

DOI: 10.13376/j.cbls/20150118

文章编号: 1004-0374(2015)07-0859-08



俞立, 博士, 教授, 国家杰出青年基金获得者。主要科研领域与方向: 综合细胞生物学、酵母遗传学、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) 细胞自噬的分子生物学机制, 尤其细胞自噬末期自噬性溶酶体再生的分子机制, 并对其进行了体外重构; (2) 新细胞器 Migrosome 的分子生物学机制和其在细胞迁徙中的功能。

## 细胞自噬分子机制的进展

冯文之<sup>1,2</sup>, 陈 扬<sup>2</sup>, 俞 立<sup>2\*</sup>

(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:** 细胞自噬是一类依赖于溶酶体的蛋白质降解途径, 在真核生物中非常保守。自噬能够感受细胞所处环境的各种信号, 如氨基酸、糖等营养物质的缺乏、pH 值或渗透压的改变等, 使细胞做出应激反应, 在恶劣环境下存活。同时, 自噬过程会清除细胞内错误折叠或聚集的蛋白质, 受损或老化细胞器以维持细胞内部稳态。自噬发生时, 细胞内部的胞质组分被包裹在自噬体中, 自噬体与溶酶体融合进行降解, 产生新的小分子, 如氨基酸等供细胞重新利用。一系列研究发现自噬的信号通路非常复杂, 已报道有 40 个自噬相关蛋白 (Atg 蛋白) 参与了自噬体的形成过程。Atg 蛋白按照一定步骤发挥功能, 同时相互影响, 利用内膜系统构建成一个闭合的双层膜结构。将对细胞自噬研究的历史、自噬分子机制的前沿进展进行综述。

**关键词:** 细胞自噬; 自噬体; 溶酶体; Atg 蛋白; 蛋白质降解

中图分类号: Q25 文献标志码: A

## Process in molecular mechanism of autophagy

FENG Wen-Zhi<sup>1,2</sup>, CHEN Yang<sup>2</sup>, YU Li<sup>2\*</sup>

(1 PTN Program, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

2 Tsinghua University-Peking University Joint Center for Life Sciences, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Autophagy is a conserved protein degradation process dependent on lysosome. Cells can sense various signals in the environment, such as amino acids, glucose or other nutrient deprivation, variation of pH or osmotic pressure to induce stress response and guarantee cell survival. Autophagy can maintain cell homeostasis by elimination of unfolded or aggregated proteins or damaged cell organelles. When autophagy occurs, autophagosome engulfs cytosolic components and fuses with lysosome for cargo degradation to produce recycling materials such as

收稿日期: 2015-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31125018, 31030043, 31321003)

\*通信作者: E-mail: liyulab@mail.tsinghua.edu.cn

amino acids and lipids. Studies have shown that the signal mechanism of autophagy is very complicated and there are 40 autophagy related proteins (Atg) identified by now regulating the autophagy process. These proteins function step by step and interact with each other to build a double-membrane closed structure *de novo* from endomembrane system. In this review, we describe the history of research on autophagy and discuss the progression in autophagy regulation mechanism.

**Key words:** autophagy; autophagosome; lysosome; Atg proteins; protein degradation

## 1 细胞自噬简介

细胞自噬是细胞将自身一些蛋白质和细胞器包裹在特定的膜结构中,送入溶酶体(酵母的液泡)降解,产生能量和小分子,如氨基酸等供细胞再次利用的过程。这对细胞耐受饥饿,清除胞内错误折叠的蛋白质和受损衰老的细胞器,维持内部稳态至关重要。这一过程在真核生物细胞中从单细胞酵母到多细胞的哺乳动物中广泛存在。自噬通常分为3种:巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)。巨自噬的特征是有独特的双层膜结构——自噬体形成,自噬体包被胞质成分,如蛋白质聚集体,损伤或者衰老的线粒体、过氧化物酶体等,最终与溶酶体融合。微自噬则是溶酶体内陷,包裹部分胞质进入溶酶体,没有独立的双层膜自噬体形成。而分子伴侣介导的自噬则是由特定蛋白 Hsc70 等介导,具有选择性<sup>[1]</sup>。此外,巨自噬和微自噬针对包含的内容物种类又都有选择性和非选择性。

