

ATP依赖的Lon蛋白酶研究进展

夏雷[#] 刘永章[#] 姚蔚[#] 黎真 张纪亮 武芝 陈林 吕斌*

(温州医学院Attardi线粒体生物医学研究院, 浙江省医学遗传学重点实验室,
温州医学院检验医学与生命科学学院生物系, 温州 325035)

摘要 Lon蛋白酶, 也叫蛋白酶La, 是一种同质寡聚环状的ATP依赖的蛋白酶, 在古生菌、原核生物和真核生物中高度保守。Lon蛋白酶属于AAA⁺超家族(与多种细胞活性相关的ATP酶)。自Lon蛋白酶被发现以来, 许多研究表明Lon的蛋白酶活性对于维持细胞体内平衡、蛋白质质量控制和代谢调控起着重要作用。该文综述了近年来Lon蛋白酶的研究进展, 主要从Lon蛋白酶的结构和功能、与衰老和疾病的关系等方面进行了系统的阐述。

关键词 AAA⁺蛋白酶; Lon蛋白酶; 线粒体; 衰老; 蛋白质质量控制

ATP依赖的Lon蛋白酶的名称来源于大肠杆菌Lon基因的突变表型, 该表型是由于细菌在紫外线照射之后形成成长的、不可分裂的线状结构而形成的。自Lon蛋白酶被发现以来, 许多研究表明, Lon蛋白酶通过介导异常或损伤的蛋白和短暂调控蛋白的降解来维持细胞的体内平衡。Lon蛋白酶主要在原核生物的胞质以及真核生物的线粒体和过氧化物酶体中起作用^[1,2-6]。ATP依赖的Lon蛋白酶不论是在古生菌、原核生物中, 还是在真菌和哺乳动物的线粒体和过氧化物酶体中都是高度保守的。

1 Lon蛋白酶的结构和功能

人Lon蛋白酶由核基因组编码(图1)^[7], 是由959个氨基酸组成的蛋白质, 与细菌的La蛋白酶同源。它可以在细胞质中翻译成带有氨基末端线粒体靶向序列的前体多肽(mitochondrial targeting sequence, MTS), MTS可直接使Lon蛋白酶前体穿过线粒体外膜和内膜, 进入线粒体基质; 此后, 靶向序列被切除, 形成成熟的Lon蛋白酶。Lon蛋白酶分子量约为106 kDa, 它可以形成有活性的同质寡聚复合体, 在细菌和真菌(如酵母)中分别形成六聚体和七聚体。Lon蛋白酶含有三个功能结构域: N端结构域、ATP酶结构域(也叫AAA⁺模块)以及P结构域^[8]。N端结构域在氨基酸组成上有相当程度的差异, 可参与底物的识别。AAA⁺模块由两部分组成: 一部分是可与ATP结合的区域, 即 α/β 结构域; 另一区域则用于ATP水解, 即 α 区域; 第三个结构域(P结构域)相当保守, 含有丝氨酸和赖氨酸活性位点残基, 可形成催化二联体并具

有蛋白水解活性。Lon作为丝氨酸蛋白酶, 利用切割特异性, 形成酰基酶中间体, 对疏水氨基酸(如甲硫氨酸、酪氨酸、色氨酸)的C末端进行水解^[9]。Lon蛋白酶的蛋白水解活性的另一个特点就是可以被ATP激活; 反之, ADP可作为Lon蛋白酶的抑制剂^[10]。

Lon蛋白酶依赖ATP的蛋白降解机制与其它蛋白酶的蛋白降解机制有着相似之处: 第一, 通过全酶的N端结构域和AAA⁺结构域识别并结合蛋白底物的特异性识别位点, 但不依赖于ATP的水解; 第二, ATP的结合和水解使复合体的构象发生改变, 底物多肽去折叠; 第三, 底物进入蛋白水解部位; 第四, 当去折叠的底物进入蛋白降解部位后, 肽键剪切开始发生。

Lon作为热休克蛋白, 它的主要功能之一就是蛋白质质量控制。在细菌中, Lon蛋白酶的突变表现为异常的蛋白质降解发生缺陷, 证明了Lon蛋白酶在蛋白质质量控制中的作用。在大肠杆菌中, 大肠杆菌Lon蛋白酶(EcLon)不仅参与了异常蛋白的降解, 还选择性地降解短暂调控蛋白, 如噬菌体 λ N蛋白(SulA细胞分裂调控子)、荚膜合成正调控子RCS和ccdAB系统蛋白CcdA^[11]。最近研究发现, Lon对前分泌蛋白proOmpF的降解也起着重要作用^[12]。Choy等^[13]发现

