

领域前沿·中国



赵世民, 复旦大学附属妇产科医院教授、博士生导师, 主要研究营养代谢物失调与人类疾病的关系, 是国际代谢物信号研究先行者之一。在 *Science*、*Cell Metab*、*Nature Metab* 等顶级期刊发表研究论文 70 余篇, 系列成果入选美国化学会“2010 年超级成就”和科技部“中国科学十大进展”, 被编入经典美国本科教材; 获教育部自然科学一等奖、中华医学奖、“吴-杨奖-基础医学”、“谈家桢奖”等。

氨基酸信号通过抑制SIRT4调控细胞氨脱毒

胡颂华 冯雨阳 徐薇 赵世民*

(复旦大学附属妇产科医院/生物医学研究院, 上海 200032)

摘要 氨基酸是细胞主要的能源物质之一。然而, 氨基酸在代谢过程中产生的氨具有很强的神经毒性, 因此其需要在肝脏中被转化成尿素排出体外。已有的研究表明, 氨的清除主要是通过尿素循环(又称鸟氨酸循环)来完成的, 然而这一代谢通路是如何基于细胞内氨基酸水平的变化来被精确调控目前仍不清楚。该团队发现, 线粒体中的SIRT4会作为一个去氨甲酰化酶响应细胞内氨基酸水平的变化来调控氨的清除。机制上, 氨基酸代谢产生的氨甲酰磷酸(CP)会通过修饰尿素循环代谢酶(ornithine transcarbamylase, OTC)的307位赖氨酸来激活OTC的酶活, 促进氨的清除。当感知到氨基酸不足时, 细胞会通过GCN2-Eif2A-ATF4信号通路上调SIRT4的表达, 进而去除OTC上的氨甲酰化修饰, 关闭尿素循环。针对这一调控机制, 该团队发现敲除*Sirt4*会降低小鼠的血氨水平并且改善四氯化碳诱导的肝性脑病。该研究揭示SIRT4是细胞内氨解毒的一个新的调控因子, 且SIRT4有望成为肝性脑病的一个新的干预靶点。

关键词 SIRT4; 氨甲酰化修饰; 尿素循环; 氨基酸代谢

Amino Acid Downregulate SIRT4 to Detoxify Ammonia

HU Songhua, FENG Yuyang, XU Wei, ZHAO Shimin*

(Institutes of Biomedical Sciences, the Obstetrics & Gynaecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Amino acids are one of the major sources of cellular energy, yet ammonia produced from amino acid catabolism has serious neurotoxicity. The urea cycle (ornithine cycle) is the primary metabolic pathway involved in ammonia detoxification, but the processes underlying the regulation of ammonia removal by amino acids re-

国家重点研发计划重点专项(批准号: 2018YFA0801300、2018YFA0800300)和国家自然科学基金(批准号: 92253305、31821002、32230054、31930062、91857000、92157001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-31246779, E-mail: zhaosm@fudan.edu.cn

This work was supported by the State Key Development Programs of China (Grant No.2018YFA0801300, 2018YFA0800300), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.92253305, 31821002, 32230054, 31930062, 91857000, 92157001)

*Corresponding author. Tel: +86-21-31246779, E-mail: zhaosm@fudan.edu.cn

main unclear. SIRT4 acts as a decarbamylase that responds to amino acid sufficiency and regulates ammonia removal. Mechanistically, amino acids-derived CP (carbamoyl phosphate) promotes lysine 307 carbamylation (OTC K307-CP) of OTC (ornithine transcarbamylase), which activates OTC and the urea cycle. SIRT4 expression was transcriptionally upregulated by the amino acid insufficiency-activated GCN2-Eif2A-ATF4 axis, leading to decarbamylation of OTC and inactivation of urea cycle. Based on this mechanism, *Sirt4* ablation decreased mouse blood ammonia levels and ameliorated CCl₄-induced hepatic encephalopathy phenotypes. This study uncovers a novel role of SIRT4 in ammonia detoxification, which could be harnessed to develop a new strategy to cure hepatic encephalopathy.

