

植物细胞内膜运输对植物发育的调控机制

庞磊 朱颖 金中财 夏曦华 李瑞熙

(南方科技大学生物系 植物与食品研究所, 深圳 518055)

摘要: 植物细胞内膜体系与别的真核生物体系相似, 由一系列连续的内膜结构组成, 包括核膜、内质网、高尔基体、反式高尔基体、液泡、转运囊泡和细胞膜。其中, 反式高尔基体和液泡具有植物细胞特有的结构特征和对应功能。从几个方面综述植物细胞内膜运输对植物发育的调控作用, 包括内膜运输与生长素极性运输和稳态平衡之间的关系, 内膜运输对根毛极性生长的作用机理, 以及液泡运输在花粉管极性生长和种子萌发过程中的重要作用。旨在对致力于植物细胞内膜运输与发育调控的研究人员提供参考。

关键词: 内膜运输; 极性运输; 稳态平衡; 尖端极性生长; 种子萌发

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0360

Mechanism of Plant Development Regulation by Endomembrane Trafficking

PANG Lei ZHU Ying JIN Zhong-cai XIA Xi-hua LI Rui-xi

(SUSTech-PKU Institute of Plant and Food, Department of Biology, Shenzhen 518055)

Abstract: Similar to other eukaryotic system, plant endomembrane system is a functionally inter-related membrane system including the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus, the trans-Golgi network (TGN), vacuoles, endosomes, plasma membrane (PM) and vesicles. It also displays some highly complex and unique characteristics, such as the unique feature of plant TGN and vacuole. This review mainly summarizes the regulatory mechanisms of plant endomembrane trafficking in plant development. We focus on the recent progresses about how endomembrane system regulate auxin polar transport and homeostasis, mechanism of root hair tip growth as well as the vacuole transport in the regulation of pollen tube tip growth and seed germination. We hope this review could be helpful to the researchers who study the process of plant growth, development and endomembrane trafficking.

Key words: plant endomembrane trafficking; polar transport; homeostasis; tip growth; seed germination

真核细胞的内膜系统由一系列连续的内膜结构组成, 包括核膜、内质网、高尔基体、液泡/溶酶体、转运囊泡和细胞膜。不同内膜结构之间存在网络式的内膜运输, 这对细胞内蛋白质和酯类的运输和交换起着至关重要的作用。植物细胞内膜体系与别的真核生物体系相似, 但也有植物细胞特有的结构和运输方式^[1]。其中最典型的结构是位于高尔基体反式表面上由一系列互相连接且具有动态性的细

管和囊泡组成的反式高尔基体 (Trans-Golgi network, TGN)。反式高尔基体作为植物细胞内的分选中心, 引导蛋白转运至不同内膜细胞器及分泌到胞外空间。最近研究表明, 反式高尔基体也可作为植物细胞的早期内吞体 (Early endosome, EE), 接受来自于细胞膜内吞形成的囊泡。利用超高分辨率显微镜技术, 研究者观察到植物细胞反式高尔基体可以分为两种类型: 一种是高尔基体连接的反式高尔基体

收稿日期: 2018-06-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31770306), 广东省“珠江人才”引进创新创业团队 (2016ZT06S172)

作者简介: 庞磊, 博士, 高级研究学者, 研究方向: 植物小 G 蛋白介导的内膜运输; E-mail: pangl@sustc.edu.cn

通讯作者: 李瑞熙, 博士, 助理教授, 研究方向: 植物细胞内膜运输机制; E-mail: lirx@sustc.edu.cn

(Golgi-associated TGN), 位于高尔基体反式一侧; 另一种是不依附高尔基体的相对独立的反式高尔基体 (Golgi-released independent TGN) [2-3]。

另一个植物细胞特有的细胞器是液泡。植物液泡作为成熟细胞中最大的细胞器是植物体内维持细胞膨压和促进细胞体积扩张的主要细胞器, 也是次生代谢物储存、蛋白质和细胞器降解、氨基酸循环利用、毒害物质去除和病虫害抵御的重要场所。液泡运输根据膜来源和途经细胞器差异可以大致分为两大类途径。一类是不依赖高尔基体直接从内质网向液泡运输的途径, 包括玉米糊粉层蛋白和南瓜子叶储藏蛋白等。这一途径是植物特有的液泡运输途径, 对种子萌发, 单子叶植物胚乳形成以及次生代谢物和激素储藏具有重要作用 [4-8]。另一大类是经过高尔基体的运输途径, 又可细分为三种相对独立的液泡运输途径, 包括由 AP3 复合体介导的直接从高尔基体向液泡运输的途径 [9-10]、受小 G 蛋白 Rab5 GTPase 直接调控的液泡运输途径, 以及依赖于 Rab5 向 Rab7 GTPase 转化的液泡运输途径等 [11-14]。

植物细胞内膜结构的特异性不仅介导了一系列植物特有的内膜运输方式, 也对植物发育起着重要作用。本文将从几个方面综述植物细胞内膜运输对发育的调控作用, 包括内膜运输与生长素极性运输和稳态平衡之间的关系, 内膜运输对根毛极性生长的作用机理, 以及液泡运输在花粉管极性生长和种子萌发过程中的重要作用。

