

# 酵母中糖饥饿下的细胞自噬: 诱导条件和现有 Atg蛋白作用的初步探索

单梅华<sup>1</sup> 谢志平<sup>2</sup> 王悦<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南开大学医学院, 天津 300071; <sup>2</sup>上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

**摘要** 细胞自噬是一类有利于维持真核细胞正常生存的保护性亚细胞降解途径, 作者猜测不同环境下发生的自噬也会有不同的分子机制。该文的目的是探索在出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中能有效诱导自噬的糖饥饿条件, 并着重研究糖饥饿和氮饥饿时自噬分子机制的差异。作者首先尝试了四种糖饥饿诱导条件YCD-D、SC-D、SD-D及YPD-D, 并最终确定将诱导水平最强的SC-D作为后续实验条件, 进一步检测了SC-D条件下各atg突变菌株的自噬诱导水平。根据Pho8Δ60方法和GFP-Atg8剪切方法的结果, 初步判断atg11Δ、atg20Δ、atg21Δ、atg23Δ和atg38Δ这些突变菌株在糖饥饿条件下的自噬诱导水平不同于氮饥饿。这些工作为进一步探索糖饥饿条件下的自噬分子机制奠定了基础。

**关键词** 细胞自噬; 糖饥饿; Atg; 分子机制; 酵母

## Glucose Starvation Induced Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*: Inducing Conditions and Unique Involvement of Select Atg Proteins

Shan Meihua<sup>1</sup>, Xie Zhiping<sup>2</sup>, Wang Yue<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract** Nutrient depletion induces autophagy, a protective subcellular degradation process. We hypothesized that autophagy triggered by different conditions might involve diverse molecular mechanisms. Here we explored glucose starvation conditions that efficiently induce autophagy in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and examined the differential involvement of known Atg proteins in autophagy between nitrogen and glucose starvation conditions. We tested four conditions of glucose depletion, including YCD-D, SC-D, SD-D and YPD-D, and found SC-D to be most effective at inducing autophagy. We further tested the levels of autophagy in all 38 atg mutants under both glucose starvation (SC-D) and nitrogen starvation (SD-N) conditions, using the Pho8Δ60 assay and the GFP-Atg8 processing assay. We found that five mutants, including atg11Δ, atg20Δ, atg21Δ, atg23Δ and atg38Δ, displayed differing levels of autophagy under the two conditions. In particular, autophagy in atg11Δ and atg20Δ cells was reduced in SC-D, but normal in SD-N; autophagy in atg21Δ and atg23Δ cells was blocked in SC-D, but only partially reduced in SD-N. In contrast, the level of autophagy in atg38Δ cells was normal in SC-D, but reduced in SD-N. Our work laid the foundation for further mechanistic investigation of glucose starvation induced autophagy.

**Keywords** autophagy; glucose starvation; Atg; molecular mechanism; yeast

收稿日期: 2015-01-19 接受日期: 2015-03-16

国家自然科学基金(批准号: 31471301、31222034、31171285)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 022-23508677, E-mail: wangyue@nankai.edu.cn

Received: January 19, 2015 Accepted: March 16, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471301, 31222034, 31171285)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23508677, E-mail: wangyue@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-01 14:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1442.003.html>

细胞自噬是真核生物中不可缺少的一种应对生存危机的亚细胞降解过程<sup>[1-3]</sup>。它通过形成一种双层膜的自噬泡(*autophagosome*), 包裹细胞中的物质运送到溶酶体(酵母中为液泡)进行降解, 使氨基酸、脂质、核苷酸等物质得到重复利用, 帮助细胞度过逆境<sup>[4]</sup>。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中多种条件可以诱导自噬的发生: 除传统的氮饥饿以外, 硫饥饿、以甘油为碳源的碳饥饿以及单一氨基酸饥饿都可以诱导自噬<sup>[5-6]</sup>。动物细胞则多采用氨基酸饥饿、糖饥饿或雷帕霉素诱导。

细胞自噬于20世纪60年代初在哺乳细胞中被发现<sup>[7]</sup>。它的分子机制以及与多种生理过程的联系已经有了较为详尽的报道, 其中一个重要的突破源于对出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)的遗传筛选<sup>[8-14]</sup>。至目前为止, 在这些酵母中已经有38种自噬相关(*autophagy-related*, *ATG*)基因被发现<sup>[15]</sup>, 其中, 17种组成了细胞自噬的核心机制, 对于非选择性自噬和Cvt(*cytoplasm to vacuole targeting*)途径、线粒体自噬(*mitophagy*)、过氧化物酶体自噬(*pexophagy*)等选择性自噬都是必不可少的。其他21种则相对特异地在某种自噬途径中发挥作用<sup>[3,16-19]</sup>。这些关于*ATG*基因的研究结果绝大多数是在氮饥饿诱导的情况下得出的。