Keywords SIRT4; carbamylation; urea cycle; amino acid metabolism

1 尿素循环与氨甲酰化修饰

氨基酸的氧化脱氨在具有双层膜包裹的线粒体内进行,以防止氨泄露到细胞质及其他亚细胞器中,降低氨对细胞的毒性。氨的解毒主要在肝脏中进行:肝脏的线粒体中高表达一种叫氨甲酰磷酸合成酶1(carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1)的催化酶,其可将氨基酸氧化脱下的氨迅速转化为毒性较低的氨甲酰磷酸(carbamoyl phosphate, CP)。接下来,CP会通过鸟氨酸氨甲酰基转移酶(ornithine transcarbamylase, OTC)进入尿素循环(urea cycle)生成尿素将氨排出体外^[2-3]。同时,CP也可以作为核苷酸从头合成的原料,参与细胞周期和细胞分裂过程^[4]。CP具有很强的反应活性,可自发与赖氨酸的末端氨基(ϵ 氨基)反应生成赖氨酸氨甲酰修饰(lysine carbamylation, CP-K)^[5]。CP-K也许是自然界中最为重要的一种蛋白质翻译后修饰,因为光合作用依赖的羧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, RuBisCO)依赖于CP-K的激活^[6]。在人体中,CP-K也同样具有重要的生理与病理意义。有研究表明皮肤中胶原蛋白的氨甲酰化水平会随着衰老的进程而升高,因此蛋白质的氨甲酰化修饰也被认为是一种新的衰老标志物^[7-8]。此外,大量的研究报道在一些肾脏疾病中蛋白质的氨甲酰化修饰的水平也是升高的,因此氨甲酰化修饰同样可以作为疾病的标志物^[9-11],然而CP-K在哺乳动物中的生理功能是什么目前仍不清楚。尤其是,CP-K与细胞代谢之间是否存在联系以及这一翻译后修饰是否可逆这些重要的科学问题仍未得到很好的回答。

