

## 特约综述



我们实验室主要利用酵母和哺乳动物细胞研究自吞噬在细胞及分子水平上的调控机制, 主要关注细胞代谢同自吞噬的相互作用, 自噬过程晚期阶段的调控机制, 以及自吞噬在细胞器生成过程中的作用。

<http://life.tsinghua.edu.cn/faculty/faculty/336.html>

## 自噬过程的晚期阶段

杜万清 俞立\*

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

**摘要** 自噬是高度保守的细胞内降解途径。在此过程中, 部分细胞质和细胞器被双层膜的囊泡包裹形成自噬体, 随后与溶酶体融合并降解被吞噬的物质。降解产物被释放到细胞质中重新用于必需的物质和能量合成。本文主要关注自噬的晚期阶段, 即从自噬体合成结束到溶酶体再生过程。通过对这一过程相关基因及蛋白产物的研究, 初步揭示了此过程的分子机制。

**关键词** 自噬; 晚期阶段; 融合

自噬(autophagy)是细胞内一种溶酶体依赖性的降解途径<sup>[1]</sup>。在真核细胞中, 自吞噬通常被划分为三类: 巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)<sup>[2,3]</sup>。在本文中所涉及到的自噬是巨自噬, 在之后的叙述中将其统称为自噬。自噬是进化上非常保守的细胞内降解过程, 主要用于细胞内物质的更新以及促进细胞在营养缺陷下的存活。同时, 它也在免疫防御、细胞程序化死亡、肿瘤抑制等方面发挥了重要作用<sup>[4~6]</sup>。在过去的十年中, 自噬相关基因及其产物的发现促进了对这一过程的理解, 为进一步描述自噬的分子机制及功能奠定了基础。

自噬的机制是一个有趣的细胞生物学问题。在真核细胞中, 自噬通常发生于较低的水平, 但在饥饿等条件下自噬作用显著增强。如图1所示, 首先双层膜片非选择性地沿部分细胞质延伸并形成一个封闭的囊泡——自噬体(autophagosome)<sup>[7]</sup>。随后, 自噬体与溶酶体(在酵母细胞中为酸性囊泡)融合形成自噬溶酶体。细胞质在溶酶体内部酸性水解酶的作用下发生降解, 降解形成的氨基酸及脂类等产物被重新

释放到细胞质中供给所需的物质和能量的合成<sup>[8]</sup>。通过对酵母基因的研究发现, 主要有约30种自噬相关基因参与了此过程, 它们分别在自噬过程的不同阶段起作用。目前的研究主要集中于自噬诱导及自噬体形成的分子机制。这个过程受一套自噬基因控制, 其相关基因产物构成了自噬体合成的核心机器, 主要为: Atg1 激酶复合物(Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31)、PI(3)K 复合物(Vps34、Vps15、Atg6、Atg14、Atg2、Atg9 和 Atg18)以及两个泛素类蛋白系统(Atg8、Atg12、Atg7、Atg10、Atg5、Atg16、Atg3 和 Atg4)<sup>[9]</sup>。到目前为止, 大量的研究较好地阐释了这一过程。

然而相对于早期阶段, 对自噬晚期过程的理解知之甚少。本篇综述主要关注自噬的晚期阶段, 并初步揭示其分子机制。在这里, 我们将这一过程主要分为四个部分: 1)自噬体的成熟; 2)自噬体与溶酶体/液泡的融合; 3)物质的降解过程; 4)降解产物的释放

