

DOI: 10.13376/j.cblls/2016056

文章编号: 1004-0374(2016)04-0442-10

COPII各组分在蛋白质分泌途径中的功能

徐晓峰¹, 普雪娇², 莫蓓莘^{2*}

(1 深圳大学生命科学学院, 深圳市海洋生物技术与生态环境重点实验室, 深圳 518060;

2 深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060)

摘要: 细胞质被膜复合体 II (COPII) 介导蛋白质从内质网 (ER) 运向高尔基体 (Golgi)。它是真核生物蛋白质分泌途径中的重要组分, 在保持细胞内各个细胞器动态平衡中发挥重要功能。COPII 小泡由 5 种高度保守的细胞质蛋白组成: 胞质 GTP 酶 Ras 相关蛋白 1 (Sar1)、内衣被组分 Sec23 和 Sec24、外衣被组分 Sec13 和 Sec31。对 COPII 的形成过程、COPII 各个亚单位的功能研究进展以及各物种间 COPII 组分的冗余问题进行了讨论。

关键词: COPII; 蛋白质分泌途径; 亚单位; 冗余

中图分类号: Q26 **文献标志码:** A

Functions of COPII subunits in protein secretory pathway

XU Xiao-Feng¹, PU Xue-Jiao², MO Bei-Xin^{2*}

(1 Shenzhen Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecological Environment, College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2 Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: The coat protein complex II (COPII) transport proteins from endoplasmic reticulum (ER) to Golgi. COPII is an important component of the protein secretory pathway in eukaryotes and plays an essential role in maintaining the homeostasis of various intracellular organelles. COPII coat complex consists of five highly conserved cytosolic proteins: cytosolic GTPase Ras related protein 1 Sar 1, inner shell component Sec23-Sec24, and outer cage component Sec13-Sec31. Here, we discuss the processes of COPII formation, and review the research progress of each subunit of COPII, and the redundancy of COPII subunit in different species.

Key words: COPII; protein secretory pathway; subunit; redundancy

1 真核生物的蛋白质分泌途径

内膜系统是真核细胞有别于其它细胞的一个典型特征。内膜系统由许多细胞器组成, 每一种细胞器都有各自独特的组分和功能^[1]。为了维持细胞器在功能和形态上的动态平衡, 细胞器之间进行着大量的膜组分和细胞器腔内物质的交换, 这一过程通过膜泡运输来完成。膜泡从一种细胞器的膜上萌芽, 然后和另一种细胞器的膜融合, 完成不同细胞器间信息和物质的交换^[2]。虽然膜泡交换持续地发生, 但是每一个细胞器有相对恒定的膜蛋白和腔蛋白。目前大家认同的内膜系统运输途径有两种: 分泌途径和内吞途径。分泌途径主要代表蛋白质合成途径,

蛋白质在核糖体翻译并进入内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 进行正确的折叠和修饰, 随后被运向高尔基体 (Golgi) 进行进一步的加工修饰, 然后向其他亚细胞组分、质膜或细胞外基质运输^[3]。与分泌对应的内吞途径将物质从质膜或细胞外基质吞噬进入细胞内, 使其转化为细胞内的一部分^[1]。整个运输途径的核心是可运载物质的小泡的形成, 这些小泡在细胞器间进行蛋白质的运输。

分泌途径的起点是 ER, 在真核生物中大概有

收稿日期: 2015-12-07; 修回日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571332)

*通信作者: E-mail: bmo@szu.edu.cn

1/3 蛋白质的运输起始于这个多功能的细胞器^[4]。这些分泌蛋白必须和 ER 的驻留蛋白分开, 然后进入由 ER 衍生的分泌泡中^[5], 该分泌泡称为细胞质被膜复合体 II (coat protein complex II, COPII)。COPII 由 5 个蛋白质组成, 这些蛋白质在所有真核生物中都高度保守^[5-7]。它们负责在 ER 出口位点 (ER export sites, ERES) 形成运输小泡并介导加载物质从 ER 向 Golgi 运输^[8]。

已有大量关于 COPII 小泡的研究报道, 但是由于 COPII 小泡各组分均存在数量不等的亚型 (表 1), 使得对 COPII 的研究变得十分复杂和困难。迄今为止, COPII 小泡各组分功能尚不十分清楚。

2 COPII小泡的形成

19 世纪 20 年代, 科学家们开始对起始于 ER 的分泌途径展开研究。首先在酿酒酵母的遗传筛选、体外运输分析以及突变体的研究过程中发现了衣被蛋白, 并将其命名为 COPII 小泡^[9-10]。COPII 小泡由 5 个细胞质蛋白组成, 分别是小 G 蛋白 Sar1、内被蛋白 Sec23 和 Sec24、外衣被蛋白 Sec13 和 Sec31。这 5 个高度保守的蛋白是 COPII 小泡形成所需的基本单位^[9]。

利用人造脂质体对 COPII 小泡进行体外组装实验, 发现 COPII 小泡以分层的方式进行组装^[5-7], 在生物体内的研究证实了这一组装机理。首先通过 ER 膜锚定的鸟苷交换因子 Sec12 将细胞质中可溶

蛋白 Sar1-GDP 的 GDP 交换为 GTP, 将其激活^[11]。Sar1 的激活触发了自身结构的重排, 暴露出一段亲水的 α 螺旋, 该螺旋插入 ER 磷脂双分子层中, 诱导 ER 膜弯曲^[12-13]。其次, 结合在 ER 上的 Sar1-GTP 通过和 Sec23 的相互作用, 招募由 Sec23-Sec24 形成的领带型异质二聚体。Sar1-GTP 与 Sec23 相互作用区域占据了 Sar1 表面的 20%^[14]。由 Sar1-Sec23-Sec24- 加载物质组成的蛋白质复合体被称为“初级萌芽复合体”, 该复合体又称初期小泡 (nascent vesicle), 是 ER 驱动形成的 COPII 运输小泡的最小功能单位^[14-15] (图 1)。