相对于我们常提到的非选择性自噬,选择性自噬常见有 Cvt pathway (cytoplasm-to-vacuole targeting pathway)、过氧化物酶体自噬和线粒体自噬、内质网自噬等。这些选择性自噬的主要过程与非选择性的自噬有一定的相似性。但是,选择性自噬的特征是有自己特异的受体蛋白介导特定的包含物配体,即有识别底物的过程。受体蛋白会与待降解的配体结合并形成聚集体,然后在受体蛋白或者其支架蛋白附近会有囊泡和双层膜形成特异性的自噬体。例如,在酵母中,线粒体自噬的受体是其外膜蛋白 Atg32<sup>[2]</sup>,能够和其他 Atg 核心蛋白结合,使受损老化的线粒体进入自噬体。而与线粒体自噬非常类似的是过氧化物酶体自噬。酵母从含甲醇或者脂肪酸的培养基中切换到含糖或氨基酸的正常培养基中会发生过氧化物酶体自噬,Atg36 和 PpAtg30 是该自噬的特异性受体<sup>[3]</sup>,Pex3 和 Pex14 则是特异的配体。

本文中除特殊说明外,所讲的自噬均指非选择性巨自噬。

## 2 细胞自噬的历史

细胞自噬 (autophagy), 英文名词是由著名的生物化学和细胞生物学家 Christian De Duve 在 1963 年提出,来描述细胞内由包裹胞质内组分送入溶酶体(也是由 Christian De Duve 发现和命名的)的这一过程。Christian De Duve 因为在细胞器领域的巨大贡献,开发了新的细胞研究手段,发现了溶酶体这一新的细胞器而获得 1974 年诺贝尔生理学或医学奖。在自噬研究初期,由于实验手段的限制,自噬研究难以深入,相关的分子机制难以入手,细胞自噬只能处于形态学描述阶段:大多数关于细胞自噬的工作都是描述性的,通常是用电子显微镜下观察不同生理或病理状态下自噬体的产生。例如,研究者发现动物模型中胰高血糖素等激素会诱导肝脏细胞中自噬的发生<sup>[4]</sup>。

在 20 世纪 80 年代,挪威生物化学家 Per Ottar Seglen 发现氨基酸可以抑制自噬的发生,在此工作的基础上,提出自噬受细胞营养状态的调控。同时,Per Ottar Seglen 发现多种激酶的抑制剂可以阻止自噬的发生。因此,自噬这一细胞过程的调控机制很可能非常复杂。在研究中,Seglen 发现磷脂酰肌醇-3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P) 激酶抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA) 可以抑制自噬的发生<sup>[5]</sup>。至今,在自噬的研究中 3-MA 是最常用的自噬抑制剂。

在 20 世纪 90 年代初,日本的遗传学家 Yoshinori Ohsumi 的研究组发现酵母中的细胞自噬过程。他们发现在缺乏营养的环境中,如饥饿培养,自噬对酵母的存活是必需的。Ohsumi 于是利用酵母这一经典的模式生物通过遗传学手段做了突变筛选,首先是看哪些突变菌株在饥饿条件下无法存活,然后人工在显微镜下分析自噬体是否形成,与酵母的液泡是否融合,最终筛选出了多数参与自噬的关键基因<sup>[6]</sup>。这些基因被命名为 *apg* (autophagy) 基因。随后,很多研究者在酵母中筛选出了各类自噬基因,如 Cvt pathway 相关的基因<sup>[7]</sup>。然而,不同的研究

组对这些自噬基因命名各异, 经过协商在 2003 年统一命名为 *atg* (*autophagy*) 基因<sup>[8]</sup>。Ohsumi 实验室于 1997 年克隆了第一个自噬基因 *apg1* (*atg1*)<sup>[9]</sup>。2015 年又有 *atg39* 和 *atg40* 被报道<sup>[10]</sup>, 已经有 40 个自噬关键基因被鉴定出来, 并且在拟南芥、果蝇等模式生物中相继有 *atg* 的同源基因被鉴定。最近, 张宏研究组在秀丽线虫中也找到一系列的 *atg* 同源基因 (*epg*), 并表明其在发育中起重要作用<sup>[11]</sup>。随着相关研究的深入还会有更多的 *atg* 基因被发现。

在哺乳动物细胞中, 日本的 Mizushima 等<sup>[12]</sup>在 1998 年首先报道了 *Atg5* 和 *Atg12* 的同源基因, 并证明其分子机制与酵母十分相似。而 Tamotsu Yoshimori 研究组则鉴定了细胞自噬中的关键标记分子, *Atg8* 的同源蛋白 LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), 并且基于 LC3 的功能, 即 LC3-I 到 LC3-II 的变化, 建立了哺乳动物细胞中检测自噬水平的方法<sup>[13]</sup>。这已成为细胞自噬研究中普遍使用的标准检测方法。值得一提的是, 对自噬研究做出重大贡献的 Mizushima 和 Yoshimori 都曾在 Ohsumi 实验室受过系统的科研训练。在自噬功能与人体疾病的关系的研究中, Beth Levine 实验室在 1999 年报道了自噬的关键基因 *beclin1/atg6* 是肿瘤的抑制基因, 首次将自噬与人类疾病联系在一起<sup>[14]</sup>。Mizushima 实验室发现在小鼠神经细胞中特异性的敲除 *Atg5* 会导致神经退行性疾病类似的表型<sup>[15]</sup>, 随后很多研究组也报道了自噬在各种人类疾病中发挥重要作用。

