



植物膜蛋白的囊泡转运及调控机制的研究进展

徐昌文^{1,2}, 钱虹萍^{1,2}, 罗鹏云^{1,2}, 玉猛³, 邢晶晶⁴, 张亮⁵, 张曦^{1,2}, 崔亚宁^{1,2*}, 林金星^{1,2*}

1. 林木育种与生态修复国家工程研究中心, 北京 100083;

2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

3. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001;

4. 河南大学生命科学学院, 开封 457001;

5. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

* 联系人, E-mail: cuiyaning@bjfu.edu.cn; linjx@ibcas.ac.cn

2022-09-24 收稿, 2022-11-19 修回, 2022-11-21 接受, 2022-11-22 网络版发表

国家自然科学基金(32030010, 32000483)资助

摘要 膜蛋白的囊泡转运对维持植物的生长发育、细胞内外的物质交换、细胞识别、免疫应答、信号转导等生物学过程具有重要的生理学意义。近年来, 随着超分辨显微技术和蛋白标记方法的更新和进步, 对膜蛋白转运相关机制的研究也取得了很大进展。尽管当前对囊泡转运机制的研究手段或技术方法有很多, 但关于膜蛋白囊泡转运途径及其研究技术方法缺少系统的总结。本综述首先介绍了膜蛋白囊泡转运所涉及的相关细胞器, 全面总结了植物膜蛋白的不同囊泡转运途径, 并在此基础上, 系统概括了研究植物囊泡转运所使用的化学方法和突变体; 最后, 展望了植物膜蛋白囊泡转运途径中的研究前景, 以期为了了解和阐明植物体如何感知及适应环境的调控机制提供一定的思路和见解。

关键词 膜蛋白, 囊泡转运, 胞吞/胞吐途径, 胞吐-胞吞耦联, 自噬途径

植物膜蛋白作为细胞膜结构重要的组成成分, 是通过嵌入脂双层, 与脂质一起构成植物细胞膜的分子结构, 并在植物的物质交换、免疫应答及信号转导等过程中发挥着重要作用^[1]。研究表明, 植物膜蛋白可以作为信号分子通过囊泡进行转运, 进而在植物生长发育和胁迫应答反应中起到调节作用。例如, 在植物中, 配体诱导的鞭毛敏感蛋白FLS2(flagellin sensing 2)的胞吞作用, 对于维持其在质膜(plasma membrane, PM)上的密度, 以及启动并调控细胞响应细菌鞭毛蛋白的免疫反应至关重要^[2]。近年来, 囊泡转运(vesicle trafficking)与气孔运动之间的关系也受到研究者的关注。例如, Eisenach等人^[3]研究发现, 脱落酸(abscisic acid, ABA)可以调控植物在水分胁迫下的离子运输和

蒸腾作用, 从而触发表皮细胞和保卫细胞中钾离子通道蛋白的选择性胞吞, 导致气孔关闭。本研究团队崔亚宁等人^[4]发现, 在拟南芥中细菌鞭毛蛋白小肽flg22可以诱导保卫细胞的水通道蛋白AtPIP2;1(plasma membrane intrinsic protein 2;1)发生胞吞, 并进而导致气孔的关闭。综上所述, 膜蛋白通过囊泡转运在调控植物生长发育及应答逆境胁迫反应方面发挥重要的作用, 也备受关注。

囊泡转运是指物质由脂双层膜包裹并形成囊泡, 通过与膜融合或断裂来完成进出细胞的一种生物学过程。对真核生物有机体而言, 囊泡转运不仅促进了物质在内膜系统与细胞膜之间的运输, 还可以感知并应对不同环境信号的影响, 从而对维持细胞稳态发挥着不

引用格式: 徐昌文, 钱虹萍, 罗鹏云, 等. 植物膜蛋白的囊泡转运及调控机制的研究进展. 科学通报, 2023, 68: 762–778

Xu C W, Qian H P, Luo P Y, et al. Advances in vesicle trafficking of membrane proteins and their regulatory mechanisms (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 762–778, doi: 10.1360/TB-2022-0968

可取代的作用。研究表明,细胞壁合成所需要的物质在细胞质的高尔基体等细胞器中生成,然后经囊泡转运送到花粉管顶端,再通过胞吐释放出来^[5],从而不断地沉积形成新的细胞壁,以维持花粉管的持续生长。此外,已有的研究也表明,植物花粉管的生长周期短且迅速。例如,拟南芥花粉管在体外的生长速度为250 $\mu\text{m}/\text{h}$ ^[6],百合花粉管在体外的生长速度为500 nm/s ^[7],而囊泡转运在维持这种机体组织快速生长过程中起着重要的作用。

随着对囊泡转运机制相关研究的不断深入,以往关于动植物细胞中各种生命活动的“未解之谜”也不断地被人们揭示。植物细胞膜蛋白通过囊泡转运的途径通常可以分为胞吞和胞吐,当前对于囊泡转运不同途径的研究,以及其研究的技术和方法已经有不少总结,但尚不够全面,或未及时更新。本文综述了膜蛋白通过囊泡转运的不同途径及对植物生长和胁迫应答的调节作用,并比较系统地对膜蛋白转运过程中常用的化学试剂和突变体进行了梳理和归纳,以期对囊泡转运领域的研究提供借鉴,并为我们了解植物体感知和适应环境的机制提供思路和见解。

1 囊泡转运途径涉及的相关细胞器

真核细胞中的内膜系统由多种细胞器组成。这些细胞器经过精准且有序的调控,在彼此之间进行物质运输和信息交流,能够参与并协调介导内膜系统内的囊泡转运,进而维持细胞内环境的稳态。组成植物细胞内膜系统的细胞器包括内质网(endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体(Golgi)、反式高尔基体(*trans*-Golgi network/early endosome, TGN/EE)、多泡小体(multivesicular bodies, MVBs)又称液泡前体(prevacuolar compartments, PVCs)、液泡(vacuole)及生物膜所包裹的囊泡。随着各种新的研究方法不断涌现和显微技术的蓬勃发展^[8~10],在植物细胞研究中,对于各种细胞器的生成机制及结构的解析取得了显著成果。香港中文大学姜里文研究团队^[11]运用荧光pH分子探针PEpHluorin和PRpHluorin实现了对各个细胞器腔内pH的测量,并建立了首个植物体内细胞器pH图谱。此外,他们利用液泡分选受体蛋白,通过免疫胶体金实验,发现该抗体定位在MVBs的膜上,并首次确定MVBs为PVCs^[12]。运用全细胞电子断层扫描技术,该团队以纳米分辨率分析了拟南芥根细胞液泡形成过程的形态变化和发育情况,结果显示,大液泡是由直径为400~1000 nm的小液泡

(SVs)逐步融合/成熟产生的;进一步的ET分析证实,这些小液泡中含有来源于MVBs的腔内囊泡,表明中央液泡的形成主要源于MVBs到小液泡的过渡和小液泡的相互融合^[13]。更值得关注的是,南方科技大学李瑞熙团队^[14]结合遗传学和药理学方法,利用免疫电子显微镜和光电关联技术对进化保守的HOPS复合体亚基VPS41蛋白的亚细胞定位进行了研究,在植物中首次发现了该蛋白定位的依附于内质网的无膜结构。对囊泡转运相关细胞器的解析和探索为膜蛋白通过囊泡转运的机制及功能的研究提供了重要依据。

2 植物膜蛋白的转运途径

生物体中的囊泡转运过程是指通过内膜系统中的各种细胞器参与介导完成的生物学过程^[15]。它能够将膜蛋白等货物包裹在囊泡中运送到特定的靶部位。植物细胞的囊泡转运需要转运包被囊泡的参与,在囊泡出芽时会被不同包被蛋白包被形成包被囊泡。根据囊泡表面的包被蛋白不同,可将包被囊泡分为三类,即COPII(coat protein II)包被囊泡、COPI(coat protein I)包被囊泡和网格蛋白/接头蛋白(clathrin/adaptor protein)包被囊泡,这三者分别介导细胞内不同的囊泡转运形式。其中,COPII包被囊泡是介导从内质网到高尔基体的物质运输(又被称为正向运输,anterograde transport);而COPI包被囊泡的转运被称为反向运输(retrograde transport),是介导物质从反面高尔基体到顺面高尔基体以及从顺面高尔基体到内质网的转运(图1);网格蛋白/接头蛋白包被囊泡介导蛋白从反面高尔基体到胞内体或液泡,以及在胞吞时介导物质从质膜到液泡的转运。根据囊泡转运的方向,通常将囊泡转运分为胞吐(exocytosis)、胞吞(endocytosis)以及胞吐-胞吞的耦联。

2.1 胞吐途径

胞吐是指一些大分子物质通过内质网或高尔基体形成的囊泡,最终与质膜融合,同时扩展质膜所需要的蛋白质和脂类以及细胞壁生长所需要的多糖与糖蛋白等的过程^[16]。胞吐是一个复杂的过程,包括囊泡的形成、定向转运、拴系、锚定、膜融合等步骤。有报道, Rab GTPases、胞泌复合体(exocyst)和SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)复合体保证了囊泡靶向、拴系和融合的特异性^[17],其中,分泌蛋白的转运是胞吐现象最为重

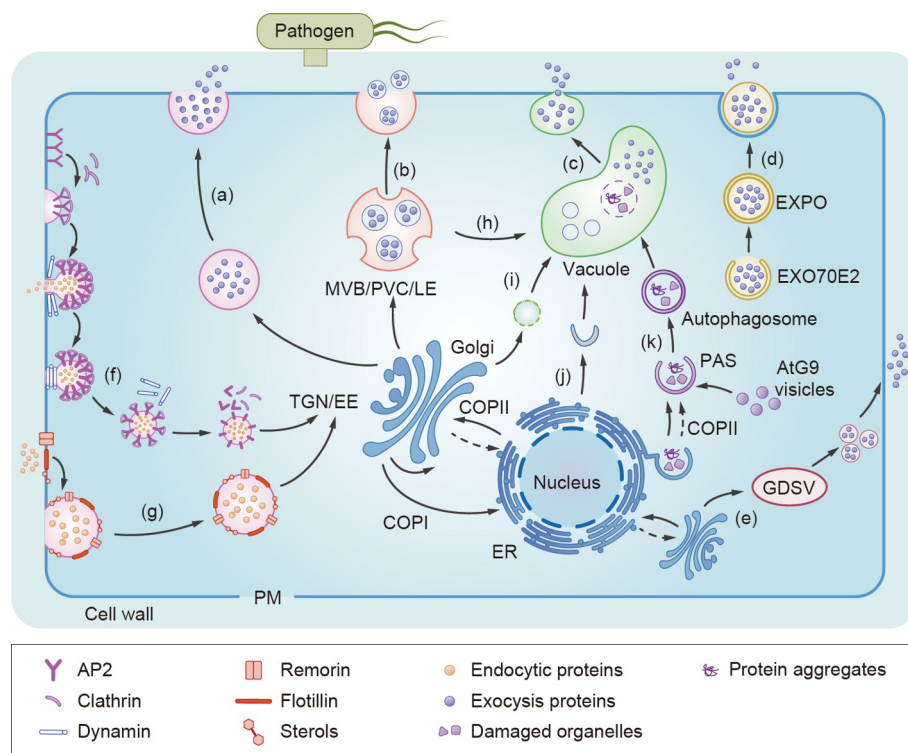


图1 (网络版彩色)囊泡转运的不同途径。(a)经典蛋白分泌(CPS)途径;(b)MVB介导的UPS途径;(c)液泡介导的UPS途径;(d)EXPO介导的UPS途径;(e)高尔基体分泌囊泡(GDSV)介导的UPS途径;(f)网格蛋白介导的胞吞途径(CME);(g)非网格蛋白介导的胞吞途径(CIE);(h)MVB靶向液泡的途径;(i)高尔基体靶向液泡的途径;(j)ER直接靶向液泡的途径;(k)自噬途径。LE, 晚期内涵体; PAS, 吞噬小体前体结构

