

磷脂酰肌醇转移蛋白

莫萍丽 严重玲* 李裕红 覃光球

(厦门大学生命科学学院, 厦门361005)

摘要 磷脂酰肌醇转移蛋白(phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer proteins, PITP)普遍存在于真核生物细胞中, PITP能够结合并交换一分子的磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)或磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC), 并促进这两类脂分子在细胞内膜组分间的转移。PITP对细胞内膜组分间脂类的运输和代谢、分泌囊泡的形成和运输、磷脂酶C(phospholipase, PLC)调节的信号传导以及神经退化等生理生化过程具有重要的影响。综述了近年来PITP的研究进展, 并对目前研究中存在的一些问题进行探讨。

关键词 磷脂酰肌醇; 磷脂酰胆碱; 转移蛋白

磷脂酰肌醇转移蛋白(phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer proteins, PITP)广泛分布于真核生物的各个组织中, 在真核生物细胞内具有很多重要且保守的功能^[1-3]。除了调节真核生物细胞内膜系统间磷脂的转运、调节磷脂信号传递外, PITP对哺乳动物的神经退化和肠吸收疾病有着重要影响; PITP对高等植物的逆境响应以及发育调节过程也起着重要作用。

根据氨基酸序列的保守性, PITP主要分成两类^[3]: 一类是哺乳动物、两栖动物和昆虫等多细胞动物的PITP, 这类PITP的分子量约35 kDa, 氨基酸序列具有较高的相似性; 另一类是真菌和植物中的PITP, 这一类PITP的分子量也在35 kDa左右, 其氨基酸序列相似性也非常高。两类PITP的氨基酸序列几乎无任何的相似性, 但是二者却具有相似的功能。我们分别对这两类PITP的研究进展进行综述, 并尝试通过结构比较与分析来解释和推测PITP的部分功能, 而且对目前PITP研究中存在的一些问题进行了探讨。

1 多细胞动物中的PITP

1.1 进化关系和分类

在哺乳动物中有3种可溶性的PITP^[4]: PITP α 、PITP β 以及RdgB。PITP α 和PITP β 之间存在着70%的相似性, RdgB与PITP α , PITP β 只有40%的相似性。从进化关系上来看, PITP α 与PITP β 在进化关系上比较近, 而且各自形成一个亚类; 而RdgB与PITP α , PITP β 间进化关系较远, 尤其是RdgB1和RdgB2, 似

乎更倾向于形成一个独立的亚类(图1)。功能研究也表明, 尽管RdgB成员间序列的相似性较高, 但功能上可能具有较大差异。

1.2 表达模式

尽管PITP普遍存在于真核细胞生物的各个组织中, 但是不同类型的表达模式在发育阶段、组织和亚细胞等不同的层次上都具有一定的差异(表1)。

就组织表达特异性而言, PITP在大脑中的含量最丰富, 其含量大约为5~10 $\mu\text{mol/L}$, 约占脑细胞质总蛋白的0.1%^[4]; PITP β 主要在灰质(gray matter)和嗜中性粒细胞(neutrophils)中表达, PITP β 在嗜中性粒细胞中的含量约为5~10 $\mu\text{mol/L}$; RdgB主要在视网膜、嗅球以及大脑中表达^[5]。

不同类型PITP的亚细胞定位也有一定的差异。PITP α 主要定位在细胞质和细胞核; PITP β 主要定位在高尔基体和细胞质; RdgB主要定位在高尔基体膜以及内质网, 还有一小部分定位在细胞质^[5]。

另外, PITP的表达水平在不同的发育时期也有一定差异^[4,5]。例如, 在小鼠胚胎和出生后前期, 中枢神经系统形成的过程中都能检测到PITP α 和PITP β 的表达, 但是成年鼠脑细胞的神经元中表达的主要是PITP α ; 在灰质发育的前期, 除了小脑皮层(cerebellar cortex)外, PITP β 的表达量要高于PITP α 。

收稿日期: 2006-06-01 接受日期: 2006-12-11

国家自然科学基金项目(No. 30530150, No. 30470301, No. 4067064)和福建省青年科技人才创新项目(No. 2004J053)资助

