

浮游植物细胞自噬作用特点及研究方法

卢雪^{1,2}, 蔡伟聪^{1,2}, 刘静雯^{1,2*}

(1. 集美大学 食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要 自噬(Autophagy)是真核生物细胞中一类高度保守的、依赖于溶酶体或液泡途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的生物学过程。细胞自噬除维持细胞稳态外,在细胞响应各种外界胁迫中也发挥重要作用。近年来,陆续发现浮游植物能够通过细胞自噬应答众多环境胁迫,并在浮游植物细胞中鉴定出了类似于哺乳动物细胞中的核心自噬功能单位。自噬作为一种独特的程序性细胞死亡(PCD)形式,对浮游植物遭受胁迫后的个体存活及种群延续具有至关重要的作用。因此,细胞自噬也将成为浮游植物研究领域的一个新的着力点。主要综述了浮游植物细胞中自噬的保守性、诱导因素、调控机制、自噬与凋亡的交互作用以及浮游植物自噬研究方法等研究进展。

关键词 浮游植物细胞自噬;保守性;诱导因素;自噬调控机制;自噬与凋亡;自噬研究方法

中图分类号 Q938.8 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2020)04-0105-09

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.04.016

Features and Research Methods Summarization on Phytoplankton Cell Autophagy

LU Xue^{1,2}, CAI Wei-cong^{1,2}, LIU Jing-wen^{1,2}

(1. Coll. of Food & Bioengin., Jimei Uni, Xiamen 361021;

2. Fujian Prov. Key Lab. of Food Microbiol. & Enzyme Engin., Xiamen 361021)

Abstract Autophagy is a highly conservative biological process and depends on lysosomes or vacuoles pathway in eukaryotic cells to degrade their cytoplasmic proteins and organelles. In addition to maintain cell homeostatic state, cell autophagy also plays a crucial role in responding to various external coercions. Recently it has been found in succession that phytoplankton could respond numerous environmental coercions through cell autophagy and have been characterized as kernel autophagy functional unit in phytoplankton cells similar to those in mammalian cells. Autophagy, as a unique programmed cell death (PCD), has an imperative impact on individual survival and population continuation of phytoplankton after being coerced. Therefore, cell autophagy will become a new emphasis point in phytoplankton research field. The conservativity of autophagy in phytoplankton cells, the induction factor, the regulation mechanism, the interplay between autophagy and apoptosis, as well as the methods in phytoplankton autophagy research were mainly summarized in this paper.

Keywords phytoplankton autophagy; conservativity; induction factors; autophagy mechanism; autophagy and apoptosis; autophagy research methods

基金项目:国家自然科学基金项目(41576166);福建省自然科学基金项目(2019J01696);福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目(B18097-1)

作者简介:卢雪 女,硕士研究生。主要从事海洋微生物生物化学与分子生物学相关研究。

Tel: 0592-6181487, E-mail: 2393924779@qq.com

* 通讯作者。女,教授,博士生导师。主要从事海洋生物/海洋微型生物分子生物学相关研究。

Tel:0592-6181487, E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期:2019-12-18

自噬 (Autophagy) 是真核生物细胞中一类高度保守的、依赖于溶酶体或液泡的降解途径。根据发生程度以及细胞所处环境的不同,自噬可分为基础自噬和诱导自噬。基础自噬,是一种在生理条件下细胞中持续发生且水平相对较低的自噬过程,用于胞内物质的更新以及环境稳态的维持;诱导自噬,是细胞应对外界胁迫的一种应激反应。如营养物质缺乏等胁迫条件下,细胞内自噬水平迅速升高,将不必要或有害的胞内物质运送到溶酶体或液泡中进行降解和回收以维持细胞存活^[1]。但是,在严重胁迫条件下,过度自噬将导致细胞程序性死亡,因此自噬又称为 II 型程序性细胞死亡 (Programmed cell death, PCD)^[2]。自噬的过程主要包括自噬的启动、自噬前体的延伸、自噬体的闭合、自噬体与溶酶体的融合以及溶酶体再生等五个阶段。该过程由一系列自噬相关基因 (Autophagy related genes, ATGs) 编码的自噬相关蛋白 (Autophagy related proteins, Atgs) 所介导,这些自噬相关基因在酵母、植物和哺乳动物中具有高度保守性^[3]。浮游植物 (Phytoplankton) 是指生活在水体中的单细胞微小植物,通常指浮游藻类。根据生活环境的不同,将其分为淡水浮游植物和海洋浮游植物。浮游植物是淡水和海洋食物网的基础,通过光合作用为生物圈贡献了约 50% 的净初级生产力,也为生态系统中其他生物提供了生长与新陈代谢所需要的初级有机物能源,因此它们的命运决定了光合固定有机物的去向,并最终对生物地化循环产生影响。浮游植物细胞的命运受到一系列生物和非生物因素的影响,如营养、温度、光照、牧食以及病毒感染等。而自噬通路可以被这些因素激活、甚至被劫持,因此自噬对浮游植物细胞命运起着决定性作用^[4]。近年来,陆续发现浮游植物细胞中存在自噬现象,鉴于自噬在细胞应对各种胁迫中的重要作用,以及浮游植物命运对水生生态系统、全球气候以及生物地化循环的重要影响,所以对不同胁迫条件诱导浮游植物细胞自噬的研究显得尤为重要。本文综述了近期淡水以及海洋浮游植物细胞自噬的研究状况,以供研究者参考。

