

and diabetes in the elderly population. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015, 70(3): 294-302.

[26] Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, et al. Alzheimer's

disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(8): 1665-1675.

线粒体未折叠蛋白反应及其与神经系统疾病关系研究进展

蔡优生¹ 综述 叶钦勇² 审校

1. 福建医科大学协和临床医学院/福建医科大学附属协和医院/
福建医科大学脑血管病研究所,福建省福州市 350001
2. 福建医科大学附属协和医院神经内科/
福建医科大学脑血管病研究所,福建省福州市 350001

摘要:线粒体功能障碍,尤其是线粒体蛋白质稳态失衡,在许多人类疾病的发生发展中有重要作用。应激时发生的线粒体未折叠蛋白反应(mtUPR),通过分子伴侣和蛋白酶折叠降解有缺陷的蛋白质,维持线粒体蛋白稳态,保证细胞与机体健康。本文将从mtUPR的定义、激活、在线虫和哺乳动物身上的信号转导途径,以及mtUPR与神经系统疾病的关系予以综述,从而为尽早调节线粒体稳态平衡的干预目标提供新思路。

关键词:线粒体未折叠蛋白反应;蛋白质稳态;蛋白质质量控制;神经系统疾病

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2016.04.019

线粒体是十分重要的细胞器,它的功能包括产生能量、合成生物分子和参与凋亡等。线粒体蛋白质量控制(PQC)是细胞维持正常状态的关键机制,决定着线粒体命运。PQC体系包括线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response, mtUPR)、线粒体氧化应激反应、线粒体生物合成、线粒体动力学异常、线粒体DNA异常以及线粒体自噬等方面。早期发生的mtUPR是一种新兴的适应性应激反应,确保了线粒体蛋白质组最佳的质量和功能。mtUPR在维护线粒体健康中起重要作用,与其他PQC途径相互作用,共同维护线粒体正常结构和功能^[1,2]。越来越多证据表明,mtUPR可能直接或间接地参与了神经系统疾病的发生发展。

1 mtUPR的定义、激活及信号转导

1.1 mtUPR的定义

mtUPR是指在各种应激条件下,线粒体基质积累大量未折叠、错误折叠以及无效蛋白质,导致核

编码靶向线粒体伴侣蛋白,如热休克蛋白家族A成员9(heat shock protein family A Member 9, HSPA9)、热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)、热休克蛋白10(heat shock protein 10, HSP10)以及蛋白酶如酪蛋白线粒体基质缩氨酸酶蛋白水解亚基(caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit, CLPP)、YME1样ATP酶(YME1-like 1 ATPase, YME1L1)、线粒体Lon蛋白酶样蛋白(mitochondrial Lon protease-Like protein, LONP)等表达上调;其中伴侣蛋白帮助错误折叠蛋白恢复正常构象、新合成蛋白正确折叠,蛋白酶降解无用蛋白。这种由线粒体至核的逆行信号传导过程即为mtUPR^[3,4]。

1.2 mtUPR的激活

许多因素可刺激mtUPR的激活,其模型已经分别在线虫、果蝇、哺乳动物细胞培养及小鼠建立。这些因素主要包括以下五个方面:①损害线粒体蛋

基金项目:国家自然科学基金(81271414)

