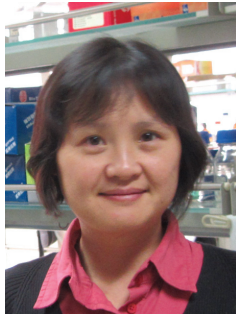


特约综述



本实验室以培养细胞系、原代神经元以及小鼠为模型,运用细胞生物学、生物化学、分子遗传学等多种研究方法,探讨细胞内逆向囊泡运输的调控机制,并通过对于目标基因敲除小鼠的表型分析,深入探讨它们在神经元中通过囊泡运输调控神经发育与功能的作用机制及相关人类神经系统疾病的致病机理。

<http://www.genetics.ac.cn/expert/liujijia.htm>

囊泡运输的功能与调控机制

张程 牛洋 刘佳佳*

(分子发育生物学国家重点实验室,中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101)

摘要 真核细胞通过区隔化形成各种细胞器,这些膜状结构和细胞质膜共同构成了复杂的生物膜系统。细胞质膜和细胞器之间以及细胞器之间大量的物质和信息交流构成了细胞生命活动的基础。由马达蛋白驱动的囊泡运输是细胞内物质运输的主要形式,囊泡运输的调控机制是细胞生物学领域的重大科学问题。该文重点总结了近年来基于微管轨道的囊泡运输领域中关于马达蛋白kinesin和cytoplasmic dynein的货物识别机制、货物卸载机制的研究进展,并对马达蛋白对于微管轨道的识别机制进行了初步探讨。此外,该文还总结了囊泡运输与人类疾病之间的关系。

关键词 囊泡运输; 马达蛋白; 货物识别; 货物卸载

Functions and Regulatory Mechanisms of Vesicular Transport

Zhang Cheng, Niu Yang, Liu Jijia*

(State Key Laboratory for Molecular Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Vesicular transport is essential for cellular functions. The transport machinery comprises cargoes, cytoskeletal tracks and molecular motors. Among these motors are kinesins and cytoplasmic dynein, which are plus end- and minus end-directed microtubule motors, respectively. This review focuses on the mechanisms for cargo recognition and cargo release by kinesins and dynein, as well as the mechanisms underlying microtubule track selection by these motors. We also discuss the involvement of vesicular transport in human diseases.

Key words vesicular transport; molecular motor; cargo recognition; cargo release

科技部重大研究计划(批准号: 2014CB942802)和国家自然科学基金(批准号: 31325017)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-64806561, E-mail: jjliu@genetics.ac.cn

This work was supported by the National Basic Research Program of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2014CB942802) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31325017)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64806561, E-mail: jjliu@genetics.ac.cn

网络出版时间: 2014-09-02 17:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20140903.1435.001.html>

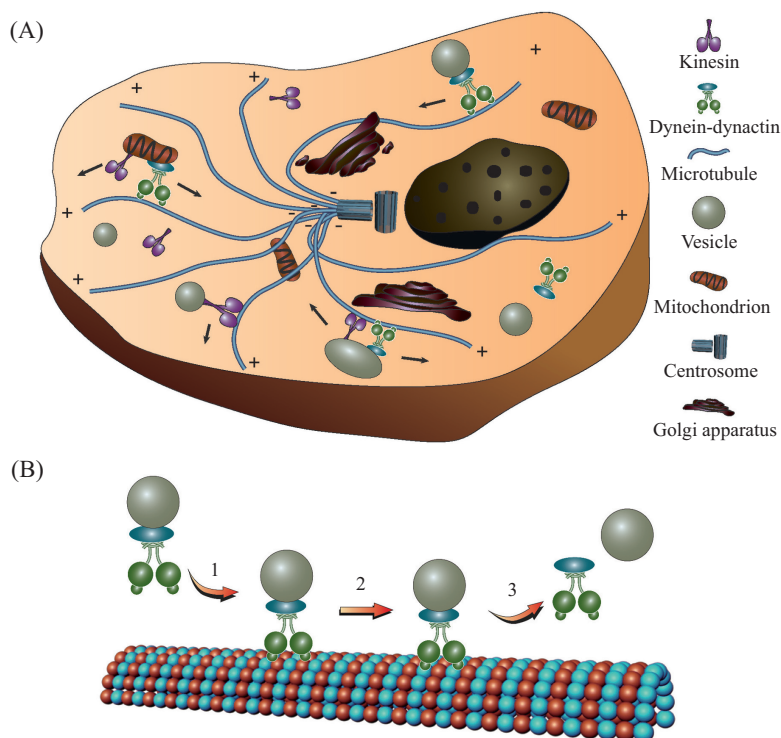
1 前言

真核细胞中通过膜结构造成的区隔化形成多种结构与功能特异的细胞器,从而得以行使复杂的生理功能。细胞器的形态和结构是动态变化的,细胞器之间、细胞器与细胞质膜之间也不断进行着物质和信息的交流。这些亚细胞膜状结构和细胞质膜以及它们之间的运输囊泡共同构成了复杂的生物膜系统,其物质交换依赖于细胞内的物质运输。细胞内的运输系统将各种需要运输的物质(货物)分拣、包装到膜状的囊泡结构中,利用被称为分子马达的蛋白复合体(molecular motor,简称motor)水解ATP产生的能量驱动携带货物的囊泡在微管或微丝细胞骨架充当的轨道上移动,能够高效精确地将各种类型的货物分子定向运输到相应的亚细胞结构,发挥其生理功能。由马达蛋白驱动的囊泡运输是细胞内物质运输的主要形式,本文对基于微管细胞骨架的囊泡运输的调控机制及其生理意义作一简略介绍。

