

• 综述 •

神经酰胺转运蛋白在非囊泡转运中的作用机制

许佳丽, 郭 军*

(南京医科大学基础医学实验教学中心, 南京 210029)

摘要 神经酰胺转运蛋白 (ceramide transfer protein, CERT) 是介导神经酰胺 (ceramide) 非囊泡转运的载体. 它包括 3 个功能区域: PH、FFAT 和 START. PH 和 FFAT 分别发挥高尔基体和内质网的靶向作用, 羧基端的 START 主要用于与神经酰胺结合. CERT 的转运受多种因素的调节, 依赖于 PKD 和 PP2C ϵ 诱导的丝氨酸重复区域 (SR) 的磷酸化和去磷酸化, 氧化应激刺激的 CERT 三聚体形成, 以及 PI4K III β 催化的高尔基体接头 PI4P 的生成等. CERT 功能障碍会导致细胞易受氧化应激的损害. 本文拟从 CERT 的结构、作用及其调节机制 3 方面进行综述, 揭示 CERT 的研究进展.

关键词 神经酰胺; 神经酰胺转运蛋白; 非囊泡运输; 调节机制

中图分类号 Q71

Molecular Mechanism of CERT in Non-vesicular Transfer

XU Jia-Li, GUO Jun*

(Laboratory Center for Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract Ceramide transfer protein (CERT) has been identified as a key factor in non-vesicular transfer of ceramide from ER to Golgi apparatus. CERT contains several functional domains including a PH (pleckstrin homology) domain, a FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) motif and a START domain. Among these regions, the PH and FFAT are responsible for the targeting the Golgi apparatus and ER, respectively. The C-terminal START domain is capable to bind ceramide. The transportation of ceramide is regulated *via* several mechanisms, such as the phosphorylation and dephosphorylation of serine repeat domain, in which protein kinase D and PP2C ϵ are involved. Oxidative stress is known to induce the rapid formation of a stable CERT homotrimer complex. PI4P, which is the production of phosphorylated PI by PI4K III β , also plays a role in the regulation of CERT. Loss of functional CERT can cause the plasma membrane susceptibility to reactive oxygen species and results in enhanced oxidative damage to cellular proteins. In this review, recent progresses of the study in CERT structure, function and regulation will be summarized.

Key words ceramide; ceramide transfer protein; non-vesicular transfer; molecular mechanism

神经酰胺转运蛋白 (ceramide transfer protein, CERT) 又称 GPBP Δ 26, 是 Goodpasture 抗原结合蛋白 (Goodpasture antigen-binding protein, GPBP) 的一种裂剪变体. GPBP 能与 Goodpasture 自身抗原即胶原 IV α 3 的非胶原性羧基端 NC1 结合并将其磷酸化. CERT 和 GPBP (又称 CERTL) 都是细胞内亲水蛋白质, 它们分别由 598 个氨基酸残基和 624 个氨基酸残基组成, 都含有 PH、FFAT 和 START 结构域, 和 1 个丝氨酸重复区域 (serine repeat, SR). 另外, CERT 还比 GPBP 少 1 个富含丝氨酸的区域, 称为 SR2, 它包含 26 个氨基酸残基^[1]. 目前, 对于 SR2 的功能尚不明了. COL4A3BP 是正式命名的编码 GPBP/s CERTs 的基因. 人类 COL4A3BP 基因在染色体

5q13.3 区域, 涵盖 17 个外显子, 大小约 130 kb. 转录 CERT/GPBP Δ 26 的 COL4A3BP 基因不含第 11 个外显子 (编码 SR2 的区域). 体内和体外实验证实, GPBP 和 CERT 能够催化神经酰胺在质膜系统间的定向转运.

