

综述

植物R-SNARE蛋白研究进展

冯瑶洁^{1,2} 蒋苏^{2*} 刘振东² 赵淑举² 张聪聪² 李师鹏²¹聊城大学生命科学学院, 聊城 252000; ²齐鲁师范学院生命科学学院, 济南 250200)

摘要 真核细胞中囊泡膜与靶膜的融合是囊泡运输的关键环节, 由进化保守的SNARE(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)蛋白家族介导完成。SNARE蛋白可被分为定位于囊泡的R-SNARE(v-SNARE)和定位于靶膜的Q-SNARE(t-SNARE)两大类。R-SNARE与Q-SNARE的特异性配对形成“SNARE复合物”, 该复合物可介导囊泡膜与靶膜融合。与酵母和动物相比, 植物R-SNARE基因在进化过程中经历了大量扩增, 推测其与植物细胞特有的胞内转运途径有关。该文综述了R-SNARE参与植物发育和胁迫响应的研究进展, 结合其亚细胞定位信息探讨了不同R-SNARE的作用靶位和调控特点, 并对该领域研究前景进行了展望。

关键词 R-SNARE; SNARE; 囊泡运输; 植物

Advances in the Research of R-SNARE in Plants

FENG Yaojie^{1,2}, JIANG Su^{2*}, LIU Zhendong², ZHAO Shuju², ZHANG Congcong², LI Shipeng²¹School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China;²School of Life Sciences, Qilu Normal University, Jinan 250200, China)

Abstract Membrane fusion is the key step of membrane trafficking in eukaryocyte, which is mediated by a family of proteins named SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). SNARE proteins are classified into two groups, vesicle localized R-SNARE (v-SNARE) and target organelle localized Q-SNARE (t-SNARE). The specific pairing of R-SNARE with the cognate Q-SNARE forms the “SNARE complex”, and the complex resulted in the fusion of the vesicle membrane with the target membrane. In contrast to yeast and animal, plant R-SNARE genes had experienced copious duplications during evolution, which is assumed to cope with particular trafficking pathways evolved in plant cell. Here, the recent research on plant R-SNARE is reviewed, particularly regarding their involvement in development and stress responses. Based on their subcellular localizations in different cells, the target and regulatory characteristics of various R-SNARE were discussed. The prospects for future research on plant R-SNARE were also discussed.

Keywords R-SNARE; SNARE; membrane trafficking; plant

真核细胞内膜系统由细胞核、内质网(endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体(Golgi)、线粒体等多种膜结构组成, 不同膜结构之间通过囊泡运输(membrane

trafficking)进行物质交流。囊泡运输过程主要包括4个环节: 囊泡出芽(budding)、运输(transportation)、拴系(tethering)以及融合(fusion)^[1]。其中, 囊泡膜与靶膜的

收稿日期: 2023-02-14 接受日期: 2023-04-21

国家自然科学基金(批准号: 31571467)和山东省自然科学基金(批准号: ZR2020MC067)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0531-66778095, E-mail: jiangsu@qlnu.edu.cn

Received: February 14, 2023 Accepted: April 21, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571467) and the Shandong Natural Science Foundation (Grant No.ZR2020MC067)

*Corresponding author. Tel: +86-531-66778095, E-mail: jiangsu@qlnu.edu.cn

融合导致货物被运输到目的膜, 因此, 融合是囊泡运输的关键环节^[2]。膜融合过程由可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)介导^[3]。真核细胞编码多类SNARE, 可根据其亚细胞定位或者结构两种方式进行分类。根据其亚细胞定位, SNARE可被划分为定位于靶膜的t-SNARE和定位于囊泡膜上的v-SNARE^[4], 两者通过其SNARE基序的相互作用形成异源四聚或三聚复合体来介导膜融合; 根据SNARE基序中保守的核心氨基酸的不同, 也可将其分为Q(Gln)-SNARE(通常对应t-SNARE)和R(Arg)-SNARE(通常对应v-SNARE), 其中Q-SNARE可进一步被分为Qa-、Qb-、Qc-和含有两个SNARE基序的Qbc-SNARE(SNAP-25)^[3-4]。R-SNARE在小GTP酶及其效应蛋白(譬如拴系蛋白)的作用下与囊泡发生关联, 当囊泡被运输到目的膜附近时, R-SNARE与靶膜上的Q-SNARE互作形成SNARE复合体, 进而介导膜融合的发生。目前, 对植物SNARE功能的了解主要来自Q-SNARE相关的研究, 而对R-SNARE的研究相对较少。近年来, R-SNARE在植物生长过程中的生物学功能越来越受到关注。研究显示, 植物R-SNARE在进化过程中发生了显著基因扩增, 它们介导了不同类型囊泡与靶膜的融合过程, 这种基因扩增暗示植物存在特异的膜融合调控机制。近期XIANG等^[5]对SNARE蛋白参与植物根发育的机制进行了系统综述, 本文主要聚焦植物R-SNARE研究进展, 在植物发育和胁迫响应的框架下, 重点讨论不同R-SNARE家族成员的细胞学作用靶位和特点, 以期对相关研究提供参考。

