

电压门控离子通道结构生物学研究进展

宋方俊¹, 郭江涛^{1,2}

1. 浙江大学医学院生物物理系, 浙江 杭州 310058

2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院病理科, 浙江 杭州 310016

[摘要] 离子通道介导离子的跨膜运转,在生物体内的物质交换、能量传递和信号传导过程中发挥关键作用。近年来,离子通道结构生物学研究极大地推动了人们对离子通道的离子选择性和门控机制的认识。电压门控钾通道结构生物学研究阐明了钾离子选择性的结构基础和电压门控机制;电压门控钠通道结构生物学研究揭示了钠通道的慢失活和快失活机制;瞬时受体电位通道结构生物学研究提供了瞬时受体电位通道复杂多样的结构和配体门控机制。本文总结了近年来离子通道结构生物学的研究进展,并展望了未来离子通道结构生物学的发展。



[关键词] 离子通道;蛋白质结构;离子选择性;电压门控;配体门控;综述

[中图分类号] Q615 **[文献标志码]** A

Progress on structural biology of voltage-gated ion channels

SONG Fangjun¹, GUO Jiangtao^{1,2} (1. Department of Biophysics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Pathology, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China)

Corresponding author: GUO Jiangtao, E-mail: jiangtaoguo@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-8850-286X>

[Abstract] Ion channels mediate ion transport across membranes, and play vital roles in processes of matter exchange, energy transfer and signal transduction in living organisms. Recently, structural studies of ion channels have greatly advanced our understanding of their ion selectivity and gating mechanisms. Structural studies of voltage-gated potassium channels elucidate the structural basis for potassium selectivity and voltage-gating mechanism; structural studies of voltage-gated sodium channels reveal their slow and fast inactivation mechanisms; and structural studies of transient receptor potential (TRP) channels provide complex and diverse structures of TRP channels, and their ligand gating mechanisms. In the article we summarize recent progress on ion channel structural biology, and outlook the prospect of ion channel

收稿日期:2018-07-25 接受日期:2018-09-21

基金项目:国家重点研发计划(2018YFA0508100)

第一作者:宋方俊(1996—),男,硕士研究生,主要从事离子通道结构生物学研究;E-mail: fangjun_s@163.com; <https://orcid.org/0000-0001-8534-4889>

通信作者:郭江涛(1984—),男,博士,研究员,博士生导师,主要从事离子通道和离子转运蛋白结构生物学研究;E-mail: jiangtaoguo@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-8850-286X>

structural biology in the future.

[Key words] Ion channels; Protein structure; Ionselectivity; Voltage-gating; Ligand-gating; Review

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2019,48(1):25-33.]

生物膜主要由疏水性的磷脂双分子层组成。在生命进化过程中,生物膜将生命与周围的水溶液环境区分开来,一方面为生物膜内部的生化反应提供适宜的环境,另一方面阻断了生物膜内外两侧的物质、能量和信息交换。离子通道是一类定位于生物膜上的本体膜蛋白,可以形成亲水性的孔道,介导水溶性离子的跨膜运转。离子通道通常有开放态和关闭态两种状态。在开放态下,离子可以顺着电化学梯度快速通过离子通道。离子通过离子通道的跨膜运转会引起生物膜两侧离子电化学梯度变化、渗透压改变以及生物膜膜电位变化。另外,某些离子如钙离子进入细胞后会激活下游一系列信号通路,调节细胞的生理状态。特别是在可兴奋细胞如肌肉细胞和神经元细胞中,离子通道直接参与电信号的产生和传递,是肌肉收缩和神经元放电的结构基础之一。因此,离子通道在物质交换、能量传递和信号传导过程中发挥着非常关键的作用。

一般来说,离子通道具有两个特性:离子选择性(ion selectivity)和门控(gating)。大部分离子通道都选择性通透某一种或某一类离子,称为离子选择性。离子选择性体现了离子通道蛋白的底物特异性。生物膜两侧的各种离子浓度不同,选择性跨膜运输对于电信号的产生至关重要。例如,钠离子通道对钠离子具有选择性,细胞外的钠离子浓度(145 mmol/L)远高于细胞内的钠离子浓度(15 mmol/L),其开放可导致钠离子内流,引起膜电位去极化,促进动作电位产生。具有离子选择性的离子通道在结构中通常具有一个特殊的结构域,称为离子选择性滤器(selectivity filter),该结构域决定了离子通道的离子选择性(图1)。离子通道的开放状态受各种因素的调控,称为门控。门控是离子通道蛋白的活性调节。根据门控因子的不同,离子通道可以进行分类:一些离子通道受膜电位的调控,称为电压门控离子通道(voltage-gated ion channel);一些离子通道受配体小分子调

控,称为配体门控离子通道(ligand-gated ion channel);一些离子通道受细胞膜表面张力等机械力调控,称为机械力敏感通道(mechano-sensitive channel)等。同样,离子通道结构中也有特定的结构域,其构象变化决定了离子通道的开放程度,称为阀门(gate)。因此,离子选择性滤器和阀门是离子通道结构中最关键的两个结构域。

