

# 内体分拣转运复合体的组成及其功能研究

赵雅惠 吴旻 林福呈 刘小红\*

(浙江大学生物技术研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310058)

**摘要** 内体分拣转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)是一种能够识别并分拣泛素化蛋白质货物的蛋白复合体, 由四个亚复合体(ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III)和一些辅助成分构成。研究表明, ESCRT途径能参与病毒的出芽过程、调控细胞自噬, 并且与包括肿瘤和神经退行性疾病在内的重要疾病有关。因此, ESCRT复合体结构与功能研究对未来新型治疗药物的开发具有重要意义。该文综述了ESCRT的结构、各成员在多种生命活动中的功能、组装因子之间的互作关系以及ESCRT复合体的功能, 旨在为日后深入研究ESCRT的作用机制开辟更科学的研究方向。

**关键词** 内体分拣转运复合体; 泛素化膜蛋白; 招募; 溶酶体; 降解; 互作

## Studies on Components and Functions of Endosomal Sorting Complex Required for Transport

Zhao Yahui, Wu Min, Lin Fucheng, Liu Xiaohong\*

(State Key Laboratory for Rice Biology, Biotechnology Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Endosomal sorting complex required for transport is a kind of protein complex which can identify and sort the ubiquitinated proteins. It consists of four sub complexes which include ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III, and some auxiliary complex. Some studies show that ESCRT pathway is involved in virus budding process, the regulation of autophagy, and it is related to several important diseases including human cancer, neurodegenerative diseases and so on. Therefore, the studies on the structures and functions of the ESCRT complex are of great significance for the development of new therapeutic drugs in the future. This article summarizes the components of ESCRT, the functions of each member in a variety of life activities, the interaction between assemble factors and the function of the ESCRT complex, aiming to develop a more scientific research direction for the intensive study of mechanism of ESCRT.

**Keywords** ESCRT; ubiquitinated membrane protein; recruit; lysosome; degrade; interaction

内体分拣转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)是一种与机体肿瘤、神经变性疾病以及感染性疾病等发生发展过程相关的保守蛋白质<sup>[1]</sup>。ESCRT复合体主要参与调控泛素化膜蛋白的识别、分拣并将其转运进内体, 在细胞

内发挥着十分重要的作用。

泛素化是指泛素分子在一系列特殊酶(如泛素激活酶、结合酶、连接酶和降解酶等)的作用下, 将细胞内的蛋白质进行分类, 分拣出其中的靶蛋白分子, 并对其进行特异性修饰的过程。这种泛素化修

收稿日期: 2016-09-23 接受日期: 2016-11-14

国家自然科学基金(批准号: 31370171、31371890)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-88982183, E-mail: xhliu@zju.edu.cn

Received: September 23, 2016 Accepted: November 14, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31370171, 31371890)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88982183, E-mail: xhliu@zju.edu.cn

网络出版时间: 2017-02-10 15:53:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170210.1553.002.html>

饰过程在生物体细胞内蛋白质定位、代谢、功能和降解中发挥着重要作用。同时,它还参与了细胞增殖、分化、信号转导等几乎一切生命活动的调控过程,与肿瘤、神经变性疾病和心血管等疾病的发生有着密切的关系<sup>[1-4]</sup>。

泛素化修饰途径在蛋白质转运过程中发挥着辅助作用,它可以帮助细胞确定哪些蛋白质应该经循环途径重新回到细胞质膜上,而哪些蛋白质应该进行降解。待降解的不同种类的蛋白质最后将进入何种途径将取决于泛素化修饰作用<sup>[4]</sup>。如果某种蛋白质未经泛素化修饰(例如营养素受体蛋白等),那么它将重新循环回到质膜上;如果靶蛋白在第48位赖氨酸位点处连接多聚泛素分子,那么它将进入蛋白酶体途径被降解;而如果靶蛋白(通常指细胞质膜上的蛋白质)在第63位赖氨酸位点处连接多聚泛素分子或在多个赖氨酸位点连接单个泛素分子,那么它将通过溶酶体途径进行降解<sup>[5]</sup>。

上述泛素蛋白酶体途径和溶酶体降解途径是高等真核生物中存在的两种由泛素修饰所介导的蛋白质降解途径。其中,泛素蛋白酶体所介导的蛋白质降解是生物体调节细胞内蛋白质水平与功能的一个重要机制,该途径主要受泛素及其启动酶系统和蛋白酶体系统调控。泛素启动酶系统首先活化泛素,并促进其结合到待降解的蛋白质上,形成靶蛋白多聚泛素链(即所谓的泛素化),随后蛋白酶体系统识别泛素化的蛋白质,并在蛋白酶体的作用下将其降解,从而维持机体细胞内蛋白质水平和正常的生理功能。