细胞自噬的发生过程主要受三种保守的激酶调控。氮饥饿条件下的调节机制已经有了比较明确的研究: 即AMP活化激酶(*AMP-activated protein kinase*, *AMPK*)诱导自噬、cAMP依赖性蛋白激酶[*cAMP-dependent protein kinase*, also known as *protein kinase A* (*PKA*)]和雷帕霉素靶向激酶复合体1(*target of rapamycin complex 1*, *TORC1*)抑制自噬<sup>[20]</sup>。在酵母中, 糖饥饿时*AMPK*途径被激活, *PKA*被抑制<sup>[21-22]</sup>。动物细胞中, 糖饥饿条件下己糖激酶II通过TOS结构域结合*mTORC1*, 从而抑制*mTORC1*的活性<sup>[23]</sup>。由*Unc-51*样蛋白激酶1(*Unc-51-like kinase 1*, *ULK1*)及其调控蛋白*ATG13*和*FIP200*组成的*ULK1*复合体在营养条件下被*mTORC1*抑制, 当*mTORC1*失活时, *ULK1*复合体被激活并引发自噬。然而也有报道称, 作为*mTORC1*的底物, *ULK1*复合体在糖饥饿诱导的自噬中是可有可无的: *ULK1*和*ATG5*复合体通过各自的组分蛋白*FIP200*和*ATG16L1*相互作用, 这种相互作用消失时, 氨基酸饥饿诱导的自噬被完全阻断, 而糖

饥饿则不受影响<sup>[24]</sup>。总之, 我们对糖饥饿条件下的自噬过程和自噬相关信号通路了解不多, 并且从现有的研究来看, 氮饥饿条件下自噬的相关分子机制的结果并不能完全代表糖饥饿条件下的情况。

为了更透彻地了解糖饥饿条件下的自噬, 我们以自噬研究最为透彻的酵母为模式生物, 探索相关分子机制。本文选取了四种糖饥饿条件YPD-D(*Yeast extract*, *Peptone*, *Dextrose without Dextrose*)、SC-D(*Synthetic Complete without Dextrose*)、SD-D(*Synthetic minimal Dextrose without Dextrose*)和YCD-D(*Yeast nitrogen base*, *Casamino acids*, *Dextrose without Dextrose*), 分别测试了它们的自噬诱导水平, 最后确定了SC-D是能有效诱导自噬发生的糖饥饿条件。之后, 我们检测了这种条件下各种*atg*突变菌株的自噬情况。结果表明, *atg11Δ*、*atg20Δ*、*atg21Δ*、*atg23Δ*和*atg38Δ*这些突变菌株的自噬发生水平有别于传统的氮饥饿, 这证明细胞自噬在氮和糖缺失的情况下存在某些不同的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

本文使用的是BY4741背景の出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的基因敲除库<sup>[25]</sup>。在此基础上, 我们根据实验需要构建了一系列其他菌株(表1)。

其中, 基因*ATG1*、*ATG11*、*ATG20*是利用基因重组的方法直接进行基因敲除, 以质粒UG72/UG27为模板, 所用引物见表2, PCR获得含有约48 bp *ATG*基因同源序列以及表达筛选标记基因*URA3/HIS3*的基因片段, 该PCR片段可直接替换目的敲除基因的编码框。然后对得到的菌落进行菌落PCR验证和*Pho8Δ60*方法验证, 以确保菌株的正确性。*pho8Δ60*和*pho1Δ3*的构建利用含有同源序列的质粒*pho8Δ60-HIS*<sup>[26]</sup>/*pho13Δ-LEU2*, 通过PCR或酶切得到DNA片段, 再进行转化敲除。质粒*pho13Δ-LEU2*是为提高敲除效率, 对质粒*pho13Δ-LEU*<sup>[26]</sup>进行改造而得: 以BY4741基因组为模板PCR得到*pho13*起始密码子上游250~850 bp的片段pro(引物: 5'-AGA TCC GCG GTT GGA TAT TTT AGA CAA TGG-3'和5'-CAG CGA GCT CAT CTT CAA CGT CTT CCT CTA-3')和终止密码子上游100 bp至下游500 bp的片段ter(引物: 5'-GGT TGT CGA CCG AAG AGA GAG CCT TGA AGA-3'和5'-GTA CGC GGC CGC TGG GCC ATT

