

荚膜红假单胞菌膜结合态氢酶 生理电子受体性质的研究

朱长喜 陈秉俭 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

对光合细菌荚膜红假单胞菌 F 菌株的部分纯化膜结合态氢酶进行了分离, 此酶虽能催化氢的可逆氧化还原反应, 但主要行使吸氢功能, 其吸氢活性是放氢活性的 100 倍左右。在吸氢反应中, 对电子载体 MB 的 K_m 为 $10.4\mu M$; 此氢酶放氢活性的最适 pH 为 7.2, 电子载体为 MV, 阴离子 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 和 SO_4^{2-} 对放氢活性有不同程度抑制。同时, 过渡金属阳离子 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 以及极性溶剂 Me_2SO 对其放氢活性也有抑制作用。

细胞色素 C_3 作为电子载体可参与氢酶放氢反应; 在氢酶存在下, 细胞色素 C_3 能被分子氢还原。而在相同测定条件下, Fd 支持的氢酶放氢活性却很低, 并且很难被氢-氢酶体系所还原。基于这些结果, 对氢酶的生理电子受体性质进行了讨论。

关键词 荚膜红假单胞菌; 膜结合态氢酶; 天然电子受体

氢酶是一个古老的酶, 它参与电子传递与视为原始能量偶联系统的氢氧作用相联系, 所以涉及氢酶的氢代谢。在研究微生物的共同祖先生物能力学方面是很重要的^[1,2]。过去十余年, 由于生物固氮和能源危机大大促进了对氢酶的研究^[3,4], 但至今只对几个细菌氢酶有了认识, 不同来源的氢酶, 它们的生理电子受体性质各异。而紫色非硫光合细菌氢酶的生理电子受体性质尚属未知。

我们已经报道过荚膜红假单胞菌 *Rhodospseudomonas capsulata*, 氢是支持固氮活性的电子供体^[5], 以及该菌氢酶的一些生理和催化性质^[6,7]。本文进一步报道影响此膜结合态氢酶放氢活性的因素, 以及细胞色素 C_3 可以作为氢酶生理电子受体的证据。

材料与方 法

(一) 菌种及菌体培养条件

荚膜红假单胞菌 *Rps. capsulata* 菌株 F, 按前述以 DL-苹果酸和 L-谷氨酸分别为碳、氮源的 O'nerod 培养基中生长^[8], 菌体光照培养 4 天后, 用连续离心机收集并新鲜使用。

(二) 化学试剂

甲基紫精 (MV) 和苜基紫精 (BV) 系 Roth 公司产品; Triton X-100、二硫苏糖醇 (DTT)、DEAE-52 纤维素、铁氧还蛋白 (Fd, 菠菜) 分别为 Koch-light, Serva Whatman, Sigma 公司产品; 马心细胞色素 C_3 、Vitaman K, 分别为上海牛奶公司、东风试剂厂产品。其余化学试剂亚甲蓝 (MB)、二甲亚砷 (Me_2SO)、 Na_2SO_4 、 $HgCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、KI、KBr 和 KCl 均为国产分析试剂。5A 分子筛为国产色谱纯。

(三) 天然电子载体细胞色素 C_3 、Fd 的制备
按前法分离纯化获得细胞色素 C_3 ^[9] 和 Fd^[10]。

(四) 氢酶活性的分析方法

1. 放氢活性: 按我们改进的 Rao 方法^[6] 进

本文于 1985 年 6 月 24 日收到。

本所技术室张正福、纪来昇及中国科学院上海药物研究所庞大伟同志在超离心中给予了大力协助, 特此致谢。

行测定。以 2.5mM MV 作为电子载体, 100mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 作为还原剂, 反应后的气体试样用配有 5A 分子筛柱和热导池的上海分析仪器厂-100 型气相色谱仪检测。在 3.5ml 严密封闭的反应瓶内进行反应, 内含 0.5ml 酶液, 0.1ml MV, 0.8ml 25mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2)。反应体系经多次抽气充氩达到无氧条件, 后置于 28°C 水浴中振荡 5 分钟。以注入 0.1ml 新鲜配制的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液开始反应, 连续振荡一定时间后, 吸取 100 μl 气体注入气相色谱仪进行检测。

