

线粒体蛋白质的转运

马 军, 孙 飞

中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

收稿日期: 2010-08-23; 接受日期: 2010-08-25

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(“973”计划)(2006CB806506, 2006CB911001), 国家自然科学基金(30721003, 30970569)

通讯作者: 孙飞, 电话/传真: (010)64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

摘要: 线粒体含有约 1000 种蛋白质, 其中 99% 由细胞核 DNA 编码, 在细胞质核糖体上合成后被分别转运至线粒体的内膜或外膜上、基质或膜间隙中。由众多分子机器组成的线粒体蛋白质转运系统参与了该生物学过程的执行。线粒体 DNA 编码的 13 种蛋白质也由该系统转运至线粒体内膜。本文就线粒体蛋白质转运系统中线粒体前体蛋白质的定位分选信号、转运复合物和转运途径作简要介绍。

关键词: 蛋白质转运; 前导序列; TOM 复合物; TIM23 复合物; TIM22 复合物

中图分类号: Q244

0 引 言

线粒体在细胞的生命活动中占据着重要的位置, 不仅是细胞的能量工厂, 还参与细胞代谢的调节、细胞周期的调控、细胞发育、抗病毒和细胞凋亡等重要生命活动^[1]。这些功能由线粒体中约 1000 种蛋白质来执行, 其中 99% 的蛋白质由细胞核 DNA 编码, 在细胞质核糖体上合成后被运输至线粒体的不同部位。

线粒体拥有一套非常复杂而又精细的蛋白质转运系统来介导线粒体前体蛋白质的转运。这套复杂精细的蛋白质转运系统涉及了前体蛋白中的各种不同定位分选信号、多种执行定位分选的转运复合物、ATP 消耗、内膜膜电位和氧化还原势以及分子伴侣等多种因子。在这些因子的协同作用下, 蛋白质通过多种不同的转运途径被运输至线粒体中的不同部位。线粒体 DNA 编码的蛋白质也通过该转运系统被运输至线粒体内膜上 (图 1)。

本文拟就线粒体前体蛋白所携带的各种不同定位分选信号、前体蛋白向线粒体基质、内膜、膜间隙和外膜转运所涉及的转运复合物, 以及各种可能的转运途径进行简要的介绍。

1 线粒体前体蛋白定位分选信号

线粒体前体蛋白定位分选信号大致可以分为两类: 可剪切的前导序列和非剪切的多种整合定位信号 (图 2)。可剪切的前导序列是线粒体蛋白质最典型的定位信号, 介导绝大多数蛋白向线粒体基质的转运; 非剪切整合定位信号的形式更加多样化。各种不同形式的定

位分选信号反映了蛋白质向线粒体运输的多样性^[2-5]。

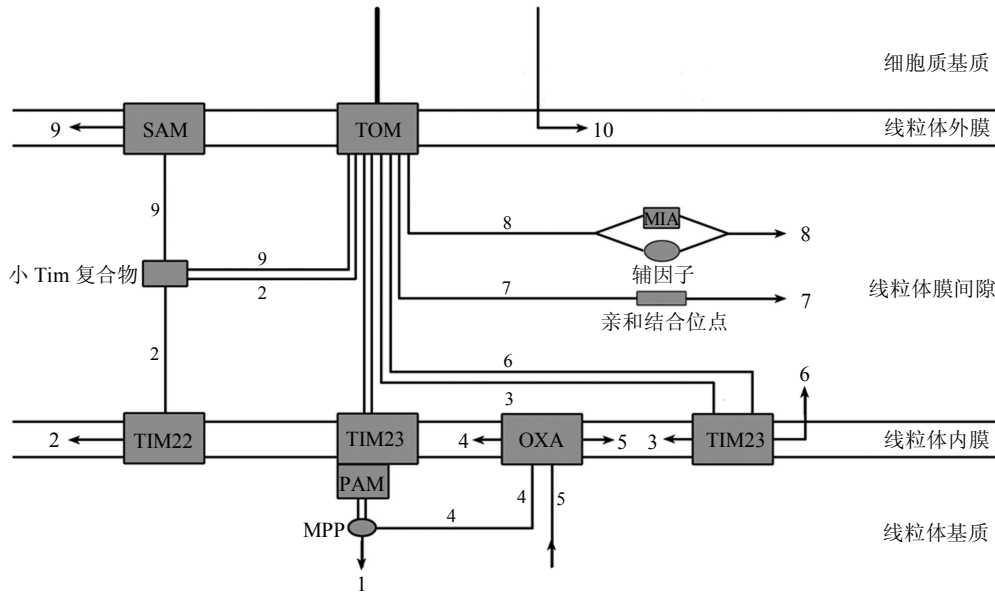
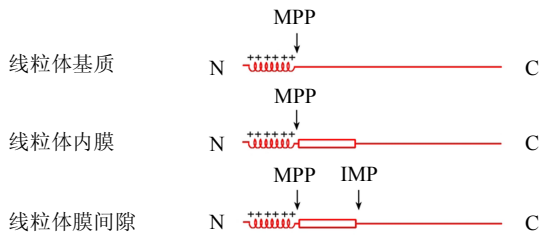


图 1 线粒体蛋白质转运途径概览 1: 导肽运输途径; 2: 转运体运输途径; 3: 停止 - 转移运输途径; 4: 保守型运输途径; 5: 线粒体 DNA 编码蛋白质向内膜的运输; 6: 二元导肽运输途径; 7: 折叠诱捕运输途径; 8: 亲和结合运输途径; 9: β 桶状蛋白运输途径; 10: α 螺旋蛋白运输途径

Fig.1 Overview of the pathways of proteins translocation into mitochondrial 1: Presequence pathway; 2: Metabolite carrier pathway; 3: Stop transfer pathway; 4: Conservative sorting pathway; 5: Mitochondrial DNA encoded protein translocation pathway; 6: Bipartite presequences pathway; 7: Folding traps pathway; 8: Affinity sites pathway; 9: β -barrel protein translocation pathway; 10: α -helical protein translocation pathway

(A) 可剪切的前导序列及其变化形式



(B) 非剪切的多种整合定位信号

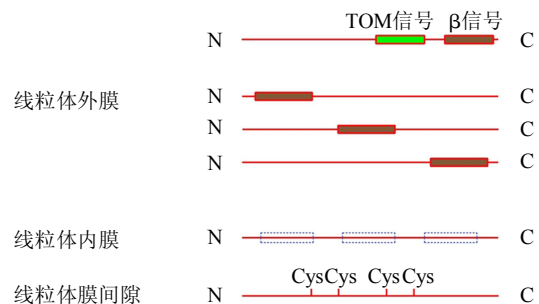


图 2 线粒体前体蛋白的定位分选信号^[2]

