

生命科学研究的又一个里程碑

——记 2003 年度诺贝尔化学奖

陈联万 李姗姗 汲娟娟*

(中国科学院生物物理研究所脑与认知科学研究中心, 中国科学院视觉信息加工重点实验室, 北京 100101)

摘要 瑞典皇家科学院宣布, 美国的两位科学家 Agre 和 MacKinnon, 因他们在细胞膜物质转运通道蛋白质研究方面的重要发现分享 2003 年度诺贝尔化学奖. Agre 发现了水通道 (water channel), 并且解释了水通道对水分子的选择性通透等重要特性; MacKinnon 确立了 K^+ 离子通道的高分辨率的三维结构, 并且详细地阐明了其离子选择性等功能机制. 两位科学家把他们对科学研究前沿领域的高度敏感性与科学的方法论紧密结合在一起. 他们从化学基础研究出发, 为生命科学前沿领域后基因组的研究作出了卓越贡献.

关键词 2003 年度诺贝尔化学奖, 水通道, K^+ 通道, 分子结构, 信号转导

学科分类号 Q73

2003 年 10 月 8 日, 瑞典首都斯德哥尔摩传出消息, 本年度诺贝尔化学奖的桂冠授予了两位美国科学家 Agre 和 MacKinnon. Agre 发现了人们在 100 年前就开始注目的水通道蛋白并描述了其分子特征, MacKinnon 阐明了钾离子通道结构及其功能机制. 他们在细胞物质转运通道蛋白的功能机制方面的贡献令人震惊和兴奋, 堪称膜蛋白结构与功能乃至生命科学研究领域的里程碑.

细胞是生物体的基本功能单元, 它相对独立, 同时不停顿地与外界发生作用和反作用. 脂双层能够有效地限制水、离子以及其他极性分子的进出, 保护细胞内环境. 然而, 当细胞对内外信号应答时, 需要迅速的物质跨膜转运, 而构筑在细胞膜上的功能蛋白质分子是帮助这些物质跨膜运动的重要环节, 其中通道蛋白沿着浓度下降的方向转运物质, 而 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶沿着浓度上升的方向转运物质.

膜蛋白分子是细胞与外界相互作用的枢纽. 它们在细胞内外信号的作用下, 发生构像变化, 以此调节细胞功能, 沟通细胞内外信号系统间的相互作用, 成为当今生命科学研究的热点领域.

生命对于水和多种离子的依赖, 决定了解读水通道和离子通道蛋白分子功能机制的重要性. 水通道在任何生物体内都有表达. 它参与调节细胞容积和细胞内渗透压, 同时在体液平衡中发挥重要功能, 如尿液在肾脏中生成的过程. 对于植物, 水通道在水分吸收和维持体内水平衡方面起到重要作用.

离子通道蛋白, 是细胞产生并传递电信号的分子基础, 在包括神经信息网络的生物体信息系统中

起到关键作用. 各种类型的离子通道选择性地、迅速地导通离子, 并且其开放几率及电导率接受配体、跨膜电位、机械负荷 (mechanical stress)、温度、细胞内第二信使、细胞内代谢水平等化学和物理信号的调节. 因此离子通道的功能状态关系到人体所有器官的健康, 包括脑、心脏、肌肉…….

由于膜蛋白分子在细胞的表达量和疏水基的限制, 给膜蛋白的纯化、分子序列和空间结构的确定、功能预测等一系列研究带来困难.

1 Agre 和 MacKinnon 的工作

1.1 水通道 (water channel)

早在 19 世纪中叶, 人们就推测膀胱等生物组织或细胞壁存在水分子和小分子溶质的通道. 20 世纪 50 年代确定了选择性地通透水分子的水通道的存在, 水可以通过它快速地进入红细胞. 另外, 它甚至能够在对 H_2O 分子保持 109 分子/s 之高的通透率的同时, 阻止阳离子 H_3O^+ 通过. 但是, 直到 1987 年, 水通道的本质还不清楚, 人们还在争论水特异性通透区即水通道的真正概念^[1].

Agre 发现了这使人们久久困惑的水通道. 20 世纪 80 年代中期, Agre 用红细胞膜研究 Rh 血液型抗原. 他从红细胞和肾小管中纯化了一种功能未知、分子质量为 28 ku 的新型膜蛋白 CHIP28^[2], 获得了 CHIP28 的 N 端肽链序列^[3] 和 cDNA 的全长

* 通讯联系人.