收稿日期: 2012-01-17 接受日期: 2012-04-05

国家自然科学基金(No.31070710, No.31171345)、浙江省钱江人才B基金(No.2010R10045)、温州医学院科研启动基金(No.QTJ09010)、教育部留学回国人员科研启动基金、温州市科技局对外合作基金(No.H20100064)和浙江省自然科学基金(No.Y2110097)资助项目

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86699722, E-mail: lubmito@wzmc.edu.cn

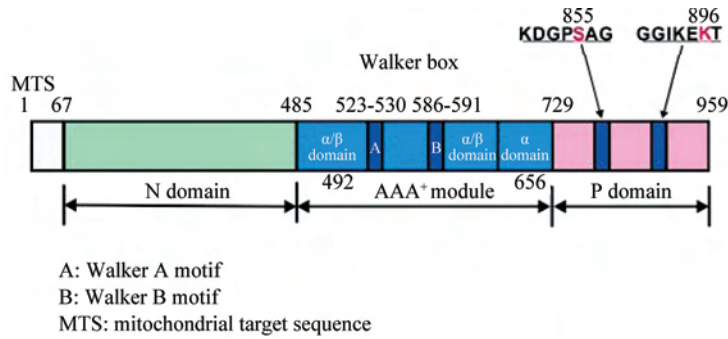


图1 人类线粒体Lon蛋白酶亚基结构域的组成及功能基序(根据参考文献[7]修改)

Fig.1 Domain structure and functional motifs within the primary amino acid sequence of human mitochondrial Lon (modified from reference [7])

Lon蛋白酶能降解转运信使RNA(transfer-messenger RNA, tmRNA)标记的蛋白质。反式翻译是细菌体内一种修复翻译水平上受阻的遗传信息表达过程的机制。tmRNA是反式翻译的核心分子,它兼具tRNA和mRNA的特点,在SmpB蛋白的帮助下特异性识别携带mRNA缺失体的核糖体,在核糖体蛋白S1的传递作用下结合在核糖体A位点上,这一过程一方面可以延续被中断的mRNA上的遗传信息;另一方面可以终止蛋白质的合成,释放被束缚的核糖体和tRNA进入新的翻译过程。EcLon不仅在SOS应答、酸耐受、营养缺失中起作用,还参与毒素-抗毒素系统的调控^[14]。通过对一些蛋白质的研究发现,富含非极性氨基酸N末端的降解标签对于Lon的降解是必需的。另一个Lon依赖的蛋白降解的重要决定因素是蛋白底物与它们的受体之间的相互作用。至今,大多数研究显示受体可以保护底物免受Lon的降解,例如大肠杆菌中的前分泌蛋白proOmpF对于Lon的特异性降解十分敏感,但是在分子伴侣DnaJ或者SecB的作用下,它们不被Lon降解。

在真核生物中, Lon蛋白酶的缺失或下调会导致不同的表型。在酵母线粒体基质中, Lon是唯一的ATP依赖的蛋白酶,不像多细胞动物中还有ClpXP存在。因此,在酵母中,同源蛋白Pim1/Lon在线粒体中行使着重要的功能。在酿酒酵母的研究中发现, Pim1/Lon突变菌株具有呼吸缺陷,不能利用非发酵碳源作为底物,导致线粒体基质中ATP依赖的蛋白水解缺陷,电子致密包涵体积和大量mtDNA缺失^[15-16]。

