

多囊体生物发生和蛋白质分拣 ——ESCRT、Vps4、Ubiquitination 一个都不能少*

夏恒传 张春霞 冯 凡 袁 弋 周 阳 刘晓勇 朱克明 姚 勤 陈克平**

(江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013)

摘要 多囊体(multivesicular body, MVB)是由晚期内吞体的限制膜内陷出芽而形成的动态的亚细胞结构, 是真核细胞重要的膜和蛋白质运输与分拣中心, 并与信号转导、胞质分裂、基因沉默、自噬、蛋白质的质量控制、病毒出芽等密切相关。多囊体生物发生涉及 20 多种囊泡分拣蛋白(Vps), 最重要的是在内吞体膜上形成的 4 种内吞体运输分拣复合物(ESCRT 0、I、II、III)和 Vps4。ESCRT 0 与包涵素在内吞体膜上形成微域并富集泛素化的货物蛋白。ESCRT I 和 II 诱导 MVB 囊泡出芽、促进囊泡形成并分拣货物蛋白到囊泡中。ESCRT III 收缩及剪切芽颈, 完成最后的膜脱落过程。Vps4 解离 ESCRT 以循环利用。泛素化及泛素化蛋白也能修饰或调控 ESCRT 的定位及功能。这些研究表明, 泛素化蛋白、ESCRT 和 Vps4 在内吞体膜上的相继协同作用是驱动紧密偶联的多囊体生物发生及蛋白质分拣的主要力量。本文以蛋白质-蛋白质相互作用为主, 综述了 ESCRT 复合物及 Vps4 多聚体的组装机制、相互作用、生理功能以及泛素化蛋白和泛素化对 ESCRT 的调控, 并对下一步研究进行了展望。

关键词 多囊体, 内吞体运输分拣复合物, 囊泡分拣蛋白, 泛素化, 腔内囊泡, 出芽, 膜脱落

学科分类号 Q2, Q6, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00171

20 世纪 50 年代, de Robertis 和 Roizin 等^[1-2]首先观察到多囊体(multivesicular body, MVB)现象。MVB 是含有腔内囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)的晚期内吞体, 如酵母的 MVB 直径约 200 nm, 腔内充满直径约 24 nm 的椭圆形小囊泡(图 1)。后来在多种细胞中也发现了 MVB, 但直到 21 世纪初, Emr 等发现 MVB 途径的重要蛋白包括 E 类(class E)囊泡分拣蛋白(vacuolar protein sorting, Vps)形成的内吞体运输分拣复合物(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)和 Vps4^[3-5], 才开始分子机制研究。目前认为^[3-13], MVB 途径参与或调控信号转导、自噬、胞质分裂、细胞凋亡、蛋白质的质量控制、基因沉默、神经系统的调控、病毒出芽等, 在癌症、神经退行性疾病、病毒病(艾滋病、乙型肝炎)的发生发展以及真核生物生长发育的调控等方面都具有重要作用。

最近, MVB 途径的研究不断深入^[3-7, 13-24], 发现泛素(ubiquitin, Ub)化修饰(ubiquitination)不仅是蛋白货物(cargo)进入 MVB 途径的重要信号, 还能调控 ESCRT 的定位及功能。ESCRT 0、I、II、III

及 Vps4 等依次参与 MVB 途径并协同作用。对蛋白质的结构、功能、相互作用、与内吞体膜的作用、溶液构象及构象变化进行了深入研究。对 MVB 囊泡形成及蛋白质分拣(sorting)过程进行了体外重建(*in vitro* reconstitution)。这些研究使 MVB 途径的主题变得日益清晰: 主要由泛素化蛋白、ESCRT 和 Vps4 在内吞体膜上相继的协同作用作为最重要的驱动力量, 保障紧密偶联的 MVB 生物发生和蛋白质分拣的经济、高效的运行。本文以蛋白质-蛋白质相互作用为主线, 综述了这个偶联过程的分子机制, 重点讨论 ESCRT 复合物及 Vps4 多聚体的形成机制、相互作用、生理功能以及泛素化对 ESCRT 的调控, 并对下一步的研究进行了展望。

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB114600), 国家自然科学基金(31101673), 江苏省高校自然科学基金(10KJB180001), 江苏大学启动基金(09JGD005)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0511-88791923, E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

收稿日期: 2012-04-06, 接受日期: 2012-07-19

1 多囊体的生理功能及作用蛋白

MVB 是由晚期内吞体的限制膜(limiting membrane)内陷出芽(budding)而形成的富含 ILVs 的亚细胞结构(图 1), 汇集了来自于细胞膜和高尔基体的“物流”, 是真核生物蛋白质及膜的运输与分拣中心^[3-6]. 有些膜蛋白循环回到细胞膜上, 如转

铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR). 有些进入 ILVs, 如表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR), 伴随 MVB 与溶酶体或液泡的融合而释放出来被降解. 有些不被降解, 而是定位到溶酶体或液泡中, 如酵母的羧肽酶 S(carboxypeptidase S, CPS). 目前研究最多的是酵母和人类的 MVB, 也是本文讨论的重点.

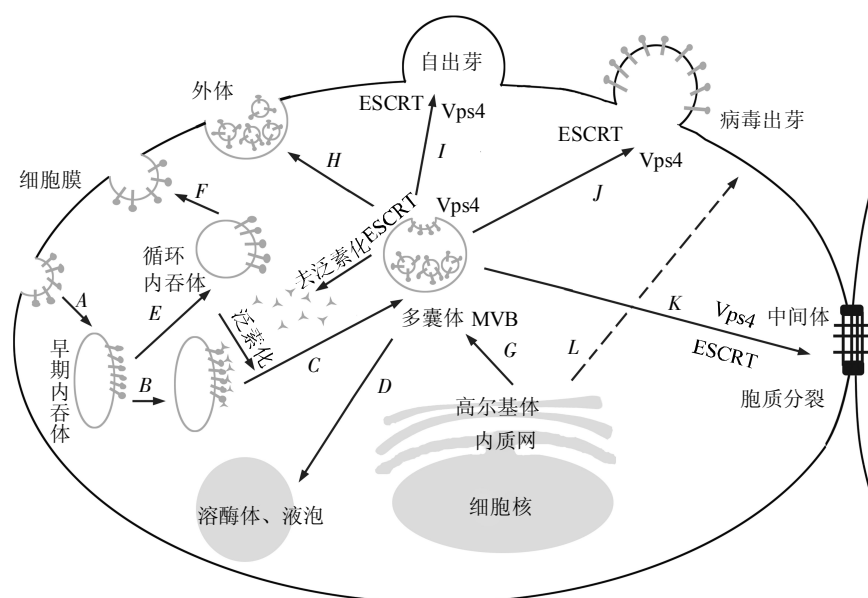


Fig. 1 MVB pathway and related processes

图 1 多囊体途径及相关过程

多囊体途径能分拣来源于细胞膜(A、B、C、D)及高尔基体(G、D)两个途径的蛋白质及脂类货物. A: 细胞膜内陷形成早期内吞体; B: 细胞膜受体等的泛素化, 三角星表示泛素分子; C: 早期内吞体成熟为晚期内吞体, 并在泛素化蛋白、ESCRT、Vps4 等的作用下向腔内出芽形成多囊体, 泛素化蛋白被分拣进入腔内囊泡并去除泛素修饰; D: 多囊体和溶酶体或液泡融合, 释放腔内囊泡及货物蛋白并进行降解; E、F: 某些细胞膜受体不被泛素化, 经循环内吞体途径回到细胞膜; G、D: 来自高尔基体新合成的蛋白酶经多囊体分拣途径进入溶酶体或液泡内, 有些膜蛋白运输到细胞膜上(L); H: 多囊体膜与细胞膜融合, 向胞外释放腔内囊泡, 成为外体; I: 细胞膜向胞外出芽形成非内吞体来源的囊泡, 没有溶酶体相关膜蛋白 LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1) 等晚期内吞体标志, 是细胞固有的自出芽; J: 病毒出芽过程; K: 胞质分裂后期的中间体分离过程, 使子代细胞完全分开. I、J、K 都需要 MVB 途径的功能蛋白, 比如 ESCRT 和 Vps4.

