



路群博士, 云南大学生命科学学院研究员, 现担任中国细胞生物学学会细胞器生物学分会委员。实验室主要研究方向: 天然免疫炎症发生和调控、病毒感染与宿主互作。主要利用小鼠和哺乳动物细胞模型, 探究自噬和相关自噬蛋白: (1) 在巨噬细胞炎症发生中的作用及对肠道组织免疫稳态的调控; (2) 在肠道诺如病毒感染中的作用及病毒蛋白与宿主细胞的互作关系。以(共同)通讯或一作身份在 *Autophagy*、*Cell Host & Microbe*、*Developmental Cell* 等刊物上发表相关论文。
<http://www.ynusky.ynu.edu.cn/info/1009/1534.htm>

自噬小体的生物发生和成熟

武春艳¹ 杨意¹ 杨霞¹ 刘洪源¹ 庞永豪¹ 田锐利¹ 路群^{1,2*}

(¹云南大学生命科学学院, 生命科学研究中心, 昆明 650500;

²云南省细胞代谢与疾病重点实验室, 云南大学, 昆明 650500)

摘要 细胞自噬是真核生物中一种高度保守的由溶酶体介导的降解过程。自噬小体是在自噬过程中形成的双膜囊泡, 用于包裹自噬底物并将其运输到溶酶体进行后续降解, 以维持细胞的存活、生长和稳态。自噬是一种维持细胞稳态的重要机制, 参与机体生命过程的多个方面, 自噬异常与多种人类疾病的发生发展密切相关。因此, 对自噬小体生物发生和成熟的机制探究具有重要的意义。该文总结了多细胞真核生物中自噬小体的形成过程, 并阐述了自噬小体生物发生和成熟的调控机制, 为自噬相关的研究提供参考。

关键词 自噬; 自噬小体; 自噬小体的生物发生; 自噬小体的成熟

Autophagosome Biogenesis and Maturation

WU Chunyan¹, YANG Yi¹, YANG Xia¹, LIU Hongyuan¹, PANG Yonghao¹, TIAN Ruili¹, LU Qun^{1,2*}

(¹Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China;

²Yunnan Key Laboratory of Cell Metabolism and Diseases, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract Autophagy is an evolutionarily conserved lysosome-mediated degradation process in the cell. Autophagosomes are double-membrane vesicles formed during autophagy to engulf a wide range of cytosolic contents and transport them to lysosomes for subsequent degradation, which therefore have essential roles in survival, development, and homeostasis of the cell. Autophagy plays important roles in the physiological process of different organisms and its disruption has been associated with the pathogenesis of various human diseases. Thus, the exploration to the mechanism of autophagosome biogenesis and maturation has a great significance. Here, this ar-

收稿日期: 2023-12-10

接受日期: 2024-01-05

国家自然科学基金(批准号: 32070745)和云南省基础研究计划(批准号: 202101AV070011、202301BF070001-014)资助的课题

*通信作者。Tel: 0871-65931221, E-mail: qunlu@ynu.edu.cn

Received: December 10, 2023

Accepted: January 5, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070745) and the Yunnan Fundamental Research Project (Grant No.202101AV070011, 202301BF070001-014)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65931221, E-mail: qunlu@ynu.edu.cn

ticle summarizes the autophagosome formation process and the molecular mechanisms underlying autophagosome maturation in multicellular eukaryotes to provide insights into the studies related to autophagy.

Keywords autophagy; autophagosomes; autophagosome biogenesis; autophagosome maturation

细胞自噬 (autophagy, 本文中主要指巨自噬 macroautophagy) 是一种由溶酶体介导的细胞成分降解和循环利用的基本过程。自噬在进化中高度保守, 广泛存在于酵母、线虫、果蝇和哺乳动物中。在正常的生理条件下, 自噬以基础水平清除错误折叠蛋白或受损的细胞器来维持细胞自身的稳态平衡。在营养缺乏、能量缺失、病原体入侵等各种胁迫环境中, 自噬活性显著增强, 降解胞内物质产生氨基酸、单糖等小分子为细胞提供营养或者清除入侵的病原体, 帮助细胞和机体应对胁迫环境。因此, 自噬在真核生物中的一个核心功能是清除细胞内部不需要的和潜在的有害的细胞成分, 以维持细胞的稳态。自噬功能异常已经被研究证实与多种人类疾病, 包括癌症、神经退行性疾病、自身免疫疾病、病原体感染等^[1]相关, 说明了自噬在生理和病理上的重要性。

自噬最早是在 20 世纪 50 到 60 年代通过电镜对小鼠和大鼠细胞的形态观察时被发现。因为对其生理功能不甚了解也没有找到合适的研究体系, 对自噬分子机制的研究几乎处于停滞状态。直到 20 世纪 90 年代, 大隅良典 (Yoshimori OHSUMI) 教授实验室^[2]利用酵母建立了研究细胞自噬的遗传学模型, 鉴定并获得了参与自噬过程的关键基因, 后来统一将其命名为 ATG (autophagy-related genes)。随后, 科学家们在其他生物体如拟南芥、果蝇、小鼠和人中发现了 ATG 同源物, 并以线虫为遗传模型发现了在多细胞真核生物中保守的新的自噬基因 [以 EPG (ectopic PGL granules) 命名]^[3], 加深了对自噬过程的认识 (表 1)。进一步发现自噬是有选择性的, 自噬受体可以特异性识别并结合不同的自噬底物进行降解, 即选择性自噬 (selective autophagy)。根据降解底物类

表1 真核模式生物核心自噬基因及其同源物
Table 1 Essential autophagy genes and their homologies in eukaryotic model organisms