1 SNARE蛋白

SNARE蛋白的研究始于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), NOVICK等^[5]对酵母中的温度敏感突变体进行筛选, 克隆到了SEC17、SEC18、SEC20和SEC22等参与膜融合调控的基因。随后在哺乳动物中, 鉴定出了NSF(N-ethylmaleimide-sensitive factor)与SNAPs(synaptosome-associated proteins)分别为SEC18与SEC17的同源物^[6-7]。拟南芥SYP21是植物中首先被鉴定出来的SNARE蛋白, 其功能可互补酵母SNARE突变体表型, 参与胞质分裂的SYP111(又称KNOLLE)随后也被成功克隆^[3,8-10]。已测序的基因组信息显示, SNARE在真核生物中普遍存在多个成员, 在酿酒酵母中有25个, 人类中有36个, 植物基因组编码的SNARE

蛋白数量更为庞大, 譬如水稻(*Oryza sativa*)中有57个、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有64个^[3,10], 推测这很可能与植物特有的生物学过程(如植物细胞的胞质分裂、向性反应以及植物激素生长素的转运等)有关。

SNARE蛋白是一类分子量相对较小的多肽(200~400个氨基酸), 其结构在酵母、动物和植物间高度保守^[10], 通常包含3个部分: C末端结构域、SNARE结构域和N末端结构域^[11]。C末端含有疏水跨膜结构域(transmembrane domain, TMD), 此跨膜结构域可将SNARE蛋白固定在膜上, 一些没有TMD结构的SNARE蛋白通过其修饰基团与膜脂互作^[10]。SNARE结构域是SNARE核心复合体(core complex)形成时各SNARE蛋白相互作用的区域。N末端结构域具有多态性, 可与多种调节蛋白(如SM蛋白)互作, 参与SNARE复合体组装和解聚的调控^[1]。

SNARE复合体由Qa-、Qb-、Qc-和R-SNARE组成, 在囊泡拴系到靶膜后Qa-、Qb-、Qc-SNARE与R-SNARE形成松弛型反式SNARE复合体(loose trans-complex), 随后囊泡膜和靶膜互相靠近, 形成紧密型反式SNARE复合体(tight trans-complex), 导致囊泡与靶膜完成融合, 此时SNARE复合体以顺式SNARE复合体(cis-complex)方式存在于融合后的靶膜上; 最后, 在NSF和 α -SNAP蛋白的共同作用下顺式SNARE复合体解聚, 参与下一轮膜融合过程^[10-13](图1)。这一工作模型在体外、酵母和动物中都得到了验证, 并可能适用于植物细胞的膜融合过程^[14-15]。

2 植物R-SNARE亚群与其结构特点

真核生物中的R-SNARE蛋白家族有多个成员, 例如在酿酒酵母中有5个, 哺乳动物中有9个, 拟南芥中有15个^[10,14]。根据N末端结构域的长度R-SNARE可被分为2种类型: Brevin型(N末端结构域长度较短)和Longin型(N末端结构域长度较长), 植物中所有的R-SNARE都是Longin型^[9]。根据蛋白序列的不同, 植物基因组编码的R-SNARE可分为3个亚家族: SEC22-类、YKT6-类和VAMP7-类^[10]。高等植物中的VAMP7蛋白主要由VAMP71和VAMP72两大类组成, 其中VAMP72为绿色植物所特有^[9]。SEC22-类与VAMP7-类的R-SNARE通过TMD结构域固定在膜上, 而YKT6-类R-SNARE则通过翻译后的棕榈酰化修饰与膜脂互作附着在靶膜上^[10]。Longin结构域与R-SNARE蛋白亚细胞定位有关^[16]。SEC22与YKT6的Longin结

