

• 特约综述 •

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.03.01

编者按 随着 2016 年诺贝尔生理学或医学奖被颁发给自噬基本机制的阐释者——大隅良典, 不仅将自噬研究再一次推向了高潮, 还激发了普通大众学习了解自噬的热情。自噬作为一条进化中保守的胞内降解途径, 参与很多重要的生理或病理过程, 如细胞稳态、器官建成、神经变性、肿瘤发生及迁移等。自噬分子机制与功能的相关研究已经成为生命科学家所关注的热点问题之一。本文旨在通过回顾自噬研究史, 带领读者了解自噬的发现及自噬机制研究的前世今生。

自噬的前世今生

王懿峥^{1), 2)}, 陈 扬²⁾, 俞 立²⁾ *

(¹⁾ 北京大学生命科学学院 PTN 项目, 北京 100871; (²⁾ 清华大学-北京大学生命科学联合中心, 清华大学生命科学学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 自噬是细胞通过溶酶体(或液泡)分解自身组分以达到维持细胞内正常生理活动及稳态的一种细胞代谢过程。自噬作为一种在真核生物中保守存在的细胞通路, 与人类的疾病与健康息息相关。2016 年, 诺贝尔生理学或医学奖颁发给为自噬通路研究做出过卓越贡献的日本生物学家大隅良典(Yoshinori Ohsumi)。本文其一旨在通过介绍自噬及自噬相关基因的发现细节, 带领读者了解自噬被发现和阐释的历程; 其二旨在通过介绍自噬起始的相关机制及自噬与疾病的联系, 引导读者对于自噬生理功能有更深入的理解; 最后本文还提出了一些自噬领域目前尚待进一步研究的方向, 供读者参考。

关键词 自噬; 大隅良典; ATG 基因

中图分类号 Q26

The Discovery and Research of Autophagy

WANG Yi-Zheng^{1), 2)}, CHEN Yang²⁾, YU Li²⁾ *

(¹⁾ School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; (²⁾ Tsinghua-Peking Joint Center for Life Sciences, State Key Laboratory of Membrane Biology School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Autophagy is an evolutionally conserved cell process, which degrades cellular contents to generate biomolecules depending on lysosome (or vacuole). The proper operation of autophagy has been shown to be tightly related to human health and diseases. 50 years ago, Christian de Duve discovered lysosome and proposed the idea of "autophagy". Nowadays, the Japanese molecular and cell biologist Yoshinori Ohsumi was given the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2016 because of his great

收稿日期: 2017-04-07; 修回日期: 2017-11-14; 接受日期: 2018-01-15
中国科技部重点研发专项 (No. 2016YFA0500202 和 2017YFA0503404); 国家自然科学基金重点项目 (No. 31430053)、国家自然科学基金面上项目 (No. 316713950); 国家自然科学基金创新团体 (No. 31621063); 国际合作交流项目 (No. 31561143002) 和清华大学自主科研项目 (No. 20161080135) 资助
* 通讯作者 Tel: 62792880; E-mail: liyulab@mail.tsinghua.edu.cn
Received: April 7, 2017; Revised: November 14, 2017; Accepted: January 15, 2018
Supported by Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (No. 2016YFA0500202 and 2017YFA0503404); Major Program of National Natural Science Foundation of China (No. 31430053), National Natural Science Foundation of China (No. 316713950); National Natural Science Fund for Innovative Research Groups (No. 31621063); the State Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 31561143002); and Independent Research of Tsinghua University to Li Yu (No. 20161080135)
* Corresponding author Tel: 62792880; E-mail: liyulab@mail.tsinghua.edu.cn

breakthrough in discovery of autophagy essential genes. This review will summarize the brief history of autophagy researches and propose some unanswered questions which are worth studying in the future.

Key words autophagy; Yoshinori Ohsumi; ATG gene

1 细胞自噬是什么

细胞之所以成为生命的基本单位,除了可以自我增殖,在感应外部环境刺激后所表现出的应激性及适应性也是重要原因之一。在外界营养匮乏的条件下,细胞如何存活,是其必须习得的技能,而自噬就是其存活的方式之一。自噬 (autophagy) 是细胞通过溶酶体 (或液泡) 降解自身组分以达到维持胞内正常生理活动及稳态的一种细胞代谢过程。这种降解既可以是由于外界营养匮乏而进行的“自给自足”,也可以用以清除细胞内异常组分。

细胞自噬根据其细胞降解底物进入溶酶体 (或液泡) 方式的不同,分为微自噬 (microautophagy)、巨自噬 (macroautophagy) 以及分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)^[1,2]。通常文章所提及的细胞自噬都是有一双层膜细胞器——自噬体参与的巨自噬,本文亦然,故下文所提及的“自噬”,均为“巨自噬”。

细胞自噬还可根据其降解底物的特异性,分为选择性自噬 (selective autophagy) 和非选择性自噬 (non-selective autophagy)。常见的选择性自噬有细胞质至液泡的寻靶 (cytoplasm-to-vacuole targeting, Cvt) 通路、内质网自噬 (ER phagy)、过氧化物酶体自噬 (pexophagy) 等^[3]。而常用于诱导酵母自噬的氮源饥饿则为非选择性自噬。

2 自噬的提出

自噬的发现可以追溯到上世纪 50 年代溶酶体的发现。1955 年,比利时生物学家 Christian de Duve 及其同事将大鼠肝细胞裂解物多重离心后,获得沉降能力介于线粒体和微粒体之间的颗粒^[4],并发现其中含有酸性磷酸酶、组织蛋白酶、 β -葡萄糖醛酸苷酶、核糖核酸酶以及脱氧核糖核酸酶等水解酶。因此,根据其功能特点,将其命名为“溶酶体 (lysosome)”,意为“降解体 (digest body)”^[5]。而 C. de Duve 本人也由于发现过氧化物酶体和溶酶体而被授予 1974 年的诺贝尔生理学或医学奖。1956 年,Straus^[6]通过类似于 de Duve 的方法,评估了从大鼠肾细胞中分离的包含多种水解酶的颗粒。虽然通过简易的细胞器分离实验和酶活检测可以从侧面

印证溶酶体的存在,但无法排除其是由于类似于微粒体 (人工破碎细胞时由内质网碎片形成的非自然存在的囊泡^[7]) 的成因而产生的一类非细胞器囊泡,所以直接观察细胞中溶酶体的结构显得十分必要。在 1956 年,Novikoff 等^[8]利用电镜观察纯化后的溶酶体结构,并称之为“致密体 (dense body)”,而且在大鼠肝切片薄壁组织细胞中观察到类似的结构,进一步证明溶酶体是真实存在的细胞器。同年, Bennett 评论溶酶体很可能有降解细胞并通过胞吞或胞饮作用摄入物质的功能^[9]。1959 年, Essner^[10]利用电镜,在内吞作用活跃的巨噬细胞中发现大量的不透电子的致密囊泡结构,称之为“吞噬体 (phagosome)”,并认为吞噬体是溶酶体的一种。1960 年, Cohn 等^[11]在多形核白细胞中也发现类似结构,并通过一系列生化实验认定此囊泡结构与 C. de Duve 所发现的溶酶体相同。随后, Tappel 等^[12]、Muller 等^[13]相关领域的学者,在自原生动 (变形虫) 到哺乳动物的细胞内都发现疑似溶酶体的结构。

