



吴一弘, 陈国庆, 王文凯, 冯国忠. 昆虫中的核输出现象 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1095–1106.

昆虫中的核输出现象

吴一弘^{1,2}, 陈国庆², 王文凯^{1*}, 冯国忠^{2*}

(1. 长江大学农学院, 湖北荆州 434025; 2. 中国水稻研究所/水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006)

摘要: 核质转运是真核细胞生命活动重要的组成部分, 细胞核内蛋白的平衡及转录出的 RNA 出核成熟过程都依赖于核输出, 核输出与真核生物的生命活动密切相关; 病原物在侵染昆虫时也会利用宿主的核输出机制干扰宿主的免疫反应或劫持宿主的核输出蛋白以利于病毒的组装及复制。本文主要介绍真核细胞中核输出的基本机制、蚊子和果蝇等模式昆虫中核输出通路; 简述核输出机制在昆虫胚胎发育及免疫等生理活动及信号通路中的影响, 以及与昆虫相关的病毒蛋白对昆虫等宿主核输出机制的利用和破坏情况。

关键词: 昆虫; 核孔复合体; 核质转运; 核输出信号; 核输出受体

中图分类号: Q963; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1095-12

Nuclear export in insects

WU Yi-Hong^{1,2}, CHEN Guo-Qing^{1,2}, WANG Wen-Kai^{1*}, FENG Guo-Zhong^{2*} (1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China; 2. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: Nucleocytoplasmic transport plays an essential role in diverse cellular activities. The protein balance and the transport of RNA from the nucleus depend on the nuclear export, which is closely related to the life processes of eukaryotes. Pathogens also take advantage of host nuclear export mechanism to interfere with host immune response or hijack host nuclear export proteins for viral assembly and replication. This review mainly introduced the mechanism of nuclear export in eukaryotic cells, especially model insects such as mosquitoes and fruit flies, and described the effects of nuclear export mechanism on physiological activities and signal pathways of insect embryonic development and immunity, as well as the utilization and destruction of insect-related viral proteins on the nuclear export mechanism of host insects.

Key words: Insect; nuclear pore complex; nucleocytoplasmic transport; nuclear export signal; exportin.

昆虫是地球上数量最多的动物群体, 昆虫的生理活动依赖于细胞中信号通路转导及各种基因的有序性表达。核质转运过程是真核生物细胞核膜内外物质平衡的基础 (Lusk and King, 2017)。在细胞生命活动周期中, 无论是转录因子类穿梭蛋白的核质转运、细胞分裂末期肌动蛋白的核内

外平衡, 还是未成熟的 mRNA 及各种小 RNA 的转运等都需要跨过细胞质与细胞核之间的核膜屏障。核膜内外周聚集着多种助力核质转运的蛋白, 组装出复杂的核质转运结构。在昆虫的胚胎发育、代谢循环和免疫机制等生命活动中, 一些重要的穿梭蛋白或 RNA 通过核输出机制从细胞核转运至

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972983, 32072487); 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (CPSIBRF-CNRRRI-202115)

作者简介: 吴一弘, 男, 1995 年生, 湖北黄石人, 硕士研究生, 研究方向为生物农药, E-mail: redone233@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 冯国忠, 博士, 研究员, 研究方向为微生物资源与生物农药, E-mail: fengguozhong@caas.cn;

王文凯, 博士, 教授, 研究方向为植物保护, E-mail: ww@yangtzeu.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-07-08; 接受日期 Accepted: 2021-08-05

细胞质中,行使其功能或进一步加工成熟。核输出的受阻使这些穿梭蛋白的功能遭受严重破坏,相应信号通路无法继续响应,严重时导致昆虫细胞死亡 (Mason and Goldfarb, 2009)。

杆状病毒等病原物在侵入昆虫细胞并进行增殖时,也会争夺宿主的众多细胞器以及核质转运装置使病毒蛋白顺利穿梭核膜,同时也会抑制宿主编码的抗病毒因子 mRNA 的表达或分解宿主核膜蛋白组分以利于其在宿主细胞内的增殖复制。本文主要描述核质转运结构、蛋白核输出的基本机制及果蝇等昆虫中核输出的功能,简单介绍杆状病毒及一些虫媒病毒等对昆虫等宿主核输出机制的利用情况。

1 核孔复合体

真核生物的细胞核被核膜包被,基因组存在于细胞核内,确保了遗传物质的稳定性。核膜在空间上分隔开细胞核与细胞质的各种内容物,并在细胞分裂时短暂的消失,这是真核生物区别于原核生物的一个典型特征。真核生物基因在转录和翻译等表达调控过程中,核膜屏障在确保中心法则的核质交换时各细胞器有序地运且转互不干扰,保证细胞代谢运转的高效性和稳定性。不同的细胞器由膜状结构隔开,不同隔膜内的细胞器也需要广泛的信息交换。因此,分子之间需要频繁且可靠地进行跨膜运输,内质网、线粒体和高尔基等细胞器通过不同的途径进行信息交换,包括信号通路、转运体和囊泡运输等。细胞核和细胞质之间的分子跨核膜运输主要通过镶嵌在核膜上的核孔复合体 (Nuclear pore complex, NPC) 完成。NPC 是一种巨大的蛋白质复合体,大约由 30 多种不同的核孔蛋白 (Nucleoporin, Nup) 重复 16 份拷贝组成一个八面对称的轮状结构,外径 120 nm,高度 70 nm,预测分子量为 50 ~ 110 MDa (Devos *et al.*, 2014; Guglielmi *et al.*, 2020)。在内质网的环状片层 (Annulate lamellae, AL) 上也存在一些类似 NPC 的结构,称为 ALPC,但是没有核篮 (Nuclear basket) 与中心通道等结构 (Hampoelz *et al.*, 2016)。核质转运系统可以分为固定和流动两个部分,固定在 NPC 中的 Nup 包括多螺旋结构域与跨膜结构域的 Scaffold-Nup 和富含

苯丙氨酸-甘氨酸 (FG) 重复序列的 FG-Nup,可移动部分的核转运受体蛋白 (Karyopherin, Kap) 短暂地结合至 FG-Nup 上运输货物蛋白。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中绝大部分的 Nup 位于 NPC 中,少量 Nup 存在于核仁、核散斑及内质网等结构。其中 Scaffold-Nup 构成 NPC 的结构框架,嵌合在核膜上,建立起一个内径大约 50 nm 的疏水通道,FG-Nup 结合 Kap 并引导 Kap-载体蛋白 cargo 复合体的运输 (Rout *et al.*, 2000; Denning *et al.*, 2003; Hampoelz *et al.*, 2019; Mobbs and Hoelz, 2020)。

2 核质转运蛋白

2.1 Ran 蛋白

Ran (Ras-related nuclear protein) 是一种广泛存在的小分子 G 蛋白,在介导蛋白核质转运中起重要的调节作用,翻译后通过赖氨酸乙酰化起调节作用,泛素化的 RanGTP 酶激活蛋白 (Ran GTPase-activating protein, RanGAP) 在脊椎动物、酵母及植物中的氨基酸序列修饰及靶向作用存在很大差别 (Mahajan *et al.*, 1997; Quimby and Dasso, 2003)。Ran 主要与核质转运相关,同时 Ran 在与组蛋白 H3/H4 结合促进 NPC 的组装、纤毛的形成以及微管的聚合等方面具有诸多调控功能,并与细胞有丝分裂中纺锤体的形成、维持和调控相关,通过释放纺锤体组装因子 (Spindle assembly factor, SAF) 介导有丝分裂功能,Ran 与幼虫神经干细胞的时序性发育密切相关,敲除致死 (Kahana and Cleveland, 1999; Dasso, 2001; Chen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2019)。昆虫能通过上调 Ran 的表达进而调控 NTF2 (Nuclear transport factor 2) 介导的核输入,提高多个解毒酶 (Cyp4d20、Cyp4ae1、GstD5、Sod3) 表达的效率以应对溴氰菊酯等药物的胁迫作用 (Liu *et al.*, 2016a; Karamipour *et al.*, 2019)。家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 和苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 在感染宿主过程中通过编码 microRNA (miRNA) 下调宿主 Ran 蛋白的表达,从而调节宿主小 RNA 介导的防御机制 (Singh *et al.*, 2012; Karamipour *et al.*, 2019)。