Figure 1 (Color online) Different routes of vesicle transport. (a) Conventional protein secretion (CPS) pathway. (b–e) The different unconventional protein secretion (UPS) pathways reported in plant cells. (b) MVBs-mediated UPS pathway; (c) vacuole-mediated UPS pathway; (d) EXPO (exocyst-positive organelle)-mediated UPS pathway; (e) Golgi-derived secretory vesicle (GDSV)-mediated UPS pathway; (f) clathrin-mediated endocytosis (CME) pathway; (g) clathrin-independent endocytosis (CIE) pathway; (h) MVB targets vacuolar pathway; (i) Golgi targets vacuolar pathway; (j) ER targets vacuolar pathway; (k) autophagy pathway. LE, late endosome; PAS, pre-autophagosomal structure

要的生物学过程之一。根据蛋白分泌囊泡是否经过ER-高尔基体转运路径, 又可以将胞吐途径分为经典蛋白分泌(classical protein secretion, CPS)途径和非经典蛋白分泌(unconventional protein secretion, UPS)途径。

2.1.1 经典蛋白分泌(CPS)途径

真核生物中, 大多数分泌蛋白包含一种信号序列或跨膜结构域, 使其具有到达内质网腔并固定在内质网膜上的特性, 能够被信号识别颗粒识别并结合, 通过SEC61介导进入内质网^[18,19]。然后, 这些货物通过COPII和COPI包被小泡介导的ER-高尔基体转运路径^[20], 将新合成的蛋白质从ER输送到高尔基体。货物进入高尔基体完成修饰后, 通过TGN/EE进行分类, 最后通过分泌囊泡或分泌颗粒进入PM或细胞外间隙, 整个过程称为经典蛋白分泌途径(图1(a))。

在真核细胞中, 负责ER-高尔基体转运路径的COPI、COPII包被蛋白及相关蛋白的同源物已得到广

泛的研究。起初有研究发现, COPI和网格蛋白重链(clathrin heavy chain, CHC1)均与一种跨顺面高尔基体/TGN标记蛋白共定位^[21]。后来的证据证明, COPI囊泡主要由顺式高尔基体产生, 而网格蛋白囊泡是由TGN及PM等产生。COPI介导的高尔基体内运输被认为在碳水化合物和转运囊泡形成阶段起作用, 之后的运输机制则是由网格蛋白介导完成^[22]。不同于COPI包被囊泡, COPII囊泡是从内质网出口位点(ER exit sites, ERESs)衍生的, 包含5种细胞质成分, 即Sar1小GTPase, 内层蛋白Sec23、Sec24和外层蛋白Sec13、Sec31。在真核生物中, COPII转运已经多样化, 多种COPII旁系同源物已经被发现^[23]。最近的证据表明, 一些小的GTPases不仅调控转运囊泡COPI/COPII产生或融合的离散位点, 而且还调控其所在的细胞器的膜动力学。例如, ER定位的Sar1在ERESs促进COPII转运囊泡的形成, 将货运蛋白从ER转运到高尔基体; 高尔基体定位的ARF1(ADP ri-

bosylation factor1)作用于COPI和网格蛋白囊泡的生成,以及Rab GTPase作用于这些转运囊泡与细胞器之间的膜融合^[22]。

在植物调节生长发育及应答逆境胁迫反应方面,CPS分泌途径被发现参与并发挥了重要的功能。例如,在应答逆境胁迫方面,南京农业大学张正光研究团队^[24]研究发现,在水稻感染稻瘟病菌时,MoEcp1等多种分泌蛋白通过CPS途径的转运过程,于感病水稻宿主对病菌的识别和自身抗病性具有重要作用。拟南芥SNARE蛋白VAMP721(vesicle-associated membrane protein 721)和VAMP722定位于TGN/EE,其介导的囊泡运输包括从TGN到质膜的胞吐以及胞吞循环运输,维持了TGN的结构和功能,在生长素运输载体PIN(pin-formed)的极性定位中起重要作用。Zhang等人^[25]发现,VAMP721和VAMP722功能缺失突变体导致PIN蛋白在胞质内异常聚集,根组织中生长素分布异常,并产生畸形的子叶,严重抑制侧根的生长,说明CPS在植物调节生长发育方面不可或缺。

2.1.2 非经典蛋白分泌(UPS)途径

虽然CPS的机制非常保守,但它不能解释分泌途径中的两个例外事件:第一,许多缺乏信号肽的蛋白质仍然能够到达细胞表面;第二,一些含有信号肽的蛋白质不经过高尔基体就能到达PM或细胞外。最近的研究发现,许多缺乏信号肽的蛋白或其他分泌物质能够绕过ER-高尔基体转运途径而通过非经典蛋白分泌途径进行转运。其中,关于缺乏信号肽的蛋白转运起始是如何进入囊泡的相关机制研究还相对较少。清华大学葛亮研究团队^[26]在动物中发现一种TMED10(transmembrane emp24 protein transport domain 10)蛋白通道能够介导此过程,当无信号肽的货物产生并与细胞质中HSP90A(heat shock protein 90 alpha)结合后,与ER-高尔基体中间室(ER-Golgi intermediate compartment, ER-GIC)定位的TMED10相互作用,并促进其发生同源寡聚化形成蛋白转运通道,介导货物蛋白进入囊泡。

最近研究报道了植物中几种不同机制介导的UPS通路,包括液泡介导的UPS(图1(c))、MVB介导的UPS(图1(b))、高尔基体分泌囊泡GDSV介导的UPS(图1(d))以及新型双层膜细胞器EXPO介导的UPS途径(图1(e))。这几条通路在植物生长发育及对逆境胁迫的应答反应中发挥重要作用。例如,植物在被致病细菌攻击时,拟南芥的中央液泡与PM在细菌攻击位点融合,导致液泡酶进入UPS途径,从受感染叶片的液泡中排出的细胞外

液具有抗菌活性和诱导细胞死亡的活性,可用于植物防御^[27]。另一种分泌囊泡通过运输至高尔基网络,经多泡小体MVBs或晚期内涵体(later endosomes, LEs)进行相关分泌物质运输的UPS途径被发现(图1(b))。Nielsen和Thordal-Christensen^[28]通过用Brefeldin A(BFA)处理被大麦白粉病真菌入侵的拟南芥,发现仍有PM定位的SNAREs蛋白家族成员PEN1(PENETRATION1)蛋白在真菌的侵袭部位聚集并积累,且MVBs在植物中特异性标记蛋白Rab5 GTPase成员Ara6也在真菌侵袭部位存在积累^[29],表明在病原体攻击时,含有PEN1的MVB囊泡能够绕过ER-高尔基体转运路径,直接与PM融合,释放外泌体(exosome)到感染部位形成防御结构。此外,除了应对病原体感染,MVB介导的UPS也发生在植物-微生物共生过程中。在丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)的形成和成熟过程中,MVBs被证明与宿主来源的丛枝周围膜(peri-arbuscular membrane, PAM)融合,PAM与植物PM连接,并将腔内小泡释放到植物和真菌相互作用的丛枝周围空间^[30,31]。Wang等人^[32]还发现一种由高尔基体衍生的分泌囊泡GDSVs(Golgi-derived secretory vesicles)介导的UPS途径,遵循高尔基体-GDSV-PM/CP(cell plate)的极性而独立于TGN向PM极性的胞吐途径,该途径介导烟草果胶甲基酯酶(NtPPME1)的分泌,在细胞扩增和胞质分裂过程中参与细胞壁的形成。Wang等人^[33]在拟南芥和烟草细胞中首次发现了一种由EXPO(exocyst-positive organelle)介导的UPS分泌途径,能够介导囊泡从细胞质到细胞壁的胞吐作用。双层膜细胞器EXPO在细胞内形成,并与PM融合,以胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的形式将囊泡释放到细胞外空间。不仅如此,UPS途径在介导缺乏信号肽的蛋白等货物进行胞吐的过程中,需要与PM融合,往往会导致EVs的产生。因此,越来越多的证据显示,除EXPO外,MVBs、液泡和自噬小体也可能参与了EVs的形成^[13,34]。Zhang等人^[35]研究发现,拟南芥synaptotagmin蛋白SYT2定位于高尔基体,介导了潮霉素磷酸转移酶(hygromycin-resistant, HYG^R)转运至胞外发挥功能。HYG^R通常作为转基因植物阳性筛选抗性标记,缺乏信号肽。GFP标记的HYG^R显示生物合成后在其C末端被截断,从胞质中转运到胞外,此转运过程对BFA处理不敏感。synt2突变体影响了HYG^R的C端截断而聚集在液泡中,表明SYT2介导HYG^R经非经典分泌途径进行胞内运输。

植物利用多种UPS途径来实现植物特有的生物功

能,如应对病原体感染、植物-微生物的相互作用、细胞板(CP)的形成等过程.对不同植物物种进行的多项研究表明,当植物受到病原体攻击时,能够通过UPS分泌途径释放EVs,且这些EVs含有各种防御相关蛋白、sRNA和脂质信号,表明EVs能够作为植物免疫反应的重要组成部分^[36].美国加州大学金海玲教授研究团队^[37]利用活细胞成像手段对MVB标记物ARA6和EVs的标记物TET8(tetraspanin-8)进行共定位,表明植物通过UPS释放的EVs将防御性sRNA转运至坏死性病原体灰葡萄孢中,这些含有sRNA的囊泡在感染部位积聚并被真菌细胞吸收以使致病基因沉默. De Caroli等人^[38]通过对拟南芥中木葡聚糖内转葡糖基酶/水解酶(xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases, XTH)家族的3个成员XTH11、XTH33和XTH29进行比较分析发现,只有XTH29是由EXPO介导的UPS途径分泌,且在干旱和热胁迫的生理环境下该蛋白表达量显著上调,表明XTH29通过UPS途径参与了拟南芥的逆境胁迫反应.因此,UPS与CPS共同负责植物中的蛋白质分泌,并可能通过在CPS和UPS之间建立平衡来应对逆境.