表1 研究所用的菌株  
Table 1 Strains used in this study

名称 Name	基因型 Genotype	来源 Source
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 met15Δ0 ura3Δ0</i>	[25]
Ys4741	BY4741 <i>pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys711	BY4741 <i>atg11Δ::URA pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys719	BY4741 <i>atg19Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys720	BY4741 <i>atg20Δ::URA pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys721	BY4741 <i>atg21Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys722	BY4741 <i>atg22Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys723	BY4741 <i>atg23Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys724	BY4741 <i>atg24Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys726	BY4741 <i>atg26Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys727	BY4741 <i>atg27Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys729	BY4741 <i>atg29Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys731	BY4741 <i>atg31Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys732	BY4741 <i>atg32Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys733	BY4741 <i>atg33Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys734	BY4741 <i>atg34Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys738	BY4741 <i>atg38Δ::KanMX pho8Δ60::HIS pho13Δ::LEU</i>	This study
Ys500	BY4741 <i>leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys501	BY4741 <i>atg1Δ::HIS leu2::LEU2 met15::MET15 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys511	BY4741 <i>atg11Δ::HIS leu2::LEU2 met15::MET15 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys513	BY4741 <i>atg13Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys517	BY4741 <i>atg17Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys519	BY4741 <i>atg19Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys520	BY4741 <i>atg20Δ::HIS leu2::LEU2 met15::MET15 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys521	BY4741 <i>atg21Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys522	BY4741 <i>atg22Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys523	BY4741 <i>atg23Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys524	BY4741 <i>atg24Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study
Ys526	BY4741 <i>atg26Δ::KanMX leu2::LEU2 met15::MET15 his3::HIS3 ura3::URA3-GFP-Atg8</i>	This study

表2 用于基因敲除的引物  
Table 2 Primers used for gene deletion

引物名称 Name	引物序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
Atg1 F	ATG GGA GAC ATT AAA AAT AAA GAT CAC ACA ACC TCT GTG AAC CAT AAT GCT TCG TAC GCT GCA GGT CG
Atg1 R	TTA ATT TTG GTG GTT CAT CTT CTG CCT CAA TAT TTT CAA CCT GTT TGC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TC
Atg11 F	ATG GCA GAC GCT GAT GAA TAT AGC ACT GCA CCT ACC CAG CAA GAA ATA GCT TCG TAC GCT GCA GGT CG
Atg11 R	TCA AAC TCC CTG GTA TGA AAC CAC AAC CGC AGT GAC CTG AAA CCA AAC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TC
Atg20 F	ATG TCA GAC TTA AAT GAT GTC CAA GAA AAT GCT AAA TTG AAT TCG GAA GCT TCG TAC GCT GCA GGT CG
Atg20 R	CTA TGC AAA ATC TTG ATG TCT TTT GAC TTC TTT CCA AAT TTC TAA ATT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TC

TTT TAA AGG-3')。片段pro用*Sac* II和*Sac* I消化, 插入到质粒的*Sac* II-*Sac* I位点; 同时, 片段ter用*Sal* I和*Not* I消化, 插入到*Sal* I-*Not* I位点, 最后得到质粒pho13Δ-LEU2。

另外, 质粒BS-Ura3-GFP-Atg8可以表达GFP-Atg8的融合蛋白(待发表), 本文利用它检测游离GFP及GFP-Atg8的相对比例, 从而推知酵母中自噬发生的水平。

## 1.2 细胞培养条件

细胞在营养条件下培养至对数期( $D_{600}$ 约1.0), 然后分别取3 *D*转至糖饥饿培养基饥饿4 h, 诱导自噬。本文用到的培养条件如表3所示。

## 1.3 Pho8Δ60方法中ALP(alkaline phosphatase)酶活检测

在*pho8Δ60 pho13Δ*菌株中, 自噬的诱导水平

可以通过测定碱性磷酸酶的活性进行定量检测<sup>[27]</sup>。收取3 *D*细胞沉淀, 加入150  $\mu$ L裂解液(20 mmol/L PIPES pH6.8, 50 mmol/L KCl, 100 mmol/L KOAc, 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ mol/L ZnSO<sub>4</sub>, 1 mmol/L PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.5% Triton X-100)和100  $\mu$ L玻璃粉震荡破碎, 离心, 取4  $\mu$ L上清液加入16  $\mu$ L裂解液、80  $\mu$ L含有底物 $\rho$ -对硝基苯磷酸二钠盐( $\rho$ -nitrophenylphosphate, 1.3 mmol/L)的反应液(250 mmol/L Tris-HCl pH8.5, 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ mol/L ZnSO<sub>4</sub>, 0.4% Triton X-100)来检测酶的活性, 30  $^{\circ}$ C反应一段时间后加入100  $\mu$ L终止液(1 mol/L glycine, pH11.0)终止反应。自噬水平由以下公式计算:

$$\text{Autophagy activity} = (D_{\text{sample}} - D_{\text{enzyme blank}} - D_{\text{substrate blank}}) / (\text{Reaction time} \times \text{Protein concentration} \times 0.018)$$

