

## 特约综述



我们的研究主要是以酵母为模式生物,利用分子生物学、细胞生物学方法寻找作用于自噬体形成过程的新基因,进一步揭示自噬体形成的分子机理,理清上游信号转导网络对细胞自噬的调节作用。

<http://medical.nankai.edu.cn/chinese/department/molecular/xiezhiping.asp>

## 酵母中细胞自噬的研究进展

王海燕<sup>1</sup> 倪涛<sup>2</sup> 谢志平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南开大学医学院,天津 300071; <sup>2</sup>南开大学生命科学学院,天津 300071)

**摘要** 细胞自噬是真核生物中高度保守的一类亚细胞降解途径。它通过降解细胞内组分维持细胞内生理平衡并帮助细胞度过逆境。细胞自噬在生物体生长发育、免疫防御、细胞程序性死亡、肿瘤抑制、预防神经退行性病变等方面有非常重要的作用。酵母是目前细胞自噬研究最充分的模式生物,其中分子机制及其他方面的研究成果对整个真核生物细胞自噬的研究有很关键的作用。本综述旨在对近年来酵母中关于细胞自噬的研究进展和常用检测手段作一概括总结。

**关键词** 细胞自噬; 分子机制; 酵母; 检测手段

## 1 前言

细胞自噬(Autophagy)是对维持真核生物健康有关键作用的一类亚细胞降解途径<sup>[1,2]</sup>。细胞自噬一词泛指溶酶体(Lysosome)(酵母中为液泡, Vacuole)介导的细胞质降解过程。与蛋白酶体(Proteasome)相比,溶酶体具有更强大的降解能力,因此细胞自噬可以大批量的降解从可溶蛋白到完整细胞器在内的胞内物质。细胞自噬在生物体生长发育、免疫防御、细胞程序性死亡、肿瘤抑制、神经性病变抑制等方面有非常重要的作用<sup>[3-5]</sup>。

根据包裹物质及运送方式的不同,细胞自噬可以分为宏自噬(Macroautophagy)、微自噬(Microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(Chaperone-mediated autophagy)。宏自噬通过形成具有双层膜结构的自噬体(Autophagosome)包裹胞内物质,最终自噬体与溶酶体融合;微自噬通过溶酶体或液泡表面的形变直接吞没特定的细胞器;分子伴侣介导的自噬通过分子伴侣将胞浆蛋白解折叠导入溶酶体内腔。

细胞自噬现象最初由 Christian de Duve 等<sup>[6]</sup>在二

十世纪六十年代初发现。二十世纪九十年代初,以 Daniel J.Klionsky、Yoshinori Ohsumi 为代表的一批细胞生物学家以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为模式生物展开了相关基因的筛选和细胞生物学的研究。到目前为止酵母中已经有 34 种细胞自噬相关基因(ATG, *AuTophagy-related Genes*)被发现(功能及同源物情况见表 1)<sup>[7]</sup>。经过二十多年的积累,酵母已成为细胞自噬分子机制研究最为充分的模式生物。

本文介绍的重点是在酿酒酵母中发生的宏自噬。这一过程在自噬体组装位点(PAS, Pre-autophagosomal structure/Phagophore assembly site)发生,自噬体前体膜囊(Phagophore/Isolation membrane)在相关蛋白的作用下扩展、生长成双层膜结构的自噬体,细胞质物质同时被包裹进自噬体内腔;随后自噬体的外膜与液泡融合,其内膜与内含物被水解酶降解为氨基酸等小分子物质,为细胞重新利用,帮助细胞度过逆境<sup>[1]</sup>(图 1)。细胞自噬既可以是非选择性的,也可

\* 通讯作者。Tel: 022-23499550, E-mail: zxie@nankai.edu.cn

**Table 1 List of yeast Atg proteins**

Name <sup>a</sup>	Function	Homologues in higher eukaryotes
<b>Atg1</b>	Serine/threonine protein kinase, regulates magnitude of autophagy.	Yes ULK1/2
<b>Atg2</b>	Interacts with Atg18, mediates the retrieval of Atg9 from the PAS back to peripheral sites.	Yes
<b>Atg3</b>	E2-like conjugating enzyme, functions in the conjugation of Atg8.	Yes
<b>Atg4</b>	Cysteine protease, removes the C-terminal arginine residue from newly synthesized Atg8 or PE from Atg8-PE conjugate.	Yes
<b>Atg5</b>	Conjugation target of Atg12, part of the Atg12-Atg5-Atg16 complex.	Yes
<b>Atg6/Vps30</b>	Common component of class III PI3K complex I and II, functions in autophagy and the VPS pathway.	Yes Beclin1
<b>Atg7</b>	E1-like activating enzyme, functions in the conjugation of Atg8 and Atg12.	Yes
<b>Atg8</b>	Ubiquitin-like protein, conjugated to PE, controls the expansion of the phagophore.	Yes LC3, GABARAP
<b>Atg9</b>	Transmembrane protein, shuttles between the PAS and other peripheral sites.	Yes
<b>Atg10</b>	E2-like conjugating enzyme, functions in the conjugation of Atg12.	Yes
<b>Atg11</b>	Scaffold protein, required for selective autophagy, participates in the assembly of PAS proteins.	
<b>Atg12</b>	Ubiquitin-like protein, conjugated to Atg5, part of the Atg12-Atg5-Atg16 complex.	Yes
<b>Atg13</b>	Subunit of Atg1 complex, phosphorylation status controls the activity of Atg1 and the magnitude of autophagy.	Yes
<b>Atg14</b>	Autophagy-specific component of class III PI3K complex I, targets the complex to the PAS.	Yes
<b>Atg15</b>	Vacuolar lipase, functions in the breakdown of autophagic bodies.	
<b>Atg16</b>	Component of the Atg12-Atg5-Atg16 complex, mediates the oligomerization of the complex.	Yes
<b>Atg17</b>	Subunit of Atg1 complex, regulates the magnitude of autophagy, participates in the assembly of PAS proteins.	
<b>Atg18</b>	WIPI protein, binds PI3P, interacts with Atg2 to mediate the retrieval of Atg9 from the PAS back to peripheral sites.	Yes WIPI*
<b>Atg19</b>	Cargo receptor in the Cvt pathway.	
<b>Atg20</b>	Sorting nexin, binds PI3P, functions in the Cvt pathway.	
<b>Atg21</b>	WIPI protein, binds PI3P.	Yes WIPI*
<b>Atg22</b>	Amino acid permease on the vacuolar membrane.	
<b>Atg23</b>	Peripheral membrane protein, transits with Atg9.	
<b>Atg24/Snx4</b>	Sorting nexin, binds PI3P, functions in the Cvt pathway.	
<b>Atg25</b>	Functions during macrophexophagy in <i>Hansenula polymorpha</i> .	
<b>Atg26</b>	Functions during pexophagy in <i>Pichia pastoris</i> .	
<b>Atg27</b>	Integral membrane protein, transits with Atg9.	
<b>Atg28</b>	Functions during pexophagy in <i>Pichia pastoris</i> .	
<b>Atg29</b>	Part of the Atg17-Atg29-Atg31 complex, functions in non-selective autophagy.	
<b>Atg30</b>	Receptor of peroxisomes in <i>Pichia pastoris</i> .	
<b>Atg31/Cis1</b>	Part of the Atg17-Atg29-Atg31 complex, functions in non-selective autophagy.	
<b>Atg32</b>	Receptor of mitochondria, mitochondrial outer-membrane protein.	
<b>Atg33</b>	Functions in mitophagy under certain conditions.	
<b>Atg34</b>	Paralogue of Atg19, receptor of Ams1.	