收稿日期: 2008-10-19; 接受日期: 2009-01-14

国家自然科学基金资助 (No. 30871200)

* 联系人 Tel: 025-86862729; E-mail: Guoj69@yahoo.com.cn

Received: October 19, 2008; Accepted: January 14, 2009

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30871200)

* Corresponding author Tel: 025-86862729;

E-mail: Guoj69@yahoo.com.cn

GPBP 和 CERT 在横纹肌和脑组织中高表达,在胎盘、肺、肝脏中低表达。有研究发现,GPBP(而非 CERT),在早期的胚胎发育中有抗凋亡作用,且对大脑、骨骼肌的正常发育有重要作用^[2]。和 GPBP 相比, CERT 在肾脏、胰腺和癌细胞中高表达。

1 CERT 的结构

CERT 是一种 68 kD 的亲水蛋白质。氨基酸序列分析显示, CERT 含有 PH (pleckstrin homology) 和 FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) 结构域,分别发挥高尔基体和内质网的靶向作用。同时,其羧基端有 1 个 START (StAR-related lipid transfer) 结构域,主要用于与神经酰胺结合^[3](Fig. 1)。以下详细介绍

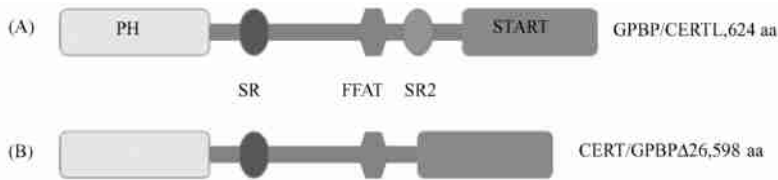


Fig. 1 Domain structure of GPBP and CERT GPBP and CERT both contain several functional domains including PH domain, FFAT motif, START domain and SR motif, but GPBP (A) has 26 more amino acid residues (SR2) than CERT (B)

1.2 START 结构域

START 是一个由约 210 个氨基酸残基组成的蛋白质模块。人类基因组有 15 个 START 结构域,无脊椎动物和植物也有,而单细胞真核生物和原生生物几乎没有这一结构域。细胞中的长链神经酰胺由于其高度疏水性而牢固地嵌在膜上。START 能够有效地将神经酰胺从膜上提取出来,使它在内质网和高尔基体间的转运变得十分容易和迅速。START 与神经酰胺的结合率是 1:1,它能转运 C14、C16、C18、C20 神经酰胺,但不能结合有更长酰基链的神经酰胺。CERT 对二酰基甘油 (diacylglycerol, DG) 的转运活性是神经酰胺的 5%~10%,虽然两者结构相似。CERT 不能转运神经鞘氨醇或胆固醇。Kudo 等^[4]研究了 CERT 的 START 结构域的脱辅基形式和不同酰基链长的神经酰胺形成复合物的晶体结构。在这些结构中,START 形成 1 个长两性分子腔,将 1 分子神经酰胺包埋。在长腔的末端,神经酰胺的酰胺和羟基形成 1 个有特殊氨基酸残基的氢键网络,它在神经酰胺立体结构特异识别中起关键作用。神经酰胺的 2 条脂肪链(1 条是神经鞘氨醇的主链,另 1 条是酰胺-酰基链)被这个腔的疏水壁包围,腔的大小和形状限制了能够被转运的神经酰胺的长度。这些结构特征是 CERT 识别神经酰胺,并且区分不同型别的

这 3 部分的结构与功能:

1.1 PH 结构域

PH 是 1 个含有约 120 个氨基酸残基的蛋白质模块,由 7 个反向平行 β -折叠夹层和 1 个位于 C 端的 α 螺旋构成。PH 与位于高尔基体上的磷脂酰肌醇-4 磷酸 (phosphatidylinositol-4-monophosphate, PI4P) 识别结合,使 CERT 靶向运输至高尔基体。磷脂酰肌醇磷酸 (PIPs) 亚型在各细胞器的分布不同。缺陷 LY-A 细胞内 CERT 的 cDNA 有突变,使其第 67 个氨基酸残基由甘氨酸突变成谷氨酸 (G67E)。这一突变破坏了 PH 与 PI4P 结合的能力。需要强调的是,PIPs 细胞内的分布还不足以完全解释 CERT 对细胞器定位的特异性。

