

SNAREs 蛋白复合物与囊泡融合分子调节机制的研究进展*

陈立强¹, 王洋洋¹, 司艳辉² 综述; 梁洁玲¹, 李海珠¹ 审校 (广东省肇庆市第一人民医院: 1. 检验科; 2. 血液内科 526060)

【关键词】 SNAREs; 囊泡融合; Synaptobrevins; Syntaxins; 突触相关蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.10.057 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)10-1462-02

细胞内大分子物质及颗粒性物质不能自由穿过细胞膜, 必须以囊泡运输的方式进行跨膜转运, 囊泡介导的转运方式, 无论是正向或是逆向转运, 都包括 3 个主要步骤, 分别是外壳蛋白的选择, 囊泡的出芽与形成和转运物质的选择^[1]。研究表明在囊泡运输过程中 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNAREs) 发挥着重要作用, 自从 SNAREs 蛋白复合物被发现, 它就作为细胞膜融合的关键组分而被广泛深入研究^[2]; 现将 SNAREs 蛋白复合物与囊泡融合分子调节机制研究的最新进展进行综述。

1 SNAREs 核心蛋白的分子结构与功能

SNARE 复合物指的是 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体复合物, 其由 4 个七肽重复序列的 SNARE 结构组成的螺旋形结构体^[3-4], 其中 3 个 SNARE 结构体会在细胞膜的特定位置进行锚定位, 形成膜与膜之间的结合位点, 被称为定位-SNARE 复合物 (target-SNARE 或 t-SNARE); 而第 4 个 SNARE 结构体可锚定在需要融合的膜上, 称为囊泡-SNARE 复合物 (vesicle-SNARE 或 v-SNARE), 膜融合过程需要一系列如 Synaptobrevins, Syntaxins 和突触相关蛋白等 SNAREs 核心蛋白的分子的协同作用共同完成^[5-6]。

1.1 Synaptobrevins SNARE 蛋白的氨基酸序列和胞吐作用已经得到广泛的研究, 其中 v-SNARE Synaptobrevins 蛋白是由一组相对分子质量为 19×10^3 的小分子蛋白组成, 其参与 Ca^{2+} 依赖的囊泡融合作用。Synaptobrevins 蛋白通过其 C-末端跨膜结构域促进 SNARE 的“拉链样结合”反应而实现囊泡融合^[7]。Synaptobrevins 蛋白可被血清型为 B、D、F 和 G 的肉毒杆菌神经毒素 (肉毒毒素) 裂解而失去生物学作用, 造成胞吐作用受到抑制。Synaptobrevins 1 和 2 在真核细胞均有表达, 例如在神经肌肉接头、感觉细胞 (如毛细胞等) 和光感受器等, Synaptobrevins 蛋白缺乏会使囊泡分泌功能严重受损以及完全抑制由 Ca^{2+} 诱导的囊泡分泌作用^[8-9]。

1.2 Syntaxins Syntaxins 是镶嵌于胞膜的 t-SNARE 跨膜蛋白, 在膜融合过程和 Ca^{2+} 诱导的胞吐过程中, 不同的 Syntaxins 蛋白功能结构域在融合过程的各环节都发挥着重要作用。Syntaxins 具有单一的跨膜区结构域和胞内组成的 SNARE 复合体结构域 (H3) 和调节结构域 (Habc)^[10]。Syntaxin 蛋白的核心结构域由特定的 synaptobrevin 和 SNAP-25 蛋白复合体组成; 最近的研究表明, Syntaxin 可被神经毒素 BoNT/C 裂解, 而抑制了 Ca^{2+} 诱导的神经元细胞和神经内分泌细胞分泌神经递质。Habc 结构域是由 3 个 α -螺旋折叠形成的一个封闭蛋白结构, 在囊泡融合过程中封闭结构会解开而暴露 SNARE 结构域。Syntaxin 与一系列融合调节蛋白相互作用, 例如 synaptotagmin, Ca^{2+} 通道蛋白和存在于毛细胞的 otoferlin 蛋白, 对胞膜融合起到精细的调节作用^[11]。Syntaxin 1A

和 syntaxin 1B 是大脑中主要的 syntaxin 异构体, 但 syntaxins 3 和 3A 主要存在于神经分泌细胞和视网膜细胞中; 哺乳动物毛细胞表达 syntaxin 1A 和 syntaxin 3, 然而毛细胞 SNARE 复合物的分子确切机制还有待深入研究^[12]。