Tel: 010-64888534, E-mail: jijj@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2003-11-12, 接受日期: 2003-11-19

序列^[4]. 将转染 (transfection) 了 CHIP28 的非洲爪蟾卵母细胞置入低渗透压媒质中, 细胞迅速膨胀^[5] (图 1). 另外, 将纯化的 CHIP28 再造于脂

质体也观察到了类似现象^[6]. 两者的膨胀, 都能被红细胞膨胀的阻断剂 Hg^{2+} 抑制. 上述结果表明 CHIP28 就是人们注目已久的水通道.

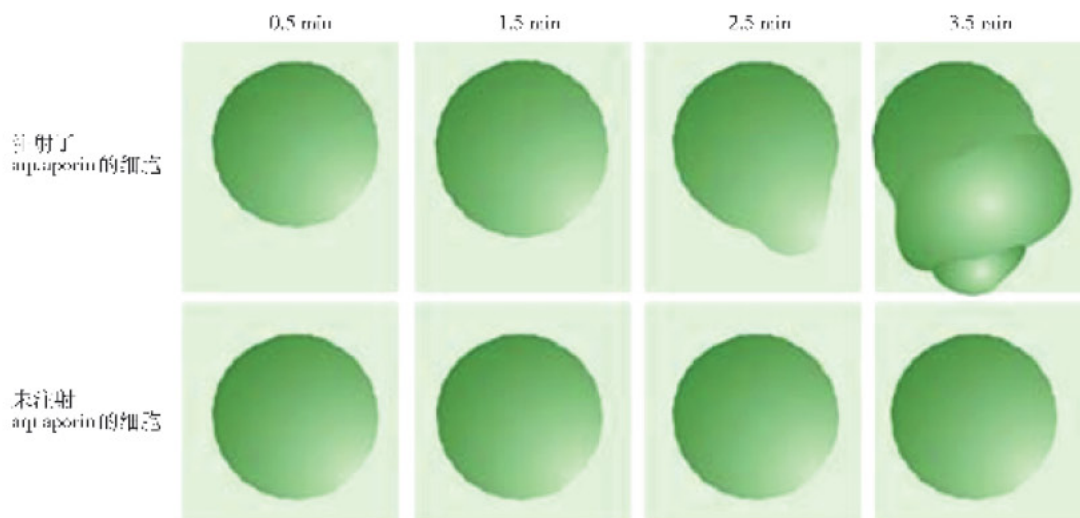


Fig. 1 *Xenopus* oocytes microinjected with AQP1 mRNA swell rapidly when placed in a hypo-osmotic medium, in contrast to noninjected oocytes (<http://www.Nobel.Se>)

图 1 在非洲爪蟾卵母细胞内显微注射 AQP1 的信使 RNA, 移入低渗透压溶液, 卵母细胞迅速膨胀
对照组未施行显微注射 (<http://www.Nobel.Se>).

CHIP28 (现称 aquaporin 1 或 AQP1) 的发现, 在细胞水通道的研究中是决定性的进展. aquaporin 类似体蛋白普遍表达于生物界, 仅在人体中就表达有至少 11 种, 其中多数与疾病有关联^[7,8]. 植物中 Aquaporin 的种类更多, 在模式植物 *Arabidopsis thaliana* 中现已发现有不下 35 种的 aquaporin 蛋白^[9]. 人体内 aquaporin 蛋白的生理意义也许在肾脏是最突出的, 肾脏每天回收的水达 150 ~ 200 L 之多, 可能主要依靠 AQP1 和 AQP2 两种 aquaporin 蛋白质分子. AQP1 表达于近曲小管和下位的近直小管, AQP2 表达于收集管. AQP2 蛋白在细胞膜上的表达受抗利尿素的调节, 并且其表达量的增减, 关系到肾源性糖尿病的潜伏性, 也有个别病例表明在某些特殊情况下它与淤血性心力衰竭有关^[10].

