植物内膜系统细胞器生物发生及功能的分子机制研究

崔勇^{1†*}, 庄小红^{1†*}, 沈锦波^{2†*}, 高彩吉^{3†*}, 姜里文^{1,4*}

1. 香港中文大学生命科学学院, 细胞及发育生物学研究中心, 农业生物技术国家重点实验室, 香港 999077;

2. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 亚热带森林培育国家重点实验室, 杭州 311300;

3. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631;

4. 香港中文大学深圳研究院, 深圳 518057

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yongcui@cuhk.edu.hk; Xhzhuang@cuhk.edu.hk; jshen@zafu.edu.cn; gaocaiji@163.com; ljiang@cuhk.edu.hk

收稿日期: 2019-07-29; 接受日期: 2019-11-19; 网络版发表日期: 2019-12-03

国家自然科学基金(批准号: 31670179, 91854201)和香港研究资助局研究基金(批准号: AoE/M-05/12, C4012-16E, C4002-17G, R4005-18)资助

摘要 所有真核细胞都含有一套由多种细胞器组成的内膜系统, 包括内质网(endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体(Golgi)、反式高尔基体网络(trans-Golgi network, TGN)、液泡前体/多囊泡体(prevacuolar compartment or multivesicular body, PVC/MVB)和液泡(vacuole)或溶酶体(lysosome)。这些细胞器在有序调控下被准确和高效地生成, 参与细胞内物质运输, 在生物个体的生长发育和对环境应答中发挥着重要作用。自2000年以来, 我国学者在植物内膜系统细胞器的生物发生及功能方向开展了深入研究并取得了重大进展。本文首先概述了我国学者在植物蛋白运输领域中的代表性研究成果。随后以液泡前体/多囊泡体为例, 重点介绍了其鉴定及由其介导的植物液泡蛋白转运, 接着详细阐述了由内体蛋白分选转运装置(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)介导的多囊泡体生物发生的分子机制, 并着重介绍了植物特异的ESCRT组分FREE1蛋白在其中的作用。此外, 近年来我国学者采用前沿的全细胞电子断层扫描技术, 首次对植物根细胞内膜系统进行了精细的三维结构分析并提出了一种新型的由多囊泡体成熟转变成液泡的模型, 为进一步研究液泡形成的分子调控机制提供了依据。最后, 本文对当前植物细胞器(包括多囊泡体和液泡)的生物发生和功能的研究进行了总结, 并对此领域研究的发展前景做出了展望。

关键词 细胞器, 生物发生, 内膜系统, 液泡前体/多囊泡体, 液泡

2019年是中华人民共和国成立70周年。70年来我国植物细胞生物学经历了从起步到蓬勃发展的历程。自2000年以来, 我国植物细胞生物学的研究逐渐步入国际前沿, 涌现出大量具有代表性的科研成果。当前

研究展现出快速发展的态势, 归其原因离不开国家对植物细胞生物学学科的重视和大力支持, 以及越来越多本土学者和留学归国人员在此研究领域的辛勤投入和付出。本文重点回顾总结了进入21世纪以来我国学

引用格式: 崔勇, 庄小红, 沈锦波, 等. 植物内膜系统细胞器生物发生及功能的分子机制研究. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1679–1694
Cui Y, Zhuang X H, Shen J B, et al. Organelle biogenesis and function in plants (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 1679–1694, doi: [10.1360/SSV-2019-0136](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0136)

者在植物细胞器生物发生及功能方面的代表性成果。

内膜系统是植物细胞内的高效“物流系统”，负责将蛋白质等生物大分子选择性转运至目标部位令其得以发挥功能，而组成内膜系统的细胞器则是此“物流系统”的传递者或中继站。植物细胞内膜系统包括多个膜包裹的细胞器，比如内质网(endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体(Golgi apparatus)、反式高尔基体网络(trans-Golgi network, TGN)、液泡前体/多囊泡体(pre-vacuolar compartment/multivesicular body, PVC/MVB)和液泡(vacuole)等(图1)^[1~3]。内膜系统中各细胞器之间的物质运输主要通过囊泡完成。囊泡运输一般包括出芽、转运、锚定和融合等过程。细胞对囊泡运输的精确调控是物质高效运输的必要前提^[4~6]。

1 植物细胞内的蛋白运输途径

植物细胞通过内膜系统完成蛋白质的多种定向运输。通常，蛋白质在核糖体合成之后经蛋白分泌途径被运送到细胞膜或胞外特定部位行使生物学功能；另一方面，蛋白质在胞内行使完生物学功能后则通过靶向液泡途径抵达液泡完成降解，达到物质的回收循环再利用(图1)。除此之外，植物细胞还可透过内吞途径将细胞外物质或细胞膜蛋白转运至细胞内而完成物质的吸收和信号转导。当植物体经历环境胁迫时，植物细胞利用自噬途径降解受损蛋白质和细胞器，帮助植物适应环境。这些通路彼此高效协作，共同调控蛋白质的运输，维持细胞内环境的稳态^[2,7]。

1.1 植物蛋白分泌途径

植物细胞中，蛋白质作为最主要的生理功能执行者，在核糖体合成后需要抵达细胞特定位置方可正常发挥其功能。其中，蛋白质运送到细胞膜或细胞外的途径被称为蛋白分泌途径。这些蛋白质可为细胞壁的形成提供原料或负责传递细胞间信息等^[8]。通常，含有信号肽或跨膜结构域的分泌蛋白在核糖体合成之后会经由内质网和高尔基体，继而分泌到细胞外或细胞膜发挥功能。人们将这类需要经过内质网-高尔基体分泌的途径称为经典蛋白分泌途径(conventional protein secretion, CPS)(图1)^[9,10]。通过这种方式分泌的植物蛋白，包括细胞膜蛋白和细胞壁修正酶等，它们均是植物生长的基本材料^[11]。在经典蛋白分泌的研究领域，香港

中文大学姜里文研究组^[9]证明了水稻分泌载体膜蛋白(secretory carrier membrane protein 1, SCAMP1)的分泌是通过经典蛋白分泌途径(内质网-高尔基-反式高尔基体网络-细胞膜)完成的，并发现SCAMP1蛋白的细胞质区域和跨膜区域对于其正确的细胞膜靶向运输都是必需的。此外，中国科学院植物研究所刘春明研究组^[12,13]发现，EXO70蛋白质家族成员的多样性使胞外分泌复合体(exocyst)具有多种的功能。他们发现，在发育的导管分子中，EXO70A1在囊泡运输过程中发挥重要作用，调控导管分子特征性次生壁加厚的过程。

然而，最近有研究发现，部分没有信号肽或跨膜结构域的分泌蛋白仍可被运送到细胞外，说明细胞中存在着不依赖经典蛋白分泌途径的其他途径。这种不依赖内质网-高尔基体的途径被称为非经典蛋白分泌途径(unconventional protein secretion, UPS)(图1)^[14]。直到近20年，植物相关的非经典蛋白分泌途径才开始受到关注。非经典蛋白分泌途径通过其特有的调控机制运送一些独特的蛋白，对经典蛋白分泌途径进行了有效地补充，通常参与植物生物胁迫和非生物逆境胁迫应答等过程^[15]。最近的研究还发现，非经典分泌途径也参与了细胞外囊泡的形成。通过非经典蛋白分泌途径，一些细胞器如多囊泡体在与细胞膜融合之后可以将腔内小泡释放到细胞外。研究认为，这些囊泡一方面在长途运送货物蛋白中发挥了保护作用，另一方面，它们还为运输货物蛋白到植物体的不同部位起到了导航作用，使货物蛋白抵达特定位置后才被释放，进而发挥生物学作用^[14~17]。

植物非经典蛋白分泌途径主要包括以下4种^[18,19]：
(i) 无前导序列蛋白高尔基旁路分泌途径。由于布雷菲德菌素A(brefeldin A, BFA)对蛋白从内质网向高尔基体的转运具有抑制作用，所以其常被用来识别高尔基体旁路分泌途径。中国科学院植物研究所林金星研究组^[20]在拟南芥中发现，潮霉素磷酸转移酶的胞外分泌对BFA处理不敏感，从而证明了植物细胞中存在高尔基体旁路的蛋白分泌途径。(ii) 多囊泡体介导的非经典蛋白分泌途径。在植物细胞内，多囊泡体也被称为液泡前体，被证实参与植物抗病等防御反应^[21]。当植物细胞受到病原菌入侵时，多囊泡体会通过与细胞膜融合然后释放内容物到细胞外从而完成蛋白分泌。研究发现，PEN1, SNAP33, VAMP721和VAMP722等蛋白参与调控了该囊泡至胞外的运输途径^[22]。(iii)

