



LC3脂质化修饰的机制和功能研究进展

许银丰¹, 张慧², 邹立军¹, 万伟^{3*}

1. 湖南第一师范学院基础生物学实验室, 长沙 410205;

2. 浙江大学医学院附属第二医院口腔科, 杭州 310058;

3. 浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: wanwei@zju.edu.cn

收稿日期: 2022-03-22; 接受日期: 2022-05-30; 网络版发表日期: 2023-03-03

国家自然科学基金(批准号: 31970694, 31701213)、湖南省自然科学基金(批准号: 2022JJ30186, 2021JJ30171)、长沙市杰出创新青年培养计划(批准号: kq2206049)和中国科协青年人才托举工程(批准号: 2019QNRC001)资助

摘要 LC3(包括LC3/GABARAP蛋白家族所有成员)的脂质化修饰是细胞自噬过程中的关键事件. LC3完成脂质化修饰后, 由水溶性形式转化为膜结合形式, 在自噬小体的形成、自噬底物的招募和自噬小体-溶酶体融合等阶段均发挥重要作用. 包括营养状态和病原菌入侵在内的多种细胞内外刺激信号均可参与调控LC3的脂质化修饰过程. 近年来的研究发现, 脂质化的LC3不仅可以靶向细胞内双层膜的自噬小体, 也可以靶向细胞内多种单层膜结构, 如吞噬体和溶酶体等, 参与调控细胞的内存和微自噬等生物学过程. 本文将围绕LC3脂质化修饰的机制和功能综述近年来的相关研究进展.

关键词 LC3, 脂质化, 细胞自噬, 内存, 溶酶体, 微自噬

LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3)和GABARAP(gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein)蛋白家族(酵母中的同源蛋白为autophagy-related protein 8, Atg8)作为哺乳动物细胞中最早鉴定的自噬小体(autophagosome)定位蛋白之一^[1], 一直被当作双层膜自噬小体的标记分子, 广泛应用于细胞自噬(autophagy)相关研究. 然而, 近年来的研究发现, 在某些特定刺激下, LC3也可以靶向细胞内的多种单层膜结构, 如吞噬体(phagosome)和溶酶体(lysosome)等^[2]. 无论是靶向细胞内双层膜的自噬小体还是其他的单层膜结构, LC3都需要通过脂质化修饰(lipidation)反应获得膜结合能力, 从而行使其功能. 总之,

LC3的脂质化修饰在细胞自噬、内存(phagocytosis)、微自噬(microautophagy)等一系列与细胞内膜系统密切相关的生物学过程中均发挥关键的调控作用.

1 LC3脂质化修饰的基本过程

LC3脂质化修饰的最终完成依赖于细胞内的两套类泛素化连接系统(ubiquitination-like conjugation system)(图1)^[3]. 在ATG12系统中, 在E1样酶ATG7和E2样酶ATG10的依次作用下, ATG12羧基末端尾的甘氨酸残基与ATG5上的赖氨酸残基形成异肽键, 从而使ATG12共价连接到ATG5上, 形成ATG12-ATG5复合物.

引用格式: 许银丰, 张慧, 邹立军, 等. LC3脂质化修饰的机制和功能研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 449–455

Xu Y F, Zhang H, Zou L J, et al. Molecular mechanisms and functions of LC3 lipidation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 449–455, doi: 10.1360/SSV-2022-0048

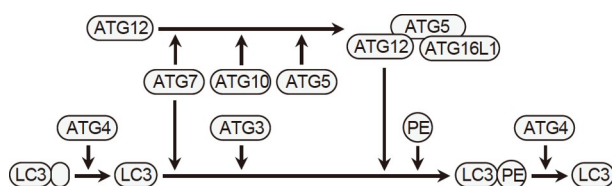


图1 LC3脂质化修饰的基本过程

Figure 1 The general process of LC3 lipidation.