MVB 途径的作用蛋白很保守, 在古细菌、线虫、拟南芥、果蝇、酵母、小鼠、人类等中都存在, 种类也很多, 在酵母中主要包括 20 多种 E 类 Vps 蛋白^[3-6, 13-24]. 同源蛋白首次出现时用酵母蛋白/人类蛋白来表示, 比如 Vps27/HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)表示酵母中为 Vps27, 人类中为 HRS, 然后主要用酵母蛋白来代表, 人类蛋白的英文缩写用大写字母表示. Vps 蛋白存在于细胞质中, 通过蛋白质-脂类

和蛋白质-蛋白质相互作用招募(recruit)到内吞体膜上, 依次组装成 ESCRT 0、I、II、III 复合物(成员及组装机制见下文), 按顺序并协同作用, 结合、簇集(cluster)泛素化货物蛋白, 驱动多囊体形成, 分拣货物蛋白, 最后招募 ATP 酶(ATPase) Vps4/VPS4 通过水解 ATP 提供能量来解离 ESCRT III. ESCRT III、Vta1 (vps twenty associated 1) / LIP5 (LYST-interacting protein 5)、Did2 (Doa4-independent degradation 2, 又称为 Vps46) / CHMP1

(CHarged multivesicular body protein 1)、Vps60/CHMP5、Ist1 (increased sodium tolerance 1)/IST1 都能调控 Vps4 的多聚化及功能。Vps4 或 ESCRT 亚基的基因敲除或功能失活都能彻底阻断 MVB 途径, 不产生正常的 ILVs, 货物蛋白和膜脂源源不断地运输而来却不能被分拣及离开, 而是和 ESCRT 一起积累在内吞体上, 导致内吞体膨胀变形, 称为 E 室(class E compartment), 说明 Vps4 和 ESCRT 的作用是至关重要的, 也是本文内容的重点。

MVB 途径的正常进行需要完整的泛素化和去泛素化过程^[3-6, 24-30]。Rsp5 (reverse spt phenotype 5)/NEDD4 (neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4) 是泛素连接酶(ubiquitin ligase)。Doa4 (degradation of alpha 4) 是去泛素化(deubiquitination, DUB) 酶, 能被 Bro1 (BCK1-like resistance to osmotic shock 1) 激活。人类相应的去泛素化酶为 AMSH (associated molecule of SH3 domain of STAM) 和 UBPY (ubiquitin isopeptidase Y), 含有 Bro1 结构域的为 ALIX (ALG-2-interacting protein X) 等。多数蛋白质都需要泛素化以进入 MVB 途径, 有的蛋白质似乎不需要, 但还不能完全排除与泛素化酶的作用。泛素化蛋白还能主动促进 ESCRT I 和 II 的内吞体膜定位, ESCRT 0 和 I 也能被泛素化, 去除货物蛋白的泛素化能特异性地阻止 ILVs 的形成和蛋白质分拣, 说明二者是偶联的过程。这些发现表明泛素化及去泛素化对 MVB 途径具有重要的调控作用, 也在本文中进行讨论。

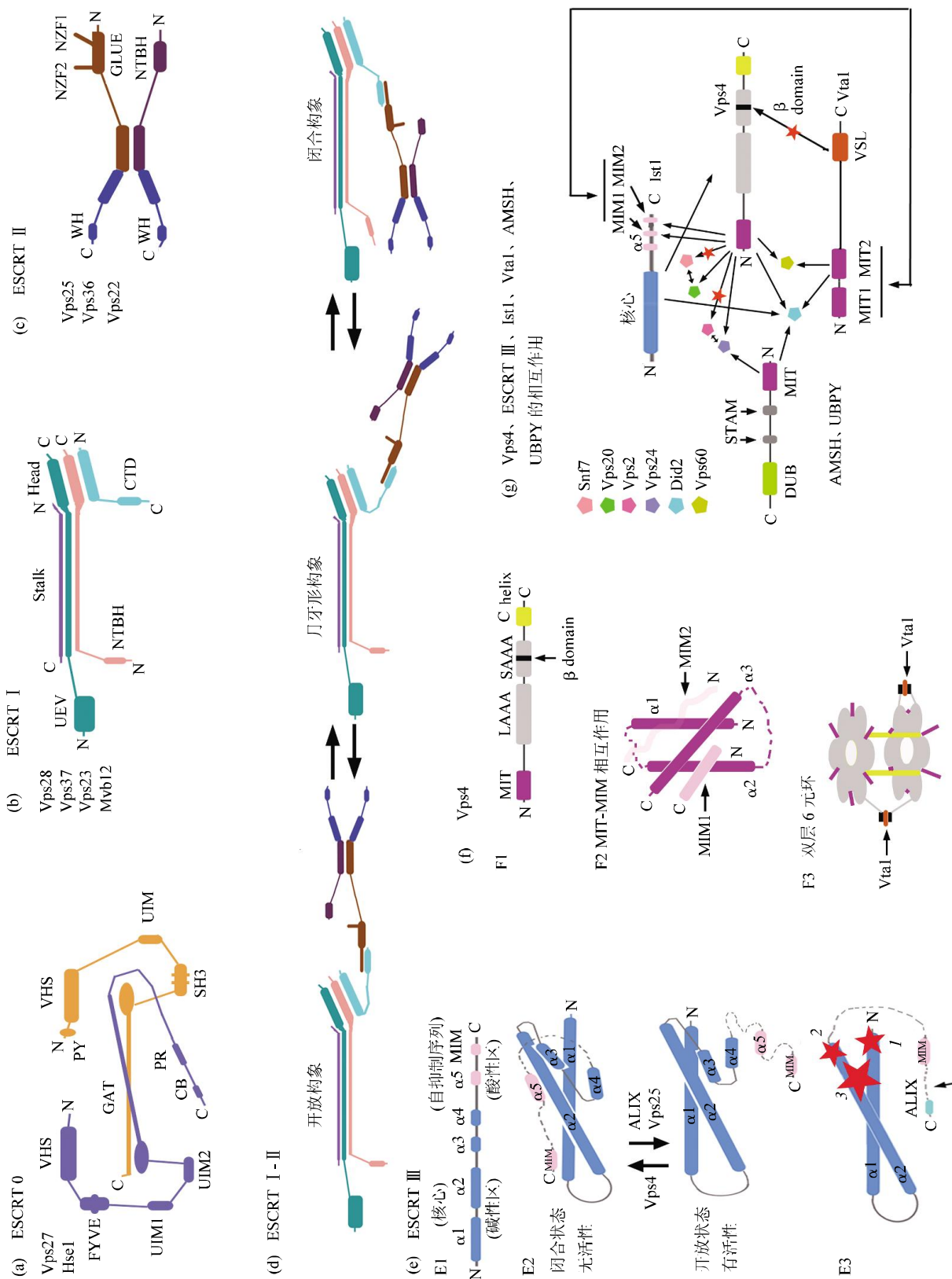
MVB 途径与病毒出芽、胞质分裂等有密切关系。许多哺乳动物病毒, 如 HIV-1 (human immunodeficiency virus 1) 和 HBV (hepatitis B virus), 能利用 MVB 途径的蛋白质来出芽外泌^[12](图 1)。宿主自身也能调控 MVB 途径来阻断病毒的出芽释放, 是对抗病毒的防御策略^[31]。这些发现为抗病毒药物的研发提供了新的靶向途径。细胞不仅在内吞体上出芽, 还能在细胞膜上向胞外出芽形成非内吞体来源的囊泡^[32](图 1), 没有晚期内吞体标志, 如溶酶体相关膜蛋白 LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1), 是细胞固有的出芽机制。在胞质分裂中, MVB 途径的蛋白质也被招募到连接两个子代细胞的中间体(midbody)上发挥作用^[7](图 1)。这些过程都拥有类似的 MVB 作用蛋白, 特别是最后阶

段的膜脱落(membrane abscission), 都需要 Vps4 和 ESCRT III 来负责囊泡芽颈(bud neck)或中间体的剪切过程, 是最小的膜重组机器(minimal membrane remodeling machinery)^[3-7, 12, 32]。细胞还能运输 MVB 到细胞膜上, 与膜融合后释放 ILVs 到细胞外, 称为外体(exosome)^[13](图 1)。上文提到, MVB 途径还在多种生理及病理进程中发挥作用, 与癌症、神经退行性疾病、艾滋病、乙型肝炎以及真核生物的生长发育等都有密切关系。因此, MVB 途径的研究不仅能深入了解蛋白质分拣及膜运输的机理, 对相关的分子机制研究 also 具有重要意义, 还可能应用到上述重大疾病的防治中。

2 ESCRT 蛋白质复合物

2.1 ESCRT 0: 簇集货物蛋白

ESCRT 0 由 Vps27/HRS 和 Hse1 (has symptoms of class E mutants 1)/STAM (signal transducing adapter molecule) 形成^[3-5, 20, 33](图 2)。人类中存在 STAM1 和 STAM2 两个亚型(isoform), HRS 又称为 VPS27 或 HGS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)。ESCRT 0 的核心(core)是由 2 个蛋白质相互交织形成的 GAT(GGA and Tom1) 结构域, 呈“杠铃”状。Vps27 通过 FYVE(Fab1, YGL023, Vps27 and EEA1) 与内吞体膜的磷脂酰肌醇三磷酸(phosphatidylinositol -3-phosphate, PI3P) 结合, 介导它的膜定位, 通过 C 端的富含脯氨酸(proline-rich, PR) 区域可与 ESCRT I 亚基 Vps23 的 UEV (ubiquitin conjugating enzyme E2 variant) 结构域结合, C 端有包涵素结合基序(clathrin-binding motif, CB), 通过 VHS (Vps27, Hrs and STAM) 及 2 个泛素作用基序(ubiquitin-interacting motif, UIM) 与泛素或泛素化蛋白结合, 是泛素结合结构域 UBD (ubiquitin binding domain)。HRS 含有 1 个 UIM, 但两个侧面(double sided)都能结合泛素, 相当于 2 个 UIM。Hse1/STAM 也含有 VHS 和 UIM, 能结合泛素, 还有 SH3 (Src homology 3), 能结合去泛素化酶, 如 AMSH 和 UBPY, 通过 PY 能结合泛素连接酶, 如 Rsp5, 能协调泛素化及去泛素化过程, 但没有 FYVE, 通过 Vps27/HRS 的作用而定位到内吞体膜上。与 Hse1/STAM 相比, Vps27/HRS 的作用更重要, 基因突变能导致更严重的功能缺陷。



