

www.pibb.ac.cn

钙离子通道蛋白的研究进展*

范雪新杨磊项斌王世强** (北京大学膜生物学国家重点实验室,北京100871)

摘要 钙离子是最广泛存在的细胞内信使,调控着几乎所有生命过程。最近的结构生物学研究解析了很多不同种类的钙离子 通道在不同开放-关闭状态下的近原子分辨率结构。有关进展揭示了这些通道的分子组成、动态活动、生理功能、调控修饰 的分子基础,为阐明钙信号转导和相关疾病的微观机制提供了理论基础.

关键词 钙离子信号,TPR 通道,电压门控钙通道,ryanodine 受体,库控钙内流,线粒体单向转运体
 学科分类号 Q71
 DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0365

钙离子是细胞内最古老、作用最广泛的信号物 质,参与调控机体几乎所有的生物学功能,诸如心 脏和肌肉收缩、神经信息传递、学习和记忆、胚胎 形成和发育、细胞增殖和凋亡、细胞分裂和分化、 细胞能量代谢、蛋白质磷酸化和去磷酸化修饰、基 因表达和调控等等[1-2]. 哺乳动物细胞的细胞质游 离钙离子浓度一般控制在 100~200 nmol/L, 而胞 外和细胞器内钙浓度则维持在 mmol/L 量级. 钙离 子在细胞膜内外以及细胞质和细胞器之间这种陡峭 但严格受控的浓度梯度之所以得以维持,并根据细 胞的需要动态调控,凭借的是多种多样的离子通 道、离子泵以及转运体的协同工作.虽然不同细胞 有不同的具体机制,但参与其中的分子一般包括细 胞膜和细胞器膜离子通道(介导钙离子进入细胞 质)、细胞膜和细胞器膜的转运蛋白(包括原发性主 动转运和继发性转运,将钙离子运出细胞或运入细 胞器)、细胞质和细胞器的钙缓冲蛋白(结合储存钙 离子) 等[2-3](图 1). 其中任何一个环节的异常都可 能引起钙稳态的失稳,并引起疾病. 阐明钙通道的 调控机制是揭示钙稳态与生命过程调控规律的基本 环节之一.

20世纪后叶,随着电压钳和膜片钳等电生理 技术的不断进步,人们逐步对各种钙离子通道的电 生理特性、生理功能有了全面深入的认识.然而, 要揭示钙离子通道的门控机制、精细调控、基因突 变、与疾病的关系,还有赖于对通道蛋白分子结构



Fig. 1 Channels and transporters for intracellular Ca²⁺ cycling 图 1 细胞主要钙离子通道和转运体

的认识.21世纪以来,MacKinnon¹⁴和颜宁实验 室¹⁵等分别用晶体学方法解析了细菌钾通道和钠通 道的结构,揭示了离子通道电压门控和离子选择性 通透的一般机制.然而,离子通道蛋白的结构与功 能不仅取决于膜蛋白本身,更取决于膜脂与膜蛋白

^{*}国家重大研发计划(2016YFA0500401),国家自然科学基金 (31630035,81370203,81461148026,31327901)和北京市科技计 划(Z141100000214006)资助项目.

^{**} 通讯联系人. Tel: 010-62755002, E-mail: wsq@pku.edu.cn 收稿日期: 2016-11-21, 接受日期: 2016-12-15

相互作用.要对通道蛋白进行结构解析,通道蛋白 的制备及其与膜脂的配伍和优化是一个非常重要、 特别需要技术探索和经验积累的工作¹⁶. 通道蛋白 晶体制备的技术瓶颈限制了对膜蛋白结构与功能的 认识,因此该领域一直在寻求新的研究技术.理论 上,冷冻电镜单颗粒技术有可能达到原子级别的分 辨率,但真正实现这一点面临着许多的挑战.2013 年,美国加州大学旧金山分校程亦凡与同事 David Julius 合作,采用新研发的单电子计数探测器,以 3.4 Å 分辨率解析了 TRPV1 离子通道的结构[7-8]. 这 一重要突破使科学界开始重新认识冷冻电镜对解析 分子结构带来的空前契机. 与 X 射线衍射晶体学 技术相比,冷冻电镜单颗粒技术所需的样品量较 少,对纯度的要求也较低,关键是不需要制备晶 体,这大大降低了膜蛋白结构与功能研究的门槛. 单电子计数探测器与冷冻电镜单颗粒技术的联合应 用极大地推动着各种离子通道的结构与功能研究.

