

线粒体的结构与功能*

杨福愉

(中国科学院生物物理研究所)

线粒体是细胞的一个重要细胞器。它通过呼吸作用为细胞各项活动提供能量,有细胞“动力站”之称。在一般情况下,凡真核细胞都有线粒体。在植物细胞中,除线粒体外,叶绿体亦是一个能量转换器。它将光能转化为化学能并主要贮存于碳水化合物的化学键中。线粒体则通过氧化作用将光合作用产物的化学键中的能量逐步释放出来,供给细胞各种活动使用。

线粒体是1898年 Benda 首先命名的。Mitochondrion 来源于希腊字 (Mitos——线, Chondros——颗粒)。在线粒体命名之前,1850—1890年期间已经有不少科学工作者在显微镜下观察到动物细胞内含有这种形态的结构。1890年德国 Altmann 认为:细胞中这种颗粒与细菌很相似。可能是共生于细胞内能独立自主生活的有机体。他称之为“基本的活颗粒”(bioblast)。但当时这一假说(“内共生假说”)并没有引起注意,更没有被大家所接受。在20世纪初期在植物细胞中亦发现了线粒体。

由于技术方法的限制,线粒体研究在很长时间内仅仅停留在形态观察上,无法对其结构和功能进行细致的研究。1934年 Bensley 与 Hoerr 企图从肝组织中分离线粒体,但没有获得成功。1940年 Claude 改进了分离方法。1948年经 Hogeboom, Schneider, Palade 等人进一步努力才比较成熟地建立了用分步离心来分离线粒体的方法。从此线粒体的生化研究才逐步开展起来。开始阶段对线粒体的脂肪酸氧化和三羧酸循环进行了研究,1950年前后才扩展到电

子传递和氧化磷酸化方面。1952—1953年美国 Palade 和瑞典的 Sjöstrand 各自利用电镜超薄切片技术观察到线粒体的精细结构。从此线粒体结构与功能的研究进入到一个新的阶段,两者相互配合,相互促进使这方面的工作得到迅速的发展。

1963—1964年又确定线粒体有DNA存在,以后继续发现它还具有自我繁殖所需的基本组份(包括DNA、DNA聚合酶、RNA聚合酶、核糖体、转移-RNA,氨基酸活化酶等等)。这样,线粒体的研究又增加了新的内容。七十年代以来线粒体自主性和生物发生的研究一直非常活跃。与此同时,早在19世纪后期 Altmann 提出的“内共生的假说”又重新流行起来。

从线粒体正式命名到现在不过79年,由于生化研究与电镜技术(如负染、冰蚀等等)的不断改进与创新,线粒体结构与功能的研究一直发展很快,近年来随着分子生物学尤其是生物膜、生物能力学和分子遗传学的发展,使具有精细结构、多样功能的线粒体的研究更加广泛、更加深入。

线粒体的研究不仅具有理论上的意义,而且在实际应用方面也日益引起人们的注意。近年来在农作物育种方面,在肌肉病、克山病、肿瘤等病变机理方面亦开展了不少研究,下面就线粒体结构与功能研究的几个方面作一简单介绍。

* 1977年8月全国细胞培养与体细胞杂交、线粒体呼吸代谢与杂种优势会上综述报告。

一、线粒体结构的共同性和变异性

在光学显微镜下线粒体呈很小的球、棒状或细丝状。通过电镜观察可以显示线粒体的精细结构,图版 I 图 1, 2, 3 分别是蝙蝠胰细胞、大鼠淋巴细胞和玉米的线粒体电镜图。从图中可以看出,线粒体由内、外两层膜组成。内膜向线粒体的中心腔内陷形成嵴。图 1 和图版 II 图 4 是线粒体的模式图。

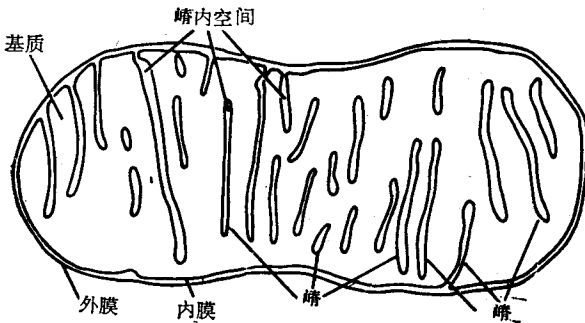


图 1 线粒体模式图

线粒体一般直径为 0.5—1.0 微米,长 3 微米左右。但有的线粒体较大,直径为 2—3 微米。最大的可达 7 微米。这种线粒体称为“巨大线粒体”^[1]。

每个细胞内线粒体的数量也有很大的差异。最少的每个细胞只含一个线粒体,最多的可达 300,000 (卵母细胞)甚至 500,000 [一种巨大变形虫 (*Chaos chaos*)]。大鼠肝细胞平均有 800 个 (500—1,400) 线粒体。植物细胞线粒体含量一般比动物细胞要少一些。

在整体细胞内线粒体的外形除常见的杆、圆形外,有的呈环形(对数生长期的四膜虫线粒体)、哑铃形(羊齿植物愈伤组织线粒体)、星形、Y 形等等^[2,3]。

从线粒体内部结构来看,各种细胞亦存在着很大的变异性。大多数细胞线粒体内膜内折形成片状的嵴,它们与线粒体的长轴相垂直。但也可观察到与长轴相平行的嵴(图版 II 图 5)。嵴可以是单条的,也可以分支而形成复杂的网状。有的还可以观察到同心圆型的嵴(大鼠软上颌

肌线粒体)^[2]。线粒体内膜的内折可以管状来替代片状(图版 II 图 6),这在植物细胞比较普遍。变形虫 (*Chaos chaos*) 的线粒体的嵴不仅呈管状而且组成网状与波形相结合的复杂结构^[2]。

嵴的数目也可能有很大的差异。有的线粒体内部充满着嵴(如蝙蝠甲环肌线粒体,图版 II 图 7),有的则很稀少(如肝线粒体)。一般讲,能量需要较多的细胞,线粒体数量较多,其内部结构亦比较复杂;反之,线粒体数量较少,嵴的数量亦不多。

同一类细胞在不同生理条件下线粒体也会发生明显的变化,例如,在冬眠末期蝙蝠褐脂肪组织的线粒体不仅数量多,而且嵴的密度亦大^[1]。因为,在即将苏醒的情况下,脂肪细胞不仅需要将碳水化合物转变为脂肪,而且还需要通过脂肪分解来提供热量以升高体温。这都需要增加线粒体的数量,加强活动。

外界环境因素亦会引起线粒体结构与功能的变化。当冬小麦经过低温阶段进入初冬时,其幼叶细胞中的线粒体数量增加,形状变大,嵴的数目亦增多,不耐寒的春小麦细胞中的线粒体没有类似的变化^[4]。动物受电离辐射整体照射后脾脏、胸腺、肝脏等细胞线粒体的结构与功能在早期即发生变化^[5]。

在机体发育和分化过程中,线粒体的变化亦是很显著的。例如,蝗虫 *Locusta migratoria* 的飞翔肌在变态过程中线粒体数量大幅度增加,蜕皮前 8 天线粒体只占肌肉细胞 6%。蜕皮后增至 30%。在此期间肌肉细胞亦增长 10 倍。因此实际上线粒体增加了 50 倍^[6]。植物线粒体的结构与分化亦有密切的关系。从玉米幼苗分离的线粒体是几种类型的混合物。这些类型分别与离体线粒体的收缩、膨胀及其中间类型很相似。有人认为,这可能反映不同分化程度的细胞所含线粒体的差异性。成熟细胞的线粒体可能类似收缩型(嵴的数目较多,基质占的体积较小,电子密度较大),不成熟细胞的线粒体可能类似膨胀型(嵴的数量较小,基质比例较大,电子密度较小)^[7]。