2.2 胞吞途径

所有真核细胞在吞入来自质膜的跨膜蛋白时,以及在摄取过大而不能通过双层膜扩散的物质时,都需要胞吞来进行^[39,40].胞吞途径可以分为网格蛋白介导的胞吞途径(clathrin-mediated endocytosis, CME)(图1(f))和不依赖网格蛋白进行的胞吞途径(clathrin-independent endocytosis, CIE)(图1(g)).在植物中研究较多的是CME途径,此途径在植物的生长发育中起着重要的生物学功能^[41].

2.2.1 网格蛋白介导的胞吞途径

作为真核细胞胞吞的主要途径,CME途径是指将细胞外物质包裹进网格蛋白包被囊泡(clathrin-coated vesicles, CCVs),通过CCVs内陷将货物释放进细胞质中.CME途径是研究最为深入也是最普遍的一种胞吞途径^[42].研究发现,CME途径需要大量的蛋白参与,并且是一个循序渐进的过程,可分为5个步骤:成核、货物选择、网格蛋白涂层组装、膜分裂和囊泡脱膜^[43].具体步骤为^[16]:(1)CCVs的形成始于接头蛋白复合体AP2(adaptor protein complex 2)通过结合磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸[PI(4,5)P₂]与PM进行结合.(2)AP2招募网格蛋白和辅助蛋白,并与各种货物蛋白结合.在辅助蛋白的帮助下,AP2继续招募网格蛋白,网格蛋白聚合并在

新形成的膜内陷周围形成网格蛋白外壳.(3)CCVs成熟时,GTPase动力学相关蛋白(dynamin-related proteins, DRP)在囊泡颈部被招募.(4)囊泡与PM进行分离.(5)一旦小泡被切断,CCVs组件被拆卸,并将含有货物的胞吞小泡释放到细胞质中.其中,除真核生物中进化保守的接头蛋白复合体AP2外,参与植物CME成核以及货物分选过程的接头蛋白复合体,还包括进化更为古老且植物特有的接头蛋白复合体TPC(TPLATE adaptor complex),植物中的TPC复合体通常由8个亚基组成,并且在CME中发挥重要作用^[44].通过超高分辨显微镜观察发现,在CME过程中TPC的相关亚基在到达PM前就已组装完毕^[45].此外,研究也证明,TPC比AP2及DRP蛋白更早地富集到PM的胞吞位点^[44,46]. Jiří Friml研究团队^[47]通过超分辨观察发现,在CME过程中,TPC的亚基分布于CCV外周并在CCV与膜分离之前离开胞吞位点.

近年来,CME在植物中研究进展主要集中在发现新的CME胞吞相关蛋白、货物蛋白、胞吞具体机制以及影响胞吞的因素等.譬如,邓兴旺研究团队^[48]发现,AP2 σ 对植物网格蛋白包被囊泡的形成是必需的,它通过网格蛋白介导的胞吞途径调控AtAGP(arabinogalactan proteins)蛋白的胞吞循环.浙江师范大学潘建伟研究团队^[49]研究证明,植物通过调节PIN蛋白的CME途径,介导调节生长素的转运过程,从而影响拟南芥下胚轴钩形成.拟南芥硼(B)流入通道NIP5;1和流出转运体BOR1的胞吞均由CME介导,而在AP2亚基突变体中NIP5;1的极性定位受损.同样,CME有助于BOR1在根细胞中的极性定位和硼诱导的降解,表明CME胞吐途径在调节植物细胞的营养稳态中发挥作用^[50].在高盐胁迫下,植物通过刺激CME介导的PIN2胞吞作用使其重新定位,进而导致生长素的重新分布,并使根的定向弯曲远离较高的盐浓度^[51].福建农林大学陈栩研究团队^[52]在拟南芥中证明了一种防御-生长平衡机制,即水杨酸通过抑制PIN2蛋白依赖于REM1.2(Remorin1.2)的横向扩散而使其在质膜纳米结构域聚集,并显著抑制了PIN2的CME途径,从而破坏了生长素的不对称分布和由此产生的向地性响应.所以,CME在植物的生长发育和逆境胁迫应答反应中发挥着重要的作用.

2.2.2 非网格蛋白介导的胞吞途径(CIE)

网格蛋白介导的胞吞途径包括从起始、装载、膜弯曲到膜断裂以及囊泡释放到细胞质中的过程,其中的一个关键组成部分是网格蛋白^[43].CIE的胞吞途径跟CME的主要区别在于,CIE途径不借助于网格蛋白,胞

吞时膜的弯曲程度和尺度是胞吞过程的主要决定因素^[53]。

近些年来, 在植物的研究也发现存在CIE胞吞途径。含有stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C(SPFH)结构域的Flotillins蛋白家族在抗洗涤剂膜(detergent-resistant membrane, DRM)组分中被检测到, 存在于多种细胞膜的脂筏微域中。Thomas Ott研究团队^[54]通过对不同类型的脂筏微域进行高分辨率的成像, 并以此对不同膜筏微域在细胞膜上的分布结构进行了精确区分。本研究团队的Li等人^[55]运用单分子分析技术和免疫胶体金标记等, 首次在拟南芥中发现了一条CIE胞吞途径, 即膜筏蛋白flotillin1(Flot1)介导的胞吞途径, 进一步应用VA-TIRFM技术, 分析了拟南芥中膜筏标记蛋白Flot1和Clathrin蛋白的共运动以及共定位情况, 研究结果发现两个蛋白运动状态不同, 并且两个蛋白共定位比例较低, 进而证明Flot1标记了一种不同于CME的胞吞过程。后期本研究团队的相关研究也发现, Flot1参与的胞吞途径在植物响应逆境胁迫过程中发挥重要作用。例如, Li等人^[56]发现正常条件下, 拟南芥中水通道蛋白PIP2;1主要以CME途径胞吞, 但当受到NaCl胁迫时, CIE途径也能够参与PIP2;1的胞吞。除此之外, Hao等人^[57]发现高盐胁迫可以引起AtRbohD(respiratory burst oxidase homolog D)蛋白通过FLot1介导的CIE途径而胞吞进入细胞质中。本研究团队还对AtFLS2、AtBSK1(brassinosteroid signaling kinase 1)、AtHIR1(hypersensitive induced reaction 1)、AtBRI1(brassinosteroid insensitive 1)以及AtFER(FERONIA)等^[5,15,58-61]发挥重要作用的质膜蛋白做了比较深入的研究, 揭示在正常情况下, 质膜蛋白的胞吞途径以CME途径为主要途径; 而在环境胁迫条件下, CIE途径能够在CME进行的同时, 参与介导质膜蛋白的胞吞过程, 从而在植物适应环境的机制中发挥作用。

类似地, Baral等人^[62]通过应用GPI(glycosylphosphatidylinositol)锚定蛋白作为CIE标记蛋白, 发现NaCl可以重塑拟南芥根部的CIE途径。正常情况下, CIE途径只发生在拟南芥根的表皮细胞。当用盐胁迫处理后, CIE途径会在根的不同层之间都有存在。这些实验不仅说明植物中存在CIE途径, 而且证明了CIE途径在植物响应外界胁迫过程中发挥重要作用。

2.3 胞吐-胞吞耦联

通常在哺乳动物的分泌细胞中, 胞吐作用和胞吞

作用是紧密耦合的膜转运过程, 控制着质膜的表面积和组成。前人的研究证明, 至少存在3种大小匹配的胞吐-胞吞耦联作用: 完全塌陷融合与网格蛋白介导的胞吞作用、KR(kiss and run)或KS(kiss and stay)与非网格蛋白介导的胞吞作用, 以及复合胞吞作用与大量胞吞作用^[63]。事实上, 植物生长发育的许多方面, 如叶尖生长、免疫应答和蛋白质极性建立等, 都离不开胞吐-胞吞作用之间平衡的紧密调节。胞吐为细胞壁形成、顶端生长和抵抗病原菌提供成分^[64]。胞吞作用则调节质膜蛋白的密度和活性^[16]。为此, Zhang等人^[65]针对植物如何调控胞吞-胞吐平衡以响应生长发育和环境信号提出假说(图2): 在发育状态下, 胞吞-胞吐的平衡是维持PM完整性和细胞稳态所必需的(图2中间图)。当应对环境刺激时, 胞吞-胞吐的平衡被打破。例如, 在病原体感染时, MVB介导的UPS途径物质分泌被增强, 促进MVBs与PM融合, 并将防御性化合物或相关蛋白释放以形成防御结构(图2左图)。相比之下, 高渗处理能增强PM蛋白的胞吞, 并通过CME介导在液泡中进一步降解, 同时抑制胞吐途径(图2右图)。此外, 在调节植物免疫方面, Xing等人^[66]总结了磷脂信号转导通路与胞吞-胞吐平衡之间的关系: 在病原体刺激下, 植物细胞质膜上的多种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)包括FLS2、BAK1(BRI1-associated receptor kinase 1)等, 能够结合来自细菌和真菌的微生物或病原体相关分子模式配体, 然后通过CME或CIE途径进行胞吞; 而植物磷脂酶(PLAs, PLCs和PLDs)和脂质激酶(PIPKs)在受到病原体刺激后被激活并产生磷脂酸(phosphatidic acid, PA)等衍生分子, 这些衍生分子能够作用于模式受体蛋白或网格蛋白, 以促进受体蛋白的胞吞; 同时, 磷脂衍生分子能够招募运输防御相关蛋白通过胞吐途径到病原体感染部位, 以此来维持植物免疫中磷脂信号转导与囊泡转运之间的协调。