哺乳动物Lon蛋白酶的內源性底物包括氧化的线粒体顺乌头酸酶、类固醇合成快速调控蛋白

(StAR)以及细胞色素C氧化酶(COX)等。在哺乳动物细胞中,氧化的顺乌头酸酶可以被Lon选择性降解^[17-18]。顺乌头酸酶在用H₂O₂处理之后失活并聚集;轻微氧化的顺乌头酸酶可被Lon降解,而受到过度氧化的顺乌头酸酶却不能被降解,这可能是由于蛋白的过度氧化导致蛋白聚集或疏水性增加。而且,ATP可以刺激氧化修饰的顺乌头酸酶蛋白降解。用反义寡聚核苷酸处理人WI-38肺纤维细胞后, Lon蛋白酶的量 and 活性减少,使氧化修饰的顺乌头酸酶积累。类固醇在特异性的性腺细胞和肾上腺皮质细胞的线粒体中由胆固醇合成,而StAR蛋白可以促进胆固醇转移入线粒体。虽然该机制仍未清楚,但是StAR蛋白在线粒体中主要被Lon降解, Lon可能参与了类固醇激素合成的调控^[19]。同样, Lon也参与了COX全酶的重新组装。COX是由13个亚基组成的二聚体,在哺乳动物细胞中主要表达COX4-1亚型,另一个COX4-2亚型也有表达,但是只在某些组织中(如肝脏)表达。最近的研究表明, Lon可以通过对COX全酶的重组来对低氧应激作出合适的应答。在正常氧分压情况下, COX亚基的COX4-1亚型是完整的酶复合体的稳定组成部分;然而,在缺氧情况下,低氧诱导因子HIF-1激活COX的另一个亚型蛋白(COX4-2)和Lon。Lon蛋白水平增加促使COX4-1降解,并使COX4-2组装入COX全酶。因此, COX4-1和COX4-2在COX全酶中组成的变化使细胞线粒体呼吸在低氧条件下维持最佳的效率^[20]。最近,在果蝇细胞中研究发现, Lon可以降解线粒体转录因子A(TFAM)。如果用siRNA下调果蝇细胞中的Lon蛋白酶水平,则TFAM水平增加, mtDNA拷贝数也随着增加;同时,在Lon下调的细胞中,线粒体转录因子B2(TFB2M)

上升,表明TFB2M也可能是Lon的蛋白底物^[21]。

在人肺纤维细胞中, Lon蛋白酶下调使线粒体结构破坏、功能丧失和细胞凋亡, 并且多数细胞在4天内经历caspase 3活化和细胞凋亡^[22]。电镜观察发现线粒体形态异常, 线粒体基质内存在电子密集的包涵体, 这可能是氧化修饰和聚集的蛋白质。下调人乳腺癌细胞MCF7中的Lon蛋白酶水平, 发现细胞增殖受到抑制且诱导了细胞凋亡^[23]。5-氨基酮戊酸合成酶-1(ALAS-1)是亚铁血红素生物合成途径的限速酶, 最近研究发现, 它也是Lon蛋白酶的底物。在多数组织中, 终产物亚铁血红素的合成可以对ALAS-1进行负调控, 可以通过抑制基因转录、加速mRNA降解和破坏ALAS-1前体的线粒体转移来影响ALAS-1的活性。亚铁血红素水平的增加也会促进成熟亚铁血红素依赖性Lon的降解^[24]。Calpain 10是一种广泛表达的非典型钙蛋白酶, 在细胞质、线粒体和细胞核中都有该蛋白的存在。Smith等^[25]研究发现, calpain 10的表达对于细胞生存至关重要, 同时它也是Lon的底物, 但是Lon蛋白酶降解calpain 10却不是ATP依赖的。在氧化剂的作用下, calpain 10的降解速度加快, 这与氧化的顺乌头酸酶相一致。最近研究发现, 在小鼠和人中, 阳离子三苯甲烷染料如亮绿、龙胆紫等具有潜在的抗肿瘤和抗血管生成的作用。用纳摩尔浓度的亮绿就能杀死细胞, 并且线粒体Trx2(human trithorax homolog 2)受到氧化和降解。氧化还原免疫印迹显示, Trx1(human trithorax homolog 1)和Trx2都受到了氧化, 细胞色素C和凋亡诱导因子从线粒体中释放; 同时, Lon蛋白酶的

mRNA水平上升, 表明Trx2可能是Lon蛋白酶的一个底物^[26]。

虽然Lon蛋白酶的许多蛋白底物在降解之前是去折叠的, 但是最近的研究显示, 线粒体Lon蛋白酶的一些内源性底物在折叠状态时也能被降解^[9]。例如: 线粒体加工肽酶 α 亚基(MPP α)在折叠状态具有胰酶抗性, 可以组装成有活性的酶, 可以被Lon降解; 而MPP α 在未折叠状态时不能被Lon降解。折叠状态的MPP α 的切割位点是暴露在表面并被大量电荷围绕的疏水残基, 这些位点可能是Lon选择性降解的识别位点。