初期小泡形成后, Sec13 和 Sec31 形成的异源四聚体通过内被组分 Sec23 和 Sec31 的相互作用被招募到初期小泡上, 并在初期小泡上形成一个笼形的外壳^[16], 进一步驱动膜弯曲, 形成 COPII 小泡, 同时增加 COPII 小泡的刚性^[17-19]。其中, Sec23 是 Sar1 的 GTP 酶激活蛋白 (GAP), 促使 Sar1-GTP 水解, 这一作用被外衣被组分 Sec31 以指数倍增强。因此, 内外衣被的完全组装促使 Sar1-GTP 水解。水解了的 Sar1-GDP 对内外衣被的亲水性降低, 导致 COPII 小泡衣被解聚, 这些衣被进入下一轮的小泡形成^[11]。

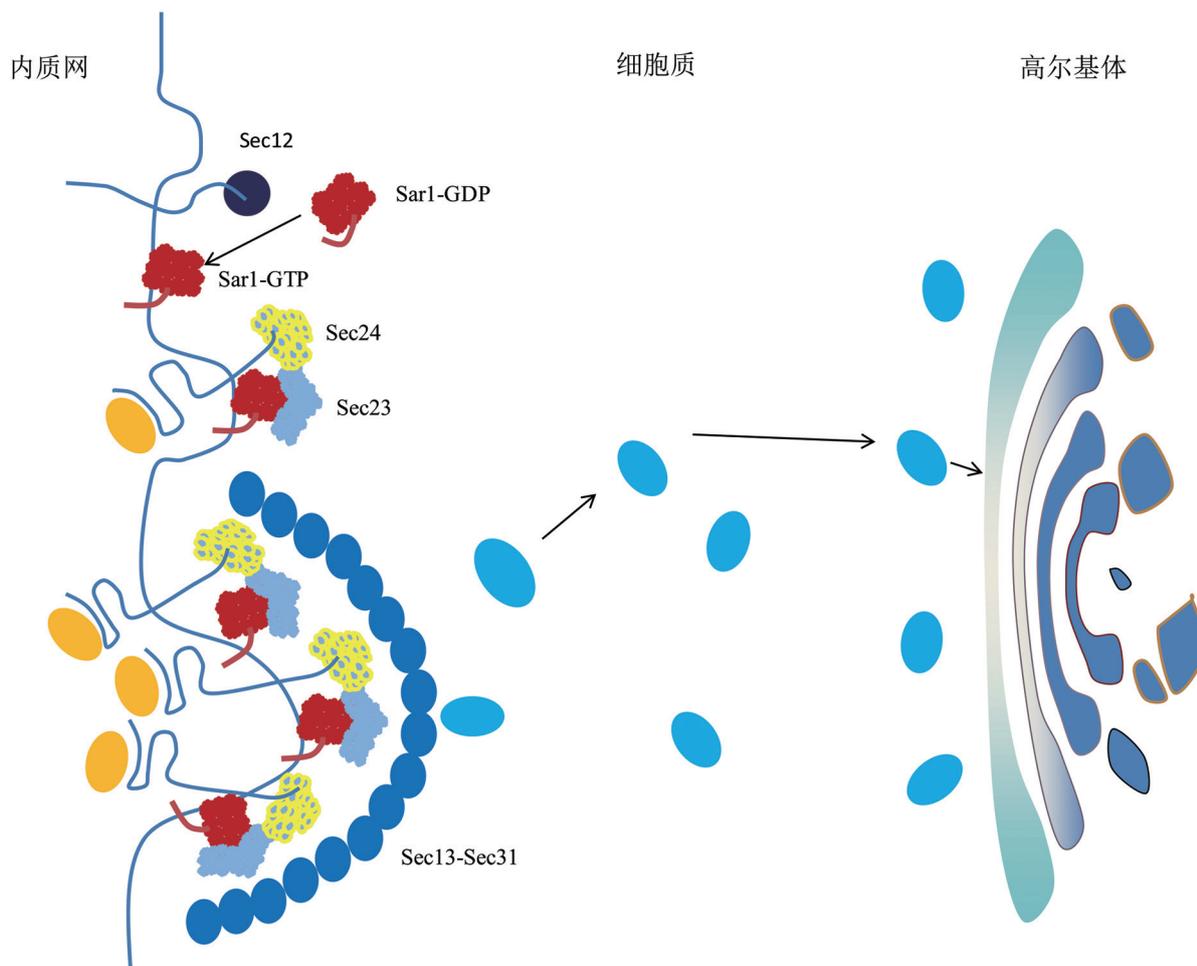
3 COPII各组分的功能

3.1 小G蛋白Sar1

Sar1 (secretion-associated Ras-related protein) 是

表1 不同物种COPII各组分有不同的亚型

酵母	人类	拟南芥	功能/特征
Sar1p	Sar1a	AtSARA1a	Ras GTP酶超家族蛋白起始COPII小泡的组装
	Sar1b	AtSARA1b	
	Sar1c	AtSARA1c、AtSARA1d	
Sec23p	Sec23A	AtSec23A	Sar1-GTP 的结合亚单位
	Sec23B	AtSec23B	Sar1 的GTP激活蛋白(GAP)
		AtSec23C	
		AtSec23D	
		AtSec23E	
		AtSec23F	
		AtSec23G	
Sec24p	Sec43A	AtSec24A	通过与分选信号相互作用对运输物质进行分选
Lst1p	Sec23B	AtSec24B	
Iss1p	Sec23C	AtSec24C	
	Sec23D		
Sec13p	Sec13R	AtSec13A	COPII外层衣被组分, 支架蛋白
	SEH1	AtSec13B	
Sec31p	Sec31A	AtSec31A	COPII外层衣被组分, 支架蛋白
		AtSec31B	



COPII小泡的组装起始于细胞质蛋白Sar1-GDP的招募, Sar1-GDP通过鸟苷交换因子Sec12将GDP交换为GTP而被激活, 激活的Sar1继而招募由Sec23-Sec24形成的异质二聚体, 该二聚体具有选择物质的功能。最后, Sar1-Sec23-Sec24-货物被Sec13-Sec31捕获, Sec13-Sec31形成COPII的外衣被, 具有加固小泡的功能。COPII小泡形成后介导物质从ER运向Golgi, 完成物质的顺向运输。

图1 COPII小泡的形成过程(修改自^[15])