目前, 对植物胞吞-胞吐耦联机制的研究并不多。其中, 在调节植物生长发育方面, Grebnev等人^[67]提出, 花粉管顶端的胞吐和胞吞的协调作用有助于维持细胞质膜中脂质/蛋白质组成的极性。研究也发现, 在花粉管生长过程中, 胞吞作用可与胞吐作用同时发生, 并回收与质膜融合失败的胞吐囊泡以保持物质运输平衡^[68]。本研究团队Zhang等人^[69]应用荧光相关/互相关光谱(FCS/FCCS)技术, 从单分子水平实时定量分析了胞吞胞吐过程, 揭示了胞吞和胞吐的耦联机制, 为进一步解析胞吞-胞吐耦联的机制提供了新的思路和见解。

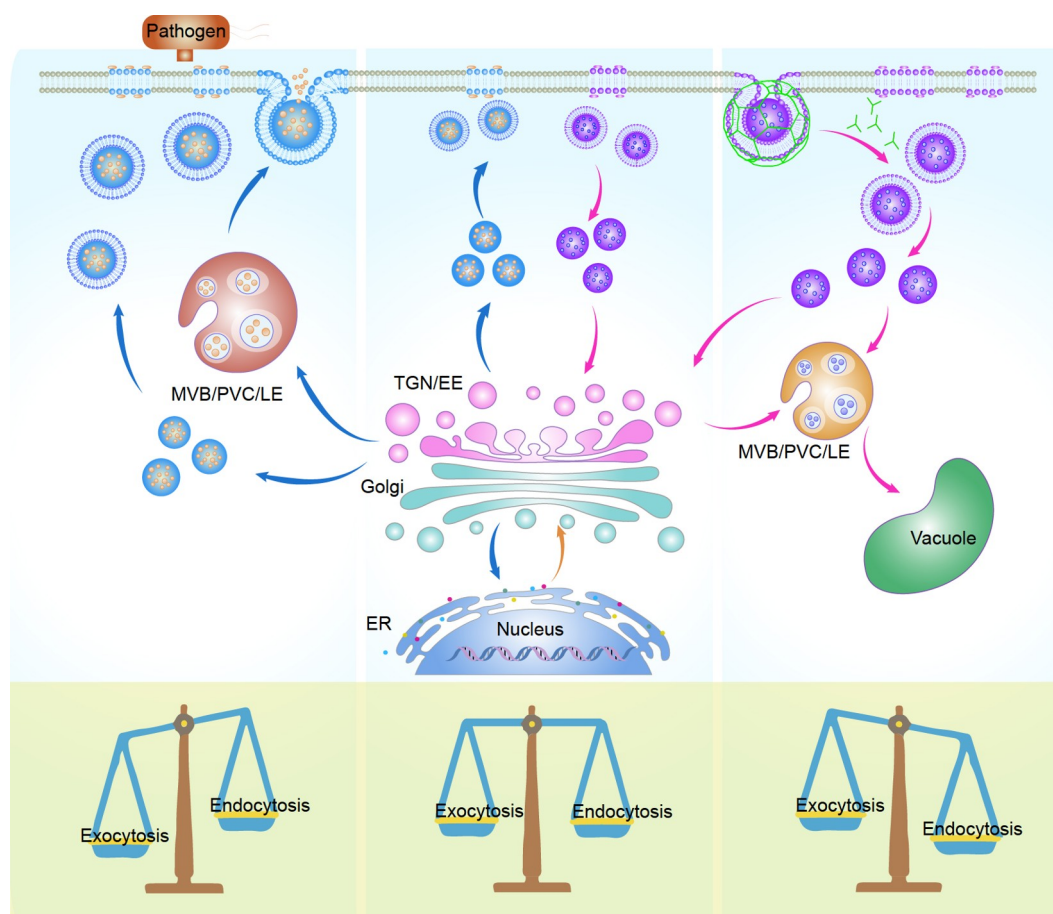


图2 (网络版彩色)植物生长发育和环境胁迫调节胞吞胞吐平衡的模式图

Figure 2 (Color online) Hypothetical model of plant vesicle transport in response to developmental and environmental cues

2.4 膜蛋白的降解与自噬

有机体的所有的细胞内蛋白质和大多数的细胞外蛋白都在不断地进行更新,而一些受损伤的细胞器、错误编码的蛋白质及代谢废物等都需要被转运到特定部位(哺乳动物中的溶酶体以及植物和酵母中的液泡)进行降解,从而得以维持细胞的内环境稳态.植物细胞中蛋白向液泡运输的途径可以分为途经TGN的MVB靶向液泡的运输途径(图1(h))、依赖接头蛋白复合物3(adaptor protein complex-3, AP-3)介导的高尔基体靶向液泡的运输途径(图1(i))、ER直接靶向液泡的途径(图1(j))以及自噬途径(图1(k))^[70],其中MVB靶向液泡的运输途径又可以分为经典Rab5和Rab7双依赖型靶向液泡的途径和仅依赖Rab5靶向液泡的途径.近年来,在植物体中对高尔基体或ER直接靶向液泡的途径研究证据相对较少,而对自噬途径机制的研究相对较多.

自噬途径(autophagy pathway)(图1(k))作为一种保守的自降解途径,将功能失调的细胞器或其他细胞质成分传递到可降解的囊泡结构(植物和酵母中的液泡)进行降解和循环利用^[71].该途径是由一种称为自噬小体的独特双层膜细胞器介导,能够向溶酶体/液泡递送细胞质(蛋白质、RNA和细胞器)成分,使大分子得以循环利用,以维持真核细胞内的细胞稳态^[72].在自噬的相关研究中,通常将自噬过程分为4个步骤:诱导与货物选择、成核与扩张、对接与融合、降解与排出^[73].在植物的研究中发现,自噬小体的形成始于自噬前体结构(PAS),自噬前体形成时的膜来源众多,其中包括ER、ATG9(autophagy-related 9)囊泡池以及COPII囊泡等^[74].Zhuang等人^[75]发现,ER可能作为应激感知和调节自噬的中心部位,且ATG9被证明是ER调节自噬体成熟所必需的,并可能以植物特异性的方式在植物自噬小体形成中发挥作用.此外,在高等植物中,越来越多

的证据表明,自噬和内膜系统之间存在联系.最近一项研究也揭示了ER-COPII与自噬通路之间是相互作用的^[76].值得关注的是,正常生长条件下,COPII囊泡不仅能够调控CPS中ER-高尔基体的正向运输,而且在植物胁迫或营养缺乏条件下,COPII作为自噬前体膜的提供者,被植物特有的AtRabD2a与AtSar1d作为分子开关协同调节,从而在自噬过程中通过循环中间代谢产物来维持细胞稳态^[77].此外,虽然自噬小体在UPS中的作用仍然未知,但是植物细胞UPS途径中的EXPO和自噬体之间可能的生理关系不仅是它们在结构上的相似性,而且还因为在植物自噬诱导过程中EXPO也可能通过与液泡的融合在植物自噬诱导过程中参与蛋白质的降解过程^[33].对于自噬途径的调节机制,姜里文研究团队^[78]发现,ESCRT复合物在多囊泡体形成及膜蛋白的选择性分选和降解过程中起着重要的调控作用.该团队通过将拟南芥的ESCRT蛋白成员与动物和酵母中的ESCRT蛋白成员进行结构域对比,鉴定出一个植物中特有的ESCRT复合物组分FREE1^[79].研究证明,FREE1能够与BRO1, VPS23和SH3P2等多个蛋白互作,从而调控多囊泡体形成、液泡蛋白转运和自噬降解等过程^[79,80].

植物自噬功能与植物的营养生长、繁殖、衰老和各种免疫反应有关.其中,Minina等人^[81]将自噬相关的ATG5或ATG7基因过表达转入到植物中,通过研究发现,与对照相比,过表达植株的自噬明显增强,在调节植物生长方面能够抑制植物衰老,刺激营养生长,增加结实率;在胁迫应答方面,对氧化胁迫和油菜链霉菌的抗性增加.因此,自噬途径在植物发育和逆境反应等方面具有重要的作用.

3 研究植物囊泡转运使用的化学方法和突变体

3.1 研究囊泡转运的常用化学抑制剂

为了更好地理解和确定各种蛋白的亚细胞定位及细胞中的运输途径,多种化学抑制剂已经被开发并使用,已经成为了一种强大的工具.本文对植物膜蛋白囊泡转运研究中常用的化学抑制剂进行了简要介绍,并对其进行了总结(表1).

3.1.1 BFA

Brefeldin A(BFA)是一种真菌毒素,其直接作用底物为ARF GEF(guanine nucleotide exchange factor),主

要机制是能够阻断从TGN/EE到质膜和TGN/EE与液泡之间的运输,并可能间接抑制COPI囊泡的转运. BFA可以使植物在细胞内形成大的胞内体和反式高尔基腔体聚集物,通常被称为BFA小体^[82].在研究植物囊泡转运时, BFA是应用最为广泛的抑制剂.例如, Fan等人^[16]用BFA处理PIN1-GFP的转基因材料, 研究表明, PIN1蛋白会聚集到BFA小体中;当洗脱BFA后, PIN1又可重新循环到细胞膜上,表明PIN1在细胞膜与内涵体之间转运. Foissner等人^[83]的研究表明, BFA能够抑制多细胞绿藻节间细胞中CME途径和离子转运.此外, Xing等人^[84]通过使用BFA对PLD δ -GFP转基因拟南芥进行处理,发现在静息状态下, PLD δ (phospholipase D δ)蛋白可能以BFA不敏感的胞吐途径进行运输;但在病原体刺激下, PLD δ 蛋白对BFA敏感的胞吐途径显著增强,证明植物已经进化出一种机制,通过改变BFA敏感和不敏感的胞吐途径之间的动态平衡来应对病原体的攻击.可见, BFA在抑制囊泡转运方面效果较显著,这也为植物膜蛋白囊泡转运方面的研究提供了便捷与科学的方法.

3.1.2 Conc A

Conc A(concanamycin A)是一种膜透性大环内酯类抗生素,其主要功能是抑制液泡中V-ATPases的活性,并阻断TGN/EE向MVBs的蛋白运输^[85].之前的研究发现, Conc A处理后蛋白货物积聚在液泡中,因此Conc A通常被用来初步分析蛋白经囊泡转运的酸化降解过程^[86].在植物膜蛋白的囊泡转运研究中, Zhou等人^[87]用Conc A处理来研究V-ATPase α 亚基(VHA-c)对植物生长的影响,结果显示GFP标记的PutVHA-c在内涵体区室明显聚集,证明PutVHA-c通过影响依赖V-ATPase的囊泡转运在植物生长中发挥重要作用.此外,本研究团队Zhang等人^[88]通过比较M β CD和Conc A/Baf A1处理T101A幼苗时硝酸盐诱导的Ca²⁺积累的情况,发现M β CD处理后硝酸盐诱导的Ca²⁺积累明显受损,而Conc A和Baf A1处理都促进了Ca²⁺内流,进一步证明非磷酸化NRT1.1(nitrate transporter1.1)的胞吞作用与硝酸盐触发的信号通路呈正相关.在马铃薯叶片中, Teper-Bam-nolker等人^[89]对BY-2细胞中StVPE1(vacuolar processing enzyme 1)-GFP的组织学进行分析,发现Conc A处理可导致StVPE1-GFP在细胞液泡中积累,证明VPE是通过自噬途径转运至液泡,并使细胞发生程序性死亡.通过以上研究展示, Conc A已成为抑制物质经囊泡转运后酸化降解过程的有效药剂.