核心复合体 Core complex	酵母 Yeast	线虫 <i>C. elegans</i>	果蝇 Fruit fly	哺乳动物 Mammal	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>
Atg1/ULK complex	<i>Atg1</i>	<i>unc-51</i>	<i>Atg1</i>	<i>Ulk1/Ulk2</i>	<i>ATG1</i>
	<i>Atg13</i>	<i>epg-1</i>	<i>Atg13</i>	<i>Atg13</i>	<i>ATG13</i>
	<i>Atg17</i>		<i>Atg17</i>	<i>Fip200</i>	
PI3K complex I	<i>Vps34</i>	<i>vps-34</i>	<i>Pi3K59F</i>	<i>Pik3c3</i>	<i>VPS34</i>
	<i>Vps15</i>	<i>vps-15</i>	<i>Vps15</i>	<i>Pik3r4</i>	<i>VPS15</i>
	<i>Vps30/Atg6</i>	<i>atg-6</i>	<i>Atg6</i>	<i>Beclin1</i>	<i>ATG6</i>
	<i>Atg14</i>	<i>epg-8</i>	<i>Atg14</i>	<i>Atg14l</i>	
Atg8 conjugation complex	<i>Atg4</i>	<i>atg-4.1/4.2</i>	<i>Atg4a/b</i>	<i>Atg4a/b/c/d</i>	<i>ATG4a/b</i>
	<i>Atg8</i>	<i>lgg-1/2</i>	<i>Atg8a</i>	<i>LC3a/b/c</i>	<i>ATG8a/b/d/g/h/f</i>
	<i>Atg7</i>	<i>atg-7</i>	<i>Atg7</i>	<i>Atg7</i>	<i>APG7</i>
	<i>Atg3</i>	<i>atg-3</i>	<i>Atg3</i>	<i>Atg3</i>	<i>ATG3</i>
Atg12 conjugation complex	<i>Atg12</i>	<i>lgg-3</i>	<i>Atg12</i>	<i>Atg12</i>	<i>ATG12a/b</i>
	<i>Atg5</i>	<i>atg-5</i>	<i>Atg5</i>	<i>Atg5</i>	<i>APG5</i>
	<i>Atg16</i>	<i>atg-16.1/16.2</i>	<i>Atg16</i>	<i>Atg16l1/2</i>	
	<i>Atg7</i>	<i>atg-7</i>	<i>Atg7</i>	<i>Atg7</i>	<i>APG7</i>
	<i>Atg10</i>	<i>atg-10</i>	<i>Atg10</i>	<i>Atg10</i>	<i>ATG10</i>
Atg9 vesicle	<i>Atg9</i>	<i>atg-9</i>	<i>Atg9</i>	<i>Atg9a</i>	<i>APG9</i>
Atg2-Atg18 complex	<i>Atg2</i>	<i>atg-2</i>	<i>Atg2</i>	<i>Atg2</i>	<i>ATG2</i>
	<i>Atg18</i>	<i>epg-6/atg-18</i>	<i>Atg18a/b</i>	<i>Wipi1/2/3/4</i>	<i>ATG18a/b</i>
		<i>epg-3</i>		<i>Vmp1</i>	
		<i>epg-4</i>		<i>Ei24</i>	
		<i>epg-5</i>	<i>Epg5</i>	<i>Epg5</i>	

Wipi3/4 also known as Wdr45b/Wdr45.

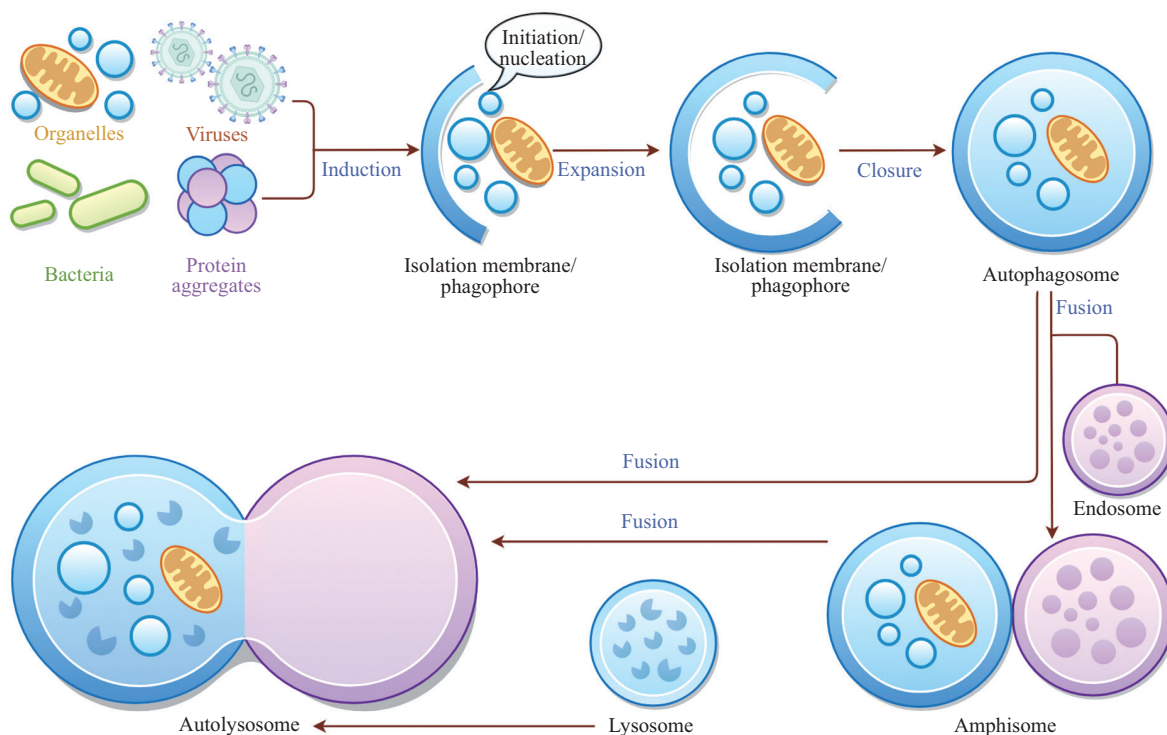


图1 多细胞真核生物细胞自噬的过程(本图由Figdraw绘制)

Fig.1 Overview of the autophagy pathway in multicellular eukaryotes (by Figdraw)

型的不同,选择性自噬又可以分为蛋白聚集体自噬(aggrephagy)、线粒体自噬(mitophagy)、核糖体自噬(ribophagy)、内质网自噬(ERphagy)、过氧化物酶体自噬(pexophagy)、脂质自噬(lipophagy)和异源自噬(xenophagy,被清除的底物为入侵细胞的病原体)等^[1]。

多细胞生物中自噬过程起始于片状隔离膜(isolation membrane, 也称作自噬小体前体或自噬泡 phagophore)的出现。这种结构进一步延伸弯曲,包裹隔离一部分细胞质中的成分,包括受损的细胞器、感染细胞的病原体和蛋白聚集体等,并最终闭合形成双膜囊状自噬小体(autophagosome)。在酵母和植物细胞中,自噬小体直接与液泡融合降解被包裹的底物;在高等动物细胞中,自噬小体在与溶酶体融合前需要经历一系列的成熟过程。新产生的自噬小体与内吞体和/或多泡小体(multi-vesicular bodies, MVBs)融合形成偏酸性的自噬中间囊泡(amphisome, 也被称为自噬内吞体),中间囊泡再与溶酶体融合形成具有降解能力的自噬溶酶体(autolysosome)^[4](图1)。综上,自噬小体的形成和成熟是自噬过程中的关键步骤,因此本文主要针对多细胞真核生物中自噬小体的生物发生过程进行总结。