<sup>a</sup>Proteins labeled with bold font are collectively referred to as the “core autophagy machinery” proteins, reflecting the fact that these proteins are essential for autophagosomes formation and are conserved during evolution. In most cases, homologues of yeast autophagy genes found in other species are named after their yeast counterparts. Only those named differently are listed in the homologue column.

\*In general, there are multiple WIPI family members in a given species; not all WIPI proteins function in autophagy.

以是选择性的。酵母中的选择性细胞自噬主要有 Cvt (Cytoplasm to vacuole targeting) 途径、线粒体自噬 (Mitophagy)、过氧化物酶体自噬 (Pexophagy) 等途径。

## 2 酵母中细胞自噬的分子机制

细胞自噬的整个过程从概念上基本可以分为以下几个方面: (1) 细胞自噬的调控; (2) 自噬体在 PAS 的

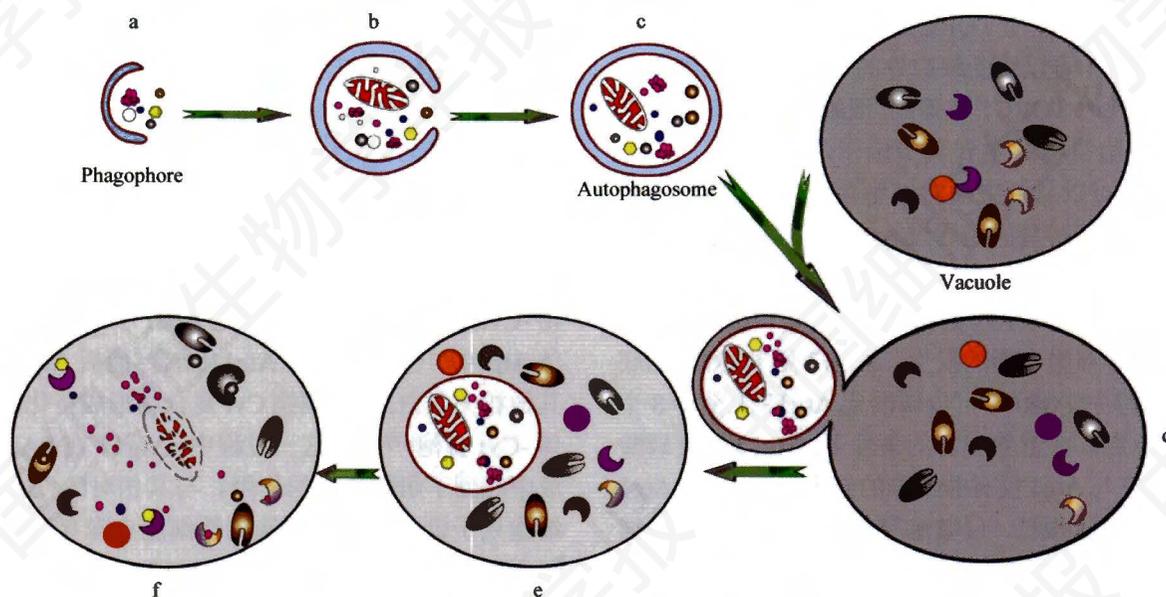


Fig. 1 The process of macroautophagy in yeast

a, b: obsolete or damaged organelles and proteins are sequestered into the concave side of an expanding membrane sac, the phagophore/isolation membrane; c: the phagophore matures into a double-membrane autophagosome; d: the outer membrane of an autophagosome fuses with the vacuole limiting membrane; e, f: the inner-membrane-bound vesicle (termed the autophagic body) enters the lumen of the vacuole; eventually, the inner membrane and the cytosolic materials enclosed are degraded by vacuolar hydrolases.

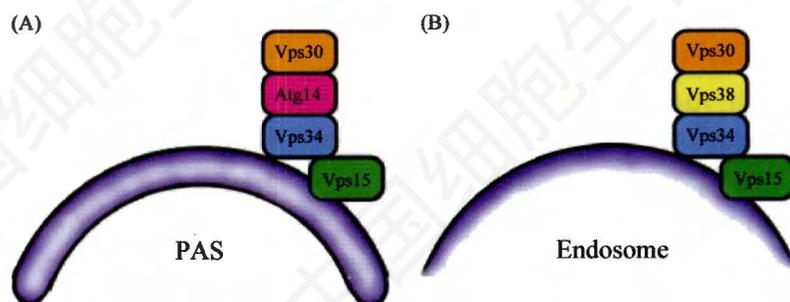


Fig. 2 The composition of PI3K complexes

A: PI3K complex I contains Vps34, Vps15, Vps30/Atg6, and Atg14. Atg14 is responsible for targeting the complex to the PAS; it mediates the interaction between Vps30 and Vps34-Vps15; B: PI3K complex II contains Vps34, Vps15, Vps30/Atg6, and Vps38. Vps38 is responsible for targeting the complex to the endosome, where it participates in the VPS (Vacuolar protein sorting) pathway.

形成; (3)自噬体与液泡融合及内含物的降解与循环利用。这里需要指出的是, 尽管其在概念上处于上游, 细胞自噬的调控并非仅限于自噬体形成的某一特定阶段, 而是贯穿于细胞自噬的整个过程。

## 2.1 细胞自噬的调控

生理条件下, 细胞自噬受到严格的调控。现在了解得比较多的细胞自噬调控通路主要有两条: TOR (Target of rapamycin)通路和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K, Phosphoinositide 3-kinase)通路。很多其他细胞自噬调控信号直接或间接的通过这两条通路发挥作用。

在此, 我们首先介绍 TOR 通路, PI3K 通路将在下面自噬体形成分子机制部分介绍。TOR 是一个在进化上与 PI3K 有亲缘关系的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 对细胞自噬起到负调控作用。在正常生长条件下, TOR 处于激活状态, 细胞自噬受到抑制; 当细胞处于饥饿或受到雷帕霉素(Rapamycin)刺激时, TOR 被抑制, 细胞自噬被诱导增强<sup>[8]</sup>。在酵母中, TOR 有两个同源基因 *TOR1*、*TOR2*, 它们可以形成两种蛋白复合物: TORC1(包含 Tor1 或 Tor2)、TORC2(仅含有 Tor2)。两个复合物都参与细胞生长与细胞内

