

HOPS复合体蛋白在细胞自噬过程中的功能研究

胡晚秋^{1#} 林志祥^{2#} 陈丽莲³ 晏向华⁴ 陈放^{1*}

¹四川大学生命科学学院, 成都 610064; ²清华大学生命科学学院, 北京 100064;

³中国农业大学生物学院, 北京 100083; ⁴华中农业大学动物科学与技术学院, 武汉 430070)

摘要 自噬(autophagy)是一种溶酶体依赖性的细胞内降解途径,其主要功能是将生物大分子(蛋白质、多糖等)或细胞器(线粒体等)回收至溶酶体中并将其降解为单糖、氨基酸等小分子以重复利用。发现HOPS复合体中的两个基因*vps39*和*vps41*的缺失会导致酵母内GFP-ATG8大量积累。进一步研究表明,积累的原因是GFP-ATG8与液泡不能发生融合。而在HOPS复合体中的另外两个基因*vps16*和*vps18*缺失的情况下,自噬融合没有受到影响;在*vps16*和*vps18*双敲除的菌株中,自噬融合同样没有受到影响。该实验结果为理解HOPS复合体的功能和自噬体与液泡融合的过程提供了新的线索。

关键词 自噬;膜泡融合;HOPS复合体

自噬(autophagy)是一种溶酶体依赖性的细胞内降解途径,其主要功能是将生物大分子(蛋白质、多糖等)或细胞器(线粒体等)回收至溶酶体中并将其降解为单糖、氨基酸等小分子以重复利用^[1-3]。自噬在发育、程序性死亡、免疫应答以及细胞内细菌等病原体的清除中都有重要作用,并与癌症、帕金森氏综合征等神经退行性疾病的病理进程密切相关^[2-4]。

在自噬过程中,细胞内首先形成延伸的杯状膜片将周围细胞质包被以形成一个封闭的双层膜囊泡——自噬体(autophagosome),随后自噬体的外膜与溶酶体膜(在酵母细胞中为液泡)融合,使内容物暴露于溶酶体的水解酶中,最终自噬体的内膜与被包裹的物质一同被降解,所产生的分子会通过溶酶体膜被释放到细胞内回收利用。目前研究认为,自噬体与溶酶体/液泡之间的融合涉及到的蛋白同液泡与液泡之间的融合几乎完全相同^[5]。许多证据表明,HOPS复合体在液泡之间的融合过程中起重要作用^[6-8]。HOPS复合体由六个从79 kDa~123 kDa的蛋白所构成。其中*vps11*、*vps16*、*vps18*、*vps33*属于C类基因家族,而*vps41*和*vps39*属于B类基因家族^[7-8]。研究表明,这个复合体介导了液泡与液泡之间最初的连接^[6],最近的工作还发现HOPS复合体可以通过*vps33*与t-SNARE *vam3*以及Rab GTPase *Ypt7*发生相互作用^[6,9-10]。有研究显示,在*vps41*和*vps39*基因缺失的酵母中,会导致液泡形态的改变,并影响API (aminopeptidase I)与液泡的融合^[11]。尽管人们对于HOPS复合体的六个

蛋白都有所研究,但是这六个蛋白对于整个复合体所起到的单独的功能尚不清楚,而且HOPS复合体在自噬体与液泡融合中是否有作用也不清楚。

我们在进行酵母全基因筛选时,成功鉴定出HOPS复合体中与细胞自噬相关的基因*vps39*、*vps41*。进一步研究表明,这些蛋白可能在自噬体与酵母液泡的融合过程中起关键作用。令人惊异的是,我们发现HOPS复合体中C类家族的*vps16*、*vps18*并不参与自吞噬的过程。我们的实验结果为理解HOPS复合体的功能和自噬体与液泡融合的过程提供了新的线索。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验中使用的酵母菌株依次为:转化了GFP-ATG8的野生型BY4741, *vps16*Δ、*vps18*Δ、*vps39*Δ、*vps41*Δ、*ypt7*Δ、*vam3*Δ(表1)。野生型以及突变菌株购自Invitrogen公司。GFP-ATG8质粒由Yoshinori Ohsumi实验室所赠。