线粒体前体蛋白定位分选信号主要分为可剪切和非剪切两种。(A) 可剪切的前导序列及其变化形式; (B) 非剪切的多种整合定位信号。在信号序列的引导下, 前体蛋白通过不同的分子机器被转运至目的地

Fig.2 Targeting and sorting signals of mitochondrial precursor proteins^[2]

Mitochondrial precursor proteins contain cleavable or noncleavable targeting signals. (A) Presequences and variations. (B) Multiple noncleavable internal signals. The signals direct the precursor proteins to their destinations by different molecular machines

1.1 可剪切的前导序列及其变化形式

可剪切的前导序列是一种经典的定位信号。前导序列位于线粒体前体蛋白质的 N 端, 一般含有 10~80 个氨基酸残基, 形成一种带正电的两性 α 螺旋: 一侧是带正电的亲水表面, 另外一侧为疏水性表面。前体蛋白在被运输进入基质后, 前导序列被线粒体加工肽酶 (mitochondrial processing peptidases, MPP) 水解^[4,6,7]。

前导序列可以将蛋白质定位至线粒体基质。此外, 有一些前体蛋白除了前导序列之外, 在前导序列之后还含有一段疏水分选信号 (hydrophobic sorting signal) ——该信号决定了前体蛋白在内膜上或膜间隙中的定位。对于内膜蛋白, 其分选信号是成熟蛋白的一部分并辅助前体蛋白质锚定于线粒体内膜上; 对于定位于线粒体膜间隙的蛋白质, 其疏水分选信号可被定位于内膜外侧的内膜肽酶 (inner membrane peptidase, IMP) 所剪切, 所形成的成熟蛋白被释放到线粒体膜间隙中。内膜上有多种蛋白酶参与膜间隙前体蛋白分选信号的剪切, 如 IMP、Oct1、m-AAA、i-AAA 和 Pcp1 等^[2,8-11], 这些蛋白酶对线粒体蛋白质定位分选实现起到了决定作用。

1.2 非剪切的多种整合定位信号

大部分线粒体外膜蛋白属于 α 螺旋蛋白质, 它们的定位信号多种多样, 分别位于 N 端 (信号锚定序列)、C 端 (末端锚定) 和成熟蛋白质的中间。这些信号为典型的 α 螺旋跨膜片段, 周围常含有带正电的氨基酸残基, 这些蛋白质并不是以同一种方式整合于线粒体外膜上^[9]。

线粒体外膜蛋白 β 桶状蛋白质的 C 端含有 β 信号, 这种 β 信号与 α 螺旋的导肽序列完全不一样。 β 信号由位于蛋白质最末端的 β 片层所形成, 可被定位于线粒体外膜上的 SAM 复合物所识别^[9]。 β 桶状蛋白质 β 信号的前端还含有一段 TOM 信号, 可被 TOM 复合物的起始受体 Tom20 识别, 但是它的特征和机制都还不清楚。

线粒体内膜上有一类被称为代谢物转运体 (metabolite transporter) 的蛋白质, 如 ADP/ATP 转运体、磷酸盐转运体等, 它们通常含有六次跨膜 α 螺旋, 其定位信号分布于成熟蛋白的整个区域, 为几个不连续的片段, 每个片段约 10 个氨基酸残基^[12]。

此外, 有一类膜间隙前体蛋白的定位信号为双重半胱氨酸基序 (twin CXC motif), 每个基序由两个半胱氨酸残基被数个氨基酸间隔所组成^[11,13]。

2 线粒体前体蛋白质向基质的转运

蛋白质向线粒体基质的运输——导肽运输途径 (图 3), 是研究得最透彻的一条经典的运输途径。

线粒体基质蛋白的定位分选信号为可剪切的前导序列。这种前导序列至少含有三种不同的信息: 其疏水性表面可被 TOM 复合物的起始受体 Tom20 所识别, 正电表面可被 Tom22 识别; 前导序列所带的正电荷对于前体蛋白转运穿过内膜时利用其膜电位能起了决定作用 (内膜的膜间隙侧电位高于其基质侧电位); 前体蛋白被转运进线粒体基质时呈伸展态, 剪切位点被 MPP 所识别^[2,3]。

参与该运输途径的蛋白质分子机器主要有：TOM、TIM23 和 PAM 复合体。

2.1 TOM 复合物

TOM 复合物 (translocase of the outer mitochondrial membrane) 定位于线粒体外膜, 是线粒体的门户, 几乎所有被转运至线粒体各部位的前体蛋白都必须先通过 TOM 复合物。TOM 复合物的主要组成亚基有 Tom20、Tom70、Tom22、Tom40、Tom5、Tom6 和 Tom7。Tom20 和 Tom70 为 TOM 复合物的起始受体, 分别识别带有不同信号的前体蛋白, Tom20 识别含有前导序列的前体蛋白, Tom70 识别含有整合定位信号的前体蛋白, 两者之间的功能也存在一定的重叠。Tom22 为跨膜蛋白, 其 N 末端为非常保守的带负电荷的残基, 暴露于外膜胞质侧, 其有一段小的 C 末端结构域伸至膜间隙; Tom22 可接受来自 Tom20 和 Tom70 的前体蛋白, 并将前体蛋白转移至 Tom40 形成的跨膜通道中; 除此之外, Tom22 在 TOM 复合物的组装过程中也起着重要的作用。Tom40 为 β 桶状蛋白质, 整合于外膜中, 形成 TOM 复合物的跨膜通道。Tom40 与 Tom22 和 Tom5、Tom6、Tom7 形成稳定的通用输入孔道。Tom20 通过 Tom22 与通用输入通道连接, 而 Tom70 与通用输入孔道之间只存在瞬间相互作用。Tom5 协助 Tom22 将前体蛋白转移至 Tom40 形成的跨膜通道, 并与 Tom6 和 Tom7 共同维持 TOM 复合物的动态平衡。Tom6 负责 TOM 复合物的组装, 而 Tom7 的功能与 Tom6 正好相反, 它调节 TOM 复合物的去组装^[2,4,14]。

2.2 TIM23 复合物及 TIM23-PAM 复合物

TIM23 复合物 (presequence translocase of the inner mitochondrial membrane) 为线粒体内膜主要的转运与装配复合物, 在发挥作用的过程中, 可存在两种不同的状态: 游离态以及与 PAM 复合物 (presequence translocase-associated motor) 的结合态 (TIM23-PAM 复合物)。TIM23 复合物两种不同的状态代表其参与的前体蛋白的不同转运途径^[15,16]。