表 1 研究植物囊泡转运的化学抑制剂

Table 1 Commonly used chemical inhibitors for investigating endosomal trafficking in plants

抑制剂	功能	作用部位	局限性	文献
Brefeldin A(BFA)	抑制ARF GEF的活性	阻断从TGN/EE到质膜的运输, 以及阻断TGN/EE与液泡之间的运输	未知	[82~84]
Concanamycin A(Conc A)/ Bafilomycin A(BafA)	抑制液泡中V-ATPases 的活性	阻断TGN/EE向MVBs的 蛋白转运	未知	[85~89]
Wortmannin	特异性抑制磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)	阻断液泡前体PVC/MVB/LE 向液泡的融合	未知	[14,90~92]
Ikarugamycin(IKA)	对CME胞吞途径有强烈、 可逆的短期抑制作用	IKA破坏CCP结构, 导致AP2和 CHC向PM再分配	未知	[91,93~95]
Cycloheximide(CHX)	真核翻译延伸的抑制剂	抑制胞质核糖体的蛋白质合成	具有较强的细胞毒性	[90,96~100]
Tyrphostin A23(TyrA23)	抑制CME途径	与拟南芥网格蛋白重链结合; 导致胞质酸化	能够影响除CME外的生化过程	[60,101~103]
M β CD/M α CD(Methyl- β / α -cyclodextrin)	胆固醇抽提剂	常用来破坏脂筏结构	在抽提胆固醇的同时, 能够影响 其他的固醇成分, 效果不够特异	[15,53,104~107]

3.1.3 Wortminnin

Wortminnin(Wm)是一种真菌代谢产物, 其主要作用是特异性抑制磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)。研究表明, Wm能够影响液泡前体PVC/MVB/LE向液泡的融合, 从而影响多个囊泡转运通路^[90], 被广泛用于胞吞体组织和转运的研究。Scali等人^[91]的研究表明, Wm处理的烟草花粉管能够影响脂类代谢、能量代谢等相关蛋白质的囊泡转运过程, 证明花粉管的生长是一个复杂的机制, 依赖于能量消耗过程。De Caroli等人^[92]通过用Wm处理拟南芥显著改变了PGIP2(polygalacturonase-inhibitor gene 2)-GFP的胞吞途径, 导致中央液泡中的荧光减弱, 蛋白积累减少, 证明PGIP2-GFP可能被转运至MVB和PVC。此外, 李瑞熙研究团队^[14]应用Wm处理拟南芥根系, 结果显示, 晚期内涵体标记蛋白ARA7等聚集形成典型的内涵体融合环状结构, 而液泡蛋白分选相关蛋白41(vacuolar protein sorting 41, VPS41)极少形成; 进一步研究发现大部分VPS41和内涵体蛋白具有不同的亚细胞定位。如上所述, Wm已经被作为一种广泛应用的药物化合物, 用于研究特定蛋白质或细胞化合物的囊泡转运路线。

3.1.4 IKA

Ikarugamycin(IKA)是一种具有抗原虫活性的抗生素, 属于多环四甲酸酯大内酰胺类。研究发现, IKA具有多种功能, 如抗肿瘤作用和调节免疫系统等^[93]。Elkin等人^[94]发现, IKA对CME胞吞途径有强烈的短期抑制作

用, 且这种短期抑制作用是可逆的, 但对其他细胞胞吞途径没有显著抑制作用。因此, IKA已经被用于研究CME途径。例如, Moscatelli等人^[95]使用IKA处理烟草的原生质体, 发现烟草原生质体中存在独立于CME的胞吞通路。此外, 还有研究通过使用IKA来处理烟草花粉管, 发现IKA能够影响花粉管细胞膜上的蛋白密度分布, 从而影响能量代谢过程^[91]。因此, IKA可以作为一种有用的药物来探索植物中膜蛋白的胞吞转运途径。

3.1.5 CHX

Cycloheximide(CHX)是真核翻译延伸的抑制剂, 可抑制胞质核糖体的蛋白质合成, 在蛋白质合成的研究中起着至关重要的作用^[96]。因此, 在囊泡转运相关研究中, CHX常被用作蛋白合成抑制剂。本研究团队Su等人^[97]通过CHX结合BFA处理拟南芥幼苗, 证明BSK1只发生了部分的组成型胞吞作用以及存在其他形式的胞吞作用。此外, Liu等人^[98]发现, 亚细胞主要定位于细胞核的RH31(RNA helicase31)蛋白, 与胁迫颗粒(stress granules, SGs)的标记蛋白共定位, 且在盐胁迫下, 它能易位到细胞质中, 导致胁迫颗粒积累, 但CHX处理能够抑制RH31颗粒的形成, 证明RH31是植物SGs的组成部分。研究也发现, CHX还可以来测定蛋白质的半衰期。Guo等人^[99]对WT和fer突变体中MYC2蛋白的半衰期进行检测发现, CHX处理可以使fer突变体中蛋白质的半衰期比WT的多一倍左右, 表明FER磷酸化明显降低了MYC2蛋白水平。然而, CHX除了作为一种强

效的蛋白合成抑制剂外,也被证明存在有较强的植物毒性和抗真菌活性,在农业生产方面有助于开发杀菌剂和除草剂^[100]。因此,在植物蛋白质合成及囊泡转运研究中,若以合理的工作浓度使用也将成为一种广泛有用的工具。

3.1.6 TyrA23

Tyrphostin A23(TyrA23)是一种CME途径的特异性化学抑制剂,其作用机理是能够使细胞内酸化,抑制含有YxxØ结构域的细胞膜蛋白和接头蛋白的识别而发挥作用^[101]。Yu等人^[60]通过使用TyrA23处理FER-GFP拟南芥幼苗,发现FER-GFP的胞吞点数量显著降低。随后通过TyrA23和BFA共处理FER-GFP拟南芥幼苗,发现FER-GFP在细胞内形成的BFA小体显著减少,说明FER-GFP可以通过CME途径进行胞吞。尽管在囊泡转运的相关研究中,TyrA23已经成为一种公认且有效的CME抑制剂,但是有研究报道,TyrA23能够抑制flg22诱导的活性氧形成,表明TyrA23不仅影响CME,还影响细胞中其他生化过程^[102]。此外,Dejonghe等人^[103]在研究中指出,TyrA23对CME的特异性抑制是由于TyrA23使细胞酸化,同时又不能完全排除抑制作用是否取决于其对接头蛋白和货物蛋白结合的影响,因此植物中TyrA23抑制CME途径的具体作用机理有待进一步验证。

3.1.7 MβCD/MαCD

甲酰-β-环式糊精(methyl-β-cyclodextrin, MβCD)是一种固醇抽提剂,与磷脂和胆固醇有很强的相互作用但不具特异性,可以抽提细胞膜中的固醇类物质。与MβCD类似,MαCD(methyl-α-cyclodextrin)与细胞膜中的磷脂有特异性的相互作用,但无法结合胆固醇,常被用于哺乳动物细胞中外源性磷脂对细胞外叶的脂质替换^[104],目前在植物中应用较少。Thomas Ott研究团队^[105]证明,拟南芥在经MβCD处理后,膜筏标记蛋白Remorins会从膜筏微域分离,膜筏结构遭到破坏。本研究团队前期工作也发现,通过施加MβCD处理拟南芥幼苗,能够破坏细胞膜上的膜筏介导的胞吞^[106]。后期的研究发现,MβCD处理可以显著影响flg22激活的FLS2-GFP的胞吞作用,表明膜筏在flg22依赖的FLS2胞吞途径中至关重要^[115]。可见,在胞吞途径相关的研究中,MβCD确实可以作为研究CIE途径的一种有效化学抑制剂。但同时,在利用MβCD直接抽提胆固醇时,除了预期可破坏脂筏外,也可能影响到其他固醇类物质的功能,抑制效果不够特异。因此,由此所得到的数据尚需

其他方面的实验证据进行验证^[107]。

此外,除上述介绍的几种常用的植物囊泡循环相关药剂外,还包括像Endosidin(ESs)的系列药剂^[108,109]、Bafilomycin A(BafA)^[88]等。

3.2 研究植物囊泡转运的相关突变体

为更深入研究并解析植物膜蛋白通过囊泡转运相关的机制,除应用相关抑制剂处理之外,一些囊泡转运相关突变体也被广泛应用在研究中。本文对胞吐途径(表2)和胞吞途径(表3)中的相关突变体进行了总结。

近几年,研究者们对胞吐途径的囊泡转运进行了大量的研究,结果发现胞吐途径被破坏能够显著影响植物的生长发育。例如,瞿礼嘉研究团队^[110]对定位于MVBs及液泡膜上的VPS18(vacuolar protein sorting18)蛋白在花粉管生长过程中的调节作用进行了研究,结果发现VPS18突变的花粉管会在顶端区域产生过多的胞吐囊泡,并导致果胶和果胶甲酯酶的分泌过量,证明VPS18调节的囊泡转运对控制拟南芥花粉管生长过程中果胶及其修饰酶的正常分泌发挥着重要作用。Marković等人^[111]通过对比外囊复合亚基EXO70(exocyst component of 70 kDa)成员EXO70A1突变前后的表型,发现exo70a1突变体中,生长素运输载体PIN2蛋白在胞内囊泡中积累,该蛋白的胞吐途径受阻,表明EXO70A1在介导分泌囊泡与PM融合过程中发挥重要作用。

