



细胞骨架系统调控分泌囊泡与质膜互作的研究进展

张凡凡¹, 赵玉婉², 王婷^{1*}, 任海云^{1,2*}

1. 北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875;

2. 北京师范大学珠海校区自然科学高等研究院, 生物科技研究中心, 珠海 519085

* 联系人, E-mail: twang@bnu.edu.cn; hren@bnu.edu.cn

收稿日期: 2021-05-18; 接受日期: 2021-07-23; 网络版发表日期: 2021-11-15

国家自然科学基金(批准号: 91854206)资助

摘要 胞吐作用是真核生物最基本的细胞活动之一, 广泛参与了有机体内的多种生理过程. Exocyst复合体介导的分泌囊泡在质膜的定向栓系以及SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)蛋白介导的分泌囊泡与质膜的融合过程是胞吐作用的关键步骤, 有众多调控因子参与其中. 已有的研究表明, 细胞骨架的时空动态分布与分泌囊泡在质膜的栓系和融合具有紧密的互作调控关系: 一方面, 细胞骨架为分泌囊泡在质膜的栓系和融合提供了重要的动力来源; 另一方面, 栓系和融合相关的调节因子也可以影响细胞骨架的动态结构. 深入探究真核细胞中细胞骨架在分泌囊泡与质膜栓系和融合过程中的作用和调控机理, 对于理解包括胞吐作用在内的各种细胞生理活动具有重要的科学意义. 本文对分泌囊泡在质膜栓系和融合的动态过程进行了系统性的综述, 并着重关注了细胞骨架在这两个过程中的调控作用.

关键词 细胞骨架, 分泌囊泡, 质膜, Exocyst复合体, SNARE复合体

细胞内的囊泡(vesicles)穿梭于各种膜性细胞器之间, 通过胞吞(endocytosis)和胞吐(exocytosis)作用与胞外环境进行信息交流, 传递各种刺激因子或者信号分子^[1]. 分泌囊泡是指在胞吐过程中起源于真核细胞的反面高尔基网并包含蛋白质、脂质或多糖等货物的转运膜泡, 它们经过细胞骨架(cytoskeleton)的定向运输以及在靶标质膜(plasma membrane)上的栓系, 最终与质膜融合, 同时将内容物嵌入质膜或者释放到胞外空间, 从而为细胞的分裂、生长、形态建成、极性建立

等基本的生理活动运送原料或传递信号^[2]. 分泌囊泡靶向质膜的栓系和融合过程包含了蛋白、磷脂以及其他信号分子之间的相互作用, 是多种调控因子相互关联并被精细调控的复杂过程. 细胞骨架的动态变化能够从时空层面调控膜动力学的改变和关键调控因子的分布与功能, 是分泌囊泡与质膜互作必不可少的基础之一. 然而, 以往的研究较多关注于细胞骨架在分泌囊泡转运中的作用^[3,4], 本文着重讨论了细胞骨架在分泌囊泡与质膜栓系和融合过程中的功能.

引用格式: 张凡凡, 赵玉婉, 王婷, 等. 细胞骨架系统调控分泌囊泡与质膜互作的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 107–120

Zhang F F, Zhao Y W, Wang T, et al. Advances in the study of cytoskeleton system regulating interactions between secretory vesicles and plasma membrane (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 107–120, doi: [10.1360/SSV-2021-0145](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0145)

1 分泌囊泡在质膜的栓系

1.1 Exocyst复合体介导分泌囊泡在质膜的栓系

分泌囊泡在质膜上的栓系是两者在空间上的最初接触, 在时空上为后续的膜融合奠定了重要的基础^[5]. 目前, 在酵母和动物细胞中的研究鉴定了一系列的栓系复合体, 其中Exocyst复合体在分泌囊泡与质膜的栓系过程中发挥关键作用^[6,7]. Exocyst复合体是由SEC3 (Secretory3), SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70(Exocyst component of 70 kD)和EXO84(Exocyst component of 84 kD)这些亚基组成的八聚体^[8](图1). Exocyst复合体的一些组分定位在分泌囊泡上, 另外一些亚基定位于质膜, 这些亚基的结合能够在空间尺度上将分泌囊泡向质膜拉近^[8]. 因此, Exocyst复合体的分步组装对于分泌囊泡在质膜的栓系至关重要. 酵母中早期的研究发现, Sec15亚基能够与分泌囊泡表面的小G蛋白Rab结合^[9], 而Sec3和Exo70亚基则能够稳定地与胞吐位点的质膜结合^[10~12](图1). 但是, 目前对于具体哪些亚基与SEC3一起定位于质膜、哪些亚基与SEC15一起定位于分泌囊泡还存在一些争议. 一种观点认为SEC3和EXO70亚基定位于质膜并标注胞吐位点, 其他亚基则定位于分泌囊泡^[7]; 而另外一种观点认为SEC3/5/6/8定位于质膜, SEC10/15, EXO70和EXO84这些亚基位于分泌囊泡^[8]. 近期关于Exocyst复合体结构的解析更倾向于支持8个亚基会形成SEC3-SEC5-SEC6-SEC8和SEC10-SEC15-EXO70-EXO84这两个四聚体亚复合体^[13]. 已知在酵母和动物细胞中, Exocyst复合体对于细胞的形态建成和极性生长非常重要, 广泛参与了芽殖酵母的出芽生长、裂殖酵母的胞质分裂以及动物细胞中伪足和神经元树突的形成等基本生理过程^[14,15]. 总之, Exocyst复合体为分泌囊泡与质膜的相互作用建立了直接的物理联系, 能从时空层面调控胞吐作用, 并通过直接或者间接互作整合膜蛋白、细胞骨架蛋白、Rab和Rho等家族的小G蛋白以及其他细胞皮质蛋白, 被认为是胞吐作用的“调控中枢”.

磷脂酰肌醇PIP2(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)是Exocyst复合体所介导的栓系过程的重要调节因子. 酵母中的研究发现, PIP2能够与Sec3 N端的PH结构域直接互作, 从而影响Sec3的定位与功能^[10](图1). PIP2对SEC3亚基的影响在不同物种中是不同的. 在烟草中, SEC3A的PH结构域对于其在花粉管顶

端质膜的定位是必须的; 但在拟南芥中, 该结构域的缺失似乎并不影响其在花粉管顶端的定位与功能, 且在PIP2的催化激酶PIP5K4(phosphatidylinositol-4-monophosphate-5-kinase 4)的功能缺失突变体中, SEC3A在花粉萌发位点的定位也没有发生改变. 这一结果暗示着PIP2对Exocyst复合体的调控在不同的物种中可能存在差异, 其具体机制仍有待于进一步研究. 此外, EXO70亚基在质膜的定位也受PIP2的调节(图1). 在哺乳动物中的体内和体外实验均表明, EXO70的C端结构域可以直接与PIP2互作, 该结构域的缺失会导致EXO70质膜定位的消失^[16]. 在烟草花粉管中, NtEXO70A1a和NtEXO70B1与PIP2部分共定位, 进一步暗示PIP2对于植物中EXO70在质膜的定位也有影响^[17]. 此外, PIP2的前体PI4P(phosphatidylinositol-4-phosphate)也在Exocyst复合体介导的分泌囊泡在质膜的栓系过程中发挥重要作用. 酵母中的研究发现, PI4P浓度梯度的维持在分泌囊泡从高尔基体向质膜转移过程中十分重要: 高浓度的PI4P有利于分泌囊泡从高尔基体的脱落, 但会阻止Rab GTP酶Sec4的GEF激活因子Sec2与Exocyst复合体Sec15亚基的结合; 只有当PI4P的浓度下降到一定阈值后, Sec2才能与Sec15结合进而介导囊泡与质膜的栓系; 并且该过程中PI4P浓度梯度的维持受到氧甾酮结合蛋白Osh4的调节^[18](图1).

