

线粒体腺苷酸转运蛋白

王燕萍 高 静*

(南京大学生命科学学院, 南京大学医学院, 南京 210093)

摘要 腺苷酸转运蛋白(ANT)是 32 kDa 的线粒体内膜蛋白。ANT 有双重功能, 一方面它能作为一个反向转运载体介导胞浆 ADP 和线粒体 ATP 的交换, 另一方面 ANT 能参与线粒体非特异性 PTP 的形成而调控细胞凋亡。现就 ANT 的结构、特性、功能以及 ANT 活性对细胞凋亡的调控进行综述。

关键词 线粒体; 腺苷酸转运蛋白; 凋亡

目前研究认为, 线粒体通透性转运孔(permeability transition pore, PTP)的非特异性开放将引起线粒体跨膜电位降低和促凋亡物质释放等一系列变化, 最终导致细胞凋亡^[1]。PTP 主要由位于线粒体内膜的腺苷酸转运蛋白(adenine nucleotide translocator, ANT)、位于线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)以及位于线粒体内室的环孢菌素 A 受体 D (cyclophilin-D, Cyp-D)所组成。近年来一些学者着力于 ANT 的研究, 发现 ANT 是一个有双重功能的蛋白质, 它能介导胞浆 ADP 和线粒体 ATP 的交换, 也能参与形成非特异性 PTP 而调控凋亡的发生。而 ANT 对 PTP 的影响还与 Bcl-2 家族成员以及其他一些因子(如 Ca^{2+} 、ADP 等)的作用有关^[2]。

1 ANT 的结构和特性

ANT 属于线粒体载体家族, 由核基因编码, 在胞浆中合成, 然后运输到线粒体内膜。ANT 的分子量为 32 kDa, 其主要序列大约有 300 个氨基酸残基, 组成 3 个重复的结构域(图 1A)。每个结构域都有两个跨膜螺旋, 螺旋间的亲水肽链突出到线粒体基质内, 而相邻结构域两个跨膜螺旋间的亲水肽链突出到内膜的胞浆侧。ANT 分子的 N 端和 C 端都暴露于内膜的胞浆侧^[3]。近年来, 有学者研究酵母 Anc2 (ANT 的异构体)发现, 共价二聚体是 ANT 的最小功能结构, 每个二聚体参与转运一个 ATP 或 ADP^[4]。

目前为止已发现 ANT 有 50 个同源物。很多物种包括哺乳动物、昆虫、酵母、真菌、甚至植物中都有几种 ANT 编码基因。目前已知人类有 3 种表

型(ANT1, ANT 2, ANT3), 酵母也有 3 种(Anc1, Anc 2, Anc 3), 而啮齿动物只有 2 种表型。一些转化的细胞系如 HeLa、HL60、Hep3B 和 143B 只表达 ANT2 和 ANT3。人类 ANT1 基因定位于 4 号染色体, 主要分布在心脏和骨骼肌^[5]。ANT2 基因定位于 X 染色体的长臂上, 在大多数成熟组织微弱表达, 但高度表达于肝脏和增殖细胞(如成肌细胞和肿瘤细胞)。ANT3 基因定位于 X、Y 染色体的假常染色体区, 低表达于脑、肝脏、心脏和骨骼肌。而小鼠的 ANT1 基因定位于 8 号染色体。虽然 ANT 异构体的氨基酸序列同源性高达 70%~80%, 但其功能却不尽相同。下面主要讨论的是 ANT1。

2 ANT 参与 ADP/ATP 的交换

ANT 是线粒体内膜最丰富的蛋白质, 表面有 ATP 和 ADP 的结合位点。在生理状态下, ANT 作为一个反向转运载体把胞浆的 ADP 转运到线粒体基质, 而把线粒体基质 ATPase 合成的 ATP 转运到胞浆, 并且一个 ATP 交换一个 ADP^[6]。在某些特殊环境下, 当呼吸链受阻, ANT 会把 ADP 转运到胞浆而把 ATP 转运到线粒体基质从而导致严重的代谢障碍。另外, 有学者发现在一些肿瘤细胞中, ANT2 的表达远远高于 ANT1 和 ANT3, 因此认为 ANT2 的功能偏向于把 ATP 转运到线粒体基质而把 ADP 转运到胞浆从而阻止有氧呼吸的进行^[7]。