1 自噬的诱导起始

自噬小体的生物发生可以被细胞内外多种信号诱导,包括营养物质的缺乏、应激、异常的蛋白质聚集体和受损的细胞器以及感染微生物等。ULK(unc-51-like kinase, 酵母 Atg1 同源蛋白)复合体是一种自噬起始激酶复合体,由 ATG13、FIP200(focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa)、ATG101 和 ULK1 或 ULK2 组成,它们最早靶向到自噬小体前体/隔离膜形成部位的膜结构。ULK 复合体的磷酸化调控自噬的发生,而上游激酶可以调控 ULK 复合体,例如 TORC1 激酶复合体(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)^[5]的磷酸化。mTORC1 是营养感知的枢纽,并调节细胞的生长和代谢等多种功能。在营养丰富或氨基酸存在的情况下, mTORC1 具有活性,通过磷酸化 ULK1 和 ATG13 的多个残基来抑制自噬的发生^[6-7]。mTORC1 磷酸化 ULK1 导致其催化活性受到抑制,从而抑制自噬过程的启动;并且,依赖于 mTORC1 的 ATG13 的磷酸化也会抑制 ULK1 的活性且阻碍复合体募集到自噬起始位点^[8]。在饥饿或者去除氨基酸或者其他的外界压力刺激下, mTORC1 活性丧失, ULK1 和 ATG13 迅速去磷酸化,

导致ULK1激酶激活并伴随自噬的起始。因此,抑制剂抑制mTORC1的活性是常用的诱导自噬发生的方法之一。另外,生长因子信号转导和能量缺失也可以改变mTOR的活性,从而影响自噬。例如,低ATP水平或AMP:ATP值的增加,导致AMP激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的激活,活化的AMPK通过磷酸化mTORC1中的关键蛋白RAPTOR(regulatory-associated protein of mTOR)使mTORC1失活进而诱导自噬;AMPK还可以直接磷酸化多个ULK1的丝氨酸残基使其激活,在应对低糖诱导的自噬中发挥重要作用^[9-10]。

ULK1作为重要的激酶,现已发现还有多种参与自噬的蛋白,包括ATG9、磷脂酰肌醇3-激酶复合体I(phosphatidylinositol 3-kinase complex I, PI3K-C1)亚基组分、AMBRA1(activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1)、ATG4和包被蛋白复合体II(coat protein complex II, COPII)中的SEC23B等^[11-16]可以作为其底物被磷酸化来驱动自噬小体的生物发生。ATG9是有6个跨膜域的跨膜蛋白,在进化中保守。在酵母中大多数Atg9位于胞质特定区域的一些小囊泡上,这些囊泡是Atg9在胞质中的存储库^[17];在哺乳动物细胞中ATG9还定位在反式高尔基网络(trans-Golgi network, TGN)、内吞体和质膜上^[18-19]。无论在酵母还是哺乳动物细胞中,研究显示ATG9-膜/囊泡可以在自噬小体膜上定位,并在TGN、内吞体和质膜与自噬小体之间转运,为自噬小体双层膜的形成提供起始的膜或蛋白质组分,该过程是膜成核的关键步骤。ULK1可以与蛋白激酶SRC协同作用,使ATG9磷酸化,从而促进ATG9-囊泡易位到自噬起始位点^[13]。哺乳动物的PI3K-C1由VPS34、VPS15、ATG14L、BECN1(Beclin1, 酵母Atg6同源蛋白)和NRBF2(nuclear receptor-binding factor 2, 酵母Atg38同源蛋白)组成,定位在隔离膜/自噬小体前体上,结合膜组分,并将脂分子磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)转化生成磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)^[20]。ULK1能直接磷酸化BECN-1或者ATG14L,导致VPS34活性增强、PI3P产生和自噬起始^[12,14]。AMBRA1作为自噬的正向调节因子,结合BECN-1并介导PI3K-C1黏附到细胞骨架上,ULK1磷酸化AMBRA1导致其与细胞骨架分离,这与PI3K-C1在自噬起始位点的定位有重要关系^[15](ULK1通过对ATG4和SEC23B的磷酸

化促进自噬小体的形成会在后面部分介绍到)。以上这些结果表明,ULK1对自噬的调控发生在不同的阶段,使其对自噬反应的精细调节成为可能。

2 自噬小体膜的成核

自噬被诱导后,细胞质中的多个核心ATG蛋白被募集到自噬小体生物发生的位点,与这里的膜源相互作用,产生自噬小体前体/隔离膜^[21-23],这个过程也被称为膜成核(membrane nucleation)。与酵母中所有的自噬小体起始于液泡附近的单一位点不同的是,多细胞生物中隔离膜可以在内质网的多个位点同时形成。

如前所述,ULK复合体是最早靶向到自噬小体前体形成的膜结构的自噬蛋白。哺乳动物中ULK复合体是组成性结合的,不依赖于PI3P和下游ATG蛋白的招募^[24],但是PI3P可以稳定其膜定位^[25]。起始自噬小体的发生,需要多个ULK复合体的组装,组装后的复合体进而作为其他ATG蛋白的招募平台^[26]。通过FIP200与内质网膜整合蛋白VAP(VAMP associated protein, VAPA/VAPB)的相互作用^[27]和ULK1、ATG13与内质网跨膜蛋白ATL2/3(Atlastin 2, 3)的相互作用^[28],多个ULK复合体在VMP1(vacuole membrane protein 1, 线虫EPG-3同源蛋白)-TMEM41B(transmembrane-protein 41B)复合体和富含磷脂酰肌醇合成酶(phosphatidylinositol synthase, PIS)的内质网膜结构处组装^[29-30]。PIS介导的PI的产生可以募集下游蛋白WIPI2(WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2)^[31],而VMP1-TMEM41B复合体在自噬体生物发生的后期介导隔离膜从内质网上分离以释放自噬小体^[30,32]。也有研究显示,ULK复合体组分可能直接与膜关联,因为在ULK1蛋白中预测到一个与膜脂质结合的结构域^[33];而ATG13中也有一个可能的脂质结合区,通过蛋白N-端的精氨酸/赖氨酸残基与带负电荷的膜磷脂相连^[25]。

ULK复合体与内质网结合形成支架结构后,依赖PI3K-C1募集ATG9囊泡^[31]。前面已经介绍到ATG9通过囊泡运输在不同细胞器间循环,并在自噬诱导下到达自噬小体形成部位,提供膜成核所需要的脂质和蛋白质组分。PI3K-C1靶向自噬小体形成位点对膜成核的过程来说是必需的。为了产生PI3P,PI3K-C1需要直接与膜相互作用并识别底物PI。VPS34、BECN1和ATG14L蛋白上都有脂结合结构

