

• 综述 •

## Mieap 与线粒体的质量控制

周立强<sup>1)</sup>, 张颖<sup>2)\*</sup>

(<sup>1)</sup> 华中科技大学同济医学院第一临床学院, 武汉 430030; (<sup>2)</sup> 华中科技大学同济医学院基础医学院, 武汉 430030)

**摘要** 线粒体在细胞能量代谢和细胞凋亡中起着至关重要的作用. 质量控制是线粒体在细胞中维持正常状态的关键机制. 2011 年 Miyamoto 等发现 Mieap 参与线粒体质量控制的两个新机制. Mieap 诱导的溶酶体样细胞器, 进入线粒体内, 并在线粒体积聚, 能通过特异性的清除氧化的线粒体蛋白来修复异常线粒体, 使得线粒体维持在正常状态. Mieap 诱导的通过细胞膜内吞机制形成的囊泡, 识别异常线粒体, 并对其特异性的清除. Mieap 诱导的这两个过程参与了线粒体质量控制, 并决定线粒体的命运.

**关键词** Mieap; MALM; MIV; 线粒体; p53-Mieap 途径; p53

中图分类号 Q291

## Mieap and Mitochondria Quality Control

ZHOU Li-Qiang<sup>1)</sup>, ZHANG Ying<sup>2)\*</sup>

(<sup>1)</sup> First Clinical Medical School, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

<sup>2)</sup> Basic Medicine School, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract** Mitochondria plays an important role in energy metabolism and apoptosis of cell. Mitochondrial quality control has become a key mechanism that maintains the normal state of the mitochondria. In 2011, Miyamoto *et al.* found that Mieap was involved in two novel mechanisms of mitochondrial quality control. Mieap-induced lysosome-like organelles translocate into mitochondria and accumulation in the mitochondria, repair unhealthy mitochondria by specifically eliminating oxidized mitochondrial proteins, and maintain the normal state of the mitochondria. Mieap-induced vesicle may be formed by endocytic pathway, identify and specifically engulf unhealthy mitochondria. Both of the Mieap-induced processes were involved in mitochondrial quality control and decide the fate of mitochondria.

**Key words** Mieap; MALM; MIV; mitochondria; p53-Mieap pathway; p53

在需氧旺盛的真核细胞 (aerobic eukaryotic cells) 中, 线粒体通过氧化磷酸化产生 ATP, 提供能量<sup>[1]</sup>. 如果没有线粒体, 即使是肿瘤细胞也不能在体内生存和生长<sup>[2]</sup>. 同时, 线粒体也在细胞凋亡中起着重要的作用<sup>[1]</sup>. 因此, 线粒体质量控制 (mitochondrial quality control, MQC) 在维持细胞的生存和参与细胞死亡过程中显得非常重要.

MQC 对维持机体稳定和健康状态很重要<sup>[3]</sup>, 但是参与其中的机制仍然不清楚. 首先, 整个线粒体的降解可能涉及以下几个环节, 被称为线粒体自噬 (mitophagy)<sup>[1]</sup>. 在酵母菌中, 多通过经典的自噬即大自噬 (macroautophagy) 和小自噬 (microautophagy) 来清除不正常的线粒体, 维持线粒体的质量<sup>[4]</sup>. 大自噬是指由内质网来源的膜包裹待降解物形成双层

膜的自噬体, 然后与溶酶体融合并降解其内容物的过程. 而小自噬是指溶酶体的膜直接包裹并降解待降解的物质的过程. 其次, 线粒体中受损蛋白的降解在维持线粒体正常状态中也起着重要作用<sup>[5]</sup>. 以前的研究已经发现, 线粒体内存在一些线粒体蛋白酶 (mitochondrial proteases), 而这些线粒体蛋白酶在线

收稿日期: 2013-01-14; 接受日期: 2013-04-02

国家自然科学基金 (No. 30700296) 资助

\* 联系人 Tel: 13607170056; E-mail: seaside\_zy@163.com

Received: January 14, 2013; Accepted: April 2, 2013

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30700296)

\* Corresponding author Tel: 13607170056;

E-mail: seaside\_zy@163.com

粒体蛋白的降解中起重要作用<sup>[6]</sup>. 并且, 一些线粒体蛋白被认为是这些蛋白酶的基质( substrates) <sup>[7]</sup>.