2. 吸氢活性: 氢酶的吸氢活性按前报道用减压法测定, 以 MB 作为电子受体^[1]。

(五) 其它方法

蛋白质含量测定按 Rowry 方法^[11], 以牛血清白蛋白为标准; 光谱分析和 pH 值测定分别在 751-A 分光光度计和 PHS-3 酸度计上进行。

结 果

(一) *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶的分离

已知 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶具有氧敏感和冷不稳定特性, 因此所有分离步骤均在厌氧和 20°C 左右条件下进行, 并且使用含有 1mM 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的缓冲液。主要分离方法与前报道相似^[6], 菌体经超声破碎 40, 000 $\times g$ 离心 30 分钟 (4°C), 上清液于 190, 000 $\times g$ 离心 60 分钟后, 将沉淀溶于适量缓冲液中, 经 0.2% Triton X-100 室温处理 60 分钟, 再于 105, 000 $\times g$ 离心 60 分钟 (10°C), 上清液在 55°C 加热 5 分钟, 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 部分沉淀, 然后厌氧透析 24 小时, 最后将酶液通过 DEAE-52 离心交换层析柱, 以 0.01—0.40 M NaCl 直线梯度洗脱, 氢酶活性处于 0.18 M NaCl 离子强度的洗脱液中, 洗脱行为如图 1 所示。

此膜结合态氢酶的吸氢活性远大于放氢活性, 前者为后者的 100 倍左右。表明氢酶主要行使吸氢功能, 这与氢酶粗提取

液的结果是一致的^[7]。根据氢酶最适吸氢反应条件, 改变电子受体 MB 浓度, 进而测定其吸氢活性, 两者呈线性关系, 用双倒数作图, 其 K_m 为 10.4 μM (图 2)。同时, 观察到在氢气相、20°C 保存时, 氢酶吸氢活性在 2—3 天明显降低, 而放氢活性变化不大。

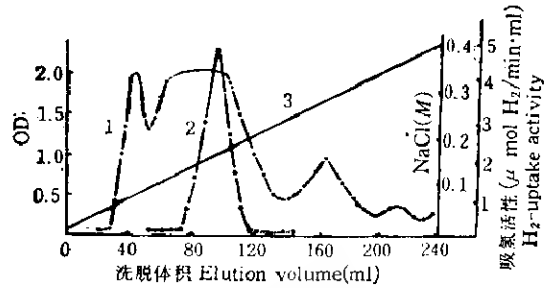


图 1 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶的洗脱行为
Fig. 1 Elution pattern of membrane-bound hydrogenase in *Rps. capsulata* from a DEAE-52 column

1. OD 280nm
2. 吸氢活性 H_2 -uptake activity
3. [NaCl] 直线梯度 gradient

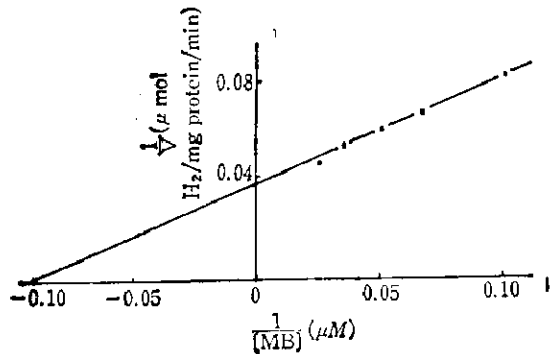


图 2 MB 浓度与 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶吸氢活性的相互关系
Fig. 2 Effect of methylene blue concentration on H_2 -uptake activity of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata*

