

骨骼肌内质网 Ca^{2+} 泵转运 Ca^{2+} 的结构基础*

韦日生 王佩荣 尹长城**

(北京大学基础医学院生物物理学系, 北京 100083)

摘要 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} -ATPase)是调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的重要蛋白质之一. Ca^{2+} 泵在转运 Ca^{2+} 的过程中经历一系列构象变化. 其中, E1 状态为外向的 Ca^{2+} 高亲和状态, E2 状态则为内向的 Ca^{2+} 低亲和状态. 目前, 骨骼肌内质网 Ca^{2+} 泵转运 Ca^{2+} 过程中的几个中间状态, 包括 E1- 2Ca^{2+} , E1-ATP, E1-P-ADP, E2-Pi 和 E2 状态的三维晶体结构已经解析. 介绍这几种状态的晶体结构, 并分析 Ca^{2+} 泵在执行功能过程中结构与功能的关系.

关键词 Ca^{2+} 泵 (Ca^{2+} -ATPase), 晶体结构, 构象变化

学科分类号 Q6

骨骼肌细胞内质网膜上的 Ca^{2+} -ATPase 是调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的重要蛋白质之一^[1], 其作用是导致细胞收缩的胞浆 Ca^{2+} 转运到内质网中储存, 使细胞回到静息状态. 这是一个主动运转过程, 需要消耗 ATP 提供能量, Ca^{2+} -ATPase 每转运 2 个 Ca^{2+} 需要消耗一分子的 ATP^[2~4]. Ca^{2+} -ATPase 是内质网膜上重要的跨膜蛋白, 分子质量约为 110 ku^[5,6], 因其具有自动磷酸化特性, 因此被归为 P 型 Ca^{2+} -ATPase^[7~9].

Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 的跨膜转运是通过酶自身对 Ca^{2+} 亲和性的改变来完成的. 根据对 Ca^{2+} 的亲性和不同, 将 Ca^{2+} -ATPase 分为 E1 和 E2 状态^[10~12]. E1 状态时, Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 亲和性高, 可以和胞浆内的游离 Ca^{2+} 结合; E2 状态 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 亲和性低, Ca^{2+} 从 Ca^{2+} -ATPase 解离. Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 的转运是一个动态循环过程, 如图 1 所示. 在 E1 状态, 由于 Ca^{2+} -ATPase 的 Ca^{2+} 结合位点向胞浆面开放, 胞浆内游离 Ca^{2+} 可以与 Ca^{2+} -ATPase 自由结合, 形成 E1- 2Ca^{2+} 状态(图 1, E1- 2Ca^{2+} 状态), 当环境中存在 ATP 时, ATP 可与 E1- 2Ca^{2+} 的 N 结构域 (核苷酸结合结构域, nucleotide binding domain) 结合, N 结构域向 P 结构域 (磷酸化结构域, phosphorylation domain) 倾斜, ATP 的 γ 位 P 与 P 结构域的磷酸化位点结合, 导致 Ca^{2+} -ATPase 的构象发生改变, 2 个 Ca^{2+} 被闭锁在 Ca^{2+} -ATPase 中(图 1, E1-ATP 状态). 随后,

ATP 被水解为 ADP 和磷酸, 为 Ca^{2+} -ATPase 磷酸化提供磷, Ca^{2+} -ATPase 磷酸化, Ca^{2+} -ATPase 的构象进一步改变, 2 个 Ca^{2+} 被完全闭锁在 Ca^{2+} -ATPase 内(此时 Ca^{2+} -ATPase 内的结合 Ca^{2+} 不能释放回到胞浆内), 形成图 1 中的 E1-P-ADP 状态. Ca^{2+} -ATPase 磷酸化之后, 其构象再次发生变化, ADP 从 Ca^{2+} -ATPase 解离下来, Ca^{2+} -ATPase 的构象变成图 1 中 E1-P 状态. 此时, 由于 Ca^{2+} 结合位点周围空间结构的改变, Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 亲和力降低, Ca^{2+} 从 Ca^{2+} -ATPase 解离并被释放到内质网腔内, Ca^{2+} -ATPase 的构象变成图 1 中 E2-Pi 状态, 完成将胞浆内 2 个 Ca^{2+} 向内质网腔内的转运. 最后磷酸化位点上的磷酸酯键断裂, 磷酸从 Ca^{2+} -ATPase 释放, Ca^{2+} -ATPase 变成图 1 中 E2 状态, E2 状态的 Ca^{2+} -ATPase 在胞浆内高浓度 Ca^{2+} (Ca^{2+} 浓度在 mmol/L 水平以上)作用下再次被激活^[13], 变成对 Ca^{2+} 具有高亲和性的 E1 状态并与胞浆内 Ca^{2+} 结合进入下一个转运 Ca^{2+} 的循环. 因此, Ca^{2+} -ATPase 利用 ATP 提供能量, 通过自身一系列构象的改变, 从而完成将胞浆内超量的 Ca^{2+} 转运到内质网中进行储存的功能.

*国家自然科学基金重点课题资助(批准号 30330160).

** 通讯联系人. Tel: 010-82801394, 010-82801410

E-mail: ccyin@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2005-09-02, 接受日期: 2005-11-30

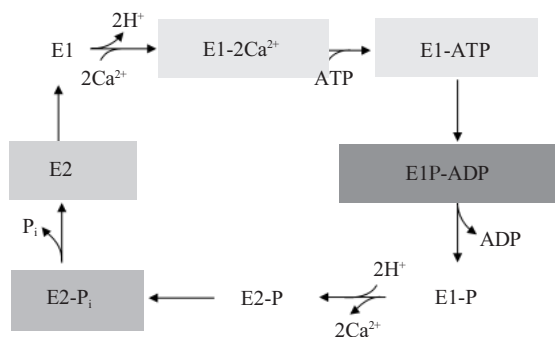


Fig. 1 Process of Ca^{2+} transport by the Ca^{2+} -ATPase^[17]

图1 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 的循环过程^[17]

目前对 Ca^{2+} -ATPase 三维结构的研究已经取得令人振奋的结果, Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中几个状态的晶体结构已经获得解析. E1-2 Ca^{2+} (PDB code 1SU4, 分辨率为 0.26 nm)^[14], E2(E2-TG) (PDB code 1IWO, 分辨率为 0.31 nm)^[15] 和 E1-ATP (E1-AMPPCP) (PDB code 1VFP, 分辨率为 0.29 nm)^[16] 及 E2-Pi (E2-TG-MgF₄²⁻) (PDB code 1WPG, 分辨率为 0.23 nm)^[17] 状态由日本科学家 Toyoshima 等分别于 2000 年, 2002 年和 2004 年解析. 丹麦科学家 Sorensen 等于 2004 年解析出

E1-ATP (E1-AMPPCP) (PDB code 1T5S, 分辨率为 0.26 nm) 和 E1-P-ADP (E1-AlF₄²⁻-ADP) (PDB code 1T5T, 分辨率为 0.29 nm) 的结构^[18]. AMPPCP [adenosine 5'-(β, γ-methylene) triphosphate] 是 ATP 类似物, 与 Ca^{2+} -ATPase 磷酸化位点结合, 但不能使 Ca^{2+} -ATPase 磷酸化, 因此用 E1-AMPPCP 模拟 E1-ATP 状态^[16,19], 同样用 AlF₄²⁻ 和 MgF₄²⁻ 分别模拟 E1-P-ADP 和 E2-Pi 状态中结合的磷酸^[20], TG (thapsigargin) 是 Ca^{2+} -ATPase 的特异性抑制剂, 与未结合 Ca^{2+} 的 Ca^{2+} -ATPase 结合, 将 Ca^{2+} -ATPase 锁定在 E2 状态^[19,21]. 这些结构的解析为我们了解内质网膜上的 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 的机制提供了翔实的结构基础.