此外,溶酶体降解途径是高等生物体中存在的另一种蛋白质降解途径。生物体内要维持细胞正常的新陈代谢和生理功能,需要将细胞质膜上错误折叠的蛋白质、激活的受体分子、生长因子等膜蛋白有选择地转运至溶酶体中并对其进行降解<sup>[7]</sup>。在此途径中,泛素化修饰的跨膜蛋白首先经内吞作用进入到细胞内部,细胞内的内体(endosome)通过有序招募一系列复合体蛋白将泛素化修饰的膜蛋白识别并分拣出来,从而阻止其进入循环途径重新回到细胞质膜上;然后,内体膜经变形、破裂,从而使泛素化膜蛋白分拣进入到内体中;最后,内体结构被破坏,形成包裹着上述泛素化膜蛋白的管腔内小泡(intraluminal vesicles, ILV),包裹泛素化膜蛋白的ILV与溶酶体融合之后,ILV的膜被溶酶体内的脂肪酶水

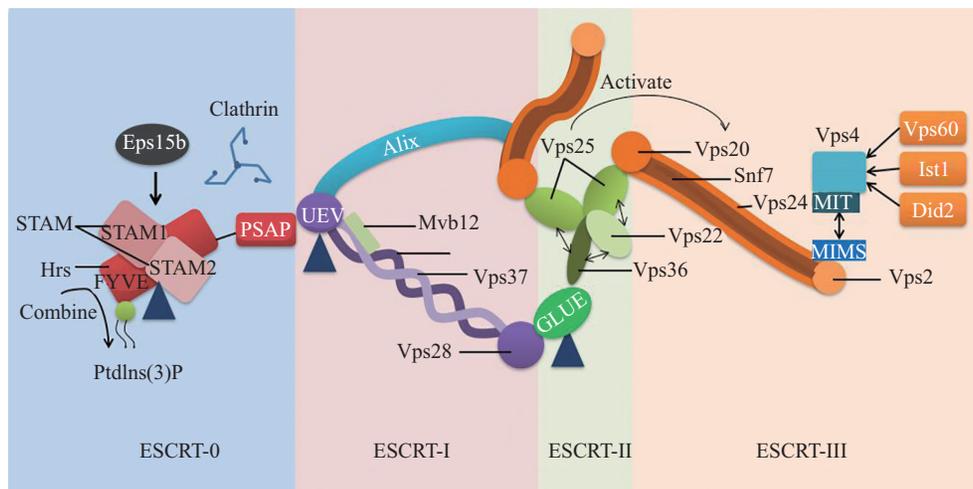
解,而暴露出的泛素化膜蛋白则被溶酶体中的蛋白酶降解。这三个过程虽然各不相同,但却相互紧密配合<sup>[5-6]</sup>。因此,ESCRT复合体与维持机体细胞内蛋白质水平和功能方面密切相关,对生物体正常新陈代谢有着十分重要的意义。本文将主要介绍ESCRT复合体的组成、识别与分拣泛素化膜蛋白的作用机制及其进入溶酶体后被降解的详细过程,以及ESCRT复合体在机体生命活动中发挥的主要功能。

## 1 ESCRT复合体的组成

ESCRT复合体主要是由四个亚复合体,即:ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III以及一些辅助成分组成,这些辅助成分主要包括Vps4(vacuolar protein sorting protein 4)、Vta1(Vps20 associated protein 1)、Ist1(increased sodium tolerance protein 1)等。ESCRT复合体的组成及各个组分间的相互作用如图1所示。在酵母中,ESCRT-0亚复合体主要包括Vps27和Hse1亚基;在多细胞动物中,ESCRT-0主要由Hrs(hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)和STAM(signal transducing adaptor molecule)亚基组成;ESCRT-I亚复合体主要由Vps23、Vps28、Vps37等亚基组成;ESCRT-II亚复合体主要包括Vps22、Vps25、Vps36三个亚基;而ESCRT-III亚复合体主要由四个亚基组成,即Vps2、Vps20、Vps24和Vps32。这些亚复合体的每个成员均在人中有同源物,这些同源是溶酶体运输所必需的。哺乳动物ESCRT-I亚复合体由Tsg101(tumor susceptibility gene 101)(与Vps23同源)、hVps28、hVps37A(与Vps37同源)和hVps37B构成。而哺乳动物ESCRT-II亚基为EAP20(Vps25)、EAP30(Vps22)、EAP45(Vps36)。ESCRT-III组分Vps2、Vps24、Snf7及Vps20分别和哺乳动物CHMP2A(charged mul-tivesicular body protein 2A)、CHMP3、CHMP4B及CHMP6同源<sup>[13]</sup>。

### 1.1 ESCRT-0亚复合体

1.1.1 ESCRT-0亚复合体的结构 ESCRT-0亚复合体主要由肝细胞生长调节因子酪氨酸激酶底物Hrs和信号转导接头分子(STAM)组成。其中,STAM主要有STAM1和STAM2。这两种分子在结构上是相关的,并且在N-端都含有功能不明的VHS(Vps27、Hrs和STAM)结构域、泛素结合结构域(ubiquitin-binding domains, UBDs)、笼形蛋白结合结构域