2.2 RanGTP-RanGDP 循环

Ran 与 Kap 之间的相互作用调节货物蛋白的运输, Ran 与 GDP 或 GTP 组成不同形式的 Ran 蛋白穿梭于核膜两侧。RanGDP 主要分布在细胞质中, RanGTP 主要分布在细胞核中, 在核膜两侧形成 RanGTP 浓度梯度决定核质转运的方向 (Quimby and Dasso, 2003)。在 RanGTP 与 RanGDP 循环及核质转运中, Kap 与细胞质中的货物蛋白结合进入细胞核内, 再与 RanGTP 结合释放货物蛋白, Kap-RanGTP 复合物再次进入细胞质循环; 核输出时, RanGTP 和货物蛋白分别结合 Kap, 在穿过 NPC 后, RanGTP 在细胞质中水解成 RanGDP, 导致复合体的解体, 释放出货物蛋白。细胞质中 RanGAP 激活 RanGTPase 水解 RanGTP, 产生的 RanGDP 通过专用的 NTF2 转运入核, RanGDP 在细胞核内的 Ran 鸟嘌呤-核苷酸交换因子 (Ran guanine-nuclear exchange factor, RanGEF) 以及调控染色体浓缩调节因子 (Regulator of chromosome condensation 1, RCC1) 促进下与 GTP 转化为 RanGTP 及 GDP。RanGTPase 系统为货物蛋白结合和释放的主动控制提供核质转运周期中唯一的能量输入, 这种 RanGTP-RanGDP 的不同区域循环也是 RanGTP 核质内外浓度梯度差产生的主要原因 (Weis, 2003; Mosammaparast and Pemberton, 2004; Fan *et al.*, 2011; Hampoelz *et al.*, 2019)。

2.3 核转运受体

离子和小分子物质包括能被 FG-Nup 识别并互作的小分子蛋白质可以通过扩散穿过 NPC, 疏水残基以及带正电荷的精氨酸残基等具有显著的促进转运效果 (Timney *et al.*, 2016; Frey *et al.*, 2018)。而生物大分子的核质穿梭受限于体积与分子量的大小。一般直径小于 5nm 或者分子量小于 40 kDa 的蛋白质也可以自由通过 NPC, 分子量大于 40 kDa 的蛋白质及一些 RNA 的转运需要依赖于核转运受体蛋白 Kap 的协助。Kap 属于高度保守的 Karyopherin- β (Kap β) 超家族, 不同物种之间 Kap 的数量也不等, 例如在酿酒酵母中存在 14 种 Kap, 而哺乳动物中存在 20 种以上的 Kap (Gorlich *et al.*, 1997; Tessier *et al.*, 2019)。Kap 分子量范围在 90 ~ 145 kDa, Kap 包含一个 N 端结构域用于结合 RanGTP, 并可以直接与 NPC 中的 Nup 相互作用。Kap 可分为核输入受体蛋白 (Importin) 与核

输出受体蛋白 (Exportin), 通过识别货物蛋白的核输入信号 (Nuclear localization signal, NLS) 或核输出信号 (Nuclear export signal, NES) 直接与底物蛋白相互作用。Kap 也可通过接头蛋白 (Adaptor protein) 识别底物, 将底物运送进细胞核或运出细胞核 (Mosammaparast and Pemberton, 2004; Xu *et al.*, 2010)。

核输出因子 (Nuclear export factor, NXF) 是另一类保守的核转运因子, NXF 主要将未成熟的 mRNA 前体复合物及病毒的 RNA 转运出细胞核, NXF 的功能依赖于 NXF 与 NTF2-related export protein (NXT) 的异源二聚体结合 (Black *et al.*, 1999)。NXF 与典型的核输出受体相似, 能识别 FG 重复序列并与相关 Nup 相互作用, 从而介导 mRNA 复合体的出核转运 (Izaurralde, 2002)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* S2 细胞中, NXF1 缺失时, 无内含子与剪切体的 poly (A) + mRNA 无法运出细胞核 (Herold *et al.*, 2001)。利用 RNA 标记技术发现 NXF2 与 NXF3 具有介导 mRNA 的核输出活性, 但在内源性 mRNA 底物核输出中的功能尚不明确 (Herold *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001)。此外, 在酵母等真核生物中, Mtr2p、Yra1p、EJC、Nab2p、Sac3p、Gle2p 等蛋白被报道参与 RNA 转运出核过程的不同阶段, 具体蛋白功能详见 (Erkmann and Kutay, 2004)。

2.3.1 Importin 介导的入核转运

在 Kap-RanGTP 转运模型中, 大分子蛋白质主动运输进入细胞核, 需要含有富含碱性氨基酸 NLS 作为识别信号, 目前研究最多的是经典型核定位信号 (classical NLS, cNLS), 此外还有诸多类型的核定位信号, 包括空间型核定位信号、隐秘型核定位信号和多分型核定位信号等。典型的 cNLS 是猿猴病毒 SV40 大 T 抗原上一段单分型 cNLS (PKKKRKV) 及核蛋白上一段双分型 cNLS (KRPAATKKAGQAKKKK), 根据这些特点建立起 NLS 预测公式 (表 1) (Kalderon *et al.*, 1984; Robbins *et al.*, 1991; Marfori *et al.*, 2011)。Importin α 又称为 Karyopherin α , Importin β 又称为 Karyopherin β , 具有 cNLS 的货物蛋白与 Importin α 的犴猿重复 (Armadillo repeat) 序列结合, Importin α 的 N 端识别 Importin β 的结合域 (Importin β binding domain, IBB) 并结合, 形成

Cargo-Importin α -Importin β 复合体, 经 NPC 中的 FG-Nup 识别后被胞质环纤维推入中心通道, 进入细胞核后 RanGTP 与 Importin β 结合将货物蛋白从复合体中释放出来, 完成货物蛋白转运入核 (Conti *et al.*, 1998; Goldfarb *et al.*, 2004; Kimura and Imamoto, 2014)。蛋白质入核过程如图 1-A 所示。在透化细胞中, Importin β 在没有携带 Importin α 或 Cargo 且无外源能量时, 又能以不依赖于 Ran 循环的方式转运进细胞核 (Kose *et al.*, 1997)。黑腹果蝇中主要存在三种 Importin α (Importin $\alpha 1$ 、Importin $\alpha 2$ 和 Importin $\alpha 3$), 三者相互之间同源性在 42% ~ 46% 之间, Importin $\alpha 1$ 和 Importin $\alpha 2$ 突变体配子存在缺陷, Importin $\alpha 3$ 突变导致幼虫在 1 龄或 2 龄期间死亡 (Goldfarb *et al.*, 2004; Ratan *et al.*, 2008)。