1.2 植物细胞中Exocyst复合体的研究现状

相对于酵母和动物细胞, 植物细胞中关于分泌囊泡在质膜上栓系的机理研究还十分有限. 已知Exocyst复合体的各个亚基在植物细胞中存在多拷贝的现象. 例如, 在拟南芥中除了SEC6和SEC8由单拷贝基因编码外, SEC3, SEC5, SEC10和SEC15由2个基因编码, EXO84由3个基因编码, 而EXO70的编码基因多达23个^[19]. 这些基因家族的扩充暗示植物Exocyst复合体较酵母和动物可能存在更加多样化的组合方式或功能特点以应对复杂的外部环境^[20]. 目前植物中已鉴定到一些Exocyst复合体亚基的功能缺失突变体, 它们在一些胞吐作用旺盛的生理过程中存在严重缺陷^[21,22]. 例如, 在拟南芥中SEC3A-GFP定位于花粉的萌发位点和花粉管顶端, 荧光标记的EXO70C1和EXO70C2蛋白则定位于花粉粒和花粉管的胞质内, 这些基因突变会导致花粉萌发或花粉管生长缺陷^[23~25]. 拟南芥的单突变体*exo70A1*在胞质分裂和种皮形成方面也存在缺陷^[26,27],

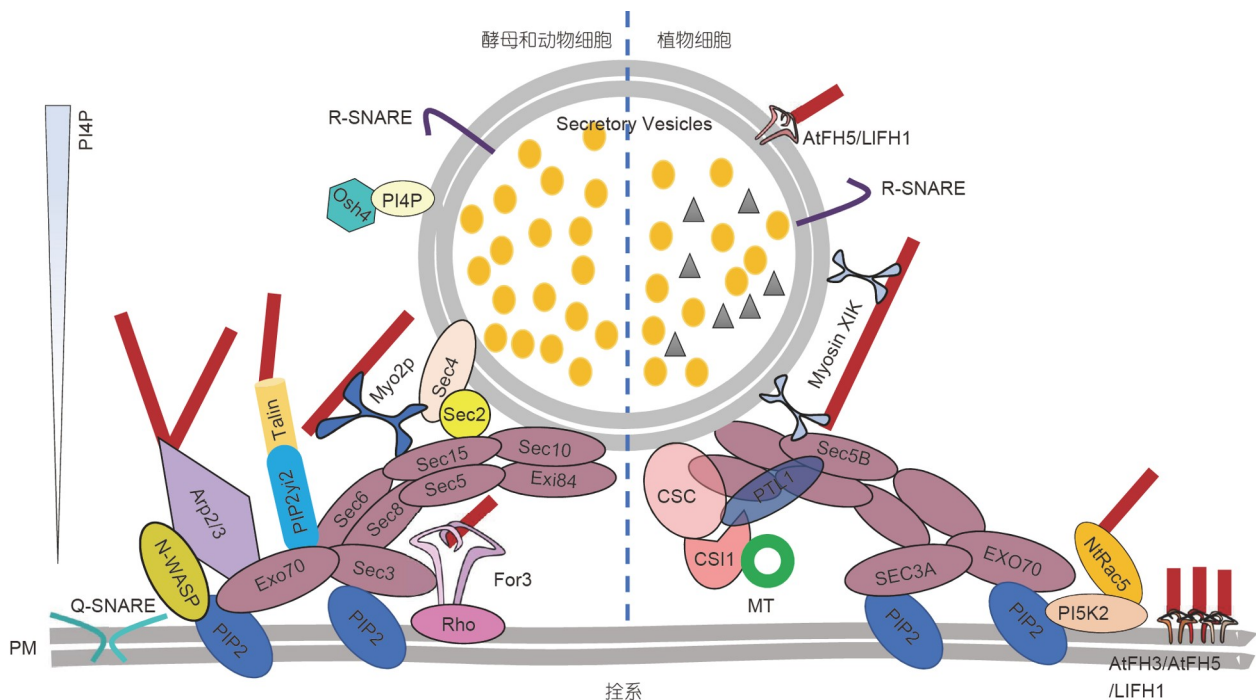


图 1 细胞骨架系统参与分泌囊泡在质膜拴系过程的功能模型. 在分泌囊泡的拴系过程中, 酵母和动物细胞中的研究发现, 微丝骨架系统的Formin, Arp2/3复合体和Myosin等与Exocyst复合体组分存在直接互动, 从而影响Exocyst复合体的极性定位和组装, 同时Exocyst复合体也能调控微丝骨架的聚合、分支等动态变化. 磷脂酰肌醇PIP2、小G蛋白以及他们的调节蛋白在介导微丝骨架与Exocyst复合体、质膜(PM)和分泌囊泡互作中发挥重要作用. 植物细胞中的研究发现, 微管骨架(MT)通过CSI1和PTL1蛋白, 微丝骨架通过Myosin XIK, 与Exocyst复合体组分建立联系, 参与了纤维素合酶复合体(CSC)在质膜的定向锚定. 植物中的一些Formin蛋白AtFH3、AtFH5和LIFH1能够定位于质膜和囊泡, 它们有可能参与了微丝骨架、分泌囊泡和质膜三者互作. 图中分泌囊泡内的黄色小圆泛指内容物, 而灰色三角特指细胞壁相关的内容物

Figure 1 The functional model of the cytoskeleton system modulating the tethering process of secretory vesicles to plasma membrane. During the tethering of secretory vesicles to plasma membrane, according to findings in yeast and mammal cells, formin, Arp2/3 complex and Myosin of the actin cytoskeleton system can directly interact with the components of the Exocyst complex, thus affecting the polarity localization and assembly of the Exocyst complex; meanwhile, the Exocyst complex also regulates the aggregation, branching and other types of actin cytoskeleton dynamics. PIP2, small G proteins, and their regulatory proteins play important roles in mediating the interaction of the actin cytoskeleton with the Exocyst complex, plasma membrane (PM), and secretory vesicles. Studies in plant cells have shown that microtubules (MT), via CSI1 and PTL1 proteins, and actin filaments, via Myosin XIK, are associated with the components of the Exocyst complex and participate in the directional anchoring of the cellulose synthase complex (CSC) in PM. Some formin proteins in plants, such as AtFH3, AtFH5 and LIFH1, are located in plasma membrane and vesicles, and they may be involved in the interaction between actin filaments, secretory vesicles and PM. The small yellow circles within the secretory vesicle refer to the contents generally, while the gray triangles refer specifically to the cell wall related contents

双突变体*sec5a exo70A1*和*sec8 exo70A1*黄化苗的下胚轴细胞伸长存在缺陷^[28]. 有趣的是, 通过对拟南芥群体中自然变异的全基因组关联分析, 研究人员发现*EXO70A3*基因能够通过调控PIN4蛋白的极性分布而影响由生长素所介导的根系的形态建成, 并且这一基因的不同等位变异和突变形式可以导致植物不同的根系分布和抗旱反应^[29]. 此外, 在植物与微生物互作方面, Exocyst复合体也发挥重要作用. 例如, *EXO70B2*和*EXO70H1*基因突变增加了拟南芥植株对病原菌的敏感性^[30], *EXO70H4*基因参与了苜蓿与根瘤菌共生过程中侵染线的极性生长^[31], 等. 这些研究结果说明植物

中*EXO70*基因家族的不同成员可能特异地参与了不同的生理过程. 但是, 目前植物中大多基于植株表型对Exocyst复合体一些亚基的定位和功能进行了研究, 对不同亚基的相互关系, 不同亚基在整个复合体中的角色, 以及Exocyst复合体所介导的拴系过程在细胞内发挥功能的分子调控机制的研究仍十分缺乏.