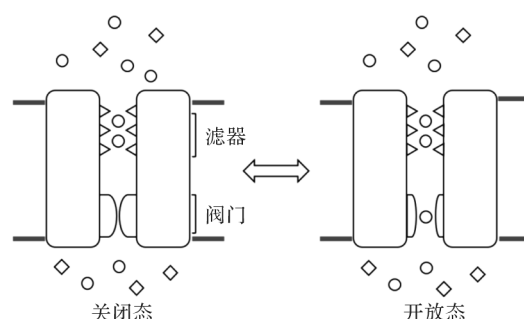


图1 离子通道整体结构示意图

Figure 1 Overall architecture of ion channels

从1998年第一个离子通道钾通道KcsA的晶体结构解析至今^[1],20年来离子通道一直是结构生物学领域的研究热点。本文以电压门控离子通道超家族为例,重点阐述电压门控钾通道(voltage-gated potassium channel, Kv)、电压门控钠通道(voltage-gated sodium channel, Nav)和瞬时受体电位通道(transient receptor potential channel, TRP)的结构和机制研究进展^[2],并对离子通道结构生物学的发展进行展望。

1 电压门控钾通道

电压门控离子通道超家族包括140多个成员,是人类基因组编码的第三大蛋白超家族,仅次于G蛋白偶联受体超家族和蛋白激酶超家族。电压门控离子通道超家族包括经典钾通道、钙通道、钠通道和TRP通道等。电压门控离子通道超家族的基本组成单元是6次跨膜螺旋(S1~S6, 6-TM)结构域,4个拷贝的6-TM组成一个具有功能的离子通

道。钾通道的种类和成员最多,研究也最为深入。除了Kv外,钾通道还包括内向整流型钾通道(inward rectifying potassium channel)、钙激活钾通道(calcium-activated potassium channel)和双孔钾通道(two pore-domain potassium channel)等^[2]。

1.1 Kv的结构

1998年,Mackinnon实验室解析了第一个钾通道KcsA的晶体结构,揭示了钾通道的整体结构和钾离子选择性滤器的详细结构^[1]。KcsA为四聚体离子通道,每个亚基均含有2个跨膜螺旋S5~S6,4个S5~S6组成孔道结构域(pore domain, PD),其中4个拷贝S6的羧基末端在细胞膜内表面附近形成阀门,而S5和S6之间的区域在细胞膜外表面附近形成选择性滤器。2003年,Mackinnon实验室报道了第一个电压门控钾通道KvAP的晶体结构^[3]。该晶体结构中,首次发现4个感受膜电位变化的电压感受器结构域(voltage-sensing domain, VSD)围绕在孔道结构域周围,每个VSD包含4个跨膜螺旋即S1~S4。在KvAP全长结构中,S4和S3的下半段并没有插入细胞膜中,而是滑落至细胞膜内表面和细胞质基质侧,与单独的VSD结构相差甚远,因此该KvAP的VSD被认为是一种假象,据此提出的桨模型(paddle model)后来也被认为是不合理的。2005年,Mackinnon实验室再次解析了哺乳动物钾通道Kv1.2与 β 亚基复合物的晶体结构^[4-5]。该结构第一次揭示了哺乳动物Kv的全长结构,其VSD处于激活态,离子通道处于开放态。2007年,Mackinnon实验室又报道了Kv1.2-2.1嵌合体的高分辨率晶体结构^[6],该结构清楚地展现了激活态VSD的精细结构,为阐明电压门控机制奠定了基础。2016年,电压门控钾通道Eag1(Kv10.1)的电镜结构被解析^[7];2017年,电压门控钾通道BK(Slo1.1)、hERG1(Kv11.1)和KCNQ1(Kv7.1)的电镜结构相继被解析^[8-11],进一步丰富了Kv的结构信息。在Eag1、BK、hERG1和KCNQ1的结构中,VSD也均处于激活态。

1.2 Kv的离子选择性

钾通道的离子选择性多年来一直困扰人们:为什么离子半径更小的钠离子不能透过而离子半径更大的钾离子可以透过?从原核钾通道KcsA的结构解析

起,人们发现所有钾通道的选择性滤器都具有类似的结构。钾通道选择性滤器中,4个拷贝的TVGYG基序组成一个狭长的孔道,孔道中间形成4个钾离子结合位点;TVGYG基序的氨基酸残基的主链羰基氧都朝向孔道中间,每个钾离子周围被8个氧原子配位,钾离子与氧原子之间的距离在0.3 nm左右,表明钾离子是以去水化的状态通过选择性滤器^[12](图2)。钾通道选择性滤器中的4个钾离子结合位点并不是均一的。实际单个离子通道中,钾离子可能会占据其中一个或多个位点,且晶体学和冷冻电镜在计算过程中都会进行平均化,最终高分辨率结构显示为4个位点。另外,通过晶体学滴定实验可以发现,钾通道选择性滤器中存在2个钾离子高亲和力的位点;在低浓度下,钾离子仍然占据高亲和力位点,从而阻断钠离子的进入和通透^[13-14]。总之,钾通道选择性滤器狭长、多位点的特征保证了钾离子的选择性通透:钠离子去水化半径较小,离子配位距离更短,完全去水化需要更高的能量,这些性质使得钠离子在通过钾通道选择性滤器时难以与钾离子竞争。