Lon蛋白酶是一种多功能蛋白酶(图2)^[27], 除了调控ATP依赖的蛋白降解之外, Lon蛋白酶还具有分子伴侣的功能。有研究表明, 在酵母和哺乳动物的线粒体中, Lon参与了蛋白复合体的组装, 但不依赖于它的蛋白酶活性^[28-29]。内质网应激可使内质网内异常蛋白积累, 线粒体功能损伤; 在哺乳动物中, 内质网、细胞核和线粒体之间的压力应答导致Lon蛋白酶水平上调^[28], 从而促进细胞色素C氧化酶亚基2(COX2)组装到COX复合物中, 并部分恢复线粒体的功能^[29]。

我们的研究发现, Lon倾向于结合在线粒体DNA的D-loop区(也叫mtDNA控制区)^[30]。不仅如此, Lon还可与线粒体DNA聚合酶 γ 和解旋酶(twinkle helicase)相互作用, 表明Lon可能在线粒体DNA的复制中也起着重要作用。已有研究证明, Lon也是线粒体拟核(nucleoids)的一个组成蛋白^[31]。在生理条件下, Lon可能直接或间接地与线粒体基因组相互作用^[28]。因此,

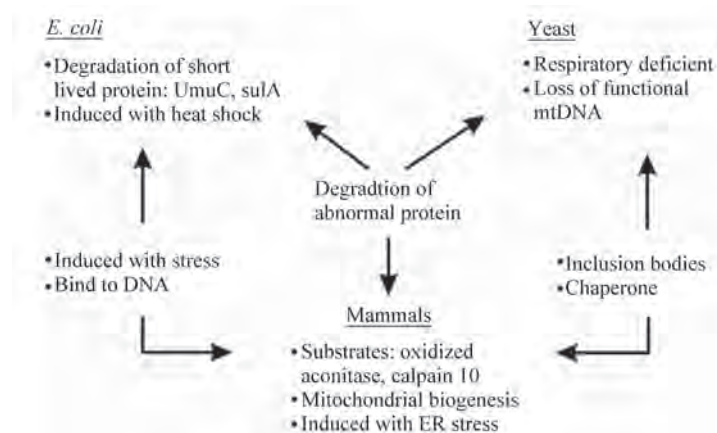


图2 Lon蛋白酶作为多功能蛋白影响多种细胞进程(根据参考文献[27]修改)

Fig.2 The Lon protease is a multifunctional protein affecting many cellular processes(modified from reference [27])

Lon可能通过降解和调控蛋白, 从而对mtDNA的复制、转录和表达进行调控, 重塑线粒体拟核。最近研究发现, 在不同条件下, 线粒体拟核的结构和组成会发生改变, 比如, 线粒体拟核在含甘油培养基生长条件下的酵母细胞中要比含葡萄糖培养基生长条件下的酵母细胞中更为暴露, 因而更易受到核酸酶的攻击^[32]。Ilv5和Hsp60也是拟核的组成部分, 都可以与mtDNA相互作用, 维持mtDNA稳定。这些拟核蛋白在葡萄糖阻遏效应和氨基酸饥饿条件下, 会被募集到拟核中, 重新与其它拟核组成蛋白相结合, 这些蛋白的动态定位造成了线粒体拟核重塑。拟核重塑对于维持mtDNA的稳定十分重要, 因为编码这些蛋白的基因突变会导致mtDNA不同程度的不稳定。

2 Lon蛋白酶与衰老

对于生理和病理的刺激, 线粒体需要通过功能完整、迅速及合适的反应来满足细胞的能量需求。除此之外, 线粒体还参与了细胞内钙离子的体内平衡、信号级联放大, 在一定条件下诱导细胞凋亡。线粒体呼吸链是内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源之一, 线粒体蛋白作为ROS氧化修饰的目标而失去活性。越来越多的研究证明, 衰老和某些疾病可能是自由基对细胞内大分子持续损伤的结果^[33]。线粒体内ROS的产生会随着年龄的增加而增加, 导致更多的蛋白质被氧化。其中, 一个复杂的抗氧化系统就是对氧化修饰的损伤蛋白进行降解。氧化修饰的酶的修复和蛋白质降解是维持细胞体内平衡和生存的两种重要因素。Lon蛋白酶在去除氧化和受损伤的蛋白质中起着至关重要的作用。

Lee等^[34]在对衰老小鼠骨骼肌的研究中首次发现Lon mRNA与衰老有关。他们发现, 在30个月的老年小鼠中, 稳定的Lon mRNA水平仅是年轻小鼠的1/4左右。Bota等^[18]研究发现, 与年轻小鼠相比, 老年小鼠中线粒体Lon蛋白酶的水平和活性降低了将近80%。老年小鼠中有很高水平的羰基化蛋白(氧化的蛋白质), 特别是氧化的线粒体顺乌头酸酶, 可能是由于Lon蛋白酶降解氧化蛋白的能力下降而导致其不断积累。顺乌头酸酶是线粒体三羧酸循环中必需的酶, 对于氧化损伤十分敏感。在衰老或与衰老相关的疾病中, 在氧化应激作用下, 线粒体中的蛋白质, 特别是顺乌头酸酶会被氧化修饰并失