细胞可以通过内吞作用摄取胞外物质,并通过溶酶体降解,而胞内组分降解过程在当时仍鲜为人知^[14]。在溶酶体的存在与否还存在争议的同时,已经有文章报道在胞内发现包裹着其他细胞组分的囊泡,这为自噬的提出打下坚实的基础。1957 年, Clark^[15]在运用电镜观察新生小鼠肾细胞的分化时,意外地观察到在细胞质中存在一些大小、形状不一的包裹着无固定形状的、致密的片层结构,甚至是线粒体的致密体。1962 年, Ashford 和 Porter^[16, 17]在用胰高血糖素处理大鼠肝后,发现在肝细胞中产生大量包裹着细胞组分的溶酶体,且线粒体更容易被包裹。这说明,至少在大鼠肝细胞中溶酶体不仅降解细胞从外界摄取的物质,还可以降解自身的组分。

随着关于溶酶体的井喷式报道,1963 年,在伦敦召开了“溶酶体 CIBA 基金研讨会 (Lysosomes. Ciba Foundation Symposium)”。在这次会议上,基于大量的观察和形态学研究, C. de Duve 提出了“自噬 (autophagy)”的概念^[18]。

3 自噬的抑制与促进

自噬的概念被提出后,包裹着细胞组分的囊泡

自然而然就被叫做了自噬泡 (autophagic vacuoles), 但是自噬与溶酶体之间的关系尚不清楚^[19]。为了研究两者之间的关系, 可人为诱导自噬则显得尤为重要, 胰高血糖素成为第一个诱导自噬的药物。

1967年, C. de Duve 课题组^[20, 21]接连发力, 发表2篇关于胰高血糖素可诱导自噬的文章, 并得出溶酶体有可能参与自噬的结论。1968年, Arstila 和 Trump^[22]利用胰高血糖素诱导自噬, 发现自噬泡形成于粗面内质网表面, 并发现一种包被着细胞组分却无水解酶的双层膜结构, 即自噬体 (autophagosome) 和另一种含多种水解酶的单层膜结构, 即自噬溶酶体 (autolysosome)。并描绘出自噬相关囊泡的形成和相互作用模式, 使得人们更加相信自噬的存在及能更好地了解其细节。

若要对某一通路进行研究, 找到适宜的方式进行抑制或促进其发生尤为重要。既然胰高血糖素可以诱导自噬, 那么与其拮抗的胰岛素是否可以抑制自噬的发生呢? Pfeifer^[23]曾报道, 在给未处理的大鼠注射5 U/kg 胰岛素后, 肝细胞细胞质中的自噬泡体积分数迅速降低。1976年, Mortimore 和 Ward^[24]在研究大鼠肝蛋白质降解机制的过程中发现, 氨基酸水平参与调节该过程。当氨基酸浓度较高时, 蛋白质降解受到抑制; 反之, 则促进蛋白质降解。1980年, Seglen 等^[25]进一步重复 Mortimore 和 Ward 于1976年的工作, 并得出同时使用亮氨酸和天冬酰胺对自噬的抑制效果最佳的结论; 1981年, 根据亮氨酸可使大鼠肝细胞自噬泡的形成减少70%这一现象, 表明亮氨酸在抑制自噬中发挥最主要作用^[26]。1982年, Seglen 和 Gordon^[27]发现, 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 对细胞内自噬体的形成有明显的抑制作用。3-MA 从此成为一种至今仍被广泛使用的自噬抑制剂。

4 自噬相关基因的发现与命名

在各类真核生物的全基因组测序尚未完成时, 学者们已经开始运用遗传手段寻找参与调控自噬的基因。因此, 选择一个生长周期短、可大量培养、并容易观察的自噬缺陷表型的模式生物则显得格外关键。

4.1 APG

日本学者大隅良典选择的模式生物是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。酿酒酵母不仅生长周期短 (2 h 左右一代)、易培养、生物量大等优点, 其细胞质中还存在一个巨大的单层膜囊泡结构, 即液泡

(vacuole)。液泡中富含氨基酸和各种离子等营养物质, 而且还含有多多种水解酶, 因此一般将其等同于哺乳动物细胞的溶酶体。换句话说, 自噬泡将与液泡融合, 其内容物将在液泡中被分解。

1992年, Y. Ohsumi 实验室 Takeshige 等^[28]发现, 缺乏蛋白酶 A、B 及羧肽酶 Y 的菌株在碳源或氮源饥饿后, 利用电镜观察到酵母液泡中有很多囊泡状结构, 即自噬小体 (autophagic body, 此处译为自噬小体, 为与自噬体 autophagosome 区分开来), 且该现象仅凭普通的相差或 Nomarsky 显微镜就可直接观察, 这为后续的遗传筛选提供了一个很好的工具。随后他们发现, 用含有苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的无氮源培养基培养酵母, 可以模拟出蛋白水解酶缺陷型菌株在饥饿之后液泡中富集自噬小体的表型。

1993年, Tsukada 和 Ohsumi^[29]利用上述现象, 进行了一系列的自噬缺陷突变菌株的筛选。他们首先用甲基磺酸乙酯 (ethylmethylsulfone, EMS) 制备酿酒酵母诱变菌库, 再分别运用碳源和氮源饥饿来对菌库进行筛选, 将诱变产生的菌株进行碳源饥饿再通过显微镜观察, 或将诱变产生的菌株, 影印至含有焰红染料 B (phloxine B, 可将死细胞染色) 的氮源饥饿平板上, 挑选变为红色的菌株, 再由含 PMSF 的无氮源培养基饥饿处理, 显微镜观察。两者均以期筛得未在液泡中观察到自噬小体的诱变菌株。通过上述方法, 他们首先筛选获得2个突变菌株, 这2个突变位于同一等位基因, 将该基因位点命名为 APG1 (*AutoPhaGy* 1, 即现在的 *ATG1*)。利用这种方法, 共找到15个基因, 将它们依次命名命名为 APG1 至 APG15 (后来的研究表明, 其中 APG7 和 APG11 是等位基因, 所以实际是14个)。这些基因缺陷型的菌株在生长增殖方面并未表现出明显的缺陷, 但在氮源饥饿之后它们的生存能力受到巨大影响。1997年, Matsuura 等^[30]发现, APG1 编码一种新型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 且其激酶活性是自噬所必需的。

4.2 CVT

几乎与大隅良典同时, 在太平洋彼岸美国的 Klionsky 等^[31]发现, 酿酒酵母基因 APE1 所编码的氨基肽酶 I (aminopeptidase I, API) 前体 (pro-API) 需被送至液泡, 才能被加工成有活性的氨基肽酶 I, 且 *pep4Δ* 菌株无法完成该过程。

1995年, D. J. Klionsky 课题组的 Harding 等^[32]利用遗传诱变筛选的方法, 试图寻找参与该途径的基因。如果该途径无法正常进行的话, pro-API 就无

法转化为成熟的 API 蛋白 (mAPI)。D. J. Klionsky 课题组利用 pro-API 特异性抗血清蛋白质免疫印迹,以及 pro-API 与 mAPI 的大小不同,设计了如下实验:将由甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变的菌液涂布于 YPD 平板,控制每个平板有 150 ~ 300 个菌落,置于 23℃ 培养 5 d;首先检测每个平板上是否有较大的 pro-API 的条带,再检测每 15 个菌落中是否有较大的 pro-API 的条带,最后再确定有较大的 pro-API 条带的目标菌落。

运用这种方法,他们找到一系列使 pro-API 无法被转化为 mAPI 的基因,将其命名为 CVT1 至 CVT8 [其中的 CVT4 及 CVT8 分别被认为是当时已被发现的 VPS (Vacuolar Protein-Sorting) 家族的 VPS39 及 VPS41],而该通路则被命名为细胞质至液泡的寻靶^[33] (cytoplasm to vacuole protein targeting, Cvt) 通路。

