

细胞自噬的基因调控及其与稻瘟病的关系

刘小红 鲁书玲 林福呈*

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要 细胞自噬是真核生物中广泛存在的过程, 并且在进化上十分保守。在真核生物分化和发育的过程中, 它参与胞内细胞器和蛋白质的周转, 被认为在细胞的形态建成方面发挥重要作用。现就细胞自噬的分子机制和功能做一介绍, 并对稻瘟病菌细胞自噬的研究现状进行了回顾。

关键词 细胞自噬; 分子机制; 稻瘟病菌; 细胞自噬相关基因

在细胞生长发育过程中, 胞内物质如蛋白质、核酸、核糖体以及各种细胞器要通过各种不同的途径来进行更新, 这种不断的分解和合成的代谢过程维持了细胞基本的生活需要。真核细胞主要通过两种降解途径来降解胞内物质, 一是通过泛素-蛋白酶体降解胞内的短寿命蛋白, 是一个选择性的途径; 另一种是通过细胞自噬作用(autophagy), 降解长寿命蛋白和一些细胞器(如线粒体等), 这是一条主要的、大量的和非选择性的降解途径^[1]。细胞自噬最早是 Ashford 等^[2]于 1962 年用电子显微镜在人的肝细胞中观察到的, 是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性降解途径。

细胞自噬过程是进化上高度保守的过程, 在真核细胞中, 已经确定微自噬(microautophagy)和巨自噬(macroautophagy)是涉及隔离膜动态重组的两种自噬样式。微自噬通过液泡膜的内陷把溶酶体周围的待降解的物质包裹到溶酶体腔内, 而在水解酶的作用下进行降解。相反, 巨自噬, 即通常所指的细胞自噬, 涉及隔离部分细胞质、细胞溶液的双层膜泡的形成, 形成的泡囊或自噬泡和溶酶体的融合, 导致内部的泡囊或自噬泡被传递到降解性的隔离物的腔内。细胞自噬被诱导后, 包裹被降解物质的多层液泡在胞浆中开始形成, 随后与溶酶体结合, 其中的底物在酸性环境及溶酶体酶等的作用下, 被降解为氨基酸、核苷酸、游离脂肪酸等。因此, 细胞自噬在维持胞内环境稳定、细胞免疫、组织重塑等方面有着十分重要的作用, 是清除无用或有毒物质的一种重要手段^[1]。

1 细胞自噬的分子机制

虽然细胞自噬现象已经在动物细胞中较早被发现, 但这种活动是否以及如何被调控却一直不清楚。

直到上世纪 90 年代, 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、甲醇酵母(*Pichia pastoris*)等酵母, 被作为模式来进行细胞自噬分子机制的研究。到目前为止, 已经约有 30 多个细胞自噬相关基因在酵母中被发现, 其中 17 个基因参与自噬泡的形成, 近一半基因在果蝇、线虫、哺乳动物等多细胞物种中都十分保守^[3]。由于各个系统对自噬相关基因有不同命名, 2003 年, Klionsky 等^[4]建议将这些基因统一命名为 ATG (autophagy-related), 用来代表自噬基因及其相对应的蛋白质, 以研究它们之间的相互作用及在自噬过程中的功能。

细胞自噬过程主要是由自噬的诱导、自噬泡的形成、自噬泡与液泡的融合和自噬泡内物质在液泡腔内的降解这几个步骤来完成的。而自噬过程的诱导和自噬泡的形成是自噬过程重要的两个环节。目前, 人们认为它主要是通过至少 17 个 Atg 蛋白协同作用来完成的, 它们首先聚集或短暂的停留在到 PAS (preautophagosomal structure) 上。这 17 个 Atg 蛋白可被分成 5 个功能组(图 1), (i) Atg1 激酶功能组(Atg1 protein kinase complex); (ii) Atg9 膜蛋白循环系统(Atg9 membrane protein recycling system); (iii) Atg8- 磷脂酰乙醇胺(PE)功能组(Atg8 lipid conjugation system; PE, phosphatidylethanolamine); (iv) Atg12-Atg5 复合体功能组(Atg12-Atg5 protein conjugation system); (v) 磷脂酰肌醇转移蛋白 3 (PtdIns3)- 激酶复合体(phosphatidylinositol-3 kinase complex)。5 个功能组相互作用, 参与细胞

