

DOI: 10.13376/j.cbls/2023117

文章编号: 1004-0374(2023)08-1071-09

泛素特异性蛋白酶30在线粒体动力学和自噬中的作用研究进展

郑仕桥¹, 夏志^{2,3}, 尚画雨^{1*}

(1 成都体育学院运动医学与健康学院, 成都 610041; 2 温州大学体育与健康学院, 温州 325035; 3 井冈山大学体育学院, 吉安 343009)

摘要: 线粒体作为细胞的能量中心, 在细胞内呈现高度的动态变化, 其数量、质量及功能的稳定对维持细胞的正常活动至关重要。线粒体动力学与线粒体自噬之间可互相调控, 共同构成线粒体质量控制的重要环节。泛素特异性蛋白酶 30 (USP30) 作为去泛素化酶, 既可通过线粒体融合蛋白 1/2 (Mfn1/2)、线粒体动力蛋白相关蛋白 1 (Drp1) 等融合与分裂蛋白参与调控线粒体动力学过程, 还能通过 E3 泛素连接酶 Parkin、泛素 (Ub) 及电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC1) 等多种信号而调控 PTEN 诱导激酶 1 (PINK1)/Parkin 途径介导的线粒体自噬, 但其详细机制尚未完全阐明。本文对 USP30 在调控线粒体动力学和线粒体自噬中的作用与其机制进行了综述。

关键词: 泛素特异性蛋白酶 30; 线粒体动力学; 融合; 分裂; 线粒体自噬

中图分类号: Q244; R363 **文献标志码:** A

Research progress on the role of ubiquitin-specific protease 30 in the mitochondrial dynamics and mitophagy

ZHENG Shi-Qiao¹, XIA Zhi^{2,3}, SHANG Hua-Yu^{1*}

(1 School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China; 2 College of Physical Education and Health, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China; 3 Physical Education College of Jinggangshan University, Ji'an 343009, China)

Abstract: Mitochondrion, as an important energy center, presents highly dynamic changes in cells, and the stability of its quantity, quality and function is essential to maintain the normal activities of cells. Mitochondrial dynamics and mitophagy can be mutually regulated, which together constitute important parts of mitochondrial quality control. Ubiquitin-specific protease 30 (USP30), as a deubiquitinating enzyme, not only participates in the regulation of mitochondrial dynamics through deubiquitinating fusion and fission proteins such as mitofusin 1/2 (Mfn1/2) and dynamin-related protein 1 (Drp1), but also deubiquitinates E3 ubiquitin ligase Parkin, ubiquitin (Ub) and voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) to regulate PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin-mediated mitophagy. This article reviews the role and mechanism of USP30 in regulating mitochondrial dynamics and mitophagy.

Key words: ubiquitin-specific protease 30; mitochondrial dynamics; fusion; fission; mitophagy

线粒体是细胞进行氧化磷酸化合成三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的主要场所, 糖类、脂肪、蛋白质等在细胞内通过一系列反应裂解成丙酮酸、脂肪酸后进入线粒体进一步裂解为乙酰辅酶 A,

收稿日期: 2023-02-21; 修回日期: 2023-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31900842, 31960192); 四川省自然科学基金项目(2023NSFSC1524); 成都体育学院运动医学与健康研究所创新课题(CX21A01); 江西省杰出青年科学基金项目(20202ACBL216004); 浙江省自然科学基金项目(LY23C110001); 温州市基础科学研究项目(Y20220209)

*通信作者: E-mail: santanasan@163.com

后者经过三羧酸循环所产生的 NADH 和 H^+ 或 $FADH_2$ 通过氧化呼吸链逐级传递, 生成 H_2O 和 CO_2 等终末产物, 这一过程中释放的能量使二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 氧化磷酸化, 从而生成 ATP, 为机体提供能量。此外, 线粒体还参与氧化应激、 Ca^{2+} 稳态、抗病毒免疫应答、细胞自噬和凋亡等多种重要代谢过程^[1-2]。为了维持线粒体数量与正常的生理功能, 细胞在应激作用下启动相应的线粒体生物发生、损伤修复或自噬清除机制, 称为线粒体质量控制 (mitochondrial quality control, MQC)。正常情况下, 已损伤的线粒体可以与邻近的、完整的线粒体融合, 并恢复其功能^[3]。然而, 当线粒体损伤程度超过其修复能力时, 受损线粒体则首先被分裂为易被自噬体包裹的片段, 随后被选择性地自噬清除。此外, 为适应机体代谢需求, 自噬引起的线粒体选择性减少与线粒体生物发生相互作用, 从而共同维持线粒体质量和数量的稳定^[4]。

目前研究表明, 线粒体在参与融合、分裂与自噬等过程中受到泛素化酶^[5-7]与去泛素化酶 (deubiquitylating enzymes, DUBs)^[8-10]的严格调控。泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin-specific proteases, USPs) 是 DUBs 中数量最多的家族, 均具有由 Finger、Thumb 和 Palm 三个子域构成的高度保守的 USP 催化结构域^[11-12], 主要通过水解泛素羧基末端的酯键、肽键或异肽键, 特异性地将已泛素化修饰的蛋白质去泛素化^[13]。USP30 属于 USPs 家族, 其 USP 催化结构域的催化三联体 (由 Cys77、His452 和 Ser477 组成) 对 Lys6 等位点连接的泛素链具有高效的裂解活性^[14-15]。近年研究发现, USP30 通过直接或间接对线粒体蛋白和线粒体转位分布蛋白的去泛素化作用, 在调节细胞凋亡^[16]、线粒体动力学 (融合与分裂)^[17-18]及线粒体自噬^[19]方面具有重要作用, 从而可能影响多种组织器官 (如肝脏和脂肪) 的肿瘤发生、脂质代谢和炎症反应^[18, 20-21]。例如, USP30 可通过下调线粒体融合蛋白 1/2 (mitofusin 1/2, Mfn1/2) 的非降解泛素化水平而抑制线粒体融合^[17]; 并通过拮抗 E3 泛素连接酶 Parkin (Parkinson protein 2) 线粒体转位及其泛素化线粒体底物的作用进而阻滞线粒体自噬^[19]。基于此, 本文对近年来 USP30 蛋白的相关研究的初步进展进行梳理, 并归纳其对线粒体动力学和线粒体自噬的调控作用, 以期 USP30 相关疾病 (如癌症和神经退行性疾病等) 的新药研发提供参考资料。