TIM23 复合物主要由 Tim23、Tim50、Tim17 和 Tim21 等四个亚基组成, 其中 Tim21 对 TIM 复合物行使功能是非必需的。Tim23 形成 TIM23 复合物的跨膜通道^[17], 其 N 末端为暴露在膜间隙的一段亲水结构域, 在特定条件下可与外膜相互作用, 并对 Tim23 的二聚化

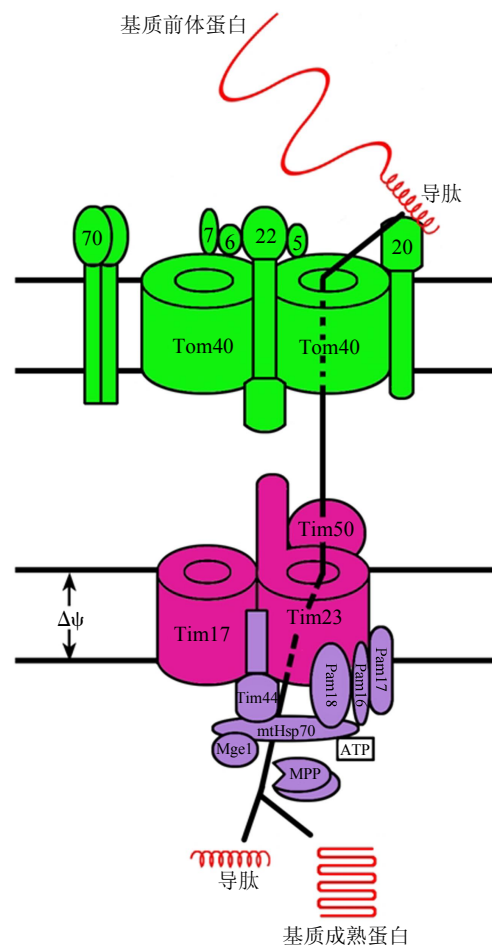


图3 线粒体前体蛋白质向基质的转运: 导肽运输途径

Fig.3 The presequence pathway of mitochondrial precursors to the mitochondrial matrix

和底物结合起重要作用。Tim17与Tim23同源,但其N末端只有一段很短的片段暴露在膜间隙中, Tim17与Tim23构成了TIM23复合物整合跨膜中心,在TIM23复合物孔道的开放中起着重要作用^[18]。Tim50通过N末端跨膜片段锚定于内膜上,在膜间隙侧含有一个较大的结构域。当前体蛋白出现在膜间隙侧后,前体蛋白与该结构域结合并被转移至TIM23复合物的跨膜通道中^[19,20]。当前体蛋白穿过TIM23复合物的跨膜通道后,其进一步向基质的转运是由运输驱动蛋白PAM复合物驱使的。此时,与PAM复合物结合的TIM23复合物组分中没有Tim21的存在^[15]。

PAM复合物由如下组分构成: mtHsp70、Tim44、Mge1、Pam16、Pam17和Pam18等。mtHsp70通过基质内的外周膜蛋白Tim44在基质侧锚定于内膜上,通过水解ATP释放的能量来驱动前体蛋白向基质方向的转移^[21,22]。Tim44是前体蛋白出现在基质侧后结合的第一个蛋白。核交换因子Mge1促进mtHsp70从ADP状态向ATP状态的转变,从而参与下一个循环。Pam18通过N末端锚定于内膜,是mtHsp70的活化因子。Pam16通过与Pam18形成复合物来调节Pam18的活性^[23,24]。Pam17结合在Tim23上,具有整合Pam18-Pam16复合物的功能,并介导TIM23-PAM的相互作用。

2.3 导肽运输途径 (presequence pathway) 的具体过程

前体蛋白首先与外膜表面受体Tom20结合,然后转移至Tom22。在Tom5的协助下,前体蛋白以去折叠状态并以N端先通过的方式穿过TOM复合物的跨膜通道。在TIM23复合物亚基Tim23和Tim50的协同作用下^[25],出现在膜间隙侧的前体蛋白被牵引至TIM23复合物表面。在线粒体内膜膜电位和mtHsp70水解ATP提供的能量驱动下,前体蛋白穿过TIM23跨膜通道,并依次与Tim44和mtHsp70结合,最终被mtHsp70牵引进线粒体基质。在基质中,前体蛋白被MPP水解剪切掉前导肽后折叠形成成熟的蛋白。

3 线粒体前体蛋白质向内膜的转运

作为重要的细胞器,线粒体与细胞质之间有着频繁的物质交换,如ATP、磷酸、氨基酸、肉碱/脂酰肉碱、戊二酸/苹果酸和tRNA等,这种功能是由线粒体内膜上一类非常重要的蛋白质家族——代谢物转运体 (metabolite carrier) 来实现的^[26]。代谢物转运体蛋白家族具有相似的结构特征,通常含有六次跨膜 α 螺旋片段,其线粒体定位分选信号便包含在这些跨膜螺旋中。代谢物转运体蛋白的运输需要TOM复合物、TIM22复合物和小Tim复合物等众多分子机器的参与 (图4)。

线粒体内膜还存在一些其它的蛋白质,它们具有不同类型的信号肽序列并通过以下两种转运途径定位于内膜:一是通过TIM23复合物横向释放至内膜的停止-转移运输途径;二是前体蛋白先以导肽序列运输途径转运至线粒体基质后,再通过Oxa1向外运输至线粒体内膜的保守型运输途径^[4] (图4)。

