

## 毕赤酵母过氧化物酶体吞噬的研究进展

张建国\* 黄勋娟 刘菲 刘俊秀

(上海理工大学 医疗器械与食品学院 上海 200093)

**摘要:** 过氧化物酶体吞噬是生物体的一种重要自我调控方式。过氧化物酶体吞噬是多种吞噬相关蛋白的共同作用,而且吞噬相关蛋白质之间的作用具有严格的时序性。由于毕赤酵母有两种吞噬方式、全基因组序列已知、基因操作技术成熟,所以毕赤酵母是研究过氧化物酶体吞噬的良好素材,也是目前研究的热点。本文对近年来毕赤酵母过氧化物酶体吞噬的启动、两种吞噬类型的形成、过氧化物酶体在液泡中降解的研究进行梳理,为毕赤酵母过氧化物酶体吞噬的进一步研究奠定基础。

**关键词:** 毕赤酵母, 过氧化物酶体, 自我吞噬, 吞噬相关蛋白

### The research progress of pexophagy in *Pichia pastoris*

ZHANG Jian-Guo\* HUANG Xun-Juan LIU Fei LIU Jun-Xiu

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Pexophagy is an important self-regulation mechanism. It is composed of various interactions by many autophagy related proteins (Atgs) according to strict spatial and temporal orders. *Pichia pastoris* was selected as the model to clarify the pexophagy mechanism for following reasons: two pexophagy modes, genome sequenced, and well-established gene manipulation protocols. In this review, the mechanism for Atgs involved in pexophagy activation, two pexophagy modes formation, and peroxisome degradation in vacuole of *Pichia pastoris* were organized, which provided a solid foundation for further research.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, Peroxisome, Autophagy, Autophagy related protein

#### 1 毕赤酵母及其过氧化物酶体

过氧化物酶体是由内质网分化出来的一种单膜细胞器<sup>[1-2]</sup>。在毕赤酵母中,过氧化物酶体的主要功能是由醇氧化酶、催化酶、甲醛脱氢酶代谢甲醇。毕赤酵母和其它另外3种也可以代谢甲醇的酵母(多型汉逊酵母、假丝酵母、球拟酵母属)被称为

甲基营养型酵母<sup>[3]</sup>。另外,过氧化物酶体还可以降解脂肪酸、甲酰胺、过氧化氢。所以过氧化物酶体的主要作用是去除细胞中的有毒物质。由于过氧化物酶体在细胞中的重要作用<sup>[4]</sup>,细胞会根据环境因素严格控制过氧化物酶体的数目。毕赤酵母以甲醇、油酸、有机胺类物质生长时产生的过氧化物酶

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21306112); 上海市自然科学基金项目(No. 13ZR1429100); 上海市高校青年教师培养计划资助

\*通讯作者: Tel: 86-21-55271117; ✉: jgzhang@usst.edu.cn

收稿日期: 2013-10-14; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-08

体占细胞体积的 80%。这时,当毕赤酵母的碳源转变为葡萄糖、乙醇时,过氧化物酶体被液泡吞噬。这个过程称为过氧化物酶体吞噬(Pexophagy)。发生吞噬后过氧化物酶体占细胞体积的 5%不到。

过氧化物酶体吞噬是细胞的一种自我调节机制,可以消除细胞内的杂物,并且循环利用细胞内的资源<sup>[5-6]</sup>。研究过氧化物酶体吞噬是阐明细胞控制过氧化物酶体机理和过程的重要内容,也将为人类诸多与过氧化物酶体有关的疾病做出指导。毕赤酵母是唯一可以根据不同培养基组分的而发生不同过氧化物酶体吞噬方式的菌种<sup>[7]</sup>,而且过氧化物酶体的产生和吞噬速度快,基因组小且容易分析<sup>[8]</sup>;同时,毕赤酵母的营养单倍体容易发生接合得到过氧化物酶体吞噬的突变体<sup>[9]</sup>,所以毕赤酵母是研究过氧化物酶体吞噬的良好模型。另外,毕赤酵母也是常用的外源蛋白表达宿主<sup>[10]</sup>,过氧化物酶体中醇氧化酶的强启动子是毕赤酵母高效表达外源蛋白的主要原因。过氧化物酶体吞噬会抑制醇氧化酶启动子,抑制外源蛋白的表达<sup>[11]</sup>。所以过氧化物酶体吞噬的研究对阐明外源蛋白表达和抑制的控制有指导意义。

毕赤酵母过氧化物酶体吞噬有微吞噬(Micropexophagy)和宏吞噬(Macropexophagy)两种方式(表 1)<sup>[7]</sup>。当毕赤酵母的碳源由甲醇转变为葡萄糖时发生微吞噬。微吞噬中过氧化物酶体首先和液泡接近,接着液泡变扁平后周围生长出手臂状的新液泡膜组分。液泡、新生成的膜组分、以及一种特殊的过氧化物酶体微吞噬组分(Micropexophagy apparatus, MIPA)合力将过氧化物酶体包围。最后,

