

网格蛋白介导的内吞作用机制^①

姚鹏程, 叶恭银

(浙江大学 应用昆虫研究所, 中国浙江 杭州 310029)

摘要: 受体介导的内吞作用是公认的生物体摄取生物大分子的途径, 而网格蛋白介导的内吞又是最重要的受体介导方式. 结合国内外最新报道, 介绍了网格蛋白和衔接蛋白的结构、分子特性和功能; 从衔接蛋白、网格蛋白的招募; 包被小凹的内陷、缢缩和包被液泡的芽殖和包被液泡的脱壳等过程, 阐释了网格蛋白介导的内吞作用机制.

关键词: 网格蛋白; 衔接蛋白; 包被液泡; 网格蛋白介导的内吞

中图分类号: Q492

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2003)S0-0022-04

The Mechanism of Clathrin-mediated Endocytosis

YAO Peng-cheng, YE Gong-yin

(Institute of the Applied Entomology of Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

Abstract Receptor-mediated endocytosis is the principal route which organisms uptake the biological mass molecular. While the clathrin-mediated endocytosis is the main way of the receptor-mediated endocytosis. The adaptor proteins and clathrin's atomic structure, molecular organization and functions are detailed. The mechanism of clathrin-mediated endocytosis from the recruitment of adaptor proteins and clathrin, the invagination of coated pits, constriction and budding of vesicle, the uncoating of vesicle are reviewed.

Key words clathrin; adaptor protein; coated vesicle; clathrin-mediated endocytosis

(Life Science Research, 2003, 7(2): 22~ 25)

膜运输是与生物发生、细胞器膜的形成和细胞器间物质交流紧密相连的一个过程. 内吞作用(endocytosis)是目前公认的生物体摄取生物大分子的主要途径, 它是1964年Roth等在研究埃及伊蚊卵子摄取卵黄蛋白超微结构时首次观察到的. 卵黄物质开始沉积时, 滤泡上皮收缩, 呈现凹窝, 凹窝内充满卵黄物质后形成液泡进入卵母细胞^[1]. 包被小凹(coated pit)和包被液泡(coated vesicle)的内吞作用即为受体介导的内吞作用(receptor-mediated endocytosis). 包被液泡外面骨架

为网格蛋白(clathrin), 里面为衔接蛋白(adaptor). 网格包被液泡存在于所有具核的细胞中, 它们是蛋白质和脂类从质膜运到胞内的方式, 也是蛋白质和脂类从反式高尔基网状物(trans-Golgi network, TGN)到核内体的载体. 网格蛋白在调控质膜蛋白组成中起重要作用, 研究它对明确细胞和周围环境是如何相互作用; 促有丝分裂(mitogenic)信号的转导; 细胞对营养的摄取; 建立细胞外环境细胞特性(identity)包括与免疫系统的作用和维持细胞内环境的稳定性有重要的意义.

① 收稿日期: 2003-05-05; 修回日期: 2003-06-01

基金项目: 国际基金(IFS: 4267042)和国家自然科学基金资助

作者简介: 姚鹏程(1977), 男, 湖北钟祥人, 硕士研究生, 从事昆虫生理和分子生物学研究. E-mail: yaopengcheng2001@sina.com; 叶恭银(1966), 男, 浙江建德人, 浙江大学教授, 博士生导师.