20 世纪 90 年代, Ohsumi 利用酵母为模式生物, 通过遗传学手段得到自噬各相关基因 *atg*, 从而将细胞自噬带入了分子时代, 自噬机制得以进一步被阐明。随后自噬与各种疾病之间的密切关系被报道, 使得越来越多的研究人员参与到自噬的研究中, 近 20 年自噬领域发表的文章呈现指数级增长 (图 1)。自噬已经成为生命科学中的热点。

### 3 细胞自噬发生的分子机制

细胞自噬的发生可分为以下几步: (1) 自噬体形成起始步骤, 在酵母细胞中是特异结构 PAS (*pre-autophagosomal structure*, 自噬体的前体结构) 的形成并招募其他 *Atg* 蛋白和囊泡等膜成分定位, 在哺乳动物细胞中是欧米茄体和分离膜形成杯状结构; (2) 自噬体的双层膜在多个 *Atg* 蛋白的调控下扩展、延伸、包裹各种胞内组分; (3) 双层膜在 *Atg* 蛋白等帮助下延伸和封闭, 形成自噬体; (4) 自噬

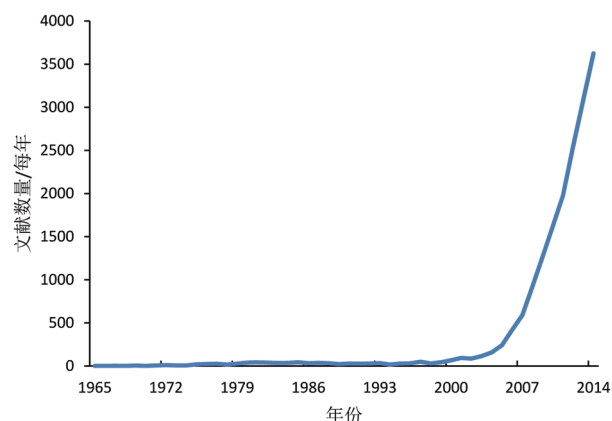


图1 1965年—2014年, Pubmed数据库收录的自噬领域发表的文章数量

体的外膜与溶酶体或者酵母的液泡发生融合, 该特异结构称为自噬溶酶体, 而内膜和内含物则被溶酶体内酯酶和蛋白酶降解为小分子; (5) 自噬溶酶体会在 *Clathrin*、*Kif5b*、*Dynamin* 等膜相关蛋白质帮助下产生细管状结构, 通过自噬性溶酶体再生形成新的溶酶体<sup>[16-17]</sup>。

选择性和非选择性等不同类型的自噬的分子核心机制类似, 由大约 18 个核心基因编码的蛋白质调控。概括为以下几个部分: (1) *Atg1/ULK1* 复合体, 包括 *Atg1*、*Atg13*、*Atg11*、*Atg17*、*Atg29* 和 *Atg31*, 于自噬的开始过程中发挥重要作用; (2) *Atg9* 的囊泡和 *Atg2-Atg18* 复合体, *Atg9* 囊泡可在双层膜和胞质中循环, 依赖 *Atg17* 或 *Atg11* 复合体定位到 PAS, 依赖 *Atg2-Atg18* 复合体离开 PAS; (3) *PI3K* 激酶复合体, 包括 *Vps34*、*Vps15*、*Atg6/Beclin1*、*Atg14* 和 *Atg38*, 可与膜结合, 催化脂分子 PI 转换为 PI3P, 从而招募与 PI3P 结合的蛋白; (4) 两套类泛素化体系, *Atg8/LC3*、*Atg4*、*Atg3*、*Atg7* 和 *Atg12*、*Atg7*、*Atg5*、*Atg10*、*Atg16*。具体功能和相互之间的关系有待进一步研究, 可能发挥识别底物, 在双层膜延伸中维持曲度等作用。

#### 3.1 *Atg1/ULK1* 激酶复合体

*Atg1/ULK1* 的激酶复合体在酵母和高等哺乳动物细胞都有类似的作用。Atg1 蛋白复合体的核心组成是 *Atg1* 和 *Atg13*, 其中 *Atg13* 的去磷酸化可以诱导细胞自噬的发生。而很多自噬上游信号的激酶可以调控 *Atg1* 复合体的磷酸化, 如 *Tor* (*target of rapamycin*) 激酶复合体、*AMPK* (*AMP-activated protein kinase*)、*PKA* (*protein kinase A*) 等激酶都可磷酸化 *Atg1* 和 *Atg13*, 相关位点先后被报道<sup>[18]</sup>。在营养丰富的环



