



## Scap-Insig-2-25HC复合物与细胞内胆固醇水平的调控\*

唐尚书 张敏\*\* 唐朝克\*\*

(南华大学衡阳医学院心血管疾病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 动脉硬化性疾病湖南省国际科技合作创新基地, 衡阳医学院仪器设备技术实验室, 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心, 衡阳 421001)

**摘要** 固醇调节原件结合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein, SREBP) 是调节细胞内固醇类物质水平的重要细胞核转录因子, 通过负反馈机制维持细胞内固醇稳态. SREBP 裂解激活蛋白 (SREBP-cleavage activating protein, Scap) 和胰岛素诱导基因 2 (insulin-induced gene-2, Insig-2)、25-羟基胆固醇 (25-hydroxycholesterol, 25HC) 对 SREBP 激活、成熟及核转位具有重要调节作用. 最近研究揭示了 Scap-Insig-2-25HC 复合物的分子结构, 这对细胞内胆固醇代谢研究具有重要的意义.

**关键词** 固醇调节原件结合蛋白, SREBP 裂解激活蛋白, 胰岛素诱导基因 2

**中图分类号** R363

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0035

固醇调节原件结合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein, SREBP) 是调节细胞内固醇类物质水平的重要细胞核转录因子, 通过负反馈机制维持细胞内固醇稳态<sup>[1]</sup>. 胆固醇衍生物 25-羟基胆固醇 (25-hydroxycholesterol, 25HC)、SREBP 裂解激活蛋白 (SREBP-cleavage activating protein, Scap) 和胰岛素诱导基因 2 (insulin-induced gene-2, Insig-2) 对 SREBP 蛋白激活、成熟及核转位具有重要调节作用, 但其具体结构信息和分子机制尚未被完全阐述. 近日, 颜宁和闫创业团队利用低温电子显微镜对 25HC 作用下 Scap 中的固醇敏感结构域 (sterol sensing domain, SSD) 和 Insig-2 中的跨膜 (transmembrane, TM) 部分进行解析, 发现 25HC 分子夹在 Scap 的 S4~S6 段与 Insig-2 的 TMs3/4 段之间. Scap-S4 中段的展开对与 25HC 和 Insig 结合至关重要<sup>[2]</sup>. 该研究建立了 Scap-Insig-2-25HC 复合物结构模型, 揭示 25HC 依赖性的 Scap 和 Insig-2 相互作用的结构基础, 研究结果于 2021 年 1 月 14 在线发表于《科学》(Science) 杂志. Scap-Insig-2-25HC 复合物结构模型的建立对细胞内胆固醇代谢研究具有重要意义.

### 1 Scap-Insig-2-25HC 复合物

SREBP 最初是由 Yokoyama 等<sup>[3]</sup> 鉴定为转录因子, 参与调节胆固醇摄取和合成相关基因的表达. Scap 包括 8 个跨膜片段, 其中 S2~S6 片段构成 SSD. SREBP 与 Scap 结合形成 SREBP/Scap 复合物, 当细胞内固醇类物质水平较高时, Insig-2 与 Scap-SSD 结合, 稳定 SREBP 在内质网上, 抑制其加工成熟与核转位. 当细胞内固醇水平较低时, SREBP/Scap 复合物与 Insigs 解离, 随囊泡转运至高尔基体, 经裂解切割形成成熟的 SREBP 蛋白, 转位至细胞核, 上调低密度脂蛋白受体等胆固醇摄取相关蛋白质以及胆固醇合成限速酶羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR) 的表达. Scap 与 Insigs 结合依赖于 25HC 等胆固醇及其衍生物 (图 1).

\* 国家自然科学基金(81570408)资助项目.

\*\* 通讯联系人. Tel:0734-8281853

唐朝克. E-mail: tangchaoke@qq.com

张敏. E-mail: mzhangusc@126.com

收稿日期: 2021-02-05, 接受日期: 2021-02-23

对SREBP复合物的结构研究主要来自于低等生物, 例如古细菌金属蛋白酶S2P的晶体结构、分枝杆菌Insig的晶体结构、裂变酵母SREBP和Scap的同源基因Sre1和Scp1<sup>[4-7]</sup>. 目前已经揭示了许多蛋白质的SSD结构信息, 比如NPC1(C型尼曼-匹克病相关的关键因子)、NPC1L1(NPC1同源蛋白)、Patched 1和Dispatched蛋白的冷冻电镜结构<sup>[8-11]</sup>. 在Ptch1和NPC1L1的SSD膜表面观察到一个假定的固醇结合口袋, 位于S2~S4中间. 25HC的结合位点以及Scap与Insig的结合具体结构仍然未知. 对SREBP/Scap与Insigs和25HC结合形成的