网格蛋白是非常热门的研究领域,目前在原子结构、分子特性、作用机制等方面取得了重大进展,本文结合国内外的最新报道,综述了网格蛋白介导的内吞作用机制^[2-4]。

1 网格蛋白

1964年Roth等在研究埃及伊蚊卵子摄取卵黄蛋白时,首次发现包被液泡,在研究泡膜上小凹(invagination)时,发现硬毛状的外壳(coats),在电镜下呈五边形、六边形排列闭合双层的足球状的晶体结构,其外径600~2000 Å,晶格顶点相距160 Å,1976年Pearse用SDS-PAGE研究外壳蛋白成分时,将其中180~190 kD的蛋白带命名为网格蛋白。网格蛋白形似蜘蛛,由3根大链在顶部聚合而成,也称为三脚复合蛋白(triskelion),其每根腿长约475 Å,厚约20 Å,腿的中部有一膝状弯曲,把它分成规则的三体。大链和辅助蛋白相结合形成中心(hub),从中心到弯曲部称为近腿,从弯曲部到远端成为远腿。每根腿由一个190 kD的大链和一个25 kD的小链在顶点处相连。网格蛋白的中心位于每个晶格顶点,腿沿两边伸展,膝位于相邻的顶点,每个多边形的边由两个反平行的近腿组成,远腿的末端伸向笼形的中心,通过一个相对短β铰链连接到衔接蛋白耳状物^[3,4]。

除人类的网格蛋白大链基因有两个拷贝外,绝大多数生物只有一个拷贝。此基因在脑组织中

大量表达,在心脏、骨骼肌和睾丸组织中表达较少,从低等的酵母到高等的人类,大链的蛋白由1675个氨基酸组成,其序列高度保守,只有1~3个残基的变化。大链通过4个螺旋束与小链相作用,小链的C端朝向顶点,小链和大链前腿结合并不是单一的α螺旋,而是α螺旋状的之字形,每个之字形约由30个氨基酸组成^[4]。绝大多数哺乳动物组织有两种既相关又差异明显的小链。每个小链分子质量为20~26 kD,其N端90个残基富含脯氨酸和甘氨酸,都含有10个重复序列,每个重复序列由7个氨基酸组成。呈缠绕α螺旋(α helix coiled coile),其中第5、6位是保守的,这71残基的中心是小链与大链结合的必要条件^[3]。小链能与Ca²⁺和钙调蛋白结合,易磷酸化,因此,小链可能作为调控亚基影响网格蛋白的组装和拆卸^[4]。

2 衔接蛋白

衔接蛋白顾名思义是起连接作用,它具有膜结合与定位、识别分类信号和结合肌醇磷酸化的功能^[4],既能连接货物(cargo)、网格蛋白,还能连接质膜磷脂头簇(headgroup)。衔接蛋白位于包被液泡的内部,现已发现4种衔接蛋白(AP1-4),它们都由一对100~130 kD大亚基(γ, β, α, δ和ε中的一对),一个~50 kD中亚基(μ)和一个17~20 kD小亚基(σ)组成,见下表。

表1 衔接蛋白的种类及特征

Table 1 The types and characteristic of the adaptors

类型 Types	亚基组成 Subunits	识别受体 Recognize receptors	存在部位 Location	参考文献 References
AP-1	γ ₁ , β ₁ , μ ₁ 和 σ ₁	6-磷酸甘露糖受体	TGN 包被液泡	[3~5]
AP2	α, β ₂ , μ ₂ 和 σ ₂	运铁蛋白 transferrin、低密度脂蛋白和表皮生长因子受体	质膜包被液泡	[3~6]
AP-3	δ, β ₃ , μ ₃ 和 σ ₃	酪蛋白酶	闭合核内体	[3,4]
AP-4	ε, β ₄ , μ ₄ 和 σ ₄	运铁蛋白、脱唾液酸受体	闭合TGN	[3,7]

在电子显微镜下,衔接蛋白像一个砖核通过一个活动的铰链与小“耳状物”相连,耳状物相当于大亚基的C端,砖核由大亚基的N端及μ和σ亚基组成。大亚基又由一个主干(70~75 kD)和一个附枝(~30 kD)组成,它们由一个伸展的易水解的链相连。主干主要由α螺旋管(solenoid)组成,附枝由α/β结构混合而成。衔接蛋白(AP1-4)中对应