在细胞病变过程中,线粒体也伴有明显的变化。如多发性肌炎病人的骨骼肌线粒体含有一种特殊类结晶形结构,它具有周期性暗和明的区带图型^[8],人类原发性肝癌线粒体嵴的数量显著减少^[9]。当某些病毒引起植物病变时,线粒体会出现异常的变化。如,一种从苹果分离出的 HMV-A 病毒感染草本植物 *Chenopodium* 后,能使叶肉细胞中 10% 的线粒体产生肥大现象,它们比正常线粒体直径扩大 10—15 倍。用一种烟草裂碎病毒(tobacco rattle virus)接种 5 天后,烟叶(*Nicotiana glauca*)叶尖的海绵状叶肉细胞 80% 以上线粒体的表面都附有病毒颗粒,但其它亚细胞结构并没有观察到类似现象。同时,被感染细胞的线粒体内部的电子密度亦比正常大大增加(图版 III 图 8)。

二、线粒体内膜的超细微结构和功能

线粒体是细胞进行呼吸作用的重要场所。其中含有催化三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸分解、电子传递、偶联磷酸化等有关的酶和辅酶共 100 余种。它们有序地构成高度组织的系统来进行各种反应。生物化学、细胞化学结合电子显微镜以及免疫反应等研究结果表明,催化三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸分解、蛋白质合成等有关酶系以及 DNA、RNA 都分布在基质中。很多脱氢酶、电子传递、偶联磷酸化的酶系(这三部分约占内膜蛋白 35%)以及一些运转载体(如,二羧酸载体、三羧酸载体、L-谷氨酸载体、 Ca^{++} 载体,嘌呤核苷酸载体等)都位于内膜和嵴上。线粒体外膜在组份和酶的分布方面与

内膜比较都有很大的差异。综上所述,从能量转换角度来考虑,线粒体内膜显然起着主要作用,因而对它的结构与功能亦进行了更多的研究。

1. 线粒体内膜“基本单位”的结构与功能

早在 50 年代,呼吸链和偶联磷酸化酶系的研究已经开始,60 年代初美国 Green 及其共同工作者从牛心线粒体分离出电子传递颗粒 ETP (直径为 100—150 埃,长度为 445 埃)它们能酶促还原辅脱氢酶 I ($\text{NADH} \rightarrow \text{O}_2$ 和琥珀酸 $\rightarrow \text{O}_2$)。换言之它们具有呼吸链的全部组份。Green 学派进一步对呼吸链的组份及其顺序作了研究并成功地拆离成四个复合物,在一定条件下还可以按 1:1:1:1 的比例重新将它们组合成基本上恢复原有活力的完整单位。四个复合物的组份及其在呼吸链上的顺序总结于图 2。Green 学派根据电子传递颗粒(ETP)的研究结果,认为线粒体内膜可能含有很多象 ETP 那样的功能单位。Green 的研究结果和设想引起电镜学家 Fernández-Morán 极大的兴趣。他们共同协作想从形态上来验证功能单位的存在。通过采用低温电镜检术和负染技术于 1960—1961 年在视杆细胞和牛心、鼠肝线粒体嵴的两侧成功地观察到圆或多面形颗粒(图版 III 图 9)其直径约为 80—100 埃。他们称这些重复单位为“基粒”。如果将电镜照片进一步放大还可以观察到“基粒”以短柄与嵴相联结。基粒比 ETP 要小得多,但后者除含有氧化还原功能蛋白外还有“结构蛋白”、类脂等其它组份。因此 Green 学派认为电子显微镜所观察到的基粒也就是线粒体膜上电子传递的功能单位,它们含有四个复合物所组成的能催化 $\text{NADH} \rightarrow \text{O}_2$ 和琥珀酸 $\rightarrow \text{O}_2$

反应的完整呼吸链。ETP 也许是功能单位和“结构蛋白”、类脂等所组成的复合物。于是他们提出了一个线粒体嵴的超细微结构的模式图(图 3)。嵴两侧表面伸出紧密而均匀的圆形颗粒(直径为 80—100 埃)。每个颗粒各以圆柱形短柄(30 × 50 埃)与嵴的中层相连。短柄之间距离为 100 埃,中层系由“结构蛋白”和

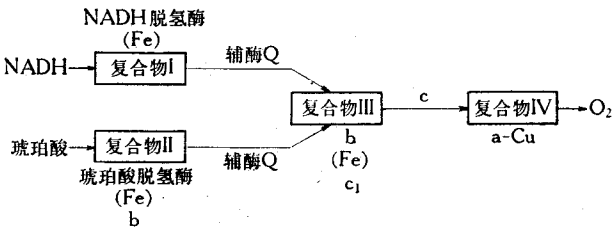


图 2 呼吸链上四个复合物的组份及其结合顺序

a、b、c、c₁ 分别代表细胞色素 a、b、c、c₁。(Fe) 代表非血红素铁

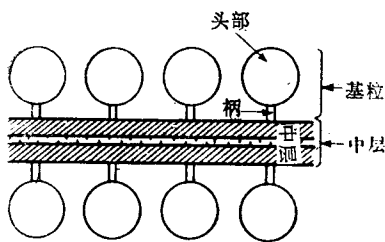


图3 线粒体嵴结构的模式图

(自 Green, D. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 70, 554, 1963)

类脂所占有。

Green 学派根据电镜观察以及生化研究结果提出基粒就是线粒体膜传递电子的基本单位,这的确引起广泛的兴趣和注意。但不少实验室对这种假设表示异议。因为直径为80—100埃的基粒,其分子量不会超过400,000。这样的颗粒容纳不下分子量总和约为1,400,000的呼吸链的全部组份。因此,Green 等就对原来的假设作了修正。认为基本单位应该包括上述三个部分(直径为80—100埃的圆形颗粒,柄部和基部)。根据呼吸链四个复合物的生化性质及其大小,它们可能作如下的分布:复合物IV位于圆形颗粒,复合物III位于柄部,基部则为复合物I和II所占有。

Green 学派对基本单位的假设虽然经过一些修正,但与不少实验室所获得的研究结果仍有很大的矛盾。例如,Chance 等发现,如果用高频声波将大鼠肝线粒体膜97%以上的颗粒去除以后,细胞色素c, a 和 a_3 的含量并未显著减少,氧化NADH和琥珀酸的活力亦并未降低。此外,还有人从另一角度来进行验证。他们将经过超声波处理的牛心肌线粒体进行超速分步离心,分别测定各部分的细胞色素含量和传递电子活力,并用电镜观察。实验结果表明,含有大量直径为90埃颗粒的部分却几乎完全不含有细胞色素,也没有传递电子的功能。这样,人们对电镜观察的颗粒是否就是含有呼吸链的功能单位就不得不表示很大的怀疑。而且,1964年瑞典电镜学家Sjöstrand又提出采用负染技术在线粒体膜上所观察到的颗粒很可能是一种矫作物。这就更加强了上述怀疑。Sjöstrand

认为磷钨酸负染时样品事先未经固定,因而蛋白质和类脂组份很可能从膜内挤出而形成颗粒状结构。很多实验室相继对这个问题进行了验证。结果表明,在下列各种情况下亦都能观察到颗粒状的重复单位^[10]:(1)线粒体95%的类脂被去除;(2)在负染之前线粒体用戊二醛加以固定;(3)未经负染的整体或分离的神经元线粒体的超薄切片同样能观察到很多颗粒。这样,用电镜观察到的,分布于线粒体内膜和嵴上的颗粒是否是矫作物的问题才得到了澄清。它们的存在才被广泛地接受。

那末这些颗粒的生化组份及其功能究竟是什么呢?