*通讯作者。Tel: 0592-2183805, E-mail: ycl@xmu.edu.cn

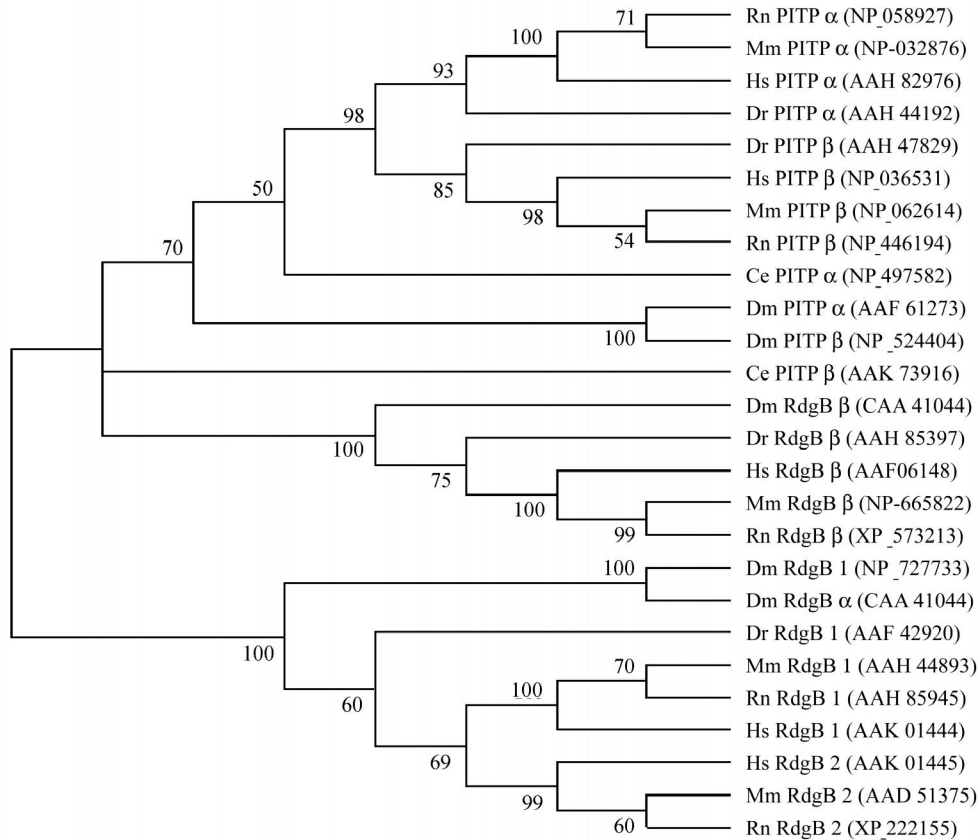


图1 多细胞动物PITP进化树

图中仅列出了一部分已知的多细胞动物PITP家族成员。物种名称缩写: Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dr, *Danio rerio*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Rn, *Rattus norvegicus*.

表1 多细胞动物PITP的表达模式

PITP	组织分布	亚细胞定位
PITP α	大脑、神经元	细胞质、细胞核
PITP β	灰质、嗜中性粒细胞	高尔基体、细胞质
RdgB	大脑、视网膜、嗅球	高尔基体膜、内质网、细胞质

1.3 功能

1.3.1 结构和生化功能 PITP的基本结构见图2, 其中PITP α 和PITP β 只含有磷脂转移功能域; 除RdgB β 外, RdgB家族成员还含有酸性区(acid region)、DDHD结构域(DDHD domain)、若干短的疏水区(hydrophobic region)以及羧基端保守区(C terminal); 有些文献还列出了一些氨基端不含磷脂转移功能域的RdgB类型^[5], 笔者认为这些RdgB实际上可能已不能再称为PITP, 故本文中未再列出。酸性区能和Ca²⁺结合, 据推测Ca²⁺和PITP的锚定有关; 酸性区还含有一个保守的EFFDaxE模体, 该模体被称为FFAT模体, FFAT被认为和磷脂的结合以及感知有关^[6]。DDHD结构域包含金属离子结合位点,