2.3.2 Exportin 介导的出核转运机制

Exportin 介导的出核转运机制与 Importin 介导的入核转运机制稍有不同, exportin 识别的货物蛋白密集富含亮氨酸 (Leu) 等疏水性氨基酸的

NES。经典型 NES 最早是从人类免疫缺陷病毒 I 型 (*Human immunodeficiency virus type 1*, HIV-1) 的 REV 蛋白上鉴定而来 (Meyer *et al.*, 1996), 目前已经在超过 300 种蛋白中鉴定到 NES 序列, 如转录因子、核糖核蛋白和病毒蛋白等, 依据这些 NES 特点得到一个较为宽泛的 NES 典型特征序列模式: $\Phi-X_{2-3}-\Phi-X_{2-3}-\Phi-X-\Phi$ (Φ 为 L/I/V/F/M, X 代表任意氨基酸) (表 1) (la Cour *et al.*, 2004)。与 cNLS 不同, NES 的预测经常不准确, NES 能以氮端-碳端或碳端-氮端的方向结合染色体维持蛋白 (Chromosomal region maintenance, CRM1), 使得 NES 具有多样性 (Fung *et al.*, 2017)。三元复合物 Cargo-Exportin-RanGTP 经 NPC 从细胞核转运至细胞质中, Ran 结合蛋白 (Ran binding protein, RanBP) 中含有 NES 及 Ran 结合域的 RanBP1 将 RanGTP 从三元复合物中解离释放出来, RanGAP 水解 RanGTP 后释放货物蛋白完成蛋白质的出核转运 (图 1-B) (Fukuda *et al.*, 1997; Floer and Blobel, 1999; Koyama and Matsuura, 2010)。

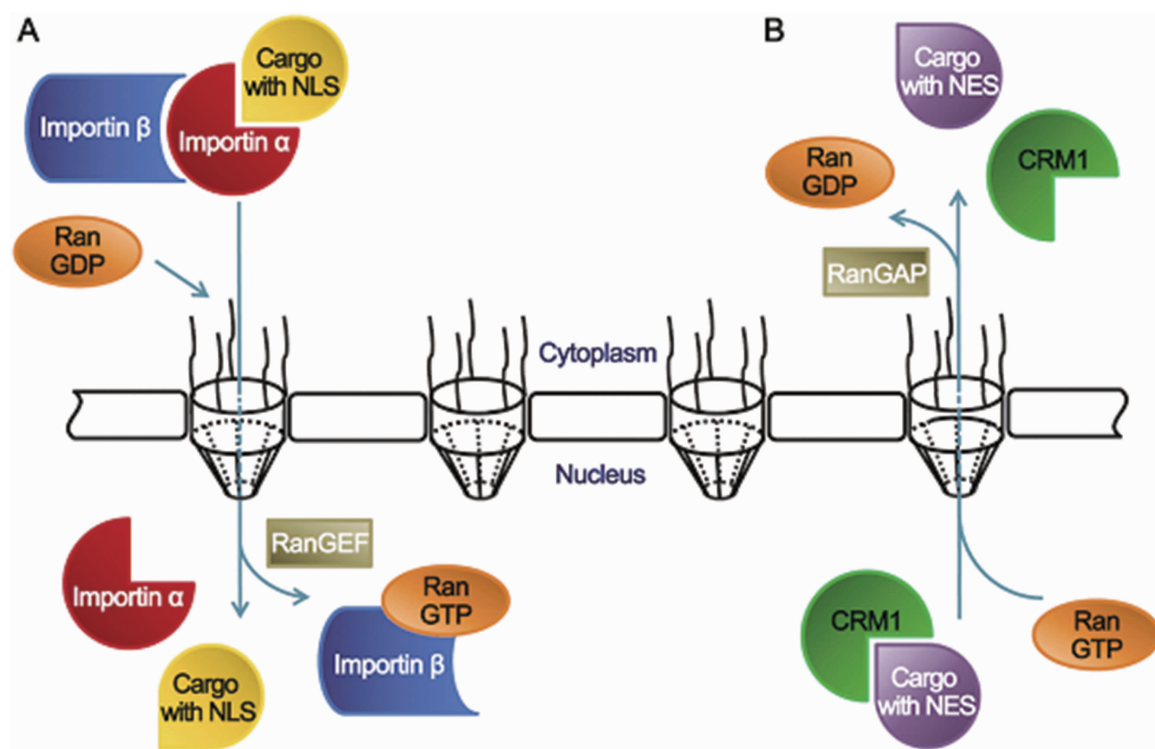


图 1 核质转运示意图

Fig. 1 Schematic diagram of nucleocytoplasmic transport

注: A, 含 NLS 蛋白质经 Importin- α /Importin- β 二聚体介导的入核过程; B, 含 NES 蛋白主要经由 CRM1 调控出核。Note: A, Importin- α /Importin- β heterodimer mediated nuclear import of NLS-containing proteins; B, NES-containing proteins were mainly regulated by CRM1 for nuclear export.

表 1 NLS 和 NES 模序的典型特例及其代表性序列
Table 1 Consensus and representative sequences of NLS and NES

类别 Category	保守序列 Consensus sequence ^a	代表性序列 Representative sequence ^b
单分型 NLS	KR (K/R) R, K (K/R) RK	PKKKRKV
Monopartite NLS	(P/R) XXKR (^DE) (K/R)	PAAKRVKLD
	KRX (W/F/Y) XXAF	AAAKRSWSMAF
	(R/P) XXKR (K/R) (^DE)	RAAKRKYFAA
	LGKR (K/R) (W/F/Y)	SALGKRKFA
双分型 NLS	KRX ₁₀₋₁₂ K (KR) (KR)	KRPAATKKAGQAKKKK
Bipartite NLS	KRX ₁₀₋₁₂ K (KR) X (K/R)	KRIAPDSASKVPRKKTK
NES	ΦX ₂₋₃ ΦX ₂₋₃ ΦXΦ	LPPLERLTL

注: “X 代表任何一种氨基酸, ^DE 为除酸性氨基酸 (天冬氨酸和谷氨酸) 之外的氨基酸, Φ 为 L/I/V/F/M。^b 序列来源为 (Dingwall and Laskey, 1991; Kutay and Guttinger, 2005; Kosugi *et al.*, 2009) 。 Note: “X, Any amino acid; ^DE, Any amino acid except aspartate or glutamate; Φ, Leucine, isoleucine, valine, phenylalanine or methionine. ^bThe sequences were from (Dingwall and Laskey, 1991; Kutay and Guttinger, 2005; Kosugi *et al.*, 2009) .