2011 年 Miyamoto 等<sup>[8]</sup>在研究一种名为 Mieap 的蛋白过程中, 发现了 MQC 中有关蛋白降解的一个新机制. p53 诱导的蛋白 Mieap 能诱导线粒体内的溶酶体样细胞器( intramitochondrial lysosome-like organelles) 来消除氧化的线粒体蛋白, 而不会破坏线粒体结构. 这个现象与经典的自噬无关, 被称为 Mieap 诱导的线粒体内溶酶体样细胞器的积累( Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria, MALM). 同时 Mieap 还能在胞浆中诱导囊泡生成, 来清除异常线粒体. 同时该现象也不同于经典的自噬, 被称为 Mieap 诱导的囊泡( Mieap-induced vacuole, MIV) <sup>[9]</sup>.

## 1 Mieap 的简介

Mieap 最开始是在精子发生的研究中发现的, 被称为 SPATA18 ( spermatogenesis associated 18 homolog). 其基因 SPATA18 定位在染色体 4q12, 编码 538 个氨基酸并有 2 个卷曲螺旋区域的蛋白, 是 p53 的靶基因<sup>[10]</sup>. Mieap 在小鼠中的同源蛋白为 Spetex-1 ( spermatid-expressing gene-1). Spetex-1 与 Mieap 有 82% 的蛋白序列相同, 并且也是精子发生的相关蛋白<sup>[10]</sup>. 使用选择性剪接( alternative splice sites), Mieap 蛋白能表达成两种形式: Mieap- $\alpha$  和 Mieap- $\beta$ ( DDBJ Accession No. 分别为 AB465501 和 AB465502) <sup>[8]</sup>. 最近研究<sup>[8]</sup>发现, Mieap 通过诱导 MALM 和 MIV 两个不同的机制, 来参与线粒体的质量控制.

## 2 Mieap 诱导线粒体内溶酶体样细胞器的积累

### 2.1 Mieap 诱导线粒体内溶酶体样细胞器的积累的发现

目前, 对于 MQC 的研究主要有两个方面: (1) 大自噬和/或小自噬作用对整个线粒体的质量控制; (2) 线粒体蛋白的质量控制. 而线粒体内受损蛋白的质量控制( quality control) 机制还没有完全被发现. 仅仅只有一些线粒体内蛋白降解的部分机制被发现. 例如, 线粒体中一些蛋白酶在蛋白降解的调节中起重要作用<sup>[6]</sup>. 其中, 线粒体基质中的 LON 蛋白酶( LON protease) 和乌头酸酶( aconitase) 是促进氧化的蛋白降解的重要因子<sup>[11]</sup>. 除了 LON 蛋白酶外, AAA 蛋白酶( AAA proteases) ( 包括 i-AAA 和 m-

AAA) 也被认为参与线粒体内膜蛋白的降解<sup>[12]</sup>. 但由于 AAA 和 LON 的蛋白酶活性主要依赖于 ATP, 仅当 ATP 浓度充足时, 它们才能发挥功能<sup>[6]</sup>. 因此, 当细胞经历各种不同的应激事件( various stressful events) 导致线粒体损伤, 线粒体的 ATP 产生减少时, 将导致 LON 和 i-AAA 或者 m-AAA 蛋白酶功能受影响. 而在这种情况下, 线粒体是通过什么机制来控制线粒体蛋白的质量? 另外, 大部分的线粒体蛋白又是通过什么机制控制线粒体蛋白的质量?

2011 年 Miyamoto 等<sup>[8]</sup>研究发现了 1 个与先前完全不同的机制来参与 MQC. 他们发现, Mieap 只在线粒体和胞浆内表达, 并且 Mieap 的表达与线粒体内溶酶体信号重叠, 而在 Mieap 甲基化的细胞系中没有 Mieap 表达, 并且线粒体内也没有溶酶体信号. 而将 Mieap 未甲基化的细胞暴露于过氧化氢时, Mieap 蛋白可被强烈地诱导出来, 同时, 溶酶体信号加强. 在 Mieap 敲减的细胞中, 线粒体内没有溶酶体信号出现. 根据这些结果, 他们提出, Mieap 诱导的线粒体内溶酶体样细胞器的积累( MALM) 的现象. 他们研究发现, MALM 可持续几 d, 同时也不具有自噬体的双层膜结构的特征. 而且, MALM 发生时既没有线粒体结构的破坏也没有线粒体信号的丢失, 而线粒体结构的破坏和线粒体信号的丢失经常在经典的线粒体自噬中观察到, 因此, MALM 与自噬体无关.

