

# Nix介导的线粒体自噬机制的研究进展

郑艳榕, 张翔南, 陈忠

浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058

**[摘要]** 线粒体自噬对于维持细胞稳态至关重要。近年的研究发现, Nix是参与介导线粒体自噬的一个重要蛋白, 在许多生理、病理过程中扮演了重要的角色。但是, Nix介导线粒体自噬的具体机制尚不清楚, 现主要存在以下三种假说: ①Nix可能与另一线粒体自噬关键蛋白 Parkin 相互作用, 共同介导线粒体自噬; ②Nix作为一种自噬受体蛋白, 通过自身的 Atg8 家族相互作用模体招募 Atg8 家族成员至损伤线粒体, 导致线粒体移除; ③作为 Bcl-2 家族成员, Nix可能与参与自噬泡生成的重要蛋白 Beclin-1 竞争结合 Bcl-2 或 Bcl-XL, 导致细胞质中游离的 Beclin-1 增加, 进而诱导自噬发生。本文阐述了 Nix介导线粒体自噬的可能机制, 为以 Nix作为靶点进行相关疾病的治疗策略提供理论依据。



**[关键词]** 线粒体; 自噬; 微管相关蛋白质类; 综述

**[中图分类号]** R329.28 **[文献标志码]** A

## Research progress on mechanism of Nix-mediated mitophagy

ZHENG Yanrong, ZHANG Xiangnan, CHEN Zhong (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Corresponding author: CHEN Zhong, E-mail: [chenzhong@zju.edu.cn](mailto:chenzhong@zju.edu.cn), <http://orcid.org/0000-0003-4755-9357>

**[Abstract]** Autophagy is fundamental to maintain cellular homeostasis. As one kind of the most well-studied selective autophagy, autophagy of mitochondria (mitophagy) is crucial for the clearance of damaged mitochondria. Mitophagy dysfunction has been proved to be closely associated with many human diseases. Nix is a key protein for mitophagy during the maturation of reticulocytes. However, the detailed molecular mechanisms underlying Nix-mediated mitophagy are not fully understood. This article summarizes three possible working models of Nix in mitophagy induction. Firstly, Nix can interplay with Parkin, another important protein for mitophagy, to initiate mitophagy. Secondly, Nix can serve as a receptor for autophagy machinery by interacting with Atg8 family through its LIR motif. Finally, as a BH3-only protein, Nix

收稿日期: 2016-10-02 接受日期: 2016-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(81273506, 81102429)

第一作者: 郑艳榕(1992—), 女, 博士研究生, 主要从事缺血性脑卒中的基础研究; E-mail: [yanrong\\_zh@zju.edu.cn](mailto:yanrong_zh@zju.edu.cn); <http://orcid.org/0000-0001-6253-9835>

通讯作者: 陈忠(1968—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事慢性脑病的分子生物学机制及药物新靶点研究; E-mail: [chenzhong@zju.edu.cn](mailto:chenzhong@zju.edu.cn); <http://orcid.org/0000-0003-4755-9357>

can compete with Beclin-1 to bind other members of Bcl-2 family resulting in increased free Beclin-1 in cytosol, which further promotes autophagy flux.

[ **Key words** ] Mitochondria; Autophagy; Microtubule-associated proteins; Review

[ J Zhejiang Univ ( Medical Sci ), 2017, 46(1) :92-96. ]

自噬是细胞通过溶酶体降解长寿命蛋白和细胞器的过程<sup>[1]</sup>。研究表明,自噬具有选择性,如细胞通过自噬选择性清除线粒体的过程,即线粒体自噬就是一种重要的选择性自噬<sup>[2]</sup>。线粒体自噬清除损伤线粒体是细胞实现线粒体质量控制的主要途径,对维持细胞稳态至关重要。

目前广泛认可的介导线粒体自噬的通路主要包括:①酵母菌中 Atg32 介导的线粒体自噬;②在多种后生动物细胞中 Parkin 和 PTEN 诱导假定激酶 1 ( PTEN-induced putative kinase protein 1, PINK1) 共同介导的线粒体自噬;③哺乳动物中 Nix、FUNDC1 等线粒体自噬受体介导的线粒体自噬<sup>[3]</sup>。PINK1/Parkin 通路已成为近年研究的热点。简单说来,受损线粒体的膜电位降低,使 PINK1 在线粒体外膜上累积,继而招募细胞质中的 Parkin 泛素化标记线粒体<sup>[4-5]</sup>并招募自噬泡包裹这些线粒体。最近的研究表明,PINK1/Parkin 通路还参与了其非自噬依赖的线粒体清除过程<sup>[6]</sup>。同时 Parkin 缺失的细胞株如 HeLa 同样存在线粒体自噬的现象<sup>[7-8]</sup>,提示线粒体自噬发生机制的复杂性。