Ras GTP 酶超家族中的一个成员^[2], 在调控 COPII 小泡的形成过程中发挥着重要功能。通过对 Sar1 进行 X 射线晶体分析, 发现它由四个结构域组成: 鸟嘌呤核苷酸结合口袋(G 结构域)、Switch I、Switch II、N 端的两亲性 α 螺旋^[2,20]。其中鸟嘌呤核苷酸结合口袋是 Sar1 的核心组分, 有着高度保守的核苷酸结合基序 GxxxxGKT39, 该基序是 Ras 超家族的独有特征^[2]。对哺乳动物的研究发现, 若将该保守基序的第 39 位苏氨酸突变成天冬酰胺, 鸟苷交换因子 Sec12 不能与之相互作用, Sar1 将一直处于与 GDP 结合状态, 不能被 GTP 置换, 处于失活状态, 表明鸟嘌呤核苷酸结合口袋对 Sar1 功能的发挥具有非常重要的调节作用^[21]。Switch I 结构域调节鸟苷酸和 Mg^{2+} 之间的相互作用。Switch II

在 GTP 水解方面发挥着重要的功能^[20]。N 端的两亲性 α 螺旋通过和磷脂疏水残基中的磷酸基团相互作用, 进而插到磷脂双分子层中, 将 Sar1 锚定到 ER 上^[2]。Sar1- α 螺旋的插入对 ER 膜的变形产生了影响。有研究发现, 当 Sar1 和 ER 膜结合后, Sar1 两亲性 α 螺旋的亲水面位于靠近磷脂的地方, 而疏水面则埋在膜的内部, 干扰脂质的相互作用, 并引起膜的变形。同时, 这一插入也影响了膜泡的形成。将外源的 Sar1 添加到半通透的细胞中, 可以观察到源于 ER 的管状结构。将 Sar1 添加到没有内衣被 Sec23-Sec24 或是没有外衣被 Sec13-Sec31 的人造脂质体中, 脂质体能形成大的管状结构^[12-13,22]。同时, 其他的研究表明, 当 Sar1 的两亲性 α 螺旋被删除或是当 Sar1 的 GTP 水解被阻止时, 萌芽小泡的形

成和释放都被阻止^[12,23]。以上研究表明, Sar1 在膜变形、小泡形成、小泡与 ER 的分离等方面发挥着重要的功能。

除了以上所述的功能外, Sar1 也参与 COPII 早期形成过程的调控。例如, 通过单分子荧光实验研究发现, Sar1-GTP 的水解在初级萌芽复合体的形成过程中影响了腔内物质的浓缩^[24]。COPII 初级萌芽复合体内物质的浓度跟 GTP 水解的多轮循环有关, 并且当 GTP 被水解时, 没有腔内物质的 Sar1 和 Sec23-Sec24 复合体更容易从膜上分离^[24-25]。以上研究表明, 一方面, Sar1 和 GTP 结合之后插入 ER, 对下一步 Sec23-Sec24 的招募很重要; 另一方面, 结合了运输物质的 ER 膜也增加了对 Sec23-Sec24 的亲水性。因此, Sar1 不仅对 Sec23-Sec24 的招募起到位点锚定的功能, 而且在 COPII 小泡的形成过程中发挥调控功能^[26]。

3.2 内衣被蛋白 Sec23-Sec24 异质二聚体

Sar1 被招募到 ER 之后, 紧接着是 Sec23-Sec24 异质二聚体的招募。2001 年, Lederkremer 等^[27]通过单颗粒负染电镜对 Sec23-Sec24 异质二聚体的研究发现, 该二聚体是一个有轻微曲面的领带型结构, 同时两个单体之间存在非常紧密的相互作用。Sec23-Sec24-Sar1 异质三聚体的原子模型表明, 虽然 Sec23、Sec24 有很低的序列一致性, 但是它们有相同的折叠模式, 都形成 5 个明显的结构域: β 折叠、锌指结构、 α 螺旋、主干区域和 C 端区域^[28]。目前, 对 Sec23-Sec24 异质二聚体的研究表明, 该二聚体最主要的功能是与各种分泌蛋白质直接或间接地结合, 将分泌蛋白质分选到 COPII 小泡中, 以及作为 Sar1 GTP 酶的激活蛋白发挥功能。

Sec23 是 Sar1 的 GTP 酶激活蛋白 (GAP), 它将精氨酸残基插入到 Sar1 的催化口袋, 通过对 Sar1 磷酸基团的稳定使 GTP 酶激活, 促进 GTP 的水解^[28]。同时, Sec23 作为连接 Sar1、Sec24、Sec13-Sec31 之间的桥梁, 将 COPII 小泡的各个组分很好地关联起来。除此之外, Sec23 也和其他蛋白质相互作用, 在调控 COPII 小泡形成的多种过程中发挥功能^[5]。

冷冻电镜研究发现, Sec23 能使 Sec24 定位于一个最佳的位置, 使其能够很好地发挥与装载物结合的功能^[19]。同时, Sec23 可能和 Sec31 的两个独特的位点结合, 通过调控 COPII 的三维结构来适应不同大小和形状的装载物的运输^[19]。这些结合位点也对装载物的选择进行精细的调节。例如在对人的

研究中发现, Sec23A 的突变会引起颅面疾病 (cranio-lenticulo-sutural dysplasia, CLSD), 该疾病是由原骨胶原蛋白在 ER 积累所致^[29]。研究发现两个引起 CLSD 的 Sec23 突变 (F382L 和 M702V) 位点均为与 Sec31 的结合位点^[30]。Sec23A F382L (Sec23A 的第 382 位氨基酸由苯丙氨酸变为了亮氨酸) 的突变使 Sec23A 和 Sar1B、Sec31A 的相互作用受到影响, 导致了 COPII 组装缺陷, ER 潴泡 (ER cisternae) 大量形成, 使 COPII 小泡不能有效地形成^[30-31]。而 Sec23A M702V (Sec23A 的第 702 位氨基酸由甲硫氨酸变为了缬氨酸) 突变在纤维母细胞中表达时有正常的 COPII 组装, 但是选择性地抑制了前胶原蛋白的运输^[32], 表明 Sec23-Sec31 的交界面在选择装载物方面发挥了重要的功能。其次, 斑马鱼 Sec23A 第 402 位氨基酸由亮氨酸突变为其他氨基酸时 (L402X), 斑马鱼表现出由于软骨细胞胶原蛋白、II 型胶原蛋白积累减少引发的颅面发育缺陷^[33], 该缺陷和人类 CLSD 相类似, 是否说明 402 位亮氨酸是 Sec31 的结合位点或是暗示 Sec23 对胶原蛋白的运输发挥特殊功能还有待深入研究。

