

ABCA1 结构对胆固醇流出的影响 *

王斯琦 ** 张 敏 ** 陈凌燕 唐朝克 ***

(南华大学心血管疾病研究所, 动脉粥样硬化湖南省重点实验室, 医学研究实验中心,
湖南省分子靶标新药研究协同创新中心, 衡阳 421001)

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0264

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 作为介导细胞内脂质流出, 维持细胞脂质代谢平衡的重要跨膜蛋白, 对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的防治具有重要意义^[1]. 近日, 清华大学结构生物学高精尖创新中心的颜宁教授与龚欣博士组成的研究团队 (Cell, 2017, 169: 1228–1239) 采用冷冻电子显微镜技术, 经过重组人全长 ABCA1 蛋白制备、透射电子显微镜成像、图像处理及结构解析等步骤, 首次获得了重组人 ABCA1 在未结合 ATP 状态下近原子级分辨率的结构, 并创新性地提出了 ABCA1 通过 “lateral access” 方式转运细胞内胆固醇的学说^[2]. 上述实验结果建立了新的 ABCA1 结构模型, 对于 ABCA1 作用机制的进一步研究, 以及推动 AS 相关性心血管疾病的防治具有重要意义.

1 揭示了 ABCA1 的新结构

ABCA1 是 Luciani 等^[3]在 1994 年经克隆得到的一类以三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 为能源的跨膜转运蛋白, 是三磷酸腺苷结合盒转运体家族 (ATP-binding cassette transporters, ABCs) 的重要成员. ABCA1 在调节细胞内胆固醇流出、炎症反应、细胞增殖、迁移和凋亡过程中发挥着重要作用. 细胞内的磷脂以及游离胆固醇在 ABCA1 作用下流出到乏脂的载脂蛋白 A-I (apolipoprotein A-I, apoA-I) 形成新生高密度脂蛋白 (nascent high-density lipoprotein, nHDL), nHDL

促进胆固醇逆向转运, 抑制 AS 的发生发展^[4]. 有研究表明, 人源性 ABCA1 包含 2 个跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD)、2 个核苷酸结合结构域 (nucleotide-binding domain, NBD) 和 1 个调节结构域, 其中 NBD 和调节结构域在 ABCA 各亚型中高度保守^[5]. 而 ABCA1 区别于 ABCs 其他成员的一个重要结构特征是其具有 2 个很大的细胞外结构域 (extracellular domains, ECD), 提示 ABCA1 可能通过 ECD 与 apoA-I 结合介导胆固醇流出^[6].

对 ABCA1 结构缺乏精确的认识是研究其作用机制的最大阻碍. 2013 年 Tsybovsky 等^[7]报道过牛体内 ABCA4 的结构, 但其分辨率仅为 18 Å, 远不足以对其结构进行精确分析. 颜宁教授带领的团队采用单粒子冷冻电子显微镜技术得到人源性 ABCA1 的蛋白结构, 其整体分辨率为 4.1 Å, 其中经过软模板处理的 ECD 区域分辨率高达 3.9 Å. 研究者发现, ABCA1 中位于细胞质的 NBD1、NBD2 和调节结构域相互结合, 但贯穿脂质双分子层的 TMD1 和 TMD2 (每个 TMD 包含 6 个跨膜片段) 则独立折叠, 除跨膜片段 TM5、TM11 互相连接, 其余部分均暴露于脂质双分子层中. TMD1 及 TMD2

* 国家自然科学基金资助项目 (81570408).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281853, E-mail: tangchaoke@qq.com

收稿日期: 2017-08-06, 接受日期: 2016-09-05

独立折叠是包括 ABCG5 和 ABCG8 在内的 II 型 ABC 转运蛋白的重要结构特点。尽管 ABCA1 和 ABCG5/G8 的 TMD 和 NBD 区域具有相似的折叠结构,但在未结合 ATP 的情况下,ABCA1 的 TMD 区域呈现朝外构象,而 ABCG5/G8 和 ABCB10 等则呈现朝内构象^[2]。研究还首次发现,TMD 仅与 ECD2 相连接,而 ECD2 又与 ECD1 相互折叠形成一个疏水性通道和密封的顶部,该疏水性通道开口于距基底部 30 Å 处,提示胆固醇可能是通过 ECD 区域中的疏水性通道流出到细胞外,并与 apoA-I 相结合^[2]。