FYVE: 锌指模体; PtdIns(3)P: 内体脂质磷脂酰肌醇-3-磷酸; PSAP: 早老素相关蛋白; UEV: 泛素结合酶变体蛋白; GLUE: GRAM样泛素结合结构域; MIT: 微管的相互作用与转运; MIMS: MIT相互作用模体。图中列出了ESCRT的四个组分, 及其相互作用的PtdIns(3)P、去泛素化酶、Alix和Vps4。由于图片的数据来源于酵母和哺乳动物的ESCRT系统, 因此图中的部分蛋白是哺乳动物蛋白名称。

FYVE: zinc finger motif; PtdIns(3)P: lipid-phosphatidylinositol-3-phosphate; PSAP: presenilin-associated protein; UEV: ubiquitin-conjugating E2 enzyme variant; GLUE: GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45; MIT: microtubule interacting and trafficking; MIMS: MIT interacting motifs. Composition and interactions between the four ESCRTs are indicated in Fig.1. In addition, it displays the interactions with ubiquitylated cargo and accessory molecules such as PtdIns(3)P, deubiquitylating enzymes (DUBs), Alix and the ATPase Vps4. The data of the Fig.1 were obtained from studies of yeast and mammalian ESCRTs. Mammalian protein names have been used in Fig.1.

图1 ESCRT复合体的组成与相互作用(根据参考文献[5]修改)

Fig.1 Composition and molecular interactions of the ESCRT machinery (modified from reference [5])

(clathrin-binding domains)以及两个互相缠绕在一起的GAT(GGA1和TOM)结构域等<sup>[19]</sup>, 而这两个GAT结构域是ESCRT-0亚复合体的核心结构, 每一个GAT结构域又都由两个源自不同亚单位的螺旋结构组成, 反向平行的卷曲螺旋结构(antiparallel coiled-coil)将这两个GAT结构域连接在一起<sup>[7]</sup>。在ESCRT-0亚复合体中, Hrs亚基通过FYVE锌指模体(zinc finger motif)与内体脂质磷脂酰肌醇-3-磷酸[lipid phosphatidylinositol-3-phosphate, PtdIns(3)P]相结合<sup>[8]</sup>。随后, 在人体细胞中又发现了第三个与ESCRT-0亚复合体有关的蛋白质, Eps15b——此蛋白质也含有泛素结合结构域。ESCRT-0亚复合体是所有ESCRT中保守性最低的一个复合体, 所以到目前为止, 还没有在植物中发现ESCRT-0亚复合体。

表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)是ESCRT-0复合体的靶蛋白, 在哺乳动物细胞中已有详尽研究。在高浓度表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)作用下, EGFR会被泛素化修饰, 这种修饰作用既可以是在多个位点上被单个泛素分子所修饰, 也可以是在其第63位赖氨酸位点处被多个泛素分子所修饰<sup>[7-8]</sup>。这种多泛素所修饰的EGFR是ESCRT-0复合体的常见靶蛋白, 也是最

容易被降解的EGFR。

1.1.2 ESCRT-0亚复合体的功能 ESCRT-0亚复合体识别泛素化蛋白质并通过与网格蛋白相互作用将其集中到内体的微结构域中, 此相互作用过程可借助UIMs(ubiquitin-interacting motifs)和VHS(Vps27、Hrs和STAM)结构域实现。尽管ESCRT-0亚复合体中的UBDs与泛素化膜蛋白之间的亲和力比较低, 但Hrs和STAM亚基的多UBDs增强了泛素的整体亲和性, 同时还通过增加局部ESCRT-0亚复合体的浓度来增加它与泛素化膜蛋白间的亲和力, 以强化ESCRT-0亚复合体的分拣功能<sup>[5]</sup>。

ESCRT-0亚复合体作为内体分拣转运复合体最上游的启动因子, 它之所以能够被招募到内体膜, 主要是因为Hrs亚基能通过FYVE锌指模体与内体脂质磷脂酰肌醇-3-磷酸相结合<sup>[16]</sup>。Eps15b在EGFR分拣时发挥重要作用。Hrs亚基和STAM亚基能够共同识别泛素化膜蛋白, 当Hrs亚基与STAM亚基分离时, Hrs亚基被招募到内体膜上, 而当Hrs亚基与STAM亚基重新结合形成ESCRT-0亚复合体时, Hrs亚基便从内体膜上脱离下来, ESCRT-0亚复合体从内体上的聚集与解离循环对于内体蛋白质分拣过程至关重要<sup>[7]</sup>。综上, 我们可以将ESCRT-0亚复合体当成将泛