神经酰胺的基础。

1.3 FFAT 结构域

FFAT 是一个短肽基序,它的功能是与内质网的 II 型膜蛋白 (vesicle-associated membrane protein-associated protein, VAP) 相互作用。哺乳动物有 2 个 VAP,即 VAP-A 和 VAP-B。两者有约 60% 的氨基酸是相同的,能形成同源二聚体和异源二聚体,在许多组织中广泛的表达。VAP-A 和 VAP-B 的亲水区域定位在内质网的胞质面。在 VAP 和 FFAT 形成的晶体中,2 个 VAP 和 2 条 FFAT 肽链在 VAP 的接口处相连,FFAT 的苯丙氨酸残基在 VAP 的疏水口袋与之结合,FFAT 的天冬氨酸残基在 2 条 FFAT 肽链之间形成对称的氢键。FFAT 的突变破坏了它与 VAP 的相互作用,影响神经酰胺的转运。

2 CERT 介导的神经酰胺非囊泡运输的分子提取和转运模型

神经鞘磷脂类 (sphingomyelin, SM) 是真核细胞的主要成分,它们可以发挥信号分子、物质分子、膜受体调节分子的作用,对维持细胞脂质稳态和生物膜的稳定性有重要作用。神经酰胺对细胞也有重要作用,它能调节细胞生长变异,诱导细胞凋亡等。CERT 转运神经酰胺是神经鞘磷脂合成的关键步骤。

神经酰胺从内质网到高尔基体的转运至少有两条途径: 主要是 ATP 依赖的非囊泡转运, 辅以不依赖 ATP 的囊泡运输^[5].

神经酰胺从内质网到高尔基体的依赖 CERT 的非囊泡运输又有两种机制^[6]. 一种是 CERT 通过内质网和高尔基体的膜接触点(membrane contact sites, MCS), 分别由 FFAT、PH 与 VAP、PI4P 结合, 将内质网和高尔基体联接起来. 然后由 START 提取并转运 1 分子神经酰胺. 通过对内质网的分析发现, 它还可以与细胞膜、线粒体膜、内含体膜等连接, 表明 MCS 可能是内质网特殊的结构, 涉及与其它细胞器的联系和物质转运; 另一种机制是, CERT 能够快速的在内质网和高尔基体中穿梭, 先结合后释放神经酰胺, 以达到转运的目的. 当未结合神经酰胺时, START 能将 PH 隐藏起来, 并且暴露 FFAT 与内质网上 VAP 结合. 1 分子神经酰胺即被 START 提取出来. 然后 CERT 发生构象变化, 打断了 FFAT 与 VAP 的相互作用, 使 CERT/神经酰胺复合物得以从内质网释放, 暴露 PH 结构域. 紧接着, PH 与 PI4P(可能还有 Arf1) 识别发挥高尔基体的靶向作用, 神经酰胺被转运至高尔基体. PI4P 也能识别氧类固醇结合蛋白(oysterol-binding protein, OSBP)、PI4P 接头蛋白(phosphatidylinositol 4-phosphate adapter protein, FAPP) 的 PH 结构域, 还需要 G 蛋白作为额外的决定因子, 但目前尚不清楚 CERT 的 PH 对高尔基体的定位是否需要这样 1 个额外的决定因子. 到达高尔基体后, 神经酰胺从 START 结构域释放到高尔基体, 引发 CERT 再次发生构象变化, 隐藏它的 PH, 并暴露 FFAT, 使 CERT 能够定向返回内质网膜. 返回途中, CERT 还能少量地与 SM 合成过程中产生的二酰基甘油结合并转运它.