先于细胞质中形成的囊泡定向与液泡融合,其内容物终将被液泡中的蛋白酶降解。Cvt 通路的这一特点,让 D. J. Klionsky 意识到,Cvt 通路很可能与自噬有关。但同时他们也意识到,自噬多发生于营养匮乏时,而 Cvt 通路多发于营养充足时,所以两者也存在着固有的不同。1996 年,Scorrt 等^[34]发现,APG 基因缺陷菌株均会影响 Cvt 途径,且将部分 CVT 基因与 APG 基因相对应,如 CVT10 即是 APG1。于是殊途同归,在 1997 年,D. J. Klionsky 与大隅良典实验室^[35]合作阐明了 Cvt 通路和经典自噬的区别与联系,pro-API 以自噬底物蛋白的形式被运往液泡,并被加工为 mAPI。Cvt 通路是将自噬与生物合成通路联系的枢纽。

4.3 ATG

上世纪 90 年代是自噬基因发现的黄金时期,各国科学家们运用各种不同方法,找到多个参与自噬的基因,并相应命名,比如,AUT 系列^[36]、GAS 系列^[37]等。但是后经证实,他们存在很大的交集,同一个基因拥有多个名字,例如,ATG1 在未定名之前,就有 APG1、AUT3、CVT10、GSA10、PAZ1、PDD7 等多个名字^[38],十分不利于学者之间的交流。

在 2003 年,为了自噬领域更好地进行研究交流和讨论,D. J. Klionsky、大隅良典及其他自噬领域的同仁^[38]联合发文,第一次统一了自噬相关基因在酿酒酵母中的命名方法,即 ATG 相关基因 (Autophagy related genes)。命名的统一不仅系统地总结了过去十几年对自噬相关基因的一系列研究工作,还为接下来的研究及同行之间沟通消除很多不必要的障碍。

5 自噬分子机制的相关研究

自噬的本质其实就是细胞内的膜重排。在膜重排的过程中,形成一个具有双层膜并裹挟着随机或特定底物的封闭囊泡,即自噬体 (autophagosome),进而与溶酶体融合,形成自噬溶酶体 (autolysosome) 并降解底物。而最先形成的是自噬体前结构 (pre-autophagosomal structure, PAS) 或欧米茄体 (omegasome),前者存在于酵母,后者则存在于哺乳动物细胞。PAS 和欧米茄体均起到招募 ATG 蛋白,进而促进自噬发生的功能。PAS 和欧米茄体的调节和 ATG 蛋白的整合,则是自噬能正常发生的必需条件。由于本文重点讨论大隅良典所发现的 ATG 基因的相关研究,遂仅对自噬体形成之前的自噬分子机制展开讨论。

5.1 TORC1 复合体及 AMPK 复合体

TORC1 及 AMPK 复合体通过感知细胞营养状态,抑制或促进自噬的发生^[33]。1991 年,Heitman 等^[39]在利用酿酒酵母分离抗雷帕霉素 (rapamycin) 突变体时,找到 2 个新基因。由于其被认为是雷帕霉素的靶标 (target of rapamycin),所以被命名为 TOR1 及 TOR2,而雷帕霉素后被发现可在全培养基中诱导自噬的发生。

雷帕霉素诱导自噬是通过抑制 Tor 实现的。在酵母中,TORC1 的底物之一即是 Atg13p。Atg13p 至少有 8 个磷酸化位点。在富含营养条件下,Atg13p 在 TORC1 的调控下维持高磷酸化状态。此时的 Atg13p 与 Atg1p、Atg17p 等蛋白质的结合能力大大减弱,Atg1p 的激酶活性也受到了抑制,使自噬保持基底水平。反之,当加入雷帕霉素或饥饿条件下,Atg13p 磷酸化水平下降,与 Atg1p、Atg17p 结合能力增强,Atg1p 的激酶活性被激活,进而诱发自噬。

另一个感受细胞营养状态的关键激酶是腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK),也被证明参与调控自噬^[40]。当细胞内 ATP 水平急剧下降时,高水平的 AMP 将激活 AMPK。在哺乳动物细胞中发现,AMPK 在能量匮乏诱导的自噬中通过磷酸化 ULK1,或磷酸化 Beclin1,并抑制 Vps34 的磷酸化^[41],或通过磷酸化 GAPDH,进一步破坏 DBC1 和 SIRT1 的结合,从而导致 LC3 出核,最终诱导细胞自噬的发生^[42]。在酵母细胞中,AMPK 的同源蛋白 Snf1p,在能量匮乏条件下通过磷酸化 DNA 损伤修复蛋白 Mec1p 来诱导自噬发生^[43]。

综上所述,TORC1 被认为是自噬的最上游,它

是通过调控 Atg1p 激酶复合体的活性来调控自噬的;而 AMPK 的激活为能量匮乏所诱导的自噬所必需。

5.2 Atg1p-Atg13p 复合体

Atg13p 存在 Tor 依赖的高磷酸化,且饥饿或加入雷帕霉素之后,Atg13p 会迅速去磷酸化,与 Atg1p 互作并激活后者,两者都是传统自噬及 Cvt 通路所必需的^[44]。Atg13p 的去磷酸化是自噬所必需的起始步骤,且 TOC1 可直接磷酸化 Atg13p^[45]。因此,Atg13p 的磷酸化水平成为指示自噬起始状态的指标,D. J. Klionsky 课题组也由此开发出一套运用蛋白质免疫印迹来检测 Atg13p 磷酸化水平的行之有效的方法^[46]。

Atg1p-Atg13p 复合体还能与 Vac8p、Atg11p 及 Atg17p 发生相互作用。此后,Atg29p 和 Atg31p 也陆续被发现是 Atg1p-Atg13p 复合体的一部分^[47-50]。在酵母中,Atg13p 去磷酸化后,与 Atg1p 互作并激活后者,进一步诱发下游自噬事件。哺乳动物细胞中的 ULK1/2 复合体是酵母 Atg1p-Atg13p 复合体的同源复合体,其组分有 ULK1/2 (Atg1p 哺乳动物同源蛋白)、ATG13、RB1CC1/FIP2000 (与 Atg17 部分同源)及 ATG101^[51-53]。ATG101 作为哺乳动物细胞中特有的组分,具有稳定 ATG13 及 ULK 本底磷酸化水平的功能,并保护 ATG13 不被蛋白酶体降解,同时,其可与 ULK-Atg13-FIP200 形成不受营养条件调节的稳定的互作^[54, 55]。

5.3 Atg5p-Atg12p 类泛素系统

Atg5p-Atg12p 类泛素化系统的发现是十分偶然的。1998 年,大隅良典课题组 Mizushima 等人^[56, 57],在利用蛋白质免疫印迹检测带有 HA 标签的 Atg12p(31 ~ 32.5 kD)时,意外发现在约 70 kD 的位置上有 1 个多余的条带,这就是所谓的 Atg5p-Atg12p 异源二聚体。