1 USP30概述

USP30 于 2004 年通过筛选人类基因 12q24.11 而首次被发现^[22], 是 USP 家族成员之一, 在人类骨骼肌、肝脏和肾脏^[23]以及大鼠脑、睾丸和卵巢^[24]等组织广泛高表达^[23-24]。USP30 由 517 个氨基酸残基组成, 包含 N 端的线粒体膜间结构域 (aa1~35)、跨膜结构域 (aa36~56) 和 C 端特有的 USP 催化结构域 (aa57~517)^[23]。其中, 跨膜结构域使其定位于线粒体外膜, 且其 USP 催化结构域中存在不同于其他 USPs 蛋白的双泛素结合位点: 其中 S1 部位 (包含 Finger、Thumb 和 Palm 子域) 负责连接远端泛素 (ubiquitin, Ub), 其识别远端 Ub 的机制与其他 USPs 蛋白相同, 而 S1' 部位 (包含 Thumb 和 Palm 子域) 负责连接近端 Ub, 尽管与 Ub 互作能力弱于 S1 部位, 但其对 Lys6 位点连接的泛素链具有偏好性^[23, 25]。总体而言, USP30 具有三个特定的分子特征: 一是 Palm 子域的疏水区包含可与泛素 Phe4 补丁相结合的保守残基 His445、His452 和 Trp475; 二是泛素 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 链与位于 Thumb、Palm 子域的 USP30 环相连接, 形成 5 个氢键; 三是 USP 催化结构域的催化三联体中存在异肽键, 其易致使 Lys6 位点连接的泛素链发生断裂 (图 1)^[23, 25]。

研究表明, USP30 还涉及多方面调节机制, 如激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体而增加糖尿病足溃疡大鼠创面面积^[21]; 正性调节线粒体动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 相关线粒体分裂, 促进肝细胞性肝癌细胞增殖^[18]; 拮抗 Parkin 介导的线粒体自噬并增强蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT)/雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 活性, 从而抑制白血病细胞的凋亡^[16]。因此, USP30 的靶向抑制可能具有

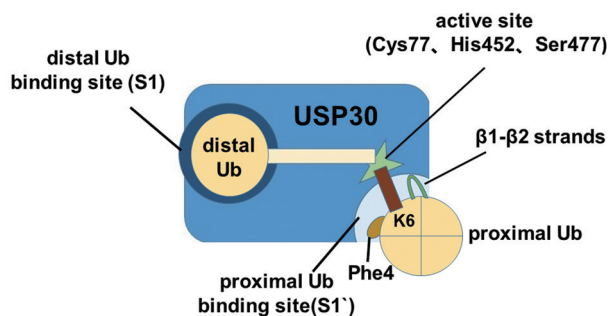


图1 USP30蛋白结构示意图

促自噬、抗炎症及线粒体分裂等功能, 从而在促进糖尿病皮肤溃疡创面愈合、抑制癌细胞存活和增殖等方面发挥重要作用。

2 USP30参与调节线粒体动力学

线粒体通过不断地分裂和融合, 调节自身形态、数量和分布, 维持细胞内稳态, 该过程被称为线粒体动力学^[26]。哺乳动物细胞内线粒体分裂过程主要由 Drp1 介导, 此外一些线粒体蛋白, 如线粒体分裂蛋白 1 (fission mitochondrial 1, Fis1)、线粒体分裂因子 (mitochondria fission factor, Mff)、线粒体动态蛋白 49 (mitochondrial dynamic protein of 49 kDa, MiD49) 和线粒体动态蛋白 51 (mitochondrial dynamic protein of 51 kDa, MiD51) 可作为 Drp1 受体参与招募胞质内的 Drp1, 使其转位至线粒体外膜以介导线粒体分裂为两个子线粒体^[26-27]。另外, 线粒体融合蛋白 Mfn1 和 Mfn2 是嵌于线粒体外膜上的跨膜 GTP 酶, 高度同源且结构相似, 能形成同型或异型二聚体而参与介导线粒体外膜融合^[27]。目前研究表明, USP30 可通过下调 Mfn1 和 Mfn2 蛋白的非降解途径泛素化水平以降低其蛋白活性, 从而抑制线粒体外膜融合^[24, 28-29]。Nakamura 等^[24]报道指出, 利用 siRNA 干扰 USP30 表达会引起 HeLa 细胞内线粒体呈现出延长且相互关联的融合形态, 在此基础上同时敲低 Mfn1 和 Mfn2 后可见线粒体融合明显被抑制, 表明敲低 USP30 可促进 Mfn1 和 Mfn2 介导的线粒体融合。二萜衍生物 15-oxospiramylactone (S3) 是目前所知的天然小分子去泛素化酶抑制剂^[17], 可通过与 USP30 催化结构域中的半胱氨酸残基互作而抑制 USP30 的去泛素化活性, 致使 Mfn1 和 Mfn2 非降解途径泛素化的增强, 从而上调 Mfn1/2 的活性以促进线粒体融合^[28-29]。

然而, USP30 亦能阻止 Mfn2 被泛素化降解并促进线粒体融合。近期 Chen 等^[30]观察到神经母细胞瘤 SK-N-BE (2) 细胞发生氧-葡萄糖剥夺/再灌注损伤后, Mfn2 被泛素化降解且线粒体呈碎片化, 而在此基础上 USP30 过表达可有效阻止 Mfn2 被降解并促进线粒体融合; 此外, 仅转入 Mfn2 亦可明显下调线粒体碎片化程度, 故推测 USP30 可通过阻止 Mfn2 被泛素化降解以抑制线粒体分裂, 从而减轻氧-葡萄糖剥夺/再灌注诱导的线粒体损伤; 鉴于血管重建在治疗急性缺血性脑卒中的同时会引起脑缺血再灌注损伤, 诱导神经元细胞凋亡并加剧线粒体功能障碍及分裂^[31-32], 因此, 通过过表达