本文结合最近对钙离子通道结构与功能研究的 最新进展,对影响细胞钙信号和钙稳态的主要离子 通道的分子性质研究进行一个简要总结.

1 瞬时感受器电位 (transient receptor potential, TRP) 通道

TRP 通道是一类在各器官组织分布很广泛的 通道蛋白, TRP 通道通常包含4个亚基, 每个亚 基均为6次跨膜蛋白,其N端和C端均在胞内, 由第五和第六跨膜结构域共同构成非选择性阳离子 孔道,一般都对钠、钾、钙离子有通透性,但它们 对钙离子的通透性会因亚型不同而有很大差异.这 些通道可被多种因素调节,包括温度、渗透压、 pH 值、机械力、细胞内信号分子,以及一些内源 或外源配体.到目前为止,哺乳动物中已克隆了超 过 30 个 TRP 通道. 它们按照基因同源性等特点可 分为6个家族,包括TRPC(canonical)、TRPV (vanilloid) 、 TRPA (ankyrin) 、 TRPM (melastatin)、 TRP polycystin (TRPP)、TRPML (mucolipin)等. 每 个家族又有很多亚型.有的 TRP 通道可以由不同 亚型的4个亚基组成.这些不同亚型和不同亚型组 合表达于不同器官和组织,发挥不同的作用¹⁹.

TRPC 通道是在高等动物中与最早发现于果蝇的 TRP 通道最接近的一个 TRP 家族, TRPC 通道介导蛋白激酶 C 依赖性钙内流^[10].现已发现 7 种不同的 TRPC(TRPC1~7).其中, TRPC1 在血管内皮细胞中和平滑肌细胞中是库控钙内流的主要通

道,对血管紧张度维持很重要,TRPC4主要表达 于脑血管,在G蛋白耦联受体和受体酪氨酸激酶 激活后介导蛋白激酶C依赖性钙内流,并可调节 血管舒张^[11].

TRPV 通道是脊椎动物中研究得最多的 TRP 通道,对钙离子的选择性比较高.TRPV 在各种热 或痛的感觉中发挥关键作用.其中 TRPV1 是辣椒 素受体,对刺激性化学物质敏感^[12],TRPV2 对 52℃以上的温度敏感^[13],TRPV3 对较温和的温度 敏感^[14],TRPV4 对机械和渗透刺激敏感^[15].TRPV5 和 TRPV6 与前面几种 TRPV 有所不同,分别主要 分布在肾脏、小肠等器官的上皮组织,与钙摄取密 切相关^[16].

2013年,程亦凡与 Julius 首次用冷冻电镜单 颗粒技术解析了 TRPV1 离子通道在三种状态下的 结构,其中一种是通道不结合底物的自然状态下的 结构,其孔径尺寸显示通道处于关闭状态四,另两 种分别是在肽类神经毒素 resiniferatoxin 或辣椒素 存在时的结构^[8]. TRPV1 三维结构与电压门控离子 通道类似,每个亚基中含有6个α螺旋(S1~S6)贯 穿磷脂膜,其中 S5 和 S6 及二者间的孔道螺旋 (pore helix)和孔道环(pore loop)共同组成通道蛋白 的离子通透孔道. 来自每个亚基的 643 位甘氨酸所 处位置为孔道最狭窄部位,是通道的离子选择器; 通道离子选择器下方,由每个亚基 S6 螺旋上的 679 位异亮氨酸构成另外一个狭窄的疏水区域,是 TRPV1 通道的"低位门控(lower gate)"结构.因 此 TRPV1 的冷冻电镜结构研究揭示了该通道具有 "双门控(dual gating)"的调节机制^[8]. 当辣椒素或 resiniferatoxin 结合通道时,这个狭窄区域直径扩 大,这一构象变化是通道由关闭态向开放态转变的 重要过程. 由于 TRP 通道家族与人体多数细胞感 受各种理化刺激有关,因此对通道结构的认识将极 大地推动这些感受过程的分子机制和生物物理原理 的研究.对这些原理的揭示不仅是弄清 TRP 突变 或功能异常造成疾病的原因,并且对开发药物和工 程器件有重要参考价值.

2 电压门控钙通道 (voltage-gated calcium channel)

电压门控钙通道介导细胞钙内流,对脑、骨骼 肌、心肌和平滑肌、内分泌腺以及其他可兴奋细胞 的生理功能至关重要.这些膜蛋白将细胞膜去极化 信号转换为快速、局部的胞质钙浓度变化,继而触 发分泌、收缩、迁移和基因转录等关键生物学事 件^[2,17].