新陈代谢的调节,而TORC1对雷帕霉素更加敏感<sup>[9]</sup>;同时,TORC1可以感受细胞外的营养条件,当细胞处于饥饿条件时TORC1被抑制,细胞自噬水平上升<sup>[10]</sup>,因此是细胞自噬的主要调节因子。

TOR可以从两方面对细胞自噬进行调节,其中目前研究比较清楚的是通过Atg1-Atg13-Atg17复合物来调节细胞自噬的水平。Atg1是细胞自噬非常关键的一个蛋白,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[11]</sup>,它的激活诱导细胞自噬的发生。Atg13是TORC1的底物,在酵母中TORC1可以磷酸化Atg13上至少8个丝氨酸位点。在营养丰富的条件下,Atg13高度磷酸化,这时它与Atg1仅有非常低的结合能力,因此Atg1的激酶活性也很低,自噬水平保持基底水平。当细胞用雷帕霉素处理或处于饥饿条件时,TORC1被抑制,Atg13迅速部分的脱磷酸化,其与Atg1、Atg17的结合能力大大提高,从而Atg1的酶活性也大大提高,细胞自噬水平迅速上升<sup>[12]</sup>。并且当细胞表达非磷酸化的Atg13突变体时,即使在营养丰富的条件下也可以激活Atg1,诱导细胞自噬<sup>[13]</sup>。同样,Atg17也是一个很关键的蛋白,atg17的突变体在饥饿条件下形成自噬体的能力大大受到限制;即使形成自噬体,其大小也不及正常情况下大小的二分之一。Atg13介导了Atg1与Atg17的相互作用;Atg17可以与Atg1-Atg13复合物相互作用,并且这种相互作用在饥饿条件下明显升高。当Atg17与Atg13的相互作用减弱时Atg1的酶活性受到抑制,这表明Atg17-Atg13复合物的形成也是细胞自噬的一个限制因素<sup>[12,14]</sup>。Atg1复合体除了含有Atg13、Atg17外,还包括Atg29、Atg31、Atg11、Atg20和Atg24,前两者主要参与非选择性细胞自噬,后三者参与Cvt途径。

TOR调节细胞自噬的另一条通路涉及Tap42和PP2A(Protein phosphatase type 2A)磷酸酶。TORC1可以磷酸化Tap42,磷酸化的Tap42可以激活PP2A磷酸酶。PP2A磷酸酶对细胞自噬有负调控的作用,但这方面的具体机制还不十分清楚<sup>[12,15]</sup>。

## 2.2 自噬体在PAS的形成

自噬体的形成是细胞自噬的关键步骤,自噬体的大小与数量也反应了细胞自噬发生的水平,这一步骤涉及的蛋白可分为几个系统,包括: PAS的组装骨架(Scaffold/adaptor)、III型PI3K信号系统、Atg9循环系统和泛素样蛋白结合系统。

**2.2.1 PAS的组装骨架** PAS是自噬体形成的位点;它通常出现在靠近液泡的位置。在荧光显微镜

下,大部分Atg蛋白都可以共定位到PAS。到目前为止,PAS的定位看来是一个酵母特有的现象:其他物种自噬体的产生位点遍布于细胞质中,而不是局限在几个有限的位点。一般认为Atg蛋白在PAS的组装起始于几个重要的骨架蛋白,其具体过程依赖于细胞自噬的调控诱导条件。在富营养生长条件下发生的Cvt途径中,PAS的组装信号来自该途径运送的货物-Cvt复合体,其主要成分是Ape1多聚体和它的受体Atg19<sup>[16,17]</sup>。Atg19与Atg11结合,而后Atg11募集其他相关蛋白,逐渐围绕Cvt复合物形成特化的自噬体-Cvt囊泡<sup>[18]</sup>。在这一过程中,Atg11在PAS的形成中起到了组装蛋白的作用。与其相对的,Atg17在细胞处于饥饿条件、非选择性细胞自噬显著增强时起主要作用<sup>[19]</sup>。当同时敲除Atg17、Atg11时,PAS无法正常组装,自噬体形成所需蛋白也无法正常定位于PAS上。这些骨架蛋白不仅是PAS组装的基础,同时还参与自噬体形成的各个方面,包括对Atg1的活性的调控<sup>[12,14]</sup>、Atg9向PAS的运输等<sup>[20,21]</sup>。需要注意的是,PAS的概念是建立在荧光显微镜下多种Atg蛋白共定位的实验基础上的。受分辨率限制,荧光显微镜观测并没有提供更精细的PAS结构信息,特别是关于膜结构方面的信息。换言之,我们现在并不清楚位于PAS的蛋白是否共处于同一个膜结构上,尽管我们的示意图暂且这样表示。

**2.2.2 PI3K复合体及其下游作用蛋白** PI3K是一类重要的胞内信号调控分子,它们通过对膜上的磷酸肌醇进行磷酸化修饰控制细胞生长、分化、细胞内物质的运输等过程。根据底物特异性,PI3K可以分为3类;其中,III型PI3K是最为古老的一类,可以将磷脂酰肌醇磷酸化为磷脂酰肌醇3-磷酸(PI3P, Phosphatidylinositol 3-phosphate)。酵母的基因组只含有一个基因编码PI3K,它对应III型PI3K-Vps34(Vacuolar protein sorting 34)<sup>[22]</sup>。Vps34至少可以参与形成两种复合物:I类复合物含有Atg14,参与细胞自噬;II类复合物含有Vps38,参与VPS(Vacuolar protein sorting)途径,负责将蛋白由高尔基体经内含体转运到液泡<sup>[23]</sup>。二者都含有Vps34、Vps15、Vps30/Atg6。Vps15是一种蛋白激酶,是Vps34的调节亚基<sup>[24,25]</sup>。Atg14将Vps30/Atg6与Vps34-Vps15连接在一起,形成复合物。起到这一作用的是Atg14 N端的I、II超螺旋结构域<sup>[26]</sup>。在细胞自噬中,Atg14将PI3K复合物定位于PAS位点,通过其产物PI3P募集下游蛋白(图2)。