收稿日期:2016-04-05;修回日期:2016-07-18

作者简介:蔡优生(1989-),男,硕士,主要从事帕金森病的基础和临床研究。Email:yscai297@163.com。

通讯作者:叶钦勇(1970-),男,主任医师,教授,博士,主要从事帕金森病的基础和临床研究。Email:unionqyye@163.com。

白质:鸟氨酸氨甲酰转移酶(ornithine carbamoyl transferase, OTC)为线粒体基质蛋白,敲除 OTC 第 33 至 144 位氨基酸后发生突变(dOTC),可观察到线粒体应激反应^[4]。百草枯通过诱导线粒体锰超氧化物歧化酶 3(superoxide dismutase 3, SOD-3)基因表达,使线粒体基质内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积,从而损伤线粒体内蛋白质,这些氧化损伤蛋白质大量积累诱发 mtUPR^[5]。②干扰电子传递链(electron transfer chain, ETC):这会产生线粒体-核蛋白失衡,即通过下调或抑制单个或成组 ETC 部分,导致线粒体 DNA(mtDNA)和核 DNA(nDNA)编码的 ETC 亚基不匹配,未组装亚基与分子伴侣共同停留于线粒体基质中^[6, 7]。在哺乳动物细胞敲除 130 KD 亮氨酸富集蛋白(130 KDa leucine-rich protein, LRP130)基因,导致 ETC 复合体 IV 缺失,其余亚基积累在线粒体基质中,触发 mtUPR^[8]。线虫 RNA 干扰(RNAi)核编码细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, CCO-1)^[9],以及在编码复合物 III 基因 isp-1 或泛醌合成基因 CLK-1 的突变体株,使 ETC 亚基表达减少,mtUPR 亦可观察到^[10]。ETC 抑制剂如抗霉素或鱼藤酮,通过产生 ROS 激活 mtUPR^[11]。③干扰线粒体输入和结构:药物三氧化二砷特异性干扰线粒体内膜转位酶 23(translocase of inner mitochondrial membrane 23, TIM23)^[12]及 YME1L1 介导的内膜转位酶(inner membrane preprotein translocase tim17a, TIM17a)降解,诱发 mtUPR^[13]。④干扰蛋白质量控制(PQC):体内和体外模型敲除 HSPA9 基因^[14],既增加线粒体内未折叠蛋白质,又使 ROS 水平上升及线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)丢失,强烈激活 mtUPR。这也在 RNAi 干扰 hsp60、DnaJ 同源亚家族 C 成员 21(DnaJ homolog subfamily C member 21, dnj-21)、痉挛性截瘫蛋白 7(spastic paraplegia 7 protein, spg-7)模型中观察到^[5]。⑤干扰线粒体翻译:线粒体蛋白合成时,错误掺入精氨酸类似物刀豆氨酸,诱发异常翻译产物和不稳定 mtDNA,导致线粒体呼吸链复合物丢失^[15];干扰细

菌和线粒体翻译的抑制剂,如强力霉素及氯霉素,下调线粒体核糖体蛋白表达^[7]。以上均启动 mtUPR。

1.3 mtUPR 的信号转导

典型 mtUPR 在未折叠蛋白积累时引发。在线虫体内,CLPP 剪切形成的多肽由转运蛋白 1(haf ABC transporter 1, HAF-1)输出到线粒体外^[16, 17],然后分散到细胞质。这些肽通过与应激转录因子 1(activating transcription factor 1, ATFS-1)相互作用触发信号级联。ATFS-1 有线粒体靶向序列(mitochondrial targeting sequence, MTS)和核靶向序列(nuclear targeting sequence, NTS),无应激时 ATFS-1 在 MTS 作用下进入线粒体基质内,由 Lon 蛋白酶降解^[12, 17];应激时 ATFS-1 进入受到抑制,在 NTS 引导下易位到细胞核内,与转录调节子泛素样蛋白 5(ubiquitin-like protein 5, ubl-5)和同源结构域转录因子 1(dve-1)复合体相结合,激活相关伴侣蛋白、蛋白酶基因表达,使线粒体蛋白质稳态恢复(图 1)。

但在哺乳动物 mtUPR 并不十分清楚。现有数据表明 mtUPR 在哺乳动物身上信号转导更加复杂,如何驱动线粒体-核间具体信号转导机制有待进一步确定。早期研究发现在 d-OTC 转染哺乳动物细胞,碳端 Jun 氨基末端激酶 1(C-Jun N-terminal kinase 1, c-Jun)和碳端 Jun 氨基末端激酶 2(C-Jun N-terminal kinase 2, JNK2)磷酸化后绑定到碱性亮氨酸拉链(basic-leucine zipper, b-zip)转录因子基因 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein, CHOP)和 CCAAT/增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP β)启动子,使它们激活,从而启动细胞核中 mtUPR 基因表达(图 1)。mtUPR 元件(mitochondrial unfolded protein response elements, MUREs)的诱导需要 CHOP-C/EBP β 二聚化,其靶基因的表达与二聚体的转录因子 CHOP-C/EBP β 相互作用, MUREs 结合到两侧靶向启动子位点^[18](图 1)。CHOP 可通过多种形式应激诱导,目前仍不清楚它如何与线粒体应激反应协调一致地活动。