除此之外,线粒体DNA也编码一些蛋白质,而且这些蛋白质都定位于线粒体内膜上,它们的转运也是由OXA复合物介导的 (图4)。

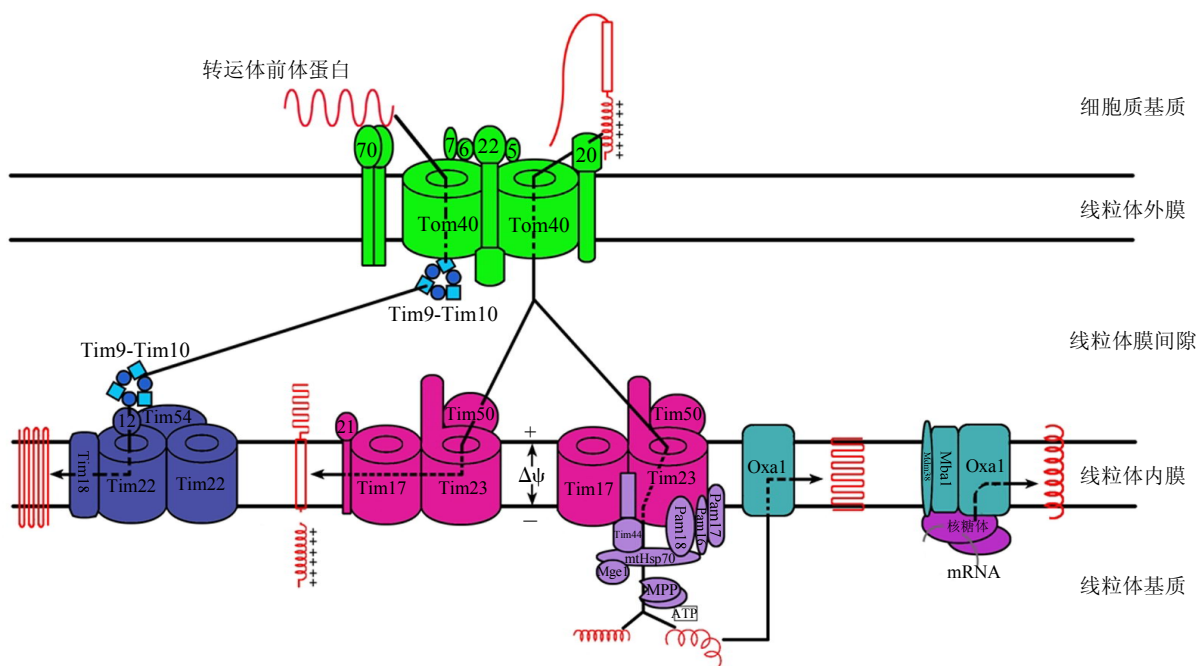


图4 线粒体前体蛋白质向内膜的转运 线粒体前体蛋白质向内膜转运主要有四种不同的转运途径（从左至右）：代谢物转运体运输途径，停止-转移运输途径，保守型运输途径以及线粒体DNA编码蛋白质向内膜的运输

Fig.4 Translocation of mitochondrial proteins into the inner membrane Proteins are sorted to the inner membrane by four pathways. From left to right are metabolite carrier pathway, stop transfer pathway, conservative sorting pathway, and proteins encoded by mitochondrial DNA translocated to inner membrane

3.1 转运体运输途径 (metabolite carrier pathway)

3.1.1 TIM22 复合物

TIM22 复合物 (carrier translocase of the inner mitochondrial membrane) 主要由四个亚基组成——Tim22、Tim9、Tim10 和 Tim12。其中 Tim22 为 TIM22 的主要成分，形成复合物跨膜通道。Tim9-Tim10-Tim12 为膜结合分子伴侣，结合并引导穿过 TOM 复合物的前体蛋白定位至 TIM22 复合物^[27]。内膜整合膜蛋白 Tim54 是 Tim9-Tim10-Tim12 与前体蛋白形成的复合物在 TIM22 复合物上的受体，它在膜间隙侧含有较大的结构域，为 Tim9-Tim10-Tim12 复合物提供了结合位点。Tim18 参与 TIM22 复合物的组装^[28,29]。

3.1.2 小 Tim 复合物

线粒体膜间隙含有 5 种小 Tim 蛋白质：Tim8、Tim9、Tim10、Tim12 和 Tim13。它们的分子量在 8~13 kD 之间，都含有双重 CX₃C 基序。小 Tim 蛋白质通过形成两种不同的异源六聚体 Tim9-Tim10 和 Tim8-Tim13^[30-32]来行使其分子伴侣的功能。Tim9-Tim10 为膜间隙主要的分子伴侣，两个亚基对细胞的生存都是必需的。Tim9-Tim10 除了介导转运体前体蛋白向内膜定位外，同时也结合定位于内膜的非剪切前体蛋白和定位于外膜的 β 桶状蛋白质。Tim8-Tim13 与 Tim9-Tim10 同源，但 Tim8 和 Tim13 对细胞的生存是非必需的，Tim8-Tim13 以相似的方式引导一些前体蛋白，如 Tim23、Tim22 和 Tim17 等穿过线粒体膜间隙^[33]。小 Tim 复合物功能的发挥不需要 ATP 的辅助。

3.1.3 转运体运输途径的具体过程

转运体蛋白转运定位至线粒体内膜大致可分为以下几个步骤^[24,34]: 合成的转运体前体蛋白首先与胞质因子结合, 在分子伴侣的引导下与 TOM 复合物受体 Tom70 结合。前体蛋白含有多重整合定位信号, 它们之间以一种协同作用的方式与多个 Tom70 结合, 可诱导 Tom70 形成多聚体, 介导前体蛋白的转运。在 Tom22 和 Tom5 及其它因子的帮助下, 前体蛋白穿过 Tom40 形成的转运跨膜通道。转运体前体蛋白的跨膜转运与含有导肽的前体蛋白跨膜的方式不一样。含有导肽的前体蛋白为线性形式, N 端先穿过跨膜通道; 转运体前体蛋白在跨膜转运时形成环状 (loop) 结构, 且环状结构先转运穿过跨膜通道, N 末端和 C 末端仍然滞留于胞质中。转运体前体蛋白穿过 TOM 复合物跨膜通道出现在基质侧后, 与膜间隙的 Tim9-Tim10 复合物结合, Tim9-Tim10 与内膜 TIM22 复合物膜间隙侧表面的外周膜蛋白 Tim12 结合形成膜结合形式的 Tim9-Tim10-Tim12 三元复合物^[27], Tim9-Tim10-Tim12 与前体蛋白形成的复合物进一步与 TIM22 复合物上的受体 Tim54 结合, 随后前体蛋白插入 Tim22 形成的跨膜孔道中, 并以横行释放的方式整合至线粒体内膜上, 最后转运体蛋白聚合组装形成功能形式。转运体前体蛋白插入跨膜孔道的过程需内膜膜电位提供能量, 其横向释放并整合至线粒体内膜上的机理尚不清楚。

通过转运体运输途径被运输至线粒体内膜上的蛋白不只代谢物转运体, Tim23、Tim17 和 Tim22 也都是通过该途径被转运至内膜上的^[33]。

3.2 停止 - 转移运输途径 (stop transfer pathway)

