

李巍, 博士, 首都医科大学附属北京儿童医院教授, 博士生导师。于1997年获中山医科大学医学遗传学博士学位, 2004年获美国纽约州立大学Buffalo分校生物信息学硕士学位。1999~2004年在美国RoswellPark肿瘤研究所从事博士后研究。2005年入选中国科学院“百人计划”。2005年获国家杰出青年科学基金。2009年入选“新世纪百千万人才工程”国家级人选。李巍团队主要研究因囊泡运输障碍导致的遗传代谢疾病、心血管疾病、神经精神疾病等的发病机制, 取得了重要创新性研究成果。以Hermansky-Pudlak综合征(HPS)小鼠为模型, 研究HPS相关基因导致出血、白化病、神经精神疾病和免疫缺陷的发生机制。HPS是由于一类被称为溶酶体相关细胞器的发生缺陷而导致的多组织器官受累的综合征。例如, 由于黑色素体的发生缺陷导致色素生成障碍, 引起白化病; 由于血小板致密颗粒的缺乏导致出血; 由于血管内皮的Weibel-Palade小体的缺陷导致vWF的分泌缺陷, 引起凝血功能障碍; 由于大致密核心颗粒或突触囊泡的缺陷导致神经内分泌功能紊乱。相关论文发表在*Nature Genetics*、*Journal of Cell Biology*、*eLife*、*Autophagy*、*PLoS Genetics*、*Oncogene*、*Journal of Cell Science*、*Traffic*、*Journal of Biological Chemistry*等杂志上。

囊泡运输的分子细胞机制

陈元颖 郝振华 李巍*

(首都医科大学附属北京儿童医院, 国家儿童医学中心, 北京市儿科研究所, 北京 100045)

摘要 内膜系统构成了细胞及细胞器之间的天然屏障, 保证重要的生命活动在相对独立的空间内进行。细胞内膜性细胞器之间的物质(如蛋白质、脂类)的运输主要是通过囊泡完成的。囊泡运输需要货物分子、运输复合体、动力蛋白和微管等的参与以及多种分子的调节, 包括出芽、锚定和融合等过程。从上世纪60年代开始, 人们认识到细胞分泌的蛋白需要先进入内质网, 再到高尔基体, 然后分泌到其作用部位。之后, 信号肽假说被提出和证明。随后的研究完善了囊泡运输的过程, 包括经内质网到高尔基体的蛋白质分泌运输过程中关键的调控基因及其作用环节、蛋白质复合物SNARE(可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感的融合蛋白附着蛋白受体)在囊泡锚定和融合中的作用机制等。在囊泡运输中的具有代表性的神经细胞突触囊泡中, 触发突触囊泡融合的钙感受器(synaptotagmin)能快速准确地将钙信号传递到突触囊泡, 通过与SNARE复合体等作用, 实现与细胞膜融合并释放神经递质, 最终完成神经信息的传递。该文从囊泡运输的研究历史回顾、已有研究成果以及未来展望等三个方面对囊泡运输分子细胞机制进行了阐述。

关键词 囊泡; 囊泡运输; 囊泡融合; 囊泡分泌

Molecular and Cellular Mechanism of Vesicle Trafficking

Chen Yuanying, Hao Zhenhua, Li Wei*

(Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing Pediatric Research Institute, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China)

*通讯作者。Tel: 010-5961-6628, Fax: 010-5971-8699, E-mail: liwei@bch.com.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-5961-6628, Fax: +86-10-5971-8699, E-mail: liwei@bch.com.cn

网络出版时间: 2018-12-29 14:18:30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20181229.1418.004.html>

Abstract Endomembrane system constitutes natural barriers between cells and organelles to ensure that important life activities are regulated in compartments. The transport of cargoes such as proteins and lipids between membrane-bound organelles in cells is mainly mediated by vesicles. Vesicle trafficking requires the involvement of cargoes, transport complexes, motor proteins and microtubules, as well as many regulators in the process of vesicle budding, docking and fusion. Since 1960s, the secretory pathway had been characterized by several key steps, firstly synthesizing in the endoplasmic reticulum, then entering into the Golgi apparatus and transporting soluble and membrane proteins to their appropriate destination in the cell. Later on, the signal peptide hypothesis was proposed. Further investigations have gained insights into the details of vesicle trafficking, including the discovery of key regulatory genes and their roles in the protein transport pathway from ER to Golgi, the role of SNAREs (soluble *N*-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptors) in vesicle docking and fusion. In the neuronal synaptic vesicles, a typical model in vesicle trafficking, a calcium-binding protein (synaptotagmin) triggers synaptic vesicle fusion. Synaptotagmin transmits calcium signals to synaptic vesicles which fuse with plasma membrane to release neurotransmitters through its interaction with SNARE complexes. Here we reviewed the molecular and cellular mechanism of vesicle trafficking by mainly focusing on three aspects, the history of studying vesicular trafficking, the current progress of this field and the future prospects.