液泡中蛋白酶将过氧化物酶体降解<sup>[12]</sup>。微吞噬是多个过氧化物酶体一起被液泡吞噬<sup>[13]</sup>。当毕赤酵母的碳源由甲醇转变为乙醇时发生宏吞噬。在宏吞噬中,吞噬体的组分和过氧化物酶体结合<sup>[14-15]</sup>,直至形成一个将过氧化物酶体包围的双层膜结构的吞噬体,吞噬体和液泡融合后将过氧化物酶体送入液泡中降解。宏吞噬中液泡每次吞噬一个过氧化物酶体。微吞噬和宏吞噬的过程见图 1。在毕赤酵母过氧化物酶体吞噬过程中加入蛋白质合成抑制剂(放线菌酮)可以抑制微吞噬,但不能抑制宏吞噬。这说明微吞噬过程需要合成新蛋白质,而宏吞噬过程不需要合成新的蛋白质<sup>[7]</sup>。所以微吞噬的速度比宏吞噬慢。添加蛋白酶抑制剂(PMSF)可以抑制微吞噬中液泡封存臂对过氧化物酶体的包围,而只能抑制宏吞噬中过氧化物酶体在液泡中降解。这是由于蛋白酶是微吞噬过程中过氧化物酶体靠近液泡,以及被液泡包围之后运送过氧化物酶体所必需的。但是宏吞噬的这个步骤不需要蛋白酶<sup>[12]</sup>。毕赤酵母过氧化物酶体两种吞噬方式的表现也不一样。微吞噬中醇氧化酶和甲酸脱氢酶活力都明显下降。宏吞噬中醇氧化酶活力明显下降,而甲酸脱氢酶活力没有明显下降<sup>[7]</sup>。

过氧化物酶体吞噬的研究已经深入到分子水平。有关毕赤酵母过氧化物酶体吞噬的基因和蛋白质的研究取得了突飞猛进的发展。最初,利用亚硝基胍(NTG)对毕赤酵母突变得到吞噬突变体,然后鉴定突变的基因。例如, Tuttle 等得到突变体 (Glucose-induced selective autophagy ,*gsa1* 和 *gsa2*) 不能发生微吞噬,但是仍然可以发生宏吞噬<sup>[7]</sup>。 Sakai 用 NTG 突变得到的 7 个微吞噬突变体(*pag*)

表 1 过氧化物酶体吞噬发生时的碳源转变			
Table 1 Carbon sources turnover for pexophaby in <i>Pichia pastoris</i>			
吞噬类型	诱导过氧化物酶体的碳源	吞噬发生时的碳源	文献
Pexophagy	Carbon sources for peroxisome induction	Carbon sources for pexophagy	References
Micropexophagy	Methanol	2.0% Glucose	[7]
		2.0% Fructose	[16]
		2.0% Glycerol	[16]
Macropexophagy	Methanol	0.5% Ethanol	[7]
		0.5% Sodium acetate	[16]