#### 1.4 GFP-Atg8免疫印迹

细胞培养到对数期后, 转至糖饥饿培养基4 h, Western blot检测GFP标签<sup>[26]</sup>。1%脱脂奶粉+1:5 000的GFP一抗(M20004L, ABMART公司)孵育2 h, 洗膜5次, 1%脱脂奶粉+1:10 000的Anti-mouse二抗(W402B, Promega公司)孵育2 h, 洗膜, 曝光。内参抗体为 $\beta$ -actin(AT0014, CMCTAG公司)。

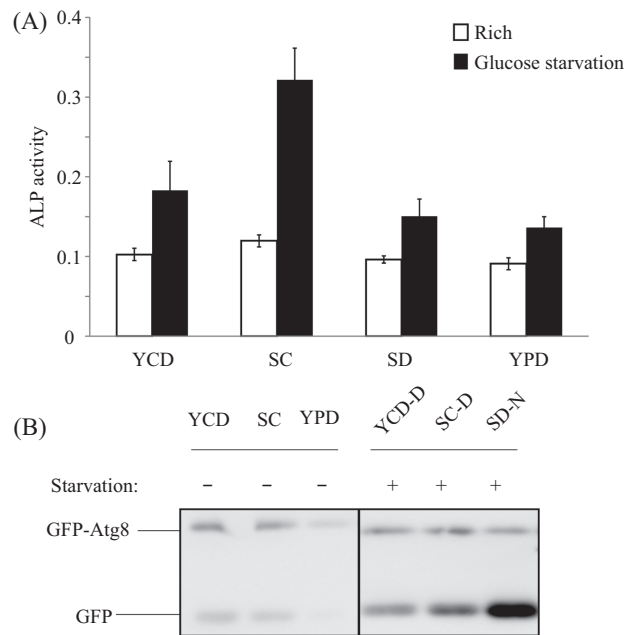
#### 1.5 统计学分析

在本实验中的统计采用SPSS 17.0软件完成分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对正常组与饥饿组采用两独立样本 $t$ 检验进行统计学分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用Illustrator绘图分析软件进行图片绘制。

## 2 结果

### 2.1 诱导细胞自噬的糖饥饿条件的探索

为了探究细胞自噬在氮或糖缺失条件下分子



A: 野生型酵母Ys4741在不同的培养基(YCD、SC、SD、YPD)中培养至对数期, 然后转入相应的糖饥饿培养基中饥饿4 h。采用Pho8D60的方法检测自噬水平。所标误差线为标准差,  $n=3$ ; B: 表达GFP-Atg8的细胞Ys500在YCD、SC、YPD培养基中培养至对数期, 然后分别转入相应的缺糖培养基YCD-D、SC-D和缺氮培养基SD-N中饥饿培养4 h。每条泳道加样5  $\mu$ g蛋白, 用GFP抗体做Western blot检测蛋白含量。

A: wild type yeast cells (Ys4741) were grown to mid-log phase in four different media (YCD, SC, SD and YPD), and then shifted to corresponding glucose-depleted media for 4 h. The levels of autophagy were measured by the Pho8 $\Delta$ 60 assay. Error bar=standard deviation,  $n=3$ ; B: wild type cells (Ys500) expressing GFP-Atg8 from plasmid BS-URA3-GFP-Atg8 were grown to mid-log phase in YCD, SC or YPD, and then shifted to YCD-D, SC-D or SD-N for 4 h. For each sample, 5  $\mu$ g of total protein was loaded and analyzed by Western blot with anti-GFP antibody.

图1 能有效诱导自噬的糖饥饿条件的探索

Fig.1 The search for glucose starvation conditions effective at inducing autophagy

表3 酵母细胞培养基  
Table 3 Yeast media recipe

培养基名称 Name	培养基成分 Compositions
YCD (Yeast nitrogen base, Casamino acids, Dextrose)	0.67% yeast nitrogen base, 0.5% casamino acids, 20 mg/L uracil, 50 mg/L tryptophan and 2% glucose
SC (Synthetic Complete)	0.67% yeast nitrogen base, 20 mg/L adenine sulfate, 20 mg/L uracil, 20 mg/L tryptophan, 20 mg/L histidine-HCl, 20 mg/L arginine-HCl, 20 mg/L methionine, 30 mg/L tyrosine, 60 mg/L leucine, 30 mg/L isoleucine, 30 mg/L lysine-HCl, 50 mg/L phenylalanine, 100 mg/L glutamic acid, 100 mg/L aspartic acid, 150 mg/L valine, 200 mg/L threonine, 400 mg/L serine and 2% glucose
SD (Synthetic minimal Dextrose)	0.67% yeast nitrogen base, 30 mg/L adenine sulfate, 20 mg/L uracil, 20 mg/L histidine-HCl, 50 mg/L leucine, 30 mg/L lysine-HCl, 50 mg/L tryptophan, 20 mg/L methionine and 2% glucose
YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose)	1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose

机制的不同, 首先需要找出能有效诱导自噬发生的糖饥饿条件。我们在基本合成培养基SMD(Synthetic Minimal Dextrose)中分别加入酪蛋白氨基酸以及不同组合的核碱基、氨基酸配制成不同的培养基YCD、SC、SD(表3); 第四种培养条件是全营养培养基YPD。这些培养基未加糖的培养基就是对应的糖饥饿培养基YCD-D、SC-D、SD-D、YPD-D。通过Pho8Δ60方法检测野生型酵母的自噬诱导效率(图

1A)。可以发现, 其中SD-D和YPD-D培养基的诱导效率较低, YCD-D稍高, SC-D最高。与这一结果一致, 我们在表达GFP-Atg8的菌株中检测游离GFP蛋白的含量, 发现SC-D条件下的GFP含量虽低于氮饥饿SD-N, 但高于YCD-D(图1B)。另外, 为了排除菌株背景差异的可能性, 除了BY4741, 我们对TN124菌株也进行了相应的实验, 证明这一结果是稳定存在的(结果未展示)。这些结果表明, SC-D条件是自

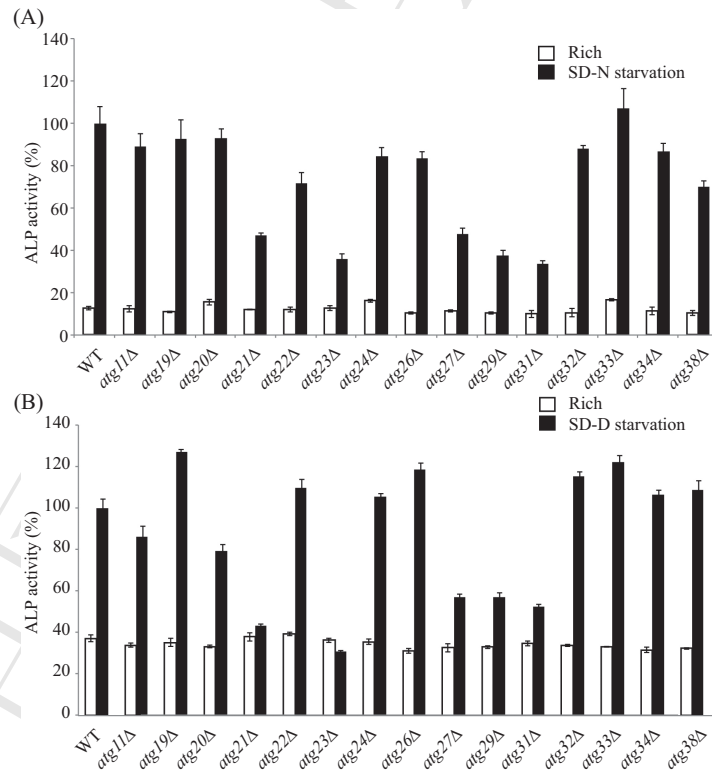
表4 氮饥饿和糖饥饿条件下 $atg$ 突变菌株的相对自噬水平

Table 4 Magnitudes of autophagy in 38  $atg$  mutants under nitrogen starvation (SD-N) and glucose starvation (SC-D)

$atg$ 突变菌株 $atg$ mutants	氮饥饿 Nitrogen starvation	糖饥饿 Glucose starvation
$atg1\sim atg10, atg12\sim atg18$	0%	0%
$atg19, atg22, atg24, atg26, atg32\sim atg34$	100%	100%
$atg27, atg29, atg31$	30%~40%	20%~30%
$atg38$	80%	100%
$atg11, atg20$	100%	50%
$atg21, atg23$	30%~40%	0%

相对自噬水平( $atgx$ )=[ALP( $atgx$ , 4 h)-ALP( $atgx$ , 0 h)]/[ALP(WT, 4 h)-ALP(WT, 0 h)]×100%,  $x$ 代表不同的 $ATG$ 基因编号。ALP水平为图2所标数值。

The relative levels of autophagy in a given mutant ( $atgx$ ) is computed from the ALP values in Fig.2, using the following formula: Relative autophagy ( $atgx$ )=[ALP( $atgx$ , 4 h)-ALP( $atgx$ , 0 h)]/[ALP(WT, 4 h)-ALP(WT, 0 h)]×100%.