2 囊泡运输系统的组成

囊泡运输系统的主要构件是运输轨道、马达

蛋白和货物囊泡(vesicular cargo)。在真核细胞中,本身具有极性的微丝和微管细胞骨架充当了定向运输的轨道,能沿着微丝轨道运动的马达蛋白是myosin家族成员,而沿微管轨道运动的马达蛋白分为kinesin(驱动蛋白,又称为KIF)超家族和cytoplasmic dynein(动力蛋白,简称dynein)两类。微丝和微管纤维均由头尾相连从而具有极性的蛋白多聚体构成^[1],两端不断发生蛋白质亚基的聚合和解聚^[2-3]。由于微管两端的蛋白结构不同致使其聚合和解聚常数不同, β -tubulin暴露的正端生长速率较高, α -tubulin暴露的负端生长速率较低^[3-4]。细胞内微管的聚合始于位于细胞核旁边作为微管组织中心(microtubule organization center, MTOC)的中心粒(centrosome),大部分微管的正端指向细胞外周,而负端在细胞中心/核周汇聚。在胞内物质运输领域,将从细胞中心向外周的运输定义为正向运输(anterograde transport),而将从细胞外周向中心的运输定义为逆向运输(retrograde transport)。大多数kinesin家族成员向微管正端运动,而cytoplasmic dynein向微管负端运动是基于微管的逆向运输中主要的马达蛋白(图1A)。胞内



A: 细胞内基于微管细胞骨架的运输系统; B: dynein-dynactin驱动的囊泡运输主要环节示意图。1: 货物识别; 2: 轨道运输; 3: 货物卸载。

A: the microtubule-based intracellular transport machinery; B: transport cycle of cytoplasmic dynein. 1: cargo recognition; 2: movement along microtubule tracks; 3: cargo release.

图1 基于微管的囊泡运输

Fig.1 Microtubule-based vesicular transport

运输系统将多种货物分子以囊泡的形式运送到正确的地点, 而囊泡运输是一个精确调控的过程, 其主要环节为: (1) 马达蛋白对囊泡货物的识别; (2) 马达蛋白沿着微管轨道驱动囊泡货物的定向运输; (3) 马达蛋白在靶细胞器/膜将囊泡货物卸载(图1B)。以下将对目前在这三个环节中已知的调控机制逐一进行介绍。

3 马达蛋白识别货物的机制

囊泡运输系统需要运输的货物种类繁多, 包括各种膜性细胞器如线粒体(mitochondria)、内质网(endoplasmic reticulum)、高尔基体(Golgi apparatus)、过氧化物酶体(peroxisome)、溶酶体(lysosome)以及多种囊泡结构如早胞内体(early endosome)、晚胞内体(late endosome)、回收胞内体(recycling endosome)、自噬体(autophagosome)、运输囊泡(transport vesicle)、分泌囊泡(secretory vesicle)如突触囊泡(synaptic vesicle)等。马达蛋白特异性识别、选择货物的分子机制一直是囊泡运输领域的重要科学问题。

3.1 kinesin识别货物的机制

哺乳动物基因组中有45个编码kinesin超家族成员的基因, 根据其编码蛋白产生运动性(motility)所必需的马达结构域(motor domain)序列的相似性被归类为15个家族^[5]。它们各自特有的非马达结构域的氨基酸序列赋予了各个kinesin分子特异的调控机制和/或特性功能。大多数kinesin是同源二聚体, kinesin-1是由重链(kinesin heavy chain, KHC)和轻链(kinesin light chain, KLC)组成的异源四聚体, kinesin-2家族成员以异源三聚体或同源二聚体形式存在, kinesin-3以单体或同源二聚体形式存在, kinesin-5家族成员则为同源四聚体^[6]。近年来, kinesin家族各成员所对应的货物囊泡类型陆续被鉴定出来, 它们对货物的选择性通过对货物或结合货物的介导分子(adaptor)或脚手架(scaffold)蛋白的识别来实现^[7]。例如, 在神经元细胞里KIF5(kinesin-1)家族成员通过识别Milton-Miro复合体、syntabulin和RanBP2这几种介导分子运输线粒体^[8-11]; 在神经树突内, KIF17通过其羧基端结合脚手架蛋白复合体LIN10(Mint1)-LIN2-LIN17, 从而能够转运携带神经递质受体NMDAR亚基NR2B的囊泡^[12]。KIF5则通过介导蛋白GRIP1识别并运输另一个神经递质受体