境中, Tor 复合体使 Atg13 处于高度磷酸化状态, 在饥饿或者其他的外界压力刺激下, Tor 激酶失活, Atg13 发生去磷酸化与 Atg1 发生结合, 从而激活 Atg1 的激酶活性, 使 Atg1 形成二聚体并且发生自身的磷酸化<sup>[19]</sup>。最近一些新的研究表明, 不论 Atg13 的磷酸化水平如何, Atg13 都与 Atg1 存在一些结合, 但是当自噬发生, Atg13 的去磷酸化使其与 Atg1 的结合大大增强, 并且与 PAS 结构的支架 Atg17-Atg31-Atg29 复合体结合, 共同组成 PAS, 并招募其他 Atg 蛋白<sup>[20]</sup>。

Atg1 蛋白是自噬过程的核心蛋白中的一个重要的蛋白激酶, 但是其底物一直不确定, 目前有一系列研究报道了 Atg1 的不同底物, 如 2014 年, Papinski 等<sup>[21]</sup>报道了 Atg1 可以磷酸化 Atg9, 磷酸化的 Atg9 对于招募 Atg8 和双层膜的扩展是必需的。

高等哺乳动物细胞中的激酶 Atg1 的同源蛋白是 ULK1/2。ULK1/2 与 ATG13 (与酵母的 Atg13 同源)、FIP200 (与 Atg17 同源) 和 ATG101 (在酵母中无同源物) 构成 ULK1/2 激酶复合体, 与酵母中的该复合体不同的是 ULK1/2、ATG13 和 FIP200 之间是稳定的结合, 不受饥饿刺激与否的影响。而且 MTORC 与 ATG13 存在结合。值得一提的是, 细胞在耐受糖饥饿时, MTORC 失活离开 ULK1/2-ATG13 复合物, 而 AMPK 激酶会被激活, 结合并磷酸化 ULK1/2, 激活的 ULK1/2 会磷酸化 ATG13、AMBRA1 以及 Beclin1。ULK1/2 的磷酸化对 VPS34 激酶复合体的组成和活性也有重要影响<sup>[22]</sup>。

### 3.2 Atg9膜泡

Atg9 蛋白在进化中非常保守, 是自噬相关蛋白中唯一一个跨膜蛋白, 有六个跨膜域。Atg9 位于一些细小的单层膜囊泡上, 这些囊泡在胞质中定位于特定区域, 可看作是 Atg9 位于胞质中的存储库。在哺乳动物细胞中, Atg9 也定位在晚期内含泡和反式高尔基 (trans-Golgi) 膜网中。自噬发生时, Atg9 的囊泡会在酵母 PAS (或者哺乳动物细胞自噬前体 phagophore) 同胞质存储库之间来回转运。Atg9 囊泡定位在 PAS 或者自噬前体上需要 Atg17、Atg11 以及 Atg23 和 Atg27 的协助, 离开需要 Atg1 (ULK1/2) 复合体的激活和 Atg2-Atg18 (哺乳动物中的 WIPI2) 复合体。其具体机制有待进一步研究。有观点认为 Atg9 囊泡为自噬体双层膜的形成提供了起始的膜或蛋白质组分。

### 3.3 PI3K复合体I和II

PI3K 复合体 I 的组分包括 Vps15、Atg6 (Beclin1)、

Vps34、Atg14 和 Atg38。该复合体定位在 PAS 结构或者哺乳动物细胞的自噬前体上, 可以结合膜组分, 并将脂分子中的磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 转化成 PI3P。PI3P 可招募膜结合蛋白 Atg18 到双层膜上<sup>[23]</sup>。酵母中蛋白组分中的 Vps15、Atg6 (Beclin1)、Vps34 也可同 Vps38 而不是 Atg14 结合构成 PI3K 复合体 II。其不参与自噬体的形成。哺乳动物细胞中有相似的 PI3K 复合体 I, 但是其 PI3K 复合体 II 由 UVRAG 取代 Atg14, 参与了内吞作用和自噬。