ATG5通过蛋白相互作用招募ATG16L1, ATG12-ATG5进而与ATG16L1组装成ATG16L1-ATG5-ATG12复合物. 在LC3系统中, 全长的LC3蛋白在半胱氨酸蛋白酶ATG4的切割下, 暴露出羧基端的甘氨酸残基, 转化为活化形式的LC3, 继而在E1样酶ATG7、E2样酶ATG3和E3样酶ATG16L1-ATG5-ATG12复合物的依次作用下, LC3的甘氨酸残基共价连接到脂质磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)上, 水溶性的LC3进而转化为膜结合形式的LC3-PE. 值得注意的是, LC3-PE同样也可以在ATG4的切割下重新转化为水溶性的LC3.

仅ATG12-ATG5复合物就可以充当E3样酶催化LC3-PE的形成^[4,5]. 虽然ATG16L1并不直接参与LC3脂质化修饰反应, 但是ATG16L1的膜定位直接决定了LC3最终在细胞内的单层膜结构还是双层膜结构上进行脂质化修饰^[6,7].

2 细胞自噬中LC3脂质化修饰的调控机制和功能

2.1 细胞自噬的基本过程

细胞自噬是真核生物特有的依赖溶酶体的细胞内降解途径, 主要包括3种类型, 巨自噬(macroautophagy)、微自噬和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)^[8]. 如无特别说明, 细胞自噬一般指的是巨自噬, 其显著特征是需要细胞内形成双层膜结构的自噬小体. 自噬小体将蛋白聚集体、受损细胞器和入侵病原菌等细胞内容物包裹起来并运送至溶酶体内进行降解, 以此维持细胞内环境的稳定^[9]. 细胞自噬过程一般分为自噬前体(phagophore)的生成、自噬底物的招募、自噬小体的形成、自噬小体-溶酶体融合等主要阶段. 目前已知的约40种自噬相关ATG基因主要在以上阶段发挥作用^[9]. 细胞自噬功能

的紊乱, 与癌症、神经退行性疾病、代谢性疾病和感染性疾病等人类重大疾病的发生发展密切相关^[10,11].

2.2 细胞自噬中LC3脂质化修饰的调控机制

脂质3-磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P)的结合蛋白WIPI2(WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2)是细胞内介导LC3在自噬小体上进行脂质化修饰的关键分子^[12,13]. WIPI2通过结合自噬前体膜上的PI3P和细胞质中的ATG16L1, 将ATG16L1-ATG5-ATG12复合物招募到自噬前体膜上, 进而促进LC3的脂质化修饰反应(图2)^[12,13]. WIPI2这一关键的桥梁分子受到营养信号mTORC1(mechanistic target of rapamycin complex 1)的直接调控^[14,15]. 营养充足条件下, 激活的mTORC1直接磷酸化WIPI2的S395位点, 促进WIPI2与E3泛素连接酶HUWE1(E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1)的结合和后续的泛素化反应, 导致WIPI2经由蛋白酶体途径降解, 进而抑制自噬前体膜处LC3的脂质化修饰, 并显著降低细胞自噬的发生强度^[14,15].

此外, 参与LC3脂质化修饰的核心组分也受到细胞内营养信号的调控. 营养丰富条件下, LC3, ATG5, ATG7和ATG12等核心组分均维持高水平的乙酰化状态^[16,17]. 诱导自噬的条件下, 细胞核内的LC3去乙酰化后在核蛋白TP53INP2(tumor protein p53-inducible nuclear protein 2)的协助下由细胞核移位至细胞质中, 进而在细胞质中完成脂质化修饰, 参与自噬小体的形成^[18,19]. 研究表明, TP53INP2的亚细胞定位同样受到细胞内营养信号的严格调控^[19,20]. 营养充足条件下, TP53INP2主要定位于细胞核内, 部分可定位于核仁上, 参与多种基因的转录调控^[19]. 而在营养缺乏条件下, 细胞核内及核仁处的TP53INP2转位至细胞质中, 一方面关闭其介导的基因转录, 另一方面参与细胞自噬的启动^[19,20]. TP53INP2在细胞自噬的调控中发挥多种作用. TP53INP2由细胞核进入细胞质后, 既可通过加强LC3与ATG7的结合直接促进LC3的脂质化, 也可通过其泛素结合基序(ubiquitin-interacting motif, UIM)将泛素化的底物招募至自噬小体内进行降解^[21,22].