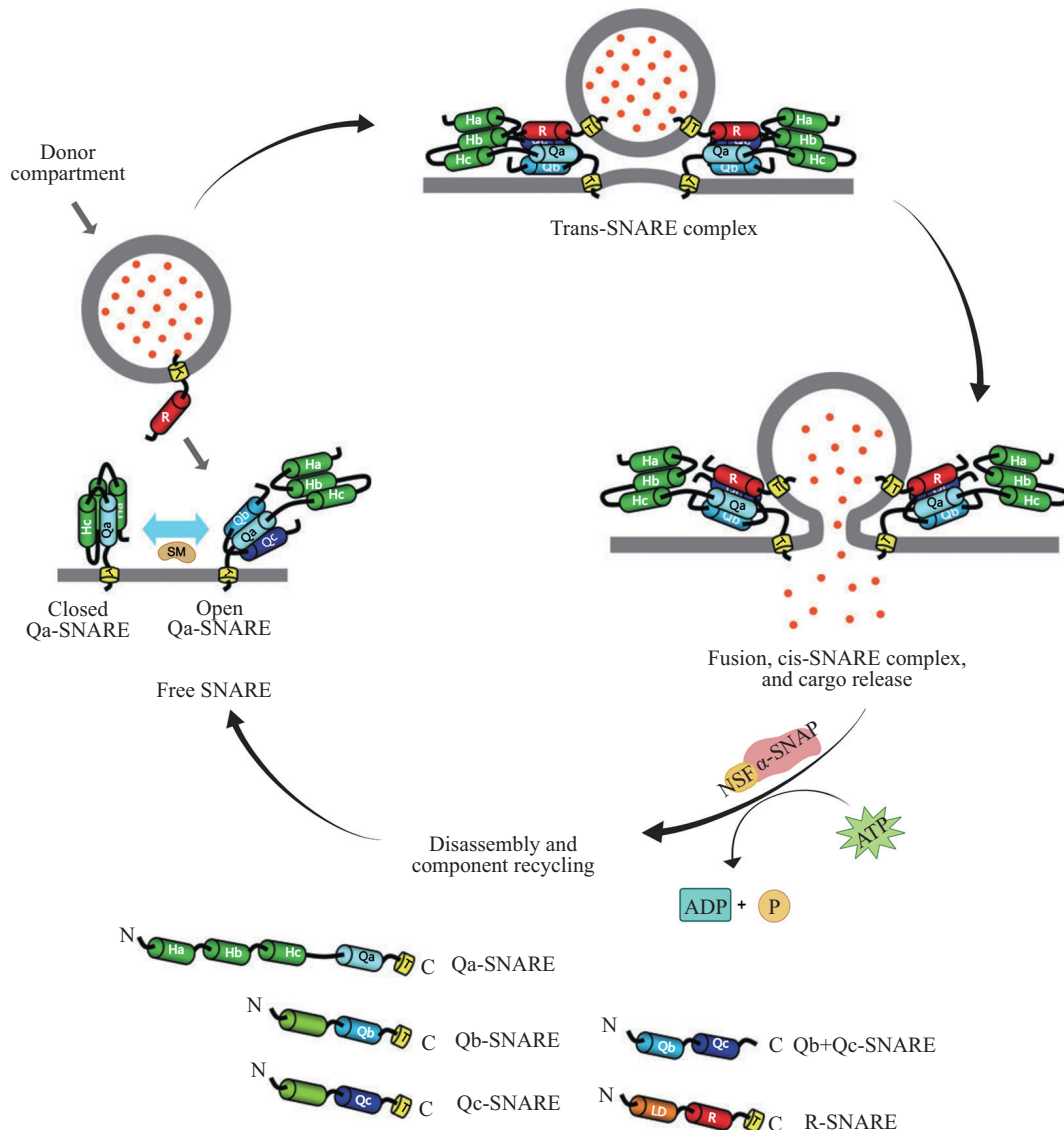


图1 SNARE复合体参与膜融合的机制(根据参考文献[10]修改)

Fig.1 The mechanism of SNARE complex mediated membrane fusion (modified from the reference [10])

构域较为相似,但其longin结构域折叠方式不同,导致这两种蛋白的亚细胞定位存在差异^[16-17]。同样,VAMP71和VAMP72的Longin结构域的差异也决定了两者分别定位于不同的亚细胞结构^[16]。此外,TMD的长度也可能影响R-SNARE的亚细胞定位,例如定位于ER的SEC22的TMD由17个氨基酸组成,而定位于Golgi与反式高尔基体网(trans-Golgi network, TGN)等的R-SNARE的TMD超过17个氨基酸^[17]。以上研究说明,植物R-SNARE家族蛋白亚细胞定位的差异性主要是由非保守的N末端和C末端决定的,推测这种蛋白结构的多样性决定了不同R-SNARE亚群参与了不同亚细胞结构之间的囊泡融合。

随着细胞学研究的深入,R-SNARE的亚细胞定

位及其所参与细胞学过程逐渐明晰(表1),这为理解植物R-SNARE进化脉络及其在植物生命活动中的作用特点提供了帮助。

3 植物R-SNARE蛋白功能分工

利用遗传学、分子生物学和细胞学等研究手段,人们对模式植物R-SNARE的功能进行了研究,研究结果显示R-SNARE广泛参与了植物生长发育和胁迫响应,不同R-SNARE家族成员在不同运输途径中发挥作用(图2)。