Atg12p 作为第一个被发现的泛素样 Atg 蛋白,高度保守。在类泛素化过程中,Atg12p 先经 E1 样酶 Atg7p 激活,后经 E2 样酶 Atg10p 修饰^[58],Atg12p 和 Atg5p 形成 1 个异源二聚体。且 Atg12p-Atg5p 复合物的形成是不可逆的。该异源二聚体与 Atg16p 连接^[59],由于 Atg16p 的寡聚化作用,形成 1 个 Atg12p-Atg5p-Atg16p 复合物。在自噬体形成的早期,Atg12p-Atg5p-Atg16p 复合物定位在隔离膜的外侧,隔离膜弯曲延伸的方向总与其相悖。且定位在分离膜外侧的 Atg12p-Atg5p-Atg16p 复合物可募集 Atg8p 到隔离膜,并决定 Atg8p 在膜上的定位及其酯

化的位点。

综上所述,Atg12p-Atg5p 类泛素化系统中,泛素样蛋白为 Atg12p, E1 样酶是 Atg7p, E2 样酶是 Atg10p,底物是 Atg5p。和 Atg8p-PE 类泛素化系统相比,在 Atg12p-Atg5p 复合物形成的过程中,不存在类似 Atg4p 的起始加工酶和分离酶。

5.4 Atg8p-PE 类泛素化系统

Atg8p-PE 类泛素化系统是自噬体形成过程中的另一个泛素样化系统。Atg8p 被 Atg4p 切去羧基端的精氨酸,暴露甘氨酸残基后,再经 E1 样酶 Atg7p、E2 样酶 Atg3p,在 Atg12p-Atg5p-Atg16p 复合体的帮助下,Atg8p 羧基端的羧基与自噬双层膜上的磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)的氨基发生共价结合,形成 Atg8p-PE 复合体以促进自噬体双层膜的延伸^[61-63]。

与 Atg12p-Atg5p 类泛素化系统不同的是,Atg8p-PE 的形成是可逆的。Atg4 除了在 Atg8 泛素样修饰开始时使其暴露甘氨酸残基外,还在泛素样修饰的最后,参与切断 Atg8p-PE,使 Atg8p 脱离。该现象对 Atg8p 的循环以及自噬体膜的形成至关重要。

由于在自噬发生时,Atg8p 会从胞浆中富集到自噬体,Atg8p 常用来作为自吞噬发生的 1 个标记蛋白质。酵母中,在自噬被激活的状态下,GFP-Atg8p 融合蛋白被分解出 GFP 单体,可用蛋白质免疫印迹检出;同时,若用共聚焦显微镜观察,会发现液泡中出现大量绿色荧光。哺乳动物细胞中,常用 LC3-I 及 LC3-II 的比例来表征自噬水平。关于检测自噬水平的详细内容,读者可按需阅读 Klionsky 等在 2016 年发表在《自噬》(*Autophagy*)上的文章^[60]。

2012 年,俞立课题组易聪等研究^[64]发现,由 Esa1p 介导的 Atg3p K19 及 K48 的乙酰化,影响后者与 Atg8p 的互作及 Atg8p 酯化。与清华大学化学学院刘磊课题组合作^[65],利用化学生物学手段半合成的 Atg3p-K19ac-K48ac 进行的体外实验,进一步证实了这一观点。

综上所述,Atg8p-PE 类泛素化系统中泛素样蛋白为 Atg8p, E1 样酶是 Atg7p, E2 样酶是 Atg3p, E3 样酶是 Atg12p-Atg5p,底物是磷脂酰乙醇胺,且反应可逆。

5.5 PI3K 复合体

PI3K 复合体可以结合膜组分,并将脂分子中的磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)转化为 PI3P。PI3P 进一步招募膜结合蛋白 Atg18p 到双层膜。作

为 PI3K 复合体组分的 Vps34p, 至少参与组成 2 种不同的 PI3K 复合体, 即 PI3K 复合体 I 和 II, 两者都包含 Vps34p、Vps15p 及 Vps30p/Atg6p。复合体 I 另含 Atg14p, 定位于自噬体前结构, 参与调控自噬; 复合体 II 另含 Vps38p, 定位于外泌体 (exosome), 参与调控羧肽酶 Y (carboxy-peptidase Y, CPY) 分选^[66-68]。

Atg38p 是 PI3K 复合体 I 的一个起稳定复合体功能的亚基。Atg38p 通过其氨基端与 Atg14p 和 Vps34p 互作, 通过其羧基端形成的同源二聚体形式, 参与调节 PI3K 复合体 I 的稳定性。在 *atg38Δ* 的菌中, PI3K 复合体 I 被分解为 Atg14p-Vps30p 和 Vps15p-Vps34p 两个亚复合体^[69]。

哺乳动物细胞中 PI3KC3 复合体有 2 个, 同酵母一样, 复合体 I 为自噬所必需, 而非复合体 II。清华大学王宏伟课题组与俞立课题组^[70]合作, 利用结构生物学方法, 发现 PI3KC3 复合体 I 通过 ATG14 L 的 BATS 结构域 (BAKOR/ATG14 L autophagosome targeting sequence domain^[71]) 与 VPS34 的羧基端结构域 (C-terminus domain, CTD) 站立于膜上, 表明复合体 I 可能通过 BATS 及 VPS34-CTD 被招募至 ER, 直接与 ER 上的 PI 互作, 进而诱发欧米伽体的形成。由于复合体 II 中无 BATS, 所以其结合能力弱于复合体 I, 这也为复合体 I, 而不是复合体 II 在欧米伽体形成中起到重要作用提供了合理的解释。

综上所述, PI3K 复合体共用的亚基有 Vps34p、Vps15p 和 Vps30p/Atg6p, 复合体 I 还有 Atg14p 及 Atg38p, 而 II 有 Vps38p, 且前者参与自噬, 而非后者。

5.6 Atg9p 循环系统

作为自噬机制的相关研究中第一个被鉴定为膜蛋白的是 Atg9p, 其功能的相关报道, 直到 2000 年才见诸期刊。据报道, Atg9p 是一个整合膜蛋白, 定位于液泡周边的大型点状结构, 是自噬及 Cvt 通路分别形成自噬体和 Cvt 囊泡所必需^[72]。而后陆续发现另一个自噬中的膜蛋白 Atg2p 及 Atg18p, 也参与 Atg9p 循环^[73, 74]。

Atg9p 由周边位点被运输至 PAS 的过程被称为顺行 (anterograde) 运输, 反之被称为逆行 (retrograde) 运输^[75]。在顺行运输过程中, 需 Atg11p、Atg23p、Atg27p 等蛋白质。在逆行运输过程中, 则需要 Atg1p-Atg13p、Atg2p 和 Atg18p^[75-77]。作为 Atg9p 循环中直接与 Atg9p 互作的蛋白质 Atg11p, 同时也是一个支架蛋白^[78]。Atg11p 通过卷曲螺旋域 (coiled-coil domain), 在 Cvt 通路中与

Atg19p 互作^[79], 在线粒体自噬中与 Dnm1p 及 Atg32p 互作^[78], 在过氧化物酶体自噬中与 Atg36p 互作^[80]等。

综上所述, Atg9p 循环过程中, 顺行运输需 Atg11p、Atg23p 和 Atg27p 等蛋白质, 逆行运输则需要 Atg1p-Atg13p、Atg2p 和 Atg18p 等。

5.7 自噬体前结构

1999 年, T. Kirisako 等人利用 Atg8p 作为免疫电镜的标记, 发现 Atg8p 定位于隔离膜、成熟的自噬体及自噬小体上。2001 年, Suzuki 等^[81]发现, 在富含营养的条件下, GFP-Atg8p 形成临近液泡的点状结构; 利用荧光显微技术, 分析 Atg 蛋白的定位, 发现 Atg1p、Atg5p、Atg12p 及 Atg16p 都与点状结构上的 Atg8p 共定位; 长时间观察后发现, 该点状结构在自噬体的形成中起关键作用, 因此, 他们将其命名为自噬体前结构, 即 PAS。