Vps27 和 Hse1 形成 ESCRT 0 来协同簇集货物蛋白^[3-5, 16, 20, 33-41]。a. Vps27 是介导 ESCRT 膜定位的最上游因子, 招募包涵素并一起形成微域(microdomain), 簇集 ESCRT 0 及泛素化蛋白, 决定了后者进入 MVB 途径的命运。比如, 野生型 TfR 不进入微域而被循环, 与泛素融合表达的 TfR 则进入微域并被降解, 泛素化促进上皮细胞 Na⁺ 离子通道 EnaC(epithelial Na⁺ channel)与 HRS 的结合及 MVB 介导的降解, 去除 HRS 的 UIM 则抑制 EnaC 的降解并促进细胞膜循环途径。细胞新合成的溶酶体或液泡的蛋白酶处于无活性的前体状态, 需要经 MVB 途径转运到溶酶体或液泡内进行蛋白质剪切, 以最终形成具有酶活性的成熟形式并正确定位。b. 泛素化蛋白与 ESCRT 0 在膜上的簇集具有协同作用。与泛素化蛋白的结合能促进 ESCRT 0 的簇集, 但泛素化蛋白只有通过泛素与 UBD 的结合才能簇集。其他 ESCRT 没有或只有很弱的簇集能力, 说明 ESCRT 0 是簇集货物蛋白的主要因子。ESCRT 0 的突变抑制其与 ESCRT I 的结合后则丧失在囊泡芽颈的定位能力, 说明它还需要下游 ESCRT 的稳定作用。c. Vps27 与 Hse1 相互作用来协调货物蛋白的泛素化、簇集及去泛素化过程。ESCRT 0 含有 6 个功能性 UBD, 在膜上能形成异四聚体(UBD 达 12 个), UBD 在 ESCRT 0 中对泛素的亲和力(affinity)也比游离时明显提高, 说明存在协同作用。ESCRT 0 能结合泛素连接酶及去泛素化酶, 协调泛素化及去泛素化过程, 但具体机制还不清楚。

ESCRT 0 在溶液中的构象具有高度的柔性(flexibility), 能够适应大小和泛素化水平都不同的大量的货物蛋白。通过测定 ESCRT 0 的水动力学半径(hydrodynamic radius, R_H)及蒙特卡罗(Monte Carlo)分子模拟研究^[20, 33], 发现 ESCRT 0 在溶液中呈现高度开放的(open)、动态的(dynamic)构象, 结构域之间只有很弱的不稳定的相互作用, 在所有 ESCRT 中柔性是最高的, 能够适应多种多样的货物蛋白。Vps27 与膜磷脂及泛素化蛋白的作用使它更接近膜表面。Hse1 则相对远离膜, UIM 结合泛素化蛋白后在空间上接近 SH3, 拉近了与去泛素化酶的距离, 促进去泛素化过程。

2.2 ESCRT I - II: 驱动 MVB 形成、分拣货物蛋白

ESCRT I 和 II 在膜上共同组装, 形成比较稳定的复合物 ESCRT I - II, 作为整体来结合泛素化

蛋白并促进 MVB 囊泡的形成, 因此我们把二者放在一起介绍。

ESCRT I 由 Vps23/VPS23、Vps28/VPS28、Vps37/VPS37、Mvb12/MVB12 按 1:1:1:1 的比例形成, 核心结构比较稳定, 包括 Mvb12、Vps23、Vps37 的 3 股长 α 螺旋形成的“杆”(stalk)状结构和 Vps23、Vps28、Vps37 形成的“头”(head)状结构^[3-5, 21-22, 42-44](图 2)。Vps23 的 UEV 和 Vps28 的 C 端结构域(C terminal domain, CTD)分别通过柔性区与核心结构的两头连接。酵母和人的 UEV 能分别与 ESCRT 0 亚基 Vps27/HRS 的 PR 区的基序 PSDP 或 PSAP 结合, 显示了这个作用的高度保守性, 还能结合泛素, 2 个位点不重合; CTD 能结合 ESCRT II 的 Vps36。VPS23 又称为肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101), 在癌症的发生发展中起重要作用, 通过 UEV 与逆转录病毒的晚期结构域(late domain)基序 PTAP 结合, 是病毒“劫持”MVB 途径的重要一环。Vps37 的 N 端含有碱性 α 螺旋(N terminal basic helix, NTBH), 能结合酸性的膜脂, 通过柔性区与核心结构连接。VPS37 存在 A、B、C、D 4 种亚型, MVB12 也有 A、B 2 种亚型, 功能也有不同, 说明人类的 MVB 途径更复杂。

ESCRT II 由 Vps22/VPS22、Vps36/VPS36、Vps25/VPS25 按 1:1:2 比例形成 Y 状的核心结构^[3-5, 22, 45-47](图 2)。VPS22 又称为 EAP30(ELL-associated protein of 30 ku)或 SNF8(sucrose non-fermenting 8), VPS25 又称为 EAP20, VPS36 又称为 EAP45。Vps22 和 Vps36 形成“主干”, N 端都远离核心结构, 前者有 NTBH, 后者有 GLUE(GRAM-like ubiquitin binding in EAP45)结构域。Vps25 形成 2 个“分叉”, 远离核心结构的 C 端含有 WH(winged helix), 能结合 ESCRT III 的 Vps20。酵母的 GLUE 能结合磷脂, 含有 2 个锌指序列(Npl4-type zinc finger, NZF), NZF1 能结合 Vps28 的 CTD, NZF2 能结合泛素。人的 GLUE 没有 NZF, 但也能结合磷脂和泛素, 还通过 GLUE 的一个 α 螺旋与 VPS28 的 CTD 结合。

ESCRT I、II 通过 Vps28 与 Vps36 的相互作用形成 ESCRT I - II 复合物, 协同诱导 MVB 囊泡的形成并驱动蛋白质分拣过程。体外实验发现^[16], ESCRT I、II 都存在时能使脂质体(liposome)产生大量的 ILVs, 单独存在时则不能, ESCRT 0、III 的影响很小。ESCRT I - II 只含有 3 个 UBD, 对泛

素化蛋白的簇集能力很低, 但能与 ESCRT 0 的 UBD 协同作用来运输与分拣泛素化蛋白, 并受泛素化的调控^[24, 30, 38-41]. 相对于未结合的蛋白质, 与 ESCRT 0 结合的泛素化蛋白的运动性受到明显限制, 能被 ESCRT I 和 II 进一步限制并隔离到囊泡中, 在 ESCRT III 的作用下与细胞质完全隔离. ESCRT I 和 II 定位在囊泡芽颈处, 显著降低了泛素化蛋白的运动性, 说明二者能稳定芽颈的结构.

这些 ESCRT 含有高度柔性的区域, 难以通过 X 射线晶体学、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR) 或低温电镜 (Cryo-electron microscopy, Cryo-EM) 来研究. 最新的进展^[21-22], 采用 X 射线小角散射 (small-angle X-ray scattering, SAXS)、荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)、电子-电子双共振 (double electron-electron resonance, DEER)、电子顺磁共振 (electron paramagnetic resonance, EPR) 等方法, 对 ESCRT I 和 II 的溶液构象及动态变化进行了探索. 研究发现, ESCRT I 处于伸展状态, UEV 和 CTD 既能靠近核心结构呈现闭合(closed)构象, 也能远离核心结构呈现高度伸展的开放构象, 二者处于平衡状态. ESCRT I 与 II 结合后, 闭合构象减少, 开放构象增多, CTD 与 ESCRT I 核心的距离也加大了. ESCRT II 仍然保持球状, GLUE 与核心结构的连接具有高度柔性, 不受 ESCRT I 的影响. ESCRT I - II 最长可达 381Å, 呈线性的头尾相连的开放构象; 最短为 208Å, 二者相向靠在一起呈闭合构象; 绝大多数构象呈现不同程度弯曲的“月牙状” (crescent-shaped), 是诱导膜变形、出芽蛋白的特征性形态; 二者协同作用的构象变化能沿着膜牵引泛素化蛋白跨过 300Å 以上的距离, 有效驱动货物蛋白进入 MVB 囊泡, 而 ESCRT I 或 II 都不能产生如此巨大的构象变化.

2.3 ESCRT III: 驱动 MVB 囊泡的膜脱落

ESCRT III 的亚基很多^[3-7, 13-19, 47-55], 在酵母中主要由 Vps2、Vps20、Vps24、Snf7 (又称为 Vps32) 组成(图 2), 可形成 Vps20-Snf7 和 Vps2-Vps24 两个亚复合物, 还包括 Did2、Vps60 和 Ist1. 人类中对应的同源蛋白依次是 CHMP2A (或 2B)、CHMP6、CHMP3、CHMP4A (或 4B、4C)、CHMP1A (或 1B)、CHMP5、IST1, 还有 CHMP7 (在酵母中未见同源蛋白). 这些蛋白质虽然序列不完全相同, 但折叠方式及三维结构非常类似. 它们在 N 端为碱性的核心区, 由 4 个 α 螺旋($\alpha 1 \sim \alpha 4$)

形成束状结构(four helix bundle), 负责膜结合及多聚化. 中间为柔性区. C 端为酸性的自抑制 (autoinhibition) 区, 包括小 α 螺旋($\alpha 5$)及 MIM 基序 (MIT interacting motif), 能与核心结构结合而抑制多聚化, 使它们处于无活性的单体状态, MIM 能与 Vps4 等含有 MIT (microtubule interacting and transport) 结构域的蛋白质结合.

