

文章编号: 1000-7423(2005)-05-0309-03

【综述】

毛滴虫氢化酶体的起源、功能与生物学特性的研究进展

肖建春综述, 伦照荣审校

中图分类号: R382.211

文献标识码: A

毛滴虫隶属于肉足鞭毛门(Phylum Sarcomastigophora)动鞭纲(Class Zoomastigophorea)的毛滴虫科(Trichomonadidae)。阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)寄生于人体引起的疾病称为阴道毛滴虫病(trichomoniasis)。毛滴虫是一类独特的兼性厌氧性原虫, 与其他自由生活的鞭毛虫有显著差异, 具有典型的真核细胞特征即具核膜、内膜系统和细胞骨架, 但缺乏线粒体而具有在其他原生动物体内罕见的氢化酶体(hydrogenosome)。随着基因分析、基因组结构和转录机制的不断阐明, 越来越多的研究表明毛滴虫同时具有原核及真核生物的许多重要特性^[1], 是研究原核与真核生物进化关系的一种理想模型。

毛滴虫的能量代谢依靠内源性糖元和外源性葡萄糖的分解, 无论是在有氧还是厌氧条件下, 其代谢方式都是无氧代谢。糖类和能量代谢是在细胞质与氢化酶体两个场所进行。氢化酶体在生化代谢方面的许多原始特征, 主要功能以及在进化上它的独特位置均表明其特殊性与重要性。近年来, 在毛滴虫氢化酶体的超微结构、功能和起源方面上取得了一系列重要的进展。

1 形态学

氢化酶体多分布于核、内质网、肋和轴柱附近, 约 10 余个。外观呈球形或卵圆形, 直径约 0.5~1.0 μm , 分裂期时为长形, 有 2 层膜包被, 但膜不内陷成嵴, 具有颗粒性内质和电子致密的中心。内膜向氢化酶体内室褶叠形成嵴形式, 可在瘤胃纤毛虫和经药物治疗后的阴道毛滴虫及胎牛毛滴虫(*Trichomonas foetus*)的氢化酶体中观察到。氢化酶体内膜所包围的空间, 含有毛滴虫无氧代谢产能所需的各种酶及高水平的镁离子、钙离子、磷酸钙, 其功能可能与细胞内钙调节有关。

2 功能

与需氧真核细胞的线粒体相类似, 氢化酶体为毛

滴虫提供了一个能量代谢的场所, 它含有毛滴虫特有的丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶和氢化酶等厌氧酶。氢化酶体代谢的终末产物是乙酸、 H_2 和 CO_2 。葡萄糖经过经典的糖酵解途径转变为丙酮酸。毛滴虫的此步代谢过程与真核生物大体相同, 唯一区别在于毛滴虫的磷酸果糖激酶是利用无机焦磷酸而不是三磷酸腺苷(ATP)作为酵解过程中的磷酸供体。这一特性也存在于一些其他的厌氧原生动物中。此外, 毛滴虫丙酮酸的进一步代谢过程, 也是有别于其他真核生物的主要特性之一。在毛滴虫, 丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶可把糖酵解产物——丙酮酸氧化为乙酰辅酶 A, 再经乙酸: 琥珀酰辅酶 A 转移酶催化, 形成琥珀酰辅酶 A, 进而产生 ATP。铁氧还蛋白和氢化酶参与电子传递, 在氢化酶作用下, 电子被传递给氢离子从而产生 H_2 。丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶是一种古老的酶, 而线粒体催化同一反应的多酶系统——丙酮酸脱氢酶复合体则是进化的酶系统。在已知的生物中, 丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶和丙酮酸脱氢酶复合体之间是互相排斥的, 换言之, 这 2 种酶不会同时存在。毛滴虫氢化酶体功能方面的奇特之处, 在于缺乏三羧酸循环所需的酶及细胞色素, 也不进行氧化磷酸化反应, 但能产生 ATP。到目前为止仍未有充足的证据表明氢化酶体含有 DNA, 但它却能独立分裂, 并将细胞质中翻译的蛋白质跨膜运送至氢化酶体。迄今为止, 仅有报道在纤毛虫(*Nyctotherus ovalis*)体内发现了氢化酶体的基因组^[2]。