此后的研究发现, PAS 招募大量 Atg 蛋白, 如 Atg1p-Atg13p、Atg5p-Atg12p 类泛素化系统、Atg8p-PE 类泛素化系统、PI3K 复合体 I、Atg9p 循环系统及 Atg17p-Atg29p-Atg31p 复合体等, 其在自噬体的形成过程中是必需的。在任何一个不能产生 PAS 的酵母缺失突变体中, 自噬都无法发生^[82]。传统认为, 哺乳动物细胞中不存在 PAS。近年的一个工作揭示, 哺乳动物细胞中也存在着一个类似 PAS 的结构。Ktistakis 的研究小组最近利用在内质网上锚定的 PI3P 结合蛋白 DFCP (double FYVE domain-containing protein)-GFP 标记细胞^[83], 发现饥饿会引起本来散布在细胞质中的 DFCP 形成点状结构。由于这一结构同内质网联接形成“Ω”状, 作者把这些 DFCP 阳性的点状结构命名为欧米伽体。欧米伽体实际上是一个在 ER 上的 PI3P 富集区域。因为 PI3P 的功能是通过 PI3P-蛋白质相互作用而募集 PI3P 结合蛋白, 如含有 PH、PX 结构域的蛋白质。因此, 在欧米伽体上可以募集许多蛋白质。许多在自噬体形成所必需的蛋白质, 如 ATG1、VPS34 都会在欧米伽体上富集。目前认为, 与酵母中 PAS 的功能类似, 欧米伽体的主要作用可能是将自噬形成所必需的蛋白质富集在一起, 从而促进自噬体的形成。

综上所述, 90 年代所发现的自噬相关蛋白质, 基本上都起作用于自噬起始阶段及自噬体形成时期。

6 自噬与疾病

正常的生理过程受损时, 导致多种疾病, 自噬也

是如此。

6.1 自噬与肿瘤

早在1999年,B. Levine课题组的Liang等人^[84]就发现,酿酒酵母Atg6p的哺乳动物同源蛋白Beclin 1可以抑制人类乳腺癌细胞系MCF7的增殖,以及其裸鼠中的成瘤。而同时Beclin 1的杂合敲除小鼠体内,恶性肿瘤发生的几率有所增加,细胞增殖加快,因此怀疑自噬可能参与肿瘤生长的调控^[85]。既然自噬可能负调控肿瘤的生长,促进自噬是否会起到治疗肿瘤的效果呢?2001年,Podsypanina等^[86]发现,雷帕霉素的类似物可以通过抑制mTOR的活性来减缓PTEN缺陷型小鼠体内肿瘤的形成。

Ryan K. M. 实验室^[87]利用胰腺导管腺癌的小鼠模型发现,仅仅激活致癌基因Kras远远不能导致癌变,从而揭示了自噬和p53在成瘤癌变过程中的重要作用,并为胰腺导管腺癌的治疗提供方向;胰腺星状细胞可通过分泌自噬产生的丙氨酸来供养肿瘤组织^[88]。Berger S. L. 实验室^[89]发现并阐释了由核纤层蛋白B1充当适配蛋白的核纤层自噬,并发现该过程在致癌因素出现时尤为活跃,暗示这可能是一种自噬避免细胞癌变的新途径。有研究表明,在肿瘤发生及进展过程中,癌细胞受到氧化应激及营养受限等多种应激压力,细胞自吞噬过程被高度激活,维持癌细胞的代谢平衡,从而维持癌细胞的持续存活。

由此可见,自噬在肿瘤的迁移、浸润与肿瘤干细胞的分化等过程中发挥双面作用,既参与抑制肿瘤的生长,又可能为肿瘤细胞提供营养^[90]。

6.2 自噬与发育

自噬还在多个发育和生理过程中发挥重要作用,比如造血和器官形成等。

2006年,Hara等人^[91]发现,Atg5^{-/-}敲除小鼠的神经细胞的发育存在异常,有渐进性损伤,细胞质中积累大量内含体。因此,他们以为自噬可能通过降解不正常蛋白质,避免其积累来保证神经细胞的正常发育。

在酵母细胞中,线粒体自噬需要受体蛋白Atg32p通过与Atg8p结合对受损的线粒体进行清除。而哺乳动物细胞在缺氧时,受损的线粒体则通过FUNDC1与LC3直接结合将其清除,从而达到控制线粒体质量的目的。最近发现,酵母细胞中需要被降解的内质网和细胞核内蛋白质,能够通过特定受体蛋白Atg39p和Atg40p与Atg8p结合进行清除,而在哺乳动物细胞中,Atg40p的同源物FAM134B,

通过与LC3结合介导内质网自噬。

Komatsu等人^[92]发现,p62参与调控内含体的形成,且敲除p62可以显著缓解因自噬缺陷而导致的肝细胞损伤;p62还可以通过其泛素结合域(ubiquitin associated domain,UBA domain)及LC3互作域(LC3 interaction region,LIR),分别与泛素和LC3相互作用,将多泛素化蛋白聚集体降解^[93]。

不仅是选择性自噬广泛参与其中,自噬还参与调控基础代谢来参与发育。

2012年,Poon等^[94]发现,自噬可能通过调控胞内ROS水平影响TGFβ1介导的肺部气道的生成,进而影响哮喘的发生;Levine实验室^[95]发现,剧烈锻炼会诱导小鼠骨骼肌和心肌细胞发生自噬,且BCL2的磷酸化参与其中,对维持肌肉细胞葡萄糖稳态起重要作用;Ferguson实验室^[96]发现,自噬还通过Atg5及Beclin1参与到视觉系统的运作中。

参与纤毛生成的部分分子机制也会参与到自噬的早期步骤中,且基底自噬可能通过降解细胞纤毛内转运蛋白来调节纤毛的生长^[97]。其中,纤毛类疾病相关蛋白OFD1,通过自噬降解会促进初级纤毛的生成,在Atg5或Atg3缺陷的胚胎成纤维细胞中,OFD1的积累导致初级纤毛生成受阻^[98]。而且,自噬通过初级纤毛-自噬-Nrf2信号轴,参与人类胚胎干细胞分化成神经外胚层的过程中^[99]。

由此可见,自噬可能通过细胞器质量的把控、细胞内物质的更新,甚至是其副产物也可能对个体的发育过程产生重要作用。

6.3 自噬与神经系统变性疾病

神经退行性疾病,如阿尔茨海默症(Alzheimer disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨廷顿氏症(Huntington's disease)等都与泛素标记蛋白质的异常累积有关,而自噬又在清除细胞内累积的蛋白质的过程中发挥重要作用。本文将以帕金森氏症及亨廷顿氏症为例,简介现有研究成果。

帕金森氏症是一种神经系统变性疾病,确切病因尚不清楚。帕金蛋白(parkin)本质上具有E3酶的活性,其异常被认为与帕金森氏症有关。帕金蛋白很可能是通过选择性自噬降解受损线粒体来避免帕金森氏症出现^[100,101]。

当线粒体受损后,PINK1会迅速积累并维持其去极化的状态,进而招募parkin,激活后者泛素连接酶活性,招募NDP52并泛素化自噬受体蛋白optineurin至线粒体来诱导线粒体自噬的发生。在该过程中,去泛素化酶USP30同帕金蛋白互相颉