\* 通讯作者。Tel: 010-62792880, E-mail: liyulab@mail.tsinghua.edu.cn

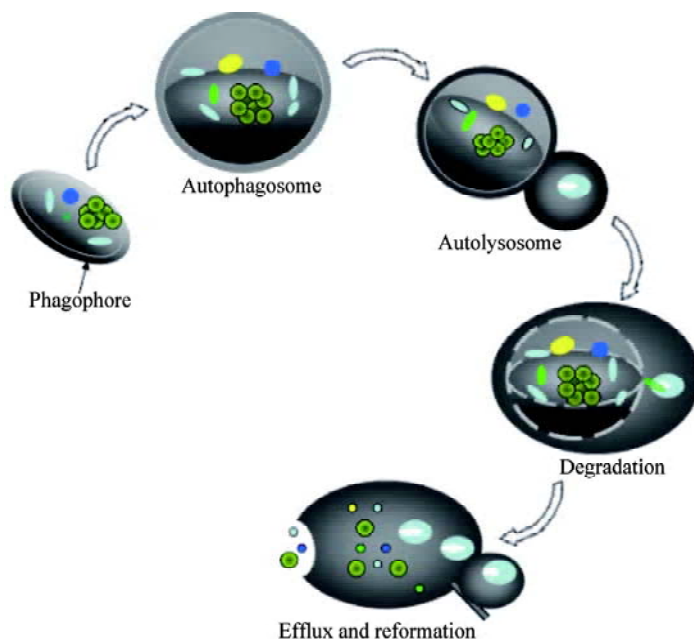


图1 自噬的细胞生物学过程

Fig.1 The process of autophagy

以及溶酶体的再生。

## 1 自噬体的成熟

如上所述, 自噬体的合成需要多种Atg蛋白的参与, 一旦自噬体合成完毕, 大部分 Atg 蛋白在与溶酶体/液泡融合前即从自噬体膜泡上脱落, 但位于内层膜上的 LC3(在哺乳动物细胞中 Atg8 的同源物)仍滞留在膜上。LC3 在自噬过程中负责自噬体膜的延伸。Atg8 在自噬体内外膜上均有一定分布, 但在自噬体形成后外层膜上 Atg8 即被 Atg4 蛋白酶切除。研究表明, 在自噬体合成前位于外膜上的这些 Atg 蛋白可能还存在额外的作用。Yang 等<sup>[10]</sup>的研究发现, Atg12-Atg5-Atg16 复合物在融合前附着在自噬体外侧细胞膜上可能起到衣被作用, 阻止了自噬体合成前与溶酶体/液泡的融合。同样, 位于自噬体外侧膜上的 Atg8-PE 可能也发挥了相同的作用。由于这些 Atg 蛋白的衣被作用, 它们在融合前从自噬体膜上撤回是非常必要的。然而到目前为止, 这些 Atg 蛋白撤回的机制还不清楚。细胞可能存在一些因素, 它们能监测自噬体双层膜泡的完成从而启动自噬合成机器从膜上撤离。近期在酵母中的研究发现, Atg1 在囊泡合成的后期也起了重要作用, 它能启动 Atg9 和 Atg11 从 PAS(phagophore assembly site, PAS)处撤离<sup>[11]</sup>。这暗示 Atg1 的激酶活性可能在 PAS 的解聚以及 Atg

蛋白的撤回中发挥了重要作用。

在哺乳动物细胞中, 自噬体与溶酶体的融合是一个复杂的过程。在融合之前, 自噬体还需与早期/晚期的内吞体融合从而成为成熟的自噬体。这一过程使自噬体能够获得同溶酶体融合所需要的分子。Nara 等<sup>[12]</sup>研究发现, 内吞体运输调控因子(SKD1 ATPase)突变体的过量表达抑制了内吞体向自噬体的转运, 从而抑制了自噬体同溶酶体间的融合。

## 2 自噬体与溶酶体/液泡的融合

在形成封闭的双层膜泡后, 自噬体即被运送至液泡/溶酶体处参与后期的融合过程。自噬体与溶酶体/液泡的融合可分为三个过程: 1)细胞器靠近; 2)细胞器之间锚定; 3)融合。上述每个过程都有不同的物质参与, 共同作用促使了融合过程。酵母的分子遗传学研究表明, 促使同型液泡融合的机器也参与了自噬体与液泡的融合<sup>[13]</sup>。这些机器主要包括: SNARE 蛋白 Vam3、Vam7、Vti1 和 Ykt6; NSF、SNAP、Sec17、Sec18 和 Sec19; Rab 蛋白 Ypt7; class C Vps/HOPS 复合物; Ccz1 和 Mon1<sup>[14,15]</sup>。