电压依赖性钙通道通常由 α_1 、 α_2 、 β 、 γ 和 δ 等多个亚基组成(图 2),其中 α_1 、 α_2/δ 、 β 是必需的 组成部分. γ 亚基一直被认为只存在骨骼肌中. α 1 亚基是构成钙离子跨膜孔道的亚基.与电压门控钠 通道类似, α 1 亚基由 4 个同源结构域(I ~ IV)组 成,每个结构域与电压门控钾通道的一个亚基同 源,都含 6 个跨膜螺旋(S1~S6),其中第 4 个跨膜 螺旋 S4 是一个带正电荷的高度保守片段,能够感 受细胞膜电场变化,在细胞去极化时 S4 向胞外方 向位移,导致通道构象发生变化. S5 和 S6 两个跨 膜螺旋之间有一个连接环,构成了离子选择性滤 器^[7].α1 亚基的羧基末端较长,可以通过二硫键 构成一个环,有很多磷酸化位点,对通道的激活性 质有重要影响.羧基末端还有酶切位点,断开后的 肽段可以进入细胞核,发挥转录因子的作用.



Fig. 2 Diagram of the structure of an L-type Ca²⁺ channel 图 2 L型钙通道结构示意图

α2/δ 亚基紧密结合在 α1 亚基上.其中 α2 亚基全部游离在胞外,而δ 亚基有一个跨膜片段.
α2 与δ 亚基由同一个基因编码,通过后期的剪切形成不同的结构,两者由二硫键相连(图 2). α2/δ 亚基调节 α1 亚基的物理学特性,并可能和β 亚基一起协助 α1 亚基正确地定位到细胞膜上.

β 亚基存在于细胞内侧,没有跨膜区域,而是 通过与 α1 亚基的第一和第二结构域间的连接环紧 密相连.一般来说,β 亚基调节 α1 亚基的电压依 赖性,导致电流 - 电压(*I-V*)曲线向左移动.β 亚基 的这一作用受到 RGK 的调节.RGK 蛋白是单体 GTP 酶家族的一员,是电压门控钙通道最强的细 胞内源调节因子^[18].

根据编码基因的不同,电压门控钙通道可分为 L、T、N、P/Q和R等多种类型.目前为止,共确 认了10个α1亚基的基因,分成Cav1.1-4(L型钙 通道)、Cav2.1-3(分别为P/Q、N、R型钙通道)、 Cav3.1-3.3(T型钙通道)^[18].其中,Cav1.1也叫二氢 吡啶受体(dihydropyridine receptor,DHPR),是最 早被鉴定出的电压门控钙通道,主要位于骨骼肌细 胞的横管,是肌肉兴奋收缩耦联(excitationcontractioncoupling)的膜电位敏感元件,在感受膜 电位变化后,第Ⅱ和第Ⅲ结构域之间的连接环上第 671位苏氨酸至第690位亮氨酸这一段序列通过与 ryanodine 受体相互作用激活后者,是骨骼肌L型 钙通道控制钙释放,进而引起骨骼肌收缩的关键机 制.Cav1.2和1.3存在于脑、心脏、血管、腺体等 多种可兴奋组织,在心肌兴奋收缩耦联和多种细胞 钙信号转导方面发挥关键作用.

电压门控钙通道的 α1 亚基的 4 个结构域大致 对称但又不完全相同,这给结构解析带来很大困难 (难以识别通道方向). 2015 年,颜宁实验室利用带 有谷胱甘肽巯基转移酶标签的 β1a 亚基融合蛋白从 兔骨骼肌膜上纯化出了内源性 Cav1.1 复合物.由 于亚基的存在 Cav1.1 具有了不对称性,便于识别 通道的方向,从而利用单颗粒冷冻电镜技术首次重 构出兔源 Cav1.1 复合物三维结构¹¹⁹,分辨率为 4.2 Å. 2016年,该实验室又在 3.6 Å 的标称分辨 率上解析了兔 Cav1.1 复合物的结构,发现其中形 成孔道的 α1 亚基内闸门是关闭的,所有 4 个电压 传感结构域都采用一个"向上"的构造,这意味着 通道处于失活的状态.