1 植物细胞内膜运输对长素极性运输的调控机制

生长素主要以离子态 (IAA^-) 的形式存在于植物体内, 在不同细胞和组织间的移动需依赖质膜 (Plasma membrane, PM) 上的运输载体蛋白 [15]。在已被证实具有生长素运输功能的载体蛋白中, PIN-FORMED (PIN) 蛋白的研究最为深入。PIN 蛋白家族在拟南芥中有 8 个成员, 分别命名为 PIN1-PIN8。PIN 蛋白均为膜蛋白, 具有两个疏水跨膜区和中央胞内亲水环。根据亲水环长度, 将 PIN 蛋白分成两个亚家族: 具有长亲水环的 PIN1、PIN2、PIN3、PIN4 和 PIN7, 定位在细胞膜上呈不对称极性分布, 负责向细胞外运输生长素; 具有较短亲水结构域的

PIN5、PIN6 和 PIN8, 定位于内质网上, 介导内质网和细胞质间的生长素平衡 [16-17]。在很多组织中, PIN 蛋白具有极性定位的特征并且介导了生长素的极性运输。例如, 在植物根尖中柱细胞表达的 PIN1 蛋白和内皮层表达的 PIN2 蛋白为基底极性 (basal polarity) 定位, 而位于茎尖分生组织的 PIN1 蛋白和根尖表皮细胞的 PIN2 蛋白为顶端极性 (apical polarity) 分布, 分别介导生长素向根尖和向茎尖方向极性运输 [18]。因此, PIN 蛋白极性缺失会阻碍生长素的极性运输, 进而导致胚胎发育出现缺陷、细胞极性及植株形态建成异常 [19]。

在亚细胞水平上, PIN 蛋白均只在质膜上被检测到, 但事实上, PIN 蛋白的质膜极性受内膜系统中的多条囊泡运输 (Vesicular trafficking) 途径共同协调控制 [20]。质膜蛋白在内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 被合成后, 通常依靠囊泡运输参与的胞外分泌途径, 经由高尔基体 (Golgi) 或反式高尔基体 / 早期内涵体 (Trans-Golgi networks/early endosomes, TGN/EE) 分选后出芽形成包被小泡 (Coated vesicle), 在小 G 蛋白的介导下被运输到质膜上 [21]。后期的胞吞 (Endocytosis) 将质膜蛋白运输到 TGN/EE, 其中一部分通过再循环 (Recycling) 从 TGN/EE 被运回到质膜上; 另一部分则随囊泡成熟和融合过程进入晚期内吞体 / 液泡前体 (Late endosome/pre-vacuolar compartment, LE/PVC) 到达液泡被降解。因此, 植物细胞能够根据外环境通过胞吞和再循环途径精准调节膜蛋白在质膜上的丰度。

胞吞过程在真核生物中具有高度的保守型, 在动物细胞中, Rab5 GTPase 是调控胞吞作用的关键因子 [22]。在拟南芥中, ARA7 是 Rab5 GTPase 的同源蛋白。PIN 蛋白在 ARA7/Rab5 GTPase 的 GEF 因子 VPS9A 功能缺失突变体或持续表达组成型失活状态 (Dominantly negative, DN) 下的 ARA7 (DN-ARA7) 的背景下失去质膜上的极性分布, 并且胚胎出现严重的发育缺陷 [23], 说明胞吞作用参与 PIN 蛋白质膜极性定位的调控机制。PIN 蛋白与接头蛋白 (Adaptor proteins) AP2 复合体在质膜上结合后能够招募网格蛋白 (Clathrin), 形成包被小泡启动 PIN 蛋白的胞吞过程 [24], 而 AP2 复合体亚基和构成网格蛋白的轻链或重链基因的功能缺失均导致 PIN 蛋白完全失

去基底或顶端极性定位^[24-26]，进一步说明胞吞在调控 PIN 蛋白质膜极性定位途径中的重要功能。此外，GFP 与网格蛋白 CLC 融合表达显示 GFP 信号强度在侧面质膜上明显高于基底和顶端质膜，而化学抑制剂 Tyrphostin A23 处理后，PIN2 蛋白在侧面与顶端质膜上的信号比值明显增加^[27]，表明侧面质膜上网格蛋白介导的胞吞对 PIN 蛋白基底和顶端的极性定位具有决定性作用。