### 2.1 细胞器的靠近与锚定

细胞器靠近与锚定是融合的先决条件, 它需要 HOPS 复合物和 Rab 蛋白等因素的参与。HOPS 复合物非常保守, 能与细胞器膜上的 t-SNARE Vam3 和

Rab GTPase Ypt7 相互作用<sup>[16]</sup>。由于 SNARE 复合物相对较小, HOPS 复合物结构的微小变化就会拉动其移动较大的距离, 从而可能促进两个细胞器相互靠近。近期研究显示, HOPS 复合物也能与 SNARE 和 Rab 共同作用促进囊泡的融合<sup>[17]</sup>。因此, HOPS 复合物可能具有广泛的生物学功能, 在自噬过程中其精确作用还需进一步证实。

Rab 蛋白为小的 GTP 结合蛋白, 在推动囊泡运至靶位点与锚定上发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。近期的实验显示, Rab7 GTPase 被运送到自噬体膜对于融合是必需的<sup>[19]</sup>。Liang 等<sup>[20]</sup>证实 UVRAG 能够与 class C-Vps 复合物结合并活化 Rab7 GTPase, 从而参与自噬体的成熟过程。Rab 蛋白通过与脂分子尾部作用锚定于膜泡表面, 活化的 Rab 蛋白负责将囊泡准确运送至靶位点。然而, Rab 蛋白参与的自噬体转运与锚定还需要其他效应物的存在<sup>[21]</sup>。HOPS 复合物作为 Rab 蛋白的一个效应物, 调节 Rab 蛋白的定向移动<sup>[22]</sup>。在哺乳细胞中, hVps39 也是 Rab 蛋白的一个效应物, 它调节 Rab7 到早期的内体膜定位。Novick 等<sup>[23]</sup>研究发现, Rab 蛋白效应物并不是随机地分散在细胞器膜上, 而是聚集在特定区域。在融合过程中, Rab 蛋白效应物和 SNARE 以及 Rab 蛋白相互作用, 这暗示 Rab 蛋白可能通过对 SNARE 复合物的调控从而参与细胞器的移动与锚定<sup>[24]</sup>。

此外在哺乳细胞中, 微管骨架蛋白也参与了自噬体与溶酶体的融合。研究表明, 采用长春碱等药物处理后, 微管聚合受到抑制同时阻断了自噬体的成熟; 而紫杉酚等药物处理不仅提高了微管的稳定性也促进了自噬体与溶酶体的融合<sup>[25]</sup>。然而, 在自噬过程中微管如何发挥作用还不清楚。Jahreiss 等<sup>[26]</sup>的研究显示溶酶体聚集在微管组织中心附近, 随后自噬体也沿着微管被运送至靠近的溶酶体部位。Yoshimori 等<sup>[27]</sup>和 Kouno 等<sup>[28]</sup>也发现, 部分 GFP-LC3 能与微管动力蛋白相互作用, 而用抗 LC3 的抗体处理可抑制自噬体沿着微管的移动。这表明, 自噬体与微管的相互作用可能促进拉近与溶酶体的距离从而增大融合几率。

## 2.2 融合

对于保证自噬的正常降解功能, 细胞器的融合是一个重要的阶段。融合的完成可能需要多种物质的参与, 包括 SNARE 复合物、Mon1-Ccz1 复合物、ESCRT 蛋白、UVRAG-Beclin 复合物以及 Lamp2 等。

