种色素蛋白复合物组成了结构和功能不同的两个光系统,调节和控制光合作用中光能的吸收、传递、分配和转化。我们研究发现, Mg^{2+} 离子能使光系统 II 捕光叶绿素蛋白质复合体从富含光系统 I 的间质膜区横向迁移到光系统 II 的基粒膜区,增加了光系统 II 的捕光截面,调节了激发能,有利于向光系统 II 分配。这项工作具有自己特色,研究成果于 1990 年获中国科学院科技进步奖三等奖。

4. 抗衰老药物抗活性氧的氧化损伤及其机制的研究

细胞老化是机体衰老的基础,研究细胞衰老的分子机制是当前国际上瞩目的课题之一。在探讨红细胞老化分子机制过程中,发现红细胞膜脂、膜蛋白均有明显变化。活性氧自由基是

促进红细胞老化的重要因素。从中草药中筛选出某些清除自由基的药物, 离体和动物实验表明, 这类药物对红细胞膜脂、膜蛋白均有保护作用。该成果获1992年卫生部科技进步三等奖。

5. 抗寒剂的研制及其在水稻育秧中的应用

减轻和防止农作物寒害是农业生产中急待解决的重要问题。我们的工作是从膜脂-膜蛋白相互关系上来探讨植物的寒害和抗寒机理。研究出一种水稻育秧抗寒剂, 用于水稻浸种处理。经过从实验室、盆栽到大田的系统试验, 确证在防止水稻烂秧, 提高成秧率及增加产量方面均有明显效果, 首次为解决我国水稻早春育秧中长期存在的低温烂秧问题提供了一种有效措施。1990年经过专家鉴定, 现已开始推广应用, 效果良好。

6. 水稻抗冷性检测方法 (ATP含量发光法、体内叶绿素a荧光诱导动力学的研究)

选育高抗寒性农作物新品种对发展我国农业生产具有重要意义。以不同抗冷性水稻品种为材料, 通过线粒体膜的氧化磷酸化的产物——ATP含量和叶绿体膜上叶绿素a荧光动力学的测定, 获得了较理想的结果。经过三十几个水稻品种测定, 无论是梗稻或籼稻, 不抗冷品种的幼芽在低温处理后ATP含量明显降低, 而抗冷品种经同样处理后, ATP含量或者有不同程度的增加, 或者没有变化, 与多年田间测定结果相比, 符合率达90%左右。通过叶绿素a荧光动力学的检测, 也获同样的结果, 得到了相互验证。这两种方法均快速简便易行, 适于在农业生产中推广应用, 1992年通过专家鉴定。

四、几点体会

1. 选题是关键 国家自然科学基金委员会要求重大项目必须针对我国科学技术、国民经济和社会发展中的一些重大科学技术问题, 组织跨学科、跨单位、跨部门的联合研究。根据这个要求, 我们选定了生物膜研究的中心环节“膜脂-膜蛋白相互作用”这一重要课题, 并结合我国农业和医学实际开展基础和应用基础研究。七个子课题中四个为基础研究, 两个为应用基础研究, 一个侧重研究新技术。由于选题的覆盖面较广, 参加的单位原有基础比较雄厚, 这样就能既发挥各单位原有的特色, 又分工协作取长补短形成一个整体。研究材料包括哺乳动物线粒体膜, 植物细胞质膜及叶绿体内囊体膜, 微生物支原体膜, 人红细胞膜以及人工膜等, 从不同角度进行研究双层脂、非双层脂与膜蛋白的相互作用, 所获得的系统结果是任何某一个单位单独研究所难以完成的。而且, 通过定期交流与协作, 在学术思想和实验技术方法上都有很多收获。因此, 重大项目是否成功的关键在于选题。选题既要考虑某一领域前沿的问题, 又要选择综合性强、目的性明确的目标, 才能将我国在这一领域的有限而又较强的力量组织起来, 集中优势在短期内获得较显著的成果。

2. 管理制度化 本项目在批准立项以后, 制定了必要的规章制度, 即每年至少组织一次以学术活动方式进行的课题计划完成情况检查评比会。项目学术领导小组对各子课题完成计划的进度、质量等进行评分, 对完成计划好的子课题, 从机动费分配上适当增加额度, 以资鼓励, 起到较好的作用。

3. **加强国际合作与学术交流** 本项目制订计划时,就重视国际合作与国际学术交流,曾计划1991年在北京召开膜脂-膜蛋白相互作用的国际学术讨论会,后因故中止。在执行计划期间,1989年5月由国家自然科学基金委员会生命科学部组织的生物膜学术考查组(4人)赴加拿大进行考查和学术交流,与加拿大同行科学家增进相互了解并建立合作关系,收获不小,反映很好。各子课题组成员每年都有人参加国际学术会议,五年来出席国际学术会议20次,参加人数53人。通过参加国际学术会议,掌握了国际科学最新信息并与同行专家交流了经验,对工作有较大促进作用。

4. **狠抓培养青年科技人才** 我们的经验认为,出成果、出人才是一致的。五年期间在取得一批重要成果的同时,也培养出一批青年科技人才。原计划培养博士生8名,硕士生10—15名,实际上共培养各类人才72人,其中博士后1人,博士研究生13人,硕士研究生58人。在这批青年科技人员中有20%为各种成果奖获奖者,有的获国家自然科学基金青年基金或中国科学院青年科学基金资助,有的获中国科学院院长奖或国家教委光华奖等等。个别人已获副教授职称,成为研究工作中的骨干力量。

STUDY ON LIPID-PROTEIN INTERACTION OF BIOMEMBRANES AND ITS APPLICATIONS IN MEDICINE AND AGRICULTURE

Yang Fuyu and Hwang Fen

(National Laboratory of Biomacromolecules,
Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

Abstract

Study on lipid-protein interaction is one of the challenging projects in biomembrane research. Studies on the effect of bilayer or non-bilayer phospholipid on the structure and function of membrane proteins from mitochondria, mycoplasma and human erythrocytes have been carried out. Results show that the physical state of phospholipid could affect and modulate the activities and conformation of mitochondrial H^+ -ATPase, *Acholeplasma laidlawii* ATPase and chloroplast light harvesting chlorophyll protein complexes LHC-II. The non-bilayer phospholipid (e. g. PE. MGE) -protein interaction has also been investigated. Besides, on the basis of membrane research efficient plant cold resisters and tests for screening chilling tolerance of rice varieties have been developed. An anti-aging drug from Chinese medicinal herbs has been isolated and identified.