1 浮游植物细胞中自噬信号通路的组成及其保守性

调控自噬的中心分子——雷帕霉素靶点复合体 1 (Target of rapamycin complex 1, TORC1) 位于自噬信号通路的最上游,它可以通过感受细胞内多种信号变化,对自噬进行负调控,而且在浮游植物细胞中具有较高的保守性^[5]。同时,与哺乳动物细胞类似,浮游植物细胞中也存在由核心自噬相关蛋白组成的 3 个关键功能单位,即 Atg9 循环系统、III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 复合体 I 以及类泛素化 (Ubiquitin-like, Ubl) 系统^[2]。其中 Atg9 循环系统由 Atg1、Atg2、Atg9、Atg13、Atg18 和 Atg27 (仅存在于海洋球石藻 *Emiliania huxleyi*) 中组成,参与自噬启动以及向形成中的自噬体提供脂质和蛋白质; PI3KC3 复合体 I 由 Vps30/Atg6、Atg14、Vps15、和 Vps34 组成,参与自噬启动以及募集促进自噬体成熟的其它自噬相关因子;类泛素化系统由 Atg3、Atg4、Atg5、Atg7、Atg8、Atg10、Atg12 和 Atg16 组成,参与自噬体的形成以及与溶酶体或液泡的融合^[2]。

1.1 TORC1 在浮游植物细胞中的组成及其保守性

哺乳动物 TORC1 由催化亚基 TOR 激酶、支架蛋白 Raptor 和稳定蛋白 LST8 组成。以模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为参考,对绿藻门 (Chlorophyta)、红藻门 (Rhodophyta) 以及囊泡藻 (Chromalveolata) 中多种浮游植物的 TORC1 相关蛋白进行生物信息学分析。结果显示 (表 1), 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 中有 3 个 TOR 同源物, 微拟球藻 (*Nannochloropsis gaditana*) 中有 2 个 Raptor 同源物, 海洋球石藻中存在 4 个 TOR 同源物和 2 个 Raptor 同源物, 而温泉红藻 (*Galdieria sulphuraria*) 中存在 2 个 TOR 同源物, 3 个 Raptor 同源物和 3 个 LST8 同源物。同时, 浮游植物中这 3 种蛋白的结构域具有较高的保守性 (表 1)。与酵母和哺乳动物类似, 大多数浮游植物 TOR 蛋白的 N-末端也存在一个 HEAT 重复序列, 该序列参与蛋白的精准定位^[6]。另外, TOR 蛋白不仅具有催化结构域 PIKKc-TOR, 还存在辅助结构域 (Accessory domains) FAT (Name after FRAP, ATM and TRRAP) 和 FACT (Name after FRAP,

ATM, TRRAP C-terminal), 这两个辅助结构域对蛋白间相互作用非常重要^[6-7]。

浮游植物中 FKBP12 (FK506 binding-protein 12)-雷帕霉素 (Rapamycin) 结合结构域 (FKBP12-rapamycin bind motif, FRB) 保守性也较高, 该结构

域可能是 FKBP12-雷帕霉素复合体特异性抑制 TOR 活性的结合位点^[6]。另外, 上述浮游植物的 Raptor 蛋白中都具有保守的 Raptor N-端 (RNC) 结构域。除盐藻 (*Dunaliella salina*) 以外, LST8 蛋白中都具有一个 WD40 结构域。

表 1 浮游植物中 TORC1 相关蛋白的组成及保守性

Table 1 Composition and conservation of TORC1 related proteins in phytoplankton

门	物种名称	TOR 蛋白	Raptor 蛋白	LST8 蛋白
Chlorophyta	<i>Chlorella variabilis</i> (小球藻)	■△▽◆	□▼	□
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (莱茵衣藻)	■△▽◆ ¹ , ■△▲▽◆ ² , △▲▽◆ ³	▼	□
	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> (胶球藻)	■△▲▽◆	▼	□
	<i>Volvox carteri</i> (团藻)	■△▲▽◆	▼	□
	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545 (细小微胞藻)	■△▲▽◆	□▼	□
	<i>Micromonas</i> sp. RCC299 (细小微胞藻)	△▽◆	□▼	□
	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> (绿色鞭毛藻)	△▽◆	□	□
	<i>Ostreococcus tauri</i> (金牛蛇球藻)	■▽	□▼	□
	<i>Dunaliella salina</i> (盐藻)	N. H	▼	N. H
Angiospermae	<i>Arabidopsis thaliana</i> (拟南芥)	■△▽◆	□■▼ ¹ , □▼ ²	□ ¹ , □ ²
Rhodophyta	<i>Porphyridium purpureum</i> (紫球藻)	■▲▽◆	□■▼	□
	<i>Galdieria sulphuraria</i> (温泉红藻)	■△▲▽◆ ¹ , △▲◆ ²	□▼ ¹ , □▼ ² , ▼ ³	□ ¹ , □ ² , □ ³
	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (原始红藻)	■△▲▽◆	□■▼	□
Chromalveolata	<i>Emiliania huxleyi</i> CCMP1516 (球石藻)	■△▲▽◆ ¹ , ▲▽◆ ² , ▲▽◆ ³ , ▼◆ ⁴	▼ ¹ , ▼ ²	□
	<i>Thalassiosira pseudonana</i> (假微型海链藻)	■△▲▽◆	□▼	□
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (三角褐指藻)	■△▲▽◆	□■▼	□
	<i>Nannochloropsis gaduana</i> (微拟球藻)	■△▲▽◆	□■▼ ¹ , □▼ ²	□