顽,而 parkin 病理突变体,如 K161N、K211N 等,可能是因阻抑了上述过程而导致帕金森氏症^[102-105]。另外,Hsp70 可通过与 PINK1 互作,降低 PINK1 降解率^[106]。PINK1 和 parkin 通过阻抑 RAB9 及 SNX9 被招募至线粒体,从而阻抑线粒体的抗原呈递过程^[107]。这可能是一个参与帕金森氏症病理的新角度。

亨廷顿氏症是一种常染色体显性遗传性神经退行性疾病,是由含多聚谷氨酰胺序列 (polyQ) 的异常的亨廷顿蛋白在神经细胞中堆积导致的。2014 年, Lu 等^[108]在酿酒酵母中发现了作用机制类似于哺乳动物细胞中 p62 的 Cue5p。Cue5p 通过与 Atg8p 及泛素互作,降解蛋白质聚集体,但其与 p62 无同源性;而在哺乳动物细胞中的同功同源蛋白质是 Tollip,后者参与降解富谷氨酰胺蛋白 (polyglutamine,polyQ) 来避免亨廷顿症出现。有研究表明,亨廷顿蛋白可通过与 p62 互作,促进 p62 同 LC3 及泛素修饰的底物结合,从而参与到选择性自噬中^[109]。除此之外,Wang 实验室^[110]运用酵母发现泛醌蛋白/Dsk2 会促进包涵体的形成,并促进异常亨廷顿蛋白的降解。提出人类泛醌蛋白 UBQLN1/2 有可能也参与到清除异常亨廷顿蛋白的生理过程中的观点。

由此可见,自噬作为一个细胞蛋白质质量控制体系,在清除异常累积蛋白质,进而保护细胞以致整个组织、器官的稳定性方面发挥了重要作用。

7 问题与展望

自噬的核心分子机制虽然已被阐明,但仍有很多存疑的问题等待着科学家们去解决。

(1)膜的来源及闭合。虽然有研究表明,隔离膜可能来源于内质网^[111],且 LC3/Atg8 参与调控隔离膜的闭合^[112,113]。但我们对隔离膜形成的起始和自噬体封闭的分子机制还不甚了解^[114]。2013 年,Yoshimori 实验室^[115]列出一系列实验证据,以期证明自噬体是在内质网-线粒体触点 (ER-mitochondria contact site) 处形成的。其所列证据如下:其一,显微镜观察结果显示,饥饿后自噬体标记 Atg14 被招募至内质网-线粒体触点处,亚细胞结构分离实验也验证了这一实验事实;其二,破坏内质网-线粒体触点会阻抑 Atg14 斑点的形成;其三,Stx17 会与 Atg14 互作并将其招募至内质网-线粒体触点处。

(2)转录层面。传统对自噬的研究总是习惯性地聚焦至细胞水平,而对其转录水平,即自噬过程中

参与的转录因子及所被调控的基因的研究数量较少。现有研究表明,FOXO 及 TFEB 等转录因子,很有可能参与调节自噬^[116,117]。在饥饿状态下,FOXO3a 被 AMP 激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase,AMPK) 磷酸化,抑制 SKP2 的转录,进而提高 CARM1 的水平,从而提高 H3R17 的二甲基化水平,进一步调节自噬水平^[118]。转录因子 TFEB 被溶酶体释放的钙离子所激活的钙调磷酸酶去磷酸化,这一过程是 TFEB 所参与的自噬的发生所必需的,且溶酶体可能是细胞内稳态调节相关信号通路的枢纽所在^[119]。另有研究表明,法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor,FXB) 及转录激活子 cAMP 响应元件结合蛋白 (cAMP response element-binding protein,CREB),共同调节餐后小鼠肝细胞的自噬基因表达网络^[120]。

(3)不同的胁迫条件所诱导的自噬。不同的胁迫条件可能会引发潜在的新的参与调节新的自噬通路,其中也可能存在有待鉴定的新基因。俞立课题组的易聪博士后致力于能量匮乏所导致的细胞自噬的研究。他利用酿酒酵母这一单细胞模式生物,发现能量匮乏所导致的自噬通路与传统自噬通路 (氮源饥饿所导致的) 是不同的,尤其是在感知信号和自噬起始的阶段^[47]。

(4)多细胞生物的自噬。由于自噬信号通路的研究大多是基于酵母等低等真核生物,以及体外培养的细胞系来进行研究的,无论是从细胞类别、所受胁迫条件的种类、各个组织器官之间的协调与各个发育时间点的调控等方面来讲,在高等多细胞真核生物中的自噬过程都必定要复杂的多。所以,基于酵母和体外培养的细胞系的自噬研究,并不能代替或者很难揭示多细胞生物在生长发育过程中复杂的自噬调控机制及其功能。因此,利用多细胞模式动物展开对自噬新基因和新通路的鉴定就显得尤为重要。虽然已有学者利用如秀丽线虫等多细胞模式生物发现了一系列多细胞生物特有的自噬相关基因^[121,122],但是对此我们仍知之甚少。

参考文献 (References)

[1] Feng Y, He D, Yao Z, *et al.* The machinery of macroautophagy [J]. Cell Res, 2014, **24**(1): 24-41

[2] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. J Pathol, **221**(1): 3-12

[3] 冯文之,陈扬,俞立. 细胞自噬分子机制的进展[J]. 生命科学 (Feng WZ, Chen Y, Yu L. Process in molecular mechanism of autophagy[J]. Chin Bull Life Sci), 2015, **27**(7): 859-866

[4] Appelmans F, Wattiaux R, de Duve C. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special