ANT 有两种构象: c 态和 m 态。只有当 ANT 的构象在 c 态和 m 态之间交互变换, 底物的结合位

收稿日期: 2004-10-24 接受日期: 2004-12-15

* 通讯作者。Tel: 025-83593374, Fax: 025-83686559, E-mail: jinggao@nju.edu.cn

实验证实 ANT 能够形成蛋白质通道^[14]。氧化剂、苍术苷、Bax、Ca²⁺ 诱导非特异性通道的形成, 而低 pH、ADP、Bcl-2 和米酵菌酸起抑制作用(图 1B)。

如上所述, ANT1 参与 PTP 的形成而诱导细胞凋亡, 但 ANT2 的过量表达却与细胞凋亡无关, 这可能与它们在线粒体上的不同定位以及和 CyP-D 结合能力的差异有关^[15]。最近, Zamora 等^[16]还发现把 3 种 ANT 异构体转染到 HeLa 细胞, ANT3 和 ANT1 一样能引起亚 G₁ 期细胞含量升高、膜联蛋白 V 阳性、线粒体膜电位下降以及 caspase-9 和 caspase-3 的活性升高, 而且 ANT3 引起的凋亡能被环孢菌素 A(CsA) 和米酵菌酸抑制。因此, ANT3 和 ANT1 的功能比较相似。然而, Kokoszka 等^[17]提出 ANT 剔除的小鼠肝线粒体仍有 PTP 活性, 因此他们认为 ANT 并不是线粒体 PTP 的必要组成部分, 也不是 PTP 介导细胞凋亡所必需的, ANT 的存在仅能增加 PTP 对 Ca²⁺ 的敏感性, 起调控作用。

4 ANT 活性的调节与凋亡

ANT 能与很多参与线粒体膜通透性调节和凋亡的蛋白质相互作用。对纯化的 PTP 作 Western 印迹分析发现不仅有 ANT、VDAC、己糖激酶、肌酸激酶, 还有 Bcl-2 家族成员的存在。下面就介绍 ANT 和这些蛋白质相互作用对凋亡的影响。

4.1 CyP-D

CyP-D 是 CsA 及其衍生物在线粒体上的作用靶点。CsA 及其衍生物在很多不同的模型中能抑制 PTP 的开放和细胞凋亡^[18]。将 CyP-D 和 GST 做成融合蛋白, 用亲和层析的方法可知 ANT 上有 CyP-D 的结合部位。CsA 可以抑制 ANT 和 CyP-D 的结合; 而二酰胺可以促进二者结合, 从而诱导凋亡。

4.2 VDAC

Beutner 等^[19]分离纯化 VDAC-ANT 复合物时发现其有两种结合方式: 一种是 VDAC 直接和 ANT 结合, 这里 VDAC 的作用可能是使 ANT 构象处于 c 态, ATP/ADP 的结合位点暴露到内膜的胞浆侧, 使苍术苷和 Ca²⁺ 促进 ANT 形成非特异性 PTP, 诱导凋亡的发生; 另一种是 VDAC 通过和肌酸激酶作用而间接与 ANT 结合, 在这种情况下, ANT 形成 PTP 的过程将受阻。

4.3 肌酸激酶

线粒体内、外膜间的肌酸激酶(creatine kinase, CK)的最小功能单位为二聚体, 聚集为八聚体时一

端与线粒体外膜上的 VDAC 连接, 另一端通过心磷脂间接与 ANT 相连, 因此能抑制 PTP 孔道的形成。然而自由基、Ca²⁺ 等因素能使肌酸激酶八聚体分离, 从而导致 VDAC 能直接与 ANT 作用形成 PTP^[20]。过量表达肌酸激酶的转基因小鼠将不易形成 PTP, 因而更易保持肝线粒体膜通透性的恒定^[21]。

4.4 Bcl-2 家族蛋白

Brenner 等^[14]将 ANT 与 Bax 或 Bcl-2 加入脂质体可以构建脂双层小体, 通过电生理方法发现 Bax 与 ANT 相互作用形成有效的复合通道, 该通道的电生理特性在质和量上都不同于 Bax 或 ANT 单独形成的通道。相反, Bcl-2 与 ANT 结合不能形成通道。而且, Bcl-2 能够阻止 Bax 与 ANT 的相互作用, 从而阻止通道的形成, 抑制凋亡的发生。另外, 免疫共沉淀和酵母双杂交系统也都显示 Bax 和 ANT 相互作用, 而 Bax 突变体对 ANT 通道的形成不起作用。Marzo 等^[22]认为 ANT-Bax 复合物本身并不能改变膜通透性, 必须由 ANT 配体苍术苷来激活从而诱导细胞凋亡, 而米酵菌酸的作用恰恰相反。