Racker 实验室^[11]在研究线粒体偶联因子(F_1)时,发现它具有腺三磷酶的活力。进一步提纯结果表明它就是可溶性的腺三磷酶。分子量为360,000。在电镜观察下它们呈匀一的,直径为85埃的颗粒,与Fernández-Morán观察到的基粒十分相似。进一步的研究表明,分离的亚线粒体经超声等方法处理后,这些颗粒即行消失。这时可溶性腺三磷酶活集中表现在离心后的上清液中,在电镜下可观察到直径为85埃的颗粒。在一定条件下这些颗粒又能重新装回到去腺三磷酶的线粒体内膜上,恢复酶活并在电镜下重现这些颗粒。这样,才弄清电镜下观察到的颗粒就是可溶性腺三磷酶(F_1)。一场持续多年的争论亦得到了答案。线粒体的模式图可以进一步用图4来表示。

对线粒体腺三磷酶的大量研究结果表明,它是一个很复杂的复合体,是偶联磷酸化的关键装置。它由三部分组成(图5):(1)可溶性腺三磷酶即 F_1 ;(2)对寡霉素敏感的蛋白(OSCP);(3)联结蛋白或称疏水蛋白,是偶联磷酸化抑制剂寡霉素或二环己基二亚胺(DCCD)作用的部位。这三个部分相应于Green 学派原来提出的基本单位的头、柄和基部。腺三磷酶复合体的分子量共约448,000, F_1 共有五种亚单位,分子量共约360,000,其中三种亚单位较大(二种可能是表现酶活的主要部分,一种通过OSCP与膜蛋白相结合),另外二种亚单位较小,它们的功能

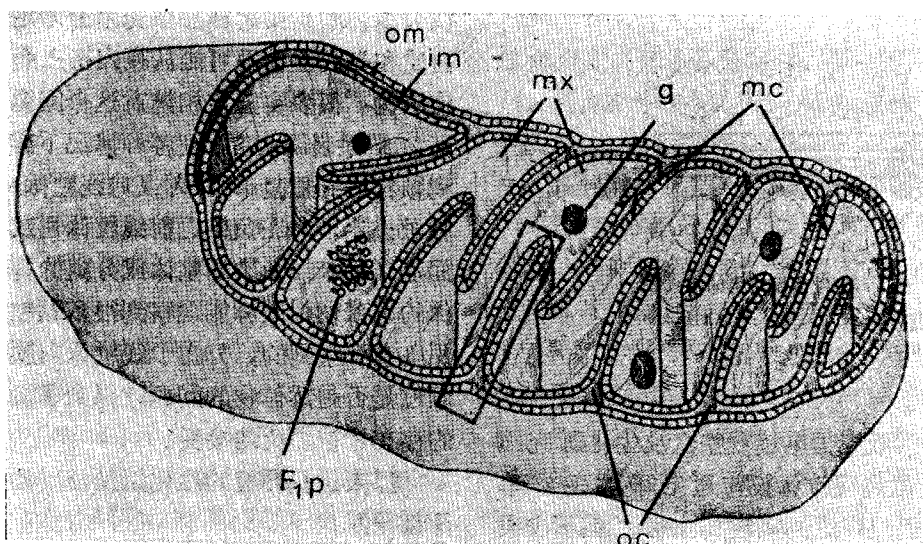


图4 线粒体模式图

om: 外膜, im: 内膜, mc: 嵴, mx: 基质, F_1p : 腺三磷酸酶, oc: 内外膜间隔, g: 颗粒
(自 Robertis, Er D.: Cell Biology, 210, 1976)

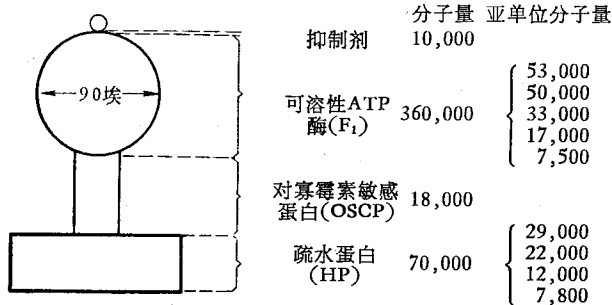


图5 ATP 酶复合体的组份及其亚单位

还不清楚。OSCP 分子量约为 18,000。联结蛋白共有四种亚单位,分子量约为 70,000,可能是质子通道。此外,还有一个分子量约为 10,000 的多肽,它是 ATP 酶复合体的抑制剂,可能具有调节酶活的功能。

2. 呼吸链组份在内膜上的分布

关于呼吸链的组份及其序列已经进行了大量的研究,虽然还存在着一些不同的看法和问题,各种来源的线粒体亦有一定的差异,但基本组份已经搞得比较清楚。它含有两种黄素蛋白,几个铁-硫中心,辅酶 Q,细胞色素 b、 c_1 、c、a 和 a_3 。Green 实验室很早就将整个呼吸链拆离成四个复合物。近年来对它们的组份及其相互比例的研究又有了一定的发展(图 6)。图 6 综合了这方面的研究结果。

关于呼吸链各组份在内膜上的分布情况亦作了不少的研究。通过下列各种研究方法说明它们在内膜上的分布是不对称的:

(1) 专一抗体试验 根据某一组份专一抗体的作用情况进行定位。完整线粒体经过超声处理形成亚线粒体使内膜产生内翻外现象,即原来与基质相接触的嵴膜各组份翻在外面。原来与嵴膜间隔或内外

膜间隔相接触的部分翻到内部(图 7)。这就为研究内膜和嵴上各蛋白组份的定位提供了一个

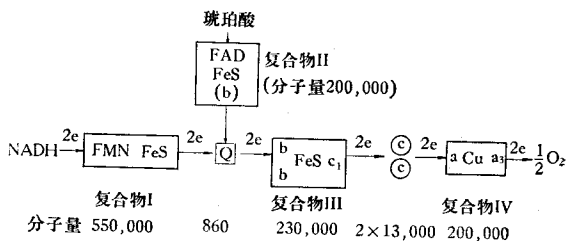


图6 呼吸链的组份及其顺序

(自 Ernster, L.: Biomembranes: Structure and Function 261, 1974)

复合物 I: NADH-辅酶 Q 还原酶,复合物 II: 琥珀酸辅酶 Q 还原酶,复合物 III: QH_2 -细胞色素 c 还原酶,复合物 IV: 细胞色素氧化酶, FMN: 异咯嗪单核苷酸, FAD: 异咯嗪腺嘌呤二核苷酸, FeS: 铁硫中心, b, c, c_1 : 细胞色素 b、c、 c_1 , Q: 辅酶 Q

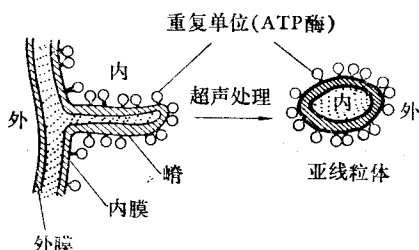


图7 超声处理线粒体形成亚线粒体

有利的条件。例如,加入可溶性 ATP 酶(F_1)的抗体即能完全抑制氧化磷酸化的功能,因而说明它位于亚线粒体的外侧,而在完整线粒体则系位于靠基质的一侧(M 侧): 类似的实验结果列于表 1。

表 1 用膜组份抗体进行定位的实验结果

抗 体	测 试 指 标	线粒体	亚线粒体
F_1 抗 体	P:O	不抑制	抑 制
细胞色素 c 抗体	琥珀酸氧化	抑 制	不抑制
细胞色素 c_1 抗体	珀琥珀酸氧化	抑 制	不抑制
细胞色素氧化酶抗体	还原型细胞色素氧化	抑 制	抑 制

以上结果间接说明,细胞色素 c, c_1 系位于线粒体靠嵴内间隔和内外膜间隔一侧(C 侧)。细胞色素氧化酶则横跨嵴和内膜。

(2) 标记“修饰”化合物的参入试验 利用一些标记“修饰”化合物能与膜表面组份作用而不能透过膜的性质亦能测定膜组份的分布情况。将 [35 S] 重氮苯磺酸即 [35 S] DABS 与线粒体亚线粒体进行结合,测定其参入情况并与分离状态的蛋白质加以比较,就可以判断它们的定位(表 2)。表 2 总结了利用这个方法测得 F_1 、细胞色素 c、细胞色素氧化酶的定位结果,它们与专一抗体定位法所得结果十分相似。[35 S] DABS 参入分离状态的细胞色素氧化酶远比完整线粒体或亚线粒体要多得多,这说明这个酶