1.3 Kv的门控机制

电压门控离子通道的核心问题是膜电位如何调控离子通道的开放和关闭,而Kv的结构生物学研究为阐明电压门控机制提供了大量信息。以高分辨率的Kv1.2-2.1结构为例,人们发现:①VSD的S4上有大量带正电荷的氨基酸残基(通常为精氨酸),这些精氨酸高度保守,而且排布规律,通常每3个氨基酸残基出现一个精氨酸;②在精氨酸出现的区域,S4通常变为 3_{10} 螺旋, 3_{10} 螺旋使得精氨酸都排布在S4螺旋的一侧^[6];③在VSD中部存在一个电荷转移中心(gating charge transfer center),该中心由一个侧链较大的芳香族氨基酸和两个带负电的氨基酸残基组成,带正电荷的精氨酸侧链通常指向电荷转移中心,与带负电的氨基酸残基侧

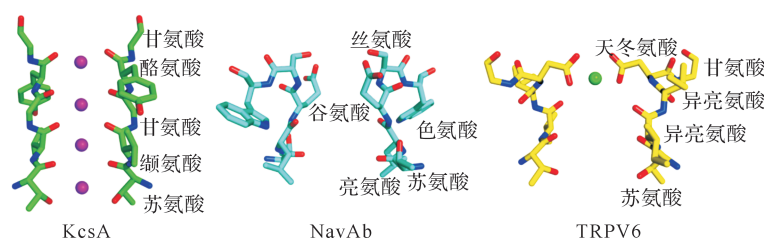


图2 KcsA、NavAb和TRPV6选择性滤器的结构

Figure 2 Structures of selectivity filters of KcsA, NavAb and TRPV6

链相互作用^[15];④在激活态(activated state)的VSD中,S4上的精氨酸通常处于电荷转移中心以上;⑤VSD紧连着S4-S5 linker,通过S4-S5 linker与S6的羧基末端相互作用来调节阀门的开放和关闭;⑥激活态的VSD与开放的阀门相偶联^[6]。

目前已经解析的Kv结构中,VSD均处于不同程度的激活态。而要阐明Kv的门控机制,需要处于激活态和静息态(resting state)VSD的结构。在质子通道Hv1.1^[16]和植物电压门控双孔通道TPC1的晶体结构中^[17],VSD均处于静息态,可以为阐明电压门控机制提供参考信息。通过结构比较,我们可以推测,当膜电位去极化时,电场驱动S4上带正电荷的精氨酸依次线性通过电荷转移中心;S4在垂直方向的向上移动牵引S4-S5 linker向外旋转,由于S4-S5 linker与S6的羧基末端有较强的相互作用,S4-S5 linker向外旋转可引起S6的羧基末端向外弯曲,从而导致通道开放(图3)。

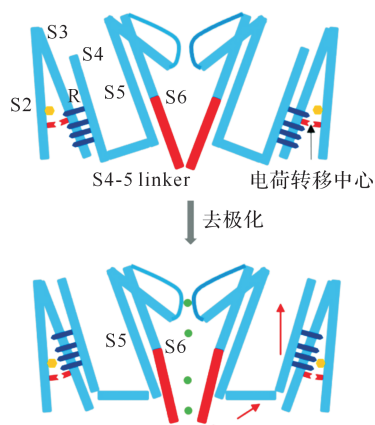


图3 电压门控钾通道的电压门控机制示意图

Figure 3 Voltage gating mechanism of voltage-gated potassium channels

2 电压门控钠通道

原核Nav与Kv类似,为同源四聚体,每个亚基具有6次跨膜螺旋。真核Nav一般包含 α 和 β 亚基,其中每个 α 亚基含有4个拷贝的6-TM结构域,形成离子通透的孔道; β 亚基为单次跨膜蛋白,具有调节作用。Nav的结构研究起步较晚,但近年来得益于冷冻电镜技术的发展,人们对真核Nav的研究有了长足的进步。

2.1 Nav的结构

2011年,第一个原核钠通道结构NavAb的晶

体结构被解析^[18]。NavAb与真核Kv整体结构类似,其VSD处于激活态,但是阀门处于关闭态,因此可以认为是处于预开放态(pre-open state)。2012年,失活态(inactivated state)原核钠通道NavRh的晶体结构被解析^[19],同期《自然》杂志还报道了NavAb另外两种失活状态的晶体结构^[20]。此外,经过长期的努力,Wallace实验室最终获得完全开放状态的原核钠通道NavMs的高分辨率晶体结构^[21]。基于NavAb的晶体结构,Ahuja等^[22]阐明了药物小分子选择性抑制真核钠通道Nav1.7的结构基础,为药物研发提供了重要依据。近年来,生物学家颜宁在真核钠通道结构解析方面取得了出色的成果。2017年,颜宁实验室率先报道了第一个真核钠通道NavPaS近原子分辨率的电镜结构,揭示了真核钠通道的整体结构^[23]。最近,颜宁实验室又报道了NavPaS与多个毒素复合物的结构,其中河豚毒素与蛤蚌毒素结合在选择性滤器入口附近,阻断了钠离子的进入,而蜘蛛毒素(Dc1a)则结合在通道外侧第二个VSD与孔道结构域之间的空隙^[24]。颜宁实验室在真核钠通道复合物结构研究方面也取得了巨大进展。2017年,他们率先报道了来源于电鳗的EeNav1.4的电镜结构,该结构第一次揭示了 β 亚基的结构及其与 α 亚基的相互作用^[25]。最近,他们又报道了人源Nav1.4与 $\beta 1$ 亚基复合物的电镜结构^[26]。