在酵母中, SNARE 复合物不仅参与了同型液泡

之间的融合, 同样在自噬体与液泡的融合中也发挥了重要作用<sup>[29,30]</sup>。SNARE 复合物为大的跨膜蛋白家族, 在酵母和哺乳细胞中含有 60 多个成员。虽然这些成员之间在结构和分子大小上有很大区别, 但是所有的 SNARE 在细胞质部分均含有共同的成分——SNARE motif。这些成员之间能形成包含 60~70 个氨基酸残基的四螺旋桨结构。四螺旋桨的中心是由一个精氨酸残基(R)和三个谷氨酸残基(Q)构成的离子层, 其中每个残基来源于不同的 SNARE 蛋白。这四个 SNARE 构成聚合物, 被称为 trans-SNARE 复合物。因此, 根据不同的结构划分, SNARE 蛋白可分为 R-SNARE 和 Q-SNARE<sup>[31]</sup>。在融合期间, 位于囊泡反面膜上的 SNARE 蛋白聚合成 trans-SNARE 复合物。根据经典的拉链假说, 该复合物的聚合开始于 SNARE motif 的 N 端, 然后朝着 C 端不断延伸。此复合物在不同囊泡的脂层之间搭桥, 不仅拉近了两个囊泡的距离, 同时促进了融合孔的形成, 从而进一步启动融合反应<sup>[32]</sup>。体外研究表明, SNARE 复合物能促进脂质体的融合<sup>[33]</sup>。近期 siRNA 敲除实验也表明, SNARE 蛋白可能通过保守的卷曲螺旋结构域在两个细胞器间建立连接进一步调节自噬体与液泡的融合<sup>[33]</sup>。而在哺乳细胞中, SNARE 也能促进自噬体和溶酶体融合。Atlashkin 等<sup>[34]</sup>研究发现, 在 SNARE 蛋白 Vti1b 敲除的鼠细胞中自噬体大量积累。SNARE 复合物在融合中的作用已被广泛研究, 但如何被运输至自噬体上行使功能还不清楚。近期 SNARE 研究模型显示, 至少一种 SNARE 分子存在于成熟的自噬体膜上<sup>[35]</sup>。同时, 经典的形态学研究表明, 自噬体在与溶酶体融合前首先与早期/晚期内吞体囊泡融合<sup>[36]</sup>。这暗示 SNARE 复合物可能通过内吞体囊泡被运输到自噬体。

Mon1-Ccz1 复合物为膜结合蛋白, 它的定位需要 HOPS 复合物的 class C 亚基的参与。在自噬体与溶酶体/液泡的融合中, Mon1-Ccz1 复合物也非常重要。Wang 等<sup>[37]</sup>研究发现, Mon1-Ccz1 复合物能通过 Ypt7 调节 SNARE 复合物的形成, 并进一步调节融合过程。Wang 等<sup>[38]</sup>也发现此复合物的缺失会影响与液泡的融合。

许多内吞体运输复合物(ESCRT)在自噬体的成熟中也发挥了重要作用。Rusten 等<sup>[39]</sup>发现, ESCRT 复合物 vps28、vps25、vps32 或者 vps4 成分缺失导致自噬体在细胞内的大量积累而不与溶酶体融合。Lee 等<sup>[40]</sup>研究发现通过 mSnf7-2 siRNA 敲除老鼠大脑神经细胞的 ESCRT-III 亚基, 在营养限制的情况下自

噬效率显著降低。同时,共聚焦显微镜观测结果显示自噬体在细胞内大量积累,仅有少量的自噬体与溶酶体融合。这表明ESCRT复合物对于自噬体的成熟是必需的。然而,在酵母细胞中此复合物的缺失并没有影响到自噬过程<sup>[41,42]</sup>。因此,ESCRT复合物的作用还需进一步确定。

ATPase是一个大的蛋白质家族,它能与许多蛋白质相互作用促进细胞内膜的融合<sup>[43]</sup>。NSF是一个AAA ATPase,与SNARE复合物结合并通过水解ATP释放的能量促进SNARE循环利用。Ishihara等<sup>[44]</sup>发现在Sec18(NSF的同源物)突变的酵母中,自噬体能够形成但不能与液泡融合。此外,NSF活性减弱同样会导致融合速度降低。Csc1是另外的ATPase成员,它通过控制ESCRT复合物的聚合也参与了自噬体的成熟<sup>[45]</sup>。