表 2 [35 S] 重氮苯磺酸参入线粒体膜的表面组份

组 份	[35 S] DABS 每分钟计数 (cpm)		
	从线粒体分离	从亚线粒体分离	分离状态蛋白质
F_1	80	1514	1450
细胞色素 c	758	100	783
细胞色素氧化酶	265	197	1580

很大部分是“埋藏”在膜的内部。换言之,整个酶的分子是跨膜分布的。

根据上述二种方法的研究结果,对于呼吸链各组份和 ATP 酶复合体在线粒体内膜和嵴两侧的不对称分布情况可用图 8 表示。近年来有人应用电镜冰蚀制片技术研究线粒体内膜的内部结构也支持内膜蛋白质分布的不对称性。

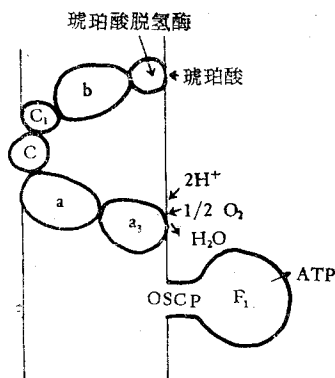


图 8 呼吸链组份在线粒体内膜上的不对称分布

b、c、 c_1 : 细胞色素 b、c、 c_1 ; F_1 : 可溶性 ATP 酶; a + a_3 : 细胞色素氧化酶; OSCP: 对寡霉素敏感蛋白

呼吸链各组份和 ATP 酶复合体在线粒体内膜上的分布不仅是不对称而且也是不等量的。ATP 酶复合体: 复合物 III: 细胞色素 c: 复合物 IV = 1:1:2:2。呼吸链各组份和 ATP 酶复合体约占内膜蛋白质 32—40%, 辅酶 Q 的浓度比细胞色素高 5—10 倍, 而复合物 I, II 则比细胞色素浓度低 5—10 倍。

不仅蛋白质, 类脂在线粒体内膜的分布从初步的研究结果来看也是不对称的。例如, 当细胞色素氧化酶在脂质体上重组成功并表现呼吸控制活力时, 在膜的一侧分布有较多量的磷脂酰胆碱^[11]。

综上所述, 人们目前对线粒体内膜上蛋白质和磷脂的分布情况的了解还是很初步的。对于生物膜上蛋白质-蛋白质以及蛋白质-磷脂相互关系的研究, 还有待于新技术的创建和应用。这样才能有助于进一步阐明线粒体内膜的三维结构, 更深入地探讨其结构与功能的关系。

3. 氧化磷酸化的作用机理

在线粒体中呼吸作用是一个释放能量的过

程。在这个过程中能量水平较高的电子经过呼吸链传递降到能量较低的水平,最后电子和 H^+ 结合氧形成水。在此过程中能量是逐步释放的。被释放的能量主要转化成 ATP 形式贮存并供给细胞使用。整个过程称为“氧化磷酸化”,它是在线粒体内膜上进行的。呼吸链有三个部位进行偶联磷酸化: 从 $NADH \rightarrow$ 辅酶 Q, 辅酶 Q $\rightarrow$ 细胞色素 c 以及还原细胞色素 c $\rightarrow O_2$ (图 9)。进行偶联磷酸化的主要装置是 ATP 酶复合体, 但是由电子传递释放的能量不一定都通过形成 ATP 之后才能利用、含有高能键的中间体可以直接用于 $NADH \rightarrow NADPH$ 的转化, 各种离子的主动运转以及其它过程^[12]。

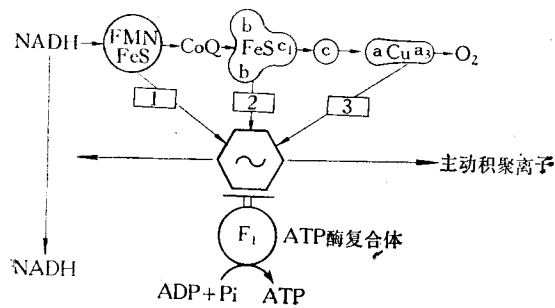
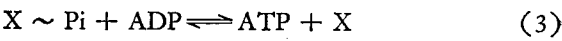
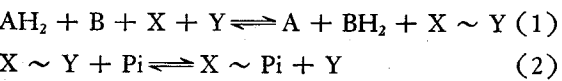


图 9 线粒体呼吸链的氧化磷酸化
1、2、3 表示进行偶联磷酸化的三个部位;
NADH: 还原辅脱氢酶 I; NADPH: 还原辅脱氢酶 II; 其它符号的含意同图 6

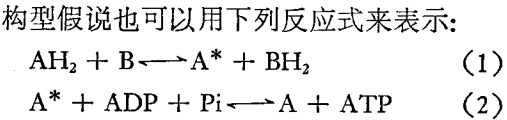
氧化磷酸化的现象早在 20 世纪 30 年代就已发现。几十年来对这个问题虽然进行了大量的研究并获得不少重要进展, 但氧化磷酸化的机理迄今尚未全部阐明。在这方面有许多不同的看法, 归纳起来有三种假说:

(1) 化学假说 化学假说提出的时间最早, 它主要参照在糖酵解过程中 (3-磷酸甘油醛 $\rightleftharpoons$ 1,3-二磷酸甘油酸) 形成高能磷酸键的事实而提出来的。根据化学假说, 电子传递时高能磷酸键的合成是由于化学能的直接转换。电子传递释出的化学能直接转入 ATP 的前体, 而后再生成 ATP。这个假说认为, 化学偶联机理大致可以表示如下:

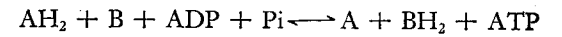


化学假说在氧化磷酸化的作用机理研究的早期曾占有很重要的位置。目前亦还不断有一些实验结果来支持它。但主要的问题在于迄今始终未能分离出含高能键的中间递体。近年来化学假说的一些主要创始人和支持者已经转向构型假说。

(2) 构型假说 随着蛋白质结构研究的进展, 并受到肌肉收缩机理的启发 (ATP 引起肌球蛋白构型变化使肌肉收缩, 收缩的甘油化纤维的伸长会导致 ATP 形成), 又提出了一种构型假说。这种假说设想在电子传递过程中并不形成含高能键的中间递体而是通过蛋白质构型变化来形成 ATP。具体的过程是这样的: 在电子传递过程中氧化还原递体的构型首先发生了变化。这个变化继而引发 ATP 酶分子中形成一个高能共价键。接着后者使 ADP 和 Pi 合成 ATP。



总反应是:



A^* 代表电子 (氢) 递体 A 的高能构型状态。如果将化学假说与构型假说加以比较, 可以看出二者十分相似, 只不过构型假说认为电子传递释出的能量原始不是贮存于共价键中而是积储于蛋白质肽键的立体结构之中。

1973 年以后 Slater, Boyer 等人提出一种新的构型假说。他们发现每克分子可溶性 ATP 酶 (F_1) 内含紧密结合的 3 分子 ATP 和 2 分子 ADP。他们设想这些分子参与了偶联磷酸化过程。Slater 等认为呼吸链电子传递所产生的能量主要用于使 ATP 酶的构型发生变化因而使之紧密结合的 ATP 得以释出 (图 10) Boyer^[13] 等则主张 ATP 酶构型发生变化的结果首先是 ADP、 Pi 与之结合, 与此同时将 ATP 解脱下来。

(3) 化学渗透假说 化学渗透假说是 1961 年英国微生物生化学家 Mitchell 提出的, 但当时并未引起人们足够的注意。1966 年他根据多年来积累的氧化磷酸化实验结果特别是运用了