2 细胞骨架调控分泌囊泡在质膜的拴系

2.1 微丝骨架系统与Exocyst复合体紧密相关

伴随着活跃的胞吐作用, 细胞骨架的动态变化在

分泌囊泡与质膜拴系过程中发挥着非常重要的功能。Exocyst复合体与微丝骨架系统是紧密相关、相互作用的, 它们的关系主要表现在两个方面。一方面, Exocyst复合体组分能够与微丝骨架的成核因子Arp2/3 (Actin-related protein 2/3)复合体成员、Formin以及微丝骨架的上游调控因子小G蛋白直接结合, 从而调控微丝骨架的成核和分支等动态变化(图1); 而相关基因的突变会引发严重的微丝骨架缺陷, 随后造成细胞生长、迁移和形态建成上的缺陷^[32-35]。目前研究得较为清楚的是Exocyst复合体组分EXO70与Arp2/3之间的互作关系(图1)。据推测, 在动物细胞迁移过程中, EXO70在对微丝骨架的调控作用中扮演双重角色: 首先, EXO70可以作为Arp2/3复合体的动力学激活因子(kinetic activator of the Arp2/3 complex), 促进Arp2/3复合体与成核促进因子(nucleation promoting factors) WAVE2(wiskott-Aldrich syndrome protein Verprolin-homologous protein 2)的相互作用, 通过加速微丝的成核和分支进而参与调控板状伪足的形成和细胞迁移等过程^[34]; 其次, EXO70还可以直接结合Arp2/3复合体的调节因子WRC(wave regulatory complex), 并将其运送到细胞的运动前缘, 从而促进细胞迁移^[36]。在裂殖酵母中, Exocyst复合体成员Sec3可以与微丝成核因子Formin蛋白For3互作并调控其在质膜的特异定位(图1), 其功能突变使细胞中三种不同的微丝结构均受到影响^[33]。另外, 微丝骨架的动态变化也可以影响Exocyst复合体的功能(图1)。在芽殖酵母中的研究认为, 定位在分泌囊泡上的大多数Exocyst复合体成员靶向定位到质膜的过程需要微丝骨架的调控, 但在质膜上定位的Sec3和Exo70基本不受影响^[37-39]。肌球蛋白Myo2p可以通过其GTD结构域分别与Rab GTP酶Sec4以及Exocyst复合体成员Sec15结合, 将携带有Exocyst复合体亚基的分泌囊泡沿着微丝轨道运送到出芽位点, 并在到达质膜后继续维持与分泌囊泡的结合, 以确保分泌囊泡在质膜被拴系, 以完成后续的融合过程^[40,41](图1)。

然而, 裂殖酵母中Exocyst复合体成员的极性定位很大程度上不依赖于微丝骨架或者微管骨架, 之后的极性生长过程也并不依赖于微丝或微管骨架的运输系统; 但如果For3和Sec8的基因功能同时缺失, 将破坏微丝束结构和Exocyst复合体的功能, 导致细胞呈各向同性生长, 失去其特有的极性生长模式, 由此有推测认为

在裂殖酵母的极性生长过程中微丝骨架和Exocyst复合体的功能可能存在部分重叠^[42]。与此相关的一项研究是在小立碗藓中鉴定的一个新蛋白For1F, 它同时包含Exocyst复合体的SEC10亚基结构域和微丝骨架的成核因子Formin结构域, 为植株存活所必需。For1F可以与Exocyst复合体SEC6亚基共定位, 并且它们的定位受到微丝骨架的动态调控^[43]。该研究进一步表明Exocyst复合体与微丝骨架系统在胞吐过程中是协同作用、密不可分的。目前在植物细胞的研究中也发现Exocyst复合体与微丝骨架之间有重要的相互作用。例如, 使用微丝解聚药物Latrunculin B长时间处理拟南芥的根尖细胞, 会使Exocyst复合体的各个亚基发生异常聚集, 其动态分布受到影响^[44]。另外有研究表明, ACT7突变会导致EXO84b在拟南芥根表皮细胞质膜的极性分布受到影响^[45]。

尽管上述研究结果均表明Exocyst复合体与微丝骨架系统密切相关, 但具体两者之间如何相互作用以及在分泌囊泡拴系过程中微丝的动态分布是否会发生改变, 目前尚不甚清楚; 且与动物和酵母相比, 植物中关于这方面的研究则更为滞后, 如果能在植物中筛选和鉴定与Exocyst复合体直接结合的微丝结合蛋白, 将为理解植物细胞中分泌囊泡在质膜拴系的动态过程提供重要思路。

2.2 微管骨架系统参与调控Exocyst复合体的极性定位

与微丝骨架系统相比, 微管骨架系统参与Exocyst复合体功能调控的报道比较少。在哺乳动物嗜铬细胞瘤细胞系PC12中, Exocyst复合体与微管骨架结合并共定位, 而微管解聚药物处理影响了Exocyst复合体的定位^[46]。另有报道发现, 在肾细胞系NRK中过表达EXO70破坏了微管骨架网络, 并导致质膜处产生类似丝状伪足的突起; 根据这一结果, 他们推测Exocyst复合体可能具有通过调控微管骨架动态来增加质膜延展性的功能^[47]。在小立碗藓中, Exocyst复合体的SEC6组分特异地定位于微管重叠区, 参与了胞质分裂中成膜体的形成过程^[48]。此外, 在拟南芥细胞壁形成和木质部导管发育中, 越来越多的研究表明植物Exocyst复合体的极性定位依赖于微管骨架, 它们共同调控了纤维素合酶向质膜的定向定位和次生细胞壁的沉积过程^[49-51], 暗示植物中的微管骨架-Exocyst复合体调控

单元能够从空间层面调控纤维素合酶在质膜的锚定位点^[52]。例如, 在植物中特异表达的蛋白PATROL1(proton ATPase translocation control 1)和植物肌球蛋白家族成员Myosin XIK均被报道可以与Exocyst复合体成员SEC5B结合, 共同调控纤维素合酶向质膜的定向传递、栓系和分泌过程, 且在质膜上沿着微管定位的纤维素合酶互作蛋白CSII(cellulose synthase interacting 1)在上述分泌过程中可以特异标记纤维素合酶在质膜的锚定位点^[49,53](图1)。

2.3 小G蛋白和PIP2是细胞骨架系统与Exocyst复合体互作的上游调控因子

此外, 在Exocyst复合体与细胞骨架的动态互作中, 小G蛋白发挥了非常重要的调控作用。这种单体形式的GTP水解酶作为真核生物中高度保守的分子信号“开关”, 广泛参与到信号转导、细胞骨架组装和极性建立等基本的生理过程^[54]。例如, 对微丝和微管骨架都有调控作用的IQGAP1(IQ motif containing GTPase activating protein 1)蛋白在小G蛋白RhoA(Ras homolog family member A)和CDC42(cyclin-dependent protein 42)的激活下, 能够与Exocyst复合体的SEC3和SEC8亚基结合, 而这一互作对于肿瘤细胞侵蚀性伪足的功能是必需的^[55~57]。在海拉细胞中关于GEF-H1(guanine nucleotide-exchange factor H1)蛋白的功能研究进一步说明细胞骨架、Exocyst复合体与小G蛋白三者之间存在复杂的互作关系。首先, GEF-H1可以结合微管骨架, 微管解聚能够激活GEF-H1^[58]; 然后, GEF-H1还是肌动蛋白的激活因子小G蛋白RhoA的GTP交换因子, GEF-H1的激活能够进一步激活RhoA, 从而促进微丝聚合^[59,60]; 此外, GEF-H1能够与Exocyst复合体的SEC5亚基直接结合, 这一结合依赖于小G蛋白RalA(RAS like proto-oncogene A)的功能, 并可以促进RhoA的激活^[61]。因此, 无论微管解聚还是与Exocyst复合体亚基结合, 都能够帮助GEF-H1激活RhoA, 从而调控微丝聚合以及Exocyst复合体的定位和组装, 最终形成一个正反馈调节通路。研究发现, 这一调控通路对于胞质分裂中卵裂沟的形成以及动物细胞的迁移是必不可少的^[59,60]。与酵母和哺乳动物细胞中的Rho类似, 植物特异的小G蛋白ROPs(Rho of plants)也同时具有调控细胞骨架动态变化和胞吐作用的功能^[62]。ROPs主要通过其效应蛋白RIC(ROP-interactive CRIB-motif-contain-