活。*MnSOD*(+/-)小鼠遭受严重的氧化损伤, 导致MnSOD水平比正常线粒体中少近一半, Lon蛋白水平和蛋白酶活性比野生型*MnSOD*(+/+)小鼠低得多, 这些现象在年轻小鼠和衰老小鼠中都可以清晰地观察到, 表明Lon蛋白的表达随着年龄增加而下降。对10个月和27个月小鼠的肝线粒体呼吸和Lon活性进行检测, 发现在年幼和年老的小鼠中, 氧消耗基本相同, Lon蛋白水平没有明显改变, 但是在衰老小鼠中ATP促进的Lon蛋白酶活性比年轻小鼠中降低了一半。与年幼小鼠相比, 在27个月的年老小鼠的线粒体中, CML(nepsilon-carboxymethyllysine)修饰的蛋白增加了52%, 表明在衰老细胞中由于Lon蛋白酶的活性下降而使得氧化损伤的蛋白不能及时被清除而积累^[35]。研究还发现, 心脏线粒体中Lon蛋白的表达随着年龄增长而增加, 但ATP刺激的活性不变^[36], 这可能是由于Lon蛋白酶的效率随着年龄增长而降低, 为了维持与年轻细胞中相同的活性水平, 而需要较高的表达水平。总之, 这些研究表明Lon的效率会随着年龄增加而降低, 从而影响衰老线粒体对外界应激的应答能力。

Ngo等^[37]还发现在早期的人WI-38肺纤维细胞中, 在H₂O₂应激作用下, Lon蛋白的表达迅速上升。在氧化应激下的中期细胞, Lon蛋白酶的表达十分微弱, 氧化蛋白开始积累; 在后期或衰老细胞中只有很低水平的Lon蛋白, 并有大量的氧化蛋白积累。衰老细胞分成两种: 一种表现为有正常数量的线粒体, 另一种则有明显的线粒体缺失。两种细胞的线粒体膜电位都有所下降, 这与早期衰老细胞中Lon蛋白酶活性下调导致的效果相似。因此, Lon蛋白酶的应激反应能力的缺失可能是细胞在衰老过程中适应性能力降低的一种表现。

子囊菌柄孢霉是一种丝状真菌, 它作为一种模式生物, 被广泛应用于机体衰老分子机制的研究。Luce等^[38]研究表明, 柄孢霉Lon蛋白酶(PaLon)在衰老柄孢霉中的持续过表达可使ATP依赖的丝氨酸蛋白酶活性增加。这些菌株表现出较低的羰基化和羧甲基化蛋白质水平、过氧化氢分泌减少、对外源氧化应激的耐受性较高, 它们的寿命得到延长, 各种重要的功能, 如呼吸、生长和繁殖没有受到损伤, 表明PaLon蛋白酶在衰老过程中具有重要作用。在野生型柄孢霉中, 野生型柄孢霉开始衰老的特点是mtDNA的重组并出现线粒体功能障碍, 而mtDNA的

稳定使其寿命延长。研究显示,呼吸的类型对于衰老有重要影响。正常情况下,菌株呼吸要通过COX,依赖于呼吸链。然而,该途径由于各种原因受到损伤时,另一途径(也叫逆向反应)会被诱导,并使编码选择性氧化酶(AOX)的基因表达。该酶可传递电子,使氧气生成水,将电子传给复合体3和COX。已知多种寿命较长的突变型主要利用AOX进行呼吸。Scheckhuber等^[39]发现两种利用AOX的突变型:grisea和PaCox27::ble,它们可以通过增加线粒体含量,从而部分补偿由于依赖于AOX呼吸导致的低效率氧化磷酸化。在这两种突变型中用于质量控制的线粒体蛋白,如PaLon和Hsp60的水平比野生型都要高。总之,PaLon蛋白水平的增加可使柄孢霉保持正常生长而且延长了其寿命。这些研究表明,及时降解受损伤的线粒体蛋白能力的增强,可以保护线粒体的功能,这充分说明了线粒体蛋白质量控制系统在衰老进程中的重要性。