综合现有的研究报道推测<sup>[8]</sup>, MALM 完全不同于整个线粒体的降解机制, 而这种 MALM 系统是应激情况下的后备系统( back-up system), 在线粒体内清除受损的蛋白, 来加速异常线粒体的修复过程. 过氧化氢的实验结果也支持他们的这一想法.

### 2.2 Mieap 诱导线粒体内溶酶体样细胞器的形态

从形态学的观点看, 在细胞质中, 一个经典的溶酶体结构是一个生物膜形成的囊泡, 从小于 1  $\mu\text{m}$  到几  $\mu\text{m}$ , 并且它的内容物包含了不同的多种多样的组分, 有时还会包含其它需要消化的细胞器<sup>[13]</sup>. 在电镜下, 这种线粒体内的这种类型的溶酶体结构不能看到<sup>[8]</sup>. 然而, 运用包埋前 DAB 染色免疫电镜技术( pre-embedding immunoelectron microscopy with DAB) 在线粒体中清楚的显示了 Mieap 和溶酶体蛋白( 包括 LAMP1、LAMP2、组织蛋白酶 D( cathepsin D) 和组织蛋白酶 B( cathepsin B) ). 另外, 运用包埋后金标记免疫电镜技术( post-embedding immunoelectron microscopy with gold particles) 也在线粒体中显示了 Mieap、组织蛋白酶 D 和 LAMP1 蛋白的存在. 而且, 在分离的线粒体中蛋白酶 K 保护的

分析 (proteinase K protection assay with the fractionated mitochondria) 结果显示 Mieap、组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 D 的存在。基于这些结果,线粒体中存在不典型的溶酶体或者溶酶体样细胞器 (atypical lysosomes or lysosome-like organelles),而且这种结构不会破坏线粒体结构。因此,可以推测 Mieap 诱导的线粒体内溶酶体样细胞器的形态学结构不同于典型溶酶体结构。溶酶体的常规结构很难描述。在形态学方面,溶酶体比其它亚细胞结构的细胞器更不清楚<sup>[13]</sup>。溶酶体结构是多种多样的,并依赖于细胞类型和实际情况 (actual conditions)<sup>[13]</sup>。溶酶体的大小从少于 1  $\mu\text{m}$  ( $\sim 10\text{ nm}$ ) 到几  $\mu\text{m}$ <sup>[14]</sup>。而溶酶体的最小尺寸是不清楚的。并且由于线粒体嵴 (mitochondrial cristae) 和内膜 (inner membrane) 的存在,线粒体还包含了许多膜结构。因此,通过区别溶酶体膜与线粒体膜的不同来判断线粒体内的溶酶体结构是很困难的。特别是,当一个溶酶体参与一个特定的蛋白降解 (例如伴侣介导的自噬 (chaperon-mediated autophagy, CMA)<sup>[15]</sup>) 时,由于溶酶体没有包含一些细胞器结构的任何降解成分,使得区分溶酶体结构变得很困难。目前,在这个研究中很有可能只有免疫细胞化学和生化分析能够辨别线粒体内溶酶体样细胞器的存在。

### 2.3 Mieap 诱导线粒体内溶酶体样细胞器的积累的形成机制

**2.3.1 Mieap 诱导的溶酶体样细胞器的形成位置**线粒体内溶酶体样细胞器的发现带来许多问题。其中最重要的问题是线粒体中这种细胞器是怎么发生的。

线粒体中溶酶体样结构的形成可以通过两种可能途径。第一,细胞质中的溶酶体或者溶酶体样细胞器移位到线粒体中,而不破坏线粒体的内膜和外膜。第二,溶酶体或者溶酶体样细胞器在线粒体中生成。而前一种机制比后一种机制的可能性更大。首先,溶酶体中至少存在超过 50 种蛋白<sup>[8]</sup>,在线粒体内生成的可能性很小。其次,因为线粒体 DNA 中不存在编码溶酶体蛋白的基因,所以在线粒体内溶酶体样细胞器的组装之前,溶酶体的所有成分必须导入到线粒体中。然而,溶酶体的蛋白没有线粒体定位信号序列,提示这些蛋白不能进入线粒体。第三,细胞器还有双层膜结构,而在线粒体中溶酶体的膜结构不可能生成。第四,线粒体内 MALM 中的组织蛋白酶 D 与组织蛋白酶 B 的分子量与胞浆中的组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 B 相同<sup>[8]</sup>,这提示线粒体内的组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 B 不是在线粒体内合成,但可