3.1 SEC22、VAMP723参与ER-Golgi途径的膜融合

在拟南芥中,SEC22定位于ER,其功能缺失会

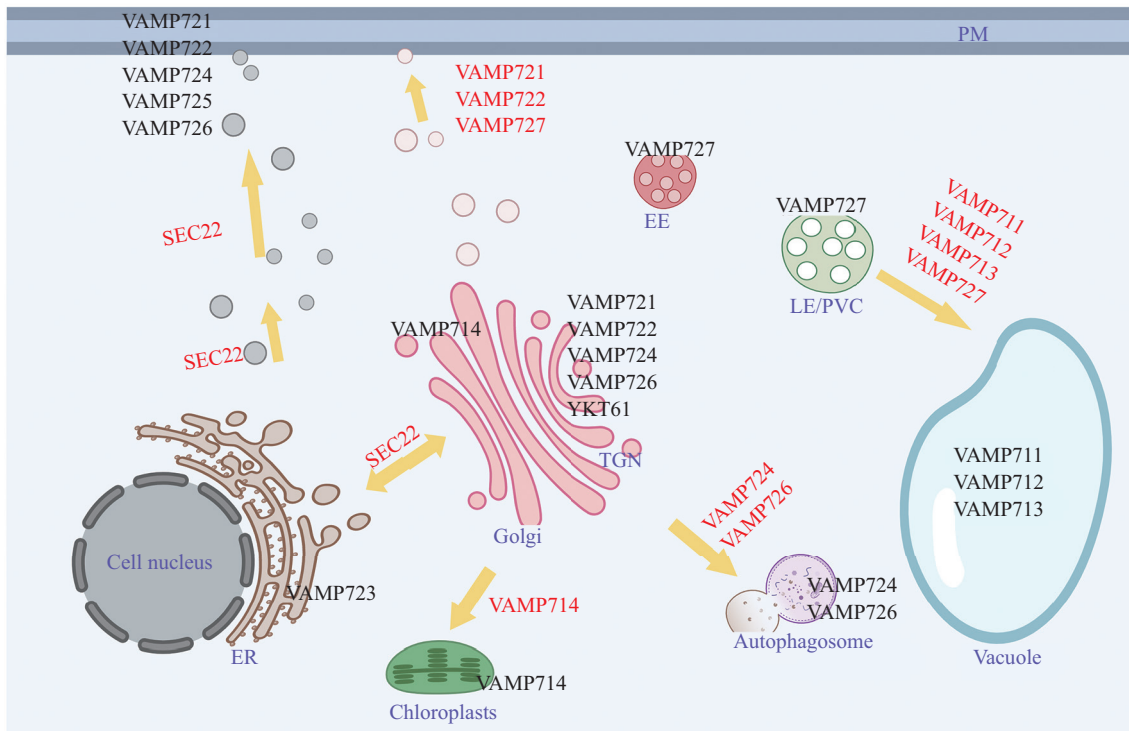
表1 拟南芥R-SNARE的亚细胞定位与功能

Table 1 Intracellular distribution and function of R-SNARE in *Arabidopsis thaliana*

R-SNARE名称 R-SNARE name	基因座 Locus	定位 Localization	主要功能 Major function	参考文献 References
YKT61	AT5G58060	Punctate vesicles	YKT61 involved in TGN-related membrane fusion	[3,18]
YKT62	AT5G58180	-	-	[3,19]
SEC221	AT1G11890	ER/Golgi	SEC221 related to membrane trafficking between ER and Golgi	[3,20]
SEC222	AT5G52270	-	-	[3]
VAMP711	AT4G32150	TGN/PVC/vacuole	VAMP711 and VAMP712 mediate the membrane fusion of LE-vacuole and vacuole-vacuole	[3,21-22]
VAMP712	AT2G25340	TGN/vacuole		
VAMP713	AT5G11150	TGN/vacuole	VAMP713 interacts with HOPS and mediates fusion of vacuole-vacuole	[23]
VAMP714	AT5G22360	Golgi	VAMP713 mediates vesicle transport from Golgi to vacuoles	[19,24-25]
VAMP721	AT1G04750	PM/TGN/EE	VAMP721 and VAMP722 regulate secretion pathway, participate in cell plate formation and trafficking of PIN protein	[9,26]
VAMP722	AT2G33120	PM/TGN/EE		
VAMP723	AT2G33110	ER	-	[19]
VAMP724	AT4G15780	TGN/PM	VAMP724 involved in the formation of autophagosomes	[19,27]
VAMP725	AT2G32670	TGN/PM	-	[3,19]
VAMP726	AT1G04760	TGN/PM	VAMP726 involved in the formation of autophagosomes	[3,19]
VAMP727	AT3G54300	PM/endosome/PVC/vacuole	VAMP727 mediates membrane fusion of PVC and vacuole	[3,19,28-29]

PM: 质膜; ER: 内质网; TGN: 反式高尔基体网; EE: 早期内体; PVC: 液泡前体; -: 未确定。

PM: plasma membrane; ER: endoplasmic reticulum; TGN: trans-Golgi network; EE: early endosome; PVC: prevacuolar compartments; -: not determined.



PM: 质膜; ER: 内质网; TGN: 反式高尔基体网; EE: 早期内体; LE: 晚期内体; PVC: 液泡前体; 黑色字体呈现的名称代表在亚细胞结构上驻留的R-SNARE蛋白, 红色字体呈现的名称代表参与细胞内转运途径的R-SNARE蛋白。

PM: plasma membrane; ER: endoplasmic reticulum; TGN: trans-Golgi network; EE: early endosome; LE: late endosome; PVC: prevacuolar compartments; the R-SNARE of black words were localized on subcellular structures, and the R-SNARE of red words were involved in intracellular transport pathways.

图2 植物R-SNARE在细胞内的定位与功能

Fig.2 Subcellular localizations and functions of R-SNARE in plant cells

导致花粉 Golgi 的形态出现异常、花粉发育受损,使质膜定位的 YFP-SYP124 滞留于 ER^[30]; GUAN 等^[31]发现拟南芥 SEC22 与 Golgi 定位的 SYP32 蛋白存在生化互作,突变体植株叶表皮细胞中内质网的形态异常, Golgi 驻留蛋白 ST-GFP 在内质网中积累,推测 SEC22 参与了 ER 向 Golgi 的膜转运过程。拟南芥突变体 *at-sec22-4* 植株根中 PIN1 在质膜上的极性定位发生了异常^[31],但目前尚未确定 SEC22 是否直接参与了 PIN1 向质膜的转运过程。此外,在烟草中发现, SEC22 的过表达阻断了 Phytolongin 蛋白从 ER 中输出的过程^[20]。这些结果表明,植物 SEC22 主要介导了 ER-Golgi 之间的物质转运过程,并且其功能在不同植物中是保守的。

利用拟南芥悬浮培养细胞体系, UEMURA 等^[19]观察到 VAMP723 定位于 ER 上,推测 VAMP723 介导了 ER-Golgi 的膜融合过程,目前尚未见有关 VAMP723 参与物质运输的进一步报道。