(二) 放氢活性的最适反应条件

氢酶活性的最适反应条件与其来源有关^[2]。为了研究氢酶的活性, 我们观察了 pH 人工电子载体等对放氢活性的影响(图

3)。 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶放氢活性的最适 pH 为 7.2, 这与一般认为氢酶放氢活性应处于较低 pH 有所不同, 当 pH 5—6 时, 放氢活性反而降低。

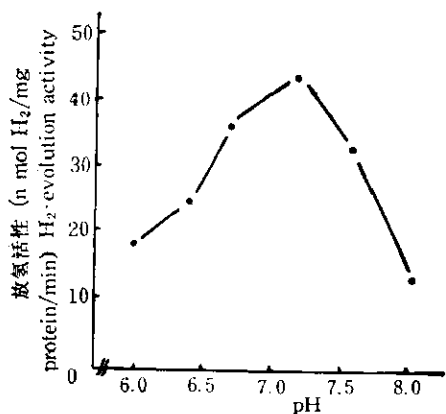


图3 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶放氢活性的最适 pH 值

Fig. 3 pH dependence of H₂-evolution activity of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata*

一些人工电子传递载体对氢酶放氢活性的影响如表 1, 以 MV 作为电子载体时, 氢酶具有较大的放氢速率, 而其它人工电子载体, 例如 BV、MB, 放氢速率都比较低, 分别为以 BV 时放氢速率的 1/2 和 1/3 左右, 这与其它来源的氢酶性质是一致的。

(三) 盐和极性溶剂对氢酶放氢活性的影响

氯化钠对 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶粗提液的吸氢活性有抑制作用^[6]。现在又观察到部分纯化的膜结合态氢酶放氢活性也明显被 NaCl 抑制。当 NaCl 浓度为 0.15M 时, 抑制作用为 35% 左右, 0.40M 时达 90% 左右。同系列化合物 KF、KBr、KI 以及 Na₂SO₄ 对氢酶放氢活性也有抑制作用, 其程度也颇为相似(图 4)。因此在研究氢酶放氢活性的动力学性质时, 需保留一定的离子强度。

另外, 极性溶剂如 Me₂SO, 对氢酶放氢活性也有影响。Me₂SO 对放氢活性的抑

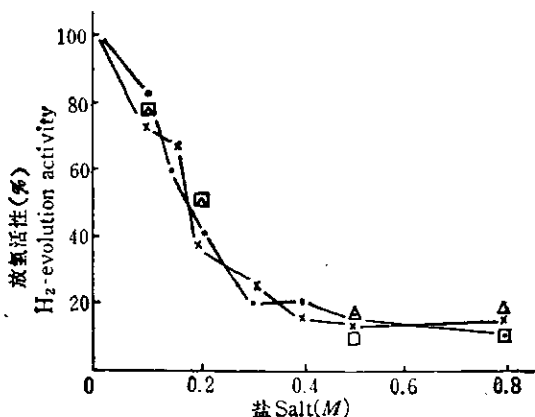


图4 不同盐浓度对 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶放氢活性的抑制作用

Fig. 4 Effect of salts on H₂-evolution activity of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata* ×——× NaCl; ·——· Na₂SO₄; △——△ KF; □——□ KI

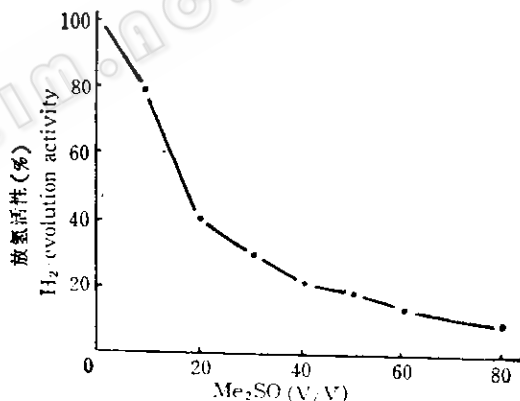


图5 极性溶剂 Me₂SO 对 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶放氢活性的抑制作用

Fig. 5 Effect of Me₂SO on H₂-evolution activity of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata*