的亚基,其功能相似。α和β亚基介导膜的定位和网格蛋白与其它组成部分如动力蛋白 dynamin, 辅助蛋白 auxilin, Eps15等蛋白间相互作用,β链似乎识别其他内吞信号如LL模块;μ₂亚基通过结合“Yxx”分类信号,识别胞质尾区受体和内吞货物;σ₂的功能还不清楚^[5,6]。

3 作用机制

网格蛋白的从招募到终解离是非常短暂的过程。为了方便理解其作用机制,可把这个过程分为:衔接蛋白和网格蛋白的招募;包被小凹的内陷、缢缩和液泡的芽殖;包被液泡的脱壳几个过程。

3.1 衔接蛋白和网格蛋白的招募

在质膜受体胞质尾区分类信号和停靠蛋白(docking protein)的作用下,招募 AP2 复合体到高活性、可饱和、易酶解位点,启动网格蛋白包被液泡在质膜的形成^[3,4]。分类信号(sorting signal)由 4~6 个氨基酸短肽组成,它决定特定的分子在液泡中运输和最终的归宿,控制 3 类细胞表面受体进入到包被小凹中,它们分别是:1) 低密度脂蛋白受体或运铁蛋白受体;2) 表皮生长因子受体或 β 肾上腺素受体;3) CD4 糖蛋白受体。大多数内在化受体含有酪氨酸分类信号。酵母双杂交实验证明 AP2 衔接蛋白 μ 亚基 C 末端区域识别“Yxx”酪氨酸内吞分类信号^[5]。

衔接蛋白的招募受以下几个因素的影响:其一,衔接蛋白可以自我组装,衔接蛋白组装的越多, μ 亚基识别“Yxx”内吞分类信号的能力越强^[5];其二,受磷酸化的调控,衔接蛋白铰链区丝氨酸和苏氨酸的磷酸化影响衔接蛋白与网格蛋白、膜结合能力,衔接蛋白磷酸化后不能被装配到的笼子里。衔接蛋白有两个磷酸肌醇结合位点,一个位于 α 亚基 N 端前 80 个氨基酸,主要是第 55 位、第 56 位、第 57 位的赖氨酸起重要作用,第 12 位 Gly、11 位 Arg、39 位 Asn、43 位 Lys、53 位 Tyr、57 位 Lys 和 61 位 Lys 是 IP6 重要结合位点;另一个位于 μ_2 的 C 端,通过 μ 亚基第 341、343、356 位 Lys 起作用^[6], μ_2 的 T156 是另外一个重要的磷酸化靶标,它被衔接蛋白相连激酶(adaptor-associated kinase, AAK1)特异性地修饰,与网格包被液泡共纯化。Thr156 的磷酸化有利于对含有运铁蛋白的包被小凹的形成、有利于 AP2 结合到“Yxx”和二亮氨酸“D¹E¹xxLL”的模块^[3,8,9],AP2 与 PI3P、P(3,4)P2 磷酸肌醇在肌醇环 D-3 位置的磷酸化,识别“Yxx”模块能力增加;其三,受“YQRL”肽的影响,AP2 与“YQRL”肽相连,导致突触性结合蛋白的结合能力的增加。

质膜招募 AP2 后,AP2 通过铰链区网格蛋白盒“L[D/E]₁[D/E]₂”(是庞大的疏水残基)与

网格蛋白相作用,组装网格蛋白到质膜上,另外在弱酸和存在 Ca^{2+} 条件下,网格蛋白可以自我组装;通过附枝域结合“D¹F”模块和其他蛋白,招募大量辅助或调控蛋白如 Eps15, AP180, epsin, 突触特异性蛋白 amphiphysin, 辅助蛋白 auxilin, GAK, AAK 和 synaptojanin 等,有利于网格蛋白的组装^[3,4,10]。但在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中敲除衔接蛋白基因,并不消除包被液泡,至少说明在酵母中,网格蛋白的招募不依赖衔接蛋白^[3]。