Sec23 存在多种翻译后修饰, 这些修饰调控 COPII 小泡的运输。Lord 等^[34]研究发现, Sec23 的磷酸化和去磷酸化调控着它和特异蛋白之间的反应, 影响了 COPII 膜泡的运输。对酵母细胞的研究发现, 泛素蛋白酶 Ubp3p 和它的共同调节因子 Bre5p 组成的去泛素复合体, 能对酵母 Sec23 进行特异的去泛素化, 调控 COPII 小泡从 ER 到 Golgi 的运输^[26]。

Sec24 负责运输物质的有效分选^[35-37]。运输物质通过信号肽和 Sec24 表面的结合位点相互作用, 进而被招募到初期小泡^[37-39]。Sec24 上的物质结合位点大部分都沿着弯曲的 ER 膜结合面分布^[40]。一方面, 早期的研究显示酵母中 Sec24 有 3 个独立的结合位点 (A、B、C), 而哺乳动物中 Sec24 至少有 4 个结合位点^[5]。这些位点有着各自的特征, 并控制不同的物质被选择性运输^[36-37]。另一方面, 在不同的物种中均存在多个不同的 Sec24 亚型, 酵母有 2 个 Sec24 亚型 (Iss1/Sfb2 和 Lst1/Sfb3), 哺乳类 Sec24 有 4 个亚型 (Sec24A、Sec24B、Sec24C 和 Sec24D), 拟南芥有 4 个亚型 (AtSec24A、AtSec24B、AtSec24C 和 AtSec24D)^[41-43] (表 1)。多种 Sec24 亚型和多种结合位点的存在使得 Sec24 能和多种信号肽结合, 从而使 Sec24 结合物质的范围及其与物质之间相互作用的特异性也得以扩展^[7]。

最近对哺乳类的研究证据表明, Sec24除了作为物质的结合平台外,也涉及对细胞信号的应答。对人类的研究发现,一个参与癌症和糖尿病发生过程的重要信号激酶 Akt 可以使哺乳类的 Sec24C 磷酸化;在体外实验中也发现, Akt 重组蛋白能使 Sec24C 重组蛋白磷酸化,磷酸化了的 Sec24C 很少和 Sec23 结合^[44]。该研究表明 Sec24 能应答细胞信号,并且通过改变和 Sec23 的结合来调控初级萌芽复合体的形成。

不仅 Sec23 存在翻译后修饰, Sec24 也存在多种翻译后修饰。在对人类细胞的研究中发现, Sec24 至少有两种不同形式的翻译后修饰,如 Sec24C 有 O-糖基化修饰、磷酸化修饰^[45]。Sec24C 在细胞分裂间期有 O-连接的 β -N-乙酰葡萄糖胺 (O-GlcNAc) 修饰,但是在有丝分裂期间, Sec24C 的糖基化修饰被磷酸化所取代,它们以一种竞争的方式对 Sec24C 进行修饰^[45],表明 Sec24 的翻译后修饰在细胞分裂调控方面发挥重要功能。

以上对 Sec24 功能的研究都是在哺乳动物中进行的,最近几年对 Sec24 功能的研究也陆续在植物中开展,其中对拟南芥的研究比较深入。在拟南芥的 4 个 Sec24 亚型中研究最多得是 Sec24A 亚型,目前已经通过不同的方式得到了 Sec24A 的 3 种不同的突变体 (*Sec24a-1*、*Sec24a-2* 和 *G92/ermo2*)。 *G92/ermo2* 在 DNA 序列的 2078 位 G 变为 A,使得对应的 Sec24A 蛋白在 693 位由精氨酸转变成了赖氨酸,这一转变导致了拟南芥小苗 ER 和 Golgi 的形态异常^[46-47]。在酵母和哺乳动物中的研究表明,693 位残基在真核生物中高度保守,对运输物质的结合非常重要^[36,38]。2011 年, Conger 等^[48] 将拟南芥 *Columbia* (*Col-0*) 的 *AtSec24A* 的第二个外显子插入 T-DNA,成为 *atsec24a-1* 突变株系。研究发现, *atsec24a-1* 突变株系没有纯合个体 *atsec24a-1* (*m/m*),在杂合体的情况下 *atsec24a-1* (*+/m*) 导致了花粉的传播缺陷,致使有突变的 *atsec24a-1* 等位基因不能通过花粉传递到后代中,但是不影响雌性传播。2014 年,另一个 Sec24 的单碱基突变株 *Sec24a-2* 被发现, *Sec24a-2* 的 DNA 序列中的 1327 位 G 变为 T,使得 443 位氨基酸由脯氨酸变为了丝氨酸,该突变株在花萼细胞中有异常的大细胞表型,其原因是 Sec24A 在拟南芥花萼细胞中的核内复制和细胞大小模式调控方面发挥作用。同时, *Sec24a-2* 也像其他两种突变体一样有 ER 和 Golgi 形态异常的现象^[49]。

以上的研究结果显示 Sec24A 的突变引起多种缺陷,表明它在多种不同的发育途径中发挥作用,从而证明了 Sec24A 通过对多种不同运输物质的筛选,将其运到不同的目的地而发挥不同的功能。