目前的研究表明, LC3等自噬蛋白的乙酰化水平受到多种营养信号的调控. 葡萄糖饥饿条件下, 激活的蛋白激酶AMPK(AMP-activated protein kinase)直接磷酸化糖酵解酶GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate

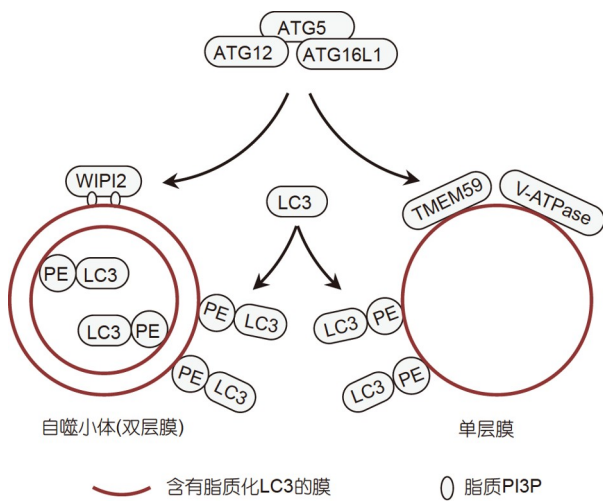


图 2 控制双层膜的自噬小体和单层膜的囊泡上进行LC3脂质化修饰的关键组分

Figure 2 The key players controlling LC3 lipidation on double membrane autophagosomes or single membrane vesicles

dehydrogenase)的S122位点, 促进其由细胞质移位至细胞核内, 细胞核内的GAPDH进而直接与去乙酰化酶SIRT1(sirtuin 1)结合, 并导致后者的抑制蛋白CCAR2/DBC1(cell cycle and apoptosis regulator protein 2)解离, 从而激活SIRT1并导致细胞核内的LC3发生去乙酰化^[23]. 而在氨基酸饥饿条件下, LC3的乙酰化下降主要由其乙酰转移酶EP300/p300(E1A binding protein p300)的失活引起^[24]. 氨基酸充足条件下, mTORC1磷酸化p300的S2271, S2279, S2291和S2375位点, 解除p300的分子内自抑制作用并促进p300的激活, 进而促进LC3的乙酰化^[24]. 与LC3等自噬相关蛋白不同, 在营养丰富条件下, ATG3的乙酰化水平较低^[25]. 而在饥饿条件下, 乙酰转移酶KAT5/TIP60(lysine acetyltransferase 5)的活性升高^[26], 导致其底物ATG3的乙酰化水平随之升高^[25]. ATG3的乙酰化通过促进ATG3与LC3的相互作用, 促进LC3的脂质化修饰和细胞自噬的启动^[25].

值得注意的是, 除了LC3, ATG5、ATG7和ATG12等核心组分的乙酰化是否影响LC3的脂质化修饰反应以及潜在的分子机制仍不明确.

2.3 细胞自噬中LC3脂质化修饰的功能

LC3脂质化修饰在细胞自噬的多个阶段均发挥重要作用, 自噬小体膜结合的LC3通过结合不同的蛋白在自噬前体膜的延伸长大、自噬底物的招募、自噬小

体的运动和自噬小体-溶酶体融合等过程中均发挥调控作用^[3]. 很多参与调控细胞自噬的蛋白均含有一个或者多个保守的负责与LC3结合的氨基酸基序, 称作LC3结合区域(LC3-interacting region, LIR)^[3]. 这些蛋白通过LIR被LC3招募至自噬小体处, 从而在细胞自噬过程中发挥功能^[3]. 目前鉴定的大量介导内质网自噬(ER-phagy)、线粒体自噬(mitophagy)和异源自噬(xenophagy)等选择性自噬的受体蛋白均通过它们含有的LIR结合LC3, 进而把待降解的自噬底物运送到自噬小体内(图3)^[27]. 此外, LC3还可以结合含有UIM的蛋白^[28]. 目前鉴定的通过UIM结合LC3的主要是选择性自噬的受体蛋白, 在自噬底物的招募过程中发挥作用^[28].