3.2 包被小凹的内陷、缢缩和液泡的芽殖

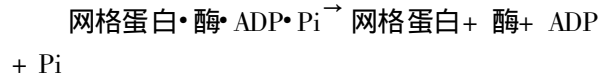
在离体条件,没有核酸和胞质条件下,平面网格蛋白网格能转型为弯曲的小凹;在活体内,内吞包被液泡也不同程度的弯曲,似乎在液泡生长过程中网格蛋白晶格渐近弯曲。内陷可能是由于网格蛋白在晶格内或网格蛋白间组装时结构的改变和重排引起的。

网格蛋白包被液泡的芽殖需要含有 GTP 酶的动力蛋白,动力蛋白在体外形成指环形或管形,它是液泡从膜上解离的扳机。动力蛋白属于大 GTP 酶亚族,在酵母、植物和高等真核生物中高度保守。利用失能性突变研究受体介内吞哺乳动物细胞瞬间转染构建 GTP 超表达时,发现了动力蛋白的功能。动力蛋白具有两方面功能:其一,在低离子浓度缓冲液或有人工模板如微管、酸性磷脂条件下,动力蛋白可以自我组装成单一环状或螺圈的超分子结构,激活动力蛋白 GTP 酶活性。GTP 结合启动动力蛋白从网格蛋白上重新分配,干扰它结合部分,在顶部使动力蛋白自我组装到螺旋环,形成缢缩包被小凹,这些螺旋环含有一个由 20 个动力蛋白分子组成的螺圈;其二,动力蛋白水解驱使动力蛋白的拆卸。GTP 水解导致全体动力蛋白环状变紧,最终使包被液泡解离。包被液泡的芽殖需要 ATP 水解,暗示动力蛋白不足以驱动液泡的拆卸。动力蛋白通过其 C 末端富含脯氨酸和精氨酸结合到网格蛋白晶格上;通过“血小板-白细胞”C 激酶(pleckstrin)同源域识别 PI(3,4,5)P₃ 和 PI(4,5)P₂ 与膜脂直接作用;通过结合 SH3 域招募突触特异性蛋白和溶血磷脂乙酰转移酶 endophilin。溶血磷脂乙酰转移酶催化反应的产物结合花生酸(arachidonic acid)和溶血磷脂酸(lysophosphatidic),使芽孢脂双层的变形,有利于包被小凹的形成^[4,11]。

3.3 包被液泡的脱壳

包被液泡的脱壳需要 hsc70、辅助蛋白和

ATP^[3-5]. 网格蛋白的大链有两个位点与衔接蛋白相互作用: 一个在近腿或中心; 一个在远腿. 另外, hsc70 与网格蛋白也在这两个位点相互作用. 脱壳的机理可能是破坏网格蛋白与衔接蛋白间的作用^[4]. 微注射抗 hsc70 单克隆抗体抑制受体介导的内吞, 阻止配体到核内体, 导致配体在网格蛋白相连的结构上累积说明 Hsc70 与包被液泡的脱壳相关. Hsc70 属于 70 kD 热激关联蛋白家族 (heat shock cognate protein, hsc70), 在细胞中含量非常高, 占细胞蛋白的 1% ~ 2%, 它具有调节胞内蛋白的折叠状态; 调节蛋白跨内质网、线粒体、溶酶体和核内体膜的运输; 拆卸寡聚复合体; 在应激条件下, 阻止蛋白的聚集等功能^[15]. Hsc70 通过 C 末端的“EEVD”模块与辅助蛋白中 J 模块 (类似大肠杆菌中热激蛋白“Dna-J”同源域) 相作用而表现活性^[12, 13]. 辅助蛋白分子质量为 100 kD, 编码它的基因全长为 2472 bp, 有两个作用域: 一个连接网格蛋白 (由 547~814 片段编码); 一个连接 hsc70 (由 815~910 片段编码). 辅助蛋白不仅可招募 hsc70 到网格蛋白包被液泡的活性, 还可刺激 hsc70 ATP 酶的活性. 在体外 hsc70, 介导网格蛋白从包被液泡上解离. 其反应如下:



过表达 hsc70 突变型, 阻断运铁蛋白受体的循环, 使“装配—拆卸”平衡向装配方向移动. 包被液泡的脱壳是一个耗能过程, 需要消耗 ATP. 解离的网格蛋白和衔接蛋白可再循环, 参与下一轮包被液泡的组装. Hsc70 解离网格蛋白, 但不解离衔接蛋白, 什么因子解离衔接蛋白目前尚不清楚^[16-18].

