

领域前沿·中国



张明杰, 博士生导师, 讲席教授, 南方科技大学生命科学学院创院院长, 中国科学院院士, 香港科学院创院院士。实验室长期从事神经信号转导中重要蛋白质复合体的生物化学和结构学研究, 以及神经细胞极性产生和维持的机制研究。近年在突触相分离领域做出一系列开创性成果。研究论文在*Science*、*Cell*、*Mol Cell*、*Neuron*、*Nat Neurosci*、*Cell Res*等期刊上发表。曾荣获香港裘槎基金会优秀学者奖、国家自然科学基金二等奖、何梁何利基金科学与技术奖、谈家桢生命科学成就奖。

相分离介导细胞内短距离囊泡运输

吴先登¹ 裘骅¹ 张明杰^{2*}¹香港科技大学生命科学部, 香港; ²南方科技大学生命科学学院, 深圳 518055)

摘要 细胞内的囊泡运输大致分两类, 一类是经典的马达蛋白与细胞骨架依赖性的长距离运输, 另一类是局域的短距离运输。短距离运输也有明确的方向, 却不依赖马达蛋白或细胞骨架, 长期以来科研人员对短距离囊泡运输的原理缺乏清晰的理解。以突触囊泡(synaptic vesicle, SV)的定向转运为例, 该研究发现了一种新的由相分离介导的、钙信号调控的、定向的运输方式。具体来讲, 一个名为Pclo(Piccolo)的支架蛋白, 通过与囊泡发生受钙信号调控的相分离, 一方面介导囊泡从储备池的提取, 另一方面促进囊泡在活性区的栓系。此外, 该研究还发现, 在普通的动物细胞中, TFG(Trk-fused gene)的相分离可以介导COPII(coat protein complex II)囊泡从内质网(endoplasmic reticulum, ER)到内质网-高尔基体中间体(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC)的转运。因此, 相分离提供了一种普适的介导短距离囊泡定向运输的方式。

关键词 相分离; 无膜细胞器; 囊泡运输; 突触囊泡循环

Phase Separation Mediates Short-Distance Vesicle Transport in Cells

WU Xiandeng¹, QIU Hua¹, ZHANG Mingjie^{2*}¹Division of Life Science, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China;²School of Life Sciences, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China)

Abstract Cellular vesicles are moved via two distinct routes: the canonical motor-powered transport, which moves along cytoskeletons typically over long distances, and local and short-distance transport. The short-

国家自然科学基金委基础科学中心项目(批准号: 82188101)、国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0508402)和深圳市孔雀计划(批准号: KQTD20210811090115021)资助的课题

*通信作者。Tel: 0755-88015947, E-mail: zhangmj@sustech.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82188101), the National Key R&D Program of China (Grant No.2019YFA0508402), and the Shenzhen Talent Program (Grant No.KQTD20210811090115021)

*Corresponding author. Tel: +86-755-88015947, E-mail: zhangmj@sustech.edu.cn

distance transport is also with directions but does not involve molecular motors and cytoskeletons. The molecular mechanisms underlying short-distance vesicle transport are totally unknown. Using SV (synaptic vesicle) transport as a paradigm, this study discovers a new way of short-distance vesicle transport mediated by phase separation in a Ca^{2+} -regulated and directional manner. Specifically, a scaffold called Pclo (Piccolo) in the presynaptic bouton undergoes phase separation with SV. On the one hand, Pclo can extract SVs from the reserve pool, on the other hand, Pclo can facilitate SV tethering on the active zone. In addition, this study further finds a protein called TFG (Trk-fused gene) can facilitate COPII (coat protein complex II) vesicles transport from ER (endoplasmic reticulum) to the ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) via phase separation. Therefore, phase separation may be a general mechanism for short-distance vesicle transport in cells.

Keywords phase separation; membraneless organelles; vesicle transport; synaptic vesicle cycle

1 细胞内短距离囊泡运输的需求

囊泡运输是细胞中物质运输的一种不可或缺的方式。通常来讲,囊泡以货物的形式被马达蛋白识别,并沿着细胞骨架进行定向运输^[1-2]。细胞内也有局部的短距离运输囊泡的需求,但是我们对这种运输方式的原理几乎一无所知。比如高尔基体不同腔室之间的囊泡运输,只经历数百纳米的路程^[3-4]。又如在突触前膜,突触囊泡(synaptic vesicle, SV)需要从突触小结内部转运到细胞膜附近以实现囊泡与质膜的融合以及神经递质的释放,这个距离也只有数百纳米^[5-7]。对这种局部的、短距离的定向运输,基于马达蛋白与细胞骨架的运输方式可能并不参与其中。一方面,马达蛋白依赖性转运的条件比较苛刻,除了马达蛋白和细胞骨架外,通常还需要接头蛋白、小G蛋白、ATP等因子的协调^[2,8],对短距离运输来说,这可能并不是一种经济有效的方式;另一方面,如上描述的两种场景,细胞骨架似乎并未涉及其中^[9-11],对马达蛋白的抑制也并未导致运输异常^[12]。自由扩散是另一种潜在的运输方式,却无法满方向性的需求。因此,我们推理应该有其他方式来介导短距离囊泡运输。