为了研究胞吞途径在植物生长发育中的重要作用,大量的突变体被发现,例如,Kitakura等人^[118]对chc1、chc2功能缺失突变体的表型进行研究,结果证明这些突变体呈现出异常的胚胎模式、不完整的子叶、向地生长和侧根器官发生受损等表型。这种表型的产生是由于CHC(clathrin heavy chains)功能的缺失,导致生长素转运蛋白PIN的CME途径发生缺陷后,生长素运输和分布不均匀。另有研究表明,通过对拟南芥的小Rab5 GTPases成员ARA7(RabF2b)蛋白的突变体植株进行分析发现,与野生型相比,ara7突变体中定位于MVBs的ARA7蛋白的表达量增加,导致ARA7对于蛋白胞吞作用的调节作用增强,使得植物体代谢加快从而获得更高层次的耐盐性^[119]。潘建伟研究团队^[120]对拟南芥中网格蛋白轻链蛋白(clathrin light chain, CLCs)调控CME、生长素信号转导和发育进行了研究,结果显示,与野生型相比,在网格蛋白轻链CLC2和CLC3功能缺失的纯合双突变体中,PM蛋白的胞吞转运明显减慢,生长素对PIN蛋白的胞吞作用抑制性减弱。此外,Yang

表 2 参与植物胞吐途径相关的突变体

Table 2 Mutants involved in the plant exocytic pathway

突变体名称	突变基因	SALK编号	表型
<i>vps18</i> ^[110]	<i>VPS18</i>	SALK_133060	雄性传粉受损、花粉管生长严重受损
<i>vps16</i> ^[110]	<i>VPS16</i>	SALK_048324	
<i>vps33</i> ^[110]	<i>VPS33</i>	SALK_143407	
<i>exo70a1-2</i> ^[111]	<i>EXO70A1</i>	SALK_135462	失去顶端优势、外观矮小、不育, 根细胞伸长减慢, 根毛生长受损
<i>ech</i> ^[112]	<i>ECH</i>	SAIL_163_E09	细胞伸长严重缺陷, 植株矮小以及TGN 结构和功能缺陷
<i>vamp721/vamp722</i> ^[25]	<i>VAMP721/VAMP722</i>		纯合双突致死, 杂合体根、下胚轴和子叶严重缺陷; 子叶数目异常
<i>syp121-1</i> ^[113]	<i>SYP121</i>		气孔开放和气孔蒸腾作用的增加延迟
<i>syp122</i> ^[113]	<i>SYP122</i>	SALK_021525	细胞壁受损
<i>syp123-1</i> ^[114]	<i>SYP123</i>	CS488587	根毛长度明显缩短
<i>rgtb1-1</i> ^[115]	<i>RGTB1</i>	SALK_015871	花粉管尖端生长缺陷, 根毛和花粉管变形 角果变小且很少含有种子
<i>sec1a</i> ^[116]	<i>SEC1A</i>		花粉萌发率降低, 花粉管变短变粗
<i>sec1a/keu</i> ^[117]	<i>SEC1A/KEU</i>		花粉完全不育
<i>sec15b</i> ^[117]	<i>SEC15B</i>		下胚轴和根毛伸长延迟、顶端优势丧失、植株矮化和种皮黏液形成减少

表 3 参与植物胞吞途径相关的突变体

Table 3 Mutants involved in the plant endocytosis pathway

突变体名称	突变基因	SALK编号	表型
<i>chc2-1</i> ^[118]	<i>CHC2</i>	SALK_028826	胚胎形态异常、子叶数目异常、重力响应异常 侧根数目减少
<i>chc2-2</i> ^[118]	<i>CHC2</i>	SALK_042321	
<i>chc1 chc2</i> ^[118]	<i>CHC1/CHC2</i>		纯合胚胎致死
<i>ara7</i> ^[119]	<i>RabF2b(ARA7)</i>		根和叶质量增加、耐盐性增强
<i>clc2-1</i> ^[120]	<i>CLC2</i>	SALK_028826	主根变短, 下胚轴变长
<i>clc3-1</i> ^[120]	<i>CLC3</i>	CS100219	
<i>clc2-1/clc3-1</i> ^[120]	<i>CLC2-1/CLC3-1</i>		主根更短, 下胚轴更长, 叶片向上卷曲, 叶柄变长
<i>tno1</i> ^[121]	<i>TNO1</i>	SALK_112503	液泡运输和TGN形态学缺陷; 对盐胁迫高度敏感
<i>vamp711-6</i> ^[122]	<i>VAMP711</i>		比野生型更耐碱性、对干旱胁迫敏感; 气孔闭合受损
<i>vamp711-7</i> ^[122]			
<i>ara6-1/rabF1-1</i> ^[123]	<i>ARA6(RabF1)</i>	SAIL_98_E08	叶片衰老加快
<i>ara6-2/rabF1-2</i> ^[123]		WiscDsLox481-484C9	
<i>vha-a1-1</i> ^[124]	<i>VHA-a1</i>		花粉发育缺陷无法产生种子

等人^[121]研究发现, TGN定位蛋白TNO1(TGN-localized SYP41-interacting protein)突变后, 植物对盐胁迫高度敏感, TGN结构被破坏, 高尔基池中的囊泡出芽减少, 胞吞到液泡的囊泡转运途径被破坏, 表明TNO1在囊泡转运过程中的作用至关重要。

4 展望

综上, 植物膜蛋白通过囊泡转运的途径可分为胞吞途径、胞吐途径、胞吞-胞吐耦联途径及自噬降解途径。其中网格蛋白介导的胞吞途径被证明是植物中最为广泛的胞吞途径, 与网格蛋白介导的胞吞途

径相比, 非网格蛋白介导的胞吞途径在植物中的研究相对较少。近几年越来越多关于植物囊泡转运的实验证据表明, 多种膜蛋白在植物中通过不同的囊泡转运途径参与调节植物的信号传递、抗病免疫和生长发育等生物学过程。为了阐明植物囊泡的转运过程及作用, 新技术新方法不断涌现, 为深入了解细胞和结构水平上囊泡转运的不同机制注入了动力, 对于我们理解植物在特定生理或环境条件下的调节机制也至关重要。

因此, 基于目前的研究状况, 未来以下3个方面可能对植物膜蛋白通过囊泡转运的途径具有重要意义: 第一, 植物中非网格蛋白介导的胞吞途径分类还有哪些? 各自的作用及调控机制是怎样的? 第二, 植物在感知外界环境刺激时, 通过协调胞吞-胞吐平衡, 以及协调自噬途径与内膜系统之间平衡的具体机制是怎样的? 第三, 无膜细胞器在囊泡转运中发挥怎样的作用? 这些科学问题的探究或将成为今后几年植物细胞囊泡转运相关研究领域的热点关注方向。

参考文献

- Xing J J, Liu H J, Fan L S, et al. Endocytic pathways in plant cells and related research techniques: A review (in Chinese). *J Chin Electron Microsc Soc*, 2014, 33: 449–460 [邢晶晶, 刘海娇, 范路生, 等. 植物细胞胞吞途径及其研究方法. *电子显微学报*, 2014, 33: 449–460]
- Cui Y N, Li X J, Yu M, et al. Sterols regulate endocytic pathways during flg22-induced defense responses in *Arabidopsis*. *Development*, 2018, 145: dev165688
- Sutter J U, Sieben C, Hartel A, et al. Abscissic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Curr Biol*, 2007, 17: 1396–1402
- Cui Y N, Zhao Y X, Lu Y Q, et al. *In vivo* single-particle tracking of the aquaporin AtPIP2;1 in stomata reveals cell type-specific dynamics. *Plant Physiol*, 2021, 185: 1666–1681
- Zhou X, Lu J, Zhang Y Q, et al. Membrane receptor-mediated mechano-transduction maintains cell integrity during pollen tube growth within the pistil. *Dev Cell*, 2021, 56: 1030–1042.e6
- Zheng Y Y, Xie Y R, Jiang Y X, et al. *Arabidopsis* actin-depolymerizing factor7 severs actin filaments and regulates actin cable turnover to promote normal pollen tube growth. *Plant Cell*, 2013, 25: 3405–3423
- Bibeau J P, Galotto G, Wu M, et al. Quantitative cell biology of tip growth in moss. *Plant Mol Biol*, 2021, 107: 227–244
- Ma L Y, Wang G C, Zhang X, et al. Quantification and distribution analysis of cotyledonal chloroplasts during seedling development in *Arabidopsis* (in Chinese). *J Chin Electron Microsc Soc*, 2021, 40: 9 [马灵玉, 王广超, 张曦, 等. 拟南芥子叶发育过程中叶绿体特征的量化及分布分析. *电子显微学报*, 2021, 40: 9]
- Zhang X, Man Y, Zhuang X H, et al. Plant multiscale networks: Charting plant connectivity by multi-level analysis and imaging techniques. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 31
- Shen W W, Ma L Y, Zhang X, et al. Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii* mast. pollen grains using automated electron microscopy. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 9
- Shen J B, Zeng Y L, Zhuang X H, et al. Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Mol Plant*, 2013, 6: 1419–1437
- Tse Y C, Mo B X, Hillmer S, et al. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells. *Plant Cell*, 2004, 16: 672–693
- Cui Y, Cao W H, He Y L, et al. A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in *Arabidopsis* root cells. *Nat Plants*, 2019, 5: 95–105
- Jiang D, He Y L, Zhou X G, et al. *Arabidopsis* HOPS subunit VPS41 carries out plant-specific roles in vacuolar transport and vegetative growth. *Plant Physiol*, 2022, 189: 1416–1434
- Baena G, Xia L F, Waghmare S, et al. SNARE SYP132 mediates divergent traffic of plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 and antimicrobial PR1 during bacterial pathogenesis. *Plant Physiol*, 2022, 189: 1639–1661
- Fan L S, Li R L, Pan J W, et al. Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 388–397
- Uemura T, Ueda T. Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 22: 116–121
- Rapoport T A, Li L, Park E. Structural and mechanistic insights into protein translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 369–390
- Voorhees R M, Hegde R S. Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 41: 91–99
- Pantazopoulou A, Glick B S. A kinetic view of membrane traffic pathways can transcend the classical view of Golgi compartments. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 153
- Papanikou E, Day K J, Austin I J, et al. COPI selectively drives maturation of the early Golgi. *eLife*, 2015, 4: e13232