近年来的研究显示,Nix 是介导线粒体自噬的重要蛋白,对哺乳动物网织红细胞成熟过程中线粒体的清除至关重要<sup>[9]</sup>,然而其作用机制尚未完全阐明。本文将重点综述 Nix 介导的线粒体自噬机制的研究进展。

## 1 Nix 的发现及其功能

Nix 又被称为 Bnip3L, 即 B-cell leukemia/lymphoma 2 ( Bcl-2 )/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like。其中 E1B 19 K 是腺病毒基因组中编码的一种 Bcl-2 同源蛋白<sup>[10]</sup>。Nix 是通过以 E1B 19 K 为诱饵蛋白的酵母双杂交筛选<sup>[11]</sup>和高通量 cDNA 文库筛选<sup>[12]</sup>被发现的。因此,最初 Nix 就被归为 Bcl-2 家族成员。后续研究进一步发现,Nix 只含有凋亡效应结构域 ( Bcl-2

homologue 3, BH3) 和跨膜结构域,属于 BH3-only 蛋白,可与 Bcl-2 和 Bcl-XL 相互作用,改变线粒体膜通透性,增加细胞色素 c 的释放,从而引起细胞凋亡<sup>[13]</sup>。

但是,随着对 Nix 功能研究的深入,人们发现 Nix 不同于其他典型的 BH3-only 蛋白。首先,与典型的 BH3-only 蛋白相比,Nix 诱导凋亡的能力较弱<sup>[14]</sup>;其次,典型的 BH3-only 蛋白主要依赖自身 BH3 结构域发挥作用<sup>[15]</sup>,而 Nix 却主要依赖其跨膜区发挥促凋亡作用<sup>[13]</sup>。这些实验结果提示,促凋亡可能不是 Nix 主要的功能。2007 年 McLelland 等<sup>[6]</sup>研究发现,在网织红细胞成熟的过程中,线粒体的程序性清除依赖于 Nix。至此,人们才逐渐关注到 Nix 另一重要的生理功能——介导线粒体自噬。

Nix 介导的线粒体自噬除了在生理状态下发挥重要作用,与许多疾病也相关。Nix 在多种肿瘤中发挥的抑癌作用<sup>[16-18]</sup>不仅与它介导凋亡的功能相关<sup>[19]</sup>,也与其介导的线粒体自噬相关;新型抗癌药物 KP46 能够特异性地激动 Nix 依赖的线粒体自噬而发挥抑癌作用<sup>[20]</sup>。Nix 与其同源蛋白 Bnip3 对于病毒感染后自然杀伤细胞的存活是必需的,其介导线粒体自噬清除自然杀伤细胞中受损的线粒体,参与免疫应答<sup>[21]</sup>;Nix 与帕金森病重要蛋白 Parkin 发生相互作用,可能也参与了帕金森病的病理进程<sup>[22]</sup>。鉴于 Nix 介导的线粒体自噬在多种疾病中都发挥着重要作用,其介导线粒体自噬的具体机制及与不同疾病的关系都有待进一步研究。

## 2 Nix 通过与 Parkin 相互作用介导线粒体自噬

线粒体膜电位降低是 Parkin 介导的线粒体自噬过程中的重要一环<sup>[23]</sup>。早期的研究发现,线粒体膜电位与 Nix 介导线粒体自噬之间存在密切关系。线粒体去耦联试剂 FCCP 可诱导线粒体的膜电位降低,进而逆转网织红细胞中 Nix 缺失对

线粒体自噬的抑制作用<sup>[24]</sup>。此外,在 HeLa 细胞中,Nix 对于线粒体去耦联试剂 CCCP 诱导的线粒体膜电位降低是必需的<sup>[25]</sup>,而高表达 Nix 也可以引起线粒体膜电位降低<sup>[10]</sup>。近期研究还发现,Nix 可调控 Parkin 向线粒体转移,激活 Parkin-Ubiquitin-p62 介导的线粒体自噬<sup>[25]</sup>。然而,Nix 调控 Parkin 转位的具体机制还不明确,很有可能是通过调控线粒体膜电位的改变从而影响 Parkin 介导线粒体自噬(图 1)。