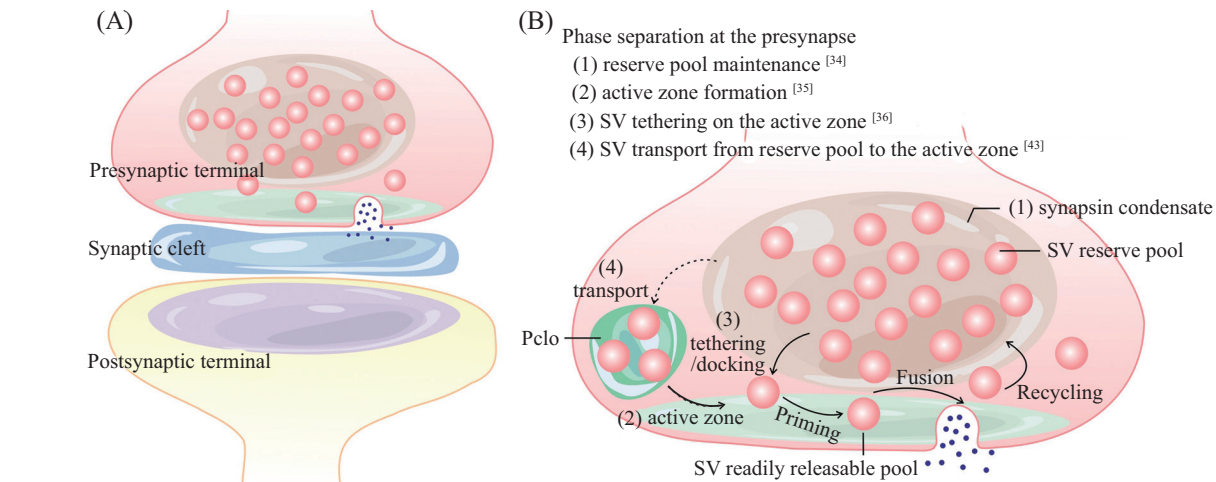
2 突触前膜——研究蛋白质相分离与囊泡互作的经典模型

突触前膜是研究囊泡运输的一个经典模型。SV可被马达蛋白(驱动蛋白)带动沿着细胞骨架(微管)从胞体转运到轴突末梢(突触小结)^[13-14]。对SV沿着轴突转运过程的研究直接促成了驱动蛋白的发现^[15],以及对马达蛋白依赖性的长距离囊泡运输的原理的发掘^[1-2,8]。那么对SV在突触小结内部的组织与移动的研究,很可能推动我们揭开短距离囊泡运输的神秘面纱。

在一个成熟的突触小结中,SV被组织成三个亚群,形成三个不同的功能区^[16-19],它们分别是:维持在轴突内部远离细胞膜的储备池(reserve pool),其中SV数目占比达SV总数的80%以上;锚定在突触前膜活性区(active zone)的即刻可释放池(readily releasable pool, RRP),SV数目占比<5%;以及在储备池和RRP之间穿梭的循环池(recycling pool)。SV在突触小结中循环,静息状态下处于储备池中的SV需要经历栓系(tethering)、锚定(docking)、启动(priming)才能到达活性区,构成RRP。只有RRP中的SV才能直接响应突触激活后流入的钙信号,实现与细胞膜的融合(fusion)以及神经递质的释放^[7,20]。膜融合后,活性区的RRP需要被储备池中的SV及时补充。

SV在突触小结中并非孤立存在,一方面SV本身包被着许多蛋白,另一方面SV所处的空间环境充满着拥挤的蛋白质^[21-22]。虽然不同亚群的SV在组成上并没有太大区别,但是不同亚群的SV与不同的蛋白质相偶联,而且不同蛋白质也参与到不同亚群的SV的维持当中。比如,对突触蛋白(synapsin)进行遗传敲除或者抗体封闭都会特异性地导致储备池的减少,而不影响已经定位在活性区的SV的数量^[17,23]。相反地,如果对活性区的支架蛋白,如Rab3互作蛋白(Rab3 interacting molecule, RIM)、RIM结合蛋白(RIM binding protein, RIMBP)、ELKS(a protein rich in glutamate, leucine, lysine and serine)等进行遗传干扰,则会使SV不能定位到活性区,而储备池的SV不受影响^[24-25]。

突触是一个高度特化的结构,突触内部有着非常精细的结构和功能分区^[26-27]。传统的观点认为,生物膜包裹的细胞器是将细胞进行分区的基本方式。近些年大分子相分离和无膜细胞器的发现极大地扩充了我们对细胞分区的认识^[28-31],这种不依赖



A: 突触相分离总结; B: 相分离视野下的突触囊泡循环。

A: phase separation at the synapse; B: synaptic vesicle cycle in the view of phase separation.

图1 突触前膜相分离总结(根据参考文献[32-33]修改)

Fig.1 Phase separation at presynaptic boutons (modified from the references [32-33])

于生物膜的大分子凝聚体更加灵活,既能特异性地富集分子形成结构和功能性区室,又能快速响应细胞信号进行动态调控。

在突触前膜中,不同的大分子凝聚体相继被报道^[32-33](图1)。有意思的是,这些无膜细胞器以不同的方式特异性地与有膜的SV相互作用,例如,突触蛋白形成的蛋白凝聚体可以与SV形成共定位的凝聚体^[34];而由RIM、RIMBP和ELKS形成的活性区凝聚体,SV则贴附在其表面^[35-36]。因此,不同的突触前膜蛋白质凝聚体可以将SV组织到不同亚群中,从而定义具有不同功能的SV。我们此前在体外重构了SV的这两种亚群和类突触小结的多层结构,揭示了相分离如何实现SV区室化的原理^[36]。以介观尺度的蛋白质凝聚体而非微观尺度的单个蛋白质分子来理解突触,为我们提供了新的视角来检视无膜凝聚体与有膜的SV的相互作用,以及无膜细胞器对SV运动与区室化的调节。