- class of cytoplasmic granules in rat liver [J]. *Biochem J*, 1955, **59**(3): 438-445
- [5] de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, *et al.* Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue [J]. *Biochem J*, 1955, **60**(4): 604-617
- [6] Straus W. Concentration of acid phosphatase, ribonuclease, desoxyribonuclease, β -glucuronidase, and cathepsin in "droplets" isolated from the kidney cells of normal rats [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1956, **2**(5): 513-521
- [7] Voet D, Voet JG. *Biochemistry* (3rd ed) [M]. Wiley: Hoboken, NJ, 2004
- [8] Novikoff AB, Beaufay H, de Duve C. Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1956, **2**(4 Suppl): 179-184
- [9] Bennett HS. A suggestion as to the nature of the lysosome granules [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1956, **2**(4): 185
- [10] Essner E. An electron microscopic study of erythrophagocytosis [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1960, **7**: 329-334
- [11] Cohn ZA, Hirsch JG. The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes [J]. *J Exp Med*, 1960, **112**: 983-1004
- [12] Tappel AL, Zalkin H, Caldwell KA, *et al.* Increased lysosomal enzymes in genetic muscular dystrophy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1962, **96**: 340-346
- [13] Muller M, Toth J, Toro I. Studies on feeding and digestion in protozoa. IV. Acid phosphatase and nonspecific esterase activity of food vacuoles in amoeba proteus [J]. *Acta Biol Acad Sci Hung*, 1962, **13**: 105-116
- [14] Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research [J]. *Cell Res*, 2014, **24**(1): 9-23
- [15] Clark SL Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1957, **3**(3): 349-362
- [16] Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes [J]. *J Cell Biol*, 1962, **12**: 198-202
- [17] Klionsky DJ. Autophagy revisited; a conversation with Christian de Duve [J]. *Autophagy*, 2008, **4**(6): 740-743
- [18] de Reuck AVS, Cameron MP. *Lysosomes*, Ciba Found. Symp [M]. J. A. Churchill, Ltd., London, 1963
- [19] De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes [J]. *Annu Rev Physiol*, 1966, **28**: 435-492
- [20] Deter RL, de Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes [J]. *J Cell Biol*, 1967, **33**(2): 437-449
- [21] Deter RL, Baudhuin P, De Duve C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon [J]. *J Cell Biol*, 1967, **35**(2): C11-C16
- [22] Arstila AU, Trump BF. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration [J]. *Am J Pathol*, 1968, **53**(5): 687-733
- [23] Pfeifer U. Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles [J]. *Acta Biol Med Ger*, 1977, **36**(11-12): 1691-1694
- [24] Mortimore GE, Ward WF. Behavior of the lysosomal system during organ perfusion. An inquiry into the mechanism of hepatic proteolysis [J]. *Front Biol*, 1976, **45**: 157-184
- [25] Seglen PO, Gordon PB, Poli A. Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980, **630**(1): 103-118
- [26] Grinde B, Seglen PO. Leucine inhibition of autophagic vacuole formation in isolated rat hepatocytes [J]. *Exp Cell Res*, 1981, **134**(1): 33-39
- [27] Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine; specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(6): 1889-1892
- [28] Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, *et al.* Autophagy in yeast demonstrated with proteinase- deficient mutants and conditions for its induction [J]. *J Cell Biol*, 1992, **119**(2): 301-311
- [29] Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Lett*, 1993, **333**(1-2): 169-174
- [30] Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, *et al.* Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Gene*, 1997, **192**(2): 245-250
- [31] Klionsky DJ, Cueva R, Yaver DS. Amino-peptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* localized to the vacuole independent of the secretory pathway [J]. *J Cell Biol*, 1992, **119**(2): 287-299
- [32] Harding TM, Morano KA, Scott SV, *et al.* Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway [J]. *J Cell Biol*, 1995, **131**(3): 591-602
- [33] Levine B, Yoshimori T, Deretic V 编, 程轶喆, 刘娟译. 细胞自噬[M]. 北京: 化学工业出版社 (Levine B, Yoshimori T, Deretic V. *Autophagy in infection and immunity* [M]. Beijing: Chemical Industry Press), 2012
- [34] Scott SV, Hefner-Gravink A, Morano KA, *et al.* Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(22): 12304-12308
- [35] Baba M, Osumi M, Scott SV, *et al.* Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome [J]. *J Cell Biol*, 1997, **139**(7): 1687-1695
- [36] Thumm M, Egner R, Koch B, *et al.* Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Lett*, 1994, **349**(2): 275-280
- [37] Yuan W, Tuttle DL, Shi YJ, *et al.* Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase [J]. *J Cell Sci*, 1997, **110**(Pt 16): 1935-1945
- [38] Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes [J]. *Dev Cell*, 2003, **5**(4): 539-545
- [39] Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast [J]. *Science*, 1991, **253**(5022): 905-909
- [40] Samari HR, Seglen PO. Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of ampicillin-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(37): 23758-23763
- [41] Kim J, Kim YC, Fang C, *et al.* Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy [J]. *Cell*, 2013, **152**(1-2): 290-303
- [42] Chang C, Su H, Zhang D, *et al.* AMPK-dependent phosphorylation of GAPDH triggers Sirt1 activation and is necessary for autophagy upon glucose starvation [J]. *Mol Cell*, 2015, **60**(6): 930-940
- [43] Yi C, Tong J, Lu P, *et al.* Formation of a Snf1-Mec1-Atg1 module on mitochondria governs energy deprivation-induced autophagy by regulating mitochondrial respiration [J]. *Dev Cell*, 2017, **41**(1): 59-71
- [44] Funakoshi T, Matsuura A, Noda T, *et al.* Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Gene*, 1997, **192**(2): 207-213
- [45] Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, *et al.* Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, **30**(4): 1049-1058
- [46] Miller-Fleming L, Cheong H, Antas P, *et al.* Detection of *Saccharomyces cerevisiae* Atg13 by western blot [J]. *Autophagy*, 2014, **10**(3): 514-517
- [47] Scott SV, Nice DC 3rd, Nau JJ, *et al.* Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(33): 25840-25849
- [48] Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, *et al.* Cvt9/Gsa9 functions in

- sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole [J]. *J Cell Biol*, 2001, **153**(2): 381-396
- [49] Kawamata T, Kamada Y, Suzuki K, *et al.* Characterization of a novel autophagy-specific gene, *ATG29* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**(4): 1884-1889
- [50] Kabeya Y, Kawamata T, Suzuki K, *et al.* *Cis1/Atg31* is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **356**(2): 405-410
- [51] Mizushima N. The role of the *Atg1/ULK1* complex in autophagy regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, **22**(2): 132-139
- [52] Hara T, Takamura A, Kishi C, *et al.* *FIP200*, a *ULK*-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells [J]. *J Cell Biol*, 2008, **181**(3): 497-510
- [53] Hara T, Mizushima N. Role of *ULK-FIP200* complex in mammalian autophagy: *FIP200*, a counterpart of yeast *Atg17* ? [J] *Autophagy*, 2009, **5**(1): 85-87
- [54] Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. A novel, human *Atg13* binding protein, *Atg101*, interacts with *ULK1* and is essential for macroautophagy [J]. *Autophagy*, 2009, **5**(5): 649-662
- [55] Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, *et al.* *Atg101*, a novel mammalian autophagy protein interacting with *Atg13* [J]. *Autophagy*, 2009, **5**(7): 973-979
- [56] Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy [J]. *Nature*, 1998, **395**(6700): 395-398
- [57] Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, *et al.* A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast *Apg12p* conjugation system essential for autophagy [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(51): 33889-33892
- [58] Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, *et al.* *Apg10p*, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast [J]. *EMBO J*, 1999, **18**(19): 5234-5241
- [59] Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. *Apg16p* is required for the function of the *Apg12p-Apg5p* conjugate in the yeast autophagy pathway [J]. *EMBO J*, 1999, **18**(14): 3888-3896
- [60] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, **12**(1): 1-222
- [61] Kirisako T, Baba M, Ishihara N, *et al.* Formation process of autophagosome is traced with *Apg8/Aut7p* in yeast [J]. *J Cell Biol*, 1999, **147**(2): 435-446
- [62] Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, *et al.* The reversible modification regulates the membrane-binding state of *Apg8/Aut7* essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway [J]. *J Cell Biol*, 2000, **151**(2): 263-276
- [63] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature*, 2000, **408**(6811): 488-492
- [64] Yi C, Ma M, Ran L, *et al.* Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation [J]. *Science*, 2012, **336**(6080): 474-477
- [65] Li YT, Yi C, Chen CC, *et al.* A semisynthetic *Atg3* reveals that acetylation promotes *Atg3* membrane binding and *Atg8* lipidation [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14846
- [66] Kihara A, Noda T, Ishihara N, *et al.* Two distinct *Vps34* phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Cell Biol*, 2001, **152**(3): 519-530
- [67] Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, *et al.* Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, *Cvt13* and *Cvt20*, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(33): 30198-30207
- [68] Hettema EH, Lewis MJ, Black MW, *et al.* Retromer and the sorting nexins *Snx4/41/42* mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes [J]. *EMBO J*, 2003, **22**(3): 548-557
- [69] Araki Y, Ku WC, Akioka M, *et al.* *Atg38* is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity [J]. *J Cell Biol*, 2013, **203**(2): 299-313
- [70] Ma M, Liu JJ, Li Y, *et al.* Cryo-EM structure and biochemical analysis reveal the basis of the functional difference between human *PI3KC3-C1* and *-C2* [J]. *Cell Res*, 2017, **27**(8): 989-1001
- [71] Diao J, Liu R, Rong Y, *et al.* *ATG14* promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes [J]. *Nature*, 2015, **520**(7548): 563-566
- [72] Noda T, Kim J, Huang WP, *et al.* *Apg9p/Cvt7p* is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the *Cvt* and autophagy pathways [J]. *J Cell Biol*, 2000, **148**(3): 465-480
- [73] Wang CW, Kim J, Huang WP, *et al.* *Apg2* is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(32): 30442-30451
- [74] Barth H, Meiling-Wesse K, Epple UD, *et al.* Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require *Aut10p* [J]. *FEBS Lett*, 2001, **508**(1): 23-28
- [75] Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, *et al.* The *Atg1-Atg13* complex regulates *Atg9* and *Atg23* retrieval transport from the pre-autophagosomal structure [J]. *Dev Cell*, 2004, **6**(1): 79-90
- [76] Yorimitsu T, Klionsky DJ. *Atg11* links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**(4): 1593-1605
- [77] Yen WL, Legakis JE, Nair U, *et al.* *Atg27* is required for autophagy-dependent cycling of *Atg9* [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, **18**(2): 581-593
- [78] Mao K, Wang K, Liu X, *et al.* The scaffold protein *Atg11* recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy [J]. *Dev Cell*, 2013, **26**(1): 9-18
- [79] Yorimitsu T, Klionsky DJ. *Atg11* links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**(4): 1593-1605
- [80] Motley AM, Nuttall JM, Hettema EH. *Atg36*: the *Saccharomyces cerevisiae* receptor for pexophagy [J]. *Autophagy*, 2012, **8**(11): 1680-1681
- [81] Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, *et al.* The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation [J]. *EMBO J*, 2001, **20**(21): 5971-5981
- [82] Suzuki K, Ohsumi Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS) [J]. *FEBS Lett*, 2010, **584**(7): 1280-1286
- [83] Cottam EM, Maier HJ, Manifaca M, *et al.* Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate [J]. *Autophagy*, 2011, **7**(11): 1335-1347
- [84] Liang XH, Jackson S, Seaman M, *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1* [J]. *Nature*, 1999, **402**(6762): 672-676
- [85] Qu X, Yu J, Bhagat G, *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin1* autophagy gene [J]. *J Clin Invest*, 2003, **112**(12): 1809-1820
- [86] Podsypanina K, Lee RT, Politis C, *et al.* An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in *Pten*^{+/-} mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**(18): 10320-10325
- [87] Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, *et al.* p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development [J]. *Nature*, 2013, **504**(7479): 296-300
- [88] Sousa CM, Biancur DE, Wang X, *et al.* Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion [J]. *Nature*, 2016, **536**(7617): 479-483
- [89] Dou Z, Xu C, Donahue G, *et al.* Autophagy mediates degradation of nuclear lamina [J]. *Nature*, 2015, **527**(7576): 105-109
- [90] Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Autophagy in cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2017, **36**(12): 1619-1630
- [91] Hara T, Nakamura K, Matsui M, *et al.* Suppression of basal

- autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. *Nature*, 2006, **441**(7095): 885-889
- [92] Komatsu M, Waguri S, Koike M, *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. *Cell*, 2007, **131**(6): 1149-1163
- [93] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(33): 24131-24145
- [94] Poon A, Eidelman D, Laprise C, *et al.* ATG5, autophagy and lung function in asthma [J]. *Autophagy*, 2012, **8**(4): 694-695
- [95] He C, Bassik MC, Moresi V, *et al.* Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis [J]. *Nature*, 2012, **481**(7382): 511-515
- [96] Kim JY, Zhao H, Martinez J, *et al.* Noncanonical autophagy promotes the visual cycle [J]. *Cell*, 2013, **154**(2): 365-376
- [97] Pampiega O, Orhon I, Patel B, *et al.* Functional interaction between autophagy and ciliogenesis [J]. *Nature*, 2013, **502**(7470): 194-200
- [98] Tang Z, Lin MG, Stowe TR, *et al.* Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites [J]. *Nature*, 2013, **502**(7470): 254-257
- [99] Jang J, Wang Y, Lalli MA, *et al.* Primary cilium-autophagy-Nrf2 (PAN) axis activation commits human embryonic stem cells to a neuroectoderm fate [J]. *Cell*, 2016, **165**(2): 410-420
- [100] Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1 [J]. *Science*, 2004, **304**(5674): 1158-1160
- [101] Narendra D, Tanaka A, Suen DF, *et al.* Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2008, **183**(5): 795-803
- [102] Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin [J]. *PLoS Biol*, 2010, **8**(1): e1000298
- [103] 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
- [104] Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy [J]. *Nature*, 2015, **524**(7565): 309-314
- [105] Cunningham CN, Baughman JM, Phu L, *et al.* USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, **17**(2): 160-169
- [106] Zheng Q, Huang C, Guo J, *et al.* Hsp70 participates in PINK1-mediated mitophagy by regulating the stability of PINK1 [J]. *Neurosci Lett*, 2018, **662**: 264-270
- [107] Matheoud D, Sugiura A, Bellemare-Pelletier A, *et al.* Parkinson's disease-related proteins PINK1 and Parkin repress mitochondrial antigen presentation [J]. *Cell*, 2016, **166**(2): 314-327
- [108] Lu K, Psakhye I, Jentsch S. Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin- Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family [J]. *Cell*, 2014, **158**(3): 549-563
- [109] Rui YN, Xu Z, Patel B, *et al.* Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, **17**(3): 262-275
- [110] Chuang KH, Liang F, Higgins R, *et al.* Ubiquitin/Dsk2 promotes inclusion body formation and vacuole (lysosome)-mediated disposal of mutated huntingtin [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, **27**(13): 2025-2036
- [111] Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, *et al.* A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(12): 1433-1437
- [112] Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, *et al.* An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, **19**(11): 4651-4659
- [113] Sou YS, Waguri S, Iwata J, *et al.* The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, **19**(11): 4762-4775
- [114] Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis [J]. *Cell Res*, 2014, **24**(1): 58-68
- [115] Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites [J]. *Nature*, 2013, **495**(7441): 389-393
- [116] van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, *et al.* Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, **14**(8): 829-837
- [117] Settembre C, De Cegli R, Mansueto G, *et al.* TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, **15**(6): 647-658
- [118] Medina DL, Di Paola S, Peluso I, *et al.* Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, **17**(3): 288-299
- [119] Shin HJ, Kim H, Oh S, *et al.* AMPK-SKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy [J]. *Nature*, 2016, **534**(7608): 553-557
- [120] Seok S, Fu T, Choi SE, *et al.* Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis [J]. *Nature*, 2014, **516**(7529): 108-111
- [121] Zhang Y, Yan L, Zhou Z, *et al.* SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans* [J]. *Cell*, 2009, **136**(2): 308-321
- [122] Tian Y, Li Z, Hu W, *et al.* *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms [J]. *Cell*, 2010, **141**(6): 1042-1055

俞立教授简介



俞立,博士,清华大学生命科学学院教授、博士生导师,国家杰出青年基金获得者、“长江学者奖励计划”特聘教授。主要科研领域与方向:综合利用细胞生物学,遗传学,生物化学,分子生物学等研究方法,以从酵母到小鼠等不同模式生物为模型研究:1)新细胞器迁移体(Migrasome)的机制与功能;2)自吞噬在细胞及分子水平上的调控机制。