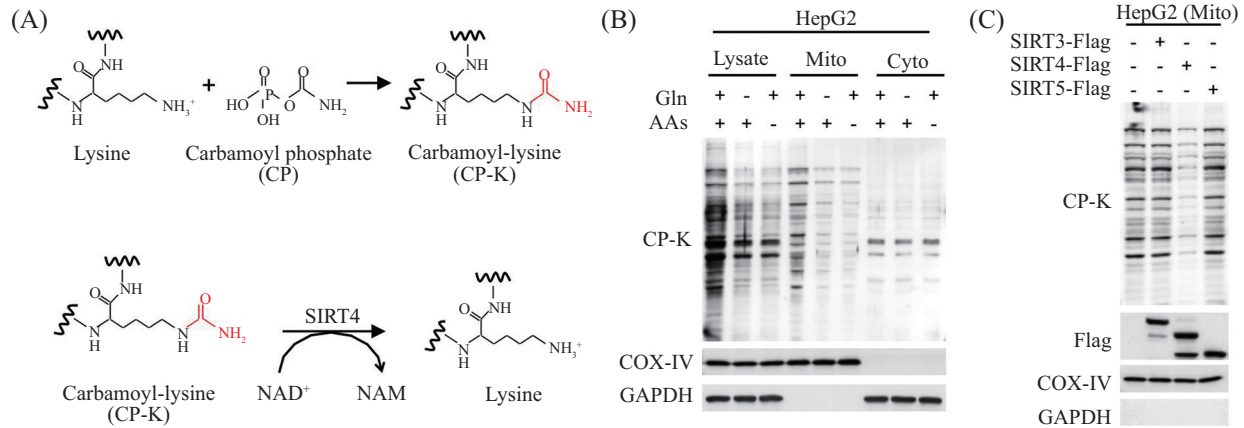
2 细胞内氨甲酰修饰水平受到氨基酸水平与SIRT4蛋白的共同调控

由于氨基酸分解代谢产生CP可以自发修饰蛋

白形成CP-K(图1A),因此为了探究细胞内CP-K的水平是否受到细胞内氨基酸水平的影响,我们对细胞进行了氨基酸饥饿处理,结果显示无论是单独缺乏谷氨酰胺还是全氨基酸饥饿处理都能显著降低细胞内CP-K水平(图1B)。氨基酸的氧化脱氨主要是在线粒体中进行的,我们发现氨基酸饥饿导致的CP-K水平降低在线粒体中更为显著,这说明线粒体中CP-K水平的确与氨基酸的分解代谢密切相关。Sirtuin蛋白是一类以NAD⁺为底物的蛋白质去修饰酶家族,这一类去修饰酶会通过去除蛋白质赖氨酸上的翻译后修饰来影响蛋白的功能从而调控细胞内一系列的生理过程^[12-14]。为了探究蛋白上CP-K是否可以被线粒体中的sirtuin蛋白去除,我们分别在细胞中过表达了三种定位于线粒体的sirtuin蛋白——SIRT3~5,结果显示只有过表达SIRT4可以降低线粒体内的CP-K水平,提示SIRT4或许是CP-K的去修饰酶(图1C)。进一步,我们纯化了SIRT4蛋白并通过体外实验验证了SIRT4去修饰酶活,并且我们发现相比较于其他几个已知的去修饰底物,包括之前报道的乙酰化(Ac-K)^[15]、硫辛酰化(Lipoyl-K)^[16]以及羟甲基戊二酰化(HMG-K)^[17]修饰,SIRT4具有更强的去氨甲酰化修饰的活性(图1和表1)。

3 SIRT4调控OTC和尿素循环

为了探究CP-K的生理功能,我们利用蛋白质组学和代谢组学去寻找可能受到CP-K和SIRT4调控的底物蛋白以及代谢通路。首先,我们用CP-K的抗体和定量分析质谱在小鼠肝脏中鉴定到142个存在CP-K修饰的蛋白;接下来,我们利用BIO-ID(邻近蛋白标记技术)在小鼠肝细胞中鉴定到135个与SIRT4存在相互作用的蛋白。我们发现一共有22个蛋白同时存在于这两个集合当中,说明这些蛋白上不仅存在CP-K修饰,并且其很可能会受到SIRT4的



A: CP修饰蛋白质赖氨酸残基形成CP-K的示意图。B: 氨基酸饥饿降低细胞内的CP-K水平。HepG2细胞分别用Glutamine缺乏培养基和全氨基酸缺乏培养基处理4 h, 然后分离线粒体和胞质并用Western blot检测不同细胞组分中CP-K的水平。C: 过表达SIRT4降低细胞内CP-K水平。细胞分别转染SIRT3、SIRT4和SIRT5 48 h之后分离线粒体并检测CP-K的水平。D: SIRT4去除蛋白质上CP-K的示意图。

A: schematic diagram of nonenzymatic carbamylation between carbamoyl phosphate and ϵ -amine of lysine. B: amino acid starvation decreases mitochondrial CP-K levels. CP-K levels in whole-cell lysates, mitochondria, and cytoplasm of HepG2 cells, with or without glutamine or total amino acid starvation for 4 h. C: SIRT4 overexpression decreases mitochondrial CP-K levels. CP-K levels of mitochondrial proteins were detected in HepG2 cells and HepG2 cells overexpressing SIRT3, SIRT4, or SIRT5. D: schematic illustration of NAD^+ -dependent decarbamylation catalysed by SIRT4.