2.2 Nav的离子选择性

尽管原核钠通道和真核钠通道都具有钠离子选择性,但其在选择性滤器上存在差别。原核钠通道具有4次对称性,而真核钠通道不具有对称性。以NavAb为例,其形成选择性滤器的氨基酸为TLESW,其中的谷氨酸Glu177形成选择性滤器最窄的区域,对钠离子选择性至关重要^[18]。与钾通道相比,原核钠通道选择性滤器较宽,表明钠离子是以水化或部分水化的形式通过选择性滤器(图2)。Wallace实验室曾报道原核钠通道NavMs的选择性滤器上存在多个钠离子结合位点^[27];但是由于在晶体学上钠离子与水分子难以区分,目前对原核钠通道钠离子选择性的机制认识仍然十分有限。真核钠通道选择性滤器上具有高度保守的DEKA基序,4个氨基酸残基分别来自4个6-TM结构域。与原核钠通道类似,真核钠通道选择性滤器也很短,DEKA前后分别有一个 α 螺旋,分别称为P1(pore helix 1)和P2(pore helix 2)。尽管目前真核

钠通道结构的最高分辨率已经达到0.26 nm^[24],人们对真核钠通道钠离子选择性机制的认识仍然非常有限。在NavPaS-Dc1a和NavPaS-Dc1a-TTX复合物结构中,钠离子选择性滤器口附近有一个潜在的钠离子结合位点(DEE位点),由来自DEKA基序中的Asp375、Glu701和第二个6-TM的P2上的Glu704配位,这对真核钠通道钠离子选择性的机制认识有所启发^[24]。

2.3 Nav的门控机制

Nav具有多种状态,包括关闭态、开放态、快失活态和慢失活态。VSD本身的性质决定了在溶液状态下其处于激活态,所以目前已知Nav的结构中VSD都处于激活态。Nav的VSD结构特征与Kv类似,都具有高度保守的精氨酸、3₁₀螺旋和电荷转移中心等^[18-21],所以尽管目前没有处于静息态的钠通道VSD的结构,我们有理由推测Nav可能采用与Kv类似的电压门控机制。慢失活态的原核钠通道NavAb和NabRh的结构表明,在慢失活状态下钠通道的孔道结构域发生构象变化,选择性滤器塌陷堵塞,膜对称性缺失,导致钠离子不能通过^[19-20]。而真核钠通道的结构为揭示钠通道的快失活机制提供了结构信息。在EeNav1.4和人源Nav1.4的结构中,Ⅲ-IV linker之间的IFM快失活基序结合在第Ⅲ和第Ⅳ个6-TM结构域的S4-S5 linker和S6形成的口袋里,而没有直接阻断阀门,从而说明IFM快失活基序可能通过别构效应来调控钠通道的开关^[25-26]。IFM快失活基序与第Ⅲ和第Ⅳ个6-TM结构域的S4-S5 linker和S6相互作用,可能限制了其在正常状态下开放的构象变化,从而导致钠通道快速失活^[25-26]。

3 瞬时受体电位通道

TRP一般为同源或异源四聚体非选择性阳离子通道,人类基因组共编码27个成员,包括TRPV1~6、TRPC1和TRPC3~7、TRPM1~8、TRPA1、TRPML1~3、TRPP1~3^[28]。TRP通道也具有6-TM结构域,在6-TM结构域外通常含有较大的水溶性结构域。尽管某些TRP通道具有一定的电压依赖性,但是TRP通道的S1~S4通常不能感受膜电位的变化,为非电压门控离子通道。TRP通道可以感受并响应一系列刺激,如PIP₂等配体、钙离子、温度、机械力等。

3.1 TRP的结构

2013年底,高分辨率TRPV1的电镜结构解析标志着冷冻电镜结构生物学进入了一个新时代。

生物学家程亦凡利用新的冷冻电镜技术率先解析了关闭态和开放态TRPV1的冷冻电镜结构,揭示了TRPV1的整体结构和配体门控机制^[29-30]。他们还进一步解析了结合在脂纳米盘(lipid nanodisc)中的TRPV1的电镜结构,为研究离子通道在脂环境下的电镜结构开创了先例^[31]。近年来,各种TRP通道的结构相继被解析,包括TRPA1^[32]、TRPV2^[33-35]、TRPV4^[36]、TRPV5^[37]、TRPV6^[38-39]、TRPP2^[40-42]、TRPML1^[43-44]、TRPML3^[45]、TRPM2^[46-47]、TRPM4^[48-51]、TRPM8^[52]、TRPC3^[53-54]、TRPC4^[55-56]、TRPC6^[53]、NOMPC^[57]、PKD2L1^[58-59]等(表1)。这些TRP的结构揭示了不同TRP的整体结构、门控机制、离子选择性的结构基础等,极大地丰富了人们对TRP结构和机制的认识,并为相关药物的研发提供了数据支持。