Keywords vesicle; vesicle trafficking; vesicle fusion; vesicle secretion

1 历史回顾

生物膜构成了细胞及细胞器之间的天然屏障,使得一些重要的生命活动能在相对独立的空间内进行,由此产生了细胞之间、细胞器之间的物质、能量和信息交换的过程。细胞内的膜性细胞器之间的物质运输(如蛋白质、脂类),主要是通过囊泡(vesicle)完成的。囊泡是由单层膜所包裹的膜性结构,从几十纳米到数百纳米不等,主要司职细胞内不同膜性细胞器之间的物质运输,称之为囊泡运输(vesicle trafficking)(图1)^[1]。细胞内的囊泡有很多种,按结构特征可以分为包被囊泡(coated vesicle)和无包被囊泡(uncoated vesicle)两类;按生理功能可分为转运囊泡、储存囊泡、分泌囊泡等。通过囊泡运输的物质主要有两类:一类是囊泡膜上的膜蛋白和脂类等,参与细胞器的组成与特定的细胞功能(如细胞代谢和信号转导等);另一类是囊泡所包裹的内含物,如神经递质、激素、各种酶和细胞因子等,这些物质可参与蛋白质或脂类的降解或剪切功能等,或者分泌到细胞外调节自身或其他细胞的功能。

囊泡运输既是生命活动的基本过程,又是一个极其复杂的动态过程,在高等真核生物中尤其如此,涉及到许多种类的蛋白质和调控因子。囊泡运输一般包括出芽(budding)、转运(trafficking)、锚定(docking)和融合(fusion)等过程,需要货物分子、运输复合体、动力蛋白和微管等的参与以及多种分子

的调节(图2)。

在传统细胞生物学中,对各种细胞器的描述往往以静态结构为主。随着近年来活细胞成像、超高分辨显微成像等技术的发展,人们对细胞器的认识已上升到动态的层面,即各种类型的细胞器虽然分别局限在特定分区内完成细胞的某些生理功能,但细胞器之间也在发生不断的物质交换,以保障细胞器的稳态和发挥其正常功能。细胞内经囊泡运输的成千上万种货物,究竟是怎样被标记和识别,再精确地运送到特定的地点并卸载的呢?囊泡运输过程是如何被精细地调控而有条不紊地进行的?另外,一旦这个运输过程发生紊乱,对细胞又将产生什么样的后果?这些都是需要解决的问题。

囊泡运输的研究主要始于20世纪60年代,Palade等^[2]发现,细胞分泌的蛋白需要先进入内质网,再到高尔基体,然后分泌到胞外。这个细胞分泌途径的重大发现,使他获得了1974年诺贝尔生理学或医学奖。尽管如此,这个分泌途径的细节并不清楚。Blobel^[3]进一步提出了分泌蛋白进入内质网的信号肽学说,并因此获得了1999年诺贝尔生理学或医学奖。之后获得2013诺贝尔生理学或医学奖的三位科学家,分别在该领域作出了杰出的贡献。Schekman所领导的课题组^[4]以酵母为研究材料,通过遗传学筛查以及生物化学方法,发现了参与蛋白质分泌运输过程中经内质网到高尔基体运输过程中的50多个