3 增殖

Benchimol 等^[3]采用透射电镜, 结合免疫荧光和免疫细胞化学等技术研究了胎牛毛滴虫氢化酶体在细胞周期中的增殖, 发现氢化酶体在细胞周期的任何时期都可以分裂, 与细胞的分裂并不同步。在有丝分裂间期, 氢化酶体主要沿着轴柱和肋分布, 而在分裂的初期迁移到核附近。氢化酶体共有 3 种分裂形式, ①收缩分离: 分裂时氢化酶体中部收缩并向两端拉长, 使

整个氢化酶体呈哑铃状,最后分成 2 个氢化酶体;②隔膜分离:氢化酶体分裂时,先由内膜向中心内褶,形成一个贯通的隔膜,把氢化酶体一分为二,使之成为只有外膜相连的 2 个独立的细胞器,接着氢化酶体完全分离;③一种新的分裂形式:“心”形的氢化酶体,膜不断内陷,但并不形成隔膜,只形成分裂沟,最终导致氢化酶体分裂断开。前 2 种分裂形式 Benchimol 等^[4]已经在 1996 年观察到,其中收缩分离与隔膜分离也是线粒体常见的分裂方式,氢化酶体与线粒体在细胞周期中增殖行为的相似性,有助于阐明两者之间的关系。

4 与抗药性的关系

目前,甲硝唑仍是治疗滴虫病的首选药物,但临床上已发现有不少抗性株^[5]。硝基咪唑类药物的特点是对厌氧的原核和真核细胞具有高毒性,而对需氧的原核和真核细胞毒性很低。其作用机制是将硝基基团还原活化,从而具有细胞毒性。在毛滴虫,丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶还原的铁氧还蛋白被认为是硝基基团的电子供体,5-硝基咪唑可以被还原型铁氧还蛋白迅速还原,产生具有细胞毒性的中介产物。正是由于硝基咪唑可以起还原型铁氧还蛋白替代受体的作用,并抑制阴道毛滴虫 H₂ 的生成,从而导致细胞死亡。O₂ 是硝基还原的有效电子竞争者,可以抑制硝基咪唑类药物的抗原虫活性。因此,在有氧的条件下,这类药物的作用明显减弱。

毛滴虫的氢化酶体是甲硝唑活化的场所。许多研究显示,毛滴虫抗性株中的丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶和氢化酶的含量及活性都很低^[6]。Land 等^[5]发现高抗性株毛滴虫氢化酶体蛋白的大量缺失与药物抗性有关。他们选择了胎牛毛滴虫药物敏感株及其变异的子代抗性株进行分析比较,结果发现丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶和铁氧还蛋白在抗性株中含量大大减少。编码丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶的 mRNA 大约减少了 60%,而编码氢化酶、铁氧还蛋白、苹果酸酶的 mRNA 则大约减少了 90%~98%。在抗性株中,丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶基因的转录水平下降了 60%,而苹果酸酶基因的转录水平则下降了 85%。这些氢化酶体蛋白的下降或缺失可能削弱了虫体对药物的活化能力,从而导致抗性表型的出现。超微结构分析显示,与抗性株的父代虫株比较,抗性虫株的细胞体积缩小了 20%,而氢化酶体的体积缩小了 1/3。这些数据显示,氢化酶体蛋白基因表达水平的改变导致了氢化酶体的变化,从而出现抗药性。