下面分别介绍这几种状态的晶体结构, 并分析 Ca^{2+} -ATPase 在执行功能过程中结构与功能的关系.

1 Ca^{2+} -ATPase 的整体结构

从目前已经解析的 Ca^{2+} -ATPase 晶体结构看^[1,14,22] (图 2), Ca^{2+} -ATPase 由位于内质网膜中的 10 个跨膜 α 螺旋 (transmembrane helices) (M1 ~ M10) 和位于内质网膜外的 3 个胞浆结构域 (cytoplasmic domains), 即 A 结构域 (actuator

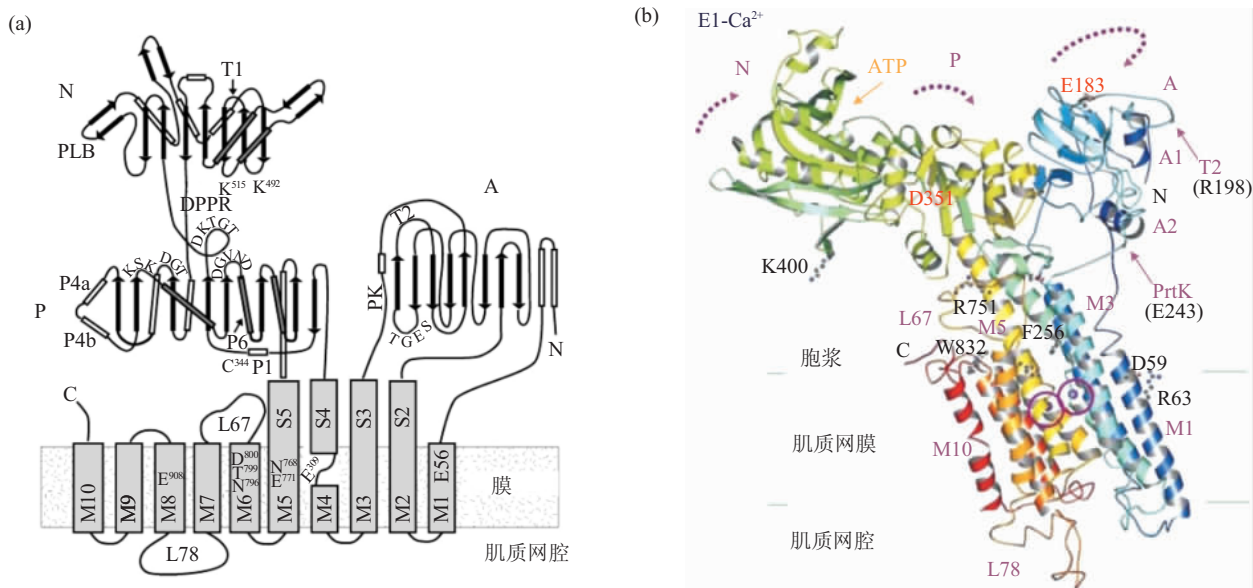


Fig. 2 Topology of Ca^{2+} -ATPase (a)^[1] and crystal structure of Ca^{2+} -ATPase in E1-2 Ca^{2+} state (b)^[15] viewed from the front and parallel to the membrane (x-y) plane

图2 Ca^{2+} -ATPase 的拓扑结构示意图 (a)^[1] 和 Ca^{2+} -ATPase 在 E1-2 Ca^{2+} 状态的晶体结构 (b)^[15] (视角与膜平行)

氨基酸从蓝色 N 端到红色 C 端排列, 其中, Asp 351 (位于 P 结构域) 是 Ca^{2+} -ATPase 磷酸化位点, Phe 487 (位于 N 结构域), 是核苷酸结合位点, Glu 243 (位于 A 结构域) 是蛋白酶 K (proteinase-K, PrtK) 的消化位点, Arg 198 (位于 A 结构域) 是胰蛋白酶 (trypsin, T2) 的消化位点, Glu 183 位于 TGES 模体 (位于 A 结构域), Phe 256 (位于 M3, M5 和 M7 之间) 是 Ca^{2+} -ATPase 抑制剂 TG 的结合位点. 图中两个紫色的小圆圈代表结合的 Ca^{2+} .

domain), N 结构域(nucleotide binding domain)和 P 结构域(phosphorylation domain)组成. P 结构域位于酶中央, 由两部分组成, 其中 N 端部分与 M4 连接, C 端部分与 M5 连接. Ca^{2+} -ATPase 磷酸化位点(Asp 351)位于 P 结构域, ATP 的 γ 位 P 与 Asp 351 结合, 使 Ca^{2+} -ATPase 磷酸化. N 结构域的分子质量在 3 个胞浆结构域里最大(~ 27 ku), 它是由 Gln 360 到 Arg 604 氨基酸残基组成. N 结构域有核苷酸结合位点(Phe 487), ATP 通过与 Phe 487 结合为 ATP 与 P 结构域磷酸化位点结合提供了可能. 在 3 个胞浆结构域中, A 结构域的分子质量最小(~ 16 ku), 它位于与其直接连接的跨膜 α 螺旋 M1~M3 之间, 由 110 个氨基酸残基组成. TGES 模体(TGES motif)位于 A 结构域表面, 由 Thr181, Gly182, Glu183 和 Ser184 组成, 在磷酸化过程中, 它进入 P 结构域的磷酸化位点附近, 取代 ADP 的位置, 并促进磷酸根从 E2-P 磷酸化位点 Asp 351 水解下来.

10 个跨膜 α 螺旋具有不同的长度和倾斜度, M2 和 M5 直而且长(约 6 nm), 其中 M5 是 10 个跨膜 α 螺旋中最长和最直的螺旋, 它位于 Ca^{2+} -ATPase 跨膜 α 螺旋中央, 从内质网腔内贯穿整个内质网膜终止于 Ca^{2+} -ATPase 胞浆区的 P 结构域, 被认为是酶的“中心桅杆”(centre mast), 对 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中构象改变起重要的调控作用. M4 和 M6 中部比较松弛, 是 Ca^{2+} -ATPase 结合 Ca^{2+} 最适合的部位, M5, M6 和 M8 参与 Ca^{2+}

结合位点 I 的形成, M4 参与 Ca^{2+} 结合位点 II 的形成. 在 E1- 2Ca^{2+} 状态, M2, M4, M6 的胞浆端共同构成胞浆内 Ca^{2+} 进入 Ca^{2+} -ATPase 的通路. Ca^{2+} -ATPase 的内质网腔内环(luminal loops)除了连接 M7 和 M8 的 L7-8 环比较长外, 其他都较短, 它们构成 Ca^{2+} -ATPase 释放 Ca^{2+} 到内质网腔内的门(luminal gate).