在哺乳动物细胞中, 诱导自噬起始的ULK1(unc-51-like kinase 1)复合物的多个组分, 包括ULK1, ATG13和RB1CC1/FIP200(RB1-inducible coiled-coil protein 1), 均可以通过自身含有的LIR与LC3结合^[29]. ULK1的LIR对于ULK1复合物定位于自噬小体必不可少^[29]. 更重要的是, LC3与ULK1的结合能抑制其激酶活性, 而LC3的同源蛋白GABARAP则发挥相反的作用^[30,31].

以上研究表明, LC3脂质化修饰不仅参与调控细胞自噬的多个下游阶段, 也参与调控上游自噬信号的激活.

3 单层膜结构上LC3脂质化修饰的调控机制和功能

3.1 单层膜结构上LC3脂质化修饰的调控机制

决定在细胞内单层膜结构上进行LC3脂质化的蛋白主要是ATG16L1. 与酵母中的Atg16不同, 哺乳动物细胞中ATG16L1的羧基端含有很长的一段包含7个WD40重复(WD40 repeat)功能域的桶状结构. 删除该桶状结构不影响ATG16L1在细胞自噬中的功能^[2], 表明其对于ATG16L1靶向双层膜的自噬小体并不必需. 更重要的是, 在内吞或者微自噬等会诱发LC3在单层膜的内吞体或者溶酶体等细胞内囊泡上进行脂质化修饰的生物学过程中, 删除ATG16L1羧基端的7个WD40重复功能域, 会导致ATG16L1无法靶向内吞体或者溶酶体等的外膜处, 也会完全抑制后续的LC3脂质化修饰^[2]. 显然, ATG16L1羧基端的7个WD40重复功能域

