

膜通道研究再获诺贝尔奖

麻彤辉, 杨红

(东北师范大学膜通道实验室, 长春 130024)

2003年的诺贝尔化学奖再次垂青膜通道领域的研究成果: Peter Agre 因发现第一个细胞膜水通道蛋白, Roderick Mackinnon 则因离子通道三维结构与功能机制方面的突破性成就而共同获奖。他们的研究成果为认识水和离子通过细胞膜的机制奠定了坚实的基础, 同时开启了若干全新的生物医学研究领域。

如所周知, 细胞膜是一种脂质双层的膜结构。单纯的脂质双层膜对水、离子和其它极性分子的通透性很低或不通透。然而, 在很多情况下当细胞执行生理功能时需要这些物质能够快速和选择性地通过细胞膜。细胞膜上存在的各种膜通道蛋白便是选择性地转运这些物质的基本功能单位。

1 离子通道研究

关于细胞膜离子转运机制的研究此次已经是第五次荣获诺贝尔奖。早在 1890 年, 德国科学家 Wilhelm Ostwald 就根据人造胶体膜的实验结果提出生物活组织中测到的电信号可能是由于离子通过细胞膜的移动形成的。他因此获得了 1909 年的诺贝尔化学奖。20 世纪初, Bernstein, Loeb 和 Beutner 等工作确立了膜电位的电化学性质。1925 年, Michaelis 提出细胞膜上有狭窄的离子通道存在。

50 年代初, 两位英国科学家 Alan Hodgkin 和 Andrew Huxley 应用枪乌贼巨大神经突触进行的跨膜离子转运研究开启了现代神经生理学时代, 因此获得了 1963 年的诺贝尔医学与生理学奖。基于细胞膜上分别存在电压门控的 Na^+ 和 K^+ (有时也可能是 Ca^{2+}) 通道的观点, 神经细胞动作电位产生的详细模型相继出现。此外还有实验证明钾离子是排成单行通过细胞膜的, 进一步支持膜镶嵌的通道结构的观点。关于离子通道快速转运、离子选择性、通道门控和通道失活的核心概念在此早期阶段已经清晰地建立起来。然而, 这些离子通道特征的分子基

础却完全不清楚。

60 年代和 70 年代, 对电鳐鱼配体门控的乙酰胆碱受体 (属于 Cys-loop 离子通道家族) 的大量研究首次从生物化学上鉴定了第一个离子通道蛋白。低分辨率结构研究显示, 该离子通道蛋白形成一个细胞外大漏斗并延伸成狭窄的膜通道。

70 年代初, Amstrong 应用生物物理学技术对神经元上电压门控的 Na^+ 和 K^+ 通道 (属于 P-loop 离子通道家族成员) 中离子“选择性滤器”的份围进行了测定, 并建立了通道门控和选择性滤器分属不同结构域的观点。两位德国科学家 Nehem 和 Sakmamm 于 70 年代后期发明的膜片钳技术使精确测定单个通道的离子通透性成为可能。该技术与基因克隆、基因突变和基因表达技术相结合, 极大地推进了各种离子通道蛋白上决定选择性和门控机制功能区的划定。他们因此获得了 1991 年的诺贝尔医学与生理学奖。

1997 年的诺贝尔化学奖颁给了丹麦科学家 Jens Skou。他在研究离子逆浓度梯度转运机理时于 1957 年发现了 Na^+/K^+ ATP 酶, 一种存在于细胞膜上的蛋白泵, 可以通过耗能过程逆着浓度差使细胞内的 Na^+ 离子移出膜外, 同时把细胞外的 K^+ 移入膜内, 以此保持细胞膜内高 K^+ 和膜外高 Na^+ 的不均衡离子分布。