2000 年和 2001 年, AQP1 蛋白和嗜丙三醇细菌型通道蛋白 (GlpF) 的高分辨率 3D 结构被报道^[11~14]. 基于这些构造建立起的详细的分子模型, 解释了对水分子的高通透率、精确的选择性^[15,16]. 水通道的中间孔道部分存在阳性静电区, 水分子是极性分子, 通过孔道时可以不断调节自身的电偶极距方向, 将负电区即氧原子侧朝向通道的阳性静电

区, 刚好可以沿着渗透压上升的方向扩散 (图 2).

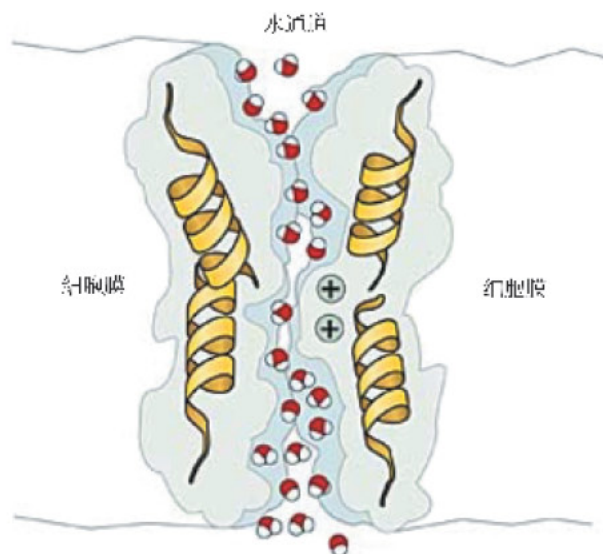


Fig. 2 Passage of water molecules through the aquaporin AQP1 (<http://www.Nobel.Se>)

图 2 水分子通过 aquaporin 蛋白 AQP1
由于在通道的中央带阳性静电荷, 带电荷的离子如 H_3O^+ 的运动受到控制. 这样可以防止离子通过通道 (<http://www.Nobel.Se>).

Agre 关于 Aquaporin 的发现不仅在水通道功能研究中具有划时代的意义,同时也迈出了由生物化学到生理学、药理学的关键步伐。由于他们的贡献,我们能够在原子水平理解真核生物和原核生物水通道的关键功能,并且由此引发的关于其功能以及健康与疾病关系的研究也十分活跃。

1.2 离子通道

同样是 19 世纪末, Ostwald (1909 年诺贝尔化学奖得主), 根据人工胶质膜的实验, 提出对于活组织标本, 电流有可能发生于离子穿过细胞表面的过程中。进入 20 世纪, 人类建立了膜电位的电生理学说, 阐明了狭窄的离子通透域即离子通道的存在。

此后, Hodgkin 和 Huxley 在 20 世纪 50 年代研究离子通过乌贼巨轴突形脂膜的机制 (获 1963 年诺贝尔生理学及医学奖), 开拓了现代神经生理学 (neurophysiology)。他们分别阐明了神经细胞动作电位的模式, 以及电位依存性 Na^+ 、 K^+ 离子通道都表达在细胞膜上, 证明了 K^+ 也是逐个地通过细胞膜, 还进一步证实了离子通道的膜镶嵌结构。20 世纪 60 和 70 年代, 生物化学的工作, 还主要是在几个实验室, 运用电鰻放电进行离子通道蛋白的生物化学鉴定, 研究配体门控乙酰胆碱受体 (Cys-loop 型离子通道受体家族的一员)。乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor) 低分辨率结构的研

究, 揭示了细胞外较大的漏斗状部分连通狭窄的膜通道。当时已经确立了迅速导通、离子选择性、门控机制、失活等对离子通道的核心认识, 但是其中的分子机理还完全不明确。

由于生物物理技术的发展, 在 1970 年就确定了神经细胞电压门控 Na^+ 、 K^+ 通道的选择性通透部位的尺度, 并且揭示了通道的电压门控位点与选择性通透区域具有不同的结构要素。Neher 和 Sakmann 提出的单通道记录的 patch-clamp 技术 (1991 年诺贝尔生理学及医学奖), 与克隆、诱导突变以及通道蛋白在非洲爪蟾卵母细胞表达技术的结合, 使各种各样的离子通道的功能及其对应的结构域相继被描述出来。