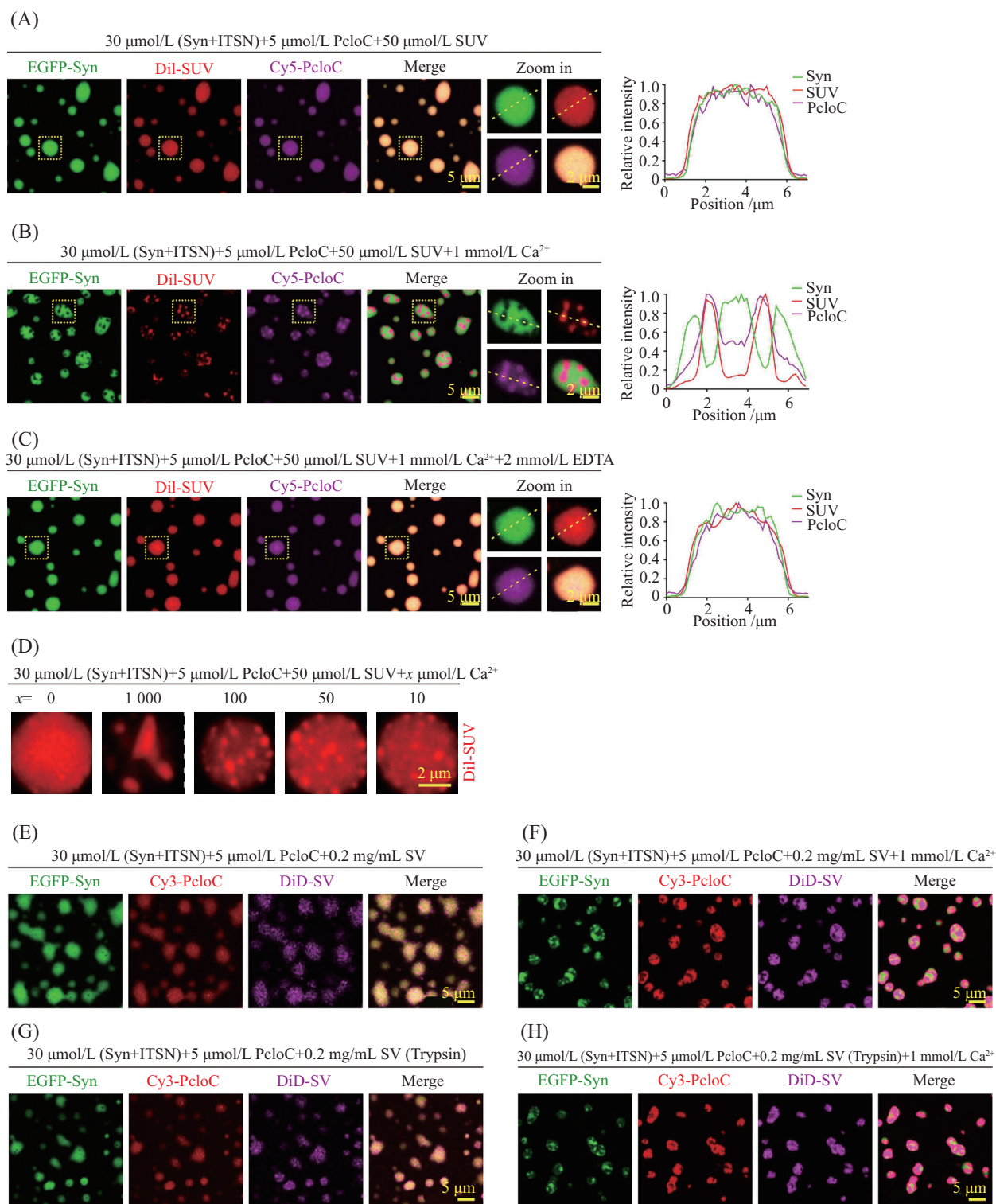
3 Pclo相分离介导突触囊泡定向转运

Pclo(Piccolo)和Bassoon是脊椎动物特异性的巨型支架蛋白(Pclo全长超过5 000个氨基酸,Bassoon近4 000个氨基酸)^[37]。此前的超分辨显微成像结果显示,Pclo呈现细长拉伸的状态,且一端朝向活性区,另一端伸向轴突内部的储备池,整体构象正好使它成为非常理想的连接储备池和活性区的桥梁^[38]。遗传学上,Pclo与Bassoon的敲除导致总SV数量减少,

贴附在活性区的RRP与穿梭的循环池SV数目都显著降低^[39-42]。而突触蛋白只负责储备池的维持,活性区的蛋白只参与RRP的形成。Pclo和Bassoon同时对多个SV亚群的影响提示这两种支架蛋白可能协调SV不同亚群之间的交流。

我们采用体外重构的策略,纯化了Pclo蛋白的截短体,分别从储备池和活性区两方面探究了Pclo在SV转运中的作用^[43]。

一方面,Pclo可以富集到突触蛋白的凝聚体当中,与突触蛋白和小单层囊泡(small unilamellar vesicle, SUV)形成共定位的凝聚体(图2A)。在钙信号的刺激下,Pclo通过相分离驱动凝聚体的所有组分的重新分配(图2B)。这时SUV从原来的突触蛋白中分离,转而与Pclo形成共定位的凝聚体。这个过程完全由钙信号诱发,囊泡的提取效率与 Ca^{2+} 浓度呈正相关,只需要生理浓度的 Ca^{2+} ^[44-45]就可以诱导囊泡的部分提取(图2D)。这一体外发现与在突触小结中只要少量SV的调动就足以补充RRP相符合。 Ca^{2+} 诱导的囊泡重新定位过程是可逆的,过量EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)处理可以使凝聚体的所有组分重新共定位在一起(图2C)。从大鼠脑内纯化得到的SV也有类似的性质(图2E和图2F):在 Ca^{2+} 诱导前,突触蛋白、SV和Pclo共定位在均一的凝聚体中; Ca^{2+} 刺激后,SV与Pclo共定位在突触蛋白之外的凝聚体中。考虑到SV自身携带大量蛋白,我们用胰蛋白酶消化去除SV表面蛋白,余下



A~C: 突触蛋白、PcloC、SUV在基础情况(A)、 Ca^{2+} 刺激(B)或EDTA处理(C)下的分布, 虚线方框选中的凝聚体用于放大分析, 斜线所示位置的荧光强度用来表征凝聚体不同组分的浓度; D: 不同浓度 Ca^{2+} 诱导的SUV被PcloC提取的情况比较; E、F: 鼠脑纯化的SV被 Ca^{2+} 依赖的PcloC提取的情况; G、H: 胰蛋白酶消化后的SV被 Ca^{2+} 依赖的PcloC提取的情况。Syn: 突触蛋白; ITSN: 交叉蛋白; PcloC: Pclo的C-端截短体。

A~C: synapsin, PcloC, and SUV distribution under basal (A), Ca^{2+} (B) or EDTA (C) conditions. A dashed box is selected for zoom in, and dash lines are used to profile fluorescence intensities and concentrations of different components in the condensate; D: SUV extraction by PcloC induced by different concentration of Ca^{2+} ; E,F: rat brain derived SV extraction by PcloC in a Ca^{2+} -dependent manner; G,H: trypsin digested SV extraction by PcloC in a Ca^{2+} -dependent manner. Syn: synapsin; ITSN: intersectin; PcloC: C-terminal fragment of Pclo.