90 年代中期, 对 P-loop 离子通道进行的研究已经清楚地将通道分子中的选择性滤器定位于细胞外的一端, 而通道的门控区则分设于细胞内的一端。离子选择性是通过滤器中氧原子的适当定位来实现的: 这些氧原子起到了替代离子周围结合的水分子的作用, 直径大小适中的离子进入狭窄的通道时能够优先脱水而通过滤器。通道蛋白分子上形成选择性滤器的区段 P-loop 也因此得到确定。然而, 选择性滤器的详细分子设计以及负责门控的机制仍不清楚。至此除非获得高分辨率的结构资料, 进一步的研究将很难开展。

测定膜蛋白的高分辨率三维结构极为困难, 离

子通道也不例外。困难在于膜蛋白难以大量表达和纯化以获得足够的蛋白进行结晶。尤其是真核细胞的膜蛋白较原核细胞膜蛋白更难操作。这方面的工作中,若干与真核细胞 K^+ 通道高度同源的细菌 K^+ 通道的克隆和成功超表达使该离子通道的蛋白质结晶成为可能。

Roderick Mackinnon 研究组于 1998 年首次成功地结晶并解析了链霉菌 KcsA K^+ 通道的高分辨率晶体结构,终于使离子通道结构与功能机制的研究获得了实质性突破。该 K^+ 通道选择性滤器的设计完美地适应于钾离子的脱水工作,而将直径较小的钠离子排除在外,因而解释了对钾离子的高选择性和高转运率。在更高分辨率上甚至可以看到位于选择性滤器的两侧、处于水合状态的钾离子,而位于滤器内部脱水的钾离子与蛋白构架中的氧原子相协调。很明显,选择性滤器是由连续的 K^+ 结合位点组成,每一个结合位点几乎精确地模拟了包绕着钾离子的水合外层。

上述解析的 KcsA K^+ 通道的结构是处于关闭状态的构像。为了解释通道的门控机制, Mackinnon 又获得了处于通道开放状态的受钙离子激活的细菌钾离子通道 MthK 的蛋白质结晶。对处于关闭构像的 KcsA 和处于开放构像的 MthK 结构进行比较研究揭示出一个共同的门控机制:感受器区域的构象变化拉动靠近通道胞内一端的跨膜螺旋分开而使通道开放。

有些钾离子通道只允许 K^+ 向一个方向转运,起着分子二极管的作用。这些内向整流通道可以被 Mg^{2+} 和多胺分子阻断。这些分子能够在细胞膜去极化时从钾离子通道的胞浆端穿入通道。Mackinnon 于 2002 年首次解析了负责受 G-蛋白门控的钾离子通道内向整流的结构域:胞浆端向碱性的孔道结构延伸并与酸性疏水的氨基酸残基协同排列使通道的长度延长到几乎 60 Å,并且提供了多胺分子的内部结合位点。此外, Mackinnon 还通过对与 KcsA 高度同源的真核细胞钾离子通道的突变分析阐明了另一类重要的通道失活过程—球和链失活。

在可兴奋的神经细胞、肌肉细胞和内分泌细胞,电压诱导的离子通道门控机制是细胞激活的核心原理。最近, Mackinnon 解析了与针对电压敏感区的抗体片段共同结晶的古老电压门控钾离子通道 Kv1P。有趣的是,抗体片段将通道分子的电压敏感区托离了通道本身。因此,未受干扰的电压门控通道的精确结构仍未解决,但该项研究无疑向解析

电压感受机制的结构细节迈出了第一步。

Mackinnon 在钾离子通道结构和机理方面的出色工作阐明了离子选择性、门控和失活过程的分子基础,同时使离子通道功能更为详细的生物化学、生物物理学和理论研究成为可能。他的发现为从分子水平认识许多神经、肌肉和心脏疾病奠定了坚实的基础,并为药物设计开辟了新的可能性。

2 水通道研究

与离子通道的研究相比,细胞膜水转运机制的研究一直进展缓慢。虽然早在 19 世纪中叶就有人提出细胞膜上可能存在介导水转运的通道,此后一百年几乎没有进展。直到 1957 年, Sidel 和 Solomon 才发现红细胞膜的高效水通透性是由水选择性通道介导的。该通道只容许水分子通过,而离子和其它溶质则不能通过。70 年代初, Macey 和 farmer 发现红细胞膜的渗透性水通透性可被汞化合物抑制。一直到 1987 年都没有人能够确定水通道的化学性质,也就是说水通道是否是蛋白质都有争议。