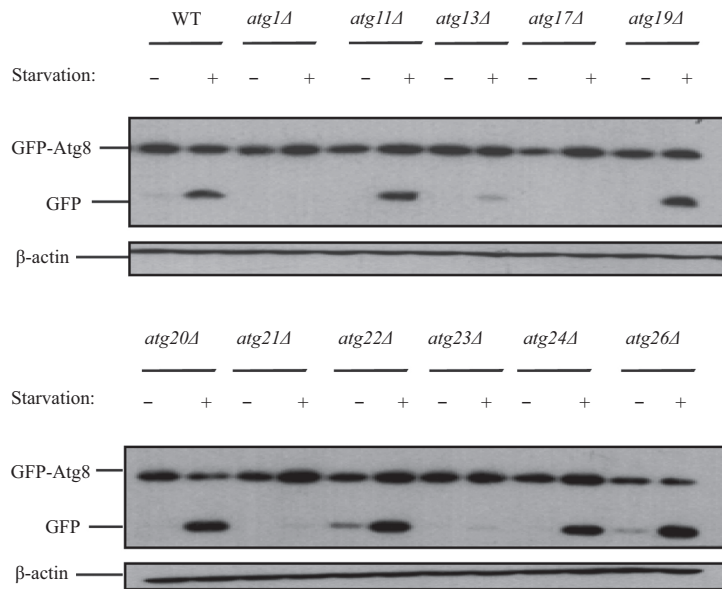


图中所示的 $atg$ 敲除菌株在YPD培养基(A)或SC培养基(B)中培养至对数期, 然后转入氮饥饿培养基SD-N或糖饥饿培养基SC-D中饥饿4 h。采用Pho8Δ60的方法检测自噬水平。所标误差线为标准差,  $n=3$ 。

The indicated  $atg$  mutants were grown to mid-log phase in YPD (A) or SC (B), and then shifted to nitrogen starvation medium (SD-N) or glucose starvation medium (SC-D) for 4 h. The levels of autophagy were measured by the Pho8Δ60 assay. Error bar=standard deviation,  $n=3$ .

图2 Pho8Δ60方法检测 $atg$ 敲除菌株的自噬水平

Fig.2 Levels of autophagy in  $atg$  mutants measured by the Pho8Δ60 assay



表达GFP-Atg8的野生型和 $atg$ 敲除菌株在SC培养基中培养至对数期, 然后在SC-D糖饥饿培养基中饥饿4 h。每条泳道加样5  $\mu$ g蛋白, 用GFP抗体做Western免疫印迹检测蛋白含量。

Wild type and mutant cells expressing GFP-Atg8 from plasmid BS-URA3-GFP-Atg8 were grown to mid-log phase in SC, and then cultured in SC-D for 4 h. For each sample, 5  $\mu$ g of total protein was loaded and analyzed by Western blot with antibodies against GFP and  $\beta$ -actin.

图3 GFP-Atg8剪切方法检测糖饥饿(SC-D)条件下的细胞自噬

Fig 3 Autophagy under glucose starvation (SC-D) measured by the GFP-Atg8 processing assay

噬诱导效率最高的糖饥饿条件。

## 2.2 不同诱导条件下对酵母自噬基因的筛选检测

接下来, 我们用SC-D这种糖饥饿条件来检测三十多种 $ATG$ 基因敲除菌株的自噬诱导水平(表4和图2B)。作为对照, 我们同时检测了氮饥饿条件时这些基因的诱导情况(表4和图2A)。两种条件下大部分敲除菌株的自噬相对水平一致(表4, 一致阻断的结果图2中未展示), 如 $atg1\Delta$ ~ $atg10\Delta$ 、 $atg12\Delta$ ~ $atg19\Delta$ 、 $atg22\Delta$ 、 $atg24\Delta$ 、 $atg26\Delta$ 、 $atg27\Delta$ 、 $atg29\Delta$ 、 $atg31\Delta$ ~ $atg34\Delta$ 。然而部分菌株如 $atg11\Delta$ 、 $atg20\Delta$ 、 $atg21\Delta$ 、 $atg23\Delta$ 和 $atg38\Delta$ 则呈现出不同的自噬水平(表4):  $atg11\Delta$ 、 $atg20\Delta$ 氮饥饿时诱导水平与野生型近似, 而在糖饥饿时则下降至野生型的约50%;  $atg21\Delta$ 、 $atg23\Delta$ 氮饥饿时自噬水平为野生型的30%~40%, 糖饥饿条件下自噬则被完全阻断;  $atg38\Delta$ 氮饥饿时较野生型低约20%, 糖饥饿时则与野生型相近。此结论与GFP-Atg8剪切方法对游离GFP蛋白的检测结果一致(图3)。这均证明SC-D糖饥饿条件下细胞自噬的分子机制在某种程度上不同于氮饥饿。