2 Ca^{2+} 结合位点结构

Ca^{2+} 结合位点通常位于 Ca^{2+} 结合蛋白分子中 α 螺旋的疏松部位, 如图 3a 所示, 该结构由 α 螺旋-环- α 螺旋三个肽段组成, 在环中有几个恒定的亲水侧链, 侧链末端的氧原子通过配位键与 Ca^{2+} 结合. 在 Ca^{2+} -ATPase 中, Ca^{2+} 结合位点的 Ca^{2+} 就是通过与周围氨基酸残基上的氧原子配位形成. 图 3b 显示, Ca^{2+} 结合位点 I 位于 M5、M6 和 M8 之间, 跨膜 α 螺旋上 Asn 768、Glu 771 (M5)和 Thr 799、Asp 800 (M6) 及 Glu 908 (M8) 侧链上的氧原子与 Ca^{2+} 配位, 构成 Ca^{2+} 结合位点 I, 其中 Asn 768, Thr 799, Asp 800 和 Glu 908 侧链上的氧原子规则排列在同一个平面上, 而 Glu 771 侧链上的氧原子则位于这个平面的下方; Ca^{2+} 结合位点 II 几乎位于 M4 的松弛部位, 由 Val 304、Ala 305、Ile 307 (M4)主链和 Asn 796、Asp 800 (M6)及 Glu 309 (M4) 侧链上羰基的氧原子与 Ca^{2+} 配位, 构成 Ca^{2+} 结合位点 II. 这样的结构有利于 Ca^{2+} -ATPase 的结合 Ca^{2+} 与胞浆内游离 Ca^{2+} 自由交换^[23~25].

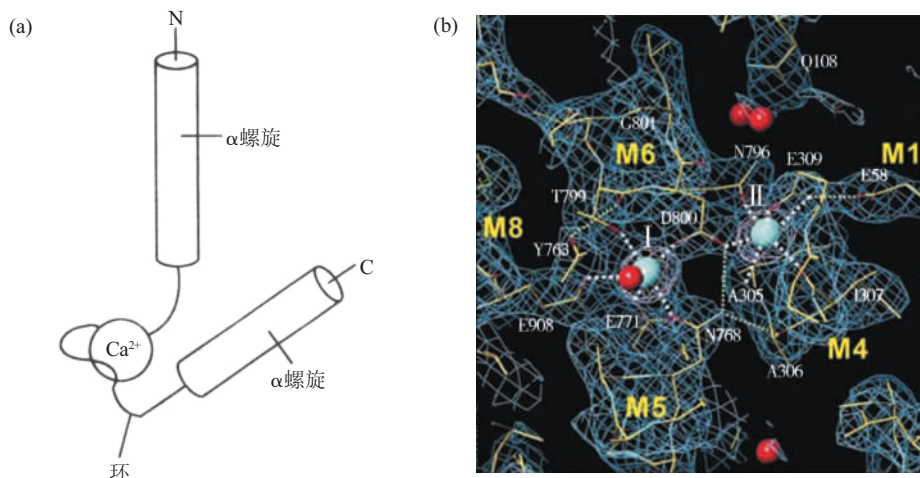


Fig. 3 A model of Ca^{2+} binding site in a Ca^{2+} -binding protein (a) and details of Ca^{2+} -binding sites of Ca^{2+} -ATPase (b)^[14]

图 3 Ca^{2+} 结合蛋白分子中 Ca^{2+} 结合位点的模型 (a) 和 Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} 结合位点的结构 (b)^[14]
(a)该结构由 α 螺旋-环- α 螺旋三个肽段组成, 在环中有几个恒定的亲水侧链, 侧链末端的氧原子通过配位键与 Ca^{2+} 结合. (b) 图中红色球表示水分子, 2 个蓝色球及其附近区域分别表示 Ca^{2+} 结合位点 I 和位点 II.

3 Ca^{2+} 如何进入 Ca^{2+} -ATPase 并与 Ca^{2+} 结合位点结合^[14]

胞浆内游离 Ca^{2+} 与 Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} 结合位点的结合需要有两个条件: (1) Ca^{2+} -ATPase 要形成与转运 Ca^{2+} 相匹配的几何空间; (2) Ca^{2+} -ATPase 要提供有序的氧排列以引导游离 Ca^{2+} 进入, 同时还要具有解离水分子的能力。

如图 4 所示, Ca^{2+} 进入到 Ca^{2+} 结合位点的通道位于 M2, M4 和 M6 之间, 确切地说它不是通道而是一个向胞浆开放的腔, 这个腔对水分子亲和力

高, 图 4 中可见通道中有多个水分子(用红色小圆球代表). 腔的上部有与 Ca^{2+} -ATPase 活性密切相关的 Gln 108 和 Asn 111^[26]. 在 M4 和 M6 跨膜螺旋的疏松部位, 从 Pro 312 到 Glu 309(M4) 和从 Gly 801 到 Asp 800 (M6), 氨基酸残基上氧原子形成有序排列, 并指向胞浆, 这种排列方式为胞浆 Ca^{2+} 进入 Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} 结合位点提供了亲水性空间, 这个亲水性空间决定了 Ca^{2+} 比其他单价阳离子取代水分子后的结合力要强^[27], 从而决定了 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 的特异性。

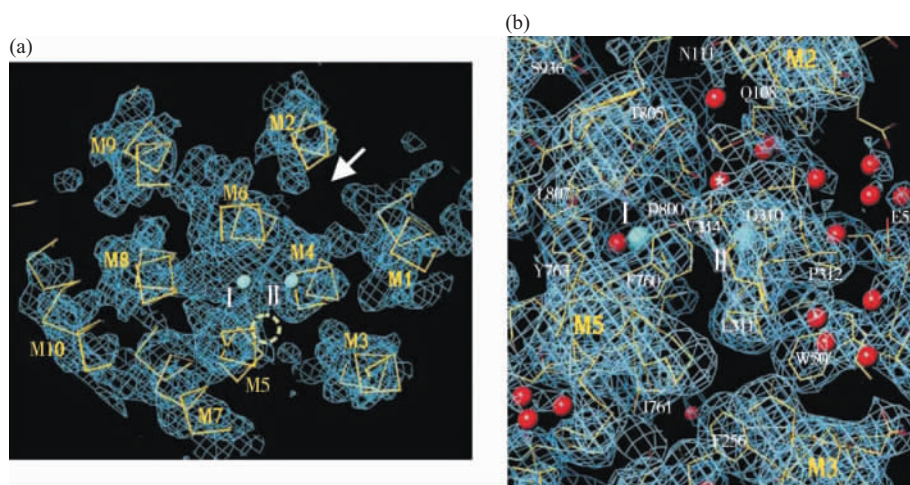


Fig. 4 The entrance path of Ca^{2+} from cytoplasm to Ca^{2+} -binding sites in Ca^{2+} -ATPase^[14]

图 4 胞浆 Ca^{2+} 进入 Ca^{2+} -ATPase 的通道^[14]

(a) 10 个跨膜 α 螺旋在内质网膜上的排列方式, 蓝色球表示 Ca^{2+} 结合位点, 白色箭头表示 Ca^{2+} 进入 Ca^{2+} -ATPase 的通道. (b) 用红色圆球表示水分子在 Ca^{2+} -ATPase 胞浆面的分布, 提示胞浆游离 Ca^{2+} 通过亲水途径进入 Ca^{2+} -ATPase 的 Ca^{2+} 结合位点。

4 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程的构象变化

图 5 和图 6 显示 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中 Ca^{2+} -ATPase 的构象变化. 从图 5 可以看到, 在 E1- 2Ca^{2+} 状态, 3 个胞浆结构域是散开的, 而从 E1-AMPPCP 到 E2-TG 状态, 3 个胞浆结构域转变成紧密连接, 但 E2-TG 状态显得相对松散一些, 各个跨膜 α 螺旋也出现不同程度的倾斜和移位. 图 6 描述 E1- 2Ca^{2+} 状态结合 ATP, Ca^{2+} -ATPase 发生磷酸化后一系列的构象改变, 包括各个胞浆结构域的旋转和倾斜, 跨膜螺旋的移位, Ca^{2+} 的结合和释放以及 ATP 的结合和 ADP 的释放。