复合物具体结构缺乏精确的认识是研究其作用机制的最大阻碍. 得益于冷冻电子显微镜技术的发展, 颜宁和闫创业教授团队对Insig-2和Scap进行了分析, 得到Scap-Insig-2-25HC三者复合物结构模型, 其整体分辨率为4.2 Å, 其中TM区域分辨率高达3.7 Å. Insig-2具有TM1~6跨膜区, Scap具有S1~S7跨膜区. 除TM片段外, SSD和Insig-2之间还有细长的固醇片段. 通过pull-down和SREBP裂解实验证明25HC像三明治一样夹在Scap的S4~S6部分和Insig-2的TM3/4之间.

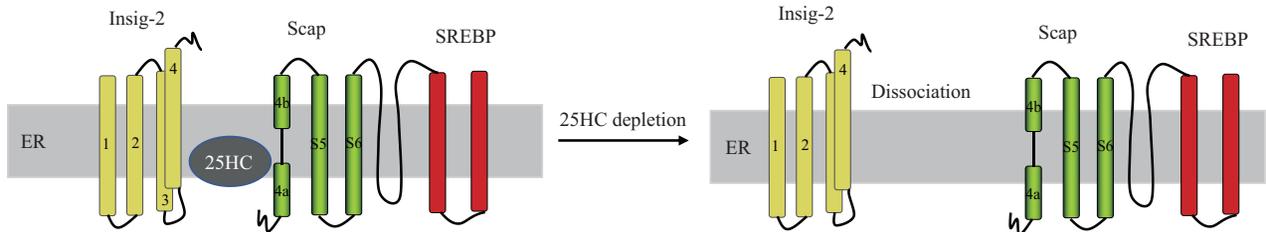


Fig. 1 Scap-Insig-2-25HC complex

图1 Scap-Insig-2-25HC复合物示意图

ER: 内质网; SREBP: 固醇调节原件结合蛋白; Scap: 固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白; Insig-2: 胰岛素诱导基因2; 25HC: 25-羟基胆固醇; 25HC depletion: 25-羟基胆固醇消耗; Dissociation: 分离. 25HC存在时, Scap、Insig-2与25HC形成复合物. 25HC消耗后, Scap与Insig-2分离.

## 2 Scap和Insig-2的结合位点

Insig-2的结构与此前解析的Insig同源物MvINS结构类似. 在MvINS的晶体结构中, 内源性甘油二酯分子将一条尾巴插入由TMs 1/2/3/5包裹的中央口袋中, 另一条尾巴通过TM2和TM5之间的间隙投射到膜上<sup>[5]</sup>. 根据甘油二酯结合MvINS的结构, 预测Insig-2同源模型中的中央口袋是胆固醇的结合位点. 虽然Insig-2结构有类似的中央口袋和侧裂, 但即使在低分辨率的图像过滤, 口袋内也没有观察到对应胆固醇的密度. 为了证实Insig的中央口袋不是25HC的结合位点, 作者进行了一系列的结构引导的突变表征. Insig能与25HC结合, 但不能与胆固醇结合<sup>[12-13]</sup>. 这两个固醇分子之间唯一的区别是25HC存在一个极性羟基, Insig中央口袋应该有位点专门识别25-OH. 然而, 中央口袋是高度疏水性的, 只有一个极性残基Ser81在口袋附近. 作者引入了单点突变S81A, 突变体在25HC依赖性Scap结合和抑制SREBP裂解方面表现得与野

生型蛋白质一样, 从而排除了Ser81作为25-OH结合位点. 进一步证实了口袋并非结合配体的位置. 结构分析和生化证据表明, Insig的中央口袋并不是Scap和Insig相互作用所需要的25HC分子调节位点.