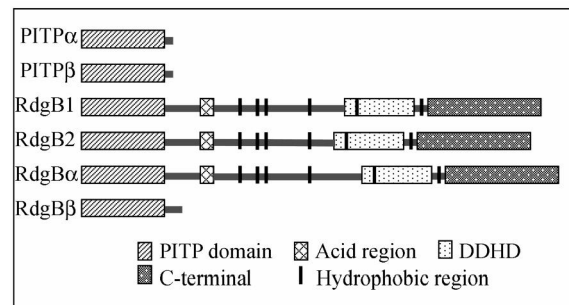


图2 多细胞动物PITP基本结构图

DDHD结构域可能和磷脂的转运、分泌以及代谢有关。羧基端保守区含有大约300个氨基酸残基, 由于这一区域能够和酪氨酸激酶PYK2以及一些和细胞骨架构成相关的蛋白质互作, 因此这一区域被认为和磷脂的代谢、磷脂的胞间运输以及细胞骨架的建成有关^[5-7]。

尽管PITP α 和PITP β 都只含有磷脂转移功能域, 并且它们的序列相似性高达70%以上, 但其生化功能还是具有一定的差异^[4]。PITP α 主要的功能是参与

了为磷脂酶C(PLC)调节的 PIP_2 的水解提供底物及维持 PIP_2 的水平; P1TP β 主要与囊泡的出芽有关并维持磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)与磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)的相对水平。另外, 在同等水平PI与PC存在的情况下, P1TP α 对PI的转运活性是对PC转运活性的16倍; 而P1TP β 对PI的转运活性只是对PC转运活性的3倍^[6]; 当分泌囊泡的磷脂主要为PC时, P1TP β 对PI和PC的转运效率是一致的^[8], 据此可推测, P1TP β 可能对PC的转运与调节影响更大一些; 此外, P1TP β 与P1TP α 不同之处还在于, 它除了能够转移PI和PC外还能够结合SM(鞘磷脂)^[9]。造成这些细微差异的可能原因有二: 一是亚细胞定位的不同造成了P1TP α 和P1TP β 功能上的分化; 二是晶体结构上的细微差异影响了P1TP α 和P1TP β 对PI及PC的选择、结合以及转运活性。

1.3.2 生理功能 利用模式动物、突变体等材料, 通过基因剔除、功能互补以及蛋白互作等手段对P1TP生理功能的研究发现, P1TP不但和内膜系统间的磷脂转运和交换有关, 还参与磷脂信号的调节、影响胞外分泌过程、参与细胞周期的调节以及胞浆运动等生理过程。

对P1TP α 功能的阐述最早来自于小鼠Vibrator(VB)突变体的研究。在vibrator mouse中, vibrator(vb)等位基因是一个隐性突变, 对小鼠vibrator突变体的脑细胞及脊髓研究发现, P1TP α 表达相对于P1TP β 降低了许多^[10, 11], 其中P1TP α 的水平下降了80%, 而P1TP β 则保持在正常水平^[12]; 进一步的研究表明, P1TP α 的减少是由于编码P1TP α 的基因内含子4中插入了一个反转录转座子造成的。在vibrator mouse中, P1TP α 表达水平的降低加深了老鼠的战栗(tremor)、大脑干细胞和脊髓的退化以及早亡。这表明P1TP α 和P1TP β 在细胞水平上行使不同的功能, P1TP α 对于生命的维系是必需的; P1TP α 的缺失除了能造成神经退化外, 还能引起肝、肠的脂肪变性以及低血糖症等疾病。P1TP主要通过影响内膜系统间磷脂的交换与转运以及影响磷脂信号的转导等造成了上述危害。

P1TP还可能参与了细胞周期的调节过程。在NIH3T3细胞中过量表达P1TP α (而非P1TP β)能够激活磷脂酶 A_2 , 并能缩短细胞周期中的 G_1 期^[13], 考虑到P1TP α 主要定位在细胞核, 因此可推测P1TP α 可能会对细胞周期的调控具有一定的影响。

