

领域前沿 · 中国



饶枫, 南方科技大学生命科学学院生物系副教授, 研究员。新加坡国立大学生物医学学士, 南洋理工大学生物学博士, 美国约翰-霍普金斯大学医学院博士后, 加入南科大前任职北京生命科学研究所以研究员。饶枫实验室(信使与代谢生物学实验室)主要研究细胞内新兴小分子信使的功能机制和蛋白质稳态的代谢调控, 以及疾病微环境中这些生命过程如何参与神经与代谢和肿瘤组织的互调互作, 获基金委优秀青年科学基金, 重大研究计划和国自然面上与深圳市孔雀团队等项目支持。作为最后通讯作者在*Nature Metabolism*、*PNAS*和*Nature Communications*等杂志上发表研究论文多篇。成果多次被作为研究亮点点评或被F1000等推荐。

5-IP₇小分子是神经调控胰岛素分泌和葡萄糖稳态过程中的胆碱能GPCR第二信使

李娜 饶枫*

(南方科技大学生命科学学院, 深圳 518055)

摘要 5-焦磷酸-五磷酸肌醇(5-IP₇)是一种进化上保守的小分子代谢物, 其作用模式尚不清楚。该研究揭示5-IP₇通过介导突触结合蛋白-7(Syt7)依赖性胰岛素释放的副交感刺激信号参与葡萄糖稳态的神经调控。迷走神经刺激通过毒蕈碱乙酰胆碱受体-G_{αq}-PLC-PKC/PKD磷酸化激活5-IP₇的合成酶IP6K1。5-IP₇及其前体IP₆都与PIP₂竞争Syt7。然而, Ca²⁺以高亲和力选择性结合5-IP₇, 释放Syt7以促进囊泡膜相互作用。β细胞特异性IP6K1缺失可减少毒蕈碱刺激引起的胰岛素分泌和葡萄糖清除; 而模拟IP6K1磷酸化活化的突变体表现出胰岛素释放能力增强、先天性高胰岛素血症和肥胖, 这些表型在Syt7基因敲除后消失。此研究提出了一个新的概念框架来理解焦磷酸肌醇生理学: 5-IP₇是外周神经系统和代谢器官之间联系的GPCR信号信使, 它将G_q偶联的GPCR刺激传递给Syt7依赖性的生物学过程。

关键词 5-IP₇; G蛋白偶联受体; 突触结合蛋白-7; 胰岛素分泌

5-IP₇ is a GPCR Messenger Mediating Neural Control of Insulin Exocytosis and Glucose Homeostasis

LI Na, RAO Feng*

(School of Life Sciences, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China)

国家自然科学基金优秀青年科学基金(批准号: 3212200406)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-88018439, E-mail: raof@sustech.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.3212200406)

*Corresponding author. Tel: +86-755-88018439, E-mail: raof@sustech.edu.cn

Abstract 5-IP₇ (5-diphosphoinositol pentakisphosphate) is an enigmatic signaling metabolite. This study elucidated a GPCR pathway that utilized 5-IP₇ as a 2nd messenger to mediate neural control of endocrine secretion and metabolic homeostasis. Specifically, vagal stimulation activates IP6K1, the 5-IP₇ synthase, is activated via a muscarinic acetylcholine receptor-G_{aq}-PLC-PKC/PKD phosphorylation axis in pancreas. Upon parasympathetic nerve input, this pathway activates by mediating parasympathetic stimulation of Syt7 (synaptotagmin-7)-dependent insulin release. Both 5-IP₇ and its precursor IP₆ compete with PIP₂ for Syt7. However, Ca²⁺ selectively binds 5-IP₇ with high affinity, freeing Syt7 to promote vesicle membrane interaction. β -cell specific IP6K1 deletion diminishes insulin secretion and glucose clearance elicited by muscarinic stimulation; whereas mice carrying a phosphorylation-mimic, hyperactive IP6K1 mutant display augmented insulin release, congenital hyperinsulinism, and obesity. These phenotypes are absent in a Syt7 null background. This study suggests a new conceptual framework to understand inositol pyrophosphate physiology: 5-IP₇ is a metabolic messenger for GPCR signaling at the interface between peripheral nervous system and metabolic organs, where it transmits G_q-coupled GPCR stimulation to unclamp Syt7-dependent and perhaps other exocytotic events.