USP30 以逆转线粒体损伤和分裂可能有助于减轻由血管重建所致脑缺血再灌注损伤, 从而提高急性缺血性脑卒中的疗效。

此外, USP30 还可促进 Drp1 相关的线粒体分裂。Gu 等^[18]在肝细胞性肝癌 Hep3B 与 HepG2 细胞内通过 siRNA 干扰 USP30 表达后观察到线粒体碎片化程度和 Drp1 蛋白表达均明显下调, 线粒体趋向融合且脂质合成与癌细胞增殖受阻, 提示 USP30 可通过正性调节 Drp1 介导的线粒体分裂而促进癌细胞增殖, 故靶向抑制 USP30 可能是阻止肝细胞性肝癌发生发展的有效方法。因此, USP30 在线粒体融合与分裂中的作用可能具有细胞类型特异性, 但其具体作用 (促进或抑制) 迄今仍不明确。

3 USP30参与调节线粒体自噬

胞质中的 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) 和 Parkin 是两个帕金森症相关蛋白, 近年来被发现参与介导哺乳动物细胞线粒体自噬^[5, 33]。其中, PINK1 位于 Parkin 上游, 二者协调介导受损线粒体表面结构或功能蛋白的多聚泛素化过程^[33]。PINK1 在正常线粒体中含量很低; 当线粒体损伤时, PINK1 大量累积在线粒体外膜 (outer mitochondrial membrane, OMM), 并通过上调自磷酸化水平和 (或) 磷酸化 Parkin 与 Ub, 促使 Parkin 从胞质转位至 OMM^[34-35]。随后在 E1 泛素激活酶和 E2 泛素结合酶协助下, Parkin 通过其 E3 连接酶活性连接活化的 Ub 和底物, 如电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) 和 Mfn1/2, 形成底物多聚泛素链^[36-38]。Pan 等^[39]报道, 衰老大鼠心肌细胞内衰老相关蛋白 p53、p21、p16 蛋白表达明显上调, 而线粒体微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 蛋白表达显著下调, 表明衰老大鼠心肌线粒体自噬被抑制; 而过表达 Parkin 或敲低 USP30 后, 衰老大鼠心肌 p53、p21、p16 蛋白表达明显下降且线粒体 LC3 蛋白表达显著升高; 相反, 心肌过表达 USP30 则可有效逆转上述反应, 提示 USP30 可能通过抑制 Parkin 依赖性线粒体自噬而促进心肌细胞衰老。目前研究表明, USP30 参与调控 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬过程: (1) 防止正常线粒体被 Ub 错误识别^[40-42]; (2) 抑制 Parkin 转位至受损线粒体^[43]; (3) 裂解 Parkin 在损伤线粒体上构建的泛素链^[14, 44]并抑制 Parkin 对其底物蛋白的泛素化^[19, 45]。

3.1 USP30防止正常线粒体被自噬清除

如前所述, PINK1 和 Parkin 在介导线粒体自噬过程中会依次使用 Ub 作为自噬信号标记受损的线粒体^[35]。Marcassa 等^[40]报道指出, 在人骨肉瘤 U2OS-MGFIS 细胞 (不表达 Parkin) 内通过 siRNA 干扰 USP30 表达可明显激活线粒体自噬, 提示泛素化是线粒体自噬的一个关键信号; 需要注意的是, 在敲低 USP30 的基础上敲除 PINK1 反而抑制自噬激活^[40], 且 McWilliams 等^[46]单独敲除多巴胺能神经细胞中 PINK1 后线粒体自噬水平并无明显变化。因此, Marcassa 等^[40]认为 USP30 对线粒体自噬的抑制作用依赖于 PINK1, 且 USP30 位于 PINK1 上游而抑制 PINK1 底物 (线粒体外膜蛋白) 的泛素化。随后, Rusilowicz-Jones 等^[41]推测, USP30 可有效降低线粒体外膜蛋白的泛素化水平, 从而阻止 PINK1 和 Parkin 通过 Ub 标记及介导自噬以降解正常线粒体。该课题组^[41]在视网膜色素上皮细胞中敲除 USP30 或使用 USP30 特异性抑制剂 FT3967385 后, 均观察到 Ub 在线粒体外膜定位的量和线粒体自噬水平明显上调, 提示 USP30 可能通过清除 Ub 的标记以阻止后者在正常线粒体外膜上积累及其介导自噬。由此可见, USP30 参与维持基础状态下线粒体处于低泛素水平, 避免其被 PINK1-Parkin 途径介导的泛素化降解^[42](图 2)。然而, USP30 防止正常线粒体被自噬清除的具体作用机制尚有待进一步研究阐明。

另有报道指出, USP30 与 E3 泛素连接酶膜相关锌指蛋白 5 (membrane-associated RING-CH 5, MARCH5/MITOL) 共同调节线粒体上 Ub 的丰度^[47]。

在线粒体自噬过程中, PINK1 通过磷酸化 Ub Ser65 以促进 Parkin 向线粒体转位^[48]。Phu 等^[47]在 HeLa 细胞中敲除 USP30 或 MARCH5 可分别上调和下调 Ub Ser65 磷酸化表达, 提示 USP30 和 MARCH5 可能相互拮抗以正性/负性调节线粒体泛素化水平, 但尚不清楚是否存在其他因子参与其中。USP30 在抗 PINK1 底物泛素化、调节 Parkin 和 Ub 在线粒体定位及其介导自噬中的不同作用究竟如何整合至协调反应过程中, 亦有待厘清。

