sequences from large fragment genomic DNA is a key step in the positional cloning of disease genes. Exon trapping is one of the most successful methods. The basic principle, methodology improvements and practical achievements of the exon trapping approach are reviewed in detail.

**Key words** exon trapping, positional cloning, genome research

# 突触小泡膜蛋白与神经递质释放的局部调节*

吴馥梅 徐晓虹[1] 强 梅[2]

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

**摘要** 突触小泡膜蛋白及其在神经递质释放过程中的作用已取得若干研究进展. 突触素 I、SY 蛋白、SO 蛋白、SB 蛋白、SG 蛋白等都是突触小泡膜的重要蛋白质, 这些蛋白质在突触小泡的贴靠、膜融合及胞吐作用中起着局部自主性调节作用.

**关键词** 突触小泡, 膜蛋白, 神经递质释放, 胞吐融合

在长期进化过程中, 通过选择作用使突触区释放神经递质形成了局部调节的自主过程, 包括胞吐作用 (exocytosis) 和小泡膜重复循环 (recycling) 的自主调节等. 在这一过程中, 某些蛋白质起着重要作用. 目前, 突触蛋白的研究已取得不少进展. 突触区的蛋白质可以分为突触膜蛋白 (如 $Ca^{2+}$ 通道蛋白、syntaxin、neurexin、SNAP-25 等)、突触胞浆蛋白 (如 NSF、Munc-18 等) 和突触小泡膜蛋白三类, 本文介绍后者.

## 1 突触小泡膜蛋白

在突触小泡膜蛋白中, 研究得较多的有以下几种, 现分别作简要介绍.

### 1.1 突触蛋白

突触蛋白 (synapsin, 又称突触素) 包括突触素 I 和突触素 II, 是突触小泡膜外侧的一种连接蛋白. 这种蛋白与突触小泡膜连接的亲和性大小受磷酸化作用调节, 它是几种不同的蛋白激酶的底物, 其分子尾部是与小泡膜相结合的部位, 有磷酸化作用位点, 通过磷酸化与脱磷酸化作用控制其与小泡膜结合的紧密程度并参与调节小泡在突触区的移动. 有关这种蛋白质的特性与生理意义已有专门介绍[1,2].

### 1.2 突触小泡蛋白

突触小泡蛋白 (synaptophysin, SY 蛋白) 是突触小泡的特异性组成膜蛋白. 这种蛋白质的分子有 4 个跨膜区段, 位于胞浆一侧的羧基端是含有磷酸化作用位点的肽段. 这种蛋白质既是 $Ca^{2+}$ / CaM 依赖性蛋白激酶又是酪氨酸激酶作用的底物, 在进化过程中的保守性较强, 变异不大. SY 蛋白通常以同源四聚体或六聚体的形式存在. 以 $^{32}P$ 标记方法研究表明: 在鼠脑切片中或分离的突触体中, 膜的去极化作用能诱发 SY 蛋白迅速发生磷酸化作用. 其生理生化特征的研究提示: 它可能构成突触小泡特异性膜通道, 并参与突触小泡的形态发生和神经递质释放过程[3~5].

### 1.3 突触孔蛋白

突触孔蛋白 (synaptoporin, SO 蛋白) 与 SY 蛋白都属于通道蛋白家族, 二者在神经递质释放过程参与形成类似于间隙连接的通道.

* 国家自然科学基金资助项目.

[1] 浙江师范大学生物学系, 金华 321004.

[2] 山西医科大学生理学教研室, 太原 030001.

收稿日期: 1996-05-07, 修回日期: 1997-01-27

已有一些研究发现，SY 蛋白与 SO 蛋白在动物不同发育时期以及在中枢神经系统不同部位有不同的表达水平．一些研究结果提示：在不同的发育阶段以及脑内不同的神经元中，突触小泡有不同的膜蛋白组分．对大鼠纹状体而言，胚胎期神经元优先合成 SY 蛋白，出生以后则 SY 蛋白逐渐被 SO 蛋白取代．嗅球内突触小泡的这两种膜蛋白也有不同的表达情况，说明神经元在不同的状态下可以选择性地合成突触小泡膜的特定的蛋白组分[4,5]．