## 3 Scap-S4的不连续性对Insig-2与25HC结合至关重要

Scap的跨膜结构域与NPC1和Ptch1类似, 但Scap的S4区域中间“断开”形成了一个类似解旋的扭结, 形成两个由S4a和S4b组成的半个螺旋. NPC1和Ptch1的相应区域是完整的. Scap-S4中间的弯曲以及S4a的倾斜在Scap和Insig之间形成容纳25HC的空腔. Scap-S4的展开为Insig-2的TM3上Arg110和S2上Tyr298的庞大侧链提供了空间. 当Scap-S4展开点Gly357突变为 $\alpha$ 螺旋稳定残基Ala时, Scap(G357A)突变体不能与Insig-2形成25HC介导的复合物. 结构和生化实验均证实Scap-S4螺旋的不连续对于25HC结合以及与Insig-2的相

相互作用不可或缺。

#### 4 研究意义和展望

SREBP是脂类合成和细胞摄取的调节者<sup>[14]</sup>。本课题组发现LXR激动剂T0901317能上调SREBP-1c表达<sup>[15]</sup>，NF- $\kappa$ B激活可导致SREBP-2的表达增加<sup>[16]</sup>。结合颜宁和闫创业团队提出的Scap-Insig-2-25HC复合物结构模型，T0901317是否能影响Scap-Insig-2-25HC复合物结构有待进一步研究。但值得注意的是，单独的Scap和Insig蛋白的结构仍未确定。此前有研究表明Insig-1能与Scap结合维持细胞内胆固醇稳态<sup>[17]</sup>。Scap-Insig-2-25HC复合物结构模型对Insig-1与Scap结合具有借鉴意义。将Scap与其他含SSD的蛋白质，如NPC1和Ptc1进行结构比较，为未来的研究提供了线索。综上，阐明Scap-Insig-2-25HC的电镜结构，揭示Scap和Insig-2之间以依赖25HC的方式相互作用的分子机制，为理解SREBP调节细胞内胆固醇稳态机制提供了新视角。

#### 参 考 文 献

- [1] Goldstein J L, DeBose-Boyd R A, Brown M S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 2006, **124**(1): 35-46
- [2] Yan R, Cao P, Song W, *et al.* A structure of human Scap bound to Insig-2 suggests how their interaction is regulated by sterols. *Science*, 2021: eabb2224 (DOI: 10.1126/science.abb2224)
- [3] Yokoyama C, Wang X, Briggs M R, *et al.* SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, 1993, **75**(1): 187-197
- [4] Feng L, Yan H, Wu Z, *et al.* Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. *Science*, 2007, **318**(5856): 1608-1612
- [5] Ren R, Zhou X, He Y, *et al.* PROTEIN STRUCTURE. Crystal structure of a mycobacterial Insig homolog provides insight into how these sensors monitor sterol levels. *Science*, 2015, **349**(6244): 187-191
- [6] Gong X, Li J, Shao W, *et al.* Structure of the WD40 domain of SCAP from fission yeast reveals the molecular basis for SREBP recognition. *Cell Res*, 2015, **25**(4): 401-411
- [7] Gong X, Qian H, Shao W, *et al.* Complex structure of the fission yeast SREBP-SCAP binding domains reveals an oligomeric organization. *Cell Res*, 2016, **26**(11): 1197-1211
- [8] Gong X, Qian H, Zhou X, *et al.* Structural insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1) -mediated cholesterol transfer and ebola infection. *Cell*, 2016, **165**(6): 1467-1478
- [9] Gong X, Qian H, Cao P, *et al.* Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. *Science*, 2018, **361**(6402): eaas8935
- [10] Huang C S, Yu X, Fordstrom P, *et al.* Cryo-EM structures of NPC1L1 reveal mechanisms of cholesterol transport and ezetimibe inhibition. *Sci Adv*, 2020, **6**(25): eabb1989
- [11] Cannac F, Qi C, Falschlunger J, *et al.* Cryo-EM structure of the Hedgehog release protein Dispatched. *Sci Adv*, 2020, **6**(16): eaay7928
- [12] Radhakrishnan A, Sun L P, Kwon H J, *et al.* Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*, 2004, **15**(2): 259-268
- [13] Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon H J, *et al.* Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(16): 6511-6518
- [14] Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, **13**(12): 710-730
- [15] 欧翔, 代小艳, 唐雅玲, 等. T0901317对apoE基因敲除小鼠肝脂质蓄积及胆固醇调节元件结合蛋白-1c表达的影响. *解剖学研究*, 2008, **30**(3): 184-189
- [16] Ou X, Dai X Y, Tang Y L, *et al.* *Anatomy Research*, 2008, **30**(3): 184-189
- [17] Zhao G J, Tang S L, Lv Y C, *et al.* NF- $\kappa$ B suppresses the expression of ATP-binding cassette transporter A1/G1 by regulating SREBP-2 and miR-33a in mice. *Int J Cardiol*, 2014, **171**(3): e93-e95
- [17] Yang T, Espenshade P J, Wright M E, *et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*, 2002, **110**(4): 489-500