3.2 VAMP714、VAMP721/722/725 参与 Golgi-TGN-PM 途径的膜融合

对拟南芥悬浮培养细胞中瞬时表达 GFP 标记的 SNARE 进行观察发现 VAMP714 定位于 Golgi 上^[19],这暗示 VAMP714 介导了囊泡与 Golgi 膜的融合过程。有趣的是,拟南芥 VAMP714 与生长素输出载体 PIN1 (PIN-FORMED1) 和 PIN2 在根细胞的质膜上存在共定位, VAMP714 功能缺失突变体的 *PIN1*、*PIN2* 和 *PIN4* 基因转录水平降低,暗示 VAMP714 与生长素转运蛋白存在某种功能关联^[32], VAMP714 是否直接参与 PIN 蛋白的向膜运输有待确认。水稻 *OsVAMP714* 主要定位于 Golgi, 另外在叶肉细胞的叶绿体中也发现有该蛋白的分布^[25],有研究表明,叶绿体蛋白除了利用信号肽靶向到叶绿体外,还可通过 ER-Golgi 途径进入叶绿体^[33]。VAMP714 是第一个在植物中鉴定出的叶绿体 R-SNARE 蛋白,其在 Golgi 和叶绿体之间的膜融合过程中发挥作用。另外,遗传学证据显示 VAMP714 还参与了多种生物和非生物胁迫响应。水稻 *OsVAMP714* 参与水稻稻瘟病抗性反应^[25]; 小麦 (*Triticum aestivum*) *TaVAMP714* 参与了对条锈菌的感病反应; 干旱与盐胁迫能够诱导 *TaVAMP714* 的上调表达,推测其通过脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号途径参与非生物胁迫响应^[34]。最近有研究发现拟南芥 VAMP714 的表达受到 AtSRT2 (sirtuin2) 的调控,两者在种子萌发过程的盐耐受反应中发挥作用^[24]。这些结果表明,不同植物中的 VAMP714 参与了多种胁迫响应,迄今

对 VAMP714 在胁迫响应过程中的分子和细胞学机制还不清楚,或许其通过相似的细胞和分子机制参与了不同的胁迫响应。

胞吐 (exocytosis) 参与细胞分泌、细胞极性建立、细胞信号转导、细胞生长和细胞分裂等基本的细胞学过程,多种植物 R-SNARE 蛋白参与了分泌囊泡与 PM 的融合过程。细胞学研究揭示 VAMP721、VAMP722 与 VAMP725 主要定位于 PM, 因此它们可能参与了分泌囊泡与 PM 的融合过程^[19]。进一步的研究表明 VAMP721 和 VAMP722 定位在 VHA-a1 标记的 TGN/早期内体 (early endosome, EE) 中^[9],这暗示着它们在 TGN/EE 中发挥作用。我们利用放线菌酮 (cycloheximide, CHX; 蛋白质合成抑制剂) 处理暗培养的拟南芥幼苗后,发现下胚轴细胞中 VAMP721/722 与 CESA6 标记的 Golgi 共定位,说明 VAMP721/722 可能参与了 TGN/EE 与 Golgi 之间的膜融合过程 (本实验室尚未发表的数据)。VAMP721/VAMP722 T-DNA 插入单突变体表型与野生型相似,而 *vamp721 vamp722* 双突变体植株出现严重矮化,细胞分裂过程存在缺陷,说明 VAMP721 与 VAMP722 在植物中具有明显的功能冗余^[9]。最近研究发现, *vamp721 vamp722* 植物根尖生长素的分布发生异常, PIN1、PIN2 在细胞膜上的极性定位被干扰,说明 VAMP721/VAMP722 调控 PIN 蛋白从 TGN 向膜转运的过程^[26]。这一工作鉴定了植物 R-SNARE 的货物蛋白,对进一步深入研究运输囊泡与 PM 的融合机制意义重大。通过免疫共沉淀、质谱分析等多种生化研究手段发现,小 GTP 酶 (small GTPase) RABA2a 与 VAMP721/VAMP722 互作,参与了 VAMP721/VAMP722-SYP121-SNAP33 三元 SNARE 复合物的组装^[35]。关于 RABA2a 在细胞内如何调控 SNARE 复合物的组装尚不清楚。最近,利用反向遗传学手段发现 VAMP721/VAMP722 参与植物抗病,推测其通过参与分泌抗病相关组分发挥作用^[36]。迄今有关 VAMP725 的生物学功能尚未见报道。

3.3 VAMP711/712/713、VAMP727、YKT6 参与 TGN-液泡/PVC 途径的膜融合

在哺乳动物细胞中发现 VAMP7 参与向溶酶体的物质转运^[37-38]。利用蛋白组学、细胞生物学等手段发现拟南芥 VAMP71 家族的成员 VAMP711、VAMP712 以及 VAMP713 定位于液泡膜上^[19,39],这说明它们与向液泡/晚期内体 (late endosome, LE) 的物