在哺乳细胞中,UVRAG-Beclin1复合物也被认为参与了后期的融合过程。Liang等<sup>[20]</sup>研究发现,UVRAG的过量表达促进了自噬体与溶酶体的融合。因此在自噬过程中,UVRAG-Beclin1复合物有更为广泛的功能。

此外,溶酶体膜蛋白Lamp2在自噬体的成熟过程中也发挥了重要作用<sup>[46]</sup>。Saftig等<sup>[47]</sup>研究发现在Lamp2敲除的鼠细胞中,溶酶体并没有聚集在特定的区域而是弥散性地散落在细胞质中。因此,自噬体不能与溶酶体融合而在细胞质中大量积累。

### 3 溶酶体内物质的降解

自噬体外层膜与溶酶体膜/液泡膜融合,自噬体内层膜连同被降解物质一起进入溶酶体/液泡内部。在自噬过程中,物质的降解主要分为两个步骤:1)自噬体内层膜断裂,释放被包裹的物质;2)物质在溶酶体/液泡内部酸性水解酶的作用下发生降解。自噬体膜的断裂是降解的第一步,自噬体膜成分主要由大量的脂质和少量蛋白组成。在酵母中,自噬小体膜的断裂依赖液泡的酸化作用和Pep4/Prb1<sup>[13]</sup>。在液泡或溶酶体内部,几乎所有的酶均为酸性水解酶。因而,酸性的内环境对于维持稳定的酶活性及水解能力是必需的。Pep4/Prb1是液泡内的一种水解酶,参与了液泡内部许多酶原的活化从而促进了膜的断裂<sup>[10]</sup>。此外,Atg15/Cvt17在自噬小体膜的断裂中发挥了重要作用<sup>[48]</sup>。Atg15的氨基酸序列与脂肪酶家族具有较高的同源性,是液泡内部唯一被公认的脂肪酶。它在合成后通过多泡体途径运输进入液泡,直接参与

了自噬小体膜的断裂。上述这些膜断裂因子已经广泛被研究,它们的缺失引起自噬降解功能的缺陷<sup>[49]</sup>。这表明,膜断裂因子对于释放内容物促进物质的降解是必需的。

在酵母中,内容物的降解需要液泡内部的一些酸性水解酶。然而,一些参与物质降解的酶蛋白在早期通常以酶原形式存在,不具有降解功能。因此,物质的完全降解需要预先对一些酶原进行活化,这依赖于内部的Pep4/Prb1蛋白。活化后的酶蛋白直接促进内部物质的降解。

然而,在哺乳细胞中自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体(autolysosome)。自噬溶酶体内物质的降解直接依赖于溶酶体的酸性水解酶,这类似于酵母液泡内物质的降解过程。

### 4 降解产物的释放以及溶酶体的再生

自噬的目的是在营养缺失时降解细胞质中物质促进循环利用,从而抵御不利环境的影响。一旦细胞质中的生物大分子在溶酶体内部被降解,降解产物将会被运回到细胞质中供给必要的生命活动。然而,对这一过程的报道并不多见。研究表明,Atg22位于液泡/溶酶体膜上,在调节自噬产生的氨基酸输出中起了重要的作用<sup>[50]</sup>。除此之外,Avt3和Avt4是酵母细胞中通透酶家族成员,它们能与Atg22共同作用促进物质的输出<sup>[51]</sup>。在哺乳细胞中,Atg22的类似物还没有发现;Avt3和Avt4的哺乳细胞类似物已被识别,分别为SLC36A1/LYAAT-1和SLC36A4/LYAAT-2<sup>[52]</sup>。由此,上述三种因子促进了氨基酸从溶酶体中输出。但是,其他生物大分子如何输出细胞仍然需要进一步研究,比如一些糖类和脂类等<sup>[16]</sup>。