- 22 Suda Y, Kurokawa K, Nakano A. Regulation of ER-Golgi transport dynamics by GTPases in budding yeast. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 122
- 23 Zeng Y L, Chung K P, Li B Y, et al. Unique COPII component AtSar1a/AtSec23a pair is required for the distinct function of protein ER export in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14360–14365
- 24 Qian B, Su X T, Ye Z Y, et al. MoErv29 promotes apoplasmic effector secretion contributing to virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *New Phytol*, 2022, 233: 1289–1302
- 25 Zhang L, Ma J W, Liu H, et al. SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 mediate the post-Golgi trafficking required for auxin-mediated development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2021, 108: 426–440
- 26 Zhang M, Liu L, Lin X B, et al. A translocation pathway for vesicle-mediated unconventional protein secretion. *Cell*, 2020, 181: 637–652.e15
- 27 Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, et al. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev*, 2009, 23: 2496–2506
- 28 Nielsen M E, Thordal-Christensen H. Transcytosis shuts the door for an unwanted guest. *Trends Plant Sci*, 2013, 18: 611–616
- 29 Nielsen M E, Feechan A, Böhlenius H, et al. *Arabidopsis* ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11443–11448
- 30 Ivanov S, Austin I J, Berg R H, et al. Extensive membrane systems at the host-arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nat Plants*, 2019, 5: 194–203
- 31 Roth R, Hillmer S, Funaya C, et al. Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules. *Nat Plants*, 2019, 5: 204–211
- 32 Wang H, Zhuang X H, Wang X F, et al. A distinct pathway for polar exocytosis in plant cell wall formation. *Plant Physiol*, 2016, 172: 1003–1018
- 33 Wang J, Ding Y, Wang J Q, et al. EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in *Arabidopsis* and tobacco cells. *Plant Cell*, 2010, 22: 4009–4030
- 34 Movahed N, Cabanillas D G, Wan J, et al. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves. *Plant Physiol*, 2019, 180: 1375–1388
- 35 Zhang H Y, Zhang L, Gao B, et al. Golgi apparatus-localized synaptotagmin 2 is required for unconventional secretion in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2011, 6: e26477
- 36 Rybak K, Robatzek S. Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence. *Plant Physiol*, 2019, 179: 1236–1247
- 37 Cai Q, Qiao L L, Wang M, et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 2018, 360: 1126–1129
- 38 De Caroli M, Manno E, Piro G, et al. Ride to cell wall: *Arabidopsis* XTH11, XTH29 and XTH33 exhibit different secretion pathways and responses to heat and drought stress. *Plant J*, 2021, 107: 448–466
- 39 Thottacherry J J, Sathe M, Prabhakara C, et al. Spoiled for choice: Diverse endocytic pathways function at the cell surface. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, 35: 55–84
- 40 Estadella I, Pedrós-Gómez O, Colomer-Molera M, et al. Endocytosis: A turnover mechanism controlling ion channel function. *Cells*, 2020, 9: 1833
- 41 Renard H F, Boucrot E. Unconventional endocytic mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 2021, 71: 120–129
- 42 Barbieri E, Di Fiore P P, Sigismund S. Endocytic control of signaling at the plasma membrane. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 39: 21–27
- 43 Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 313–326
- 44 Gadeyne A, Sánchez-Rodríguez C, Vanneste S, et al. The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell*, 2014, 156: 691–704
- 45 Wang J, Mylly E, Johnson A, et al. High temporal resolution reveals simultaneous plasma membrane recruitment of TPLATE complex subunits. *Plant Physiol*, 2020, 183: 986–997
- 46 Narasimhan M, Johnson A, Prizak R, et al. Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants. *eLife*, 2020, 9: e52067
- 47 Johnson A, Dahhan D A, Gnyliukh N, et al. The TPLATE complex mediates membrane bending during plant clathrin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2113046118
- 48 Wang L H, Cheng M Z, Yang Q, et al. Arabinogalactan protein-rare earth element complexes activate plant endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 14349–14357
- 49 Yu Q Q, Zhang Y, Wang J, et al. Clathrin-mediated auxin efflux and maxima regulate hypocotyl hook formation and light-stimulated hook opening in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2016, 9: 101–112
- 50 Wang S, Yoshinari A, Shimada T, et al. Polar localization of the NIP5;1 boron channel is maintained by endocytosis and facilitates boron transport in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 2017, 29: 824–842
- 51 Galvan-Ampudia C S, Julkowska M M, Darwish E, et al. Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr Biol*, 2013,

- 23: 2044–2050
- 52 Ke M Y, Ma Z M, Wang D Y, et al. Salicylic acid regulates *PIN2* auxin transporter hyperclustering and root gravitropic growth via *Remorin*-dependent lipid nanodomain organisation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 2021, 229: 963–978
 - 53 Johannes L, Wunder C, Bassereau P. Bending “on the rocks”—A cocktail of biophysical modules to build endocytic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a16741
 - 54 Thomas O. Membrane nanodomains and microdomains in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 40: 82–88
 - 55 Li R L, Liu P, Wan Y L, et al. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell*, 2012, 24: 2105–2122
 - 56 Li X, Wang X, Yang Y, et al. Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell*, 2011, 23: 3780–3797
 - 57 Hao H Q, Fan L S, Chen T, et al. Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 1729–1745
 - 58 Lü X Q, Jing Y P, Xiao J W, et al. Membrane microdomains and the cytoskeleton constrain AtHIR1 dynamics and facilitate the formation of an AtHIR1-associated immune complex. *Plant J*, 2017, 90: 3–16
 - 59 Wang L, Li H, Lü X Q, et al. Spatiotemporal dynamics of the BRI1 receptor and its regulation by membrane microdomains in living *Arabidopsis* cells. *Mol Plant*, 2015, 8: 1334–1349
 - 60 Yu M, Li R L, Cui Y N, et al. The RALF1-FERONIA interaction modulates endocytosis to mediate control of root growth in *Arabidopsis*. *Development*, 2020, 147: dev189902
 - 61 Cui Y N, Zhang X, Yu M, et al. Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: Principles, limitations, and recent progress. *Sci China Life Sci*, 2019, 14: 62
 - 62 Baral A, Irani N G, Fujimoto M, et al. Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root. *Plant Cell*, 2015, 27: 1297–1315
 - 63 Liang K, Wei L S, Chen L Y. Exocytosis, endocytosis, and their coupling in excitable cells. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 3389
 - 64 Kanazawa T, Ueda T. Exocytic trafficking pathways in plants: Why and how they are redirected. *New Phytol*, 2017, 215: 952–957
 - 65 Zhang L, Xing J J, Lin J X. At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol*, 2019, 224: 1479–1489
 - 66 Xing J J, Zhang L, Duan Z K, et al. Coordination of phospholipid-based signaling and membrane trafficking in plant immunity. *Trends Plant Sci*, 2021, 26: 407–420
 - 67 Grebnev G, Ntefidou M, Kost B. Secretion and endocytosis in pollen tubes: Models of tip growth in the spot light. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 154
 - 68 Zhao L F, Rehmani M S, Wang H. Exocytosis and endocytosis: Yin-yang crosstalk for sculpting a dynamic growing pollen tube tip. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 572848
 - 69 Zhang X, Cui Y N, Yu M, et al. Single-molecule techniques for imaging exo-endocytosis coupling in cells. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 879–880
 - 70 Li Y B, Qi Q, Zheng X H, et al. Progress on plant endomembrane trafficking regulatory mechanism in plant cells and related advanced electron microscopy application (in Chinese). *J Xiamen Univ (Nat Sci)*, 2022, 61: 446–458 [李彦斌, 齐青, 郑晓慧, 等. 植物细胞内膜运输调控机制及相关前沿电子显微镜技术应用的研究进展. 厦门大学学报(自然科学版), 2022, 61: 446–458]
 - 71 Yang M, Liu Y L. Autophagy in plant viral infection. *FEBS Lett*, 2022, 596: 1873–3468
 - 72 Zeng Y L, Li B Y, Ji C Y, et al. A unique AtSar1D-AtRabD2a nexus modulates autophagosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2021293118
 - 73 Liu X H, Xu F, Snyder J H, et al. Autophagy in plant pathogenic fungi. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 57: 128–137
 - 74 Zeng Y L, Li B Y, Lin Y S, et al. The interplay between endomembranes and autophagy in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2019, 52: 14–22
 - 75 Zhuang X H, Chung K P, Luo M Q, et al. Autophagosome biogenesis and the endoplasmic reticulum: A plant perspective. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 677–692
 - 76 Wang J, Davis S, Zhu M, et al. Autophagosome formation: Where the secretory and autophagy pathways meet. *Autophagy*, 2017, 13: 973–974
 - 77 Zeng Y L, Jiang L W. A unique COPII population in plant autophagy. *Autophagy*, 2021, 17: 1785–1787
 - 78 Gao C J, Zhuang X H, Shen J B, et al. Plant ESCRT complexes: Moving beyond endosomal sorting. *Trends Plant Sci*, 2017, 22: 986–998
 - 79 Gao C J, Luo M, Zhao Q, et al. A unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Curr Biol*, 2014, 24: 2556–2563
 - 80 Shen J B, Gao C J, Zhao Q, et al. AtBRO1 functions in ESCRT-I complex to regulate multivesicular body protein sorting. *Mol Plant*, 2016, 9: 760–763
 - 81 Minina E A, Moschou P N, Vetukuri R R, et al. Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *J Exp Bot*, 2018, 69: 1415–1432
 - 82 Robinson D G, Langhans M, Saint-Jore-Dupas C, et al. BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci*, 2008, 13: 405–408