质转运有关。降低VAMP711的表达会抑制囊泡与液泡的融合,影响叶片气孔的关闭,使植物体对于干旱胁迫的耐受度降低^[40]。另外发现VAMP711、VAMP712能够直接与由ABA诱导的AHA1和AHA2(H⁺-ATP酶)相互作用并抑制其活性,是H⁺-ATP酶的负调控因子;而过表达VAMP711能够部分回补ost2(OPEN STOMATA2)突变体气孔闭合缺陷的表型^[21],说明VAMP711介导的向液泡转运过程在植物抗旱过程中发挥重要作用。拟南芥VAMP711与砷在液泡中的积累有关,具有参与重金属累积和调节细胞水势的作用^[41]。VAMP713与拴系复合物HOPS(homotypic fusion and protein sorting)的一个亚基VPS39在液泡-液泡接触位点有共定位,两者存在生化互作关系,协同介导液泡之间的同源融合^[23]。综上,植物VAMP711/712/713主要介导了与液泡相关的物质运输过程,其在植物中应对干旱等非生物胁迫的细胞学机制值得重点关注。

水稻胚乳中VAMP727参与谷蛋白前体的累积^[42]。早期研究发现拟南芥VAMP727定位于原生质体的内体/液泡前体(endosome/prevacuolar compartments, PVC)上^[19],与SYP22、VTI11和SYP51组成SNARE复合体介导PVC和液泡的融合^[28]。此外,VAMP727与油菜素类固醇受体(brassinosteroids-insensitive, BRI)直接互作, *syp22 vamp727*^{-/-}突变体表现出对油菜素内酯(brassinosteroids, BR)处理不敏感的表型,这说明VAMP727参与了BRI的转运,并可能通过调控BRI1在PM上的丰度参与

对根结线虫的防御^[43-44],目前尚不清楚VAMP727调控BRI1转运的细胞学机制。通过免疫共沉淀发现VAMP727还可与PM上的Q-SNARE SYP121形成复合物,利用渥曼青霉素(wortmannin)抑制胞吞作用,会导致VAMP727在PM上积累^[29],这表明VAMP727还参与了囊泡与PM的膜融合。

在酵母中YKT6参与了ER-Golgi的运输、Golgi内部的运输以及TGN-液泡等多类运输过程;在哺乳动物中参与内体(endosome)-TGN的运输过程;在拟南芥中,编码YKT6-类R-SNARE蛋白的基因包括YKT61与YKT62,体外脂质体融合实验的结果显示,YKT61/YKT62均与TGN定位的SYP41存在互作关系,暗示YKT61与YKT62可能参与了TGN相关的膜融合事件^[45]。YKT61在植物中的表达属于组成型表达,而YKT62的表达调控情况未知,推测YKT62受到环境因子诱导才会表达^[19,45]。此外,通过基因编辑技术获得的拟南芥*ykt61*功能缺失突变体,在有丝分裂过程中其花粉雄配子体发育停滞、雌配子体退化^[18],说明YKT61的功能是雌雄配子体发育所必需的,其背后的细胞学和分子机制需要进一步解析。

综上所述,植物中的VAMP711/712/713、VAMP727以及YKT6主要参与了TGN与液泡/PVC间的物质运输过程,在植物的生长发育、液泡内物质积累以及抵御逆境胁迫过程中发挥了重要的作用(图3)。

3.4 VAMP724与VAMP726参与TGN-自噬体途径的膜融合

早期研究发现拟南芥VAMP724与VAMP726

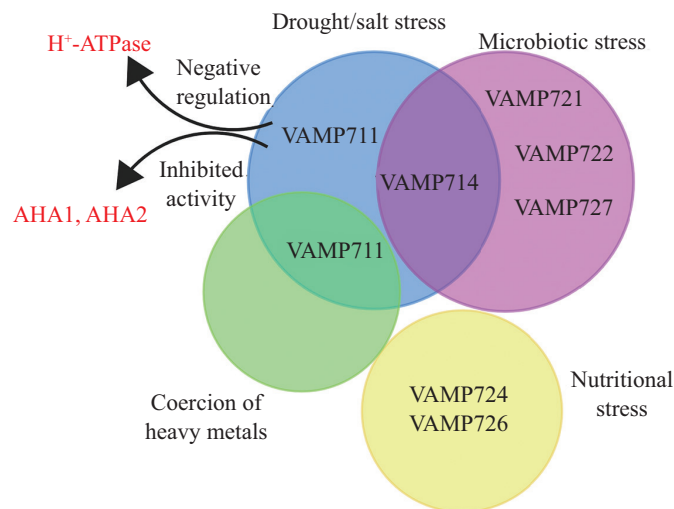


图3 植物R-SNARE参与胁迫反应

Fig.3 Plant R-SNARE involved in stress responses

定位于原生质体的PM上^[19], 近期研究发现两者还定位于根细胞中的TGN上^[27]。拟南芥 *vamp724 vamp726* 双突变体植株自噬途径受损、对营养胁迫敏感; 生化研究发现 VAMP724、VAMP726 与 ATG9 (autophagy-related 9) 蛋白和 ATG8e 存在关联, 细胞学观察发现在根细胞中 VAMP724、VAMP726 与 ATG8e 标记的自噬体有共定位^[27], 这些结果表明两者参与了 TGN-自噬体的转运途径, 但 VAMP724、VAMP726 与自噬机制如何发生关联尚未被阐明。