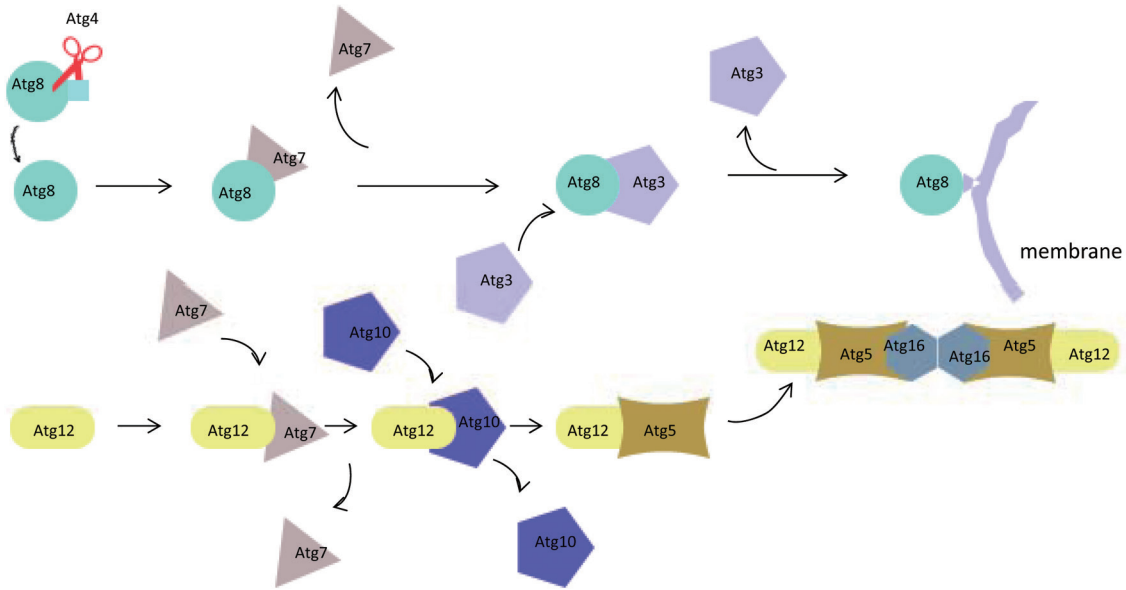
### 3.4 类泛素化结合系统

自噬的分子机制中比较独特的是存在两条类泛素化结合的途径。Atg8 和 Atg12 都是类泛素化的蛋白, Atg8 可与脂分子磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE), Atg12 可同 Atg5 发生共价结合。与泛素化途径中存在的 E1-E2-E3 激活和连接酶类似, 该途径的 E1 是 Atg7, E2 是 Atg3、Atg10。在 Atg8 (LC3 A/B/C, GABARAP) 类泛素系统内, Atg8 蛋白的 C 端被蛋白酶 Atg4 剪切, 末端变为甘氨酸, 之后 Atg7 (E1) 将 Atg8 传递到 Atg3 (E2), 在 Atg12-Atg5-Atg16 的帮助下, Atg8 的 C 端甘氨酸 COOH 与自噬双层膜上的 PE 膜组分的氨基发生共价结合, 帮助自噬体双层膜的扩展。Atg12 被 Atg7 传递到另一个 E2: Atg10, 最后 C 端与 Atg5 中的赖氨酸侧链结合, 并结合 Atg16, 而 Atg16 可与自身结合, 形成二聚体, 最终 Atg5-Atg12、Atg16 构成 2:2:2 的复合体, 该复合体进一步与自噬体的双层膜结合, 帮助 Atg8 定位在双层膜上并控制双层膜的大小和曲度。该过程概括为图 2。

目前, 相继有研究组报道了 Atg7、Atg3、Atg10、Atg8 和 Atg12-Atg5 的蛋白结构, 为该途径提供了分子结构上的解释<sup>[24-28]</sup>。

### 3.5 自噬中的蛋白质修饰

自噬蛋白有很多翻译后修饰, 如 Atg13、Atg1 和 Atg3 等会发生磷酸化、乙酰化等多种修饰。乙酰化修饰在自噬的发生中起重要作用<sup>[29]</sup>。酵母细胞的乙酰化酶 ESA1 失活, 自噬不能正常发生, 研究人员通过蛋白质的相互作用和质谱分析鉴定, 发现 ESA1 可以乙酰化 Atg3 蛋白的多个赖氨酸位点, 在自噬体形成中促进 Atg8 与 PE 的共价结合反应。这一乙酰化修饰对自噬体的正常形成是必需的。泛素化修饰对自噬的影响也有报道。在哺乳动物细胞中, ULK1 可发生 K63 位的多泛素链修饰, 这对自噬的发生也是必需的<sup>[30]</sup>。此外, 在自噬中研究最多的是



注: 不同的形状和颜色表示该系统中各Atg蛋白, 其中E1是Atg7, E2分别是Atg3和Atg10, 而E3 很可能是Atg12-Atg5-Atg16复合体。

图2 酵母中的两套类泛素系统

关键的 Atg 蛋白上的多种磷酸化修饰变化。Atg13 被 TOR 激酶磷酸化, 在 TOR 失活后, Atg13 发生去磷酸化才会诱导自噬的发生。去磷酸化的 Atg13 会与自噬中唯一的激酶 Atg1 结合, 使得 Atg1 激酶活性升高, 发生自身磷酸化并招募其他 Atg 蛋白, 如 Atg8、Atg9 囊泡等, 起始自噬体双层膜的装配。此外, Beclin1 可被 ULK1 和 AMPK 磷酸化, 激活 VPS34 复合体, 而 Atg14 可被 TOR 磷酸化, 抑制 VPS34 的激酶活性。ULK1 还可以磷酸化 AMBRA1, 使 VPS34 从细胞骨架上脱离, 定位在自噬体起始位置<sup>[18,22,31-32]</sup>。