下面对 Ca^{2+} -ATPase 的各个状态的构象进行详细介绍。

4.1 E1-AMPPCP 状态 (E1-ATP 状态)^[16]

与 E1- 2Ca^{2+} 状态比较, 此状态最明显的变化

是当 Ca^{2+} -ATPase 与 AMPPCP 结合后 N 结构域向 P 结构域发生 90° 的倾斜。

P 结构域的构象变化: P 结构域所包含的 Rossman 折叠, 由平行的 7 个 β -sheet ($\text{P}\beta 1 \sim \text{P}\beta 7$) 和与其关联的螺旋 ($\text{P}\alpha 1 \sim \text{P}\alpha 7$) 组成. 在 E1- 2Ca^{2+} 状态时, Rossman 折叠的两半部分 ($\text{P}\beta 1 \sim \text{P}\beta 4$ 和 $\text{P}\beta 5 \sim \text{P}\beta 7$) 摇摆不定, 在 E1-AMPPCP 状态, 它们与 AMPPCP 的 γ -P 结合. 同时磷酸化位点附近的 Thr 353、Thr 625、Gly 626 和 Asp 703 也通过 Mg^{2+} 和 AMPPCP 的 γ -P 形成配位结合, Asp 703 导致 $\text{P}\alpha 5 \sim \text{P}\alpha 7$ 发生倾斜. P 结构域构象的改变直接导致 N 结构域向 P 结构域倾斜 30° . N 结构域向 P 结构域近乎 90° 的倾斜使得 ATP 能够到达 P 结构域的磷酸化位点 (Asp 351) 并与之结合, Asp 351 也是通过 Mg^{2+} 和 ATP 的 γ -P 形成配位。

A结构域的构象变化: N结构域向P结构域倾斜 90° , 使N结构域与A结构域发生直接接触. A结构域在与膜平行的轴向发生 30° 倾斜, 同时也在与膜垂直的轴向发生 110° 旋转, 结果导致与A结构域相连的跨膜 α 螺旋M1~M3发生不同程度的移位, M1向胞浆面移动2个螺距的距离(约1 nm), M2向胞浆面移动1个螺距的距离, M3变化幅度较小, 其上端向M2倾斜 20° . M1和M2向胞浆面移位, 阻断了 Ca^{2+} 结合位点与胞浆之间的通路, 使 Ca^{2+} -ATPase结合位点上的 Ca^{2+} 被闭锁.

4.2 E1-AIF_4^{2-} -ADP 状态 (E1-P-ADP 状态)^[18]

与 E1-AMPPCP 状态比较, E1-AIF_4^{2-} -ADP状态的晶体结构没有明显变化. 在 E1-AMPPCP 状态, AMPPCP 的 γ -P通过 Mg^{2+} 与Asp 351形成配位, 而在 E1-AIF_4^{2-} -ADP状态, 不仅 γ -P与Asp 351形成配位, β -P还与Thr353侧链形成配位, 使得N结构域与P结构域连接更加紧密(图7). 由此推测 E1-AIF_4^{2-} -ADP状态对 Ca^{2+} 的闭锁程度比 E1-CAMPPCP 状态更完全^[25], Ca^{2+} -ATPase结合位点上的 Ca^{2+} 不易被释放回到胞浆内.

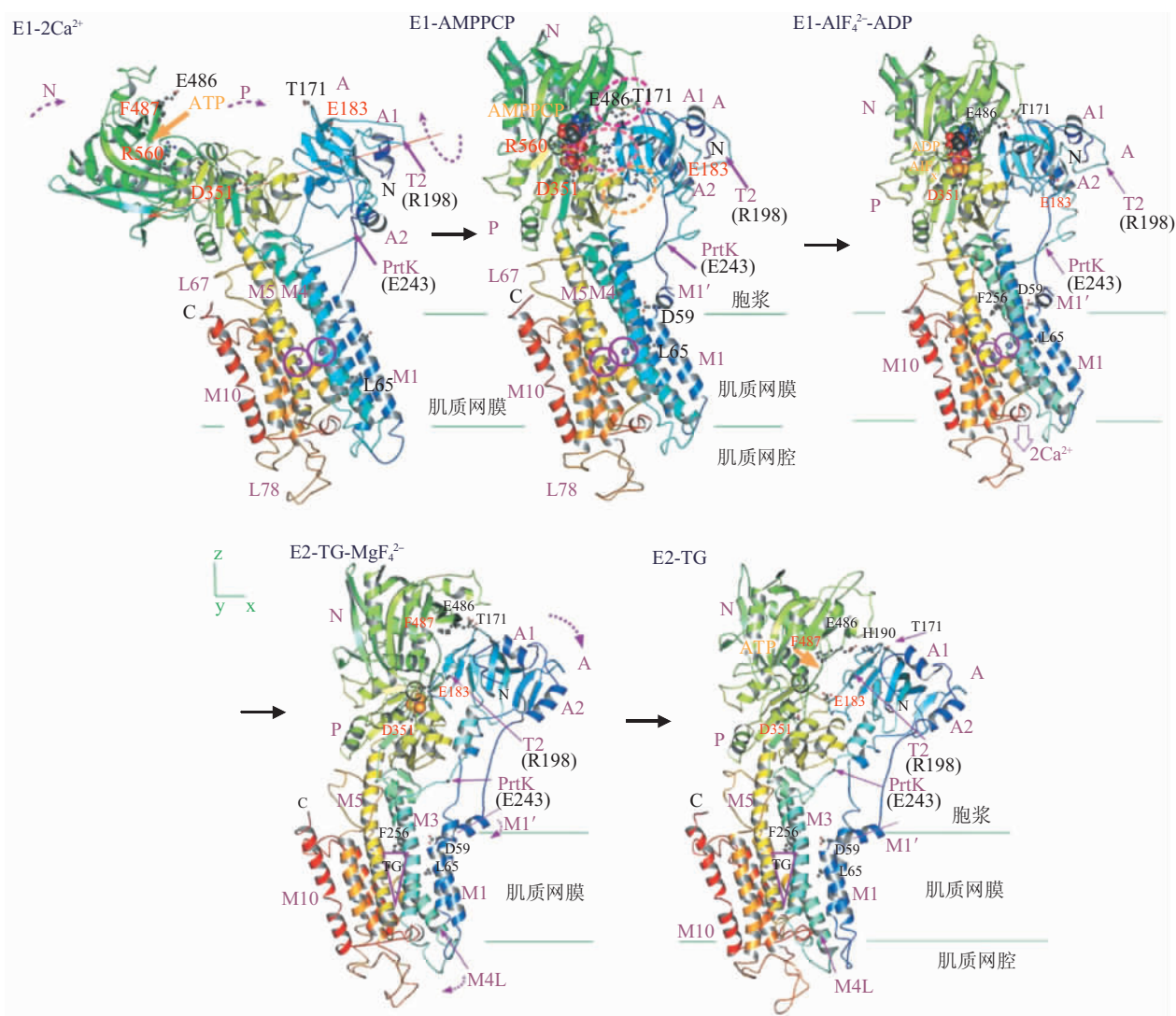


Fig. 5 The crystal structures of Ca^{2+} -ATPase in different functional states, including a Ca^{2+} -bound form (E1-2Ca^{2+}), a Ca^{2+} -unbound form stabilized by a potent inhibitor thapsigargin (TG) (E2-TG), an ATP-bound form (E1-ATP), an E1-P-ADP state, and an E2-Pi state. [views parallel to the membrane (x - y) plane]^[14-18]

图5 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中的几个功能状态的晶体结构^[14-18]

分别是 E1-2Ca^{2+} , E1-AMPPCP (E1-ATP), E1-AIF_4^{2-} -ADP(E1-P-ADP), E2-TG-MgF_4^{2-} (E2-Pi)和 E2 (E2-TG)状态(视角与膜平行).