### 1.4 突触小泡小蛋白

突触小泡小蛋白（synaptobrevin，SB 蛋白）又称突触小泡连接膜蛋白（vesicle-associated membrane proteins，VAMPs），包括 SB Ⅰ 和 SB Ⅱ 两种异构体，其分子的 C 端带有一个较小的跨膜区段．这类蛋白质可译为“突触小蛋白”（brevin 是短小的意思）．还有一种类似的蛋白叫做 cellubrevin（即 CB 蛋白或细胞小蛋白），是与 SB 蛋白属于同一个大家族，但 CB 蛋白分布很广泛[6,7]．

### 1.5 突触结合蛋白

突触结合蛋白（synaptotagmin，SG 蛋白），分子质量为 65 ku，又称 p65 蛋白，是突触小泡膜的一种组成蛋白，参与调节神经递质的排放．其肽链 N 端朝向突触小泡内侧，只有一个跨膜区，功能区段主要在 C 端，这个区段是与 $Ca^{2+}$ 及磷脂相结合的部位．这种蛋白有 4 种异构体，不同形式的 SG 蛋白有不同的组织分布．啮齿类动物脑组织中 SG 蛋白 Ⅰ 和 Ⅱ 有较高水平的表达，这两种形式是起主要作用的组分[8,9]．

以上五种是研究较多的突触小泡膜蛋白，但不是突触小泡膜蛋白的全部．例如，还有一种值得重视的蛋白质是 Rab 亲和蛋白-3A（rabphilin-3A），是结合 $Ca^{2+}$ 与磷脂的一种膜蛋白，以其分子的 N 端与突触小泡膜相连，可能有某种尚未揭示的潜在性功能[10]．

## 2 突触小泡膜与突触前膜相互作用

突触小泡要向突触间隙释放神经递质，首先必须贴靠（docking）在前膜上．Docking 本是形态学的术语，但其分子水平的概念是指突触小泡蛋白与突触前膜蛋白的相互作用．紧接在“贴靠”后面发生的步骤就是融合（fusion），即突触小泡的膜与突触前膜融合起来并产生胞吐融合孔（exocytotic fusion pore）或称突触孔（synatopore），这是神经递质释放过程的一种暂时结构．融合孔的产生是通过“半融合机制”（a hemifusion mechanism）介导的，某种蛋白质支架（a protein scaffold）对胞吐融合孔起调节作用，小分子的 GTP 结合蛋白可以激活蛋白质支架的组装，引起小凹穴形成，促进两膜融合，某些 $Ca^{2+}$ 结合蛋白也参与调节作用[11]．目前，关于胞吐融合的分子机制以及突触小泡膜蛋白的作用正是研究的热点，并已取得若干进展．

探讨突触小泡膜与突触前膜相互作用的介导分子是关键问题之一．已发现两种可溶性蛋白是膜融合的重要因素，这两种蛋白是 N-乙基马来酰亚胺敏感因子（N-ethylmaleimide-sensitive factor，NSF）和突触小体相关蛋白（synaptosome-associated protein，SNAP），后者包括三种，即 α-，β-，γ-SNAP，其受体简称为 SANRE，所谓 SANRE 学说即是认为两膜融合作用与此受体有关[12]．已知肉毒杆菌神经毒素（botulinum neurotoxins）和破伤风毒素（tetanus toxin）都能有效地抑制神经递质的释放，其作用机制涉及到突触小泡膜及突触前膜上某些特异性蛋白（如 SB 蛋白和突触融合蛋白），上述神经毒素能引起这些特异性蛋白的 $Zn^{2+}$-依赖性蛋白水解作用，从而破坏小泡膜与突触前膜融合，必然也就抑制了神经递质释放．有趣的发现是，这些蛋白质能与 NSF 及 SNAP 形成 ATP-依赖性的复合物，这种复合物已被假定为膜的融合机构（fusion-machine）[11,12]．在这一过程中，GTP 结合蛋白和 $Ca^{2+}$ 结合蛋白协同激活融合孔的蛋白支架而调节胞吐作用．已有实验证据表明，SG 蛋白与 SB 蛋白都能与突触前膜的突触融合蛋白（syntaxin）及 $Ca^{2+}$ 通道蛋白形成复合物，

提示这些蛋白质在融合孔的蛋白支架中起重要作用. 同时, 在胞吐融合机构与 $Ca^{2+}$ 通道之间应当有某种分子偶联, 而 syntaxin 是质膜上的一种 SNARE, 它既可与钙通道蛋白结合又可与突触小泡膜结合, 起了这种分子偶联 (molecular coupling) 作用[13].