图 1 植物细胞内膜运输系统. A: 在经典分泌途径中, 蛋白质经内质网和高尔基体被分泌到细胞膜或细胞外; B: EXPO分泌体介导的非经典分泌途径; C: 多囊泡体介导的蛋白靶向液泡运输途径; D: 自噬体介导的蛋白靶向液泡从而完成降解和循环利用的途径. EE, 早期内体; ERES, 内质网的排出位点

Figure 1 Overview of the plant endomembrane system. A: In the CPS pathway, proteins are synthesized in the ER and secreted to the plasma membrane (PM) or the outside via the Golgi apparatus; B: EXPO-mediated UPS pathway; C: MVB-mediated vacuolar trafficking pathway; D: autophagosome-mediated protein transport to the vacuole for degradation and recycling. EE, early endosome; ERES, ER exit site

液泡介导的非经典蛋白分泌途径. 当植物体遭受病原菌侵袭时, 液泡可以通过与细胞膜直接融合而释放液泡酶等物质来抵抗病原菌的攻击^[23]. (iv) EXPO(exo-cyst-positive organelle)分泌体介导的非经典蛋白分泌途径(图1). 这种由姜里文研究组首次发现的新型双层膜细胞器, 被Exo70E2-XFP融合蛋白标记后, 不与细胞中的高尔基体、反式高尔基体网络和多囊泡体共定位; 而且多种分泌途径和胞吞途径的抑制剂亦对EXPO分泌体没有任何影响. 免疫电子显微镜结果显示, Exo70E2抗体可特异地识别两种结构: 其中一种是在细胞质内的双层膜结构细胞器, 其内容与周围细胞质非常相似; 另一种结构则位于细胞膜上, 呈现出与细胞膜融合的状态. EXPO分泌体外膜与细胞膜的融合可使一个单层膜的囊泡释放到胞外. 由EXPO分泌体介导的蛋白运输包括拟南芥蛋白-S-腺苷甲硫氨酸合成酶2(*S-adenosylmethionine synthetase 2*, SAMS2)等^[14,15,24-26].

1.2 植物蛋白靶向液泡的运输途径

植物蛋白质在细胞内合成后, 除了被分泌到细胞

膜或细胞外发挥作用, 还可经过多条途径被运输到液泡行使胞内生物学功能^[27,28]. 在经典的植物蛋白靶向液泡的运输途径中, 具有N端信号肽序列或跨膜结构域的蛋白质在内质网加工后, 通过COPII囊泡被运输到高尔基体进行进一步修饰, 而COPI囊泡主要负责将蛋白质从高尔基体运回内质网以及将蛋白质从反式高尔基体运向顺式高尔基体的过程^[29-32]. 成熟的分泌蛋白经高尔基体被运送到反式高尔基体网络进行分选, 后经液泡前体/多囊泡体最终被运输到液泡发挥功能(图1). 在植物蛋白靶向液泡运输的研究领域, 姜里文研究组发现, 植物中不同的Sar1蛋白在COPII囊泡形成中起不同的作用. 他们还发现, 拟南芥调控COPII囊泡形成的小G蛋白Sar1a和Sar1c在植物中有不同的亚细胞定位和功能. 通过点突变筛选, 研究人员发现, Sar1a的Cys84位点与COPII的另一个蛋白Sec23a存在特异的配对互作. 结构建模和免疫共沉淀进一步确定了Cys84氨基酸对于Sar1a与Sec23a特异性互作是必需的. 在细胞水平上, Cys84氨基酸导致Sar1a和Sar1c具有不同的调控特定货物蛋白内质网输出的功能. 进一步的研究证明, Sar1a特异性地调控内质网胁迫相关转录因

子bZIP28的内质网输出^[29,33]。同时该研究组还发掘并解析了新型高尔基体膜蛋白的分选机制。他们发现, 内膜蛋白EMP12的C端拥有内质网输出信号, 其氨基酸FV/Y的突变导致其融合蛋白GFP-EMP12滞留于内质网。他们还发现, 内膜蛋白EMP12的C端具有新的COPI结合模体KxD/E, 令内膜蛋白EMP12定位于高尔基体。KxD/E的突变使其融合蛋白GFP-EMP12经由反式高尔基体网络及多囊泡体运输到液泡进行降解^[32]。另外, 万建民研究组^[34]在水稻中发现了一个进化上保守的膜蛋白GOT1B。它定位于与顺式高尔基体相连的内质网输出位点。他们还发现, 该GOT1B可以通过与COPII的组分Sec23c互作, 从而调控COPII转运囊泡的形成, 并有助于植物细胞中谷蛋白正确的内质网输出。同时该研究组发现, 在水稻中, 小G蛋白Rab5a和它的上游激活因子VPS9a在谷蛋白向二型蛋白体的输送过程中起关键作用^[35,36]。而且GPA3/Kelch1蛋白可与Rab5a和VPS9a形成一个功能蛋白复合体, 负责协同调控致密囊泡到贮藏型液泡的定向转运。在*gpa3*突变体中, 致密囊泡则会被错误地分选到细胞膜附近并通过与膜融合将其分泌到细胞外^[37]。除了经典的植物蛋白靶向液泡的运输, 山东农业大学张彦研究组^[38]则报道了由衔接蛋白复合体3(adaptor protein-3, AP-3)介导的拟南芥棕榈酰基转移酶10(protein S-acyl transferase 10, PAT10)靶向液泡的运输途径, 并且发现COP的小G蛋白SAR1c和HOPS复合体的VPS41亚基参与了该运输过程。另外, 中国农业大学郭岩研究组^[39]揭示了拟南芥的衔接蛋白AP3M通过与微丝结合并影响气孔闭合过程中液泡形态的改变。

为了更好地研究植物蛋白靶向液泡的运输, 姜里文研究组^[40]成功地在植物细胞内实时测量了各个细胞器的pH值, 为细胞器功能以及蛋白转运的研究提供了重要的依据。他们通过运用新开发的荧光pH分子探针PEpHluorin和PRpHluorin对各个细胞器的腔内pH值进行了测量, 从而将拟南芥内膜系统中细胞器的酸碱性进行了量化和可视化, 依此建立了首个植物体内细胞器pH值图谱。

1.3 植物内吞途径

除了向细胞外或细胞膜运输蛋白质的分泌途径, 植物细胞还可将细胞外物质或细胞膜蛋白转运进细胞内, 这种类型的运输途径被称为内吞途径。细胞利用内

吞途径不仅可以完成对胞外物质的吸收, 而且可以调控细胞膜蛋白的丰度并实现细胞内外信号转导等生理过程^[41]。内吞途径可分为网格蛋白依赖的和非网格蛋白依赖的内吞。目前, 对网格蛋白依赖的内吞途径研究得较为清楚。网格蛋白复合体由3条重链和3条轻链组成, 其彼此互相交织形成一个具有5边形网孔的笼子^[42]。接头蛋白复合2(adaptor protein-2, AP-2)负责连接网格蛋白与细胞膜表面受体等蛋白完成货物的选择性募集。在网格蛋白有被小泡组装完毕之后, 动态蛋白聚集在小泡的颈部并在其他蛋白的帮助下将小泡从细胞膜掐下。随后网格蛋白脱落, 内吞小泡被运送到反式高尔基体网络(早期内体), 经多囊泡体(晚期内体)最终被运送到液泡完成降解。通常需要被降解的细胞膜蛋白会首先被泛素化修饰, 然后被内体蛋白分选转运装置(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)识别并被分选到多囊泡体的腔内囊泡中。ESCRT复合体装置在酵母、动物和植物中高度保守。除此之外, 植物ESCRT复合体也含有一些植物特有的蛋白, 如FREE1(FYVE-domain protein required for endosomal sorting 1)等^[43]。多囊泡体在组装完成后被运送到液泡并与之融合, 完成货物在液泡中的降解。多囊泡体到液泡的运输主要由Rab5和Rab7家族蛋白介导。Rab家族蛋白先募集栓系因子, 并在其帮助之下进一步募集SNARE复合体从而完成多囊泡体与液泡的融合^[44,45]。