另一方面，为了维持 PIN 蛋白在质膜上的丰度，植物细胞内的小 G 蛋白介导的囊泡运输能够将部分 PIN 蛋白从 TGN/EE 通过再循环途径运输到质膜上。真菌霉素 Brefidin A (BFA) 能够阻碍从 TGN/EE 到质膜上的囊泡运输途径。BFA 处理能够引起 PIN1 蛋白质在细胞质中的聚集形成所谓的“BFA 聚合物”，导致 PIN1 蛋白失去基底极性分布；而 BFA 被洗脱后，抑制效应被解除，PIN1 蛋白恢复其在基底质膜上极性分布^[28]。ADP 核糖基化鸟苷酸交换因子 (ADP-ribosylation factor guanine-nucleotide exchange factors, ARF-GEFs) GNOM 作为 ARF1 GTPase 的 GEF 因子，能够激活 ARF1 GTPase 酶的活性，介导 PIN1 蛋白的向底性再循环途径，而 PIN1 蛋白在 GNOM 功能缺失突变体的背景下完全失去极性分布^[29]。因此，PIN1 蛋白的向底性再循环途径受 ARF-GEF GNOM 所调控，且 BFA 能够抑制该途径。与之相反，BFA 处理对 PIN2 蛋白的顶端极性分布影响不大^[30]，表明植物细胞内存在着不同的内膜运输途径分别介导 PIN 蛋白的向底性和向顶性运输。最近研究表明，小分子化合物 - Endosidin16 (ES16) 能够特异性诱导顶端极性定位的 PIN2 蛋白形成类似于“BFA 聚合物”的胞内聚合物并改变其顶端极性分布，但却不影响胞吞过程和 PIN1 的向底性循环^[31]。药物亲和反应靶点稳定性 (Drug affinity responsive target stability, DARTS) 分析进一步发现 ES16 不直接作用于鸟苷酸交换因子 ARF-GEF 家族蛋白，包括 GBF 亚支和 BIG 亚支蛋白，但能特异性抑制一类小型 GTP 酶 - RabA GTPases，并能特异性靶定于 RabA2A GTPase^[31]。PIN2 蛋白在组成型失活状态的 RabA2A (DN-RabA2A) 的背景下也在细胞内形成类似于 ES16 处理后的胞内聚合物，并且其顶端极性分布发生改变^[31]，表明 RabA2A GTPase

很可能参与了 PIN2 蛋白向顶性循环的调控途径。除此之外，介导囊泡与质膜栓系的 Exocyst 复合体亚基功能缺失也会导致 PIN 蛋白基底和顶端极性定位发生缺陷^[32-33]。以上结果表明 PIN 蛋白的极性定位由内膜运输中的持续性胞吞和再循环途径共同调控来实现的，且 PIN 蛋白的基底和顶端极性定位由不同的内膜运输途径所调控。

2 植物细胞内膜运输对生长素稳态平衡的调控作用

Mravec 等^[17]在 2009 年首次报道了定位于内质网的 PIN5 参与调节细胞内生长素的平衡。该文首先证明了 PIN5 与经典的 PIN 一样具有运输生长素的能力。之后的亚细胞定位分析表明 PIN5 并不像经典的长 PIN 定位于质膜，而是定位于内质网。通过对拟南芥 PIN 家族 8 个成员进行氨基酸序列比对，作者发现 PIN 蛋白中存在一个推测的含酪氨酸的基序 (NPNTY)。质膜定位的 PIN 蛋白在推测的酪氨酸基序附近含有一段高度保守的序列 (MVWRKL)，而这段序列在 PIN5 亚类的蛋白中并不是高度保守。作者将 PIN1 的含酪氨酸基序突变为 NSLSL，失去酪氨酸基序的 PIN1 定位于内质网。但这一结果并不能很好的解释两个亚类的 PIN 蛋白存在不同亚细胞定位的原因^[17]。Ganguly 等^[34]关注于两个亚类的 PIN 蛋白存在最大差异的亲水性环，研究了亲水性环对 PIN 蛋白亚细胞定位的作用。作者选取了两个具有代表性的 PIN 蛋白 PIN2 和 PIN5，将 PIN2 的长亲水性环导入 PIN5 短亲水性环的区域，并用 PIN5 自身启动子驱动，改造后的 PIN5 和 PIN2 一样定位于质膜，并且和其他质膜定位的 PIN 蛋白类似，在 BFA 处理后能形成 BFA 小体，而正常的 PIN5 则不能形成。说明 PIN2 的长亲水性环确实能介导非质膜定位的 PIN5 向质膜运输，但并不足以令 PIN5 像 PIN2 一样在细胞内存在极性定位。

短 PIN 家族的另一个成员 PIN8 特异性定位于花粉中，与 PIN5 一样定位于内质网，参与调节细胞内生长素的平衡，对花粉的发育和花粉管的生长至关重要^[35-36]。Dal Bosco 等^[37]通过构建 PIN8 过表达的转基因拟南芥及异源表达 PIN8 的转基因烟草分析了 PIN8 在调控细胞内生长素稳态方面的作

用。PIN8 的异位表达造成了强烈的生长素相关的表型,表型的严重程度依赖于 PIN8 的蛋白水平,并且与自由态生长素和束缚态生长素的上升水平呈正相关。当用 NAA 处理 PIN8 过表达的幼苗时,生长素响应基因被强烈的抑制。这些结果表明内质网定位的 PIN8 在控制生长素阈值,调控生长素相关的转录方面有重要作用^[38]。Ding 等^[36]也做了类似关于 PIN8 的研究,并且揭示了 PIN8 和 PIN5 在调节细胞内生长素平衡方面起着拮抗作用。*pin5* 突变体表现出与 *pin8* 突变体同样比例的形态缺陷型花粉粒,但 *pin5pin8* 双重突变体可以恢复花粉形态缺陷的表型。Dal Bosco 等^[37]随后对这一结果提出了疑问。PIN5 广泛表达于各组织中,在花粉中并没有很高的表达,相反 PIN8 只在花粉中表达。那么在花粉的发育过程中,缺少 PIN5 如何能恢复花粉特异性的表型?结合 *pin5*、*pin8* 单突变体、*pin5pin8* 双突变体,以及 PIN5 和 PIN8 单过表达和双过表达株系的分析。Ding 等^[36]认为 PIN5 和 PIN8 在功能上相互拮抗可能是通过两种方式。PIN5 调节生长素从细胞质运输到内质网腔, PIN8 可能作为一个活性的生长素运输载体介导生长素从内质网腔流向细胞质,也可能通过负调控 PIN5 的活性而起到拮抗作用。