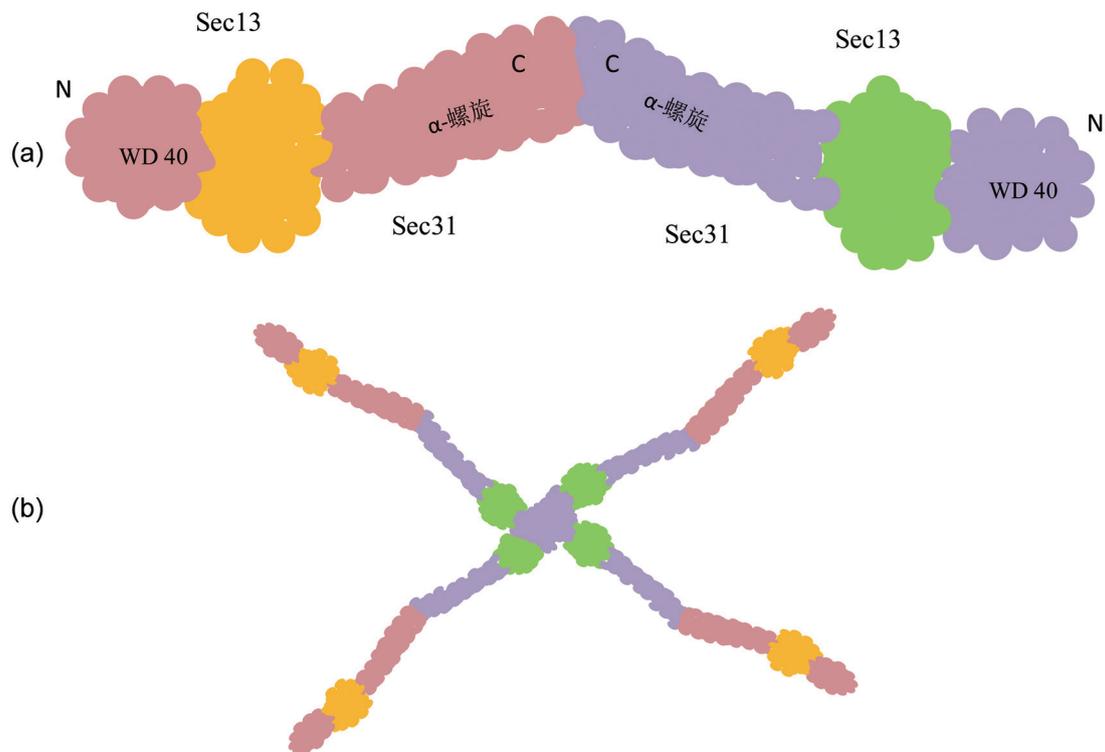
3.3 外衣被蛋白 Sec13-Sec31 异质四聚体

在初期小泡形成之后, Sec13-Sec31 异质四聚体被招募形成 COPII 的笼形外层。Sec13-Sec31 异质四聚体由两个彼此相互作用的 Sec13-Sec31 异质二聚体构成 (图 2a)^[49]。序列分析表明, Sec13 由一个不完整的 WD40 结构域组成, WD40 结构域由重复的 β 基序组成,完整的 WD40 结构域会形成典型的 7 个 β 折叠,而 Sec13 的 WD40 结构域与典型的 WD40 结构域不同,它只有 6 个 β 折叠^[50]。根据预测, Sec31 在 N 端有一个 WD40 结构域,剩下的部分由两个 α 螺旋结构组成,这两个螺旋被一段复杂性较低的区域隔开^[50]。当 Sec13 和 Sec31 形成异质二聚体时, Sec13 锚定于 Sec31 的 α 螺旋和 β 折叠之间, Sec13 通过和 Sec31 共用第 7 个 β 折叠,形成完整的 WD40 结构域^[18]。生化和电镜研究的结果表明,两个 Sec13-Sec31 异质二聚体通过两个 Sec31 分子的 α 螺旋结构尾尾相连,形成一个 Sec13-Sec31 异质四聚体棒状结构 (图 2a),四个棒状结构通过 Sec31 的 N 端 WD40 结构域中的 β 折叠片形成 COPII 的一个顶端 (图 2b)^[49]。

对 Sec13-Sec31 的晶体研究发现,在 Sec23-Sec24 不存在的情况下, Sec13-Sec31 能自发组装成直径为 60 nm 的十四面体结构^[17,52]。在生物体内 COPII 小泡的直径在 50~90 nm 之间变动,表明体外组装的 COPII 小泡和生物体内 COPII 小泡的直径相一致。该十四面体结构可以通过调节自身结构和形状,来容纳不同形状和大小的运输物质^[17,52]。

相对于 COPII 的其他组分来说,关于 Sec13、Sec31 功能研究的报道比较少。最近的研究表明, Sec13-Sec31 的组装驱动了 COPII 膜的弯曲,促进 COPII 小泡形成^[17]。D'Arcangelo 等^[26] 研究发现,在酵母中,减少 COPII 运输物质的数量, COPII 对 Sec13 的需要量也随之减少;人为删除 Sec31 与 Sec13 的结合位点,使 Sec13 不能与 Sec31 结合, COPII 小泡仍然能够形成。这些研究表明, Sec13 的主要功能是对 COPII 笼形外层提供结构刚性加固。

Sec13 除了在 COPII 小泡中发现外,在核孔复合体 (nuclear pore complexes, NPC) 和有丝分裂纺锤体 (mitotic spindle) 中也有发现,并在其中发挥功能^[50,53-56]。同时,小鼠的体内研究表明,在 Sec13



(a) Sec13-Sec31异质四聚体由两个Sec13-Sec31二聚体构成, Sec13-Sec31结构主要由 β 折叠构成的WD40结构域和 α 螺旋构成。Sec13位于Sec31的WD40结构域和 α 螺旋之间。两个Sec13-Sec31异质二聚体通过两个Sec31分子的 α 螺旋结构尾尾相连, 形成一个Sec13-Sec31异质四聚体棒状结构。(b)四个棒状结构通过Sec31的N端WD40结构域的相互作用形成COPII的一个顶端。

图2 COPII小泡的笼形结构组装(修改自^[51])

表达量很低的情况下 (Sec13 敲除致死), 细胞核与细胞质之间的运输以及分泌途径没有受到影响, 但是该突变影响了 γ -干扰素 (interferon gamma, IFN γ)、 β 转化生长因子 (transforming growth factor- β , TGF- β) 和白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6) 的表达以及免疫球蛋白 (immunoglobulin) 的产生, 造成了特异的免疫缺陷, 表明 Sec13 在细胞免疫方面发挥重要的功能^[57]。除此之外, 在果蝇的研究中发现, Sec13 在调控发育诱导基因的转录过程中发挥着重要的功能^[58]。综上所述数据表明, Sec13 的功能不仅限于 COPII 形成机制, 它在其他多种途径中也发挥着重要功能^[51]。