AMPA的GluR2亚基^[13]。

3.2 dynein识别货物的机制

由于胞内驱动逆向运输的马达蛋白主要是cytoplasmic dynein, 而逆向运输的货物种类繁多, 且dynein的结构远较kinesin复杂, 其识别不同货物的机制更加复杂。dynein是分子量约1.4 MDa的巨大蛋白质复合体, 含有6种共12个亚基, 其二聚化的重链具有马达蛋白活性^[14]。在dynein蛋白复合体中还分别含有两个拷贝的中链(intermediate chain, DIC)、轻中链(light intermediate chain, DLIC)及三种类型的轻链(light chain, DLC)Roadblock、Tctex及LC8^[4,15-16]。dynein发挥马达蛋白的功能需要另一个蛋白质复合体dynactin协助, 而且体外实验证明dynactin能够增强dynein在微管上运动的进行性^[17-20]。dynactin包含至少九个亚基, 其中最大的亚基p150^{Glued}的氨基端与dynein的DIC亚基结合, 从而联结这两个巨大的蛋白质复合体^[21]; 其羧基端对p150^{Glued}与膜的结合可能有调节作用^[22]。近年的研究陆续发现并鉴定了dynein-dynactin逆向运输蛋白复合体籍以识别货物的蛋白质因子, 例如亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)相关蛋白HAP-1(huntingtin-associated protein-1)和p150^{Glued}直接作用^[23], 介导神经营养因子BDNF在神经细胞内的囊泡运输^[24]; 介导某些跨膜蛋白从胞内体到高尔基体的逆向囊泡运输的蛋白质复合体retromer亚基SNX6和p150^{Glued}直接作用以连接retromer囊泡和dynein-dynactin^[25-26]; 高尔基体结合蛋白Bicaudal-D2和dynactin另一亚基p50/dynamitin直接作用^[27], 介导高尔基体到内质网的运输^[28], 并通过其与核孔复合体蛋白RanBP2作用, 将dynein和核膜相连, 介导细胞进入有丝分裂时中心粒和细胞核的定位^[29]; 晚胞内体膜上Rab7的效应分子RILP与p150^{Glued}羧基端结合以介导其逆向运输^[30], 囊泡膜表面蛋白 β III-spectrin与dynactin另一亚基Arp1结合^[31]。此外, dynein蛋白质复合体中14 kDa的轻链分子Tctex-1可与神经营养因子(neurotrophins)的膜受体Trk^[32]以及视杆细胞中的感光色素分子视紫质(rhodopsin)相结合^[33], 而轻中链分子LIC1/LIC2被发现具有将dynein蛋白复合体招募到晚胞内体和溶酶体上的功能^[34]。最近的研究发现, 早胞内体蛋白HOOK/HOOKA是dynein-dynactin的货物介导因子^[35-36]。这些dynein-dynactin复合体的亚基通过蛋白质-蛋白质相互作用使之与不同种类囊泡货物的介导分子结合, 从而将dynein锚定到

囊泡货物上。目前, 运输领域的共识是, kinesin以及dynein-dynactin通过其亚基和某些囊泡膜上的蛋白质介导分子特异性结合, 实现对囊泡货物的选择性运输。

4 马达蛋白卸载货物的机制

当马达蛋白携带囊泡货物沿着微管轨道到达靶细胞器/靶膜(target organelle/target membrane)时, 马达蛋白通过何种机制识别靶细胞器/靶膜, 将囊泡货物精确释放/卸载在正确的地点? 囊泡货物卸载的调控本质上是对于马达蛋白-囊泡货物之间相互作用的时空精确性调控, 虽然对于货物卸载机制的研究较少, 近年也取得了一定进展。

4.1 kinesin卸载货物的机制

先前的研究发现, Hsc70能够将kinesin从囊泡表面释放^[37], 提示马达蛋白与囊泡之间的相互作用是可调的。体外和体内实验结果表明, kinesin蛋白重链(kinesin heavy chain, KHC)和轻链(kinesin light chain, KLC)的磷酸化导致其与囊泡解离, 例如蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)依赖的KIF5-KLC复合体的磷酸化抑制了该马达蛋白与突触囊泡的结合^[38], 而糖原合成酶激酶GSK3(glycogen synthase kinase 3)也能磷酸化KLC, 抑制KIF5-KLC复合体与膜结合^[39]。在神经元树突中, 蛋白激酶CaMKII(Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase)通过磷酸化KIF17羧基端, 使之失去与携带NR2B的运输囊泡表面的脚手架蛋白Mint1结合的能力, 从而在突触后结构精确释放NR2B运输囊泡^[40]。研究还发现, 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路对于kinesin和囊泡货物之间的结合有调控作用。JIP1是将MAPK通路的组分MAPKKK、MAPKK和JNK组装在一起的脚手架蛋白, 同时也是kinesin-1囊泡货物的连接/介导因子^[41]。在果蝇轴突中, MAPKKK、MAPKK的激活导致kinesin-1和JIP1之间的解离和囊泡的累积^[42]; 而MAPK的突变导致了衣藻和利什曼原虫鞭毛以及线虫感觉神经元纤毛增长^[43-45], 而且MAPK突变线虫的神经元中kinesin-2在纤毛远端累积^[44], 提示MAPK对kinesin-2与其货物的解离具有调节作用。