同源重组验证使用的*vps16*引物,上游引物:5'-CTA GAA TAT GCG AGT CAA ACT GC-3';下游引物:5'-ATT CGT GTC CTT AAC AAC TAC CG-3'。

收稿日期:2011-01-02 接受日期:2011-03-31

国家十一五科技支撑项目(No.2006BAD07A04)资助项目

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 028-85417281, Email: chenfang@scu.edu.cn

表 1 本研究中使用的菌种

Table 1 Yeast strains used in this study		
菌株	基因型	参考文献
Strain	Genotype	Reference
WT	BY4741 GFP-Atg8::URA	Kim <i>et al.</i>
<i>vps16Δ</i>	BY4741 <i>vps16Δ</i> GFP-Atg8::URA	This study
<i>vps18Δ</i>	BY4741 <i>vps18Δ</i> GFP-Atg8::URA	This study
<i>vps39Δ</i>	BY4741 <i>vps39Δ</i> GFP-Atg8::URA	This study
<i>vps41Δ</i>	BY4741 <i>vps41Δ</i> GFP-Atg8::URA	This study
<i>ypt7Δ</i>	BY4741 <i>ypt7Δ</i> GFP-Atg8::URA	This study
<i>vam3Δ</i>	BY4741 <i>vam3Δ</i> GFP-Atg8::URA	This study

1.2 培养基配方

酵母SD-Ura培养基: 1 L ddH₂O、1.7 g酵母氨基、20 g葡萄糖、5 g (NH₄)SO₄、10 mL氨基酸混合液。

酵母SD-N饥饿培养基: 1 L dd H₂O、1.7 g酵母氨基、20 g葡萄糖。

酵母YPD培养基: 1% 酵母提取物、2%蛋白胨、2% 葡萄糖、95% dd H₂O。

1.3 化学试剂

裂解工作液配方: 1 mL lysis buffer + 100 μL 10%

SDS + 11 μL PI + 11 μL PMSF。

转化用 PEG: 由 50% PEG4000、10×TE、10×LiAC, 配制成终浓度分别为40%、1×、1×。

1.4 仪器设备

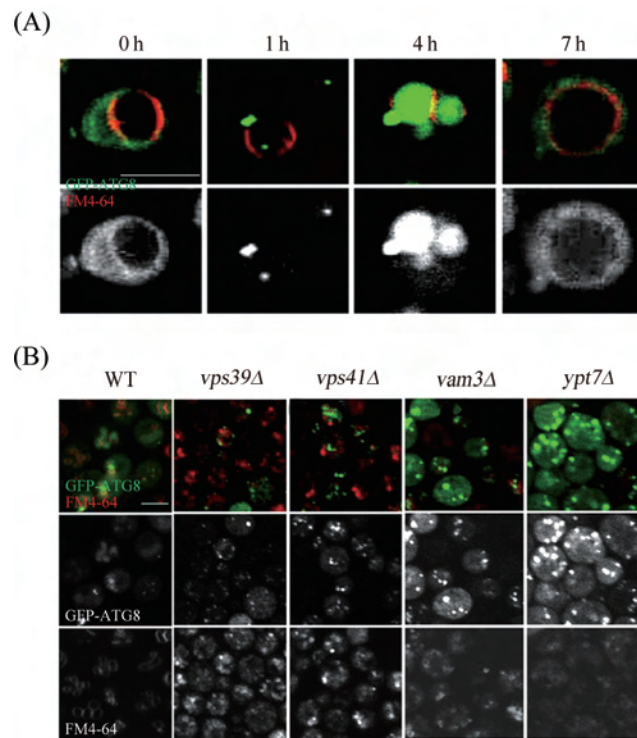
本实验中图像采集使用的是OLYMPUS FV1000激光共聚焦显微镜。所有图像采取均选取沿轴向接近半径最大处, 进行单层扫描。

