

細胞生命的重要基礎： 囊泡運輸研究

文・圖／李芳仁

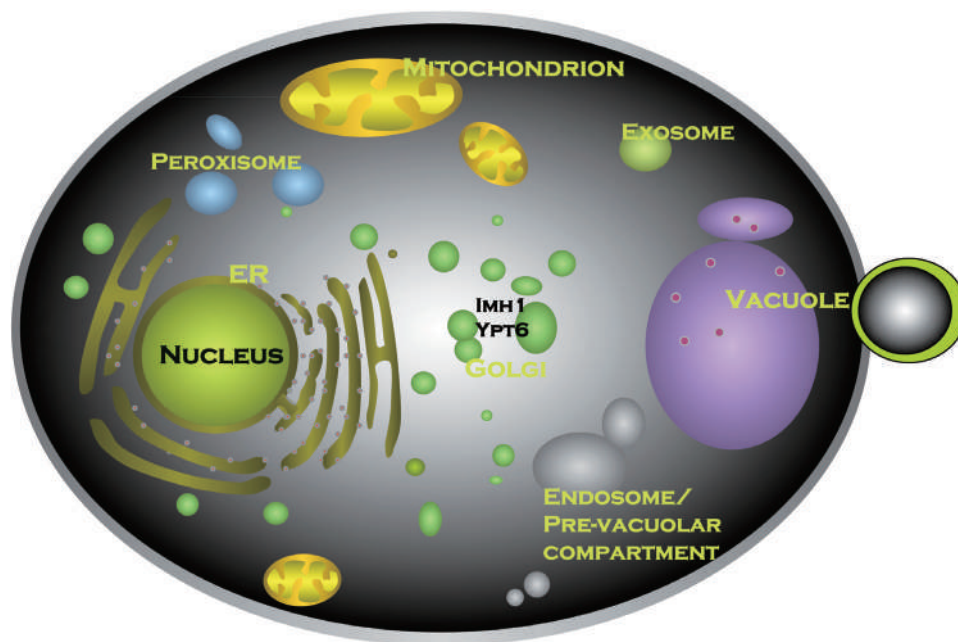


圖1：各種不同的細胞內均具有特定功能的膜胞器。

不管是人類、還是低等生物如酵母菌的細胞生命活動，都仰賴細胞內的分子與物質運輸系統。在各種不同的細胞內都有特定功能的膜胞器（如圖1），而多數蛋白分子與物質不能直接穿過胞膜，必須藉助由單層膜包裹的精細「囊泡」（vesicle）來運輸，囊泡並能融入特定的膜胞器或細胞膜。囊泡運輸的物質有兩類：一類是囊泡膜上的膜蛋白和脂類分子等，主要用於信號傳遞或細胞中膜成分的新陳代謝；另一類是囊泡的內含物，包括荷爾蒙、酵素、胰島素、神經傳導物質等分子，在細胞內膜胞器之間執行特定功能，或經分泌到細胞外後調節細胞本身或其他細胞的功能。若將每個細胞想像成生產與輸出「分子貨物」的工廠，分子貨物就是被包裹在囊泡內或是囊泡膜上，囊泡則是貨車，在細胞內運送分子。囊泡的分子貨物必須精確地傳遞至細胞內特定位置，而時間和地點的正確是最關鍵的。細胞利用囊泡運送建構了生物合成、分子物質分泌及胞飲作用（endocytosis），並且藉此調控蛋白質運送、腦中信號的傳遞、荷爾蒙的釋放、免疫細胞活素訊息傳遞、細胞移動、及細胞生長等重要功能。如果囊泡輸運機制失準，就像路上交通堵塞一樣，細胞們會陷入一片混亂之中，就可能引發不同程度的問題，如神經紊亂、免疫系統紊亂、糖尿病等。2013年全球矚目的諾貝爾生理學或醫學獎，頒發給美國科學家羅斯曼、謝克曼與德國科學家祖多夫，就是因為他們發現細胞內囊泡運輸的調控機制。