3 Lon蛋白酶与其它疾病

蛋白错误折叠和损伤蛋白的聚集也与人类的各种疾病相关。近年来,研究发现Lon与肿瘤也存在着密切的关系。Wang等^[40]发现肝肿瘤细胞中Lon蛋白水平上调,而用siRNA下调Lon蛋白导致capsase 3介导的肿瘤细胞凋亡。三桠乌药内酯A(Obtusilactone A)和芝麻素((-)-sesamin)能作为Lon蛋白酶抑制剂,并激活DNA损伤检查点,诱导细胞凋亡。Bernstein等^[41]发现恶性B细胞淋巴瘤病人样品和细胞系中Lon蛋白水平上调,CDDO和它的衍生物通过与Lon相互作用,抑制Lon的蛋白酶活性并导致淋巴瘤细胞死亡,表明Lon蛋白可以作为抗肿瘤治疗的新靶标。这些药物的发现为肿瘤治疗过程中克服其化学抗性和对其它化学疗法的敏感性提供了新的研究方

向。不仅如此,Lon在其它疾病中也起着重要作用(表1)。不同药物组合用于高效抗逆转录病毒治疗,可以延长HIV感染的过程。但是,高效抗反转录病毒治疗(high active anti-retroviral therapy, HAART)会产生各种副作用,包括脂肪代谢障碍。核苷类逆转录酶抑制剂是HAART的主要成分,对线粒体有一定的毒性。Pinti等^[42]在伴有脂肪代谢障碍的HIV阳性病人体内发现Lon蛋白水平明显增加。线粒体肌病、脑病、乳酸性酸中毒和卒中样发作(MELAS)主要与mtDNA中tRNA^{leu(UUR)}A3243G突变相关。最近,Felk等^[43]利用双向电泳发现MELAS幼成淋巴细胞中的Lon蛋白水平是正常细胞的2~3倍。肌阵挛性癫痫伴肌肉蓬毛样红纤维是一种罕见的疾病,主要表现为肌阵挛性癫痫、小脑共济失调和四肢近端无力等,80%~90%的病因与mtDNA tRNA^{Lys}A8344G突变紧密相关,该突变会导致低效率ATP和活性氧的产生。最近研究发现,在该病病人细胞内,Lon蛋白酶的水平增加了近两倍^[44]。遗传性痉挛性截瘫是一种神经退行性疾病,主要是由于皮层脊髓束中神经元的渐进性退化,在病人中发现编码Hsp60的基因HspDI发生了突变。Hansen等^[45]对杂合病人的细胞和正常细胞的研究发现,HspDI基因突变对线粒体功能、细胞生存、氧化应激敏感性没有明显的影响,但是线粒体质量控制蛋白Lon和ClpP的表达减少。遗传性共济失调是一种很罕见的遗传神经退行性疾病,表现出进行性共济失调和心肌症。主要原因是线粒体中Fratxin蛋白缺陷,它是一种铁离子分子伴侣,对于铁硫簇蛋白的成熟起着重要作用。研究发现,在该病中期,Lon和ClpP的蛋白水平有所增加并伴随着蛋白水解活性增强;同时,铁硫簇蛋白水平减少,但mRNA水平没有发生明显改变,表明可能是这两种质量控制蛋白参与了铁硫簇蛋白的降解^[46]。

表1 各种疾病中线粒体Lon蛋白酶的变化

Table 1 Expression of mitochondrial Lon in various human diseases

疾病 Diseases	病因 Causes	Lon的变化情况 Changes of Lon
Lipodystrophy	Side effect of HAART	Increase
Myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, strock-like episodes syndrome (MELAS)	mtDNA mutation A3243G in tRNA ^{leu(UUR)}	2~3 folds increase
Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome	mtDNA mutation A8344G in tRNA ^{Lys}	2 folds increase
Hereditary spastic paraplegia (SPG13)	Axon degeneration in specific motor neurons, gene mutation	40%~50% decrease
Friedreich ataxia (FRDA)	Defect in mitochondrial frataxin	2~3 folds increase