1.3 突触相关蛋白 (SNAP) SNAP 是广泛表达于原核和真核生物中的 t-SNARE, 在膜融合过程中起着重要作用。SNAP 是缺乏跨膜结构域的胞质蛋白, 其通过位于中心分子的棕榈酰侧链半胱氨酸残基形成的硫酯键附着于突触前膜上, SNAP-25 的两个蛋白螺旋结构是 SNARE 核心复合体的组成部分, 在钙触发的胞吐作用中发挥重要作用^[13-14]。研究表明 SNAP-25 基因敲除小鼠的钙触发胞吐作用严重受损, 表明 SNAP-25 在神经分泌的重要性; 肉毒杆菌神经毒素 BoNT/A 可裂解 SNAP-25, 使 t-SNARE 形成陷阱, 从而抑制胞吐作用。SNAP-23 与 SNAP-25 是同源异构体, 是突触后膜谷氨酸受体蛋白的组成部分, 这两个 SNAP 亚型是通过棕榈酰侧链连接到胞膜上; 然而它们对肉毒毒素的敏感性不同, SNAP-25 的可被肉毒毒素 BoNT/A, C 和 E 裂解, 而 SNAP-23 被肉毒毒素 BoNT/A 和 E 裂解^[15-16]。

2 SNAREs 在囊泡融合中的作用

SNAREs 通过其稳定存在的三分子结构来连接囊泡膜和细胞膜, 三个分子结构各由约 60 个氨基酸组成, 其一是由 synaptobrevin 蛋白和 syntaxin 蛋白组合而成, 另外两个由 SNAP-25 组合构成的。SNAREs 复合体精细的分子结构通过许多平行排列的 α -蛋白螺旋结构相互缠绕, 形成一个“亮氨酸拉链样”的嵌入式结构, 该结构外周由 1 个亮氨酸残基和 3 个谷氨酰胺残基组合而成的重复模块组件^[17-18]。嵌入式结构延伸进入胞膜脂质双层, 参与囊泡膜融合体的形成。“亮氨酸拉链样”嵌入式结构的相互连接, 促使囊泡和细胞膜之间互相靠近, 连接结构的构象改变与 syntaxin 和 synaptobrevin 蛋白特定结构氨基酸序列改变在囊泡融合中起到关键作用^[19-20]。

SNARE 的两个结构域通过跨膜结构域锚定在相互融合的两膜上, 而 t-SNARE 和 v-SNARE 的介导使连接的两膜在特定的位置发生融合作用^[21]。绝大多数 t-SNARE 复合体在螺旋束的中心位置都含有相对保守的谷氨酰胺序列, 称为“Q-SNARE 蛋白”, 而在 v-SNARE 的这个位置含有的是精氨酸序列, 称为“R-SNARE 蛋白”。所有的 SNARE 复合物在膜融合的过程中产生催化功能, 不同类型 SNARE 复合物在不同的膜转运过程中发挥作用^[22-23]。大量研究表明 SNARE 复合物参与酵母细胞内膜系统转运过程, 包括那些参与内质网到高尔基体, 高尔基体到囊泡, 高尔基体到细胞膜转运和同型液泡融合等, 大多数的酵母或哺乳动物的 SNARE 同源基因的功能相似^[24]。酵母含有 5 种 R-SNAREs (Snc 1p, Snc 2p, Nyv 1p, Sec22p 和 Ykt 6p), 而哺乳动物细胞中含有至少 10 种 (包括

* 基金项目: 广东省科技厅产业技术研究与开发资金计划项目资助 (2012B031800498); 广东省肇庆市科技创新计划项目资助 (2012E284)。

VAMPs 1,2,3,4,5,7,8,sec22b,ykt 6 和 tomosyn^[25]。因此,R-SNAREs 对哺乳动物细胞膜转运过程和协调哺乳动物生理功能起关键作用。在某些情况下,多细胞生物完成正常生理功能需要专门的膜结构,而在这些膜结构之间转运需要特定的 SNAREs,称为组织特异性 SNAREs。例如组织特异性 SNAREs(包括 syntaxin 1A,SNAP-25 和 VAMP 2)能调节哺乳动物细胞囊泡的胞吐作用,而在酵母中没有同源蛋白的表达^[26]。VAMP 5,属于质膜 SNARE,主要是在肌肉细胞中,在诱导肌肉收缩过程中发挥作用。此外,syntaxin 17 主要在于类固醇激素合成细胞的滑面内质网中表达,而 syntaxin 11 在免疫系统的特定转运过程中发挥重要作用^[27]。

3 小 结

SNAREs 蛋白复合物在囊泡融合中起到核心的作用,亮氨酸拉链模式是诠释囊泡融合机制最有代表性的解说,然而其机制有待进一步的完善。对 SNARE 蛋白及其调控因素的研究,有利于更加深入了解 SNAREs 蛋白复合体调节囊泡融合未知的相关机制,从而为揭示囊泡融合过程提供可靠地科学依据。