水通道的幸运之神终于降临到 Peter Agre 身上。80 年代中期, Peter Agre 在研究红细胞膜 Rh 血型抗原时分离纯化了一个分子量约 28 kD 的膜内在蛋白,命名为 CHIP28 (channel-forming integral protein, 28 kD)。当时该膜蛋白的功能尚不清楚。通过对该蛋白进行氨基末端测序及后续的分子克隆研究获得了 CHIP28 的 cDNA 全序列。经 CHIP28 的组织定位研究并与其他学者交流, Peter Agre 意识到 CHIP28 可能就是长久以来寻之不到的神秘的水通道。他很快通过非洲爪蟾卵表达实验证实了他的推断。将表达 CHIP28 的非洲爪蟾卵置于低渗透压缓冲液中使卵细胞体积迅速膨大。将纯化的 CHIP28 蛋白重建于脂质小体膜上并将其置于低渗环境也观察到同样的体积膨大现象。两种情况下的体积膨大都可被已知能够阻断红细胞水通透性的 Hg^{2+} 抑制。至此,第一个分子水通道终于确定了。像许许多多的其它膜通道一样,水通道的化学性质也无非就是一种膜蛋白。Peter Agre 当时并非研究水通道的专家,其发现第一个水通道的过程当属“意外收获”。

CHIP28 的发现是认识细胞膜水转运机制的决定性里程碑。此后很快发现水通道蛋白(现命名为 Aquaporin, AQP; CHIP28 命名为 AQP1)在整个

生物界,从单细胞的细菌到复杂的人体,都广泛存在。在人类目前已发现至少12种不同的水通道样蛋白,其中遗传性尿崩症/尿浓缩障碍与AQP2和AQP1的基因突变有关。植物的水通道蛋白家族大得多,简单的模型植物拟南芥就已发现多达38种不同的成员,其转运功能和调节也更为复杂。

2000年到2001年,多个实验室成功获得了AQP1的晶体,并对其三维结构在原子水平进行了高分辨率的解析。这使AQP1对水分子的高效通透性、高度选择性和防止质子泄露的机制从原子水平上得到解释。实质上,水通道的构造只允许水分子排成单行通过,而通道内部带正电荷的氨基酸残基排斥带正电荷的 H_3O^+ 通过。另外,蛋白分子内部产生的局部静电场使通道中间的极性发生转换,迫使水分子在通过通道时进行旋转式双极运动,通过通道上半部时的旋转方向与通过下半部时的旋转方向相反。这种旋转方向的转换阻止了通道内部形成连续的水合质子分子网,从而阻断了质子通过“质子逃逸”机制(又称Grotthuss机制)通过水通道。

水通道在生理学上的重要性近年来通过小鼠基因敲除和人类基因突变分析等手段得到广泛研究。AQP2的常染色体隐性和显性突变成为新一类遗传性尿崩症的分子遗传学基础。AQP1基因‘丧失功能’突变的个体也有尿浓缩功能障碍。小鼠基因敲除研究表明,水通道家族蛋白在肾脏尿浓缩机制、外分泌腺功能、皮肤功能、脑水肿形成、眼压调节、消化吸收功能、视觉和听觉等生理功能中扮演重要角色。水通道蛋白的重要生理功能使其有可能成为研发新型利尿剂、脑水肿拮抗剂等的药物作用靶点。植物水通道也在根部吸收水分和维持整个植物体水平衡等方面发挥重要作用。