相比较于P1TP α 和P1TP β , 除了具有磷脂酰肌醇

和磷脂酰胆碱的转移功能外, RdgB还表现出了更多的独特功能^[6, 14]。首先, RdgB调节着果蝇以磷脂酰肌醇为介质的视觉系统的信号转导过程。RdgBp作用于光转导的终点, 能除掉光的刺激作用并能维持视紫质的水平, RdgBp的缺失导致光加速视网膜的退化。尽管P1TP α 的N端与RdgBp的同源性很高, 但是P1TP α 并不能互补RdgBp的功能。其次, RdgB还参与了胞浆运动^[15, 16]。RdgB正常情况下定位在高尔基体, 但在细胞分裂的后期, RdgB和RhoA互作, 出现在卵裂沟(cleavage furrow), 而RhoA是胞浆运动的重要调节因子。据此可推测, RdgB在胞浆运动中还可能起着重要作用。

2 真菌和高等植物P1TP

我们将动物、真菌和植物的P1TP做一个简单的聚类分析就会发现, 动物的P1TP会单独聚成一类, 而真菌和植物的P1TP可聚成一类。在植物和真菌的这个亚类中, 真菌和植物又会单独聚成更小的亚类; 并且在植物亚类中, 单子叶植物和双子叶植物会各自聚成一类(图3)。由此可看出, 尽管现行的分类系统将真菌和植物的P1TP归为一类, 但这只是相对的, 二者之间还是有较大差别的。

2.1 真菌P1TP

Sec14p是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中主要的P1TP, Sec14p是由12个 α 螺旋, 6个 β 折叠片及8个 3_{10} 螺旋(tightly wound 3_{10} -helices, 标记为T)构成一个紧密的折叠形式^[17]。Sec14p包含一个足以能够容下一个磷脂分子的巨大疏水结构域, 这个结构域由6个 β 折叠片、两个 α 螺旋以及 $\alpha 10/T4$ 构成。在这个结构域的背后有一个主要由 3_{10} 螺旋构成的“套索”状结构(string-like motif), 这一结构可维持磷脂结合腔的稳定^[18, 19], 主要由 $\alpha 10/T4$ 构成。

来自体内的实验证据表明, Sec14p对反式高尔基体蛋白质的运输和细胞的存活发挥着重要的作用^[3]。形态学上的数据表明从高尔基体表面分泌囊泡的形成需要Sec14p的参与^[16]。形态学分析发现在SEC14突变体的细胞质中聚集了大量的分泌囊泡, 进而导致高尔基体膨胀, 转化酶的分泌停止, 最终使酵母的生存能力受到伤害。但是至少7个基因^[20], 包括CDP-胆碱生物合成途径上的基因发生突变, Sec14p的功能就会被忽略, 这就是Sec14 bypass途径(Bypass Sec14p)。在温度敏感型Sec14突变体中, 加入外源短链DAG部分地减轻囊泡分泌的阻塞。