注:表中的图形分别表示不同的结构域:“□”表示 WD40 蛋白结构域,“■”表示 HEAT 重复序列,“△”表示未知功能结构域 (DUF3385),“▲”表示泛素蛋白 (FAT) 结构域,“▽”表示 FATC 结构域,“▼”表示 Raptor_N 蛋白,“◆”表示雷帕霉素受体蛋白 FKBP12,“◆”表示雷帕霉素靶蛋白-磷脂酰肌醇三激酶蛋白激酶 PIKKe-TOR;“N. H”表示没有检索到对应蛋白的同源物;“1、2、3、4”分别表示同一个蛋白的不同亚型;“a”表示 qRT-PCR 实验验证

1.2 Atg9 循环系统的组成及其保守性

Atg9 是一个多次跨膜 Atg 蛋白,可能通过影响膜泡运输调节自噬的发生。酵母 Atg9 在自噬体和其他具膜细胞器之间的往返运动需要 Atg1、Atg2、Atg11、Atg13、Atg18 和 Atg27 的协助,其作用是向成熟中的自噬体提供膜和脂质^[8-9]。绿藻和囊泡藻的 Atg9 以及 Atg1 高度保守,分别含有一个保守的 APG9 结构域和一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域;绿藻和囊泡藻的 Atg2 保守性较低,大多数的 C-末端都有一个自噬相关结构域,一些浮游植物 Atg2 的 N-末端还存在 Chorein 结构域(表 2),该结构域可能参与蛋白在膜泡之间

的运输^[10]。海洋球石藻和假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 的 Atg2 除了存在自噬相关结构域,还含有一个未知功能的 CAD 基序;绿藻和囊泡藻的 Atg13 以及 Atg18 也比较保守,分别含有一个 Atg13 结构域和一个典型的 WD40 结构域;浮游植物中 Atg27 的保守性最低且只存在于海洋球石藻中(表 2)。

1.3 PI3KC3 复合体 I 的组成及其保守性

PI3KC3 复合体 I 是自噬体形成和成熟所必需的,该复合体由 Atg6、Atg14、Vps15 和 Vps34 组成^[11]。其中,Atg6 与其他蛋白相互作用,参与汇聚信号、维持自噬和其他信号级联反应之间的平

表 2 浮游植物细胞自噬关键功能单位相关蛋白的组成及保守性

Table 2 Composition and conservative property of key functional unit related proteins in phytoplankton autophagy

物种名称	Alg β 循环系统										PBK3 复合体 I						泛素样 (Ub1) 结合系统					
	A1	A2	A9	A13	A18	A27	A6	A14	V15	V34	A3	A4	A5	A7	A8	A10	A12	A16				
<i>C. variabilis</i> (小球藻)	■	+	▼	◇	□□	N.H	N.H	⊕	■□□	N.H	▲▲	▲ ¹ ▲ ²	[]]	▼	☆	N.H				
<i>C. reinhardtii</i> (莱茵衣藻)	■	■	▼	◇	□	N.H	● ¹ ● ²	⊕	□	Δ00 ¹ , Δ00 ²	▲▲	▲	[]]	▼	☆	□♀				
<i>C. subellipsoidea</i> (假球藻)	■	+	▼	◇	□ ¹ , □ ²	N.H	●	⊕	■□□	Δ00	▲▲	▲	[]]	▼M.	☆	□♀				
<i>V. costeri</i> (团藻)	■	■	▼	N.H	□ ¹ , □ ²	N.H	●	⊕	□	Δ00	▲▲	▲	[]]	N.H	☆☆	□♀				
<i>M. pusilla</i> (细小微藻)	■	■	▼	◇	□	N.H	●	⊕	■□□	Δ00	▲▲	N.H	[]]	+	☆	□				
<i>M. commoda</i> (细小微藻)	■	■▲	▼	◇	□ ¹ , □ ²	N.H	●	⊕	■	Δ00	▲▲	▲	N.H]]	+	☆	□♀				
<i>O. lucimarinus</i> (绿色鞭毛藻)	■	■▲	▼	◇	□	N.H	●	⊕	■□□	□□	▲▲	▲	[]]	+	☆☆	□♀				
<i>O. cauti</i> (金牛靴藻)	■	■	▼	◇	□	N.H	●	⊕	■□□	Δ00	▲▲	▲	[]]	+	☆	□♀				
<i>D. salina</i> (盐藻)	■	■	▼ ¹ , ▼ ²	◇	N.H	N.H	●	N.H	■	□□	▲▲	▲	[¹ ,] ²]]	N.H	+	□♀				
<i>A. thaliana</i> (拟南芥)	■ ¹ ,] ²	■▲	▼	◇ ¹ , ◇ ²	□ ¹ , □ ² , □ ³ , □ ⁴ , □ ⁵ , □ ⁶ , □ ⁷ , □ ⁸	N.H	●	⊕	■□□	Δ00	▲▲	▲ ¹ , ▲ ²	[]]	N.H	☆☆ ¹ , ☆ ²	□♀				
<i>P. purpureum</i> (紫球藻)	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H				
<i>G. sulphuraria</i> (温泉红藻)	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H				
<i>C. menziesii</i> (原始红藻)	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H	N.H				
<i>E. huxleyi</i> CCMP1516 (绿石藻)	■	▲ ¹ ▲ ²	▼ ¹	◇ ¹ , ◇ ²	+	◆	●	N.H	■	□□ ¹ , Δ00 ²	▲▲	▲ ¹ , ▲ ²	[]]	N.H	☆☆	N.H				
<i>T. pseudonana</i> (假微型海链藻)	■	▼	▼	◇	□	N.H	● ¹ ● ²	⊕	■□□	Δ0 ¹ , □ ²	▲▲	▲	[]]	N.H	☆	□				
<i>P. tricornutum</i> (三角扁藻)	■	■▲	▼	◇	□	N.H	● ¹ ● ²	⊕	■□□	□	▲▲	▲	[]]	N.H	☆M.D	□♀				
<i>N. guillardii</i> (假拟球藻)	■	▲	▼	◇	□	N.H	● ¹ ● ²	N.H	■	□ ¹ , Δ00 ²	▲▲	▲ ¹ , ▲ ²	[]]	☆	□♀					