4 展望

Lon作为一种多功能蛋白酶,对线粒体的多种功能起着重要的调控作用,包括呼吸链蛋白复合体的组装、异常和受损伤蛋白质的降解、mtDNA完整性的维持等。迄今为止,还只发现了一小部分Lon蛋白酶的特异性底物。Lon蛋白酶的稳态对于细胞的命运至关重要,Lon蛋白酶的水平 and 活性与衰老和疾病有着密切的关系。因此,对Lon蛋白酶进行深入研究,进一步明确Lon在蛋白质质量控制、衰老和疾病中的作用机制,对于延缓衰老、疾病治疗及相关药物的研发有着重要的指导意义。然而,深入了解Lon蛋白酶的结构动力学和功能多样性依然是一项艰巨的挑战,至今尚无Lon蛋白酶的特异性抑制剂或激活剂。今后,基于Lon蛋白酶的高通量药物筛选模型的建立以及从天然产物和合成小分子化合物库中寻找Lon蛋白酶特异性抑制剂和激活剂,无疑将会大大加快Lon蛋白酶的作用分子机制的全面和深入研究,并将促进相关药物的开发。Lon蛋白酶基因改造(转基因或基因敲除)细胞模型和模式生物的发展对于更详细深入阐述Lon蛋白酶在细胞和分子水平如何支撑整个代谢网络尤为重要。

参考文献 (References)

- Gottesman S, Maurizi MR. Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* 1992; 56(4): 592-621.
- Maupin-Furlow JA, Gil MA, Humbarb MA, Kirkland PA, Li W, Reuter CJ, *et al.* Archaeal proteasomes and other regulatory proteases. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8(6): 720-8.
- Aksam EB, Koek A, Kiel JA, Jourdan S, Veenhuis M, van der Klei IJ. A peroxisomal Lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy* 2007; 3(2): 96-105.
- Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimozawa N, Imanaka T, Taniguchi H. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: Presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 421-8.
- Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(1): 56-66.
- Garcia-Nafria J, Ondrovicova G, Blagova E, Levdikov VM, Bauer JA, Suzuki CK, *et al.* Structure of the catalytic domain of the human mitochondrial Lon protease: Proposed relation of oligomer formation and activity. *Protein Sci* 2010; 19(5): 987-99.
- Goldberg AL, Moerscheil RP, Chung CH, Maurizi MR. ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 1994; 244: 350-75.
- Gottesman S. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 565-87.
- Ondrovicova G, Liu T, Singh K, Tian B, Li H, Gakh O, *et al.* Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent Lon protease. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 25103-10.
- Watabe S, Hara M, Yamamoto M, Yoshida M, Yamamoto Y, Takahashi SY. Activation of mitochondrial ATP-dependent protease by peptides and proteins. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195(3): 153-61.
- Lee I, Suzuki CK. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784(5): 727-35.
- Sakr S, Cirinesi AM, Ullers RS, Schwager F, Georgopoulos C, Genevaux P. Lon protease quality control of presecretory proteins in *Escherichia coli* and its dependence on the SecB and DnaJ (Hsp40) chaperones. *J Biol Chem* 2010; 285(30): 23506-14.
- Choy JS, Aung LL, Karzai AW. Lon protease degrades transfer-messenger RNA-tagged proteins. *J Bacteriol* 2007; 189(18): 6564-71.
- van Melderen L, Aertsen A. Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Res Microbiol* 2009; 160(9): 645-51.
- Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G. Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* 1994; 264(5161): 891.
- van Dyck L, Pearce DA, Sherman F. PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994; 269(1): 238-42.
- Bota DA, Davies KJ. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 2002; 4(9): 674-80.
- Bota DA, van Remmen H, Davies KJ. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett* 2002; 532(1/2): 103-6.
- Granot Z, Kobiler O, Melamed-Book N, Eimerl S, Bahat A, Lu B, *et al.* Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors. *Mol Endocrinol* 2007; 21(9): 2164-77.
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007; 129(1): 111-22.
- Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(43): 18410-5.
- Bota DA, Ngo JK, Davies KJ. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(5): 665-77.
- Xue X, Zhu YF, Mao JP. Effect of RNA interference for Lon gene silencing on growth and apoptosis of human breast cancer MCF7 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007; 27(6): 870-4.
- Tian Q, Li T, Hou W, Zheng J, Schrum LW, Bonkovsky HL. Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells. *J Biol Chem* 2011; 286(30): 26424-30.