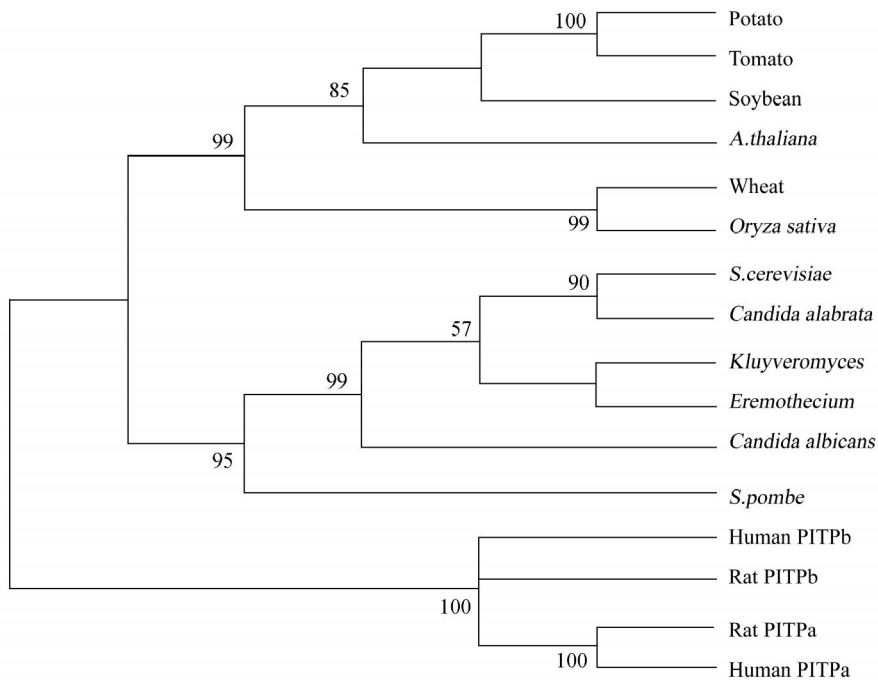
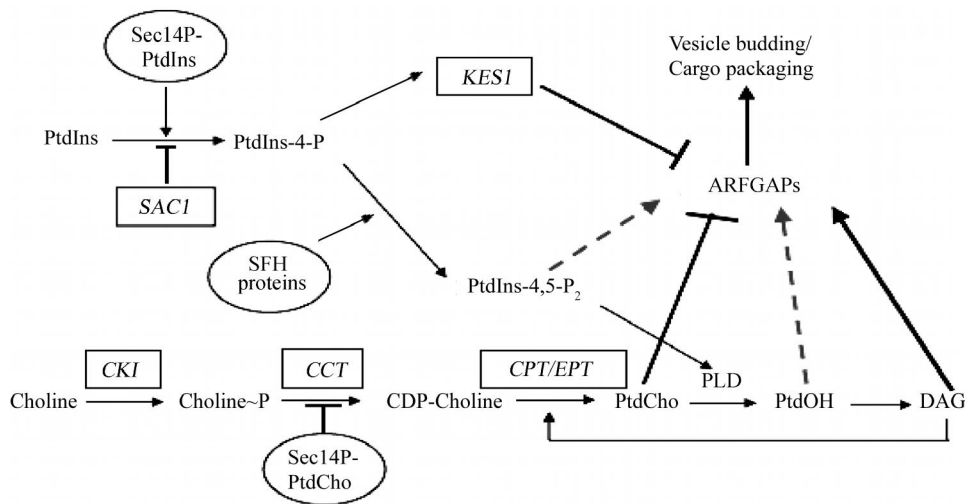


图3 部分PITP的聚类分析图

图4 Sec14p途径^[20]

Bypass Sec14p 基因用框表示, 重要的调节脂用粗线表示。其中胆碱激酶(CKI1), 胆碱磷酸化胞嘧啶转移酶(CCT1), 胆碱磷酸转移酶(CPT1)代表的是磷脂酰胆碱(PtdCho)的生物合成途径即CDP-胆碱途径上的基因。CDP-胆碱途径会消耗DAG。结合着PtdCho的Sec14p抑制这些基因的表达。SAC1基因编码的是一个多磷酸肌醇磷酸化酶(polyphosphoinositide phosphatase), 该基因的突变引起内质网上累积大量的PtdIns-4-P, 最终导致Kes1p从高尔基体错误地定位到内质网上。Kes1p的分子功能未知, 但其是一个结合PIP的蛋白质并定位于高尔基体膜上, 是高尔基体分泌的负调节因子。SFH蛋白能刺激PLD的活性, 推测其可能是促进了Ptd-4,5-P₂的合成。ARFGAPs(ARFGTPase activating proteins)是Sec14p下游因子, 能够刺激分泌囊泡的形成。

DAG调节着Sec14p下游组分的活性, 因此其作为一个信号脂促进囊泡的分泌^[20]。ARFGAP是Sec14p途径的下游调节因子, 刺激高尔基体囊泡的分泌(图4)。

Sec14p既能转移磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱, 因此它可被认为是酵母中典型的PITP。除Sec14p外,

在酿酒酵母(*S.cerevisiae*)还存在着一类PITP, 称为SFH(Sec14 homologue, Sec14同源基因)^[21,22]。这类蛋白质有5个成员: sfh1p, sfh2p, sfh3p, sfh4p, sfh5p。其中sfh1p与Sec14p最为相似(氨基酸序列一致性达64%), 但在生化功能上没有一致的地方。剩下的4种蛋白质与Sec14p在一级结构上大约具有25%的一