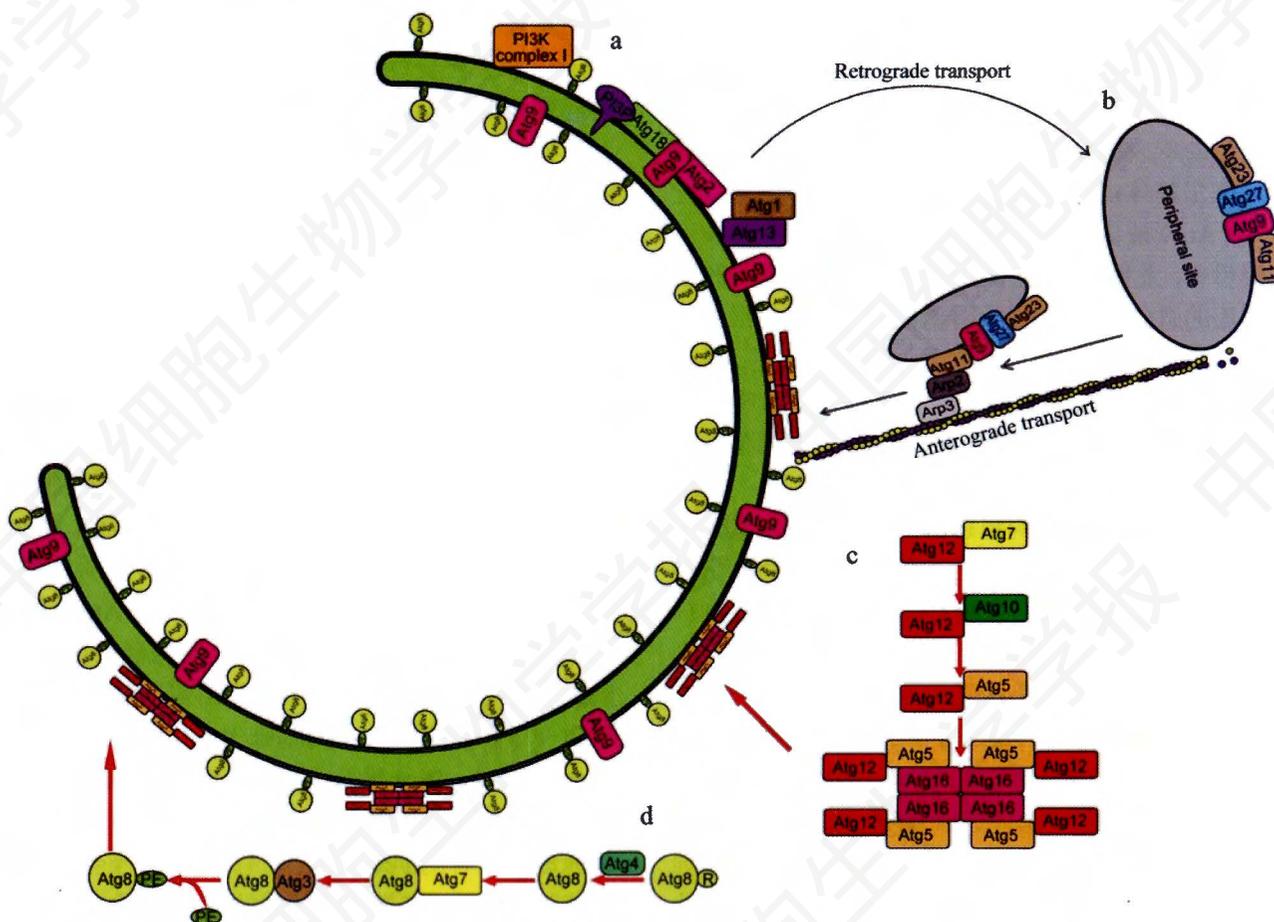


Fig. 3 The molecular machinery of autophosomes formation<sup>#</sup>

a: the PI3K signaling system. PI3K complex I is targeted to the PAS, where it produces PI3P to recruit downstream effector proteins; b: the Atg9 cycling system. Atg9 shuttles between the PAS and other peripheral sites. The anterograde trafficking of Atg9 to the PAS under nutrient rich conditions depends on Atg11, Atg23, Atg27, Actin and the Arp2-Arp3 complex. Atg9 forms a complex with Atg23 and Atg27 during trafficking. Atg11 is responsible for targeting the Atg9-Atg23-Atg27 complex to the PAS. The movement of this complex is facilitated by the Arp2-Arp3 complex. The anterograde trafficking of Atg9 under starvation condition depends on Atg17 (not shown). The retrograde trafficking of Atg9 requires the concerted action of the Atg1-Atg13 complex, Atg2-Atg18 complex and PI3K complex I; c: the Atg12 conjugation system. Atg12 is conjugated to Atg5 under the actions of Atg7 (E1) and Atg10 (E2). The resulting Atg12-Atg5 conjugate interacts with Atg16 and forms a tetrameric complex. This complex transiently resides on the convex side of the phagophore, where it facilitates the correct targeting of Atg8-PE; d: the Atg8 conjugation system. Newly synthesized or PE-conjugated Atg8 is processed by Atg4 to expose the C-terminal glycine that is needed for subsequent conjugation reaction. Atg7 (E1) and Atg3 (E2) then catalyze the conjugation of processed Atg8 to PE. Atg8-PE resides on both the convex side and the concave side of the phagophore. <sup>#</sup>At present, the details of membrane structure(s) at the PAS is lacking; it is for simplicity that most of the membrane-associated proteins are depicted as residing on the phagophore.

在细胞自噬中, PI3K 的主要下游蛋白是 Atg18 和 Atg21。虽然 Atg18、Atg21 并不含有 PI3P 结合结构域, 但它们也可以与其相互作用<sup>[27]</sup>。细胞自噬发生时, PI3P 募集 Atg18, 使其定位于 PAS 组成 Atg2-Atg18 复合体并在 Atg9 的循环中起作用(图 3)。它们中任何一个组分的缺陷都会导致 Atg9 聚集在 PAS 位点, 无法返回外周膜, 从而影响自噬体的形成。Atg18 和 Atg21 同属 WIPI 蛋白家族, Atg18 参与非选择性细胞自噬与选择性细胞自噬, 而 Atg21 主要参与选择性

细胞自噬。此外, PI3P 可以募集下游含有 PX 结构域的蛋白 Atg20 与 Atg24; 这两个蛋白在 PI3K 复合体 I、II 的作用下分别定位于 PAS 和内含体膜上, 它们在 Cvt 途径中发挥一定的作用<sup>[28,29]</sup>。

需要指出的是, 由于基因序列的错误, 一个参与 Atg9 运输的跨膜蛋白 Atg27 曾被误认为是 PI3K 的下游蛋白。这一结论已被实验推翻<sup>[30]</sup>, 但仍在近期的一些综述中出现。

2.2.3 Atg9 的循环转运 自噬体膜的起源一直是

人们致力解决的问题, 而其中的关键可能就是 Atg9。Atg9 是一个整合膜蛋白, 含有高度保守的 6 个跨膜结构域以及位于胞质中的 N 端与 C 端<sup>[31]</sup>。它在相关蛋白的协助下, 在 PAS 与外周膜结构(如线粒体、内质网、高尔基体)之间往复循环, 参与自噬体的形成过程, 故 Atg9 被认为有可能起“膜载体”的作用<sup>[20,32]</sup>。在酵母中, 大量 Atg9 位于线粒体膜的表面或与线粒体相连的组分上<sup>[32]</sup>, 但还没有明确的证据表明线粒体膜是酵母中自噬体膜的来源之一。有趣的是, 最近在哺乳动物中也有研究表明线粒体提供了自噬体生成的膜单位<sup>[33]</sup>, 尽管动物细胞里 Atg9 的同源蛋白并不出现在线粒体上。