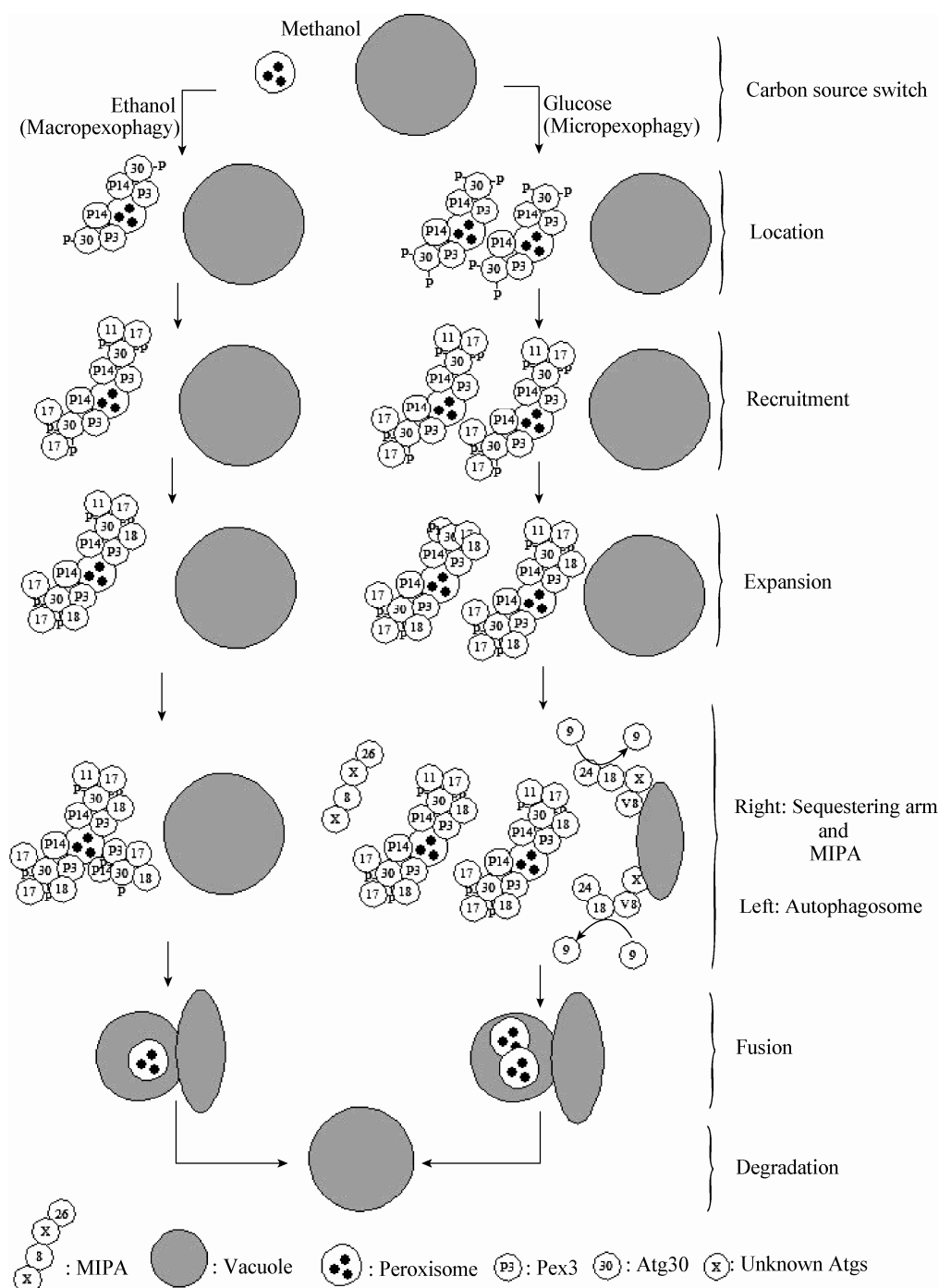


图1 毕赤酵母过氧化物酶体吞噬的模型

Figure 1 Two pexophagy modes of *Pichia pastoris*

中, *pag1*、*pag5*、*pag6* 也是宏吞噬突变体<sup>[12]</sup>, 所以宏吞噬和微吞噬的一些基因是共用的<sup>[17]</sup>。经过对吞噬相关基因(Autophagy related genes, *atg*)的统一命名<sup>[18]</sup>, 目前发现 30 多个 *atg* 编码的吞噬相关

蛋白(Autophagy related proteins, Atg)在微吞噬和宏吞噬中共同起作用, 说明很多 Atg 共同调控这两种吞噬方式<sup>[15]</sup>。本文分析了过氧化物酶体中 Atg 的作用, 以及其相互作用的时序性, 对微吞噬和宏

吞噬机制进行了梳理。

2 过氧化物酶体微吞噬和宏吞噬的启动

毕赤酵母代谢葡萄糖或乙醇的速度比代谢甲醇的速度快。这说明当毕赤酵母的碳源由甲醇变为葡萄糖或乙醇时，毕赤酵母就会产生更多的能量。这些多余的能量使毕赤酵母的一个特异性受体 Atg30 的磷酸化水平升高。吞噬启动前 Atg30 的磷酸化水平为 5%–10%。吞噬启动初始阶段(1.5 h 以内) Atg30 磷酸化程度升高到 80%–90%，没有磷酸化的 Atg30 量明显降低。过氧化物酶体吞噬的后期(1.5–6.0 h)由于 Atg30 随着过氧化物酶体被液泡降解而导致 Atg30 的总量明显减少。Atg30 的 95–119 位氨基酸是在过氧化酶体吞噬中发挥功能的必需区间。在甲醇培养毕赤酵母中大量表达 Atg30 也会启动过氧化物酶体吞噬<sup>[19]</sup>。Atg30 中 112 位丝氨酸的磷酸化和吞噬启动有确切的关系。Atg30 在吞噬启动时有下面三个功能。

2.1 定位(Location)

Atg30 定位到过氧化物酶体的膜蛋白 (Peroxisome biogenesis defective) Pex3 和 Pex14 上，Pex14 也有磷酸化和非磷酸化两种形式。表 2 是 Atg30 在突变(S112A)和非磷酸化情况下与 4 种蛋白质的结合结果。由表 2 可以看出 Atg30 的 112 位丝氨酸经过突变依然可以和 Pex3、Pex14 结合。酿酒酵母双杂交实验中 Atg30 和 Pex3、Pex14 没有被磷酸化，Pex14 磷酸化是 Pex14 与 Atg30 结合所必需的。