Sec13-Sec31 结合到初期小泡上加强了 Sar1-GTP 酶的水解活性。Sar1-Sec23-Sec31 复合物的晶体分析表明, Sec31 的结合增加了 Sec23 的 GAP 活性, 使 Sar1 的 GTP 水解活性增加 10 倍以上^[59], 这种活性加强是由于 Sec31 的结合诱导了 Sec23 和 Sar1 的构象变化。在 Sec23-Sar1-GTP 复合体中 Sec23 的第 720 位谷氨酰胺的位置远离活性位点, Sec31 结合后, Sec23 的构象发生变化, 使得第 720 位的谷氨酰胺靠近活性位点, 并和第 922 位色氨酸和第

923 位天冬酰胺形成氢键。这表明 Sec31 在提高水解酶活性方面发挥作用, 虽然它本身没有任何催化活性^[23]。

研究发现, COPII 内衣被 Sec23 突变引起外衣被 Sec13-Sec31 从内衣被上解离下来, 导致斑马鱼出现由胶原蛋白分泌缺陷引起的颅面疾病^[31]。胶原蛋白的直径达到 300 nm, 而 COPII 完整的笼形几何结构的最大直径才 100 nm^[19], 要运输这样直径较大的蛋白, 显然它的直径是远远不够的^[60-61]。在 Sec23 没有突变的情况下, 这样直径较大的蛋白质很好运输, 所以上述实验从侧面表明了直径较大蛋白质的运输有赖于 Sec13-Sec31 较大的膜弯曲力, 这些直径较大的物质借助 Sec13-Sec31 的膜弯曲力将自己压缩到 COPII 小泡中。另一方面, 也可能是 Sec13-Sec31 的缺失改变了衣被的 GTP 酶活性, 使这些含有直径较大蛋白质的 COPII 小泡不能成功和膜分离^[9]。同时, 有研究表明 Sec31 的修饰对于大直径物质的运输也起非常重要的调控作用。2012年, Fromme 等^[62]对小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cells, ESCs) 的研究发现, 泛素连接酶 (ubiquitin ligase) CUL3- KLHL12 可以使 Sec31 单泛素化, 并

且促进较大 COPII 小泡的形成,使其可以容纳较大直径的运输物质,如胶原蛋白,但是对于较小或是较柔韧物质的运输,Sec31 的单泛素化显得不是那么的重要。综上研究表明,Sec13-Sec31 通过自身的结构、激酶活性以及其他调节因子对其修饰,从而对直径较大蛋白质的运输起到一定的调节作用。

4 COPII各组分亚型的功能

COPII 小泡的研究源于对酵母遗传突变的筛选,酵母 COPII 小泡中除 Sec24 有 3 个亚型外,其他的组分都只有 1 种亚型^[63]。随着对哺乳动物和植物中 COPII 小泡研究的深入,相继发现多种 COPII 组分的亚型,且各组分亚型之间均存在较大的差异^[64]。COPII 组分的亚型如此多样化的意义尚不清楚,COPII 亚型是否存在冗余或者组织特异性也有待进一步研究。

哺乳动物细胞中 Sec24 有 4 个不同的亚型 (Sec24A、Sec24B、Sec24C 和 Sec24D), Sec13 有 1 个, Sar1 有 2 个, Sec23 有 2 个。拟南芥基因组编码的 COPII 亚型在数量上远超其他真核生物, Sec23 有 7 个, Sec24 有 3 个, Sar1 有 5 个, Sec13 有 2 个, Sec31 有 2 个^[65](表 1)。

有证据表明,虽然存在这么多亚型,但是物种间相似的亚型可能有相同的功能。例如,人类 Sec23B 的突变会引起先天性 II 型贫血^[66];在斑马鱼中敲除 Sec23B 也导致红细胞发育出现异常^[66]。

对非植物系统的研究清晰地表明,COPII 同一组分的不同亚型间有相似但不完全重叠的功能。例如,在酿酒酵母中,存在 3 个 Sec24 亚型,但是只有 1 个亚型 (Sec24p) 对酵母的生存是必要的,该亚型基因的敲除能通过 ISS1 (另一个 Sec24 亚型) 的过表达部分恢复^[43]。而酵母 Sec24 另一亚型 Lst1p 的功能则是参与 Gas1p (一个 GPI 锚定蛋白) 和 Pma1p (质膜质子泵 ATP 酶) 的运输^[42,67]。对哺乳动物细胞的研究发现,Sec24 亚型在识别膜蛋白方面有着高度重叠的功能,但只有 Sec24A 对尾部具双亮氨酸的膜蛋白的运输起调控作用^[68]。对人类 Sar1 亚型的研究发现,虽然 Sar1A 和 Sar1B 之间有着 90% 的序列一致性,但是只有 Sar1B 在大脂肪粒的包装过程中起作用^[60],而且只有 Sar1B 对于 Sec23A 的突变非常敏感(涉及颅面发育失常)^[31]。对小鼠细胞的正向遗传学筛选研究发现,3 个 Sec24 亚型中只有 Sec24A 对于神经管的闭合起重要作用^[69-70]。

对植物细胞的研究也表明,COPII 同一组分的不同亚型间可能有不完全重叠的功能。有研究发现,在烟草原生质体中,分别过表达两个拟南芥 Sar1 亚型 (AtSar1A 和 AtSar1B,在氨基酸水平有 93% 的一致性) 和 YFP 融合蛋白,均在不同程度上抑制了 α -淀粉酶的分泌^[71],而且这 2 种融合蛋白在烟草叶表皮细胞中表现了不同的定位,AtSar1B 和膜的结合程度大于 AtSar1A^[71]。另外,拟南芥 Sec24A 突变株的回复实验发现,AtSec24A 或 AtYFP-Sec24A 的表达能回复 AtSec24A 突变株的表型,而 AtSec24B 和 AtSec24C 却不能^[47],并且 AtSec24A 功能的完全丢失是致死的,表明 Sec24A 对拟南芥是至关重要的一个基因,而 AtSec24B 敲除仅仅引起了由于花粉萌发率下降导致的雄性不育的微弱表型,AtSec24C 的敲除有雌性配子体异常的表型^[72]。禾本科植物水稻 (*Oryza sativa*) 的研究表明,4 个 Sar1 亚型 (OsSar1a、OsSar1b、OsSar1c 和 OsSar1d) 其中之一过表达或是通过 RNA 干扰技术抑制其中一个亚型的表达,都不会产生明显的表型,但是同时敲除 OsSar1 a/b/c 会引起种子缩小以及易粉碎,在突变株的胚乳中还引起了异常蛋白体的产生,表明 Sar1 在水稻中存在功能冗余^[73]。综上数据说明,在植物中同一组分的不同亚型之间仅有一部分的功能重叠。