2 结果

2.1 酵母自吞噬过程的细胞生物学描述

在本课题研究中, 为了更准确地进行基因筛选, 首先探索野生型酵母自噬性状的变化。实验中, 采用GFP-ATG8标记自噬体, FM4-64对液泡进行染色。初步实验结果表明: 饥饿0 h、1 h、4 h、7 h这四个时间点, 最适宜观察酵母发生自噬的情况。野生型酵母性状随饥饿的变化见图1A。

根据图1A, 在饥饿0 h时, GFP-ATG8主要在细胞内呈现弥散状, 点状结构的自噬体较少; 当饥饿1 h时, 由于受到饥饿的刺激, 自噬水平明显升高, GFP-



A: 野生型或突变型酵母转化自吞噬标记蛋白GFP-ATG8(绿色), 用FM4-64对液泡进行染色(红色)。野生型酵母进行饥饿处理1~7 h, 样品用共聚焦显微镜进行活细胞成像; B: WT、*vps39Δ*、*vps41Δ*、*vam3Δ*、*ypt7Δ*型酵母进行饥饿处理4 h, 样品用共聚焦显微镜进行活细胞成像。标尺=5 μm。

A: wild type or mutation yeasts were transmitted with autophagy marker GFP-ATG8 (green), and vacuole was stained with FM4-64 (red), WT cells were starved from 1 to 7 hours for living images; B: WT, *vps39Δ*, *vps41Δ*, *vam3Δ*, *ypt7Δ* yeasts were starved 4 hours for living images. Scale bar=5 μm.

图 1 酵母的自吞噬过程

Fig.1 Process of autophagy in yeast

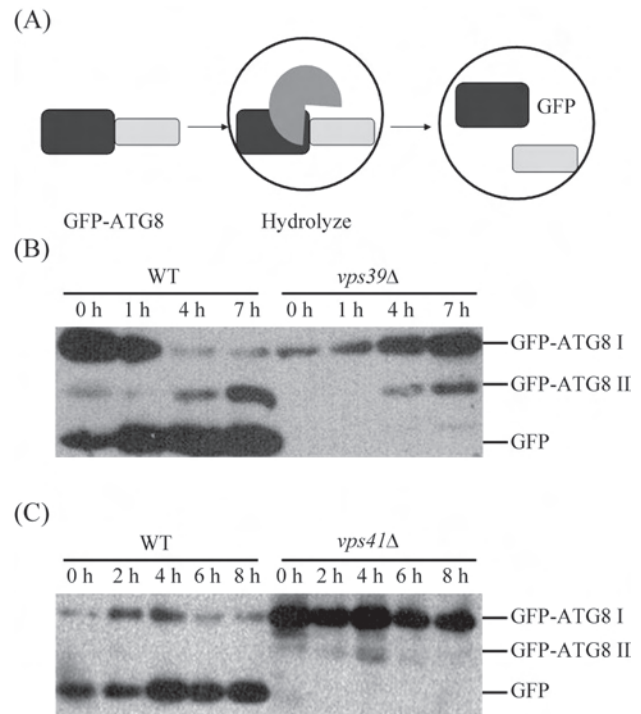
ATG8点状结构增多, 自噬体大量形成; 当饥饿4 h时, 由于大部分自噬体已经与液泡融合, 受到水解酶的作用, GFP信号在液泡内弥散; 当饥饿7 h时, 受到液泡酸性pH以及降解的影响, GFP信号的强度在液泡内大大减少, 有GFP-ATG8点状结构出现, 即又有新的自噬体形成。

由于本课题主要研究对象是自噬的融合过程, 野生型酵母在饥饿4 h左右, 几乎所有自噬体都进入液泡中, 易于观察判断, 因此在之后的基因筛选中, 主要选取饥饿4 h作为观察的实验点。