- 25 Smith MA, Schnellmann RG. Mitochondrial calpain 10 is degraded by Lon protease after oxidant injury. *Arch Biochem Biophys* 2012; 517(2): 144-52.
- 26 Zhang X, Zheng Y, Fried LE, Du Y, Montano SJ, Sohn A, *et al.* Disruption of the mitochondrial thioredoxin system as a cell death mechanism of cationic triphenylmethanes. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(7): 811-20.
- 27 Ngo JK. The human Lon protease in mitochondrial stress protection and aging. Los Angeles: University of Southern California, 2008, 1-11.
- 28 Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, *et al.* Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: Enhanced expression of Lon protease. *J Cell Biol* 2002; 157(7): 1151-60.
- 29 Rep M, van Dijl JM, Suda K, Schatz G, Grivell LA, Suzuki CK. Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* 1996; 274(5284): 103-6.
- 30 Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Puksza S, *et al.* Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J Biol Chem* 2007; 282(24): 17363-74.
- 31 Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 2008; 283(6): 3665-75.
- 32 Kucej M, Kucejova B, Subramanian R, Chen XJ, Butow RA. Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 11): 1861-8.
- 33 Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11(3): 298-300.
- 34 Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 1999; 285(5432): 1390-3.
- 35 Bakala H, Delaval E, Hamelin M, Bismuth J, Borot-Laloi C, Corman B, *et al.* Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem* 2003; 270(10): 2295-302.
- 36 Delaval E, Perichon M, Friguet B. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur J Biochem* 2004; 271(22): 4559-64.
- 37 Ngo JK, Pomatto LC, Bota DA, Koop AL, Davies KJ. Impairment of Lon-induced protection against the accumulation of oxidized proteins in senescent wi-38 fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66(11): 1178-85.
- 38 Luce K, Osiewacz HD. Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat Cell Biol* 2009; 11(7): 852-8.
- 39 Scheckhuber CQ, Houthoofd K, Weil AC, Werner A, de Vreese A, Vanfleteren JR, *et al.* Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the aging model *Podospora anserina*. *PLoS One* 2011; 6(1): e16620.
- 40 Wang HM, Cheng KC, Lin CJ, Hsu SW, Fang WC, Hsu TF, *et al.* Obtusilactone A and (-)-sesamin induce apoptosis in human lung cancer cells by inhibiting mitochondrial Lon protease and activating DNA damage checkpoints. *Cancer Sci* 2010; 101(12): 2612-20.
- 41 Bernstein SH, Venkatesh S, Li M, Lee J, Lu B, Hilchey SP, *et al.* The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: A novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives. *Blood* 2012; 119(14): 3321-9.
- 42 Pinti M, Gibellini L, Guaraldi G, Orlando G, Gant TW, Morselli E, *et al.* Upregulation of nuclear-encoded mitochondrial LON protease in HAART-treated HIV-positive patients with lipodystrophy: Implications for the pathogenesis of the disease. *AIDS* 2010; 24(6): 841-50.
- 43 Felk S, Ohrt S, Kussmaul L, Storch A, Gillardon F. Activation of the mitochondrial protein quality control system and actin cytoskeletal alterations in cells harbouring the MELAS mitochondrial DNA mutation. *J Neurol Sci* 2010; 295(1/2): 46-52.
- 44 Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol* 2010; 41(2/3): 256-66.
- 45 Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Durr A, Fontaine B, Nielsen MN, *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): 474-82.
- 46 Guillon B, Bulteau AL, Wattenhofer-Donze M, Schmucker S, Friguet B, Puccio H, *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): 1036-47.

Progress on the Studies of ATP-dependent Lon Protease

Xia Lei[#], Liu Yongzhang[#], Yao Wei[#], Li Zhen, Zhang Jiliang, Wu Zhi, Chen Lin, Lü Bin*

(Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Zhejiang Key Laboratory of Medical Genetics, Department of Biology, School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Lon, also known as protease La, is a homo-oligomeric ring-shaped ATP-dependent protease which is highly conserved among archaea, prokaryotes and eukaryotes. Lon is a member of the superfamily of ATPase (AAA⁺ ATPase) which is associated with diverse cellular activities. Since its first discovery, the Lon protease was found to play an important role in cellular homeostasis, mitochondrial protein quality control and metabolic regulation. In this review, we summarized recent advances in the studies of the ATP-dependent Lon protease. We focused on its structure, function in protein quality control, as well as its involvement in aging and diseases. Research achievements in model organisms will also be covered.

Key words AAA⁺ protease; Lon protease; mitochondria; ageing; protein quality control

Received: January 17, 2012 Accepted: April 5, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31070710, No.31171345), Zhejiang Qianjiang Talent Project B Grant (No.2010R10045), Wenzhou Medical College Foundation (No.QTJ09010), Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholar, State Education Ministry, Wenzhou Science & Technology Bureau (No.H20100064) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2110097)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-577-86699722, E-mail: lubmito@wzmc.edu.cn