以由胞浆中的组织蛋白酶移位到线粒体中。这是因为组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 B 在胞浆中合成后,会被糖基化然后通过 ER-Golgi 转移途径定位到溶酶体中。如果线粒体内的组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 B 在线粒体中合成,由于线粒体中缺乏蛋白糖基化的酶,它的分子量也会不同于胞浆蛋白。综上所述,可以推测后一种机制是行不通的,线粒体内溶酶体样细胞器的形成是通过细胞浆中的溶酶体样细胞器移位到线粒体中而实现的。

**2.3.2 Mieap 诱导的溶酶体样细胞器识别异常线粒体的机制**“异常线粒体”通常是指氧化磷酸化功能不全的线粒体,而这种功能不全的氧化磷酸化主要以 ATP 的合成减少和 ROS 过度生成作为特征的。而 Mieap 诱导的 MALM 正是通过 ROS 来识别不正常的线粒体的。然而,由于 ROS 是很小的可溶分子,它们可能在线粒体局部一产生就从线粒体分散到整个胞浆。那么 mtROS 是怎么样标记异常线粒体而被 Mieap 识别的。最近的研究发现,异常线粒体产生的过度 ROS 可以氧化和修饰线粒体外膜脂质和/或蛋白,而这些脂质和/或蛋白起到了对异常线粒体的标记作用<sup>[16]</sup>。

经研究发现,另一种蛋白 NIX 在 Mieap 识别异常线粒体中也发挥着重要作用。NIX (也称为 BNIP3L) 是一个 BH3-only 蛋白,属于 Bcl-2 家族<sup>[17]</sup>。同家族蛋白 BNIP3 有 55% 的氨基酸序列与 NIX 相同<sup>[14]</sup>。NIX 位于线粒体外膜上,能调节细胞死亡<sup>[17]</sup>。有趣的是,相对于其它线粒体的 Bcl-2 家族蛋白,NIX 和 BNIP3 没有参与细胞色素 C 的释放,引起 caspase 依赖的凋亡,而是通过调节线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 来参与坏死的过程<sup>[18]</sup>。NIX 还定位于内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 上,可以增加  $\text{Ca}^{2+}$  蓄积,导致  $\text{Ca}^{2+}$  流入线粒体,引起细胞死亡<sup>[19]</sup>。Kitamura 等<sup>[9]</sup>发现: (1) NIX 作为一种线粒体的外膜蛋白,在 MALM 中是必须的因子; (2) Mieap 通过与 NIX 相互作用来定位识别异常线粒体; (3) mtROS 对于 Mieap 与 NIX 的相互作用是必须的。ROS 的修饰会影响一些蛋白,而 ROS 修饰过程的其它类型能可逆调节一些蛋白的功能。后者类似于磷酸化与去磷酸化的过程<sup>[20]</sup>。因此,线粒体产生的 mtROS 可能调节 NIX 和/或 Mieap,使得 NIX 与 Mieap 能相互作用,从而介导溶酶体样细胞器识别异常线粒体。

**2.3.3 Mieap 诱导的溶酶体样细胞器进入线粒体的机制**溶酶体样细胞器是如何进入线粒体中而不

需要破坏线粒体结构呢? 以前的研究发现, 线粒体内外膜上存在一些通道, 能调节线粒体蛋白的转运<sup>[21]</sup> 或者在凋亡时细胞色素 C 从线粒体膜间释放<sup>[22]</sup>. 由于这些蛋白转运机制只允许个别蛋白的特异性转运<sup>[21]</sup>, 并且凋亡机制的孔道(例如 VDAC) 只在线粒体外膜上用来释放细胞色素 C<sup>[22]</sup>. 因此, 没有一种通道能解释 MALM 的形成机制. 然而, Miyamoto 等<sup>[8]</sup> 推测, 线粒体外膜上可能存在一种类似线粒体通透性转换孔( mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的通道来调节溶酶体样细胞器移位到线粒体中. MPTP 被认为是一种非特异性通道, 跨越在线粒体外膜和内膜上, 能在胞浆和线粒体基质之间打开一个很大的孔<sup>[23]</sup>. 因此, MPTP 被认为参与了不典型细胞死亡( atypical cell death) (如坏死( necrosis)). 然而, MPTP 的生理作用仍然不清楚<sup>[23]</sup>. MPTP 可渗透的溶质大小不超过 1.5 kD, 孔的大小对于溶酶体或者溶酶体样细胞器的移位太小. 因此, Miyamoto 等<sup>[8]</sup> 推测线粒体外膜上可能存在一种未证实的 MPTP 样通道( unidentified MPTP-like channel), 这种通道能被 Mieap 所调节, 能从线粒体外膜到线粒体内膜开一个大孔, 使溶酶体样细胞器从胞浆转移到线粒体.