在植物细胞网格蛋白依赖的内吞途径中, 我国学者利用拟南芥等多种模式生物, 对参与内吞途径中的关键蛋白质开展了丰富的研究。针对网格蛋白的重链和轻链, 潘建伟研究组^[46]证明了网格蛋白轻链是生长素结合蛋白(auxin binding protein 1, ABP1)信号途径下游的重要调控因子, 在植物发育过程中对源于反式高尔基网络 and 细胞膜的囊泡运输具有关键作用。而中国科学院遗传与发育生物学研究所唐定中研究组^[47]发现, EDR4作为白粉病的负调控因子可以与网格蛋白重链2形成复合体参与内吞作用和先天免疫反应。华中农业大学张忠明研究组^[48]则发现, 百脉根网格蛋白重链1可以与Rho-类似的GTP酶ROP6相关联, 并参与根瘤的形成。针对接头蛋白复合体和内体形成和转运过程, 张彦研究组^[49]发现, AP1的 μ 亚基可以和AP1复合体中其他亚基相互作用共同介导反式高尔基网络处的蛋白分选。赵光裕研究组^[50]发现,

ESCRT-II复合体中的VPS36具有与泛素结合的能力,且可与其他ESCRT-II复合体中的VPS22和VPS25结合,共同参与内体分拣的正常运作及液泡的形成. 北京大学瞿礼嘉研究组^[51]发现, VPS41蛋白作为内吞途径的重要成员参与了将细胞外信号分子从晚期内体运送到液泡的过程,该过程对植物正常的有性生殖十分重要.

另外,在内吞途径的分子调控及其生理作用的研究中,杨贞标研究组发现,在花粉管顶端区域,磷酸肌醇负责调控网格蛋白介导的内吞作用^[52]. 该研究组还发现,网格蛋白介导的内吞作用参与调控花粉管顶端膜与侧面膜分子的极性分布以及细胞顶端极性生长^[53]. 而潘建伟研究组^[54,55]则阐明了水杨酸调控网格蛋白介导的内吞途径的机理,以及网格蛋白在下胚轴顶钩形成与蓝光诱导的顶钩打开及向光性生长中的生物学功能.

除了传统的研究手段,林金星研究组^[56]利用变角隐失波显微镜技术、荧光相关光谱技术和单颗粒追踪分析技术等方法对拟南芥PIP2;1蛋白开展了研究,他们发现在不同生理状况下此蛋白使用两种不同的方式进入细胞. 在正常情况下,细胞利用网格蛋白依赖的途径进行拟南芥PIP2;1蛋白的内吞作用;而在高渗胁迫时,脂筏介导的内吞途径被激活,细胞通过脂筏介导与网格蛋白依赖的内吞途径,共同完成PIP2;1蛋白的内吞过程. 同时,该研究组通过对GFP-Flot1阳性囊泡形成的研究证明了植物细胞内同时存在不依赖于网格蛋白的胞吞过程^[57],拓展了对植物内吞途径的理解. 此外,该研究组还从单分子水平上分析了RbohD蛋白的内吞过程并发现其在盐胁迫下通过胞吞从细胞膜进入胞质, RbohD蛋白与网格蛋白以及膜微区标志蛋白Flot1等有不同程度的共定位,揭示了植物细胞可通过调节该蛋白在质膜上的运动状态及胞吞转运方式实现对逆境自我调控的机制^[58-62].

1.4 植物自噬途径

自噬(*autophagy*)是真核细胞中保守的自我降解机制,主要受各类环境胁迫条件(如营养缺陷、逆境、病原入侵等)的诱导,参与受损蛋白质和细胞器降解再循环的过程^[5,63]. 在酵母、动物和植物中都含有一系列

保守的自噬相关基因^[64]. 自噬的一个显著特征是它会通过形成一个双层膜的自噬体结构吞噬细胞内货物(蛋白质或者细胞器等),最后与液泡融合将货物降解(图1)^[65]. 目前研究已证实,除了环境胁迫,自噬在植物生长发育过程中,如种子发育中细胞和器官的生理水平也发挥重要功能^[66],而自噬相关的突变体大都存在出现早衰的表型以及产量少和抗逆能力下降等缺陷. 此外,最近的研究还发现,自噬途径在植物应激状态,如植物超敏免疫反应中扮演一些植物特异性的调控角色^[67]. 植物自噬途径由一系列保守的自噬相关蛋白(*autophagy-related genes*, ATG)和一些植物特有的蛋白(如SH3P2等)共同参与完成. 在该研究领域,姜里文研究组首次在植物细胞中鉴定出自噬体形成的过程,发掘并阐明了植物新型自噬调控因子SH3P2调控自噬体形成的功能. 深入的研究表明,SH3P2蛋白通过与ATG6和ATG8等互作形成磷脂酰肌醇3-激酶(*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K)复合物调控植物细胞内自噬体的形成和自噬降解途径,首次证明了ESCRT介导的多囊泡体转运途径和SH3P2调控的自噬途径之间的分子关联. 他们在最近的研究中还发现,植物自噬调控蛋白ATG9调控了自噬体由内质网起源和成熟的过程^[5,65,67,68]. 此外,清华大学刘玉乐研究组^[69]发现,细胞质定位的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPC)与细胞自噬保守蛋白ATG3相互作用并负调控细胞自噬过程,在*R*基因介导的抗性反应和植物基础抗性中发挥重要作用. 该研究组和中国农业大学李大伟研究组^[70]合作研究发现,大麦条纹花叶病毒通过破坏植物自噬体系而感染植株,说明植物自噬在植物对病毒感染的响应中发挥重要作用. 此外,唐定中研究组^[71]发现, *atg2-2*突变体中与防御有关的基因被组成型激活,突变体表现出对白粉病的抗性增强并出现明显的由白粉病引起的细胞死亡,揭示了自噬、细胞程序性死亡和植物防卫反应之间的联系.

蛋白质通过以上各种途径分别抵达特定部位,执行相应的生物学功能. 在众多细胞器中,多囊泡体不但参与了以上这4种蛋白运输途径,还在其中发挥了重要的作用. 因此,本文接下来以多囊泡体为例,重点介绍其鉴定、生物发生和功能,并在最后提出源于多囊泡体的液泡生成模型.

2 液泡前体/多囊泡体的鉴定及特征分析

2.1 利用液泡分选受体蛋白确定多囊泡体为液泡前体

植物溶解型液泡内含有多种水解酶用于降解不再需要的细胞内物质。通常这些水解酶在内质网加工后, 被运输到高尔基体完成进一步修饰, 并在反式高尔基体网络被分选, 然后经液泡前体最终被运送到液泡中发挥功能^[72]。在植物细胞中, 分选可溶性液泡蛋白的受体被称为液泡分选受体(vacuolar sorting receptor, VSR)。液泡分选受体是 I 型跨膜蛋白, 含有N端腔内区域(N-terminal lumenal region, NT)、单个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和C端胞质尾区(C-terminal cytoplasmic tail, CT)^[73,74]。

姜里文研究组对植物液泡分选受体开展的一系列研究发现, 在烟草原生质体中, 含有液泡分选受体TMD和CT区域的报告蛋白与内源性液泡分选受体呈点状共定位。因此, 在植物细胞中液泡分选受体的TMD和CT序列能够将报告蛋白特异性地靶向液泡前体, 故液泡分选受体抗体及其融合报告蛋白均可用来作为植物细胞内液泡前体的标记物。在免疫金电子显微镜实验中, 利用液泡分选受体抗体证明其定位在多囊泡体的膜上^[3]。另外, 从BY-2细胞中进一步纯化多囊泡体, 通过免疫金负染, 发现其含有液泡分选受体蛋白。因此, 利用液泡分选受体抗体和表达液泡前体报告基因的转基因BY-2细胞系, 多囊泡体首次被确定为液泡前体。

类似地, 转基因BY-2细胞系表达GFP与拟南芥VSR的TMD-CT序列的融合蛋白(称为GFP-ArVSR1-7)都能定位在液泡前体上, 且呈现典型的点状分布^[75]。这些研究再次证实, 植物细胞的液泡分选受体的TMD和CT序列对于其靶向运输是必要和特异的。除了液泡分选受体抗体及其报告蛋白外, 拟南芥Rab5同系物RHA1和ARA7也可被用作液泡前体/多囊泡体的标记蛋白^[4]。如图2A~C所示, YFP-ARA7和mCherry-RHA1(CH-RHA1)在植物根部细胞中共定位, 呈点状分布。它们也与液泡前体/多囊泡体的标记分子GFP-VSR1共定位, 但与反式高尔基体网络的标记蛋白CH-VTI12分离^[4]。