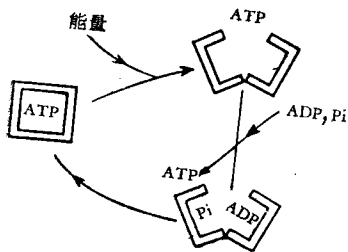


图 10 偶联磷酸化构型假说图解

(自 Slater, E. C.: Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation, 379, 1975)

有关生物膜的概念, 进一步充实了化学渗透假说。目前这个假说已成为研究氧化磷酸化作用机理最流行、最受人支持的一个假说。

化学渗透假说的中心内容是: 呼吸链在线粒体内膜上构成三个回路, 通过电子(氢)传递, 使质子向内膜外侧定向移位, 因而产生了膜电位(膜外侧带正电, 内侧带负电)和质子梯差(图

11)。因此可以把呼吸链看作是一个质子泵, 而由此产生的膜电位和质子梯差是合成 ATP 的动力。化学渗透假说对呼吸链各组份和电子传递过程的想法与一般稍有不同。这表现在; a. NADH 脱氢酶中非血红素铁接受二个电子, 而后 FMN (异咯嗪单核苷酸) 接受二个氢原子。b. 辅酶 Q 的位置在细胞色素 b 与 c_1 之间。当内膜外侧的质子通过 ATP 酶复合体重新泵回膜内侧时, 膜电位和质子梯差消失并使 ADP 偶联成 ATP。化学渗透假说与化学假说的不同在于电子传递所释出的能量最初并非以含有高能键的氧化还原递体来积聚的, 而是转化为质子梯差和膜电位 (图 12)。化学渗透假说的最大特点是突出膜的结构。线粒体内膜和其它能量转换膜对质子和离子的通透性是很差的。这是膜内外两侧产生质子梯差的先决条件。如果膜不完整, 质子能自由出入, 膜电位与质子梯差

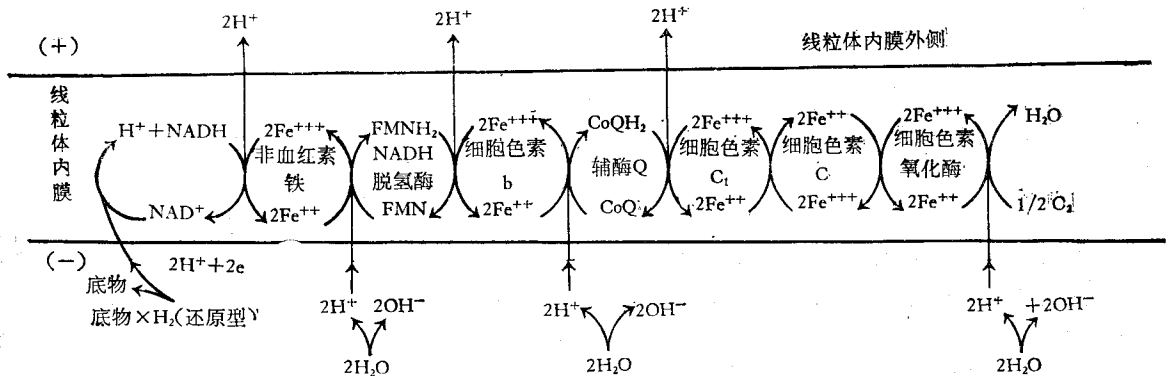


图 11 化学渗透假说图解

(自 De Witt Williams; Biology of the Cell, An Evolutionary Approach, 547, 1976)

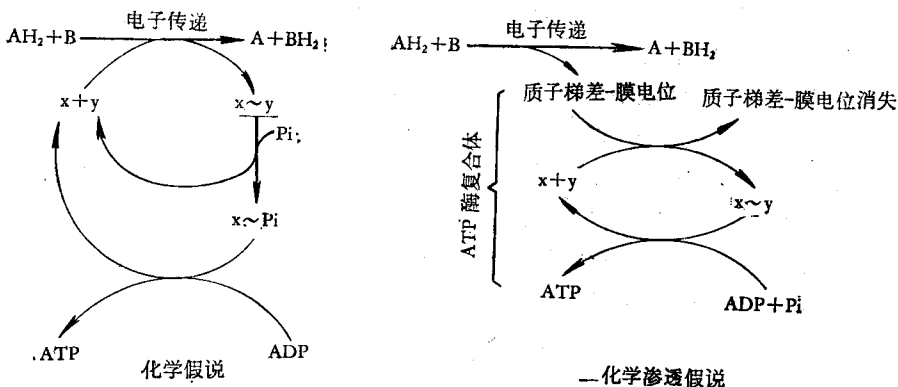


图 12 化学假说与化学渗透假说的比较

亦就无法形成。偶联磷酸化的功能也就无法表现。近年来很多实验结果都支持化学渗透假说。例如,一些消除质子梯差的化合物都具有使磷酸化解偶联的作用。此外,将呼吸链中的电子传递复合物或ATP酶复合物分别提取并在人工膜——脂质体上重组,当进行反应时都能产生质子梯差和膜电位。如果将两者共同组装,在一定条件下还能表现出偶联磷酸化的功能^[4]。

从70年代以来,化学渗透假说获得比较多的支持,但亦存在不少有待解决的问题。其中最困难的是,膜电位与质子梯差是如何合成ATP的?

从目前研究的情况来看,要否定或肯定上述任何一种假说是很困难的,实际上它们之间并不是没有相互联系的地方。因此不应将这三种假说看成是相互排斥的,而应该加以详细分析,吸取它们合理的部分并进一步作深入的研究。这样才能对氧化磷酸化的机理有一个正确的认识。

三、线粒体的自主性

1964年发现线粒体基质中有DNA存在,之后又陆续发现了RNA,DNA聚合酶,RNA聚合酶,核糖体,转移-RNA,氨基酸活化酶等。这意味着线粒体拥有自我繁殖所需的基本组份。这样,人们就自然会提出这样一个问题:线粒体具备的遗传装置能否完全满足其合成子代的全部需要?换言之,它的独立自主程度有多大?此外,在真核细胞内部含有核-质和线粒体两套遗传系统的生物学意义又是什么?

1. 线粒体DNA的大小和信息含量

大多数线粒体的DNA呈环状,它与原核细胞的DNA在大小上有悬殊的差别,而且不同真核生物在线粒体DNA大小上也存在着很大的差异,大多数动物线粒体DNA只有5微米长,分子量约为 10×10^6 daltons (dalton系分子量的单位名称,约等于一个氢原子的重量)。高等植物线粒体的DNA分子约长20微米。酵母线粒体DNA比大多数动物大五倍(约25—26微米

长)。每个线粒体含2—6个这样大小的DNA分子。由于它们似乎都具有相同的碱基顺序,因此从每一DNA分子大小就可以估计其所含的信息量。大多数动物线粒体每一DNA分子所含的信息约为15,000碱基对。根据分子杂交的实验结果,估计其中30%信息用来合成核糖体-RNA和一些转移-RNA(表3),剩余的70%信息仅够合成20个左右蛋白质分子(假定每一个蛋白质分子系由150个氨基酸组成)。从表3可以看出,酵母线粒体DNA比动物线粒体DNA约大五倍。按理,它的自主性应该大得多。但已有的实验结果并不能在这方面提供足够的证据。这是一个值得进一步研究的问题。

表3 线粒体DNA的转录

来 源	线 粒 体 DNA大小 (碱基对)	杂 交 量		
		转移-RNA (4SRNA)	核糖体-RNA	剩余的信息量
HeLa 细胞	15,000	900	3,600	10,500
非洲蟾蜍 <i>Xenopus</i>	15,000	900	3,600	10,500
酵 母	75,000	1,600	3,600	70,000