图2 Ca^{2+} 诱导PcloC将囊泡从储备池里提取出来(根据参考文献[43]修改)

Fig.2 PcloC extracts SVs from the reserve pool condensates in response to Ca^{2+} (modified from the reference [43])

的不含表面蛋白的SV也同样经历 Ca^{2+} 诱导的重定位(图2G和图2H)。以上结果提示我们: Pclo可以响应 Ca^{2+} , 将SV从储备池中调动和提取出来。

机制上, Pclo本身含有两个磷脂结合结构域——C2A和C2B^[46-47](图3A和图3B)。其中C2B能不依赖 Ca^{2+} 结合脂质, 而C2A只有在 Ca^{2+} 诱导条件下才能结合脂质。也就是说, 在基础情况下, Pclo有一定结合囊泡的能力, 这种能力会随着 Ca^{2+} 的涌入而放大。我们进而发现, 在简单体系下, Pclo有与SUV发生相分离的能力(图3C)。这种能力可以被钙信号放大, 且高度依赖Pclo与脂质的结合, 如果用中性的磷脂或者Pclo的突变体阻断Pclo与脂质的结合, Pclo与SUV的相分离则会被破坏(图3C)。相应地, 这种突变体也无法再从突触蛋白中提取出SUV(图3D~图3G)。

另一方面, Pclo直接与多种活性区蛋白(如RIMBP、ELKS)相互作用^[37,48], 我们定量剖析了Pclo与RIMBP或ELKS的直接结合, 并验证了结合的特异性和选择性(图4A)。如RIMBP通过SH3结构域与RIM互作^[35], 但是RIMBP有3个SH3结构域, RIM与Pclo分别选择不同的SH3结构域结合, 从而确保它们形成统一的整体。我们解析了Pclo与ELKS复合物的晶体结构, 这是ELKS这个长的卷曲螺旋(coiled coil)蛋白的首个晶体结构, 也从结构上确定了Pclo的第三段卷曲螺旋结构域是单体而非以前猜测的二聚体。疏水相互作用和静电相互作用共同参与到Pclo与ELKS复合物的形成与稳定中。

通过与RIMBP、ELKS的直接相互作用, Pclo可以被特异性地富集到由RIM、RIMBP和ELKS形成的活性区凝聚体中(图4B)。重要的是, Pclo的引入可以极大地增强囊泡在活性区表面的贴附(图4C和图4D), 且 Ca^{2+} 可以进一步提高囊泡的贴附效率(图4E)。考虑到Pclo可以从储备池中攫取SV, 已经与Pclo形成共凝聚体的SV还能否被有效传递到活性区? 我们预先准备了Pclo/囊泡凝聚体和活性区凝聚体, 再将它们混合在一起。通过动态监察, 我们可以清晰地看到: 一旦两种凝聚体相互接触, Pclo可以迅速进入到活性区并与活性区组分形成均匀的共凝聚体, 而囊泡则滞留并富集在活性区表面(图4F), 这契合了SV栓系在活性区表面的状态。

因此, 钙信号诱导的Pclo与囊泡的相分离可以将囊泡从一种凝聚体中提取出来, 并将其定向地交付给另一种凝聚体。我们充分利用体外重组的优势,

在试管中实现了这一过程。这种自下而上的方法可以使我们清晰了解这一过程的必要条件, 在整个过程中, 既没有马达蛋白或者细胞骨架的引入, 也没有额外注入能量。完全靠着蛋白质与囊泡的自组装以及细胞内第二信使(Ca^{2+})的驱动, 实现了囊泡的定向运输。这提示我们, 除了以往熟知的马达蛋白赋能的运动外, 还有其他囊泡运输方式的存在, 这种以相分离介导囊泡转运的方式对局域的、短距离的囊泡运输可能尤其重要。相分离除了能指导分子组装外, 还有着广泛的功能应用, 而这些受到细胞信号调控的动态过程更值得将来深入研究。