Atg9 从外周膜结构到 PAS 的运输是需要其他蛋白的协助来完成的, 在不同的条件下需要的协助蛋白也不同。在选择性细胞自噬 Cvt 途径中, 当 Atg11、Cvt 复合体或 Actin 细胞骨架中的组分缺失任一个时, Atg9 从外周膜结构到 PAS 的运输都会被阻断<sup>[16,34,35]</sup>。Actin 相关蛋白 Arp2 与 Atg9 相互作用, 直接调节 Atg9 从外周膜结构向 PAS 的运输; 作为 Arp2-Arp3 复合物的一个亚基, 它很可能促进了 Atg9 的运动, 并重塑 Actin 结构以便于 Atg9 的运输<sup>[36]</sup>(图 3)。在饥饿诱导的非选择性细胞自噬中, 这种运输需要 Atg17 的协助。Atg17 帮助 Atg9 定位于 PAS, 进一步完成膜的组装, 但这个过程并不需要 Atg1 的激酶活性<sup>[21]</sup>。Atg1 在其中的作用很可能是调节 Atg9 在 PAS 位点组装与卸载之间的平衡。除此之外, Atg9 的顺向转运还需要 Atg23 与 Atg27, 它们同 Atg9 相似, 也是定位于 PAS 和胞质中其他一些散在的膜结构上, 在转运中, 三者是作为一个复合体单位共同转移的(图 3)。二者既参与 Cvt 途径, 又参与非选择性细胞自噬<sup>[30]</sup>。在非选择性细胞自噬中, 这两种蛋白并不是必需的: 在两者缺陷的菌株中, 自噬体仍能形成, 虽然要比正常的小<sup>[30,37]</sup>。最近又有研究发现, Atg9 可以自我相互作用, 形成一个多聚复合物, 而这种多聚复合物对 Atg9 从外周膜结构到 PAS 的运输也是很重要的, 若无法形成这种多聚复合物, 自噬体的形成便会受到限制<sup>[38]</sup>。

当自噬体形成时, Atg9 并不留在自噬体膜上, 而是从 PAS 返回胞质中的膜结构。这一逆向运输途径依赖于 Atg1-Atg13 复合体、Atg2-Atg18 复合体以及 PI3K 复合物 I(图 3)<sup>[39]</sup>。其中大家比较公认的模式是: 一旦 Atg1-Atg13 复合物与 Atg9 被募集到 PAS, Atg1-Atg13 促使 Atg9 与 Atg2-Atg18 相互作用, 这种

三元复合物的形成促使 Atg9 从 PAS 返回外周膜。

**2.2.4 泛素样蛋白结合系统** 细胞自噬中, 两个类泛素样蛋白 Atg12、Atg8 分别在泛素样酶的作用下与 Atg5、磷脂酰乙醇胺(PE, phosphatidylethanolamine)相结合, 促进自噬前体囊膜的不断延伸。Atg12、Atg8 并没有明显的泛素同源序列, 不过它们的晶体结构显示有保守的泛素样折叠结构<sup>[40,41]</sup>。

Atg12 是自噬相关蛋白中最先发现的泛素样蛋白, 其氨基酸序列 C 端最后一个为甘氨酸残基。与泛素化过程相类似, Atg12-Atg5 的形成需要 E1(泛素活化酶)、E2(泛素结合酶)样的酶, 充当这两种酶的分别是 Atg7、Atg10; 这个过程中没有典型的 E3(泛素连接酶)。其具体过程为: Atg7 与 ATP 结合, 其 507 位的半胱氨酸被激活, 与 Atg12 C 端 186 位的甘氨酸形成硫脂键<sup>[42]</sup>; 之后激活的 Atg12 在 E2 酶 Atg10 的作用下, 与其 133 位的半胱氨酸结合, 形成硫脂键<sup>[43]</sup>; 最后 Atg12 与目标蛋白 Atg5 149 位的赖氨酸相互作用, 形成一个异肽键<sup>[44]</sup>。在此基础上, Atg5 与 Atg16 相结合, 通过 Atg16 介导形成 Atg12-Atg5-Atg16 多聚体; 这个多聚体的分子量在 350kDa 左右, 所以这个多聚体应该是三者的四聚体<sup>[45]</sup>(图 3)。此外, 至今没有发现切割 Atg12-Atg5 之间异肽键的酶, 它们之间的结合作用是不可逆的。

Atg8 是一个独特的泛素样蛋白: 它的结合靶分子是脂类 PE, 而不是一般的蛋白。首先, Atg8 在半胱氨酸蛋白酶 Atg4 的作用下, 切掉其末端 117 位的精氨酸, 从而暴露出 116 位的甘氨酸<sup>[46]</sup>; 之后经过修饰的 Atg8 与 E1 样酶 Atg7 第 507 位的半胱氨酸形成一个硫脂键, 这个位点也正好是 Atg12-Atg5 系统中的作用位点<sup>[47]</sup>; 激活的 Atg8 被转移给 E2 样酶 Atg3, 与其 234 位的半胱氨酸残基形成硫脂键; 最后 Atg8 的甘氨酸残基与 PE 通过酰胺键连接, 从而与膜紧密相连<sup>[47]</sup>(图 3)。与 Atg12-Atg5 的结合不同的是, Atg8-PE 的结合是可逆的, Atg8 可以在 Atg4 的作用下, 被释放回胞质<sup>[46,48]</sup>。在整个 Atg8-PE 的结合中, Atg4 发挥了两次切割作用, 实验证明, Atg4 的第二次切割作用, 对细胞自噬的效率有一定影响。当将 Atg8 $\Delta$ R(Atg8 去掉 C 末端的精氨酸)转入 *atg4 $\Delta$*  菌株时, 虽然 Atg8-PE 仍然可以正常形成, 但 Atg8 不能被正常释放, 细胞自噬的水平与 *atg4 $\Delta$*  菌株相比仅有少量恢复。

当非选择性细胞自噬被诱导时, Atg8 的蛋白表达量迅速升高, 是自噬相关蛋白中在 PAS 密度最大的蛋白, 并且 Atg8 的量与自噬体的大小正相关<sup>[48,49]</sup>。在体

外重建试验中, Atg8 可以介导膜的结合与半融合<sup>[50]</sup>。在自噬体形成过程中, Atg8-PE 位于内外两层膜, 但当自噬体完全形成后, 外膜的 Atg8 会在 Atg4 的作用下, 释放回细胞质, 被循环利用; 而内膜的 Atg8 会随内膜一同进入液泡, 在水解酶的作用下降解<sup>[46,48]</sup>。