PIN6 是 PIN 蛋白家族中一个较特殊的成员,在结构上它更接近经典的长 PIN 蛋白^[39],具有长亲水性环。在进化上则与短 PIN 蛋白亚类 (PIN5 和 PIN8) 距离更近^[17]。Simon 等^[39]在 2016 年对 PIN6 的亚细胞定位及功能进行了详细分析。亚细胞定位的研究揭示 PIN6 在质膜和内质网均有定位。生长素运输和代谢实验表明 PIN6 可以介导生长素跨质膜运输以及细胞内生长素的平衡,包括调节自由态生长素和束缚态生长素的水平。进一步的功能分析显示侧根和不定根发生过程中生长素的分配都需要 PIN6 的参与。Ditengou 等^[40]进一步分析了 PIN6 存在内质网与质膜双重定位的机制。研究发现在 PIN6 表达水平较低的组织,如根中, PIN6 定位于内质网,而在 PIN6 表达较高的花序茎中, PIN6 则定位于质膜。而造成 PIN6 的双重定位的原因是 MPK4 和 MPK6 对 PIN6 的磷酸化。PIN6 的亚细胞定位是受到组织特异性的发育信号对其表达水平及磷酸化状态的调控。

3 植物细胞内膜运输对根毛极性生长的调控作用

植物的根毛是由单个表皮细胞通过极性生长发育而来的。通常我们把根毛的生长发育划分为 3 个阶段:命运决定、根毛起始和尖端生长。对拟南芥的根毛来说,命运决定阶段是以 GL2 为核心的信号网络决定表皮细胞是发育成根毛还是非根毛。根毛起始阶段决定了根毛的平面极性,即根毛的起始位置是靠近根尖侧 (Basal) 还是远离根尖的一侧 (Apical)。尖端生长则是根毛起始后直到成熟前的快速伸长阶段^[41]。

根毛从起始开始便进入极性发育过程,这一过程的建立和维持受到一系列因素调控,包括植物激素、脂筏、磷脂酰肌醇、ROP GTPases、Ca²⁺、ROS、细胞骨架和囊泡运输等。其中囊泡运输的极性又受到其它各因素直接或间接的调控。根毛尖端的快速生长需要新的细胞膜和细胞壁成分的供应,伴随着大量的脂质、蛋白质和多糖的转运。这一过程主要由细胞内膜组成的囊泡运输完成。

内膜运输主要过程可以分为五步:第一步,从供体膜上出芽并装载正确的货物形成囊泡。ARF GTPases 在此过程中起着重要作用。ARF GTPases 是一类小 G 蛋白,参与调控内膜运输和肌动蛋白的组装过程^[42]。拟南芥基因组总共编码了 21 个 ARF GTPases,其中有 6 个属于 ARF1 家族。第二步,囊泡被传送到他们的最终目的地。这依赖于作为运输桥梁的细胞骨架朝着正确方向组装。第三步,囊泡被靶标膜捕获并栓系在一起,这一过程需要由栓系因子 (Tethering factors) 和 Rab GTPases 的参与。目前有报道的能作用于根毛形态发生过程中的栓系因子只有 Exocyst。Exocyst 是一个巨大的多亚基的栓系复合体。GTP 结合状态下的 Rab GTPases 具有连接囊泡和靶标膜的功能。拟南芥基因组共编码了 57 个 Rab GTPases,其中 RabA 占有最大的比例,有 26 个成员^[43]。它主要在反式高尔基体以及后高尔基体囊泡运输的调控中发挥作用。其中 RabA4b 已经被证实能够调控根毛的形态发生。RabA4b 定位在根毛的尖端,在根毛成熟后消失。酵母双杂实验证实了 RabA4b 与磷脂酰肌醇激酶 (PI-4Kβ1) 能够互作。

而且 PI-4K β 1 还能与一种钙离子感受器互作^[44]。因此, RabA4b 被认为具有能够整合膜运输、磷脂酰肌醇信号和顶端钙离子感知的功能。第四步, 囊泡和靶标膜相互融合, 从而成功卸载货物。SNAREs 和其调控因子 Sec1 是介导这一过程的主要蛋白。拟南芥基因组编码了大量的 SNAREs。系统发育分析表明植物细胞膜上至少含有 5 种 t-SNAREs 的亚族 syntaxins。Sec1 蛋白结合 syntaxin 或者 t-SNAREs 并使其构象发生改变。在动物细胞里, Sec1 结合到 syntaxin 上导致 syntaxin 形成闭合态构象, 无法与 v-SNARE 互作。拟南芥基因组总共编码了 6 个 Sec1 基因, 其中的一个叫 KEULE 的已经被证实参与到根毛形态发生和细胞分裂过程中^[45]。KEULE 已经被证实具有 Sec1 的特征, 包括与 syntaxin 的结合性能。根毛的正常发育需要 Sec1 的正常功能, 因此这也间接的证明了 SNAREs 也参与到根毛的形态发生。第五步, 参与膜运输的工具分子被重新回收为下一轮运输作准备。