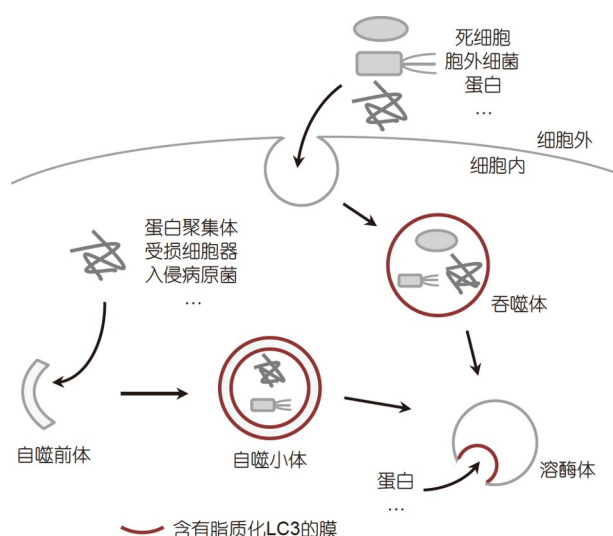


图3 细胞中LC3脂质化修饰的生物学功能

Figure 3 The biological functions of LC3 lipidation in the cell

正是决定ATG16L1能否靶向细胞内单层膜结构的关键。

近年来的多项研究发现,多个可以定位于溶酶体等单层膜结构的蛋白/蛋白复合物,包括跨膜蛋白TMEM59(transmembrane protein 59)和质子泵V-ATPase,正是通过结合ATG16L1羧基端的7个WD40重复功能域将ATG16L1招募到单层膜结构上,进而促进LC3的脂质化修饰(图2)^[32-34]。在沙门氏杆菌(*Salmonella*)感染细胞的时候,其分泌蛋白SopF(type III secretion system effector SopF)可通过催化V-ATPase的亚基ATP6V0C(V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit)的Q124位点发生ADP-核糖基化(ADP-ribosylation),抑制V-ATPase招募ATG16L1,进而抑制后续的LC3脂质化以及宿主细胞对沙门氏杆菌的清除^[34]。此外,在激活细胞内DNA感应通路cGAS(cyclic GMP-AMP synthase)-STING(stimulator of interferon genes)信号通路的条件下,内质网定位的STING蛋白激活后会脱离内质网形成单层膜的STING囊泡^[35],ATG16L1也可以靶向STING囊泡介导LC3的脂质化修饰^[33]。而在细胞内表达SopF则会显著抑制STING囊泡处的LC3脂质化^[33],表明质子泵V-ATPase对ATG16L1的招募作用可能在细胞内多种单层膜结构上的LC3脂质化过程中均发挥作用。

值得注意的是,TMEM59和V-ATPase对ATG16L1

的招募作用是否是相互独立的过程尚不明确,仍有待于未来的深入研究。另外,除了沙门氏杆菌感染,细胞内是否存在其他调控单层膜结构招募ATG16L1以及后续LC3脂质化修饰的生理刺激仍有待阐明。

3.2 单层膜结构上LC3脂质化修饰的功能

目前的研究发现,LC3可以在吞噬体、溶酶体和STING囊泡等细胞内单层膜结构上进行脂质化修饰^[2,33]。

细胞外的蛋白质、病原菌和死细胞等内吞进入细胞后会形成单层膜的吞噬体,LC3可在其表面进行脂质化修饰(图3)。LC3参与调控的内吞过程称作LAP(LC3-associated phagocytosis)^[36]。显然,在LC3脂质化修饰之前,细胞外的底物已经被包裹进入吞噬体。因此,与自噬小体不同,吞噬体的内膜处不含有脂质化的LC3。换言之,LC3不参与内吞过程中底物的招募。此外,内吞体闭合后,LC3才能在其表面进行脂质化修饰,表明LC3也不参与调控吞噬体的形成过程。目前的研究表明,LC3脂质化修饰主要在吞噬体-溶酶体融合过程中发挥促进作用^[36]。然而,参与吞噬体-溶酶体融合的蛋白机器尚不十分明确,LC3脂质化修饰在吞噬体-溶酶体融合过程中发挥作用的潜在分子机制仍有待阐明。在细胞层面,LAP缺陷的巨噬细胞清除病原菌和死细胞的效率大为降低^[36];在动物层面,LAP缺陷的小鼠(*Mus musculus*)在衰老过程中由于无法有效地清除死细胞,导致衰老小鼠表现出类似红斑狼疮的自身免疫病症状^[37]。

除了接收自噬小体来源的细胞内容物,溶酶体可以通过外膜的内陷直接将细胞内的物质包裹进入溶酶体腔内进行降解,这种依赖于溶酶体膜内陷的细胞内降解方式称作微自噬(图3)。研究表明,在溶酶体处于应激状态下,微自噬可以选择性地降解溶酶体的膜组分,维持溶酶体的稳态^[38]。然而,LC3脂质化修饰是否参与调控溶酶体膜组分的选择性降解尚不明确。在短时间饥饿的条件下,溶酶体膜上脂质化的LC3对于SQSTM1/p62(sequestosome 1)等细胞自噬受体蛋白经由微自噬途径进行降解则是必需的^[39]。

此外,细胞内cGAS-STING通路激活的条件下,LC3也可以在STING囊泡处进行脂质化修饰。然而,脂质化的LC3在STING囊泡上的功能尚存争议。最早的研究认为,脂质化的LC3参与STING诱导的细胞自噬

中自噬小体的形成^[40,41]。后续的研究发现, 单层膜的 STING 囊泡上也可以进行 LC3 的脂质化修饰^[33]。在 LC3 脂质化修饰缺陷的细胞中, cGAS-STING 通路的激活完全不受影响^[40], 表明 LC3 的脂质化修饰可能不直接参与 cGAS-STING 通路的信号转导过程。总之, 脂质化的 LC3 在 STING 囊泡上到底发挥何种功能仍不明确, 有待于后续深入的研究。