ing protein)来发挥其调控作用, 后者已被证明可以协调微丝骨架的动态变化与胞吐作用^[63,64]。

此外, 已有许多研究表明PIP2可以通过与多种微丝结合蛋白通过直接或间接作用来调节微丝骨架动态, 如Formin, Villin, Arp2/3和N-WASP(neural wiskott-aldrich syndrome protein)等^[65,66]。例如, 通过与小鼠的Formin蛋白mDia1和mDia2 N端BD结构域的两个碱性多聚氨基酸基序直接互作, PIP2以剂量依赖的方式调节Formin所介导的微丝聚合^[67]; 通过与Villin的S1, S2及HP结构域结合, PIP2可以促进Villin的二聚化, 使其在细胞中的局部浓度增加, 进而使微丝骨架的束化程度增加, 促进膜形变和丝状伪足的形成^[68]; 通过与Arp2/3复合体的激活因子N-WASP蛋白相互作用, PIP2间接调节由Arp2/3复合体介导的微丝聚合^[69](图1)。考虑到这些结果, 再结合Exocyst复合体Sec3和Exo70亚基在质膜的定位需要通过与PIP2直接结合, 可以推测PIP2可能是介导微丝骨架与胞吐复合体相互作用的“桥梁”。例如, 在人乳腺癌细胞(MDA-MB-231 cells)中, PIP2的催化激酶PIPKI γ 2(phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ 2)一方面可以直接与SEC6和EXO70结合促进Exocyst复合体的组装; 另一方面可以与踝蛋白(Talin)的FERM结构域结合减轻其分子内自抑制, 促进微丝的组装和整合素(integrin)向细胞前缘的极性运输, 并且PIPKI γ 2, Exocyst复合体以及Talin三者中任一组分的缺失都将影响细胞的定向迁移^[70](图1)。在植物细胞中的研究显示, PIP2在花粉管质膜上以纳米域和弥散分布两种形式存在, 质膜纳米域PIP2的过量产生(过表达PIP5K2(phosphatidylinositol-4-monophosphate-5-kinase 2))可能使烟草ROP蛋白NtRac5的功能转向RIC4依赖的微丝的聚合, 而弥散分布的PIP2的过量产生(过表达PIP5K6)可能有利于RIC3依赖的微丝的解聚并促进胞吐作用^[71](图1)。因此质膜上两种不同分布模式的PIP2可能对协调微丝骨架动态变化与胞吐之间的平衡不可或缺, 未来关于PIP2在二者之间作用机制的进一步研究, 将会对微丝骨架、胞吐作用及质膜三者之间的关系有更加明确的认识。

3 分泌囊泡与质膜的融合

3.1 SNARE复合体介导分泌囊泡与质膜的融合

为了保证分泌囊泡与质膜的融合, 被栓系的分泌

囊泡需要进一步锚定在质膜上。当使用电子显微镜观察到分泌囊泡与质膜的距离小于10~30 nm, 或者使用内反射显微镜观察到分泌囊泡的流动性受限时, 一般认为分泌囊泡已经锚定在质膜上^[72]。随后, 分泌囊泡将进一步通过SNARE(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)复合体在膜上进行融合。SNARE蛋白是一类由100~300个氨基酸组成的小分子量蛋白质, 它们都包含一个或两个约含有70个氨基酸的SNARE结构域^[73]。根据SNARE蛋白定位的不同被分为囊泡膜定位SNARE(vesicle-membrane SNARE, v-SNARE)和靶标膜定位SNARE(target-membrane SNARE, t-SNARE), 或者根据其SNARE结构域上保守残基的不同被分为Q-SNARE(glutamine SNARE)和R-SNARE(arginine SNARE)^[74]。一个具有活性的SNARE复合体由三个位于靶标膜上的Q-SNARE与一个位于分泌囊泡上的R-SNARE聚合而成^[75], 分别位于分泌囊泡和靶标膜上的SNARE从N端起始并像拉拉链一样逐渐聚合形成一个被称为*trans*-SNARE复合体或SNAREpin的 α -螺旋结构, 在这一过程中产生的驱动力促进两种膜靠近并融合^[76]。

目前已知很多关键的因子参与调控了由SNARE复合体介导的膜融合过程, 包括SM蛋白(SEC1/MUNC18-like)、Exocyst复合体和SYT I (synaptotagmin I)等。早期在酵母和哺乳动物中的体外实验发现, SM能与SNARE结合并加速由SNARE复合体介导的膜融合过程^[77,78]。随后越来越多的研究证明, SM作为SNARE的分子伴侣发挥功能, 能够调控SNARE的蛋白水平, 提高SNARE复合体组装的速度和精确性, 抑制SNARE复合体在膜融合之前的解聚等, 与SNARE一起参与了所有的内膜融合过程和胞吐作用^[79,80]。酵母中的研究发现Exocyst复合体也可以通过与SNARE及SM蛋白互作参与调控SNARE复合体的组装和膜融合过程^[81,82]。这些结果说明由Exocyst复合体介导的栓系过程和由SNARE复合体介导的融合过程并不是泾渭分明的, 它们在时空上存在连续性且在功能上存在协同作用^[73]。此外, 细胞微环境内 Ca^{2+} 浓度的增加是诱发分泌囊泡与质膜融合的重要信号因子(图2)。在哺乳动物的神经元中, SYT I 作为 Ca^{2+} 信号的“传感器”参与突触前活跃区的囊泡融合过程^[83]。SYT I 是一个定位在分泌囊泡的小的跨膜蛋白, 它的两个保守的C2结构域能够和 Ca^{2+} 结合; 当 Ca^{2+} 内流的

时候, SYT I 能够和SNARE复合体或者质膜上的PIP2结合, 从而将囊泡拉近质膜并促进融合。关于SYT I 激发囊泡融合的分子机制存在多种假说, 这些假说认为当与 Ca^{2+} 结合时, SYT1能够改变SNARE复合体的构象, 或是增加内膜的弯曲度, 或者拉近囊泡与质膜的距离^[84]。

3.2 植物细胞中SNARE蛋白的研究现状

相对于酵母和动物中的研究, 植物中关于分泌囊泡与质膜融合的机理研究还处于起步阶段。与Exocyst复合体的情形类似, 植物中SNARE蛋白的编码基因也存在多拷贝的情况。拟南芥的基因组中含有65个SNARE基因, 其中大部分基因仍保留原始的功能, 暗示真核生物中膜融合的机制是比较保守的^[85]。目前植物中已经鉴定到一些SNARE及其调控基因, 它们通过介导保守的膜融合过程参与了众多基本的生理过程, 这些基因的突变往往导致严重的植物生长发育缺陷。例如, 拟南芥中的SNARE基因SYPI32(*Syntaxin of Plants 132*)和SYPIII/*KNOLLE*突变会导致胞质分裂缺陷^[86], 拟南芥三突变体*syp124 syp125 syp131*的花粉管生长存在严重缺陷^[87], 苜蓿中SYPI32A突变影响了根瘤菌共生体的成熟和丛枝菌根真菌的定植^[88], 水稻中SYPI21突变导致植物更易感染稻瘟病^[89], 拟南芥中VAMP721(*Vesicle-associated membrane protein 721*)和VAMP722基因的缺失导致植物细胞对白粉病的抗性降低以及花粉管生长的缺陷^[90,91]。有意思的是, 植物中一些SNARE蛋白能够与质膜上的离子通道进行功能偶联。例如, 拟南芥中的SYPI21能够与 K^{+} 通道的电压感应结构域结合, 从而将生长过程中的离子吸收和内膜转运关联起来^[92]; VAMP711在ABA诱导下能够负调控质膜上 H^{+} -ATPase的活性, 从而参与植物的干旱条件下气孔的关闭过程^[93]; VAMP721和VAMP722通过与MLO5(mildew resistance locus O 5)结合, 参与调控花粉管生长过程中 Ca^{2+} 通道CNGC18(cyclic nucleotide-gated channel 18)在质膜的定位^[91]。

总的来说, 虽然这些研究鉴定了SNARE及其调控因子的重要作用, 但是这些蛋白所介导的膜融合过程在植物生长发育中的具体调控机制仍不清楚。未来的研究有必要对分泌囊泡在质膜上的动态运动特征进行观察和分析, 以解析植物中分泌囊泡栓系和融合的分子机理及其在各项生理活动中的调控机制。