收稿日期: 2008-06-11 接受日期: 2008-09-05

国家自然科学基金(No.30671351)和第 42 批中国博士后科学基金(No.X90804)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-86971185, Fax: 0571-86971516, E-mail: fuchenglin@zju.edu.cn

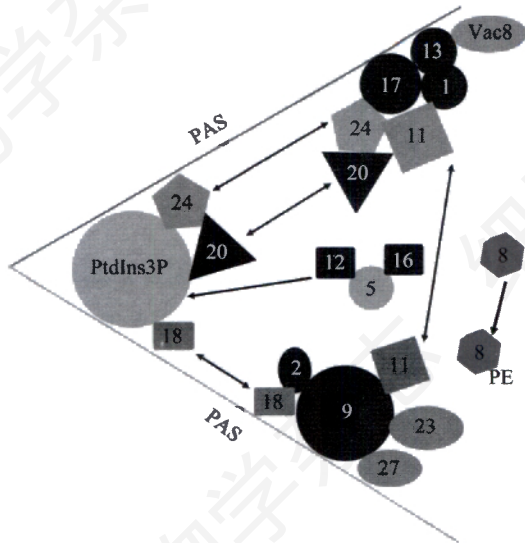


图1 自噬相关蛋白在PAS上形成的5个功能复合体

Atg9、PtdIns3P和Atg1复合体(Atg1-Atg13-Atg17)最先被征召到PAS上,之后Atg2-Atg18复合体、Atg12-Atg5-Atg16复合体和Atg8-PE在它们的帮助下也被募集到PAS上。其中,Atg11也是最早被募集到PAS上的,但只参与Cvt泡的形成。双向箭头分别指示相同的蛋白质,这些蛋白质分布在3个复合体上,这种共有的蛋白质可能使它们形成一个大的功能体。

自噬的诱导,自噬泡形成,液泡融合等各个过程^[5]。正是在PAS上,这5个功能组协同作用,共同完成了对自噬泡的加工。而形成的自噬泡被转运到液泡上并发生融合,最后自噬泡内的物质被释放到液泡内腔里,并被降解。

1.1 自噬的诱导

所有真核细胞中都存在低水平的细胞自噬现象,在细胞受到外界刺激(例如,营养饥饿,供氧不足,群体过剩,高温等)或内部条件发生变化(例如,损坏的或过剩的细胞器,细胞质组件的堆积等)情况下,细胞自噬水平会上调。因此,在胁迫的环境下,为了适应和存活,细胞自噬被迅速地激活。

以酵母为例,酵母中存在一种特殊的选择性蛋白运输途径,即细胞质至液泡运输途径(cytoplasm to vacuole targeting pathway, Cvt途径)^[6]。在正常的营养状态下,细胞会启动Cvt途径把氨肽酶等蛋白酶运输到液泡内腔。但是在饥饿、环境胁迫或者雷帕霉素(rapamycin)诱导下,细胞启动自噬过程非选择性地降解胞内待降解物质。这两个途径的转换通过一种自噬开关复合物“Atg1激酶功能组”来实现^[7]。Atg1是这种复合物的关键组成成分,它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在高等真核细胞中,Atg1在细胞自噬过程中发挥的作用是高度保守的^[8]。另一组

分Atg13的磷酸化状态受其上游蛋白雷帕霉素靶点蛋白激酶TOR(target of rapamycin)的负调控^[9]。TOR是氨基酸、ATP和激素的感受器,是细胞内感知环境变化的最重要信号^[10]。当细胞受外界饥饿诱导时,TOR基因活性被抑制,Atg13发生去磷酸化,与Atg17相结合形成Atg13-Atg17复合体,并激活Atg1,形成Atg1-Atg13-Atg17复合体,诱导自噬发生。该复合体还涉及了Atg20、Atg24、Atg11、Vac8等蛋白质。然而,还没有证据表明Cvt途径存在于除酵母^[11]和白色链球菌^[12]之外的其他多细胞真核生物中。