20 世纪 90 年代中期, 阐明了带有 p-loop 的离子通道蛋白的选择性通透区附近存在细胞外末端, 在门控区域附近存在细胞内末端。当有直径相当的离子通过某种途径进入到选择性通透区, 便优先地找到与区域内氧原子的合理的相对位置, 从而实现选择性通透。然而由于门控域的结构尚不清楚, 很难详细地勾画出选择性通透域的分子样式, 除非能够得到高分辨率结构信息, 否则举步维艰^[17]。

MacKinnon 成功地确定了有关离子通道的第一个高分辨率 3D 结构。这个源于链霉菌 *Streptomyces lividans* 的 KcsA K^+ 通道结构^[18] (图 3), 解释了通

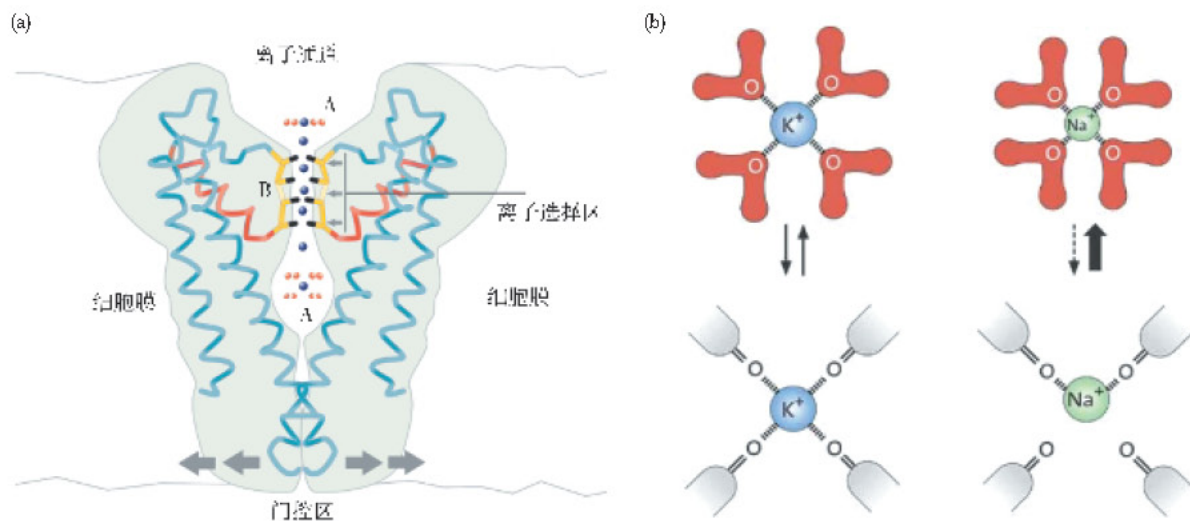


Fig. 3 The ion channel permits passage of potassium ions but not sodium ions (<http://www. Nobel. Se>)

图 3 KcsA K^+ 离子通道允许钾离子通过, 却不允许钠离子通过

这种离子通道离子过滤部分的氧原子构成与外部水溶液内十分相似的环境。细胞能够控制通道的开闭。(a) 在离子通道的外侧。在细胞膜外侧, 离子的空间位置被水分子限定, 保持到达 H_2O 中氧原子的距离为一定。(b) 在离子选择区内。钾离子在离子选择区内与氧原子的距离相同于在外部的水中情形。钠离子的空间限度小于钾离子, 不适于离子选择区内氧原子的空间位置。这样可以防止其通过此离子通道 (<http://www. Nobel. Se>)。

道的离子选择性和高导通率。钾通道中央孔道部分形成离子过滤区域,此区域的氧原子排列逼真地模拟了钾离子水合物中氧原子的位置模式,使钾离子在过滤区域内找到合适的位置的几率不低于在通道外的水溶液中。这样,当门控装置被激活时便有机会在跨膜电位的驱使下快速通过通道。而对于同属一价阳离子的 Na^+ , 因为其空间尺度小于 K^+ , 情况就不同了^[19]。上述研究结果无疑促进了面临困难的关于离子通道分子机械学的研究。