3.2 TRP的离子选择性

一般来讲,TRP为非选择性阳离子通道,各种阳离子包括钠离子、钾离子、钙离子等都可以通透。因此,大部分TRP的选择性滤器不具备钾通道、钠通道那样高度保守的序列和结构特征。但是,某些TRP具有一定的选择性,如TRPV5和TRPV6对钙离子具有选择性,而TRPM4和TRPM5可以通透单价阳离子如钠离子和钾离子,但是不能通透二价阳离子如钙离子和镁离子。具有离子选择性的TRP其选择性滤器也有相应的结构特征。TRPM4的高分辨率电镜结构显示,TRPM4的选择性滤器较宽,对角线原子之间的最短距离在0.8 nm左右,表明离子是以水化形式通过;在选择性滤器中间有两团电子密度,可以认为是钠离子,钠离子与周围选择性滤器的主链羰基氧之间的距离在0.4~0.5 nm,表明主链羰基氧相当于第二水化层稳定选择性滤器中间的钠离子;选择性滤器中Gln973侧链与相邻亚基Gly972主链羰基氧形成很强的氢键,在一定程度上稳定了TRPM4选择性滤器的构象^[49]。单价阳离子如钾离子和钠离子的水化半径在0.4 nm以内,而二价阳离子如钙离子和镁离子的水化半径大于0.4 nm;水化半径的大小可能是影响TRPM4具有单价阳离子选择性的主要因素之一。TRPV6晶体结构和反常散射数据显示,在选择性滤器中有2个钙离子结合位点(位点1和2),另外在下方的中央腔(central cavity)中也有一个亲和力较弱的钙离子结合位点(位点3)。其中位点1与周围4个保守的天冬氨酸侧链之间的距离在0.24 nm左右,表明

表1 已知电压门控钾通道、电压门控钠通道、瞬时受体电位通道结构一览

Table 1 Statistics of Kv, Nav and TRP channel structures

| 通道家族 | 通道名称 | 分辨率(nm) | 状 态 | 结合配体或相互作用蛋白 | 参考文献 |
|----------|-----------|-------------|--------------|-----------------------|--------|
| 电压门控钾通道 | KcsA | 0.32 | 关闭态 | Apo | 1 |
| | KvAP | 0.32 | 开放态 | Apo | 3 |
| | Kv1.2 | 0.29 | 开放态 | 氧化还原酶的 β 亚基 | 4-5 |
| | Kv1.2-2.1 | 0.24 | 开放态 | 嵌合体 | 6 |
| | Eag1 | 0.38 | 关闭态 | 钙调素 | 7 |
| | Slo1.1 | 0.35 | 开放态 | Apo、钙离子 | 8-9 |
| | hERG1 | 0.38 | 开放态 | Apo | 10 |
| | KCNQ1 | 0.37 | 关闭态 | 钙调素 | 11 |
| 电压门控钠通道 | NavAb | 0.27 ~ 0.32 | 预开放态、(慢)失活态 | Apo, 突变体 | 18, 20 |
| | NavRh | 0.31 | (慢)失活态 | Apo | 19 |
| | NavMs | 0.25 | 开放态 | Apo | 21 |
| | Nav1.7 | 0.35 | 失活态 | 嵌合体, 拮抗剂 GX-936 等 | 22 |
| | NavPaS | 0.26 ~ 0.38 | 关闭态 | Apo, 河豚毒素, 蛤蚌毒素, 蜘蛛毒素 | 23-24 |
| | EeNav1.4 | 0.40 | 开放态 | β 1 亚基 | 25 |
| | Nav1.4 | 0.32 | 开放态 | β 1 亚基 | 26 |
| 瞬时受体电位通道 | TRPV1 | 0.38 | 关闭态、半开放态、开放态 | Apo、辣椒素、双结毒素/树脂毒素 | 29-30 |
| | TRPA1 | 约 0.40 | 关闭态 | Apo、拮抗剂 A-967079 | 32 |
| | TRPV2 | 0.31 ~ 0.50 | 关闭态、开放态 | Apo、钙离子、树脂毒素 | 33-35 |
| | TRPV4 | 0.38 | 关闭态 | Apo | 36 |
| | TRPV5 | 0.48 | 关闭态 | 拮抗剂益康唑 | 37 |
| | TRPV6 | 0.33 ~ 0.40 | 关闭态、开放态 | Apo, 突变体 | 38-39 |
| | TRPP2 | 0.30 ~ 0.43 | 关闭态 | Apo | 40-42 |
| | TRPML1 | 0.35 ~ 0.37 | 关闭态、开放态 | Apo、激动剂 ML-SA1 | 43-44 |
| | TRPML3 | 0.29 | 关闭态 | Apo | 45 |
| | TRPM2 | 0.30 ~ 0.38 | 关闭态 | 钙离子, 二磷酸腺苷核糖 | 46-47 |
| | TRPM4 | 0.29 ~ 0.38 | 关闭态 | ATP、钙离子、十钒酸 | 48-51 |
| | TRPM8 | 0.41 | 未知 | Apo | 52 |
| | TRPC3 | 0.33 ~ 0.44 | 关闭态 | Apo | 53-54 |
| | TRPC4 | 0.33 ~ 0.36 | 关闭态 | Apo | 55-56 |
| | TRPC6 | 0.38 | 关闭态 | 抑制剂 BTDM | 53 |
| | NOMPC | 0.36 | 关闭态 | Apo | 57 |
| | PKD2L1 | 0.34 | 开放态 | Apo | 58-59 |