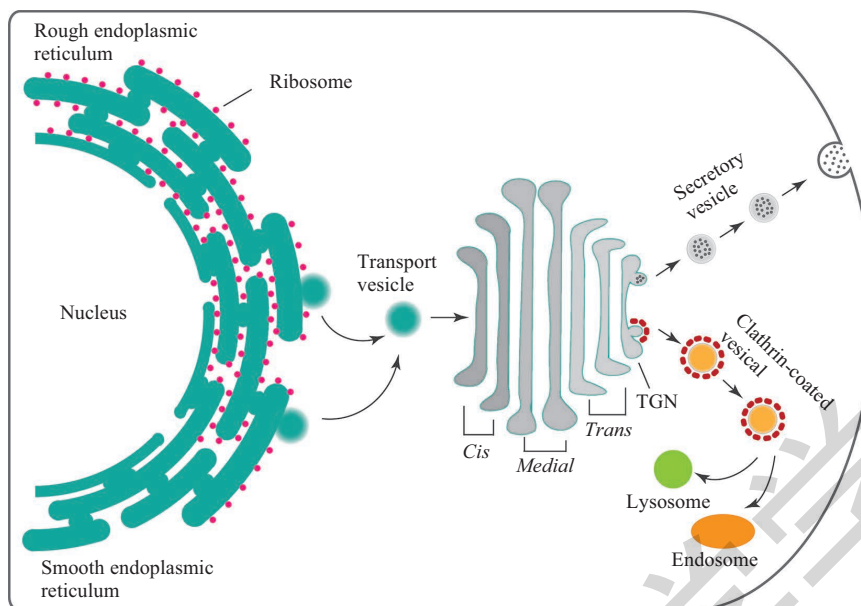


图1 囊泡及蛋白分泌过程中的囊泡运输示意图
Fig.1 Vesicle trafficking in the secretory pathway

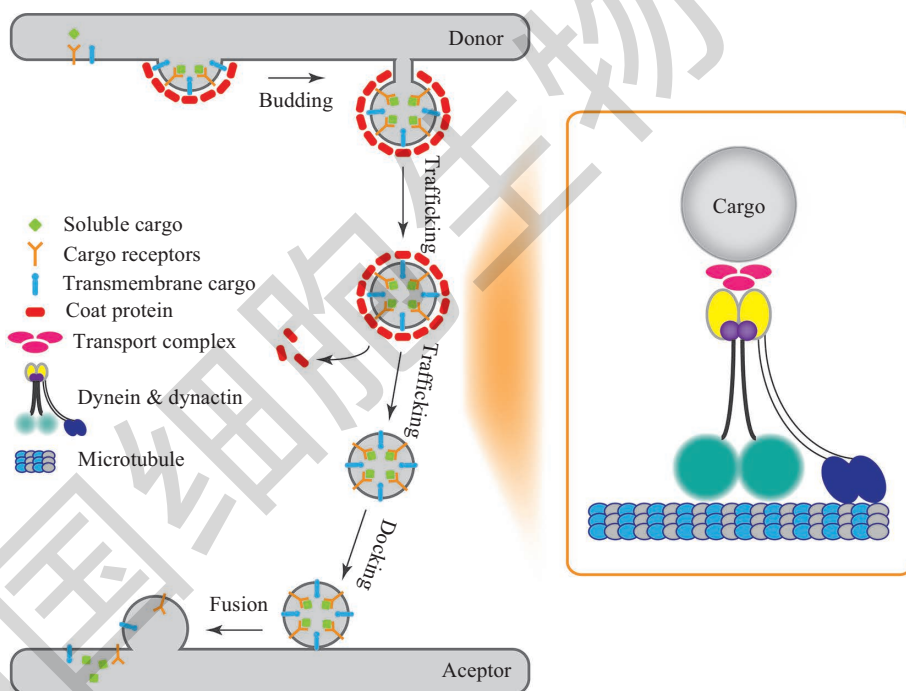


图2 囊泡运输过程示意图及四个基本要素

Fig.2 Schematic diagram of vesicle transport and four basic elements

关键调控基因及其作用环节。而Rothman实验室^[5]主要以哺乳动物细胞为研究材料, 着重阐明了一个特殊的蛋白质复合物SNARE(可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感的融合蛋白附着蛋白受体)在囊泡锚定和融合中的作用机制。囊泡运输是所有细胞都具有的物质运输方式, 神经细胞在囊泡运输研究中最具代表性, 主要是因为神经细胞内存在着一种特殊类

型的囊泡——突触囊泡, 它参与了神经递质的释放。Südhof实验室^[6]发现了触发突触囊泡融合的钙感受器(synaptotagmin), 并证实它能快速准确地将钙信号传递到突触囊泡, 通过与SNARE复合体等的作用, 实现与细胞膜融合并释放神经递质, 最终完成神经信息的传递(图3)。以这三个实验室的代表性工作为基础, 囊泡运输中出芽、锚定和融合等基本过程及

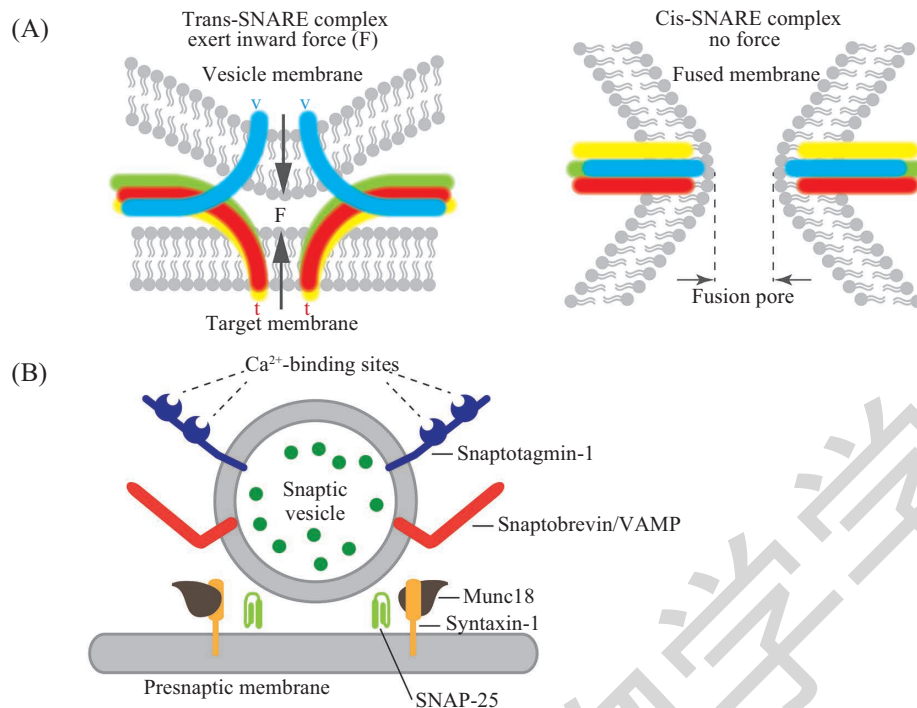


图3 囊泡融合与释放的调节, SNARE复合体和钙感受器(根据参考文献[41,43]修改)

Fig.3 Regulation of vesicle fusion and release, SNARE complex and snaptotagmin (modified from references [41,43])

其调节机制得到了初步的揭示, 从而使我们加深了对囊泡运输的分子细胞机制的了解。

2 已有研究成果

2.1 囊泡运输假说

20世纪60年代, Palade及其同事^[2]关于蛋白分泌相关的研究发现, 新合成的分泌蛋白需要通过一系列被膜包被的细胞器(包括内质网、高尔基体)分泌颗粒后再被分泌到细胞外。1975年, Blobel^[3]进一步提出信号肽假说(signal peptide hypothesis)。之后的研究发现, 分泌蛋白的N-端存在一段由10个疏水的氨基酸残基构成的信号序列, 可以将新合成的蛋白引导到膜上定位^[3]。新生蛋白从核糖体通道出来时其信号序列可以被信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)识别, 同时信号识别颗粒又能识别内质网膜上的SRP受体(SRP receptor), 通过其“桥梁”作用使得新生蛋白结合于内质网膜^[7]。定位在质膜、内体、溶酶体的蛋白与分泌蛋白共享这一通路。更为重要的是, 分泌蛋白通常被发现存在于较小的、被膜包被的囊泡中, 这些囊泡则散布在细胞中^[1]。受到已有研究成果的启发, 囊泡运输的假说认为, 分泌途径中货物分子在细胞器之间的运输过程是通过穿梭的囊泡介导的。该假说认为, 囊泡从“供体”膜中“出