2.2 *vps39*、*vps41*的缺失影响GFP-ATG8与液泡的融合

根据图1的结果, 在饥饿条件下, GFP-ATG8以及FM4-64信号的相对分布会发生变化。因此, 我们利用转化有GFP-ATG8的基因缺失型菌种, 在共聚焦显微镜下观察这些菌株在饥饿条件下的性状变化, 以方便进行基因筛选。在基因筛选过程中, 我们发现一些基因的缺失对自噬过程造成了极大的影响。具体实验结果见图1B, 图中所取的时间点为饥饿4 h。这个时间点, 野生型酵母的GFP-ATG8已经与液泡发生融合。然而在*vps39*和*vps41*基因缺失性突变的菌株中, 没有观察到GFP信号在液泡中弥散的现象, 不仅如此, 在这两个突变株中, 有GFP-ATG8点状结构的大量积累, 并且这些GFP-ATG8的点状结构几乎与液泡没有共定位。虽然, 我们需要进一步的实验数据表明自噬体已经完整地形成, 但GFP-ATG8的点状结构可以表明至少类似自噬体的结构是能够进行装配的。值得一提的是, 在*vps39*和*vps41*基因缺失性突变的菌株中, 液泡的形态也发生了较大的改变, 由野生型的大液泡改变为小的点状小液泡。由于*vps39*和*vps41*基因属于C类的基因家族, 液泡的这种形态和之前研究是一致的。

为了更进一步证实实在*vps39*和*vps41*基因缺失性突变的菌株中, GFP-ATG8与液泡无法融合, 我们试图利用生物化学手段。在野生型酵母中, 当自噬体与液泡发生融合后, 自噬体内膜上的GFP-ATG8暴露于液泡水解酶中, 于是GFP就会被切下来, 由于GFP结构非常紧密, 因此降解较慢(图2A)。因此, 我们可以通过观察GFP的剪切来衡量细胞自噬的融合过程(图2B和图2C)。 *vps39*和*vps41*的缺失性突变菌株中, GFP-ATG8中的GFP几乎完全没有被剪切下来, 生化实验结果也进一步验证了显微镜下的结果。



A: GFP-ATG8剪切模型; B, C: 野生或突变型酵母饥饿处理后进行Western blot, 使用Image J软件对GFP-ATG8剪切进行定量分析。

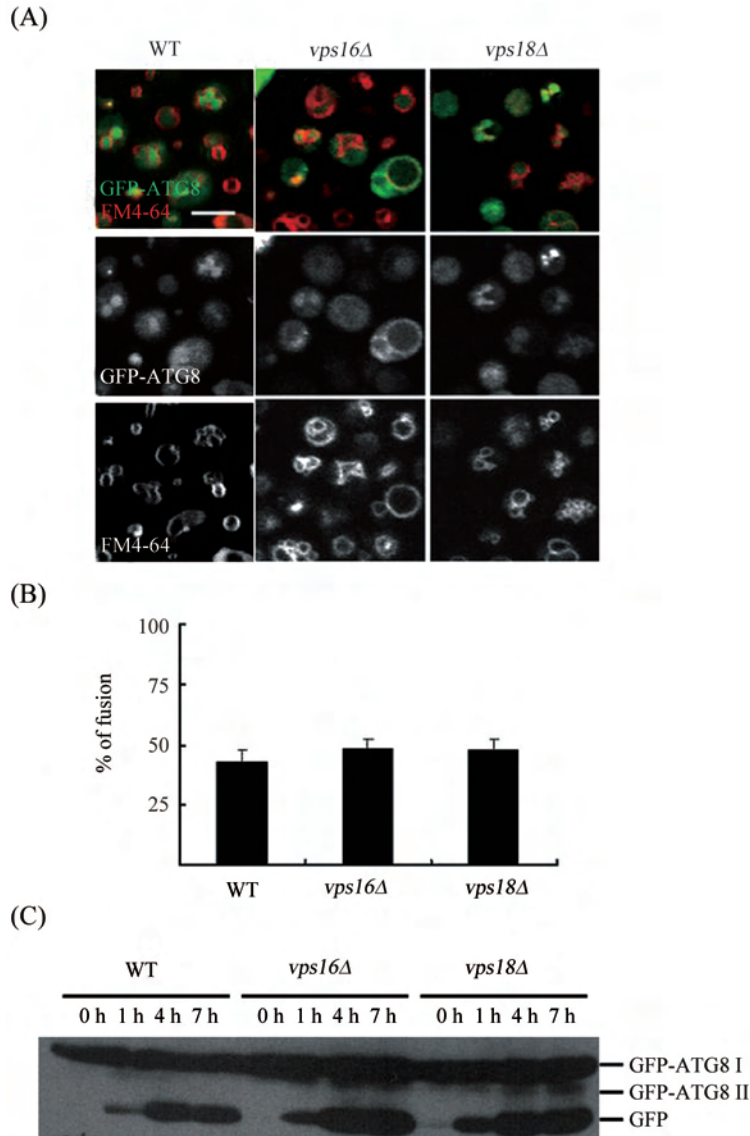
A: model of GFP-ATG8 cleavage; B, C: WT or mutant yeasts were starved for indicated hours before harvested for Western blot.