目前,Nix 调控线粒体膜电位的机制尚不清楚。一般情况下,BH3-only 蛋白需要依赖促凋亡蛋白以及线粒体通透转运孔道 (mitochondrial permeability transitionpore, MPTP) 来诱导线粒体去极化,如 Nix 的同源蛋白 Bnip3 引发线粒体膜电位降低依赖于促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 诱导的 MPTP 开放<sup>[26]</sup>。此外,抗凋亡蛋白 Bcl-XL 也可抑制 Nix 诱导的线粒体膜电位降低<sup>[13]</sup>。但也存在一些矛盾的现象,如在哺乳动物网织红细胞中,Nix 的缺失不会引起线粒体膜电位显著改变,且 Nix 介导的线粒体自噬并不依赖 Bax 和 Bak<sup>[6]</sup>。

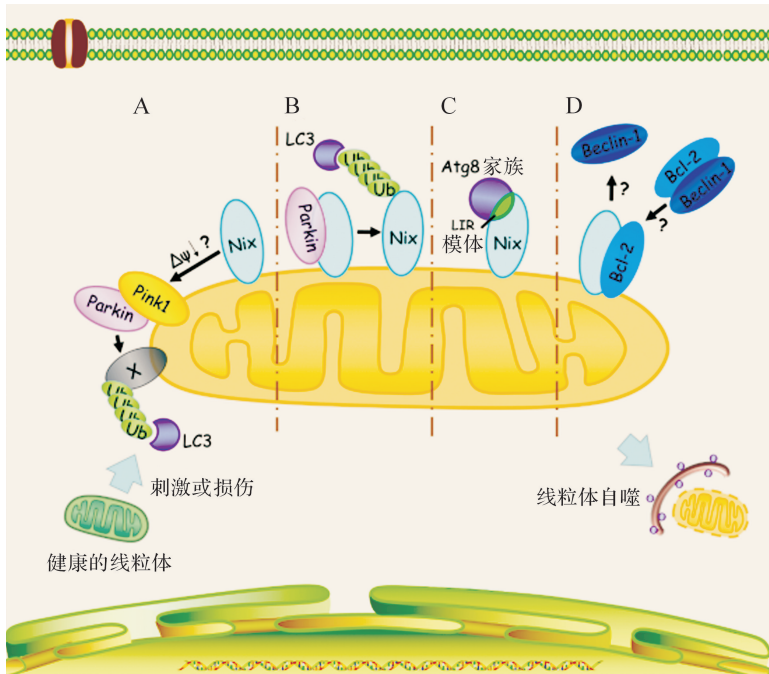
因此,Nix 与线粒体膜电位的关系及其对于 Parkin 介导的线粒体自噬的作用还有待进一步明确。

Nix 不仅可以影响 Parkin 的功能,Parkin 亦可调控 Nix。有研究发现,Parkin 可以泛素化 Nix,进而促进其被自噬受体识别,最终导致线粒体自噬性清除<sup>[22]</sup>(图 1)。这条通路可能与帕金森病的发病密切相关。已有的研究结果提示,Nix 与 Parkin 可以相互影响,但它们之间是否存在功能上的相关性尚不完全清楚,这可能成为下一阶段该领域的研究重点。

### 3 Nix 作为自噬受体招募 Atg8 蛋白家族启动线粒体自噬

目前已知的大多数自噬受体都是通过 Atg8 家族成员相互作用而发挥介导自噬的功能,而 Atg8 家族相互作用模体 (Atg8-family interacting motif, AIM, 在哺乳动物中为 LC3 interacting region, LIR) 是这些受体与 Atg8 家族成员结合的重要结构域<sup>[27]</sup>。Novak 等<sup>[28]</sup>研究表明,Nix 有两个 LIR 序列,一个位于 Nix 的近氨基端,另一个则临近 BH3 结构域;Nix 通过 LIR 与 Atg8 蛋白家族成员 (包括 LC3A、GABARAP、GABARAP-L1、GABARAP-L2) 发生相互作用,进而诱导线粒体自噬。这提示,Nix 可以作为一个受体蛋白,招募自噬机制包裹线粒体,进而清除线粒体(图 1)。对 *Nix*<sup>-/-</sup>网织红细胞线粒体自噬情况的研究也显示,*Nix*<sup>-/-</sup>网织红细胞中线粒体的清除停留在线粒体被自噬体吞噬前的阶段,Nix 缺失并不影响自噬体的形成<sup>[11]</sup>。这些结果提示,Nix 可能作为受体招募自噬机制清除线粒体。除了 LIR 之外,也有研究发现,Nix 74 位的亮氨酸对其诱导线粒体自噬也发挥了关键作用,该位点参与了 Nix 与其他蛋白的相互作用<sup>[29]</sup>。