Atg12-Atg5-Atg16 复合体对 Atg8 作用基本表现为两方面。一方面, 在自噬体形成过程中, 二者均定位于 PAS 位点, 但 Atg8 的定位依赖于 Atg12-Atg5-Atg16, 而 Atg12-Atg5-Atg16 在 *atg8Δ* 的菌株中却能正常定位于 PAS 位点<sup>[19]</sup>。另一方面, Atg12-Atg5 在 Atg8-PE 的结合过程中表现出 E3 的功能, Atg12-Atg5 既可以与 Atg3 相作用, 又与含 PE 的脂质体相联系, 这正好符合了典型 E3 的作用模式(与 E2 的靶向底物相结合)。同时, Atg12-Atg5 加速了 Atg8 从 Atg3 向 PE 的转移<sup>[51]</sup>。在自噬体形成过程中, Atg12-Atg5-Atg16 大部分位于双层膜的外层膜<sup>[52]</sup>, 这提示我们 Atg12-Atg5-Atg16 除了将 Atg8 定位于 PAS 外, 还可能作为膜的外被体而存在。但最近的一项研究不支持这一假设: 计算表明, 位于 PAS 的 Atg16 的分子数, 即间接的 Atg12-Atg5-Atg16 的分子数, 不足以紧密覆盖整个自噬体的膜<sup>[53]</sup>。就目前已有证据而言, Atg12-Atg5-Atg16 最主要的功能便是对 Atg8 的辅助作用, 而 Atg8-PE 是双层膜不断向外延伸的直接作用者。

### 2.3 自噬体与液泡的融合与营养物质的循环利用

自噬体在靠近液泡的 PAS 形成后, 最终会与液泡融合。这个融合过程与细胞中其他囊泡与液泡的融合相类似, 该过程涉及到的蛋白有 SNARE 蛋白(Vam3、Vam7、Vti1、Ykt6)、小 GTP 酶 Ypt7、HOPS 复合体、Mon1-Ccz1 复合体等<sup>[54-56]</sup>。融合的结果是自噬体的外膜成为液泡膜的一部分, 其内膜小泡和内含物在液泡内腔被降解。

细胞自噬的目的之一便是将细胞质中一些废弃多余的大分子物质降解重新利用。目前为止, 对这方面的研究还不是很多。自噬体内膜及内含物的降解依赖于液泡内的酸环境及水解酶, 比如 Pep4、Prb1。除此之外, 酯酶 Atg15 也在这一步中发挥了相关作用<sup>[57]</sup>。一般来说, 降解得到的小分子会通过液泡膜上的相应通道被释放到细胞质中重新利用。现已知道, Atg22、Avt3、Avt4 在部分氨基酸的释放中发挥作用<sup>[58,59]</sup>。

## 3 选择性细胞自噬

细胞自噬曾被长期认为是非选择性为主的, 但随

着研究的深入, 选择性细胞自噬的生理意义愈发显著。酵母中选择性细胞自噬的研究是与非选择性细胞自噬的研究同步开展的, 现在也积累了大量的结果。酵母中的选择性细胞自噬主要有 Cvt 途径、线粒体自噬和过氧化物酶体自噬。

### 3.1 Cvt 途径

Cvt 途径是研究得最透彻的选择性细胞自噬。它的主要功能是将细胞质中的氨基肽酶(Ape1)、甘露糖酶(Ams1)等酶的前体定向送到液泡, 以使其激活并发挥其水解酶活性。Ape1 在细胞质中以无活性的前体 PrApe1 形式存在<sup>[60]</sup>。PrApe1 会形成一个寡聚体, 其后受体蛋白 Atg19 与 PrApe1 相结合, 而 Ams1 通过 Atg19 的另一个位点与 Atg19 相结合, 共同形成 Cvt 复合物<sup>[17,61]</sup>。Atg19 与 Atg11 相互作用, 引导 Cvt 复合物定位到 PAS 位点; Atg11 C 端的超螺旋结构负责其与 Atg19 的相互作用, 而其 N 端和中间的超螺旋结构负责将 Cvt 复合物定位到 PAS 位点上<sup>[18]</sup>。Atg19 进而与 Atg8-PE 相互作用, 促进特化的自噬体-Cvt 囊泡的形成。在 Cvt 囊泡形成之前, Atg11 与整个复合体解离, 释放回胞质, 而 Atg19 则被一并包进囊泡, 进入液泡<sup>[62,63]</sup>。最近有研究发现, Ams1 的受体除了 Atg19 外, 还有另外一个受体 Atg34; Atg34 是 Atg19 的同源物, 在饥饿条件下作为 Ams1 的受体, 使 Ams1 通过宏自噬进入液泡<sup>[64]</sup>。

### 3.2 线粒体自噬(Mitophagy)

特异降解线粒体的选择性细胞自噬称为线粒体自噬。线粒体是细胞内物质新陈代谢的主要细胞器, 为细胞提供能量, 同时也是细胞内 ROS(Reactive oxygen species)的主要来源。ROS 可以造成线粒体的进一步损伤, 这种损伤线粒体的累积会打破细胞内的生理平衡, 因此及时清除这些受损伤的线粒体, 维持线粒体的正常功能与数量对细胞内生理平衡是至关重要的。线粒体自噬是一种选择性细胞自噬, 除了需要细胞自噬共用的蛋白之外, 也需要一些介导特异性的蛋白。在 2009 年 Klionsky 和 Ohsumi 两个实验室同时发现 Atg32 是线粒体自噬的关键蛋白。Atg32 位于线粒体外膜上, 可以作为线粒体的受体与 Atg11 相互作用, 定位于 PAS, 之后与 Atg8-PE 相互作用, 负责自噬体的形成<sup>[65,66]</sup>。Atg32 在线粒体自噬中的作用类似于 Atg19 在 Cvt 途径中的作用。

### 3.3 过氧化物酶体自噬(Pexophagy)

过氧化物酶体负责脂类代谢与细胞内过氧化物的降解, 其生成与降解受到严格的调控。酵母可以通过

细胞自噬降解多余及受损伤的过氧化物酶体,根据降解形式的不同分为过氧化物酶体宏自噬(Macropexophagy)和过氧化物酶体微自噬(Micropexophagy)<sup>[67]</sup>。研究过氧化物酶体自噬最常用的模式生物不是酿酒酵母,而是另外两种生有大量过氧化物酶体的酵母:在 *Pichia pastoris* 与 *Hansenula Polymorpha* 中,细胞可以利用甲醇作为唯一的碳源生长;当将碳源从甲醇换为乙醇或葡萄糖时,过氧化物酶体便会过剩,这时就会发生自噬以降解多余的过氧化物酶体。同 Cvt 途径一样,过氧化物酶体自噬也需要 Atg11。除此之外, Pex14 是细胞自噬赖以识别过氧化物酶体的表面标志,而 Pex3 必须被去除才能使过氧化物酶体被吞食<sup>[68,69]</sup>。这一过程中相应的受体蛋白是 Atg30,它连接 Atg11 与 Pex14<sup>[70]</sup>。