3 真核生物核输出途径及其细胞功能

RNA 的核输出途径主要通过 NXF-NXT 转运出核, 然而近年发现多种不同的 exportin 也能介导各类 RNA 的核输出, exportin 的 “货物” 更加多样。虽然一些小分子的蛋白能自由通过 NPC, 但是一些与 FG-Nup 亲和力较高的小分子蛋白能更高效快速地通过 NPC, 这表明一些小分子蛋白能通过 FG-Nup 或 exportin 出核, 实现更快的出核转运速率。因此, 本章仅介绍各种 exportin 的功能及这些 exportin 典型的货物蛋白。

exportin 在高等真核生物中普遍存在, 目前在酵母、果蝇及人类细胞中已发现的核输出受体共有 7 类, 包括 XPO1 (也称 CRM1/EMB1)、XPO2 (也称 CSE1/CAS)、XPO4、XPO5、XPO6、XPO7 和 XPOt 等 (Kimura and Imamoto, 2014) 。众多 exportin 分别协助不同类型大分子的核质转运, CRM1 是最主要的核输出受体蛋白, 包括昆虫病毒蛋白、生长调节蛋白及肿瘤抑制因子等绝大多数需要出核转运货物蛋白经由 CRM1 途径介导出核, Leptomycin B (LMB) 及一些烷基化试剂能与 CRM1 结合并抑制这一途径 (Kudo *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2006; Hutten and Kehlenbach, 2007) 。其它的几个核输出受体研究较少, Cse1/CAS 主要介导 Importin α 的出核, 并参与染色体的分离, 是

有丝分裂中细胞周期蛋白 B 降解所必需的 (Scherf *et al.*, 1996) 。CAS 还是几种增殖激活蛋白、转录因子、癌基因和肿瘤抑制基因产物如 p53 和 BRCA1 的核输出所必需的 (Behrens *et al.*, 2003) 。*xpo4* 也是一种肿瘤抑制基因, 与人类肝癌密切相关。XPO4 能双向转运, 介导真核翻译起始因子 eIF5A 及转录因子 SMAD3 的出核, 转录因子 Sox 家族成员依赖高迁移率结构 (High-mobility group, HMG) 被 XPO4 识别互作并介导入核 (Lipowsky *et al.*, 2000; Kurisaki *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014) , *xpo4* 敲除时致使胚胎干细胞中转录因子 Sox 表达降低, 向内胚层分化, 同时抑制神经外胚层的分化 (Sangel *et al.*, 2014) 。XPO5 能转运细胞核内的 pre-miRNA 至细胞质, 翻译延长因子 eEF1A 能通过氨酰 tRNA 间接结合至 XPO5 出核。XPO5 能介导 tRNA 及腺病毒 RNA 的出核, 并被证实与 RNA 结合蛋白 STAU2、白介素增强子结合因子 ILF3 的出核相关 (Bohnsack *et al.*, 2002; Gwizdek *et al.*, 2003; Gwizdek *et al.*, 2004; Macchi *et al.*, 2004) 。XPO6 在前纤维蛋白 (Profilin) 的协助下, 将细胞核内的肌动蛋白转运至细胞质中, XPO6 是 Profilin-Actin 复合物的唯一的出核载体, *xpo6* 基因缺陷的果蝇突变体是隐性致死的 (Perrimon *et al.*, 1989; Stuken *et al.*, 2003; Fiore *et al.*, 2017) 。XPO7 (RanBP16) 也是一种具有双向转运功能的 Kap 之一, XPO7 对血细胞的红系分化及去核是必要的 (Hattangadi *et al.*, 2014; Aksu

et al., 2018)。免疫分析及亚细胞定位分析表明 XPO7 多为信号通路中的负调控因子, 能与 Smyd3、Sufu、MetAP1 和 Sestrin2 等货物蛋白相互作用并转运出核 (Aksu *et al.*, 2018)。质谱分析表明 XPO7 能介导 eIF1、eIF4AI、p50RhoGAP、14-3-3 σ 以及逆转运复合物 (Retromer) 中 Vps35、Vps26 和 Vps29 亚基的出核转运。不同于 CRM1 识别的 NES, eIF1 及 p50RhoGAP 等货物蛋白以富含正电荷氨基酸残基信号被 XPO7 识别, 而且亲和力较低 (Haft *et al.*, 2000; Mingot *et al.*, 2004)。XPOt 依赖于与 RanGTP 的结合, 双向穿梭于 NPC, 主要与 tRNA 形成复合体出核。XPOt 识别成熟的、正确折叠的 tRNA, 与 tRNA 的二氢尿嘧啶环 (DHU loop)、氨基酸臂和 T ψ C 环等多个位点密切结合, tRNA 的三级结构破坏后出核转运受阻碍 (Arts *et al.*, 1998; Kuersten *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2009)。但是昆虫中缺乏 XPOt 的同源物 (Lippai *et al.*, 2000)。一些双向转运蛋白也具有核输出功能, 其中 Importin13 是典型的双向转运蛋白, 介导 Mago-Y14 二聚体、糖皮质激素受体 (Glucocorticoid receptor, GR)、泛素结合酶 9 (Ubiquitin conjugating enzyme 9, Ubc9) 等蛋白的核输入, Importin13 也是 eIF1A、eIF4G2 和高迁移率蛋白 HMG20A 的核输出受体蛋白 (Mingot *et al.*, 2001; Bono *et al.*, 2010; Fatima *et al.*, 2017; Baade *et al.*, 2018)。在果蝇幼虫中, Importin13 与突触稳态间接相关, 影响神经肌肉接点处突触前膜神经递质的释放, 可能控制视觉转导级联过程 (Giagtoglou *et al.*, 2009)。

4 昆虫细胞中核输出现象及其功能

昆虫的生命活动中, 生殖发育、代谢循环和免疫反应等各种生理活动依赖于不同基因的有序表达及信号转导通路, 这些途径都需要相应的激活因子进行核质穿梭或者转录出的 mRNA、miRNA、piRNA 等各种 RNA 的核输出。高等真核生物细胞分裂时, 细胞核与细胞质的内容物会短暂的混合, 回到间期后需要重新分离, 如肌动蛋白等需要在完成核膜重构后从细胞核内分离出去, 出核过程需要 XPO6 的协助 (Stuven *et al.*, 2003)。昆虫各项生命活动与核质转运具有紧密的联系, 核质转运对于维持和调控昆虫生命活动具有不可或缺的作用。转化生长因子 β (Transforming growth

factor β , TGF- β) 是调节细胞增殖、分化和凋亡的蛋白 (Upadhyay *et al.*, 2017), 如 TGF- β 信号通路的下游转录因子 Smad 与 Wnt 信号通路中下游核受体 β -Catenin 需要依赖于 RanBP3 促进转录因子的出核调控信号通路, Smad 系列蛋白的核质穿梭依赖不同途径的核输出受体蛋白的协助, Smad3 的核输出由 XPO4 介导 (Dai *et al.*, 2009)。果蝇缺氧诱导因子 α 蛋白 Sima 依赖 NLS 和 NES 反复地快速核质穿梭响应细胞缺氧状态 (Romero *et al.*, 2008)。细胞周期素 B (Cyclin B, CycB) 在 NPC 通道中的 CRM1/Emb 和 Nup62 复合物介导下出核, 核输出保证了细胞质中 CycB-周期蛋白依赖性激酶 1 (Cyclin-dependent kinases 1, CDK1) 的修饰和形成, 这对雄性果蝇减数分裂的启动具有关键作用 (Okazaki *et al.*, 2020)。昆虫卵母细胞的成熟、胚胎发育、生物钟和脂肪体功能调节中具有重要作用的 Dorsal、Mago-nashi、TIMELESS 和 Hox 蛋白等都需要依赖于核质穿梭行使调节功能, NES 或 NLS 对这些蛋白是必不可少的 (Micklem *et al.*, 1997; Xylourgidis *et al.*, 2006; Duffraisse *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2021)。