除了kinesin本身的磷酸化, 货物介导因子的磷酸化也能够调节马达蛋白和囊泡货物的相互作用。在线虫神经元轴突中, UNC-76是kinesin-1重链的货

物介导因子, 被UNC-51磷酸化的UNC-76与突触囊泡蛋白Synaptotagmin-1结合能力增强, 而由于突变不能被磷酸化的UNC-76不能结合Synaptotagmin-1, UNC-51或UNC-76功能失活均导致kinesin-1与突触囊泡的解离, 从而引起运输障碍及突触囊泡在轴突内的堆积^[46]。

4.2 dynein卸载货物的机制

dynein蛋白复合体亚基的磷酸化也对其与货物之间的结合强度具有调节作用。在极性的上皮细胞中, dynein的轻链亚基Tctex-1第82位丝氨酸残基(Ser82)的磷酸化使之与视紫质的结合减弱, 有利于视紫质在细胞顶面的释放^[47]。

除了磷酸化修饰对于蛋白质-蛋白质相互作用的调控外, 我们最近的研究还揭示了磷脂对于蛋白质-蛋白质相互作用的调控在货物卸载中的重要意义。磷脂是生物膜的重要成分, 由于细胞内膜系统中各种磷脂的分布不同, 磷脂和Rab以及Arf GTPase家族蛋白在不同细胞器等亚细胞膜结构上的种类和浓度各异, 作为生物膜的生化属性, 它们共同组成了各种细胞器特异的识别码(identity code), 在膜运输中对于膜识别、膜融合、膜塑形及重塑等重要动态过程发挥重要的调控作用^[48]。我们发现, 在胞内体到高尔基体的逆向囊泡运输中, 与运输囊泡结合的运输复合体retromer不仅介导了货物的分选, 其亚基SNX6还通过与dynactin亚基p150^{Glued}的相互作用, 将dynein-dynactin动力蛋白复合体锚定到胞内体局部富集了穿膜蛋白货物的膜表面, 介导了运输囊泡的运输^[25]。当货物囊泡被dynein-dynactin沿着微管轨道运输到反式高尔基体表面时, 高尔基体膜富含的磷脂分子PI(4)P被SNX6的PHOX(简称PX)结构域识别; PI(4)P抑制了SNX6和p150^{Glued}的蛋白质-蛋白质相互作用, 从而促进了马达蛋白和运输囊泡之间的解离。通过这一机制, 高尔基体膜内的PI(4)P能精确调控dynein-dynactin对囊泡货物的卸载^[49]。有趣的是, 我们同时发现, PI(4)P也能抑制另一个货物介导分子SNX4与dynein之间的蛋白质互作, 并调控SNX4介导的transferrin及其受体的内吞运输^[49]。这项研究初步揭示了靶细胞器膜中的磷脂对于马达蛋白-囊泡货物相互作用的调控作用, 为囊泡运输的货物卸载调控提供了新的机制。除了已知的货物介导分子如SNX家族蛋白具有磷脂结合能力外, 某些kinesin家族蛋白也能够识别磷脂, 例如kinesin-3家

族成员KIF16B通过其PX结构域直接结合内胞体膜中的PI(3)P^[50], 另一个kinesin-3家族成员GAKIN通过PI(3,4,5)P3结合蛋白PIP3BP识别并介导膜中含有PI(3,4,5)P3的囊泡的运输^[51]。我们推测, 不仅dynein驱动的逆向囊泡运输途径受到生物膜中磷脂的调控, 而且kinesin驱动的正向囊泡运输很有可能也受到了膜脂的调控。

5 马达蛋白识别轨道的机制

5.1 微管蛋白的翻译后修饰

在囊泡运输中, 微管细胞骨架是大部分长程运输的轨道; 而在真核细胞中, 微管骨架构成了复杂的三维网络结构。马达蛋白对于轨道的选择也对运输的时空精确性调控机制有贡献。微管由微管蛋白 α -及 β -tubulin形成二聚体, 再由二聚体头尾相连组装形成原丝(protofilament)^[14], 进一步由13根原丝通过侧面的相互作用组装成为中空的管状结构^[14,16]。而 α -及 β -tubulin蛋白分子均能发生翻译后修饰, 在微管纤维上微管蛋白的多种修饰形式的组合构成了微管蛋白密码(tubulin code), 有可能被马达蛋白、微管结合蛋白(microtubule associated protein, MAP)或微管正端结合蛋白(plus end tracking proteins, +TIPs)识别^[52-53]。先前的研究发现, 某些kinesin对微管蛋白的翻译后修饰有选择性, 例如, kinesin-1选择性结合乙酰化(acetylation)^[54]和去酪氨酸化(detyrosination)的微管^[55-56], 而在神经元中由于酪氨酸化微管在胞体和树突中富集, 使kinesin-1极分化分布于轴突中^[57]。Kinesin-2及kinesin-3家族成员对乙酰化和去酪氨酸化的微管没有选择性; 然而研究发现, α -tubulin的多聚谷氨酰化(polyglutamination)对于kinesin-3家族成员KIF1A在神经元中的分布有影响, 在 α -tubulin的多聚谷氨酰化酶PGs1缺失的小鼠神经元中, KIF1A在神经轴突中分布减少, 而且KIF1A运输的突触囊泡数量在突触部位也减少^[58]。除此之外, 体外和体内实验也发现, dynein倾向于结合乙酰化微管^[59]。亨廷顿舞蹈症(Huntington disease)的一个重要特征是神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)囊泡运输在神经轴突中的减少, 由于BDNF的供给不足而导致神经元死亡。在亨廷顿舞蹈症小鼠模型中, 用催化微管去乙酰化的组蛋白去乙酰化酶HDAC6的抑制剂处理突变小鼠的皮层神经元, 能够增加微管的乙酰化程度, 还提高了BDNF囊泡