Apo: 该离子通道没有结合配体或相互作用蛋白。

该位点的钙离子为去水化的形式(图2);位点2与周围氨基酸之间的配位距离在0.4 ~ 0.5 nm,表明该位点的钙离子为水化的形式^[38]。TRPV6对钙离子的选择性一方面取决于电荷,选择性过滤器上4个天冬氨酸侧链形成很强的负电势,易于招募二价钙离子;另一方面取决于离子去水化半径,0.24 nm左右的配位距离刚刚适合钙离子。

3.3 TRP的门控机制

目前解析的TRP结构大部分处于关闭状态

(表1)。TRPV1和TRPML1与配体复合物的结构分别揭示了各自开放状态,可以为我们理解TRP的门控机制提供参考。程亦凡实验室报道了TRPV1分别结合double-knot toxin/resiniferatoxin(DkTx/RTX)和辣椒素(capsaicin)配体时的电镜结构,并与Apo状态(关闭态)下的电镜结构进行比较^[29-30]。其中RTX和辣椒素均结合在S3、S4、S4-S5 linker以及相邻亚基的S5、S6包围形成的侧面凹槽中,而DkTx则结合在TRPV1通道外侧S6的氨

基端、pore helix 和 pore loop 附近。TRPV1 的门控机制与经典的 Kv 有所不同:①TRPV1 具有 2 个阀门,其选择性滤器也具有阀门的功能。结合辣椒素的 TRPV1 的下阀门(lower gate)处于半开放状态,而选择性滤器构象保持不变;同时结合 DkTx/RTX 的 TRPV1 的下阀门进一步开放,而且选择性滤器也发生了构象变化而导致开放;②在 TRPV1 开放过程中,S1~S4 结构域的构象保持基本不变,这与经典的电压门控离子通道差别较大。与 TRPV1 的门控机制类似,TRPML1 结合激动剂 ML-SA1 在选择性滤器和下阀门区域也发生了构象变化^[43]。ML-SA1 结合在孔道结构域侧面,pore helix 下面,S5、S6 和相邻亚基的 S5 形成的口袋中。结合 ML-SA1 后,选择性滤器整体向侧下方发生移动,同时 S6 的羧基末端向外旋转导致下阀门打开(图4)。

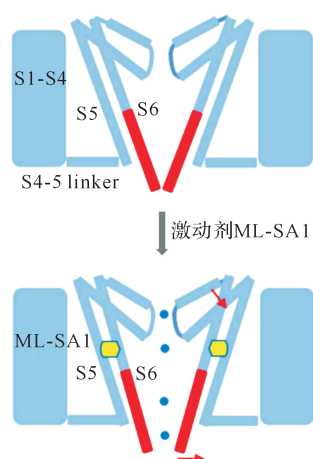


图4 TRPML1 的配体门控机制示意图

Figure 4 Ligand gating mechanism of TRPML1

4 离子通道结构生物学的发展趋势

离子通道在神经系统、心血管系统和肌肉系统中发挥着至关重要的作用,是人体各项生命活动所必需的一类生物大分子,同时也是重要的药物靶点。因此,离子通道结构生物学一直是结构生物学领域的研究热点。离子通道结构生物学研究从分子水平揭示了离子的跨膜运转、电信号的产生和传递等过程,并为药物研发提供坚实的结构数据。离子通道结构生物学的发展伴随着技术的革新。钾通道 KcsA 晶体结构的解析开创了重组表达膜蛋白用于结构生物学研究的新时代,而 TRPV1 高分辨率电镜结构的解析则标志着冷冻电

镜结构生物学进入原子分辨率时代。未来,离子通道结构生物学研究同样将推动技术和理念的革新。随着冷冻电镜技术的深入应用,我们预计未来离子通道结构生物学将会在以下几个方向有较大发展:①冷冻电子断层成像技术(cryo-electron tomography, cryo-ET)在离子通道结构生物学中的应用。cryo-ET 将用于揭示生理状态下超分子尺度上离子通道的定位和结构,为阐明离子通道的生理功能提供更多生理状态下的细节。②离子通道复合物结构解析。生理状态下离子通道可受其他蛋白的调控,解析离子通道与其他调控蛋白复合物的结构也将成为未来的重要研究方向。③基于离子通道冷冻电镜结构的药物研发。冷冻电镜技术的应用大大提高了离子通道和药物小分子复合物结构解析的效率,更快捷地为药物研发提供结构信息。④离子通道动态结构解析。总之,冷冻电镜技术的应用让我们可以看到离子通道多个不同状态的构象,有助于阐明离子通道动态结构变化的完整过程。

