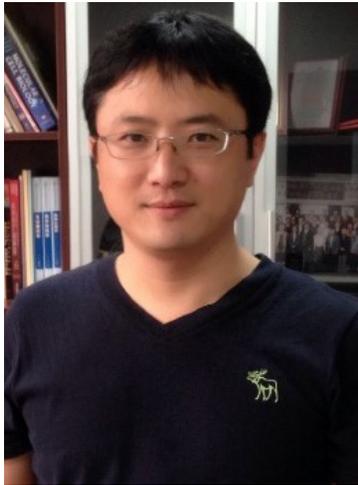


## 领域前沿 · 中国



胡荣贵, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员。1995年毕业于安徽师范大学生物系, 获理学学士学位。2000年8月毕业于中国科学院上海生物化学研究所, 获理学博士学位。2001年至2006年在加州理工学院生物系Alexander Varshavsky实验室从事博士后研究。2006年任加州理工学院生物系Senior Research Fellow。自2006年起获加州再生药物研究所资助研究干细胞发育过程中蛋白质降解系统的调控。2009年7月起担任中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所担任研究员、博士生导师, 建立和领导蛋白质稳态调控与分子识别课题组, 课题组主要致力于研究蛋白质泛素化及降解等稳态调控及其异常的生理病理意义, 并基于蛋白质的分子识别的工程设计并开发有效的诊断和治疗手段。现已在Nature、Science、Cancer Cell、Proc Natl Acad Sci USA、Cell Res、Cell Rep、Biomaterials、J Mol Cell Biol、J Biol Chem等刊物发表多篇研究论文, 其研究成果多次被国际学术期刊如Nat Rev Mol Cell Biol、J Cell Biol、Sci Signal、Chem Biol等选为亮点。课题组最新发表在Cancer Cell的工作阐明了肿瘤抑制活性的泛素连接酶HACE1泛素化修饰自噬受体OPTN促进自噬受体复合物的形成激活细胞自噬并抑制肿瘤分子机理, 揭示了细胞内泛素化信号与细胞自噬交叉调控的新机制。

## 泛素化信号调控细胞选择性自噬的新机制

刘征兆 胡荣贵\*

(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

### 细胞选择性自噬

自噬(autophagy)途径是细胞对胞内的大分子物质的包被、吞噬后在溶酶体中降解的过程<sup>[1-2]</sup>。细胞受到饥饿、高温、低氧及荷尔蒙等外界刺激, 或细胞器的损坏、突变蛋白的积聚及微生物的侵袭等, 都可能引起细胞自噬的发生<sup>[3]</sup>。自噬最早被认为是非选择性的, 而近期研究发现, 自噬受体蛋白(autophagy receptor)对自噬底物有特异性的识别、分选和运输的作用, 可以选择性地靶向自噬底物的降解<sup>[4-5]</sup>, 从而赋予了依赖自噬降解的蛋白质稳态极

其精密的动态调控。自噬受体蛋白一方面通过泛素结合结构域(UBA domain)以依赖或非依赖的方式识别和结合自噬底物蛋白, 同时也以其LC3相互作用结构域(LC3-interaction region, LIR)锚定在自噬体膜上, 最终通过自噬小体和溶酶体的融合而伴随底物进入溶酶体降解。目前已知的自噬受体蛋白约有十种<sup>[6]</sup>, 如p62/SQSTM1(sequestosome 1)、NBR1(next to BRCA1 gene 1)、OPTN(optineurin)等。已知这些自噬受体蛋白的基因突变或缺失与多种人类疾病相关。这些疾病表现各异却有部分共同的特点。OPTN由于其基因某些位点的突变最早被发现与人类的各型青光眼有关而得名。近来, OPTN的一些基因位点的突变被发现与肌萎缩侧索性硬化症

\*通讯作者。Tel: 021-54921408, E-mail: coryhu@sibs.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921408, E-mail: coryhu@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2014-09-26 15:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.9001.html>

(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)或Paget's骨系统疾病有关<sup>[7-8]</sup>。已知OPTN蛋白参与调节细胞内重要的免疫信号通路、细胞极性及细胞自噬等,但其机理尚不清楚。关于这些自噬受体蛋白本身的修饰和功能调控以及自噬受体蛋白之间的相互作用及其组织方式(如是否和如何形成复合物)等目前的了解还很粗浅,因此这方面的研究也成为当前自噬领域的热点之一。

## HACE1介导的泛素化信号通路调控细胞选择性自噬

研究表明,编码泛素连接酶HACE1(HECT domain ankyrin repeats-containing E3 Ub ligase 1)的基因在多种人类肿瘤中发生了染色体片段缺失、基因突变或启动子区域甲基化,而且HACE1敲除的小鼠多个组织都发生肿瘤,其肿瘤抑制活性依赖于HACE1的泛素连接酶活性,但HACE1作为泛素连接酶的底物则鲜有报道。近年有报道发现,某些泛素化途径可能影响细胞自噬水平,但机制并不清楚<sup>[9-10]</sup>。我们实验室近期的研究发现,具有肿瘤抑制活性的泛素连接酶HACE1能够与OPTN蛋白直接相互作用并催化OPTN的多泛素化<sup>[11]</sup>。

