

领域前沿 · 中国



宋保亮, 武汉大学生命科学学院教授、院长、长江学者、杰青。2002年毕业于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 2002年至2006年在美国西南医学中心从事博士后研究。长期从事胆固醇代谢研究, 取得了国际同行公认的成果。胆固醇合成途径的一个关键负反馈调控通路以及小肠胆固醇吸收的分子机制均主要由宋保亮实验室揭示; 另外, 该实验室2015年发表于《Cell》的工作开辟了细胞内胆固醇运输这一新的研究方向。他的系统性工作推动了胆固醇研究领域的发展。已在国际学术期刊上发表研究论文30余篇, 其中作为通讯作者发表《Cell》1篇、《Nat Med》1篇、《Cell Metab》4篇和《Proc Natl Acad Sci USA》1篇。曾获得首届陈嘉庚青年科学奖和中国青年科技奖等奖项, 并担任J Biol Chem杂志的Editorial Board Member、J Mol Cell Biol副主编、国际脂质协会(ICBL)筹划委员。

溶酶体与过氧化物酶体形成膜接触介导胆固醇转运

褚贝贝¹ 宋保亮^{2*}

(¹河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; ²武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 胆固醇是真核细胞中含量非常丰富的一类脂质小分子, 其主要生物学功能是掺入到磷脂双分子层中, 调节膜的性质。胆固醇在细胞内不同膜上的分布极不均匀而且高度动态运输, 这对维持细胞的正常生命活动至关重要。然而, 细胞内胆固醇运输的机制一直不清楚。针对这一胆固醇代谢领域的重要问题, 同时也是一个基本的细胞生物学问题, 通过巧妙设计、全基因组筛选, 鉴定出341个参与细胞内胆固醇转运的候选基因, 其中, 过氧化物酶体相关基因被显著富集。进而发现溶酶体通过和过氧化物酶体相互接触, 将胆固醇转移给后者。而介导该接触分子分别是溶酶体上的Synaptotagmin VII (Sy7)和过氧化物酶体膜上的PI(4,5)P₂磷脂。将这种新发现的溶酶体-过氧化物酶体膜接触命名为LPMC(lysosome-peroxisome membrane contacts)。过氧化物酶体功能缺失会导致一大类相关疾病——过氧化物酶体紊乱疾病, 表现为发育和神经系统功能障碍, 目前还没有有效的治疗手段。该工作第一次揭示在这些病人和小鼠模型的细胞中有大量胆固醇堆积, 且该现象的出现大大早于神经症状, 提示胆固醇堆积是过氧化物酶体紊乱疾病的发病原因之一。这项研究工作的意义在于: (1)发现了细胞内胆固醇运输的新途径; (2)揭示了过氧化物酶体这一细胞器的新功能; (3)证明胆固醇运输异常是导致过氧化物酶体紊乱疾病的病因之一, 为治疗该类疾病提供了全新的思路。

关键词 胆固醇; 溶酶体; 过氧化物酶体; Sy7; PI(4,5)P₂

Lysosome-peroxisome Membrane Contacts Mediate Cholesterol Transport

Chu Beibei¹, Song Baoliang^{2*}

(¹College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

²College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

*通讯作者。Tel: 027-68755497, E-mail: blsong@whu.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-27-68755497, E-mail: blsong@whu.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-03 17:05

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150603.1705.006.html>

Abstract Cholesterol is an essential lipid for eukaryotic cells. Its major function is regulating membrane characters. Cholesterol is not evenly distributed among different organelles and is dynamically transported in the cell. However, the mechanism underlying intracellular cholesterol transport has remained largely unknown. We established an amphotericin B-based assay enabling a genome-wide shRNA screen for delayed LDL-cholesterol transport, and identified 341 hits with particular enrichment of peroxisome genes, suggesting a previously unappreciated pathway for cholesterol transport. We showed dynamic membrane contact between peroxisome and lysosome, which was mediated by lysosomal Synaptotagmin VII binding to the lipid PI(4,5)P₂ on peroxisomal membrane. LDL-cholesterol enhances such contact and cholesterol is transported from lysosome to peroxisome. Disruption of critical peroxisome genes leads to cholesterol accumulation in lysosome. Together, these findings reveal an unexpected role of peroxisome in intracellular cholesterol transport. We further demonstrate massive cholesterol accumulation in human patient cells and mouse model of peroxisomal disorders, suggesting a contribution of abnormal cholesterol accumulation to the diseases.