4 展望

近年的研究发现, 除了脂质 PE, LC3 还可以共价连接到脂质磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)上^[42]。而且, LC3-PS 只存在于细胞内的单层膜结构上^[42]。LC3-PS 在单层膜结构上是否发挥不同于 LC3-PE 的功能尚不明确。此外, 除了脂质, LC3 还可以共价连接到蛋白上^[43~45]。目前鉴定的可以共价连接 LC3 的蛋白仅包括 ATG3 和 ATG16L1^[43~45], 二者均属于介导 LC3 脂质化修饰的核心组分。细胞内其他非自噬途径相关蛋白是否也可以共价连接 LC3 还有待研究。而且, 只有鉴定更多的 LC3 共价连接蛋白才能更好地阐明 LC3 共价修饰蛋白的生物学功能。需要注意的是, 虽然 LC3 可以在细胞内的单层膜结构上进行脂质化修饰, 但是细胞内也有相当比例的单层膜结构上完全检测不到脂质化的 LC3^[46]。何种信号决定 LC3 在哪些单层膜结构上进行脂质化修饰仍然不清楚。更重要的是, 不含有

脂质化 LC3 的单层膜吞噬体最终仍然可以正常地和溶酶体融合^[46], 表明脂质化的 LC3 并非为吞噬体-溶酶体融合所必需。吞噬体外膜上脂质化的 LC3 是否发挥其他未知的生物学功能仍然是领域内值得关注的重大科学问题。

参与 LC3 脂质化修饰的核心蛋白机器也是重要的药物靶点。既往的研究发现, 天然小分子药物姜黄素(curcumin)、亚精胺(spermidine)和白藜芦醇(resveratrol)等均可通过靶向调控蛋白激酶 mTORC1、乙酰转移酶 p300 和去乙酰化酶 SIRT1 等的活性影响 LC3 的脂质化修饰, 进而调控细胞自噬^[16,47~50]。近年来, 基于参与 LC3 脂质化修饰的核心蛋白(特别是 LC3 蛋白家族)而开发的活性小分子或者短肽能够特异性地调控 LC3 的脂质化修饰或者影响自噬底物的招募^[51,52]。更重要的是, 鉴于蛋白聚集体、受损细胞器、脂滴或者入侵病原菌等与一系列人类重大疾病的发生发展密切相关, 利用小分子胶水作为桥梁, 一方面结合底物, 另一方面结合 LC3 家族蛋白, 进而特异性地将底物靶向自噬小体进行清除, 也可达到治疗相关疾病的目的^[53,54]。目前, 针对亨廷顿病的致病蛋白和脂肪肝内异常累积的脂滴, 均成功开发了相应的小分子胶水, 并在动物水平展现出了良好的特异性清除效果^[53,54]。相信在不久的将来, 靶向更多自噬底物的小分子胶水会被陆续开发出来, 从而为相关疾病的治疗提供一条全新的思路。

参考文献

- 1 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19: 5720–5728
- 2 Fletcher K, Ulferts R, Jacquin E, et al. The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes. *EMBO J*, 2018, 37: e97840
- 3 Mizushima N. The ATG conjugation systems in autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 63: 1–10
- 4 Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 2001, 152: 657–668
- 5 Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, 2001, 20: 5971–5981
- 6 Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 2092–2100
- 7 Lystad A H, Carlsson S R, de la Ballina L R, et al. Distinct functions of ATG16L1 isoforms in membrane binding and LC3B lipidation in autophagy-related processes. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 372–383
- 8 Juenemann K, Reits E A. Alternative macroautophagic pathways. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 189794