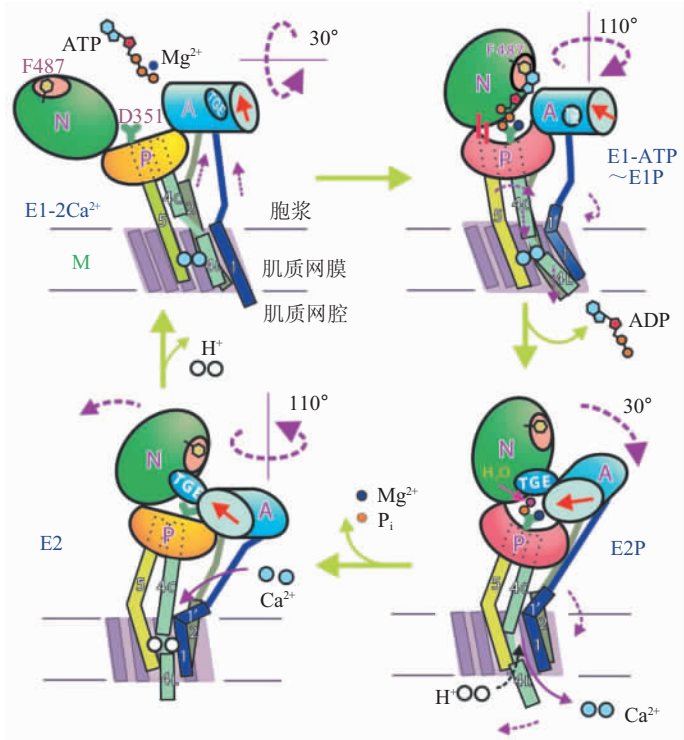


Fig. 6 Model of sequential conformational transition of Ca^{2+} -ATPase during the Ca^{2+} transport process based on crystal structures solved to date^[17]

图 6 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中的构象变化模型^[17]

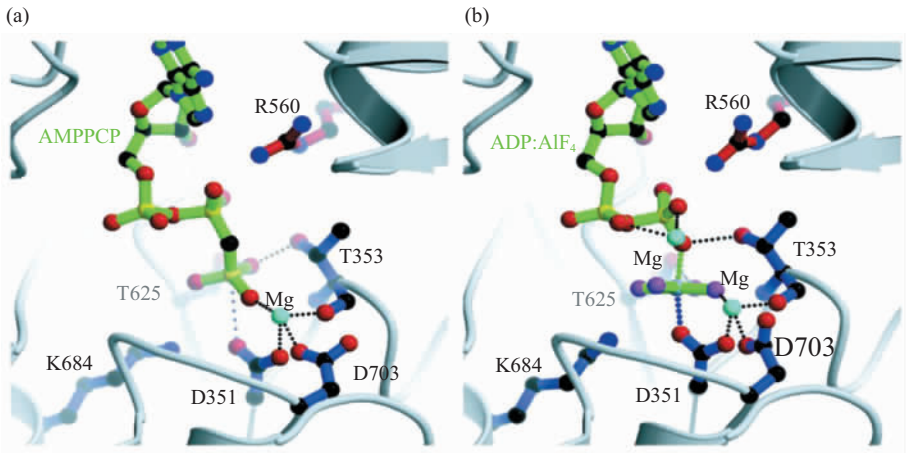


Fig. 7 The structure of phosphorylation site in E1-AMPPCP (a) and E1-AIF₄²⁻-ADP (b)^[18]

图 7 E1-AMPPCP (a) 和 E1-AIF₄²⁻-ADP (b) 状态磷酸化位点的结构^[18]

在 E1-AMPPCP 状态，AMPPCP 的 γ -P 通过 Mg^{2+} 与 Asp 351 形成配位，而在 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态，不仅 γ -P 与 Asp 351 形成配位， β -P 还与 Thr353 侧链形成配位，使得 N 结构域与 P 结构域连接更紧密。

4.3 E2-TG-MgF₄²⁻状态 (E2-P_i 状态)^[17]

与 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态比较，E2-TG-MgF₄²⁻ 状态由于 ADP 从 Ca^{2+} -ATPase 上解离下来，N 结构域和 P 结构域失去连接桥梁，N 结构域离开 P 结构域 60°，N 结构域和 A 结构域的连接也变得松散，

A 结构域也发生旋转，A 结构域上的 TGES 模体移动到 ADP 遗留的空间即 P 结构域的磷酸化位点附近。M1~M6 的跨膜 α 螺旋也发生明显改变，M3、M4 向肌质网腔面移动一个螺距的距离，M5 向 M1 弯曲，使得 P 结构域向膜平面倾斜 30°，这种变化

结果有利于 Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} 向内质网腔内释放。

TGES 模体的主要作用是使 Pi 从磷酸化位点 Asp 351 解离下来, 与 Pi 相连的 Mg^{2+} 也被解离下来, 同时还可以阻止 ATP 再次进入磷酸化位点。图 8 所示, 在 E2-TG- MgF_4^{2-} 状态, TGES 模体的结合位点是通过其上的 Thr 181, Ser 184 与邻近的 N 结构域中 Glu349, Asn359 等形成氢键来维持。Glu 183 与 MgF_4^{2-} 的氟之间有一个氢键的距离, 而 Asp 351 羧基氧原子并没有和 MgF_4^{2-} 的氟形成配位, 因

而推测 Glu 183 与 MgF_4^{2-} 的氟可能有氢键形成, Glu 183 和 Thr 181 通过水分子和 Asp 351 羧基氧原子连接, 从而促使磷酸化 Asp 351 的水解, 并将 P 解离下来。Gly 182 位于 Mg^{2+} 的上方并通过水分子与 Mg^{2+} 连接, 因此在 Pi 水解下来的同时 Mg^{2+} 也被解离下来。

4.4 E2-TG 状态 (E2 状态)^[15]

与 E1-2 Ca^{2+} 状态比较(图 9), N 结构域与膜形成 90°的倾斜, P 结构域与膜形成 30°倾斜, N 结构

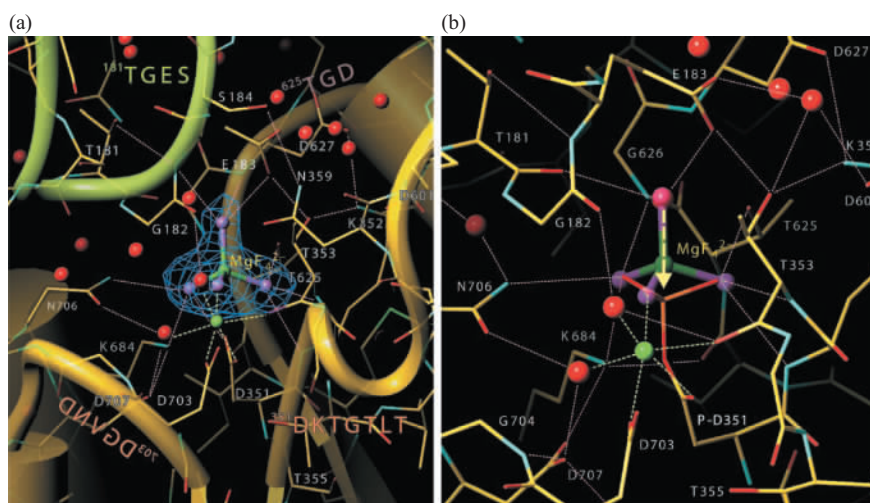


Fig. 8 Interaction of TGES motif and phosphorylation site in the E2-TG- MgF_4^{2-} state^[17]