3.2 USP30通过抑制Parkin在受损线粒体上募集而阻滞自噬

在线粒体损伤过程中, Parkin 从胞质转位至线粒体外膜进而介导线粒体自噬, 而 USP30 可抑制上述过程以阻止自噬发生。Wang 等^[43]利用羰基氰化物氯苯腙 (carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone, CCCP) 处理转染 Parkin 的 HeLa 细胞 (Parkin 低表达) 后, 线粒体清除率和 Parkin 蛋白表达明显上调, 而 USP30 过表达则可有效逆转上述结果, 提示 USP30 为线粒体自噬的负性调节因子, 其可通过抑制 Parkin 向线粒体募集进而阻滞后者介导的线粒体自噬 (图 2)。此外, Wang 等^[43]还发现, Mfn2 的泛素化可增强 Parkin 转位至受损线粒体的信号, 他们推测 USP30 可能是通过抑制 Mfn2 泛素化进而阻止 Parkin 转位。因此, 关于 USP30 抑制 Parkin 从胞质向线粒体募集的具体机制, 仍有待进一步研究确认。

3.3 USP30通过抑制Parkin泛素化底物作用而阻滞自噬

现已证实, USP30 亦可通过 Lys6 等位点裂解

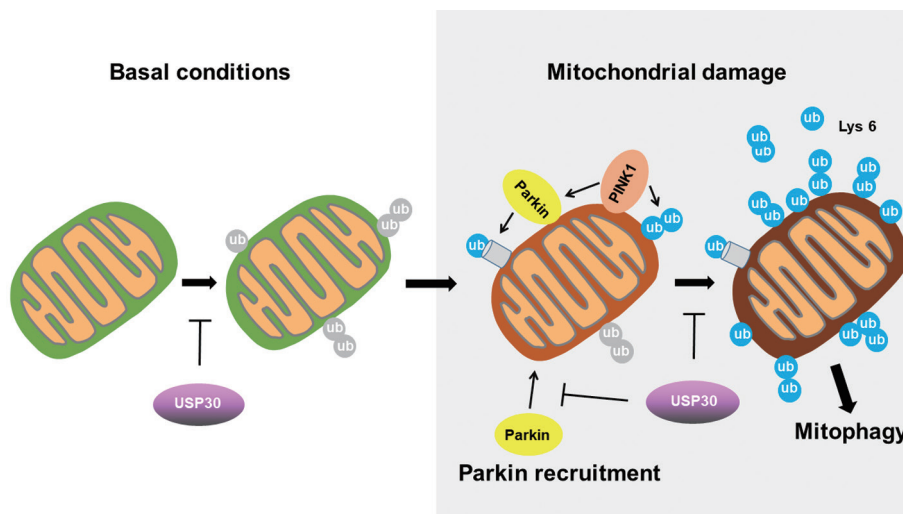


图2 USP30通过逆转线粒体泛素化而抑制自噬示意图

Parkin 在损伤线粒体上构建的泛素链^[14, 44]以及抑制 Parkin 对其底物的泛素化^[19, 45], 进而负性调节线粒体自噬(图 2)。

3.3.1 USP30通过Lys6等位点裂解Parkin构建的泛素链

研究表明, Parkin 通过 Lys6、Lys11 和 Lys63 位点在损伤线粒体上构建泛素链以介导线粒体自噬^[49], 而 USP30 可裂解 Lys6 和 Lys11 位点连接的泛素链以抑制自噬^[14, 44]。Cunningham 等^[14]和 Ordureau 等^[44]分别对敲除 USP30 的 HEK293 细胞与多巴胺能神经细胞给予 CCCP 处理, 均观察到 Lys6 位点连接的泛素链数量相较于野生型细胞明显增加, 这共同证实 USP30 对裂解 Lys6 位点连接的泛素链具有重要作用。另外, Cunningham 等^[14]将 USP30 与多个位点连接的二聚体和四聚体共同孵育, 结果显示, USP30 在 Lys6、Lys11 和 Lys48 位点上具有明显的去泛素化活性且在 Lys6 位点上最为显著, 而在 Lys27、Lys29、Lys33 和 Lys63 位点上的去泛素化活性较低, 提示 USP30 在 Lys6、Lys11 和 Lys48 位点连接的泛素链上呈现出特异且高效的裂解活性。

虽然 USP30 可通过 Lys6 等位点裂解泛素链, 但 PINK1 和 Parkin 均可削弱其裂解能力^[19, 50-51]。在线粒体损伤过程中, 一方面 PINK1 可通过磷酸化作用介导线粒体外膜定位的 p-Ub 蛋白表达增加, 但相较于 Ub 底物, USP30 对 p-Ub 底物的裂解效率明显更低^[51]; 另一方面, Parkin 在转位至受损线粒体后可泛素化 USP30 并诱导其降解, 从而抑制 USP30 对泛素链的裂解作用^[19]。综上所述, USP30 通过裂解 Parkin 介导下 Lys6 等位点连接的泛素链以抑制线粒体的自噬, 但 USP30 对泛素链的裂解作用又会随着 PINK1 和 Parkin 在损伤线粒体上高表达而明显受阻。

3.3.2 USP30抑制Parkin对其底物蛋白的泛素化

在通过 CCCP 下调线粒体膜电位而诱导线粒体损伤过程中, 除裂解 Parkin 构建的泛素链以外, USP30 还可抑制 Parkin 对受损线粒体的泛素化, 进而阻止自噬激活^[19, 45]。Bingol 等^[19]利用 CCCP 处理 HEK293 细胞以诱导线粒体损伤, 观察到 Parkin 介导其底物蛋白线粒体相关 Rho GTP 酶 1 (mitochondrial Rho GTPase1, Miro1) 和线粒体外膜转位蛋白 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOM20) 的泛素化水平明显升高, 然而过表达 USP30 后上述泛素化水平显著下降, 表明 USP30 可抑制 Parkin 对底物 Miro1 和 TOM20 的泛素化。研究人