对植物系统和酵母系统的 COPII 亚型的交叉研究表明,在高等有机体中 COPII 小泡进化程度较高,可以从内质网运输一些重要的因子到高尔基体,这些因子在不同的系统中对于细胞的生命活动起不同的作用。尽管在不同物种间 COPII 蛋白有着较高的序列保守性,但在进化程度越高的生物体中,COPII 组分亚基所发挥的作用就越专一化。在最近的一项研究中,将不同的拟南芥 COPII 组分亚基在相应的温度敏感型酵母突变株中表达,通过观察酵母在不同温度下的生长,以及检测可溶性酵母 α 因子信息素和质膜 SNARE SNC1 的分泌,来分析不同组分亚基的互补作用,发现除了拟南芥 Sar1 的一个亚型 AtSar1D 以及 Sec13 的一个亚型 AtSec13A 回复了相应突变的表型,其他的都没有回复^[74]。这一实验表明,同一 COPII 组分的不同亚型在不同的生物体中可能发挥不同的功能。

5 展望

目前已经有大量的研究结果阐述了 COPII 小泡的形成过程、各组分以及各组分不同亚型的功能,但是对于 COPII 小泡很多方面的认识尚不清楚。

首先, 对小鼠、果蝇等哺乳动物的研究揭示了 Sec13 除了在 COPII 运输过程中起作用, 还在核孔复合体、基因转录、纺锤丝调节、细胞免疫等方面起着非常重要的调控作用, 植物中 Sec13 是否具有类似的功能? 目前对此问题的研究尚未开始。

其次, 目前对哺乳动物的众多研究表明, Sec23 突变或缺失以及 Sec13-Sec31 的突变都将影响类似胶原蛋白这样直径较大物质的运输, 导致相应表型的产生。根据 Sec23 的一般功能, 它和 Sec24 一起作为运输物质的分选平台, 而 Sec13-Sec31 形成 COPII 小泡外层的刚性结构。在这样的基础上是否可以推测: Sec23 可能对胶原蛋白这样直径较大的物质具有选择或专一性结合功能, 将其分选到 COPII 小泡中, 而 Sec13-Sec31 对这样含有较大直径物质的 COPII 小泡的形成具有较大的膜弯曲力、压缩力, 使其能够形成较大直径的 COPII 小泡足够容纳大的物质。目前还需更多的证据来证明此推测。

最后, COPII 各组分在不同物种中都有数量不等的亚型, 大量的研究证据表明这些亚型有各自独特功能, 但是同一组分的不同亚型之间都存在功能冗余的现象, 目前有很少的研究涉及到同一组分各亚型之间功能冗余的程度。

COPII 小泡在 ER 到 Golgi 的蛋白质运输过程中发挥重要的功能, 通过对不同物种 COPII 各组分功能以及作用机制的研究, 有利于全面认识分泌蛋白的分选运输过程, 对蛋白质的分选提供更清晰、更详细的细节, 从而为人类由于顺向运输缺陷导致的疾病的预防、诊断以及治疗提供新的思路 and 策略。

[参 考 文 献]

- [1] Bassham DC, Brandizzi F, Otegui MS, et al. The secretory system of *Arabidopsis* [M]// American Society of Plant Biologists. The *Arabidopsis* Book, 2008, 6: e0116
- [2] Russell C, Stagg SM. New insights into the structural mechanisms of the COPII coat. *Traffic*, 2010, 11: 303-10
- [3] Foresti O, Denecke J. Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic*, 2008, 9: 1599-612
- [4] Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 2003, 425: 686-91
- [5] Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, et al. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 20-8
- [6] Bickford LC, Mossessova E, Goldberg J. A structural view of the COPII vesicle coat. *Curr Opin Struct Biol*, 2004, 14: 147-53
- [7] Marti L, Fornaciari S, Renna L, et al. COPII-mediated traffic in plants. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 522-8
- [8] Hanton SL, Chatre L, Renna L, et al. *De novo* formation of plant endoplasmic reticulum export sites is membrane cargo induced and signal mediated. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1640-50
- [9] Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 2004, 116: 153-66
- [10] Lord C, Ferro-Novick S, Miller EA. The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5: a013367
- [11] Shindiapina P, Barlowe C. Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2010, 21: 1530-45
- [12] D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA. Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833: 2464-72
- [13] Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, et al. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol*, 2005, 171: 919-24
- [14] Lee MC, Orci L, Hamamoto S, et al. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*, 2005, 122: 605-17
- [15] Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*, 2002, 419: 271-7
- [16] Bi X, Mancias JD, Goldberg J. Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23•Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell*, 2007, 13: 635-45
- [17] Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, et al. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, 2006, 439: 234-38
- [18] Fath S, Mancias JD, Bi X, et al. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell*, 2007, 129: 1325-36
- [19] Bhattacharya N, Jason O, Stagg SM. The structure of the Sec13/31 COPII cage bound to Sec23. *J Mol Biol*, 2012, 420: 324-34
- [20] Rao Y, Bian C, Yuan C, et al. An open conformation of switch I revealed by Sar1-GDP crystal structure at low Mg²⁺. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348: 908-15
- [21] Weissman JT, Plutner H, Balch WE. The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic*, 2001, 2: 465-75
- [22] Aridor M, Fish KN, Bannykh S, et al. The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J Cell Biol*, 2001, 152: 213-30
- [23] Bacia K, Futai E, Prinz S, et al. Multibudded tubules formed by COPII on artificial liposomes. *Sci Rep*, 2011, 1: 17
- [24] Sato K, Nakano A. Dissection of COPII subunit-cargo

- assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 167-74
- [25] Tabata KV, Sato K, Ide T, et al. Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J*, 2009, 28: 3279-89
- [26] D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA. Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833: 2464-72
- [27] Lederkremer GZ, Cheng Y, Petre BM, et al. Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10704-9
- [28] Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*, 2002, 419: 271-77
- [29] Boyadjiev SA, Kim SD, Hata A, et al. Cranio-lenticulo-sutural dysplasia associated with defects in collagen secretion. *Clin Genet*, 2011, 80: 169-76
- [30] Boyadjiev SA, Fromme JC, Ben J, et al. Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking. *Nat Genet*, 2006, 38: 1192-97
- [31] Fromme JC, Ravazzola M, Hamamoto S, et al. The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Dev Cell*, 2007, 13: 623-34
- [32] Kim SD, Pahuja KB, Ravazzola M, et al. SEC23-SEC31 the interface plays critical role for export of procollagen from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2012, 287: 10134-44
- [33] Lang MR, Lapierre LA, Frotscher M, et al. Secretory COPII coat component Sec23a is essential for craniofacial chondrocyte maturation. *Nat Genet*, 2006, 38: 1198-203
- [34] Miller E, Antonny B, Hamamoto S, et al. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J*, 2002, 21: 6105-13
- [35] Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, et al. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, 2003, 114: 497-509
- [36] Mossessova E, Bickford LC, Goldberg J. SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 2003, 114: 483-95
- [37] Mancias JD, Goldberg J. The transport signal on Sec22 for packaging into COPII-coated vesicles is a conformational epitope. *Mol Cell*, 2007, 26: 403-14
- [38] Mancias JD, Goldberg J. Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *EMBO J*, 2008, 27: 2918-28
- [39] Faini M, Beck R, Wieland FT, et al. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol*, 2013, 23: 279-88
- [40] Roberg KJ, Crotwell M, Espenshade P, et al. LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 1999, 145: 659-72
- [41] Shimoni Y, Kurihara T, Ravazzola M, et al. Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 2000, 151: 973-84
- [42] Kurihara T, Hamamoto S, Gimeno RE, et al. Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 983-98
- [43] Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. Akt phosphorylates Sec24: new clues into the regulation of ER-to-Golgi trafficking. *Traffic*, 2011, 12: 19-27
- [44] Dudognon P, Maeder-Garavaglia C, Carpentier JL, et al. Regulation of a COPII component by cytosolic O-glycosylation during mitosis. *FEBS Lett*, 2004, 561: 44-50
- [45] Nakano RT, Matsushima R, Ueda H, et al. GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2009, 21: 3672-85
- [46] Faso C, Chen YN, Tamura K, et al. A missense mutation in the *Arabidopsis* COPII coat protein Sec24A induces the formation of clusters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant Cell*, 2009, 21: 3655-71
- [47] Conger R, Chen Y, Fornaciari S, et al. Evidence for the involvement of the *Arabidopsis* SEC24A in male transmission. *J Exp Bot*, 2011, 62: 4917-26
- [48] Qu X, Chatty PR, Roeder AH. Endomembrane trafficking protein SEC24A regulates cell size patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2014, 166: 1877-90
- [49] Gurkan C, Stagg SM, Lapointe P, et al. The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 727-38
- [50] Devos D, Dokudovskaya S, Alber F, et al. Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol*, 2004, 2: e380
- [51] Stagg SM, LaPointe P, Razvi A, et al. Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell*, 2008, 134: 474-84
- [52] Siniosoglou S, Wimmer C, Rieger M, et al. A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell*, 1996, 84: 265-75
- [53] Devos D, Dokudovskaya S, Williams R, et al. Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2172-77
- [54] Loiodice I, Alves A, Rabut G, et al. The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 3333-44
- [55] Siniosoglou S, Lutzmann M, Santos-Rosa H, et al. Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol*, 2000, 149: 41-54
- [56] Moreira TG, Zhang L, Shaulov L, et al. Sec13 regulates expression of specific immune factors involved in inflammation *in vivo*. *Sci Rep*, 2015, 5: 17655
- [57] Capelson M, Liang Y, Schulte R, et al. Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell*, 2010, 140: 372-83
- [58] Antonny B, Madden D, Hamamoto S, et al. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 531-37
- [59] Jones B, Jones EL, Bonney SA, et al. Mutations in a Sar1

- GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet*, 2003, 34: 29-31
- [60] Malhotra V, Erlmann P. Protein export at the ER: loading big collagens into COPII carriers. *EMBO J*, 2011, 30: 3475-80
- [61] Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, et al. Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature*, 2012, 482: 495-500
- [62] Fromme JC, Orci L, Schekman R. Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol*, 2008, 18: 330-6
- [63] Robinson DG, Herranz MC, Bubeck J, et al. Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Critl Rev Plant Sci*, 2007, 26: 199-225
- [64] Vernoud V, Horton AC, Yang Z, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1191-208
- [65] Schwarz K, Iolascon A, Verissimo F, et al. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nature Genet*, 2009, 41: 936-40
- [66] Peng R, De Antoni A, Gallwitz D. Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members. *J Biol Chem*, 2000, 275: 11521-28
- [67] Wendeler MW, Paccaud JP, Hauri HP. Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, 2007, 8: 258-64
- [68] Merte J, Jensen D, Wright K, et al. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 41-6; sup pp 1-8
- [69] Wansleeben C, Feitsma H, Montcouquiol M, et al. Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development*, 2010, 137: 1067-73
- [70] Hanton SL, Chatre L, Matheson LA, et al. Plant Sar1 isoforms with near-identical protein sequences exhibit different localisations and effects on secretion. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 283-94
- [71] Tanaka Y, Nishimura K, Kawamukai M, et al. Redundant function of two *Arabidopsis* COPII components, AtSec24B and AtSec24C, is essential for male and female gametogenesis. *Planta*, 2013, 238: 561-75
- [72] Tian L, Dai L L, Yin ZJ, et al. Small GTPase Sar1 is crucial for proglutelin and α -globulin export from the endoplasmic reticulum in rice endosperm. *J Exp Bot*, 2013, 64: 2831-45
- [73] Hino T, Tanaka Y, Kawamukai M, et al. Two Sec13p homologs, AtSec13A and AtSec13B, redundantly contribute to the formation of COPII transport vesicles in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75: 1848-52