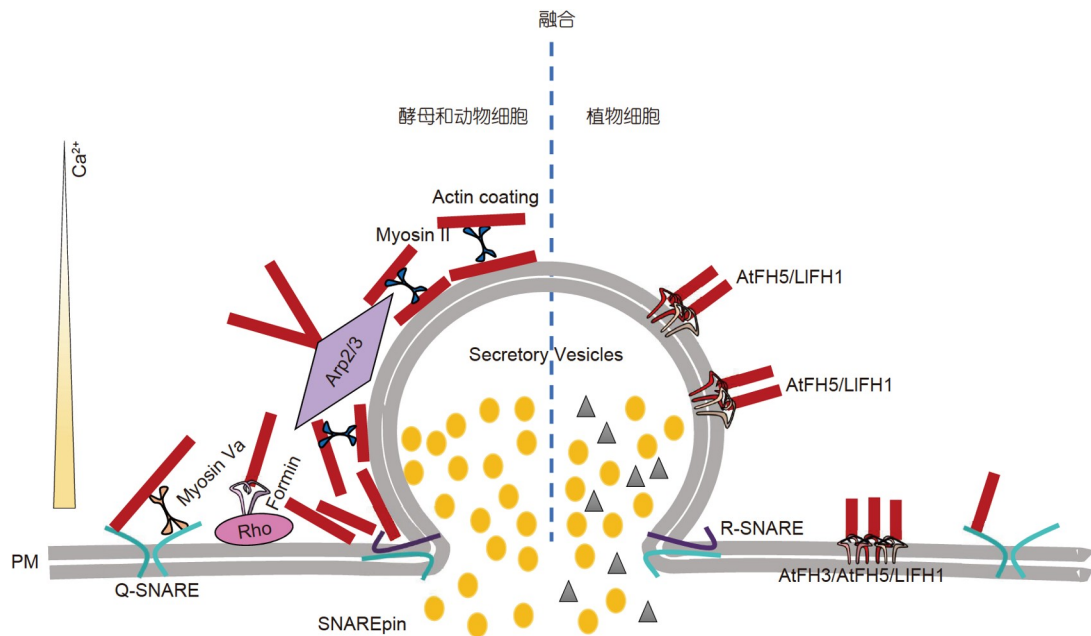


图 2 细胞骨架系统参与分泌囊泡与质膜融合过程的功能模型。在分泌囊泡与质膜(PM)融合过程中, 酵母和动物细胞中的研究发现, 大量含有肌动蛋白和肌球蛋白Myosin II的复合体被招募到分泌囊泡表面, 并且这层肌动蛋白包被(actin coating)的形成依赖于Rho, Formin, Myosin II和Arp2/3复合体。Ca²⁺浓度的增加是诱发分泌囊泡与质膜融合的重要信号因子。Myosin Va可以Ca²⁺依赖的方式与SNARE蛋白结合。这些微丝骨架系统的蛋白能够帮助SNARE复合体(SNAREpin)完成两种膜的融合, 最终释放内容物。植物细胞中的Formin可能在分泌囊泡与质膜融合过程中发挥作用, 但是具体的分子机制还不清楚

Figure 2 The functional model of the cytoskeleton system modulating the fusion of secretory vesicles with plasma membrane. During the fusion of secretory vesicles with plasma membrane (PM), a large number of complexes composed of actin and Myosin II are recruited to the surface of secretory vesicles, and the formation of this actin coating depends on Rho, formin, Myosin II, and the Arp2/3 complex in yeast and mammal cells. The increase of Ca²⁺ concentration is an important signal factor to induce the fusion of secretory vesicles with PM. Myosin Va binds to the SNARE protein in a Ca²⁺-dependent manner. These proteins of the actin cytoskeleton system help the SNAREpin complex to complete the fusion of the two membranes and finally release the contents of secretory vesicles. In plant cells, formins may play a role in the fusion of secretory vesicles with PM, but the specific molecular mechanism remains unclear

4 细胞骨架在分泌囊泡与质膜融合中的作用

4.1 微丝骨架系统调控分泌囊泡与质膜的融合

分泌囊泡与质膜的锚定和融合过程涉及两种膜的相互作用以及动力学的改变, 细胞骨架系统的动态变化在其中发挥非常关键的作用。哺乳动物细胞中的研究发现, 膜融合起始后, 会有大量含有肌动蛋白和肌球蛋白Myosin II的复合体(the actomyosin complex)被招募到分泌囊泡表面^[94](图2)。进一步的研究证明, 分泌囊泡上肌动蛋白的包被(actin coating)及其收缩能够帮助内容物的挤出和释放, 而这层包被的起始依赖于Myosin II, Rho以及Formin^[95](图2)。与这些结果相吻合的, 以果蝇唾液腺为材料, 研究人员发现分泌囊泡在质膜融合时皮层处的肌动蛋白发生了重排, 从质膜被

招募到分泌囊泡表面, 且这种肌动蛋白的再分布对于分泌囊泡内容物的分泌是必需的^[96]。与前一个研究结果不同的是, 研究发现微丝骨架的成核因子Arp2/3而不是Formin在这一过程中发挥重要作用^[96](图2)。此外, 在哺乳动物神经内分泌细胞中的研究发现, 融合孔的扩张和收缩依赖于由微丝产生的膜张力和Ca²⁺^[97]。根据现有研究结果推测, 这些被招募到分泌囊泡表面的微丝骨架及其驱动蛋白主要具有两个方面的作用: 其一, 通过产生平行于质膜的作用力驱动融合孔的扩张; 其二, 通过对分泌囊泡表面施加切线的力将分泌囊泡的膜拉向质膜^[72]。

在膜融合过程中, 微丝骨架及其分子马达还能够与一系列相关调控因子直接结合或者功能偶联。例如, 在小鼠的MIN6细胞系中, 微丝能够与SNARE蛋白直接互作(图2), 而葡萄糖刺激或者微丝解聚药物处理后

这一互作减弱, 微丝骨架发生重构以促进胰岛素向质膜的动员和分泌^[98]。在哺乳动物中, 突触囊泡上的分子马达Myosin Va可以Ca²⁺依赖的方式与神经元质膜定位的SNARE蛋白Syntaxin 1A结合(图2), Syntaxin 1A-Myosin Va这一复合体的形成在肾上腺髓质细胞响应Ca²⁺的胞吐作用中发挥重要作用^[99]。此外, Annexin作为Ca²⁺通道蛋白既能够以Ca²⁺依赖的方式与质膜上的磷脂结合, 也能与微丝骨架结合, 被认为是胞吐作用中偶联Ca²⁺信号、细胞骨架以及质膜的重要因子^[100]。

4.2 植物细胞中发现Formin可能是关联微丝骨架系统与融合过程的重要因子

相较我们对动物细胞分泌囊泡融合过程的了解, 目前关于植物细胞骨架与囊泡融合之间关系的研究非常有限。在小立碗藓中的研究发现, 微丝解聚药物Latrunculin B的处理破坏了细胞顶端SNARE蛋白VAMP72所标记分泌囊泡的分布, 同时抑制了细胞的生长^[101]。类似的, 采用Latrunculin B对拟南芥的根毛细胞和花粉管进行处理, 发现SNARE蛋白SYP123在根毛顶端以及SYP124和SYP125在花粉管中的分布受到了严重影响, 这些药理学实验结果暗示微丝骨架参与调控了顶端生长细胞中SNARE蛋白的极性定位^[102,103]。拟南芥中一个定位于内质网膜上的SNARE蛋白SYP73具有肌动蛋白结合结构域, 可将内质网膜锚定在微丝骨架上, 过表达或者缺失SYP73基因会影响内质网的动态变化和早期根尖细胞伸长^[104]。此外, 对拟南芥SNARE蛋白的互作组分析也鉴定到了一些肌动蛋白和肌动蛋白相关蛋白^[105]。

作为真核生物中一类保守的微丝结合蛋白, Formin不仅对肌动蛋白的组装具有成核、封端、延伸和成束等多种调控方式, 还往往具有膜锚定的共同特征: 被子植物分为I型和II型两种Formin, 其中I型Formin的N端具有跨膜结构域, II型Formin具有PTEN相关的膜结合结构域, 而低等植物中的III型Formin及其非植物物种中的Formin具有可以与结合在膜上的小G蛋白Rho互作的结构域^[106]。这一特征暗示Formin很有可能作为重要的调控因子参与到细胞骨架与膜系统的互作过程中。与这一推测相吻合的是, 植物中以花粉管为材料的研究发现, I型Formin蛋白AtFH3, AtFH5和LIF1可定位于花粉管顶端的质膜或亚顶端的囊泡上, 并参与顶端和亚顶端微丝结构的组装^[107-109](图1, 2)。