图2 *vps39*、*vps41*缺失抑制GFP-ATG8的正常剪切
Fig.2 *vps39*, *vps41* losses block GFP-ATG8 cleavage

之前研究表明, HOPS复合体与Rab GTPase Ypt7以及SNARE蛋白Vam3有相互作用。因此, 对*ypt7*以及*vam3*缺失的菌株进行饥饿处理, 观察这两个基因缺失对自噬的影响(图1B)。在*ypt7*以及*vam3*缺失性突变的菌株中, 与*vps39*、*vps41*缺失性突变的菌株相同, 在饥饿4 h条件下, 有GFP-ATG8点状结构的大量积累, 并且这些点状结构几乎与液泡没有共定位。而同样在*ypt7*和*vam3*基因缺失性突变的菌株中, 液泡的形态也发生了较大的改变, 由野生型的大液泡改变为小的点状小液泡。

2.3 *vps16*、*vps18*的缺失对GFP-ATG8与液泡的融合没有影响

我们针对HOPS复合体另外两个基因*vps16*和*vps18*的突变株进行观察。有趣的是, 从拍摄的照片来看, 这两个基因的突变株在饥饿4 h时, 并没有GFP-ATG8点状结构的积累, 而且表现型几乎与野生型一致(图3A)。为了避免个别细胞对整体情况的影响, 我们对饥饿4 h发生融合的细胞所占的比例进行数据统计(图3B)。结果显示, *vps16*、*vps18*缺失株相



A: WT、*vps16Δ*、*vps18Δ*型酵母转化自吞噬标记蛋白GFP-ATG8(绿色), 用FM4-64对液泡进行染色(红色), 饥饿处理4 h, 样品用共聚焦显微镜进行活细胞成像, 标尺=5 μm; B: 饥饿4 h后, WT、*vps16Δ*、*vps18Δ*型酵母中能够发生融合的细胞比例; C: 野生或突变型酵母饥饿处理后进行Western blot。

A: WT, *vps16Δ*, *vps18Δ* yeasts were transmitted with autophagy marker GFP-ATG8 (green), and vacuole was stained with FM4-64 (red). Cells were starved 4 hours for living images. Scale bar=5 μm; B: percentage of fusion cells in WT, *vps16Δ*, *vps18Δ* yeasts after 4 h starvation; C: WT, *vps16Δ*, *vps18Δ* yeasts were starved for 0, 1, 4, 7 h before harvested for Western blot.