4.5 其他

HIV 病毒 R 蛋白(Vpr)是 HIV-1 的一个辅助蛋白, 通过直接而且特异地与结合在 PTP 中的 ANT 相互作用, 改变线粒体膜通透性, 导致细胞色素 c 的释放, 激活 caspase 级联反应, 最终引起细胞凋亡^[23]。而细胞凋亡病毒源性线粒体抑制子(viral mitochondrial inhibitor of apoptosis, vMIA)是巨细胞病毒 UL37 基因的产物, 它特异地与 ANT 相互作用, 可阻断由 Vpr 引起的细胞凋亡^[24]。

目前, 线粒体 PTP 在缺血缺氧、氧化应激等病理条件下导致细胞凋亡中的重要作用已得到广泛认识, 所以 PTP 的各个组成蛋白质也日益受到大家的重视。ANT 是一个具有双重功能的蛋白质, 不仅对线粒体正常功能的维持有重要作用, 而且能在一些相关蛋白质的作用下诱导凋亡的发生。因此, ANT 与线粒体疾病的相关性及在线粒体疾病治疗中的意义值得进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Zamzami N *et al.* *J Exp Med*, 1996, **183**: 1533
- [2] Belzacq AS *et al.* *Curr Drug Targets*, 2003, **4**: 517
- [3] Belzacq AS *et al.* *Biochimie*, 2002, **84**: 167
- [4] Trezeguet V *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1457**: 81
- [5] Portman MA. *Mol Genet Metab*, 2000, **71**: 445
- [6] Vieira HL *et al.* *Cell Death Differ*, 2000, **7**: 1146

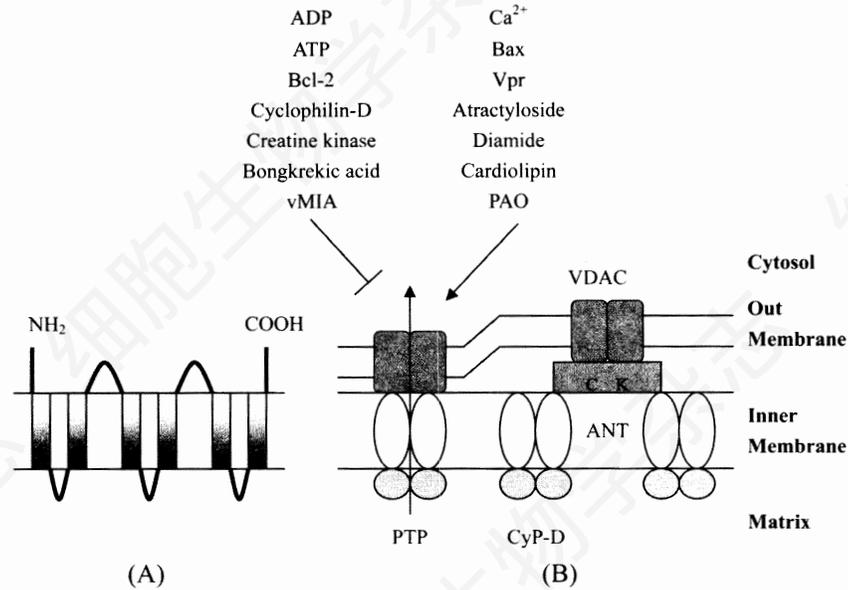


图1 ANT 结构、功能模式图

A: ANT 的结构模式图; B: ANT 及相关蛋白质参与线粒体 PTP 形成的模式图。正常情况下, ANT 作为一个反向转运载体介导胞浆 ADP 和线粒体 ATP 的交换; 病理情况下, ANT 和 VDAC、CyP-D 形成非特异性 PTP 而调控细胞凋亡。

点分别朝向胞浆或线粒体基质时, ADP 和 ATP 才能交换^[8]。米酵菌酸(bongkreikic acid, BA)能竞争结合于 ANT 的线粒体基质面使其构象处于 m 态, 而苍术苷(atractyloside, Atr)及其衍生物羧基苍术苷(carboxyatractyloside, Catr)能竞争性与非竞争性结合于 ANT 的胞浆面使其构象处于 c 态, 从而抑制 ADP/ATP 的交换^[6]。进一步研究发现, 这 3 种抑制剂的结合位点均在 ANT 暴露于内膜线粒体基质侧或是胞浆侧的亲水肽链上。

ADP/ATP 的交换遵循 Michaelis-Menten 动力学^[3]。在有氧能量代谢时, 哪种腺苷酸先转运取决于负电荷的多少。由于 ATP 比 ADP 多一个负电荷, 所以 ATP 先转运到胞浆。ANT 有高度特异性, 在天然核苷酸中, 只转运 ATP 和 ADP。