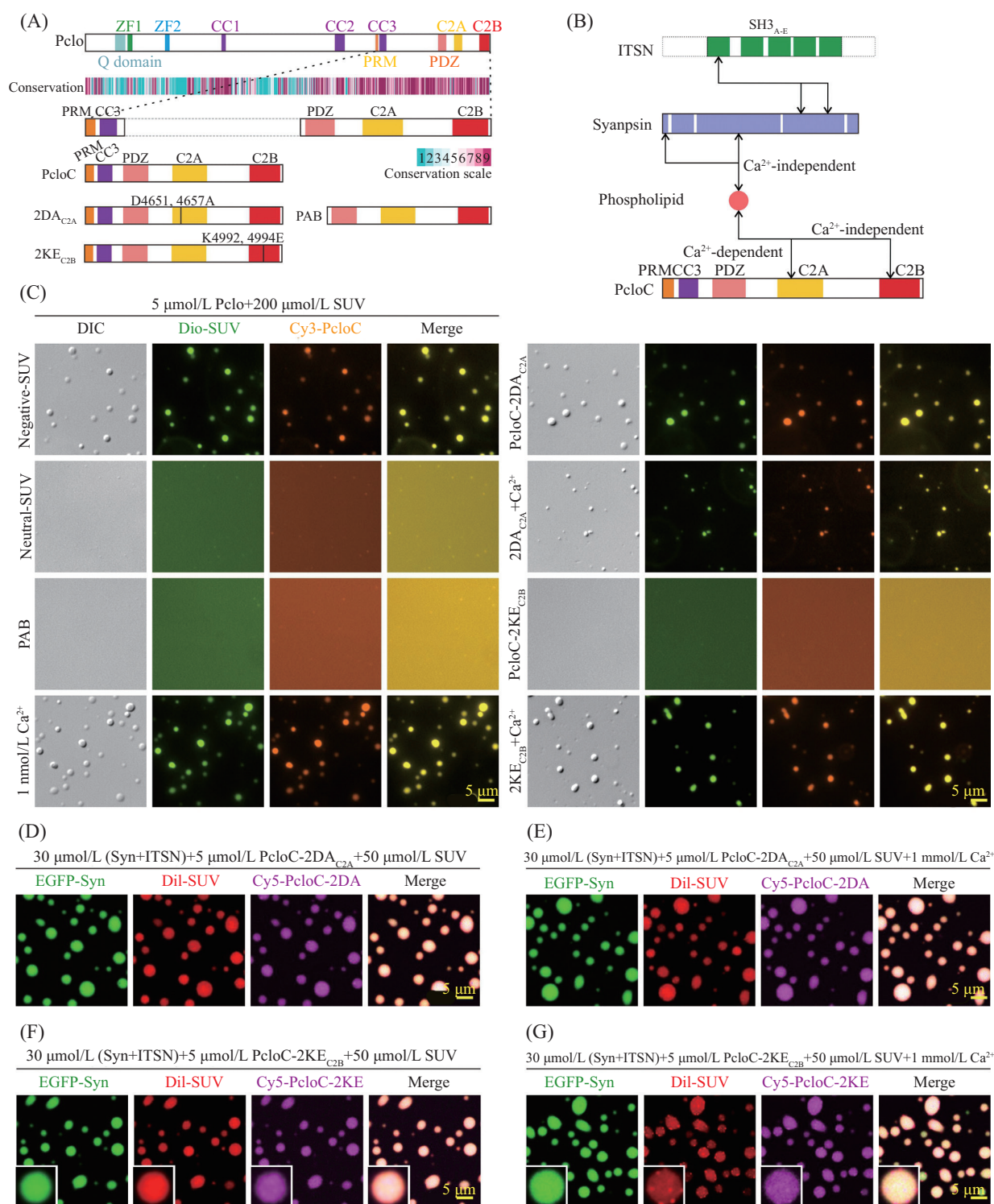
4 相分离介导的囊泡运输的普适性

至此, 我们以突触前膜为样板, 揭示了SV是如何在相分离的介导下从储备池定向转运到活性区的。这种由相分离驱动的囊泡定向转运很可能是在细胞内广泛存在的, 比如COPII囊泡在内质网(endoplasmic reticulum, ER)与内质网-高尔基体中间体(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC)之间的运输。支架蛋白TFG聚集在ER-ERGIC之间, 可能参与到COPII囊泡的早期分泌过程^[49-52]。通过活细胞高分辨显微成像, 我们确定了TFG与COPII囊泡形成共定位的凝聚体, 它们可以一起经历移动、融合、分裂(图5A)。进一步体外实验也验证了TFG相分离的倾向以及TFG凝聚体对囊泡的富集能力(图5B~图5E)。此外, 光电联用技术使我们直接观察到了TFG凝聚体里的COPII囊泡(图5F)。与SV的定向转运类似, COPII囊泡随TFG凝聚体的运输也不依赖于细胞骨架(图5G)。因此, 由相分离介导的短距离囊泡运输可能具有比较普适的意义。

5 总结与展望

我们通过突触前膜SV从储备池到活性区的定向运输和动物细胞COPII囊泡的早期分泌两个案例, 揭示了相分离对短距离囊泡运输的作用(图6)。与经典的马达蛋白和细胞骨架介导的运输方式相比, 相分离的方式同样具有方向性, 且受到细胞信号(如钙信号)的调控, 但不依赖于更加苛刻的其他多种分子。需要指出的是, 相分离介导的定向转运有其适用范围, 可能对短距离的运输尤为重要; 而对长距离的运输, 马达蛋白与细胞骨架的组合仍然起到主导作用。

对于相分离介导的短距离运输, 一个关键的问



A: Pclo的结构域; B: Pclo与突触蛋白和脂质等的相互作用网络; C: Pclo与SUV发生特异性相分离; D、E: 2DA_{C2A}(PcloC的C2A结构域突变体, 同时含 D4651A和D4657A双突变)不能从储备池中提取SUV; F、G: 2KE_{C2B}(PcloC的C2B结构域突变体, 同时含K4992E和K4994E双突变)在Ca²⁺条件下只能从储备池中提取少量SUV, 左下角为代表性凝聚体的3倍放大图。Syn: 突触蛋白; ITSN: 交叉蛋白。

A: domain organization of Pclo; B: interaction network among Pclo, synapsin, and lipid, etc.; C: Pclo undergoes phase separation with SUV in a specific and regulated manner; D,E: 2DA_{C2A} (PcloC with C2A domain mutations D4651A and D4657A) fails to extract SUV from the reserve pool condensate; F,G: 2KE_{C2B} (PcloC with C2B mutations K4992E and K4994E) slightly extracts SUV from the reserve pool condensate after Ca²⁺ stimulation, image at the left corner shows a representative zoom in condensate with 3 $\times$ magnification. Syn: synapsin; ITSN: intersectin.

图3 Pclo与带负电囊泡发生Ca²⁺调控的相分离(根据参考文献[43]修改)

Fig.3 Pclo undergoes phase separation with negatively charged vesicles in a Ca²⁺-regulated manner (modified from the reference [43])