4.1 RNA 的核输出与昆虫的发育及抗病

昆虫发育中各种信号通路的转导及激活反应, 都需要明确的激活因子进入细胞核, 随后相应基因表达的 RNA 都必需通过核孔上核转运受体的协助离开细胞核。包括 mRNA、piRNA 和 miRNA 等各类 RNA 的成熟及调控过程离不开出核转运, 不同转录因子和 RNA 出核所需的载体不同, 主要但不止于 CRM1 的介导, 还包括 Cse1、XPO5 和 XPOt 等在内多个核输出受体蛋白。

piRNA (Piwi-interactingRNA) 是动物生殖细胞中一类 22 nt 左右的保守小 RNA, 在基础的免疫通路, 在动物发育中起调控作用, 保护细胞基因组抵御转座子带来的各种危害 (Aravin *et al.*, 2007)。piRNA 最早是在果蝇中发现, 果蝇卵巢里的 piRNA 也研究的最为广泛与深入。在果蝇的卵巢中, 大部分的 piRNA 来源于双链簇, 双链簇从两个基因组链产生 piRNA。在果蝇卵巢的生殖细胞核中存在多个 NXF 转运体, 其中依赖于 NXF3 的 piRNA 前体在 NXT1 的协助下, 复合物通过核孔上的 CRM1 转运到细胞质中, 随后 piRNA 簇的转录本进入类核周体 nuage 进行下一步加工 (ElMaghraby *et al.*, 2019; Kneuss *et al.*, 2019)。

在蝇类和脊椎动物中, XPO5 将 pre-miRNA 以

pre-miRNA-XPO5-RanGTP 复合物的形式输出到细胞质中并释放, pre-miRNA 由 Dicer 进一步裂解, 除此之外, XPO5 还能维持 pre-miRNA 结构的稳定, XPO5 过表达时能增强 miRNA 和 Short hairpin RNA (shRNA) 介导的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) (Zeng and Cullen, 2004; Yi *et al.*, 2005; Shcherbata, 2019)。CRM1 可以介导成熟的 miRNA 进行核质穿梭, LMB 的处理或 *crm1* 的敲除导致 pri-miRNA 在细胞核内积累, pri-miRNA 至 pre-miRNA 的加工过程中断 (Buessing *et al.*, 2010)。RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中包括 Ago1、Ago2 及 RNA 解旋酶 (RNA helicase A, RHA) 与 CRM1 有相互作用 (Castanotto *et al.*, 2009), RHA 也与 NXF1 有相互作用 (Tang and Wong-Staal, 2000), 表明 CRM1 可能通过调节 RISC 复合物的核质转运, 调节 miRNA 形成过程。

4.2 核输出与昆虫免疫反应

昆虫对病原体的细胞固有免疫反应的调控发生在多个水平上, 包括核质转运水平, 编码细胞防御蛋白的 mRNA 的核输出对于宿主对病原体入侵的反应是至关重要的。在病毒感染期间, 特定的病原体相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 被细胞内模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 识别。宿主识别病原体启动自分泌和旁分泌先天免疫信号, 产生细胞因子和趋化因子, 建立一种促炎、抗增殖的抗病原的状态 (Kingsolver *et al.*, 2013; Kuss *et al.*, 2013)。哺乳动物在面对病毒感染时, 以干扰素家族的表达进行免疫反应, 而昆虫在病毒感染时, 很大程度上依赖 RNAi 抗病毒。也有学者发现在果蝇的抗病毒免疫反应中, IMD、Toll 以及 JAK/STAT 均在不同程度上发挥了不同免疫作用 (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Herrera and Bach, 2019), 而这些免疫途径涉及的穿梭蛋白需要 CRM1 等介导核输出。果蝇的 SOCS36E、去泛素化酶 dUSP36-B 亚型等信号通路的负反馈因子多含有 NES 能通过 exportin 途径出核进行负调控功能 (Thevenon *et al.*, 2009; Thevenon *et al.*, 2020)。

昆虫的体液免疫主要以合成的凝集素、抗菌肽、酚氧化酶和溶菌酶等与异源病原物进行抗争, 相应基因转录出的 mRNA 需要在核输出受体的协助下出核才能进一步剪切或翻译, 而有些凝集素需要通过跨核膜运动维持动态平衡以响应免疫反

应。以昆虫的体液免疫中凝集素 (Lectin) 为例, *galectin* 基因在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、果蝇、非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 和人类细胞中都存在。Galectin-3 (Gal3) 是一种多功能蛋白, 调控细胞生长、细胞粘附、细胞间相互作用、细胞凋亡、血管生成和 mRNA 加工等多种生物学功能。Gal3 在细胞核与细胞质间均有存在动态平衡, 磷酸化的 Gal3 存在于细胞质, 非磷酸化的 Gal3 存在于细胞核, Gal3 的磷酸化及核输出过程对 Gal3 的生物活性是不可或缺的 (Takenaka *et al.*, 2004)。Gal3 的 C 端含有 NES, 通过与 CRM1 的辅因子 Nup98 相互作用而不是直接与 CRM1 结合完成出核转运, 其出核受到 LMB 的抑制 (Haudek *et al.*, 2010)。

4.3 病毒蛋白在昆虫细胞中的核输出

4.3.1 病毒蛋白的核质穿梭

昆虫等节肢动物是一个天然的病毒库, 被多种病毒感染, 其中一些病毒对昆虫是致病性的, 还有一些病毒是以昆虫为媒介传播给脊椎动物和植物。病毒自身并没有完整的细胞器结构, 在进行增殖时需要利用宿主的细胞器合成所需的蛋白质和核酸。病毒在进化中产生一些短线性基序 (Short linear motifs, SLiM) 如 NLS 与 NES, 这些 SLiM 介导病毒蛋白与宿主核质转运蛋白相互作用, 扰乱争夺宿主细胞核质转运通路 (Davey *et al.*, 2011; Via *et al.*, 2015)。如甲型流感病毒 (*Influenza A virus*, IAV) 的 NP 蛋白、人巨细胞病毒 (*Human cytomegalovirus*, HCMV) 的 UL94 蛋白和狂犬病毒 (*Rabies virus*, RV) P 蛋白等同时具有 NLS 与 NES, 在感染期间具有双向核质穿梭功能 (Liu *et al.*, 2012; Oksayan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015)。这种穿梭现象对昆虫病毒复制周期来说也是必不可少的。双生病毒的 C4 蛋白、番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 的 CP 蛋白是典型的穿梭蛋白, 对于病毒在植物和昆虫细胞核内的积累是不可缺少的 (Kunik *et al.*, 1998; Mei *et al.*, 2018)。昆虫杆状病毒 DNA 聚合酶、LEF11 等蛋白具有 NLS, 介导与宿主草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的 Importin α 相互作用, 转运入核, 对病毒的增殖复制至关重要 (Chen *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021)。ME53 和 Ac34 等不具有常规型 NLS, 但通过特殊的序列能转运入核, 对病毒的增殖复制也是至关重要的 (Liu *et al.*, 2016b; Qiu *et al.*, 2017)。BmNPV 的 BRO 蛋白具有经典的 NES, 利用家蚕的 CRM1 进行出核转运