- 83 Foissner I, Hoefftberger M, Hoepflinger M C, et al. Brefeldin A inhibits clathrin-dependent endocytosis and ion transport in *Chara* internodal cells. [Biol Cell](#), 2020, 112: 317–334
- 84 Xing J J, Li X J, Wang X H, et al. Secretion of phospholipase D δ functions as a regulatory mechanism in plant innate immunity. [Plant Cell](#), 2019, 31: 3015–3032
- 85 Cai Y, Jia T R, Lam S K, et al. Multiple cytosolic and transmembrane determinants are required for the trafficking of SCAMP1 via an ER-Golgi-TGN-PM pathway. [Plant J](#), 2011, 65: 882–896
- 86 Yu J F, Zhou J. Vacuolar accumulation and colocalization is not a proper criterion for cytoplasmic soluble proteins undergoing selective autophagy. [Plant Signal Behav](#), 2021, 16: 1932319
- 87 Zhou A M, Bu Y Y, Takano T, et al. Conserved V-ATPase c subunit plays a role in plant growth by influencing V-ATPase-dependent endosomal trafficking. [Plant Biotechnol J](#), 2016, 14: 271–283
- 88 Zhang X, Cui Y N, Yu M, et al. Phosphorylation-mediated dynamics of nitrate transceptor NRT1.1 regulate auxin flux and nitrate signaling in lateral root growth. [Plant Physiol](#), 2019, 181: 480–498
- 89 Teper-Bamnolker P, Danieli R, Peled-Zehavi H, et al. Vacuolar processing enzyme translocates to the vacuole through the autophagy pathway to induce programmed cell death. [Autophagy](#), 2021, 17: 3109–3123
- 90 Foissner I, Sommer A, Hoefftberger M, et al. Is wortmannin-induced reorganization of the *trans*-Golgi network the key to explain charasome formation? [Front Plant Sci](#), 2016, 7: 756
- 91 Scali M, Moscatelli A, Bini L, et al. Protein analysis of pollen tubes after the treatments of membrane trafficking inhibitors gains insights on molecular mechanism underlying pollen tube polar growth. [Protein J](#), 2021, 40: 205–222
- 92 De Caroli M, Manno E, Perrotta C, et al. CesA6 and PGIP2 endocytosis involves different subpopulations of TGN-related endosomes. [Front Plant Sci](#), 2020, 11: 350
- 93 Minamide A, Onizawa M, Saito C, et al. A potent endocytosis inhibitor ikarugamycin up-regulates TNF production. [Biochem Biophys Rep](#), 2021, 27: 101065
- 94 Elkin S R, Oswald N W, Reed D K, et al. Ikarugamycin: A natural product inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. [Traffic](#), 2016, 17: 1139–1149
- 95 Moscatelli A, Ciampolini F, Rodighiero S, et al. Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. [J Cell Sci](#), 2007, 120: 3804–3819
- 96 Park Y, Koga Y, Su C, et al. Versatile synthetic route to cycloheximide and analogues that potently inhibit translation elongation. [Angew Chem Int Ed](#), 2019, 58: 5387–5391
- 97 Su B D, Zhang X, Li L, et al. Dynamic spatial reorganization of BSK1 complexes in the plasma membrane underpins signal-specific activation for growth and immunity. [Mol Plant](#), 2021, 14: 588–603
- 98 Liu Y N, Liu S J, Shi H Y, et al. The TSN1 binding protein RH31 is a component of stress granules and participates in regulation of salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. [Front Plant Sci](#), 2021, 12: 804356
- 99 Guo H Q, Yin Y H. Measuring protein half-life in *Arabidopsis thaliana*. [Bio Protoc](#), 2019, 9: e3318
- 100 Hang T, Kim J D, Raj V, et al. Deciphering the relationship between cycloheximides structures and their different biological activities. [Front Micro](#), 2021, 12: 644853
- 101 Banbury D N, Oakley J D, Sessions R B, et al. Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. [J Biol Chem](#), 2003, 278: 12022–12028
- 102 Smith J M, Salamango D J, Leslie M E, et al. Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand-induced degradation and *de novo* synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLAGELLIN-SENSING2. [Plant Physiol](#), 2013, 164: 440–454
- 103 Dejonghe W, Kuenen S, Mylle E, et al. Mitochondrial uncouplers inhibit clathrin-mediated endocytosis largely through cytoplasmic acidification. [Nat Commun](#), 2016, 7: 11710
- 104 Li G, Kim J H, Huang Z, et al. Efficient replacement of plasma membrane outer leaflet phospholipids and sphingolipids in cells with exogenous lipids. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113: 14025–14030
- 105 Konrad S S A, Popp C, Stratil T F, et al. S-acylation anchors remorin proteins to the plasma membrane but does not primarily determine their localization in membrane microdomains. [New Phytol](#), 2014, 203: 758–769
- 106 Wang L, Lü X Q, Li X J, et al. Dynamics and endocytosis of important membrane proteins in plants (in Chinese). [Chin Sci Bull](#), 2014, 59: 3035–3042 [王莉, 吕雪芹, 李晓娟, 等. 植物重要膜蛋白的扩散与胞吞机制. 科学通报, 2014, 59: 3035–3042]
- 107 Yu M, Cui Y N, Zhang X, et al. Organization and dynamics of functional plant membrane microdomains. [Cell Mol Life Sci](#), 2020, 77: 275–287
- 108 Zhang C H, Brown M Q, van de Ven W, et al. Endosidin2 targets conserved exocyst complex subunit EXO70 to inhibit exocytosis. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113: E41–50
- 109 Li R X, Rodriguez-Furlan C, Wang J Q, et al. Different endomembrane trafficking pathways establish apical and basal polarities. [Plant Cell](#), 2017,

29: 90–108

- 110 Hou S Y, Shi J, Hao L H, et al. VPS18-regulated vesicle trafficking controls the secretion of pectin and its modifying enzyme during pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2021, 33: 3042–3056
- 111 Marković V, Kulich I, Žárský V. Functional specialization within the *EXO70* gene family in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 7595
- 112 Gendre D, Oh J, Boutté Y, et al. Conserved *Arabidopsis* ECHIDNA protein mediates *trans*-Golgi-network trafficking and cell elongation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 8048–8053
- 113 Larson E R, Van Zelm E, Roux C, et al. Clathrin heavy chain subunits coordinate endo- and exocytic traffic and affect stomatal movement. *Plant Physiol*, 2017, 175: 708–720
- 114 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
- 115 Gutkowska M, Wnuk M, Nowakowska J, et al. Rab geranylgeranyl transferase β subunit is essential for male fertility and tip growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2015, 66: 213–224
- 116 Beuder S, Lara-Mondragón C, Dorchak A, et al. *SEC1A* is a major *Arabidopsis* Sec1/Munc18 gene in vesicle trafficking during pollen tube tip growth. *Plant J*, 2022, 110: 1353–1369
- 117 Batystová K, Synek L, Klejchová M, et al. Diversification of SEC15a and SEC15b isoforms of an exocyst subunit in seed plants is manifested in their specific roles in *Arabidopsis sporophyte* and male gametophyte. *Plant J*, 2022, 110: 1382–1396
- 118 Kitakura S, Vanneste S, Robert S, et al. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 1920–1931
- 119 Sergienko O V, Khalilova L A, Orlova Y V, et al. Mutation of the *ARA7/AiRabF2b* gene, that increases the content of the Ara7 protein regulating endocytic trafficking pathways, improves salt tolerance of the *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh plants. *Russ J Plant Physiol*, 2022, 69: 11
- 120 Wang C, Yan X, Chen Q, et al. Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 499–516
- 121 Yang X C, Liao C Y, Tang J, et al. Overexpression of *trans*-Golgi network t-SNAREs rescues vacuolar trafficking and TGN morphology defects in a putative tethering factor mutant. *Plant J*, 2019, 99: 703–716
- 122 Xue Y, Zhao S S, Yang Z J, et al. Regulation of plasma membrane H^+ -ATPase activity by the members of the V-SNARE VAMP7C family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, 2019, 14: e1573097
- 123 Yin C F, Karim S, Zhang H S, et al. *Arabidopsis* RabF1 (ARA6) is involved in salt stress and dark-induced senescence (DIS). *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 309
- 124 Lupanga U, Röhrich R, Askani J, et al. The *Arabidopsis* V-ATPase is localized to the TGN/EE via a seed plant-specific motif. *eLife*, 2020, 9: 60568

Summary for “植物膜蛋白的囊泡转运及调控机制的研究进展”

Advances in vesicle trafficking of membrane proteins and their regulatory mechanisms

Changwen Xu^{1,2}, Hongping Qian^{1,2}, Pengyun Luo^{1,2}, Meng Yu³, Jingjing Xing⁴, Liang Zhang⁵, Xi Zhang^{1,2}, Yaning Cui^{1,2*} & Jinxing Lin^{1,2*}¹ Forest Tree Breeding and Ecological Restoration, National Engineering Research Center, Beijing 100083, China;² College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;³ College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;⁴ School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 457001, China;⁵ College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China* Corresponding authors, E-mail: cuiyaning@bjfu.edu.cn; linjx@ibcas.ac.cn

Membrane proteins are essential components of cell membrane structures and can be transported through vesicles as signaling molecules. The vesicle trafficking of membrane proteins is crucial for maintaining biological processes such as plant growth and development, substance exchange, cell recognition, immune response, and signal transduction. Both vesicle exocytosis and endocytosis play integral roles in regulating the activities and turnover of plasma membrane proteins required for signal triggering or attenuation at the cell surface. Exocytosis involves the transport of newly synthesized or recycled material to the plasma membrane (PM) in vesicles where they are released into the extracellular space. Recent investigations have shown that changing the balance between conventional and unconventional protein secretion can be an efficient strategy to respond to stressful conditions in eukaryotes. With the aid of an N-terminal located signal peptide (SP), conventional protein secretion delivers newly synthesized proteins from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus and the *trans*-Golgi network (TGN) and finally to the PM or extracellular space via secretory vesicles or secretory granules. Unconventional protein secretion is responsible for the secretion of such SP-lacking protein. Notably, several unconventional protein secretion pathways mediated by distinct mechanisms have been reported in plants, most of which are related to stress responses. Conversely to exocytosis, endocytosis is the process by which material associated with the cellular surface is uptaken by invagination of the plasma membrane and internalized as an endocytic vesicle. In recent years, substantial progress has been made in the characterization of the plant components involved in clathrin-mediated and membrane microdomain-associated endocytic pathways. Moreover, the coordination of exocytic and endocytic trafficking has been shown to be important for various plant cell functions. An increasing pool of evidence has indicated that multiple cellular processes require tightly regulated exocytosis-endocytosis coupling, including nutrient uptake, signaling transduction, and plant-microbe interactions. However, compared to animal systems in which multiple mechanisms have been described, the functions and regulation of coupled trafficking processes in plants remain poorly understood. All proteins in the cells of an organism and most extracellular proteins are continually being degraded and replaced. The autophagy pathway is a conserved protein auto degradation pathway that delivers dysfunctional organelles or other cytoplasmic components to vacuoles for degradation and recycling in plants. In addition, autophagy is reported to be involved in plant development as part of processes such as root tip cell growth and differentiation. Recent observations have revealed possible interplay between vesicle trafficking and autophagic pathways in regulating vacuolar degradation in plants.

In recent years, with constant advances in super-resolution microscopy and labeling methods, much progress has been made in mechanistic studies of membrane protein transportation, and a diversity of exocytic and endocytic trafficking pathways have been uncovered in plants. Although a variety of methods and techniques have been used to study plant vesicle trafficking, a systematic summary of vesicle trafficking pathways of plant membrane proteins has not been published. This review first introduces the relevant organelles involved in membrane protein vesicle trafficking, and then summarizes the different plant vesicle trafficking pathways for membrane proteins. Based on the review, we systematically consolidated the chemical treatments and mutants used in the study of plant vesicle trafficking. Finally, future directions for research in vesicle trafficking pathways of plant membrane proteins are discussed. With recent advancements, we expect major breakthroughs in our understanding of the regulatory mechanisms that determine the perception and adaptability of plants to their environments in the coming years.

membrane protein, vesicle trafficking, endocytosis or exocytosis pathway, exocytosis-endocytosis coupling, autophagy pathway

doi: [10.1360/TB-2022-0968](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0968)