细胞若缺失 CERT 将导致严重后果. 采用化学突变法得到缺失功能性 CERT 的突变黑腹果蝇, 它们体内磷酸乙醇胺神经酰胺和神经酰胺比正常果蝇减少超过 70%. 这些果蝇在 10 d 至 30 d 内死亡, 而对照组平均寿命是 75 d 到 90 d, 说明 CERT 功能的缺失, 使胞内神经酰胺水平下降, 导致 SM 的合成障碍, 从而影响了生物膜的流动性, 加重了氧化应激对细胞蛋白的损害, 果蝇表现出过早衰老. 因此, 活体内 CERT 对防止氧化应激的损害、维持动物正常寿命具有重要作用^[7,8].

3 CERT 转运神经酰胺的调节机制

CERT 在 SR 结构域的磷酸化、去磷酸化, 能调

节神经酰胺从内质网到高尔基体的转运. SR 的磷酸化同时抑制了 PH 与 PI4P 结合以及 START 对神经酰胺的转运活性, 可以认为是 CERT 从激活状态到静止状态构象改变的开关^[9].

最近, 丝/苏氨酸特异的蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD) 家族被发现能将 CERT 的 Ser132 磷酸化, 敲除 PKD1 和 PKD2 会减少 CERT 的磷酸化. CERT 磷酸化后, PH 与 PI4P 的亲和力下降. 有趣的是, CERT 的过表达能反向调节 PKD 的活性, 促进 PKD 对其的磷酸化. 这种调节可能是通过 SM 合成过程中产生的二酰基甘油的作用, 它是 PKD 的一个刺激因子. 这些证明了 PKD 对 CERT 有负性调节作用, 而 CERT 也能调节 PKD 的活性^[10]. CERT 还能被酪蛋白激酶 I (casein kinase I, CK I) 磷酸化. 鉴定这一关键酶的作用并阐明其激活机制有助于明确 CERT 的调节机制^[11].

磷脂酰肌醇 4-激酶 β (PI4K IIB) 是 PKD 作用的另一底物. 它是位于高尔基体的外膜蛋白. PKD 将 PI4K IIB 磷酸化激活, 活化的 PI4K IIB 催化磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI) 磷酸化, 生成 PI4P. 由于 CERT 与高尔基体的相互作用依靠其 PH 结构域与高尔基体上 PI4P 的识别结合, 故 PKD 通过这一途径也能调节 CERT 对神经酰胺的转运^[12].

最近, 蛋白质磷酸酶 2C ϵ (protein phosphatase 2C ϵ , PP2C ϵ) 被证实能够使 CERT 去磷酸化^[13]. PP2C ϵ 是哺乳动物 PP2C 家族成员. 它是位于内质网的 I 型跨膜蛋白, 氨基端的疏水跨膜区域嵌在内质网膜内, 羧基端的催化区域面向胞质溶胶. CERT 是 PP2C ϵ 的作用底物. VAP-A 是与 PP2C ϵ 结合的配偶体, 在 CERT 去磷酸化过程中起支架作用, 它同时与 PP2C ϵ . CERT 作用并刺激 CERT 被 PP2C ϵ 去磷酸化. 去磷酸化后 CERT 被激活, 从胞质溶胶靶向运动到高尔基体, 表明 PP2C ϵ 是神经酰胺转运的激活物. 这一结论通过敲除 PP2C ϵ 基因的表达使 SM 合成下降而被证实. 因此 PP2C ϵ 在调节神经酰胺的转运过程中起重要作用.

脂筏是膜脂双层内含有特殊脂质和蛋白质的微区. 主要由鞘脂、胆固醇及蛋白质组成. 脂筏的组分和结构特点有利于蛋白质之间相互作用和构象转化, 脂筏区主要参与信号转导和细胞蛋白转运^[14]. CERT 的磷酸化还因 SM/胆固醇筏的干扰而抑制. 研究发现, 质膜丢失 SM/胆固醇会使 SR 去磷酸化而激活 CERT. SM 的水平或 SM/胆固醇之间的平衡与 CERT 的活性有关^[15]. 但在 PKD、PP2C ϵ 调节通路中