运输的速度和流量^[59]。最近, 利用酵母细胞表达纯化的微管蛋白在体外聚合形成的微管轨道, 进一步检测了马达蛋白对于微管的翻译后修饰的选择性, 证实了微管蛋白的多聚谷氨酰化增强kinesin-1及kinesin-2的进行性, 而 α -tubulin羧基端的酪氨酸抑制kinesin-2的活性, 其去酪氨酸化能提高kinesin-2的速度和进行性, 相反却抑制了kinesin-1的进行性^[60]。相比之下, dynein对微管蛋白这两种修饰均不敏感^[60]。

5.2 微管蛋白亚型

值得注意的是, α -tubulin和 β -tubulin微管蛋白家族有多个成员, 由多个基因编码, 在人类基因组中存在7个 α -tubulin和8个 β -tubulin亚型(isotype), 亚型之间在羧基端的序列有所不同^[60]。对于8种 β -tubulin亚型的比较发现, kinesin-1在TUBB7亚型微管上的运动速率最低, 其进行性在TUBB1和TUBB3亚型微管上较低; 而dynein对 β -tubulin亚型没有明显的选择性^[60]。

5.3 微管结合蛋白

微管结合蛋白也能影响马达蛋白对微管的结合能力。Tau是神经元细胞表达的一种微管结合蛋白, 细胞内过量表达Tau会减少kinesin依赖的正向囊泡运输, 造成线粒体、内质网及囊泡在细胞中心的堆积^[61-63]。体外实验发现, 结合于微管的Tau能够通过抑制kinesin与微管的结合或促进其从微管轨道解离^[64-65], 调节囊泡上与微管结合的kinesin分子数目, 而dynein与微管轨道的结合不受Tau影响^[64]。由于Tau在阿尔兹海默症(Alzheimer disease)患者神经元中表达水平升高而且分布于胞体树突部位, 研究者推测, 可能由于Tau的错误分布抑制了神经元中从胞体到轴突末梢的正向囊泡运输, 从而导致神经元的退行性病变^[61,64]。与Tau作用相反, 在果蝇卵母细胞中的微管结合蛋白Enscosin能促进kinesin-1与微管的结合及其驱动的正向运输^[66]。细胞中存在多种微管结合蛋白, 可以推测它们对马达蛋白与微管结合的调控作用将被逐步揭示。

6 马达蛋白的竞争-合作关系

由于绝大多数kinesin家族成员和dynein沿着微管向相反方向运动, 而细胞内的货物囊泡表面这两种马达蛋白往往同时存在^[67-68], 最初人们认为, 它们之间存在拮抗作用, 形象的比喻是拔河。也就是当一方驱动力下降, 朝向相反方向的运输必然增加。在体外重建的运输体系中也证明了kinesin和dynein

之间存在拔河效应^[69]。然而在果蝇S2细胞中,当kinesin或dynein通过RNA干扰技术被敲降,它们共同的囊泡货物过氧化物酶体却并不曾呈现极性分布^[70],说明kinesin或dynein对囊泡的驱动需要极性相反的马达蛋白激活。因此,马达蛋白互相依赖,它们之间存在竞争-合作(competition-coordination)关系。另外需要指出的是,dynein分子本身就是kinesin的货物,其在微管正端的分布依赖于kinesin^[71]。利用纯化的酵母蛋白进行的最新体外实验结果表明,在Lis1、Clip170和EB1等微管正端结合蛋白的协助下,kinesin能够将dynein分子沿微管运输到其位于细胞外周的正端^[72],使之能够搜索捕获需要逆向运输到细胞中心的货物。

7 囊泡运输的生理功能及其与疾病的关系

真核细胞内有多种结构功能各异的细胞器,使之能够实现各种复杂而又相互协调的生理功能。在真核细胞之间和细胞内部各种细胞器之间发生大量的物质和信息交流,而细胞内的物质运输,尤其是囊泡运输是物质信息交流的基础。生长因子和激素分泌、神经递质的释放、信号转导、细胞生长分化和稳态维持等重要生命活动均依赖高效精确的囊泡运输。例如,初级纤毛作为细胞的感觉器官,在器官发育过程中接收外界信号,通过信号转导调节细胞的增殖和凋亡。KIF3A介导鞭毛内运输(intraflagellar transport, IFT),其胚胎期的肾脏特异性敲除导致肾囊上皮细胞初级纤毛缺失,小鼠呈现多囊肾表型^[73]。