4 总结与展望

为适应其固着自养的生活方式, 植物在长期的进化过程中形成了特有的细胞内物质运输的调控机制。植物中的 SNARE 蛋白的数量要远远高于酵母和动物, 推测它们参与了细胞特异或运输途径特异的膜泡运输过程。进化分析显示 SYP7 家族、VAMP72 家族等是植物所特有的, 其中 VAMP727 仅存在于种子植物中, 能促进拟南芥种子的成熟^[28,46], 这可能与种子植物适应陆地生活有关。遗传学研究发现 R-SNARE 在植物中具有明显的功能冗余现象, 例如在拟南芥中 VAMP721、VAMP722、VAMP727 等, 这些 R-SNARE 的单突变体与野生型相比没有异常表型^[3], 给对其进行遗传分析增加了困难。因此, 构建双突变体或多突变体遗传材料, 结合细胞学研究手段, 有助于理解不同 R-SNARE 的功能分工或协同关系。

另外, 目前在植物细胞中尚未获得 SNARE 参与囊泡融合的直接证据。早期研究发现, SYP111 (又称 KNOLLE) 突变导致囊泡在细胞板附近累积^[8], 说明囊泡可以被运输到细胞板, 但不能与细胞板发生融合, 这一表型是由囊泡拴系还是囊泡融合过程出现损伤而导致的仍需确认。最近研究发现, VAMP721/722 参与 PIN1/PIN2 向膜极性转运^[26], 这为阐明 R-SNARE 介导载有货物蛋白的囊泡与质膜融合的机制提供了良好的研究体系。

在囊泡运输过程中, 囊泡拴系和融合是两个紧密联系的事件^[1]。近期研究发现拟南芥拴系因子 *sec.1a sec.6* 突变体导致 SYP125 在花粉管顶端的分布减少^[47]; *exo70a1* 突变体中 GFP-VAMP721 在根表皮细胞质膜附近的荧光强度降低^[48]。这些结果表明拴系因子对 SNAREs 的定位或维持其在质膜上的正常分布都很重要。此外, 在细胞质中 R-SNARE 怎样与拴系相关蛋白发生关联, 这种关联的细胞学意义是

什么, 这些问题的探讨是理解细胞内高效物质运输的关键。

近年来, 植物活细胞成像技术越来越成熟, 利用双色甚至多色荧光显微镜对特定的膜结构标记与 R-SNARE 进行活细胞共定位观察, 能够获得更加丰富的信息。在未来的研究工作中, 充分结合细胞学、生物化学和遗传学等手段, 明确不同 R-SNARE 蛋白在不同生物学过程中的作用特点和作用方式, 这对理解植物 R-SNARE 蛋白的功能及进化具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] KOIKE S, JAHN R. SNARE proteins: zip codes in vesicle targeting [J]. *Biochem J*, 2022, 479(3): 273-88.
- [2] KWON C, LEE J H, YUN H S. SNAREs in plant biotic and abiotic stress responses [J]. *Mol Cells*, 2020, 43(6): 501-8.
- [3] LUO C, SHI Y, XIANG Y. SNAREs regulate vesicle trafficking during root growth and development [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 853251.
- [4] SOLLNER T, WHITEHEART S W, BRUNNER M, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion [J]. *Nature*, 1993, 362(6418): 318-24.
- [5] NOVICK P, FIELD C, SCHEKMAN R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway [J]. *Cell*, 1980, 21(1): 205-15.
- [6] WILSON D W, WILCOX C A, FLYNN G C, et al. A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast [J]. *Nature*, 1989, 339(6223): 355-9.
- [7] CLARY D O, GRIFF I C, ROTHMAN J E. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast [J]. *Cell*, 1990, 61(4): 709-21.
- [8] LUKOWITZ W, MAYER U, JURGENS G. Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product [J]. *Cell*, 1996, 84(1): 61-71.
- [9] ZHANG L, ZHANG H, LIU P, et al. Arabidopsis R-SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 are required for cell plate formation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26129.
- [10] LIPKA V, KWON C, PANSTRUGA R. SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 147-74.
- [11] 金红敏, 李立新. 拟南芥 SNARE 因子在膜泡运输中的功能 [J]. *植物学报* (JIN H M, LI L X. Role of Arabidopsis SNARE proteins in vesicle trafficking [J]. *Chinese Bulletin of Botany*), 2010, 45(4): 479-91.
- [12] JAHN R, SCHELLER R H. SNAREs: engines for membrane fusion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 631-43.
- [13] BASSHAM D C, BLATT M R. SNAREs: cogs and coordinators in signaling and development [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1504-15.
- [14] HONG W. SNAREs and traffic [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1744(3): 493-517.