参考文献

- [1] Yany L,Dun AR,Martin KJ,et al. Secretory vesicles are preferentially targeted to areas of low molecular SNARE density[J]. PLOS One,2012,7(11):e49514.
- [2] Kato N,Expression BH. Localization and interaction of SNARE proteins in arabidopsis are selectively altered by the dark[J]. Plant Signal Behav,2010,5(11):1470-1472.
- [3] Wesolowski J,Paumet F. SNARE motif:a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion[J]. Virulence,2010,1(4):319-324.
- [4] Brewer KD,Li W,Horne BE,et al. Reluctance to membrane binding enables accessibility of the synaptobrevin SNARE motif for SNARE complex formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2011,108(31):12723-12728.
- [5] Lobingier BT,Merz AJ. Sec1/Munc 18 protein Vps 33 binds to SNARE domains and the quaternary SNARE complex[J]. Mol Biol Cell,2012,23(23):4611-4622.
- [6] Cheng KK,Lam KS,WU Dong-hai,et al. APPL1 potentiates insulin secretion in pancreatic beta cells by enhancing protein kinase Akt-dependent expression of SNARE proteins in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2012,109(23):8919-8924.
- [7] Alpadi K,Kulkarni A,Comte V,et al. Sequential analysis of Trans-SNARE formation in intracellular membrane fusion[J]. PLOS Biol,2012,10(1):e1001243.
- [8] Nair U,Jotwani A,Geng JF,et al. SNARE proteins are required for macroautophagy[J]. Cell,2011,146(2):290-302.
- [9] Vrljic M,Strop P,Ernst JA,et al. Molecular mechanism of the Synaptotagmin-Snare interaction in Ca²⁺-Triggered vesicle fusion[J]. Nat Struct Mol Biol,2010,98(3):325-331.
- [10] Sudhof TC,Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2011,3(12):112-115..
- [11] Gao Y,Zorman S,Gundersen G,et al. Single reconstituted neuronal SNARE complexes zipper in three distinct stages[J]. Science,2012,337(610):1340-1343.

- [12] Reverter M,Rentero C,Vila de Muga SA,et al. Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking,assembly,and function[J]. Mol Biol Cell,2011,22(21):4108-4123.
- [13] Hernandez JM,Stein A,Behrmann EA,et al. Membrane fusion intermediates via directional and full assembly of the SNARE complex[J]. Science,2012,336(688):1581-1584.
- [14] Murray DH,Tamm LK. Molecular mechanism of cholesterol-and Polyphosphoinositide-Mediated syntaxin clustering[J]. Biochemistry,2011,50(42):9014-9022.
- [15] Diao JJ,Su ZL,Ishitsuka Y,et al. A single-vesicle content mixing assay for SNARE-mediated membrane fusion[J]. Nat Commun,2010,1(1):54.
- [16] Morgera F,Sallah MR,Dubbke ML,et al. Regulation of exocytosis by the exocyst subunit Sec6 and the SM protein Sec1[J]. Mol Biol Cell,2012,23(2):337-346.
- [17] Xia T,Tong J,Rathore SS,et al. Network motif comparison rationalizes Sec1/Munc 18-SNARE regulation mechanism in exocytosis[J]. BMC Syst Biol,2012,6(1):19.
- [19] Meijer M,Burkhardt P,de Wit H,et al. Munc 18-1 mutations that strongly impair SNARE-complex binding support normal synaptic transmission[J]. EMBO J,2012,31(9):2156-2168.
- [20] Fraldi A,Annunziata F,Lombardi AA,et al. Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders[J]. EMBO J,2010,29(21):3607-3620.
- [21] Lorentz A,Baumann A,Vitte J,et al. The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion[J]. Front Immunol,2012,3:143.
- [22] Wu Y,Gu YW,Morphew MK,et al. All three components of the neuronal SNARE complex contribute to secretory vesicle docking[J]. J Cell Biol,2012,198(3):323-330.
- [23] Boswell KL,James DJ,Esquibel JM,et al. Munc 13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion[J]. J Cell Biol,2012,197(2):301-312.
- [24] Domanska MK,Kiessling V,Tamm LK. Docking and fast fusion of synaptobrevin vesicles depends on the lipid compositions of the vesicle and the acceptor SNARE Complex-Containing target membrane[J]. Biophysical J,2010,99(9):2936-2946.
- [25] Liu W,Parpura V. SNAREs;could they be the answer to an energy landscape riddle in exocytosis [J]. Scientific World Journal,2010,10(3):1258-1268.
- [26] van den Bogaart G,Holt MG,Bunt GA,et al. One SNARE complex is sufficient for membrane fusion[J]. Nat Struct Mol Biol,2010,17(3):358-360.
- [27] Khodthong C,Kabachinski G,James DJ. Munc 13 homology domain-1 in CAPS/UNC31 mediates SNARE binding required for priming vesicle exocytosis[J]. Cell Metabolism,2011,14(2):254-263.
- [28] Ramakrishnan NA,Drescher MJ,Drsecher DG. The SNARE complex in neuronal and sensory cells[J]. Mol Cell Neurosci,2012,50(1):58-69.