研究反式高基氏體（trans-Golgi network, TGN）囊泡運輸的調控機制

在真核細胞中，高基氏體（Golgi apparatus）是一個脂質包覆的膜狀胞器，其中反式高基氏體猶如繁忙而巨大的航空站，將貨物分裝入特定的囊泡，並在正確的時間運送出囊泡，此外，也接收由胞飲作用或其他胞器送來的囊泡。人們早已瞭解大量分子是「搭乘」囊泡在細胞內外往來，卻一直不明白這些太空巴士如何確定各自的啟程時間及目的地。

本人實驗室主要是探討一群小分子GTP結合蛋白酶（GTPase）及ADP-ribosylation factor-like蛋白質（簡稱ARL）在蛋白質及囊泡傳遞調控機制中的角色。重要的研究發現簡約陳述如下：

(1)發現兩個在高基氏體上新的ARL（ARL1, ARL3）

ADP-ribosylation factor（ARF）為Ras致癌基因蛋白GTPase大家族的一支，含ARF及ARF相似蛋白質（ARL）。在各種真核生物都有ARF家族成員的分布，且從人類到酵母菌均具有演化上的高度保留性。ARF會參與細胞內的囊泡運輸，活化磷脂水解酶（PLD）與肌醇磷脂3激酶（PI3 kinase）之訊息調控，而影響細胞內物質傳送、胞外分泌、以及胞飲等作用，進而影響到細胞的活動與生存。雖然到目前為止已發現許多ARL的存在，但對ARL蛋白質的功能所知有限。我們利用酵母菌為模式首先發現兩個新的ARL（ARL1, ARL3），其功能很明顯與已知的ARF不同，並不參與一般的內質網到高基氏體囊狀泡的傳送作用。ARL1與ARL3都位於高基氏體，參與調控另一個特殊的蛋白質GAS1由高基氏體到細胞膜的囊泡運輸，並因此調控了細胞壁的完整性。

(2)首先發現ARL1的活化因子

我們進一步針對調控在高基氏體上的ARL1 small GTPases 蛋白質的活性做了一系列的分析研究。ARF與ARL皆會因結合GTP而活化，如何調控活化與去活化，對於整個囊泡運輸是很重要的關鍵。我們研究中發現一個鳥糞嘌呤核苷酸交換因子(GEF)-SYT1會與ARL1直接作用，並藉此調控ARL1在高基氏體上的活化，進而影響高基氏體重要蛋白Imh1的分布與功能。我們也發現SYT1只能活化ARL1下游的一種功能。此外，我們發現ARL1不同功能的活化可能由不同活化因子來調控（圖2）。