图1 氨甲酰化修饰是一种动态可逆的翻译后修饰(数据修改自参考文献[1])

Fig.1 Carbamylation is a reversible posttranslational modification (modified from reference [1])

表1 SIRT4对于不同修饰底物的酶活参数(根据参考文献[1]修改)

Table 1 Enzyme viability parameters of SIRT4 for the different modified substrates (modified from reference [1])

多肽 Peptides	K_{cat} / s^{-1}	$K_m / \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_{cat}\cdot K_m^{-1} / \text{L}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$
K307 _{CP}	0.001 4±0.000 3	201.94±42.00	6.93±1.42
K307 _{Lipoyl}	0.001 2±0.000 2	458.60±79.40	2.62±0.48
K307 _{HMG}	0.000 6±0.000 1	660.90±105.80	0.91±0.15
K307 _{Acetyl}	ND	ND (>2 500)	ND

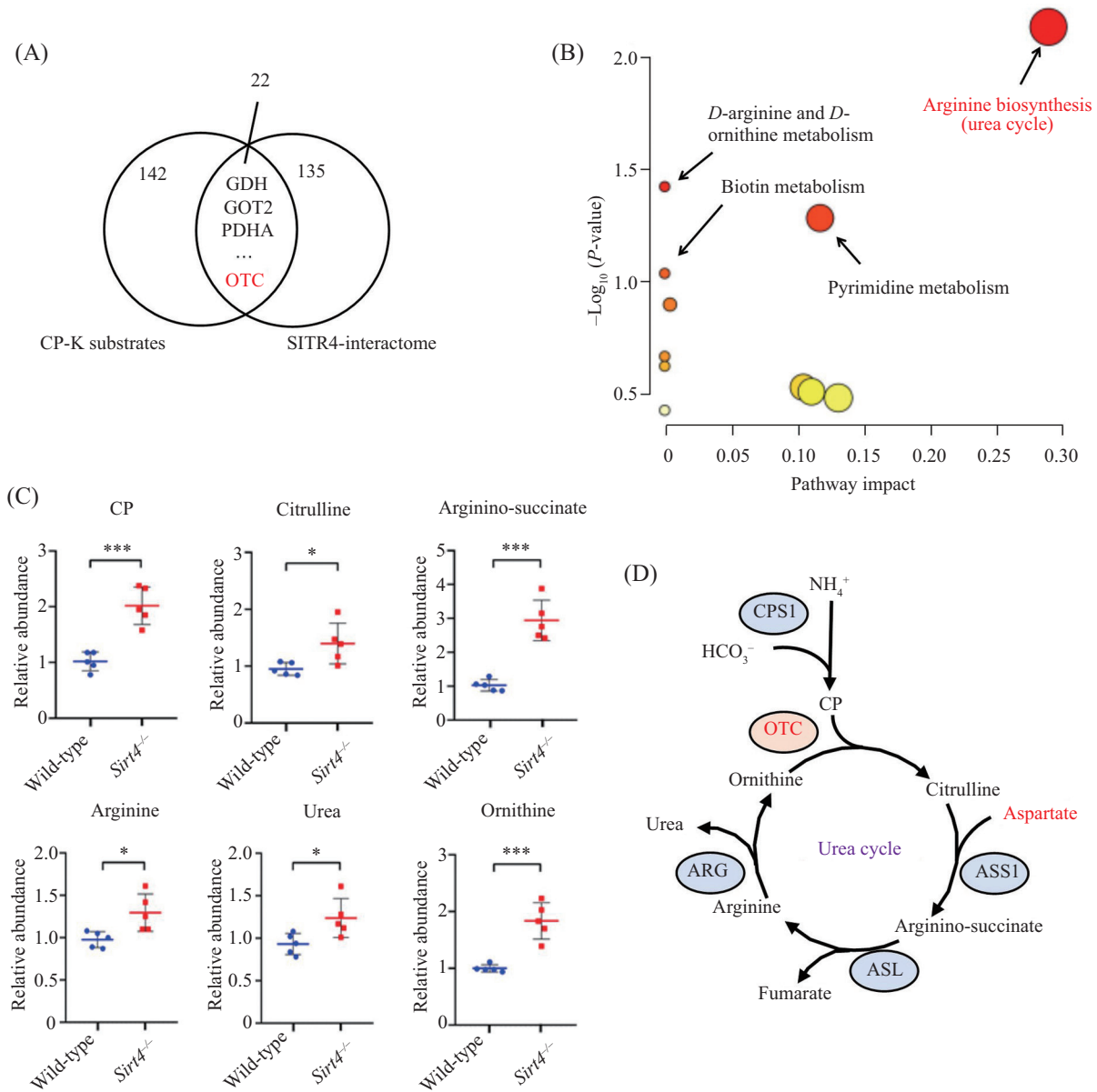
动力学参数采用Briggs-Haldane方法进行统计, 所有结果统计数据均以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示, $n=3$ 。ND: 测不出。