参考文献

- [1] DOYLE D A, MORAIS C J, PFUETZNER R A, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity [J]. *Science*, 1998, 280(5360):69-77.
- [2] YU F H, CATTERALL W A. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis [J]. *Sci STKE*, 2004, 2004 (253):re15.
- [3] JIANG Y, LEE A, CHEN J, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel [J]. *Nature*, 2003, 423 (6935):33-41.
- [4] LONG S B, CAMPBELL E B, MACKINNON R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent shaker family K⁺ channel [J]. *Science*, 2005, 309 (5736):897-903.
- [5] LONG S B, CAMPBELL E B, MACKINNON R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling [J]. *Science*, 2005, 309 (5736):903-908.
- [6] LONG S B, TAO X, CAMPBELL E B, et al. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment [J]. *Nature*, 2007, 450 (7168):376-382.
- [7] WHICHER J R, MACKINNON R. Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism [J]. *Science*, 2016, 353

- (6300):664-669.
- [8] TAO X, HITE R K, MACKINNON R. Cryo-EM structure of the open high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel[J]. **Nature**, 2017, 541(7635):46-51.
 - [9] HITE R K, TAO X, MACKINNON R. Structural basis for gating the high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel[J]. **Nature**, 2017, 541(7635):52-57.
 - [10] WANG W, MACKINNON R. Cryo-EM structure of the open human ether-à-go-go-related K^{+} channel hERG [J]. **Cell**, 2017, 169(3):422-430.e10.
 - [11] SUN J, MACKINNON R. Cryo-EM structure of a KCNQ1/CaM complex reveals insights into congenital long QT syndrome [J]. **Cell**, 2017, 169(6):1042-1050.e9.
 - [12] ZHOU Y, MORAIS-CABRAL J H, KAUFMAN A, et al. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^{+} channel-Fab complex at 2.0 Å resolution[J]. **Nature**, 2001, 414(6859):43-48.
 - [13] YE S, LI Y, JIANG Y. Novel insights into K^{+} selectivity from high-resolution structures of an open K^{+} channel pore[J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2010, 17(8):1019-1023.
 - [14] SAUER D B, ZENG W, CANTY J, et al. Sodium and potassium competition in potassium-selective and non-selective channels[J]. **Nat Commun**, 2013, 4:2721.
 - [15] TAO X, LEE A, LIMAPICHAT W, et al. A gating charge transfer center in voltage sensors [J]. **Science**, 2010, 328(5974):67-73.
 - [16] TAKESHITA K, SAKATA S, YAMASHITA E, et al. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel [J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2014, 21(4):352-357.
 - [17] GUO J, ZENG W, CHEN Q, et al. Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from Arabidopsis thaliana [J]. **Nature**, 2016, 531(7593):196-201.
 - [18] PAYANDEH J, SCHEUER T, ZHENG N, et al. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel [J]. **Nature**, 2011, 475(7356):353-358.
 - [19] ZHANG X, REN W, DECAEN P, et al. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel [J]. **Nature**, 2012, 486(7401):130-134.
 - [20] PAYANDEH J, GAMAL E T M, SCHEUER T, et al. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states [J]. **Nature**, 2012, 486(7401):135-139.
 - [21] SULA A, BOOKER J, NG L C T, et al. The complete structure of an activated open sodium channel [J]. **Nat Commun**, 2017, 8:14205.
 - [22] AHUJA S, MUKUND S, DENG L, et al. Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist [J]. **Science**, 2015, 350(6267):aac5464.
 - [23] SHEN H, ZHOU Q, PAN X, et al. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution [J]. **Science**, 2017, 355(6328):eaal4326.
 - [24] SHEN H, LI Z, JIANG Y, et al. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins [J]. **Science**, 2018, 362(6412):eaau2596.
 - [25] YAN Z, ZHOU Q, WANG L, et al. Structure of the $\text{Na}_v1.4$ - $\beta 1$ complex from electric eel [J]. **Cell**, 2017, 170(3):470-482.e11.
 - [26] PAN X, LI Z, ZHOU Q, et al. Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1.4 in complex with $\beta 1$ [J]. **Science**, 2018, 362(6412):eaau2486.
 - [27] NAYLOR C E, BAGNÉRIS C, DECAEN P G, et al. Molecular basis of ion permeability in a voltage-gated sodium channel [J]. **EMBO J**, 2016, 35(8):820-830.
 - [28] CLAPHAM D E, RUNNELS L W, STRÜBING C. The TRP ion channel family [J]. **Nat Rev Neurosci**, 2001, 2(6):387-396.
 - [29] CAO E, LIAO M, CHENG Y, et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms [J]. **Nature**, 2013, 504(7478):113-118.
 - [30] LIAO M, CAO E, JULIUS D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy [J]. **Nature**, 2013, 504(7478):107-112.
 - [31] GAO Y, CAO E, JULIUS D, et al. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action [J]. **Nature**, 2016, 534(7607):347-351.
 - [32] PAULSEN C E, ARMACHE J P, GAO Y, et al. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms [J]. **Nature**, 2015, 525(7570):552.
 - [33] ZUBCEVIC L, HERZIK M A JR, CHUNG B C, et al. Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel [J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2016, 23(2):180-186.
 - [34] HUYNH K W, COHEN M R, JIANG J, et al. Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM [J]. **Nat Commun**, 2016, 7:11130.
 - [35] ZUBCEVIC L, LE S, YANG H, et al. Conformational plasticity in the selectivity filter of the TRPV2 ion channel [J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2018, 25(5):405-415.
 - [36] DENG Z, PAKNEJAD N, MAKSAEV G, et al. Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms [J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2018, 25(3):252-260.
 - [37] TET H, LODOWSKI D T, HUYNH K W, et al. Structural basis of TRPV5 channel inhibition by econazole revealed by cryo-EM [J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2018, 25(1):53-60.
 - [38] SAOTOME K, SINGH A K, YELSHANSKAYA M V, et al. Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6 [J]. **Nature**, 2016, 534(7608):506-511.
 - [39] MCGOLDRICK L L, SINGH A K, SAOTOME K, et al. Opening of the human epithelial calcium channel