#### 2.3.4 线粒体外膜的未证实通道的形成机制

MPTP 样通道又是如何被调控的, 如何特异性介导溶酶体样细胞器进入线粒体?

BNIP3 和 NIX 一样, 也是一种 BH3-only 蛋白, 属于 Bcl-2 家族<sup>[18]</sup>. 最初, BNIP3 作为一种与 Bcl-2 相互作用蛋白被发现的, 也位于线粒体外膜上, 能通过抑制抗凋亡蛋白(包括 Bcl-2 和 Bcl-xL<sup>[24]</sup>) 来诱导凋亡. 然而, 随后的研究发现, 和 NIX 一样, BNIP3 诱导的细胞凋亡不能被 caspase 抑制剂抑制, 并且 BNIP3 诱导的细胞凋亡并不依赖细胞色素 C 的释放<sup>[25]</sup>. 与其它促凋亡的 BH3-only 蛋白(包括 Puma 和 Noxa) 相反, 同时, BNIP3 对细胞凋亡的诱导不依赖于 BNIP3 的 BH3 结构域而依赖于 TM 结构域<sup>[25]</sup>. 这些事实提示, BNIP3 可能拥有一种区别于其它 BH3-only 蛋白的特殊作用. 在最近的研究中, Nakamura 等<sup>[26]</sup> 通过在两个细胞系中过表达 BNIP3 或 NIX 没有观察到对凋亡的任何诱导以及非凋亡的细胞死亡或者线粒体膜电位( mitochondrial membrane potential, MMP) 的显著改变, 而这和以前发现的 BNIP3 或 NIX 的诱导凋亡能力弱的结论一致. 而当 Mieap, BNIP3 和 NIX 在同一个细胞中共表达时, 他们发现了 MMP 的显著减少, 但细胞并未发

生凋亡, 这提示这 3 种蛋白可能共同介导了另一种现象, 在线粒体双层膜上开启一个通道. 他们运用缺失重组体 Mieap- $\Delta$ CC(  $\Delta$ CC 是 Mieap 的 coiled-coil 结构域的突变)、NIX- $\Delta$ BH3、BNIP3- $\Delta$ BH3(  $\Delta$ BH3 是 BH3 结构域的突变), 证明线粒体膜上未证实通道的开放依赖于 3 种蛋白 Mieap, BNIP3 和 NIX 在线粒体外膜( mitochondrial outer membrane, MOM) 上的相互作用. 并且进一步研究发现, 这 3 种蛋白诱导的通道不是 MPTP. 这个研究还发现, BNIP3 和 NIX 通过它们的 BH3 结构域与 Mieap 的卷曲螺旋( coiled-coil) 结构域的相互作用. 这一结果提示, BNIP3 和 NIX 的 BH3 结构域在 MALM 中起关键作用. 同时, 研究还发现, Mieap 定位在线粒体外膜和线粒体内部, 而使用免疫荧光和蛋白酶 K 保护分析( proteinase K protection assay) BNIP3 和 NIX 仅仅在线粒体外膜上被发现. 这些结果提示, BNIP3 和 NIX 通过它们的 BH3 结构域在 MOM 上与 Mieap 相互作用, 诱导一个跨越线粒体外膜和线粒体内膜的通道开放, 介导溶酶体样细胞器从胞浆到线粒体基质的移位.

#### 2.4 Mieap 诱导线粒体内溶酶体样细胞器识别和降解氧化的线粒体蛋白的机制

MALM 的功能主要是通过清除异常线粒体中的氧化蛋白来达到线粒体质量控制的目的. 那么, MALM 在线粒体中是如何识别线粒体内氧化的蛋白?

Miyamoto 等<sup>[27]</sup> 发现, 在诱导 MALM 过程时, 有一种蛋白即 14-3-3 $\gamma$ , 从胞浆移位到线粒体内. 14-3-3 $\gamma$  属于 14-3-3 家族, 14-3-3 家族是一种酸性二聚体蛋白( acidic dimeric proteins) 家族, 从酵母菌到哺乳动物具有高度的保守性<sup>[28]</sup>, 并且每一个 14-3-3 单体都有一个结合槽( binding groove). 14-3-3 $\gamma$  能与 Mieap 相互作用, 属于 Mieap 结合蛋白复合体中的一种, 当 MALM 发生时, 14-3-3 $\gamma$  定位在线粒体内部. 14-3-3 $\gamma$  的缺陷不影响 Mieap 和溶酶体蛋白在线粒体内的积累, 但显著抑制氧化的线粒体蛋白的消除. 这些结果提示, 14-3-3 $\gamma$  在 MALM 识别氧化的线粒体蛋白的过程中起关键作用. 然而, 14-3-3 $\gamma$  是如何参与 MALM 识别氧化的线粒体蛋白?