KcsA K^+ 结构展示的是一种通道闭锁状态的构造。次年, MacKinnon 又解析了细菌型 Ca^{2+} 活化的 K^+ 通道 MthK 的结构^[20], 捕捉到这种通道在开放状态的构象。两种构象的对比提示了具有普遍意义的通道门控机理^[21], 即当传感域牵拉跨膜螺旋使之与通道蛋白的细胞内末端分离, 造成门控域的构象变化。

一些离子通道是单方向导通的“分子二极管”, 这种内向整流特性所对应的离子通道蛋白的结构域, 以及离子通道失活机制的球与链 (ball-and-chain) 模型也是由 MacKinnon 确定的^[22,23]。在过去的几年里, X 射线和电子结晶学方法的研究促进了详细的乙酰胆碱受体模型的建立^[24~28]。与此同时, 膜蛋白质结构研究拓展为分子机械构造依赖的分子功能研究^[29,30], 并且开始涉及到越来越多的明显与疾病相关的离子通道^[31,32]。

MacKinnon 创意不减, 最近又确定了在抗体断片直接与电压敏感区靠近时的 K^+ 通道 KvAP 的电压门控的构造^[33]。抗体断片拖拉电压感受域离开离子通道本身, 尽管其详细结构还没有确定, 但这项工作再一次提供了详细考察电压感受的分子机械学原理的第一手资料。

MacKinnon 有关 K^+ 通道结构的分子机械学的工作, 解明了离子选择性、门控、失活等离子通道特征的分子基础, 开辟了从原子水平进行离子通道功能的生物化学、生物物理学和理论研究的可能性。他们的发现为认识许多神经学上的、肌肉的、心脏的疾病提供了坚实的基础^[34,35], 开辟了药物设计的新的可能性。

2 讨 论

蛋白质结构与功能研究是后基因组科学中的重要组成部分, 而其中的膜蛋白研究直接涉及生物组织器官功能和生物信息系统, 并且具有一定的技术上的挑战性。荣获本年度化学奖的两位科学家

Agre 和 MacKinnon 正是在水通道和离子通道的研究中取得了重要进展。Agre 发现水通道蛋白 aquaporin, MacKinnon 详细地描述了 K^+ 通道的结构和功能机理, 使我们对膜蛋白的认识在短短十余年里, 取得了飞跃的进步。他们在蛋白质功能研究中引入分子机械学 (Molecular Biomechanics) 的观点, 使我们开始精确地认识膜蛋白分子机械在原子水平的动作, 开辟了全新的更深层次的研究领域, 同时, 又把有关原子水平上的分子功能机制的基础研究与健康和疾病联系在一起, 把我们带到病理学和药理学研究乃至药物设计的更加精细的新境界。二位科学家在科学意识、研究方法以及对科学的贡献都是发人深省的。

包括膜蛋白在内的蛋白质组学研究是继基因组研究之后生命科学的另一个高潮。随着生物物理学技术的迅速发展, 在蛋白质功能和结构方面积累了大量成果。然而其中许多蛋白质在生物体、组织、活细胞内的功能清楚但结构不详, 或结构清楚但在生物体、组织、活细胞内生理功能不详。对这些蛋白质完整的理解必将带来蛋白质科学乃至生命科学全领域的巨大突破。

纵观历届诺贝尔奖, 获奖成果大多经历数十年的考验, 而 MacKinnon 的主要工作首次发表在 1998 年, 仅短短的 5 年时间, Agre 的主要工作首次发表于 1988 年, 也不过 15 年。这在诺贝尔奖创立以来是罕见的, 但是, 这与当前生命科学研究积累日益雄厚、科研周期日益缩短的现状相符。

本文谨就 Agre 和 MacKinnon 的工作概略记述, 还有更详尽的资料有助于更多地了解这二位科学家^[36~39]。

参 考 文 献

- 1 Finkelstein A. Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. New York: Wiley Interscience, 1987. 203 ~ 222
- 2 Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, *et al.* Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28 000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubule. J Biol Chem, 1988, **263**: 15634 ~ 15642
- 3 Smith B L, Agre P. Erythrocyte Mr 28 000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. J Biol Chem, 1991, **266**: 6407 ~ 6415
- 4 Preston G M, 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
- 5 Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science, 1992, **256**: 385 ~ 387
- 6 Zeidel M L, Ambudkar S V, Smith B L, *et al.* Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. Biochemistry, 1992, **31**: 7436 ~ 7440