员在经 CCCP 处理后的 HeLa、多巴胺能神经细胞^[19]和视网膜色素上皮细胞^[45]中均观察到, 敲低或过表达 USP30 可分别促进和抑制 Parkin 介导底物(如 TOM20)泛素化及随后的自噬降解。值得注意的是, 目前共鉴定出 41 个受 USP30 负性调控的 Parkin 泛素化底物^[19], 如 Miro1、TOM20、VDAC1、VDAC2、VDAC3、FK506 结合蛋白 8、线粒体 E3 泛素连接酶 1 等。以上研究结果提示, 去泛素化酶 USP30 通过抑制 Parkin 对诸多底物蛋白的泛素化进而负调节 Parkin 依赖性线粒体自噬。然而, Bingol 等^[19]在经 CCCP 处理后的 HEK293 细胞内发现, Parkin 亦可泛素化降解 USP30, 该泛素化作用在施加蛋白酶抑制剂 MG132 后被抑制, 表明 Parkin 能通过泛素蛋白酶体途径降解 USP30。随后, Gersch 等^[25]利用体外重组实验发现线粒体外膜定位的 Parkin 单泛素化作用于 USP30 的 Lys235、Lys289 和 Lys310 位点, 但被单泛素化的 USP30 活性相较于野生型 USP30 并无明显差异。因此, Parkin 虽可介导 USP30 单泛素化, 但其作用效果仍不明确。在介导线粒体自噬和参与泛素链裂解过程中, 自噬受体 PINK1、Parkin 和去泛素化蛋白 USP30 之间可能存在的相互作用或竞争性表达机制均具有深入研究的价值。

目前研究认为, Parkin 基因突变会导致泛素蛋白酶体途径受阻而无法清除受损线粒体, 造成帕金森症相关的多巴胺能神经元损伤^[52], 然而干扰 USP30 表达可能逆转上述结果^[19, 53]。Bingol 等^[19]培养 Parkin 基因突变的 SH-SY5Y 细胞并施加 CCCP 处理后, 观察到 TOM20 泛素化及自噬水平明显下调, 大量受损线粒体在核周聚集; 而使用 siRNA 干扰 USP30 表达后, TOM20 泛素化及自噬水平显著上调, 表明抑制 USP30 可有效逆转 Parkin 突变所致线粒体泛素化及自噬受阻。此外, Cornelissen 等^[53]观察到敲低 PINK1 或 Parkin 后果蝇飞行肌损伤并丧失飞行能力, 且多巴胺能神经元线粒体自噬被抑制, 而进一步敲低 USP30 则可有效逆转上述反应, 提示 Parkin 缺失所致线粒体自噬功能障碍可通过干扰 USP30 表达而得以改善(图 3), 同时亦再次表明 USP30 可能是 Parkin 缺陷相关疾病(如帕金森症)治疗的线粒体潜在靶点。

4 USP30抑制剂在线粒体动力学和自噬中的应用

基于上述抑制 USP30 表达对延缓衰老^[39]以及治疗衰老相关疾病, 如肝细胞性肝癌^[18]和帕金森

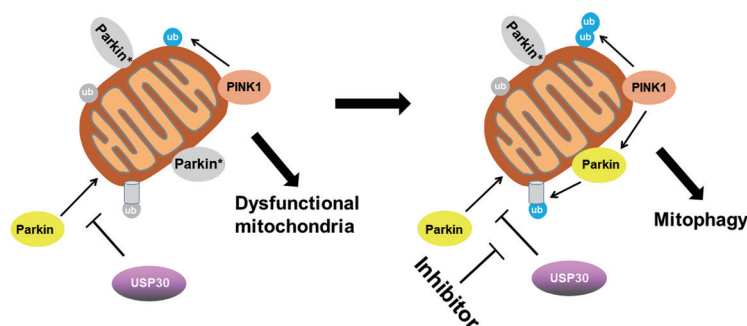


图3 靶向抑制USP30可逆转Parkin缺失(Parkin*)所致线粒体自噬功能障碍示意图

症^[19, 53]等的潜在作用, USP30的靶向抑制剂具有深入研究的价值。如前所述, 去泛素化酶抑制剂S3主要靶向线粒体外膜定位的USP30, 可通过与USP30催化结构域中的半胱氨酸残基互作而抑制USP30的去泛素化活性, 致使Mfn1/2非降解途径泛素化的增强, 从而增强Mfn1/2的活性并促进两线粒体的外膜融合, 这与在分别敲除Mfn1或Mfn2的小鼠胚胎成纤维细胞内进一步敲低USP30观察到两线粒体的外膜趋向融合的实验结果相似^[28]。Zhuang等^[54]还发现, S3(2 μmol/L)可在不影响正常视网膜神经节细胞活性的情况下明显减轻N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)所致大鼠视网膜神经节细胞凋亡和功能受损(模拟急性青光眼性损伤), 且S3对NMDA兴奋毒性的细胞保护作用可能是通过上调Mfn2非降解途径泛素化以促进两线粒体的外膜融合和Parkin线粒体转位及其介导自噬而实现。此外, S3(45 μg/kg、90 μg/kg)亦可通过下调Wnt/β-catenin信号通路表达而抑制结肠癌^[55]和肾癌^[56]小鼠移植瘤生长, 以上结果提示S3可能是青光眼和癌症治疗的潜在药物, 但有待进一步研究确认。

其次, Luo等^[57]通过在体和离体实验测试了一种隶属于外消旋苯丙氨酸衍生物(racemic phenylalanine derivative)的化合物ST-539。他们观察到ST-539可作为USP30相对特定的抑制剂, 在转染Parkin的HeLa细胞内敲除USP30或给予ST-539(3 μg/mL、10 μg/mL)处理均可引起TOM20泛素化和线粒体自噬水平明显升高; 另对正常小鼠连续5 d腹腔注射ST-539(25 mg/kg/d)亦能显著激活心肌线粒体自噬, 同时肝脏和脑组织中线粒体自噬水平以及心输出量、射血分数和左心室后壁厚度均无明显变化。上述结果提示ST-539可通过抑制USP30表达而增强Parkin介导的线粒体自噬, 且其

促自噬作用可能具有组织细胞类型特异性, 同时亦表明采取25 mg/kg/d的ST-539给药剂量并不会诱导小鼠心脏毒性。未来可进一步开展线粒体自噬功能受损相关心肌病(如心肌梗死和增龄性心力衰竭)的在体和离体研究, 以明确ST-539及其衍生物在心肌病发生发展过程中的作用机理以及心肌组织中USP30与自噬受体蛋白之间的关系。