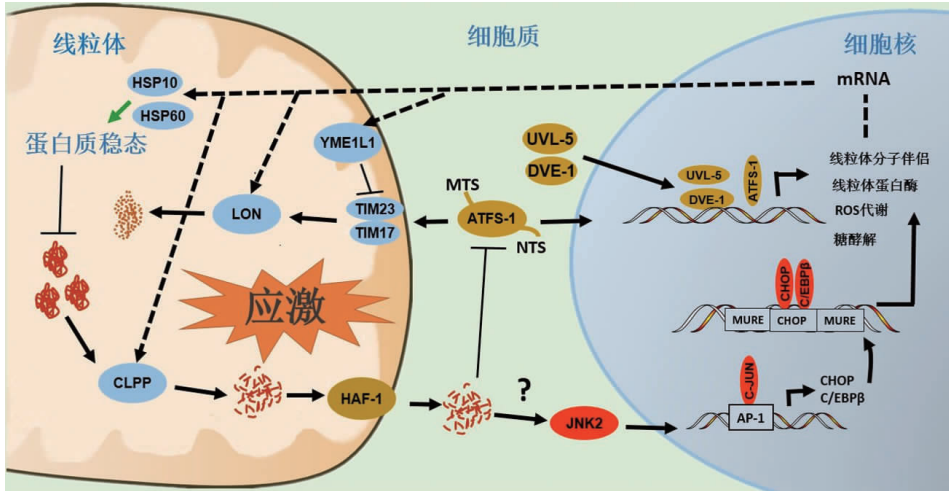


图1 线虫和哺乳动物线粒体-核间信号转导(改编自参考文献^[3])。

图中橙色为在线虫上信号转导,红色为哺乳动物信号转导,蓝色的为二者共有信号转导途径。AP-1 为 Jun 激活域绑定蛋白(Jun activation domain binding protein)。

2 mtUPR 与神经系统疾病的关系

mtUPR 激活是早期发生的线粒体保护反应,在神经系统疾病中的保护作用体现在以下三个方面。首先,发生应激反应时,线粒体新蛋白合成和输入暂时阻断,线粒体基质中的转录受到抑制,膜蛋白酶选择性降解输入孔道^[10, 13, 19]。其次,减少线粒体损伤。mtUPR 可及时感知线粒体内蛋白稳态的破坏,及时纠正,防止损害继续扩大,避免了线粒体的自噬^[2]。最后,mtUPR 与衰老和寿命相关。长寿蛋白 3(sirtuin 3, SIRT3)可通过转录因子叉头框蛋白 A3(forkhead box protein A3, FOXA3)脱乙酰化调节 mtUPR 活性,促进自身在细胞核中积累,并允许表达抗氧化基因^[20],但他的不足与年龄相关疾病(如神经系统疾病、代谢综合征、癌症等)发病率较高有关^[21]。mtUPR 可通过辅酶 I(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)或核糖体聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂诱导寿命的延长^[19];并可在过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha, PGC-1 α)过表达的情况下,增加线粒体生物合成,此时几个年龄相关衰老表型可以推迟^[22]。这在神经系统疾病尤其明显,表明维持线粒体的健康可能具有治疗价值。

目前与 mtUPR 关系较密切的神经系统疾病主要有以下三种。

2.1 mtUPR 与帕金森病

已有众多的证据表明线粒体功能障碍在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发生发展中有重要作用^[23]。PD 病人线粒体蛋白需要维持一个健康的线粒体池。目前发现家族性帕金森病(PD)的几个联合基因,如 α -突触核蛋白(α -synuclein, a-Syn)、Parkin、PINK1、DJ-1 和 LRRK2 等,均可影响线粒体功能,这为线粒体功能障碍与 PD 致病过程的联系提供了新证据。