致性和 45% 的相似性。通过体外脂转移分析试验发现这 4 种蛋白质只能转移 PI 不能转移 PC, 从磷脂转运活性的角度讲, 这类蛋白质是一类非典型的 PITP。

2.2 高等植物中的 PITP

最近, 从高等植物中发现了多种与 Sec14p 在结构和功能上较为相似的 PITP^[2, 23-29], 包括大豆 Ssh1p 和 Ssh2p、日本百脉根 LjPLPs (Lotus japonicus PITP-like proteins) 以及拟南芥中的 AtSFH (Arabidopsis thaliana Sec14 homologs)。大豆 Ssh1p 和 Ssh2p (Sec14-like soybean protein) 蛋白都是高亲和力的磷酸肌醇结合蛋白, 并对底物都有特异性^[24]。在高渗透压胁迫下, 酵母和植物中的 Ssh1p 在胁迫作用部位快速的磷酸化, 并作为胁迫反应途径中的组成成分保护生物免受渗透压的伤害, 这是因为 Ssh1p 对高渗透压胁迫下产生的信号分子 PtdIns-3,5-P₂ 具有很高的亲和力^[25]。在一级结构上, LjPLP 在 N 端具有一个 Sec14p 相关的脂结合结构域, C 端是一个类似于 Nij16 的根结结构域在转录水平上受到调控^[26]。LjPLP 可能在根结的发育过程中参与了根结细胞膜的生物合成。

根据拟南芥基因组测序结果以及与酿酒酵母的 Sec14p 序列比对分析, 拟南芥基因组中存在 30 个可能的 Sec14-like PITP 蛋白^[27], 其中有 6 个成员命名为 PATL^[28], 14 个成员命名为 AtSFH。

AtSec14 是植物中最早报道具有 PI/PC 转移活性^[23]。Peterman 等^[28]的研究表明, PATL1 (Pat1lin1) 在细胞板的发生、延伸和成熟中具有重要的作用。AtSFH 在一级结构上与 LjPLP 相似性极高, 也同时具有一个 Sec14p 结构域和 nodulin 结构域。COW1/AtSfh1p 和根毛的形成有关。我们的研究还发现^[29]: AtSFH 还可能和受精过程的调节有关。通过同源克隆, 我们得到了两个 SEC14-like 基因, 分别命名为 AtSFH3 和 AtSFH12。AtSFH3 和 AtSFH12 都可互补 SEC14 突变体, 但是 AtSFH3 主要在柱头和成熟的花粉粒中表达, 而 AtSFH12 主要在花粉粒中表达, 这种表达的差异也暗示了 AtSFH3 和 AtSFH12 可能和 COW1/AtSfh1p 类似, 通过影响蛋白质的分泌和极性运输来影响花粉管的伸长等受精过程。

从上面的描述可以看出, 高等植物中的 SEC14-like 基因是一个庞大的基因家族, 这说明这类基因在高等植物中具有重要的功能; 另一方面, 众多基因成员之间功能的分化、重叠和互补也对这类基因的功能研究造成的很大的困难。

3 小结

大量的研究表明, PITP 在质膜的运输和信号转导途径中具有重要的作用, 但其功能的分子机制仍不是很明晰, 主要原因有两个: 一是磷脂代谢的复杂性和易变性, 很多体外的研究证据并不能完全适用于体内磷脂的代谢环境; 二指突变体 (尤其是多突变) 的缺乏。

目前的研究中还存在着以下几个问题: 一是 PITP 的进化起源关系尚不明晰; 二是对于 PITP 功能的研究还侧重于体外生化功能的研究, 但对磷脂代谢而言, 体外的实验证据很可能不太适合体内的真实代谢环境; 三是定点突变的研究还主要是集中于单突变, 而且突变的的目的性还不是很强; 四是蛋白质互作研究很少, 由于 PITP 的作用过程涉及到 PITP 与膜的结合、对磷脂的选择、转运等复杂过程, 其中必然涉及大量的蛋白质互作问题, 这也使得人们很难根据当前的研究对 PITP 的作用机制得出一个系统的结论; 五是 PITP 与膜的结合及分离、PITP 对磷脂的选择以及 PITP 如何转运磷脂等基本问题仍未搞清。