- TRPV6[J]. **Nature**, 2018, 553(7687):233-237.
- [40] SHEN P S, YANG X, DECAEN P G, et al. The structure of the polycystic kidney disease channel PKD2 in lipid nanodiscs[J]. **Cell**, 2016, 167(3):763-773.e11.
- [41] GRIEBEN M, PIKE A C W, SHINTRE C A, et al. Structure of the polycystic kidney disease TRP channel polycystin-2 (PC2)[J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2017, 24(2):114-122.
- [42] WILKES M, MADEJ M G, KREUTER L, et al. Molecular insights into lipid-assisted Ca^{2+} regulation of the TRP channel polycystin-2 [J]. **Nat Struct Mol Biol**, 2017, 24(2):123-130.
- [43] SCHMIEGE P, FINE M, BLOBEL G, et al. Human TRPML1 channel structures in open and closed conformations[J]. **Nature**, 2017, 550(7676):366-370.
- [44] CHEN Q, SHE J, ZENG W, et al. Structure of mammalian endolysosomal TRPML1 channel in nanodiscs[J]. **Nature**, 2017, 550(7676):415-418.
- [45] HIRSCHI M, HERZIK M A JR, WIE J, et al. Cryo-electron microscopy structure of the lysosomal calcium-permeable channel TRPML3 [J]. **Nature**, 2017, 550(7676):411-414.
- [46] ZHANG Z, TÓTH B, SZOLLOSI A, et al. Structure of a TRPM2 channel in complex with Ca^{2+} explains unique gating regulation[J/OL]. **Elife**, 2018, 7:e36409.
- [47] HUANG Y, WINKLER P A, SUN W, et al. Architecture of the TRPM2 channel and its activation mechanism by ADP-ribose and calcium [J]. **Nature**, 2018, 562(7725):145-149.
- [48] WINKLER P A, HUANG Y, SUN W, et al. Electron cryo-microscopy structure of a human TRPM4 channel [J]. **Nature**, 2017, 552(7684):200-204.
- [49] GUO J, SHE J, ZENG W, et al. Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4[J]. **Nature**, 2017, 552(7684):205-209.
- [50] AUTZEN H E, MYASNIKOV A G, CAMPBELL M G, et al. Structure of the human TRPM4 ion channel in a lipid nanodisc[J]. **Science**, 2018, 359(6372):228-232.
- [51] DUAN J, LI Z, LI J, et al. Structure of full-length human TRPM4[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2018, 115(10):2377-2382.
- [52] YIN Y, WU M, ZUBCEVIC L, et al. Structure of the cold - and menthol-sensing ion channel TRPM8 [J]. **Science**, 2018, 359(6372):237-241.
- [53] TANG Q, GUO W, ZHENG L, et al. Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels[J]. **Cell Res**, 2018, 28(7):746-755.
- [54] FAN C, CHOI W, SUN W, et al. Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3[J/OL]. **Elife**, 2018, 7:e36852.
- [55] VINAYAGAM D, MAGER T, APELBAUM A, et al. Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel[J/OL]. **Elife**, 2018, 7:e36615.
- [56] DUAN J, LI J, ZENG B, et al. Structure of the mouse TRPC4 ion channel [J]. **Nat Commun**, 2018, 9(1):3102.
- [57] JIN P, BULKLEY D, GUO Y, et al. Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC[J]. **Nature**, 2017, 547(7661):118-122.
- [58] SU Q, HU F, LIU Y, et al. Cryo-EM structure of the polycystic kidney disease-like channel PKD2L1 [J]. **Nat Commun**, 2018, 9(1):1192.
- [59] HULSE R E, LI Z, HUANG R K, et al. Cryo-EM structure of the polycystin 2-11 ion channel [J/OL]. **Elife**, 2018, 7:e36931.

[本文编辑 刘丽娜 沈 敏]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

谁是作者?

国际医学期刊编辑委员会于2016年修订的《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发布的推荐规范》(<http://www.icmje.org/recommendations/>)提出根据以下四条标准确定作者身份:①对研究工作的思路或者设计有重要贡献,或者为研究获取、分析或解释数据;②起草研究论文或者在重要智力性内容上对论文进行修改;③对将要发表的本作最终定稿;④同意对研究工作的各个方面承担责任以确保与论文任何部分的精确性或诚信有关的问题得到恰当的调查和解决。所有被指定为作者的人都应该同时满足以上四条标准,而同时满足以上四条标准者也都应该被确定为作者。未满足以上四条标准而对论文有贡献者应该被致谢,如筹集研究基金、对研究团队进行综合管理、帮助写作、技术编辑、语言编辑和校样修改等。通信作者是在投稿、同行评议及出版过程中主要负责与期刊联系的人。