### 3.6 自噬体膜的来源

Atg 蛋白的发现和功能研究阐明了自噬体形成的分子调控机制, 但是自噬体形成过程中有一些关键问题依旧有待解答, 如自噬体双层膜的来源一直没有确定的结论, 目前在哺乳动物细胞中的研究中出现了多种膜来源的模型。自噬体膜的来源有内质网、线粒体膜、内质网和高尔基体的连接组分、高尔基膜、内吞体以及细胞质膜等。其中内质网起源说被很多研究人员认可。

#### 3.6.1 膜起源内质网

长期以来, 在哺乳动物细胞自噬的相关研究中, 自噬体形成位置一直是在内质网的膜上或者附近。Axe 等<sup>[33]</sup>发现蛋白 DFCP1 (double FYVE-containing protein 1) 定位在内质网和高尔基体上, 蛋白结构中

有两个 FYVE 结构域可结合 PI3P, 而在饥饿条件下, DFCP1 被诱导在内质网上形成点。LC3 的点则出现在 DFCP1 形成的 1 μm 直径的环状结构的中心。DFCP1 的环类似于 Ω, 该结构被称为欧米茄体 (omegasome)<sup>[34]</sup>。运用 3D 断层扫描显微成像技术展示出细胞内该结构实际上是三明治式的夹层, 形成欧米茄体的分离膜组分被两层内质网夹在中间, 分离膜组分有一细小管与内质网膜相连, 进一步证实了欧米茄体的结构存在。在分离的膜组分扩大延伸的过程中, 内质网可能持续提供膜。而且 70% 的自噬体中含内质网成分, 表明欧米茄体形成自噬体是基于内质网膜。

小分子化合物 3- 甲基腺嘌呤 (3-MA) 是复合体 PI3K 激酶的抑制剂, 阻止 PI3P 的产生, 会抑制欧米茄体的形成, 表明欧米茄体定位在内质网上脂分子 PI3P 高含量的位点。而 PI3K 复合体 I 的组分, Atg14 在内质网上定位, 对自噬体的形成非常重要。饥饿时, Atg14 由均匀分布变为内质网上的斑点。Atg14 蛋白的 N 端有保守性很高的半胱氨酸重复序列, 这对其定位是必需的<sup>[35]</sup>。突变该位点也阻止了自噬的发生, 进一步说明内质网在自噬体的形成中发挥重要作用, 提供了形成位点和膜组分。

#### 3.6.2 内质网-线粒体交接点

研究人员早已发现线粒体膜与自噬体双层膜的关系密切。有研究表明, 饥饿时蛋白 YFP-MitoTM,

线粒体外膜的标记物,与 LC3 标记的膜有共定位<sup>[36]</sup>,但是线粒体的内膜和内部基质蛋白却与 LC3 没有共定位。值得一提的是,只有外膜的外层脂分子锚定的蛋白才与 LC3 有定位,而如果是跨过外膜脂双分子层的蛋白,则不会与 LC3 有共定位。研究者认为这种情况是因为欧米茄体分离出的膜与线粒体外膜相连,但是连接处的高曲度阻止了跨脂双分子层的膜蛋白进入。该研究表明,细胞饥饿时线粒体的外膜贡献了自噬体的双层膜。

对于自噬体双层膜来源于内质网和线粒体外膜两种学说,最近 Yoshimori 研究组的工作提出了新的解释,将两者整合在一起。他们发现自噬体实际上起始于内质网和线粒体的交接处,而 YFP-Mito<sup>cb5</sup>TM 很有可能是通过该连接处到了欧米茄体的分离膜。已知该位点存在,并且在线粒体的分裂、钙信号的传导、脂分子的转运中有重要作用。内质网和线粒体外膜交界处的膜结构称为 MAM (mitochondria associated membrane),细胞饥饿后,在密度梯度离心分离出的 MAM 中有 PI3K 复合体。而 Atg5 在饥饿条件下在内质网上形成点,同时也与线粒体存在动态的结合。破坏该交接点后,抑制了 Atg14 和 LC3 点的形成,自噬体也不能正常形成<sup>[37]</sup>。

