

自噬: 细胞自身物质更新代谢的重要机制

张慧, 张宏*

中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

* 联系人, E-mail: hongzhang@sun5.ibp.ac.cn

2016年诺贝尔生理学或医学奖授予日本东京工业大学分子细胞生物学家大隅良典(Yoshinori Ohsumi), 以表彰他在阐明细胞自噬分子机制方面所作出的杰出贡献。他的研究为预防和治疗由自噬引发的包括癌症及神经退行性疾病有重要意义, 并为药物研发提供了理论依据和新的方向。

1 自噬是把双刃剑, 合理驾驭克疾病

细胞自噬(autophagy)是真核生物中一种高度保守的由溶酶体介导的降解途径。在各种胁迫条件下, 细胞通过形成双层膜结构的自噬小体, 包裹一部分胞内物质, 将其送到溶酶体中进行降解并重新回收利用, 从而维持细胞的存活^[1]。在生理条件下, 自噬作为细胞的“清道夫”, 清除受损或老化的细胞器和有毒的蛋白质聚合体, 从而维持细胞的稳态平衡。在各种胁迫条件下, 自噬又能降解一部分胞内物质, 为细胞度过胁迫环境提供物质和能量。

细胞自噬参与多细胞生物发育的各个过程, 从成长、发育到衰老, 自噬在这些过程中发挥着重要的作用。生理水平的自噬参与细胞的自我修复过程, 清除细胞内的“垃圾”、实现细胞自身的代谢需要和某些细胞器的更新, 防止细胞非正常死亡, 维持细胞、组织及器官的稳态平衡, 从而保证机体健康。自噬是把双刃剑, 自噬水平过高或过低都会导致机体稳态失衡, 甚至一些疾病的发生发展。自噬被抑制时, 有可能引发人类神经退行性疾病、糖尿病、肿瘤等; 但在某些情况下, 自噬过激活可能会导致细胞死亡等病理状态^[2]。因此, 阐明细胞自噬的分子机制和调控机理, 对我们理解自噬在人类疾病中的作用有重要意义。让我们来了解一下细胞自噬的研究近况。

2 “电镜”喜获新知, 奈何研究停滞

细胞自噬这一现象最早发现于20世纪50~60年代。1956年, 比利时生物学家汀·德·迪夫(Christian de duve)利用电子显微镜观察到, 细胞内的一些膜性结构包裹着胞内一部分物质, 如线粒体等^[3]。随后他们在小鼠肝脏细胞切片中也发现了类似的结构, 胰高血糖素(glucagon)处理小鼠肝脏细胞时, 胞内近核处会形成大量溶酶体, 而且这些



张宏 博士, 中国科学院生物物理研究所研究员, 博士研究生导师, 生物大分子国家重点实验室副主任, 创新课题组组长。2001年获美国爱因斯坦医学院博士学位。2012年入选中国科学院“百人计划”, 同年获国家杰出青年科学基金资助。研究方向为多细胞生物中自噬作用的机理和调控机制。

溶酶体内都包裹着处于不同降解阶段的线粒体^[4]。此外, Clark团队^[5]还发现, 新生鼠的肾小管细胞中, 也有一些膜状结构, 包裹一部分胞内物质, 如线粒体等。

那时通常认为溶酶体主要参与内吞作用, 但对于溶酶体降解胞内物质的发现还是全新的, 对如何研究这一过程更是束手无策。随后几年的研究让这一降解过程渐渐明朗: 细胞首先形成一个包裹自身物质的、双层膜结构的、不含水解酶的自噬小体, 然后该双层膜结构转变为处于不同降解阶段的单层膜自噬溶酶体。至此, 人们对这一胞内降解过程才有了一个初步的认识。

1963年, de Duve等人^[6]在国际溶酶体大会上, 将这一降解过程命名为自噬, 并创造了Autophagy一词, 引申为“自己吃自己(self eating)”。由于发现胰高血糖素可以诱导小鼠肝脏中的自噬作用, 研究人员开始广泛关注自噬的生理功能。科学家们尝试了多种方法来研究自噬的功能, 但因缺乏合适的研究体系和先进的技术方法, 其后的近20年人们对自噬的了解几乎陷于停顿。

3 寻求简单模型, 揭秘分子机制

20世纪90年代, 东京大学的大隅良典先生选择酵母为研究自噬的模型。酵母有一个巨大液泡, 含有大量的水解酶, 其功能类似于动物细胞中的溶酶体。当氮源匮乏时, 酵母会诱发包子体的形成, 或者会诱发酵母分裂。当氮源匮乏时, 这些分化和重组过程需要细胞降解大量的蛋白质。因此, 大隅先生猜测, 在缺乏液泡降解酶的酵母细胞