2.2 招募(Recruitment)

Atg30 招募 Atg11 和 Atg17，形成吞噬体聚合位点(Phagophore assembly site，PAS)<sup>[19-20]</sup>。Atg17

是 PAS 的标志蛋白。Atg30 的 112 位丝氨酸也是 Atg30 和 Atg11 结合所必需的(表 2)，但是不在 Atg30 和 Atg17 的结合中起作用。在吞噬过程中 Atg11 处于液泡组分和过氧化物酶体连接的位置<sup>[21]</sup>。Atg11 和 Atg17 在 Atg30 上形成 Y 形结构来招募其它吞噬相关蛋白到液泡中<sup>[22]</sup>。这个 Y 形结构可以根据目的物的大小而选择性地使用 Y 型结构组分的量。例如，招募小型的过氧化物酶体时，只需要一部分 Atg11 和 Atg17 发挥作用，招募大的过氧化物酶体时则需要全部的 Atg11 和 Atg17<sup>[23]</sup>。这个 Y 形结逐渐扩张成微吞噬的封存臂(Sequestering arm)，或者宏吞噬的吞噬体(Autophagosomes)。目前的研究表明过氧化物酶体吞噬以 PAS 为出发点，还有很多种后续的吞噬相关蛋白逐渐结合到 PAS<sup>[24-25]</sup>。

2.3 起点延伸(Expansion)

Atg30 利用 Atg8 相互作用区域 (Atg8-interaction motif)与 Atg8 结合后开始扩张<sup>[26]</sup>。Atg8 是有 125 个氨基酸残基的蛋白质，经过 Atg4 作用后去除 C 端的 9 个氨基酸残基，变成含有 116 个氨基酸残基的 Atg8<sup>[27]</sup>。Atg8 经过切割后的 C 端是甘氨酸，进而在 Atg7 (E1 酶)<sup>[28]</sup>、Atg3 (E2 酶)的作用下和磷脂酰乙醇胺结合(脂化)结合到 Atg30 上。Atg8 在微吞噬和宏吞噬中都发挥着重要的作用。Atg7 是磷酸果糖激酶 1 (PFK1)的  $\alpha$  亚基。PFK1 参与过氧化物酶体吞噬的功能和它代谢葡萄糖的功能互不相干<sup>[17]</sup>。

不同细胞器的吞噬在启动阶段都有自己的受体蛋白。例如毕赤酵母线粒体吞噬的受体蛋白是 Atg32<sup>[29]</sup>；胞质到液泡的靶向运输(Cvt)的受体蛋白是 Atg19 和 Atg34<sup>[30]</sup>。Atg30 是毕赤酵母过氧化物

表 2 毕赤酵母 Atg30 在过氧化物酶体吞噬时与 4 种蛋白质结合情况				
Table 2 Interaction of Atg30 with 4 other proteins at pexophagy activation in <i>Pichia pastoris</i>				
Acceptors	Proteins			
	Pex3	Pex14	Atg11	Atg17
Atg 30 mutation (S112A)	+	+	-	+
Two-hybrid analysis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	+

注：+：与 Atg30 结合；-：不与 Atg30 结合。  
Note: +: Interact with Atg30; -: Do not interact with Atg30.

酶体吞噬的受体。Atg30 和 Pex3、Pex14, 以及 Atg11、Atg17 的结合是作为受体发挥的两个作用<sup>[19]</sup>。微吞噬中, PAS 形成后, Atg30 和 Atg8 结合开始形成 MIPA。宏吞噬中 PAS 形成后, Atg30 和 Atg8 结合开始形成吞噬体。

### 3 微吞噬的封存臂和 MIPA 的形成

在过氧化物酶体微吞噬过程中, 液泡会在靠近过氧化物酶体的周围伸出液泡臂。同时, PAS 会生长成封存臂。液泡、封存臂和 MIPA 共同将过氧化物酶体包围。

#### 3.1 封存臂(Sequencing arm)的形成

Atg9 是封存臂形成的重要蛋白质。PAS 通过 Atg9 结合多种蛋白质组分。Atg9 是一个具有六个跨膜区域的蛋白质。它的 C、N 端都暴露在细胞质中<sup>[31]</sup>。Atg9 单体之间可以发生作用, 形成多聚体<sup>[32]</sup>。Atg9 在 Atg11 和 Vps15 (一种液泡运输蛋白) 的帮助下结合到 Atg11 上。随后 Atg2 逐渐聚集到液泡膜周围。然后, Atg9 在 Atg7 和 Atg2 的帮助下从液泡上转移回到细胞质中。Atg2 是一种水溶性蛋白<sup>[33]</sup>, 在 Atg1、Atg9、Atg18、Vps15 的帮助下定位到液泡表面组分上<sup>[14]</sup>。Atg18 是液泡膜上的一种具有类似电磁线圈结构(WD40)的蛋白质。缺少 Atg18 时, 过氧化物酶体不能和液泡连接在一起。封存臂的组分还有 Vac8 和 Atg24。Vac8 利用一个连续的氨基酸重复序列(Armadillo repeat)和封存臂上的蛋白结合, 参与到封存臂的形成过程中<sup>[34]</sup>。Atg24 存在于封存臂的顶端。它的作用是促使封存臂和液泡融合。内质网蛋白质 Sar1 突变后(Sar-T34N 和 Sar1-H79G)抑制 Atg8 的脂化和 MIPA 的形成, 但是不影响微吞噬中的封存臂形成和 Atg11、Atg9 的运输<sup>[35]</sup>。这说明 Atg9 的回收是在过氧化物酶体和液泡融合之前完成的。