分析显示, Cav1.1 孔道结构域从胞外向胞内 的方向分为三个部分,依次为胞外环状区,离子选 择器及孔内门控区. 胞外环状区包含来自Ⅰ、Ⅱ和 Ⅲ结构域 S5 胞外末端与孔道环之间的环形结构, 由多个二硫键稳固,在选择性滤器上面形成一个窗 口化的圆顶. 该圆顶结构发挥两个功能, 圆顶的一 面为 α2δ 亚基提供固着点,另一面富含酸性氨基 酸,可能通过其表面负电吸引钙离子,并运送到下 方的离子选择器.离子选择器中,第292、614、 1014、1323 位谷氨酸在空间上围成离子通透"廊 道",其侧链可以与钙离子相互作用,实现钙离子 的选择性通透. 钙离子通过离子选择器后进入孔内 门控区,该区域由疏水性氨基酸组成,分别来自4 个亚基的 S6 螺旋围成一个疏水的狭窄孔道(相当于 TRP 通道的低位门控). 通道处于关闭状态时, 该 孔道直径仅为 0.66 Å.

在 Cav1.1 的细胞内一侧, Ⅰ - Ⅱ 和 Ⅲ - Ⅳ结 构域之间的连接环存在螺旋结构,分别与 β1 亚基 和 α1 的羧基末端结构域相互作用^[20]. 由于 β1 亚基 和 α1 的羧基末端结构域均影响通道的电压依赖 性,因此这些发现为理解电压依赖性钙通道的功能 调控及它们与疾病的相关机制提供了重要的结构 基础.

3 Ryanodine 受体 (RyR)

RyR 是存在于肌细胞肌质网和其他细胞内质网的胞内钙释放通道之一(另一种是三磷酸肌醇受体, IP₃R),是已知最大的膜蛋白分子.每个分子包含相同的4个560ku的亚基,组合成了一个正方形的阳离子通道.哺乳动物的RyR有RyR1(骨骼肌型)、RyR2(心肌型)、RyR3(脑型)三种亚型^[21]. RyR1在骨骼肌表达水平最高,在海马和小脑等少数脑组织有也有表达.一般认为,骨骼肌肌质网 RyR1与细胞膜 DHPR 有分子间相互作用,DHPR 的构象变化激活 RyR1产生电压依赖性钙释放. RyR2 主要表达于心肌细胞和部分脑组织.在心肌 细胞,肌质网 RyR2 的钙释放是通过细胞膜 L 型钙 通道流入的钙离子而激活的,被称为钙致钙释放 (calcium-induced calcium release). RyR3 分布广泛, 在很多组织有表达,也是通过钙致钙释放的方式激 活.由于 RyR 钙释放在神经肌肉组织和心血管系 统的重要功能,先天性或后天性通道调控缺陷均可 引起细胞钙调控异常,导致神经肌肉疾病和心律失 常性心脏病^[21].大量文献报道统计表明,目前已有 500 多种 RyR 突变与各种疾病有关.

最近,随着单分子冷冻电镜技术的应用,对 RyR的结构生物学研究连续取得突破性进展.2015 年,Raunser、Frank-Marks以及颜宁三个课题组, 同时发表了来自兔骨骼肌的 RyR1 冷冻电镜结构, 分辨率分别为 6.1 Å^[23]、4.8 Å^[24]和 3.8 Å^[25]. RyR1 包 含跨膜孔道结构域和极为庞大的胞质结构域.其中 跨膜结构域有 6 个跨膜的 α 螺旋,与电压门控钾 通道和 TRP 通道的特点十分类似,但有额外的结 构域以实现对通道开闭状态的调控.跨膜结构域第 4 937 位异亮氨酸位于通道最狭窄的部位(相当于 TRP 通道的低位门控),孔道直径小于1Å,不能 允许钙离子的通过,显示通道处于关闭状态.

2016年, 尹长城-孙飞四、颜宁四以及 Frank-Marks^[28]课题组先后发表了 RyR1 的激活状态 结构,但其激活条件各不相同. 尹长城-孙飞课题 组解析的是结合钙离子和钌红的 RyR1 开放态结 构; 颜宁实验室通过施加钙离子和促进 RyR 激活 的 PCB95 获得了 RyR1 的开放状态结构. Frank-Marks 组解析了 RyR1 在钙离子、ATP、咖 啡因、ryanodine 存在的情况下 RyR1 的结构多态 性. 根据他们的结构和功能研究, ATP 结合在通 道 S6 的胞质端、CTD 和拇食指(TaF)结构域的交汇 区;钙离子结合在 C 端(CTD)结构域和中心螺旋 (CSol)结构域之间由 CSol 提供的一对 EF 手型结构 上;咖啡因结合于 CTD 和 S2-S3 连接区. 钙离子 集合后激活 RyR1 使通道在开放和关闭状态随机转 换;进一步集合咖啡因则可将通道保持在开放状 态.ryanodine 结合于孔道侧壁,低浓度时可将通 道锁定在亚电导状态(有部分离子流通过),高浓度 则阻断离子的通过[28](图 3).