Keywords 5-diphosphoinositol pentakisphosphate; GPCR; synaptotagmin-7; insulin secretion

1 胰岛素和磷酸肌醇研究背景

随着经济社会发展, 糖尿病(diabetes mellitus, DM)已经成为对人类生命健康产生严重危害的慢性病。其主要临床特点是循环血液中异常升高的血糖浓度, 并可能伴有胰岛素抵抗以及糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢等代谢紊乱, 是一种代谢性疾病。其临床表现为多饮、多尿、多食, 体重下降, 被概括为“三多一少”。除此之外, 严重的糖尿病患者有很多并发症, 包括糖尿病酮症酸中毒(diabetic ketoacidosis, DKA)和高渗高血糖综合征这两种急性严重代谢紊乱, 以及许多慢性并发症, 如糖尿病肾病、糖尿病性视网膜病变、神经系统并发症等。糖尿病患者发生动脉粥样硬化的风险较大, 糖尿病是动脉粥样硬化的危险因素, 易引发冠心病、缺血或出血性脑血管病等, 这些对于患者生命健康都是很严重的威胁^[1]。

胰岛素是一种由胰岛 β 细胞分泌的激素, 是体内唯一的降血糖激素, 胰岛素通过促进肝细胞、脂肪细胞及骨骼肌细胞对葡萄糖的吸收从而调控血糖。另外胰岛素也调控脂代谢及氨基酸代谢。胰岛素蛋白由51个氨基酸组成, 分子量约为 5.8千道尔顿(kDa), 由二硫键连接A链与B链而成^[2-3]。胰岛素分泌的严格精细调控对于血糖稳态具有非常重要的意义。其分泌受血糖浓度、神经信号以及多种激素的复杂调控^[4]。胰岛 β 细胞的破坏及分泌功能受损会导致分泌至血液中的胰岛素含量减少, 而长期过量的胰岛素分泌则会引起机体对胰岛素敏感性的降低, 从而造成胰岛素抵抗(insulin resistance,

IR)。因此, 胰岛素分泌异常是糖尿病发病的重要原因。

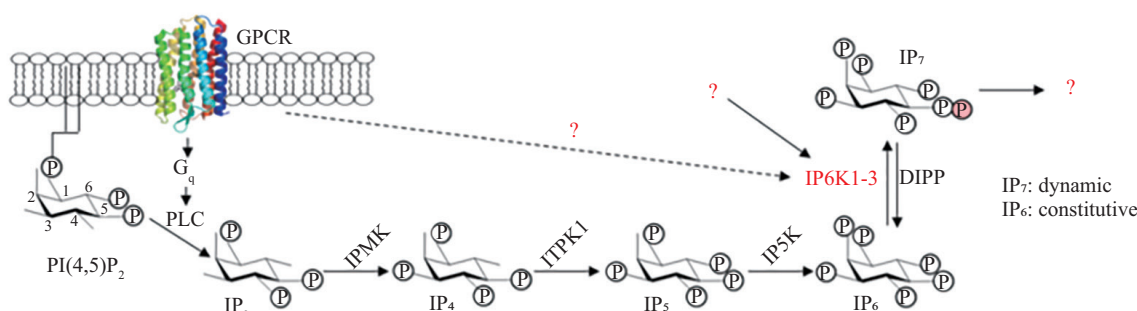
磷酸肌醇信号通路起源于G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)。GPCR在接受外源信号刺激后激活质膜上的磷脂酶C, 其切割PIP₂生成的IP₃除了能促进内质网中钙离子释放外, 还能被多级磷酸肌醇激酶催化进入多磷酸肌醇代谢途径。Ins(3,4,5)P₃首先被IPMK或IP3K磷酸化生成Ins(1,3,4,5)P₄或Ins(1,4,5,6)P₄, 然后IP₄被ITPK或IPMK催化生成IP₅, 再者IP₅被IP5K催化生成IP₆, IP₅和IP₆是细胞中最多的两种磷酸肌醇, 含量远多于IP₃。IP6Ks催化5'位焦磷酸化产生5-IP₇, PP-IP5K则催化1'位焦磷酸化产生1-IP₇。最后5-IP₇还可以实现1'位和5'位两个位点的同时焦磷酸化生成IP₈。同时, 体内存在磷酸肌醇的磷酸水解酶(diphosphoinositol-poly-phosphate phosphohydrolases, DIPP), 可以将IP₈依次水解为5-IP₇、IP₆和IP₅(图1)^[5-6]。