制作用如图 5。随加入的 Me₂SO 浓度增加, 其放氢活性显著降低, 当浓度达到 20% 时, 其放氢活性为起始活性的二分之一。

(四) 抑制剂对氢酶放氢活性的影响

已知一些过渡金属化合物和硫氰试剂对氢酶活性有不同程度的抑制作用^[2,3]。上述试剂对此膜结合态氢酶以 MB 为电子受体的吸氢反应活性的抑制如表 2 所列。这

表1 不同人工电子载体参与 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶放氢活性的比较
Table 1 H_2 -evolution activity of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata* with various artificial electron carriers

电子载体 Electron carrier	放氢活性 H_2 -evolution activity ($n \text{ mol } H_2/\text{mg protein}/\text{min}$)
$Na_2S_2O_4$ (5mM)	2.61
NADPH (5mM)	6.21
MB (25mM) + $Na_2S_2O_4$ (5mM)	7.27
BV (25mM) + $Na_2S_2O_4$ (5mM)	11.06
MV (25mM) + $Na_2S_2O_4$ (5mM)	24.91

表2 抑制剂对 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶吸氢和放氢活性的影响
Table 2 Effect of inhibitors on H_2 -uptake and H_2 -evolution activities of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata*

抑制剂 Inhibitor	吸氢活性 H_2 -uptake activity ($\mu\text{mol } H_2/\text{mg protein}/\text{min}$)	抑制(%) Inhibition	放氢活性 H_2 -evolution activity ($\text{nmol } H_2/\text{mg protein}/\text{min}$)	抑制(%) Inhibition
无 none	4.21	0	58.9	0
DTT (1 mM)	3.96	10.3	28.8	51.1
$FeSO_4$ (1 mM)	2.01	52.2	43.1	26.7
$CuSO_4$ (1 mM)	1.48	65.5	38.5	34.6
$HgCl_2$ (1 mM)	2.58	38.7	40.8	32.5

些结果与前报道相似^[6], 结果表明, 只有 DTT 对放氢活性有较明显的影响。

(五) 细胞色素 C_3 和 Fd 参与氢酶放氢活性的比较

前已报道细胞色素 C_3 可以作为电子载体参与 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶的放氢活性^[7]。我们又进一步对同源 Fd 以及菠菜 Fd 参与氢酶放氢活性的可能性进行了比较(表 3)。外源菠菜 Fd 不能作为电子载体参与氢酶的放氢活性, 同源 Fd 虽能参与, 但活性较低。只有同源细胞色素 C_3 作为电子载体时, 才具有较高的放氢活性。马心细胞色素 C_3 和维生素 K_3 等不能参与氢酶活性。这一现象在硫酸盐还原细菌^[12-13] 和桃红荚硫氢菌中也有类似报道^[14]。

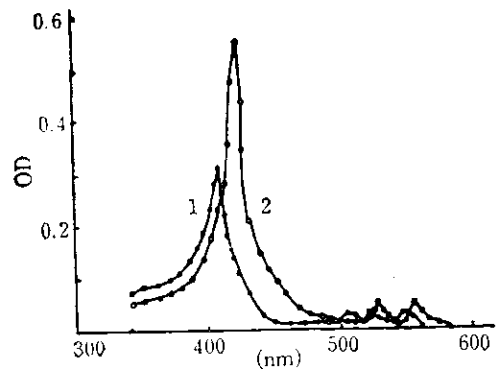


图6 细胞色素 C_3 的吸收光谱
Fig. 6 The spectra of cytochrome C_3
1. 氧化态 2. 以氢-氢酶还原后的吸收光谱
1. Oxidized cytochrome C_3
2. Spectrum of the cytochrome C_3 reduced by H_2 -hydrogenase

(六) 细胞色素 C_3 被氢气-氢酶体系的还原作用

表3 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶用各种电子载体时的放氢活性
Table 3 H_2 -evolution activity of membrane-bound hydrogenase from *Rps. capsulata* with various electron carriers.