芽”, 允许货物选择性地进入而形成囊泡, 并且在供体膜中保留驻留蛋白, 随后这些囊泡被选择性地定位在特定的受体膜上, 一旦发生囊泡融合, 货物分子就被“卸载”到受体膜性细胞器中(图1)。所有的囊泡运输过程都是被严格调控和平衡的, 所以大量的货物分子可以顺利有序地通过分泌途径而不损害细胞器的组成成分以及稳定性。

2.2 囊泡相关蛋白及囊泡运输方式

囊泡膜是由细胞质膜或内膜系统凸出或者凹陷形成的, 因此囊泡膜的成分与细胞膜相同。囊泡的表面通常被一层特异性蛋白包被, 因此也称为包被囊泡。根据囊泡外面包被的蛋白不同, 可将转运囊泡分为两类: 一类为网格蛋白包被囊泡(clathrin-coated vesicle)^[8], 主要负责从高尔基转运货物到内体、溶酶体以及植物的液泡, 也负责细胞质膜与内膜系统细胞器之间的物质转运; 另一类包被囊泡被细胞质中的蛋白包被, 称为COP(coated protein complex), 根据功能不同分为COPI和COPII, COPI主要负责将蛋白从高尔基体逆向转运至内质网, 而COPII负责将蛋白从内质网转运到高尔基体^[9]。

2.2.1 网格蛋白包被囊泡(clathrin-coated vesicle, CCV) 1975年, MRC实验室博士后Pearse等^[10-11]将包被囊泡分离纯化并发现了clathrin蛋白, 这是细胞生物

学史上一个里程碑事件。在过去的40年里, 诸多研究工作揭示了clathrin及相关蛋白组装成包被囊泡和货物分选分子机制。CCV主要参与经典的细胞内吞通路即网格蛋白依赖的细胞内吞(clathrin-mediated endocytic mechanisms, CME)过程^[12]。经典的clathrin依赖的内吞作用即CME过程中, 涉及质膜内凹形成小窝CCP(clathrin-coated pit)和CCV的形成, 过程分为五个步骤, 包括成核(nucleation)、货物筛选(cargo selection)、包被组装(coat assembly)、缢断(scission)和脱包被(uncoating)^[12]。在第一步成核过程中, FCHO蛋白结合细胞膜上磷脂酰肌醇4,5二磷酸丰富的区域, 招募EPS15-EPS15R、intersectins、AP2, 进而触发CCP的形成^[13]。第二步货物筛选, AP2(adaptor protein complex 2)通过 μ 和 σ 亚基继续招募其他相关的受体。第三步货物组装, 通过AP2招募的三腿形网格蛋白进而聚合形成六边形和五边形的形状, 然后在新生的小窝(pit)周围形成网格蛋白包被。第四步缢断, GTPase蛋白dynamin被包含BAR-domain的蛋白招募到形成的囊泡的颈部, 随着GTP的水解, 导致包被囊泡从膜上分离。第五步脱包被, auxilin和GAK招募HSC70后将网格外衣解除, 裸露的转运囊泡与内膜融合^[14](图4)。

跨膜蛋白通过其胞质结构域被招募到网格蛋白包被的囊泡上, 而基于酪氨酸的序列是最常见的识别信号^[15]。如经典的货物分子运铁蛋白受体(transferrin receptor)含有YXX Φ 基序(Φ 为任意的疏水氨基酸残基)、LDLR家族蛋白含[FY]XNPX[YF]基序, 这些货物识别序列可以直接结合在AP2的 σ 亚基上或结合在其他含磷酸化酪氨酸结构域的衔接蛋白(adaptor protein)上^[16]。

2.2.2 COP包被囊泡(coated protein coated vesicle, CPCV) 自从Palade提出蛋白质分泌途径的观点后, 20世纪70年代末Schekman和Rothman^[1]开始独立着手阐明囊泡运输过程中的分子机制。囊泡运输过程的出芽以及运输货物的选择是由囊泡外包被的蛋白介导的, 而囊泡的包被均是由蛋白组成的超大分子。囊泡包被蛋白将扁平的膜变成出芽的弧状, 最终导致运输囊泡的释放^[17]。其中一类包被蛋白COPII是目前研究最完善的一类包被蛋白复合体, COPII现在已知介导从内质网(endoplasmic reticulum, ER)向内质网-高尔基体中间区(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC)或高尔基体的物质转运^[18]。

COPII复合体的鉴定和功能研究是从“sec”突变体筛选获得的最大成就之一, Shekman及同事^[4]以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为模型, 虽然不清楚酵母与哺乳动物是否含有相似的分泌机制, 但是酵母遗传操作的简易性使得研究人员分离出具有蛋白质分泌缺陷表型的对温度敏感的“sec”突变体。