近期拟南芥花粉中关于AtFH5的研究进一步为解析微丝骨架、分泌囊泡与质膜三者的关系提供了重要线索。在花粉萌发过程中, AtFH5与RabA4d标记的分泌囊泡共定位, 并且部分AtFH5的信号会率先定位到花粉粒的细胞膜上, 而其他AtFH5标记的分泌囊泡也在这一区域聚集, 最终在此处形成微丝刷状环结构并萌发出花粉管; 如果AtFH5的功能缺失, 则花粉粒微丝骨架的分布及动态出现明显缺陷, 进而导致萌发率下降^[110,111]。这一研究结果暗示AtFH5可能作为“桥梁”蛋白介导微丝骨架、分泌囊泡与质膜三者的互作, 从而指导分泌囊泡在质膜特定定位点融合和决定花粉粒中极性位点的建立。未来关于AtFH5与Exocyst复合体或者SNARE复合体互作关系的研究或许可以为这一假设提供重要的实验证据。

总之, 虽然这些研究鉴定到了细胞骨架系统在分泌囊泡融合过程中的重要作用, 但是与栓系过程相比, 细胞骨架系统参与融合过程的分子调控机制研究相对较少, 尤其是对微管骨架在融合过程中的调控作用、微丝骨架的具体组织形式和动态变化情况、细胞骨架-分泌囊泡-质膜三者互作关系以及关键组分的时空调控情况都不甚清楚。未来的研究有必要对这些方面进行深入挖掘, 以完善细胞骨架系统参与分泌囊泡在质膜融合过程中的分子调控网络。

5 总结与展望

细胞骨架及其结合蛋白不仅决定了细胞的形状, 而且对细胞生理的很多重要方面都具有调控作用, 其中就包括胞吞和胞吐这两个细胞内转运活动。细胞结构的不断重构以及与胞外环境的紧密联系在很大程度上依赖于细胞骨架系统和膜系统之间的相互作用。在胞吐过程中, 分泌囊泡与质膜的互作是最为关键的环节, 深入探究其背后的动力学机制对理解细胞内的各种生理和病理活动都有重要的理论和实践意义。细胞骨架系统不仅为分泌囊泡在质膜的栓系和融合提供了重要的动力来源, 还与许多介导栓系和融合蛋白及其调控因子紧密相关, 能从时空层面参与或者响应栓系和融合过程的精细调控。

近些年随着显微观察和荧光标记技术的发展, 对细胞骨架系统、分泌囊泡和质膜三者的动态调控机理等均有了更多新的理解和认识, 相关研究也取得了巨

大的进展. 酵母和哺乳动物细胞中的研究发现细胞骨架系统在分泌囊泡与质膜的互作中扮演多重角色. 例如, 栓系分泌囊泡、引导分泌囊泡到锚定和融合位点、调节融合孔动态等. 这些不同的过程是如何联系在一起的, 微丝骨架重构和融合孔形成是否由同一信号途径激活, 这些都是有待解决的问题. 后续希望鉴定更多参与细胞骨架、分泌囊泡和质膜三者动态互作的核心调控组分, 并利用多组学分析以及多学科交叉的方式, 围绕核心调控组分构建该动态过程的调控网络, 挖掘并完善协同调控细胞骨架系统、分泌囊泡和质膜三者的上游因子和分子关联. 此外, 关于分泌囊泡向质膜的靠近、栓系、锚定和融合这一系列进程在细胞内是怎样有序衔接和推进, 最终使内容物得以释放, 目前尚不清楚. 建议未来的工作更多地集中于解析细胞骨架和膜系统的精细互作上. 例如, 肌动蛋白的重构是如何影响膜张力的, 以及这种张力变化在 SNARE 介导的膜融合中具有什么作用. 探究 Myosin II, PIP2, Arp2/3 以及 Formin 之间的短暂相互作用将为深入了解这一连续的细胞过程提供重要证据. 单分子和高速显微镜方法可能有助于以纳米级精度解读微丝骨架与分泌囊泡的确切变化, 再结合高灵敏度的荧光能量共振转移技术和电生理实验, 可以帮助解决这些关键问题^[112].

相较动物细胞, 植物细胞含有细胞壁, 为其在细胞内的动态成像观察和分析带来了一定的难度和挑战,

但近年来包括超高分辨率显微成像、可变角全内反射荧光显微成像、冷冻电子显微结构解析等技术的发展为深度解析植物细胞内的各种动态活动起到了极大的推进作用^[113]. 基于植物细胞材料的特性, 探究分泌囊泡与质膜的动态互作关系以及细胞骨架在其中的调控作用, 并挖掘调控上述过程的植物特异表达蛋白, 将为理解植物胞吐作用提供重要理论依据. 并且, 植物参与分泌囊泡栓系和融合的核心组件的数量在进化过程中大大增加了, 暗示分泌囊泡与质膜的互作可能存在更加多样的情况或者参与了更加特异的生理过程. 在分泌囊泡与质膜栓系和融合中, 植物是采用了与酵母和动物细胞相类似的机制, 还是演化出了一些相对独特的机制以应对更加复杂多变的环境? 因此, 有必要在特定的植物生长和环境反应中对细胞骨架系统、分泌囊泡和质膜三者关系进行深入解读, 以阐明这些组分在植物应对环境变化和生长发育中的生物学意义. 此外, 与酵母和动物细胞相比, 植物中细胞骨架系统在胞吐作用中的调控机制尚不十分清楚, 尤其是在分泌囊泡与质膜融合过程中细胞骨架及其结合蛋白的具体作用、动态定位、动力学变化以及上游信号因子都不明了. 以拟南芥花粉为材料探究 Formin 蛋白在分泌囊泡与质膜融合中的调控机制, 并将其与上游信号因子 ROPs 或 PIP2 建立分子关联, 或许将为了了解植物中细胞骨架系统、分泌囊泡和质膜三者的互作关系提供重要突破口.

参考文献

- 1 Wu L G, Hamid E, Shin W, et al. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76: 301–331
- 2 Zhang L, Xing J, Lin J. At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol*, 2019, 224: 1479–1489
- 3 Cai G, Parrotta L, Cresti M. Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 63–78
- 4 Lanzetti L. Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19: 453–458
- 5 Lürick A, Kümmel D, Ungermann C. Multisubunit tethers in membrane fusion. *Curr Biol*, 2018, 28: R417–R420
- 6 Pleskot R, Cwiklik L, Jungwirth P, et al. Membrane targeting of the yeast Exocyst complex. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*, 2015, 1848: 1481–1489
- 7 Yu I M, Hughson F M. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26: 137–156
- 8 Polgar N, Fogelgren B. Regulation of cell polarity by Exocyst-mediated trafficking. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10: a031401
- 9 Guo W, Roth D, Walch-Solimena C, et al. The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J*, 1999, 18: 1071–1080
- 10 Zhang X, Orlando K, He B, et al. Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol*, 2008, 180: 145–158