枪乌贼的巨大轴突有很多优越性 (便于分子探针的微注射和对蛋白质的分析), 可用于研究突触小泡蛋白在神经递质释放中的作用. 已有实验证据表明: SB 对触发神经递质释放的 $Ca^{2+}$ 信号并不直接产生影响, 而是参与突触前 $Ca^{2+}$ 内流以后的某一环节而促进小泡与突触前膜融合. 一种设想认为, SB 蛋白与其他蛋白质 (如 SG 蛋白、syntaxin、SNAP-25 等) 相结合, 共同参与突触小泡的贴靠及融合过程. 但也有研究结果提示: SB 蛋白实际上是在突触小泡贴靠以后的某个环节参与胞吐融合作用, 并可能是以其 N 端肽段与其他蛋白相互作用而促进融合的[6]. SG 蛋白参与调节作用的研究更多[8,9], 概括起来可以归纳为以下几点: a. SG 蛋白是神经递质释放的必要成分, 如果缺乏 SG 蛋白 (人为破坏这种蛋白质的基因表达或产生突变体) 就会引起递质释放的障碍; b. SG 蛋白可能是胞吐作用的调节因子; c. SG 蛋白单独作为钙受体起作用或者作为协同受体 (co-receptor) 起作用; d. 由于 SG 蛋白可与突触前膜蛋白质 (如 syntaxin 及 neurexin) 相互作用, 因此有人推测 SG 蛋白调节神经递质释放的作用发生在 "贴靠" 这个环节中. 在 $Ca^{2+}$ 的触发下突触小泡怎样被引导向突触前膜呢? 有实验证据提示: 正是由于突触小泡膜上的特异性蛋白质 (如 SG 蛋白和 SB 蛋白) 作为配体与突触前膜上受体相互作用的结果.

对突触小泡的其他几种膜蛋白也有报道. 例如, Greengard 等[14]提出了动员突触小泡的一种特异性钙调分子机制. 他们研究了突触小泡连接蛋白 synapsin Ⅰ, 这种蛋白可由 $Ca^{2+}$/CAM 依赖性蛋白激酶 Ⅱ 激活而发生磷酸化作用. 离体实验和微注射实验的结果提示: 突触素 Ⅰ 是作为对 $Ca^{2+}$ 和磷酸化都敏感的固定物 (anchor) 而起作用, 它能使突触小泡连接到突触前的支架上. 又如, 有实验表明: SY 蛋白参与了胞吐融合孔的形成过程, 并可能是构成融合孔的结构蛋白. 总的看来, 在突触小泡贴靠和融合过程中有多种蛋白质共同参加作用并引起复杂的级联反应 (cascade of reactions). 目前对上述几种蛋白质都有研究, 从不同的侧面提供了不少实验证据, 但对几种蛋白质协同作用的全貌尚未揭示出来. 此外, 糖蛋白胶 (proteoglycan gel) 和磷脂的电荷及极性基团所形成的融合界面微环境在胞吐作用中也会影响神经递质的释放. 人们设想, 糖蛋白胶的凝聚作用 (condensation) 和脱凝作用 (de-condensation) 或膨胀 (swelling) 都可调节递质释放的速度[11]. 值得注意的一个有趣的事实是: 已知间隙连接 (gap junction) 在细胞之间信息传递中是一种重要结构, 现在又发现化学突触上的胞吐融合孔竟与间隙连接的结构极为相似, 这其中的生物学问题还有待人们进一步探讨.

## 3 突触小泡膜的重复循环

突触小泡释放神经递质以后, 小泡膜被突触区回收并重新利用. 小泡膜如何进行回收? 围绕这个问题有不少研究, 现在看来, 有两种回收的方式. 经典的理论认为, 融合进入突触前膜的小泡膜通过胞纳作用 (endocytosis) 重新回到胞浆, 进行再循环, 这是慢速的回收过程. 在这一过程中, 壳套小泡 (coated vesicles, 或译为胞被小泡) 的形成是重要的一步, 其中笼形蛋白 (clathrin) 及其连接复合蛋白 (adaptins) 起着调节作用. 还有资料表明: SG 蛋白也参与胞纳过程的调节作用, $Ca^{2+}$ 对胞吐作用和胞纳作用的复杂影响可能是以 SG 蛋白为中介的, 因而有人认为 SG 蛋白是调节胞吐与胞纳作用的多功能蛋白. 参与胞纳作用的另一种重要蛋白是发动蛋白 (dynamin), 这是一种与壳套凹穴 (coated pits) 相连的 GTP 结合蛋白. 有实验表明: 果蝇 dynamin 基因突