有趣的是,OPTN蛋白经HACE1介导的以泛素K48方式连接的泛素链修饰后主要通过溶酶体依赖的自噬途径被降解。这个发现不同于“泛素K48连接的多泛素链只靶向底物进入蛋白酶体降解”的经典知识。Komatsu等<sup>[12-13]</sup>发现,自噬受体蛋白p62一方面作为自噬受体介导自噬底物向自噬泡的运输,同时自身也通过自噬途径被降解。我们发现,HACE1-OPTN激活自噬,OPTN蛋白本身也通过自噬途径降解<sup>[11]</sup>。这种看似矛盾的现象充分展示了典型自噬受体如OPTN和p62等在自噬调控过程中扮演的多种角色:它们既识别自噬底物并介导自噬底物运输,同时自身伴随自噬的底物一起通过自噬被降解。

## OPTN经HACE1泛素化后与p62相互作用形成自噬受体复合物并激活选择性自噬

自噬受体在选择性自噬底物的识别、募集和运输中起着至关重要的作用。然而,不同的自噬受体含有不同的功能结构域,决定了它们的功能各异。如p62和NBR1都能够通过N末端的PB1(Phox and Bem1p)结构域形成多聚体,在选择性自噬过程中的

执行和调控中起关键作用,而其他自噬受体则没有这种结构<sup>[14-15]</sup>。它们是否与其他自噬受体相互作用则未有报道。

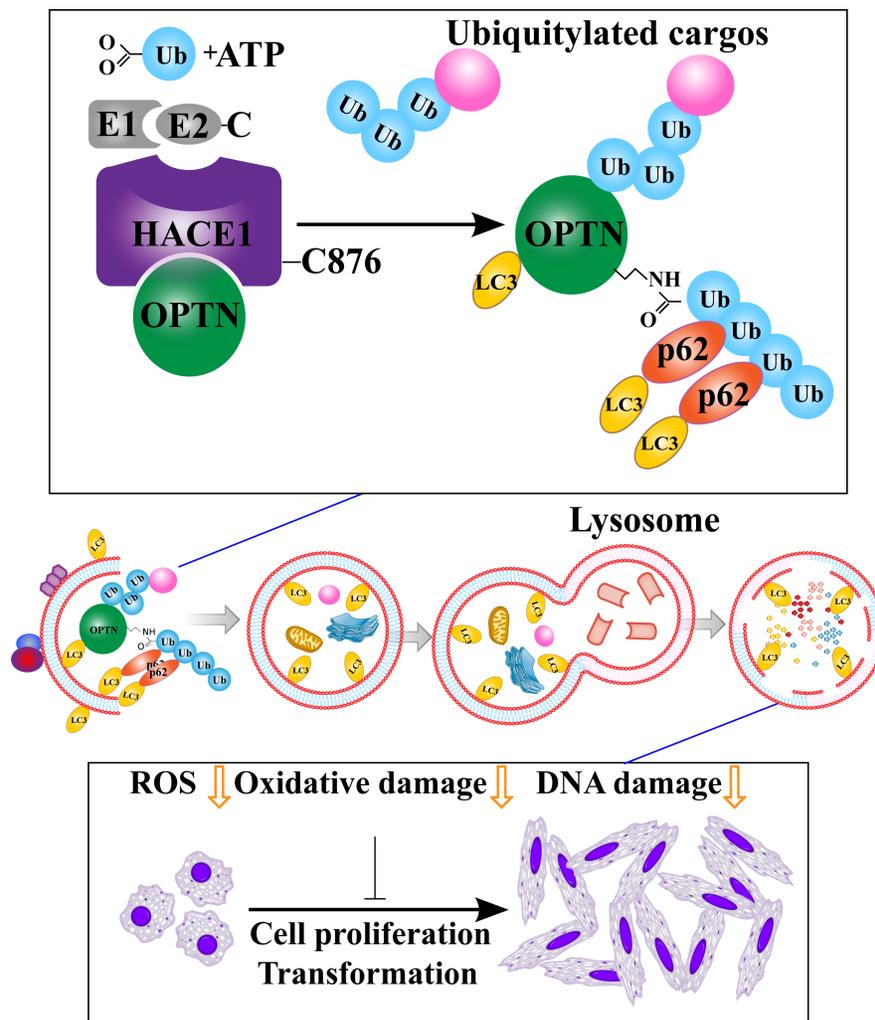
我们的研究发现,在p62被敲除或敲低的细胞中,HACE1-OPTN“激活”细胞自噬的效应都被显著削弱。这说明了p62在HACE1-OPTN介导的细胞自噬过程中起着关键作用。免疫共沉淀实验表明,内源性的OPTN、p62和HACE1能形成一个复合物。我们的实验数据进一步显示,HACE1介导的OPTN泛素化修饰,特别是在OPTN的193位赖氨酸残基侧链上形成的泛素链能够与p62的UBA结构域特异性地相互作用,并形成可以通过免疫共沉淀检测到的复合物,激活细胞自噬。显然,泛素化的OPTN与p62相互作用可以提高通过自噬受体介导的自噬底物向自噬泡运输的效率,显著增加细胞自噬降解的通量(autophagic flux),从而更加有效地招募和运输自噬底物,促进自噬溶酶体途径的降解<sup>[11]</sup>。