COPII复合体的组装开始于将小GTP结合蛋白(GTPase) Sar1招募到ER上, 这一过程是通过Sec12促进的。Sec12是一类可以催化Sar1的GDP/GTP交换的鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)。Sar1的活化需要其N-端的 α 螺旋, 该螺旋被认为能够在与GTP结合时发生摆动而暴露疏水氨基酸^[19-20]。N-端螺旋插入到ER膜上后促使初始曲率的产生, 同时招募Sec23/Sec24异源二聚体^[21-23]。Sec23和Sec24形成一个蝴蝶结状的复合体结构, 包含有一个凹形接触面, 可能有助于ER膜曲率的形成^[24]。Sec23/Sec24直接或通过一系列相关蛋白促使货物蛋白从ER中出来^[25]。Sar1/Sec23/Sec24和货物形成的复合体被Sec13/Sec31异源四聚体捕获, 该异源四聚体形成囊泡的外包被同时维持膜的曲率并促进来自于ER的囊泡膜的缢断^[26-27]。结构生物学研究表明, Sec13/Sec31异源四聚体形成杆状复合物, 在体外能够组装成高度几何的笼子, 被认为是囊泡外包被蛋白的功能性排列^[28]。之后, Sar1 GTP的水解是囊泡缢断所必需的过程, 由GTP酶激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)Sec23激活^[29]。GTP水解同样促进包被蛋白复合物的解聚, 当复合物解聚后, COPII的相关蛋白被循环到ER, 为新一轮的货物运送做准备^[30](图5A)。

COPII复合体在ER出口处(ER exit sites, ERES)选择和浓缩货物时需要一系列的衔接蛋白辅助捕获腔内的货物蛋白, COPII亚基并不直接与之结合。典型例子如调控胆固醇合成的SREBP(Sterol-regulatory element binding protein)可与ER膜上的SCAP蛋白结合, 而SCAP可与ER驻留蛋白Insig相互作用。当细胞中胆固醇浓度降低时, SCAP-Insig复合物解离, SCAP胞质端的肽环上暴露隐藏的COPII结合位点, 而此构象变化促使SCAP-SREBP被一同包装, SREBP可被转运到高尔基体上^[31]。另一辅助蛋白14-3-3通过干扰ER驻留基序从而帮助ER膜上的货物进行运输。14-3-3蛋白优先与含有磷酸化丝氨酸的序列结合, 因此, 货物磷酸化状态可能是构成基于细胞内信号

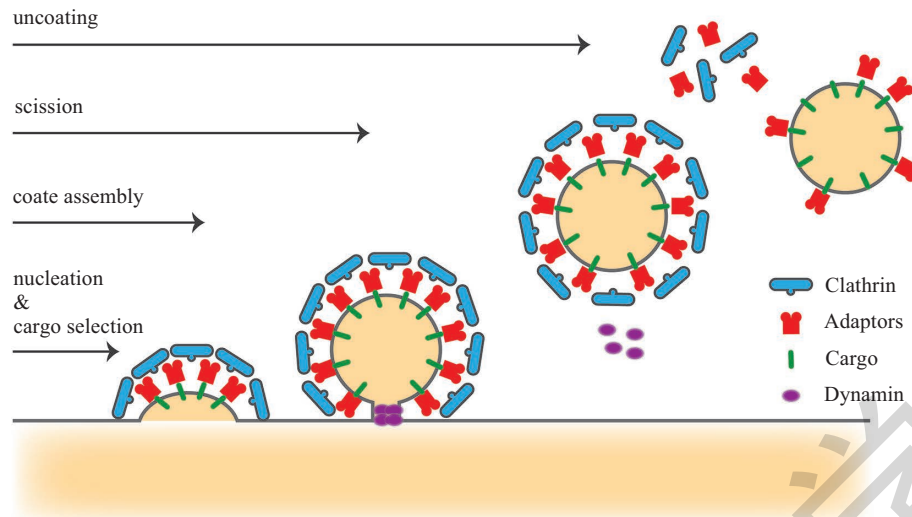


图4 网格蛋白包被囊泡形成示意图

Fig.4 Schematic diagram of the formation of clathrin-coated vesicles

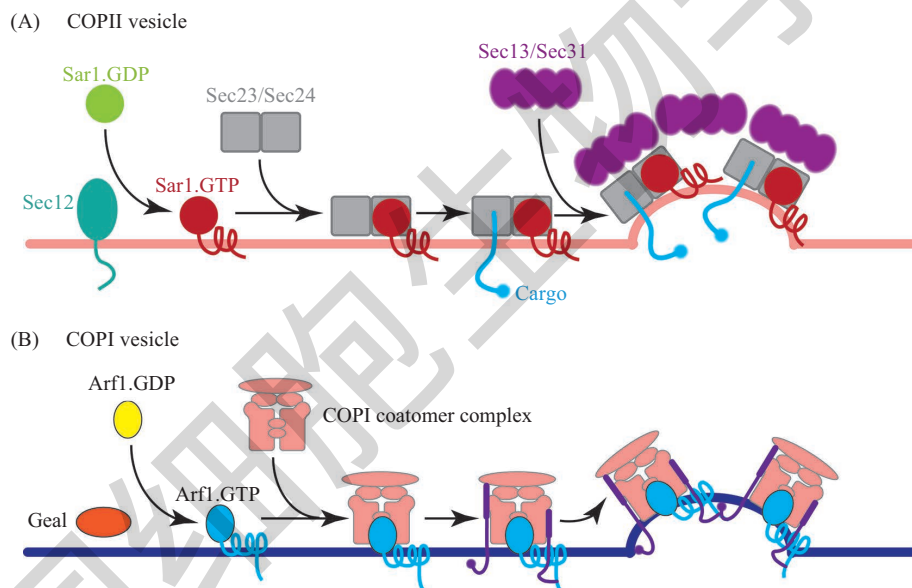


图5 COP包被囊泡形成示意图(根据参考文献[37]修改)