图 8 E2-TG- MgF_4^{2-} 状态时 TGES 模体对磷酸化位点的影响^[17]

红色小球表示水分子, 绿色小球表示 Mg^{2+} 离子, 黄色箭头表示水分子攻击磷酸化的 Asp351 (P-Asp351)。

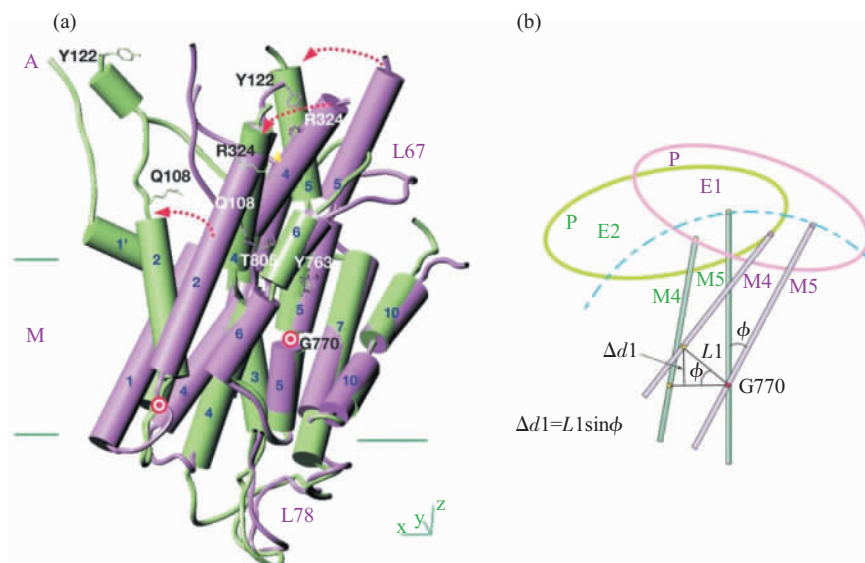


Fig. 9 The transmembrane domain movements in E1-2 Ca^{2+} and E2-TG^[15]

图 9 E1-2 Ca^{2+} 和 E2-TG 状态跨膜螺旋构象的变化^[15]

紫色代表 E1-2 Ca^{2+} 状态, 绿色代表 E2-TG 状态, 箭头表示从 E1-2 Ca^{2+} 状态到 E2-TG 状态的转变。(a)从后部观察跨膜螺旋的改变。(b)表示 M5 相对于膜法线的倾斜所导致 M4 的移位。M5 和 M4 都与 P 结构域底部相连并以刚体形式移动。

域离开 P 结构域约 50° , 同时 A 结构域也发生 110° 旋转, 这样贯穿膜的 M5 也发生倾斜, 导致 M3、M4 向肌质网腔面移动, M1、M2 向胞浆面移动约 0.5 nm (约为一个螺距的距离), 跨膜 α 螺旋的移位致使 Ca^{2+} 结合位点周围氨基酸排列方式发生改变, 导致与 Ca^{2+} 形成配位的氧原子减少, 降低了 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 亲和性, 使 Ca^{2+} 不能与 Ca^{2+} -ATPase 结合. 在肌质网腔面, 连接 M3、M4 的环(L_{3,4})向连接 M7、M8 的环(L_{7,8})靠近, 从而关闭 Ca^{2+} -ATPase 释放 Ca^{2+} 到肌质网腔的出口.

5 Ca^{2+} 结合位点构象的变化

如前所述, 在 E1-2 Ca^{2+} 状态 Ca^{2+} 结合位点 I 由 Asn 768、Glu 771 (M5), Thr 799、Asp 800 (M6) 和 Glu 908 (M8)侧链上的氧原子与 Ca^{2+} 配位

而形成, Ca^{2+} 结合位点 II 则由 Val 304、Ala 305、Ile 307 (M4)主链和 Asn 796、Asp 800 (M6) 和 Glu 309 (M4) 侧链上的羧基氧原子与 Ca^{2+} 配位而形成(图 10a). Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} 结合位点向胞浆面开放, 胞浆内 Ca^{2+} 能与之自由结合或者解离.

在 E1-AMPPCP 状态, 由于跨膜 α 螺旋 M1~M3 上移, Ca^{2+} 结合位点通向胞浆面的腔被 M1 占据(图 11), M1 上的 Leu 65 通过范德华力与 Glu 309 侧链连接, Glu 309 还通过氢键与 Asn 796 连接(在 E1-2 Ca^{2+} 状态, Glu 309 是与 Glu 58 连接)(图 10b), 这样 Glu 309 被双重锁定, Glu 309 是决定 Ca^{2+} 能否与 Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+} 结合位点结合的关键因素^[28,29], Glu 309 被锁定, 将关闭 Ca^{2+} 结合位点与胞浆之间的通路.

在 E1- AlF_4^{2-} -ADP 状态, 晶体学上不能清楚分

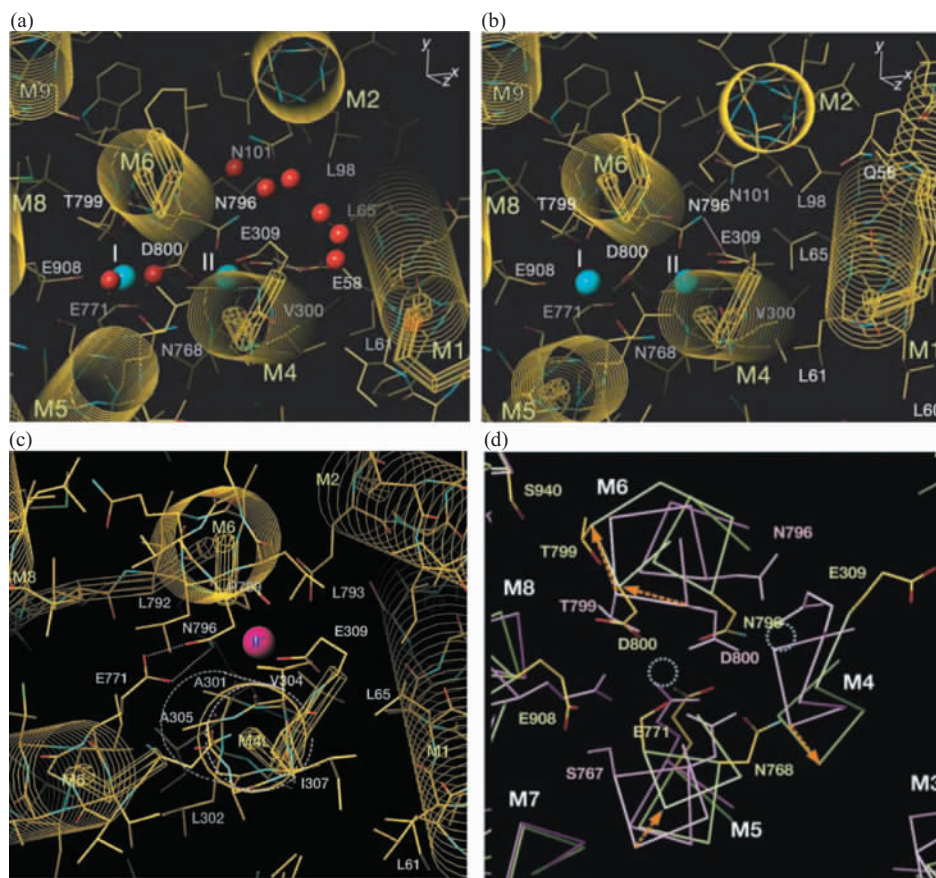


Fig. 10 The conformational changes of transmembrane helices and amino acid residues of Ca^{2+} -binding sites (I and II) in Ca^{2+} -ATPase^[14-18]