2 提出 ABCA1 作用新学说

过去实验认为,ABCA1 介导胆固醇流出的机制主要有 3 种模型,即通道转运、蘑菇状突起和胞吞-胞吐转运模型。通道转运模型即经典模型,该模型认为 ABCA1 构象改变可形成胆固醇转运通道,在 ATP 的调解下,直接介导胆固醇流出膜外,并与 apoA-I 结合形成 nHDL 蘑菇状突起模型,即 apoA-I 与 ABCA1 结合后使细胞质膜微环境发生横向和纵向重构,横向重构使细胞膜脂筏区域增多,纵向重构将磷脂酰胆碱和胆固醇从磷脂双分子层的内小叶翻转至外小叶,形成蘑菇状突起,蘑菇状突起能够结合 apoA-I 分子,形成 nHDL。胞吞-胞吐转运模型认为,在少数情况下 ABCA1 与 apoA-I 通过胞吞作用进入细胞内荷脂,形成 nHDL 后,再经胞吐作用转运到细胞外^[8]。在对 ABCA1 结构进行详细分析的基础上,研究者首次提出 ABCA1 可能是通过一种“lateral-access”方式对细胞内胆固醇进行转运,即细胞内胆固醇在 NBD 和 TMD 的协同作用下被募集到 TMD 区域的空腔中,TMD1 中的极性基团与脂质双分子层的内小叶相结合,将胆固醇从磷脂双分子层的内小叶翻转至外小叶并转运到 ECD 中的疏水通道内,随后胆固醇从开口处流出并与 apoA-I 相结合,形成 nHDL^[2]。研究者还在 TMD 极性基团和疏水性通道中检测到电子密度较大区域,进一步证实 ABCA1 转运胆固醇是通过“lateral-access”方式,而非其他 ABC 转运蛋白所采用的“alternating-access”方式^[9]。“lateral-access”方式是在确定 ABCA1 结构的基础上对现存转运模型的总结和完善,即证实了 ABCA1 构象改变能够形成胆固醇转运通道,又表明了细胞质膜微环境能够发生纵向重构,为

ABCA1 调节胆固醇流出的机制提供了更加全面可靠的学说。

3 调控 ABCA1 功能新方法

ABCA1 突变可导致人患常染色体隐性遗传疾病——丹吉尔病。丹吉尔病患者表现为 ABCA1 功能障碍,细胞内胆固醇流出减少,血浆 HDL 水平降低以及高甘油三酯血症,其冠心病发病率是正常人群的 6 倍^[10]。基因数据库分析发现,已知与丹吉尔病相关的 ABCA1 突变位点多达 97 种,其中 W590 位点和 C1477 位点突变直接导致 ABCA1 调节的胆固醇流出障碍^[11-12]。颜宁研究组成员发现,W590 和 C1477 位点分别位于 ECD1(包括 47~629 位碱基)和 ECD2(包括 1369~1639 位碱基)区域,C1477 位点突变导致 TMD1 与 ECD2 结合减少,apoA-I 与脂质结合减少,而疏水性通道底部的 W590 突变则引起细胞质膜重构能力受损,脂质无法从 TMD 转移到 ECD^[2]。前期研究表明,位于 NBD 区域的 K939M 和 K1952M 位点突变使 ABCA1 失去调节胆固醇流出的能力,这可能与 NBD 结构改变导致 ATP 水解障碍有关^[13]。此外,ABCA1 的 Tyr1698 位点、Arg937 位点和 Thr940 位点突变也能诱发丹吉尔病,故阐明 ABCA1 的结构,将有利于我们理解基因突变引起 ABCA1 功能改变的具体机制^[14-15]。

4 膜蛋白研究新技术

近年来,颜宁教授所带领的团队多次在《自然》(*Nature*)、《科学》(*Science*)和《细胞》(*Cell*)等国际性期刊上发表文章,这不仅体现了其团队刻苦钻研的科研精神,也得益于清华大学掌握了世界先进水平的冷冻电子显微镜技术。冷冻电子显微镜技术作为直接解析生物大分子分辨率结构的技术,是结构生物学领域的三大研究方法之一。2013 年美国加州大学旧金山分校的华人学者程亦凡与 David Julius 利用冷冻电镜以近原子分辨率 3.4 Å 确定了 300 ku 膜蛋白 TRPV1 的三维结构,并建立了原子模型^[16]。冷冻电子显微镜技术克服了 X 射线晶体学只能研究三维晶体样品以及核磁共振波谱学只能研究小分子质量(小于 100 ku)样品的限制,使我们对大分子、复合型膜蛋白的结构研究成为现实。高效率电子探测器的应用使冷冻电子显微镜技术在克服水分子结晶对样品构象影响的同时,解析得到近原子