素化膜蛋白“截留”在内体膜上的过滤器<sup>[5]</sup>。

## 1.2 ESCRT-I亚复合体

1.2.1 ESCRT-I亚复合体的结构 ESCRT-I亚复合体是第一个被发现的可溶性内体分拣转运复合体, 分子量为350 kDa, 先后在酵母细胞和哺乳细胞中被发现。在酵母细胞中, ESCRT-I亚复合体由四个亚单位组成, 分别为Vps23、Vps28、Vps37、Mvb12, 并且它们的比例为1:1:1:1, ESCRT-I亚复合体包含了Vps28和Vps37的多个拷贝以及Vps23的单个拷贝<sup>[9]</sup>。目前, 已通过晶体研究方法明确了ESCRT-I亚复合体完整的生物学结构, 此亚复合体具有一个类似“帽子”的结构, 即Vps28, 此结构能够使ESCRT-I和ESCRT-II亚复合体相结合; ESCRT-I亚复合体还具有一个大约13 nm长的刚性茎结构和末端结构, 其中, 刚性茎结构是通过Vps23和Vps37它们的卷曲螺旋结构相互作用形成的<sup>[3]</sup>。末端结构中主要包含泛素结合结构域UBDs和与ESCRT-0亚复合体结合的结构域UEV, 而ESCRT-I亚复合体的UEV能与ESCRT-0亚复合体中PSAP样模体(PSAP-like motif)相结合, 这一结合加速了ESCRT-I亚复合体被招募到内体中的进程<sup>[5]</sup>。

1.2.2 ESCRT-I亚复合体的功能 ESCRT-I亚复合体能够识别多泡小体(multivesicular bodies, MVB)中泛素化蛋白质货物, 其主要功能是将泛素化膜蛋白质货物分拣出来, 并转运进入MVB中。ESCRT-I亚复合体之所以能够准确识别出待降解的泛素化膜蛋白质货物, 主要依赖Vps23中一个十分保守的UBC样结构域。ESCRT-I亚复合体与内体膜相关, Vps4失活可以使ESCRT-I亚复合体与内体结合得更加稳定<sup>[9-10]</sup>。

## 1.3 ESCRT-II亚复合体

1.3.1 ESCRT-II亚复合体的结构 ESCRT-II亚复合体是分子量为155 kDa的可溶性蛋白, 主要由E类Vps蛋白质Vps22、Vps25、Vps36组成; 酵母ESCRT-II亚复合体整体构造研究表明其由八个重复的“翼状螺旋(winged-helix, WH)”结合结构域组成。ESCRT-II亚复合体核心部分呈三叶形, 主要由Vps25的两个拷贝、Vps22的一个拷贝和Vps36的C-端区域形成<sup>[11]</sup>。

其中, Vps25负责招募ESCRT-III亚复合体中Vps20, 从而使ESCRT-II亚复合体能够直接与下游的ESCRT-III亚复合体相结合, 此过程并不需要Vps22突出的N-端卷曲螺旋。此外, Vps25的两个PPXY模

体参与了Vps22和Vps36之间的结合<sup>[12-13]</sup>。Vps36 N-末端含一断裂的普列克底物蛋白同源结构域(split pleckstrin homology domain), 此结构域能与内体膜上的3-磷酸肌醇(3-phosphorylated phosphoinositides)相结合。在Eap45中称此结构域为GRAM样泛素结合结构域(GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45, GLUE), 在酵母细胞中GLUE结构域含有两个插入的NZF锌指结构, 其中一个锌指结构能与泛素相结合, 另一个能与Vps28相结合<sup>[20]</sup>。因此, Vps36 N-端既能与泛素相结合, 还能通过紧邻其GLUE结构域C-端的一螺旋结构结合ESCRT-II亚复合体与ESCRT-I亚复合体中Vps28 C-端的结构域。研究发现, 除了Vps36的GLUE结构域能与脂质相结合, Vps22中的第一个螺旋结构也能以特异性较低的方式与脂质相结合, 这种结合作用很可能有助于ESCRT-II亚复合体募集到内体膜上<sup>[5]</sup>。

1.3.2 ESCRT-II亚复合体的功能 ESCRT-II亚复合体通过与内体膜的瞬间接触来启动ESCRT-III亚复合体的形成, 其中ESCRT-II亚复合体中的Vps25负责启动招募并活化ESCRT-III亚复合体中的Vps20。Vps20在信号刺激下其N-端首先发生了豆蔻酰化(myristoylated), 经过修饰并直接结合到内体膜上, 启动ESCRT-III亚复合体其余蛋白质依次招募到内体上, 完成MVB分拣的最后一步<sup>[12-13]</sup>。

## 1.4 ESCRT-III亚复合体

1.4.1 ESCRT-III亚复合体的结构 在酵母中, ESCRT-III亚复合体由四个核心亚基(Vps20、Snf7、Vps24和Vps2)和三个调节亚基(Did2、Vps60和Ist1)组成<sup>[13]</sup>, 所有的这七个亚基在MVB生物合成中共同发挥作用<sup>[6]</sup>。与ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II亚复合体不同, ESCRT-III亚复合体是以单体形式在细胞质基质中存在, 只有当这些亚基在内体膜上有序组装时才能发挥其蛋白质分拣转运功能。这七个亚基具有相似的结构特征, 即N-端一般都富含碱性残基、酸性C-端以及一个或多个卷曲螺旋结构区域<sup>[13]</sup>。

一些带电荷的小分子亚基以高度有序的方式在内体上组装并形成分子量为450 kDa的复合物, 即所谓的ESCRT-III亚复合体。这些亚稳态(metastable)的亚单位通过自身C-端的自动抑制区(autoinhibitory)与N-端发生相互作用, 起到了稳定亚单位自身的作用, 保持它们处于失活的状态。在单体亚单位进行组装时, 会通过构象改变来阻断其自