囊泡在根毛内朝尖端极性运输的建立和维持需要各调控因子由上到下的精密控制。生长素作为内源的位置信号, 由 IAA 和 H⁺ 的共转运蛋白 AUX1 转运进入细胞。在胞内, 部分生长素结合其受体 SCFTIR1/ARF 复合体后导致 Ca²⁺ 通道 CNGC14 被激活, 进而造成胞内 Ca²⁺ 浓度改变, 进而通过调控细胞骨架组装来控制内膜运输, 并能通过 synaptotagmin 进行信号转换, 减少膜融合需要的活化能, 促进尖端的膜融合^[46-47]。在植物体内的 Rho GTPases 被称为 ROPs, 它们在根毛形态发生起重要的指挥作用, 能直接或间接的调控胞内囊泡运输极性。拟南芥总共有 11 个 ROPs 成员, 其中 ROP2、ROP4 和 ROP6 在根毛起始和尖端的位置积累, 而组成性活化 (Constitutively active, CA) 的 ROP2、ROP4、ROP6 和 ROP11 会导致球状根毛的产生。过表达 ROP2 的植株根毛产生大量分支, 说明 ROP2 在根毛分化过程中起作用。

最近的研究发现, ROP2 除了受到 GEF、GAP 和 GDI 调控外, 还受到 MAP18 的调控, MAP18 通过与 GDI/SCN1 竞争性的结合 ROP2-GDP 促进活性 ROP2 的生成, 从而调节细胞骨架, 同时 MAP18 还能直接调控微观组装过程^[48]。在酵母中的实验证明,

Exocyst 复合体的某些亚基的正确定位依赖于 RHO1。而在动物细胞中, Exo70 可能主要介导了 Rho 和 Exocyst 的互作。有趣的是, 拟南芥中至少有 23 个 Exo70, 目前发现 EXO70A1 参与到根毛尖端生长^[49]。某些蛋白如 ROPs 和 GPI (Glycosylphosphatidylinositol) 锚定蛋白在细胞膜上的极性定位对其发挥信号指示作用极其重要。细胞膜上的脂筏可能提供了这样一个特殊的锚定位点, 并为囊泡的极性分泌提供了港口。Ovecka 等^[50-51]对根毛内富含甾醇的脂筏的分布和 Zhao 的观测结果均支持了这一观点。另外, 一个有趣的突变体 *orc*, 也叫 *cephalopod* 或者 *smtIorc*, 是 *STEROL METHYLTRANSFERASE1* 基因的一个等位基因, 参与到甾醇类合成的烷基化反应中。在 *smtIorc* 背景下, 根毛的起始的平面极性遭到破坏, 这也说明甾醇类参与了根毛起始位置的选择^[52]。

总而言之, 囊泡在根毛发育过程中的极性运输是一个受到多种因素严格调控又存在反馈调节的复杂过程, 还有许多未知的机制需要进一步的研究。

4 植物细胞液泡运输对花粉管极性生长和种子萌发的调控机理。

4.1 液泡运输在花粉管极性生长过程中的作用

花粉管是一种高度极化的细胞, 其生长的过程涉及复杂的细胞内活动。之前的研究表明, 液泡对于花粉管的生长至关重要。植物细胞内液泡运输主要有: (1) PVC/MVB 介导的依赖于 Rab5 到 Rab7 转化的途径; (2) 只依赖于 Rab5 的途径; (3) 只依赖于 AP3 的途径; (4) 直接由内质网到液泡的途径^[11]。Rab GTPase 参与了蛋白运输的全过程: 囊泡的形成、运输、与细胞膜的对接、黏附、锚定和融合等。Rab GTPase 与 GDP 结合时处于失活状态, 与 GTP 结合时处于激活状态, 定位在膜上的 Rab7 能够被特定的鸟嘌呤核苷酸置换因子 MON1/CCZ1 激活, 介导 PVC 与液泡的融合^[50]。在 *mon1* 的突变体中, 由于 Rab7 介导的液泡运输丝氨酸蛋白酶功能的缺失, 花粉绒毡层细胞无法正常进行程序性死亡, 产生异常的花粉包被影响花粉的萌发和花粉管的生长^[53-55]。

介导液泡融合过程的栓留复合体 HOPS (Homotypic fusion and vacuole protein sorting) 由 4 个核心

亚基 VPS11、VPS16、VPS18 和 VPS33, 以及 2 个特异亚基 VPS39 和 VPS41 组成^[56-58]。这些亚基在植物中都是单拷贝, 对应的突变纯合致死, 通过对受精过程的研究发现, HOPS 复合体中的亚基液泡分选蛋白 VPS41 参与了将胞外信号分子及其他物质从细胞膜上运进液泡或者其他亚细胞区间内进行降解的生物学过程, *vps41* 突变体花粉管中早期从膜上到晚期内吞体的内膜运输过程是正常的, 但是从晚期内吞体到液泡的运输过程受到严重影响, 导致需要被运输到液泡降解的信号分子无法及时的被降解, 引发信号途径的紊乱, 从而影响花粉管的生长, 使其无法穿入柱头, 有性生殖过程受到影响, 导致不育^[59]。而在 *vps11* 的突变体的花粉管中, 液泡的形态并没有发生显著变化, 但是其花粉管的伸长受到了显著的抑制^[60], 以上结果说明, 参与液泡运输的 HOPS 复合体通过不同的方式影响花粉管的发育, 任何亚基的缺失突变会导致严重发育表型的出现。此外, 张彦课题组最新的研究发现在衔接蛋白 *ap3* 突变体中, AP3 复合体靶向液泡膜的“货物”棕榈酰基转移酶 PAT10 和其棕榈酰化底物 CBLs 在花粉管内失去了原本的液泡膜定位, 而呈现高尔基体定位, 并且花粉管内钙离子浓度显著降低, 液泡形态发生异常, 影响了花粉管的生长^[61-64]。