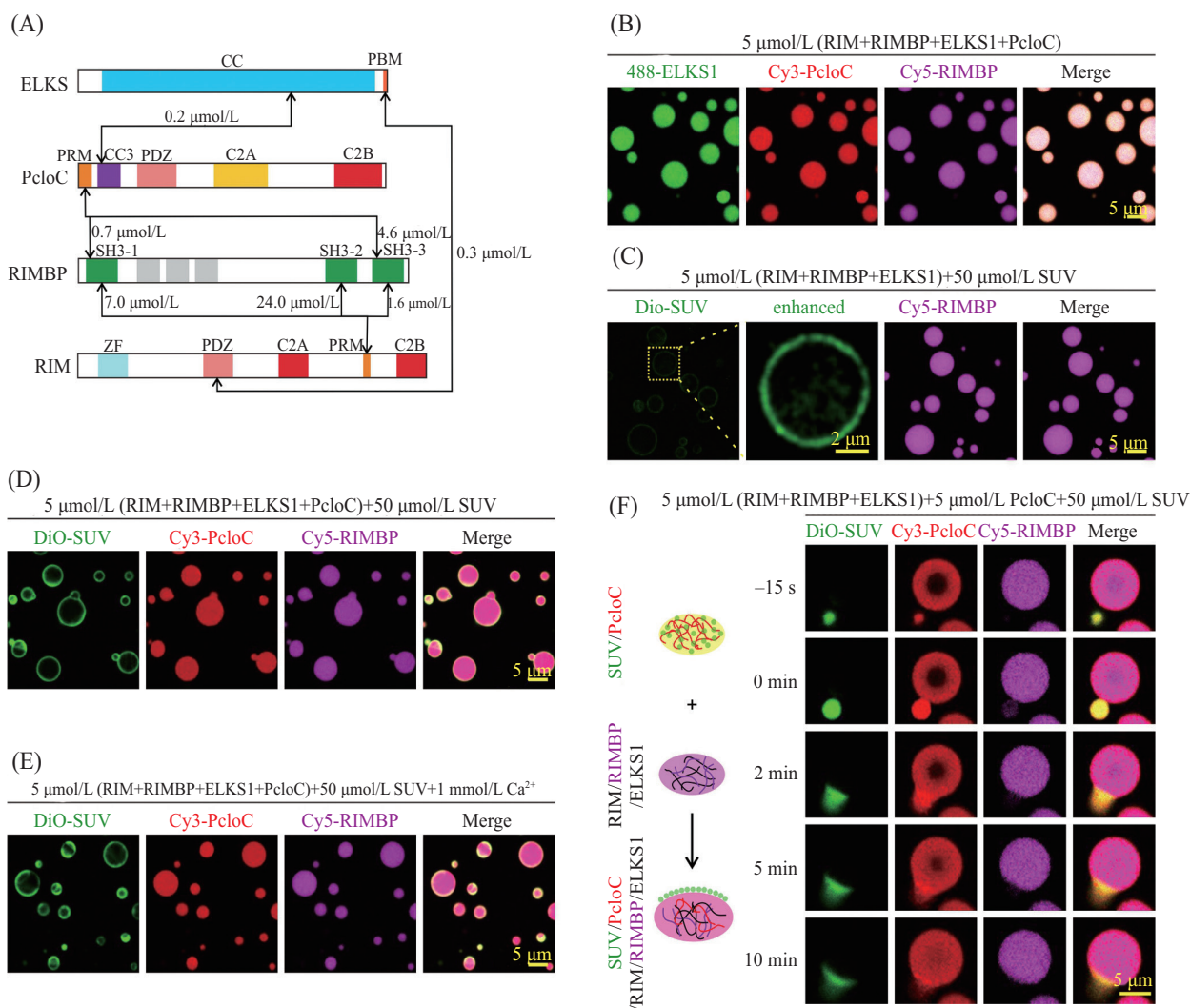


图4 Pclo促进囊泡在活性区凝聚体表面的栓系(根据参考文献[43]修改)

Fig.4 Pclo promotes vesicle tethering on the surface of the active zone condensate (modified from the reference [43])

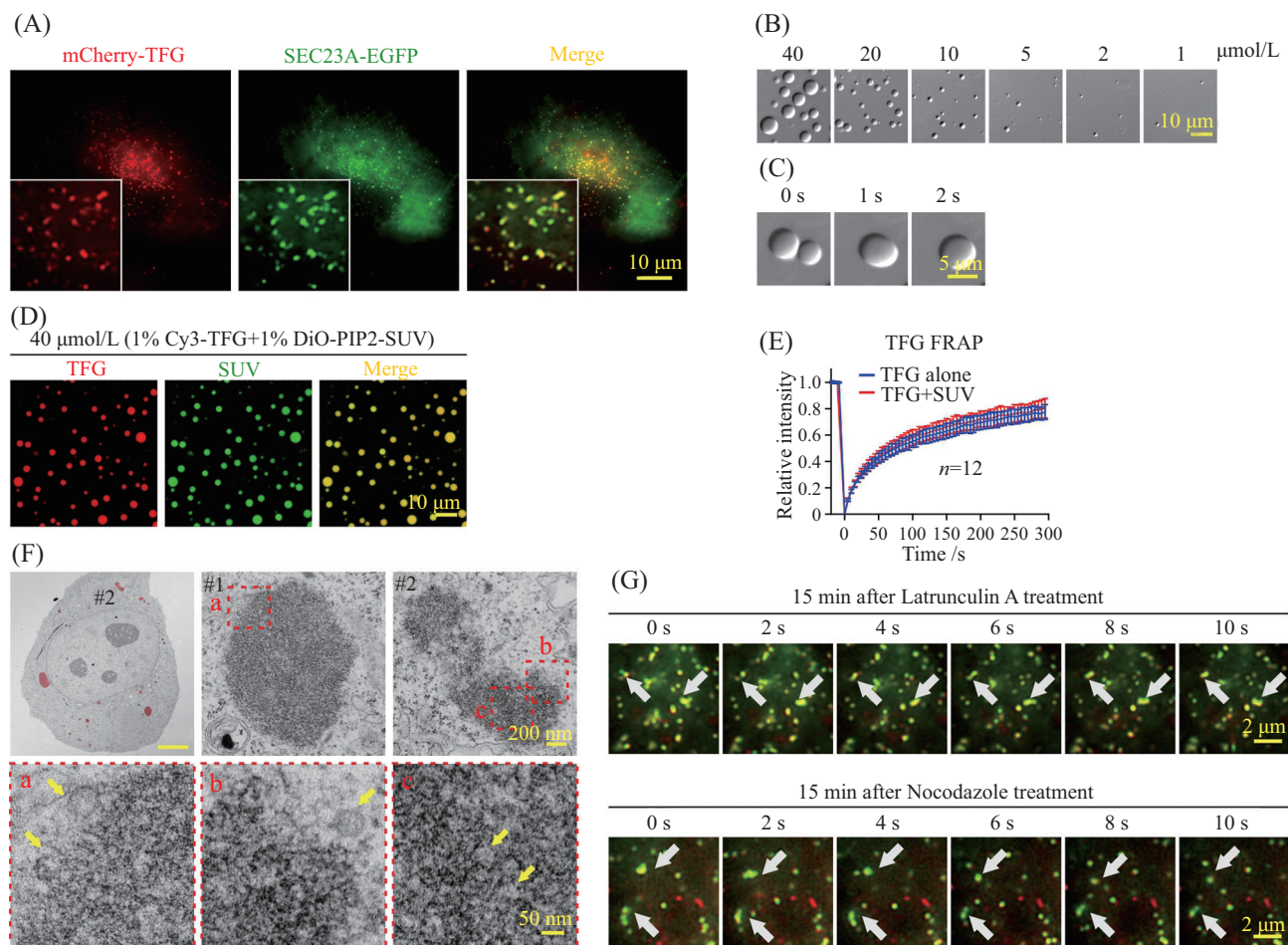
题是方向性的决定。以SV为例, Pclo与活性区相较于储备池有着更高的结合强度, 这决定了SV的流向。而关于COPII囊泡在ER与ERGIC之间的转运, 这里只是初步展示了TFG与COPII囊泡的协同运动, 至于TFG在ER和ERGIC中分别与哪些分子相互作用, 是否有着结合强度的差异, 是否受到以及受到何种细胞信号的调控, 这些都是将来需要解决的问题。

此外,细胞里还有很多短距离囊泡运输的情况,比如 COPI(coat protein complex I)囊泡在高尔基堆(Golgi stack)之间的转运等。一类被称作高尔基体蛋

白(golgin)的支架蛋白也跟Pcl_o具有相似之处,它们都具有长长的卷曲螺旋结构,也都具有捕捉囊泡的能力。因此,将来一个可能的方向是探究高尔基体蛋白是否以及如何参与到相分离介导的高尔基堆间的囊泡运输中,以及相分离在更加广阔的细胞生物学过程中的应用。