1.2 自噬泡的形成

双层膜自噬泡(autophagosome)的形成是细胞自噬过程的显著标志。在发生自噬的细胞胞浆中出现大量游离的被称为前自噬泡(preautophagosome)的膜性结构,这些膜性结构逐渐发展成为由双层膜结构形成的空泡,其中包裹着蛋白质、变性坏死的细胞器和部分细胞浆,这种双层膜结构被称为自噬泡。然后,自噬泡外膜与溶酶体膜融合,内膜及其包裹的物质进入溶酶体腔,被溶酶体中的酶水解^[13]。但是,自噬泡这种双层膜的起源尚不清楚。酿酒酵母中的自噬泡被两个脂质双分子层所围绕,它的直径在400~900 nm之间^[14]。自噬泡膜富含脂类,缺乏蛋白质^[15],并且比典型的分泌小泡要大得多,这也意味着自噬体由所需的最小限度的成分组成,去装载最终要被降解的最大限度的材料。

在酵母的研究中发现,Atg8-PE功能组和Atg5-Atg12复合体功能组参与了自噬泡的形成。两个复合体都是Cvt泡和自噬泡的结构组成,主要存在于内膜,使孤立的自噬体前体膜连接形成完整的自噬体。两者互相调节,互相影响,在真核生物中作用保守^[16]。其中一个复合体开始于泛素激活酶E1的同源体Atg7^[17]。Atg7的一个重要半胱氨酸被ATP激活后,可以与Atg12碳端的甘氨酸连接^[18]。Atg12与Atg5内第149位的赖氨酸通过异肽键的连接,被激活的Atg12被转移到E2泛素激活酶Atg10的甘氨酸上,在PAS上形成Atg12-Atg5复合物。最后,该复合物装配上Atg16或Atg16四聚物,形成Atg12-Atg5-Atg16六聚物复合体,一方面促进自噬体伸展扩张,另一方面促进Atg8-PE向自噬泡的聚集^[19,20]。另一个复合体始于半胱氨酸酶Atg4。Atg4可以切割Atg8羧端的精氨酸,暴露出甘氨酸^[21]。Atg7激活了这个甘氨酸的活性后,将具备了形成硫酯键活性的Atg8转移给Atg3。Atg3调节Atg8与PE的连接,形成Atg8-PE,

从而促进自噬体前体膜的聚集和融合^[22]。自噬泡形成过程中及过程之后, 外膜上的 Atg8-PE 被 Atg4 清除。研究还发现, Atg12-Atg5-Atg16 复合体对 Atg8-PE 作用的稳定性必不可少^[23], 但是具体作用机制尚不清楚。

另外, 最近研究发现, Atg9 膜蛋白被认为参与了自噬体膜的运输过程^[24,25]。它主要是参与了 Atg 蛋白从成熟自噬体上脱离并循环利用的过程。在 Atg2、Atg18 和 Atg1-Atg13 的作用下, Atg9 从 PAS 膜上脱离, 而 Atg11、Atg23、Atg26 则负责让 Atg9 重新回到 PAS 上, Atg9 的荧光定位表明, Atg9 不仅仅定位在自噬体膜上, 还定位在其他细胞器如线粒体上, 因此, 有理由推测, Atg9 有可能在这些细胞器之间来回穿梭。

PtdIns3- 激酶复合体, 可以结合位于 PAS 膜上的 PtdIns3。该蛋白质可协助其下游自噬相关蛋白, 如 Atg18、Atg20、Atg21 和 Atg24 等, 定位到 PAS 上^[26]。