3 ANT 参与 PTP 的形成

PTP 是横跨在线粒体内外膜接触部位的非特异性通道, 是个多聚蛋白质复合体结构, 主要包括外膜的 VDAC、内膜的 ANT 以及线粒体基质的 CyP-D。生理状态下, PTP 一般是关闭的, 有时呈现开、关交替的状态, 以调节线粒体和胞浆之间物质的流动以及氧化还原平衡。但在凋亡过程下, PTP 非特异性开放, 而且呈持续开放状态, 造成分子量小于 1.5 kDa 的物质通过 PTP 流入胞浆, 从而导致

膜电位丧失、线粒体肿胀以及外膜断裂, 最终引起一些可溶性促凋亡蛋白如细胞色素 c 释放, 细胞不可逆地凋亡^[9]。

虽然 PTP 的精确成分还不太清楚, 但目前研究认为 ANT 不仅是构成 PTP 的重要成分, 而且对于凋亡过程中线粒体膜通透性的调节起着重要作用。ANT 的配体与 PTP 的开放密切相关。天然核苷酸中只有 ANT 底物(ADP、dADP、ATP)能与 PTP 互相作用。ADP 通过降低钙触发位点对 Ca²⁺ 的敏感性而抑制 PTP 开放。ADP 有两个结合位点, 高亲和位点能被苍术苷阻断, 因此被认为与 ANT 有关^[10]。米酵菌酸能使 ANT 构象处于 m 态从而抑制 PTP 开放, 而苍术苷使 ANT 构象处于 c 态从而激活 PTP, 诱导凋亡的发生。目前认为 c 态是 PTP 开放所必需的^[11]。因此, 米酵菌酸和苍术苷是细胞凋亡模型中 PTP 的特异性抑制剂和激动剂。另外, 在缺血再灌注模型中发现米酵菌酸能保护细胞抑制凋亡^[12]。氧化苯砷(phenylarsine oxide, PAO)等氧化剂可以通过第 56 半胱氨酸残基使 ANT 交联成二聚体, 构成非特异性通道, 从而改变线粒体膜通透性而诱导细胞凋亡。最近还有学者提出心磷脂的过氧化能使 ANT 介导 PTP 的开放, 从而导致细胞色素 c 释放^[13]。另外, 将分离到的 ANT-VDAC 复合物和重组的 CyP-D 构建到脂质体中发现和完整的 PTP 有同样的特性。电生理

- [7] Giraud S *et al. J Mol Biol*, 1998, **281**: 409
[8] Gropp T *et al. Biophys J*, 1999, **77**: 714
[9] Kroemer G *et al. Nat Med*, 2000, **6**: 513
[10] Halestrap AP *et al. Biochimie*, 2002, **84**: 153
[11] Crompton M. *Biochem J*, 1999, **341**: 233
[12] Cao G *et al. J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, **21**: 321
[13] Nakagawa Y. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1011**:177
[14] Brenner C *et al. Oncogene*, 2000, **19**: 329
[15] Bauer MK *et al. J Cell Biol*, 1999, **147**: 1493
[16] Zamora M *et al. FEBS Lett*, 2004, **563**: 155
[17] Kokoszka J *et al. Nature*, 2004, **427**: 461
[18] Waldmeier PC *et al. Curr Med Chem*, 2003, **10**: 1485
[19] Beutner G *et al. FEBS Lett*, 1996, **396**: 189
[20] Vyssokikh MY *et al. Acta Biochim Pol*, 2003, **50**: 389
[21] Dolder M *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 17760
[22] Marzo I *et al. Science*, 1998, **281**: 2027
[23] Kino T *et al. DNA Cell Biol*, 2004, **23**: 193
[24] Graham BH *et al. Nat Genet*, 1997, **16**: 226

Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator

Yan-Ping Wang, Jing Gao*

(School of Life Sciences, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Adenine nucleotide translocator (ANT), a 32 kDa protein located in the mitochondrial inner membrane, appears to act as a bi-functional protein. On the one hand, ANT is a vital, specific antiporter which contributes to the exchange of cytosolic ADP and mitochondrial ATP. On the other hand, ANT can participate in the formation of the mitochondrial permeability transition pore (PTP), a nonspecific pore that is an important mediator of apoptosis. This paper summarizes some of the recent advances in the research on the structure, characterization, function of ANT and also the activity of ANT which is related to apoptosis.

Key words mitochondria; adenine nucleotide translocator; apoptosis

Received: October 24, 2004 Accepted: December 15, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-25-83593374, Fax: 86-25-83686559, E-mail: jinggao@nju.edu.cn