Fig.5 Schematic diagram of the formation of COPII and COPI vesicles (modified from references [37])

而从ER运出的调节机制^[32]。作为典型大分子的前骨胶原(procollagen)及其他超大分子颗粒如极低密度脂蛋白颗粒(VLDL)等则可能是通过膜辅助蛋白TANGO1/Mia3而从ER中运送出去, TANGO1/Mia3与COPII相互作用帮助procollagen VII从ER上的分泌^[33]。

另一类COPI蛋白复合物负责将蛋白从高尔基体逆向转运至内质网, 也称为逆向转运(retrograde transport)。COPI包被蛋白复合体的组装过程与COPII类似, 不过招募的蛋白有一定的差异。COPI

包被蛋白组装的启动首先需要Arf的GDP/GTP形式转换进而使得Arf转移到膜上定位, 该过程由Arf1的鸟苷酸交换因子GEF蛋白Geal介导^[34]。膜结合的Arf1招募预组装的包被蛋白复合体, 复合体包括7个亚基 α -、 β -、 β' -、 γ -、 δ -、 ϵ -和 ζ -COP^[35]。COPI包被蛋白复合体在不同亚基上可能包含多个货物识别位点, 介导货物的招募。最终包被蛋白复合体通过未知的机制聚合, 并且通过膜曲率变化促进Arf的GTP酶激活蛋白GAP招募, 随后促进GTP水解, Arf与膜分离^[36](图5B)。

表面上看, COPI包被蛋白与其货物的相互作用更为直接和简单, 因为所涉及的分选信号相对简单^[37]。很多年前人们就认识到KKXX基序能够直接与COPI包被蛋白相互作用, 但是相互作用细节不清楚^[38]。之后的研究证明, α -、 β' -、 ϵ -COP亚基的结合依赖于完整的KKXX基序, 而 β -、 γ -和 ζ -COP亚基与p24家族的不同蛋白结合, 并且需要芳香残基^[39]。因此, KKXX介导的逆向转运过程主要由 α -、 β' -、 ϵ -COP亚基调控, β -、 γ -、 δ -和 ζ -COP亚基则引导其他的传输过程。

2.2.3 SNARE在囊泡锚定和融合中的作用机制
在研究囊泡运输的分子机制过程中, Rothman及同事^[1]采用了完全不同的策略, 他们采用体外重构的方式来研究高尔基体顺面囊膜(cis-Golgi)。利用体外重构实验, 早期Rothman及同事鉴定了N-乙基马来酰亚胺敏感因子(N-ethylmaleimide-sensitive factor, NSF), 它可以在胞质中或以膜结合的形式存在^[40]。随后, 基于无细胞系统(cell-free system)的囊泡运输过程, 可溶性NSF结合蛋白(soluble NSF attachment protein, SNAP)被纯化出来^[41]。SNARE(soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptors)蛋白是NSF和SNAP的受体, 三种膜蛋白复合体被认为是囊泡和质膜的桥梁^[42]。目前关于SNARE蛋白的假说认为, SNARE蛋白分为两大类, 分别为转运囊泡的v-SNARE和目标膜上的t-SNARE, 这一对特定的组合能够特异性地参与膜融合过程。

SNARE的主要功能是促进膜融合, 其催化膜融合的过程可以看做是一个“拉链模型”^[41]。膜融合时, 锚定在一个膜上的三螺旋(t-SNARE)与锚定在另一个膜上的第四个螺旋(v-SNARE)组合形成反SNARE复合物或称为“SNAREpins”。这一过程逐渐从膜远处的N-端向膜近处的C-端递增, 由此产生一个内向的力矢量F, 将双层膜拉在一起, 迫使其融合。当融合发生时, 力矢量F消失, 形成“拉链”的SNAREs称为“cis-SNARE complex”, 过程如图3A所示。

2.3 神经突触囊泡循环模型

在神经元中, 突触囊泡负责存储在突触间释放的各种神经递质, 而神经递质的释放受电压依赖的钙离子通道调节。突触囊泡的融合过程由SNARE蛋白和SM(Sec1/Munc18-like proteins)蛋白介导, 它们在融合反应阶段经历结合、解离的循环^[43]。在神经

突触中, 囊泡上的SNARE蛋白synaptobrevin(VAMP)与质膜上的SNARE蛋白syntaxin-1、SNAP-25形成复合物^[42]。在SNARE复合物形成之前, syntaxin-1呈现一个封闭的构象且不能参与到复合物的形成中, 它必须呈现打开的构象以便SNARE复合物能够形成^[44]。SM蛋白Munc18-1最初结合在呈现封闭构象的syntaxin-1上, 当syntaxin-1的构象打开准备形成SNARE复合物时, Munc18-1仍与syntaxin-1相连, 但结合模式转变成与SNARE复合体间相互作用。SNARE/SM复合物的组装是由分子伴侣CSPs和synucleins蛋白介导的, 它们的缺陷会导致神经退行性疾病的发生^[45]。囊泡融合完成后, SNARE/SM复合物进行解聚, 这一解聚过程是由保守的ATP酶(ATPase) NSF蛋白以及它的调节蛋白(adaptor) SNAP介导的(图3B)。