针对以上问题, 可以采取的策略有以下几点: 首先, 需要深入地了解磷脂分子的物理特性及其与细胞膜的相互作用, 以帮助人们理解 PITP 如何从脂双分子层获取磷脂; 其次, 针对不同的翻译后修饰位点做更多的突变体研究, 最好能作体内研究 (尤其是对酵母和植物 PITP 的研究而言), 以求揭示其作用的分子机制; 最后, 根据其参与的生理过程, 加强蛋白质互作研究, 使整个研究能够系统化。

参考文献 (References)

- [1] Cockcroft S. Chem Phys Lipids, 1999, 98: 23
- [2] Bohme K et al. Plant J, 2004, 40: 686
- [3] Thomas GM et al. Mol Cell Biol Res Commun, 2000, 4: 1
- [4] Hsuan J et al. Genome Biol, 2001, 2: REVIEWS3011
- [5] Lev S. Exp Cell Res, 2004, 297: 1
- [6] Vihtelic TS et al. J Cell Biol, 1993, 122: 1013
- [7] Lev S et al. Mol Cell Biol, 1999, 19: 2278
- [8] Vordtriede PB et al. Biochemistry, 2005, 44: 14760
- [9] Loewen CJ et al. EMBO J, 2003, 22: 2025
- [10] Utsunomiya A et al. Mol Brain Res, 1997, 45: 349
- [11] Imai H et al. Mol Brain Res, 1997, 46: 256
- [12] Hamilton BA et al. Neuron, 1997, 18, 711
- [13] Snoek GT et al. J Biol Chem, 1999, 274: 35393
- [14] Milligan SC et al. J Cell Biol, 1997, 139: 351
- [15] Sciammas R et al. J Immunol, 1994, 152: 5392
- [16] Giansanti MG et al. Curr Biol, 2006, 16: 195
- [17] Sha B et al. Nature, 1998, 391: 506

- [18] Phillips SE et al. Mol Cell, 1999, 4: 187
[19] Phillips SE et al. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2006, 41: 21
[20] Routt SM et al. Biochem Cell Biol, 2004, 82: 254
[21] Martina S et al. Eur J Biochem, 2003, 270: 3133
[22] Li X et al. Mol Biol Cell, 2000, 11: 1989
[23] Jouannic NJ et al. Eur J Biochem, 1998, 258: 402
[24] Kearns BG et al. EMBO J, 1997, 17: 101
[25] Monks DE et al. Plant Cell 2001, 5: 1205
[26] Kapranov P et al. Plant Cell, 2001, 13: 1369
[27] Vincent P et al. J Cell Biol, 2005, 168: 801
[28] Peterman TK et al. Plant Physiol, 2004, 136: 3080
[29] Mo P et al. J Plant Physiol, 2006 online

Phosphatidylinositol/Phosphatidylcholine Transfer Proteins

Ping-Li Mo, Chong-Ling Yan*, Yu-Hong Li, Guang-Qiu Qin
(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Phosphatidylinositide/phosphatidylcholine transfer proteins (PITP) are ubiquitous proteins in all eukaryotic cells, such as metazoans, fungi and higher plants. PITP binds and exchanges one molecule of either phosphatidylinositide or phosphatidylcholine and facilitates the transfer of these lipids between different membrane compartments *in vitro*. PITP regulate secretory vesicles formation, trafficking, cell budding and PLC-mediated signaling and neurological degradation in metazoans; lipid metabolism and membrane trafficking in yeast; signaling in plant development. Herein, we review recent advances in PITP in biological and cellular levels and the intriguing mechanisms by which PITP execute their functions are still unknown.

Key words phosphatidylinositide; phosphatidylcholine; transfer protein

Received: June 1, 2006 Accepted: December 11, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30530150, No.30470301, No.4067064) and the Youth Science and Technology Innovation Project of Fujian Province (No.2004J053)

*Corresponding author Tel: 86-592-2183805, E-mail: ycl@xmu.edu.cn