#### 3.2 MIPA 的形成

Mukaiyama 利用 GFP 标记 Atg8 和 FM4-64 标记细胞膜进行双荧光显色发现, 在微吞噬中过氧化物酶体和液泡复合物上远离液泡的一侧存在一个

特异的膜结构, 命名为 MIPA<sup>[27]</sup>。而且, 目前只在微吞噬过程中发现 MIPA 存在。Atg8 和 Atg26 是 MIPA 的重要组成部分。Atg8 经过 Atg4 的剪切, 在 Atg7 (E1 酶)<sup>[28]</sup>和 Atg3 (E2 酶)的催化下和磷脂酰乙醇胺发生脂化, 几分钟后结合到 MIPA 的一部分上。Atg8 的 C 端氨基酸序列是一个类 VEEL-motif 序列 (VEEI), 这可能是因为 VEEI 序列抑制了 Atg8 的催化活力<sup>[36]</sup>。所以, 不发生过氧化物酶体吞噬时, Atg8 不与磷脂酰乙醇胺结合, 不向 MIPA 部分靠近。结合 Atg8 的磷脂酰乙醇胺再结合 Atg26<sup>[37]</sup>。Atg26 是微吞噬和宏吞噬都需要的尿嘧啶二磷酸葡萄糖: 甾醇葡萄糖基转移酶。但是饥饿诱导的毕赤酵母宏吞噬中不需要 Atg26。Atg26 有 3 个结构域: 同源域 (PH)、具有 4 个  $\beta$  折叠片和一个  $\alpha$  螺旋的类葡萄糖基转移酶-类 G 蛋白的三磷酸鸟苷酶-肌微管素的 GRAM 结构域 (Glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and myotubularins)<sup>[38]</sup>、催化结构域。Atg26 结合到 Atg8 的过程需要 PH 结构域和 GRAM 结构域, 不需要催化结构域。GRAM 的特点是具有保守的氨基酸残基, 其中只有一个甘氨酸是可变的<sup>[39]</sup>。Atg26 的 GRAM 结构域中氨基酸残基被替换任意一个, Atg26 就不能与 MIPA 发生作用<sup>[38]</sup>。Atg26 的葡萄糖基转移酶的活力是用来延伸 MIPA 组分。

PAS 上的 Atg17 结合 Atg28。Atg28 又结合 Atg35。Atg35 是 MIPA 的必需组分<sup>[40]</sup>。但是细胞质中过量 Atg35 抑制微吞噬的发生。酿酒酵母中 Atg35 的类似物 rA9 可以和 RNA 聚合酶 II 的大亚基结合, 说明 Atg35 可能以类似方式抑制微吞噬<sup>[40]</sup>。MIPA 的形成还需要有类泛素结合系统 (Atg1 复合物<sup>[38]</sup>、Atg9 复合物) 参与, 用于 MIPA 的形成或者提供过氧化物酶体和液泡结合的状态<sup>[27]</sup>。MIPA 和液泡臂的融合需要 Atg1、Atg24、Vac8<sup>[14]</sup>。