域, 并且 ATG14L 在 PI3K 复合体定位到 ER 上发挥了重要作用^[34-36]。PI3P 生成后, 其效应物 WIPI 蛋白(哺乳动物中有 4 个结合 PI3P 的 WIPI 蛋白, WIPI1~WIPI4, 其中 WIPI4 与 ATG2 的亲合力最强^[37]) 在栓系蛋白 ATG2 的协助下与 PI3P 直接结合并定位到隔离膜上, 并将 PI3P 信号传递给下游的 ATG 蛋白^[38]。随后, ATG16L1 复合体(ATG5-ATG12-ATG16L1)通过 WIPI 结合到隔离膜上^[39], 然后 ATG16L1 复合体与行使类泛素化连接酶 E2 功能的 ATG3 相互作用, 使 ATG8 家族蛋白[如 LC3(microtubule-associated protein light chain 3); GABARAP(GABA receptor-associated protein)]发生脂化, 通过膜脂磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)连接到隔离膜上^[40]。同时, ATG8 家族蛋白将 ATG9 囊泡募集在一起促进它们的融合, 并通过 ATG2-WIPI 复合体连接到特定的内质网区域形成自噬小体前体结构来保证膜脂从内质网到自噬小体的运输, 因其形态与希腊字母 Ω 类似, 也被称为欧米伽小体(omegasome, Ω 小体)^[21]。因此, Ω 小体为 ATG 蛋白的招募、膜结构的扩张以及自噬小体的形成提供了平台。

在膜成核过程中的之前一直未解决的一个关键问题是自噬小体在内质网上形成的信号来自于哪里。最近, 研究者们发现内质网膜外表面的钙瞬变是决定自噬小体在内质网上起始形成的关键信号, 钙瞬变的振幅、频率和持续时间由内质网跨膜蛋白 EI24(线虫 EPG-4 的同源蛋白)控制。内质网上的钙瞬变引起 FIP200 通过相分离形成液体样 FIP200 凝聚体, 进而与内质网蛋白 VAPA/VAPB 和 ATL2/3 结合组装成为自噬小体的形成位点^[41]。

3 自噬小体膜的延伸

泛素样 ATG 蛋白成员在膜的延伸过程发挥重要的作用。泛素样蛋白 ATG12 通过 E1 酶 ATG7 和 E2 酶 ATG10 催化的反应与 ATG5 中的赖氨酸残基形成异肽键连接, 然后与 ATG16L1 相互作用形成 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合体(也被称为 ATG16L1 复合体)^[42-43]。该复合体通过 ATG16L1 与 WIPI2b(WIPI2 异构体)相互作用, 并依赖 PI3K-C1 产生的 PI3P 定位于隔离膜。ATG16L1 复合体的另外一个重要作用是在形成自噬小体时发挥 E3 连接酶活性, 促进 ATG8 家族蛋白的脂质偶联反应。ATG8 家族蛋白是一类独特的泛素样蛋白质, 其 C-端结合的不是蛋白质中的赖氨酸残

基, 而是膜脂 PE 的氨基, 从而锚定在膜上。要完成这个脂质偶联反应, 首先需要泛素特异性加工蛋白酶 ATG4 的剪切, 暴露 ATG8 蛋白 C 端甘氨酸残基, 然后 ATG7、ATG3 和 ATG16L1 复合体分别作为 E1、E2 和 E3 酶, 将 ATG8 蛋白通过 PE 结合在隔离膜上。ATG4 也可以通过其蛋白酶活性将与 PE 结合的 ATG8 蛋白从膜上切割释放出来^[44-45]。

体外研究显示, ATG8 家族蛋白与 PE 在不同的膜上相互作用, 从而将膜连接在一起, 最终促进了膜的延伸^[46-48], 表明它们可能通过介导膜来源的囊泡与隔离膜的连接和融合而参与隔离膜的扩张, 当然这个过程中很可能还需要其他融合因子的参与介导。ATG8 家族蛋白也可以通过将其他蛋白募集到隔离膜上来促进膜的延伸。在自噬小体形成启动后, ULK1 复合体通过其亚基蛋白的 LC3-相互作用结构域(LC3 interacting domain, LIR)与 ATG8 家族蛋白结合, 从而结合到隔离膜上, 这种结合对自噬小体的成熟非常重要^[49-50]。ULK1 复合体还可以磷酸化 ATG4, 抑制其对 ATG8 家族蛋白的去脂化活性, 促进隔离膜的扩张^[11,51]。最近有研究发现, TANK 结合激酶 1(TANK binding kinase 1, TBK1)通过与 ATG8 家族蛋白 LC3C 和 GABARAP-L2 的结合使其磷酸化, 也可以阻止 ATG4 介导的去脂作用, 从而防止 ATG4 过早地将 ATG8 蛋白从自噬膜上切除, 确保自噬小体能够有效地包裹需要被降解的底物^[52]。

脂质来源是自噬小体前体进行膜延伸的一个重要问题。如前所述, ATG9 囊泡携带的来自于 TGN、内吞体和质膜的脂质是自噬小体膜成核过程中关键的膜脂来源。在膜延伸过程中, 根据已有研究显示内质网是自噬小体膜的主要来源。脂质从内质网运输到隔离膜的方式有两种: 一是通过 Ω 小体, 需要内质网和隔离膜的紧密结合作为前提条件; 二是通过来源于内质网-高尔基体中间体(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC)的 COPII 囊泡。自噬诱导信号触发内质网中被称为 Ω 小体的富含 PI3P 的膜结构的形成^[21]。 Ω 小体内部的精细结构是隔离膜相关管状结构(isolation membrane-associated tubular structures, IMATs), 通过这些管状结构连接内质网和隔离膜的开口边缘^[53], 因此推测脂质通过 Ω 小体/IMATs 从内质网转移到隔离膜中。另外, 脂质也可以通过 ATG2-WIPI 复合体从内质网转运到隔离膜上, 其中 WIPI 与隔离膜上的 PI3P 结合而锚定蛋白 ATG2 负责进行脂

转运^[54-55]。正常情况下, COPI(coat protein complex I)和COPII囊泡运输介导内质网-高尔基体之间的转运, 囊泡生成因子SEC12启动COPII囊泡组装后将货物从内质网出口位点(ER exit site, ERES)运送到ERGIC, ERGIC作为货物分选的平台通过COPI囊泡将其运送到高尔基体或运回内质网。饥饿条件下, 自噬蛋白FIP200和SEC12结合蛋白CTAGE5参与ERES的重塑, 导致部分SEC12被重新分配到ERGIC, 启动ERGIC-COPII囊泡的组装和出芽^[56]。ULK1复合体被发现在ERGIC-COPII囊泡组装的位置定位, 而ULK1通过磷酸化COPII囊泡组装蛋白SEC23B使其重定位到ERGIC进而促进自噬的发生^[16]。这些囊泡也可能进一步结合其他自噬小体膜前体如ATG9囊泡, 帮助隔离膜的扩张^[57-58]。ATG9囊泡除了提供膜成核中的膜脂外, 对膜延伸过程中的膜脂来源也有贡献。ATG9囊泡在细胞质内具有高度的流动性, 研究表明哺乳动物细胞的ATG9没有明显地整合入自噬体膜, 而是存在于自噬小体前体附近的囊泡和/或管状结构上, 并短暂地与自噬小体膜相关, 因此推测ATG9通过瞬时结合向自噬小体膜提供关键成分, 如蛋白质和脂质^[18,59]。另外, 有报道显示线粒体^[60]和脂滴^[61-62]也可能为隔离膜的延伸提供了脂质来源, 对这些方面的研究还有待进一步的确定和深入。