最近的研究, 特别是体内及体外重建实验发现, ESCRT III 的组装主要是按照 Vps20-Snf7-Vps24-Vps2 的顺序依次进行的^[3-5, 14-17, 47-55] (图 2).

a. Vps20 的激活. 在 MVB 途径中, 由 ESCRT II 的 Vps25 激活 Vps20, 启动 ESCRT III 的组装. Vps25 只与 Vps20 结合, 使自抑制序列脱离核心区而激活 Vps20, 使其定位在囊泡芽颈处, 但不能剪切芽颈, 而是招募 Snf7 来发挥作用. Vps20 的 N 端含有豆蔻酰化(myristoyl)基团以及碱性区, 能与膜结合. ESCRT II 和 Vps20 在溶液中的亲和力很弱, 分别与脂质体结合后则有显著的提高, 并使 Vps20 发生整体的构象变化. 二者与脂质体的亲和力也都比较弱, 但共同存在时则明显提高, 与膜的弯曲度 (curvature) 呈正相关, 并从散布状态转化为聚集状态. Vps25 与 Vps20 的结合也能促进及稳定 ESCRT I 和 II 在囊泡芽颈的定位, 说明 ESCRT 之间及与膜的结合都存在协同作用. b. Snf7 的多聚化. 在活化的 Vps20 存在时, 高浓度的 Snf7 能诱导脂质体 ILVs 的产生. 在较低的生理浓度条件下, 在包括脂质体、ESCRT 0、I、II 和 Vps20 的体系 I 中加入 Snf7 也能产生大量的 ILVs. 在极低浓度时检测不到 Snf7 的多聚化, 加入脂质体则能检测到, 再加入 Vps20 则更明显, 突变 Vps20 使其不能结合 Snf7 则能抑制 Snf7 的多聚化. Snf7 在 Vps20 存在时才能稳定地结合脂质体, 二者的结合不受脂质体的影响但构象都发生了变化, 加入 Vps25 后构象变化更大, Snf7 与膜也更紧密的接触. 过表达的 Snf7 定位在内吞体及质膜上, 形成纤维丝及环型(ring)结构. 去除自抑制区或与 Vps4 的失活突变体共表达, 能形成更紧密的环状结构, 并向细胞外突出, 呈芽状和管状结构. Snf7 与脂质体结合后, 加入 ESCRT II 和 Vps20, 也能在脂双层处形成丝状结构. c. Vps24 调控 Snf7 的多聚化. 在酵母中, 敲除 Vps24 导致 Snf7 不受限制的多聚化. 在含有 Snf7、脂质体、Vps20、Vps24 的体外反应体系中, Vps24 的加入阻止了 Snf7 的多聚化, 还能抑制与 Vps20 结合的 Snf7 的多聚化,

可能是通过直接结合或在丝状结构上加帽子(capping)的方式来实现的,具体机制还需要研究.在按顺序添加 ESCRT III 的全部 4 个亚基(Vps20 处于激活状态)及 Vps4 的脂质体反应体系 II 中,Vps20、Snf7 和 Vps24 的协同作用使脂质体产生大量 ILVs,缺少 Vps20 则 ILVs 大幅减少,缺少 Snf7 则几乎不能形成 ILVs,缺少 Vps24 则 ILVs 也减少但不如前二者严重.在含有 Snf7 的体系 I 中,加入 Vps24 也能够促进 ILVs 的形成,使几乎所有的 ILVs 都解离下来. d. Vps2 招募 Vps4 来解离 ESCRT III 以循环利用. Vps24 能结合并招募 Vps2,后者负责招募 Vps4,但只有在 ESCRT III 4 个亚基都存在时,Vps4 才能招募到脂质体膜上,说明 Vps4 在 ESCRT III 组装完成后才发挥作用,而且其他蛋白质也能影响 Vps4 的招募途径.在上述体系 II 中,ATP 和 GFP 在 Vps4 之后添加则只有部分 ILVs 含有 GFP.当有 ATP 和 GFP 但缺少 Vps4 时,以及有 Vps4 和 GFP 但缺少 ATP 时,都观察不到含有 GFP 的 ILVs,说明 Vps4 及 ATP 参与 ILVs 的再次形成过程.虽然 Vps2 不能诱导 ILVs 的形成,但缺少 Vps2 能抑制 ILVs 的再次形成.有实验发现,ESCRT III 的 4 个亚基全部与脂质体膜结合后,才能导致脂质体膜的内陷出芽,任何一个亚基都不能,而且突变 Snf7 抑制多聚化后也不能,说明这些蛋白质需要协同作用来发挥功能.

这些研究表明,Vps20、Snf7、Vps24 是囊泡膜脱落的关键因子.Vps25 激活 Vps20,使 Vps20 及下游蛋白依次聚集到具有很大弯曲度的囊泡芽颈处.Vps20 激活 Snf7 的多聚化,是芽颈收缩及断裂的主要动力.Snf7 激活 Vps24,防止 Snf7 的过度多聚化并提高芽颈剪切的效率.Vps24 激活 Vps2,后者能招募 Vps4 来解离 ESCRT III.这些蛋白质之间及与内吞体膜的结合都存在协同作用,促进了 ESCRT III 的多聚化组装和 ILVs 的形成过程.这也解释了为什么 Vps4 也能使上游 ESCRT 从膜上解离下来,因为 ESCRT III 的解离能够依次影响上游 ESCRT 与膜结合的稳定性,产生多米诺(domino)效应,从而能高效地循环利用 ESCRT 来保证 MVB 途径的持续进行.值得注意的是,高浓度(10~40 倍于生理浓度)激活的 ESCRT III 能够多聚化组装并驱动 ILVs 的形成,不需要其他 ESCRT,还能形成丝状、环状及管状多种结构,说明 ESCRT III 的多聚化也能调控膜动力学,与 ESCRT I-II 类似.

除了 Snf7,其他蛋白质也能多聚化.最近发现^[51-54],Vps24 在体外能自发地多聚化并形成丝状结构,抑制多聚化的突变也能抑制蛋白质分拣过程;去除自抑制区的 Vps2/CHMP2A 和 Vps24/CHMP3 在体外能组装成螺旋管状结构;过表达 CHMP2B 能形成长的螺旋管状结构,向细胞外突起并与质膜内壁有很强的结合,Snf7/CHMP4 则定位到管状结构的基部.目前还不清楚这些结构是否存在于 MVB 途径、病毒出芽、胞质分裂等过程中,也不清楚它们是如何发挥作用的.

ALIX 也能激活 ESCRT III 的组装,正调控 ESCRT III 的功能^[7, 26-28].ALIX 是多功能的支架(scaffold)蛋白,在细胞内吞、病毒出芽、胞质分裂中都起作用.ALIX 本身也存在自抑制,能结合 TSG101,也能通过 Bro1 结构域结合 CHMP4,绕开 ESCRT II 而直接激活 ESCRT III.ALIX 能介导特定的 MVB 途径,比如最新发现的凝血酶(thrombin) G 蛋白偶联受体 PAR1(protease-activated receptor 1)的 MVB 分拣及降解过程,但对其他大量常见的 MVB 途径的货物蛋白没有什么影响.活化的 Alix 形成二聚体,作为支架蛋白偶联 CHMP4 丝状结构在一起,似乎能调控及稳定 CHMP4 的多聚化.目前不知道是什么蛋白质或生理机制来激活 Alix,也不清楚它如何激活 ESCRT III.

最近发现,ESCRT III 的组装及功能也能被负调控^[56-57].CC2D1A 和 B(coiled-coil and C2-domain-containing protein 1 A and B)含有 4 个 DM14(*Drosophila melanogaster* 14 domains)结构域,第 3 个 DM14 与 CHMP4B 结合,抑制后者的多聚化.CHMP4B 上的结合位点为 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 形成发夹结构(hairpin)的开口端, $\alpha 2$ 的 C 端能结合 CHMP2A, $\alpha 1$ 的 N 端为 Vps25 在 Vps20 结合位点的相应区域.CC2D1 不能结合 CHMP4B 形成的纤维丝,说明结合位点被屏蔽了.Alix 和 Vps4 等与 CHMP4B 的 C 端结合,但不抑制它的多聚化.CC2D1 还能结合 CHMP4A 和 4C,也可能结合 IST1 和 CHMP3,说明具有一定的普遍性,可能在 MVB 途径、胞质分裂和病毒出芽中都起作用.最近发现,CC2D1A 或第 3 个 DM14 的过表达都能抑制 HIV-1 的出芽,也能抑制 Alix 通过 CHMP4 对病毒出芽的促进作用,RNA 干扰则促进 HIV-1 的出芽.ESCRT III 负调控的生理意义是什么?能否调控其他亚基或类似蛋白质?能否调控 MVB 途径及胞质分裂?这些都是值得研究的.