六磷酸肌醇激酶的功能有很多, 包括参与DNA损伤修复^[7]、肿瘤转移^[8]、能量消耗^[9]、脂质代谢^[10]和胰岛素信号通路^[11]等。2007年, ILLIES等^[12]通过电生理学实验测量 β 细胞膜电容证明了5-IP₇在促进胞吐作用中起重要作用。IP6K1全身敲除的小鼠表现出胰岛素分泌减少的情况^[13], 这些都证实5-IP₇与胰岛素分泌关系密切。但是, 5-IP₇如何参与囊泡释放是磷酸肌醇领域十多年来未解决的问题。我们最近发现 β 细胞里的5-IP₇是GPCR第二信使, 其通过传递神经递质信号来介导胰岛素分泌的神经调控^[14]。

2 5-IP₇生成受副交感神经信号调控

毒蕈碱型乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptors, mAChRs) 是细胞膜表面的一种 GPCR, 接受来自副交感神经的神经递质乙酰胆碱。胰岛β细胞表面的 M3R 响应副交感神经后可促进胰岛素分泌。其信号转导机制中下游重要的蛋白激酶为蛋白激酶 C (PKC), 我们首先在体外证明了 PKC 可以磷酸化 IP6K1 的 S118/S121 位点 (图 2a)。随后, 我们使用制

备的 S118/121 磷酸化抗体在细胞里证实, S118/121 磷酸化受胆碱能受体激动剂调控 (图 2b), 其信号转导是通过 Ach-M3R-G_{αq/11}-PLC-PKC/PKD-IP6K1 路径实现的 (图 2c)。在酶活方面, 我们利用体外实验发现, PKC/PKD 可增加 IP6K1 的酶活, 促进生成更多的 5-IP₇ (图 2d)。同时, 在细胞里, PKC 的激动剂佛波酯 (PMA) 可显著增加细胞内 5-IP₇ 的含量 (图 2e), 乙酰胆碱类似物卡巴胆碱也可以增加细胞内 5-IP₇ 的含量,