### 4 宏吞噬的吞噬体(Autophagosomes)形成

相比于酿酒酵母宏吞噬较为明朗的分子机制<sup>[41]</sup>, 人们对毕赤酵母宏吞噬机制的了解还不够, 许多新蛋白的发现还需要参照酿酒酵母的研究基

础。毕赤酵母宏吞噬吞噬体的形成首先是 Atg6 定位到液泡周围区域。Atg8 结合到其中一个 Atg6 就形成 PAS<sup>[27]</sup>, 然后生长为吞噬体膜。Atg30 定位到过氧化物酶体上, 也吸引 Atg8 来结合, Atg8 的脂化与液泡形状的转变没有关系, Atg8 的 C 端氨基酸序列和液泡形状的转变有关系。Atg8 的连接活力和半融合活力是液泡发生融合的原因。Atg26 经过脂化后聚集在吞噬体膜上。敲除 *atg26* 后, 吞噬体的形成就被减缓<sup>[42]</sup>。目前已经明确 Atg26 是吞噬体膜生长的必需组分<sup>[43]</sup>。Atg9 在宏吞噬中发挥和微吞噬中一样的作用。Atg9 在 Atg11 和 Vps15 的帮助下从胞质转移到吞噬体膜<sup>[44]</sup>, 再在 Atg2、Atg18 帮助下回到胞质中。宏吞噬体中还有很多蛋白组分的来源没有研究清楚, 但是这些组分在 Atg9 的作用下延伸吞噬体膜, 最后形成吞噬体。在宏吞噬中, 内质网蛋白质 Sar1 经过突变后 (Sar-T34N) 抑制吞噬体的形成, 另一种突变体 Sar1-H79G 的表达抑制过氧化物酶体由吞噬体向液泡的转运, 但是不影响 Atg9 的回收<sup>[35]</sup>, 也表明 Atg9 在吞噬体和液泡融合之前进行被回收。宏吞噬中吞噬体中有 Atg8, 没有内质网组分。但是 Sar1-H79G 突变体的吞噬体中不仅有 Atg8, 还有内质网组分, 说明 Sar1 与内质网组分从吞噬体中回收有关系。Sar1-H79G 突变体的吞噬体中的内质网组分阻碍了吞噬体的熟化和吞噬体向液泡的转运<sup>[35]</sup>。

## 5 过氧化物酶体在液泡中降解

微吞噬中液泡的封存臂和新形成的 MIPA 将过氧化物酶体包围后, 就进入降解阶段。宏吞噬的吞噬体和液泡的融合区域都分为 3 个部位: 顶部、边界、外围<sup>[45]</sup>。利用 CFP 标记研究发现吞噬体和液泡的结合是从顶部开始<sup>[46]</sup>。Atg24 结合在 Atg17 上, 在过氧化物酶体微吞噬和宏吞噬过程都需要。但是, 毕赤酵母的其它细胞器的吞噬不需要 Atg24。缺失 Atg24 的细胞在发生宏吞噬时只能停留在形成吞噬体的阶段, 而不能和液泡融合。这说

明 Atg24 是吞噬体和液泡融合过程所必需的。它通过磷脂酰乙醇胺-3-磷酸发生融合作用<sup>[46]</sup>, 但是并不是 MIPA 和吞噬体形成所必需的。过氧化物酶体微吞噬和宏吞噬将过氧化物酶体完成包围后, 在 Atg1、Atg24 和 Vac8 作用下和液泡发生融合。Vac8 的豆蔻酰化和棕榈酰化功能是其发挥融合作用的原因。Vac8 的另外一个功能是 Atg11 结合到液泡膜上这一过程的必需组分<sup>[34]</sup>。微吞噬和宏吞噬过程中的过氧化物酶体进入液泡后, 过氧化物酶体在液泡中降解所需要的组分和步骤是一样的<sup>[28]</sup>。利用 NTG 突变的方法得到蛋白酶 A (PrA) 和蛋白酶 B (PrB) 的突变体, 发现过氧化物酶体和其中的酶仍然在突变体中存在, 说明液泡是利用蛋白酶 A 和蛋白酶 B 降解过氧化物酶体<sup>[7]</sup>。利用 PMSF 抑制毕赤酵母的蛋白酶会使微吞噬停留在初始阶段<sup>[12]</sup>。葡萄糖导致毕赤酵母中过氧化物酶体吞噬属于葡萄糖分解代谢物抑制效应<sup>[47]</sup>, 毕赤酵母细胞的己糖转录蛋白 (PpHxt1) 控制着葡萄糖向细胞内的运输。大量的葡萄糖运输到细胞内会导致过氧化物酶体吞噬<sup>[48]</sup>。另外一种甲基营养型酵母 (多型汉逊酵母) 中过氧化物酶体吞噬的过程和酿酒酵母中葡萄糖分解代谢物抑制 (Glucose catabolite repression) 效应也有相似的转录抑制因子 (Mig1)<sup>[49]</sup>。

## 6 展望

毕赤酵母过氧化物酶体吞噬机制的研究对人体细胞吞噬机制的研究有重要意义。但是, 目前还有多个过氧化物酶体吞噬研究的热点需要解决: 引起微吞噬和宏吞噬的细胞内信号, MIPA 的具体组分及其来源, 宏吞噬中吞噬体的组分和来源<sup>[14]</sup>。总之, 还有很多过氧化物酶体吞噬调控蛋白有待发现, 化学随机突变是目前研究的必要途径。定点敲除技术用以研究已知调控蛋白的作用。随着毕赤酵母基因组的公布, 通过基因序列的预测、定点敲除基因来确定过氧化物酶体吞噬调控蛋白也是一种可行途径。过氧化物酶体吞噬调控的研究表明蛋白磷酸化是控制吞噬的重要因素<sup>[16,50-51]</sup>。Atg30 磷酸化