通过停止 - 转移运输途径被转运至线粒体内膜上的蛋白质通常具有如下特征: 定位分选信号位于前体蛋白中部, 通常为一段跨膜 α 螺旋, 且其疏水性比以保守型运输途径转运的蛋白质的跨膜部分更强; 在跨膜锚定片段 C 端通常含有带电氨基酸残基簇, 带电氨基酸残基间水合作用的增强可以减缓蛋白质的跨膜转运, 并促使跨膜结构域向线粒体内膜的横向整合; 酪氨酸和苯丙氨酸在跨膜序列中非常丰富, 基本上不存在脯氨酸^[35]。

停止 - 转移运输途径由 TOM 复合物和 TIM23 复合物共同介导^[15]。与基质蛋白一样, 前体蛋白首先被转运定位至 TIM23 复合物, 但是前体蛋白并不继续转运进入基质, 疏水分选信号使前体蛋白滞留在内膜中, 并以机制尚不清楚的横向释放方式整合至内膜。该过程需要膜电位提供能量, 能量来源于 Tim21 与线粒体呼吸链复合物 III 和 IV 的偶联^[16,36]。

3.3 保守型运输途径 (conservative sorting pathway)

保守型运输途径与导肽运输途径的前几步过程是基本一致的。通过保守型运输途径被转运至线粒体内膜的蛋白质的 N 末端具有导肽序列, 其后紧随一段非剪切疏水分选信号。在前体蛋白通过导肽运输途径转运至线粒体基质及前导肽被 MPP 剪切后, 余下部分在 Oxal 的作用下整合进线粒体内膜^[10]。通常, 经过这种途径被转运至线粒体内膜的蛋白质含有较多的负电性氨基酸残基, 带负电的蛋白片段与内膜膜间隙侧的正电位之间形成的电位可以促进前体蛋白向内膜的整合^[4,37]。保守型运输途径可以看作由含有导肽的前体蛋白转运至线粒体基质, 以及切除导肽的成熟蛋白整合至线粒体内膜两个独立的过程组成。

3.4 OXA 复合物介导的线粒体 DNA 编码蛋白质向内膜的运输

线粒体大约有 1% 的蛋白质是由线粒体 DNA 编码并在线粒体核糖体上合成的，这些蛋白质主要为线粒体呼吸链组分，定位于线粒体内膜^[39,40]，其向线粒体内膜的转运是由 OXA 复合物来介导的。OXA 复合物 (oxidase assembly) 主要由 Oxa1、Mba1 和 Mdm38 组成。Oxa1 为保守的 Oxa1p/YidC/Alb3 家族成员之一，分子量约 60 kD，为线粒体内膜整合蛋白，含有五次跨膜螺旋，其 N 末端位于膜间隙，C 末端位于基质，可结合线粒体核糖体。线粒体 DNA 编码的蛋白质向内膜的转运由 Oxa1 完成^[39,41-43]。Mba1 和 Mdm38 为内膜整合蛋白，与核糖体相互作用使其锚定于线粒体内膜的基质侧^[44,45]，线粒体 DNA 编码的蛋白质在翻译后通过 Oxa1 直接定位至线粒体内膜上^[40]。

4 线粒体前体蛋白向膜间隙的转运

线粒体膜间隙蛋白的转运主要有三种途径：二元导肽运输途径、折叠诱捕运输途径和亲和结合运输途径^[1] (图 5)。

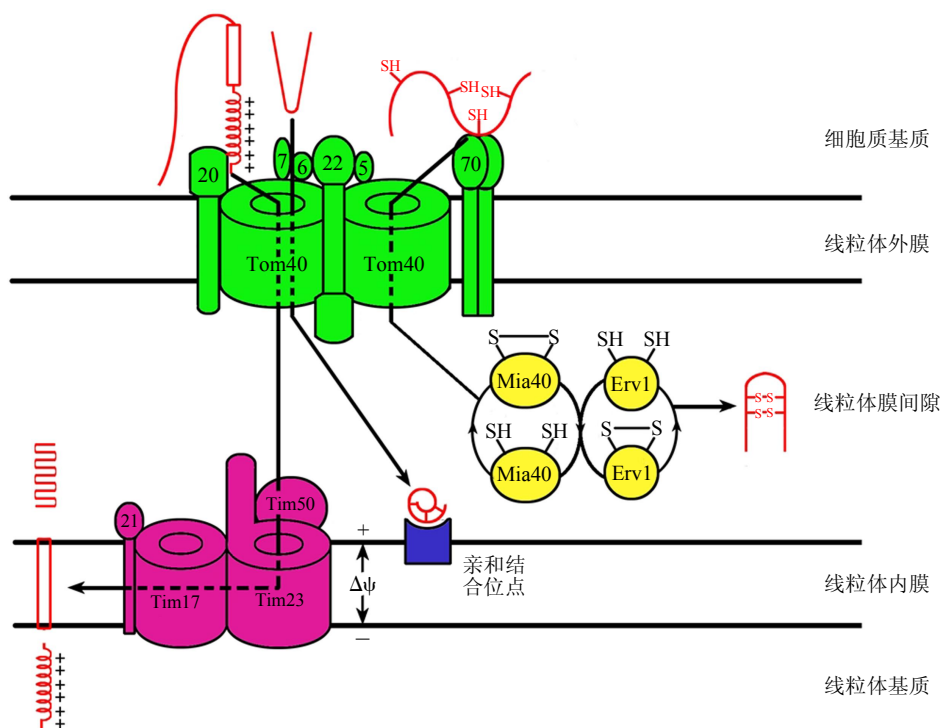


图 5 线粒体前体蛋白质向膜间隙的转运 线粒体前体蛋白质向膜间隙转运主要有三种不同的转运途径(从左至右): 二元导肽运输途径, 亲和结合运输途径和折叠诱捕运输途径

Fig.5 Translocation of mitochondrial proteins into the intermembrane space (IMS) There are three pathways for mitochondrial proteins translocated into IMS. From left to right are bipartite presequences pathway, folding traps pathway, and affinity sites pathway

4.1 二元导肽运输途径 (bipartite presequences pathway)

二元导肽运输途径所转运的蛋白与通过保守型转运途径所转运的蛋白具有相似的定位分选信号: N 末端具有导肽序列, 其后紧随一段疏水分选信号, 只是这段疏水分选信号会被肽酶所剪切。首先, 前体蛋白通过停止 - 转移的运输方式被转运定位至线粒体内膜。然后二元导肽序列被蛋白酶水解, 前体蛋白成熟并被释放至膜间隙。该转运过程由 TOM 复合物、TIM23 复合物和 PAM 复合物介导, 需要内膜膜电位和 ATP 提供能量。