Keywords cholesterol; lysosome; peroxisome; Syt7; PI(4,5)P₂

细胞内胆固醇转运研究背景

胆固醇是真核细胞必不可少的脂质小分子,其基本功能是掺入到膜的磷脂双分子层中,调节膜的流动性与相变。另外,胆固醇在其他许多生物学过程中也发挥重要作用,如:合成胆汁酸及甾体激素、影响神经突触形成、参与许多重要的信号传导途径等。

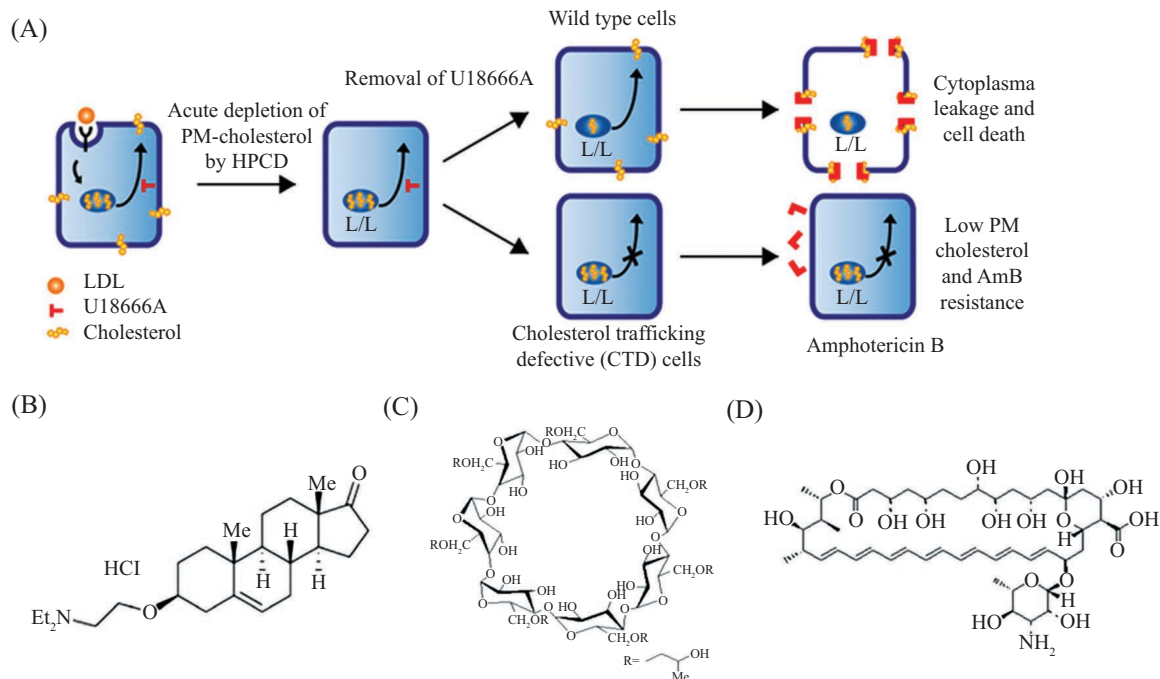
细胞内胆固醇含量非常丰富,最高可达细胞总脂质的30%~40%,它在细胞内被动态运输至各细胞器并呈现不均匀分布。内质网是胆固醇的合成场所,但其胆固醇含量仅占细胞总胆固醇的0.5%~1%^[1];高尔基体胆固醇含量较高,而细胞膜是胆固醇含量最丰富的区域,高达60%~80%^[2]。胆固醇在不同细胞器中也执行不同的功能:在内质网中,甾醇通过抑制SREBP(sterol regulatory element binding protein)的转运及促进HMGCR(HMG-CoA reductase)的降解来调控胆固醇的从头合成^[3];游离胆固醇在内质网中被酯化后以脂滴的形式储存或形成可分泌的脂蛋白^[4-5];在线粒体和过氧化物酶体中,胆固醇经过不同的氧化方式生成甾体激素和胆汁酸^[6]。因此,胞内胆固醇通过动态运输到达目的区域是细胞行使正常功能的关键。

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)介导低密度脂蛋白(LDL)的吸收是大多数细胞的主要胆固醇来源^[7]。LDL结合质膜上的LDLR后内吞进入早期内吞体,通过一系列的膜泡运输最终到达溶酶体,在这里LDL中的胆固醇酯被酸性酯酶水解成为游离胆固醇。游离胆固醇再被运