4 展望

网格蛋白研究取得了重大进展, 但以下问题尚待进一步探讨: 1) 什么蛋白启动质膜、TGN 和核内体外壳的形成? 又是受什么信号启动? 2) 包被小凹内陷的机理是什么? 3) 在不同膜上包被液泡的芽殖机制是什么? 4) 网格蛋白的晶格是如何脱壳的? 5) 什么样的结构转变是使 AP2 中心调节开启活性状态与非活性状态? 一种可能是 μ_2 C 末端区引人注目的改变了方向 (约 90°), 从一紧紧连接中心的支座 (rest) 到形成一个远离中心的突出, 近似释放一个载有发条的刀片 (spring loaded blade). 推断这个新形成物 C 末端方向平行于膜,

以致它能同时联系膜结合磷酸肌醇前头群的磷酸盐和跨膜运输蛋白胞质尾区的“Y_{XX}”分类信号. 另一种假设 μ_3 C 末端区通过 μ 衔接蛋白被疏松的限制到中心, 当释放时, 有许多方向, 直到在胞质尾区找到并结合“Y_{XX}”序列. 无论哪一种机制都需要去解释为什么许多不同条件导致 AP2 活化. 如 μ_3 连接磷酸化有利于暴露“Y_{XX}”结合点. 总之, 随着研究的深入, 先进的科学手段的运用, 对网格蛋白介导的内吞作用将得到更详细的阐述.

参考文献 (References):

- [1] ROTH T F, PORTER K R. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *J Cell Biology*, 1964, 20: 313-332.
- [2] MUKHERJEE S, GHOSH R N, MAXFIELD F K. Endocytosis [J]. *Physiological Review*, 1997, 77: 759-803.
- [3] KIRCHHAUSEN T. Clathrin [J]. *Annual Review Biochemistry*, 2000, 69: 699-727.
- [4] SCHMID S L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process [J]. *Annual Review Biochemistry*, 1997, 66: 511-548.
- [5] KIRCHHAUSEN T. Clathrin adaptors really adapt [J]. *Cell*, 2002, 109: 413-416.
- [6] COLLINS B M, MCCOY A J, KENT H M, *et al.* Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex [J]. *Cell*, 2002, 109: 523-535.
- [7] DELLANGELICA E C, MULLINS C, BONIFACINO J S. AP4, a novel protein complex related to clathrin adaptors [J]. *J Biological Chemistry*, 1999, 274: 7278-7285.
- [8] SLEPNEV V I, OCHOA G C, BUTLE M H, *et al.* Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes [J]. *Science*, 1998, 281: 821-824.
- [9] CONNER S D, SCHMID S L. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis [J]. *J Cell Biology*, 2002, 156: 921-928.
- [10] TER H, HARRISON S C, KIRCHHAUSEN T. Peptide in groove interactions link target protein to beta-propeller of clathrin [J]. *Proceeding National Academic Science USA*, 2000, 97: 1096-1110.
- [11] SEVER S, DAMKE H, SCHMID S L. Dynamin: GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting steps in clathrin-mediated endocytosis [J]. *J Cell Biology*, 2000, 150: 1137-1148.
- [12] PRASAD K, HEUSER J, EISENBERG E, *et al.* Complex formation between clathrin and uncoating ATPase [J]. *J Biology Chemistry*, 1994, 269: 6931-6939.
- [13] HOLSTEIN S E, UNGEWICKLL H, UNGEWICKLL E. Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the Dna-J homologue auxilin [J]. *J Cell Biology*, 1996, 135: 925-937.