ESCRT III 的亚基有多种亚型, 作用也有差异. 比如, CHMP4B 在 MVB 途径、病毒出芽、胞质分裂中都发挥重要作用, CHMP4A 和 4C 作用很小. 但是, 最近发现, CHMP4C 在胞质分裂中参与极光激酶 B (aurora B) 依赖的 NoCut 解离检查点 (NoCut abscission checkpoint) 机制^[58], 基因敲除能促进胞质分裂, NoCut 不能被激活并导致组蛋白 H2AX 的磷酸化水平升高, 说明 NoCut 调控失效. 过表达则能延迟胞质分裂过程. Borealin 的 C 端负责招募与染色体过客复合物 (chromosomal passenger complex, CPC) 相互作用的蛋白质, 能结合多个 CHMP 蛋白, 但与 CHMP4C 的作用最强. CHMP4C 的蛋白质序列中有一个插入序列, CHMP4A 和 4B 都没有, 含有极光激酶 B 的高保守的磷酸化位点, 能被它磷酸化并介导 CHMP4C 的中间体定位. 这些发现表明, 极光激酶 B 对 CHMP4C 的磷酸化能防止胞质分裂过快进行, 避免染色体及 DNA 损伤, 是细胞重要的保护机制. CHMP4C 的磷酸化是否抑制它的多聚化? 是否抑制与其他 ESCRT III 或类似蛋白质的相互作用? 磷酸化是否能调控 MVB 途径或病毒出芽过程? 这些问题还需要深入研究.

3 Vps4 在多囊体途径中的作用

3.1 Vps4 的结构、活性及相互作用

Vps4 是 AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATP 酶家族的成员, 是 MVB 途径中唯一的 ATP 酶^[3-7, 14-19, 49-53, 59-60], 通过水解 ATP 提供能量来解离 ESCRT 复合物以循环利用. Vps4 具有高度保守的蛋白质序列、结构域和空间结构, 在 MVB 途径、胞质分裂、病毒出芽中都发挥重要作用. Vps4 的 N 端为 MIT 结构域, 能与含有 MIM 的蛋白质结合; 中间为 AAA 结构域, 包括一大一小两个亚结构域, 二者之间能结合 ATP; 小 AAA 亚结构域还含有 Vps4 特有的小 β 片层, 称为 β 结构域, 能与 Vta1 C 端的 VSL (Vta1、SBP1、LIP5) 结构域结合; C 端为保守的小 α 螺旋 (C helix) (图 2). 作者参与了酵母 Vps4 晶体结构的解析^[61], 结合人类 Vps4 等其他多方面研究发现: Vps4 结合 ATP 后最可能形成双层环状 (double ring) 的尾对尾式 (tail-to-tail) 的 12 聚体, 每层为一个 6 元 (hexamer) 环, 并含有一个中间的孔道; β 结构域从侧面伸出来与 Vta1 结合, 稳定 12 聚体结构; MIT 分别在双层环的上面和下面, 可以与 MIM 结合;

C helix 向环内伸展, 上、下层相邻亚基的 C helix 形成二聚体来连接并稳定双层环. ATP 的结合能驱动蛋白质浓度依赖的 Vps4 的多聚化, 从酶活性很低的单体、二体逐步组装成高活性的 12 聚体结构. Vta1 能促进 Vps4 的多聚化, 激活 ATP 酶活性, 是 Vps4 的组装因子. MIT 与 ESCRT III 的结合也能激活 Vps4 的酶活性, 类似于底物对酶的激活作用. Ist1 能结合 Vps4 并抑制它的多聚化, 是 Vps4 的抑制因子.

MIT-MIM 介导 Vps4 与 ESCRT III 的相互作用^[3-7, 14-19, 49-50, 60]. MIM 基序存在 MIM1 和 MIM2 两类. MIT 由非对称的 3 个 α 螺旋形成, MIM1 结合在 2 和 3 号螺旋之间的沟槽内, 呈 α 螺旋构象; MIM2 结合在 1 和 3 号螺旋之间的沟槽, 呈伸展构象 (extended conformation), 二者不干扰, 说明 1 个 MIT 可以同时结合 2 个 MIM. ESCRT III 亚基及类似蛋白质都含有 MIM 基序, Vps20 和 Snf7 含有 MIM2, Vps2、Vps24 和 Did2 含有 MIM1, Ist1 和 CHMP7 含有 MIM1 和 MIM2. 理论上这些蛋白质都能与 Vps4 结合, 存在协同或竞争关系, 形成复杂的作用网络. 但它们与 MIT 的亲和力都比较弱, 解离常数 k_d 在 $\mu\text{mol/L}$ 级别, 难以分辨哪个是最重要的相互作用.

Vps4 受到组装因子 Vta1 和抑制因子 Ist1 的双重调控^[3-5, 18-19, 49, 60-62]. 作者对 Vta1 晶体结构及相互作用的研究发现^[62], Vta1 C 端的 VSL 形成二聚体, 能结合 2 个 Vps4 的 β 结构域. Vta1 的 N 端有 2 个 MIT, 1 个 MIT 与 Did2 结合来介导 Vta1 的膜定位, 也能结合 Vps60, 似乎能拮抗 Did2 的作用. Ist1 通过 N 端与 Vps4 的 AAA 结合, 通过 C 端的 2 个 MIM 与 Vps4 的 MIT 结合, 与 Vps4 形成异二聚体来抑制 Vps4 的多聚化. Ist1 的 N 端与 Did2 结合并在细胞质中形成稳定的复合物, 能介导和增强 Did2 与 Vps4 的相互作用.

3.2 Vps4 的膜定位、多聚化及作用机制

Vps4 不直接参与多囊体形成和蛋白质分拣过程, 而是通过解离 ESCRT 复合物的间接方式参与, 最近的体外重建实验也证明了这一点^[14-19]. ESCRT 的循环利用能保证 MVB 途径经济、高效、持续地运行, 显著增强了对信号转导等进行及时调控的响应能力. 由于 ESCRT 0、I、II、III 相互之间及与内吞体膜的协同作用, Vps4 对 ESCRT III 的解离作用也能使上游 ESCRT 解离下来. Vps4 的作用与其他 AAA ATP 酶类似, 比如 NSF (NEM-

sensitive fusion)通过水解 ATP 使多聚体的构象发生变化, 从而驱动 SNAP (soluble NSF attachment protein)-SNARE(SNAP REceptor)复合物的解离^[63].

但是, 除了结合 ESCRT III 外, Vps4 还能结合 Vta1 和 Ist1, 虽然只有一个 AAA 却能形成 12 聚体, 说明 Vps4 的作用机制要复杂的多. 目前认为, Vps4 的膜定位、多聚化组装及解离 ESCRT 复合物的过程是非常复杂的, 需要 ESCRT III 的亚基及 Did2、Vta1、Ist1 等的协同作用.

Vps4 的膜定位需要这些蛋白质的协同作用^[14-19,60]. 虽然 Vps2 能招募 Vps4, 但 ESCRT III 的其他成员也含有 MIM, 也可能参与 Vps4 的招募途径. 最近发现^[18], 这些蛋白质的 MIM1 之间、MIM2 之间、MIM1 和 MIM2 之间都存在协同作用, 共同引导 Vps4 的膜定位. 与单去除或单突变相比, 同时去除 Vps2 和 Vps24 的 MIM1 或共同突变 Vps20 和 Snf7 的 MIM2 都能增强对 Vps4 膜定位的抑制作用, 前者的抑制作用更强, 这也与 Vps2 的重要作用相一致. 类似的, 综合应用 MIM1 的缺失和 MIM2 的突变也能协同抑制 Vps4 的膜定位, 说明 MIT 的两个 MIM 结合位点都是具有功能的. Did2 和 Ist1 也能协同作用来招募 Vps4, 二者的膜定位依赖于 Vps2 和 Vps24. 除了介导 Vps4 的招募途径, 这些 MIM 在蛋白质分拣及 ESCRT 复合物的解离过程中也发挥协同作用, 但任何一个单独的 MIT-MIM 的作用都不是关键性的(essential), 说明它们具有相互作用及功能上的冗余性(redundancy). 除了基因敲除, Vps4 的显性失活突变体(dominant inhibitory mutant) E233Q 的过表达也能阻断 MVB 途径, 产生 E 室, 使货物和 ESCRT 都积累在 E 室. Vps4-E233Q 能结合但不能水解 ATP, 不抑制多聚化, 能参与内源 Vps4 的多聚化而发挥显性失活作用, 去除 MIT 也不抑制它的多聚化. 有趣的是, 在敲除 Vps4 的酵母中表达用 GFP 替换 MIT 的显性失活突变体 GFP-Vps4-E233Q, 也定位到 E 室, 但被 Vta1 或 Did2 的基因敲除所抑制, 再表达 Vps4-E233Q 则又部分恢复它的 E 室定位, 说明 Did2-Vta1 或 Vps4-Vps4 的相互作用也能引导 Vps4 的膜定位, MIM 的作用虽然重要但并不是绝对必需的.