此外, 研究人员通过高通量筛选还发现外消旋苯丙氨酸衍生物1(racemic phenylalanine derivative 1, Compound 1)亦可作为USP30相对特定的抑制剂, 其对USP1、USP8和USP9均不具有抑制作用。随即围绕Compound 1类似物展开构效关系分析, 最终鉴定出小分子化合物MF-094(Compound 31)和MF-095(Compound 29)^[23, 58-61]。其中, MF-094(0.3 μmol/L、1 μmol/L、3 μmol/L)是高效的USP30选择性抑制剂, 其可明显下调C2C12成肌细胞内线粒体DNA含量, 故推测MF-094可能通过激活自噬以清除受损线粒体, 而MF-095并未引起显著变化^[61]。最近Zhang等^[62]研究发现, 通过敲低USP30或施加MF-094(0.2 μmol/L、2 μmol/L)处理均可诱导口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)细胞内c-Myc泛素化和降解以抑制细胞增殖; 随后对OSCC小鼠连续28 d尾静脉注射MF-094(1 mg/kg/d)亦可明显下调肿瘤体积、重量和生长速度并上调细胞凋亡率, 另采用含MF-094的纳米粒递药则可进一步增强上述抗肿瘤反应, 且对小鼠肝脏、心脏、肺、肾脏和脾脏等器官均无毒副作用。上述结果表明MF-094诱导OSCC癌细胞凋亡可能是通过抑制USP30表达以促进c-Myc泛素化降解而实现, 同时亦表明含MF-094的纳米递药系统可能是一种安全、有效的肿瘤靶向治疗策略。另有报道指出, USP30可与NLRP3互作并去泛素化修饰NLRP3以激活NLRP3炎症小体, 进而增加糖尿病足溃疡

大鼠创面面积, 随后连续 10 d 给予 MF-094 处理 (50 mg/kg/d) 可通过下调糖尿病大鼠创面皮损组织中 USP30 蛋白表达而有效逆转上述反应, 由此可见 MF-094 通过抑制 USP30 以减轻炎症反应, 对于治疗糖尿病及其相关并发症可能具有重要意义^[21]。

第三类 USP30 抑制剂是一些 N- 氰基吡咯烷类化合物 (N-cyano pyrrolidines), 并在专利^[23, 61] (专利号 WO2016156816A1、WO2017009650A1、WO20170-93718A1、WO2017103614A1、WO2017109488A8、WO2017141036A1、WO2017163078A8、WO20180-60689A1、WO2018060691A1、WO2018060742A1、WO2018065768A1、WO2018220355A1 和 WO2018-234775A1) 和文献中^[41, 47, 63] 进行了报道。例如, Rusilowicz-Jones 等近期指出, N- 氰基吡咯烷衍生物 FT3967385 (FT385, 200 nmol/L)^[41] 与苯磺酰胺类化合物 Compound 39 (1 $\mu\text{mol/L}$)^[64] 均可通过抑制 SH-SY5Y 细胞内 USP30 表达而增加 TOM20 泛素化和 Ub Ser65 在线粒体外膜定位的量并最终诱导线粒体自噬, 同时 Compound 39 亦能有效改善 *Parkin* 基因突变的多巴胺能神经元内线粒体自噬功能障碍, 但 FT3967385 抑制效果存在脱靶现象, 而 Compound 39 对 USP30 具有高效选择性且无脱靶效应及神经元毒副作用。又如, Phu 等^[47] 报道了另一种亦呈现脱靶效应的抑制剂 USP30i (专利号 WO2017103614), 他们观察到, 在利用线粒体解偶联剂 BAM15 处理转染 *Parkin* 的 HEK293 细胞内, 敲除 USP30 或施加 USP30i 处理 (5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$) 均可明显上调 TOM20 泛素化水平, 但 USP30i 对线粒体自噬的调控作用仍不明确。再如, Tsefou 等^[63] 通过离体细胞实验测试了名为 USP30Inh-1、USP30Inh-2 和 USP30Inh-3 的小分子抑制剂 (专利号 WO2016156816、WO2017103614), 结果显示, USP30Inh-1、USP30Inh-2 和 USP30Inh-3 (1 $\mu\text{mol/L}$) 均能有效抑制 SHSY5Y 神经元细胞内 USP30 表达及其介导的 Ub 裂解, 且 USP30Inh-1 选择性抑制作用最为显著。他们还发现, 通过敲低 USP30 或给予 USP30Inh-1 处理 (0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$) 均可明显上调 SHSY5Y 细胞内线粒体自噬, 且 USP30Inh-1 (3 $\mu\text{mol/L}$) 亦能引起羰基-氰-对-三氟甲氧基本胺 (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP) 处理后的多巴胺能神经元细胞、星形胶质细胞和 *Parkin* 突变的成纤维细胞 (Ub Ser65 低表达) 内 Ub Ser65 磷酸化表达显著升高, 表明 USP30Inh-1 可有效抑制 USP30 表达, 一方面

上调 PINK1 介导的 Ub 磷酸化, 另一方面逆转 *Parkin* 突变所致线粒体泛素化及自噬受阻。然而, 需要注意的是, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下, USP30Inh-1 抑制效果存在脱靶现象并呈现出细胞毒性, 由此说明对于 USP30 靶向抑制剂的研究与运用仍有待继续深入^[63]。在未来的研究中, 还应对上述 USP30 抑制剂 (如 S3、ST-593、MF-094、FT3967385、Compound 39、USP30i、USP30Inh-1 等) 进行相同疾病模型的干预效果比较及相关副作用的评价, 以明确它们作为靶向 USP30 的潜在药物的功能和用途, 并最终开发出理想的选择性 USP30 抑制剂。