这种脂筏对磷酸化影响机制尚不清楚。

中波紫外线(ultraviolet light, UVB)对人体具有红斑作用,能促进体内矿物质代谢和维生素D的形成。但它也是一种氧化应激原。UVB照射或氧化应激产生的活性氧族能促进CERT之间成键,导致CERT形成稳定的三聚体。CERT三聚体的形成与位于两端的PH和START结构域无关,而涉及其中间区域。因此这并不影响CERT在细胞内的运动,而是抑制了神经酰胺与CERT的结合。SM的合成由于缺乏底物神经酰胺而发生障碍,这改变了细胞膜的流动性,使细胞更易受氧化应激的损伤。如此形成恶性循环^[5]。氧化应激所致的这种CERT构象改变代表一种新的下调神经酰胺转运和SM合成的机制,后果严重。

另外,用RNA干扰技术证明了OSBP能刺激CERT对神经酰胺转运、SM的合成^[19]。由于OSBP也有FFAT、PH,它能通过与VAP、PI4P相互作用直接或间接地调节CERT的活性:以一种短暂的或催化的方式促进VAP多聚化来增进CERT与VAP的识别结合;PH与Arf的相互作用刺激PI4KIII β ,使PI4P生成增多,促进CERT向高尔基体的转运。但是,另有研究表明当OSBP和FAPP1过表达时则抑制神经酰胺的转运,它们的PH与Arf1的相互作用干扰了CERT的PH与PI4P的结合^[12]。

由于CERT介导的神经酰胺从内质网到高尔基体的转运需要消耗能量,故能量抑制剂也能影响这一过程^[3]。CERT对高尔基体定向转移的过程可能消耗ATP,包括PI4P的生成。因为在透化处理的COS7细胞中,FAPP的PH结构域对高尔基体靶向作用需ATP。ATP还可能在减弱CERT与PI4P或VAP之间相互作用时被消耗。神经酰胺从高尔基体的胞质面转移到腔面过程也需要ATP。

总之,CERT各功能部分之间协调作用,在胞质溶胶内以非囊泡形式,将神经酰胺从内质网转运至高尔基体,同时依赖多种机制的调节。但尚存在许多问题: CERT与神经酰胺的识别除了基于START的结构,是否还存在其它机制;当神经酰胺到达高尔基体的胞质面后,它是如何纳入高尔基体腔面的;SM/胆固醇筏是如何影响CERT磷酸化的。我们相信,随着从多方面对CERT及相关物质的研究深入,这些问题终将解决,为防治紫外线、氧化应激对机体的损害等提供新的线索。

参考文献(References)

[1] Rava A, Revet-Ros F, Martinez-Martinez P, et al. Goodpasture

antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis [J]. J Biol Chem, 2000, **275** (51): 40392-40399