二元导肽序列的剪切有多种加工肽酶参与, 并存在多种剪切形式^[24,11]。

线粒体凋亡相关蛋白 Smac/Diablo 转运至内膜后被 IMP 复合物识别, 在前体蛋白的 C 末端成熟部分与跨膜片段之间进行剪切, 前体蛋白成熟并被释放至膜间隙^[4,11]。当细胞色素 b_2 整合至线粒体内膜后首先由 MPP 切掉前导序列, 然后 IMP 水解疏水分选信号, 前体蛋白成熟并被释放至膜间隙^[4,11]。

细胞色素 c 过氧化物酶 (CCPO) 的 N 末端导肽序列后紧随两段疏水序列。该蛋白整合至内膜后, 其 N 末端第一段疏水序列首先被 m-AAA 蛋白酶——一种依赖 ATP 水解的金属蛋白酶所剪切, 然后 CCPO 剪切中间物再进一步被运输, 由第二段疏水序列锚定于内膜, 接着扁菱形蛋白酶 Pcp1 对第二个疏水序列进行酶切, 从而前体蛋白成熟并被释放至膜间隙^[4,11]。

4.2 折叠诱捕运输途径 (folding traps pathway)

线粒体膜间隙中有一些蛋白质非常小, 它们的折叠是通过与辅因子结合或形成分子内二硫键来启动的。根据折叠诱捕运输假说, 蛋白质的折叠态可阻止反向运输和促进蛋白的单向输入。

4.2.1 二硫键传递系统对膜间隙前体蛋白的折叠诱捕

膜间隙有一类以形成二硫键为共有特征的蛋白质, 包括含有二重 CX_3C 基序的小 Tim 蛋白家族, 含有二重 CX_9C 基序的蛋白和其它含有二硫键的蛋白。二硫键的形成是该类蛋白正确折叠和定位膜间隙所必需的。线粒体膜间隙含有一种主要由 Mia40^[46]和 Erv1 构成的二硫键传递系统 (disulfide relay systems) 来介导二硫键的形成^[47]。

在胞质中, 前体蛋白以易被转运的去折叠还原状态存在。当前体蛋白穿过 TOM 复合物出现在膜间隙侧时, Mia40 通过其表面的疏水和还原性基序 CPC (半胱 - 脯 - 半胱) 与前体蛋白的半胱氨酸残基形成分子间二硫键, 并引导前体蛋白转运至膜间隙。接着, Mia40 与前体蛋白之间的二硫键发生异构化, 使前体蛋白形成分子内二硫键并继续进行折叠。折叠成熟的蛋白不能穿过 TOM 复合物, 从而被诱捕至膜间隙。被还原的 Mia40 在 Erv1 的作用下重新被氧化。结合 FAD 的 Erv1, 通过线粒体呼吸链复合物 III 和 IV 将电子传递给最终的电子受体 O_2 。Erv1 也可以直接将电子传递给 O_2 从而生成 H_2O_2 , H_2O_2 被细胞色素 c 过氧化物酶分解^[13]。在另外一种模型中, Mia40、Erv1 和前体蛋白可能形成三元复合物以完成电子从 Erv1 通过 Mia40 向前体蛋白的传递, 而不需要在前体蛋白和 Mia40, 以及 Mia40 和 Erv1 之间的顺序递呈^[48]。另一组分 Hot13 可能参与二硫键传递系统的功能, 但其具体功能和作用机制尚不明确^[49]。

4.2.2 细胞色素 *c* 的折叠诱捕

细胞色素 *c* 转运通过 TOM 复合物进入线粒体膜间隙后，与血红素裂合酶结合并被催化插入血红素，形成的成熟蛋白以可溶形式释放至膜间隙。血红素裂合酶催化细胞色素 *c* 正确折叠保证了其在膜间隙的稳定存在^[11,50]。

4.3 亲和结合运输途径 (affinity sites pathway)

有些前体蛋白与膜间隙中某种组分具有特异的亲和相互作用，通过这种亲和相互作用来介导蛋白质向膜间隙的运输，如细胞色素 *c* 血红素裂合酶^[11,50,51]。

5 线粒体前体蛋白向线粒体外膜的转运

线粒体外膜主要有两类蛋白质： β 桶状蛋白质 (β -barrel protein) 和 α 螺旋蛋白质 (α -helical proteins)。所有的外膜蛋白都在细胞基质中被合成并转运至线粒体上， β 桶状蛋白质通过多次跨膜 β 折叠片锚定于脂质相中， α 螺旋蛋白质通过一个或多个疏水 α 螺旋片段插入膜中。

5.1 β 桶状蛋白质运输途径

5.1.1 SAM 复合物

SAM 复合物 (sorting and assembly machinery of the outer mitochondrial membrane) 主要含有三个亚基：Sam50、Sam35 和 Sam37。Sam50 形成 SAM 复合物的跨膜通道并具有识别 β 桶状前体蛋白质整合定位信号 (β 信号) 的作用。Sam35 以受体样方式结合信号序列，与 Sam50 共同对 β 信号进行特异应答。Sam37 则参与前体蛋白从 SAM 复合物的释放^[52,53]。SAM 复合物不仅对 β 桶状蛋白质的转运至关重要，也是一些 α 螺旋蛋白质转运所必需的。

5.1.2 β 桶状蛋白质向线粒体外膜分选的具体过程

β 桶状蛋白质前体首先与外膜 TOM 复合受体——主要为 Tom20 结合，并穿过 TOM 复合物通道进入膜间隙。在膜间隙，分子伴侣 Tim9-Tim10 和 / 或 Tim8-Tim13 异源六聚体复

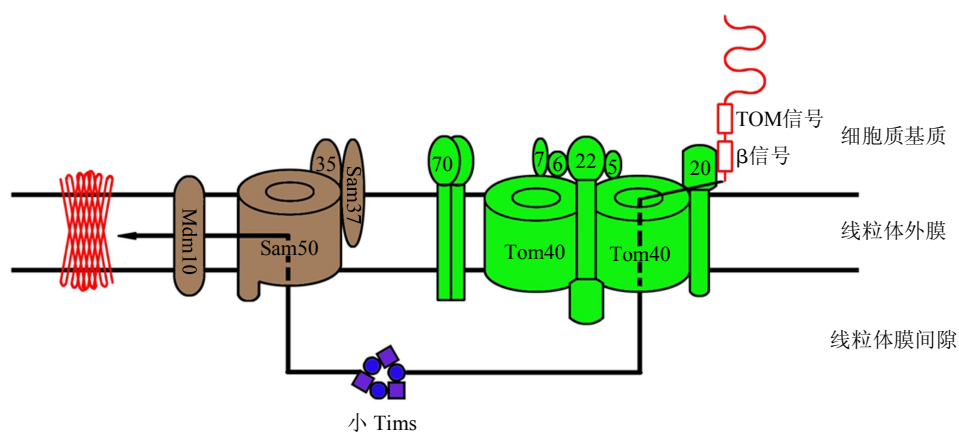


图6 线粒体 β 桶状蛋白质前体向外膜的转运

Fig.6 Translocation of mitochondrial β -barrel precursor proteins into the outer membrane