Vps4 多聚体的组装也需要这些蛋白质的协同作用^[14-19, 59-60]. 在 ATP 存在时, 纯化的 Vps4 在体外能形成多聚体, 但似乎处于多种多聚体的动态平衡中, 难以用常规方法比如超速离心来明确鉴定. 目

前虽然解析了不少单体蛋白的晶体结构, 但在全长蛋白质的晶体结构中观察不到 MIT 的电子密度, 也没有获得高分辨率的 12 聚体的晶体结构. 这都说明 Vps4 具有高度的柔性, 其多聚化是动态的过程, 需要其他因子的调控或稳定作用. 在上述 GFP-Vps4-E233Q 表达实验中^[18], 通过亚细胞分级分离(subcellular fractionation)发现 Vps4-E233Q 存在于膜组分中, 但无论 Vps4-E233Q 存在与否, GFP-Vps4-E233Q 定位到 E 室却总是存在于可溶性组分中, 说明 MIT 的缺失会影响 Vps4 多聚体的稳定性, 可能是因为缺乏 ESCRT III 作为底物的稳定作用. 去除 MIT 或突变 MIT 与 ESCRT III 及 Ist1 的作用位点都使 Vps4-E233Q(MIT*)丧失了显性失活作用, 但能通过全长 Vps4 的作用招募到 ESCRT III 上, 可能参与远离 ESCRT III 的上层 6 元环. 可能与 NSF 类似, 上层 6 元环只负责调控或结构方面的功能, 所以不受 E233Q 的影响; 靠近 ESCRT III 的下层 6 元环负责 ATP 的水解和 ESCRT 的解离, 能被 E233Q 所抑制, 因此两个环的功能可能有所不同. Vta1 与 Vps4 的结合有可能促进 Vps4 的双层环之间或之内的结构稳定性. Ist1 能抑制 Vps4 的多聚化, 与 Vta1、Vps60、Vps2 也有协同作用, 可能通过抑制 Vps4 的活性以防止过早地解离 ESCRT III, 也可能在 Vps4 完成功能后促进或稳定多聚体的解离. Ist1 对 MVB 途径、病毒出芽影响较小, 但在胞质分裂中发挥重要作用, Ist1 或 Did2 的基因敲除都能阻止 Vps4 招募到中间体上并阻止中间体的分离, 因此 Ist1 可能在不同生理活动中对 Vps4 的调控作用也不同.

Vta1、Ist1、ESCRT III 的亚基及类似蛋白质都能与 Vps4 结合, 相互之间也存在复杂的作用, 这都大大增加了它们与 Vps4 相互作用的复杂性^[3-7,18-19,60,64]. 也许这正是此作用网络的特色之处, 通过大量的冗余性、协同的相互作用保证 ESCRT III 能够有效地招募 Vps4, 并提供了多重调控机制以精确调控 Vps4 的多聚化组装和 ATP 酶活性, 保证 Vps4 及时解离 ESCRT III 复合物, 既不能过早也不能过晚, 以维持 MVB 途径的正常运行.

Vps4 是如何解离 ESCRT III 复合物的? Vps4 形成多聚体后, 中间有一个孔道, 其氨基酸残基的突变虽然不影响 Vps4 的组装, 但却能抑制 HIV 的出芽, 因此推测, 在水解 ATP 提供的能量下 Vps4 能牵引 ESCRT III 的亚基通过中间孔道释放到细胞质中^[19], 但没有直接的证据表明这些蛋白质能进入这

个通道. 有人认为, Vps4 可利用水解 ATP 产生的能量使 ESCRT III 亚基的构象发生变化, 直接从 ESCRT III 复合物上释放下来, 但具体机制也不清楚^[18-19, 50]. 由于发现 Vps4 在膜脱落之前就已经定位在中间体或病毒出芽的位置^[7, 12], 推测 Vps4 可能发挥更主动的作用. 目前有两种推测的模式^[14, 17, 19, 49]: 一是认为 Vps4 类似于绞盘, 把 ESCRT III 的亚基一个个拉出来, 使 ESCRT III 形成的蛋白丝直径逐渐减小, 导致芽颈不断收缩, 最终断裂; 二是认为在 ESCRT III 的作用下, 芽颈收缩达到临界状态, 然后 Vps4 与 ESCRT III、Vta1、Ist1、Did2 协同作用, 解离 ESCRT III 复合物, 导致芽颈处的压力突然释放, 膜因而断裂.

4 泛素化蛋白分拣与多囊体生物发生

最近发现^[24, 30], 泛素化的货物蛋白在 MVB 途径中不是被动地进行运输和分拣, 还能主动调控 ESCRT I 和 II 的膜定位和功能, 使蛋白质分拣与多囊体的生物发生偶联起来, 而且 ESCRT 也能被泛素化修饰, 显示了泛素化在 MVB 途径中的重要作用.

泛素化蛋白能促进及稳定 ESCRT I 和 II 的内吞体膜定位^[24]. 融合蛋白 Hse1-DUb 含有 ESCRT 0 的亚基 Hse1 和疱疹病毒 UL36 的去泛素化酶的催化结构域 DUB, 能够在内吞体上去除所有货物蛋白的泛素化, 阻止它们的分拣及腔内囊泡的形成, 使 ESCRT I 和 II 不能定位到内吞体膜上, 但对 ESCRT 0 影响不大. ESCRT 0 通过 FYVE 与内吞体膜结合的比较牢固, 但 ESCRT I 和 II 与膜的结合比较弱, 需要 ESCRT 0、III 和泛素化蛋白的稳定作用. 突变 Hse1-DUB 使其丧失去泛素化活性或改造货物蛋白使泛素不能被 DUB 去除, 都能使泛素化蛋白的分拣及腔内囊泡的产生恢复正常, ESCRT I 和 II 也重新定位到内吞体膜上. 与 Vps4 或 ESCRT 的系统性影响不同, Hse1-DUB 的表达只抑制泛素化蛋白的分拣及腔内囊泡的形成, 不影响液泡及内吞体的形态, 不产生 E 室, 也不影响液泡羧肽酶 Y(carboxypeptidase Y, CPY)的运输, 不影响 Vps4 敲除细胞产生的 E 室及 ESCRT 的积累, 但使泛素化蛋白不能积累在 E 室. 这些发现说明, 泛素化蛋白与 ESCRT 通过 Ub-UBD 介导的相互作用能够稳定 ESCRT I 和 II 与膜的结合, 从而促进 MVB 囊泡形成及蛋白质分拣, 使二者成为紧密偶联的过程.

抑制 K63 连接泛素链 (K63-linked ubiquitin chain, K63-Ub) 的合成也能抑制多囊体的生物发生^[30]. 除了单泛素化(monoubiquitination), 有些货物蛋白也能被多聚泛素化(polyubiquitination), 泛素分子由自身的 K63 位点连接成链^[65-66], 抑制 K63-Ub 的合成也能导致多囊体途径的缺陷. 在酵母中, Rsp5 负责单泛素化和 K63-Ub 多聚泛素化, Ubp2 (ubiquitin-specific protease 2) 则专一性地解离 K63-Ub. 以前发现, 除了待分拣的货物蛋白, ESCRT 复合物也能被单泛素化或多聚泛素化修饰. 研究发现^[30], K63-Ub 在酵母及人类中都能修饰某些货物蛋白, 介导它们的 MVB 途径, 而且酵母 ESCRT 所有的 UBD 都能进行泛素化和去泛素化过程. Bro1 能被单泛素化修饰, Hse1、Vps27、Vps23、Vps36 则被多聚泛素化修饰. Hse1、Vps27、Vps36、Bro1 的泛素化依赖于 Rsp5, Hse1、Vps23、Vps36 的去泛素化依赖于 Ubp2. 抑制 K63-Ub 的合成, 多囊体数目明显减少, 体积也明显变小, 早期内吞体明显增多, 说明抑制了内吞体的成熟及多囊体形成过程. 敲除 Ubp2 的基因, 多囊体形态保持正常, 但数目远多于表达 Ubp2 的细胞, 说明抑制 K63-Ub 的去泛素化能促进多囊体的形成. K63-Ub 介导的蛋白质与 UBD 的亲合力明显高于单泛素化, 推测 ESCRT 的 K63-Ub 修饰也许能促进 K63-Ub 修饰的货物蛋白从与 UBD 的结合中释放出来, 通过调控 ESCRT 的功能来影响腔内囊泡的形成过程.

泛素连接酶、去泛素化酶和 ESCRT 存在直接或间接的相互作用^[25, 30, 65-67]. 在酵母中, Hse1 能结合 Rsp5、Ubp7、Ubp2. Bro1 能结合并激活 Doa4, 介导它的膜定位, 还能结合 Rsp5、Vps23、Snf7. 在人类中, ALIX 能结合并介导 NEDD4 的作用, 还能结合 TSG101 和 CHMP4. STAM 能结合并激活 AMSH 和 UBPY, 前者对 K63-Ub 具有专一性, 后者是广谱的去泛素化酶. CHMP1A、1B、3 都能与 AMSH、UBPY 结合, UBPY 还能结合 CHMP7, AMSH 与 CHMP3 能形成稳定的复合物, 介导 AMSH 或 UBPY 的膜定位. 目前还不清楚 K63-Ub 对 ESCRT 的定位及功能的影响, 也缺乏对 ESCRT 的 UBD 泛素化及去泛素化的系统性研究. 虽然这些蛋白质协同作用的分子机制还不清楚, 在酵母和人类中的作用也有许多差异, 但都能通过直接或间接的作用把泛素连接酶、去泛素化酶及 ESCRT 联系起来, 保证货物蛋白被泛素化修饰以进入 MVB

途径进行分拣,并在进入 MVB 囊泡之前及时去掉泛素分子,这显然对维持细胞内泛素的稳态具有重要意义.