身的抑制作用,使其与其他亚单位进行结合<sup>[13-14]</sup>。酵母细胞生化实验结果表明,酵母细胞ESCRT-III亚复合体的组装过程按照一种连续且十分有序的方式进行,即一个亚单位激活另一个亚单位,按此方式依次激活下去<sup>[14]</sup>。最初将这些亚单位组装到内体膜上的是Vps20, Vps20能与ESCRT-II亚复合体中的Vps25相结合,而Vps25能招募并活化Vps20,因此,当接受到信号刺激时, Vps20的N-端首先发生了豆蔻酰化,经过修饰使其能够直接结合到内体膜上。ESCRT-II亚复合体中含有两个Vps25,每个ESCRT-II亚复合体能招募两个ESCRT-III亚复合体到内体膜上;随后, Vps20直接结合ESCRT-III亚复合体中的Snf7,使得Snf7聚集形成丝状寡聚体, Vps24覆盖这个寡聚体;最后, Vps2与Vps24共同招募ATP酶Vps4<sup>[5]</sup>。

**1.4.2 ESCRT-III亚复合体的功能** ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III亚复合体在内体膜上的连续活动对于分拣泛素化膜蛋白到溶酶体中意义重大, ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II亚复合体以预先形成复合体的形式被招募到内体膜上,而ESCRT-III亚基Vps20、Snf7、Vps24和Vps2只有组装成复合体后才能被招募到内体膜上<sup>[16]</sup>。

尽管每个亚基在生物化学和结构上具有相似性,但是每个亚基都行使着其特定的生物学功能<sup>[15]</sup>。Vps20亚基能使Snf7在内体上进行短暂地聚集,形成Snf7寡聚物,是ESCRT-III亚复合体主要的结构单位。体内定量实验表明, ESCRT-III亚复合体中有至少50%的成分来源于Snf7寡聚物。同时, Snf7在内体上的短暂聚集整合了MVB途径中的货物蛋白质。Vps24通过招募Vps2来终止Snf7的聚合, Vps4的N-端MIT(microtubule interacting and trafficking)区域与Vps2的MIMs(MIT-interacting motifs)之间的互作(通过AAA-ATP酶Vps4解离短暂的ESCRT-III亚复合体)对于MVB分拣意义非凡<sup>[11-15]</sup>。

由于Snf7寡聚物在内体上起到隔离泛素化货物蛋白质的作用,因此, Snf7有规则的寡聚化对于隔离货物蛋白质有着重要作用,从而传递泛素化蛋白。所以, ESCRT-III亚复合体在内体上的有序组装与拆卸是MVB分拣过程的最后一步。此外,酵母双杂交和生化实验研究表明,当ESCRT-III亚基以高浓度存在时,或在体内过表达的情况下,它们可以通过寡聚甚至在质膜处形成长丝来抑制病毒的出芽和内体的功能<sup>[11]</sup>。

## 1.5 辅助成分

Vps4属于AAA-ATP酶蛋白家族,通过其N-端MIT区域与ESCRT-III的Vps2亚基C-端MIMs结合, MIT-MIMs的结合连接了Vps4和ESCRT-III亚复合体<sup>[2]</sup>;在ESCRT-III亚复合体的解离过程中, Vps4会结合LIP5,其中LIP5是作为Vps4组装和ATP酶活性的活化剂,而Vps4的聚集过程与活性则受到两个ESCRT-III样复合物Ist1-Did和Vta1-Vps60的调控<sup>[16]</sup>。

Vps4在进化上十分保守,酵母中只有一个Vps即Vps4P,人类中有两个Vps(分别为Vps4A和Vps4B)。Vps4在泛素化蛋白质分拣转运过程中能使短暂组装的ESCRT-III亚复合体从内体上分离下来,使得它们回到细胞质基质中被重复利用<sup>[2]</sup>。

## 2 ESCRT的功能

### 2.1 ESCRT复合体各成员间的互作

通过酵母双杂交分析,研究了ESCRT复合体各成员间的互作。ESCRT-I含有四个可溶的卷曲螺旋蛋白,与其他三个亚复合体均可发生互作。ESCRT-I亚复合体中的Vps28亚基能够使ESCRT-I和ESCRT-II亚复合体相结合,从而与下游的ESCRT-II亚复合体互作;其次,该亚复合体的末端结构通过UEV与ESCRT-0亚复合体中PSAP样模体相结合,形成与上游ESCRT-0亚复合体的互作<sup>[17]</sup>;ESCRT-I亚复合体还可通过Alix与ESCRT-III相联系。鉴于上述结论可知,ESCRT-I亚复合体在整个招募过程中起着至关重要的作用。此外,在ESCRT-II复合体中, Vps22、Vps25和Vps36间两两均可发生互作;ESCRT-III Vps20亚基(或人的同源物)和ESCRT-II亚复合体的每个组分都存在互作,其中,最为直接的互作即是ESCRT-II亚复合体中的Vps25和ESCRT-III亚复合体的Vps20之间的互作<sup>[21]</sup>。