(Kang *et al.*, 2006)。AcMNPV 中有 98 个 ORF 含有符合预测通式的假定 NES (Mu *et al.*, 2016)。

4.3.2 病毒对宿主核输出的干扰

除痘病毒和藻病毒外,绝大多数 DNA 病毒选择在宿主的细胞核内进行复制,少量 RNA 病毒如慢病毒也具有跨越核膜的能力,在细胞核内复制增殖 (Kuss *et al.*, 2013)。病毒无论是在宿主细胞质中复制还是在细胞核中复制,多会抑制宿主细胞 mRNA 的核输出以逃离宿主的免疫反应或争夺及破坏宿主的核质转运结构帮助病毒 mRNA 出核 (Kuss *et al.*, 2013; Yarbrough *et al.*, 2014)。BmNPV 通过编码 miRNA (bmnpv-miR-1) 扰乱宿主依赖于 RanGTP 的 XPO5 介导的宿主 miRNA 合成途径,以此对抗家蚕的 RNAi 抗病毒反应 (Singh *et al.*, 2012)。AcMNPV 在 Sf9 细胞核内复制组装核衣壳时,通过 Ac34 蛋白抑制宿主 CRM1,阻碍肌动蛋白相关蛋白 2/3 (Actin-related protein 2/3, Arp2/3) 通过 CRM1 途径出核,使 Arp2/3 滞留细胞核内协助病毒复制 (Mu *et al.*, 2016)。干扰素 (Interferon, IFN) 通路也是病毒对宿主免疫反应的攻击位点,而不同病毒应对免疫反应的机制稍有不同,虫媒病毒中发现了多种干扰素拮抗蛋白,如黄病毒科中的非结构蛋白 NS5 抵抗宿主的抗病毒免疫反应,西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV) NS5 上 NES 的突变破坏病毒的复制 (Lopez-Denman *et al.*, 2018)。基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus, CHIKV) 是一种经伊蚊传播的病毒,CHIKV 通过 nsP2 蛋白促进宿主 STAT1 的核输出而抑制 ISG 的转录,从而扰乱宿主干扰素应答反应 (Goertz *et al.*, 2018)。但是这些虫媒病毒是否以同样的途径抑制介体昆虫的免疫反应还有待研究。

5 总结

核质转运是细胞生命活动中最频繁且重要的过程之一,细胞内遗传信息在不同时空上的选择性表达是真核生物的根本,核质转运过程几乎深入影响各种细胞活动。本文以果蝇等模式生物为例,简述核孔结构及核输出受体基础研究进展,介绍了核输出机制在一些昆虫的发育与免疫中发挥的作用。总的来说,昆虫细胞内几乎任何的代谢响应离不开核质转运基础,核质转运通路不仅是各类 RNA 与蛋白质穿梭的通道,实质也是基因

时序表达的中途限速阀门,通过穿梭蛋白的入核/出核平衡进行激活/关闭相应基因的表达。

昆虫是天然的病毒库,如杆状病毒对昆虫是致病性的,而寨卡病毒 *Zika virus*、登革病毒 *Dengue virus* 等黄病毒科多个成员以蚊媒为主要载体进行传播,以及很多植物病毒多以烟粉虱 *Bemisia tabaci*、飞虱和叶蝉等半翅目刺吸式口器昆虫为介体传播,这些病毒给医学卫生与作物病虫害管理方面带来巨大的威胁与挑战。病毒对宿主核输出机制的征用与病毒在介体/宿主细胞内的增殖复制密切相关,是病毒在介体/宿主体内传播的重要手段,以此方向可以作为开发新的抗病毒药物的重要靶点。以核输入受体为靶点的 Imp α/β 抑制剂伊维菌素 (IVM) 是目前使用最为广泛的抗寄生虫药物,IVM 能显著抑制登革病毒在白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 体内的复制,控制登革病毒的传播。尽管 CRM1 的抑制剂 LMB 对人有很高的毒性,但也是研究核质穿梭中最重要的工具。核输出抑制剂 Verdinexor (KPT-335) 具有潜在的抗病毒作用,Selinexor (KPT-330)、Eltanexor (KPT-8602) 和 BIIB-100 (KPT-185) 等结构极其相似的药物相继进入抗肿瘤和抗病毒临床开发阶段。研究核输出机制使我们更加充分理解各种细胞活动过程中基因表达调控的逻辑,也包括病毒与宿主博弈过程中对宿主免疫途径的操控,这些对控制蚊媒病毒感染及杆状病毒杀虫活力的提高提供新的研究思路。

参考文献 (References)

- Aksu M, Pleiner T, Karaca S, *et al.* Xpo7 is a broad-spectrum exportin and a nuclear import receptor [J]. *Journal of Cell Biology*, 2018, 217 (7): 2329–2340.
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race [J]. *Science*, 2007, 318 (5851): 761–764.
- Arts GJ, Kuersten S, Romby P, *et al.* The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs [J]. *Embo Journal*, 1998, 17 (24): 7430–7441.
- Baade I, Spillner C, Schmitt K, *et al.* Extensive identification and in-depth validation of Importin 13 cargoes [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17 (7): 1337–1353.
- Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A. CSE1L/CAS: Its role in proliferation and apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2003, 8 (1): 39–44.
- Black BE, Levesque L, Holaska JM, *et al.* Identification of an NTF2-related factor that binds Ran-GTP and regulates nuclear protein export [J]. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19 (12): 8616–8624.
- Bohnsack MT, Regener K, Schwappach B, *et al.* Exp5 exports eEF1A

- via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm [J]. *Embo Journal*, 2002, 21 (22): 6205–6215.
- Bono F, Cook AG, Gruenwald M, *et al.* Nuclear import mechanism of the EJC component Mago-Y14 revealed by structural studies of Importin 13 [J]. *Molecular Cell*, 2010, 37 (2): 211–222.
- Buessing I, Yang JS, Lai EC, *et al.* The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in *C. elegans* and *Drosophila* [J]. *Embo Journal*, 2010, 29 (11): 1830–1839.
- Cai YD, Xue Y, Truong CC, *et al.* CK2 inhibits TIMELESS nuclear export and modulates CLOCK transcriptional activity to regulate circadian rhythms [J]. *Current Biology*, 2021, 31 (3): 502–514. e7.
- Castanotto D, Lingeman R, Riggs AD, *et al.* CRM1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature microRNAs [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (51): 21655–21659.
- Chen GQ, Li P, Yan Q, *et al.* Identification of *Spodoptera frugiperda* Importin alphas that facilitate the nuclear import of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* DNA polymerase [J]. *Insect Molecular Biology*, 2021, 30: 400–409.
- Chen JWC, Barker AR, Wakefield JG. The Ran pathway in *Drosophila melanogaster* Mitosis [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2015, 3: 74.
- Chen T, Dong Z, Hu N, *et al.* Baculovirus LEF-1 nuclear localization signal is important for viral DNA replication [J]. *Virus Research*, 2017, 238: 133–140.
- Conti E, Uy M, Leighton L, *et al.* Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha [J]. *Cell*, 1998, 94 (2): 193–204.
- Cook AG, Fukuhara N, Jinek M, *et al.* Structures of the tRNA export factor in the nuclear and cytosolic states [J]. *Nature*, 2009, 461 (7260): 60–U60.
- Dai F, Lin X, Chang C, *et al.* Nuclear export of Smad2 and Smad3 by ranBP3 facilitates termination of TGF-beta signaling [J]. *Developmental Cell*, 2009, 16 (3): 345–357.
- Dasso M. Running on ran: Nuclear transport and the mitotic spindle [J]. *Cell*, 2001, 104 (3): 321–324.
- Davey NE, Trave G, Gibson TJ. How viruses hijack cell regulation [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, 36 (3): 159–169.
- Denning DP, Patel SS, Uversky V, *et al.* Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (5): 2450–2455.
- Devos DP, Graef R, Field MC. Evolution of the nucleus [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2014, 28: 8–15.
- Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences – a consensus? [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16: 478–481.
- Duffraisse M, Paul R, Carnesecchi J, *et al.* Role of a versatile peptide motif controlling Hox nuclear export and autophagy in the *Drosophila* fat body [J]. *Journal of Cell Science*, 2020, 133 (18): jcs241943.
- ElMaghraby MF, Andersen PR, Puehringer F, *et al.* A heterochromatin-specific RNA export pathway facilitates piRNA production [J]. *Cell*, 2019, 178 (4): 964–979.
- Erkmann JA, Kutay U. Nuclear export of mRNA: From the site of transcription to the cytoplasm [J]. *Experimental Cell Research*, 2004, 296 (1): 12–20.
- Fan S, Whiteman EL, Hurd TW, *et al.* Induction of Ran GTP drives ciliogenesis [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22 (23): 4539–4548.
- Fatima S, Wagstaff KM, Lieu KG, *et al.* Interactome of the inhibitory isoform of the nuclear transporter Importin 13 [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2017, 1864 (3): 546–561.
- Fiore APZP, Spencer VA, Mori H, *et al.* Laminin-111 and the level of nuclear actin regulate epithelial quiescence via Exportin-6 [J]. *Cell Reports*, 2017, 19 (10): 2102–2115.
- Floer M, Blobel G. Putative reaction intermediates in Crm1-mediated nuclear protein export [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (23): 16279–16286.
- Frey S, Rees R, Schuenemann J, *et al.* Surface properties determining passage rates of proteins through nuclear pores [J]. *Cell*, 2018, 174 (1): 202–217. e9.
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, *et al.* CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal [J]. *Nature*, 1997, 390 (6657): 308–311.
- Fung HYJ, Fu SC, Chook YM. Nuclear export receptor CRM1 recognizes diverse conformations in nuclear export signals [J]. *Elife*, 2017, 6: e23961.
- Giagtzoglou N, Lin YQ, Haueter C, *et al.* Importin 13 regulates neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular junction [J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29 (17): 5628–5639.
- Goertz GP, McNally KL, Robertson SJ, *et al.* The methyltransferase-like domain of *Chikungunya virus* nsP2 inhibits the interferon response by promoting the nuclear export of STAT1 [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92 (17): e01008–18.
- Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, *et al.* Importin alpha: A multipurpose nuclear-transport receptor [J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14 (9): 505–514.
- Gorlich D, Dabrowski M, Bischoff FR, *et al.* A novel class of RanGTP binding proteins [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, 138 (1): 65–80.
- Guglielmi V, Sakuma S, D'Angelo MA. Nuclear pore complexes in development and tissue homeostasis [J]. *Development*, 2020, 147 (23): dev183442.
- Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, *et al.* Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (8): 5505–5508.
- Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, *et al.* Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (2): 884–891.
- Haft CR, Sierra MDL, Bafford R, *et al.* Human orthologs of yeast

- vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into multimeric complexes [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11 (12): 4105–4116.
- Hampoez B, Andres-Pons A, Kastiris P, *et al.* Structure and assembly of the nuclear pore complex [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2019, 48 (1): 515–536.
- Hampoez B, Mackmull MT, Machado P, *et al.* Pre-assembled nuclear pores insert into the nuclear envelope during early development [J]. *Cell*, 2016, 166 (3): 664–678.
- Hattangadi SM, Martinez-Morilla S, Patterson HC, *et al.* Histones to the cytosol: Exportin 7 is essential for normal terminal erythroid nuclear maturation [J]. *Blood*, 2014, 124 (12): 1931–1940.
- Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, *et al.* Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2010, 1800 (2): 181–189.
- Herold A, Klymenko T, Izaurralde E. NXF1/p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in *Drosophila* [J]. *Rna*, 2001, 7 (12): 1768–1780.
- Herold A, Suyama M, Rodrigues JP, *et al.* TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20 (23): 8996–9008.
- Herrera SC, Bach EA. JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: From *Drosophila* to vertebrates [J]. *Development*, 2019, 146 (2): dev167643.
- Hutten S, Kehlenbach RH. CRM1-mediated nuclear export: To the pore and beyond [J]. *Trends in Cell Biology*, 2007, 17 (4): 193–201.
- Izaurralde E. A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2002, 81 (11): 577–584.
- Kahana JA, Cleveland DW. Beyond nuclear transport: Ran-GTP as a determinant of spindle assembly [J]. *Journal of Cell Biology*, 1999, 146 (6): 1205–1209.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, *et al.* A short amino acid sequence able to specify nuclear location [J]. *Cell*, 1984, 39 (3): 499–509.
- Kang W, Kurihara M, Matsumoto S. The BRO proteins of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus are nucleocytoplasmic shuttling proteins that utilize the CRM1-mediated nuclear export pathway [J]. *Virology*, 2006, 350 (1): 184–191.
- Karamipour N, Fathipour Y, Talebi AA, *et al.* The microRNA pathway is involved in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells antiviral immune defense against *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* infection [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 112: 103202.
- Kimura M, Imamoto N. Biological significance of the Importin- β family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways [J]. *Traffic*, 2014, 15 (7): 727–748.
- Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425 (24): 4921–4936.
- Kneuss E, Munafò M, Eastwood EL, *et al.* Specialization of the *Drosophila* nuclear export family protein Nxf3 for piRNA precursor export [J]. *Genes & Development*, 2019, 33 (17–18): 1208–1220.
- Kose S, Imamoto N, Tachibana T, *et al.* Ran-unassisted nuclear migration of a 97–kD component of nuclear pore-targeting complex [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, 139 (4): 841–849.
- Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, *et al.* Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of Importin α [J]. *J Biol. Chem.*, 2009, 284 (1): 478–485.
- Koyama M, Matsuura Y. An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1 [J]. *Embo Journal*, 2010, 29 (12): 2002–2013.
- Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, *et al.* Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1 [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 242 (2): 540–547.
- Kuersten S, Arts GJ, Walther TC, *et al.* Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22 (16): 5708–5720.
- Kunik T, Palanichelvam K, Czosnek H, *et al.* Nuclear import of the capsid protein of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in plant and insect cells [J]. *The Plant journal*, 1998, 13 (3): 393–399.
- Kurisasi A, Kurisasi K, Kowanetz M, *et al.* 2006. The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (4): 1318–1332.
- Kuss SK, Mata MA, Zhang L, *et al.* Nuclear imprisonment: Viral strategies to arrest host mRNA nuclear export [J]. *Viruses-Basel*, 2013, 5 (7): 1824–1849.
- Kutay U, Guttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: Born to be weak [J]. *Trends Cell Biol.*, 2005, 15 (3): 121–124.
- la Cour T, Kiemer L, Molgaard A, *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals [J]. *Protein Engineering Design & Selection*, 2004, 17 (6): 527–536.
- Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 697–743.
- Li J, Yu M, Zheng W, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins [J]. *Viruses-Basel*, 2015, 7 (5): 2668–2682.
- Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, *et al.* Exportin 4: A mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes [J]. *Embo Journal*, 2000, 19 (16): 4362–4371.
- Lippai M, Tirian L, Boros I, *et al.* The *Ketel* gene encodes a *Drosophila* homologue of Importin- β [J]. *Genetics*, 2000, 156 (4): 1889–1900.
- Liu W, Xu Q, Chi Q, *et al.* Up-regulated expression of Ran reveals its potential role to deltamethrin stress in Kc cells [J]. *Gene*, 2016a, 583 (1): 1–7.
- Liu Y, de Jong J, Nagy E, *et al.* Nuclear translocation sequence and region in *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* ME53 that are important for optimal baculovirus production [J]. *Journal of Virology*, 2016b, 90 (8): 3953–3965.