(下转第 69 页)

- [2] ITOH Y, IMAI T, FUJINO O, *et al.* Subclinical Sjogren's Syndrome and anti-Ro/SSA positive autoimmune fatigue syndrome in children [J]. *Mod Rheumatol*, 2002, 12: 201-205.
- [3] KERSHNAR E, WU S Y, CHIANG C M. Immunolaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIH and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complexes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(51):34444-34453.
- [4] ZHOU D, ZHOU H, NI J, *et al.* Membrane supports as the stationary phase in high-performance immuno-affinity chromatography[J]. *Anal Chem*, 1999, 71(1): 115-118.
- [5] KUSSAK C S, ANDERSSON B, ANDERSSON K, *et al.* Determination of aflatoxin in human urine by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(8): 1841-1848.
- [6] 鲍时强, 姚汝华. 蛋白质分离纯化与层析技术进展[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 1996, 24(12): 98-103.
- [7] VENABLES P J W, SMITH P R, MAINI R N. Purification and characterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens[J]. *Clin Exp Immunol*, 1983, 54: 731-738.
- [8] REICHLIN M. ANA negative systemic lupus erythematosus sera revisited serologically[J]. *Lupus*, 2000, 9(2): 116-119.
- [9] RAY P S, DAS S. La autoantigen is required for the internal ribosome entry site-mediated translation of coxsackievirus B3 RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(20): 4500-4508.
- [10] HUHN P, PRUIJN G J M, VENROOIJ W J, *et al.* Characterization of the autoantigen La/SSB as a dsRNA unwinding enzyme [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(2): 410-416.
- [11] MADDISON P J, SKINNER R P, VLACHOYLANLOPOULOS P, *et al.* Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and interrelations in connective tissue disease sera[J]. *Clin Exp Immunol*, 1985, 62: 337-345.
- [12] CLAIR E W, KENAN D, BURCH J A. The fine specificity of anti-La antibodies induced in mice by immunization with recombinant human La autoantigen[J]. *J Immunol*, 1990, 144(10): 3868-3876.
- [13] STEFANO J E. Purified lupus antigen La recognizes an oligonucleotide stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts[J]. *Cell*, 1984, 36: 145-154.
- [14] MANOUSSAKIS M N, KISTIS C G, AIDINIS V, *et al.* Detection of human-specific anti-La(SSB) antibodies in patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 1995, 8(6): 959-969.
- [15] 谭立明, 王外梅, 樊有龙, 等. 干燥综合症患者特异性抗体的检测[J]. *江西药学检验*, 1997, 15(2): 12-13.
- [16] 彭晓东, 张瑞薇, 刘瑾, 等. 两种检测抗可提取性核糖核抗原抗体方法的比较[J]. *华西药理学*, 2002, 17(1): 89-90.
- [17] KAVANAUGH A, TOMAR R, REVEILLE J, *et al.* Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test for specific autoantibodies to nuclear antigens[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124: 71-81.

(上接第25页)

- [14] GREENE I E, EISENBERG E. Dissociation of clathrin from coated vesicles by uncoating ATPase[J]. *J Biology Chemistry*, 1990, 265: 6682-6687.
- [15] NEWMYER S, SCHMID S. Dominant interfering hsc70 mutants disrupt multiple stages of clathrin-coated vesicle cycle *in vivo*[J]. *J Cell Biology*, 2001, 152: 607-620.
- [16] BAROUCH W, PRASAD K, GREENE L, *et al.* Auxilin-induced action of molecular chaperone Hsc70 with clathrin baskets[J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 4303-4308.
- [17] UNGEWICKELL E, UNGEWICKELL H, HOLSTEIN S E H, *et al.* Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles [J]. *Nature*, 1995, 378: 632-635.