2. 线粒体遗传装置的功能

研究线粒体的自主性主要利用专一抑制剂,如放线酮能专一地抑制细胞质的蛋白质合成,但对线粒体蛋白质合成则没有影响。氯霉素专一地抑制线粒体蛋白质合成而不影响细胞质的蛋白质合成。有关线粒体自主性的研究大多是采用酵母和链孢霉来进行的。从应用上述二种专一抑制剂的研究结果来看,线粒体核糖体所合成的蛋白质为数极为有限(共只10个左右多肽,其中包括细胞色素氧化酶7个亚单位中的3个较大亚单位,COQH₂细胞色素c还原酶6个亚单位中的1个亚单位,ATP酶复合体中基部4个亚单位)^[4]。看来,动物线粒体大概只有5—10%的蛋白质是由线粒体核糖体自身合成的,换言之线粒体的大部分组份是由细胞核DNA编码,在细胞质的核糖体内合成,然后再与线粒体自身合成的一些组份进行共同组装。值得注意的是,线粒体参与合成的几个酶都是

线粒体内膜表现氧化磷酸化功能的重要组份,都属于疏水蛋白。有人解释线粒体本身合成的疏水蛋白质主要的意义在于能就地利用,免去来回输送。在线粒体核糖体合成的蛋白质的信息是否全由线粒体 DNA 提供的问题迄今也还没有得到确切的证据。如果它们全由线粒体 DNA 编码,那末根据大多数动物线粒体的 DNA 所含的信息量来计算,除提供转移-RNA,核糖体-RNA 以及上述一些酶的亚单位合成以外,所剩的信息就不多了。因此,即使今后还可能发现线粒体合成的其它产物,但预计为数不会太多。

3. 核-质与线粒体遗传系统的相互作用

在一个细胞内含有二套相对独立的遗传系统,在生理上究竟有什么意义?它们之间又是如何协调的?这方面的研究资料还不够多。下面想介绍一下链孢霉的核-质和线粒体相互作用的一些研究结果^[45]。Kuntzel 等人以链孢霉为材料研究线粒体 RNA 聚合酶的控制和调节。他们在真菌培养液中加入氯霉素,发现线粒体所含的 RNA 聚合酶比活要比对照高出两倍左右。这表明这个酶不是在线粒体核糖体而是在细胞质核糖体内合成的。在另一个实验中,作者在真菌培养液中加入非啉溴红 (E.B.), 结果 RNA 聚合酶的活力也很高。在一般正常培养情况下,这个酶的活力是很低的。这说明 E. B. 能刺激线粒体 RNA 聚合酶的合成。E. B. 是专一地作用线粒体基因转录的抑制剂,这表示 RNA 聚合酶不是由线粒体 DNA 所决定的。根据氯霉素和 E. B. 对 RNA 聚合酶的合成不仅没有抑制作用,而且还有显著刺激作用的事实,作者推测线粒体基因产物可能具有阻遏细胞核 DNA 的转录作用。Kuntzel 等人认为,在链孢霉中,线粒体的生物合成可能分为两个阶段:第一个阶段是通过核-质体系合成线粒体大部分蛋白质和线粒体遗传装置的有关酶系并将它们输送到线粒体内。接着引起第二个阶段,即线粒体 DNA 开始转录、翻译产生组成线粒体内膜的部分蛋白质。同时也产生了与细胞核 DNA 结合因而影响细胞核基因转录的阻遏物。这样,细胞核基因转录的产物就逐渐减少。一旦这些产物耗

尽,线粒体 DNA 的作用也随即停止,影响细胞核 DNA 转录的阻遏物也就不再形成,于是又重新引起细胞核基因的转录作用,第二轮的线粒体形成过程又再次开始 (图 13)。

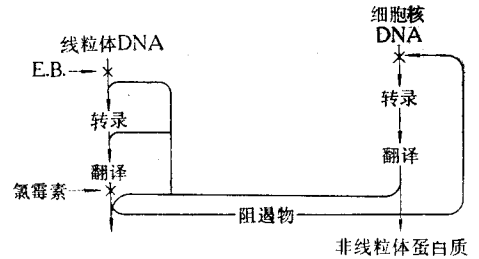


图 13 核-质、线粒体遗传系统的相互关系
(自沈善炯 科学通报 22, 17, 1977)

前几年我们实验室^[45]曾对酵母线粒体的生物发生进行过一些研究。通过电镜观察发现核与线粒体、线粒体与细胞质之间有时有细长管状结构相沟通的现象。这可能反映在线粒体生物发生过程中两套遗传装置之间的复杂关系。1976年国外有人在研究墨西哥鱼精子发生过程中亦观察到线粒体与细胞核相联接的现象^[47]。有时还可观察到从核内“出芽”形成线粒体。这些现象都反映核-质与线粒体遗传系统的相互作用的复杂关系。

线粒体是一个具有多种功能的细胞器。由于篇幅有限,本文不准备全面论述。有的功能可能还很不了解,有的则还有待于继续发现。例如,有人认为线粒体还可能具有“装配”高分子的功能,在青蛙卵母细胞的线粒体中可以发现含有一种六面体结晶的结构(图版 III 图 10)后来证明它就是卵黄蛋白质的类结晶形结构。根据电镜观察推论,这种结构可能是按照如下的顺序进行装配的:首先是蛋白质的组合,之后加上类脂形成外包膜的类结晶形结构。最后将它通过线粒体膜输送到细胞质中去。在卵细胞线粒体中发现的结晶或类结晶结构在其它线粒体中也能观察到。线粒体合成蛋白质的能力是很有限的,因此线粒体内含的这些蛋白质很可能是在细胞质中合成的。那末,被装配的蛋白质和磷脂等是如何进入线粒体的?控制装配过程的结构又是什么?装配好的结构又是如何送

进细胞质中去的? 等等,这些都是很不清楚的问题。

四、展 望

线粒体从正式命名以来虽然还只有 79 年,但它的结构与功能的研究已经获得了很大的进展。在各种细胞器中,人们对线粒体的认识还是比较深入的。但很多问题尚有待于深入和发现,因此目前线粒体结构与功能的研究仍然是一个非常活跃的领域。随着分子生物学和细胞生物学的迅速发展,线粒体结构与功能的研究将愈来愈深入。下列几方面的问题似应引起更多的注意:

1. 线粒体能量转换的机理问题

线粒体能量转换——氧化磷酸化的研究已经有几十年的历史。虽然在这方面进行了大量研究获得了不少成绩,但迄今仍未全部阐明。它主要要回答两个问题,一是电子(氢)传递释出的能量的最初贮存形式究竟是什么?二是能量的最初贮存形式如何通过 ATP 酶复合体转化为 ATP? 目前流行的化学渗透假说对第一个问题作了较为合理的解释,有较多的实验证据。比较困难的是第二个问题,为此对 ATP 酶复合体的结构、功能尤其是如何使膜电位和质子梯差转化为 ATP 的问题应该进行系统深入的研究。从近年来发展的趋势看,氧化磷酸化的作用机理可能在不太长的时间内会有较大的突破。

2. 线粒体的生物发生与自主性

七十年代以来,线粒体的自主性与生物发生一直是线粒体研究中一个非常活跃的领域。在一个细胞内核-质和线粒体两个遗传系统之间的相互作用和协调是一个十分重要的问题。目前这方面的研究还刚开始,预计将会有很大的发展。从进化的角度来考虑,不同进化程度的真核生物的线粒体在自主性方面究竟有否差别? 这与线粒体的起源问题^[18]有密切关系,亦是一个值得探索的问题。