送到细胞膜和其他细胞器供细胞利用^[8]。目前为止,大部分关于胆固醇离开溶酶体到达其他细胞器的机制来自于对遗传性溶酶体堆积型Niemann-Pick type C(NPC)疾病的研究。该疾病的致病原因是由于编码NPC1或NPC2的基因发生了突变,这些突变会导致胆固醇在病人组织中大量堆积^[9-10]。在细胞内,NPC1定位在晚期内吞体和溶酶体的膜上,而可溶的NPC2蛋白则位于溶酶体腔中。当胆固醇酯在溶酶体中被水解后,NPC2首先结合胆固醇的烷基侧链部分,暴露在外的3号位OH基和母核接着被NPC1的N端结构域识别并结合,在NPC1的帮助下胆固醇穿过糖萼并被运送到溶酶体膜上。在NPC1和NPC2突变细胞中,胆固醇不能被正常转运而堆积在溶酶体腔内^[11]。然而,这只解释了游离胆固醇如何到达溶酶体膜,对于胆固醇怎样离开溶酶体膜并转运到其他细胞器的分子机制仍然所知甚少。胆固醇运输研究的难点在于胆固醇难以进行标记和追踪,虽然也有一些荧光标记的胆固醇,但都不能模拟真正的胆固醇行为。

全基因组RNAi筛选胆固醇转运缺陷(cholesterol trafficking defective, CTD)细胞

两性霉素B是一种多烯抗真菌药物,能够和细胞膜上的胆固醇结合,改变细胞通透性使内容物外泄,造成细胞死亡^[12]。基于此特性,我们利用针对人全基因组的慢病毒shRNA文库,设计了一种高效的可以特异性富集胞内胆固醇运输缺陷细胞的筛选策略,原理和过程如图1所示。首先,将稳定表达



A: 筛选策略; B: U18666A结构; C: 羟丙基-β-环糊精(HPCD)结构; D: 两性霉素B结构。

A: screen strategy; B: the structure of U18666A; C: the structure of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD); D: the structure of Amphotericin B (AmB).

图1 筛选胆固醇转运缺陷(CTD)细胞(根据参考文献[16]修改)

Fig.1 Schematic representation of the screen strategy for isolating CTD cells (modified from reference [16])

shRNA的突变细胞库培养在含有洛伐他汀、LDL和U18666A的培养液中。因为洛伐他汀抑制细胞自身胆固醇的合成,故细胞所需胆固醇只能依靠对LDL来源胆固醇的吸收,由于U18666A这种能特异性抑制胆固醇转运药物的存在^[13],使得溶酶体中聚集了大量的胆固醇;然后,利用环糊精能够吸附胆固醇的特性短时间处理细胞,只除去细胞膜上的胆固醇^[14-15];再将细胞培养在不含U18666A的培养基中,聚集在溶酶体的胆固醇会逐渐转运到质膜或其他细胞器上;最后,两性霉素B的使用会杀死高质膜胆固醇的细胞。而CTD细胞与正常细胞相比,其转运速率及质膜胆固醇水平都低,因此,CTD细胞能够存活下来^[16]。

以抗两性霉素B的CTD细胞基因组DNA为模板,PCR扩增shRNA特异的插入序列,并利用Illumina Genome Analyzer II测序仪对纯化后的PCR产物进行高通量测序。将所得数据进行显著性分析,我们共计获得341个候选基因,其中每个基因都由2个以上独立的shRNA序列筛选获得,排除了shRNA的脱靶效应。Gene Ontology富集和KEGG通路分析候选基因,发现脂质代谢相关和参与细胞内转运的基因被显著富集。此外,胆固醇转运的关键基因如

NPC1、调节LDLR合成及内吞的基因(如:*SREBP2*、*SCAP*^[17]、*LDLR*^[7]和*AAKI*^[18])也出现在候选名单中,更证实了此筛选方法的高效、可靠。

过氧化物酶体在胆固醇转运过程中发挥重要功能

有意思的是,过氧化物酶体相关的基因在统计学上也被显著富集。我们发现,沉默*ABCD1*(ATP-binding cassette sub-family D member 1)、*BAAT*(bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase)、*ACOT8*(acyl-CoA thioesterase 8)、*PEX1*(peroxisomal biogenesis factor 1)、*PEX3*、*PEX6*或*PEX10*基因的表达都会导致细胞内胆固醇转运的缺陷,并且这些胆固醇堆积在溶酶体而非过氧化物酶体中。