4 自噬小体的成熟

多细胞真核生物细胞中, 新生成的自噬小体会与内吞途径中的囊泡包括内吞体或者MVBs甚至溶酶体融合, 形成不具有降解功能的混合的中间囊泡结构, 在这个过程中水解酶不断积累, 其内部环境相对于自噬小体更偏酸性, 这个过程被称为自噬小体的成熟。早期内吞体的功能受损会阻碍自噬小体的成熟, 造成新形成的自噬小体和自噬中间囊泡的累积^[63]。对内吞体膜内陷和腔内囊泡形成所必需的ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)蛋白的活性破坏造成的功能性MVBs形成受损时, 也会使自噬小体的成熟受到抑制^[64-65], 这些都提示了内吞途径中的囊泡在自噬小体成熟或者说自噬中间囊泡形成过程中的重要性。研究发现, 自噬中间囊泡的形成需要RAB蛋白、栓系蛋白和SNARE(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)复合体的协同作用。

参与自噬小体成熟的SNARE复合体有两组:

第一组包括自噬小体膜上定位的STX17(syntaxin 17, Qa SNARE)、SNAP29(synaptosome associated protein 29, Qbc SNARE)和内吞/溶酶体上定位的VAMP8(vesicle associated membrane protein 8, R SNARE); 第二组包括自噬小体膜上定位的YKT6(YKT6 V-SNARE homolog, R SNARE)、SNAP29和内吞/溶酶体上定位的STX7(syntaxin 7, Qa SNARE)。STX17和YKT6在隔离膜中并不存在, 介导STX17和YKT6靶向自噬小体的机制与它们靶向其他膜室的机制不同。STX17的2个跨膜结构域或者YKT6的羧基末端结构域形成独特的发夹结构参与它们招募自噬小体的功能^[66-67]。小GTPase IRGM(immunity related GTPase M)通过与STX17和ATG8家族蛋白的相互作用协助STX17转运到自噬小体上^[68]。SNAP29既不包含跨膜结构域, 也不包含膜锚定脂化位点, 因此它是通过与STX17或STX7相互作用而募集的; 自噬蛋白ATG14与STX17相互作用可以促进STX17-SNAP29亚复合体的组装^[69]。VAMP8通过内吞内化和运输靶向到内吞/溶酶体上, 这个过程受到RAB21及其GEF(guanine nucleotide exchange factor)蛋白MTMR13[也被称为SBF2(SET binding factor 2)]的调控^[70]。

栓系蛋白的主要功能是使促进这两组SNARE复合体的组装和功能的行使, 增强囊泡融合的特异性和高效性。参与自噬小体成熟的栓系蛋白包括HOPS(homotypic fusion and protein sorting)复合体、EPG5(ectopic PGL-granule 5)、PLEKHM1(pleckstrin homology and RUN domain containing M1)和TECPR1(tectonin Beta-propeller repeat containing 1)。HOPS复合体作为RAB7的GEF(催化RAB7-GDP非活性形式向RAB7-GTP活性形式的转化)和SNARE复合体的伴侣蛋白, 一边连接晚期内吞/溶酶体上的RAB7和PI3P, 一边连接自噬小体上的STX17和LC3, 在自噬小体与晚期内吞/溶酶体融合的过程中发挥了重要作用^[71-74]。EPG5是在秀丽线虫的遗传筛选中获得的^[75]一个在自噬小体成熟过程中发挥重要作用的栓系蛋白。作为RAB7的效应因子, EPG5通过与RAB7和VAMP8直接作用连接晚期内吞/溶酶体; 同时, 通过与LC3和STX17-SNAP29亚复合体的互作识别自噬小体, 促使STX17-SNAP29-VAMP8复合体的组装, 进而促进自噬小体与晚期内吞/溶酶体的融合^[76]。在神经细胞中, WDR45/WIPI4和WDR45B/

WIPI3(线虫EPG-6的同源蛋白)协助EPG5在溶酶体的定位^[77]。栓系蛋白PLEKHM1也是RAB7的效应因子,它主要是结合自噬小体上的GABARAP家族蛋白来促进自噬小体的成熟,并且通过募集HOPS复合体来保证融合的特异性和高效性^[78]。栓系蛋白TECPR1通过结合磷脂酰肌醇4-磷酸(phosphatidylinositol 4-phosphate, PI4P)定位在溶酶体上,在自噬小体上选择性地与LC3C和ATG5-ATG12结合,从而促进自噬小体/自噬中间囊泡与溶酶体的融合^[79-80]。

为了保证自噬通量适应细胞的需求,对自噬小体成熟的调控作用就非常重要。转录因子TFEB(transcription factor EB)和TFE3(transcription factor enhancer 3)对参与自噬小体形成和溶酶体生物发生的多个基因的转录调控已经有了比较全面的介绍^[81-82],本文就不再展开。下面着重对膜融合过程中关键蛋白的膜募集的调控进行简单的总结。参与自噬小体和内吞/溶酶体融合的trans-SNARE复合体的蛋白主要包括STX17、SNAP29和VAMP8。STX17的SNARE结构域可以被乙酰化修饰,主要由组蛋白乙酰转移酶CREBBP/CBP(CREB binding protein)和脱乙酰酶HDAC2(histone deacetylase 2)来完成。STX17的去乙酰化可以促进STX17-SNAP29-VAMP8复合体的组装,并促进它与HOPS复合体的结合,从而促进饥饿等应激条件下自噬小体与溶酶体的融合^[83]。SNAP29可以被O-连接 β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(O-linked GlcNAc transferase, OGT)酰基化,这种修饰抑制了包含SNAP29的SNARE复合体的组装;反之,OGT的敲降促进了SNARE复合体的形成并提高了自噬通量^[84]。MTMR13是内吞体蛋白RAB21的GEF,饥饿条件下RAB21被激活后可以促进RAB21依赖的质膜定位的VAMP8转运至晚期核内吞/溶酶体进而促进它们与自噬小体的融合^[70]。