1.3 融合与降解

自噬泡以及 Cvt 小泡和液泡的融合需要许多组分的共同参与, 这些组分包含 SNARE 蛋白 Vam3、Vam7、Vti1 与 Ykt6; NSF、SNAP 与 GDI 同源物 Sec17、Sec18、Sec19; Rab 蛋白 Ypt7; C 组 Vps/HOPS 复合物的成员和最近发现的蛋白质 Mon1 和 Ccz1^[27]。首先, 外层膜与液泡膜融合, 接着单层膜的自噬小体被释放到液泡内腔里, 随后在 Pre1 和 Pep4 蛋白酶及 Atg15 的作用下, 自噬小体破裂, 其中的待降解物质被释放并最终被降解。降解后的物质可以被细胞重新利用, 参与细胞物质的再循环过程。自噬泡的溶解被认为依赖于液泡腔的酸性 pH 值和蛋白酶 B; 然而, 蛋白酶 B 的功能可能是激活直接作用于分解过程的液泡酶原^[1]。

2 细胞自噬的功能

通过细胞自噬在细胞器和蛋白质转化中的作用, 与分化和发育时发生的细胞结构变化相关。早在 1966 年, de Duve (1974 诺贝尔奖获得者和溶酶体的发现者) 等^[28]提到, 新生儿的肾、肺、肠, 胎儿的十二指肠, 变形虫唾液腺, 衰退的苗勒管, 两栖动物红细胞、角质化的皮肤和家鼠阉割后的前列腺等细胞在分化或其他诱导变化发生时, 细胞自噬得到增强。然而直到目前为止, 关于自噬在分化和发育中作用的研究, 很大一部分都被限定在形态学相关性的研究上, 比较缺乏细胞自噬机制的作用的确切证据。

随着人们对细胞自噬过程日益深入的研究, 对于细胞自噬功能的认识不断深入。最初在酿酒酵母中,

细胞自噬被作为一种营养缺乏条件下, 细胞耐受性而被广泛研究。最近的研究表明, 在富营养生长条件下, 酵母中的细胞自噬与液泡水解酶转运到液泡^[29]。在哺乳细胞中, 细胞自噬对蛋白质聚集体的清理和抵御病毒或细菌的入侵有一定的作用^[30]。此外, 细胞自噬在植物中有抗衰老的作用^[31]。细胞自噬系统的损坏会使高等真核生物产生不良, 甚至致命的病态效应, 如蛋白质折叠障碍, 神经退化症和新生儿的夭折等^[30]。细胞自噬过程是酵母、黏菌、线虫和果蝇发育与分化所必需的; 更确切的说, 它是伴随着大量细胞组件降解的细胞重塑所必需的过程^[1]。

3 细胞自噬在稻瘟病菌中的研究现状

由于细胞自噬过程在进化上有着高度的保守性, 酵母细胞自噬分子机制的研究为高等真核生物细胞自噬生物学功能的识别提供了基础。细胞自噬过程在植物病原真菌中的研究是一个崭新的课题, 在稻瘟病菌上研究很少。众所周知, 稻瘟病是一种毁灭性病害, 给全世界的水稻生产带来巨大威胁。稻瘟病菌具有遗传上的多样性和复杂性, 在致病性方面表现多变性, 这也是稻瘟病难防难治的原因之一。从分子水平上阐明稻瘟病菌致病过程及致病性变异的机制, 对于稻瘟病的防治具有重大意义。经世界上研究稻瘟病菌的几个重要实验室的共同努力, 2002 年 10 月完成了稻瘟病菌 70-15 菌株全序列草图的绘制^[32]。稻瘟病菌已逐渐成为重要经济作物和病原真菌相互作用的研究模式。

3.1 稻瘟病菌细胞自噬相关基因

为了寻找稻瘟病菌细胞自噬相关基因, 我们以酿酒酵母基因组数据库(<http://www.yeastgenome.org>)中获得的自噬相关基因的蛋白质序列为初始序列, 提交到稻瘟病菌基因组数据库(http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/magnaporthe_grisea)中进行比对分析。E 值在 0.001 以下的序列均作为待检验的序列, 根据保守结构域的分析, 剔除没有典型蛋白质结构的序列(未发表的结果), 保留下来的序列被认为是稻瘟病菌细胞自噬相关基因。根据分析, 我们得到了 28 个候选的自噬相关基因, 如表 1 所示, 这些候选基因在稻瘟病菌中均是单拷贝的, 以上结果与 Meijer 等^[33]的研究结果一致。这些稻瘟病菌细胞自噬相关基因的发现, 对于研究稻瘟病菌细胞自噬过程提供有利的信息。