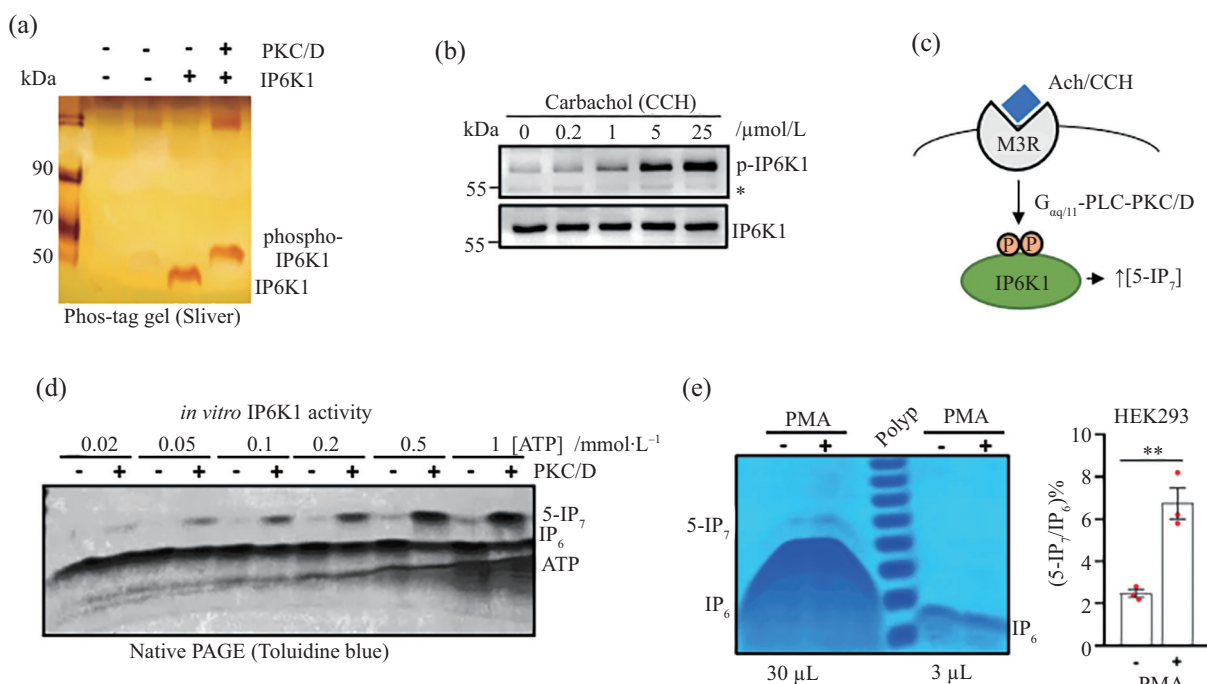


IP6K 介导的 IP₆ 至 5-IP₇ 间的动态转换可能参与了细胞对外界信号/刺激/胁迫的应答。然而, IP6K 参与应答的信号以及 5-IP₇ 的靶标与作用机制未知。

IP6K1-catalyzed IP₆ to 5-IP₇ turnover may be involved in the cell response to external signals/stimuli/stresses. However, the signal IP6K responds, the target and mechanism of 5-IP₇ were hitherto unknown.

图1 高级多酸肌醇代谢分子的信使功能与机制研究

Fig.1 The inositol polyphosphate synthetic pathway



a: 体外 PKC/PKD 磷酸化 IP6K1; b: 乙酰胆碱激动剂促进 IP6K1 S118/121 位点磷酸化, * 非特异性条带; c: 乙酰胆碱到 IP6K1 信号转导通路; d: 体外 PKC/PKD 促进 IP6K1 酶活; e: PKC 激活剂 PMA 促进 5-IP₇ 生成, **P=0.005。

a: PKC/PKD phosphorylate IP6K1 *in vitro*; b: acetylcholine agonists promote the phosphorylation of IP6K1 S118/121. * nonspecific band; c: scheme depicting the signaling pathway from acetylcholine to IP6K1; d: PKC/PKD activate IP6K1 *in vitro*; e: PKC activator PMA stimulates 5-IP₇ production. **P=0.005.

图2 IP6K1 受副交感神经系统调控激活 (根据参考文献 [14] 修改)

Fig.2 IP6K1 is regulated and activated by parasympathetic nervous system via PKC/D (modified from reference [14])

同样的过表达 $G_{\alpha q/11}$ 蛋白也可以增加5-IP₇的含量。更为重要的是,我们在迷走神经背核直接激活迷走神经可以在胰腺里检测到IP6K1磷酸化水平的增加,这种增加可以被迷走神经切除术阻断。这些都表明,IP6K1在生理状态下响应副交感神经并被激活,促使5-IP₇产生从而发挥功能。这是关于IP6Ks酶活的生理调控的首次报道,是中枢调控外周的一项新发现。