## 4 酵母中研究细胞自噬的主要手段

经过二十多年的积累,研究人员发明了丰富多样的针对酵母细胞自噬的检测手段,其中常用的主要有以下几种:

### 4.1 Western blot 检测 Atg8 以及降解的 Atg8 的量

用这种方法检测细胞自噬是因为部分 Atg8 位于自噬体的内膜,随同自噬体一同进入液泡降解,通过对比降解的 Atg8 的量便可知道形成的自噬体的量,进而知道细胞自噬发生水平的高低。这种方法一般是在 Atg8 的 N 端连上标签蛋白,如绿色荧光蛋白 GFP;当自噬体与液泡融合后,其内含物被释放进液泡被水解酶降解,包括 GFP-Atg8;由于 GFP 结构域的稳定性比较高,会单独存在一段时间,因而可以通过 Western blot 检测 GFP 的条带来衡量降解的 GFP-Atg8 的量,间接检测细胞自噬发生水平的高低。此外,用荧光蛋白做标签,也可以通过荧光显微镜观察 Atg8 的定位。

### 4.2 Pho8Δ60 测定法

Pho8Δ60 测定法也称 ALP(alkaline phosphatase)测定法。PHO8 是酵母液泡中碱性磷酸酶的唯一编码基因,是一类 II 型跨膜蛋白。它首先以无活性的前体形式在内质网被合成,而后经过高尔基体转运至液泡。在液泡中,其 C 端的肽段被液泡内的水解酶切掉,成为有活性的碱性磷酸酶。其 N 端的 60 个氨基酸构成包括跨膜结构域在内的转运信号,负责前体 Pho8 一步步的转运。为了利用 Pho8 来检测细胞自噬的水平,人们将其 N 端的 60 个氨基酸去掉<sup>[71]</sup>,故叫做 Pho8Δ60 测定法。这样处理之后的 Pho8Δ60 蛋

白无法进入内质网,只能分散在胞质中;而当发生非选择性细胞自噬时,Pho8Δ60 便会被包进自噬体,从而到达液泡并被激活。这样便可通过碱性磷酸酶的酶活性来定量检测细胞自噬发生的水平。除此之外,还可以通过将 Pho8Δ60 与靶向特异细胞器的蛋白相融合,利用这种方法检测此细胞器的特异性降解情况<sup>[72]</sup>。

### 4.3 Western blot 检测 mApe1 的量

PrApe1 是 Ape1 的前体形式,它存在于细胞质中,没有活性。在正常条件下它大部分通过 Cvt 途径进入液泡;而在饥饿条件或其他压力状态下,它也会随细胞质通过非选择性的细胞自噬进入液泡成为成熟的 mApe1。这样我们可以通过 Western blot 检测成熟的 mApe1 的量来评估细胞自噬发生的水平。

### 4.4 显微镜观察

显微镜观察也是细胞自噬研究中常用的手段。细胞自噬的研究起点便是从用显微镜观察到自噬体而开始的,随后显微镜在细胞自噬的研究进程中起了很大作用:从电子显微镜观察自噬体的形态、大小、基本位置,到荧光显微镜观察自噬相关蛋白的定位、分布,这些都给科研人员提供了非常有用的实验数据。如在电子显微镜下,可以观察到自噬体、液泡、液泡中的自噬小体(Autophagic body)等结构,便于直观把握实验结果。由于电子显微镜样品的制备比较复杂,这一技术通常在其他方法已有明确结果时用于进一步的确认。现在应用比较广泛的是荧光显微镜技术。例如,用 GFP 标记 Atg8,便可以通过荧光显微镜观察 Atg8 的运动,掌握细胞自噬的动态变化<sup>[48]</sup>。Atg9 被认为是一种“膜载体”,用荧光蛋白标记 Atg9 便可以检测其在 PAS 与外周膜结构之间的循环运动,如当敲除 ATG1、ATG2 或 ATG18 时,Atg9 便会聚集在 PAS 位点,说明他们与其返回外周膜结构相关<sup>[32,39]</sup>。

## 5 小结

细胞自噬是真核细胞的一个基本功能,它在维持细胞内生理平衡的过程中起关键的作用。研究表明,细胞自噬的缺陷与人类多种疾病密切相关,暗示细胞自噬有可能成为治疗疾病的一个新的靶点;各种有重要生理意义的选择性细胞自噬途径的发现更加强了人们对细胞自噬的兴趣。以酵母为模式生物开展的分子遗传学研究为揭示细胞自噬的奥秘提供了开启第一扇大门的钥匙;在酵母中发现的分子机制大多可以应用到包括哺乳动物在内的多细胞生物中。我们

希望本文对酵母中的研究成果的介绍能对初入细胞自噬研究领域的研究人员有一定的参考作用。细胞自噬是当前细胞生物学领域发展势头最快的研究方向之一。随着近年来大量高水平的实验室进入这一领域,关于细胞自噬的知识积累也呈现出爆炸性的增长<sup>[73]</sup>。可以预见,在接下来的几年中,自噬体膜的来源、自噬体膜的扩展成熟机制、针对细胞自噬的药物开发等方面将会有突破性的进展;而这些突破又会给细胞自噬的研究提出新的问题,使细胞自噬领域的研究呈现出更加绚丽夺目的面貌。

本实验室的研究受国家自然科学基金面上项目30971441支持,在此我们对国家自然科学基金委员会致以诚挚的谢意。

### 参考文献(References)

- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9 (10): 1102-9.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10 (7): 458-67.
- Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* 2008; 15 (3): 344-57.
- Munz C. Antigen processing via autophagy—not only for MHC class II presentation anymore? *Curr Opin Immunol* 2010; 22 (1): 89-93.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451 (7182): 1069-75.
- Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 2008; 4 (6): 740-3.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003; 5 (4): 539-45.
- Cebollero E, Reggiori F. Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793 (9): 1413-21.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, *et al.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002; 10 (3): 457-68.
- Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998; 273 (7): 3963-6.
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1997; 192 (2): 245-50.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000; 150 (6): 1507-13.
- Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, *et al.* Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* 2010; 30 (4): 1049-58.
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell* 2005; 16 (5): 2544-53.
- Yorimitsu T, He C, Wang K, Klionsky DJ. Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy* 2009; 5 (5): 616-24.
- Shintani T, Klionsky DJ. Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 29889-94.
- Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ. Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell* 2002; 3 (6): 825-37.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ. Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell* 2005; 16 (4): 1593-605.
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 2007; 12 (2): 209-18.
- He C, Song H, Yorimitsu T, Monastyrska I, Yen WL, Legakis JE, *et al.* Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *J Cell Biol* 2006; 175 (6): 925-35.
- Sekito T, Kawamata T, Ichikawa R, Suzuki K, Ohsumi Y. Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes Cells* 2009; 14 (5): 525-38.
- Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 1993; 260 (5104): 88-91.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2001; 152 (3): 519-30.
- Stack JH, DeWald DB, Takegawa K, Emr SD. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol* 1995; 129 (2): 321-34.
- Slessareva JE, Routt SM, Temple B, Bankaitis VA, Dohlman HG. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* 2006; 126 (1): 191-203.
- Obara K, Sekito T, Ohsumi Y. Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes—Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2006; 17 (4): 1527-39.
- Obara K, Sekito T, Niimi K, Ohsumi Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J Biol Chem* 2008; 283 (35): 23972-80.
- Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, Emr SD, Klionsky DJ. Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required