## 3 讨论

非选择性自噬是一种可以由不同条件诱导产生

的过程, 对细胞代谢有着重要作用。营养物质的缺失会导致细胞正常代谢的信号通路改变, 并转至其他应激性代谢途径, 从而保证细胞的自救式存活<sup>[28]</sup>。氮或糖缺失时, 细胞内信号通路的转变是不尽相同的, 介导细胞自噬发生的三十多种自噬基因也可能以不同的方式参与自噬。我们选取了四种不同的糖饥饿条件YCD-D、SC-D、SD-D、YPD-D, 并最终确定出自噬诱导水平最高的SC-D条件。然后, 我们检测了各个自噬基因的敲除菌株在SD-N和SC-D这两种饥饿条件下的自噬水平, 发现 $atg11\Delta$ 、 $atg20\Delta$ 、 $atg21\Delta$ 、 $atg23\Delta$ 和 $atg38\Delta$ 存在着差异(图2和表4), 证明这些基因在糖饥饿中的作用在某种程度上不同于传统的氮饥饿。

其中,  $atg11\Delta$ 和 $atg20\Delta$ 在糖饥饿时有自噬缺陷, 而氮饥饿时无缺陷;  $atg21\Delta$ 和 $atg23\Delta$ 在糖饥饿时的自噬缺陷比氮饥饿严重;  $atg38\Delta$ 则在糖饥饿时的自噬缺陷没有氮饥饿时严重。Atg11在多种选择性自噬中起适配蛋白的作用, 它结合受体蛋白把待降解物质运送到自噬组装位点(phagophore assembly site, PAS), 是将特异的选择性自噬蛋白与核心自噬蛋白联系起来的关键<sup>[29]</sup>。通常认为它在非选择性自噬中是不需要的, 但 $atg11\Delta$ 的自噬水平在糖饥饿条件下比野生型下降了约50%, 我们推测, 也许它在该条

件下辅助Atg17参与PAS的组装。在现有的模型中, Atg20、Atg21、Atg23都是Cvt途径特异的Atg蛋白。Atg20是sorting nexin蛋白家族的成员, 具有Phox同源结构域(Phox homology, PX), 结合磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)<sup>[30]</sup>。糖饥饿时, *atg20Δ*菌株的自噬水平较氮饥饿时, 降约50%。然而, 同属sorting nexin的Atg24虽然也有PX结构域, 但*atg24Δ*与野生型相比则没有变化, 这表明它们在非选择性自噬中发挥着不同的作用。Atg23是一个外周膜蛋白, 定位于PAS和细胞质中一些散在的膜结构上, 帮助Atg9从外周膜结构到PAS的顺向转运, 同时自身也依赖于Atg9定位于膜上。Atg23的缺失会导致氮饥饿时自噬泡减少<sup>[31]</sup>, 而在糖饥饿时自噬被完全阻断, 这可能是Atg23缺失导致的外周膜结构改变的程度在这种条件下增大, 致使Atg9不能离开外周膜而到达PAS。Atg21属于磷酸肌醇结合蛋白家族(WD-repeat protein interacting with phosphoinositides family, WIPI), 也可结合PI3P, 主要在选择性自噬中起作用, 在非选择性自噬水平上只是部分影响<sup>[32]</sup>, 而在糖饥饿时它的缺失则完全阻断了非选择性自噬。虽然Atg11、Atg20、Atg21和Atg23都是跟Cvt途径相关的Atg蛋白, 但并不是所有Cvt特异的Atg蛋白都参与糖饥饿诱导的非选择性自噬, 受体蛋白Atg19和sorting nexin家族的Atg24在这个过程中都是不需要的。Atg38是磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)复合体I的组成部分, 它形成一个二聚体促进复合体中Vps15-Vps34和Atg14-Vps30的连接<sup>[19]</sup>。而在糖饥饿时非选择性自噬似乎并不需要Atg38的参与, 我们推测在该条件下某些蛋白构象发生改变, Vps15-Vps34和Atg14-Vps30在没有Atg38参与的情况下就可紧密连接形成复合体。或者, 虽然*atg38Δ*菌株中PI3K复合体结构松散, 但仍可以产生足够多的PI3P介导的自噬的发生。