为了回答过氧化物酶体蛋白功能障碍反而会诱导胆固醇堆积在溶酶体中这一问题,我们选择*ABCD1*基因做进一步研究,因为它编码一个过氧化物酶体膜蛋白,同时又是过氧化物酶体基因类别中被最显著富集的。免疫荧光结果显示,溶酶体-过氧化物酶体约有20%的接触,我们将这种新发现的溶酶体-过氧化物酶体膜接触命名为LPMC(lysosome-peroxisome membrane contacts)。这个结果是真实

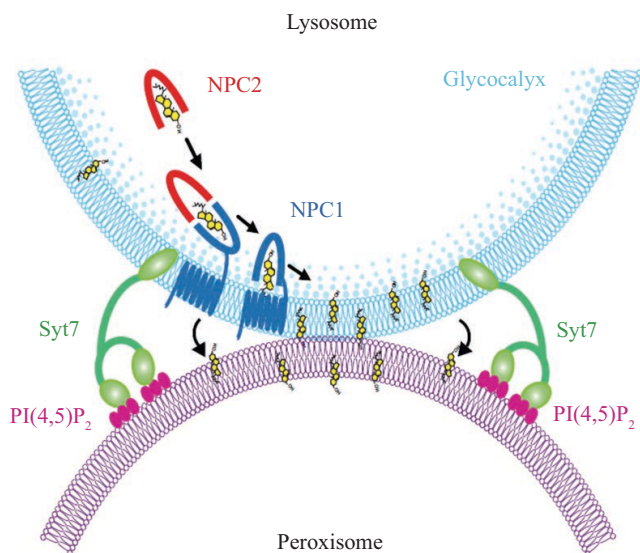


图2 LDL来源胆固醇转运出溶酶体的分子机制(根据参考文献[16]修改)

Fig.2 A working mechanism of LDL-derived cholesterol transport out of lysosome (modified from reference [16])

存在的还是由于ABCD1偶然分布到溶酶体造成的呢？由于之前国内外研究从未报道过此类接触，为了进一步验证溶酶体和过氧化物酶体的关系，我们进行了超高分辨率显微成像(SR-SIM)、PerkinElmer UltraVIEWVoX三维系统成像、透射电子显微成像、活体细胞延时成像、细胞器免疫共沉淀实验和体外重构等实验。以上结果均证实了LPMC的存在。此外，我们还发现，干扰NPC1或ABCD1的表达，该接触会显著降低，且LPMC依赖于细胞胆固醇水平，LDL来源胆固醇能够增强这种动态接触。

为了进一步揭示溶酶体-过氧化物酶体的接触机制，我们进行了多组蛋白质组学实验来分析溶酶体膜蛋白、过氧化物酶体蛋白、与NPC1相互作用蛋白中可能介导接触的蛋白质，并从合并后的蛋白列表中选择参与囊泡融合及细胞器动态运输的因子作为候选蛋白。其中，突触结合蛋白VII (Syt7)引起了我们的兴趣：作为溶酶体的膜蛋白，Syt7的基因沉默不仅会导致溶酶体内胆固醇的堆积，而且过氧化物酶体与溶酶体间的接触也明显降低；体外结合实验也证明Syt7对溶酶体-过氧化物酶体的接触至关重要。这些发现表明，Syt7是LPMC形成所需的溶酶体蛋白。

因此，下一步工作的重心就转移到寻找过氧化物酶体上与Syt7结合的因子上。我们首先便想到了SNARE蛋白，因为它们膜接触和融合过程中起核心作用。然而，到目前为止，尚未发现过氧化物酶体上存在SNARE蛋白^[19]，这也与我们的蛋白质组结果一

致。当研究陷入困境时，我们发现文献报道Syt7除了结合SNARE外，与磷脂也有相互作用^[20]。所以我们推测，Syt7可能通过与磷脂的相互作用介导LPMC。为了验证这一观点，我们重组表达了Syt7-C2AB蛋白，进行了它与多种不同磷脂结合的PIP-strip筛选实验以及脂质体漂浮实验，发现Syt7-C2AB与PI(4,5)P₂磷脂有显著的相互作用。进一步的rapamycin招募系统和体外结合实验也表明，PI(4,5)P₂就是我们要找的过氧化物酶体膜上帮助LPMC形成所需的因子。

但溶酶体与过氧化物酶体之间的接触，是否影响细胞内的胆固醇转运？为了回答这一问题，我们在体外模拟细胞质环境，检测溶酶体中的³H-胆固醇是否能够向过氧化物酶体转运。经过不同孵育时间，我们发现，过氧化物酶体从溶酶体中得到了³H-胆固醇；在LPMC形成被阻断时，这一转运便不能发生。结果证实了LPMC的形成具有促进胆固醇从溶酶体向过氧化物酶体转运的功能(图2)。