注: 1. 表中的图形分别表示不同的结构域: ■表示 STKc_ATG1_ULK_like; ■表示 Chorein_N; □表示 STKc_ATG1_ULK_like; ▲表示 ATG2_CAD; ▼表示 APC9; ◇ATG13; ◆表示 ATG27;]表示 CIMR;]表示 STKc_Vps15; ■表示 HEAT repeat; △表示 C2_P3K ClassIII; ○表示 P3K ClassIII; ●表示 P3K ClassIII; ●表示 APC6; ⊕表示 Autophagy-related subunit 14; ▲表示 Autophagy C-terminal; ▼表示 Autophagy N-terminal; ▲表示 Peptidase_C54; [表示 APC5;]表示 ATG7_N; [表示 E1 enzyme Family;]表示 GABARAP; ☆表示 APT2C; ☆表示 UBQ superfamily; ♀表示 Autophagy protein16; 2. + 表示有 NCBI 登录号, 但没有结构域信息; N.H 表示没有检索到对应蛋白的同源物; 1, 2, 3 等数字分别表示同一个蛋白的不同亚型; M.D 表示参考文献 [2]; a 表示 qRT-PCR

衡等细胞过程^[12]。哺乳动物 Atg14L 通过 C-末端自噬体靶向序列(Barkor/Atg14 autophagosome targeting sequence),促进 PI3KC3 复合体对自噬体形成位点的靶向^[13]。Vps15 是 Vps34 的调节因子^[14]。脂质激酶 Vps34 催化产生磷脂酰肌醇 3-磷酸,促进自噬体的形成^[15]。除红藻外,PI3KC3 复合体 I 成员在浮游植物中的保守性较好(表 2)。然而,浮游植物 Atg6 中不存在 BCL2 同源 3 (BH3)结构域,鉴于原生动物的凋亡信号通路中缺乏 BCL2 和 TP53 这两个重要组分,因此浮游植物 Atg6 缺失 BH3 结构域也是可能的^[16-17]。

1.4 类泛素化(Ubl)系统的组成及其保守性

自噬体膜的形成和延伸需要两种不同的 Ubl 系统,分别是 Atg5-Atg12 复合体和 Atg8 类泛素化系统。自噬过程中,泛素样蛋白 Atg12 在 Atg7 (E1 样酶)和 Atg10(E2 样酶)作用下与 Atg5 结合形成 Atg12-Atg5 复合体,该复合体与 Atg16 结合形成具有 E3 连接酶功能的复合体,转移到自噬体上参与膜的形成与延伸^[18]。新合成的泛素样蛋白 Atg8 经半胱氨酸蛋白酶 Atg4 切割后,在 Atg7(E1 样酶)和 Atg3(E2 样酶)作用下,C-末端甘氨酸残基与自噬体膜上的磷脂酰乙醇胺(PE)发生酯化,形成 Atg8-PE^[19]。酯化后的 Atg8 对称分布于自噬体内外膜上,参与自噬体膜的延伸^[19]。除红藻外,浮游植物中 Ubl 系统组分基本上都有表达,而且 Atg3 和 Atg8 高度保守,Atg3 有 3 个保守结构域,分别是 N-末端自噬结构域、包含 HPC 基序的活性位点结构域和 C-末端自噬结构域(表 2),而活性位点结构域中的保守 Cys 残基可能是识别 Atg5 所必需的,C-末端自噬结构域可能是用于稳定自噬体的结构^[20],所有 Atg8 中都有一个保守的 GABARAP 结构域(表 2)。