膜脂组分PI3P和PI4P在HOPS复合体募集促进自噬小体成熟过程中有重要的作用。除了PI3K-C1(VPS15-VPS34-BECN1-ATG14复合体)外,自噬过程中还有一个PI3K复合体参与其中,其被称为PI3K复合体II(PI3K complex II, PI3K-C2),由VPS15、VPS34、BECN1和UVRAG(UV radiation resistance-associated gene)组成,主要控制内吞体上PI3P的产生,同时也可以自噬小体/自噬中间囊泡上产生PI3P,协助募集HOPS复合体促进

自噬小体的成熟^[85]。RAB7的效应蛋白Rubicon与BECN1互作,通过拮抗UVRAG的功能负向调节自噬小体的成熟^[85-86];而自噬增强蛋白PACER[也称作RUBCNL(rubicon like autophagy enhancer)]通过SNX17和PI3P靶向到自噬中间囊泡,拮抗Rubicon的功能,募集PI3K-C2,正向调节自噬小体的成熟^[87]。如前所述,RAB蛋白RAB7在自噬中间囊泡形成过程中也具有重要的作用。RAB7的GAP(GTPase-activating protein)蛋白Arms1(也称作TBC1D2A)能够与LC3和PI3P结合靶向到自噬小体,促进RAB7由GTP活性形式向GDP非活性形式的转化,使RAB7从自噬小体上回收至内吞体,进而驱动晚期内吞/溶酶体的成熟,最终促进自噬小体与晚期内吞/溶酶体的融合^[88]。PI4P的分布受到磷脂酰肌醇4-激酶(phosphatidylinositol 4-kinase, PI4K)和PI4P磷酸酶SAC1的调控。GABARAPs可以将PI4KII α 招募到自噬小体中产生PI4P,从而促进自噬小体与溶酶体的融合^[89]。SAC1是膜整合蛋白,通过COPI和COPII囊泡介导的运输在内质网和高尔基体之间循环。内质网定位的跨膜蛋白SUS2[也被称为TMEM39A(transmembrane protein 39A)]可以同时与SAC1和COPII包被蛋白SEC23、SEC24相互作用,促进SAC1向高尔基体的转运;当SUS2缺失时,SAC1被滞留在内质网上造成晚期内吞/溶酶体上PI4P的水平增加,HOPS复合体通过与PI4P的结合被募集,促进自噬小体和溶酶体的融合^[90]。

5 自噬小体的成熟缺陷与疾病

自从自噬蛋白BECN1首次被发现对人类致死性疾病肿瘤的抑制有重要作用^[91]以来,已经有大量的研究证明自噬/自噬小体的生成缺陷与人类多种疾病有关。前面介绍到利用线虫的遗传筛选获得了在多细胞真核生物中保守且在自噬小体的成熟过程中发挥作用的EPG基因,包括Epg5和Wdr45(线虫epg-6在哺乳动物中的同源基因)等,下面就简单汇总它们在相关疾病中的研究进展。

EPG5作为一个栓系蛋白,在自噬小体与晚期内吞/溶酶体融合的过程中发挥重要作用^[76]。利用基因敲除技术构建的Epg5缺陷小鼠,其大脑、脊髓中的神经元和神经胶质细胞中自噬底物和异常的自噬小体结构聚集,小鼠表现出与年龄相关的神经退行性表型,包括大脑皮层第五层的大椎体细胞、海马

颗粒细胞和脊髓前角的运动神经元选择性受损或丢失, 后肢肌肉逐渐萎缩直至瘫痪, 这些都是人类肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的主要特征^[92]。2013年通过人类遗传学研究发现 *EPG5* 基因的隐性突变会造成一种人类多系统紊乱综合征 (Vici syndrome), 大多数患儿表现出大脑胼胝体发育不全的症状^[93], 这在 *Epg5* 敲除小鼠中也得到了验证^[94], 提示我们对 *EPG5* 生理功能的探究在阐明 Vici syndrome 的发病机理中会有重要的作用。随后, *Epg5* 敲除小鼠被发现可以抵抗流感病毒^[95] 和肠道诺如病毒^[96] 的感染, 这主要由于 *Epg5* 的缺失导致肺部或肠道内免疫内环境的失衡, 引起基础性炎症, 进而促进小鼠对病毒感染的抵抗, 表明 *EPG5* 在维持个体组织免疫平衡中的重要作用。最近的一项研究显示, 由于 *EPG5* 的缺失造成自噬过程的阻断, 导致卵泡窦期转录因子 WT1 的降解不足, 破坏卵泡颗粒细胞的分化, 从而引起雌性小鼠的原发性卵巢功能不全 (primary ovarian insufficiency, POI)^[97], 提示人类 POI 可能与 *EPG5* 的功能失调有关。

人类遗传学研究发现 *WDR45/EPG6* 突变会导致大脑认知功能的缺陷, 引发一种被称为 BPAN (β -propeller protein-associated neurodegeneration) 的儿童期静态性脑病伴随成年期神经退行性的疾病^[98], 说明 *WDR45* 通过自噬调控神经稳态。进一步研究发现, 神经细胞中 *WDR45/WDR45B* 的功能是结合 *EPG5*, 协助其内吞体的定位, 从而促进自噬小体的成熟^[77]。在 *WDR45* 神经系统特异性敲除小鼠脑内出现了严重的轴突水肿, 同时也观察到自噬小体在神经元和肿胀的轴突中明显累积。这些小鼠表现出运动协调性降低和认知障碍, 与 BPAN 患者的表型类似^[99-100]。因此, 这些结果对深入理解自噬在维持轴突稳态中的作用和 BPAN 的发病机制有重要的意义。

6 总结

自噬是细胞基本的生命活动之一, 对细胞稳态的维持至关重要, 其功能体现在肿瘤发生、哺乳动物发育、神经退行性疾病、入侵细胞病原体的降解和代谢疾病等多个方面。自噬小体作为自噬过程中一种关键的细胞器, 它的形成对自噬功能的正常执行来说具有决定性的意义。自噬小体如果不能被正确地诱导, 或不能正确发生和成熟, 就会导致自噬过程的失调, 进而造成多种人类疾病。截止到目前, 对

参与自噬小体的生物发生和成熟过程的 *ATG* 和 *EPG* 蛋白已经有大量的研究, 但是在完全理解自噬小体形成过程之前仍有很多问题需要解决。特别是对这些自噬蛋白参与的生物体内的生理和病理功能还有待深入探究, 而对于自噬小体生物发生的调控机制的研究有助于全面了解自噬小体的生成和自噬过程的调节, 在对相关疾病的治疗等方面也具有积极的意义。

参考文献 (References)