变可导致其神经末梢的胞纳作用障碍，而正常情况下的 dynamin 蛋白能自我组装成环形结构，这种结构可压缢壳套凹穴的颈部，从而使壳套凹穴向壳套小泡转变，即凹穴颈部断裂，于是壳套小泡形成[15,16]. Dynamin 可被 PKC 磷酸化以及被钙调神经磷酸酶 (calcineurin) 脱磷酸化，因此 dynamin 的磷酸化状态的改变也为 $Ca^{2+}$ 调节的胞纳作用提供某种机制. 释放递质以后，突触小泡膜还可以经快速途径回收，即通过“吻合并离去”(kiss and run) 的方式进行快速回收[13]. 但是这种方式还缺少直接的实验证据. 有人认为上述两种方式 (慢速与快速) 可能并存，快速回收方式也许在非生理刺激条件下 (如高频刺激) 才发生.

## 参 考 文 献


1 叶世鸣，吴馥梅. 突触小泡相关磷蛋白——突触素 I. 生理科学进展，1989，**20** (3)：271~ 272

2 杜红燕，吴馥梅. 突触素 I 的若干研究进展. 生物化学与生物物理进展，1995，**22** (5)：422~ 426

3 Rubenstein J L, Greengard P, Czernik A J. Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. Synapse, 1993, **13**: 161~ 172

4 Bergmann M, Schuster T H, Grabs D *et al*. Synaptophysin and synaptoporin expression in the developing rat olfactory system. Dev Brain Res, 1993, **74**: 235~ 244

5 Ovtscharoff W, Bergmann M, Marquez-pouey B *et al*. Ontogeny of synaptophysin and synaptoporin in the central nervous system: differential expression in striatal neurons and their afferents during development. Dev Brain Res, 1993, **72**: 219~ 225

6 Hunt J M, Bommert K, Charlton M P *et al*. A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. Neuron, 1994, **12**: 1269~ 1279

7 Pevsner J, Hsu S-C, Braun J E A *et al*. Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. neuron, 1994, **13**: 353~ 361

8 Koontz M A, Hendrickson A E. Comparison of immunolocalization patterns for the synaptic vesicle proteins p65 and synapsin I in macaque monkey retina. synapse, 1993, **14**: 268~ 282

9 DeBello W M, Betz H, Augustine G J. Synaptotagmin and neurotransmitter release. Cell, 1993, **74**: 947~ 950

10 Li C, Takei K, Geppert M *et al*. Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle $Ca^{2+}$/phospholipid-binding protein, depends on rab 3A/3C. Neuron, 1994, **13**: 885~ 898

11 Monck J R, Fernandez J M. The exocytotic fusion pore and neurotransmitter release. Neuron, 1994, **12**: 707~ 716

12 Whiteheart S W, Kubalek E W. SNAPs and NSF: general members of the fusion apparatus. Trends Cell Biol, 1995, **5**: 64~ 68

13 Schweizer F E, Betz H, Augustine G J. From vesicle docking to endocytosis: intermediate reactions of exocytosis. Neuron, 1995, **14**: 689~ 696

14 Greengard P, Valtorta F, Czernik A J *et al*. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. Science, 1993, **259**: 780~ 785

15 Hinshaw J E, Schmid S L. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. Nature, 1995, **374**: 190~ 192

16 Takei K, Mcpherson P S, Schmid S L *et al*. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-γ-s in nerve termianls. Nature, 1995, **374**: 186~ 190


**The Membrane Proteins of Synaptic Vesicle and Local Regulation in the Neurotransmitter Release.**

WU Fumei, XU Xiaohong, QIANG Mei (*Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing* 210093, China).

**Abstract** The membrane proteins of synaptic vesicle and their role in the neurotransmitter release have been extensively studied. Recent progress has occurred in this field. Synapsin I, synaptophysin, synaptoporin, synaptobrevin, synaptotagmin etc. are important proteins in membrane of synaptic vesicle. They play local and autonomous regulation in the docking, membrane fusion and exocytosis of synaptic vesicle, especilly in the mechanism of exocytotic fusion. A brief review of these aspects has been made.

**Key words** synaptic vesicle, membrane protein, neurotransmitter release, exocytotic fusion