- [15] SANDERFOOT A. Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(1): 6-17.
- [16] UEMURA T, SATO M H, TAKEYASU K. The longin domain regulates subcellular targeting of VAMP7 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(13): 2842-6.
- [17] ROSSI V, BANFIELD D K, VACCA M, et al. Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(12): 682-8.
- [18] MA T, LI E, LI L S, et al. The *Arabidopsis* R-SNARE protein YKT61 is essential for gametophyte development [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(4): 676-94.
- [19] UEMURA T, UEDA T, OHNIWA R L, et al. Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells [J]. *Cell Struct Funct*, 2004, 29(2): 49-65.
- [20] DE MARCOS LOUSA C, SOUBEYRAND E, BOLOGNESE P, et al. Subcellular localization and trafficking of phytolongins (non-SNARE longins) in the plant secretory pathway [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(9): 2627-39.
- [21] XUE Y, YANG Y, YANG Z, et al. VAMP711 is required for abscisic acid-mediated inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase activity [J]. *Plant Physiol*, 2018, 178(3): 1332-43.
- [22] XUE Y, ZHAO S, YANG Z, et al. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the members of the V-SNARE VAMP7C family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Signal Behav*, 2019, 14(3): e1573097.
- [23] TAKEMOTO K, EBINE K, ASKANI J C, et al. Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(10): E2457-66.
- [24] TANG W S, ZHONG L, DING Q Q, et al. Histone deacetylase AtSRT2 regulates salt tolerance during seed germination via repression of vesicle-associated membrane protein 714 (VAMP714) in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2022, 234(4): 1278-93.
- [25] SUGANO S, HAYASHI N, KAWAGOE Y, et al. Rice Os-VAMP714, a membrane-trafficking protein localized to the chloroplast and vacuolar membrane, is involved in resistance to rice blast disease [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 91(1/2): 81-95.
- [26] ZHANG L, MA J, LIU H, et al. SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 mediate the post-Golgi trafficking required for auxin-mediated development in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2021, 108(2): 426-40.
- [27] HE Y, GAO J, LUO M, et al. VAMP724 and VAMP726 are involved in autophagosome formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Autophagy*, 2022, doi: 10.1080/15548627.2022.2127240.
- [28] WU X, EBINE K, UEDA T, et al. AtNHX5 and AtNHX6 are required for the subcellular localization of the SNARE complex that mediates the trafficking of seed storage proteins in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e151658.
- [29] EBINE K, MIYAKAWA N, FUJIMOTO M, et al. Endosomal trafficking pathway regulated by ARA6, a RAB5 GTPase unique to plants [J]. *Small GTPases*, 2012, 3(1): 23-7.
- [30] EL-KASMI F, PACHER T, STROMPEN G, et al. *Arabidopsis* SNARE protein SEC22 is essential for gametophyte development and maintenance of Golgi-stack integrity [J]. *Plant J*, 2011, 66(2): 268-79.
- [31] GUAN L, YANG S, LI S, et al. AtSEC22 regulates cell morphogenesis via affecting cytoskeleton organization and stabilities [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 635732.
- [32] GU X, FONSEKA K, AGNEESSENS J, et al. The *Arabidopsis* R-SNARE VAMP714 is essential for polarisation of PIN proteins and auxin responses [J]. *New Phytol*, 2021, 230(2): 550-66.
- [33] JARVIS P. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants [J]. *New Phytol*, 2008, 179(2): 257-85.
- [34] 陆晓东, 张浩, 苑翠玲, 等. 花生 VAMP 基因家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. *山东农业科学* (LU X D, ZHANG H, YUAN C L, et al. Genome-wide identification and expression analysis of peanut VAMP gene family [J]. *Shandong Agricultural Sciences*), 2019, 51(9): 42-9.
- [35] PANG L, MA Z, ZHANG X, et al. The small GTPase RABA2a recruits SNARE proteins to regulate the secretory pathway in parallel with the exocyst complex in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2022, 15(3): 398-418.
- [36] KWON H, CHO D J, LEE H, et al. CCOAOMT1, a candidate cargo secreted via VAMP721/722 secretory vesicles in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(4): 977-82.
- [37] WARD D M, PEVSNER J, SCULLION M A, et al. Syntaxin 7 and VAMP-7 are soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(7): 2327-33.
- [38] PRYOR P R, MULLOCK B M, BRIGHT N A, et al. Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(6): 590-5.
- [39] CARTER C, PAN S, ZOUHAR J, et al. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3285-303.
- [40] LESHEM Y, GOLANI Y, KAYE Y, et al. Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in *Arabidopsis* reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(10): 2615-22.
- [41] DEROMACHI Y, URAGUCHI S, KIYONO M, et al. Stable expression of bacterial transporter ArsB attached to SNARE molecule enhances arsenic accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2020, 15(11): 1802553.
- [42] REN Y, WANG Y, PAN T, et al. GPA5 encodes a rab5a effector required for post-Golgi trafficking of rice storage proteins [J]. *Plant Cell*, 2020, 32(3): 758-77.
- [43] ZHANG L, LIU Y, ZHU X F, et al. SYP22 and VAMP727 regulate BRI1 plasma membrane targeting to control plant growth in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2019, 223(3): 1059-65.
- [44] ZHU X F, LIU Y, GAI X T, et al. SNARE proteins SYP22 and VAMP727 negatively regulate plant defense [J]. *Plant Signal Behav*, 2019, 14(7): 1610300.

- [45] CHEN Y, SHIN Y K, BASSHAM D C. YKT6 is a core constituent of membrane fusion machineries at the Arabidopsis trans-Golgi network [J]. *J Mol Biol*, 2005, 350(1): 92-101.
- [46] SAITO C, UEDA T. Chapter 4: functions of RAB and SNARE proteins in plant life [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009, 274: 183-233.
- [47] FAN T, FAN Y, YANG Y, et al. SEC1A and SEC6 synergistically regulate pollen tube polar growth [J]. *J Integr Plant Biol*, 2023, doi: 10.1111/jipb.13486.
- [48] LARSON E R, ORTMANNOVA J, DONALD N A, et al. Synergy among exocyst and SNARE interactions identifies a functional hierarchy in secretion during vegetative growth [J]. *Plant Cell*, 2020, 32(9): 2951-63.