图 10 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中与 Ca^{2+} 结合位点相关的跨膜 α 螺旋及氨基酸残基的构象变化^[14-18]

(a) E1-2 Ca^{2+} 状态, 红色小球表示水分子, 蓝色小球表示结合的 Ca^{2+} . (b) E1-AMPPCP 状态, 蓝色小球表示结合 Ca^{2+} . (c) E2-TG- MgF_4^- 状态, 红色小球表示结合位点 I 结合的 Ca^{2+} . (d) E1-2 Ca^{2+} 和 E2-TG 状态 Ca^{2+} 结合位点空间结构的改变, 紫色图案表示 E1- Ca^{2+} 状态, 浅黄色图案表示 E2-TG 状态, 两个空白圆圈表示 Ca^{2+} 的结合位点, 黄色箭头表示相关的氨基酸残基从 E1- Ca^{2+} 状态到 E2-TG 状态的构象变化.

辨 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态和 E1-AMPPCP 状态 Ca²⁺ 结合位点的结构差异. 但在 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态, 由于 M1、M2 被 A 结构域进一步往胞浆面牵拉, M1 上的 Phe57、Val62、Leu65 和 M2 上的 Ile94、Leu97、Leu98 在 Ca²⁺ 结合位点的胞浆面形成疏水

簇, 有效关闭了 Ca²⁺-ATPase Ca²⁺ 结合位点上 Ca²⁺ 通往胞浆的通路^[30]. 生化实验也表明^[25], E1-AIF₄²⁻-ADP 状态对 Ca²⁺ 闭锁程度比 E1-AMPPCP 状态更完全(图 12).

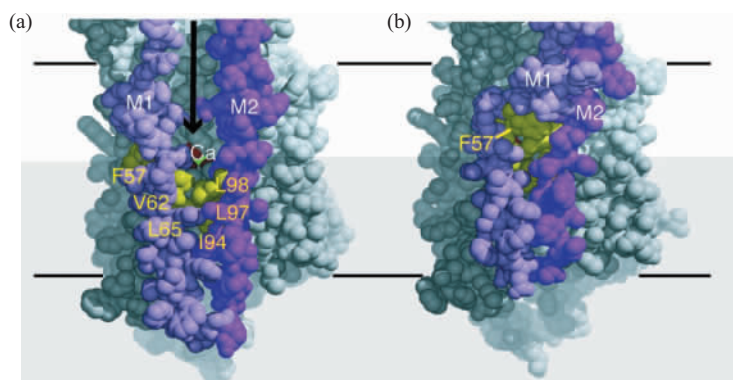


Fig. 11 Space-fill representations of the transmembrane regions of the E1-2Ca²⁺ (a) and E1-AIF₄²⁻-ADP (b) forms, as seen from the membrane toward helices M1 and M2^[18]

图 11 Ca²⁺-ATPase 的跨膜区的空间填充模型^[18]

在 E1-2Ca²⁺ 状态(a), Ca²⁺ 可以通过 M1 和 M2 之间的通道自由进出 Ca²⁺-ATPase 的 Ca²⁺ 结合位点(箭头所示为红色的配位原子和绿色的 Ca²⁺ 离子), 而在 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态(b), A 结构域移动导致 M1 向胞浆侧移动, 封闭了 Ca²⁺ 进出 Ca²⁺-ATPase 的通路, 导致 Ca²⁺-ATPase 内的 Ca²⁺ 被闭锁.

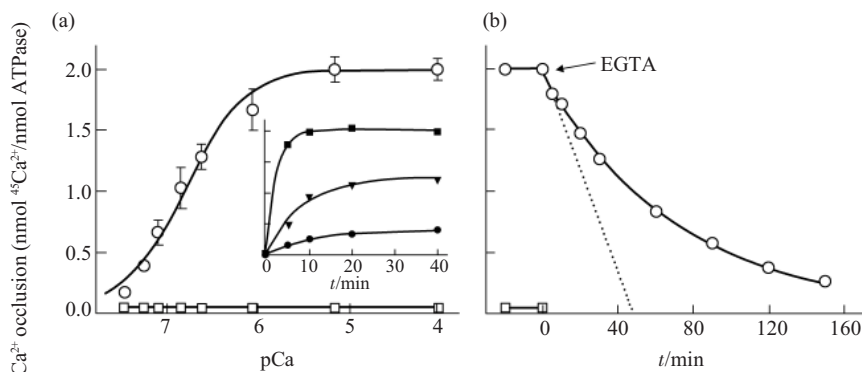


Fig. 12 Calcium occlusion in E1-AMPPCP and E1-AIF₄²⁻-ADP^[18]

图 12 E1-AMPPCP 和 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态对 Ca²⁺ 的闭锁^[18]

(a)在 E1-AMPPCP(□—□)和 E1-AIF₄²⁻-ADP(○—○)状态时浓度依赖的闭锁的 Ca²⁺ 的含量. 用 Millipore 膜过滤法测定内质网膜 Ca²⁺-ATPase 经彻底清洗后 ⁴⁵Ca²⁺ 的残留量. 小图表示 E1-AIF₄²⁻-ADP 状态 Ca²⁺ 闭锁与 Ca²⁺ 浓度及时间的关系(●—●, pCa 7.25; ▼—▼, pCa 6.0; ■—■, pCa 5.15); (b) EGTA 对 E1-AMPPCP(□—□)和 E1-AIF₄²⁻-ADP(○—○)两种状态的 Ca²⁺-ATPase 去闭锁与时间的关系.

在 E2-TG-MgF₄²⁻状态, 由于 M3、M4 向肌质网腔面移动, M4L(M4 的下段)与 M6 平行并形成 M4L~M6 之间的腔, Val 304、Ala 301、Leu 792 排列在此腔内形成疏水空间, Asn 796 侧链上的 N

原子靠近 Ca²⁺ 结合位点, 并与 Glu 771 形成氢键(图 10c). 这些氨基酸位置的移动将促进 Ca²⁺ 从 Ca²⁺ 结合位点解离下来并向内质网腔释放, 同时又阻止其他阳离子从内质网腔进入 Ca²⁺-ATPase (除 H⁺ 以

外, 此时 H^{+} 可以取代 Ca^{2+} 结合位点上 Ca^{2+} 的位置).