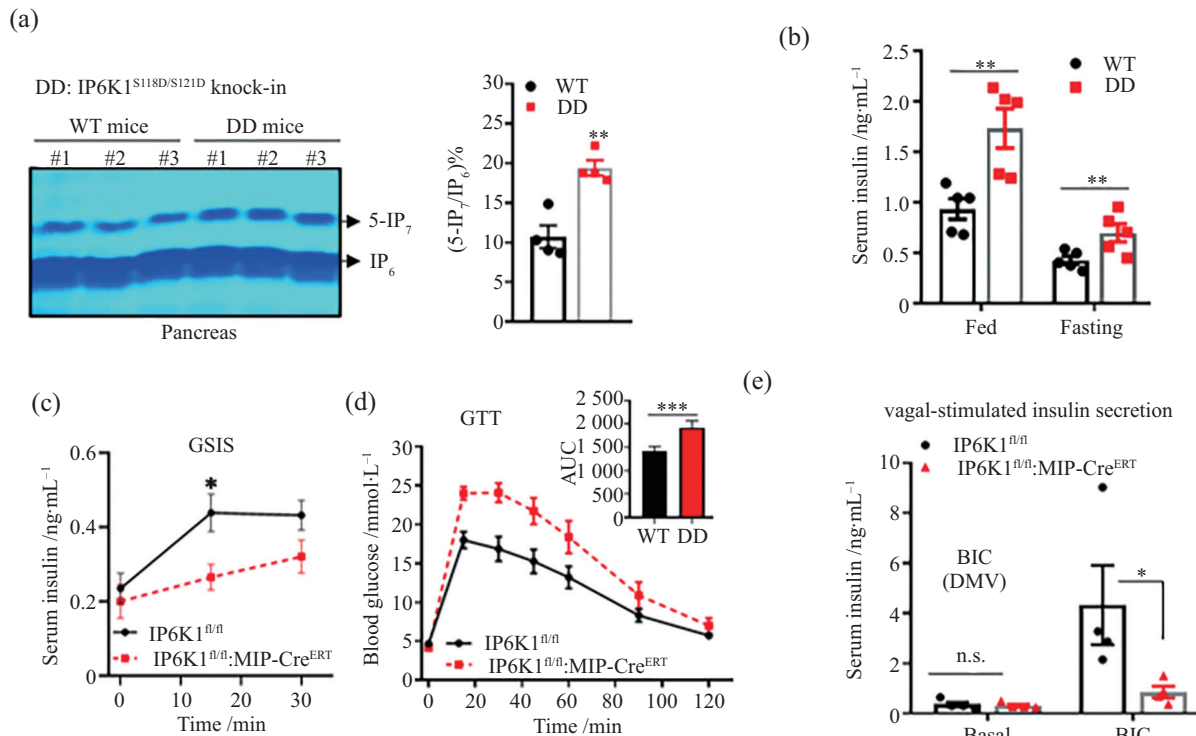
3 IP6K1磷酸化模拟突变体小鼠胰岛素分泌

为了探究5-IP₇的功能,我们构建了IP6K1^{S118D/S121D}模拟磷酸化突变的小鼠(DD鼠),在DD鼠的胰腺组织中,发现了更高水平的5-IP₇(图3a),且DD鼠具有更高的血清胰岛素水平(图3b),这也进一步证实了之前的结论,5-IP₇能够促进胰岛素囊泡释放。同时,在葡萄糖耐受实验中,DD鼠表现出更好的葡萄糖耐受以及葡萄糖刺激的胰岛素分泌。DD鼠的胰岛也表现出更好的胰岛素分泌能力。另外,DD鼠的食物摄入,氧气消耗,二氧化碳生成,呼吸速率等代谢

指标没有显著差异。而相反,胰岛β细胞中特异敲除IP6K1的IP6K1^{fl/fl}:MIP-Cre小鼠表现出受损的葡萄糖诱导的胰岛素分泌以及更差的葡萄糖耐受(图3c和图3d)。乙酰胆碱激动剂或DMV刺激迷走神经诱导生成胰岛素的能力在β细胞中特异性敲除IP6K1的小鼠中显著降低(图3e),葡萄糖清除速率显著下降,因此,IP6K1参与神经调控的胰岛素分泌过程。

4 5-IP₇参与胰岛素分泌机制研究

为进一步解析5-IP₇促进胰岛素分泌的机制,我们系统表征了胰岛的数量、大小和胰岛素含量与囊泡对接程度,以及钙内流,发现5-IP₇不参与这些过程。但是IP6K1过表达确实能够显著增加胰岛β细胞的胞吐(图4a)。胰岛素囊泡释放是一个复杂的过程,一般认为与钙离子内流相关,当大量钙离子内流时,突触结合蛋白(synaptotagmin)可以感知钙离子,从而启动胰岛素囊泡的膜融合,释放胰岛素。参与胰岛素囊泡释放的是synaptotagmin-7(Syt7)^[15-16]。因