2.2 液泡前体/多囊泡体的动态响应

液泡前体/多囊泡体的形态受多方面因素影响, 例

如多种药物、内源突变蛋白的过表达或蛋白的缺失都会引起其形态发生变化。PI3K广泛存在于哺乳动物和酵母细胞的早期内体中, 而在植物细胞中则主要分布于晚期内体中。渥曼青霉素(wortmannin)是一种常见的PI3K抑制剂。因此, 植物细胞经渥曼青霉素处理后, 胞内的PI3K活性受到抑制, 进而影响植物液泡前体/多囊泡体的形态和功能。依据这个原理, 姜里文研究组^[4]用渥曼青霉素处理了多种带有不同分子标记的拟南芥, 并观察其不同组织细胞中液泡前体/多囊泡体的变化。处理后的YFP-ARA7标记的拟南芥液泡前体/多囊泡体变得膨大(图2D), 这个变化与处理后的GFP-VSR1的响应相似。此外, 在电子显微镜下, 经渥曼青霉素处理后的拟南芥根细胞及绿豆子叶中, 也发生了液泡前体/多囊泡体之间的同型融合, 以及反式高尔基体网络和液泡前体/多囊泡体之间的异型融合^[76]。

除了渥曼青霉素, 过表达激活态的Rab5家族蛋白GFP-ARA7^{Q69L}, 也可以诱导液泡前体/多囊泡体之间的同型融合, 从而导致液泡前体/多囊泡体的增大(图2E)^[77]。基于这个发现, 姜里文研究组还开发了一种新方法来说明可溶性货物蛋白与其受体或其他蛋白分子的空间分布。在此以前, 在普通共聚焦显微镜下细胞内共表达XFP标记的可溶性货物蛋白和VSR报告蛋白可以在液泡前体/多囊泡体共定位, 但受限于共聚焦显微镜的分辨率, 它们之间的空间分布不能被区分开来。现在, 利用过表达ARA7^{Q69L}蛋白, 可以在普通共聚焦显微镜下快速区分可溶性货物蛋白与受体的空间分布: 可溶性货物蛋白Aleurain-GFP定位在膨大的液泡前体/多囊泡体内腔, 而受体GFP-VSR2与RFP-ARA7^{Q69L}则主要共定位于液泡前体/多囊泡体的膜上^[77]。

3 多囊泡体的生物发生及功能

3.1 植物ESCRT复合物调控多囊泡体形成及膜蛋白的选择性分选和降解

ESCRT复合物是真核生物中由20多个可溶蛋白组成的超级复合物系统。该复合物系统在进化上从真菌到高等动植物都高度保守^[78]。ESCRT系统主要由ESCRT-0、-I、-II、-III和VPS4(vacuolar protein sorting-associated protein 4)等5个复合物组成, 每个复合物包含2~4个不等的核心蛋白(图3A)。其中ESCRT-III和VPS4复合物又含有多个辅助蛋白, 比如VPS60/

图 2 拟南芥VSR1蛋白, Rab5家族的RHA1和ARA7蛋白共同作为液泡前体/多囊泡体的标记蛋白。A~C: 不同标记蛋白在转基因植物中的亚细胞定位关系; D: 在根细胞中, 渥曼青霉素可以促使增大的液泡前体/多囊泡体形成; E: 过量表达GFP-ARA7^{Q69L}可以诱导增大的液泡前体/多囊泡体形成; F: 在*mon1*突变体中发现增大的液泡前体/多囊泡体; G, H: 液泡前体/多囊泡体在野生型和*mon1*突变体中的超显微结构。图A~F标尺: 10 μ m; 图G和H标尺: 500 nm

Figure 2 The *Arabidopsis* VSR1 and Rab5 homologs RHA1 and ARA7 serve as PVC/MVB markers. A~C: Localization of different markers as indicated in transgenic *Arabidopsis* root cells; D: wortmannin (WM) induced the formation of enlarged PVCs/MVBs labeled by YFP-ARA7 in *Arabidopsis* roots; E: overexpression of GFP-ARA7^{Q69L} causes the formation of the enlarged PVCs/MVBs in *Arabidopsis* roots; F: in *mon1* mutants, enlarged PVCs/MVBs were observed; G, H: ultrastructure images of PVCs/MVBs in WT (G) and *mon1* mutant (H). Scale bars=10 μ m in A~F; scale bars=500 nm in G and H

CHMP5, IST1和VTA1/LIP5等。这些辅助调控因子帮助调控VPS4的活性以及ESCRT-III复合物解聚。ESCRT复合物中各组分协同作用, 识别并将泛素化修饰的膜蛋白聚集在多囊泡体的亚区域(subdomain), 驱动多囊泡体膜内陷形成腔内小泡, 并将需要被降解的膜蛋白分选至腔内小泡, 最后招募ATP酶VPS4通过水解ATP提供能量来解离ESCRT复合物并释放成员蛋白到细胞质中供下一轮复合物形成使用^[79]。除了调控多囊泡体的形成以外, 在动物和酵母中, ESCRT复合物还参与了诸多膜剪接和分离相关的生物学过程, 比如细胞膜和核膜损伤位点的修复、细胞分裂最后一步的胞质分裂以及病毒从宿主细胞的出芽等^[80]。姜里文研究组^[43]系统地总结了植物ESCRT复合物功能的研究

进展, 发现ESCRT复合物不仅参与植物多囊泡体形成, 还调控液泡形成、胞质分裂、细胞自噬、叶绿体的选择性自噬降解、抵抗病毒侵染等诸多细胞调控过程。这些研究表明, 植物ESCRT复合物不仅作为传统的囊泡运输调控因子发挥功能, 还介导了诸多非传统囊泡运输的生物学过程。

与动物和酵母相比, 拟南芥基因组编码绝大多数的ESCRT成员但缺失了传统的ESCRT-0复合物以及ESCRT-I的一个亚基MVB12^[78]。受限于ESCRT相关突变体的致死性, 一直以来都鲜有对植物ESCRT复合物功能的系统性研究。近年来, 姜里文研究组^[81]应用植物原生质体瞬时表达体系系统地研究了植物ESCRT-III复合物4个核心蛋白VPS20, SNF7, VPS24和

图 3 植物细胞中ESCRT复合体介导多囊泡体的形成机制。A: 由不同ESCRT复合体介导的多囊泡体的生成; B, C: BRAF和RST1蛋白在负调控多囊泡体形成中的作用; D: *sof*抑制子筛选的流程。ILV, 腔内囊泡; Ub, 泛素

Figure 3 ESCRT function in MVB biogenesis in plant cells. A: The roles of various ESCRT complexes in regulating MVB biogenesis; B, C: possible roles of BRAF and RST1 in negatively regulation of MVB biogenesis pathway; D: schematic flow chart of *sof* suppressor screen. ILV, intraluminal vesicles; Ub, ubiquitin

VPS2, 并证明它们协同调控了植物多囊泡体形成和膜蛋白分选的功能。同时发现, 表达任何一个C末端缺失的ESCRT-III蛋白均会抑制多囊泡体介导的泛素化膜蛋白的分选和降解过程, 当它们与液泡降解的膜蛋白比如EMP12-GFP在原生质体共表达时, 这些C末端缺失的ESCRT-III蛋白可以明显抑制EMP12被转运至液泡并抑制其降解。此外, 利用诱导型启动子驱动, 他们将这些具有显性抑制效果的ESCRT-III蛋白表达在拟南芥植物中并发现, 含有这些蛋白表达后的植物出现多囊泡体形成缺陷, 多囊泡体内小泡数量明显减少, 并伴随有子叶变绿缺陷和根发育缺陷等多个表型^[11]。总体来讲, 以上研究系统地对植物ESCRT-III复合物4个核心成员的功能进行了充分的分析。