HMG-modified and acetylated OTC K307-CP peptides, and the kinetic parameters of these reactions were determined using the Briggs-Haldane approach, data are represented as $\bar{x}\pm s$; $n=3$. ND: not detected.

调控, 而这其中很大一部分都是定位于线粒体的代谢酶, 包括GDH、GOT2和OTC等(图2A)。最后, 为了进一步缩小筛选范围, 我们对WT和Sirt4 KO小鼠肝脏进行了代谢组学实验, 通过对差异代谢物进行通路富集分析, 我们发现尿素循环这个代谢通路改变最为显著(图2B), 而我们通过蛋白组学筛选到的其中一个代谢酶OTC也是属于这一代谢通路, 这些实验结果提示SIRT4有可能会通过去除OTC上的CP-K修饰并改变OTC的酶活来调控整个尿素循环。利用LC-MS/MS去靶向检测尿素循环代谢物, 我们发现所有尿素循环中间代谢物在Sirt4 KO小鼠肝脏中的水平都是升高的(图2C和图2D)。这说明SIRT4可能会通过去除OTC上的CP-K修饰来调控尿素循环。

4 SIRT4通过去除OTC K307位点上的氨甲酰化修饰(OTC K307-CP)调控尿素循环

通过一系列的细胞生化实验, 我们发现CP会修饰OTC的K307位点并促进OTC的酶活, 因此, 氨基酸代谢产生的CP不仅仅是作为OTC的底物, 还会作为一种信号分子通过直接修饰OTC蛋白来调控蛋白的酶活。这说明当氨基酸的分解代谢旺盛时, 由氨代谢产生的CP会通过变构激活的方式来激活尿素循环从而促进氨的清除。与之相对应的是, SIRT4则会以 NAD^+ 依赖的方式去除该位点上的CP-K修饰抑制OTC的酶活从而关闭尿素循环。此外, 我们发现SIRT4的转录水平还会受到细胞内氨基酸水平的调控, 因此, 当感知到氨基酸不足时, 细胞会通过GCN2-Eif2A-ATF4信号通路上调SIRT4的表达以减



A: K-CP修饰蛋白组和SIRT4互作蛋白组中共同鉴定到的蛋白。B: 对WT和*Sirt4* KO小鼠肝脏中差异代谢物($P < 0.05$, $FC > 2$)进行通路富集分析并以气泡图的形式进行展示。通路影响因子表示鉴定到的差异代谢物数量占该通路中所有代谢物总和的百分比。C: *Sirt4* KO小鼠肝脏中尿素循环中间代谢产物水平升高。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用One/Two-Way ANOVA检验($*P < 0.05$, $***P < 0.001$)。D: 尿素循环代谢通路示意图。A: co-identified proteins in the K-CP proteome and the SIRT4 interactome. B: the metabolites ($P < 0.05$, $FC > 2$) in the liver of WT and *Sirt4* KO mice were analyzed via pathway enrichment and displayed in the form of bubble map. Pathway impact is a measure for the percentage of metabolites that measured in a given pathway. C: the intermediate metabolites of urea cycle were increased in the liver of *Sirt4* KO mice. Data are presented in the $\bar{x} \pm s$ form, and significance was calculated using a One/Two-Way ANOVA test ($*P < 0.05$, $***P < 0.001$). D: schematic diagram of the urea-cycle metabolism pathway.