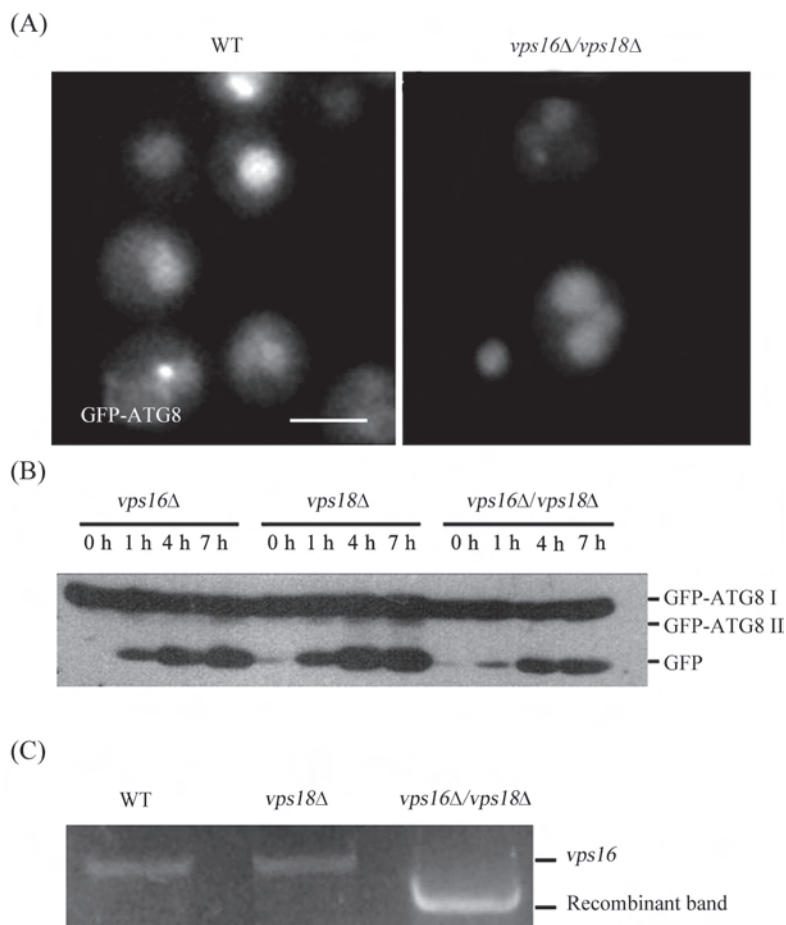
图3 *vps16*、*vps18*缺失不影响GFP-ATG8与液泡之间的融合

Fig.3 *vps16*, *vps18* losses have no influence on fusion between GFP-ATG8 and vacuole

对于野生株并没有明显差异。为了进一步证明此结论, 我们同时观察了GFP的剪切(图3C)。结果显示, *vps16*和*vps18*的缺失对GFP的剪切, 与野生型相比, 几乎没有受到影响。因此, 我们得到了相同的结论: *vps16*和*vps18*基因缺失对自噬融合过程没有影响。

由于HOPS复合体中的蛋白结构在C末端以及N末端存在一定保守性, 因此, *vps16*和*vps18*的功能可

能是冗余的, 可以相互替代。为验证此假说是否成立, 我们利用酵母基因组的同源重组原理, 在*vps18*缺失菌株中进一步敲除*vps16*, 观察双敲除菌株自噬融合过程是否受到影响(图4A)。结果发现, 即使在*vps16*、*vps18*双敲除的菌株中, GFP-ATG8中GFP的剪切也几乎没有受到影响(图4B)。基因的敲除效果已经通过菌落PCR得到验证(图4C)。



A: WT、*vps16*Δ、*vps18*Δ双敲除型酵母转化自吞噬标记蛋白GFP-ATG8(绿色), 用FM4-64对液泡进行染色(红色)。饥饿处理4 h, 样品用共聚焦显微镜进行活细胞成像。标尺=5 μm; B: *vps16*Δ、*vps18*Δ双敲除型酵母饥饿处理后进行Western blot; C: PCR验证同源重组效果。

A: WT, *vps16*Δ/*vps18*Δ double knock out yeasts were transmitted with autophagy marker GFP-ATG8. Cells were starved 4 hours for living images. Scale bar=5 μm; B: *vps16*Δ, *vps18*Δ double knock out yeasts were starved for 0, 1, 4, 7 h before harvested for Western blot; C: PCR test for the efficiency of Homologous Recombination.