- 11 He B, Xi F, Zhang X, et al. Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J*, 2007, 26: 4053–4065
- 12 Wu H, Turner C, Gardner J, et al. The Exo70 subunit of the Exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Mol Biol Cell*, 2010, 21: 430–442
- 13 Mei K, Li Y, Wang S, et al. Cryo-EM structure of the exocyst complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 139–146
- 14 Heider M R, Munson M. Exorcising the exocyst complex. *Traffic*, 2012, 13: 898–907
- 15 Vaškovičová K, Žárský V, Rösel D, et al. Invasive cells in animals and plants: searching for LECA machineries in later eukaryotic life. *Biol Direct*, 2013, 8: 8
- 16 Liu J, Zuo X, Yue P, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 4483–4492
- 17 Sekereš J, Pejchar P, Šantrůček J, et al. Analysis of Exocyst subunit EXO70 family reveals distinct membrane polar domains in tobacco pollen tubes. *Plant Physiol*, 2017, 173: 1659–1675
- 18 Ling Y, Hayano S, Novick P. Osh4p is needed to reduce the level of phosphatidylinositol-4-phosphate on secretory vesicles as they mature. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 3389–3400
- 19 Vukašinović N, Žárský V. Tethering complexes in the Arabidopsis endomembrane system. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 46
- 20 Žárský V, Sekereš J, Kubátová Z, et al. Three subfamilies of exocyst EXO70 family subunits in land plants: early divergence and ongoing functional specialization. *J Exp Bot*, 2019, doi: 10.1093/jxb/erz423
- 21 Ruan H, Li J, Wang T, et al. Secretory vesicles targeted to plasma membrane during pollen germination and tube growth. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 615447
- 22 Guo J, Yang Z. Exocytosis and endocytosis: coordinating and fine-tuning the polar tip growth domain in pollen tubes. *J Exp Bot*, 2020, 71: 2428–2438
- 23 Li Y, Tan X, Wang M, et al. Exocyst subunit SEC3A marks the germination site and is essential for pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 2017, 7: 40279
- 24 Bloch D, Pleskot R, Pejchar P, et al. Exocyst SEC3 and phosphoinositides define sites of exocytosis in pollen tube initiation and growth. *Plant Physiol*, 2016, 172: 980–1002
- 25 Synek L, Vukašinović N, Kulich I, et al. EXO70C2 is a key regulatory factor for optimal tip growth of pollen. *Plant Physiol*, 2017, 174: 223–240
- 26 Fendrych M, Synek L, Pecenkova T, et al. The *Arabidopsis* Exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell*, 2010, 22: 3053–3065
- 27 Kulich I, Cole R, Drdová E, et al. *Arabidopsis* exocyst subunits *SEC8* and *EXO70A1* and exocyst interactor *ROH1* are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytol*, 2010, 188: 615–625
- 28 Hala M, Cole R, Synek L, et al. An Exocyst complex functions in plant cell growth in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, 2008, 20: 1330–1345
- 29 Ogura T, Goeschl C, Filiault D, et al. Root system depth in *Arabidopsis* is shaped by EXOCYST70A3 via the dynamic modulation of auxin transport. *Cell*, 2019, 178: 400–412.e16
- 30 Pecenkova T, Hala M, Kulich I, et al. The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *J Exp Bot*, 2011, 62: 2107–2116
- 31 Liu C W, Breakspear A, Stacey N, et al. A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nat Commun*, 2019, 10: 2848
- 32 Aronov S, Gerst J E. Involvement of the late secretory pathway in actin regulation and mRNA transport in yeast. *J Biol Chem*, 2004, 279: 36962–36971
- 33 Jourdain I, Dooley H C, Toda T. Fission yeast Sec3 bridges the Exocyst complex to the actin cytoskeleton. *Traffic*, 2012, 13: 1481–1495
- 34 Liu J, Zhao Y, Sun Y, et al. Exo70 stimulates the Arp2/3 complex for lamellipodia formation and directional cell migration. *Curr Biol*, 2012, 22: 1510–1515
- 35 Zuo X, Zhang J, Zhang Y, et al. Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1383–1388
- 36 Biondini M, Sadou-Dubourgnoix A, Paul-Gilloteaux P, et al. Direct interaction between exocyst and Wave complexes promotes cell protrusions and motility. *J Cell Sci*, 2016, doi: 10.1242/jcs.187336
- 37 Bendežú F O, Vincenzetti V, Martin S G. Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell

- poles. *PLoS ONE*, 2012, 7: e40248
- 38 Boyd C, Hughes T, Pypaert M, et al. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol*, 2004, 167: 889–901
 - 39 Liu D, Li X, Shen D, et al. Two subunits of the exocyst, Sec3p and Exo70p, can function exclusively on the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 2018, 29: 736–750
 - 40 Donovan K W, Bretscher A. Myosin-V is activated by binding secretory cargo and released in coordination with Rab/exocyst function. *Dev Cell*, 2012, 23: 769–781
 - 41 Donovan K W, Bretscher A. Tracking individual secretory vesicles during exocytosis reveals an ordered and regulated process. *J Cell Biol*, 2015, 210: 181–189
 - 42 Bendežú F O, Martin S G. Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 44–53
 - 43 van Gisbergen P A C, Wu S Z, Chang M, et al. An ancient Sec10-formin fusion provides insights into actin-mediated regulation of exocytosis. *J Cell Biol*, 2018, 217: 945–957
 - 44 Fendrych M, Synek L, Pecenková T, et al. Visualization of the exocyst complex dynamics at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 510–520
 - 45 Mao H, Nakamura M, Viotti C, et al. A framework for lateral membrane trafficking and polar tethering of the PEN3 ATP-binding cassette transporter. *Plant Physiol*, 2016, 172: 2245–2260
 - 46 Vega I E, Hsu S C. The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *J Neurosci*, 2001, 21: 3839–3848
 - 47 Wang S, Liu Y, Adamson C L, et al. The mammalian exocyst, a complex required for exocytosis, inhibits tubulin polymerization. *J Biol Chem*, 2004, 279: 35958–35966
 - 48 Tang H, de Keijzer J, Overdijk E J R, et al. Exocyst subunit Sec6 is positioned by microtubule overlaps in the moss phragmoplast prior to cell plate membrane arrival. *J Cell Sci*, 2019, 132: jcs222430
 - 49 Zhu X, Li S, Pan S, et al. CSI1, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E3578–E3587
 - 50 Vukašinović N, Oda Y, Pejchar P, et al. Microtubule-dependent targeting of the exocyst complex is necessary for xylem development in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2017, 213: 1052–1067
 - 51 Oda Y, Iida Y, Nagashima Y, et al. Novel coiled-coil proteins regulate exocyst association with cortical microtubules in xylem cells via the conserved oligomeric Golgi-complex 2 protein. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 277–286
 - 52 Elliott L, Moore I, Kirchhelle C. Spatio-temporal control of post-Golgi exocytic trafficking in plants. *J Cell Sci*, 2020, 133: jcs237065
 - 53 Zhang W, Huang L, Zhang C, et al. *Arabidopsis* myosin XIK interacts with the exocyst complex to facilitate vesicle tethering during exocytosis. *Plant Cell*, 2021, 33: 2454–2478
 - 54 Nielsen E. The small GTPase superfamily in plants: a conserved regulatory module with novel functions. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 247–272
 - 55 Sakurai-Yageta M, Recchi C, Le Dez G, et al. The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol*, 2008, 181: 985–998
 - 56 White C D, Erdemir H H, Sacks D B. IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cell Signal*, 2012, 24: 826–834
 - 57 Swiech L, Blazejczyk M, Urbanska M, et al. CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *J Neurosci*, 2011, 31: 4555–4568
 - 58 Krendel M, Zenke F T, Bokoch G M. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 294–301
 - 59 Birkenfeld J, Nalbant P, Bohl B P, et al. GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell*, 2007, 12: 699–712
 - 60 Nalbant P, Chang Y C, Birkenfeld J, et al. Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 4070–4082
 - 61 Pathak R, Delorme-Walker V D, Howell M C, et al. The microtubule-associated Rho activating factor GEF-H1 interacts with Exocyst complex