运输障碍会导致细胞功能紊乱,并与许多人类重大疾病如神经退行性疾病、发育疾病、代谢性疾病、感染与免疫缺陷等的发生发展密切相关。例如,在人类强直性截瘫(hereditary spastic paraplegia)病人家系中发现,kinesin重链KIF5A的马达结构域中存在点突变^[74];而在小鼠中,KIF5A功能缺失导致轴突中神经纤维蛋白(neurofilament)运输的障碍和外周感觉神经元退行性病变^[75]。在腓骨肌萎缩症2A1型(Charcot-Marie-Tooth disease type 2A1, CMA2A1)病人中,负责驱动突触囊泡运输的KIF1Bb马达结构域存在导致功能失活的点突变^[76-77]。在由于运动神经元轴突萎缩导致的人类远端脊延髓肌肉萎缩症(distal spinal and bulbar muscular atrophy, dSBMA)病人家系中发现了dynactin p150^{Glued}的点突变,推测运动神经元的退行性病变是由dynein-dynactin运输功

能受损造成的^[78]。而利用果蝇、小鼠等模式动物进行的研究也提示,肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、阿尔兹海默症、亨廷顿舞蹈症等疾病与神经轴突中的囊泡运输障碍有关^[24,79-83]。此外,在具有远端脊髓肌肉萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)和皮层发育异常的病人中还发现了dynein重链DYNC1H1的功能失活突变^[84-85]。在人类短肋多指(趾)综合征病人家系中发现了dynein重链(DYN2CH1)基因的点突变,由于dynein功能缺陷使鞭毛内运输受阻,胚胎发育中Sonic Hedgehog信号转导通路的重要组分Smoothened不能正确定位到初级鞭毛表面,从而影响成骨细胞扩增,进而导致骨骼发育不良^[86-87]。

8 总结与展望

虽然细胞生物学研究近年的进展使我们对于马达蛋白驱动的囊泡运输有了初步了解,但是还有很多问题尚待阐明。囊泡运输的时空精确性取决于马达蛋白-货物相互作用的调控。最近的研究提示,生物膜的物理及化学属性,包括膜曲度、膜脂及膜蛋白等生物大分子的组成,都在马达蛋白-货物相互作用的调控中发挥重要作用。将来的研究方向之一是利用体外重组的脂质体(liposome)模拟各种生物膜,包括细胞器膜的物理及化学属性,对于生物膜在囊泡运输中的作用进行深入探讨。对于生物膜的研究手段、研究方法的发展,例如更多脂分子探针、膜脂浓度调节及监测手段的出现,将有助于对生物膜物理化学属性以及动态变化规律的理解,而膜生物学的进展也将极大推动囊泡运输研究。同样,对于微管蛋白翻译后修饰研究手段的增加也将推动关于马达蛋白的轨道识别机制及其调控机理的研究,例如,发现和鉴定针对各种翻译后修饰的酶及其抑制剂。此外,在囊泡运输过程中,马达蛋白之间的竞争-协调作用对于运输的时空特异性调控至关重要,由于体外实验体系的局限,难以模拟/重现体内多轨道的空间排列格局、微管骨架动态不稳定性(dynamic instability)以及货物囊泡形状与组分的动态变化等复杂变量,需要通过高分辨率快速活细胞成像等更多的体内研究,以阐明马达蛋白之间竞争-协调作用的调控机制。最后,鉴于囊泡运输对于个体发育及功能的重要作用,尤其是囊泡运输在信号转导中通过信号分子在囊泡上的分选、富集、激活