### 3.6.3 内质网的COPII小泡出位点

内质网的 COPII 小泡参与了内质网到高尔基的蛋白质转运过程。很早就有 COPII 小泡形成与自噬关系密切的报道。在酵母的 COPII 形成缺陷的突变体中,自噬体形成受阻,但是这些实验并不能证明自噬体形成与 COPII 形成的直接关系。最近研究表明,内质网到高尔基体的 COPII 形成的抑制剂会减少 Atg14 和 Atg16L 点的形成,抑制自噬体的发生,说明 COPII 小泡出芽在自噬体形成早期起重要作用。在酵母中的研究表明,PAS 定位靠近液泡和内质网膜,而形成中的自噬前体与 COPII 小泡的出芽位置 ERES 靠近。在自噬体形成中该位置也有 Atg9 囊泡和 Atg2-Atg18 复合体定位<sup>[38]</sup>。Graef 等<sup>[39]</sup>通过蛋白质组学发现,COPII 转运小泡的组分 Sec23 与多个 Atg 蛋白有相互作用,既定位在自噬体膜上,又定位在自噬体与内质网的相接部分 ERES 上。目前,自噬体的形成与内质网的出泡点的关系尚不清楚。但与此一致的是,内质网到高尔基体的膜转运在自噬中发挥重要作用。

### 3.6.4 内质网和高尔基体的交互成分(ERGIC)

最近有报道指出,ERGIC (endoplasmic reticulum-

golgi intermediate compartment, ERGIC) 可能为自噬体双层膜提供膜组分。Ge 等<sup>[40]</sup>利用体外的非细胞体系 (cell free system) 发现 Atg5 敲除的 MEF 细胞中的膜成分,本不能与 LC3 结合,却能在正常细胞的胞质裂解液中结合 LC3。这些膜成分的密度梯度离心显示,LC3 的定位与 ERGIC 膜蛋白的位置一致。通过抑制剂破坏掉 ERGIC,减少了 LC3 与 PE 的共价结合和点的形成,也减弱 Atg14L 在内质网膜的定位。

### 3.6.5 质膜和内吞泡

David Rubinsztein 研究组发现 Atg16 与质膜的网格蛋白 Clathrin 有结合,定位在网格蛋白包被的囊泡上。抑制网格蛋白介导的内吞也减少了 Atg16 的点和自噬体的数量<sup>[41]</sup>。SNARE 蛋白也定位在含有 Atg16 的囊泡上,介导囊泡的融合。敲低这些 SNARE 蛋白会抑制自噬体的形成,可能是 Atg16 的囊泡融合到了分离的膜组分中。Atg9 囊泡可通过网格蛋白 Clathrin 和 AP2 运到质膜上,与 Atg16 不同的是 Atg9 只定位在有 EEA1 的初级内吞泡上,但是 Atg9 和 Atg16 最终都会定位在有 Rab11 的次级内吞泡上<sup>[42]</sup>。因此,基于 Atg9 和 Atg16 在质膜和次级内吞泡的定位,该膜结构很可能为自噬体的形成提供膜或蛋白质成分。

循环的内吞泡在自噬体的形成中有重要作用。Sharon Tooze 研究组证明 Atg9 有部分定位在内吞泡<sup>[43]</sup>。SNX18 蛋白也可调控细胞自噬<sup>[44]</sup>。SNX18 含有 BAR 结构域,能感受膜的曲度。SNX18 可通过 C 端的 PX-BAR 结构域与 Atg16L 结合,通过 N 端的 LIR 序列与 LC3 结合。而且 SNX18 和 Atg16L 都定位在内吞泡上,可能为自噬体提供脂的来源。

### 3.6.6 Atg9的囊泡

哺乳动物细胞的 Atg9 囊泡与 LC3 定位,参与自噬体双层膜的形成是被人熟知的。但是,利用免疫电镜成像一直观察不到自噬体上的 Atg9 蛋白。Atg9 的囊泡可能只是瞬时同分离膜或者自噬体结合。一系列研究表明,Atg9 囊泡可以聚集而且融合,这可以是分离的膜组分的起始膜来源。值得注意的是,酵母中的研究表明,在一个自噬体形成中只需要少数几个 Atg9 囊泡即可完成。高分辨率显微镜观察到大概 3 个囊泡会定位在 PAS 上,帮助双层膜的起始,最终囊泡上的 Atg9 定位在外膜上,在自噬体形成后离开,该过程没有更多的 Atg9 囊泡参与。然而,这几个 Atg9 的囊泡不足以完全提供自噬体的双层膜,因此,自噬体双层膜扩展过程中存在其