3.2 植物特有ESCRT复合物组分FREE1的鉴定和功能分析

如前所述, 植物不具有传统的ESCRT-0复合物, 因此植物中是否有其他蛋白可以替代行使ESCRT-0复合物的功能来识别泛素化的膜蛋白并招募下游ESCRT复

合物组分调控多囊泡体的形成, 便成为一直以来植物ESCRT复合物功能研究领域的一个重要生物学问题。通过对已知动物和酵母ESCRT-0复合物成员蛋白VPS27/HRS的保守结构域研究并比对分析拟南芥中可能含有该保守结构域的蛋白, 姜里文研究组^[82]鉴定到一个植物特有蛋白并将其命名为FREE1, 其同源序列仅存在于真双子叶植物中, 而在动物和酵母中均没有同源序列。研究发现, FREE1蛋白含有一个保守的FYVE结构域, 它通过这个结构域特异地识别和结合磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P)并最终定位在多囊泡体。此外还发现, FREE1蛋白通过PASP基序与ESCRT-I复合物组分VPS23特异互作, 从而作为植物ESCRT-I的一个新成员调控多囊泡体的形成以及泛素化膜蛋白的分选和降解^[82]。通过基因共表达分析, 该研究组找到了一个与FREE1基因表达模式高度吻合的基因BRO1, 并发现该BRO1蛋白与动物中ESCRT复合物的辅助因子ALIX同源。结合分子、细胞以及遗传分析他们发现, BRO1蛋白与FREE1蛋白互作并调控了多囊泡体的形成和泛素化膜蛋白的

分选和降解^[83]。除了参与调控多囊泡体形成, 该研究组还证明, FREE1蛋白可以参与调控液泡形成以及可溶性液泡蛋白的转运; 并发现FREE1与植物自噬调控蛋白SH3P2互作, 协同调控自噬小体与液泡的融合从而影响了植物自噬降解过程, 首次解析了植物ESCRT介导的囊泡运输途径和自噬途径之间的关联和调控机制^[84]。以上研究首次发掘了植物特有ESCRT复合物组分FREE1, 并解析了其BRO1, VPS23和SH3P2等多个蛋白互作调控多囊泡体形成、膜蛋白分选和降解、液泡蛋白转运、液泡形成和自噬降解等诸多细胞行为。

FREE1功能重要并参与调控多个细胞过程, 然而拟南芥*free1*突变体表现为萌发致死。为了深入探讨FREE1蛋白调控植物环境应答的功能, 华南师范大学高彩吉研究组和姜里文研究组^[85]合作, 利用CRISPR-Cas9(lustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins 9)技术绕过FREE1功能缺失的致死性, 得到一个特异影响FREE1蛋白入核的突变体*free1-ctmut*, 并发现该突变体因FREE1蛋白不能入核导致植物对脱落酸(abscisic acid, ABA)超敏感。研究人员进一步发现, ABA处理会导致部分FREE1蛋白被SnRK2蛋白激酶磷酸化修饰并进入细胞核, 在细胞核内与ABA信号途径的重要转录因子ABI5和ABF4互作并抑制其转录激活活性。该研究首次发现了植物囊泡运输调控因子在细胞核内参与调控基因表达的全新功能。结合中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究组^[86]发现的植物ESCRT复合物组分VPS23通过调控ABA受体PYLs转运至液泡内降解从而影响了植物ABA响应, 姜里文研究组的研究进一步阐释了植物ESCRT复合物功能的多样性, 说明ESCRT蛋白不仅可以在细胞质中通过调控ABA受体PYLs降解而参与ABA信号转导, 还可以直接进入细胞核在转录水平上调控ABA信号, 说明囊泡运输途径和植物环境应答信号可能在基因表达和蛋白转运等多个层面存在交叉调控关系。

3.3 ESCRT组分FREE1的抑制子筛选

在真核细胞中, 植物细胞调节膜蛋白的转运途径是高度保守的, 但也进化出特定的功能组分^[87]。目前, 植物内膜系统的研究主要是参照动物和酵母等同源蛋白的研究。例如, ESCRT复合体可以分选质膜蛋白到多

囊泡体中, 多囊泡体与溶解型液泡融合, 泛素化的质膜蛋白被运输到溶解型液泡中降解。因此, ESCRT复合体通过这种内吞途径来调节膜蛋白的稳态。

植物特异的ESCRT组分FREE1蛋白在多囊泡体形成以及膜蛋白液泡降解途径中发挥重要作用^[82,84]。为了进一步了解FREE1在植物中调节膜蛋白运输与细胞器生物发生过程中的作用, 姜里文研究组^[88,89]利用FREE1功能缺失突变体作为材料进行了抑制子筛选。随后利用下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术, 在短时间内鉴定出相关突变基因。地塞米松(dexamethasone, DEX)诱导型*FREE1-RNAi*植物呈现出与*free1*突变体一致的表型。在DEX诱导后, *FREE1-RNAi*转基因植物是幼苗致死的, 且FREE1蛋白几乎检测不到。该研究组首先使用EMS(ethylmethanesulfonate)突变诱导处理*FREE1-RNAi*植物种子, 然后将M2代突变体种子种在含有DEX的平板上, 而后筛选出可以存活的植物就被命名为*free1*的抑制子(*suppressors of free1, sof*)(图3D)。因为通过这种方法筛选出的存活的突变体也可能是由于RNAi(RNA interference)系统遭到破坏而引起的, 所以该研究组又利用FREE1抗体通过蛋白检测分析进行了第二次筛选。经历两次筛选后那些FREE1蛋白显著减少的存活突变体才被称为FREE1相关的*sof*突变体。

3.4 FREE1抑制子BRAF和RST1在调节多囊泡体生成中的功能

通过上述遗传突变体筛选的方法, 姜里文研究组^[90]鉴定到多个*sof*突变体, 其中*sof524*突变体可以恢复*FREE1-RNAi*致死表型。另外, *sof524*突变体还能恢复泛素化膜蛋白(如PIN2, BOR1蛋白)液泡降解的全部缺陷。全基因组测序结果精确确定了*BRAF(BRO1-domain protein As FREE1 suppressor)*基因的可读框架中G到A的转变是导致蛋白质序列产生错义突变(丙氨酸变为缬氨酸)的原因。综合分子细胞生物学、生物化学等多角度的研究, 现将植物BRAF的工作机制归纳如下(图3B)^[90]: (i) BRAF是细胞质蛋白, 可通过与ESCRT-I组分VPS23的互作而被募集到多囊泡体中, 或在其被酰基化后锚定于细胞膜上; (ii) 细胞膜定位的BRAF蛋白在去酰基化后, 从细胞膜转移到细胞质中, 导致细胞质内BRAF增加, 利于其募集到多囊泡体; (iii) 在多囊泡体膜上, BRAF通过与FREE1竞争性

结合ESCRT-I组分VPS23, 负控调节FREE1在多囊泡体上的募集; (iv) *sof524*突变体同时含有FREE1与BRAF(A330V)突变. BRAF(A330V)和VPS23的结合能力比BRAF的弱, 因此其与FREE1的竞争力也相对降低. 在DEX处理的*sof524*突变体植物中, 由于BRAF(A330V)竞争能力下降, 在RNAi情况下, 更多的FREE1向多囊泡体募集, 从而回补*FREE1-RNAi*植物中的缺陷. 此外, 某些环境因素例如干旱胁迫, 亦可触发和调节蛋白质的S-酰化. 因此推测某些环境或生长信号, 有很大可能性通过S-酰化过程调节细胞质、细胞膜和多囊泡体中BRAF蛋白的分布, 进而影响多囊泡体的生成, 这将是未来研究中一个有趣的方向.

利用相同的遗传学筛选方法, 姜里文研究组^[91]鉴定到的另外4个*sof*突变体(*sof100*, *sof220*, *sof452*和*sof453*)也均可恢复*FREE1-RNAi*致死表型, 而这些*sof*突变体全部编码同一未知功能的蛋白RST1(RESUR-RECTION 1). 在*free1*突变体中RST1蛋白大量积累, 暗示FREE1蛋白参与负调控RST1蛋白水平, 并且RST1在FREE1下游负调节多囊泡体生物发生和囊泡转运(图3C). 在细胞水平上, 通常大多数多囊泡体生物发生由FREE1介导, 而不依赖于FREE1的途径可能在某些特定条件下对多囊泡体生物发生和液泡蛋白运输起关键作用. 通常, RST1抑制这种不依赖于FREE1的备用途径以限制多囊泡体形成和膜蛋白液泡转运, 使其达到稳定水平. 在*free1*突变体中, RST1的过多积累增大了其对FREE1非依赖性途径的抑制效果, 在很大程度上阻断了多囊泡体生物发生和囊泡转运的备途径, 从而导致幼苗致死. 而在*free1rst1*双突变体中, 如在缺乏RST1的*sof*突变体中, FREE1非依赖性途径被激活, 通过介导备用途径回补幼苗致死表型^[91]. 尽管如此, 关于RST1的分子功能方面仍有许多工作需要进一步开展.