鉴于 Nix 在所有线粒体外膜均有表达,Atg8 家族成员精确识别受损线粒体上 Nix 的具



A: Nix 可能通过诱导膜电势降低激活 PINK1/Parkin 通路,介导线粒体自噬,其中,蛋白 X 表示 Parkin 的泛素化底物,如 Mfn2、VDAC1 等; B: Nix 作为 Parkin 的泛素化底物,被 Parkin 泛素化后特异性被 LC3 识别,进而介导线粒体自噬; C: Nix 直接通过其 LIR 模体与 Atg8 家族成员结合,介导线粒体自噬; D: Nix 可能与 Bcl-2 竞争结合 Beclin-1,释放 Beclin-1,增强自噬流。

图 1 Nix 介导线粒体自噬的四种可能模式

Figure 1 Four possible working models of Nix-mediated mitophagy

体机制也是近期的研究热点。对 Nix 同源蛋白 Bnip3 的研究发现,其 17 与 24 位的色氨酸残基的磷酸化可促进其与 LC3B 的相互作用<sup>[30]</sup>。另一线粒体外膜蛋白 FUNDC1 在 18 位酪氨酸残基的去磷酸化可促进其与 LC3 的相互作用<sup>[31]</sup>。而在酵母菌中,Atg32 的磷酸化,尤其是 114 位丝氨酸残基的磷酸化,介导了 Atg32 与 Atg11 的相互作用并诱导线粒体自噬<sup>[32]</sup>。因此,目标线粒体上 Nix 的磷酸化调节可能是该线粒体被自噬清除的机制之一。而己知蛋白激酶 PINK1 能在去极化的线粒体的外膜上稳定存在<sup>[33]</sup>。因此,PINK1 和 Nix 之间可能存在一定联系,但仍需要进一步研究证明。

#### 4 Nix 增加细胞质中游离的 Beclin-1 进而诱导自噬

在这个模型中另一关键蛋白是 Beclin-1。Beclin-1 是 Atg6 的同源蛋白<sup>[34]</sup>,是 class III PtdIns 3-kinase 复合物的组分之一,参与诱导自噬发生与自噬泡的形成<sup>[35]</sup>。Bcl-2 可以与 Beclin-1 结合,从而抑制自噬<sup>[36]</sup>。而 Maiuri 等<sup>[37]</sup>研究发现,BH3-only 蛋白或其类似物可以与 Beclin-1 竞争结合 Bcl-2 或 Bcl-XL,从而释放出游离的 Beclin-1,进而诱导自噬发生(图 1)。因此,作为 BH3-only 蛋白的 Nix 也可能通过这一机制诱导自噬。但也存在一些矛盾的现象,如 *Nix*<sup>-/-</sup>网织红细胞中自噬泡的形成不受影响<sup>[6]</sup>,提示在某些细胞中 Nix 可能不影响 Beclin-1 的功能。因此,在不同细胞中,Nix 与 Beclin-1 的相互作用及其功能仍需要进一步研究。

#### 5 结 语

作为细胞对线粒体实行质量控制的重要手段,线粒体自噬对细胞的生存尤为重要。Nix 被证明是调控线粒体自噬的重要蛋白,参与许多重要的生理、病理过程中,但其机制尚未完全阐明。本文综述了 Nix 介导的线粒体自噬机制的研究进展,总结了三种可能的分子生物学机制,但其中仍有许多问题尚需解决,例如:①在介导线粒体自噬的过程中,Nix 与 Parkin 是否以及如何分工合作;②作为自噬受体,Nix 如何特异性标记受损伤的线粒体实现选择性线粒体自噬;③Nix 如何决定细胞走向凋亡或自噬,等等。Nix 介导的线粒体自噬的进一步阐明,将为 Nix 作为一种药物新靶点而治疗相关疾病提供新的策略。

#### 参考文献

- [1] LEVINE B, KLIONSKY D J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy[J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4):463-477.
- [2] KIM I, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, LEMASTERS J J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 462(2):245-253.
- [3] YOULE R J, NARENDRA D P. Mechanisms of mitophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1):9-14.
- [4] CHEN Y, DORN G W. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria [J]. *Science*, 2013, 340(6131):471-475.
- [5] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2):119-131.
- [6] MCLELLAND G L, SOUBANNIER V, CHEN C X, et al. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control[J]. *EMBO J*, 2014, 33(4):282-295.
- [7] DENISON M S, NAGY S R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43:309-334.
- [8] PAWLYK A C, GIASION B I, SAMPATHU D M, et al. Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48):48120-48128.
- [9] SCHWEERS R L, ZHANG J, RANDALL M S, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(49):19500-19505.
- [10] CUCONATI A, WHITE E. Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(19):2465-2478.
- [11] OHI N, TOKUNAGA A, TSUNODA H, et al. A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(4):314-325.
- [12] MATSUSHIMA M, FUJIWARA T, TAKAHASHI E, et al. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3 [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998, 21(3):230-235.
- [13] IMAZU T, SHIMIZU S, TAGAMI S, et al. Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L)



- interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability [J]. **Oncogene**, 1999, 18(32):4523-4529.
- [14] KIM H, RAFIUDDIN-SHAH M, TU H C, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies[J]. **Nat Cell Biol**, 2006, 8(12):1348-1358.
- [15] KELEKAR A, THOMPSON C B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis [J]. **Trends Cell Biol**, 1998, 8(8):324-330.
- [16] LAI J, FLANAGAN J, PHILLIPS W A, et al. Analysis of the candidate 8p21 tumour suppressor, BNIP3L, in breast and ovarian cancer [J]. **Br J Cancer**, 2003, 88(2):270-276.
- [17] UNOKI M, NAKAMURA Y. EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK[J]. **Oncogene**, 2003, 22(14):2172-2185.
- [18] REAL P J, BENITO A, CUEVAS J, et al. Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L [J]. **Cancer Res**, 2005, 65(18):8151-8157.
- [19] FEI P, WANG W, KIM S H, et al. Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth [J]. **Cancer Cell**, 2004, 6(6):597-609.
- [20] WILFINGER N, AUSTIN S, SCHEIBER-MOJDEHKAR B, et al. Novel p53-dependent anticancer strategy by targeting iron signaling and BNIP3L-induced mitophagy [J]. **Oncotarget**, 2016, 7(2):1242-1261.
- [21] O'SULLIVAN T E, JOHNSON L R, KANG H H, et al. BNIP3- and BNIP3L-mediated mitophagy promotes the generation of natural killer cell memory [J]. **Immunity**, 2015, 43(2):331-342.
- [22] GAO F, CHEN D, SI J, et al. The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1/PARK2 pathway [J]. **Hum Mol Genet**, 2015, 24(9):2528-2538.
- [23] MATSUDA N, SATO S, SHIBA K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy [J]. **J Cell Biol**, 2010, 189(2):211-221.
- [24] SANDOVAL H, THIAGARAJAN P, DASGUPTA S K, et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells [J]. **Nature**, 2008, 454(7201):232-235.
- [25] DING W X, NI H M, LI M, et al. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming [J]. **J Biol Chem**, 2010, 285(36):27879-27890.
- [26] KUBLI D A, YCAZA J E, GUSTAFSSON A B. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak [J]. **Biochem J**, 2007, 405(3):407-415.
- [27] KIRKIN V, MCEWAN D G, NOVAK I, et al. A role for ubiquitin in selective autophagy [J]. **Mol Cell**, 2009, 34(3):259-269.
- [28] NOVAK I, KIRKIN V, MCEWAN D G, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance [J]. **EMBO Rep**, 2010, 11(1):45-51.
- [29] ZHANG J, LOYD M R, RANDALL M S, et al. A short linear motif in BNIP3L (NIX) mediates mitochondrial clearance in reticulocytes [J]. **Autophagy**, 2012, 8(9):1325-1332.
- [30] ZHU Y, MASSEN S, TERENCEZIO M, et al. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis [J]. **J Biol Chem**, 2013, 288(2):1099-1113.
- [31] LIU L, FENG D, CHEN G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells [J]. **Nat Cell Biol**, 2012, 14(2):177-185.
- [32] AOKI Y, KANKI T, HIROTA Y, et al. Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy [J]. **Mol Biol Cell**, 2011, 22(17):3206-3217.
- [33] NARENDRA D P, JIN S M, TANAKA A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin [J/OL]. **PLoS Biol**, 2010, 8(1):e1000298.
- [34] CAO Y, KLIONSKY D J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein [J]. **Cell Res**, 2007, 17(10):839-849.
- [35] YORIMITSU T, KLIONSKY D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating [J]. **Cell Death Differ**, 2005, 12 Suppl 2:1542-1552.
- [36] PATTINGRE S, TASSA A, QU X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy [J]. **Cell**, 2005, 122(6):927-939.
- [37] MAIURI M C, LE T G, CRIOLLO A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X (L) and a BH3-like domain in Beclin-1 [J]. **EMBO J**, 2007, 26(10):2527-2539.