结合其他研究结果，我们绘制了胆固醇从溶酶体转运到过氧化物酶体的模式图(图2)。即：LDL被内吞途径运送至溶酶体中，由酸性酯酶水解为游离胆固醇。在溶酶体腔里，NPC2首先结合胆固醇的烷基侧链端，暴露在外的OH基和母核接着被NPC1蛋白的N端结构域识别并结合，胆固醇在NPC1的帮助下穿过糖萼并到达溶酶体的膜上。随后，溶酶体上的Syt7结合过氧化物酶体膜上的PI(4,5)P₂形成紧密的LPMC，从而实现胆固醇向过氧化物酶体的转移。

过氧化物酶体紊乱疾病与胆固醇堆积

过氧化物酶体功能缺失会导致一大类相关疾病——过氧化物酶体紊乱疾病, 表现为发育和神经系统功能障碍, 目前没有有效的治疗手段^[21-22]。我们的研究工作第一次揭示在这些病人细胞、斑马鱼和小鼠模型中有大量胆固醇堆积, 且该现象的出现远早于神经症状, 提示胆固醇堆积是过氧化物酶体紊乱疾病的发病原因之一。这项研究工作的意义在于: (1)发现了细胞内胆固醇运输的新途径; (2)揭示了过氧化物酶体这一细胞器的新功能; (3)揭示了胆固醇运输异常是导致过氧化物酶体紊乱疾病的病因之一, 为治疗该类疾病提供了全新的思路。

未来研究方向

细胞内胆固醇运输的机制是长期困扰该领域的一大难题, 我们发现过氧化物酶体通过和溶酶体形成膜接触而实现胆固醇的转运, 解释了胆固醇如何离开溶酶体膜这一关键步骤。但仍有许多问题有待解决, 如: 胆固醇到达过氧化物酶体后, 如何转运到其他细胞器? LPMC的形成有哪些调控机制? LPMC形成后, 胆固醇是如何转移过去的? 如何利用发现的机制诊断和治疗过氧化物酶体紊乱疾病? 将来针对这些问题的探索, 将有助于深入了解细胞内胆固醇转运的机制, 开辟胆固醇代谢研究的新方向。

参考文献 (References)

- 1 Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* 1999; 40(12): 2264-70.
- 2 Liscum L, Munn NJ. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1438(1): 19-37.
- 3 Goldstein JL, de Bose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006; 124(1): 35-46.
- 4 Chang TY, Chang CC, Cheng D. Acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 613-38.
- 5 Vance JE, Vance DE. Lipoprotein assembly and secretion by hepatocytes. *Annu Rev Nutr* 1990; 10: 337-56.
- 6 Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J, Russell DW. Disruption of cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J Biol Chem* 1996; 271(30): 18017-23.
- 7 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232(4746): 34-47.
- 8 Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 129-57.
- 9 Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, *et al.* Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 1997; 277(5323): 228-31.
- 10 Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Price SM, Verot L, Shen MM, *et al.* Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(16): 5886-91.
- 11 Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, *et al.* Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* 2009; 137(7): 1213-24.
- 12 Andreoli TE. On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Kidney Int* 1973; 4(5): 337-45.
- 13 Liscum L, Faust JR. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy] androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 1989; 264(20): 11796-806.
- 14 Liu B, Ramirez CM, Miller AM, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM. Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *J Lipid Res* 2010; 51(5): 933-44.
- 15 Rosenbaum AI, Zhang G, Warren JD, Maxfield FR. Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(12): 5477-82.
- 16 Chu BB, Liao YC, Qi W, Xie C, Du X, Wang J, *et al.* Cholesterol Transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell* 2015; 161(2): 291-306.
- 17 Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89(3): 331-40.
- 18 Conner SD, Schmid SL. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2002; 156(5): 921-9.
- 19 Matsumoto N, Tamura S, Fujiki Y. The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* 2003; 5(5): 454-60.
- 20 Desai RC, Vyas B, Earles CA, Littleton JT, Kowalchuck JA, Martin TF, *et al.* The C2B domain of synaptotagmin is a Ca²⁺-sensing module essential for exocytosis. *J Cell Biol* 2000; 150(5): 1125-36.
- 21 Forss-Petter S, Werner H, Berger J, Lassmann H, Molzer B, Schwab MH, *et al.* Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J Neurosci Res* 1997; 50(5): 829-43.
- 22 Moser HW, Raymond GV, Dubey P. Adrenoleukodystrophy: New approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA* 2005; 294(24): 3131-4.