- 9 Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 521–527
- 10 Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1564–1576
- 11 Yang Y, Klionsky D J. Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 858–871
- 12 Dooley H C, Razi M, Polson H E J, et al. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*, 2014, 55: 238–252
- 13 Polson H E J, de Lartigue J, Rigden D J, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 2010, 6: 506–522
- 14 Wan W, Liu W. mTORC1 regulates autophagic membrane growth by targeting WIPI2. *Autophagy*, 2019, 15: 742–743
- 15 Wan W, You Z, Zhou L, et al. mTORC1-regulated and HUWE1-mediated WIPI2 degradation controls autophagy flux. *Mol Cell*, 2018, 72: 303–315.e6
- 16 Lee I H, Cao L, Mostoslavsky R, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 3374–3379
- 17 Lee I H, Finkel T. Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J Biol Chem*, 2009, 284: 6322–6328
- 18 Huang R, Xu Y, Wan W, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*, 2015, 57: 456–466
- 19 Xu Y F, Wan W, Shou X, et al. TP53INP2/DOR, a mediator of cell autophagy, promotes rDNA transcription via facilitating the assembly of the POLR1/RNA polymerase I preinitiation complex at rDNA promoters. *Autophagy*, 2016, 12: 1118–1128
- 20 Xu Y, Wan W. The bifunctional role of TP53INP2 in transcription and autophagy. *Autophagy*, 2020, 16: 1341–1343
- 21 Xu Y, Wan W. TP53INP2 mediates autophagic degradation of ubiquitinated proteins through its ubiquitin-interacting motif. *FEBS Lett*, 2019, 593: 1974–1982
- 22 You Z, Xu Y, Wan W, et al. TP53INP2 contributes to autophagosome formation by promoting LC3-ATG7 interaction. *Autophagy*, 2019, 15: 1309–1321
- 23 Chang C, Su H, Zhang D, et al. AMPK-dependent phosphorylation of GAPDH triggers Sirt1 activation and is necessary for autophagy upon glucose starvation. *Mol Cell*, 2015, 60: 930–940
- 24 Wan W, You Z, Xu Y, et al. mTORC1 phosphorylates acetyltransferase p300 to regulate autophagy and lipogenesis. *Mol Cell*, 2017, 68: 323–335.e6
- 25 Yi C, Ma M, Ran L, et al. Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science*, 2012, 336: 474–477
- 26 Lin S Y, Li T Y, Liu Q, et al. GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*, 2012, 336: 477–481
- 27 Kirkin V, Rogov V V. A Diversity of selective autophagy receptors determines the specificity of the autophagy pathway. *Mol Cell*, 2019, 76: 268–285
- 28 Marshall R S, Hua Z, Mali S, et al. ATG8-binding UIM proteins define a new class of autophagy adaptors and receptors. *Cell*, 2019, 177: 766–781.e24
- 29 Alemu E A, Lamark T, Torgersen K M, et al. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex. *J Biol Chem*, 2012, 287: 39275–39290
- 30 Grunwald D S, Otto N M, Park J M, et al. GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for autophagy induction. *Autophagy*, 2020, 16: 600–614
- 31 Joachim J, Jefferies H B J, Razi M, et al. Activation of ULK kinase and autophagy by GABARAP trafficking from the centrosome is regulated by WAC and GM130. *Mol Cell*, 2015, 60: 899–913
- 32 Boada-Romero E, Letek M, Fleischer A, et al. TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. *EMBO J*, 2013, 32: 566–582
- 33 Fischer T D, Wang C, Padman B S, et al. STING induces LC3B lipidation onto single-membrane vesicles via the V-ATPase and ATG16L1-WD40 domain. *J Cell Biol*, 2020, 219: e202009128
- 34 Xu Y, Zhou P, Cheng S, et al. A bacterial effector reveals the V-ATPase-ATG16L1 axis that initiates xenophagy. *Cell*, 2019, 178: 552–566.e20
- 35 Chen Q, Sun L, Chen Z J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*, 2016, 17: 1142–1149
- 36 Heckmann B L, Green D R. LC3-associated phagocytosis at a glance. *J Cell Sci*, 2019, 132: jcs222984
- 37 Martinez J, Cunha L D, Park S, et al. Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*, 2016, 533: 115–119