4 植物液泡的生物发生及功能

4.1 液泡蛋白转运的分子机制

液泡作为植物细胞内最大的细胞器在植物的生长发育过程中行使多种重要功能. 液泡主要分为贮藏型液泡和溶解型液泡^[92]. 种子形成阶段的液泡以贮藏型为主, 负责保存储存型蛋白. 这些蛋白在种子萌发时被降解, 释放出能量为植株的生长提供支持. 植物溶

解型液泡的功能与酵母液泡或动物溶酶体颇为相似. 植物溶解型液泡可以储存大量离子及代谢产物, 参与解毒, 对维持细胞稳态具有重要的作用. 在植物营养性组织中, 液泡连同细胞壁产生膨压为植物生长提供动力.

除此之外, 液泡也参与到广泛细胞应激等生命活动中. 它们与其他细胞器相互作用, 共同抵御外界环境胁迫, 维持植物的正常生长. 姜里文研究组发现, 拟南芥Rab7家族中的RABG3f定位于多囊泡体和液泡膜上, 负责介导它们之间的蛋白运输. RABG3f突变体蛋白(RABG3f^{T22N})的过表达会导致植物细胞产生增大的多囊泡体, 影响植物液泡蛋白转运和液泡的形态. 进一步的研究发现, 拟南芥MON1和CCZ1蛋白可以组成一种二聚体复合物, 发挥Rab7鸟嘌呤核苷酸交换因子的作用, 从而激活Rab7及其介导的液泡蛋白转运. 相应地, 在*mon1*突变体的细胞中, 研究人员也观察到了增大的多囊泡体(图2F~H)^[44,93]. 此外, 该研究组还证明, Rab7通过介导拟南芥绒毡层相关的半胱氨酸蛋白酶的液泡运输, 诱导绒毡层细胞程序性死亡从而维持花粉的正常发育. 在缺失Rab7激活的*mon1*突变体中, 绒毡层细胞无法进行程序性死亡. 这导致花粉壁发育异常及花粉萌发率降低. 此外, *mon1*突变体的花粉管伸长也受到抑制, 这些缺陷共同造成植物雄性配子不育^[94].

4.2 溶解型液泡的形成机制

尽管溶解型液泡在植物生长发育中的重要性被广泛认可, 然而关于其形成的机制, 科学家们长期持有不同的观点^[95]. 一些研究认为, 细胞内的液泡由内质网演变而来, 且每个细胞内有且只有一个内部相互连通的液泡^[96]. 而另一种观点则认为, 液泡彼此是独立分开的, 并由细胞内不同小泡融合而成^[97].

为了解答这个问题, 姜里文研究组首先利用共聚焦光学显微镜对拟南芥根细胞中的液泡进行观察. 植物根部连续生长, 因此被广泛作为研究植物发育的材料. 该研究组发现, 在植物根中, 不同生长阶段的根细胞含有不同大小的液泡. 在根尖分生组织靠近静止中心的细胞中, 液泡以小液泡为主, 而随着根细胞的成熟, 液泡也慢慢变大(图4A~C). 然而由于普通光学显微镜分辨率只有大约200 nm, 液泡之间的关系并不能得到清晰的体现, 这限制了研究人员对液泡进一步观

图 4 植物根皮层细胞的液泡形态及生物发生模型。A~C: A为植物根尖纵截面示意图, A图粉色框所标示区域中的根皮层细胞所含液泡在激光共聚焦显微镜B及透射电子显微镜C下的形态, 标尺: 10 μm ; D, E: 透射电子显微镜下可见含有腔内小泡的小液泡在根早期皮层细胞中富集, 其中E为D粉色虚线区域的放大图, 标尺: 200 nm; F: 基于以上观察提出的最新的植物液泡生成模型

Figure 4 The vacuole morphology and biogenesis model in plant root cortex. A~C: A, schematic diagram of the root tip in longitudinal cross section. The vacuole morphology in cells from plant root cortex region as labelled in pink box of graph A, was revealed by confocal B and electron microscopy C respectively. Bars=10 μm . D, E: The small vacuoles (SVs) with intraluminal vesicles (ILVs) were observed in early stage of root cortex under electron microscopy. The pink box region with dash lines in D was enlarged as shown in E. Bars=200 nm. F: The updated working model of vacuole biogenesis in plants based on the above observation

察。而传统电子显微镜虽然在分辨率上有了明显的提升, 却只能得到它们的二维图像。故电子断层三维重构技术在此领域就显得十分必要和重要。另外, 在制备电子显微镜样品的固定环节, 该研究组采用高压冷冻固定法对样品进行固定。相比传统的化学固定法, 这个方法能快速(微秒到毫秒)将细胞内所有结构和成分一并固定, 从而获得最接近于自然状态的细胞超微结构。这两项国际先进技术配合传统细胞生物学方法, 使研究人员第一次从多角度多层次对根细胞中的液泡进行了清晰和全面的观察^[98]。

在该研究组重构出的拟南芥完整根细胞液泡模型

中, 可以清晰地看到每个液泡都是彼此独立分开的。进一步的电子断层三维重构分析发现, 早期皮层细胞中聚集了大量的液泡(small vacuole, SV), 其直径范围是400~1000 nm。这些液泡含有腔内小泡, 由多囊泡体衍生而来(图4D和E)。在中晚期皮层细胞中, 这些小液泡彼此融合最终形成中央大液泡(图4F)。此外, 该研究组还将电子断层三维重构技术拓展至拟南芥液泡缺陷型突变体(包括*free1*, *mon1*和*vti1l*)的研究中。通过对这些突变体的液泡形成过程的分析, 最终证明ESCRT复合体、小G蛋白以及SNARE蛋白共同参与了植物中央大液泡的形成^[98]。

5 总结与展望

自2000年以来, 中国学者在植物细胞内膜系统领域开展了大量的研究并产出了丰硕的成果, 特别是在多囊泡体和液泡起源方向取得了许多重要的进展, 包括首次鉴定出植物细胞内的多囊泡体即为液泡前体, 并提出了一套包含FREE1在内的ESCRT复合体介导多囊泡体形成的模型, 以及更新了由Rab7介导的源于多囊泡体的液泡发生模型. 随着前沿生物细胞成像技术(如三维电子显微镜成像技术、冷冻聚焦离子束技术和冷冻电子显微镜成像技术等)以及体外小泡生成技术在植物研究中的普及应用, 相信越来越多的难题将

会迎刃而解^[99-101]. 尽管如此, 目前人们对植物细胞内膜系统中各类细胞器的生物发生机制以及细胞器功能的理解仍为冰山一角, 要全面透彻地了解植物内膜系统还需要研究者进行更多的探索. 最后, 我们列举一些本领域中值得关注的问题供大家思考: (i) 非经典蛋白分泌途径的具体调控机制是什么? 各类非经典蛋白分泌途径之间存在着怎样的联系? (ii) 作为真核生物中高度保守的超级复合物, 植物的ESCRT复合体是否包含未知的植物特有蛋白? 它们的作用是什么? (iii) 在植物发育过程中, 液泡通过不断发生形态变化来适应植物生长, 哪些机制参与了液泡形态的调节? 这样的形态变化是否伴随着其功能的改变?