合物与前体蛋白结合并引导其定位至 SAM 复合物上。 β 桶状蛋白质进入 SAM 复合物的亲水性跨膜通道并被释放至外膜。被释放的 β 桶状蛋白质在 Mdm10 的帮助下, 组装形成具有功能的状态^[53-55]。另有其它的蛋白参与 β 桶状蛋白质的分选和组装过程, 但缺乏充分的实验证据 (图 6)。

5.2 α 螺旋蛋白质运输途径

目前研究表明, α 螺旋蛋白质整合进入外膜的机制非常多样化, 但目前对其研究并不透彻^[2,56]。

Mim1 促进所谓的信号锚定蛋白在外膜上的整合。这类信号锚定蛋白的 N 末端含有一段单次跨膜序列, 同时作为分选信号和膜锚定序列。在大部分情况下, 信号锚定蛋白向外膜的整合不需要 TOM 复合物的参与。

有一种末端锚定蛋白, 在其 C 末端含有同时作为分选信号和膜锚定序列的一段跨膜 α 螺旋片段, 其整合至外膜中的机制目前尚不清楚。

TOM 复合物的中心受体 Tom22 向外膜的整合既需要 TOM 复合物, 又需要 SAM 复合物的参与。Tom22 蛋白的中部具有疏水性片段和亲水性元件, 这些多重整合信号对蛋白向外膜的整合是必要的。TOM 受体 (Tom20/Tom70) 对 Tom22 前体蛋白的识别是必须的, 而 SAM 复合物可促进 Tom22 向线粒体外膜的整合。

还有一类外膜蛋白具有多次跨膜 α 螺旋片段, 其前体蛋白仅需要 Tom70 (而不是整个 TOM 复合物) 并通过与分子伴侣结合向外膜转运, 此外, 该类蛋白向外膜的整合还需要膜间隙因子的参与。

6 线粒体蛋白质运输的驱动力

前体蛋白向线粒体转运的驱动力类型有 ATP、线粒体内膜膜电位、前体蛋白完成折叠时所获得的能量和与膜间隙的高亲和力结合位点结合等^[2,3,4,11]。

到目前为止尚未发现以下转运过程需要能量——前体蛋白从受体转移并穿过 TOM 复合物、前体蛋白与膜间隙中的分子伴侣结合被引导定位至内膜、以及 β 桶状蛋白质向外膜整合等。

基质前体蛋白结合至 TIM23 复合物后, 向基质的转移是由内膜膜电位和 mtHsp70 水解 ATP 驱动的。在其它前体蛋白运输途径中, 如代谢物转运体运输途径、停止 - 转移运输途径和线粒体 DNA 编码蛋白质向内膜的转运途径都需要利用内膜膜电位而不需要 ATP 水解提供能量^[2,3,4]。停止 - 转移运输途径利用的内膜膜电位是通过 Tim21 与线粒体呼吸链组分偶联而产生的^[16,36]。

折叠诱捕运输途径所利用的驱动力为前体蛋白完成折叠形成稳定成熟的蛋白质所释放的能量, 如小 Tim 蛋白、Mia40、Erv1 等。另外, 有些蛋白向膜间隙的定位是通过前体蛋白与膜间隙的高亲和力结合位点结合促进转运, 如线粒体细胞色素 *c* 血红素裂合酶的转运不需要 ATP 提供能量, 其折叠产生的能量也不用于前体蛋白的输入, 而是通过与内膜上的特定定位点结合来介导的^[11,50,51]。

7 结 语

到目前为止, 人们对于线粒体蛋白质的转运已经有了一定的认识。线粒体各部分蛋白质所含有定位分选信号的类型、参与转运的分子复合物的种类和组成、可能的转运过程已经得到了阐明。但是有许多问题仍然悬而未决, 前体蛋白是如何从转运复合物向内膜或外膜横行释放的? TIM23 介导前体蛋白向基质或内膜转运不同机制的机理是什么? α 螺旋蛋白质向外膜转运的细节不清楚, 如 Sam50、Hot1 和 Tim12 等组分的确切功能尚不明确, 等等。对这些问题的回答需要开展进一步的深入研究, 对相关蛋白和复合体的精细结构研究是开启深入了解线粒体蛋白转运机理大门的关键。

参考文献:

1. Schatz G. The magic garden. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 673-678
2. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: Machineries and mechanisms. *Cell*, 2009, 138(4): 628-644
3. Mokranjac D, Neupert W. Thirty years of protein translocation into mitochondria: Unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(1): 33-41
4. Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 723-729
5. Rapaport D. Finding the right organelle: Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep*, 2003, 4(10): 948-952
6. Ito A. Mitochondrial processing peptidase: Multiple-site recognition of precursor proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265(3): 611-616
7. Taylor AB, Smith BS, Kitada S, Kojima K, Miyaura H, Otwinowski Z, Ito A, Deisenhofer J. Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure*, 2001, 9(7): 615-625
8. Gakh O, Cavadini P, Isaya G. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1592(1): 63-77
9. Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*, 2005, 123(2): 277-289
10. Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T, Reichert AS. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(9): 3582-3590
11. Herrmann JM, Hell K. Chopped, trapped or tacked—protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(4): 205-211
12. Jensen RE, Dunn CD. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: Role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1592(1): 25-34
13. Hell K. The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(4): 601-609
14. Rapaport D. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(4): 191-197
15. Popov-Celeketić D, Mapa K, Neupert W, Mokranjac D. Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J*, 2008, 27(10): 1469-1480
16. Mokranjac D, Neupert W. The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochim Biophys Acta*, 2010, in press
17. Truscott KN, Kovermann P, Geissler A, Merlin A, Meijer M, Driessen AJ, Rassow J, Pfanner N, Wagner R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(12): 1074-1082
18. Meier S, Neupert W, Herrmann JM. Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 7777-7785
19. Mokranjac D, Paschen SA, Kozany C, Prokisch H, Hoppins SC, Nargang FE, Neupert W, Hell K. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J*, 2003, 22(4): 816-825
20. Mokranjac D, Sichtung M, Popov-Celeketić D, Mapa K, Gevorkyan-Airapetov L, Zohary K, Hell K, Azem A, Neupert W. Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(5): 1400-1407
21. Moro F, Okamoto K, Donzeau M, Neupert W, Brunner M. Mitochondrial protein import: Molecular basis of the ATP-dependent interaction of Mthsp70 with Tim44. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 6874-6880
22. Schiller D, Cheng YC, Liu Q, Walter W, Craig EA. Residues of Tim44 involved in both association with the