5 结论及展望

上述研究表明,多囊体的生物发生和蛋白质的分拣是紧密偶联的过程,主要由泛素化蛋白、ESCRT、Vps4 的相继协同作用作为最重要的驱动力来完成. ESCRT 0、I、II、III 在内吞体膜上依次组装,类似于按顺序咬合的“齿轮”,与泛素化蛋白和 Vps4 协同作用来保障 MVB 途径的经济、高效、持续的运行.

ESCRT 0 与包涵素形成微域,通过高度柔性的构象和多种 UBD 簇集各种泛素化蛋白,标定 ILVs 出芽位置. ESCRT I 和 II 形成柔性的复合物,构象变化能诱导 ILVs 的出芽,促进 ILVs 的形成并牵引货物蛋白进入 ILVs. ESCRT II 激活 ESCRT III 的多聚化组装,能收缩和剪切芽颈,完成膜脱落过程. ESCRT III、Did2、Ist1、Vta1、Vps60 等的协同作用能高效地招募 Vps4,促进 Vps4 多聚化,激活 ATP 酶活性,使 Vps4 在合适的地点(囊泡芽颈处)和合适的时间(ESCRT III 组装完成后)发挥合适的作用(解离 ESCRT III). 这些 ESCRT 在亚基之间、复合物之间、与其他蛋白质及与膜的结合都按顺序进行,并能协同作用,在 Vps4 解离 ESCRT III 之后也使上游 ESCRT 都解离下来,从而有效地循环利用 ESCRT. ESCRT 0、I、III 和 Bro1、Alix 等都能与泛素连接酶及去泛素化酶直接或间接地作用,以协调泛素化和去泛素化过程. 货物蛋白的泛素化能稳定 ESCRT I 和 II 的膜定位,使蛋白质分拣与囊泡形成偶联起来,保证货物蛋白的及时分拣,在货物蛋白不存在时也避免产生空囊泡. ESCRT 也能被泛素化修饰,可能调控它的功能或定位.

研究发现^[5,16],ESCRT 虽然在囊泡芽颈处发挥作用,但不形成囊泡的衣壳,与包涵素和 COP I (coatamer protein I)、II 的作用不同,也不进入 ILVs. 这些 ESCRT 能与膜发生多处相互作用,通过核心结构相互分离,距离约为 15 nm,与芽颈大小很接近. 在它们的协同作用下,货物蛋白在膜上的运动性也逐步降低到几乎完全丧失的程度. 因此,通过复合物的组装及协同作用,它们不仅能诱导膜的变形及出芽,还可能稳定芽颈的结构来促进囊泡的形成,似乎是芽颈形成的模板(template).

目前,虽然对多囊体途径有了比较深入的认识,但还有许多问题需要解决. 特别突出的是,ESCRT III 亚基及类似蛋白质之间及与 Vps4 之间都存在复杂的作用,前者受 ALIX、CC2D1、极光激酶 B 等的调控,后者受 Vta1、Ist1、Did2 等的调控. 目前研究多局限于少数蛋白质,下一步将需要加强整体层面的系统研究,特别是包括更多蛋白质的体内及体外重建实验,以准确揭示 ESCRT III 和 Vps4 多聚体的组装机制、具体功能及调控机理. 另外,也需要研究泛素化及去泛素化与 MVB 途径的协同机制、ESCRT 泛素化的生理功能、ESCRT 0、I 相互作用的构象变化、ESCRT 及 Vps4 在病毒出芽、胞质分裂中的作用及调控、Vps4 多聚体的三维结构等.

目前国内对 MVB 的研究比较少,但也有一些重要进展. 比如研究发现, TBK1 (TANK-binding kinase 1) 激酶能够磷酸化 ESCRT I 的亚基 VPS37C,从而抑制病毒的出芽^[68], MVB 途径在植物膜蛋白的运输中也发挥重要作用^[69], 肿瘤抑制基因 CHMP1A 能抑制肾癌细胞的扩增^[70], 与 MVB 相关的自噬和外体与肿瘤发生发展的关系也有了进展^[71-72]. 最近发现,昆虫 MVB 途径与昆虫病毒的感染及释放有关^[73]. 家蚕是鳞翅目昆虫的模式生物,能生产蚕丝,也能作为生物反应器,但常受到家蚕核型多角体病毒 (bombyx mori nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 的感染而致很大损失. 我们发现家蚕基因组编码 MVB 途径几乎所有的同源蛋白,目前正开展研究以揭示 MVB 途径在家蚕生长发育及在 BmNPV 感染增殖中的作用,有可能应用到 BmNPV 的防治及家蚕良种的培育上.

参 考 文 献

- [1] de Robertis E, Vaz Ferreira A. A multivesicular cathecol-containing body of the adrenal medulla of the rabbit. *Exp Cell Res*, 1957, **12**(3): 575-581
- [2] Roizin L, Nishikawa K, Koizumi J, *et al.* The fine structure of the multivesicular body and their relationship to the ultracellular constituents of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1967, **26**(2): 223-249
- [3] Hurley J H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, **20**(1): 4-11
- [4] Woodman P G, Futter C E. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, **20**(4): 408-414
- [5] Henne W M, Buchkovich N J, Emr S D. The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 2011, **21**(1): 77-91
- [6] Dobrowolski R, De Robertis E M. Endocytic control of growth

- factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, **13**(1): 53–60
- [7] Caballe A, Martin-Serrano J. ESCRT machinery and cytokinesis: the road to daughter cell separation. *Traffic*, 2011, **12**(10): 1318–1326
- [8] Shahmoradgoli M, Mannherz O, Engel F, *et al.* Antiapoptotic function of charged multivesicular body protein 5: a potentially relevant gene in acute myeloid leukemia. *Int J Cancer*, 2011, **128**(12): 2865–2871
- [9] Fader C M, Colombo M I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ*, 2009, **16**(1): 70–78
- [10] Wang S, Thibault G, Ng D T. Routing misfolded proteins through the multivesicular body (MVB) pathway protects against proteotoxicity. *J Biol Chem*, 2011, **286**(33): 29376–29387
- [11] Gibbings D J, Ciaudo C, Erhardt M, *et al.* Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(9): 1143–1149
- [12] Calistri A, Salata C, Parolin C, *et al.* Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev Med Virol*, 2009, **19**(1): 31–45
- [13] Von Bartheld C S, Altick A L. Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog Neurobiol*, 2011, **93**(3): 313–430
- [14] Saksena S, Wahlman J, Teis D, *et al.* Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, 2009, **136**(1): 97–109
- [15] Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, *et al.* Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 2009, **458**(7235): 172–177
- [16] Wollert T, Hurley J H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 2010, **464**(7290): 864–869
- [17] Adell M A, Teis D. Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex. *FEBS Lett*, 2011, **585**(20): 3191–3196
- [18] Shestakova A, Hanono A, Drosner S, *et al.* Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Mol Biol Cell*, 2010, **21**(6): 1059–1071
- [19] Hill C P, Babst M. Structure and function of the membrane deformation AAA ATPase Vps4. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1823**(1): 172–181
- [20] Ren X, Kloer D P, Kim Y C, *et al.* Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Structure*, 2009, **17**(3): 406–416
- [21] Boura E, Rózycki B, Herrick D Z, *et al.* Solution structure of the ESCRT-I complex by small-angle X-ray scattering, EPR, and FRET spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(23): 9437–9442
- [22] Boura E, Rózycki B, Chung H S, *et al.* Solution structure of the ESCRT- I and - II supercomplex: Implications for membrane budding and scission. *Structure*, 2012, **20**(5): 874–886
- [23] Teis D, Saksena S, Emr S D. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell*, 2008, **15**(4): 578–589
- [24] MacDonald C, Buchkovich N J, Stringer D K, *et al.* Cargo ubiquitination is essential for multi-vesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Rep*, 2012, **13**(4): 331–338
- [25] Richter C, West M, Odorizzi G. Dual mechanisms specify Doa4-mediated deubiquitination at multi-vesicular bodies. *EMBO J*, 2007, **26**(10): 2454–2464
- [26] Does M R, Chen B, Lin H, *et al.* ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III / MVB sorting. *J Cell Biol*, 2012, **197**(3): 407–419
- [27] Zhai Q, Landesman M B, Chung H Y, *et al.* Activation of the retroviral budding factor ALIX. *J Virol*, 2011, **85**(17): 9222–9226
- [28] Pires R, Hartlieb B, Signor L, *et al.* A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*, 2009, **17**(6): 843–856
- [29] McNatt M W, McKittrick I, West M, *et al.* Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway. *Mol Biol Cell*, 2007, **18**(2): 697–706
- [30] Erpapazoglou Z, Dhaoui M, Pantazopoulou M, *et al.* A dual role for K63-linked ubiquitin chains in multivesicular body biogenesis and cargo sorting. *Mol Biol Cell*, 2012, **23**(11): 2170–2183
- [31] Kuang Z, Seo E J, Leis J. Mechanism of inhibition of retrovirus release from cells by interferon induced gene ISG15. *J Virol*, 2011, **85**(14): 7153–7161
- [32] Nabhan J F, Hu R, Oh R S, *et al.* Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(11): 4146–4151
- [33] Prag G, Watson H, Kim Y C, *et al.* The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev Cell*, 2007, **12**(6): 973–986
- [34] Raiborg C, Bache K G, Mehlum A, *et al.* Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J*, 2001, **20**(17): 5008–5021
- [35] Raiborg C, Bache K G, Gillooly D J, *et al.* Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(5): 394–398
- [36] Katzmann D J, Stefan C J, Babst M, *et al.* Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*, 2003, **162**(3): 413–423
- [37] Zhou R, Kabra R, Olson D R, *et al.* Hrs controls sorting of the epithelial Na⁺ channel between endosomal degradation and recycling pathways. *J Biol Chem*, 2010, **285**(40): 30523–30530
- [38] Lim J, Son W S, Park J K, *et al.* Solution structure of UIM and interaction of tandem ubiquitin binding domains in STAM1 with ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **405**(1): 24–30
- [39] Ren X, Hurley J H. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J*, 2010, **29**(6): 1045–1054
- [40] Shields S B, Oestreich A J, Winistorfer S, *et al.* ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *J Cell Biol*, 2009, **185**(2): 213–224
- [41] Mayers J R, Fyfe I, Schuh A L, *et al.* ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple

- ubiquitinated cargoes simultaneously. *J Biol Chem*, 2011, **286**(11): 9636–9645
- [42] Kostelansky M S, Schluter C, Tam Y Y, *et al.* Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT- I heterotetramer. *Cell*, 2007, **129**(3): 485–498
- [43] Ren X, Hurley J H. Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *EMBO J*, 2011, **30**(11): 2130–2139
- [44] Gill D J, Teo H, Sun J, *et al.* Structural insight into the ESCRT- I /- II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J*, 2007, **26**(2): 600–612
- [45] Alam S L, Langelier C, Whitby F G, *et al.* Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT- II EAP45 GLUE domain. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(11): 1029–1030
- [46] Im Y J, Hurley J H. Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT- II complex. *Dev Cell*, 2008, **14**(6): 902–913
- [47] Teis D, Saksena S, Judson B L, *et al.* ESCRT- II coordinates the assembly of ESCRT- III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J*, 2010, **29**(5): 871–883
- [48] Bajorek M, Schubert H L, McCullough J, *et al.* Structural basis for ESCRT- III protein autoinhibition. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16**(7): 754–762
- [49] Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N, *et al.* Divergent pathways lead to ESCRT- III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem Sci*, 2011, **36**(4): 199–210
- [50] Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, *et al.* Structural basis for selective recognition of ESCRT- III by the AAA ATPase Vps4. *Nature*, 2007, **449**(7163): 735–739
- [51] Ghazi-Tabatabai S, Saksena S, Short J M, *et al.* Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT- III subunit Vps24. *Structure*, 2008, **16**(9): 1345–1356
- [52] Hanson P I, Roth R, Lin Y, *et al.* Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT- III protein filaments. *J Cell Biol*, 2008, **180**(2): 389–402
- [53] Lata S, Schoehn G, Jain A, *et al.* Helical structures of ESCRT- III are disassembled by VPS4. *Science*, 2008, **321**(5894): 1354–1357
- [54] Bodon G, Chassefeyre R, Pernet-Gallay K, *et al.* Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport- III (ESCRT- III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2011, **286**(46): 40276–40286
- [55] Fyfe I, Schuh A L, Edwardson J M, *et al.* Association of the endosomal sorting complex ESCRT- II with the Vps20 subunit of ESCRT- III generates a curvature-sensitive complex capable of nucleating ESCRT- III filaments. *J Biol Chem*, 2011, **286**(39): 34262–34270
- [56] Martinelli N, Hartlieb B, Usami Y, *et al.* CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. *J Mol Biol*, 2012, **419**(1–2): 75–88
- [57] Usami Y, Popov S, Weiss E R, *et al.* Regulation of CHMP4 ESCRT- III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A. *J Virol*, 2012, **86**(7): 3746–3756
- [58] Carlton J G, Caballe A, Agromayor M, *et al.* ESCRT- III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science*, 2012, **336**(6078): 220–225
- [59] Landsberg M J, Vajjhala P R, Rothnagel R, *et al.* Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure*, 2009, **17**(3): 427–437
- [60] Babst M, Davies B A, Katzmann D J. Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traffic*, 2011, **12**(10): 1298–1305
- [61] Xiao J, Xia H, Yoshino-Koh K, *et al.* Structural characterization of the ATPase reaction cycle of endosomal AAA protein Vps4. *J Mol Biol*, 2007, **374**(3): 655–670
- [62] Xiao J, Xia H, Zhou J, *et al.* Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway. *Dev Cell*, 2008, **14**(1): 37–49
- [63] Zhao C, Smith E C, Whiteheart S W. Requirements for the catalytic cycle of the N-ethylmaleimide-Sensitive Factor (NSF). *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1823**(1): 159–171
- [64] Tsang H T, Connell J W, Brown S E, *et al.* A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics*, 2006, **88**(3): 333–346
- [65] Wright M H, Berlin I, Nash P D. Regulation of endocytic sorting by ESCRT-DUB-mediated deubiquitination. *Cell Biochem Biophys*, 2011, **60**(1–2): 39–46
- [66] Sato Y, Yoshikawa A, Yamagata A, *et al.* Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature*, 2008, **455**(7211): 358–362
- [67] Solomons J, Sabin C, Poudevigne E, *et al.* Structural basis for ESCRT- III CHMP3 recruitment of AMSH. *Structure*, 2011, **19**(8): 1149–1159
- [68] Da Q, Yang X, Xu Y, *et al.* TANK-binding kinase 1 attenuates PTAP-dependent retroviral budding through targeting endosomal sorting complex required for transport- I . *J Immunol*, 2011, **186**(5): 3023–3030
- [69] Cai Y, Zhuang X, Wang J, *et al.* Vacuolar degradation of two integral plasma membrane proteins, AtLRR84A and OsSCAMP1, is cargo Ubiquitination-independent and prevacuolar compartment-mediated in plant cells. *Traffic*, 2012, **13**(7): 1023–1040
- [70] You Z, Xin Y, Liu Y, *et al.* Chmp1A acts as a tumor suppressor gene that inhibits proliferation of renal cell carcinoma. *Cancer Lett*, 2012, **319**(2): 190–196
- [71] 向波, 易梅, 李小玲, 等. 细胞自噬在肿瘤发生发展中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39**(3): 241–249
- Xiang B, Yi M, Li X L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39**(3): 241–249
- [72] Cai Z, Yang F, Yu L, *et al.* Activated T cell exosomes promote tumor invasion *via* Fas signaling pathway. *J Immunol*, 2012, **188**(12): 5954–5961
- [73] Li Z, Blissard G W. Cellular VPS4 is required for efficient entry and egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2012, **86**(1): 459–472

Biogenesis of Multivesicular Body and Protein Sorting: No One of ESCRT, Vps4 and Ubiquitination Can Be Missed*

XIA Heng-Chuan, ZHANG Chun-Xia, FENG Fan, YUAN Yi, ZHOU Yang,

LIU Xiao-Yong, ZHU Ke-Ming, YAO Qin, CHEN Ke-Ping**

(Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract Multivesicular body (MVB) is a dynamic subcellular organelle formed by invagination of the limiting membrane of late endosome. MVB is an essential transport and sorting station for membranes and proteins in eukaryotic organisms. MVB pathway is intimately involved in various processes, including signal transduction, cytokinesis, gene silencing, autophagy, protein quality control and virus budding. The biogenesis of MVB requires more than 20 vacuolar protein sorting (Vps) proteins. Many of them can assemble into four distinct complexes ESCRT 0, I, II, III (endosomal sorting complexes required for transport) on the endosomal membrane. ESCRTs and Vps4 are considered to be the most important components in MVB pathway. ESCRT 0 together with clathrin can form microdomain on endosomal membrane where they cluster ubiquitinated cargo proteins. ESCRT I and II can induce the budding of intraluminal vesicles (ILVs), prompt the formation process and sort protein cargoes into ILVs. ESCRT III can constrict, cleave the bud neck and finish the membrane abscission, the last stage of MVB formation. Vps4 can disassemble ESCRT complexes and recycle them. Ubiquitinated cargo proteins and ubiquitination can also regulate the localization and function of ESCRTs. Together, these recent discoveries demonstrate that the sequential and co-ordinated actions of ubiquitinated cargo proteins, ESCRTs and Vps4 are the major driving force for the biogenesis of MVB and protein sorting process. In this review, we focus on the protein-protein interaction and mainly discuss the assembly mechanism, interaction and function of ESCRT complexes and Vps4 high-order oligomers, as well as the regulation of ESCRTs by ubiquitinated proteins and ubiquitination. We also suggest prospective studies based on these discussions.

Key words multivesicular body (MVB), endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT), vacuolar protein sorting (Vps), ubiquitination, intraluminal vesicles (ILVs), budding, membrane abscission

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00171

* This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2012CB114600), The National Natural Science Foundation of China (31101673), Natural Science Foundation for Universities of Jiangsu Province (10KJB180001) and Start-Up Research Funding of Jiangsu University for Distinguished Scholars (09JDG005).

**Corresponding author.

Tel: 86-511-88791923, E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

Received: April 6, 2012 Accepted: July 19, 2012