5 小结与展望

作为一种去泛素化酶, USP30 在调节细胞凋亡、线粒体动力学和线粒体自噬等信号通路中均不可或缺。通过对线粒体蛋白 Mfn1/2、VDAC1、TOM20 和线粒体转位分布蛋白 Drp1、Parkin、Ub 等因子的去泛素化作用, 它不仅具有抗自噬活性, 且能促进线粒体分裂并抑制线粒体融合, 在负性调节癌细胞凋亡过程中亦有重要贡献。在介导线粒体自噬和参与线粒体质量控制过程中, 上述蛋白之间可能存在的互作或竞争性表达机制均有着深入研究的价值。目前, 有如下关键问题尚待阐明: (1) USP30 防止正常线粒体被自噬清除的具体作用机制尚不清楚, 需探明是否还有更多的泛素相关蛋白参与其中; (2) USP30 抑制 *Parkin* 从胞质向线粒体外膜转位的分子机制以及 *Parkin* 单泛素化 USP30 的作用效果亦不明确, 是否存在某些特定因子参与调控 USP30-*Parkin* 的相互作用; (3) 在体内、体外不同应激状态下或癌症模型中, USP30 是否与其他线粒体相关蛋白存在相互作用, 它在线粒体融合、分裂及自噬等过程中的调节作用究竟如何整合至协调反应之中; (4) USP30 通过调控线粒体动力学蛋白而在治疗血管缺血再灌注损伤、肝细胞性肝癌等疾病方面颇具潜力, 但目前仍处于离体细胞实验层面, 尚有待进一步深入研究。厘清上述问题, 将为 USP30 作为防治衰老相关疾病潜在靶点提供理论与实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Harrington JS, Ryter SW, Plataki M, et al. Mitochondrial in health, disease, and ageing. *Physiol Rev*, 2023, 103: 2349-422
- [2] Vafai SB, Mootha VK. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 2012, 491: 374-83
- [3] Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals.

- Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 79-99
- [4] Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch Biochem Biophys, 2007, 462: 245-53
- [5] Shang H, Xia Z, Bai S, et al. Downhill running acutely elicits mitophagy in rat soleus muscle. Med Sci Sports Exerc, 2019, 51: 1396-403
- [6] Basso V, Marchesan E, Peggion C, et al. Regulation of ER-mitochondria contacts by Parkin via Mfn2. Pharmacol Res, 2018, 138: 43-56
- [7] Favaro G, Romanello V, Varanita T, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. Nat Commun, 2019, 10: 2576
- [8] Cerqueira FM, von Stockum S, Giacomello M, et al. A new target for an old DUB: UCH-L1 regulates mitofusin-2 levels, altering mitochondrial morphology, function and calcium uptake. Redox Biol, 2020, 37: 101676
- [9] Shi L, Liu J, Peng Y, et al. Deubiquitinase OTUD6A promotes proliferation of cancer cells via regulating Drp1 stability and mitochondrial fission. Mol Oncol, 2020, 14: 3169-83
- [10] Chakraborty J, von Stockum S, Marchesan E, et al. USP14 inhibition corrects an *in vivo* model of impaired mitophagy. EMBO Mol Med, 2018, 10: e9014
- [11] 黄美玲, 李南林. 泛素特异性蛋白酶调控乳腺癌的研究进展. 生命的化学, 2022, 42: 1996-2003
- [12] 杨学飞. USP30去泛素化稳定p53的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2019
- [13] 马天天, 马白荣, 靳亚平, 等. 泛素特异性蛋白酶2的生理功能及调控机制. 生命科学, 2022, 34: 1018-26
- [14] Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, et al. USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. Nat Cell Biol, 2015, 17: 160-9
- [15] Sato Y, Okatsu K, Saeki Y, et al. Structural basis for specific cleavage of Lys6-linked polyubiquitin chains by USP30. Nat Struct Mol Biol, 2017, 24: 911-9
- [16] Zhang R, Ozgen S, Luo H, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 regulates AKT/mTOR signaling. Front Pharmacol, 2022, 13: 816551
- [17] Escobar-Henriques M. Mitofusins: ubiquitylation promotes fusion. Cell Res, 2014, 24: 387-8
- [18] Gu L, Zhu Y, Lin X, et al. Amplification of glyceronephosphate O-acyltransferase and recruitment of USP30 stabilize DRP1 to promote hepatocarcinogenesis. Cancer Res, 2018, 78: 5808-19
- [19] Bingol B, Tea JS, Phu L, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. Nature, 2014, 510: 370-5
- [20] Gu L, Zhu Y, Lin X, et al. The IKK β -USP30-ACLY axis controls lipogenesis and tumorigenesis. Hepatology, 2021, 73: 160-74
- [21] Li X, Wang T, Tao Y, et al. MF-094, a potent and selective USP30 inhibitor, accelerates diabetic wound healing by inhibiting the NLRP3 inflammasome. Exp Cell Res, 2022, 410: 112967
- [22] Quesada V, Díaz-Perales A, Gutiérrez-Fernández A, et al. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314: 54-62
- [23] Wang F, Gao Y, Zhou L, et al. USP30: structure, emerging physiological role, and target inhibition. Front Pharmacol, 2022, 13: 851654
- [24] Nakamura N, Hirose S. Regulation of mitochondrial morphology by USP30, a deubiquitinating enzyme present in the mitochondrial outer membrane. Mol Biol Cell, 2008, 19: 1903-11
- [25] Gersch M, Gladkova C, Schubert AF, et al. Mechanism and regulation of the Lys6-selective deubiquitinase USP30. Nat Struct Mol Biol, 2017, 24: 920-30
- [26] Whitley BN, Engelhart EA, Hoppins S. Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target. Mitochondrion, 2019, 49: 269-83
- [27] 黄凯欣, 熊艳, 郑乐葳, 等. 线粒体融合与分裂的分子机制及相关疾病的研究进展. 武汉大学学报(医学版), 2019, 40: 333-7
- [28] Yue W, Chen Z, Liu H, et al. A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. Cell Res, 2014, 24: 482-96
- [29] 朱凤, 郑高利, 田雪君. 自噬相关去泛素化酶及其小分子抑制剂的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2020, 47: 210-23
- [30] Chen C, Qin H, Tang J, et al. USP30 protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion induced mitochondrial fragmentation and ubiquitination and degradation of MFN2. Aging (Albany NY), 2021, 13: 6194-204
- [31] Russo E, Nguyen H, Lippert T, et al. Mitochondrial targeting as a novel therapy for stroke. Brain Circ, 2018, 4: 84-94
- [32] Liu F, Lu J, Manaenko A, et al. Mitochondria in ischemic stroke: new insight and implications. Aging Dis, 2018, 9: 924-37
- [33] 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 Cell Biol, 2010, 189: 211-21
- [34] Rasool S, Soya N, Truong L, et al. PINK1 autophosphorylation is required for ubiquitin recognition. EMBO Rep, 2018, 19: e44981
- [35] Koyano F, Okatsu K, Kosako H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature, 2014, 510: 162-6
- [36] Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nat Cell Biol, 2010, 12: 119-31
- [37] Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, et al. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. Hum Mol Genet, 2010, 19: 4861-70
- [38] 马穰桂, 夏志, 尚画雨. 线粒体自噬相关受体蛋白研究进展. 生理学报, 2021, 73: 1025-34
- [39] Pan W, Wang Y, Bai X, et al. Deubiquitinating enzyme USP30 negatively regulates mitophagy and accelerates myocardial cell senescence through antagonism of Parkin.