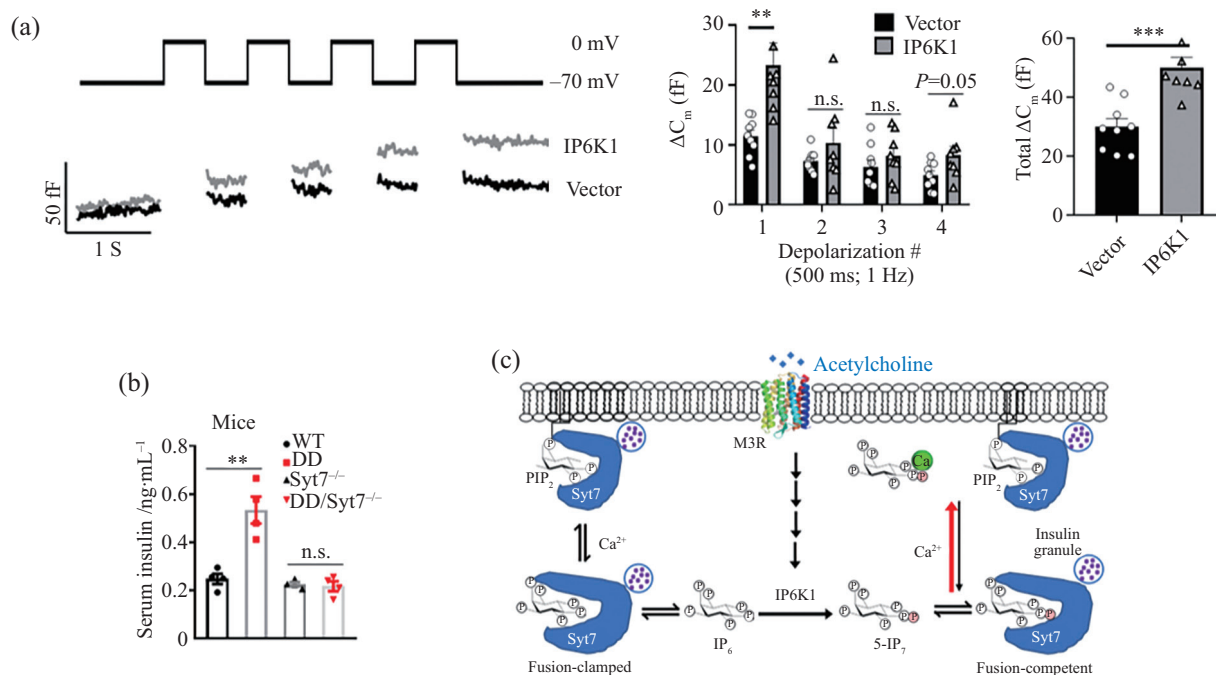


a: DD鼠胰腺5-IP₇含量, ** $P=0.002$; b: DD鼠血清胰岛素水平, ** $P=0.007$; c: β特异敲除IP6K1小鼠GSIS, * $P=0.01$; d: β特异敲除IP6K1小鼠GTT, *** $P<0.001$; e: β特异敲除IP6K1小鼠副交感神经激活刺激的胰岛素分泌, * $P=0.028$ 。

a: the content of 5-IP₇ in pancreas of DD mice, ** $P=0.002$; b: serum insulin level in DD mice, ** $P=0.007$; c: GSIS of β specific IP6K1 knockout mice, * $P=0.01$; d: GTT of β specific IP6K1 knockout mice, *** $P<0.001$; e: insulin secretion stimulated by parasympathetic nerve in β specific IP6K1 knockout mice, * $P=0.028$ 。

图3 DD鼠和β特异敲除小鼠的胰岛素分泌(根据参考文献[14]修改)

Fig.3 Insulin secretion in DD and β specific IP6K1 knockout mice (modified from reference [14])



a: IP6K1过表达的细胞胞吐能力增加, $**P=0.005$, $***P=0.0004$; b: Syt7敲除的DD鼠的血清胰岛素水平恢复到野生型鼠水平, $**P=0.003$; c: 5-IP₇与Ca²⁺作为乙酰胆碱受体GPCR通路下游的“共发”信使(coincident messenger)刺激胰岛素囊泡释放的作用模式图。

a: increased exocytosis in IP6K1 overexpressed cells, $**P=0.005$, $***P=0.0004$; b: fasting serum insulin levels in male WT, IP6K1^{DD}, Syt7^{-/-} and IP6K1^{DD};Syt7^{-/-} mice, $**P=0.003$. c: 5-IP₇ works with Ca²⁺ as “coincident messengers” downstream of the acetylcholine receptor GPCR pathway to stimulate the release of insulin vesicles.

图4 5-IP₇参与胰岛素分泌机制研究(根据参考文献[14]修改)

Fig.4 5-IP₇ promotes Syt7-triggered insulin secretion (modified from reference [14])

此我们在DD鼠的基础上引入Syt7敲除, 随后我们发现, DD鼠胰岛素水平高的现象在Syt7敲除之后恢复到野生型小鼠的水平(图4b), 因此, Syt7是5-IP₇参与胰岛素分泌的重要靶点。那么5-IP₇究竟如何作用于Syt7蛋白, 我们解析了Syt7与磷酸肌醇复合物的晶体结构, 发现5-IP₇可与PIP₂竞争结合Syt7, 从而抑制无刺激时的自发囊泡释放。在钙内流刺激的胰岛素囊泡与细胞膜融合过程中, 钙离子可与5-IP₇结合, 从而促进Syt7与细胞膜上的PIP₂结合, 催发SNARE介导的囊泡与细胞膜自然融合(图4c)。而5-IP₇的前体IP₆与钙离子的结合能力较弱, 此差异在IP6K1激活时或在IP6K1^{S118/121D}突变体里被放大, 导致鼠胰岛素分泌高于正常水平。基于以上现象, 我们认为当G_q偶联的GPCR被激活时, 5-IP₇作为与Ca²⁺共同作用的“共发”信使(coincident messenger)参与囊泡释放。