- translocon of the inner mitochondrial membrane and regulation of mitochondrial Hsp70 tethering. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(13): 4424-4433
23. Mokranjac D, Bourenkov G, Hell K, Neupert W, Groll M. Structure and function of Tim14 and Tim16, the J and J-like components of the mitochondrial protein import motor. *EMBO J*, 2006, 25(19): 4675-4685
 24. Kozany C, Mokranjac D, Sichtung M, Neupert W, Hell K. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(3): 234-241
 25. Tamura Y, Harada Y, Shiota T, Yamano K, Watanabe K, Yokota M, Yamamoto H, Sesaki H, Endo T. Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *J Cell Biol*, 2009, 184(1):129-141
 26. Kunji ER. The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett*, 2004, 564(3): 239-244
 27. Gebert N, Chacinska A, Wagner K, Guiard B, Koehler CM, Rehling P, Pfanner N, Wiedemann N. Assembly of the three small Tim proteins precedes docking to the mitochondrial carrier translocase. *EMBO Rep*, 2008, 9(6): 548-554
 28. Koehler CM, Murphy MP, Bally NA, Leuenberger D, Oppliger W, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Or E. Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(4): 1187-1193
 29. Kerscher O, Sepuri NB, Jensen RE. Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(1): 103-116
 30. Webb CT, Gorman MA, Lazarou M, Ryan MT, Gulbis JM. Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell*, 2006, 21(1): 123-133
 31. Ivanova E, Jowitt TA, Lu H. Assembly of the mitochondrial Tim9-Tim10 complex: A multi-step reaction with novel intermediates. *J Mol Biol*, 2008, 375(1): 229-239
 32. Gentle IE, Perry AJ, Alcock FH, Likic VA, Dolezal P, Ng ET, Purcell AW, McConville M, Naderer T, Chanez AL, Charrière F, Aschinger C, Schneider A, Tokatlidis K, Lithgow T. Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Evol*, 2007, 24 (5): 1149-1160
 33. Beverly KN, Sawaya MR, Schmid E, Koehler CM. The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23. *J Mol Biol*, 2008, 382(5): 1144-1156
 34. Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P, Sickmann A, Meyer HE, Kühlbrandt W, Wagner R, Truscott KN, Pfanner N. Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, 2003, 299(5613): 1747-1751
 35. Meier S, Neupert W, Herrmann JM. Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J Cell Biol*, 2005, 170(6): 881-888
 36. Wiedemann N, van der Laan M, Hutu DP, Rehling P, Pfanner N. Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain. *J Cell Biol*, 2007, 179(6): 1115-1122
 37. Reif S, Randelj O, Domanska G, Dian EA, Krimmer T, Motz C, Rassow J. Conserved mechanism of Oxa1 insertion into the mitochondrial inner membrane. *J Mol Biol*, 2005, 354(3): 520-528
 38. Herrmann JM, Bonnefoy N. Protein export across the inner membrane of mitochondria: The nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2507-2512
 39. Stuart R. Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: The role of the Oxa1 complex. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1592(1): 79-87
 40. Bonnefoy N, Fiumera HL, Dujardin G, Fox TD. Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(1): 60-70
 41. Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2250-2255
 42. Hell K, Neupert W, Stuart RA. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1281-1288
 43. Sato T, Mihara K. Topogenesis of mammalian Oxa1, a component of the mitochondrial inner membrane protein export machinery. *J Biol Chem*, 2009, 284 (22): 14819-14827
 44. Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, Funes S, Bonnefoy N, Herrmann JM. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J*, 2006, 25(8): 1603-1610
 45. Frazier AE, Taylor RD, Mick DU, Warscheid B, Stoepel N, Meyer HE, Ryan MT, Guiard B, Rehling P. Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol*, 2006, 172(4): 553-564
 46. Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuán Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J*, 2004, 23(19): 3735-3746
 47. Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, 2005, 121(7): 1059-1069
 48. Stojanovski D, Milenkovic D, Müller JM, Gabriel K, Schulze-Specking A, Baker MJ, Ryan MT, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A. Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide

- carrier and sulfhydryl oxidase. *J Cell Biol*, 2008, 183(2): 195~202
49. Curran SP, Leuenberger D, Leverich EP, Hwang DK, Beverly KN, Koehler CM. The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279(42):43744~43751
50. Steiner H, Zollner A, Haid A, Neupert W, Lill R. Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast: Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem*, 1995, 270(39): 22842~22849
51. Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 11752~11757
52. Chan NC, Lithgow T. The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(1): 126~136
53. Paschen SA, Neupert W, Rapaport D. Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem*, 2005, 30(10): 575~582
54. Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, 2003, 424(6948): 565~571
55. Yamano K, Tanaka-Yamano S, Endo T. Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. *EMBO Rep*, 2010, 11(3): 187~193
56. Becker T, Gebert M, Pfanner N, van der Laan M. Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 484~493

Translocation of Mitochondrial Proteins

MA Jun, SUN Fei

National Laboratory of Biomacromolecular, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

This work was supported by grants from '973' program (2006CB806506, 2006CB911001) and The National Natural Science Foundation of China (30721003, 30970569)

Received: Aug 23, 2010 Accepted: Aug 25, 2010

Corresponding author: SUN Fei, Tel/Fax: +86(10)64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

Abstract: There are about 1000 proteins located in mitochondria, of which 99% are encoded by nucleic DNA, synthesized by cytosolic ribosomes and then imported into one of the four mitochondrial compartments: matrix, inner membrane, intermembrane space and outer membrane. Several intricate molecular machines are dedicated to catalyze these processes as the mitochondrial protein translocation system. Thirteen proteins encoded by mitochondrial DNA are also translocated into inner membrane by this system. The various targeting signals of mitochondrial precursors, translocase complexes and mitochondrial protein translocation pathways will be described in the review.

Key Words: Protein translocation; Presequence; TOM complex; TIM23 complex; TIM22 complex