神经突触间的通讯由神经递质介导, Ca^{2+} 从突触前端释放, 触发突触囊泡的胞吐作用, 神经递质释放结合到突触后膜的受体上。那么 Ca^{2+} 是怎样触发突触膜融合从而导致神经递质释放呢? Südhof及同事^[6]关注并研究了该过程的分子机制。他们在研究突触囊泡分子解剖学过程中, 筛选了一系列的可能介导 Ca^{2+} 触发突触囊泡胞吐作用的 Ca^{2+} 传感器, 随后触发突触囊泡融合的钙感受器(synaptotagmin-1, Syt1)被克隆出来^[46]。相关的生化实验发现, Syt1的C2结构域是一个新型的 Ca^{2+} /磷脂结合结构域(Ca^{2+} /phospholipid-binding domain)^[47]。同时, Syt1的C2结构域还可以与Syntaxin-1以及SNARE复合物相结合^[48]。针对Syt1敲除小鼠的电生理实验发现, Syt1在前脑神经元的快速同步突触融合中是绝对必需的, 虽然对于缓慢的 Ca^{2+} 介导的神经递质释放是非必需的^[49]。进一步引入Syt1的点突变R233Q和D232N, 分别模拟降低和增加Syt1与 Ca^{2+} 的结合能力, 进而检测神经递质的释放, 证明Syt1是神经细胞中触发突触囊泡融合的钙感受器^[50-51]。

2.4 我国囊泡运输研究概况

上述系列里程碑式的发现揭开了人们从动态的角度去认识细胞生命活动过程及其功能的研究序幕。上述研究成果多数是20世纪60年代以来的国外实验室的经典工作。我国囊泡运输领域的研究起步较晚, 随着本世纪初一批优秀的科学家回国开展相关的研究, 国内囊泡运输研究领域也取得了一些重要进展。囊泡运输机制方面: 中科院生物物理

所徐涛研究组关注胰岛素分泌囊泡发生和释放的机制;浙江大学段树民课题组探讨研究胶质细胞溶酶体分泌机制;中科院遗传发育所刘佳佳组探索囊泡货物卸载机制等。囊泡运输障碍方面:本课题组以一种囊泡运输障碍代表性疾病Hermansky-Pudlak综合征(HPS)小鼠和病人为研究对象,探讨相关的发病机制。研究手段方面:北京大学分子医学研究所周专课题组利用碳纤电极记录单个囊泡的释放动力学;中科院生物物理所李栋研究组和徐平勇研究组、北京大学陈良怡课题组等发展了超高分辨实时观察细胞器动态和囊泡运输过程的技术。近年来,随着在国外受到良好训练的一批优秀青年科学家(以在Tomas Südhof实验室接受训练的张晨教授等为代表)的加盟,国内囊泡运输领域的研究呈现良好的发展态势。首都医科大学李巍教授于2010年组织了首届中国囊泡运输会议,此后由浙江大学段树民和刘伟教授、厦门大学王团老教授、中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所鲍岚和武汉大学生命科学院宋保亮教授、清华大学俞立教授等分别组织了年度交流会,促进了该研究领域国内科学家之间的交流与合作。在陈晔光和徐涛两位教授的积极组织 and 推动下,2017年国家自然科学基金委启动了“细胞器互作网络及其功能研究”重大研究计划,通过该项目组织的年度交流会,进一步加强了我国囊泡运输研究领域科学家之间的交流与合作。

3 未来展望

“生命在于运动”,没有囊泡运输,就没有细胞的活力,也就没有生命力。一个城市如果缺乏交通运输系统,就是一座死城;一个细胞如果缺乏囊泡运输系统,也就是一个“死”细胞了。目前人们对细胞内复杂而精细的交通运输系统的认识,仍然是初步的和框架性的。细胞内高负荷的物质运输,如何保证其有条不紊、忙而不乱?其中,对于所运送货物的精确识别、定向运输以及目的地卸载,是囊泡运输的关键环节。现有的研究表明,细胞内可能存在精确调控货物分选与运送的一套指令,由货物分子、运输复合体、动力蛋白、运输轨道及相关调节因子共同组成,称为“运输密码”(trafficking code)。解码这套指令,对于理解细胞功能和生命活力至关重要。这有赖于多学科交叉(如物理、化学、生物等)和新

技术发展(如新一代显微成像技术),以实现细胞内的囊泡运输过程的实时和长时程监控^[52]。

目前在解码DNA密码的基础上,发展出蛋白质组学、表观遗传组学等技术手段,对于基因组所编码的全套蛋白质的功能及其相互作用和调控规律有了更进一步的认识,从而构筑了蛋白质的工作网络图。在此基础上,需要在细胞的动态变化这一更高的层面上来解析它们的工作方式,重点是解读囊泡运输的密码和细胞器互作网络,这样才能更好地理解生命力的本质。从基因网络到蛋白质网络再到细胞器网络和囊泡运输网络,将是未来生命科学研究纵深发展领域。此外,探究囊泡运输的机制有赖于新技术的发展,使得人们从更高分辨率和更精细的角度了解囊泡运输的过程。