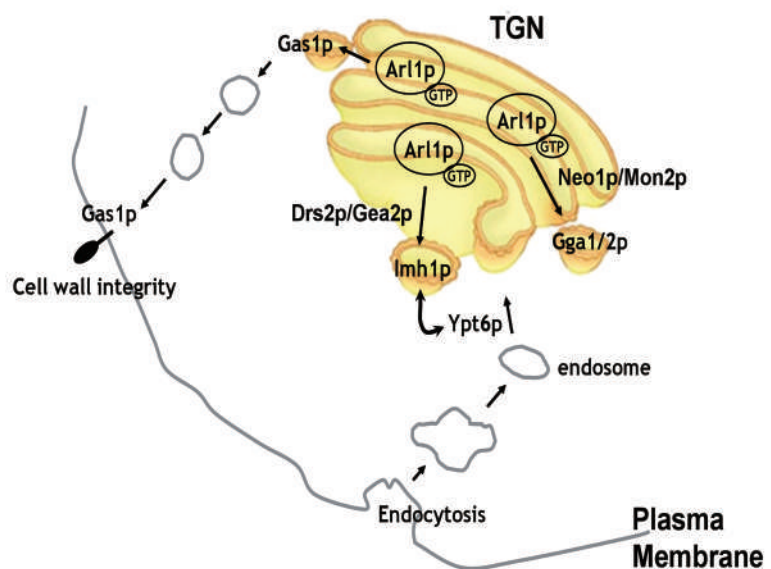


圖2：在高基氏體上活化三種不同功能的ARL1，可由不同活化因子來調控。

(3) 証實ARL1在高基氏體上有回饋作用的調控因子

高基氏體蛋白（Golgins）對於高基氏體的結構與功能上負責很廣泛的任務，而它們要被帶至高基氏體上才會執行繫鏈功能。一般會由活化的ARF、ARL等吸引至高基氏體上，但是高基氏體蛋白如何執行任務以及如何被調控仍不明朗。我們曾發現一種高基氏體蛋白IMH1會被含有GTP的ARL1吸引至反式高基氏體網路（TGN），進而參與調控特定囊泡回送到高基氏體。待GCS1水解酶將ARL1的GTP水解為GDP後，IMH1與ARL1就會離開高基氏體，而IMH1與GCS1會互相競爭與ARL1結合。此外，研究也發現IMH1的自我結合（self-interaction）力量會影響ARL1的活性；IMH1的自我結合能力越強，則ARL1-GTP越少被GCS1水解。因此，我們認為IMH1是一個在高基氏體上具有回饋作用的調控因子，在不同的時間與空間影響ARL1水解GTP與去活化的過程。高基氏體蛋白在哺乳動物細胞是個蛋白質家族，目前對於這個蛋白質家族的認識不多，但已知其異常會造成結構異常及特定蛋白質的運送缺陷。在此家族其他成員之蛋白質缺陷則會造成致死性骨骼發育不良（Lethal skeletal dysplasia）和老年樣皮膚營養不良及骨結構不良（Geroderma osteodysplastica）。因此了解高基氏體蛋白IMH1的功能以及相關機轉將有助於進一步找尋高基氏體蛋白相關的致病機制。

(4) ARL1參與調控高基氏體上脂質膜的翻轉

高基氏體雙層磷脂膜的不對稱性及曲度的動態分布，在許多生物細胞內的囊泡運輸扮演重要角色。我們想了解ARL1如何影響高基氏體脂質膜的成分與分布並進而影響高基氏體上蛋白質的坐落與脫離。我們找到一個ARL1的結合蛋白質DRS2。DRS2為一類P型三磷酸腺酶，位在高基氏體上，具有翻轉磷脂質絲胺酸（PS）的能力。GEA2為腺嘌呤核苷二磷酸核糖化因子交換因子，它會與DRS2結合並且影響DRS2磷脂質翻轉酶的活性。研究發現ARL1