中,如果氮源匮乏,那么运送到液泡中的物质可能会由于不能正常降解而大量累积,这样更加便于观察。

在氮源匮乏1 h后,大隅先生惊喜的发现,利用光学显微镜可以观察到缺乏液泡降解酶的酵母液泡内存在有自噬小体;3 h后液泡内聚集了大量的自噬小体,这是人类首次在酵母中观察到自噬现象^[7]。这一结果不仅证明了自噬存在于酵母细胞中,更为建立酵母为研究细胞自噬的遗传筛选模型奠定了基础。

由于在光学显微镜下可以通过观察自噬小体的形成来检测酵母的自噬过程,这极大地方便了遗传研究工作的开展。大隅先生推测,如果某一个自噬基因缺失了,并阻止了自噬的进程,饥饿诱导形成的大量自噬小体就有可能被抑制,液泡中就不会有自噬小体的累积。在这一思路的指导下,他们利用营养缺乏的培养基培养被诱变的多种蛋白酶缺失的酵母株,通过遗传筛选得到了一个相关基因,命名为*apg1*(即autophagy,之后被命名为*atg1*)^[8]。*atg1*突变体在营养匮乏条件下存活率显著降低,表明自噬对酵母存活是必须的。接下来大隅良典课题组利用酵母做遗传筛选,他们饥饿处理酵母,首先筛选那些存活率降低的突变体,然后再进一步鉴定液泡内无自噬小体聚集的突变体。通过这次筛选他们鉴定出了包括*atg1*在内的15个*atg*相关的基因^[8]。

随后十几年,他们深入研究这些基因的功能,发现不同的自噬基因在自噬的不同步骤发挥作用,从而构建了一条自噬通路的核心机制。其中最重要的贡献是阐明了两个类泛素系统:Atg12与Atg5的偶联和Atg8与PE的偶联^[9,10]。这两个偶联系统在自噬小体的形成过程中发挥了重要作用。大隅先生开创性地建立了酵母为研究自噬的模型,并鉴定了参与自噬过程的关键基因。这些工作阐明了自噬过程的基本机制,为人们理解自噬的生理过程奠定了基础。

4 诺奖虽给一人,却鼓舞整个领域

虽然2016年的诺贝尔生理学或医学奖只颁发给了大隅良典先生一人,但是自噬领域的快速发展离不开其他科学家的贡献。美国密歇根大学的Daniel Klionsky教授主要研究API蛋白酶被运送到液泡内的过程(Cvt通路)。API蛋白在胞内合成,并以前体的形式(proAPI)存在于胞内,之后proAPI被运送到液泡中,其氨基端被剪切后发挥水解酶的功能^[11]。Klionsky及团队通过筛选proAPI聚集的突变体找到了一系列参与Cvt通路的基因^[12]。Klionsky鉴定出来的Cvt基因与大隅良典课题组发现的自噬基因部分相同,他们后来证明proAPI被分选进入一个类似于自噬小体的双层膜结构,进而被运送到液泡中。此外,以往人们认为细胞自噬是随机的包裹一部分胞内物进行降解,但Klionsky的研究为人们了解选择性自噬的机制提供了新的思路。

在对酵母自噬通路有了一定的了解后,很多科学家

开始研究更复杂的高等生物体内的自噬通路。大隅良典实验室的吉森保(Tamotsu Yoshimori)和水岛昇(Noboru Mizushima)等科研人员发现哺乳动物细胞中的自噬通路也是高度保守的(图1)。吉森保博士发现哺乳动物细胞中自噬的标志分子——LC3(Atg8的同源蛋白)^[15],并利用LC3与PE的偶联水平建立了检测哺乳动物细胞中自噬水平的方法,该方法已经成为监测自噬水平的标准方法。

20世纪末,科学家已经成功地搭建了自噬通路的基本框架,但对自噬的生理功能的研究还鲜有突破。美国西南医学中心的Beth Levine教授发现自噬基因Beclin 1(酵母*atg6*的同源基因)可以抑制肿瘤发生,而且发现Beclin 1突变与人类乳腺癌的发生有关^[16]。这一发现极大地推动了随后自噬与疾病相关研究的爆炸性增长。Beth Levine教授在自噬异常与人类疾病方面做出了重要的贡献,虽然她没有摘得桂冠,但她非常兴奋地说:“这是整个自噬领域的胜利”!