囊泡运输参与细胞多项重要的生命活动,如细胞器发生和动态变化、细胞内信号转导、神经递质的释放及信息传递、激素分泌、天然免疫、外泌体分泌等,其运输障碍会导致多种细胞器发生缺陷和细胞功能紊乱,并与许多重大疾病(如出生缺陷、神经退行性疾病、精神分裂症、糖尿病等代谢性疾病、感染与免疫缺陷、肿瘤等)的发生、发展密切相关。研究细胞的囊泡运输,不仅对细胞生物学的基础理论研究产生积极的推进作用,也将揭示一些影响人类健康的重大疾病机理,为其治疗提供新的策略或靶点,对人类健康产生重要和深远的影响。

参考文献 (References)

- 1 Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 2004; 116(2): 153-66.
- 2 Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 1975; 189(4206): 347-58.
- 3 von Heijne G. Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 1985; 184(1): 99-105.
- 4 Novick P, Field C, Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 1980; 21(1): 205-15.
- 5 Balch WE, Dunphy WG, Braell WA, Rothman JE. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 1984; 39(2 Pt 1): 405-16.
- 6 Südhof TC. The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53(47): 12696-717.
- 7 Schwartz TU. Origins and evolution of cotranslational transport to the ER. *Adv Exp Med Biol* 2007; 607: 52-60.
- 8 Higgins MK, McMahon HT. Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(5): 257-63.

- 9 Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol* 2011; 14(1): 20-8.
- 10 Robinson MS. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* 2015; 16(12): 1210-38.
- 11 Pearse BM. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 1975; 97(1): 93-8.
- 12 Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL. Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2018; 87: 871-96.
- 13 Schmid EM, McMahon HT. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 2007; 448(7156): 883-8.
- 14 McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(8): 517-33.
- 15 Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, *et al.* Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 1995; 269(5232): 1872-5.
- 16 Maurer ME, Cooper JA. The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 20): 4235-46.
- 17 Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(5): 409-14.
- 18 Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, *et al.* COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994; 77(6): 895-907.
- 19 Huang M, Weissman JT, Beraud-Dufour S, Luan P, Wang C, Chen W, *et al.* Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol* 2001; 155(6): 937-48.
- 20 Rao Y, Bian C, Yuan C, Li Y, Chen L, Ye X, *et al.* An open conformation of switch I revealed by Sar1-GDP crystal structure at low Mg²⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(3): 908-15.
- 21 Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 2005; 122(4): 605-17.
- 22 Antony B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* 1997; 36(15): 4675-84.
- 23 Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, *et al.* COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 1998; 93(2): 263-75.
- 24 Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 2002; 419(6904): 271-7.
- 25 Miller E, Antony B, Hamamoto S, Schekman R. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* 2002; 21(22): 6105-13.
- 26 Fath S, Mancias JD, Bi X, Goldberg J. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* 2007; 129(7): 1325-36.
- 27 Stagg SM, Gurkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, *et al.* Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 2006; 439(7073): 234-8.
- 28 Stagg SM, LaPointe P, Razvi A, Gurkan C, Potter CS, Carragher B, *et al.* Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* 2008; 134(3): 474-84.
- 29 Antony B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 2001; 3(6): 531-7.
- 30 Forster R, Weiss M, Zimmermann T, Reynaud EG, Verissimo F, Stephens DJ, *et al.* Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites. *Curr Biol* 2006; 16(2): 173-9.
- 31 Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, *et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 2002; 110(4): 489-500.
- 32 O'Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 2002; 111(4): 577-88.
- 33 Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, *et al.* TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell* 2009; 136(5): 891-902.
- 34 Donaldson JG, Cassel D, Kahn RA, Klausner RD. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(14): 6408-12.
- 35 Hara-Kuge S, Kuge O, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Wieland FT, *et al.* En bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 1994; 124(6): 883-92.
- 36 Lee C, Goldberg J. Structure of coatomer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell* 2010; 142(1): 123-32.
- 37 Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 87-123.
- 38 Cosson P, Letourneur F. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 1994; 263(5153): 1629-31.
- 39 Fiedler K, Veit M, Stamnes MA, Rothman JE. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 1996; 273(5280): 1396-9.
- 40 Glick BS, Rothman JE. Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* 1987; 326(6110): 309-12.
- 41 Sudhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009; 323(5913): 474-7.
- 42 Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362(6418): 318-24.
- 43 Südhof Thomas C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 2013; 80(3): 675-90.
- 44 Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC, *et al.* A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* 1999; 18(16): 4372-82.
- 45 Sharma M, Burre J, Sudhof TC. CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol* 2011; 13(1): 30-9.

- 46 Matthew WD, Tsavaler L, Reichardt LF. Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J Cell Biol* 1981; 91(1): 257-69.
- 47 Davletov BA, Sudhof TC. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca^{2+} /phospholipid binding. *J Biol Chem* 1993; 268(35): 26386-90.
- 48 Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R. Ca^{2+} regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 1995; 270(40): 23667-71.
- 49 Maximov A, Sudhof TC. Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release. *Neuron* 2005; 48(4): 547-54.
- 50 Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 2001; 410(6824): 41-9.
- 51 Pang ZP, Shin OH, Meyer AC, Rosenmund C, Sudhof TC. A gain-of-function mutation in synaptotagmin-I reveals a critical role of Ca^{2+} -dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis. *J Neurosci* 2006; 26(48): 12556-65.
- 52 李巍, 鲍岚, 孙坚原. 2013年诺奖解读—生理学或医学奖: 囊泡运输的调控. *科学世界*(Li Wei, Bao Lan, Sun Jianyuan. *Science World*) 2013; 11: 4-6.

中国细胞生物学学报