- [2] Granero-Molt F, Samah S, Ó Ríear L, et al. Goodpasture antigen-binding protein and its spliced variant, ceramide transfer protein, have different functions in the modulation of apoptosis during zebrafish development [J]. J Biol Chem, 2008, **283** (29): 20495-20504
- [3] Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, et al. CERT and intracellular trafficking of ceramide [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, **1771** (6): 644-653
- [4] Kudo N, Kumagai K, Tomishige N, et al. Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105** (2): 488-493
- [5] Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide [J]. Nature, 2003, **426** (6968): 803-809
- [6] Pery R J, Ridgway N D. Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, **1734** (3): 220-234
- [7] Rao R P, Yuan C, Allegood J C, et al. Ceramide transfer protein function is essential for normal oxidative stress response and lifespan [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, **104** (27): 11364-11369
- [8] 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 内质网应激反应分子机理研究进展 [J]. 中国生物化学与分子生物学报(Li Zai-Quan, Zhou Ai-Ru, Tang Chao-Shu. Molecular mechanism on endoplasmic reticulum stress responses [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2004, **20** (3): 283-288
- [9] Kumagai K, Kawano M, Shinkai-Ouchi F, et al. Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT [J]. J Biol Chem, 2007, **282** (24): 17758-17766
- [10] Fugmann T, Hausser A, Seifrieder P, et al. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein [J]. J Cell Biol, 2007, **178** (1): 15-22
- [11] Yamaji T, Kumagai K, Tomishige N, et al. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism [J]. IUBMB Life, 2008, **60** (8): 511-518
- [12] Tith B, Balla A, Ma H, et al. Phosphatidylinositol 4-kinase III β regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi [J]. J Biol Chem, 2006, **281** (47): 36369-36377
- [13] Saito S, Matsui H, Kawano M, et al. Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes [J]. J Biol Chem, 2008, **283** (10): 6584-6593
- [14] 刘坤, 姜颖, 贺福初. 脂筏在病毒感染中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报(Liu Kun, Jiang Ying, He Fu-Chu. Role of lipid rafts in viruses entry and assembly [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2006, **22** (10): 767-771
- [15] Charney A, Bell S M, Kawano M, et al. Decreased ceramide transport protein, CERT, function alters sphingomyelin production

following UVB irradiation [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283**(24): 16682-16692

associated membrane protein-associated protein are required for steroid-dependent activation of the ceramide transport protein [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, **17**(6): 2604-2616

[16] Peny R J, Ridgway N D. Oxysterol-binding protein and vesicle-

[continued from *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, **25**(3): 296]

21st IUBMB and 12th FAOBMB

International Congress of Biochemistry and Molecular Biology

Theme 4: Molecular Basis of Diseases

1. Protein misfolding and neurodegeneration

Xiao-Jiang Li Distinguished Professor of Human Genetics, Emory University School of Medicine, USA

Marie F. Chesselet Charles H. Markham Professor of Neurology, Chair of Department of Neurobiology, University of California, Los Angeles, USA

Susan Ackerman Howard Hughes Medical Institute; Professor, The Jackson Laboratory, USA

David Rubinsztein Professor of Molecular Neurogenetics, Wellcome Trust Senior Fellow in Clinical Science/Honorary Consultant, Department of Medical Genetics, University of Cambridge; UK

2. Molecular mechanism of cancer

Yosef Yarden Professor, Department of Biological Regulation, The Weizmann Institute of Science; Member of European Molecular Biology Organization; Israel

Axel Ullrich PhD Professor, Max-Planck-Institute of Biochemistry, Germany

M. Iqbal Parker Professor, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

Sergey Nedospasov Professor and Head, Laboratory of Molecular Immunology, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

3. Apoptosis and autophagy

Jun-Ying Yuan Professor of Cell Biology, Harvard Medical School; Fellow of the American Academy of Arts and Sciences; USA

Eileen White Associate Director for Basic Science, The Cancer Institute of New Jersey; Professor, Molecular Biology and Biochemistry, Rutgers University, USA

Noboru Mizushima Professor, Department of Physiology and Cell Biology, Tokyo Medical and Dental University, Japan

J. Marie Hardwick Johns Hopkins University School of Medicine, USA

4. Bacterial and viral infection

Maria G. Masucci Karolinska Institutet, Sweden

Brigitte Gicquel Institut Pasteur, France

Jian-Dong Li Professor, Department of Microbiology & Immunology, University of Rochester Medical Center, USA

Sergey N. Kochetkov Professor, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

5. Stress responses and aging

F. Ulrich Hartl Professor and Director, Max Planck Institute of Biochemistry; Member of European Molecular Biology Organization; Germany

Richard Morimoto Northwestern University, USA

Kazuhiro Nagata Professor and Chairman, Department of Molecular and Cellular Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japan

Gordon Lithgow The Buck Institute for Advanced Age Research, Novato, California, USA

6. Immunological and inflammatory disorders

Ke Shuai Professor, Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Department of Biological Chemistry, University of California, Los Angeles, USA

(continued on page 326)