电子载体 Electron carrier	放氢活性 H_2 -evolution activity (n mol H_2 /mg protein/min)
无 None	0.45
菠菜铁氧还蛋白 Ferredoxin (spinach) (0.9 μ mol)	0.96
光合细菌铁氧还蛋白 Ferredoxin (<i>Rps. capsulata</i>) (0.9 μ mol)	2.67
细胞色素 C_3 Cytochrome C_3 (0.124 μ mol)	9.86
细胞色素 C_3 + 铁氧还蛋白 Cytochrome C_3 (0.124 μ mol) + ferredoxin (0.9 μ mol)	6.53
细胞色素 C_3 + MV Cytochrome C_3 (0.124 μ mol) + MV (5 μ mol)	26.4

电子载体能否被氢气-氢酶体系所还原是确定氢酶生理电子受体的另一个证据。细胞色素 C_3 在厌氧的氢气相下,经充分作用,能被 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶所还原。将细胞色素 C_3 样品和 Tris-HCl 缓冲液置于具有圆口并匹配橡皮塞的比色杯中,形成严密的封闭体系,多次抽气充氢,达到无氧程度,测定其氧化态吸收光谱,特征吸收峰为 408nm 和 520nm;然后在厌氧条件下,注入 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶于比色杯内,20℃ 左右放置 24 小时使其充分作用,进而测其吸收光谱,特征吸收峰为 420nm、520nm 和 553nm,作用时间越长,细胞色素 C_3 被还原得越充分(图 6)。

与细胞色素 C_3 相反,天然 Fd 在同样条件下(除静置反应于 4℃ 外)都很难被 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶所还原,若加入细胞色素 C_3 ,Fd 能被还原,但不明显。

表明膜结合态氢酶能直接偶联于细胞色素 C_3 ,而 Fd 不可能作为氢酶的直接底物,但它能够通过细胞色素 C_3 间接还原,这一结果与 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶以细胞色素 C_3 作为电子载体的放氢活性是一致的。

讨 论

氢酶能催化分子氢的可逆氧化还原反应,一般用公式 $H_2 + \text{电子载体} \rightleftharpoons H^+ + \text{还原电子载体}$ 来表示,已知氧化还原染料 MV 可以作为人工电子载体参与不同菌种来源氢酶催化的吸氢和放氢反应。我们的试验结果与此基本一致。但是,在氢酶催化的吸氢反应中,MB 比 MV 更适于作为电子载体,显示出较高的活性。不同菌种来源氢酶的生理电子载体性质有很大不同。一些好氧、厌氧菌的生理电子载体已被确认,而光合细菌除桃红荚硫菌可能是细胞色素

C_2 之外, 还很少报道^[14]。我们从 *Rps. capsulata* F 菌株中, 分别得到具有较高活性的氢酶, 能够催化以化学方法还原细胞色素 C_2 的放氢反应(表 3), 并且细胞色素 C_2 能在氢酶存在下, 被分子氢还原(图 6); 但该酶催化以化学方法还原 Fd 的放氢反应速率却很小, 并且只有少量的还原 Fd 存在于 H_2 -氢酶反应体系。根据以上结果以及细胞色素 C_2 参与分子氢支持的 *Rps. capsulata* 固氮酶乙炔还原活性^[5], 我们认为 *Rps. capsulata* 膜结合态氢酶的生理电子载体可能是细胞色素 C_2 。

在 Chen 和 Mortenson^[15] 从巴氏梭菌中首次分离纯化得到均一状态氢酶以前, 生理电子载体的确定采用部分纯化的氢酶进行。近年来, 较多使用纯酶。由于氢酶对氧比较敏感, 热稳定性不同, 而且它通常以膜结合态存在, 所以氢酶纯化比较困难。*Rps. capsulata* 氢酶也具有这些特性, 纯化样品尚未得到。部分纯化和均一状态氢酶的生理电子受体性质有何差异, 有待进一步研究。