## HACE1-OPTN-p62抑制肿瘤细胞增殖

肿瘤克隆形成和裸鼠成瘤实验表明,HACE1和OPTN可以协同作用抑制肿瘤增殖<sup>[11]</sup>。此前一些研究显示,多种肿瘤细胞都表现为自噬缺陷、p62蛋白质的累积以及细胞内自由基(reactive oxygen species, ROS)增加,而促进p62蛋白质的降解被认为是细胞自噬抑制肿瘤生长的主要机制之一<sup>[13,16]</sup>。我们的研究发现,HACE1-OPTN激活细胞内自噬,可有效降低细胞内p62蛋白水平,同时也能降低细胞内ROS的生成以及加速氧化损伤蛋白的清除。已知,被氧化损伤的蛋白的累积在肿瘤发生发展中扮演着重要角色<sup>[17]</sup>。这些累积的被氧化的蛋白和p62的清除,以及胞内ROS水平的降低,可能是HACE1-OPTN激活细胞自噬抑制肿瘤的主要机制。

## 泛素化修饰调控选择性自噬新机制的临床相关性意义

我们发现,在小鼠胚胎成纤维细胞、巨噬细胞、人肺癌细胞系和人胚胎肾细胞等多种细胞系中,HACE1-OPTN功能轴心均能够调控细胞自噬,从而表现出细胞类型非特异的作用特点。基于大量临床样本的数据进一步表明,HACE1和OPTN在肝癌、胃癌等肿瘤组织中高突变或低表达。而在多种肿瘤细胞中,恢复HACE1-OPTN轴心可以激活自噬而显



泛素连接酶HACE1介导自噬受体OPTN的泛素化,促进OPTN与p62的相互作用,并形成大的自噬受体蛋白复合物,显著增加自噬途径降解底物的通量,从而“激活”细胞自噬、抑制肿瘤增殖。

HACE1, a HECT-domain Ankyrin-repeats-containing E3 Ub ligase, mediates ubiquitination of autophagy receptor OPTN and promotes physical interaction between OPTN and p62 to form autophagy receptor complexes, thus significantly augmenting cellular autophagic flux and “activating” autophagy to suppress tumor.

图1 HACE1泛素化自噬受体蛋白OPTN激活细胞自噬并抑制肿瘤的分子机制示意图(根据参考文献[11]修改)

Fig.1 A model depicting how the HACE1-OPTN axis suppresses tumor through activating autophagy *in vivo* (modified from reference [11])

著抑制肿瘤增殖<sup>[11]</sup>。HACE1-OPTN功能缺陷导致其调控的自噬底物累积,这些被累积的蛋白可能成为相关肿瘤分型的分子标志物。

综上所述,我们的此项工作表明,被HACE1泛素化的OPTN为p62的泛素结合结构域所识别并形成大的自噬受体蛋白复合物,显著增加细胞内自噬途径降解蛋白质的通量从而“激活”细胞自噬<sup>[11]</sup>。本发现提示了细胞内泛素信号途径调控自噬的新机制(图1),也为进一步研究OPTN的生理作用及其突变的病理意义提供了新的研究视角,并可能有助于以细胞自噬为靶向的肿瘤化疗药物的开发。

## 参考文献 (References)

- 1 Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8(4): 445-544.
- 2 Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 2014; 24(1): 9-23.
- 3 Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Autophagy: An emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 2008; 4(5): 574-80.
- 4 Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 2009; 5(5): 732-3.
- 5 Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate

- degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282(33): 24131-45.
- 6 Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, *et al.* Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 2011; 333(6039): 228-33.
- 7 Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, *et al.* Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002; 295(5557): 1077-9.
- 8 Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, *et al.* Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010; 465(7295): 223-6.
- 9 Kuang E, Qi J, Ronai Z. Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(9): 453-60.
- 10 Kim ST, Tasaki T, Zakrzewska A, Yoo YD, Sa Sung K, Kim BY, *et al.* The N-end rule proteolytic system in autophagy. *Autophagy* 2013; 9(7): 1100-3.
- 11 Liu Z, Chen P, Gao H, Gu Y, Yang J, Peng H, *et al.* Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell* 2014; 26(1): 106-20.
- 12 Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett* 2010; 584(7): 1374-8.
- 13 Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137(6): 1062-75.
- 14 Itakura E, Mizushima N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol* 2011; 192(1): 17-27.
- 15 Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, *et al.* A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 2009; 33(4): 505-16.
- 16 White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(6): 401-10.
- 17 Xu W, Trepel J, Neckers L. Ras, ROS and proteotoxic stress: A delicate balance. *Cancer Cell* 2011; 20(3): 281-2.