4.2 液泡运输在种子萌发过程中的作用

大部分有花植物通过有性生殖和产生种子繁衍后代, 因此种子活力的保持和顺利萌发具有十分重要的意义^[65-66]。种子萌发的过程受到植物激素、光、一氧化氮和小 RNA 等复杂的调控网络协调控制^[67-72], 并且细胞内发生一系列复杂的生理变化: 细胞内膜系统内质网和高尔基体大量增殖, 一方面高尔基体运输物质到细胞壁作为合成的原料; 另一方面内质网产生的小液泡吸水胀大并且相互融合, 形成大液泡使细胞体积增大, 促进种子萌发^[66, 72]。在种子萌发的过程中液泡运输对于种子储藏蛋白的转运、pH 的维持, 以及特定蛋白如离子通道蛋白和转运蛋白的定位具有十分重要的作用。液泡运输蛋白 MAIGO2 (MAG2) 与定位在内质网上的 t-SNARE 组分 SYP81/AtUfe1 和 SEC20 互作, 促进种子萌发过程中储藏蛋白从合成部位内质网到翻译后修饰部位

高尔基体的运输^[73]。在 *mag2* 的突变体中, 由于储藏蛋白运输功能的缺失导致细胞内质网中大量不正常 MAG 小体的形成, 种子萌发受到严重影响^[74-75]。衔接蛋白复合体 AP3 参与了从高尔基体到液泡的运输, 对于液泡形态的维持和功能的发挥起着关键作用。AP3 复合体的亚基 AP3 β 和 AP3 δ 蛋白功能的缺失会导致大量原本定位在液泡膜上的蛋白在细胞质中积累, 影响细胞内 pH 的稳态和种子的萌发, 而其显性负突变体在种子萌发的过程中表现出对弱酸条件抗性的增强^[62-63]。

综上所述, 植物细胞内膜运输对植物发育各个阶段起着重要调控作用。内膜运输突变体表现出组织特异性或发育时期特异性缺陷。然而, 现阶段研究主要集中在内膜运输机制及表型的描述, 发育信号与内膜系统的衔接以及内膜蛋白相应上游信号的机制尚未有深入探索。这方面空白有待于以后进一步研究发现来填补。

参考文献

- [1] Morita MT, Shimada T. The plant endomembrane system-A complex network supporting plant development and physiology [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55 (4): 667-671.
- [2] Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (3): 715-730.
- [3] Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, et al. Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (4): 1344-1357.
- [4] Herman E, Schmidt M. Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(3): 3440-3446.
- [5] Reyes FC, Chung T, Holding D, et al. Delivery of prolamins to the protein storage vacuole in maize aleurone cells [J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (2): 769-784.
- [6] Kulich I, Zarsky V. Autophagy-related direct membrane import from ER/Cytoplasm into the vacuole or apoplast: a hidden gateway also for secondary metabolites and phytohormones? [J]. *International*