5 起源

氢化酶体的起源一直是个神秘的课题。有学者认为氢化酶体可能是共生起源的,因为线粒体到氢化酶体的转化,须将十分原始的丙酮酸代谢途径插入线粒体中以取代更有效的线粒体代谢系统。然而从进化角度来看,很难解释为何在代谢上明显占优势的细胞器反而转变为功能不完善的细胞器。况且,现存的许多毛滴虫种类,其体内常可发现共生或寄生的厌氧细菌和病毒。所以他认为氢化酶体可能在物种进化过程的不同时期获得,并与厌氧环境有关。通过对 rRNA 分子进化的分析,结果显示毛滴虫相对有线粒体的相关种类而言,其在真核生物系统发生树上所处的位置比较原始,表明毛滴虫在线粒体内共生之前可能就已分离出去。这些现象应该代表着进化的初级阶段,并不是对厌氧生活的次生适应。但是也有学者认为无线粒体的原虫虽然不存在线粒体,但也能利用氧气,它们的厌氧特征可能是一种次生适应,而不是早期真核细胞进化的遗迹。从最近分子生物学方面取得的进展来看,许多研究结果都支持线粒体与氢化酶体同源的观点^[7,8]。

在各种生物体之内,热激蛋白(heat-shock protein, HSP)在进化上十分保守,是一个多基因家族,其家族成员分别定位于真核细胞的细胞质、内质网、线粒体及叶绿体等细胞器上。在正常生理条件下,HSP 对蛋白质跨膜运送及复合物的装配起着重要的作用。此外,由于在漫长的进化过程中,内共生体会逐渐向核内转移一些基因,即使以后该共生体丢失,其基因也仍能保留在核 DNA 内。基于上述 2 个理论, Germot 等^[9]从阴道毛滴虫中分离出了一个编码 HSP70 的基因,这个基因在其他生物是用于编码线粒体基质的。同时,他们还发现,阴道毛滴虫具有 GDAWV 信号序列,而这一信号序列目前只发现存在于线粒体 HSP70 和细菌蛋白 DnaK 上。因此他们认为线粒体内共生的时间可能早于原先的估计,而氢化酶体也可能是从线粒体进化的。Giezen^[10]等进行了类似的研究,他们从厌氧真菌 *Neocallimastix patriciarum* 中分离了 HSP60 和 HSP70 的全长基因。系统进化分析结果显示它们与线粒体的定向进化同源基因同源,并发现这 2 种蛋白相应的抗体是定位在氢化酶体上。

Dyall 等^[11]在毛滴虫氢化酶体膜上发现了线粒体型的 ADP/ATP 转运蛋白 Hmp31。Hmp31 被认为是真核生物特异的蛋白,因为目前在原核生物里尚未发现与之对应的蛋白,这种蛋白也与立克次氏体的 ADP/ATP 转运蛋白无关^[12]。Hmp31 蛋白的发现有力地说明线粒体与氢化酶体是起源于同一个祖先,而且形成分

支的时间可能是在形成了 ADP/ATP 与胞质的转运方式之后^[13]。进一步的转运实验发现, 氢化酶体的 ADP/ATP 转运体可定位于酵母线粒体内膜, 反之, 酵母线粒体 ADP/ATP 转运体也可插入氢化酶体膜中^[11]。这些都说明这两种蛋白靶信号的保守性, 均能被相似的受体或移位酶识别。

前体蛋白向线粒体跨膜运送时含有导向肽, 导向肽内含有识别线粒体的信息和牵引蛋白质通过线粒体膜进行运送的功能。前体蛋白通过内膜之后, 其导向肽即被水解。与线粒体类似, 阴道毛滴虫的氨基末端前导序列对于引导基质蛋白进入氢化酶体也是必需的。氢化酶体许多蛋白的氨基末端前导序列非常保守, 与线粒体相应蛋白前导序列比较尽管稍短一些, 但极为类似^[13]。Lahti 等^[14]在阴道毛滴虫中分离了 β -琥珀酰辅酶 A 合成酶, 同时克隆了其基因, 发现这种蛋白的氨基末端前导序列非常类似于线粒体中相应的前导序列。同时可以肯定阴道毛滴虫等真核生物的丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶基因是起源于细菌^[15]。