### 2.2 内体蛋白质分拣转运过程

ESCRT-0、I、II、III亚复合体被有序地招募到内体膜上,内体分拣转运复合体ESCRT中各个成员是按顺序来行使蛋白质分拣的功能。首先由ESCRT-0亚复合体识别泛素化膜蛋白,将其“截留”在内体膜上,再由下游的ESCRT-II行使功能,而ESCRT-III主要完成MVB分拣过程中的最后一步。在ESCRT-III亚复合体执行完MVB分拣过程中的任务时,AAA型ATP酶Vps4使短暂组装的ESCRT-III亚复合体从内体上解离下来,重新回到细胞质基质中,

并以单体的形式存在,从而进入下一轮的蛋白质分拣过程<sup>[17-20]</sup>。

与ESCRT-0亚复合体不同,ESCRT-I、II亚复合体都只含有一个泛素结合结构域,因此,这两个亚复合体都不太适合担任蛋白分拣的工作,只有当ESCRT-0亚复合体作为内体膜上的“过滤器”将泛素化膜蛋白分拣出来后,才能各自发挥自身的作用<sup>[5]</sup>。那么泛素化的膜蛋白是如何从一个ESCRT亚复合体转运到另一个ESCRT亚复合体的呢?众所周知,ESCRT-0、I、II亚复合体的泛素结合结构域都能与泛素分子第44位异亮氨酸位点的疏水区域相结合,因此,很可能是通过这样的方式依次在各个ESCRT亚复合体间进行传递<sup>[5]</sup>。

### 2.3 主要功能

在最初的研究中,我们只发现内体分拣转运复合体ESCRT在多泡体形成及机体蛋白质货物降解过程中发挥着重要的作用,对酵母和哺乳动物进行大量的研究后发现,ESCRT在有机体的各种生命过程中都扮演着十分重要的角色,具体包括胞质分裂、病毒出芽、细胞质膜损伤的修复、自体吞噬、细胞自噬、信号转导调控和核膜重塑及膜变形等<sup>[4]</sup>。同时,ESCRT在人体肿瘤及一些神经退行性疾病的发生与发展中也发挥着功能,与人类健康相关<sup>[16-20]</sup>。

**2.3.1 ESCRT参与胞质分裂** 在胞质分裂后期,两个子细胞之间会产生中间体,随着中间体被剪断,两个子细胞彻底分离,从而完成胞质分裂过程。最近的研究表明,Alix(为酵母细胞Bro1的同源蛋白质)能结合ESCRT-III的亚基CHMP4b和ESCRT-I的Tsg101,而中心体蛋白CEP55可以与Alix和Tsg101发生互作,使得ESCRT-I、ESCRT-III亚复合体的成员以及Vps4被招募到中间体上,随后形成多聚体纤维束,最后在微管切割酶的作用下,通过与ESCRT-III亚复合体中的CHMP1b互作被招募到中间体处发挥剪切微管的作用<sup>[4]</sup>。胞质分裂过程并不需要ESCRT-0和ESCRT-II的参与,但ESCRT-II亚复合体中Vps25的过度表达将会对胞质分裂过程有抑制作用,因此,ESCRT-II在胞质分裂过程中也发挥着其特定的功能。

**2.3.2 ESCRT参与病毒出芽** ESCRT诱导芽颈部质膜变形并向内形成出芽小泡,在普通病毒和逆转录病毒出芽中发挥了重要的作用<sup>[1-3]</sup>。Vps4和Alix参与了病毒出芽过程,各种病毒结构蛋白质的“后期结构域(late domain)”都含有三个替代序列,即PPXY、

P(S/T)AP和LYPXL,并且这三个序列分别能与泛素连接酶、Tsg101和Alix相结合。首先,泛素结合Tsg101,将ESCRT-I亚复合体招募到包膜上,随后ESCRT-I亚复合体招募ESCRT-III亚复合体,这一过程的实现主要是通过两种方式:直接招募和由Alix介导招募<sup>[5]</sup>。

**2.3.3 ESCRT参与细胞膜损伤修复** 类似于多泡体囊泡的形成过程,细胞膜的损伤也能通过相似的机制得到修复。当细胞膜受损时,会引起细胞内钙离子浓度的增加,从而促使ESCRT-III亚复合体、Vps4和Alix被招募到受损处,最终完成细胞膜的修复作用<sup>[3-4]</sup>。

**2.3.4 ESCRT参与自体吞噬** 自体吞噬是指细胞质包裹着各种聚集的蛋白质,受损伤的细胞器或者入侵的微生物后被双层膜结构包裹从而形成吞噬泡,吞噬泡不断聚集形成自体吞噬小体的过程。自体吞噬小体经过运输与溶酶体相融合,在脂肪酶作用下水解双层膜,同时暴露出内容物,内容物在溶酶体中某些酶的作用下降解,整个过程可以被看作是溶酶体降解途径<sup>[21-22]</sup>。