- Liu Y, Zhang Z, Zhao X, *et al.* Human cytomegalovirus UL94 is a nucleocytoplasmic shuttling protein containing two NLSs and one NES [J]. *Virus Research*, 2012, 166 (1–2): 31–42.
- Lopez-Denman AJ, Russo A, Wagstaff KM, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase NS5 is critical to infection [J]. *Cellular Microbiology*, 2018, 20 (8): e12848.
- Lusk CP, King MC. The nucleus: Keeping it together by keeping it apart [J]. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2017, 44: 44–50.
- Macchi P, Brownawell AM, Grunewald B, *et al.* The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2-nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (30): 31440–31444.
- Mahajan R, Delphin C, Guan TL, *et al.* A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2 [J]. *Cell*, 1997, 88 (1): 97–107.
- Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, *et al.* Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2011, 1813 (9): 1562–1577.
- Mason DA, Goldfarb DS. The nuclear transport machinery as a regulator of *Drosophila* development [J]. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2009, 20 (5): 582–589.
- Mei Y, Wang Y, Hu T, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of Geminivirus C4 protein mediated by phosphorylation and myristoylation is critical for viral pathogenicity [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11 (12): 1466–1481.
- Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, *Visna virus*, and equine infectious *Anemia virus* Rev proteins: Identification of a family of transferable nuclear export signals [J]. *Journal of Virology*, 1996, 70 (4): 2350–2359.
- Micklem DR, Dasgupta R, Elliott H, *et al.* The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila* [J]. *Current Biology*, 1997, 7 (7): 468–478.
- Mingot JM, Bohnsack MT, Jakle U, *et al.* Exportin 7 defines a novel general nuclear export pathway [J]. *Embo Journal*, 2004, 23 (16): 3227–3236.
- Mingot JM, Kostka S, Kraft R, *et al.* Importin 13: A novel mediator of nuclear import and export [J]. *Embo Journal*, 2001, 20 (14): 3685–3694.
- Mobbs GW, Hoelz A. Nucleoporin condensates drive nuclear pore complex assembly in oocytes [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2020, 45 (4): 278–280.
- Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators [J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14 (10): 547–556.
- Mu J, Zhang Y, Hu Y, *et al.* Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus Ac34 protein retains cellular actin-related protein 2/3 complex in the nucleus by subversion of CRM1-dependent nuclear export [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12 (11): e1005994.
- Okazaki R, Yamazoe K, Inoue YH. Nuclear export of cyclin B mediated by the Nup62 complex is required for meiotic initiation in *Drosophila* males [J]. *Cells*, 2020, 9 (2): 270.
- Oksayan S, Wiltzer L, Rowe CL, *et al.* A novel nuclear trafficking module regulates the nucleocytoplasmic localization of the *Rabies virus* interferon antagonist, P protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287 (33): 28112–28121.
- Perrimon N, Engstrom L, Mahowald AP. Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome [J]. *Genetics*, 1989, 121 (2): 333–352.
- Qiu J, Tang Z, Yuan M, *et al.* The 91-205 amino acid region of AcMNPV ORF34 (Ac34), which comprises a potential C3H zinc finger, is required for its nuclear localization and optimal virus multiplication [J]. *Virus Research*, 2017, 228: 79–89.
- Quimby BB, Dasso M. The small GTPase Ran: Interpreting the signs [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15 (3): 338–344.
- Ratan R, Mason DA, Sinnot B, *et al.* *Drosophila* Importin alpha 1 performs paralogue-specific functions essential for gametogenesis [J]. *Genetics*, 2008, 178 (2): 839–850.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, *et al.* Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence [J]. *Cell*, 1991, 64 (3): 615–623.
- Romero NM, Irisarri M, Roth P, *et al.* Regulation of the *Drosophila* hypoxia-inducible factor alpha Sima by CRM1-dependent nuclear export [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28 (10): 3410–3423.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, *et al.* The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism [J]. *Journal of Cell Biology*, 2000, 148 (4): 635–651.
- Sangel P, Oka M, Yoneda Y. The role of Importin-beta s in the maintenance and lineage commitment of mouse embryonic stem cells [J]. *Febs Open Bio.*, 2014, 4: 112–120.
- Scherf U, Pastan I, Willingham MC, *et al.* The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93 (7): 2670–2674.
- Shcherbata HR. miRNA functions in stem cells and their niches: Lessons from the *Drosophila* ovary [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2019, 31: 29–36.
- Singh CP, Singh J, Nagaraju J. A baculovirus-encoded microRNA (miRNA) suppresses its host miRNA biogenesis by regulating the exportin-5 cofactor Ran [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (15): 7867–7879.
- Stuven T, Hartmann E, Gorlich D. Exportin 6: A novel nuclear export receptor that is specific for profilin center dot actin complexes [J]. *Embo Journal*, 2003, 22 (21): 5928–5940.
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, *et al.* Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs [J]. *Molecular and Cellular*

- Biology, 2004, 24 (10): 4395 – 4406.
- Tang HL, Wong-Staal F. Specific interaction between RNA helicase A and Tap, two cellular proteins that bind to the constitutive transport element of type D retrovirus [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (42): 32694 – 32700.
- Tessier TM, Dodge MJ, Prusinkiewicz MA, *et al.* Viral appropriation: Laying claim to host nuclear transport machinery [J]. *Cells*, 2019, 8 (6): 559.
- Thevenon D, Engel E, Avet-Rochex A, *et al.* The *Drosophila* ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling [J]. *Cell Host & Microbe*, 2009, 6 (4): 309 – 320.
- Thevenon D, Seffouh I, Pillet C, *et al.* A nucleolar isoform of the *Drosophila* ubiquitin specific protease dUSP36 regulates MYC-dependent cell growth [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 506.
- Timney BL, Raveh B, Mironska R, *et al.* Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex [J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 215 (1): 57 – 76.
- Upadhyay A, Moss-Taylor L, Kim MJ, *et al.* TGF-beta family signaling in *Drosophila* [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017, 9 (9): a022152.
- Via A, Uyar B, Brun C, *et al.* How pathogens use linear motifs to perturb host cell networks [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40 (1): 36 – 48.
- Weis K. Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle [J]. *Cell*, 2003, 112 (4): 441 – 451.
- Wu D, Wu L, An H, *et al.* RanGAP-mediated nucleocytoplasmic transport of Prospero regulates neural stem cell lifespan in *Drosophila* larval central brain [J]. *Aging Cell*, 2019, 18 (1): e12854.
- Xu D, Farmer A, Chook YM. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20 (6): 782 – 790.
- Xu J, Grant G, Sabin LR, *et al.* Transcriptional pausing controls a rapid antiviral innate immune response in *Drosophila* [J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12 (4): 531 – 543.
- Xylourgidis N, Roth P, Sabri N, *et al.* The nucleoporin Nup214 sequesters CRM1 at the nuclear rim and modulates NF kappa B activation in *Drosophila* [J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119 (21): 4409 – 4419.
- Yang J, Bogerd HP, Wang PJ, *et al.* Two closely related human nuclear export factors utilize entirely distinct export pathways [J]. *Molecular Cell*, 2001, 8 (2): 397 – 406.
- Yarborough ML, Mata MA, Sakthivel R, *et al.* Viral subversion of nucleocytoplasmic trafficking [J]. *Traffic*, 2014, 15 (2): 127 – 140.
- Yi R, Doehle BP, Qin Y, *et al.* Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs [J]. *Rna*, 2005, 11 (2): 220 – 226.
- Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by exportin 5 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (16): 4776 – 4785.
- Zhang F, Fan YC, Mu NN, *et al.* Exportin 4 gene expression and DNA promoter methylation status in chronic hepatitis B virus infection [J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 2014, 21 (4): 241 – 250.