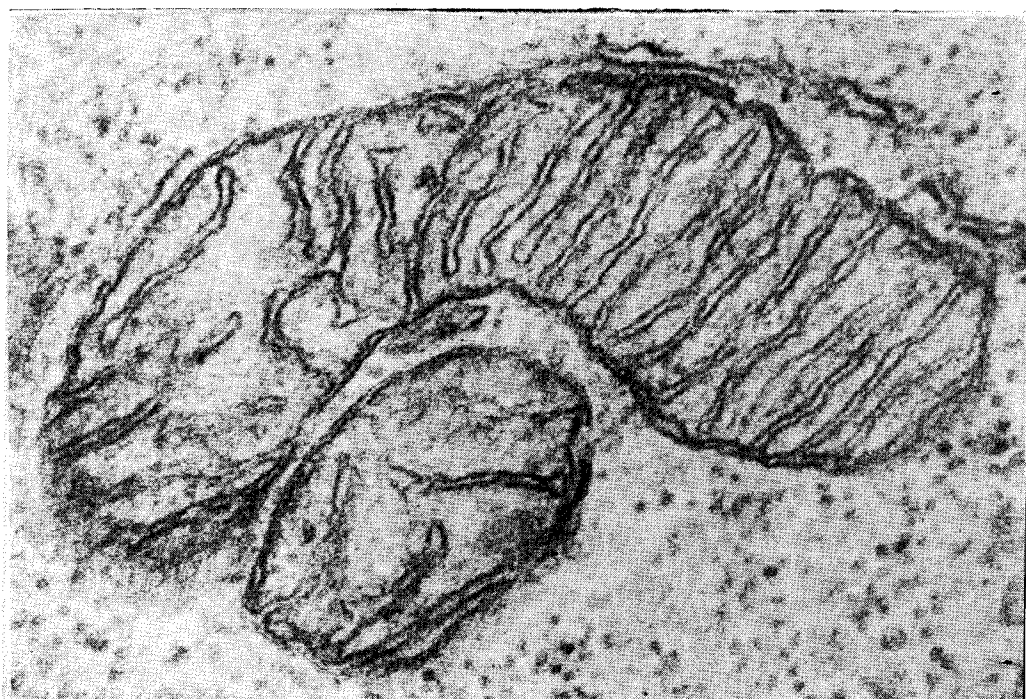
3. 线粒体研究的应用前景

随着线粒体结构与功能研究的发展,联系生产实际的前景亦愈来愈广阔。近年来无论在线粒体杂种优势和线粒体互补法预测杂种优势方面,还是在细胞质雄性不育与线粒体的关系等方面都开展了不少研究。有些学者认为作物细胞质雄性不育可能是由线粒体遗传上的变异来引发的。显然,深入探讨线粒体在遗传育种上的作用无论在理论和实践方面都是很有意义的。在医学方面对某些肌肉病、克山病等病变细胞的线粒体的结构与功能亦进行了很多研究。这方面工作的进一步深入很可能为阐明这些疾病的病变机理及其防治措施提供合理的论据。此外,氧化磷酸化作用机理一旦基本阐明,无疑将对工业上模拟高效率的能量转化提供一个理想的原型。

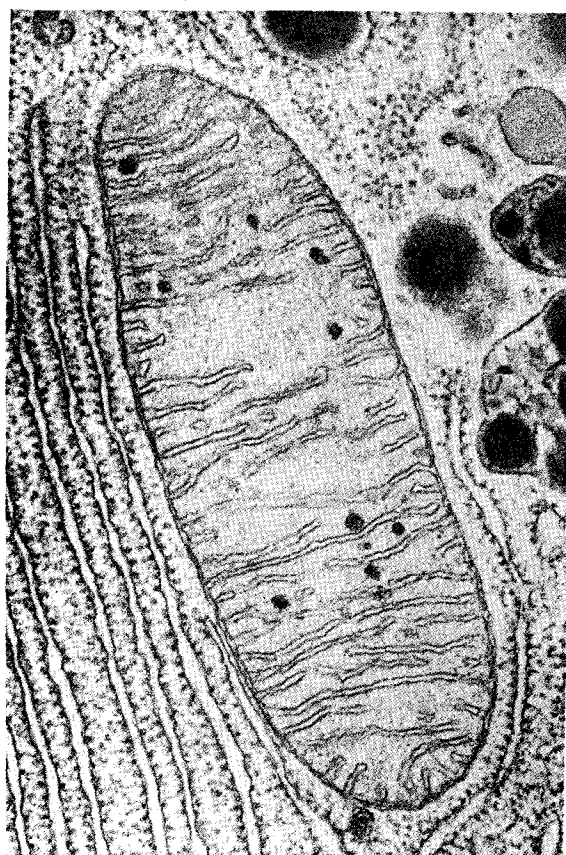
参 考 资 料

- [1] Fawcett, D. W.: *The Cell*, 71—86, 1966.
- [2] Munn, E. A.: *The Structure of Mitochondria* 7—16, 1974.
- [3] 杨福愉:《生物化学与生物物理学报》1965 年,第 5 卷,第 3 期,第 253 页。
- [4] 简令成等:《植物学报》1973 年,第 15 卷,第 1 期,第 22 页。
- [5] 杨福愉等:《实验生物学报》1964 年,第 9 卷,第 3 期,第 261 页。
- [6] Bücher, Th.: *Biochem. Soc. Symp.* 25, 15, 1965.
- [7] Malone, C.: *Plant Physiol.* 53, 918, 1974.
- [8] Chou, S. M.: *Acta Neuropath (Berlin)* 12, 68, 1969.
- [9] 刘树森等:《生物化学与生物物理学报》1976 年,第 8 卷,第 4 期,第 307 页。
- [10] Hall, J. L.: *Plant Cell Structure and Metabolism*, 233—235, 1974.
- [11] Racker, E.: *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*, 13—22, 1976.
- [12] Yang, Fu-yu (杨福愉) *Sci. Sin.* 13, 1518, 1964.
- [13] Boyer, P. D.: *Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation* 361, 1975.
- [14] Tzagoloff, A.: *Bioscience* 27, 18, 1977.
- [15] Barath, Z.: *Nature, New Biology* 240, (102), 195, 1972.
- [16] 中国科学院生物物理研究所线粒体研究小组:《生物化学与生物物理进展》1976 年,第 1 期,第 29 页。
- [17] Keyhani, E. J.: *Cell Biol.* 70(2), 81a, 1976.
- [18] 杨福愉:《生物化学与生物物理进展》1974 年,第 1 期,第 16 页。

[本文于 1977 年 10 月 11 日收到]



2



1

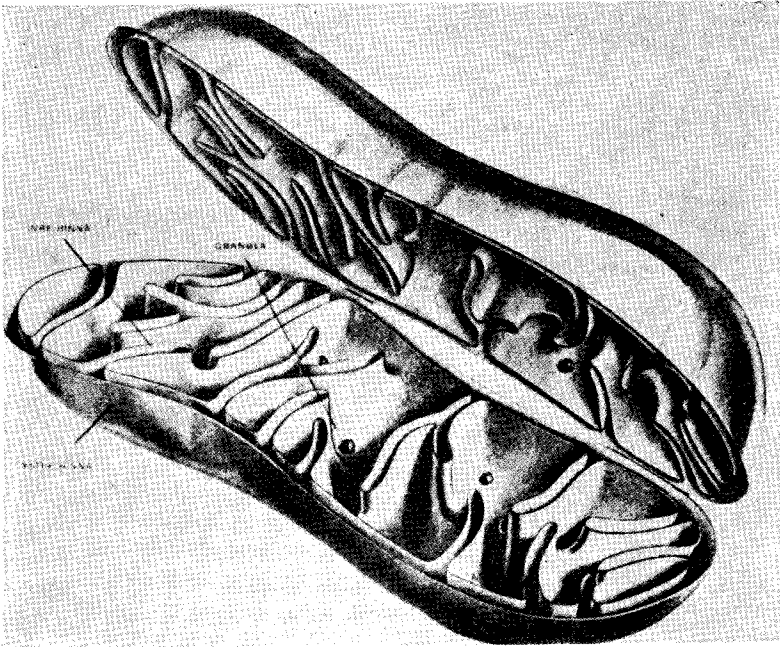


3

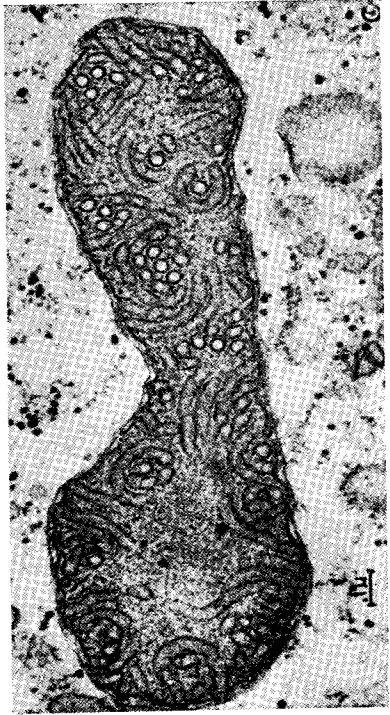
图1 蝙蝠胰线粒体 $73,000\times$ (自 Tribe, M: Chloroplasts and Mitochondria, 29, 1972)