我国也有一批中青年科学家在自噬领域取得了重要成果,使我国的自噬研究水平处于世界先进行列。本课题组在国际上首次建立了可用于遗传筛选的多细胞生物线虫自噬研究模型,并通过遗传筛选找到了很多多细胞生物特有的自噬新基因,极大地推动了人们对多细胞自噬的认识(图2)^[17]。浙江大学刘伟老师在自噬分子机制方面,清华大学俞立实验室在自噬和溶酶体再生方面,中国科学院动物研究所陈佺实验室在线粒体选择性自噬方面,清华大学陈烨光实验室在自噬和信号传导方面,北京大学医学院朱卫国和中国科学院上海生命科学院胡荣贵在自噬异常与肿瘤发生方面都做出了可喜的成绩。

5 面纱刚刚揭开,我辈需更努力

虽然2016年的诺贝尔生理学或医学奖颁给了自噬,但自噬领域的研究才刚刚开始。目前人们对自噬的分子机



图1 大隅良典(中)、吉森保(左)和水岛昇(右)赴中国敦煌参加第三届中日细胞自噬研讨会



图2 大隅先生赴敦煌参加第三届中日自噬研讨会并考察丹霞地貌

制和调控机理的认识主要局限在单细胞酵母中,对更加复杂的多细胞生物自噬通路了解甚少。多细胞生物的自噬过程比酵母的自噬过程复杂得多,包括多细胞生物特有的,酵母中不存在的步骤,如自噬小体复杂的成熟过程。而且

多细胞生物作为一个有机体,拥有多种类型的细胞、组织和器官,自噬过程在不同的组织器官中也差异。此外,多细胞生物发育过程中还需要感知多种不同的内外信号来调控细胞自噬活性,从而维持各组织、器官甚至整个机体的功能。因此,仅在酵母和体外培养细胞系中的研究无法全面地揭示多细胞生物不同生长阶段和不同组织中特有的自噬机制和功能。

研究发现细胞自噬参与多种人类疾病的发生发展,如肿瘤、神经退行性疾病、心血管疾病以及代谢疾病。但自噬参与的疾病发病机制尚不十分清楚。深入剖析多细胞生物的自噬过程,系统阐明自噬在人类自噬相关疾病的发生发展中的作用至关重要。这些研究有助于找到诊断和治疗这些疾病的新靶点,并对这类疾病的发病机制和临床治疗提供理论支撑。

总之,高等生物细胞自噬的研究才刚刚起步,这个领域里还有太多亟需解决的问题,仍然需要科学家继续努力。

参考文献

- 1 Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 458–467
- 2 Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451: 1069–1075
- 3 Novikoff A B, Beaufay H, de Duve C. Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol*, 1956, 2: 179–184
- 4 Ashford T P, Porter K R. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*, 1962, 12: 198–202
- 5 Clark S L J. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol*, 1957, 3: 349–362
- 6 de Duve C. General properties of lysosomes. The lysosome concept. In: Reuck A V S, Cameron M P, eds. *Ciba Foundation Symposium: Lysosome*. Boston: Little, Brown and Company, 1963
- 7 Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, et al. Autophagy in yeast demonstrated with roteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, 1992, 119: 301–311
- 8 Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1993, 333: 169–174
- 9 Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 1998, 395: 395–398
- 10 Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 2000, 408: 488–492
- 11 Klionsky D J, Cueva R, Yaver D S. Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol*, 1992, 119: 287–299
- 12 Harding T M, Morano K A, Scott S V, et al. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, 1995, 131: 591–602
- 13 Scott S V, Baba M, Ohsumi Y, et al. Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol*, 1997, 138: 37–44
- 14 Baba M, Osumi M, Scott SV, et al. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*, 1997, 139: 1687–1695
- 15 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19: 5720–5728
- 16 Liang X H, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999, 402: 672–676
- 17 Tian Y, Li Z, Hu W, et al. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*, 2010, 141: 1042–1055

Autophagy: A self-eating mechanism for maintaining cellular homeostasis

ZHANG Hui & ZHANG Hong

Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

On October 3, 2016, Dr. Yoshinori Ohsumi from the Tokyo Institute of Technology was awarded the Nobel Prize in Physiology and Medicine “for his discoveries of mechanisms for autophagy”. Autophagy involves the engulfment of a portion of the cytosolic contents in a double-membrane structure, called the autophagosome, and its subsequent delivery to the lysosome for degradation. Autophagy plays an important role in a wide variety of physiological processes in higher eukaryotes, including adaptation to various metabolic stress conditions, removal of aggregate-prone proteins and damaged organelles. Dysregulated autophagy activity has been linked to various pathologic conditions such as neurodegeneration and tumorigenesis. Autophagy was described in the late 1950s and early 1960s starting with the finding of partially degraded cytosolic contents inside membrane-bound bodies in kidney and liver cells under the electron microscope. In the early 1990s, Dr. Ohsumi Yoshinori established yeast as a genetic system to characterize the autophagy pathway. Using this model, Dr. Ohsumi’s lab performed genetic screens and identified a set of Atg genes essential for formation of autophagosomes, laying the groundwork for our understanding of the molecular mechanism of autophagy. Many scientists throughout the world, including many research groups in China, have also made significant contributions to our understanding of autophagy and its physiological function.

autophagy, yeast, ATG, autophagosome, CVT

doi: 10.1360/N972016-01167