2 浮游植物细胞自噬的诱因

物理、化学以及生物等因素均可诱导浮游植物细胞自噬,如光照^[21]、高浓度金属离子^[22]、营养缺乏^[23-24]以及病毒感染^[25]等。

2.1 光-氧化损伤诱导自噬

光是植物光合作用的能量来源,但是光能过剩会导致光合系统发生钝化,进而产生光抑制,严重时则会导致光合系统的光氧化损伤^[26]。例如,

高光胁迫引起莱茵衣藻细胞产生 ROS 并激活自噬,而合成类胡萝卜素的关键酶—八氢番茄红素合成酶基因的突变体即使在黑暗中也表现出高水平自噬,当转移至光照条件下时,细胞自噬水平进一步增强,并伴随细胞内 ROS 水平显著升高;而达草灭(八氢番茄红素合成酶抑制剂)只能在光照条件下激活莱茵衣藻细胞自噬^[21],这表明自噬与光照产生的 ROS 引起的光氧化损伤有关。

2.2 高浓度金属离子诱导自噬

金属粒子毒性与植物和藻类中 ROS 的产生和氧化应激信号传导有关,但它们与自噬的关系尚不十分清楚。莱茵衣藻一直被广泛用于研究光合系统中金属离子代谢以及细胞对不同金属离子浓度的响应,如高浓度的镍、钴或铜离子都会引发莱茵衣藻自噬^[22,27]。高浓度镍离子胁迫莱茵衣藻细胞的转录组分析显示,自噬等蛋白质降解通路中相关组分的丰度增加,且与细胞中 H₂O₂ 含量的变化一致,因此推测,过量的镍可能会引起氧化损伤,从而激活自噬等降解途径,以清除受损成分,恢复细胞稳态^[22]。另外,镉离子胁迫下的微星鼓藻(*Micrasterias denticulate*)细胞中,可以观察到不同阶段的自噬体,其中有些还包裹着细胞器或部分细胞质^[27]。不过,金属粒子诱导自噬的分子机制目前尚不清楚。

2.3 营养胁迫诱导自噬

营养胁迫是诱导浮游植物自噬的主要因素。比如,莱茵衣藻在碳、氮缺乏条件下,细胞中 Atg8 蛋白形成点状聚集,且酯化形式的 Atg8 含量也有所增高,这意味着莱茵衣藻细胞发生了自噬^[28]。而抑制光合作用导致碳胁迫时,微星鼓藻叶绿体中的脂质体从叶绿体中释放出来,随后被自噬体包裹,从而排出细胞或与液泡融合被降解^[23]。导致这种现象可能的原因,一是细胞试图通过自噬降解脂质来补充能量并维持胞内稳态,二是碳胁迫导致细胞内 ROS 含量显著升高,从而引起叶绿体脂质过氧化,因此通过激活自噬降解毒性脂质。此外,在 K⁺ 或 Na⁺ 胁迫下,可以观察到微星鼓藻细胞中过氧化物酶体被双层膜囊泡部分包裹或完全吞噬,说明细胞中发生了过氧化物酶体自噬(Pexophagy)^[27]。另外,在磷缺乏的海洋球石藻细胞中,观察到双层膜囊泡以及其前体结构,该囊泡最终与液泡融合;同时,细胞中酸性囊泡的数量

增多,Atg8 蛋白水平瞬时升高^[24]。因此,海洋球石藻细胞很可能通过自噬降解含磷物质,以缓解环境中的磷胁迫。

2.4 病毒感染诱导自噬

病毒感染也是诱发细胞自噬的一个常见因素。病毒感染海洋球石藻(*E. huxleyi* CCMP2090)诱导宿主细胞裂解并出现自噬体样囊泡,且自噬相关基因 *ATG5*、*ATG7*、*ATG8* 和 *VPS34* 均发生了显著的差异表达^[25]。本文作者最近研究发现,病毒感染海洋球石藻(*E. huxleyi* BOF92) 24 h 后,细胞内出现双层膜自噬体样结构,感染 45 h 后自噬体数量增多,且核心自噬相关基因 *ATG1*、*ATG4*、*ATG5*、*ATG7*、*ATG8*、*ATG9*、*ATG10* 以及 *ATG13* 均发生了显著差异表达(未发表数据)。另外,自噬对海洋球石藻(*E. huxleyi* CCMP2090)细胞中病毒粒子的组装和释放起关键作用,抑制自噬体与溶酶体的融合将导致胞外病毒粒子数量显著减少,但不影响胞内病毒基因的复制;而且病毒粒子中还存在宿主 Atg8-PE^[25],说明自噬体膜可能被用于形成新的病毒粒子。另外,病毒感染海洋球石藻后通过表达自身的鞘脂代谢相关酶,从而掌控宿主的鞘脂代谢并合成病毒特有的鞘糖脂(vGST)^[29-31]。该病毒性鞘糖脂在细胞中的积累诱导产生大量的 ROS,而抑制 ROS 的产生则会减少宿主细胞的死亡和病毒粒子的产量^[32]。