继解析 RyR1 结构之后,颜宁实验室又率先解 析了猪心 RyR2 的冷冻电镜三维结构^[29]. RyR2 的 结构与 RyR1 大致类似,但桥型螺旋(BSol)结构中 的 HD2 结构域的一部分在解析 RyR2 时没有探测 到,推测 RyR2(没有结合 FKBP)的 HD2 结构域具



 Fig. 3 The binding sites of small molecules on RyR revealed by high-resolution structural analysis

 图 3 RyR 高分辨结构解析揭示的不同小分子与 RyR 结合位点的示意图

 左上角的注字为本文提到的 RyR 有关结构域.

有较大的活动自由度,这是一个非常有趣的发现, 很可能与 RyR2 复杂的调控有关,具体生理意义尚 有待探索.

FKBP(FK506-binding protein)是结合于 RyR 的 重要调节分子. RyR1 三维结构解析显示 FKBP 在 RyR 胞质侧有 FKBP12(又称 calstabin-1)的结合位 点^[24]. 与心肌细胞 RyR2 结合的主要是 FKBP12.6 (又称 calstabin-2). 十几年来,关于 FKBP12.6 对心 肌细胞 RyR2 是否有调节作用、是否在儿茶酚胺敏 感性室速、心力衰竭等疾病中发挥作用长期存在激 烈的争论^[2430-32].由于最近解析的 RyR2 结构中并未 包含 FKBP12.6^[29],因此关于 FKBP12.6 对 RyR2 分 子性质的影响还有待未来将 RyR2-FKBP12.6 复合 体结构与 RyR2 结构进行对比.

此外,由于有 500 多种 RyR 突变与肌肉、心 血管和神经疾病有关,又加上 RyR 分子极为庞大、 修饰位点和调控分子非常多,因此,结合分子结构 对 RyR 正常、异常功能和调控的研究将成为一个 方兴未艾的热点领域.

4 三磷酸肌醇受体 (inositol-1,4,5-triphosphate receptor, IP₃R)

内质网是细胞内重要的钙离子储存库, IP₃R 是

广泛存在于各种细胞内质网的另一种钙释放通道家族. 当 IP₃R 与 1,4,5 三磷酸肌醇和钙离子两种底物 分子均结合后, IP₃R 开放,钙离子便从内质网钙库 释放到到细胞质中. 哺乳动物 IP₃R 有三种亚型, 包括 IP₃R1、IP₃R2 和 IP₃R3.

IP₃R1 在小脑的蒲肯野细胞中有较高表达,是目前研究最为深入的亚型.2015 年 Irina Serysheva 研究组利用冷冻电镜单颗粒技术解析了大鼠源 IP₃R1 结构,分辨率达 4.7 Å^[33].该研究表明,IP₃R 是与 RyR 结构相似的四聚体蛋白,每个单体由跨 膜孔道结构域和庞大的胞质结构域构成.

IP₃**R1** 孔道结构域构成与 **RyR1** 和上述其他通 道相似,有 6 个跨膜的 α 螺旋(S1~S6). 但有两点 不同:一是在相当于 **RyR1** 的 CTD 的羧基末端多 出一个很长的 α 螺旋伸到胞质侧最表面,并与相 邻亚基的氨基端结构域直接形成相互作用,推测在 协调亚基之间变构过程中发挥作用;二是 S5 和 S6 之间环特别长,横在通道内质网腔侧(图 4). 在孔 道中,S6 的 L2582、P2586 及 I2590 几个疏水氨基 酸共同围成孔道最细的瓶颈(相当于 TRP 通道的低 位门控),直径为 5 Å,不能允许 6~8 Å 的水化钙 离子的通过,因此可以推断通道处于关闭状态.由 于 IP₃ 存在于几乎所有细胞的内质网,在钙信号转



 Fig. 4 Structural comparison of S5-S6-C terminus among different channels

 图 4 不同离子通道 S5 到羧基末端的结构比较示意图

 P: 孔道螺旋; CTD: 羧基末端结构域.