14-3-3 蛋白的作用被归为 3 个模式: (1) 直接导致靶蛋白构象改变; (2) 隐藏靶蛋白特异性区域; (3) 两种蛋白的共定位( colocalization of two proteins)<sup>[28]</sup>. 在 MALM 的情况中, Miyamoto 等<sup>[27]</sup> 推测, 14-3-3 $\gamma$  可能像脚手架一样锚定蛋白质相互接

近. 在线粒体内, 14-3-3 $\gamma$  可能通过介导 Micap 与氧化的蛋白质相互作用来调节氧化的线粒体蛋白进入溶酶体样细胞器. 这一观点还需进一步的研究. Miyamoto 等<sup>[8]</sup> 研究发现, 溶酶体酶抑制剂和运用氯化铵中和线粒体内酸性环境能抑制 MALM 降解氧化的线粒体蛋白的过程. 这一结果证实, MALM 通过溶酶体酶来降解氧化的线粒体蛋白. 根据 14-3-3 $\gamma$  在 MALM 中的研究<sup>[27]</sup>, 可以推测氧化的线粒体蛋白通过 14-3-3 $\gamma$  介导进入 MALM, 并被其包含溶酶体酶所消化. 这一过程类似于在细胞浆中溶酶体通过 LAMP2A 和热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 以 CMA 方式特异性的摄取和降解的氧化蛋白的过程<sup>[15]</sup>.

### 3 Micap 诱导囊泡

#### 3.1 Micap 诱导囊泡的现象的发现

Matsui 等<sup>[29]</sup> 发现, 在大自噬缺陷的 *ATG5<sup>-/-</sup>* (是一种大自噬发生相关的基因) 小鼠的晶状体和红系细胞的分化中, 线粒体自噬能正常发生. 这提示存在线粒体自噬的替代途径. 同时, 受  $\gamma$  辐射的 MALM 被抑制的细胞, 可以发现在胞浆中出现 Micap 依赖的大囊泡. 并且, 这些囊泡 (称为 MIV) 能特异性的吞噬异常线粒体. 而电镜和免疫荧光的数据表明, MIV 与典型的通过双层膜自噬体介导的自噬不相关. 另外, 由于异常线粒体能直接被 MIV 接触和吞噬, 因此 MIV 不依赖于大自噬基因 *ATG5* 和 *ATG12*<sup>[6, 30]</sup>. 这些结果提示, 在哺乳动物细胞中, MIV 是区别于经典大自噬和小自噬 (与后面的选择性小自噬不同, 经典的小自噬会吞噬部分浆) 的线粒体自噬的另一种类型, 也是 Micap 介导的参与 MQC 的另一个机制.

#### 3.2 Micap 诱导囊泡的形成机制

在正常情况下, 哺乳细胞胞浆中没有大囊泡. MIV 是  $\gamma$  辐射通过 p53 和/或 Micap 依赖的方式诱导出来的<sup>[9]</sup>. 那么 MIV 具体是如何形成的? Kitamura 等<sup>[9]</sup> 研究发现: (1) Micap 蛋白定位在囊泡样结构的边缘, 提示 Micap 自身可能构成 MIV 膜的结构. (2) Alexa488-EGF 结合实验 (Alexa488-EGF incorporation experiment) 表明, MIV 膜可能通过细胞膜内吞的途径形成. (3) PI3K (一种内吞的信号途径) 的抑制剂阻断了 MIV 的生成, 进一步支持了内吞信号途径参与 MIV 生成的事实. 根据这些发现, MIV 很有可能是通过细胞膜内吞形成, 并且 Micap 参与构成 MIV 的膜并调节 MIV 的生成.