5 展望

IP6K家族蛋白的生理功能被广泛报道, 但是其调控机制未知, 我们首次发现了IP6K1在体内响应重要的神经信号, 这为探讨IP6K1更多的生理功能

提供了可能的方向。已被发现的800多种G蛋白偶联受体功能非常广泛, 因此IP6K1作为下游蛋白很可能有很多的生理功能还未被发现。或许它们都在参与自主神经调控的生理过程中发挥重要的作用。另外, IP6K家族的其他蛋白或可以类似的方式被调控, 它们的调控机制及生理功能还有待被挖掘。在应用方面, IP6K1对于胰岛素分泌至关重要, 这对于糖尿病治疗来说可能是一个潜在的药物靶点, 或许可以靶向调控IP6K1从而影响胰岛素分泌以达到治疗糖尿病的目的。

参考文献 (References)

- [1] KERNER W, BRÜCKEL J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014, 122(7): 384-6.
- [2] MAYER J P, ZHANG F, DIMARCHI R D. Insulin structure and function [J]. Biopolymers, 2007, 88(5): 687-713.
- [3] NISWENDER K D. Basal insulin: physiology, pharmacology, and clinical implications [J]. Postgrad Med, 2011, 123(4): 17-26.
- [4] NAKAJIMA K, JAIN S, RUIZ DE AZUA I, et al. Minireview: novel aspects of M3 muscarinic receptor signaling in pancreatic β-cells [J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(8): 1208-16.
- [5] CHATREE S, THONGMAEN N, TANTIVEJKUL K, et al. Role

- of inositols and inositol phosphates in energy metabolism [J]. *Molecules*, 2020, doi: 10.3390/molecules25215079.
- [6] CHAKRABORTY A. The inositol pyrophosphate pathway in health and diseases [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(2): 1203-27.
- [7] JADAV R S, CHANDURI M V L, SENGUPTA S, et al. Inositol pyrophosphate synthesis by inositol hexakisphosphate kinase 1 is required for homologous recombination repair [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 3312-21.
- [8] JADAV R S, KUMAR D, BUWA N, et al. Deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 (IP6K1) reduces cell migration and invasion, conferring protection from aerodigestive tract carcinoma in mice [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(8): 1124-36.
- [9] ZHU Q, GHOSH S, RODRIGUES A, et al. Adipocyte-specific deletion of Ip6k1 reduces diet-induced obesity by enhancing AMPK-mediated thermogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(11): 4273-88.
- [10] GHOSH S, TYAGI R, ZHU Q, et al. Inositol hexakisphosphate kinase-1 interacts with perilipin1 to modulate lipolysis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, doi: 10.1016/j.biocel.2016.06.018.
- [11] CHAKRABORTY A, KOLDOBSKIY M A, BELLO N T, et al. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain [J]. *Cell*, 2010, 143(6): 897-910.
- [12] ILLIES C, GROMADA J, FIUME R, et al. Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic beta cells [J]. *Science*, 2007, 318(5854): 1299-302.
- [13] BHANDARI R, JULURI K R, RESNICK A C, et al. Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7): 2349-53.
- [14] ZHANG X, LI N, ZHANG J, et al. 5-IP₇ is a GPCR messenger mediating neural control of synaptotagmin-dependent insulin exocytosis and glucose homeostasis [J]. *Nature Metabolism*, 2021, 3(10): 1400-14.
- [15] GUSTAVSSON N, LAO Y, MAXIMOV A, et al. Impaired insulin secretion and glucose intolerance in synaptotagmin-7 null mutant mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10): 3992-7.
- [16] DOLAI S, XIE L, ZHU D, et al. Synaptotagmin-7 functions to replenish insulin granules for exocytosis in human islet β -cells [J]. *Diabetes*, 2016, 65(7): 1962-76.