图2 大鼠淋巴细胞线粒体 $50,000\times$ (中国科学院生物物理所电镜室提供)

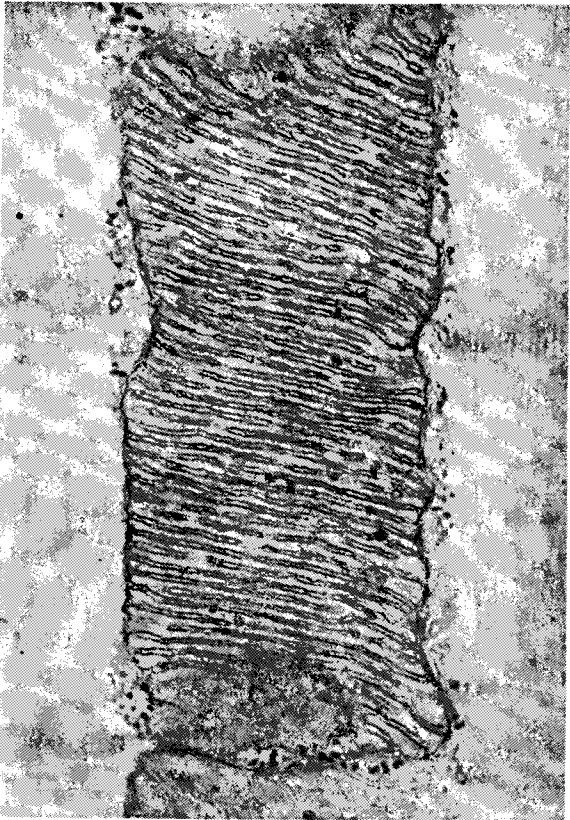
图3 玉米根组织线粒体 $42,000\times$ (自 Hall, J. L.: Plant Cell Structure and Metabolism 233, 1974)



4



6

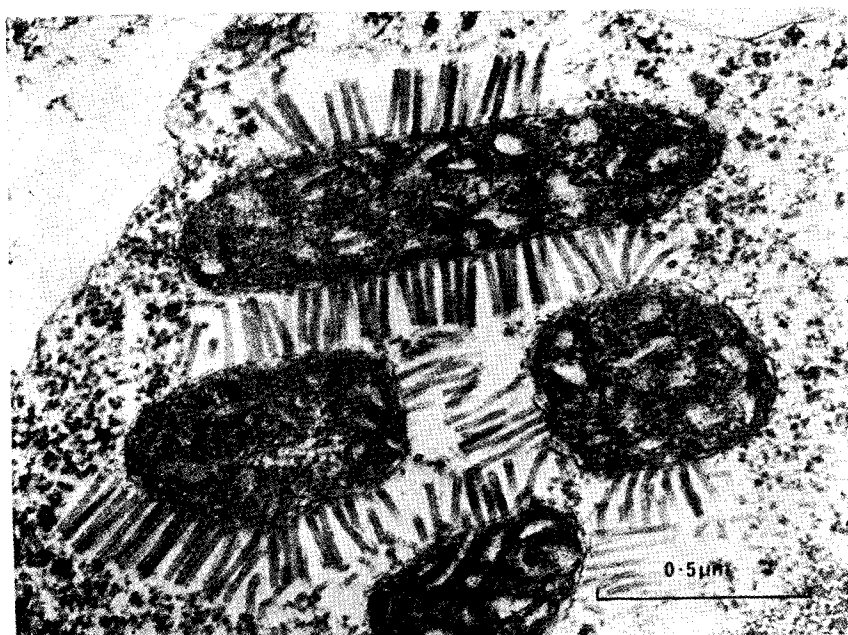


7

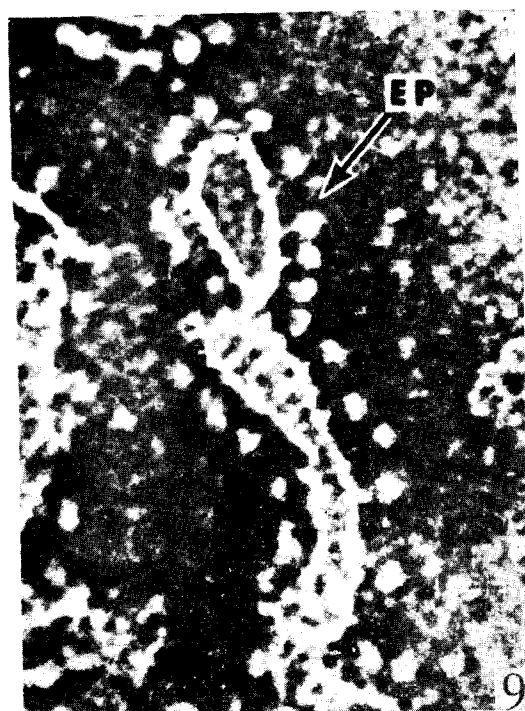


5

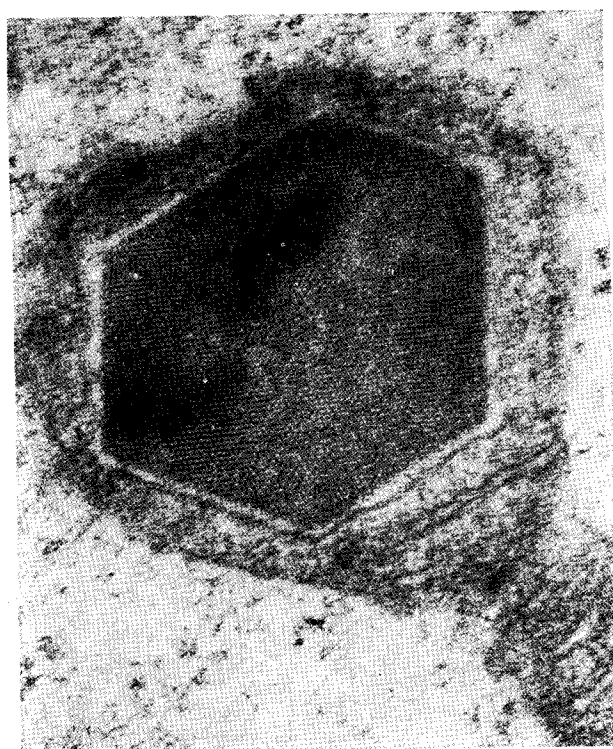
图 4 线粒体的立体模式图 (自 Ernster, L.: Biomembranes: Structure and Function 261, 1974)
图 5 蜗牛精母细胞线粒体 (自 DeRobertis, E. D.: Cell Biology 210, 1976)
图 6 草履虫线粒体 (自 DeRobertis, E. D.: Cell Biology 210, 1976)
图 7 蝙蝠甲环肌线粒体 30,000 $\times$ (自 Fawcett, D. W.)



8



9



10

图 8 烟叶 (*Nicotiana levelandi*) 叶尖海绵状叶肉细胞受烟草裂碎病毒 (tobacco rattle virus) 感染后的电子显微图
(自 Munn, E. A.: The Structure of Mitochondria, 104, 1974.)

图 9 负染牛心肌线粒体 420,000× EP-基粒 (自 Fernández- Morán, H. J.: *Cell Biology* 22, 63, 1964)

图 10 青蛙 *Rana pipiens* 卵母细胞线粒体 内含六面体类结晶结构 116,000× (自 Green, D. E.: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts 1, 1971)