图2 SIRT4调控OTC和尿素循环(数据修改自参考文献[1])

Fig.2 OTC and urea cycle are regulated by SIRT4 (modified from reference [1])

少尿素的生成(图3)。最后,为了探究SIRT4调控尿素循环的生理意义,我们利用CRISPR-Cas9构建了*Sirt4*敲除小鼠,我们发现*Sirt4* KO小鼠血氨浓度要低于WT小鼠。进一步,我们通过腹腔注射 CCl_4 的方式构建了肝性脑病小鼠模型^[18],发现敲除*Sirt4*会降低

小鼠的血氨水平,并且改善 CCl_4 诱导的肝性脑病。

5 总结与展望

作为细胞内重要的营养物质,氨基酸最主要的生理功能是为蛋白质、核苷酸等生物大分子的合成

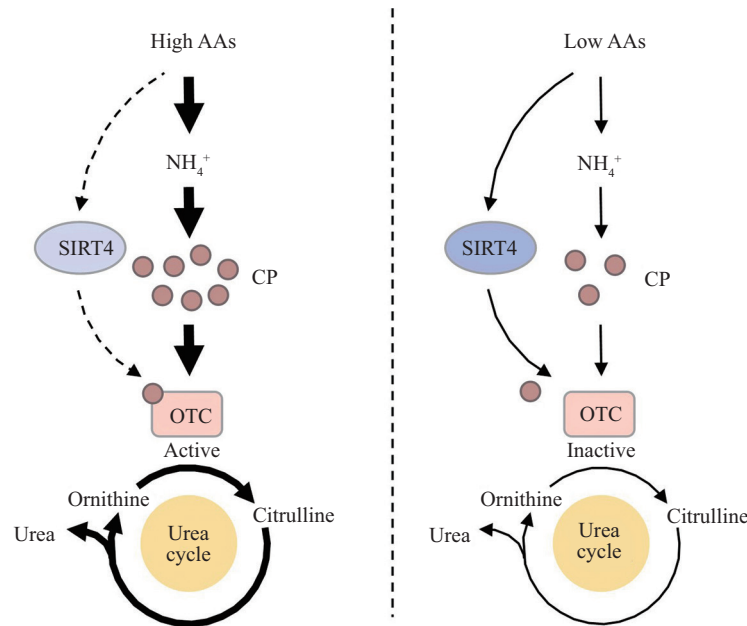


图3 SIRT4去除OTC K307-CP并调控尿素循环

Fig.3 SIRT4 regulates urea cycle via decarbamylation of OTC K307-CP

提供原料(building blocks)。然而在特定的生理情况下,例如长时间的饥饿处理,氨基酸也可以作为一种能源物质被动员起来去为细胞提供能量,而这一过程则会以产生有毒的氨作为代价。在细胞中,这些有毒的氨需要及时通过尿素循环生成尿素排出体外,否则氨的累积将会造成细胞毒性。尽管如此,选择氨基酸作为能源物质依然不是一种经济的选择,因为将游离氨以尿素的形式排出会造成细胞内氮源的流失。因此,氨的代谢去路应该根据细胞内氨基酸的丰度以及利用程度而被精确调控。本研究发现当氨基酸的分解代谢旺盛时,由氨代谢产生的CP会通过变构激活的方式来激活尿素循环,促进氨脱毒;当感知氨基酸不足时,细胞会上调SIRT4表达去除OTC上的CP-K修饰关闭尿素循环。这一调控的生理意义可能在于:当细胞感知到氨基酸不足时,细胞会尽可能利用有限的氮源,包括有毒的氨。有研究表明,CP可以直接作为底物参与嘧啶核苷酸的合成^[4],这提示当OTC的活性被抑制之后,由氨代谢而来的CP可能会直接参与核苷酸等生物大分子的合成。