目前,mtUPR 在对 PD 的影响因素中未占据主要地位,可能与哺乳动物中 mtUPR 参与 PD 发生发展的机制尚未完全阐明有关。各种诱发 mtUPR 因素,如基因突变、ROS 产生者百草枯、复合物 I 抑制剂鱼藤酮等,在引起线粒体功能障碍同时也诱发帕金森样症状^[24]。在 PD 患者黑质(substantia nigra, SN) HSPA9 基因表达水平降低,提示 mtUPR 的参与^[25, 26]。此外,mtUPR 分子伴侣 HSP60 通过 PINK1/Parkin 途径发挥作用。在 PINK1 损失的多巴胺能(dopaminergic, DA)神经元细胞培养,线粒体 HSP60 表达下调 40%^[27]。这可能是 Parkin 和 PINK1 与 HSP60 互动关闭 mtUPR,此时线粒体被认为因过度受损不能恢复;如果 mtUPR 持续发生, HSP60 可能引起线粒体自噬。上述情况暗示了在 PD 中相关 mtUPR 的保护作用,同时,也表明在哺乳动物身上找到类似于 ATFS-1 的同源物十分迫切。

2.2 mtUPR 与遗传性痉挛性截瘫

mtUPR 对神经系统疾病的作用证据一个是来自于遗传性痉挛性截瘫(hereditary spastic paraplegia,

HSP)。HSP 是一种少见的神经退行性疾病,临床表现为双下肢进行性肌张力增高和无力、剪刀步态为特征,具有明显遗传异质性的综合征,常常伴有线粒体功能障碍。目前已知 13 个基因突变导致痉挛性截瘫,其中两个分别损害线粒体伴侣蛋白 HSP60 和蛋白酶痉挛性截瘫蛋白 7 (spastic paraplegia 7 protein, SPG7)^[28]。它们编码基质 AAA + 蛋白酶亚基,这种蛋白酶降解错误折叠的蛋白质及调节线粒体核糖体聚合。线粒体基质蛋白 HSP60 介导三磷酸腺苷(ATP)依赖的各种蛋白质折叠,使其在分子质量控制机制中成为一个重要的扮演者。另一个研究中发现,HSP60 基因突变引起的遗传性痉挛性截瘫患者,在疾病进展中线粒体蛋白质量控制蛋白酶 LON 和 CLPP 表达降低^[29]。这提示未通过 HSP60 加工的错误折叠蛋白在线粒体基质中积累,表明此改变使线粒体蛋白折叠能力进一步恶化,对细胞功能造成致命性损害。

2.3 mtUPR 与 Friedreich 共济失调

mtUPR 诱导的另一个神经系统疾病是 Friedreich 共济失调(Friedreich ataxia, FA),该病以青春早期起病、腱反射消失及深感觉缺失为特征。FA 由于编码共济蛋白基因第一个内含子突变,表达的含铁硫簇亚基的 ETC 复合物 I、II 和 III 组装及功能受损。在线虫 FA 模型,细胞内的热休克反应(heat shock response, HSP)和 mtUPR 都被激活,表明线粒体和细胞质未折叠蛋白的积累^[30],可能是由于缺乏铁-硫辅因子导致折叠中间体的积累。此外,在 FA 模型中,CLPP 表达随着时间的增加而增加^[31]。在早期细胞培养,积累过多的错误折叠蛋白也会出现这种情况^[4]。以上结果支持 mtUPR 在保护线粒体蛋白折叠环境中的重要性。在这种疾病背景下是否有可能进一步增加 mtUPR,从而恢复线粒体蛋白质稳态仍有待进一步研究。

3 结语

目前 mtUPR 的研究大多集中在线虫和酵母,接下来更多的重点应放在对哺乳动物理解上。在发育、健康、疾病和衰老方面,mtUPR 的生理作用需要进一步明确。如何调节蛋白质稳态来建立线粒体最佳质量和功能,这应成为未来治疗的干预目标。在 PD 中,关于线粒体自噬调控和 mtUPR 最近的一些发现表明,促进线粒体的整体健康可以限制 PD 的疾病进展^[24],说明这条途径可以帮助我们管理一些与衰老有关的疾病,如神经系统疾病、代谢性