从第一个水通道的发现到现在前后不过十年时间,水通道研究领域得到了异乎寻常的飞速发展。其间经分子克隆确定的真核和原核生物水通道蛋白已远超过200个。AQP1在原子水平的结构和水分子转运机制得到了比较完整的认识。水通道蛋白在动植物体内的生理功能研究获得了大量重要成果。水通道蛋白在人类健康和疾病中的作用以及在新药研发中的地位也日益清晰。Peter Agre“意外发现”第一个分子水通道不仅使细胞膜水转运机制的研究发生了革命,同时也为生理学和医学中与之相关的重要研究领域奠定了坚实的生物化学基础。

参考文献:

- [1] Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett*, 2003,1:72~78
- [2] Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 2002,542:3~16
- [3] Armstrong CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Quart Rev Biophys*, 1975,7:179~210
- [4] Armstrong CM, Hille B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 1998,20:371~380
- [5] Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC. Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science*, 2002,298:1582~1587
- [6] Bernstein J. Untersuchungen zur Thermodynamik der biologischen Strömung. *Pflügers Arch*, 1902,92:521~562
- [7] Chang G, Spencer R, Lee A, Barclay M, Rees D. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. *Science*, 1998,282:2220~2226
- [8] de Groot BL, Grubmüller H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 2001,294:2353~2357
- [9] Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem*, 1988,263:15634~15642
- [10] Doyle D, Cabral J, Pfuetzner R, Kuo A, Gulbis J, Cohen S, Chait B, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and sensitivity. *Science*, 1998,280:69~77
- [11] Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a Cl⁻ chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 2002, 415:287~294
- [12] Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in Cl⁻ chloride channels. *Science*, 2003,300:108~112
- [13] Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, 2000,290:481~486
- [14] Hatta S, Sakamoto J, Horio Y. Ion channels and diseases. *Med Electron Microsc*, 2002,35:117~126
- [15] Hodgkin AL. The ionic basis of nerve conduction. In: Nobel

- Lectures in Physiology or Medicine 1963-1970. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1970
- [16] Hodgkin AL, Keynes RD. The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J Physiol*, 1955,128:61~88
- [17] Huxley AF. The quantitative analysis of excitation and conduction in nerve. In: Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1963~1970. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1970
- [18] Javot M, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot*, 2002,90:301~313
- [19] Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 2002,417:515~522
- [20] Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 2002,417:523~526
- [21] Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 2003,423:33~41
- [22] Kistler J, Stroud RM, Klymkowsky MW, Lalancette RA, Fairclough RH. Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys J*, 1982,37:371~383
- [23] Ma TH, Hara M, Sougrat R, Verbavatz JM, Verkman AS. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem*, 2002,19:17147~17153
- [24] Ma TH, Song YL, Yang BX, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,8:4386~4391
- [25] Ma TH, Fukuda N, Song YL, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest*, 2000,1:93~100
- [26] Ma TH, Song YL, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem*, 1999,29:20071~20074
- [27] Ma TH, Yang BX, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem*, 1998,8:4296~4299
- [28] Ma TH, Yang BX, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J Clin Invest*, 1997,5:957~962
- [29] Manley GT, Fujimura M, Ma TH, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *NAT MED*, 2000,2:159~163
- [30] Michaelis L. Contribution to the theory of permeability of membranes for electrolytes. *J Gen Physiol*, 1925,8:33~59
- [31] Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 2000,407:599~605
- [32] Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell*, 2002,111:957~965
- [33] Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88:11110~11114
- [34] Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 1992,256:385~387
- [35] Ross MJ, Klymkowsky MW, Agard DA, Stroud RM. Structural studies of a membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo Californica*. *J Mol Biol*, 1977,116:635~659
- [36] Schrepf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, Steinkamp T, Wagner R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J*, 1995,14:5170~5178
- [37] Sidel VW, Solomon AK. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J Gen Physiol*, 1957,41:243~257
- [38] Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 2001,414:872~878
- [39] Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen MO, Miercke LJ, O'Connell J, Stroud RM, Schulten K. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*, 2002,296:525~530
- [40] Toyoshima C, Unwin N. Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature*, 1988,336:247~250
- [41] Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol*, 1993,229:1101~1124
- [42] Verkman AS. Physiological importance of aquaporin water channels. *Ann Med*, 2002,3:192~200