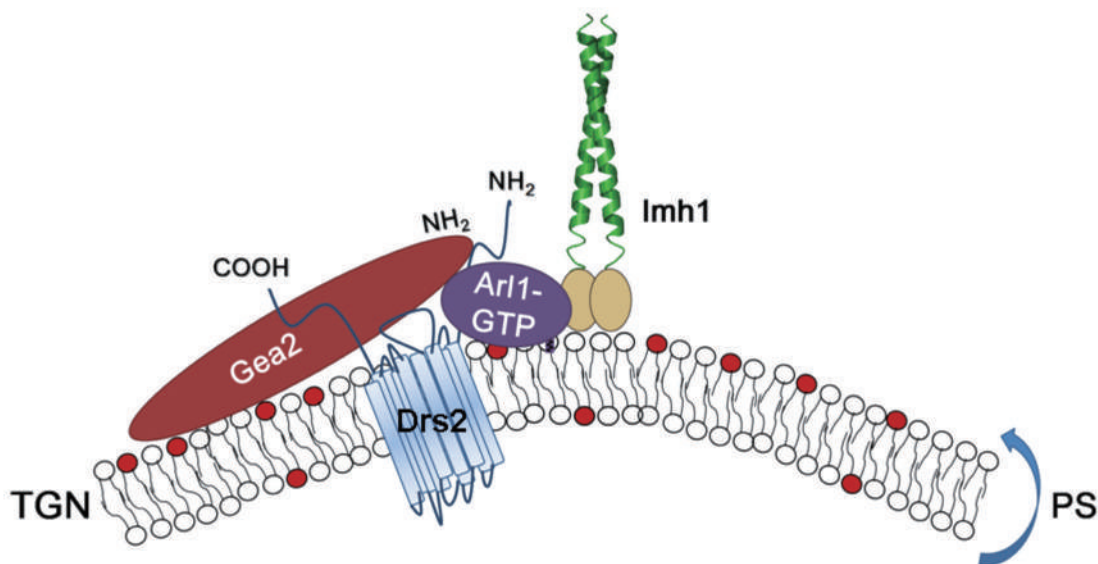


圖3：ARL1會和GEA2共同調控DRS2的磷脂質翻轉酶活性，進而影響ARL1結合蛋白質IMH1在細胞中的分布及功能。

會和GEA2共同調控DRS2的磷脂質翻轉酶活性，進而影響ARL1結合蛋白質IMH1在細胞中的分布（圖3）。ARL1及GEA2透過調控DRS2活性及高基氏體上脂質膜的翻轉，影響膜內外分布的不規則性，進而調控蛋白質運輸與囊泡傳遞。DRS2在生理上也扮演很重要的角色，在哺乳細胞中DRS2的相似蛋白的突變目前已知與小腦性的共濟失調（cerebellar ataxia）、精神發育遲滯（mental retardation）以及失衡症候群（disequilibrium syndrome）相關；而當DRS2的相似蛋白失去作用則會引起嚴重的肝病。因此了解調控DRS2的活性與機制，可以進一步幫助了解DRS2的相似蛋白在人體中的功能與調控機制。此篇研究刊登在《Proc. Natl. Acad. Sci. USA》，該刊於107篇論文中特別選出4篇撰寫評論報導，主審Dr. Randy Schekman（2013年諾貝爾生理學或醫學獎得主）選出本文，並請國際知名Dr. Todd Graham評論，文中指出：「此發表的研究成果提供了一個嶄新的調控高基氏體資訊，即ARL1及其相關結合蛋白質如何透過調控高基氏體上脂質膜的翻轉，進而影響膜內外分布的不規則性，而調控蛋白質運輸與傳遞的進行。」本人因此受邀於美國 FASEB 2010 及 2013 Science Research Conference 及 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference 國際會議演講。

(5)研究ARL在生理及醫學的重要性

現今已知共有近百種遺傳疾病、自體免疫疾病及少數癌症的致病機轉是由於某些分子在運輸過程中遭到阻礙所造成。例如高基氏體的結構在人類的神經退化疾病中即扮演重要角色，因此了解 ARL1如何調控高基氏體的結構及功能將有機會提供未來治療相關疾病的方向。在哺乳動物，本實驗室亦首度發現ARL4A對於維持高基氏體結構及胞囊運輸很重要。ARL4和早期發育、體節發生、及中樞神經系統分化有關。部分ARL與神經退化疾病有關，ARL影響纖毛的發育，ARL的突變也可能造成Bardet-Biedl氏症候群（Bardet-Biedl syndrome）及家族性小腦蚓部發育不全（Joubert氏症候群）等。ARL1的功能從人類到酵母菌具有演化上的保留性，因此了解ARL1/ARL3的活性與機制，可以進一步幫助了解ARLs在人體中的功能與調控機制。目前本實驗室正以分子遺傳、生化及細胞生物學方法探討ARL執行運輸調控之分子機轉，希望能發現與囊泡運輸及小分子GTPase相關之疾病，以建立分析及研究之對策。