6 结语

尽管氢化酶体在 30 多年前就已被发现, 但有关其超微结构的信息仍十分有限。已知除毛滴虫外, 某些自由生活的鞭毛虫、瘤胃纤毛虫及一些真菌都具有氢化酶体。毛滴虫丧失氢化酶体功能以后, 虫体仍可存活, 代谢则完全转变为在细胞质中进行。表明毛滴虫葡萄糖代谢具有多条途径, 也说明氢化酶体对于毛滴虫可能不如线粒体对于好氧真核生物那样重要。

毛滴虫缺乏线粒体存在 3 个可能性: ①毛滴虫本来就没有线粒体, ②线粒体被改造成氢化酶体, ③起初有线粒体, 后来在进化过程中丢失了。毛滴虫中线粒体类型 HSP 的发现, 虽然为线粒体与氢化酶体存在共同起源提供了证据, 尚不能排除细菌基因转移而导致的这一可能性^[16]。氢化酶体中 HSP 的发现, 可以得出的一个最重要结论是, 这些 HSP 的基因起源较早^[13]。

重建氢化酶体的进化历史最大困难在于无法获得它的基因组, 而这一点正是重建线粒体进化起源的关键^[17,18]。线粒体、氢化酶体以及最近在溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 中发现的纺锤剩体 (mitosome)^[19] 等细胞器的多样性说明了真核生物复杂的进化历史。毛滴虫的分子生物学研究仍处于初级阶段, 尚有很多问题亟待解决。譬如目前尚不清楚细胞为什么及如何选择氢化酶体的各种分裂方式, 毛滴虫致病机制的复

杂性及与宿主的相互关系等。从过去几年里对氢化酶体的研究所取得的进展来看, 氢化酶体很多基本特点与线粒体较为相似, 这绝不是一种巧合, 而更多的是起源上的关系。

参 考 文 献

- [1] Lecker MW, Alderete JF. Biology of trichomonosis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2000, 13: 37-45.
- [2] Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, et al. A hydrogenosome with a genome[J]. Nature, 1998, 396: 527-528.
- [3] Benchimol M, Johnson PJ, de Souza W. Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study[J]. Biol Cell, 1996, 87: 197-205.
- [4] Benchimol M, Engelke F. Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Trichomonas foetus*[J]. Biol Cell, 2003, 95: 283-293.
- [5] Land KM, Clemens DL, Johnson PJ. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads[J]. Exp Parasitol, 2001, 97: 102-110.
- [6] Land KM, Johnson PJ. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa[J]. Drug Resist Updates, 1999, 2: 289-294.
- [7] Martin W, Muller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote [J]. Nature, 1998, 392:37-41.
- [8] Palmer JD. Organelle genomes: going, going, gone! [J]. Science, 1997, 275:790-791.
- [9] Germot A, Philippe H, Le Guyader H. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 14614-14617.
- [10] van der Giezen M, Birdsey GM, Horner DS, et al. Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins[J]. Mol Biol Evol, 2003, 20: 1051-1061.
- [11] Dyal SD, Koehler CM, Delgado-Correa MG, et al. Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes; conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20: 2488-2497.
- [12] Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria [J]. Nature, 1998, 396: 133-140.
- [13] Dyal SD, Johnson PJ. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3:404-411.
- [14] Lahti CJ, d'Oliveira CE, Johnson PJ. Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences[J]. J Bacteriol, 1992, 174 : 6822-6830.
- [15] Horner DS, Hirt RP, Embley TM. A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes; implications for the evolution of anaerobic eukaryotes[J]. Mol Biol Evol, 1999, 16:1280-1291.
- [16] Sogin ML. Organelle origins: energy-producing symbionts in early eukaryotes[J]. Curr Biol, 1997, 7: 315-317.
- [17] Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution[J]. Science, 1999, 283: 1476-1481.
- [18] Gray MW. Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection[J]. Nature, 1998, 396: 109-110.
- [19] Tovar J, Fischer A, Clark CG. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*[J]. Mol Microbiol, 1999, 32: 1013-1021.

(收稿日期:2004-05-09 编辑:伯韦)