3.2 细胞自噬过程对稻瘟病菌的影响

表1 稻瘟病菌细胞自噬相关基因

ATG 基因	稻瘟病菌中的同源基因	ATG 基因	稻瘟病菌中的同源基因
ATG1	MGG_06393.5	ATG17	MGG_07667.5
ATG2	MGG_05998.5	ATG18	MGG_03139.5
ATG3	MGG_02959.5	ATG20	MGG_12832.5
ATG4	MGG_03580.5	ATG21	MGG_03139.5
ATG5	MGG_09262.5	ATG22	MGG_09904.5
ATG6	MGG_03694.5	ATG23	MGG_10579.5
ATG7	MGG_07297.5	ATG24	MGG_03638.5
ATG8	MGG_01062.5	ATG26	MGG_03459.5
ATG9	MGG_09559.5	ATG27	MGG_02386.5
ATG11	MGG_04486.5	ATG28	MGG_08061.5
ATG12	MGG_00598.5	ATG29	MGG_02790.5
ATG13	MGG_00454.5	VAC8	MGG_04004.5
ATG15	MGG_12828.5	VPS15	MGG_06100.5
ATG16	MGG_05255.5	VPS34	MGG_03069.5

细胞自噬过程与稻瘟病菌的产孢、附着胞膨压、穿透、致病性以及有性生殖等各个发育阶段密切相关^[34-36]。

早在1998年, Sweigard等^[37]曾报道, 稻瘟病菌的 *PTH8* (GenBank 中的登录号: AF027983) 是一个致病性相关的基因, 该基因缺失, 稻瘟病菌的致病性减弱。把这段不完整的蛋白质序列片段提交到稻瘟病菌数据库中, 获得全长蛋白质序列, 经过结构分析, 认为这个蛋白质很有可能就是 ATG26 的同源蛋白。

2006年, 英国 N.J.Talbot 实验室研究发现, 细胞自噬过程影响稻瘟病菌致病过程, 细胞自噬相关基因 *MgATG8* 缺失, 导致稻瘟病菌致病性丧失^[34]。本实验室研究发现, 稻瘟病菌细胞自噬相关基因 *MgATG1* 缺失, 稻瘟病菌细胞自噬过程被阻断, 稻瘟病菌的产孢能力下降, 孢子萌发率下降, 附着胞膨压下降, 侵染寄主的能力显著下降, 最终致病性丧失; 同时, 有性生殖受阻, 子囊壳形成延迟, 而且子囊壳的数目明显减少^[35,36]。

为了进一步研究稻瘟病菌细胞自噬过程, 本实验室已经获得 *MgATG2*、*MgATG3*、*MgATG4*、*MgATG5*、*MgATG8*、*MgATG9*、*MgATG11*、*MgATG13*、*MgATG17*、*MgATG18* 等细胞自噬相关基因的缺失突变体, 并且完成了表型的分析, 基因 *MgATG2*、*MgATG3*、*MgATG4*、*MgATG5*、*MgATG8*、*MgATG9*、*MgATG18* 分别缺失, 显示的表型与 *MgATG1* 基因缺失突变体和 *MgATG8* 基因缺失突变体相似; 然而对 *MgATG11*、*MgATG13*、*MgATG17* 基因分别缺失突变体的研究却发现, 稻瘟病菌的细胞自噬过程未被中断, 表型与野生型菌株差