從事學術研究感言

基於對臺灣培育的情感，1994年我帶著在美12年多的分子生物學研究經驗，希望能奉獻於國內研究學術。在返臺近20年研究工作歲月的10年，每天教學並與學生埋頭苦幹討論實驗做研究最少12小時，雖然辛苦但也很幸運的升等到教授，並獲得兩次國科會傑出獎。然而身體也付出了相當大的代價，並因初期肺癌而切除一葉肺臟，本以為人生最愛的研究工作將因此終止。於是在自己的研究工作上放慢腳步，也接下學校及醫院研究相關的行政工作，以便服務學校的年輕研究學者。雖然在行政工作服務能得到幫助教師及醫師做研究的快樂，但進行研究工作的初衷，才是我在每天忙完行政工作的最愛。研究基礎生物醫學本來就是吃力不討好的，尤其是細胞內囊泡傳遞功能與分子機制的研究，研究生往往需努力研究至少4至2年，才可能有一篇優質的論文。實驗室數年來學生研究上的努力，及臺大分子醫學研究所的同仁與學術界朋友在研究上的建議，才能在2013年第三次獲得國科會傑出獎。感謝學生能與

我一起秉持「追求完美、近乎苛求」的研究態度，將一系列的囊泡傳遞功能與機制研究成果發表在國際一流的期刊，並研究成果貢獻於世界生物醫學研究。最後要感謝國科會的長期研究經費支持、及家人的支持。📖（本期專欄策畫／檢驗暨生技系方偉宏教授&生命科學系黃偉邦教授）

參考文獻：

- [1] Liu Y.-W., Huang C.-F., Huang, K.-B., and *Lee F.-J. S. (2005) "Role for Gcs1p in Regulation of Arl1p at Trans-Golgi Compartments " Mol. Biol. Cell 16: 4024-4033. (Selected in the "Faculty of 1000 Biology")
- [2] Liu Y.-W., Lee S.-W., and *Lee F.-J. S. (2006) "Arl1p is Involved in Transport the GPI-anchored Protein Gas1p from the Late Golgi to the Plasma Membrane" J. Cell Sci. 119: 3845-3855. (Highlighted in the "In this Issue")
- [3] Chen K.-Y., Tsai P.-C., Hsu J.-W., Hsu H.-C., Fang C.-Y., Chang L.-C., Tsai Y.-T, Yu C.-J., and *Lee F.-J. S. (2010) "Syt1p Promotes Activation of Arl1p at the Late Golgi to Recruit Imh1p" J. Cell Sci. 123: 3478-3489. (Highlighted in the "In this Issue")
- [4] Lin Y.-C., Chiang, T.-C., Liu, Y.-T., Tsai, Y.-T., Jang, L.-T., and *Lee F.-J. S. (2011) " ARL4A Acts with GCC185 to Modulate Golgi Apparatus Organization" J. Cell Sci. 124: 4014-4026.
- [5] Chen K.-Y., Tsai P.-C., Liu Y.-W., and *Lee F.-J. S. (2012) "Competition between the golgin Imh1p and the Gcs1p GAP stabilizes activated Arl1p at the late-Golgi" J. Cell Sci. 125: 4586-4596
- [6] Tsai P.-C., Hsu J.-W., Liu Y.-W., Chen K.-Y., and *Lee F.-J. S. (2013) "Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p" Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110: E613-622 (Selected in "From the Cover" with a Commentary on page 2691), (Recommended as being of special significance in the "Faculty of 1000")



與實驗室學生及同仁聚餐同樂。

李芳仁小檔案

1980年畢業於臺灣大學農業化學系，服完兵役即赴美深造，先後獲美國北卡州立大學生物科技碩士及博士學位。1987年進入美國哈佛醫學院與麻州總醫院分子生物研究所從事博士後研究工作，1990年擔任美國國家衛生研究院（National Institutes of Health）資深研究員。1994年捨棄美國優質研究環境，返國任教於臺大醫學院分子醫學研究所至今，目前擔任分子醫學研究所特聘教授兼所長，並受醫學院轉譯醫學博士學位學程及基因體暨蛋白質醫學研究所合聘。2001-2006年曾任職臺大醫院醫學研究部副主任，2009-2012年擔任臺大醫學院研究發展處主任兼研究副院長乙職。2012年8月迄今兼任臺灣大學研究發展處研發長。從事基礎生物醫學研究，主要探討細胞內囊泡傳遞功能與分子機制，獲得三次國科會傑出研究獎。