#### 3.3 Micap 诱导囊泡识别异常线粒体

在酵母菌中, 线粒体外膜蛋白 Uth1p 在线粒体的选择性小自噬 (selective microautophagy) 中起关键作用. 但到目前为止, 人类同源的这种蛋白没有被发现. 在人类细胞中可能有一种未被发现的线粒体外膜蛋白, 而这种蛋白在 MIV 介导的线粒体自噬的识别异常线粒体上起重要的作用. 因为 MIV 在 NIX 敲减细胞中被发现能吞噬和降解线粒体<sup>[9]</sup>, 所以推测 MIV 特异性降解异常线粒体的过程不依赖于 NIX. 有趣的是, ROS 清除剂 NAC 和依布硒啉 (Ebselen) 不能抑制 MIV 的形成, 但在 Micap 蛋白过表达的情况下能完全抑制受损线粒体的摄取. 这个结果提示, 异常线粒体产生的 mtROS 也可能在 MIV 定位到异常线粒体的过程中起关键作用. 而在酵母菌中, 线粒体外膜脂质的氧化在线粒体的选择性小自噬中起关键作用<sup>[16]</sup>. mtROS 导致的线粒体外膜脂质的氧化也可能在人类细胞的 MIV 介导的线粒体自噬中起标记异常线粒体的作用. 或者, MIV 像 MALM 一样, 一种未发现的线粒体外膜蛋白和/或 mtROS 修饰的这种蛋白在 MIV 中起标记异常线粒体的作用. 这些机制需要进一步的研究.

#### 3.4 Micap 诱导囊泡降解不正常的线粒体

根据 MIV 是一种选择性线粒体自噬的结果, Kitamura 等<sup>[9]</sup> 推测, MIV 摄入和降解异常线粒体的机制类似于酵母菌中线粒体的有选择的小自噬过程. Kissova 等<sup>[31]</sup> 发现, 选择性和非选择性的线粒体自噬都在酵母菌中存在. 前者不是由经典的大自噬或者小自噬所介导, 而是被“选择性的小自噬”介导. 在这种线粒体的选择性小自噬中, 酵母菌囊泡直接接触和吞噬线粒体而不需要吞噬周围的胞浆. 因此, 人类细胞中的 MIV 介导的线粒体自噬有可能与酵母菌的这种机制类似. MIV 吞噬异常线粒体, 与溶酶体融合, 导致异常线粒体的降解. 这一机制仍需进一步的证实.

### 4 Micap 参与线粒体命运的决定

Kitamura 等<sup>[9]</sup> 证明, Micap 通过 MALM 或 MIV 分别修复或消除异常线粒体的方式在线粒体质量控制中起重要作用. 这些机制与调节凋亡的“p53 智能”模型 (“p53 smart” model)<sup>[30]</sup> 相似. 在这个模型中, p53 通过诱导凋亡来杀死肿瘤细胞或者通过修复 DNA 损伤来维持细胞生存来决定细胞命运<sup>[30]</sup>, 这种决定依赖于损伤的程度. 当损伤太严重而不能修复时, 细胞将被杀死. 然而, 如果损伤是轻度的, 那

么细胞的损伤将会被修复,而细胞将生存下来。

目前,Mieap 介导的修复或者消除异常线粒体的选择机制仍然不清楚。在目前的研究中,Kitamura 等<sup>[9]</sup>证明异常线粒体生成 ROS 的水平对于 MALM 和 MIV 的形成是至关重要的。因此,异常线粒体产生的 ROS( mtROS) 的水平可能在这个线粒体命运决定中起关键作用。Mieap 通过诱导 MALM 来降解和消除氧化的受损的线粒体内的蛋白和防止 mtROS 的进一步生成,来修复异常线粒体,有利于线粒体正常的功能。然而,当线粒体的损伤太严重,MALM 不能修复异常线粒体时,Mieap 诱导 MIV 的形成来消除严重损伤和不可修复的线粒体。Kitamura 等<sup>[9]</sup>通过抑制 NIX 来抑制 MALM 能诱导 MIV 的形成,并且线粒体被 MIV 吞噬和降解,而这个实验结果支持了这个想法。因此,MIV 起到了一个替代和应急系统(alternative and emergent system)作用,并和 MALM 一起通过消除严重受损线粒体来维持线粒体的正常状态。由于 MALM 缺陷引起线粒体产生过量的 ROS,在胞浆中 mtROS 的增加能导致 MIV 的形成。可以推测,ROS 对 Mieap 的修饰过程可能通过参与 MALM 或者 MIV 形成的选择机制,来决定线粒体命运。