- [1] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 11-42.
- [2] OHSUMI Y. Historical landmarks of autophagy research [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 9-23.
- [3] ZHANG H. The genetics of autophagy in multicellular organisms [J]. *Annu Rev Genet*, 2022, 56: 17-39.
- [4] LU Q, WU F, ZHANG H. Aggrephagy: lessons from *C. elegans* [J]. *Biochem J*, 2013, 452(3): 381-90.
- [5] WONG P M, PUENTE C, GANLEY I G, et al. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation [J]. *Autophagy*, 2013, 9(2): 124-37.
- [6] JUNG C H, JUN C B, RO S H, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-2003.
- [7] HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1981-91.
- [8] PUENTE C, HENDRICKSON R C, JIANG X. Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 6026-35.
- [9] KIM J, KUNDU M, VIOLETT B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-41.
- [10] EGAN D F, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 456-61.
- [11] PENG N, AGROTIS A, PRAK K, et al. A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 294.
- [12] RUSSELL R C, TIAN Y, YUAN H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 741-50.
- [13] ZHOU C, MA K, GAO R, et al. Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy [J]. *Cell Res*, 2017, 27(2): 184-201.
- [14] WOLD M S, LIM J, LACHANCE V, et al. ULK1-mediated phosphorylation of ATG14 promotes autophagy and is impaired in Huntington's disease models [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 76.
- [15] DI BARTOLOMEO S, CORAZZARI M, NAZIO F, et al. The

- dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(1): 155-68.
- [16] JEONG Y T, SIMONESCHI D, KEEGAN S, et al. The ULK1-FBXW5-SEC23B nexus controls autophagy [J]. *eLife*, 2018, 7: e42253.
- [17] YAMAMOTO H, KAKUTA S, WATANABE T M, et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation [J]. *J Cell Biol*, 2012, 198(2): 219-33.
- [18] ORSI A, RAZI M, DOOLEY H C, et al. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(10): 1860-73.
- [19] PURI C, RENNA M, BENTO C F, et al. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes [J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1285-99.
- [20] CHENG J, FUJITA A, YAMAMOTO H, et al. Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3207.
- [21] AXE E L, WALKER S A, MANIFAVA M, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum [J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(4): 685-701.
- [22] ITAKURA E, MIZUSHIMA N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins [J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 764-76.
- [23] HAMASAKI M, FURUTA N, MATSUDA A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 389-93.
- [24] KOYAMA-HONDA I, ITAKURA E, FUJIWARA T K, et al. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site [J]. *Autophagy*, 2013, 9(10): 1491-9.
- [25] KARANASIOS E, STAPLETON E, MANIFAVA M, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 22): 5224-38.
- [26] KAWAMATA T, KAMADA Y, KABEYA Y, et al. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2039-50.
- [27] ZHAO Y G, LIU N, MIAO G, et al. The ER contact proteins VAPA/B interact with multiple autophagy proteins to modulate autophagosome biogenesis [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): 1234-45.e4.
- [28] LIU N, ZHAO H, ZHAO Y G, et al. Atlastin 2/3 regulate ER targeting of the ULK1 complex to initiate autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(7): e202012091.
- [29] SHOEMAKER C J, HUANG T Q, WEIR N R, et al. CRISPR screening using an expanded toolkit of autophagy reporters identifies TMEM41B as a novel autophagy factor [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(4): e2007044.
- [30] ZHAO Y G, CHEN Y, MIAO G, et al. The ER-localized transmembrane protein EPG-3/VMP1 regulates SERCA activity to control ER-isolation membrane contacts for autophagosome formation [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(6): 974-89.e6.
- [31] NISHIMURA T, TAMURA N, KONO N, et al. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains [J]. *EMBO J*, 2017, 36(12): 1719-35.
- [32] MORITA K, HAMA Y, IZUME T, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies TMEM41B as a gene required for autophagosome formation [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(11): 3817-28.
- [33] CHAN E Y, LONGATTI A, MCKNIGHT N C, et al. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(1): 157-71.
- [34] HUANG W, CHOI W, HU W, et al. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein [J]. *Cell Res*, 2012, 22(3): 473-89.
- [35] ROSTISLAVLEVA K, SOLER N, OHASHI Y, et al. Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes [J]. *Science*, 2015, 350(6257): aac7365.
- [36] FAN W, NASSIRI A, ZHONG Q. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7769-74.
- [37] CHOWDHURY S, OTOMO C, LEITNER A, et al. Insights into autophagosome biogenesis from structural and biochemical analyses of the ATG2A-WIPI4 complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(42): E9792-e801.
- [38] NISHIMURA T, TOOZE S A. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation [J]. *Cell Discov*, 2020, 6(1): 32.
- [39] SUZUKI K, KIRISAKO T, KAMADA Y, et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation [J]. *EMBO J*, 2001, 20(21): 5971-81.
- [40] SUZUKI K, KUBOTA Y, SEKITO T, et al. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization [J]. *Genes Cells*, 2007, 12(2): 209-18.
- [41] ZHENG Q, CHEN Y, CHEN D, et al. Calcium transients on the ER surface trigger liquid-liquid phase separation of FIP200 to specify autophagosome initiation sites [J]. *Cell*, 2022, 185(22): 4082-98.e22.
- [42] MIZUSHIMA N, SUGITA H, YOSHIMORI T, et al. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 33889-92.
- [43] ISHIBASHI K, FUJITA N, KANNO E, et al. Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex [J]. *Autophagy*, 2011, 7(12): 1500-13.
- [44] ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 488-92.
- [45] SOU Y S, TANIDA I, KOMATSU M, et al. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an *in vitro* target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3017-24.
- [46] WU F, WATANABE Y, GUO X Y, et al. Structural basis of the differential function of the two *C. elegans* Atg8 homologs, LGG-1 and LGG-2, in autophagy [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(6): 914-29.
- [47] WEIDBERG H, SHPILKA T, SHVETS E, et al. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 20(4): 444-54.