疾病和癌症等。

参 考 文 献

- [1] Kaushik S, Cuervo AM. Proteostasis and aging. *Nat Med*, 2015, 21(12): 1406-1415.
- [2] Andreux PA, Houtkooper RH, Auwerx J. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(6): 465-483.
- [3] Jovaisaite V, Auwerx J. The mitochondrial unfolded protein response—synchronizing genomes. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 74-81.
- [4] Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, et al. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4411-4419.
- [5] Yoneda T, Benedetti C, Urano F, et al. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci*, 2004, 117(18): 4055-4066.
- [6] Owusu-Ansah E, Song W, Perrimon N. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell*, 2013, 155(3): 699-712.
- [7] Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, et al. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*, 2013, 497(7450): 451-457.
- [8] Köhler F, Müller-Rischart AK, Conradt B, et al. The loss of LRPPRC function induces the mitochondrial unfolded protein response. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(9): 701.
- [9] Wu Y, Williams EG, Dubuis S, et al. Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population. *Cell*, 2014, 158(6): 1415-1430.
- [10] Baker BM, Nargund AM, Sun T, et al. Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 α kinase GCN-2. *PLoS Genet*, 2012, 8(6): e1002760.
- [11] Runkel ED, Liu S, Baumeister R, et al. Surveillance-Activated Defenses Block the ROS-Induced Mitochondrial Unfolded Protein Response. *PLoS Genet*, 2013, 9(3): e1003346.
- [12] Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, et al. Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science*, 2012, 337(6094): 587-590.
- [13] Rainbolt TK, Atanassova N, Genereux JC, et al. Stress-regulated translational attenuation adapts mitochondrial protein import through Tim17A degradation. *Cell Metab*, 2013, 18(6): 908-919.
- [14] Burbulla LF, Fitzgerald JC, Stegen K, et al. Mitochondrial proteolytic stress induced by loss of mortalin function is rescued by Parkin and PINK1. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1180.

- [15] Konovalova S, Hilander T, Loayza-Puch F, et al. Exposure to arginine analog canavanine induces aberrant mitochondrial translation products, mitoribosome stalling, and instability of the mitochondrial proteome. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 65: 268-274.
- [16] Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, et al. ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell*, 2007, 13(4): 467-480.
- [17] Haynes CM, Yang Y, Blais SP, et al. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376. 7 in *C. elegans*. *Mol Cell*, 2010, 37(4): 529-540.
- [18] Aldridge JE, Horibe T, Hoogenraad NJ. Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PloS one*, 2007, 2(9): e874.
- [19] Rath E, Berger E, Messlik A, et al. Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation. *Gut*, 2012, 61(9): 1269-1278.
- [20] Papa L, Germain D. SirT3 regulates the mitochondrial unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(4): 699-710.
- [21] McDonnell E, Peterson BS, Bomze HM, et al. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(9): 486-492.
- [22] Dillon LM, Williams SL, Hida A, et al. Increased mitochondrial biogenesis in muscle improves aging phenotypes in the mtDNA mutator mouse. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(10): 2288-2297.
- [23] 冯娅,吴云成. 线粒体功能异常在帕金森病发病机制中的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41(4): 349-352.
- [24] Pellegrino MW, Haynes CM. Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response in neurodegeneration and bacterial infection. *BMC Biol*, 2015, 13(1): 1.
- [25] De Mena L, Coto E, Sánchez-Ferrero E, et al. Mutational screening of the mortalin gene (HSPA9) in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 2009, 116(10): 1289-1293.
- [26] Jin J, Hulette C, Wang Y, et al. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75 relevance to Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(7): 1193-1204.
- [27] Kim KH, Song K, Yoon SH, et al. Rescue of PINK1 protein null-specific mitochondrial complex IV deficits by ginsenoside Re activation of nitric oxide signaling. *J Biol Chem*, 2012, 287(53): 44109-44120.
- [28] Hansen JJ, Dürr A, Courmu-Rebeix I, et al. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(5): 1328-1332.
- [29] Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, et al. Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience*, 2008, 153(2): 474-482.
- [30] Ventura N, Rea SL, Schiavi A, et al. p53/CEP-1 increases or decreases lifespan, depending on level of mitochondrial bioenergetic stress. *Aging cell*, 2009, 8(4): 380-393.
- [31] Guillon B, Bulteau AL, Wattenhofer-Donzé M, et al. Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J*, 2009, 276(4): 1036-1047.