导中发挥关键作用,因此,其冷冻电镜结构的研究 为理解该受体的离子通透性、功能调节和相关致病 的分子机理奠定了基础.

5 库控钙内流 (store-operated Ca²⁺ entry, SOCE)

30 年前, Puteney 等^[34]发现当内质网中钙离子 通过 IP₃R 释放导致内质网钙储量下降时, 钙离子 可以从细胞外进入细胞,这一过程被称为库控钙内 流.库控钙内流在基因表达调控、细胞运动、分泌 以及免疫反应中都发挥着重要作用.

近几年研究人员陆续发现并鉴定了参与 SOCE 的蛋白质分子.SOCE 的核心蛋白包括位于内质网上的 STIM(stromal interaction molecule)^[35-37]和位于 胞膜上的 Orai^[38-40].STIM 是 SOCE 的钙感受器.与细胞膜钙感受蛋白是一个 G 蛋白耦联受体^[41]不同,STIM 是一个单次跨膜的内质网蛋白.当内质 网钙库耗竭时,STIM 可以发生快速聚集,并位移 到与细胞膜相对的区域激活 Orai 产生钙内流 (图 5).在哺乳动物中,STIM 蛋白存在高度同源的 STIM1 和 STIM2 两种亚型,广泛表达于多种器官



Fig. 5 Depletion of endoplasmic reticulum Ca²⁺ store leads to assembly of STIM molecules, which activates Orai channels on the cell membrane to produce SOCE

图 5 STIM 感受内质网钙库耗竭发生聚集,激活细胞膜 Orai 产生库控钙内流

Orai为6聚体,为清晰起见图中省略了两个.

和组织中. 在不同类型的细胞中,两种亚型的表达 丰度不同,而且可通过彼此竞争性结合 Orai 发挥 功能.

STIM1 位于内质网腔的氨基端序列由两个 EF 手型结构和 SAM 结构域组成, EF 手型结构可结合 钙离子从而感知内质网内钙离子浓度. STIM 胞质 区有若干个卷曲螺旋结构域,其中包括结合 Orai 的 CAD 结构域,位于羧基末端的可结合胞膜的碱 性结构域^[42].当钙库消耗,钙离子从 STIM1 分子 的 EF 手型结构域中解离,引起 EF-hand-SAM 结构 域的去折叠,STIM1 继而快速聚集至内质网近细 胞膜区并通过其羧基末端的卷曲螺旋结构 CC2 与 Orai 蛋白相互作用而激活后者的开放.

2012 年 Stephen Long 课题组以 X 射线晶体学 方法解析了衍射分辨率 3.35 Å 的黑腹果蝇源 Orai 通道结构^[43]. Orai 通道由 6 个亚基构成六聚体的结 构,每个亚基由 4 个跨膜 α 螺旋组成. 其中来自 6 个亚基的 S1 螺旋共同组成了通道离子通透孔道.

Orai 通道的孔道结构有别于其他离子通道,孔道内 部氨基酸侧链决定了孔道不同部位的性质. 从胞外 向胞内方向,通道可以分为4个区域: a. 谷氨酸环 区; b. 疏水区; c. 碱性区; d. 胞质区. 其中谷氨酸 环区由非常保守的 178 位谷氨酸组成. 位于胞外区 域的谷氨酸环是带正电荷钙离子通透的入口. 谷氨 酸环下方由多个保守疏水氨基酸(V174、P171 和 L167)形成直径 8~10 Å、长度 18 Å 的孔道. 这部 分疏水区是通道形成稳定三维结构的疏水核心.疏 水区下方由 18 个包含精氨酸和赖氨酸的碱性氨基 酸构成,形成非常独特的碱性区.由于阳离子带正 电荷,而碱性氨基酸在生理 pH 下也带正电荷,碱 性氨基酸孔道在阳离子通道中非常罕见. 结构分析 揭示,碱性通道部分在通透钙离子过程中必须发生 构象变化,才能允许钙离子顺利通过. Orai 的结构 分析可以解释多种致病突变的分子机理.如疏水区 域中 V102C 和 G98P 等突变,可以影响通道整体 稳定性,导致通道持续通透.