3 浮游植物细胞自噬调控的分子机制——氧化还原调控

基于哺乳动物及酵母的大量实验结果表明,细胞中氧化还原信号对自噬起调控作用,但具体的分子机制尚不十分清楚。Atg4 是一种半胱氨酸蛋白酶,在自噬体的形成中发挥重要作用,也是目前唯一一个证实受氧化还原调节的 Atg 蛋白。Atg4 可以切割新合成的 Atg8,使其与 PE 发生酯化反应;也可以切割 Atg8-PE,导致 Atg8 脱酯化从自噬体膜上解离^[33]。因此,氧化还原信号很可能通过调节 Atg4 的活性来调控自噬。

近年来,关于氧化还原调控自噬的研究在浮游植物中也取得了一些进展。最新研究发现,莱茵衣藻具有类似于酵母细胞自噬的氧化还原调控机制。莱茵衣藻重组 Atg4 的 DTT 梯度还原滴定

实验结果显示,实验数据形成的曲线与用于还原两个电子的能斯特方程拟合,说明单个二硫键参与了 Atg4 活性的氧化还原调节^[34]。另外,多重序列比对结果显示,酵母中可以形成二硫键调节 Atg4 活性的两个 Cys 残基(Cys338 和 Cys394)在莱茵衣藻中似乎是保守的,分别对应莱茵衣藻 Atg4 的 Cys400 和 Cys473^[34]。对 Cys400 和 Cys473 分别进行点突变,结果显示,Cys400 突变体即使在没有还原剂的情况下仍然是活化的,而 Cys473 的突变对 Atg4 活性没有太大影响,说明 Cys400 是调节莱茵衣藻 Atg4 活性所必需的,而 Cys473z 则是非必需的^[34]。在酵母细胞中,Cys338 和 Cys394 是正确调节自噬体生物发生所必需的,因为这两个半胱氨酸的突变导致 Atg8 向吞噬细胞形成位点的募集增加^[35]。酵母 Atg4 这两个半胱氨酸之间形成的二硫键可能在一定程度上干扰 Atg4 中催化性 Cys147 残基与底物 Atg8 之间的接触^[35]。同样,Cys338 是氧化还原调控酵母 Atg4 活性所必需的,而 Cys394 在氧化还原调控自噬中也并非必需,因为 Cys338 还可能与其下游附近的其他 Cys 残基之间形成二硫键^[35],这似乎表明 Cys338 具有功能保守性,而 Cys394 在功能上并非十分保守。莱茵衣藻中,点突变 Cys473 之所以对 Atg4 活性没有影响,推测可能也是 Cys400 与 Cys473 之外的其他 Cys 之间形成二硫键,因此,莱茵衣藻 Atg4 中 Cys473 的功能也是相对不保守的。以上结果说明 Atg4 的氧化还原调控机制在酵母和浮游植物等单细胞真核生物中具有进化保守性。

众所周知,细胞中抗氧化酶 Peroxiredoxins 在氧化还原作用下通过改变自身构象行使其生理功能。体内、外氧化还原实验均表明,莱茵衣藻可以通过调节 ATG4 的氧化还原状态以及寡聚和解聚,对其活性进行调控^[34]。而酵母 Atg4 也会发生氧化还原依赖性寡聚化,表明这种调节方式可能是 Atg4 的一个保守性特征^[34]。根据细胞内氧化还原电位的高低,莱茵衣藻 Atg4 可以呈现 3 种不同结构状态,即低氧化还原电位下,硫氧还蛋白系统使 Atg4 保持还原且有活性的单体状态;ROS 的产生促进了 Atg4 的氧化和随后的失活;随着氧化还原电位的增加 Atg4 被进一步氧化,形成寡聚体。同时,还原剂可以通过还原氧化的 Atg4 以及

解聚其寡聚体,对 Atg4 的活性进行精细调节^[36]。

4 浮游植物细胞自噬与凋亡的相互作用

细胞自噬和凋亡是两个进化上保守的生物学过程,虽然它们的代谢途径和形态学特征差异显著,但两条通路之间又存在复杂的相互关联。比如,凋亡蛋白 Caspase 可以直接与自噬相关蛋白 Atgs 发生互作,从而抑制自噬发生、启动细胞凋亡或促进自噬体形成^[37]。而自噬不仅可以抑制细胞凋亡并促进细胞存活,还可以通过 Caspase 依赖性或非依赖性途径促进细胞死亡^[38]。浮游植物不仅存在 Caspase 同源物——Metacaspase^[39],也存在自噬相关蛋白 Atgs^[2]。虽然目前对浮游植物自噬和凋亡,特别是自噬的研究鲜有报道,但最新的研究发现浮游植物自噬和凋亡之间可能存在一定的关联性。如病毒感染海洋球石藻导致自噬相关蛋白 Atg5 和凋亡特征蛋白 Metacaspase 的表达均显著上调^[25,40],而 Atg5 是自噬和凋亡之间的转换器^[41]。鉴于 Caspase 以及 Atg5 对哺乳动物自噬和凋亡的调控作用,它们很可能也参与病毒感染海洋球石藻中自噬与凋亡之间的转换,确切机制有待进一步探究。