HOPS(homotypic fusion and protein sorting)复合体(与细胞自噬相关的复合体)能调控自体吞噬小体与溶酶体之间的融合,也能控制内体与溶酶体之间的融合,Vps18是HOPS装置的组分,它能与ESCRT-0和ESCRT-I亚复合体分别发生互作,从而促进蛋白质的降解,维持细胞内正常代谢水平<sup>[5-9]</sup>。

**2.3.5 ESCRT参与细胞自噬** 细胞自噬是指当缺乏营养或细胞器受损时,细胞内的可溶性蛋白质及受损蛋白质和细胞器被自噬小泡包裹后形成自噬体,最后与溶酶体相融合并在各种酶的作用下被降解的过程。与自体吞噬过程大致相同,只是自噬需要多囊泡体的参与。多囊泡体最开始被认为参与非选择性自噬,但近期研究表明,它也能参加一些细胞选择性自噬,并且ESCRT也参与其中<sup>[4-5]</sup>。

**2.3.6 ESCRT调控信号转导** EGFR本身具有酪氨酸激酶活性,一旦与EGF组合可启动细胞核内有关基因,促进细胞分裂增殖。若EGFR过度表达,则会引发一些癌症如胃癌、膀胱癌和乳腺癌等。因此,调控EGFR的表达对于机体免受重大疾病的困扰具有重要的意义<sup>[7-8]</sup>。

EGFR是ESCRT-0亚复合体的靶蛋白,在高浓度EGF作用下,EGFR会被泛素修饰,这种修饰作用既

可在多个位点上进行单泛素化修饰,也可在其第63位赖氨酸位点处进行多泛素化修饰<sup>[7]</sup>。当EGFR与配体结合后,受体会二聚化,这对于改变配体和受体间的高亲和力状态以及受体在分子间转导磷酸化信号都至关重要<sup>[4]</sup>。

具体来说,EGFR的下调和随后的降解涉及两个依赖泛素的膜出芽步骤如下。第一步,包含泛素化膜受体的质膜向内出芽形成囊泡,这个囊泡随后便被运输到内体中。第二步,内体膜出芽离开细胞质基质,在内体内形成囊泡。随着内体中囊泡的积累,内体便形成多泡体(MVB)的形态,MVB的限制性膜与溶酶体膜相融合后暴露出内部囊泡到溶酶体中,最后在脂肪酶与蛋白酶的作用下降解泛素化蛋白质<sup>[23]</sup>。

**2.3.7 ESCRT参与核膜重塑** 与胞质分裂相似,在核膜形成与重塑的过程中也需要将纺锤体微管切断。虽然ESCRT参与核膜重塑的详细作用机制,目前尚未研究清楚,但以上研究结果已经初步证明了ESCRT在核膜重塑过程中发挥了作用。ESCRT-III亚复合体、Vps4和Spastin三者相互协调,共同调控细胞分裂后期核膜的重塑过程<sup>[4]</sup>。

**2.3.8 ESCRT参与膜变形** ESCRT能介导芽颈部细胞质表面的膜变形。最初认为,ESCRT作为参与酵母多泡体囊泡的生物合成的影响因子,如今已经证实,它还具有引起哺乳动物其他膜变形的功能,包括包膜病毒出芽和胞质的脱落以及在逆转录病毒出芽中起着关键的作用<sup>[13]</sup>。

总之,ESCRT复合体对于细胞表面受体下调、艾滋病毒的出芽以及胞质分裂等是关键。因此,ESCRT复合体参与不同的发育过程,并且它的功能障碍导致许多神经变性的疾病<sup>[11]</sup>。

## 2.4 ESCRT与人类疾病

ESCRT在人体肿瘤及一些神经退行性疾病的发生与发展中也发挥着功能。一方面,ESCRT与癌症相关,例如,ESCRT-I中Tsg101是一种肿瘤抑制因子,Tsg101水平降低后,小鼠癌细胞数量增加并发生转移。ESCRT-I中还存在另一种肿瘤抑制因子,即Vps37A,它的表达能明显降低肝癌细胞的数量。此外,在胰腺肿瘤中ESCRT-III亚复合体的核心亚基CHMP1A基因转录水平和蛋白质水平显著下调等,这些都表明,ESCRT与癌症的发生有重大关系<sup>[22]</sup>。另一方面,ESCRT突变引起机体缺失细胞自噬能力

并引发神经退行性疾病。最近研究表明,当ESCRT-I的核心亚基Hrs缺失时,小鼠细胞中泛素化蛋白质可在中枢神经系统积累,从而引起神经退行性疾病,具体表现为小鼠学习能力及反应能力均明显下降<sup>[4]</sup>。

## 3 展望

通过结构生物学,已经了解到内体分拣转运复合体ESCRT的主要结构及其功能,明确了各个成员之间的互作关系。但是,关于ESCRT-III亚复合体在内体上有序组装的机理仍在研究当中;内体膜向内凹陷并形成ILV(intraluminalvesicles)结构的原因也尚未明了;泛素化蛋白质货物与ESCRT各个成员之间进行互作的方式也不明确;在ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III亚复合体与泛素之间的亲和力相近的情况下,泛素是通过何种方式才能从一个亚复合体转移到另一个亚复合体中也无相关阐述。这些问题仍需要我们去继续探索,为未来ESCRT相关的功能研究奠定坚实的理论基础<sup>[5-6]</sup>。