参考文献

- 1 Lam S K, Siu C L, Hillmer S, et al. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, *trans*-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, 2007, 19: 296–319
- 2 Lam S K, Tse Y C, Robinson D G, et al. Tracking down the elusive early endosome. *Trends Plant Sci*, 2007, 12: 497–505
- 3 Tse Y C, Mo B, Hillmer S, et al. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell*, 2004, 16: 672–693
- 4 Cui Y, Shen J, Gao C, et al. Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies. *Mol Plant*, 2016, 9: 774–786
- 5 Zhuang X, Cui Y, Gao C, et al. Endocytic and autophagic pathways crosstalk in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 28: 39–47
- 6 Gu Y, Zavaliev R, Dong X. Membrane trafficking in plant immunity. *Mol Plant*, 2017, 10: 1026–1034
- 7 Zhang L, Xing J, Lin J. At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytol*, 2019, 224: 1479–1489
- 8 van de Meene A M L, Doblin M S, Bacic A. The plant secretory pathway seen through the lens of the cell wall. *Protoplasma*, 2017, 254: 75–94
- 9 Cai Y, Jia T, Lam S K, et al. Multiple cytosolic and transmembrane determinants are required for the trafficking of SCAMP1 via an ER-Golgi-TGN-PM pathway. *Plant J*, 2011, 65: 882–896
- 10 Wang X, Chung K P, Lin W, et al. Protein secretion in plants: Conventional and unconventional pathways and new techniques. *J Exp Bot*, 2017, 69: 21–37
- 11 Cai Y, Zhuang X, Gao C, et al. The *Arabidopsis* endosomal sorting complex required for transport III regulates internal vesicle formation of the prevacuolar compartment and is required for plant development. *Plant Physiol*, 2014, 165: 1328–1343
- 12 Li S, Chen M, Yu D, et al. EXO70A1-mediated vesicle trafficking is critical for tracheary element development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 1774–1786
- 13 Li S, van Os G M A, Ren S, et al. Expression and functional analyses of *EXO70* genes in *Arabidopsis* implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1819–1830
- 14 Ding Y, Wang J, Wang J, et al. Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 606–615
- 15 Ding Y, Robinson D G, Jiang L. Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29: 107–115
- 16 Baldrich P, Rutter B D, Karimi H Z, et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide “Tiny” RNAs. *Plant Cell*, 2019, 31: 315–324
- 17 Rybak K, Robatzek S. Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence. *Plant Physiol*, 2019, 179: 1236–1247
- 18 Drakakaki G, Dandekar A. Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci*, 2013, 203–204: 74–78
- 19 Cui Y, Gao J, He Y, et al. Plant extracellular vesicles. *Protoplasma*, 2019, doi: 10.1007/s00709-019-01435-6
- 20 Zhang H, Zhang L, Gao B, et al. Golgi apparatus-localized synaptotagmin 2 is required for unconventional secretion in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2011, 6: e26477

- 21 Li X, Bao H, Wang Z, et al. Biogenesis and function of multivesicular bodies in plant immunity. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 979
- 22 Nielsen M E, Feechan A, Böhlenius H, et al. *Arabidopsis* ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11443–11448
- 23 Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, et al. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev*, 2009, 23: 2496–2506
- 24 Wang J, Ding Y, Wang J, et al. EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in *Arabidopsis* and tobacco cells. *Plant Cell*, 2010, 22: 4009–4030
- 25 Ding Y, Wang J, Chun Lai J H, et al. Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 412–426
- 26 Lin Y, Ding Y, Wang J, et al. Exocyst-positive organelles and autophagosomes are distinct organelles in plants. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1917–1932
- 27 Wang X, Cai Y, Wang H, et al. Trans-Golgi network-located AP1 gamma adaptins mediate dileucine motif-directed vacuolar targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 4102–4118
- 28 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: 1023–1040
- 29 Chung K P, Zeng Y, Jiang L. COPII paralogs in plants: Functional redundancy or diversity? *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 758–769
- 30 Woo C H, Gao C, Yu P, et al. Conserved function of the lysine-based KXD/E motif in Golgi retention for endomembrane proteins among different organisms. *Mol Biol Cell*, 2015, 26: 4280–4293
- 31 Gao C, Cai Y, Wang Y, et al. Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. *Trends Plant Sci*, 2014, 19: 508–515
- 32 Gao C, Yu C K Y, Qu S, et al. The Golgi-localized *Arabidopsis* endomembrane protein12 contains both endoplasmic reticulum export and Golgi retention signals at its C terminus. *Plant Cell*, 2012, 24: 2086–2104
- 33 Zeng Y, Chung K P, Li B, et al. Unique COPII component AtSar1a/AtSec23a pair is required for the distinct function of protein ER export in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14360–14365
- 34 Wang Y, Liu F, Ren Y, et al. GOLGI TRANSPORT 1B regulates protein export from the endoplasmic reticulum in rice endosperm cells. *Plant Cell*, 2016, 28: 2850–2865
- 35 Wang Y, Ren Y, Liu X, et al. OsRab5a regulates endomembrane organization and storage protein trafficking in rice endosperm cells. *Plant J*, 2010, 64: 812–824
- 36 Liu F, Ren Y, Wang Y, et al. OsVPS9A functions cooperatively with OsRAB5A to regulate post-Golgi dense vesicle-mediated storage protein trafficking to the protein storage vacuole in rice endosperm cells. *Mol Plant*, 2013, 6: 1918–1932
- 37 Ren Y, Wang Y, Liu F, et al. *GLUTELIN PRECURSOR ACCUMULATION3* encodes a regulator of post-Golgi vesicular traffic essential for vacuolar protein sorting in rice endosperm. *Plant Cell*, 2014, 26: 410–425
- 38 Feng Q N, Song S J, Yu S X, et al. Adaptor protein-3-dependent vacuolar trafficking involves a subpopulation of COPII and HOPS tethering proteins. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1609–1620
- 39 Zheng W, Jiang Y, Wang X, et al. AP3M harbors actin filament binding activity that is crucial for vacuole morphology and stomatal closure in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 18132–18141
- 40 Shen J, Zeng Y, Zhuang X, et al. Organelle pH in the *Arabidopsis* endomembrane system. *Mol Plant*, 2013, 6: 1419–1437
- 41 Fan L, Li R, Pan J, et al. Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 388–397
- 42 Fan L, Hao H, Xue Y, et al. Dynamic analysis of *Arabidopsis* AP2 subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development. *Development*, 2013, 140: 3826–3837
- 43 Gao C, Zhuang X, Shen J, et al. Plant ESCRT complexes: Moving beyond endosomal sorting. *Trends Plant Sci*, 2017, 22: 986–998
- 44 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*. *Plant Cell*, 2014, 26: 2080–2097
- 45 Takemoto K, Ebine K, Askani J C, et al. Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E2457–E2466
- 46 Wang C, Yan X, Chen Q, et al. Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 499–516

- 47 Wu G, Liu S, Zhao Y, et al. ENHANCED DISEASE RESISTANCE4 associates with CLATHRIN HEAVY CHAIN2 and modulates plant immunity by regulating relocation of EDR1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 857–873
- 48 Wang C, Zhu M, Duan L, et al. *Lotus japonicus* clathrin heavy Chain1 is associated with Rho-like GTPase ROP6 and involved in nodule formation. *Plant Physiol*, 2015, 167: 1497–1510
- 49 Wang J G, Li S, Zhao X Y, et al. HAPLESS13, the *Arabidopsis* μ 1 adaptin, is essential for protein sorting at the *trans*-Golgi network/early endosome. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1897–1910
- 50 Wang H J, Hsu Y W, Guo C L, et al. VPS36-dependent multivesicular bodies are critical for plasmamembrane protein turnover and vacuolar biogenesis. *Plant Physiol*, 2017, 173: 566–581
- 51 Hao L, Liu J, Zhong S, et al. AtVPS41-mediated endocytic pathway is essential for pollen tube-stigma interaction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 6307–6312
- 52 Zhao Y, Yan A, Feijó J A, et al. Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, 2010, 22: 4031–4044
- 53 Li H, Luo N, Wang W, et al. The REN4 rheostat dynamically coordinates the apical and lateral domains of *Arabidopsis* pollen tubes. *Nat Commun*, 2018, 9: 2573
- 54 Wang C, Hu T, Yan X, et al. Differential regulation of clathrin and its adaptor proteins during membrane recruitment for endocytosis. *Plant Physiol*, 2016, 171: 215–229
- 55 Yu Q, Zhang Y, Wang J, et al. Clathrin-mediated auxin efflux and maxima regulate hypocotyl hook formation and light-stimulated hook opening in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2016, 9: 101–112
- 56 Li X, Wang X, Yang Y, et al. Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell*, 2011, 23: 3780–3797
- 57 Li R, Liu P, Wan Y, et al. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell*, 2012, 24: 2105–2122
- 58 Wang L, Xue Y, Xing J, et al. Exploring the spatiotemporal organization of membrane proteins in living plant cells. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 525–551
- 59 Hao H, Fan L, Chen T, et al. Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 1729–1745
- 60 Cui Y, Yu M, Yao X, et al. Single-particle tracking for the quantification of membrane protein dynamics in living plant cells. *Mol Plant*, 2018, 11: 1315–1327
- 61 Zhang X, Cui Y, Yu M, et al. Single-molecule techniques for imaging exo-endocytosis coupling in cells. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 879–880
- 62 Cui Y, Zhang X, Yu M, et al. Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: Principles, limitations, and recent progress. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 619–632
- 63 Cui Y, He Y, Cao W, et al. The multivesicular body and autophagosome pathways in plants. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1837
- 64 Marshall R S, Vierstra R D. Autophagy: The master of bulk and selective recycling. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 173–208
- 65 Zhuang X, Wang H, Lam S K, et al. A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 4596–4615
- 66 Zhan N, Wang C, Chen L, et al. S-nitrosylation targets GSNO reductase for selective autophagy during hypoxia responses in plants. *Mol Cell*, 2018, 71: 142–154.e6
- 67 Zhuang X, Chung K P, Luo M, et al. Autophagosome biogenesis and the endoplasmic reticulum: A plant perspective. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 677–692
- 68 Zhuang X, Chung K P, Cui Y, et al. ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E426–E435
- 69 Han S, Wang Y, Zheng X, et al. Cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with ATG3 to negatively regulate autophagy and immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 2015, 27: 1316–1331
- 70 Yang M, Zhang Y, Xie X, et al. Barley stripe mosaic virus γ b protein subverts autophagy to promote viral infection by disrupting the ATG7-ATG8 interaction. *Plant Cell*, 2018, 30: 1582–1595
- 71 Wang Y, Nishimura M T, Zhao T, et al. ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced

- cell death in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2011, 68: 74–87
- 72 Miao Y, Li K Y, Li H Y, et al. The vacuolar transport of aleurain-GFP and 2S albumin-GFP fusions is mediated by the same pre-vacuolar compartments in tobacco BY-2 and *Arabidopsis* suspension cultured cells. *Plant J*, 2008, 56: 824–839
- 73 Shen J, Suen P K, Wang X, et al. An *in vivo* expression system for the identification of cargo proteins of vacuolar sorting receptors in *Arabidopsis* culture cells. *Plant J*, 2013, 75: 1003–1017
- 74 Shen J, Ding Y, Gao C, et al. N-linked glycosylation of AtVSR1 is important for vacuolar protein sorting in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2014, 80: 977–992
- 75 Miao Y, Yan P K, Kim H, et al. Localization of green fluorescent protein fusions with the seven *Arabidopsis* vacuolar sorting receptors to prevacuolar compartments in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol*, 2006, 142: 945–962
- 76 Wang J, Cai Y, Miao Y, et al. Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J Exp Bot*, 2009, 60: 3075–3083
- 77 Jia T, Gao C, Cui Y, et al. ARA7(Q69L) expression in transgenic *Arabidopsis* cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies. *J Exp Bot*, 2013, 64: 2817–2829
- 78 Leung K F, Dacks J B, Field M C. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic*, 2008, 9: 1698–1716
- 79 Henne W M, Buchkovich N J, Emr S D. The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 2011, 21: 77–91
- 80 Christ L, Raiborg C, Wenzel E M, et al. Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42: 42–56
- 81 Miao Y, Jiang L. Transient expression of fluorescent fusion proteins in protoplasts of suspension cultured cells. *Nat Protoc*, 2007, 2: 2348–2353
- 82 Gao C, Luo M, Zhao Q, et al. A unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Curr Biol*, 2014, 24: 2556–2563
- 83 Shen J, Gao C, Zhao Q, et al. AtBRO1 functions in ESCRT-I complex to regulate multivesicular body protein sorting. *Mol Plant*, 2016, 9: 760–763
- 84 Gao C, Zhuang X, Cui Y, et al. Dual roles of an *Arabidopsis* ESCRT component FREE1 in regulating vacuolar protein transport and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 1886–1891
- 85 Li H, Li Y, Zhao Q, et al. The plant ESCRT component FREE1 shuttles to the nucleus to attenuate abscisic acid signalling. *Nat Plants*, 2019, 5: 512–524
- 86 Yu F, Lou L, Tian M, et al. ESCRT-I component VPS23A affects ABA signaling by recognizing ABA receptors for endosomal degradation. *Mol Plant*, 2016, 9: 1570–1582
- 87 Cvrcková F, Grunt M, Bezvoda R, et al. Evolution of the land plant exocyst complexes. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 159
- 88 Zhao Q, Gao C, Lee P S, et al. Fast-suppressor screening for new components in protein trafficking, organelle biogenesis and silencing pathway in *Arabidopsis thaliana* using DEX-inducible *FREE1-RNAi* plants. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 319–330
- 89 Zhao Q, Zhu Y, Cao W, et al. Genetic suppressor screen using an inducible *FREE1-RNAi* line to detect ESCRT genetic interactors in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol*, 2019, 1998: 273–289
- 90 Shen J, Zhao Q, Wang X, et al. A plant Bro1 domain protein BRAF regulates multivesicular body biogenesis and membrane protein homeostasis. *Nat Commun*, 2018, 9: 3784
- 91 Zhao Q, Shen J, Gao C, et al. RST1 is a FREE1 suppressor that negatively regulates vacuolar trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2019, 31: 2152–2168
- 92 Shimada T, Takagi J, Ichino T, et al. Plant vacuoles. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 123–145
- 93 Cui Y, Gao C, Zhao Q, et al. Using fluorescent protein fusions to study protein subcellular localization and dynamics in plant cells. *Methods Mol Biol*, 2016, 1474: 113–123
- 94 Cui Y, Zhao Q, Xie H T, et al. MONENSIN SENSITIVITY1 (MON1)/CALCIUM CAFFEINE ZINC SENSITIVITY1 (CCZ1)-mediated Rab7 activation regulates tapetal programmed cell death and pollen development. *Plant Physiol*, 2017, 173: 206–218
- 95 Krüger F, Schumacher K. Pumping up the volume—Vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 106–112
- 96 Viotti C, Krüger F, Krebs M, et al. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 3434–3449
- 97 Marty F. Plant vacuoles. *Plant Cell*, 1999, 11: 587–599

- 98 Cui Y, Cao W, He Y, et al. A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in *Arabidopsis* root cells. *Nat Plants*, 2019, 5: 95–105
- 99 Lai L T F, Yu C, Wong J S K, et al. Subnanometer resolution cryo-EM structure of *Arabidopsis thaliana* ATG9. *Autophagy*, 2019, 18: 1–9
- 100 Otegui M S, Pennington J G. Electron tomography in plant cell biology. *Microscopy*, 2019, 68: 69–79
- 101 Fu Z, Peng D, Zhang M, et al. mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM. *Nat Methods*, 2019, 93

Organelle biogenesis and function in plants

CUI Yong¹, ZHUANG XiaoHong¹, SHEN JinBo², GAO CaiJi³ & JIANG LiWen^{1,4}

1 State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Centre for Cell & Developmental Biology, School of Life Sciences, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China;

2 State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China;

3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

4 The Chinese University of Hong Kong Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China

All eukaryotic cells contain an endomembrane system with functionally distinct membrane-bound organelles, including the endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus, trans-Golgi network (TGN), prevacuolar compartment or multivesicular body (PVC/MVB) and vacuole or lysosome. These organelles are generated accurately and efficiently in a well-organized way so as to exert their essential functions in protein transport, plant growth and responses to the environment. Since the year 2000, great progress has been achieved by the Chinese scientists toward our understanding on organelle biogenesis and function in plants. In this review, representative research findings in plant protein trafficking contributed by Chinese scientists are first introduced. Due to the functional importance of PVCs/MVBs, we then focus on the identification and characterization of PVCs/MVBs as well as the mechanisms underlying their biogenesis as regulated by the ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) machinery, especially by the plant-unique ESCRT component, FREE1 (FYVE domain protein required for endosomal sorting 1). In addition, some Chinese scientists recently perform a whole-cell electron tomography analysis in the endomembrane system of root cells to first propose a new MVB-derived vacuole biogenesis model for future investigation of the underlying mechanisms of vacuole formation. Finally, we summarize current research progress on organelle (PVC/MVB and vacuole) biogenesis and function in plants and present future perspectives in this research field.

organelle, biogenesis, endomembrane system, PVC/MVB, vacuole

doi: [10.1360/SSV-2019-0136](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0136)