在氢酶催化氢的可逆氧化还原反应中, 质子既是反应产物, 又是反应底物。因此, 反应速率必然受质子浓度的影响, 最大反应速率处于一定的最适 pH 范围。一般放氢反应大多 pH 较低, 吸氢反应反之。然而, *Rps. capsulata* 部分纯化膜结合态氢酶的吸氢和放氢反应的最大速率却有不同, 最适 pH 都接近中性, 类似现象在其它细菌中也有报道^[16,17]。近年来, 已发现氢酶的活性和最适 pH 与某些因素有关^[18], 例

如: 氢的氧化还原电位, 人工和天然电子载体电位, 氢酶催化活性中心官能团的酸碱性质以及电位。因此, 来源不同的氢酶, 在不同的分析条件下有不同的 pH 值。对于 *Rps. capsulata* 的氢酶, 前述的异常现象是如何引起的, 以及它的结构有何不同, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] LeGall, J. G. et al.: Iron Sulfur Proteins, John Willway & Sons, New York, p. 111—244, 1982.
- [2] Adams, M. W. W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 594: 105—176, 1981.
- [3] Mayhew, S. G. and M. E. O'Connor: *Trends Biochem. Socie.*, January, p. 18—21, 1982.
- [4] Weaver, P. F. et al.: *Soar. Energy*, 24: 3—45, 1980.
- [5] 宋鸿遇等: 中国科学, B 辑, 28: 143—150, 1985.
- [6] 朱长喜等: 植物生理学报, 10: 147—155, 1984.
- [7] 朱长喜等: 科学通报, 29: 65—67, 1984.
- [8] 宋鸿遇等: 植物生理学报, 5: 236—243, 1979.
- [9] 朱长喜等: 植物生理学报, 6: 299—307, 1980.
- [10] 朱长喜等: 生物化学与生物物理学报, 16: 276—284, 1984.
- [11] Lowry, O. H. et al.: *J. Biochem.*, 193: 165—275, 1951.
- [12] Yagi, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 153: 699—705, 1968.
- [13] Grande, H. J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 131: 81—88, 1983.
- [14] Gogotov, I. N. et al.: *Biochimie*, 60: 315—320, 1978.
- [15] Chen, J. S. and L. E. Mortenson, *Biochim. Biophys. Acta* 371: 283—293, 1974.
- [16] Schneider, B. and H. G. Schlegel: *Biochim. Biophys. Acta*, 453: 66—80, 1976.
- [17] Arp, D. J. and R. H. Burris: *Biochim. Biophys. Acta*, 570: 221—230, 1979.
- [18] Chen, J. S.: Hydrogenase: Their Catalytic Activity, Structure and Function, E. Giltze KG, Gottingen, p. 57—81, 1978.

STUDIES ON THE PROPERTIES OF THE NATURAL ELECTRON ACCEPTOR OF MEMBRANE-BOUND HYDROGENASE FROM *RHODOPSEUDOMONAS CAPSULATA*

Zhu Changxi Chen Bingjiang Song Hongyu

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

A membrane-bound hydrogenase was isolated from *Rhodopseudomonas capsulata* strain F. This enzyme acted as a reversible hydrogenase although the rate of H₂-evolution was lower than that of H₂-uptake. The apparent K_m for MB in H₂-uptake reaction indicated as 10.4 μM. The H₂-evolution activity of the enzyme shows an optimal pH around 7.2, and MV could be the artificial electron carrier. The H₂-evolution activity was inhibited by F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻ and SO₄²⁻; Fe²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺,

DTT (asulphydryl reagent), as well as Me₂SO inhibited its activity also.

It was found that cytochrome C₈ may be the natural electron acceptor of membrane-bound hydrogenase from *Rhodopseudomonas capsulata*.

Key words

Rhodopseudomonas capsulata; Membrane-bound hydrogenase; Natural electron acceptor