- to regulate vesicle traffic. *Dev Cell*, 2012, 23: 397–411
- 62 Feiguelman G, Fu Y, Yalovsky S. ROP GTPases structure-function and signaling pathways. *Plant Physiol*, 2018, 176: 57–79
- 63 Gu Y, Fu Y, Dowd P, et al. A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol*, 2005, 169: 127–138
- 64 Lee Y J, Szumlanski A, Nielsen E, et al. Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *J Cell Biol*, 2008, 181: 1155–1168
- 65 Mandal K. Review of PIP2 in cellular signaling, functions and diseases. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8342
- 66 Senju Y, Lappalainen P. Regulation of actin dynamics by PI(4,5)P2 in cell migration and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 56: 7–13
- 67 Ramalingam N, Zhao H, Breitsprecher D, et al. Phospholipids regulate localization and activity of mDia1 formin. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89: 723–732
- 68 George S P, Chen H, Conrad J C, et al. Regulation of directional cell migration by membrane-induced actin bundling. *J Cell Sci*, 2012, doi: 10.1242/jcs.116244
- 69 Rohatgi R, Nollau P, Ho H Y H, et al. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276: 26448–26452
- 70 Thapa N, Sun Y, Schramm M, et al. Phosphoinositide signaling regulates the Exocyst complex and polarized integrin trafficking in directionally migrating cells. *Dev Cell*, 2012, 22: 116–130
- 71 Fratini M, Krishnamoorthy P, Stenzel I, et al. Plasma membrane nano-organization specifies phosphoinositide effects on Rho-GTPases and actin dynamics in tobacco pollen tubes. *Plant Cell*, 2020: 642–670
- 72 Porat-Shliom N, Milberg O, Masedunskas A, et al. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 2099–2121
- 73 Hong W J, Lev S. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol*, 2014, 24: 35–43
- 74 Tang B L. SNAREs and developmental disorders. *J Cell Physiol*, 2021, 236: 2482–2504
- 75 Hay J C. SNARE complex structure and function. *Exp Cell Res*, 2001, 271: 10–21
- 76 Südhof T C, Rothman J E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 2009, 323: 474–477
- 77 Shen J, Tareste D C, Paumet F, et al. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell*, 2007, 128: 183–195
- 78 Rodkey T L, Liu S, Barry M, et al. Munc18a scaffolds SNARE assembly to promote membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 5422–5434
- 79 Zhang Y, Hughson F M. Chaperoning SNARE folding and assembly. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 581–603
- 80 Dubuke M L, Munson M. The secret life of tethers: the role of tethering factors in SNARE complex regulation. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4
- 81 Sivaram M V S, Saporita J A, Furgason M L M, et al. Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry*, 2005, 44: 6302–6311
- 82 Morgera F, Sallah M R, Dubuke M L, et al. Regulation of exocytosis by the exocyst subunit Sec6 and the SM protein Sec1. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 337–346
- 83 Südhof T C. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol*, 2012, 4: a011353
- 84 Park Y, Ryu J K. Models of synaptotagmin-1 to trigger Ca^{2+} -dependent vesicle fusion. *FEBS Lett*, 2018, 592: 3480–3492
- 85 Barlow L D, Dacks J B. Seeing the endomembrane system for the trees: evolutionary analysis highlights the importance of plants as models for eukaryotic membrane-trafficking. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 142–152
- 86 Park M, Krause C, Karnahl M, et al. Concerted action of evolutionarily ancient and novel SNARE complexes in flowering-plant cytokinesis. *Dev Cell*, 2018, 44: 500–511.e4
- 87 Slane D, Reichardt I, El Kasmi F, et al. Evolutionarily diverse SYP1 Qa-SNAREs jointly sustain pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2017, 92: 375–385
- 88 Pan H, Oztas O, Zhang X, et al. A symbiotic SNARE protein generated by alternative termination of transcription. *Nat Plants*, 2016, 2: 15197
- 89 Cao W L, Yu Y, Li M Y, et al. OsSYP121 accumulates at fungal penetration sites and mediates host resistance to rice blast. *Plant Physiol*, 2019, 179: 1330–1342
- 90 Kim H, O'Connell R, Maekawa-Yoshikawa M, et al. The powdery mildew resistance protein RPW8.2 is carried on VAMP721/722 vesicles to the extrahaustorial membrane of haustorial complexes. *Plant J*, 2014, 79: 835–847
- 91 Meng J G, Liang L, Jia P F, et al. Integration of ovular signals and exocytosis of a Ca^{2+} channel by MLOs in pollen tube guidance. *Nat Plants*,

2020, 6: 143–153

- 92 Grefen C, Karnik R, Larson E, et al. A vesicle-trafficking protein commandeers Kv channel voltage sensors for voltage-dependent secretion. *Nat Plants*, 2015, 1: 15108
- 93 Xue Y, Yang Y, Yang Z, et al. VAMP711 is required for abscisic acid-mediated inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Plant Physiol*, 2018, 178: 1332–1343
- 94 Masedunskas A, Sramkova M, Parente L, et al. Role for the actomyosin complex in regulated exocytosis revealed by intravital microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 13552–13557
- 95 Miklavc P, Hecht E, Hobi N, et al. Actin coating and compression of fused secretory vesicles are essential for surfactant secretion: a role for Rho, formins and myosin II. *J Cell Sci*, 2012, doi: 10.1242/jcs.105262
- 96 Tran D T, Masedunskas A, Weigert R, et al. Arp2/3-mediated F-actin formation controls regulated exocytosis *in vivo*. *Nat Commun*, 2015, 6: 10098
- 97 Shin W, Ge L, Arpino G, et al. Visualization of membrane pore in live cells reveals a dynamic-pore theory governing fusion and endocytosis. *Cell*, 2018, 173: 934–945.e12
- 98 Thurmond D C, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, et al. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol*, 2003, 17: 732–742
- 99 Watanabe M, Nomura K, Ohyama A, et al. Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 4519–4530
- 100 Konopka-Postupolska D, Clark G. Annexins as overlooked regulators of membrane trafficking in plant cells. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 863
- 101 Bibeau J P, Kingsley J L, Furt F, et al. F-actin mediated focusing of vesicles at the cell tip is essential for polarized growth. *Plant Physiol*, 2018, 176: 352–363
- 102 Ichikawa M, Hirano T, Enami K, et al. Syntaxin of plant proteins SYP123 and SYP132 mediate root hair tip growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 790–800
- 103 Ichikawa M, Iwano M, Sato M H. Nuclear membrane localization during pollen development and apex-focused polarity establishment of SYP124/125 during pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reprod*, 2015, 28: 143–151
- 104 Cao P, Renna L, Stefano G, et al. SYP73 anchors the ER to the actin cytoskeleton for maintenance of ER integrity and streaming in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2016, 26: 3245–3254
- 105 Fujiwara M, Uemura T, Ebine K, et al. Interactomics of Qa-SNARE in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 781–789
- 106 Cvrčková F. Formins and membranes: anchoring cortical actin to the cell wall and beyond. *Front Plant Sci*, 2013, 4
- 107 Cheung A Y, Niroomand S, Zou Y, et al. A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 16390–16395
- 108 Li S, Dong H, Pei W, et al. LIFH1-mediated interaction between actin fringe and exocytic vesicles is involved in pollen tube tip growth. *New Phytol*, 2017, 214: 745–761
- 109 Lan Y, Liu X, Fu Y, et al. Arabidopsis class I formins control membrane-originated actin polymerization at pollen tube tips. *PLoS Genet*, 2018, 14: e1007789
- 110 Liu C, Zhang Y, Ren H. Actin polymerization mediated by AtFH5 directs the polarity establishment and vesicle trafficking for pollen germination in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2018, 11: 1389–1399
- 111 Liu C, Zhang Y, Ren H. Profilin promotes formin-mediated actin filament assembly and vesicle transport during polarity formation in pollen. *Plant Cell*, 2021, 33: 1252–1267
- 112 Papadopoulos A. Membrane shaping by actin and myosin during regulated exocytosis. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 84: 93–99
- 113 Liu Z, Gao J, Cui Y, et al. Membrane imaging in the plant endomembrane system. *Plant Physiol*, 2021, 185: 562–576

Advances in the study of cytoskeleton system regulating interactions between secretory vesicles and plasma membrane

ZHANG FanFan¹, ZHAO YuWan², WANG Ting¹ & REN HaiYun^{1,2}

¹ Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

² Center for Biological Science and Technology, Institute of Natural Science, Beijing Normal University, Zhuhai 519085, China

Exocytosis is one of the most basic cell activities of eukaryotes, which is widely involved in many physiological processes in organisms. The Exocyst complex-mediated directed tethering of secretory vesicles to plasma membrane and the SNARE (Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) protein-mediated fusion process are key steps in exocytosis, and there are numerous regulatory factors involved. Previous studies have shown that the dynamic spatial distribution of cytoskeleton is closely interacted with the tethering and fusion of secretory vesicles with plasma membrane: on the one hand, cytoskeleton provides driving forces for the tethering and fusion of secretory vesicles with plasma membrane; on the other hand, tethering and fusion related regulators can also influence the dynamic of cytoskeleton. It is of great scientific significance to explore the important role and regulation mechanism of cytoskeleton in the tethering and fusion process of secretory vesicles to plasma membrane in eukaryotic cells for the deep cognition of various physiological activities of cells including exocytosis. In this paper, we have systematically reviewed the dynamic processes of the tethering and fusion of secretory vesicles with plasma membrane and emphasized the role of cytoskeleton in these two processes.

cytoskeleton, secretory vesicles, plasma membrane, Exocyst complex, SNARE complex

doi: [10.1360/SSV-2021-0145](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0145)