目前, 造成这些差异的原因还不明确。一种可能是糖饥饿时细胞内的自噬相关信号通路改变, 根据以往研究来看, 糖饥饿与氮饥饿条件下的信号转变机制并不完全相同<sup>[21-24]</sup>, 因此, 各种Atg蛋白也可能以不同的方式参与自噬, 回应胞内环境的变化。另一种可能是, 糖饥饿时脂类的合成减弱, 导致膜供给受限。这与我们对细胞生长的检测结果一致(糖饥饿时细胞生长停止, 结果未展示)。而在氮饥饿时脂类的供给是过剩的; 尽管总蛋白不再增加, 细胞仍

会缓慢生长<sup>[33]</sup>。在这两种条件下, 脂类供给的差异可能导致两种条件下自噬体形成的限速步骤不同, 从而导致各种Atg蛋白在这两种条件下的作用也不尽相同。

长期以来, 酵母中非选择性自噬相关分子机制的研究多在氮饥饿条件下进行, 所得的结果与模型常常为其他模式生物的研究提供重要参照。我们对已知的38个Atg蛋白的研究表明: 即使在酵母这样简单的模式生物中, 氮饥饿条件下的自噬分子机制也并不能不加修饰地推广到其他条件。如果希望全面理解自噬的分子机制, 显然需要引入包括糖饥饿在内的多种诱导条件。因此, 本文的探索为深入研究糖饥饿条件下的自噬分子机制奠定了基础。

### 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.
- Inoue Y, Klionsky DJ. Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(7): 664-70.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147(4): 728-41.
- Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 1992; 119(2): 301-11.
- Ecker N, Mor A, Journo D, Abeliovich H. Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy. *Autophagy* 2010; 6(7): 879-90.
- Klionsky DJ. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 2008; 4(6): 740-3.
- Yuan W, Tuttle DL, Shi YJ, Ralph GS, Dunn WA. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt 16): 1935-45.
- Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1993; 333(1/2): 169-74.
- Titorenko VI, Keizer I, Harder W, Veenhuis M. Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J Bacteriol* 1995; 177(2): 357-63.
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, et al. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1994; 349(2): 275-80.
- Sakai Y, Koller A, Rangell LK, Keller GA, Subramani S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. *J Cell Biol* 1998; 141(3): 625-36.
- Mukaiyama H, Oku M, Baba M, Samizo T, Hammond AT, Glick

- BS, *et al.* Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. *Genes Cells* 2002; 7(1): 75-90.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2014; 16(6): 495-501.
- 17 Nazarko VY, Nazarko TY, Farre JC, Stasyk OV, Warnecke D, Ulaszewski S, *et al.* Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy* 2011; 7(4): 375-85.
- 18 Nazarko TY. Atg37 regulates the assembly of the pexophagic receptor protein complex. *Autophagy* 2014; 10(7): 1348-9.
- 19 Araki Y, Ku WC, Akioka M, May AI, Hayashi Y, Arisaka F, *et al.* Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J Cell Biol* 2013; 203(2): 299-313.
- 20 Stephan JS, Herman PK. The regulation of autophagy in eukaryotic cells: Do all roads pass through Atg1? *Autophagy* 2006; 2(2): 146-8.
- 21 Thevelein JM, de Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 1999; 33(5): 904-18.
- 22 Aoh QL, Hung CW, Duncan MC. Energy metabolism regulates clathrin adaptors at the trans-Golgi network and endosomes. *Mol Biol Cell* 2013; 24(6): 832-47.
- 23 Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM, Miyamoto S. Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol Cell* 2014; 53(4): 521-33.
- 24 Gammoh N, Florey O, Overholtzer M, Jiang X. Interaction between FIP200 and ATG16L1 distinguishes ULK1 complex-dependent and -independent autophagy. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(2): 144-9.
- 25 Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 1998; 14(2): 115-32.
- 26 Huang WP, Shintani T, Xie Z. Assays for autophagy I: the Cvt pathway and nonselective autophagy. *Methods Mol Biol* 2014; 1163: 153-64.
- 27 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.
- 28 George MD, Baba M, Scott SV, Mizushima N, Garrison BS, Ohsumi Y, *et al.* Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Mol Biol Cell* 2000; 11(3): 969-82.
- 29 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.
- 30 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.
- 31 Tucker KA, Reggiori F, Dunn WA, 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.
- 32 Nair U, Cao Y, Xie Z, Klionsky DJ. Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. *J Biol Chem* 2010; 285(15): 11476-88.
- 33 Li D, Song JZ, Li H, Shan MH, Liang Y, Zhu J, *et al.* Storage lipid synthesis is necessary for autophagy induced by nitrogen starvation. *FEBS Lett* 2015; 589(2): 269-76.