细胞中溶酶体的一定数量对于维持稳定的消化功能是非常必要的。然而,自噬体与溶酶体/液泡的融合会导致溶酶体/液泡数量的损失。为了维持溶酶体的数量,细胞可能通过两种途径共同完成。一种是,细胞不断地合成溶酶体的组分,并组装成功能性的溶酶体从而供给细胞的需求。其次,一些研究者发现,细胞内存在着一种再生机制,它允许溶酶体从融合细胞器中再生出来并促进循环利用。但是,这个过程需要内容物的凝集以及溶酶体膜从融合细胞器中撤回。胞外实验显示,溶酶体成分在ATPase和Ca<sup>2+</sup>作用下凝聚并进一步从融合细胞器再生出来<sup>[13]</sup>。然而在活细胞实验中,小的囊泡管状结构被观察到以出芽方式从融合细胞器伸出,这种结构可能与溶酶体

的再生有关<sup>[53]</sup>。Yu等<sup>[54]</sup>最近的研究发现在形成自噬溶酶体的过程中, 多个溶酶体与自吞噬体相融合, 而在完成降解及降解产物外转过程后, 吞噬溶酶体膜上的溶酶体膜成分可以通过形成一个管状结构而回收, 这个管状结构从吞噬溶酶体上向外延伸, 其形成依赖于微管, 管状结构在形成一定长度后会在顶端断裂而形成没有溶酶体基质蛋白的“原溶酶体”。“原溶酶体”又通过逐渐获得溶酶体酶而变成溶酶体, 从而完成溶酶体的再生。“原溶酶体”的发现使得自吞噬发生的整个过程更为完善, 但该过程还在进一步的研究中。

## 5 结论

自噬是依赖于溶酶体的降解过程, 在自噬的晚期阶段, 许多蛋白, 比如 SNARE 复合物、HOPS 复合物及 Rab 蛋白等参与了自噬体同溶酶体的融合过程, 这些因子的共同作用完成了自噬体与溶酶体/液泡的融合、物质的降解、降解产物的输出及溶酶体的重建。目前, 自噬晚期阶段的研究还处于起步阶段, 进一步增进对自噬晚期阶段的研究将会大大增强我们对自噬过程的理解。

## 参考文献(References)

- Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* 2008; 15(3): 344-57.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 1): 7-18.
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 2006; 73: 205-35.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4): 463-77.
- Münz C. Autophagy and antigen presentation. *Cell Micro* 2006; 8(6): 891-8.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306(5698): 990-5.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9(10): 1102-9.
- Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 2007; 6(4): 352-61.
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009; 34(3): 259-69.
- Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(12): 1421-34.
- Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2008; 19(2): 668-81.
- Nara A, Mizushima N, Yamamoto A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct Funct* 2002; 27(1): 29-37.
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Mol Cell Biol* 2007; 8(8): 622-32.
- 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.
- Yang ZF, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335: 1-32.
- Stroupe C, Collins KM, Fratti RA, Wickner W. Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p. *EMBO J* 2006; 25(8): 1579-89.
- Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* 2000; 151(3): 551-62.
- Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2001; 2(5): 1-7.
- Gutierrez MG, Vázquez CL, Munafó DB, Zoppino FCM, Berón W, Rabinovitch M, *et al.* Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell Microbiol* 2005; 7(7): 981-93.
- Liang CY, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li QL, Roberts EA, *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 2008; 10(7): 776-87.
- Ungermann C, Price A, Wickner W. A new role for a SNARE protein as a regulator of the Ypt7/Rab-dependent stage of docking. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(16): 8889-91.
- Price A, Seals D, Wickner W, Ungermann C. The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. *J Cell Biol* 2000; 148(6): 1231-8.
- Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(4): 496-504.
- Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* 2000; 151(3): 551-62.
- Blankson H, Hølen I, Seglen PO. Disruption of the cytokeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp Cell Res* 1995; 218(2): 522-30.
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The Itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 2008; 9(4): 574-87.
- Yoshimori T, Noda T. Toward unraveling membrane biogenesis in mammalian autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(4): 401-7.
- Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I, Ueno T, Kanematsu T, Mori Y, *et al.* Solution structure of microtubule-associated protein