此外,细胞自噬和凋亡还可以被其他因子共同调节,比如 ROS 和鞘脂类等,而且在浮游植物中也存在该现象。高盐胁迫首先导致微星鼓藻细胞内 ROS 含量迅速升高,DNA 发生片段化,这意味着细胞发生了凋亡,随后 ROS 的含量立刻明显下降并伴随着自噬小体的形成,表明此时细胞通过自噬清除 ROS 以阻止细胞凋亡,并降解氧化受损的细胞器以及蛋白等物质,以维持细胞内稳态^[42]。另外,病毒感染海洋球石藻也诱导产生大量的 ROS,如果清除 ROS 或抑制其产生(特别是 H₂O₂),将减少凋亡诱导的宿主细胞死亡,并且减少自噬体的形成,从而降低病毒粒子的产量^[30,43]。除此之外,病毒性鞘糖脂可以以剂量依赖性方式诱导海洋球石藻细胞凋亡^[44]。并且,病毒利用自噬体膜形成其子代病毒粒子的外膜,而其外膜主要由病毒鞘糖脂组成,因此鞘糖脂的积累也可能诱导宿主自噬^[25]。可见,病毒性鞘糖脂也可能参与调控海洋球石藻的细胞自噬与凋亡的

互作过程。

5 浮游植物细胞自噬的研究方法

近年来,透射电子显微镜观察、分子生物学、蛋白免疫印迹以及激光共聚焦等技术已成为观察和示踪浮游植物细胞自噬过程的主要方法。

电镜可以对自噬结构进行精确的鉴定。比如,电镜观察为莱茵衣藻、微星鼓藻和海洋球石藻等浮游植物中自噬的发生提供了直接证据。伴刀球霉素 A (Concanamycin A) 抑制剂处理莱茵衣藻细胞,导致自噬通路阻断、自噬体积聚在液泡中^[3]。渥曼青霉素 (Wortmannin) 处理病毒感染海洋球石藻后,自噬的抑制阻碍了病毒粒子的释放,病毒粒子在肿胀的内体样结构中积累^[25]。

自噬条件下,泛素样蛋白 Atg8 与 PE 发生酯化而稳定存在于自噬体内外膜上,直到被溶酶体或液泡降解,因此是一个很好的示踪自噬的分子标记。蛋白免疫印迹可以检测 Atg8-PE 含量的变化。在莱茵衣藻八氢番茄红素合成酶以及叶绿体蛋白酶突变体中,Atg8-PE 含量明显增加^[21]。伴刀球霉素 A 抑制剂处理,也导致莱茵衣藻细胞中 Atg8 和 Atg8-PE 的积累^[3]。此外,病毒感染海洋球石藻诱导宿主多种自噬相关蛋白在转录水平和翻译水平的显著性差异表达,特别是 Atg8-PE 含量发生显著增加,并且在纯化的病毒粒子中检测到了宿主编码的 Atg8-PE,而用抑制剂渥曼青霉素处理,则导致感染细胞内 Atg8-PE 含量显著下降^[25]。

使用激光共聚焦显微镜可以在细胞水平示踪浮游植物细胞自噬过程。如荧光染料 MDC 以及 Lysosensor Green DND-189 荧光染色结果显示,病毒感染诱导海洋球石藻细胞产生自噬体的能力比自噬诱导剂雷帕霉素更强^[25]。正常的莱茵衣藻细胞中,Atg8 蛋白的荧光信号通常微弱且分散,而自噬激活后,Atg8 发生聚集,形成显微镜下易分辨的强荧光斑点^[21]。但是,进行免疫荧光共定位检测时,除非是单克隆抗体,否则 Atg8 与其他蛋白共定位具有一定难度^[3]。而且,某些藻类缺乏除 Atg8 以外的其他亚细胞结构标记物也是一个限制因素^[3]。不过,免疫荧光可以检测内源性 Atg8,从而避免了 Atg8 融合蛋白过表达而产生的假阳性^[3]。

细胞自噬作为细胞内的一种重要的蛋白降解机制,对于浮游植物适应外界环境胁迫,维持细胞内稳态非常重要。细胞自噬参与调控浮游植物的防御机制以响应外界生物或非生物胁迫,因此浮游植物细胞自噬在水生态系统的碳循环和其他营养元素循环过程中有着极其重要的作用。学者们对包括浮游植物在内的单细胞生物自噬及其机制的研究刚刚起步,该领域的大量科学问题还有待进一步深入研究,但是作为一个新兴的发展方向,也将在未来成为浮游植物研究领域的热点。

参考文献:

- [1] Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12: 1535-1541.
- [2] Shemi A, Ben-Dor S, Vardi A. Elucidating the composition and conservation of the autophagy pathway in photosynthetic eukaryotes[J]. *Autophagy*, 2015, 11(4): 701-715.
- [3] Perez-Perez ME, Couso I, Heredia-Martinez LG, et al. Monitoring autophagy in the model green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Cells*, 2017, 6(4): 36.
- [4] Bidle KD. The molecular ecophysiology of programmed cell death in marine phytoplankton[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7(7): 341-375.
- [5] Joungmok K, Mondira K, Benoit V, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(2): 132-141.
- [6] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 253-262.
- [7] Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, et al. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(21): 20558-20564.
- [8] Pfaffenwimmer T, Kijanska M, Hansmann I, et al. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase[J]. *Molecular Cell*, 2014, 53(3): 471-483.
- [9] Yen WL, Legakis JE, Nair U, et al. Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(2): 581-593.
- [10] Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: D348-D352.
- [11] Kihara A, Noda T, Ishihara N, et al. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Cell Biology*, 2001, 152(3): 519-530.
- [12] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2011, 18(4): 571-580.
- [13] Weiliang F, Ashley N, Qing Z. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10): 7769-7774.
- [14] Stack JH, Dewald DB, Takegawa K, et al. 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]. *Journal of Cell Biology*, 1995, 129(2): 321-334.
- [15] Park JM, Jung CH, Seo M, et al. The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14[J]. *Autophagy*, 2016, 12(3): 547-564.
- [16] Sophie P, Amina T, Xueping Q, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin1-dependent autophagy[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 927-939.
- [17] Lam E. Plant cellbiology: controlled cell death, plant survival and development[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(4): 305-315.
- [18] Walczak M, Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation[J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 424-425.
- [19] Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway[J]. *Journal of Cell Biology*, 2000, 151(2): 263-276.
- [20] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: D225-D229.
- [21] Perez-Perez ME, Couso I, Crespo JL. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Autophagy*, 2012, 8(3): 376-388.
- [22] Perez-Martin M, Blaby-Haas CE, Perez-Perez ME, et al. Activation of autophagy by metals in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2015, 14(9): 964-973.
- [23] Schwarz V, Andosch A, Geretschlagner A, et al. Carbon starvation induces lipid degradation via autophagy in the model alga *Micrasterias*[J]. *Journal Plant Physiology*, 2017, 208: 115-127.
- [24] Shemi A, Schatz D, Fredricks HF, et al. Phosphorus starvation induces membrane remodeling and recycling in *Emiliania huxleyi*[J]. *New Phytologist*, 2016, 211(3): 886-898.
- [25] Schatz D, Shemi A, Rosenwasser S, et al. Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms[J]. *New Phytologist*, 2014, 204(4): 854-863.
- [26] 李天来, 路涛, 刘玉凤, 等. 高等植物 PS I 和 PS II 光抑制

- 机理的研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(5): 513-519.
- [27] Ursula LM. *Micrasterias* as a model system in plant cell biology [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(82):999.
- [28] Pugkaew W, Meetam M, Ponpuak M, et al. Role of autophagy in triacylglycerol biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by chemical inducer and inhibitors[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 30(1): 15-22.
- [29] Rosenwasser S, Ziv C, Creveld SG, et al. Virocell metabolism: metabolic innovations during host-virus interactions in the ocean[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(10): 821-832.
- [30] 马亚瑞, 刘旭宏, 蔡艺钦, 等. 病毒介导的海洋球石藻 (*Coccolithophores*) 鞘脂类代谢调控[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1555-1564.
- [31] Zeng J, Liu SSY, Cai WC, et al. Emerging lipidome patterns associated with marine *Emiliana huxleyi*-virus model system [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 521-528.
- [32] Vardi A, Haramaty L, Van Mooy BAS, et al. Host-virus dynamics and subcellular controls of cell fate in a natural *coccolithophore* population[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(47): 19327-19332.
- [33] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation[J]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 2011, 27(1): 107-132.
- [34] Perez-Perez ME, Lemaire SD, Crespo JL. Control of autophagy in *Chlamydomonas* is mediated through redox dependent inactivation of the ATG4 protease[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(4): 2219-2234.
- [35] María Esther PP, Mirko Z, Marchand CH, et al. The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 1953-1964.
- [36] Pérez-Pérez ME, Couso I, Domínguez-González M, et al. Redox control of autophagy in photosynthetic organisms [J]. *Progress in Botany*, 2017, 79: 75-88.
- [37] Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2017, 24(8): 1369-1379.
- [38] Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-beclin1 program of autophagic cell death by Caspase-8 [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1500-1502.
- [39] 苏金净, 蔡伟聪, 李桂玲, 等. 浮游植物 metacaspase 的分布、结构及其功能特性[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(5): 1-10.
- [40] Liu JW, Cai WC, Fang X, et al. Virus-induced apoptosis and phosphorylation form of metacaspase in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* [J]. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(3): 413-422.
- [41] Zalckvar E, Yosef NS, Ber Y, et al. A systems level strategy for analyzing the cell death network: implication in exploring the apoptosis/autophagy connection [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2010, 17(8): 1244-1253.
- [42] Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, et al. PCD and autophagy in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata* [J]. *Autophagy*, 2009, 5(6): 854-855.
- [43] Sheyn U, Rosenwasser S, Bendor S, et al. Modulation of host ROS metabolism is essential for viral infection of a bloom-forming coccolithophore in the ocean [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(7): 1742-1754.
- [44] Bidle KD, Liti H, Joana BER, et al. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliana huxleyi* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(14): 6049-6054.