MVB生物合成、包膜病毒出芽及胞质分裂过程中ESCRT功能的比较研究已经阐明了ESCRT途径的复杂性。然而,我们仍然需要更深入的研究来阐明不同ESCRT因子的确切作用以及不同生物过程对ESCRT因子的选择性需求。ESCRT途径已经与人的几类重要疾病联系到一起,包括肿瘤、神经退行性疾病和传染病。更好地理解这些疾病对ESCRT因子的差异需求,可能有助于最小副作用的治疗药物的研究进展<sup>[6]</sup>。

## 参考文献 (References)

- 1 李朝飞,田宏光,刘同先.内吞体分拣转运复合体(ESCRT)及其在包膜病毒出芽中的作用.生物工程学报(Li Chaofei, Tian Honggang, Liu Tongxian. Cellular ESCRT complex and its roles in enveloped viruses budding. Chinese Journal of Biotechnology) 2012; 28(9): 1031-7.
- 2 夏恒传,张春霞.多囊体生物发生和蛋白质分拣-ESCRT、Vps4、Ubiquitination一个都不能少.生物化学与生物物理进展(Xia Hengchuan, Zhang Chunxia. Biogenesis of multi-vesicular body and protein sorting: No one of ESCRT, Vps4 and ubiquitination can be missed. Progress in Biochemistry and Biophysics) 2013; 40(2): 103-17.
- 3 于乾龙.宿主细胞ESCRT-I复合体在杆状病毒AcMNPV出芽病毒粒子侵染中的作用(硕士论文).西北农林科技大学(Yu Qianlong. Functional roles of host cellular ESCRT-I complex in AcMNPV budded virions infection. North West Agriculture and Forestry University), 2014.
- 4 邵丹丹,夏恒传.多功能分子机器ESCRT的研究进展.江苏

- 大学学报(Shao Dandan, Xia Hengchuan. Research progress of multifunctional molecular machine ESCRT. Journal of Jiangsu University) 2016; 26(4): 1671-7,83.
- 5 Camilla R, Harald S. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 2009; 458(7237): 445-52.
- 6 Eiji M. Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division. *FEBS J* 2012; 8(279): 1399-406.
- 7 Kojima K, Amano Y, Yoshino K, Tanaka N, Sugamura K, Takeshita T. ESCRT-0 protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) is targeted to endosomes independently of signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the complex formation with STAM promotes its endosomal dissociation. *J Biologi Chem* 2014; 289(48): 33296-310.
- 8 Lee J, oh KJ, Lee D, Kim BY, Choi JS, Ku B, Kim SJ. Structural study of the HD-PTP Bro1 domain in a complex with the core region of STAM2, a subunit of ESCRT-0. *PLoS One* 2016; 11(2): e0149113.
- 9 Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001; 106(2): 145-55.
- 10 Mamińska A, Bartosik A, Banach-Orłowska M, Pilecka I, Jastrzębski K, Zdżalik-Bielecka D, *et al.* ESCRT proteins restrict constitutive NF- $\kappa$ B signaling by trafficking cytokine receptors. *Sci Signal* 2016; 9(411): ra8.
- 11 Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 2002; 3(2): 283-9.
- 12 Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Cell Biol* 2008; 20(1): 4-11.
- 13 Teo H, Perisic O, González B, Williams RL. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: Crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell* 2004; 7(4): 559-69.
- 14 Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev Cell* 2002; 3(2): 271-82.
- 15 Teis D, Saksena S, Emr SD. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* 2008; 15(4): 578-89.
- 16 Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Cell Biol* 2011; 23(4): 452-7.
- 17 黄欢, 李万杰, 杨东. ESCRT系统: 一个多功能的蛋白转运及膜剪切机器. *中国生物化学与分子生物学报*(Huang huan, Li Wanjie, Yang Dong. ESCRT system: A multifunctional machine for protein trafficking and membrane scission. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2013; 29(2): 99-109.
- 18 Sun S, Sun L, Zhou X, Wu CF, Wang RN, Lin SH, *et al.* Phosphorylation-dependent activation of the ESCRT function of ALIX in cytokinetic abscission and retroviral budding. *Dev Cell* 2016; 37(6): 331-43.
- 19 Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012; 22(4): 116-20.
- 20 Olmos Y, Carlton JG. The ESCRT machinery: New roles at new holes. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 38: 1-11.
- 21 William M, Nicholas J, Buchkovich Scott D. The ESCRT pathway. *Dev Cell* 2011; 21: 77-91.
- 22 Daniel Metcalf, Adrian M. Isaacs. The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem Soc Trans* 2010; 38(6): 1469-73.
- 23 Mageswaran SK, Dixon MG, Curtiss M, Keener JP, Babst M. Binding to any ESCRT can mediate ubiquitin-independent cargo sorting. *Traffic* 2014; 15(2): 212-29.