及降解参与了信号网络的调控和整合, 对于囊泡运输与信号转导等重要细胞生理活动之间的关系进行深入探讨, 不仅有助于我们在分子细胞水平更为全面深入地了解个体发育、生长分化和稳态的调控机制, 还将为相关疾病的防治提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Weisenberg RC. Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 1972; 177(4054): 1104-5.
- 2 Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, *et al.* Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: Rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* 1988; 107(4): 1437-48.
- 3 Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 83-117.
- 4 King SM, Barbarese E, Dillman JF 3rd, Benashski SE, Do KT, Patel-King RS, *et al.* Cytoplasmic dynein contains a family of differentially expressed light chains. *Biochemistry* 1998; 37(43): 15033-41.
- 5 Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 2005; 15(9): 467-76.
- 6 Verhey KJ, Hammond JW. Traffic control: Regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(11): 765-77.
- 7 Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(10): 682-96.
- 8 Cai Q, Gerwin C, Sheng ZH. Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *J Cell Biol* 2005; 170(6): 959-69.
- 9 Cho KI, Cai Y, Yi H, Yeh A, Aslanukov A, Ferreira PA. Association of the kinesin-binding domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C determines mitochondria localization and function. *Traffic* 2007; 8(12): 1722-35.
- 10 Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL. Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 2006; 173(4): 545-57.
- 11 Wang X, Schwarz TL. The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 2009; 136(1): 163-74.
- 12 Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 2000; 288(5472): 1796-802.
- 13 Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M, *et al.* Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 2002; 417(6884): 83-7.
- 14 Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(11): 713-26.
- 15 King SJ, Bonilla M, Rodgers ME, Schroer TA. Subunit organization in cytoplasmic dynein subcomplexes. *Protein Sci* 2002; 11(5): 1239-50.
- 16 Trokter M, Mücke N, Surrey T. Reconstitution of the human cytoplasmic dynein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(51): 20895-900.
- 17 Culver-Hanlon TL, Lex SA, Stephens AD, Quintyne NJ, King SJ. A microtubule-binding domain in dynactin increases dynein processivity by skating along microtubules. *Nat Cell Biol* 2006; 8(3): 264-70.
- 18 King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2000; 2(1): 20-4.
- 19 McKenney RJ, Huynh W, Tanenbaum ME, Bhabha G, Vale RD. Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes. *Science* 2014; 345(6194): 337-41.
- 20 Schlager MA, Hoang HT, Urnavicius L, Bullock SL, Carter AP. *In vitro* reconstitution of a highly processive recombinant human dynein complex. *EMBO J* 2014; doi: 10.15252/embj.201488792.
- 21 Vaughan KT, Vallee RB. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J Cell Biol* 1995; 131(6 Pt 1): 1507-16.
- 22 Kumar S, Zhou Y, Plamann M. Dynactin-membrane interaction is regulated by the C-terminal domains of p150^{Glued}. *EMBO Rep* 2001; 2(10): 939-44.
- 23 Engelender S, Sharp AH, Colomer V, Tokito MK, Lanahan A, Worley P, *et al.* Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150^{Glued} subunit of dynactin. *Hum Mol Genet* 1997; 6(13): 2205-12.
- 24 Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, *et al.* Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 2004; 118(1): 127-38.
- 25 Hong Z, Yang Y, Zhang C, Niu Y, Li K, Zhao X, *et al.* The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150^{Glued} and mediates endosome-to-TGN transport. *Cell Res* 2009; 19(12): 1334-49.
- 26 Wassmer T, Attar N, Harterink M, van Weering JR, Traer CJ, Oakley J, *et al.* The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell* 2009; 17(1): 110-22.
- 27 Hoogenraad CC, Akhmanova A, Howell SA, Dortmund BR, De Zeeuw CI, Willemsen R, *et al.* Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J* 2001; 20(15): 4041-54.
- 28 Matanis T, Akhmanova A, Wulf P, Del Nery E, Weide T, Stepanova T, *et al.* Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol* 2002; 4(12): 986-92.
- 29 Splinter D, Tanenbaum ME, Lindqvist A, Jaarsma D, Flotho A, Yu KL, *et al.* Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* 2010; 8(4): e1000350.
- 30 Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, *et al.* Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betalll spectrin. *J Cell Biol* 2007; 176(4): 459-71.
- 31 Holleran EA, Ligon LA, Tokito M, Stankewich MC, Morrow JS, Holzbaur EL. beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem* 2001; 276(39): 36598-605.
- 32 Yano H, Chao MV. Biochemical characterization of intracellular membranes bearing Trk neurotrophin receptors. *Neurochem Res* 2005; 30(6/7): 767-77.