——致谢

我们衷心感谢中国科学院生物物理研究所张宏院士课题组及清华大学生命科学学院葛亮教授课



A: TFG与COPII囊泡的标志物SEC23A在COS7细胞里共定位, 左下角为4倍放大图; B: 同源重组的TFG在体外发生相分离(3% PEG8000诱导); C: TFG凝聚体发生融合; D: TFG凝聚体富集SUV; E: TFG在有或无SUV情况下的荧光漂白恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP); F: 光电联用显微镜下TFG与COPII囊泡的共定位, 下方图片为上方红色虚线框放大图, 黄色箭头所指为COPII囊泡; G: 微丝与微管的解聚都不影响TFG凝聚体的形成与COPII囊泡的共定位, 以及它们的动态特征, 白色箭头所指为代表性凝聚体。

A: TFG and COPII vesicle marker SEC23A form colocalized puncta in COS7 cells, the left corner shows a 4 $\times$ zoom in image; B: recombinant TFG undergoes phase separation in the presence of 3% PEG8000; C: TFG droplets fusion *in vitro*; D: TFG droplets enrich SUV; E: FRAP of TFG in the presence or absence of SUV; F: CLEM (correlative light-electron microscopy) imaging showing colocalization of COPII vesicles within TFG condensates, the lower images are magnified from the red dash lines selected regions in the upper panels, and the yellow arrows indicate COPII vesicles; G: disassembly of actin filament or microtubule does not affect TFG condensation and clustering of COPII vesicles, as well as their mobilities, white arrows indicate representative condensates.

图5 TFG凝聚体介导COPII囊泡的组织与运输(根据参考文献[43]修改)

Fig.5 TFG condensates mediate COPII vesicles organization and trafficking (modified from the reference [43])

题组在此课题研究过程中的帮助。

参考文献 (References)

- [1] VALE R D. Intracellular transport using microtubule-based motors [J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1987, 3: 347-78.
- [2] VALE R D, MILLIGAN R A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins [J]. *Science*, 2000, 288(5463): 88-95.
- [3] GOMEZ-NAVARRO N, MILLER E. Protein sorting at the ER-Golgi interface [J]. *J Cell Biol*, 2016, 215(6): 769-78.
- [4] LEE M C, MILLER E A, GOLDBERG J, et al. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 87-123.
- [5] CHANADAY N L, COUSIN M A, MILOSEVIC I, et al. The synaptic vesicle cycle revisited: new insights into the modes and mechanisms [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(42): 8209-16.
- [6] MOCHIDA S. Neurotransmitter release site replenishment and presynaptic plasticity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 327.
- [7] SUDHOF T C. The synaptic vesicle cycle [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27: 509-47.
- [8] VALE R D. The molecular motor toolbox for intracellular transport [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 467-80.
- [9] FERNANDEZ-BUSNADIEGO R, ZUBER B, MAURER U E, et al. Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography [J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(1): 145-56.

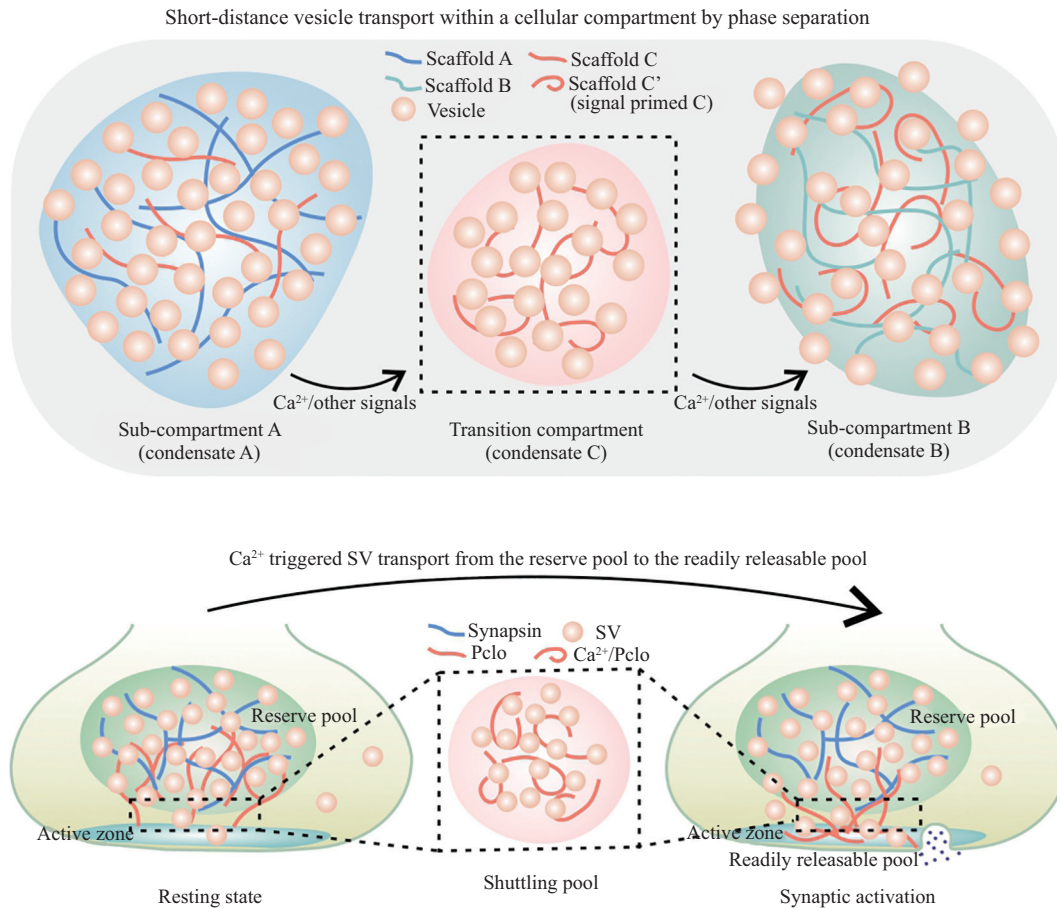


图6 相分离介导短距离囊泡运输的模型(根据参考文献[43]修改)

Fig.6 Short-distance vesicle transport via phase separation (modified from the reference [43])