- Light Chain 3 and identification of its functional subdomains. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 24610-7.
- 29 Cai HQ, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 2007; 12(5): 671-82.
  - 30 Ungermann C, Langosch D. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* 2005; 118(17): 3819-28.
  - 31 Yoshizawa AC, Kawashima SC, Okuda S, Fujita M, Itoh M, Moriya Y, *et al.* Extracting sequence motifs and the phylogenetic features of SNARE-dependent membrane traffic. *Traffic* 2006; 7(8): 1104-18.
  - 32 Diao JJ, Su ZL, Ishitsuka YJ, Lu B, Lee KS, Lai Y, *et al.* A single-vesicle content mixing assay for SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Commun* 2010; 1(5): 1-6.
  - 33 Jahn R, Scheller RH. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(9): 631-43.
  - 34 Atlashkin V, Kreykenbohm V, Eskelinen EL, Wenzel D, Fayyazi A, Fischer von Mollard G. Deletion of the SNARE *vtilb* in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin8. *Mol Cell Biol* 2003; 23(15): 5198-207.
  - 35 Sudhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009; 323(5913): 474-7.
  - 36 Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 2009; 16(1): 70-8.
  - 37 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.
  - 38 Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 2003; 9(3-4): 65-76.
  - 39 Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, *et al.* ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* 2007; 17(20): 1817-25.
  - 40 Lee J, Beigneux A, Ahmad S, Young S, Gao F. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 2007; 17(18): 1561-7.
  - 41 Epple UD, Eskelinen EL, Thumm M. Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*: Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *J Biol Chem* 2003; 278(10): 7810-21.
  - 42 Reggiori F, Wang CW, Nair U, Shintani T, Abeliovich H, Klionsky DJ. Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2004; 15(5): 2189-204.
  - 43 White SR, Lauring B. AAA+ ATPase: Achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* 2007; 8(12): 1657-67.
  - 44 Ishihara N, Hamasaki M, Yokota S, Suzuki K, Kamada Y, Kihara A, *et al.* Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE vacuolar fusion. *Mol Bio Cell* 2001; 12(11): 3690-702.
  - 45 Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LMW, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, *et al.* ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* 2007; 17(20): 1817-25.
  - 46 Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, *et al.* Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 2000; 406(6798): 902-6.
  - 47 Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 2008; 4(4): 510-2.
  - 48 Nakamura N, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y. Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 1997; 121(2): 338-44.
  - 49 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.
  - 50 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.
  - 51 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.
  - 52 Sagne C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, Mestikawy SE, *et al.* Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(13): 7206-11.
  - 53 Bright NA, Gratian MJ, Luzio JP. Endocytic delivery to lysosome mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* 2005; 15(4): 360-5.
  - 54 Yu L, McPhee CK, Zheng LX, Mardones GA, Rong YG, Peng JY, *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 2010; 465(7272): 942-7.

## The Late Stages of Autophagy

Wan-Qing Du, Li Yu\*

(School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract** Autophagy is highly conserved degradation process in which portions of cytosol and organelles are sequestered into a double-membrane vesicle, an autophagosome, and delivered into a degradative organelle, the vacuole/lysosome, for breakdown and eventual recycling of the resulting macromolecules. In this review, we discussed the late stages of autophagy, such as fusion of autophagosome with lysosome/vacuole, degradation of autophagosome and reformation of lysosome from hybrids. Identification of many autophagy-related genes reveals the machinery of the late stages of autophagy. Here, we summarize current information about the molecular mechanism of this process initially.

**Key words** autophagy; late stages of autophagy; fusion

---

\*Corresponding author. Tel: 86-10-62792880, E-mail: liyulab@tsinghua.edu.cn