除此之外,这一调控机制同样具有十分重要的病理意义。在一些肝功能损伤的疾病(例如肝硬化)当中,血液中氨水平的异常升高会引起高氨血症(又称尿素循环代谢病),最终造成中枢神经系统功能障碍,例如脑水肿和脑疝^[19-21]。肝癌病人经常发生由

于肝脏氨排毒功能障碍导致的高血氨症,直接威胁病人生命。因此,阐明肝脏的氨脱毒机制具有重要的理论与临床转化价值。

参考文献 (References)

- [1] HU S H, FENG Y Y, YANG Y X, et al. Amino acids downregulate SIRT4 to detoxify ammonia through the urea cycle [J]. *Nat Metab*, 2023, 5(4): 626-41.
- [2] KESHET R, SZLOSAREK P, CARRACEDO A, et al. Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(10): 634-45.
- [3] KLEPPE S, MIAN A, LEE B. Urea cycle disorders [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2003, 5(4): 309-19.
- [4] KIM J, HU Z, CAI L, et al. CPS1 maintains pyrimidine pools and DNA synthesis in KRAS/LKB1-mutant lung cancer cells [J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 168-72.
- [5] WAGNER G R, HIRSCHEY M D. Nonenzymatic protein acylation as a carbon stress regulated by sirtuin deacylases [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(1): 5-16.
- [6] STEC B. Structural mechanism of RuBisCO activation by carbamylation of the active site lysine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(46): 18785-90.
- [7] GORISSE L, PIETREMENT C, VUIBLET V, et al. Protein carbamylation is a hallmark of aging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(5): 1191-6.
- [8] CARRACEDO J, RAMIREZ-CARRACEDO R, MARTINEZ DE TODA I, et al. Protein carbamylation: a marker reflecting increased age-related cell oxidation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1495.
- [9] KALIM S, KARUMANCHI S A, THADHANI R I, et al. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications [J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 64(5): 793-803.

- [10] LONG J, VELA PARADA X, KALIM S. Protein carbamylation in chronic kidney disease and dialysis [J]. *Adv Clin Chem*, 2018, 87: 37-67.
- [11] KOETH R A, KALANTAR-ZADEH K, WANG Z, et al. Protein carbamylation predicts mortality in ESRD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(5): 853-61.
- [12] HAIGIS M C, GUARENTE L P. Mammalian sirtuins: emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(21): 2913-21.
- [13] HAIGIS M C, SINCLAIR D A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance [J]. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5: 253-95.
- [14] BRACHMANN C B, SHERMAN J M, DEVINE S E, et al. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability [J]. *Genes Dev*, 1995, 9(23): 2888-902.
- [15] LAURENT G, GERMAN N J, SAHA A K, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase [J]. *Mol Cell*, 2013, 50(5): 686-98.
- [16] MATHIAS R A, GRECO T M, OBERSTEIN A, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity [J]. *Cell*, 2014, 159(7): 1615-25.
- [17] ANDERSON K A, HUYNH F K, FISHER-WELLMAN K, et al. SIRT4 is a lysine deacylase that controls leucine metabolism and insulin secretion [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 838-55, e15.
- [18] WANG W W, ZHANG Y, HUANG X B, et al. Fecal microbiota transplantation prevents hepatic encephalopathy in rats with carbon tetrachloride-induced acute hepatic dysfunction [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(38): 6983-94.
- [19] WIJDICKS E F. Hepatic encephalopathy [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(17): 1660-70.
- [20] BEMEUR C, CUDALBU C, DAM G, et al. Brain edema: a valid endpoint for measuring hepatic encephalopathy [J]? *Metab Brain Dis*, 2016, 31(6): 1249-58.
- [21] Cirrhosis, hyperammonemia and hepatic encephalopathy. Proceedings of a meeting. Spain, August 10-14, 1992 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1993, 341: 1-148.