SOCE 作为调节细胞内钙稳态的重要途径,与 肿瘤发生有着密切的联系,包括细胞增殖能力、迁 移浸润能力、凋亡抵抗能力、血管生成以及肿瘤免 疫原性改变^[44].食道鳞状上皮细胞癌(ESCC)病人肿 瘤组织中的 Orail 有高水平的表达,敲减 Orail 可 以显著降低 ESCC 细胞的增殖和迁移.Dubois 等^[45] 发现在前列腺细胞中 Orail 和 Orai3 的比例可以调 节 SOCE 的功能,从而影响肿瘤细胞的增殖和 凋亡.

在心血管系统中,SOCE 同样发挥了维持钙稳态的重要作用.高血压病人往往会出现血管平滑肌细胞增殖,这一过程伴随着SOCE激活. 敲减 Orail和STIM1可以显著减弱血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[46].

6 线粒体钙离子单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter, MCU)

线粒体在细胞钙稳态和氧自由基(reactive oxygen species, ROS)稳态方面发挥关键作用^[47-48]. 发生于细胞质的钙离子信号可经 VDAC 穿过线粒 体外膜,再经 MCU 复合体转运入线粒体基质. MCU 是位于线粒体内膜上的钙离子单向转运蛋白, 将钙离子顺电化学梯度从细胞质转运入线粒体基 质^[49].线粒体基质内的钙离子可经线粒体钠钙交换 从线粒体转出^[50].作为线粒体摄入钙离子的核心结 构分子,MCU 对线粒体的能量代谢和维持细胞生 存起着关键的作用,对于神经细胞、胰腺细胞、心 肌细胞等多种细胞的正常功能至关重要.

2016年,周界文实验室采用核磁共振和电子 显微镜技术,率先解析了处于关闭状态的 MCU 结 构,发现 MCU 可能以同源五聚体形式存在,形成 一个中间内空"花瓶"样结构.每个 MCU 单体的 第二跨膜区与卷曲螺旋结构域构成了花瓶的内围, 第一跨膜区包围在第二跨膜区外侧,而位于基质侧 的疏水卷曲螺旋结构可进一步稳定整个通道的构 象^[51].在该结构中,由 D240 和 E243 形成的孔道 直径分别为7Å和11Å,比较其他形成羟基环结 构的钙离子通道(如 Orai 孔道为 12Å)可以发现该 孔道直径不能允许钙离子的通过,因此该结构中 MCU 处于关闭状态.MCU 的整个通道口均由亲水 性氨基酸构成,而 Orai 通道由于羟基环下方出现 疏水氨基酸,因此 MCU 的钙离子传导速率可能较 Orai 更快^[51].

MCU作为线粒体钙转运的核心通道,其开放 与关闭受到多个蛋白的调节,这些蛋白与 MCU 分 子以一个复合物的形式稳定存在,统称为 MCU 全 复合物.近年来,基因组学的研究已经鉴定了 MCU 全复合物的其他几个重要成员,在哺乳动物 细胞中主要有 MICU1/MICU2、MCUb 以及 EMRE(essential MCU regulator)^[49].其中,含有 EF 手形结构的 MICU1 与 MICU2 通过二硫键形成异 源二聚体,覆盖在 MCU 通道入口.当胞质内钙离 子浓度升高时,MICU1/MICU2 二聚体构象发生改 变,允许钙离子进入MCU 通道口,MICU1 可进 一步促进MCU 通道活性达到较高的钙摄入水平. EMRE 特异性表达于哺乳动物细胞,通过生物信息 学预测发现其有一个跨膜结构域和一个高度酸化的 羧基端.EMRE 可能的功能是维持MCU 通道的开 放构象并将MICU1/MICU2 所感知的钙离子信号传 导到MCU 离子通道孔中.要完整地理解MCU 的 功能还有赖于对MCU 复合体结构的全面认识.冷 冻电镜三维重构技术已为此提供了空前的可能性.

7 结 语

以上讨论的是多数细胞内存在的主要钙离子通 透性离子通道. 它们在结构上具有诸多相似性,每 个通道又具有自身的结构特性和独特功能.如 TRPV 通道、电压敏感性钙离子通道、IP₃R 和 RyR 都与钾离子通道相似,为四聚体或四个重复结构域 的膜蛋白,它们的跨膜区都有6个 α 螺旋和S5-S6 之间的孔道环和孔道螺旋. S6 靠近胞质侧的疏水 氨基酸构成的狭窄区是控制这些通道开放和关闭的 共同结构.而孔道螺旋和孔道环在钙通道、钾通道 和钠通道构成离子选择器. Orai 通道与 MCU 的孔 道都包含由酸性氨基酸侧链构成的羟基环,这与电 压门控通道由孔道氨基酸主链羟基控制孔道性质十 分不同.不过由于 Orai 与 MCU 孔道的结构很不相 同,两者的通透特性和门控特性也大相径庭.除了 孔道性质外,他们各自的调节结构域也使得每种通 道蛋白分子的功能调控机制迥异.如 RyR 和 IP₃R 的胞质结构域十分庞大,这个庞大的胞质结构域是 多种调节分子结合的区域,为其功能的复杂调控提 供了精细的结构基础.