后与过氧化物酶体结合,带动其它蛋白与过氧化物酶体和液泡膜的臂相结合。毕赤酵母细胞的ATP浓度在过氧化物酶体吞噬启动时比甲醇诱导时高,而且微吞噬时的ATP浓度比宏吞噬时的ATP浓度高<sup>[16]</sup>。同时,毕赤酵母过氧化物酶体吞噬过程伴随着ATP的消耗和cAMP的生成<sup>[47]</sup>。所以毕赤酵母过氧化物酶体吞噬的启动和细胞内的能量、能荷有着重要关系。在毕赤酵母中还发现探测葡萄糖的蛋白质Gss1。敲除毕赤酵母的Gss1基因后,毕赤酵母利用葡萄糖和甲醇的比生长速率降低,也不能发生过氧化物酶体吞噬<sup>[52]</sup>。过氧化物酶体的宏吞噬和微吞噬都由多种吞噬相关蛋白协同作用完成,这些吞噬蛋白协同作用定量关系的阐明也是一个新的研究热点。在高能量状态下避免毕赤酵母发生过氧化物酶体吞噬可以保持醇氧化酶启动子启动的外源基因的表达,同时也为外源蛋白的表达和在毕赤酵母中积累高附加值化学品提供能量。Zhang J. G在毕赤酵母中添加正己烷等氧载体<sup>[53]</sup>及细胞维持能的控制<sup>[54]</sup>使毕赤酵母在高能的状态下不发生过氧化物酶体吞噬<sup>[55]</sup>,提高了重组毕赤酵母中S-腺苷甲硫氨酸的积累量和小牛肠激酶轻链的表达量<sup>[56]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Schluter A, Fourcade S, Ripp R, et al. The evolutionary origin of peroxisomes: An ER-peroxisome connection[J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(4): 838-845.
- [2] Gabaldon T, Snel B, van Zimmeren F, et al. Origin and evolution of the peroxisomal proteome[J]. Biology Direct, 2006, 1: 8.
- [3] Negruta O, Csutak O, Stoica I, et al. Methylophilic yeasts: diversity and methanol metabolism[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2010, 15(4): 5369-5375.
- [4] Gabaldon T. Peroxisome diversity and evolution[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2010, 365: 765-773.
- [5] Islinger M, Grille S, Fahimi HD, et al. The peroxisome: an update on mysteries[J]. Histochemistry and Cell Biology, 2012, 137(5): 547-574.
- [6] 王海燕, 倪涛, 谢志平. 酵母中细胞自噬的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(6): 829-839.
- [7] Tuttle DL, Dunn W. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Journal of Cell Science 1995, 108(Pt1): 25-35.
- [8] De Schutter K, Lin YC, Tiels P, et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(6): 561-566.
- [9] Liu H, Tan X, Veenhuis M, et al. An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(15): 4943-4951.
- [10] Cregg JM. Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems[A]/Methods in Molecular Biology[M]. Clifton, NJ: Humana Press, 2007, 389: 1-10.
- [11] Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 64(15): 91-105.
- [12] Sakai Y, Koller A, Rangell LK, et al. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates[J]. The Journal of Cell Biology, 1998, 141(3): 625-636.
- [13] Manjithaya R, Nazarko TY, Farré JC, et al. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy[J]. FEBS Letters, 2010, 584(7): 1367-1373.
- [14] Dunn WA, Cregg JM, Kiel JAKW, et al. Pexophagy-The selective autophagy of peroxisomes[J]. Autophagy, 2005, 1(2): 75-83.
- [15] Till A, Lakhani R, Burnett SF, et al. Pexophagy: The selective degradation of peroxisomes[J]. International Journal of Cell Biology, 2012(2012): Article ID 512721.
- [16] Ano Y, Hattori T, Kato N, et al. Intracellular ATP correlates with mode of pexophagy in *Pichia pastoris*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(8): 1527-1533.
- [17] Yuan W, Tuttle DL, Shi YJ, et al. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase[J]. Journal of Cell Science, 1997, 110(16): 1935-1945.
- [18] Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes[J]. Developmental Cell, 2003, 5(4): 539-545.
- [19] Farré JC, Manjithaya R, Mathewson RD, et al. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy[J]. Developmental Cell, 2008, 14(3): 365-376.
- [20] Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, et al. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation[J]. Molecular Biology of the Cell, 2008, 19(5): 2039-2050.
- [21] Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, et al. Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole[J]. The Journal of Cell Biology, 2001, 153(2): 381-396.
- [22] Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, et al. Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway[J]. Developmental Cell, 2002, 3(6): 825-837.
- [23] Nazarko TY, Farré JC, Subramani S. Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins[J]. Molecular Biology of the Cell, 2009, 20(17): 3828-3839.
- [24] Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, et al. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization[J]. Genes to Cells, 2007, 12(2): 209-218.
- [25] Farré JC, Mathewson RD, Manjithaya R, et al. Roles of *Pichia pastoris* vrag in vacuolar protein sorting and the phosphatidylinositol 3-kinase complex in phagophore elongation in autophagy pathways[J]. Autophagy, 2010, 6(1):