## 5 总结与展望

Mieap 通过 MALM 消除氧化的线粒体蛋白而修复 mtROS 对线粒体轻度损伤或者通过 MIV 吞噬异常线粒体而清除被 mtROS 造成重度损伤的线粒体,来控制线粒体的质量并参与线粒体命运决定过程。但是大部分这些机制仍需进一步研究证实。这些新的关于线粒体质量控制的机制,解释许多以前关于线粒体质量控制的疑惑,并且揭示了 ROS 在线粒体质量中的决定性机制,是对线粒体质量控制的复杂调控的重要补充,将使得我们对于生命的理解更加充分,也将对细胞死亡的相关治疗开辟新的靶点。由于 Mieap 是 p53 的下游基因,所以 MALM 和 MIV 的发现还参与 p53 所引起癌症抑制过程。对于 MALM 和 MIV 的进一步研究,会让我们进一步了解线粒体维持自身稳定的机制。

## 参考文献(References)

- [1] Kubli D A, Gustafsson Å B. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control[J]. *Circ Res*, 2012, **111**(9): 1208-1221
- [2] Hayashi J, Takemitsu M, Nonaka I. Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by introduction of mitochondrial DNA from normal human cells[J]. *Somat Cell Mol Genet*, 1992, **18**(2): 123-129
- [3] Tatsuta T, Langer T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing[J]. *EMBO J*, 2008, **27**(2): 306-314
- [4] Mijaljica D, Prescott M, Devenish R J. Different fates of mitochondria: alternative ways for degradation[J]. *Autophagy*, 2007, **3**(1): 4-9
- [5] Friguet B, Bulteau A L, Petropoulos I. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing[J]. *Biotechnol J*, 2008, **3**(6): 757-764
- [6] Adam C, Picard M, Déquard-Chablat M, et al. Biological roles of the *Podospora anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e38138
- [7] Major T, von Janowsky B, Ruppert T, et al. Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease pim1[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(3): 762-776
- [8] Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, et al. Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control[J]. *PLoS One*, 2011, **6**(1): e16054
- [9] Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, et al. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria[J]. *PLoS One*, 2011, **6**(1): e16060
- [10] Bornstein C, Brosh R, Molchadsky A, et al. SPATA18, a spermatogenesis-associated gene, is a novel transcriptional target of p53 and p63[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, **31**(8): 1679-1689
- [11] Ngo J K, Davies K J. Importance of the lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining lon in aging[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, **1119**: 78-87
- [12] Gerdes F, Tatsuta T, Langer T. Mitochondrial AAA proteases—towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1823**(1): 49-55
- [13] Lullmann-Rauch R. History and Morphology of the Lysosome [M]//Saftig P ed. *Lysosomes*. Georgetown: Landes Bioscience, 2005: 1-16
- [14] Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, et al. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins[J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(1): 7-10
- [15] Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz M C, Cooper J M, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains[J]. *Arch Neurol*, 2010, **67**(12): 1464-1472
- [16] Kissova I, Deffieu M, Samokhvalov V, et al. Lipid oxidation and autophagy in yeast[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, **41**(11): 1655-1661
- [17] Lu Y, Wang L, He M, et al. Nix protein positively regulates NF-κB activation in gliomas[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(9): e44559
- [18] Zhang J, Ney P A. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2009, **16**(7): 939-946
- [19] Dorn G W 2nd. Mitochondrial pruning by Nix and BNIP3: an

- essential function for cardiac-expressed death factors [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, **3**(4): 374-383
- [20] D'Autreaux B, Toledano M B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(10): 813-824
- [21] Kutik S, Guiard B, Meyer H E, *et al.* Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import [J]. *J Cell Biol*, 2007, **179**(4): 585-591
- [22] Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(1): 67-71
- [23] Baines C P. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, **46**(6): 850-857
- [24] Boyd J M, Malstrom S, Subramanian T, *et al.* Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins [J]. *Cell*, 1994, **79**(2): 341-351
- [25] Cizeau J, Ray R, Chen G, *et al.* The *C. elegans* orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3- and caspase-independent mechanism [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(48): 5453-5463
- [26] Nakamura Y, Kitamura N, Shinogi D, *et al.* BNIP3 and NIX mediate Mcl-1-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(1): e30767
- [27] Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, *et al.* Identification of 14-3-3 $\gamma$  as a Mcl-1-interacting protein and its role in mitochondrial quality control [J]. *Sci Rep*, 2012, **2**: 379
- [28] Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, **22**(7): 663-672
- [29] Matsui M, Yamamoto A, Kuma A, *et al.* Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **339**(2): 485-489
- [30] Vousden K H. p53: death star [J]. *Cell*, 2000, **103**(5): 691-694
- [31] Kissova I, Salin B, Schaeffer J, *et al.* Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast [J]. *Autophagy*, 2007, **3**(4): 329-336