- 33 Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH. Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 1999; 97(7): 877-87.
- 34 Tan SC, Scherer J, Vallee RB. Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. *Mol Biol Cell* 2011; 22(4): 467-77.
- 35 Bielska E, Schuster M, Roger Y, Berepiki A, Soanes DM, Talbot NJ, *et al.* Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes. *J Cell Biol* 2014; 204(6): 989-1007.
- 36 Zhang J, Qiu R, Arst HN Jr, Penalva MA, Xiang X. HookA is a novel dynein-early endosome linker critical for cargo movement *in vivo*. *J Cell Biol* 2014; 204(6): 1009-26.
- 37 Tsai MY, Morfini G, Szebenyi G, Brady ST. Release of kinesin from vesicles by hsc70 and regulation of fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 2000; 11(6): 2161-73.
- 38 Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J* 2002; 21(3): 281-93.
- 39 Sato-Yoshitake R, Yorifuji H, Inagaki M, Hirokawa N. The phosphorylation of kinesin regulates its binding to synaptic vesicles. *J Biol Chem* 1992; 267(33): 23930-6.
- 40 Guillaud L, Wong R, Hirokawa N. Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: A molecular model of kinesin-cargo release. *Nat Cell Biol* 2008; 10(1): 19-29.
- 41 Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, *et al.* Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* 2001; 152(5): 959-70.
- 42 Horiuchi D, Collins CA, Bhat P, Barkus RV, Diantonio A, Saxton WM. Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr Biol* 2007; 17(15): 1313-7.
- 43 Berman SA, Wilson NF, Haas NA, Lefebvre PA. A novel MAP kinase regulates flagellar length in *Chlamydomonas*. *Curr Biol* 2003; 13(13): 1145-9.
- 44 Burghoorn J, Dekkers MP, Rademakers S, de Jong T, Willemsen R, Jansen G. Mutation of the MAP kinase DYF-5 affects docking and undocking of kinesin-2 motors and reduces their speed in the cilia of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(17): 7157-62.
- 45 Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2005; 55(5): 1606-15.
- 46 Toda H, Mochizuki H, Flores R 3rd, Josowitz R, Krasieva TB, Lamorte VJ, *et al.* UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes Dev* 2008; 22(23): 3292-307.
- 47 Yeh TY, Peretti D, Chuang JZ, Rodriguez-Boulan E, Sung CH. Regulatory dissociation of Tctex-1 light chain from dynein complex is essential for the apical delivery of rhodopsin. *Traffic* 2006; 7(11): 1495-502.
- 48 Behnia R, Munro S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 2005; 438(7068): 597-604.
- 49 Niu Y, Zhang C, Sun Z, Hong Z, Li K, Sun D, *et al.* PtdIns(4)P regulates retromer-motor interaction to facilitate dynein-cargo dissociation at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 2013; 15(4): 417-29.
- 50 Blatner NR, Wilson MI, Lei C, Hong W, Murray D, Williams RL, *et al.* The structural basis of novel endosome anchoring activity of KIF16B kinesin. *EMBO J* 2007; 26(15): 3709-19.
- 51 Horiguchi K, Hanada T, Fukui Y, Chishti AH. Transport of PIP3 by GAKIN, a kinesin-3 family protein, regulates neuronal cell polarity. *J Cell Biol* 2006; 174(3): 425-36.
- 52 Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(1): 71-6.
- 53 Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)* 2007; 6(17): 2152-60.
- 54 Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, *et al.* Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 2006; 16(21): 2166-72.
- 55 Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, Molina-Paris C, Cross RA, Alonso MC, *et al.* Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 7): 1085-95.
- 56 Cai D, McEwen DP, Martens JR, Meyhofer E, Verhey KJ. Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. *PLoS Biol* 2009; 7(10): e1000216.
- 57 Konishi Y, Setou M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 2009; 12(5): 559-67.
- 58 Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, *et al.* Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(9): 3213-8.
- 59 Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, *et al.* Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 2007; 27(13): 3571-83.
- 60 Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 2014; 16(4): 335-44.
- 61 Ebnet A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 1998; 143(3): 777-94.
- 62 Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 2002; 156(6): 1051-63.
- 63 Trinczek B, Ebnet A, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 1999; 112(Pt 14): 2355-67.
- 64 Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 2008; 319(5866): 1086-9.
- 65 Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(1): 87-92.
- 66 Sung HH, Telley IA, Papadaki P, Ephrussi A, Surrey T, Rorth P. *Drosophila* ensconsin promotes productive recruitment of kinesin-1 to microtubules. *Dev Cell* 2008; 15(6): 866-76.
- 67 Rai AK, Rai A, Ramaiya AJ, Jha R, Mallik R. Molecular adapta-

- tions allow dynein to generate large collective forces inside cells. *Cell* 2013; 152(1/2): 172-82.
- 68 Soppina V, Rai AK, Ramaiya AJ, Barak P, Mallik R. Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(46): 19381-6.
- 69 Derr ND, Goodman BS, Jungmann R, Leschziner AE, Shih WM, Reck-Peterson SL. Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science* 2012; 338(6107): 662-5.
- 70 Ally S, Larson AG, Barlan K, Rice SE, Gelfand VI. Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells. *J Cell Biol* 2009; 187(7): 1071-82.
- 71 Carvalho P, Gupta ML Jr, Hoyt MA, Pellman D. Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell* 2004; 6(6): 815-29.
- 72 Roberts AJ, Goodman BS, Reck-Peterson SL. Reconstitution of dynein transport to the microtubule plus end by kinesin. *eLife* 2014; 3: e02641.
- 73 Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, *et al.* Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(9): 5286-91.
- 74 Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, *et al.* A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 2002; 71(5): 1189-94.
- 75 Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, Cleveland DW, *et al.* Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol* 2003; 161(1): 55-66.
- 76 Niwa S, Tanaka Y, Hirokawa N. KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat Cell Biol* 2008; 10(11): 1269-79.
- 77 Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 2001; 105(5): 587-97.
- 78 Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, *et al.* Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 2003; 33(4): 455-6.
- 79 Devon RS, Orban PC, Gerrow K, Barbieri MA, Schwab C, Cao LP, *et al.* Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(25): 9595-600.
- 80 Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, *et al.* Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 2006; 15(2): 233-50.
- 81 Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, *et al.* A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 2001; 29(2): 166-73.
- 82 Gunawardena S, Goldstein LS. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 2001; 32(3): 389-401.
- 83 Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 2001; 414(6864): 643-8.
- 84 Fiorillo C, Moro F, Yi J, Weil S, Brisca G, Astrea G, *et al.* Novel dynein DYNC1H1 neck and motor domain mutations link distal spinal muscular atrophy and abnormal cortical development. *Human Mutat* 2014; 35(3): 298-302.
- 85 Lipka J, Kuijpers M, Jaworski J, Hoogenraad CC. Mutations in cytoplasmic dynein and its regulators cause malformations of cortical development and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(6): 1605-12.
- 86 May SR, Ashique AM, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zarbalis K, *et al.* Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* 2005; 287(2): 378-89.
- 87 Merrill AE, Merriman B, Farrington-Rock C, Camacho N, Sebald ET, Funari VA, *et al.* Ciliary abnormalities due to defects in the retrograde transport protein DYNC2H1 in short-rib polydactyly syndrome. *Am J Hum Genet* 2009; 84(4): 542-9.