分辨率(<4 Å)的生物大分子结构^[17]。冷冻电子显微镜的应用极大地拓宽了研究膜蛋白质结构和功能的道路。

5 研究意义和展望

促进 ABCA1 介导的细胞内胆固醇流出, 可以抑制 AS 的发生发展。本课题组通过生物信息学分析发现, miR-19b 能与 ABCA1 的 3'UTR 端结合, 下调 ABCA1 的表达, 而薯蓣皂苷元可抑制 miR-19b 表达, 促进 ABCA1 介导的胆固醇流出, 减轻 AS 病变程度^[18]。进一步研究后我们还发现, miR-33 能直接下调 ABCA1 表达^[19]。结合颜宁研究组提出的 ABCA1 结构模型, 我们推测 miR-19b 和 miR-33 通过靶向沉默 ABCA1 的编码基因, 使 ABCA1 结构发生缺失或改变, 导致细胞内 ATP 水解障碍, 磷脂双分子层纵向重构受阻, ECD 中的疏水通道破坏, 削弱 ABCA1 调节脂质代谢的功能。阐明 ABCA1 的电镜结构, 为理解 ABCA1 调节胆固醇流出机制提供新视角, 为 ABCG1、ABCB10 以及其他家族成员的进一步研究提供新方向。但值得注意的是, 该研究得到的是在缺乏 ATP 情况下 ABCA1 的电镜结构, 而不能表明动态状况下 ABCA1 结构的变化。此外, 胆固醇从疏水性通道流出后与 apoA-I 结合的具体过程, 以及 ABCA1 通过“lateral-access”方式转运胆固醇的可行性等也有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Demina E P, Miroshnikova V V, Schwarzman A L. Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse cholesterol transport proteins, in atherosclerosis. *Mol Biol*, 2016, **50**(2): 193–199
- [2] Qian H, Zhao X, Cao P, *et al.* Structure of the human lipid exporter ABCA1. *Cell*, 2017, **169**(7): 1228–1239 e1210
- [3] Luciani M F, Denizot F, Savary S, *et al.* Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics*, 1994, **21**(1): 150–159
- [4] Schumacher T, Benndorf R A. ABC transport proteins in cardiovascular disease—a brief summary. *Molecules*, 2017, **22**(4): 589
- [5] Peelman F, Labeur C, Vanloo B, *et al.* Characterization of the ABCA transporter subfamily: identification of prokaryotic and eukaryotic members, phylogeny and topology. *J Mol Biol*, 2003, **325**(2): 259–274
- [6] Kaminski W E, Piehler A, Wenzel J J. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1762**(5): 510–524
- [7] Tsybovsky Y, Orban T, Molday R S, *et al.* Molecular organization and ATP-induced conformational changes of ABCA4, the photoreceptor-specific ABC transporter. *Structure*, 2013, **21**(5): 854–860
- [8] 唐艳艳, 陈五军, 路倩, 等. ABCA1 的胞内运输及功能研究新进展. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(6): 510–519
- [9] Tang Y Y, Chen W J, Lu Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(6): 510–519
- [9] Verhalen B, Dastvan R, Thangapandian S, *et al.* Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. *Nature*, 2017, **543**(7647): 738–741
- [10] Nagappa M, Taly A B, Mahadevan A, *et al.* Tangier's disease: An uncommon cause of facial weakness and non-length dependent demyelinating neuropathy. *Ann Indian Acad Neurol*, 2016, **19**(1): 137–139
- [11] Nagao K, Zhao Y, Takahashi K, *et al.* Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1: effects of W590S mutation on lipid translocation and apolipoprotein A-I dissociation. *J Lipid Res*, 2009, **50**(6): 1165–1172
- [12] Fitzgerald M L, Morris A L, Rhee J S, *et al.* Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 2002, **277**(36): 33178–33187
- [13] Wang S, Gulshan K, Brubaker G, *et al.* ABCA1 mediates unfolding of apolipoprotein AI N terminus on the cell surface before lipidation and release of nascent high-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, **33**(6): 1197–1205
- [14] Ceccanti M, Cambieri C, Frasca V, *et al.* A Novel mutation in ABCA1 gene causing tangier disease in an italian family with uncommon neurological presentation. *Front Neurol*, 2016, **7**: 185
- [15] Brunham L R, Kang M H, Van Karnebeek C, *et al.* Clinical, biochemical, and molecular characterization of novel mutations in ABCA1 in families with tangier disease. *JIMD Rep*, 2015, **18**: 51–62
- [16] Liao M, Cao E, Julius D, *et al.* Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 2013, **504**(7478): 107–112
- [17] Nogales E. The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique. *Nat Methods*, 2016, **13**(1): 24–27
- [18] Lv Y C, Yang J, Yao F, *et al.* Diosgenin inhibits atherosclerosis via suppressing the MiR-19b-induced downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Atherosclerosis*, 2015, **240**(1): 80–89
- [19] Zhao G J, Mo Z C, Tang S L, *et al.* Chlamydia pneumoniae negatively regulates ABCA1 expression via TLR2-Nuclear factor-kappa B and miR-33 pathways in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis*, 2014, **235**(2): 519–525