在 E2-2Ca^{2+} 状态, 由于 M3、M4 进一步向内质网腔面移动, 而 M1、M2 向胞浆面移动, Ca^{2+} 结合位点周围氨基酸排列方式发生明显改变, 在 Ca^{2+} 结合位点 I, M6 上 Asn 796、Thr 799 和 Asp 800 发生 90° 的顺时针改变, Thr 799 位置被 Asp 800 取代并远离 Ca^{2+} 结合位点, Asn 768 靠近 Ca^{2+} 结合位点 II, 但 Glu 771 和 Glu 908 位置几乎没有变化. 在 Ca^{2+} 结合位点 II, Glu 309 和 Asp 800 远离结合位点, 原本与 Ca^{2+} 形成配位的羰基基团也与 Asn 768 和 Asn 796 形成氢键(图 10d). 这些氨基酸位置移动导致与 Ca^{2+} 形成配位的氧原子数目减少, 降低了 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 的亲合性, 使 Ca^{2+} 不能与 Ca^{2+} -ATPase 结合. 由此可以解释在 E1 状态 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 亲和性高, 而在 E2 状态 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 亲和性低, 进而解释为什么 Ca^{2+} -ATPase 在 E1 状态结合 Ca^{2+} 而在 E2 状态释放 Ca^{2+} .

6 有待解决的问题

虽然目前对 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 过程中几种不同状态的晶体结构已经解析(图 1 中加框的状态), 但 Ca^{2+} -ATPase 转运 Ca^{2+} 的机制尚不完全明了. 第一, 尚有一些状态的三维结构未获得解析(图 1 中未加框的状态), 特别是 Ca^{2+} -ATPase 磷酸化过程其构象变化仍不清楚(E1-P 和 E2-P 状态). 第二, E2 状态可以被高浓度 Ca^{2+} 激活变成对 Ca^{2+} 高亲和性, 从而进入 E1 状态, E1 (还未与 Ca^{2+} 结合的状态) 的构象又是如何? 第三, 有些状态的晶体结构几乎相同, 如 E1-AMPPCP (E1-ATP) 和 E1-AIF₄²⁻-ADP (E1P-ADP), 但两种状态对 Ca^{2+} 的闭锁能力却不同. 以上这些问题, 不仅依赖于结构生物学而且需要结合其他手段方能解决.

参 考 文 献

- 1 Stokes D L, Green N M. Structure and function of the calcium pump. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003, **32**: 445~468
- 2 MacLennan D H, Rice W J, Green N M. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem*, 1997, **272** (46): 28815~28818
- 3 Lee A G, East J M. What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem J*, 2001, **356** (Pt 3): 665~683
- 4 Moller J V, Juul B, le Maire M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1286** (1): 1~51
- 5 MacLennan D H, Brandl C J, Korczak B, *et al.* Amino-acid sequence of a Ca^{2+} - Mg^{2+} dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 1985, **316** (6030): 696~700
- 6 Brandl C J, deLeon S, Martin D R, *et al.* Adult forms of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1987, **262** (8): 3768~3774
- 7 Apell H J. Structure-function relationship in P-type ATPases—a biophysical approach. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2003, **150**: 1~35
- 8 Aravind L, Galperin M Y, Koonin E V. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23** (4): 127~129
- 9 Scarborough G A. Molecular mechanism of the P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr*, 2002, **34** (4): 235~250
- 10 Post R L, Hegyvary C, Kume S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 1972, **247** (20): 6530~6540
- 11 Nakamura J. Two types of proton-modulated calcium binding in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. II. Characteristics of their calcium bindings. *J Biol Chem*, 1994, **269** (49): 30822~30827
- 12 de Meis L, Vianna A L. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 1979, **48**: 275~292
- 13 Murphy A J, Coll R J. Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1992, **267** (8): 5229~5235
- 14 Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, *et al.* Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 2000, **405** (6787): 647~655
- 15 Toyoshima C, Nomura H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 2002, **418** (6898): 605~611
- 16 Toyoshima C, Mizutani T. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 2004, **430** (6999): 529~535
- 17 Toyoshima C, Nomura H, Tsuda T. Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature*, 2004, **432** (7015): 361~368
- 18 Sorensen T L, Moller J V, Nissen P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science*, 2004, **304** (5677): 1672~1675
- 19 Stokes D L, Lacapere J J. Conformation of Ca^{2+} -ATPase in two crystal forms. Effects of Ca^{2+} , thapsigargin, adenosine 5'-(beta, gamma-methylene) triphosphate, and chromium (III)-ATP on crystallization. *J Biol Chem*, 1994, **269** (15): 11606~11613
- 20 Troullier A, Girardet J L, Dupont Y. Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem*, 1992, **267** (32): 22821~22829
- 21 Sagara Y, Inesi G. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem*, 1991, **266** (21): 13503~13506

- 22 Zhang P, Toyoshima C, Yonekura K, *et al.* Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature*, 1998, **392** (6678): 835~839
- 23 Andersen J P, Vilsen B. Amino acids Asn796 and Thr799 of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum bind Ca^{2+} at different sites. *J Biol Chem*, 1994, **269** (22): 15931~15936
- 24 Zhang Z, Lewis D, Strock C, *et al.* Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca^{2+} binding and catalytic activation in the Ca^{2+} transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry*, 2000, **39** (30): 8758~8767
- 25 Orłowski S, Champeil P. Kinetics of calcium dissociation from its high-affinity transport sites on sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochemistry*, 1991, **30** (2): 352~361
- 26 Clarke D M, Maruyama K, Loo T W, *et al.* Functional consequences of glutamate, aspartate, glutamine, and asparagines mutations in the stalk sector of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1989, **264** (19): 11246~11251
- 27 Doyle D A, Morais Cabral J, Pfuetzner R A, *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K^{+} conduction and selectivity. *Science*, 1998, **280** (5360): 69~77
- 28 Vilsen B, Andersen J P. Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of Na^{+} , K^{+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms. *Biochemistry*, 1998, **37** (31): 10961~10971
- 29 Inesi G, Ma H, Lewis D, *et al.* Ca^{2+} occlusion and gating function of Glu309 in the ADP-fluoroaluminate analog of the Ca^{2+} -ATPase phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem*, 2004, **279** (279): 31629~31637
- 30 Einholm A P, Vilsen B, Andersen J P. Importance of transmembrane segment M1 of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in Ca^{2+} occlusion and phosphoenzyme processing. *J Biol Chem*, 2004, **279** (16): 15888~15896

The Structural Basis of Ca^{2+} Transport by The Ca^{2+} -ATPase From Skeletal Sarcoplasmic Reticulum*

WEI Ri-Sheng, WANG Pei-Rong, YIN Chang-Cheng**

(Department of Biophysics, Peking University Health Science Centre, Beijing 100083, China)

Abstract The Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum is a Ca^{2+} pump that plays a key role in regulating cytosol calcium concentration in muscle cells. It undergoes a sequential conformational transition during the transport process. According to the classical E1/E2 theory, in the E1 state the binding sites have high affinity and open to the cytoplasm, whereas in the E2 state the binding sites have low affinity and face the luminal side. Crystal structures of several states during the reaction cycle of Ca^{2+} -ATPase have been solved recently, including a Ca^{2+} -bound form (E1-2 Ca^{2+}), a Ca^{2+} -unbound form stabilized by a potent inhibitor thapsigargin (TG) (E2-TG), an ATP-bound form (E1-ATP), an E1-P-ADP state, and an E2-Pi state. The details of these crystal structures and the relationship between structure and function of Ca^{2+} -ATPase during reaction cycle were summarized, and the issues to be addressed in future research were raised.

Key words Ca^{2+} -pump (Ca^{2+} -ATPase), crystal structure, conformational change

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30330160).

**Corresponding author . Tel: 86-10-82801394, 86-10-82801410, E-mail: ccyin@bjmu.edu.cn

Received: September 2, 2005 Accepted: November 30, 2005