- 7 Agre P, King L S, Yasui M, *et al.* Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 2002, **542**: 3 ~16
- 8 Schrier R W, Cadnapaphornchai M A. Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003, **81**: 117 ~131
- 9 Javot M, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot*, 2002, **90**: 301 ~313
- 10 King L S, Yasui M. Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, **13**: 355 ~360
- 11 Fu D, Libson A, Miercke L J, *et al.* Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, 2000, **290**: 481 ~486
- 12 Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, *et al.* Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 2000, **407**: 599 ~605
- 13 Ren G, Reddy V S, Cheng A, *et al.* Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 1398 ~1403
- 14 Sui H, Han B G, Lee J K, *et al.* Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 2001, **414**: 872 ~878
- 15 de Groot B L, Grubmüller H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 2001, **294**: 2353 ~2357
- 16 Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen M O, *et al.* Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*, 2002, **296**: 525 ~530
- 17 Armstrong C M, Hille B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 1998, **20**: 371 ~380
- 18 Doyle D, Cabral J, Pfuetzner R, *et al.* The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and sensitivity. *Science*, 1998, **280**: 69 ~77
- 19 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. *Nature*, 2001, **414**: 43 ~48
- 20 Jiang Y, Lee A, Chen J, *et al.* Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 2002, **417**: 515 ~522
- 21 Jiang Y, Lee A, Chen J, *et al.* The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 2002, **417**: 523 ~526
- 22 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
- 23 Zhou M, Morais-Cabral J H, Mann S, *et al.* Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*, 2001, **411**: 657 ~661
- 24 Breje K, van Dijk W J, Klaassen R V, *et al.* Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 2001, **411**: 269 ~276
- 25 Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 2003, **424**: 949 ~955
- 26 Toyoshima C, Unwin N. Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature*, 1988, **336**: 247 ~250
- 27 Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol*, 1993, **229**: 1101 ~1124
- 28 Unwin N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, 1995, **373**: 37 ~43
- 29 Bass R B, Strop P, Barclay M, *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science*, 2002, **298**: 1582 ~1587
- 30 Chang G, Spencer R, Lee A, *et al.* Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. *Science*, 1998, **282**: 2220 ~2226
- 31 Dutzler R, Campbell E B, Cadene M, *et al.* X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 2002, **415**: 287 ~294
- 32 Dutzler R, Campbell E B, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science*, 2003, **300**: 108 ~112
- 33 Jiang Y, Lee A, Chen J, *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 2003, **423**: 33 ~41
- 34 Cooper E C, Jan L Y. Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 4759 ~4766
- 35 Hatta S, Sakamoto J, Horio Y. Ion channels and diseases. *Med Electron Microsc*, 2002, **35**: 117 ~126
- 36 Agre P, Konozo D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Letters*, 2003, **555**: 72 ~78 (<http://www.elsevier.nl/febs/14/241/article.pdf>)
- 37 MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Letters*, 2003, **555**: 62 ~65 (<http://www.elsevier.nl/febs/14/show/toc.htm>)
- 38 Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 2002, **419**: 35 ~42
- 39 Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot B L, *et al.* Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, **12**: 509 ~515

Another Milestone of The Life Sciences Research ——The Nobel Prize in Chemistry 2003

CHEN Lian-Wan, LI Shan-Shan, JI Juan-Juan*

(Laborary of Visual Information Processing, Centre for Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The Royal Swedish Academy of Sciences announced that The Nobel Prize in Chemistry for 2003 is shared between two USA scientists in honor of their discoveries concerning channels in cell membranes. Agre discovered water channels of the cell membrane, and clarified important properties such as the selectivity for water molecules of the water channels. MacKinnon clarified the 3D structure of the K⁺ channels with high resolution, and elucidated its functional mechanisms such as ion selectivity in detail. The two scientists utilized their high sensitivity for the top scientific research and methodology. They started their work from the basic research of biochemistry, and made excellent contribution to the post genome study, which is the top area in the field of life sciences.

Key words The Nobel Prize in Chemistry 2003, water channel, K⁺ channel, structure, signal transduction

* Corresponding author. Tel: 86-10-64888534, E-mail: jjj@sun5.ibp.ac.cn

Received: November 12, 2003 Accepted: November 19, 2003