他的膜来源。而 Atg9 的囊泡对自噬体双层膜的起始过程是必需的<sup>[45]</sup>。

#### 4 结论与展望

自噬过程是细胞的基本生命活动之一, 对细胞的存活是至关重要的。自噬的研究已经有 50 多年的历史, 随着酵母和其他模式生物中一系列自噬过程分子调控机制的阐明, 自噬已经是生命科学领域内的热点。但是, 我们现在尚处在自噬研究的早期阶段, 在自噬的具体机制中依旧有很多问题和挑战存在, 我们依旧不知道自噬体起始过程中的关键步骤, 比如自噬体起始核心如何形成, 膜上的脂分子来源于何处, 如何转运到自噬体膜上。而在自噬体双层膜的扩张中, 膜的曲度如何维持以及自噬体的大小如何决定都是有待解决的问题。自噬中关键的 Atg 蛋白的结构有待解析, 如酵母或者哺乳动物细胞 PAS 上 Atg1/ULK1-Atg13 复合体的完整结构、PI3K 激酶复合体的结构以及 Atg5-Atg12-Atg16 复合体的完整高分辨率晶体结构等都尚无报道。这些结构的解析将有助于我们深入理解自噬机制。自噬与人类多种疾病有密切关系, 自噬机制的深入研究将为癌症、神经退行性疾病等提供新的治疗方法, 而自噬相关蛋白的结构解析将为未来临床应用提供潜在药物靶标。

#### [参 考 文 献]

- [1] Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 2014, 24: 24-41
- [2] Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell*, 2009, 17: 87-97
- [3] Farre JC, Manjithaya R, Mathewson RD, et al. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell*, 2008, 14: 365-76
- [4] Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*, 1967, 33: 437-49
- [5] Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 1889-92
- [6] Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, 1992, 119: 301-11
- [7] Harding TM, Morano KA, Scott SV, et al. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, 1995, 131: 591-602
- [8] Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 2003, 5: 539-45
- [9] Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, et al. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1997, 192: 245-50
- [10] Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, et al. Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*, 2015, 522: 359-62
- [11] 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*. *Cell*, 2009, 136: 308-21
- [12] 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 Biol Chem*, 1998, 273: 33889-92
- [13] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19: 5720-8
- [14] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999, 402: 672-6
- [15] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 2006, 441: 885-9
- [16] Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 2010, 465: 942-6
- [17] Schulze RJ, Weller SG, Schroeder B, et al. Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J Cell Biol*, 2013, 203: 315-26
- [18] Wong PM, Puente C, Ganley IG, et al. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*, 2013, 9: 124-37
- [19] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, 2000, 150: 1507-13
- [20] Yeh YY, Shah KH, Chou CC, et al. The identification and analysis of phosphorylation sites on the Atg1 protein kinase. *Autophagy*, 2011, 7: 716-26
- [21] Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, et al. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell*, 2014, 53: 471-83
- [22] Russell RC, Tian Y, Yuan H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 741-50
- [23] Nagy P, Hegedűs K, Pircs K, et al. Different effects of Atg2 and Atg18 mutations on Atg8a and Atg9 trafficking during starvation in *Drosophila*. *FEBS Lett*, 2014, 588: 408-13
- [24] Hong SB, Kim BW, Lee KE, et al. Insights into noncanonical E1 enzyme activation from the structure of autophagic E1 Atg7 with Atg8. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 1323-30
- [25] Yamada Y, Suzuki NN, Hanada T, et al. The crystal

- structure of Atg3, an autophagy-related ubiquitin carrier protein (E2) enzyme that mediates Atg8 lipidation. *J Biol Chem*, 2007, 282: 8036-43
- [26] Hong SB, Kim BW, Kim JH, et al. Structure of the autophagic E2 enzyme Atg10. *Acta Crystal Sect D, Biol Crystal*, 2012, 68: 1409-17
- [27] Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, et al. The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells*, 2004, 9: 611-8
- [28] Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, et al. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 59-66
- [29] Yi C, Ma M, Ran L, et al. Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science*, 2012, 336: 474-7
- [30] Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 406-16
- [31] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res*, 2014, 24: 42-57
- [32] Kim J, Kim YC, Fang C, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 2013, 152: 290-303
- [33] Axe EL, Walker SA, Manifava M, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 2008, 182: 685-701
- [34] Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 2010, 6: 506-22
- [35] Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, et al. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol*, 2010, 190: 511-21
- [36] Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 2010, 141: 656-67
- [37] Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 2013, 495: 389-93
- [38] Suzuki K, Akioka M, Kondo-Kakuta C, et al. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 2013, 126: 2534-44
- [39] Graef M, Friedman JR, Graham C, et al. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 2918-31
- [40] Ge L, Zhang M, Schekman R. Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment. *eLife*, 2014, 3: e04135
- [41] Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, et al. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 747-57
- [42] Puri C, Renna M, Bento CF, et al. ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 2014, 10: 182-4
- [43] Young AR, Chan EY, Hu XW, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, 2006, 119: 3888-900
- [44] Knaevelsrud H, Soreng K, Raiborg C, et al. Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. *J Cell Biol*, 2013, 202: 331-49
- [45] Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol*, 2012, 198: 219-33