图4 *vps16*和*vps18*双敲除对自噬的融合过程没有影响

Fig.4 Double knock out of *vps16* and *vps18* have no influence on autophagy fusion process

3 讨论

在本研究中, 通过酵母基因筛选, 发现了一些在自噬过程中起关键作用的基因。这些基因主要是HOPS复合体的一些成员。进一步的实验证据表明*vps39*和*vps41*在自噬的融合过程(即GFP-ATG8与液泡的融合)中起关键作用: 这两个基因缺失后融合无法进行。由于之前的研究表明HOPS复合体本身就作为融合过程中的“tethering factor”, 因此, 得到这个结果并不奇怪。然而, 有趣的是, HOPS复合体的另外两个成员VPS16和VPS18在酵母中似乎对自噬的融合过程毫无作用, 因为在单敲除的情况下, 融合未受到影响, 而且把两个基因同时敲掉, 仍然没有明显的表型。需要指出的是, 在哺乳动物细胞中VPS16、

VPS18似乎是必需的, 这可能是生物进化过程中的多样化造成的。HOPS复合体由六个蛋白组成: VPS11、VPS16、VPS18、VPS33、VPS39和VPS41。*vps33*的缺失似乎是致死的, *vps11*缺失时, 融合也未受到影响(数据未在实验结果中展示)。接下来, 自然有一个问题: HOPS复合体究竟是以一个复合体形式才能发挥功能, 还是其中几个蛋白就足够促进融合了? HOPS复合体的存在已经通过生化的提纯实验所证明, 然而这些纯化都是在正常培养条件下, 即非饥饿条件下进行的。那么在饥饿条件下情况是否发生了变化了? 有可能HOPS复合体中的两个蛋白VPS39、VPS41从大的复合体中脱离下来, 单独在自噬体与液泡的融合中发挥作用。我们需要进一步的研究来

验证这一假说。

参考文献 (References)

- 1 Cuervo AM. Autophagy: Many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; 263(1/2): 55-72.
- 2 Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4): 463-77.
- 3 Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science* 2004; 306(5698): 990-5.
- 4 Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 2005; 12(Suppl2): 1535-41.
- 5 Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 2005; 12(5): 671-82.
- 6 Sato TK, Rehling P, Peterson MR, Emr SD. Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Mol Cell* 2000; 6(3): 661-71.
- 7 Seals DF, Eitzen G, Margolis N, Wickner WT, Price A. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(17): 9402-7.
- 8 Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* 2000; 151(3): 551-62.
- 9 Dulubova I, Yamaguchi T, Wang Y, Südhof TC, Rizo J. Vam3p structure reveals conserved and divergent properties of syntaxins. *Nat Struct Biol* 2001; 8(3): 258-64.
- 10 Troupe C, Collins KM, Fratti RA, Wickner W. Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *EMBO J* 2006; 25(8): 1579-89.
- 11 Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 1995; 131(3): 591-602.

Function of HOPS Complex Proteins in Autophagy Process

Hu Wanqiu^{1#}, Lin Zhixiang^{2#}, Chen Lilian³, Yan Xianghua⁴, Chen Fang^{1*}

(¹School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; ²School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100064, China; ³School of Biology, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ⁴College of Animal Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Autophagy is a lysosome dependent intracellular degradation process, which engulfs molecules or organelles to lysosome and then degraded to monosaccharide or amino acid for reuse. We investigated that in HOPS complex genes *vps39* and *vps41* loss yeasts, there were extensive accumulation of GFP-ATG8, and the fusion processes of autophagy were blocked. But in other two HOPS complex genes *vps16* and *vps18* loss yeasts, the fusion processes had little change. Moreover, in *vps16* and *vps18* double loss cells, the fusion processes were not disturbed. Therefore, our work provided a new insight to understand the function of HOPS complex and the fusion process between autophagosome and lysosome.

Key words autophagy; membrane fusion; HOPS complex

Received: January 2, 2011 Accepted: March 31, 2011

This work was supported by the National 11th Five-year Plan Scientific Support Project (No.2006BAD07A04)

[#]These two authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-28-85417281, E-mail: chenfang@scu.edu.cn