- 86-99.
- [26] Farre JC, Burkenroad A, Burnett SF, et al. Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11[J]. *Embo Reports*, 2013, 14(5): 441-449.
- [27] Mukaiyama H, Baba M, Osumi M, et al. Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(1): 58-70.
- [28] Farré JC, Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process[J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(9): 515-523.
- [29] Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy[J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(1): 87-97.
- [30] Watanabe Y, Noda NN, Kumeta H, et al. Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways structural basis for cargo recognition by Atg19 and Atg34[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(39): 30026-30033.
- [31] He CC, Song H, Yorimitsu T, et al. Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast[J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 175(6): 925-935.
- [32] Reggiori F, Shintani T, Nair U, et al. Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts[J]. *Autophagy*, 2005, 1(2): 101-109.
- [33] Strømhaug PE, Bevan A, Dunn WA Jr. GSA11 encodes a unique 208-kDa protein required for pexophagy and autophagy in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(45): 42422-42435.
- [34] Oku M, Nishimura T, Hattori T, et al. Role of Vac8 in formation of the vacuolar sequestering membrane during micropexophagy[J]. *Autophagy*, 2006, 2(4): 272-279.
- [35] Schroder LA, Ortiz MV, Dunn WA. The membrane dynamics of pexophagy are influenced by Sar1p in *Pichia pastoris*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(11): 4888-4899.
- [36] Tamura N, Oku M, Sakai Y. Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 123(23): 4107-4116.
- [37] Yamashita S, Oku M, Wasada Y, et al. PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2006, 173(5): 709-717.
- [38] Oku M, Warnecke D, Noda T, et al. Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain[J]. *EMBO Journal*, 2003, 22(13): 3231-3241.
- [39] Doerks T, Strauss M, Brendel M, et al. GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(10): 483-485.
- [40] Nazarko VY, Nazarko TY, Farre JC, et al. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*[J]. *Autophagy*, 2011, 7(4): 375-385.
- [41] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(10): 1102-1109.
- [42] Stasyk OV, Nazarko TY, Stasyk OG, et al. Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*[J]. *Cell Biology International*, 2003, 27: 947-952.
- [43] Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, et al. Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes[J]. *BBA-Molecular Cell Research*, 2006, 1763(12): 1767-1775.
- [44] Chang T, Schroder LA, Thomson JM, et al. PpATG9 encodes a novel membrane protein that traffics to vacuolar membranes, which sequester peroxisomes during pexophagy in *Pichia pastoris*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(10): 4941-4953.
- [45] Wang L, Seeley ES, Wickner W, et al. Vacuole fusion at a ring of vertex docking sites leaves membrane fragments within the organelle[J]. *Cell*, 2002, 108(3): 357-369.
- [46] Ano Y, Hattori T, Oku M, et al. A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(2): 446-457.
- [47] Murray WD, Duff SJB, Beveridge TJ. Catabolite inactivation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(8): 2378-2383.
- [48] Zhang P, Zhang WW, Zhou XS, et al. Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(18): 6108-6118.
- [49] Stasyk OG, Van Zutphen T, Kang HA, et al. The role of *Hansenula polymorpha* MIG1 homologues in catabolite repression and pexophagy[J]. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(7): 1103-1113.
- [50] Kirchberger J, Bär J, Schellenberger W, et al. 6-phosphofructokinase from *Pichia pastoris*: purification, kinetic and molecular characterization of the enzyme[J]. *Yeast*, 2002, 19(11): 933-947.
- [51] Benjamin S, Radermacher M, Kirchberger J, et al. 3D structure of phosphofructokinase from *Pichia pastoris*: Localization of the novel  $\gamma$ -subunits[J]. *Journal of Structural Biology*, 2009, 168(2): 345-351.
- [52] Polupanov AS, Nazarko VY, Sibirny AA. Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44 (11): 1906-1918.
- [53] Zhang JG, Wang XD, Zhang JN, et al. Oxygen vectors used for S-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitol as supplemental carbon source[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(4): 335-340.
- [54] Zhang JG, Wang XD, Su EZ, et al. A new fermentation strategy for S-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 41(1): 74-78.
- [55] Zhang JG, Wang XD, Zheng Y, et al. Enhancing yield of S-adenosylmethionine in *Pichia pastoris* by controlling  $\text{NH}_4^+$  concentration[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2008, 31(2): 63-67.
- [56] Zhang JG, Wang XD, Mao XZ, et al. High-level production of bovine enterokinase light chain using fed-batches by recombinant *Pichia pastoris*[J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2009, 23(2): 219-224.