- [48] NAKATOGAWA H, ICHIMURA Y, OHSUMI Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion [J]. *Cell*, 2007, 130(1): 165-78.
- [49] KRAFT C, KIJANSKAM, KALIE E, et al. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy [J]. *EMBO J*, 2012, 31(18): 3691-703.
- [50] ALEMU E A, LAMARK T, TORGENSEN K M, et al. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(47): 39275-90.
- [51] SÁNCHEZ-WANDELMER J, KRIEGBURG F, ROHRINGER S, et al. Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 295.
- [52] HERHAUS L, BHASKARA R M, LYSTAD A H, et al. TBK1-mediated phosphorylation of LC3C and GABARAP-L2 controls autophagosome shedding by ATG4 protease [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(1): e48317.
- [53] UEMURA T, YAMAMOTO M, KAMETAKA A, et al. A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(9): 1695-706.
- [54] MAEDA S, OTOMO C, OTOMO T. The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes [J]. *eLife*, 2019, 8: e45777.
- [55] OSAWA T, ISHII Y, NODA N N. Human ATG2B possesses a lipid transfer activity which is accelerated by negatively charged lipids and WIPI4 [J]. *Genes Cells*, 2020, 25(1): 65-70.
- [56] GE L, ZHANG M, KENNY S J, et al. Remodeling of ER-exit sites initiates a membrane supply pathway for autophagosome biogenesis [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(9): 1586-603.
- [57] SHIMA T, KIRISAKO H, NAKATOGAWA H. COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(5): 1503-10.
- [58] GE L, MELVILLE D, ZHANG M, et al. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis [J]. *eLife*, 2013, 2: e00947.
- [59] KARANASIOS E, WALKER S A, OKKENHAUG H, et al. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12420.
- [60] HAILEY D W, RAMBOLD A S, SATPUTE-KRISHNAN P, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation [J]. *Cell*, 2010, 141(4): 656-67.
- [61] LI D, SONG J Z, LI H, et al. Storage lipid synthesis is necessary for autophagy induced by nitrogen starvation [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(2): 269-76.
- [62] SHPILKA T, WELTER E, BOROVSKY N, et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis [J]. *EMBO J*, 2015, 34(16): 2117-31.
- [63] RAZI M, CHAN E Y, TOOZE S A. Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(2): 305-21.
- [64] FILIMONENKO M, STUFFERS S, RAIBORG C, et al. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(3): 485-500.
- [65] LEE J-A, BEIGNEUX A, AHMAD S T, et al. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(18): 1561-7.
- [66] ITAKURA E, KISHI-ITAKURA C, MIZUSHIMA N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes [J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1256-69.
- [67] MATSUI T, JIANG P, NAKANO S, et al. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17 [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(8): 2633-45.
- [68] KUMAR S, JAIN A, FARZAM F, et al. Mechanism of Stx17 recruitment to autophagosomes via IRGM and mammalian Atg8 proteins [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(3): 997-1013.
- [69] DIAO J, LIU R, RONG Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes [J]. *Nature*, 2015, 520(7548): 563-6.
- [70] JEAN S, COX S, NASSARI S, et al. Starvation-induced MTMR13 and RAB21 activity regulates VAMP8 to promote autophagosome-lysosome fusion [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(3): 297-311.
- [71] YU I M, HUGHSON F M. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26: 137-56.
- [72] JIANG P, NISHIMURA T, SAKAMAKI Y, et al. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17 [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(8): 1327-37.
- [73] STROUPE C, COLLINS K M, FRATTI R A, et al. Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p [J]. *EMBO J*, 2006, 25(8): 1579-89.
- [74] HEGEDŰS K, TAKÁTS S, BODA A, et al. The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(20): 3132-42.
- [75] TIAN Y, LI Z, HU W, et al. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms [J]. *Cell*, 2010, 141(6): 1042-55.
- [76] WANG Z, MIAO G, XUE X, et al. The Vici syndrome protein EPG5 is a Rab7 effector that determines the fusion specificity of autophagosomes with late endosomes/lysosomes [J]. *Mol Cell*, 2016, 63(5): 781-95.
- [77] JI C, ZHAO H, CHEN D, et al. β -propeller proteins WDR45 and WDR45B regulate autophagosome maturation into autolysosomes in neural cells [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(8): 1666-77, e6.
- [78] MCEWAN D G, POPOVIC D, GUBAS A, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins [J]. *Mol Cell*, 2015, 57(1): 39-54.
- [79] WETZEL L, BLANCHARD S, RAMA S, et al. TECPR1 promotes aggrephagy by direct recruitment of LC3C autophagosomes to lysosomes [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2993.
- [80] CHEN D, FAN W, LU Y, et al. A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate [J]. *Mol Cell*, 2012, 45(5): 629-41.
- [81] SAKAMAKI J I, LONG J S, NEW M, et al. Emerging roles of transcriptional programs in autophagy regulation [J]. *Transcription*, 2018, 9(2): 131-6.
- [82] ZHANG N, ZHAO Y. Other molecular mechanisms regulating autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 261-71.

- [83] SHEN Q, SHI Y, LIU J, et al. Acetylation of STX17 (syntaxin 17) controls autophagosome maturation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1157-69.
- [84] GUO B, LIANG Q, LI L, et al. O-GlcNAc-modification of SNAP-29 regulates autophagosome maturation [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1215-26.
- [85] MATSUNAGA K, SAITOH T, TABATA K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(4): 385-96.
- [86] ZHONG Y, WANG Q J, LI X, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(4): 468-76.
- [87] CHENG X, MA X, DING X, et al. Pacer mediates the function of class III PI3K and HOPS complexes in autophagosome maturation by engaging Stx17 [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(6): 1029-43, e5.
- [88] CARROLL B, MOHD-NAIM N, MAXIMIANO F, et al. The TBC/RabGAP Armus coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy [J]. *Dev Cell*, 2013, 25(1): 15-28.
- [89] WANG H, SUN H Q, ZHU X, et al. GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(22): 7015-20.
- [90] MIAO G, ZHANG Y, CHEN D, et al. The ER-localized transmembrane protein TMEM39A/SUSR2 regulates autophagy by controlling the trafficking of the PtdIns(4)P phosphatase SAC1 [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(3): 618-32, e5.
- [91] LIANG X H, JACKSON S, SEAMAN M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-6.
- [92] ZHAO H, ZHAO Y G, WANG X, et al. Mice deficient in Epg5 exhibit selective neuronal vulnerability to degeneration [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(6): 731-41.
- [93] CULLUP T, KHO A L, DIONISI-VICI C, et al. Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(1): 83-7.
- [94] ZHAO Y G, ZHAO H, SUN H, et al. Role of Epg5 in selective neurodegeneration and Vici syndrome [J]. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1258-62.
- [95] LU Q, YOKOYAMA CHRISTINE C, WILLIAMS JESSE W, et al. Homeostatic control of innate lung inflammation by Vici syndrome gene Epg5 and additional autophagy genes promotes influenza pathogenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(1): 102-13.
- [96] LEE S, KALUGOTLA G, INGLE H, et al. Intestinal antiviral signaling is controlled by autophagy gene Epg5 independent of the microbiota [J]. *Autophagy*, 2022, 18(5): 1062-77.
- [97] LIU W, CHEN M, LIU C, et al. Epg5 deficiency leads to primary ovarian insufficiency due to WT1 accumulation in mouse granulosa cells [J]. *Autophagy*, 2023, 19(2): 644-59.
- [98] SAITSU H, NISHIMURA T, MURAMATSU K, et al. *De novo* mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 445-9, e1.
- [99] ZHAO Y G, SUN L, MIAO G, et al. The autophagy gene Wdr45/Wipi4 regulates learning and memory function and axonal homeostasis [J]. *Autophagy*, 2015, 11(6): 881-90.
- [100] JI C, ZHAO H, LI D, et al. Role of Wdr45b in maintaining neural autophagy and cognitive function [J]. *Autophagy*, 2020, 16(4): 615-25.