- 38 Lee C, Lamech L, Johns E, et al. Selective lysosome membrane turnover is induced by nutrient starvation. *Dev Cell*, 2020, 55: 289–297
- 39 Mejlvang J, Olsvik H, Svenning S, et al. Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *J Cell Biol*, 2018, 217: 3640–3655
- 40 Gui X, Yang H, Li T, et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*, 2019, 567: 262–266
- 41 Liu D, Wu H, Wang C, et al. STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. *Cell Death Differ*, 2019, 26: 1735–1749
- 42 Durgan J, Lystad A H, Sloan K, et al. Non-canonical autophagy drives alternative ATG8 conjugation to phosphatidylserine. *Mol Cell*, 2021, 81: 2031–2040.e8
- 43 Agrotis A, von Chamier L, Oliver H, et al. Human ATG4 autophagy proteases counteract attachment of ubiquitin-like LC3/GABARAP proteins to other cellular proteins. *J Biol Chem*, 2019, 294: 12610–12621
- 44 Carosi J M, Nguyen T N, Lazarou M, et al. ATG8ylation of proteins: A way to cope with cell stress? *J Cell Biol*, 2021, 220: e202108120
- 45 Nguyen T N, Padman B S, Zellner S, et al. ATG4 family proteins drive phagophore growth independently of the LC3/GABARAP lipidation system. *Mol Cell*, 2021, 81: 2013–2030.e9
- 46 Florey O, Overholtzer M. Macropinocytosis and autophagy crosstalk in nutrient scavenging. *Phil Trans R Soc B*, 2019, 374: 20180154
- 47 Borra M T, Smith B C, Denu J M. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17187–17195
- 48 Pietrocola F, Lachkar S, Enot D P, et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ*, 2015, 22: 509–516
- 49 Marcu M G, Jung Y J, Lee S, et al. Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med Chem*, 2006, 2: 169–174
- 50 Xu Y, Wu Y, Wang L, et al. Identification of curcumin as a novel natural inhibitor of rDNA transcription. *Cell Cycle*, 2020, 19: 3362–3374
- 51 Fan S, Yue L, Wan W, et al. Inhibition of autophagy by a small molecule through covalent modification of the LC3 protein. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 26105–26114
- 52 Li J, Zhu R, Chen K, et al. Potent and specific Atg8-targeting autophagy inhibitory peptides from giant ankyrins. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 778–787
- 53 Fu Y, Chen N, Wang Z, et al. Degradation of lipid droplets by chimeric autophagy-tethering compounds. *Cell Res*, 2021, 31: 965–979
- 54 Li Z, Wang C, Wang Z, et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT–LC3 linker compounds. *Nature*, 2019, 575: 203–209

Molecular mechanisms and functions of LC3 lipidation

XU YinFeng¹, ZHANG Hui², ZOU LiJun¹ & WAN Wei³

¹ Laboratory of Basic Biology, Hunan First Normal University, Changsha 410205, China;

² Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China;

³ Department of Biochemistry, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China

Lipidation of LC3 (including all LC3/GABARAP family proteins) is a key event of autophagy process. LC3 obtains membrane-bound capacity via conjugation with phosphatidyl ethanolamine under the assistance of two ubiquitination-like systems. Membrane-bound LC3 controls several pivotal steps of autophagy, including autophagosome formation, cargo recruitment and autophagosome-lysosome fusion. Intriguingly, lipidated LC3 can also target to some intracellular single membrane vesicles, including phagosome and lysosome, and participates in several autophagy-independent processes, such as phagocytosis and microautophagy. Various intracellular and extracellular stimuli, such as nutrient deprivation and pathogen invasion, have been demonstrated to target LC3 lipidation to control autophagy, phagocytosis and other related processes. In this paper, we review the recent studies on the molecular mechanisms and physiological functions of LC3 lipidation in mammalian cells.

LC3, lipidation, autophagy, phagocytosis, lysosome, microautophagy

doi: 10.1360/SSV-2022-0048