异不大, 其具体原因还正在研究之中。

4 小结

细胞自噬是真核生物特有的生命现象, 贯穿于正常细胞生长发育和生理病理的整个过程。细胞自噬基因的发现使人们在分子水平上认识了自噬, 但总体来说, 人们对细胞自噬的认识还只是处于初级阶段, 尤其在较高等的真核生物中, 对自噬泡双层膜的起源、参与分子、信号转导、其对细胞生存的影响、病理生理学意义等方面的问题尚不完全清楚。细胞自噬过程与稻瘟病菌的致病性密切相关, 其作用机制还有待于进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] Levine B *et al.* *Dev Cell*, 2004, **6**: 463
- [2] Ashford TP *et al.* *J Cell Biol*, 1962, **12**: 198
- [3] Klionsky. *Nature*, 2004, **431**: 31
- [4] Klionsky DJ *et al.* *Dev Cell*, 2003, **5**: 539
- [5] Yorimitsu T *et al.* *Cell Death Differ*, 2005, **12 Suppl 2**: 1542
- [6] Shintani. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2006, **51**: 1480
- [7] Khalfan WA *et al.* *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 468
- [8] Petiot A *et al.* *Cell Struct Funct*, 2002, **27**: 431
- [9] Noda T *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 3963
- [10] Klionsky DJ. *Curr Biol*, 2005, **15**: R282
- [11] Klionsky DJ. *J Cell Sci*, 2005, **118**: 7
- [12] Palmer GE *et al.* *Microbiology*, 2007, **153**: 51
- [13] Ishihara N *et al.* *Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 3690
- [14] Takeshige K *et al.* *J Cell Biol*, 1992, **119**: 301
- [15] Baba M *et al.* *Cell Struct Funct*, 1995, **20**: 465
- [16] Ichimura Y *et al.* *Nature*, 2000, **408**: 488
- [17] Kim J *et al.* *Mol Biol Cell*, 1999, **10**: 1337
- [18] Mizushima N *et al.* *Nature*, 1998, **395**: 395
- [19] Mizushima N *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 3888
- [20] Kuma A *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 18619
- [21] Kirisako T *et al.* *J Cell Biol*, 2000, **151**: 263
- [22] Kirisako T *et al.* *J Cell Biol*, 1999, **147**: 435
- [23] Suzuki K *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 5971
- [24] Reggiori F *et al.* *Dev Cell*, 2004, **6**: 79
- [25] Wei J *et al.* *J Biol Chem*, 2007, **282**: 28904
- [26] Shintani T *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 29889
- [27] Wang CW *et al.* *Mol Med*, 2003, **9**: 65
- [28] De Duve C *et al.* *Annu Rev Physiol*, 1966, **28**: 435
- [29] Baba M *et al.* *J Cell Biol*, 1997, **139**: 1687
- [30] Shintani T *et al.* *Science*, 2004, **306**: 990
- [31] Hanaoka H *et al.* *Plant Physiol*, 2002, **129**: 1181
- [32] Dean RA *et al.* *Nature*, 2005, **434**: 980
- [33] Meijer WH *et al.* *Autophagy*, 2007, **3**: 106
- [34] Veneault-Fourrey C *et al.* *Science*, 2006, **312**: 580
- [35] Liu XH *et al.* *Eukaryot Cell*, 2007, **6**: 997
- [36] Liu XH *et al.* *Autophagy*, 2007, **3**: 472
- [37] Sweigard JA *et al.* *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, **11**: 404

Gene Regulation in Autophagy and Its Relationship with the Rice Blast Fungi

Xiao-Hong Liu, Shu-Ling Lu, Fu-Cheng Lin*

(Biotechnology Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Autophagy is a ubiquitous and evolutionarily conserved process in eukaryotes. It has been presumed to be involved in cellular architectural changes that occur during differentiation and development, presumably via its roles in organelle and protein turnover. Here we review its molecular mechanism and functions. The further concerning research on rice blast fungus *M. oryzae* were been discussed as well.

Key words autophagy; molecular mechanism; *Magnaporthe oryzae*; ATG genes

Received: June 11, 2008 Accepted: September 5, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671351) and the 42th Financial Support from China Postdoctoral Science Foundation (No.X90804)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971185, Fax: 86-571-86971516, E-mail: fuchenglin@zju.edu.cn