- [10] NELSON J C, STAVOE A K, COLON-RAMOS D A. The actin cytoskeleton in presynaptic assembly [J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(4): 379-87.
- [11] PELLETT P A, DIETRICH F, BEWERSDORF J, et al. Inter-Golgi transport mediated by COPI-containing vesicles carrying small cargoes [J]. *eLife*, 2013, 2: e01296.
- [12] TOKUOKA H, GODA Y. Myosin light chain kinase is not a regulator of synaptic vesicle trafficking during repetitive exocytosis in cultured hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(45): 11606-14.
- [13] BROWN A. Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(6): 817-21.
- [14] GUEDES-DIAS P, HOLZBAUR E L F. Axonal transport: driving synaptic function [J]. *Science*, 2019, 366(6462): eaaw9997.
- [15] VALE R D, REESE T S, SHEETZ M P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility [J]. *Cell*, 1985, 42(1): 39-50.
- [16] ALABI A A, TSIEN R W. Synaptic vesicle pools and dynamics [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(8): a013680.
- [17] PIERIBONE V A, SHUPLIAKOV O, BRODIN L, et al. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release [J]. *Nature*, 1995, 375(6531): 493-7.
- [18] RIZZOLI S O, BETZ W J. Synaptic vesicle pools [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(1): 57-69.
- [19] SIKSOU L, ROSTAING P, LECHAIRE J P, et al. Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(26): 6868-77.
- [20] SUDHOF T C. Calcium control of neurotransmitter release [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(1): a011353.
- [21] TAKAMORI S, HOLT M, STENIUS K, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle [J]. *Cell*, 2006, 127(4): 831-46.
- [22] WILHELM B G, MANDAD S, TRUCKENBRODT S, et al. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins [J]. *Science*, 2014, 344(6187): 1023-8.
- [23] ROSAHL T W, SPILLANE D, MISSLER M, et al. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation [J]. *Nature*, 1995, 375(6531): 488-93.
- [24] ACUNA C, LIU X, SUDHOF T C. How to make an active zone: unexpected universal functional redundancy between RIMs and RIM-BPs [J]. *Neuron*, 2016, 91(4): 792-807.
- [25] WANG S S H, HELD R G, WONG M Y, et al. Fusion competent synaptic vesicles persist upon active zone disruption and loss of vesicle docking [J]. *Neuron*, 2016, 91(4): 777-91.
- [26] CHEN X, WU X, WU H, et al. Phase separation at the synapse [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(3): 301-10.
- [27] WU X, CAI Q, FENG Z, et al. Liquid-liquid phase separation in neuronal development and synaptic signaling [J]. *Dev Cell*, 2020, 55(1): 18-29.

- [28] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-98.
- [29] BOEYNAEMS S, ALBERTI S, FAWZI N L, et al. Protein phase separation: a new phase in cell biology [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 420-35.
- [30] GAO Y, LI X, LI P, et al. A brief guideline for studies of phase-separated biomolecular condensates [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(12): 1307-18.
- [31] FENG Z, CHEN X, WU X, et al. Formation of biological condensates via phase separation: characteristics, analytical methods, and physiological implications [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(40): 14823-35.
- [32] WU X, QIU H, ZHANG M. Interactions between membraneless condensates and membranous organelles at the presynapse: a phase separation view of synaptic vesicle cycle [J]. *J Mol Biol*, 2023, 435(1): 167629.
- [33] FENG Z, WU X, ZHANG M. Presynaptic bouton compartmentalization and postsynaptic density-mediated glutamate receptor clustering via phase separation [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 193: 108622.
- [34] MILOVANOVIC D, WU Y, BIAN X, et al. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles [J]. *Science*, 2018, 361(6402): 604-7.
- [35] WU X, CAI Q, SHEN Z, et al. RIM and RIM-BP form presynaptic active-zone-like condensates via phase separation [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(5): 971-84, e5.
- [36] WU X, GANZELLA M, ZHOU J, et al. Vesicle tethering on the surface of phase-separated active zone condensates [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(1): 13-24, e7.
- [37] GUNDELFINGER E D, REISSNER C, GARNER C C. Role of Bassoon and Piccolo in assembly and molecular organization of the active zone [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2015, 7: 19.
- [38] DANI A, HUANG B, BERGAN J, et al. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain [J]. *Neuron*, 2010, 68(5): 843-56.
- [39] HALLERMANN S, FEJTOVA A, SCHMIDT H, et al. Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse [J]. *Neuron*, 2010, 68(4): 710-23.
- [40] MUKHERJEE K, YANG X, GERBER S H, et al. Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6504-9.
- [41] BUTOLA T, WICHMANN C, MOSER T. Piccolo promotes vesicle replenishment at a fast central auditory synapse [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2017, 9: 14.
- [42] ACKERMANN F, SCHINK K O, BRUNS C, et al. Critical role for Piccolo in synaptic vesicle retrieval [J]. *eLife*, 2019, 8: e46629.
- [43] QIU H, WU X, MA X, et al. Short-distance vesicle transport via phase separation [J]. *Cell*, 2024, doi: 10.1016/j.cell.2024.03.003.
- [44] NEHER E, SAKABA T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release [J]. *Neuron*, 2008, 59(6): 861-72.
- [45] SCHNEGGENBURGER R, NEHER E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse [J]. *Nature*, 2000, 406(6798): 889-93.
- [46] GERBER S H, GARCIA J, RIZO J, et al. An unusual C₂-domain in the active-zone protein piccolo: implications for Ca²⁺ regulation of neurotransmitter release [J]. *EMBO J*, 2001, 20(7): 1605-19.
- [47] GARCIA J, GERBER S H, SUGITA S, et al. A conformational switch in the Piccolo C2A domain regulated by alternative splicing [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(1): 45-53.
- [48] WANG X, HU B, ZIEBA A, et al. A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1 [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(40): 12584-96.
- [49] HANNA M G T, BLOCK S, FRANKEL E B, et al. TFG facilitates outer coat disassembly on COPII transport carriers to promote tethering and fusion with ER-Golgi intermediate compartments [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(37): E7707-E16.
- [50] JOHNSON A, BHATTACHARYA N, HANNA M, et al. TFG clusters COPII-coated transport carriers and promotes early secretory pathway organization [J]. *EMBO J*, 2015, 34(6): 811-27.
- [51] WITTE K, SCHUH A L, HEGERMANN J, et al. TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(5): 550-8.
- [52] ZEUSCHNER D, GEERTS W J, VAN DONSELAAR E, et al. Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(4): 377-83.