- for selective autophagy. *J Biol Chem* 2002; 277 (33): 30198-207.
- 29 Hettema EH, Lewis MJ, Black MW, Pelham HR. Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *EMBO J* 2003; 22 (3): 548-57.
- 30 Yen WL, Legakis JE, Nair U, Klionsky DJ. Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol Biol Cell* 2007; 18 (2): 581-93.
- 31 Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y, *et al.* Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* 2000; 148 (3): 465-80.
- 32 Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* 2005; 1 (2): 101-9.
- 33 Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*; 141 (4): 656-67.
- 34 Reggiori F, Monastyrska I, Shintani T, Klionsky DJ. The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2005; 16 (12): 5843-56.
- 35 Monastyrska I, Shintani T, Klionsky DJ, Reggiori F. Atg11 directs autophagosome cargoes to the PAS along actin cables. *Autophagy* 2006; 2 (2): 119-21.
- 36 Monastyrska I, He C, Geng J, Hoppe AD, Li Z, Klionsky DJ. Arp2 links autophagic machinery with the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 2008; 19 (5): 1962-75.
- 37 Tucker KA, Reggiori F, Dunn WA Jr, Klionsky DJ. Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *J Biol Chem* 2003; 278 (48): 48445-52.
- 38 He C, Baba M, Cao Y, Klionsky DJ. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell* 2008; 19 (12): 5506-16.
- 39 Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 2004; 6 (1): 79-90.
- 40 Suzuki NN, Yoshimoto K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* 2005; 1 (2): 119-26.
- 41 Paz Y, Elazar Z, Fass D. Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem* 2000; 275 (33): 25445-50.
- 42 Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, *et al.* Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* 1999; 10 (5): 1367-79.
- 43 Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, Matsuura A, Noda T, Ohsumi Y. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J* 1999; 18 (19): 5234-41.
- 44 Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 1998; 395 (6700): 395-8.
- 45 Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 2002; 277 (21): 18619-25.
- 46 Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, *et al.* The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 2000; 151 (2): 263-76.
- 47 Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; 408 (6811): 488-92.
- 48 Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 2008; 19 (8): 3290-8.
- 49 Xie Z, Nair U, Geng J, Szeffler MB, Rothman ED, Klionsky DJ. Indirect estimation of the area density of Atg8 on the phagophore. *Autophagy* 2009; 5 (2): 217-20.
- 50 Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 2007; 130 (1): 165-78.
- 51 Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, *et al.* The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282 (52): 37298-302.
- 52 Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003; 116 (Pt 9): 1679-88.
- 53 Geng J, Baba M, Nair U, Klionsky DJ. Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 2008; 182 (1): 129-40.
- 54 Wang CW, Stromhaug PE, Shima J, Klionsky DJ. The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. *J Biol Chem* 2002; 277 (49): 47917-27.
- 55 Wang CW, Stromhaug PE, Kauffman EJ, Weisman LS, Klionsky DJ. Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. *J Cell Biol* 2003; 163 (5): 973-85.
- 56 Ostrowicz CW, Meiringer CT, Ungerermann C. Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics. *Autophagy* 2008; 4 (1): 5-19.
- 57 Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM, Klionsky DJ. Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* 2001; 276 (3): 2083-7.
- 58 Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 2006; 17 (12): 5094-104.
- 59 Russnak R, Konczal D, McIntire SL. A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J Biol Chem* 2001; 276 (26): 23849-57.
- 60 Klionsky DJ, Cueva R, Yaver DS. Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol* 1992; 119 (2): 287-99.

- 61 Kim J, Scott SV, Oda MN, Klionsky DJ. Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 1997; 137 (3): 609-18.
- 62 Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, Guan J, Hefner-Gravink A, Baba M, *et al.* Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *J Cell Biol* 2001; 153 (2): 381-96.
- 63 Scott SV, Guan J, Hutchins MU, Kim J, Klionsky DJ. Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* 2001; 7 (6): 1131-41.
- 64 Suzuki K, Kondo C, Morimoto M, Ohsumi Y. Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, ATG34. *J Biol Chem* 2010; 285 (39): 30019-25.
- 65 Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* 2009; 17 (1): 98-109.
- 66 Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 2009; 17 (1): 87-97.
- 67 Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, Kiel JA. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763 (12): 1767-75.
- 68 Bellu AR, Komori M, van der Klei IJ, Kiel JA, Veenhuis M. Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p. *J Biol Chem* 2001; 276 (48): 44570-4.
- 69 Zutphen T, Veenhuis M, van der Klei IJ. Pex14 is the sole component of the peroxisomal translocon that is required for pexophagy. *Autophagy* 2008; 4 (1): 63-6.
- 70 Farre JC, Manjithaya R, Mathewson RD, Subramani S. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell* 2008; 14 (3): 365-76.
- 71 Noda T, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y. Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210 (1): 126-32.
- 72 Campbell CL, Thorsness PE. Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 16): 2455-64.
- 73 Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8 (11): 931-7.

## Current Knowledge of Autophagy in Yeasts

Hai-Yan Wang<sup>1</sup>, Tao Ni<sup>2</sup>, Zhi-Ping Xie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China;*

<sup>2</sup>*College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)*

**Abstract** Autophagy is a highly conserved subcellular degradation process in eukaryotes. By eliminating obsolete or damaged cytoplasmic materials, autophagy is critical in maintaining intracellular homeostasis under stress conditions. In multi-cellular organisms, autophagy plays important roles in development, immune defense, programmed cell death, tumor suppression, and prevention of neurodegeneration. Studies using yeast model systems have been instrumental in unlocking the molecular secrets of autophagy since the early 90s; and they remain a major source of new discoveries in the field of autophagy related research. Here we provide a summary of our current knowledge of autophagy in yeasts and a brief introduction to frequently used assays.

**Key words** autophagy; molecular mechanism; yeast; assay

\*Corresponding author. Tel: 86-22-23499550, E-mail: zxie@nankai.edu.cn