- Cell Death Discov, 2021, 7: 187
- [40] Marcassa E, Kallinos A, Jardine J, et al. Dual role of USP30 in controlling basal pexophagy and mitophagy. *EMBO Rep*, 2018, 19: e45595
- [41] Rusilowicz-Jones EV, Jardine J, Kallinos A, et al. USP30 sets a trigger threshold for PINK1-PARKIN amplification of mitochondrial ubiquitylation. *Life Sci Alliance*, 2020, 3: e202000768
- [42] Ganley IG. Organelle turnover: a USP30 safety catch restrains the trigger for mitophagy and pexophagy. *Curr Biol*, 2018, 28: R842-5
- [43] Wang Y, Serricchio M, Jauregui M, et al. Deubiquitinating enzymes regulate PARK2-mediated mitophagy. *Autophagy*, 2015, 11: 595-606
- [44] Ordureau A, Paulo JA, Zhang J, et al. Global landscape and dynamics of Parkin and USP30-dependent ubiquitylomes in iNeurons during mitophagic signaling. *Mol Cell*, 2020, 77: 1124-42
- [45] Liang JR, Martinez A, Lane JD, et al. USP30 deubiquitylates mitochondrial Parkin substrates and restricts apoptotic cell death. *EMBO Rep*, 2015, 16: 618-27
- [46] McWilliams TG, Prescott AR, Montava-Garriga L, et al. Basal mitophagy occurs independently of PINK1 in mouse tissues of high metabolic demand. *Cell Metab*, 2018, 27: 439-49
- [47] Phu L, Rose CM, Tea JS, et al. Dynamic regulation of mitochondrial import by the ubiquitin system. *Mol Cell*, 2020, 77: 1107-23
- [48] Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, et al. Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *EMBO J*, 2015, 34: 307-25
- [49] Deol KK, Eyles SJ, Strieter ER. Quantitative middle-down MS analysis of Parkin-mediated ubiquitin chain assembly. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, 31: 1132-9
- [50] Hou J, Eldeeb M, Wang X. Beyond deubiquitylation: USP30-mediated regulation of mitochondrial homeostasis. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1038: 133-48
- [51] Ordureau A, Heo JM, Duda DM, et al. Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 6637-42
- [52] Miller S, Muqit MMK. Therapeutic approaches to enhance PINK1/Parkin mediated mitophagy for the treatment of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2019, 705: 7-13
- [53] Cornelissen T, Vilain S, Vints K, et al. Deficiency of parkin and PINK1 impairs age-dependent mitophagy in *Drosophila*. *Elife*, 2018, 7: e35878
- [54] Zhuang D, Zhang R, Liu H, et al. A small natural molecule S3 protects retinal ganglion cells and promotes Parkin-mediated mitophagy against excitotoxicity. *Molecules*, 2022, 27: 4957
- [55] Wang W, Liu H, Wang S, et al. A diterpenoid derivative 15-oxospiramylactone inhibits Wnt/ β -catenin signaling and colon cancer cell tumorigenesis. *Cell Res*, 2011, 21: 730-40
- [56] 沈天一, 易晓明, 唐朝鹏, 等. 15-氧代绣线菊内酯对人肾细胞癌ACHN细胞裸鼠移植瘤生长的影响. *医学研究生学报*, 2016, 29: 808-11
- [57] Luo H, Krigman J, Zhang R, et al. Pharmacological inhibition of USP30 activates tissue-specific mitophagy. *Acta Physiol (Oxf)*, 2021, 232: e13666
- [58] Dufner A, Kisser A, Niendorf S, et al. The ubiquitin-specific protease USP8 is critical for the development and homeostasis of T cells. *Nat Immunol*, 2015, 16: 950-60
- [59] Kim JM, Parmar K, Huang M, et al. Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Dev Cell*, 2009, 16: 314-20
- [60] Paemka L, Mahajan VB, Ehaideb SN, et al. Seizures are regulated by ubiquitin-specific peptidase 9 X-linked (USP9X), a de-ubiquitinase. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005022
- [61] Kluge AF, Lagu BR, Maiti P, et al. Novel highly selective inhibitors of ubiquitin specific protease 30 (USP30) accelerate mitophagy. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28: 2655-9
- [62] Zhang X, Han Y, Liu S, et al. MF-094 nanodelivery inhibits oral squamous cell carcinoma by targeting USP30. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27: 107
- [63] Tsefou E, Walker AS, Clark EH, et al. Investigation of USP30 inhibition to enhance Parkin-mediated mitophagy: tools and approaches. *Biochem J*, 2021, 478: 4099-118
- [64] Rusilowicz-Jones EV, Barone FG, Lopes FM, et al. Benchmarking a highly selective USP30 inhibitor for enhancement of mitophagy and pexophagy. *Life Sci Alliance*, 2021, 5: e202101287