- Journal of Molecular Sciences, 2014, 15 (5) : 7462-7474.
- [7] Viotti C. ER and vacuoles : never been closer [J] . Front Plant Sci, 2014, 5 : 20.
- [8] Viotti C, Krüger F, Krebs M, et al. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis* [J] . Plant Cell, 2013, 25 (9) : 3434-3449.
- [9] Zwiewka M, Feraru E, Möller B, et al. The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in *Arabidopsis* [J] . Cell Research, 2011, 21 (12) : 1711-1722.
- [10] Feraru E, Paciorek T, Feraru MI, et al. The AP-3 beta adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in *Arabidopsis* [J] . Plant Cell, 2010, 22 (8) : 2812-2824.
- [11] Cui Y, Shen J, Gao C, et al. Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies [J] . Molecular Plant, 2016, 9 (6) : 774-786.
- [12] Wolfenstetter S, Wirsching P, Dotzauer D, et al. Routes to the tonoplast : the sorting of tonoplast transporters in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts [J] . Plant Cell, 2012, 24 (1) : 215-232.
- [13] Ebine K, Inoue T, Ito J, et al. Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways [J] . Current Biology, 2014, 24 (12) : 1375-1382.
- [14] Brillada C, Rojas-Pierce M. Vacuolar trafficking and biogenesis : a maturation in the field [J] . Current Opinion in Plant, Biology, 2017, 40 : 77-81.
- [15] Gälweiler L, Guan C, Müller A, et al. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue [J] . Science, 1998, 282 (5397) : 2226-2230.
- [16] Armengot L, Marques-Bueno MM, Jaillais Y. Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases [J] . Journal of Experimental Botany, 2016, 67 (14) : 4015-4037.
- [17] Mravec J, Skůpa P, Bailly A, et al. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter [J] . Nature, 2009, 459 (7250) : 1136-1140.
- [18] Friml J. Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport [J] . Eur J Cell Biol, 2010, 89 (2-3) : 231-235.
- [19] Friml J, Vieten A, Sauer M, et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* [J] . Nature, 2003, 426 (6963) : 147-153.
- [20] Muday GK, Peer WA, Murphy AS. Vesicular cycling mechanisms that control auxin transport polarity [J] . Trends in Plant Science, 2003, 8 (7) : 301-304.
- [21] Fu Y, Yang ZB. Rop GTPase : a master switch of cell polarity development in plants [J] . Trends in Plant Science, 2001, 6 (12) : 545-547.
- [22] Bucci C, Parton RG, Mather IH, et al. The small Gtpase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway [J] . Cell, 1992, 70 (5) : 715-728.
- [23] Dhonukshe P, Tanaka H, Goh T, et al. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions [J] . Nature, 2008, 456 (7224) : 962-U975.
- [24] Fan L, Hao H, Xue Y, et al. Dynamic analysis of *Arabidopsis* AP2 sigma subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development [J] . Development, 2010, 140 (18) : 3826-3837.
- [25] Kitakura S, Vanneste S, Robert S, et al. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis* [J] . Plant Cell, 2011, 23 (5) : 1920-1931.
- [26] Wang C, Yan X, Chen Q, et al. Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis* [J] . Plant Cell, 2013, 25 (2) : 499-516.
- [27] Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, et al. Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane [J] . Mol Syst Biol, 2011, 7 : 540.
- [28] Geldner N, Friml J, Stierhof YD, et al. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking [J] . Nature, 2001, 413 (6854) : 425-428.
- [29] Steinmann T, Geldner N, Grebe M, et al. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF [J] . Science, 1999, 286 (5438) : 316-318.
- [30] Kleine-Vehn J, Huang F, Naramoto S, et al. PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-Independent trafficking in *Arabidopsis* [J] . Plant Cell, 2009, 21 (12) : 3839-3849.
- [31] Li R, Rodriguez-Furlan C, Wang J, et al. Different endomembrane trafficking pathways establish apical and basal polarities [J] . Plant Cell, 2017, 29 (1) : 90-108.
- [32] Drdová EJ, Synek L, Pečenková T, et al. The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in *Arabidopsis* [J] . Plant J, 2013, 73 (5) : 709-719.

- [33] Tan XY, Feng YH, Liu YL, Bao YQ. Mutations in exocyst complex subunit SEC6 gene impaired polar auxin transport and PIN protein recycling in *Arabidopsis* primary root [J] . *Plant Science*, 2016, 250 : 97-104.
- [34] Ganguly A, Park M, Kesawat MS, Cho HT. Functional analysis of the hydrophilic loop in intracellular trafficking of *Arabidopsis* PIN-FORMED proteins [J] . *Plant Cell*, 2014, 26 (4) : 1570-1585.
- [35] Dal Bosco C, Dovzhenko A, Liu X, et al. The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis [J] . *Plant J*, 2012, 71 (5) : 860-870.
- [36] Ding Z, Wang B, Moreno I, et al. ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis* [J] . *Nat Commun*, 2012, 3 : 941.
- [37] Dal Bosco C, Dovzhenko A, Palme K. Intracellular auxin transport in pollen : PIN8, PIN5 and PILS5 [J] . *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7 (11) : 1504-1505.
- [38] Krecsek P, Skupa P, Libus J, et al. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters [J] . *Genome Biology*, 2009, 10 (12) : 249.
- [39] Simon S, Skůpa P, Viaene T, et al. PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in *Arabidopsis* [J] . *New Phytologist*, 2016, 211 (1) : 65-74.
- [40] Ditengou FA, Gomes D, Nziengui H, et al. Characterization of auxin transporter PIN6 plasma membrane targeting reveals a function for PIN6 in plant bolting [J] . *New Phytologist*, 2018, 217 (4) : 1610-1624.
- [41] Salazar-Henao JE, Velez-Bermudez IC, Schmidt W. The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis [J] . *Development*, 2016, 143 (11) : 1848-1858.
- [42] D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins : roles in membrane traffic and beyond [J] . *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7 (5) : 347-358.
- [43] Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis* [J] . *Plant Physiology*, 2003, 131 (3) : 1191-1208.
- [44] Preuss ML, Schmitz AJ, Thole JM, et al. A role for the RabA4b effector protein PI-4Kbeta1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana* [J] . *J Cell Biol*, 2006, 172 (7) : 991-998.
- [45] Assaad FF, Huet Y, Mayer U, Jurgens G. The cytokinesis gene KEULE encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE [J] . *J Cell Biol*, 2001, 152 (3) : 531-543.
- [46] Dindas J, Scherzer S, Roelfsema MRG, et al. AUX1-mediated root hair auxin influx governs SCF (TIR1/AFB) -type Ca^{2+} signaling [J] . *Nat Commun*, 2018, 9 (1) : 1174.
- [47] Martens S, Kozlov MM, McMahon HT. How synaptotagmin promotes membrane fusion [J] . *Science*, 2007, 316 (5828) : 1205-1208.
- [48] Kang E, Zheng M, Zhang Y, et al. The microtubule-associated protein MAP18 Affects ROP2 GTPase activity during root hair growth [J] . *Plant Physiology*, 2017, 174 (1) : 202-222.
- [49] Synek L, Schlager N, Eliás M, et al. AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development [J] . *Plant J*, 2006, 48 (1) : 54-72.
- [50] Ovecka M, Berson T, Beck M, et al. Structural sterols are involved in both the initiation and tip growth of root hairs in *Arabidopsis thaliana* [J] . *Plant Cell*, 2010, 22 (9) : 2999-3019.
- [51] Zhao X, Zhang X, Qu Y, et al. Mapping of membrane lipid order in root apex zones of *Arabidopsis thaliana* [J] . *Front Plant Sci*, 2015, 6 : 1151.
- [52] Willemsen V, Friml J, Grebe M, et al. Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function [J] . *Plant Cell*, 2003, 15 (3) : 612-625.
- [53] Cui Y, Zhao Q, Gao C, et al. Activation of the Rab7 GTPase by the MON1-CCZ1 complex is essential for PVC-to-vacuole trafficking and plant growth in *Arabidopsis* [J] . *Plant Cell*, 2014, 26 (5) : 2080-2097.
- [54] Cui Y, Zhao Q, Xie HT, et al. MONENSIN SENSITIVITY1 (MON1) /CALCIUM CAFFEINE ZINC SENSITIVITY1 (CCZ1) -mediated Rab7 activation regulates tapetal programmed cell death and pollen development [J] . *Plant Physiology*, 2017, 173 (1) : 206-218.
- [55] Nordmann M, Cabrera M, Perz A, et al. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7 [J] . *Current Biology*, 2010, 20 (18) : 1654-1659.
- [56] Balderhaar HJ, Ungermann C. CORVET and HOPS tethering

- complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion [J] .
Journal of Cell Science, 2013, 126 (6) : 1307-1316.
- [57] Takemoto K, Ebine K, Askani JC, et al. Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in *Arabidopsis* [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115 (10) : 2457-2466.
- [58] Hunter MR, Scourfield EJ, Emmott E, Graham SC. VPS18 recruits VPS41 to the human HOPS complex via a RING-RING interaction [J] . The Biochemical Journal, 2017, 474 (21) : 3615-3626.
- [59] Hao L, Liu J, Zhong S, et al. AtVPS41-mediated endocytic pathway is essential for pollen tube-stigma interaction in *Arabidopsis* [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113 (22) : 6307-6312.
- [60] Tan X, Wei J, Li B, et al. AtVPS11 is essential for vacuole biogenesis in embryo and participates in pollen tube growth in *Arabidopsis* [J] . Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 491 (3) : 794-799.
- [61] Zhou LZ, Li S, Feng QN, et al. Protein S-ACYL Transferase10 is critical for development and salt tolerance in *Arabidopsis* [J] . Plant Cell, 2013, 25 (3) : 1093-1107.
- [62] Feng QN, Li S, Zhang Y. Update on adaptor protein-3 in *Arabidopsis* [J] . Plant Signaling & Behavior, 2017, 12 (8) : e1356969.
- [63] Feng QN, Liang X, Li S, & Zhang Y. The ADAPTOR PROTEIN-3 complex mediates pollen tube growth by coordinating vacuolar targeting and organization [J] . Plant Physiology, 2018, 177 (1) : 216-225.
- [64] Feng C, Wang JG, Liu HH, Li S, Zhang Y. *Arabidopsis* adaptor protein 1G is critical for pollen development [J] . Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59 (9) : 594-599.
- [65] Weitbrecht K, Müller K, & Leubner-Metzger G. First off the mark : early seed germination [J] . Journal of Experimental Botany, 2011, 62 (10) : 3289-3309.
- [66] Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. Seed dormancy and germination [J] . Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5 (1) : 33-36.
- [67] Arc E, Sechet J, Corbineau F, et al. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination [J] . Front Plant Sci, 2013, 4 : 63.
- [68] Hancock JT, Neill SJ, Wilson ID. Nitric oxide and ABA in the control of plant function [J] . Plant Science, 2011, 181 (5) : 555-559.
- [69] Arc E, Galland M, Godin B, et al. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination [J] . Front Plant Sci, 2013, 4 : 346.
- [70] Peng J, Harberd NP. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination [J] . Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5 (5) : 376-381.
- [71] Das SS, Karmakar P, Nandi AK, Sanan-Mishra N. Small RNA mediated regulation of seed germination [J] . Front Plant Sci, 2015, 6.
- [72] Penfield S, King J. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination [J] . Proc Biol Sci, 2009, 276 (1673) : 3561-3569.
- [73] Li L, Shimada T, Takahashi H, et al. MAIGO2 is involved in exit of seed storage proteins from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis thaliana* [J] . Plant Cell, 2006, 18 (12) : 3535-3547.
- [74] Li L, Shimada T, Takahashi H, et al. MAG2 and three MAG2-INTERACTING PROTEINs form an ER-localized complex to facilitate storage protein transport in *Arabidopsis thaliana* [J] . Plant J, 2013, 76 (5) : 781-791.
- [75] Zhao P, Liu F, Zhang B, et al. MAIGO2 is involved in abscisic acid-mediated response to abiotic stresses and Golgi-to-ER retrograde transport [J] . Physiologia Plantarum, 2013, 148 (2) : 246-260.

(责任编辑 李楠)