除了以上钙离子通道介导细胞外或细胞器内的 钙离子流入细胞质或线粒体基质外,细胞还有细胞 膜钙泵、钠钙交换体、内质网钙泵等转运蛋白负责 将钙离子移出细胞或移入细胞器,另有钙感受蛋白 ^[41,36]感受细胞外和细胞器内的钙离子浓度,它们共 同构成钙信号调控系统.不同细胞还有其他一些特 殊的离子通道和转运蛋白参与细胞钙信号的调控. 各种钙离子通道、钙转运蛋白、钙感受蛋白相互配 合,共同维护细胞钙稳态.其中任何环节发生功能 异常,就可能会导致疾病的发生.

由于离子通道所处的位置、分布、通透性、选 择性、动力学、调控因素的不同,其产生的钙信号 具有不同的时空特征、不同的生理功能^[1-2,52].现代 成像技术在时间分辨率、空间分辨率方面不断超 越,为记录和分析这些各不相同的钙信号提供了有 力的工具.结合动力学建模,将结构生物学技术对 通道构象变化的微观解析和光学成像技术对钙信号 动态行为的刻画以定量的方式有机结合起来,将是 未来阐明钙信号时空动态活动特异性调控生命过程 的发展方向.目前中国科学家在这两方面都逐步跻 身国际前沿的竞争,并在一些方面取得了世界领先 的研究优势.通过继续加强跨学科合作,在提出钙 信号调控理论、发展相关研究技术方面实现两条腿 走路,中国将有望在优势方向上引领该领域的前沿 发展,并在阐明钙通道相关疾病机理和开发相关药 物方面不断取得新突破.

参考文献

- Berridge M J, Lipp P, Bootman M D. The versatility and universality of calcium signalling. Nature Reviews Molecular and Cellular Biology, 2000, 1(1): 11–21
- [2] Clapham D E. Calcium signaling. Cell, 2007, 131(2): 1047-1058
- [3] Zheng J, Zeng X, Wang S Q. Calcium ion as cellular messenger. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 1–5
- [4] Jiang Y X, Lee A, Chen J Y, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. Nature, 2003, 423(6935): 33–41
- [5] Zhang X, Ren W L, DeCaen P, et al. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. Nature, 2012, 486(7401): 130–134
- [6] Wang L G, Tonggu L G. Membrane protein reconstitution for functional and structural studies. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 66–74
- [7] Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature, 2013, 504(7478): 107–112
- [8] Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. Nature, 2013, 504(7478): 113–118
- [9] Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 387–417
- [10] Fu J, Gao Z B, Shen B, *et al.* Canonical transient receptor potential
 4 and its small molecule modulators. Science China Life Sciences,
 2015, 58(1): 39–47
- [11] Liu D Y, Xiong S Q, Zhu Z M. Imbalance and dysfunction of transient receptor potential channels contribute to the pathogenesis of hypertension. Science China Life Sciences, 2014, 57 (8): 818-825
- [12] Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, 1997, 389(6653): 816–824
- [13] Caterina M J, Rosen T A, Tominaga M, et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. Nature, 1999, 398(6726): 436–441

- [14] Peier A M, Reeve A J, Andersson D A, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. Science, 2002, 296 (5575): 2046–2049
- [15] Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom M A, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel, a candidate vertebrate osmoreceptor. Cell, 2000, 103(3): 525–535
- [16] Clapham D E, Julius D, Montell C, Schultz G, et al. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structurefunction relationships of transient receptor potential channels. Pharmacological Reviews, 2005, 57(4): 427–450
- [17] Zamponi G W, Striessnig J, Koschak A, Dolphin A C. The Physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. Pharmacological Reviews, 2015, 67(4): 821–870
- [18] Buraei Z, Lumen E, Kaur S, Yang J. RGK regulation of voltage-gated calcium channels. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 28–38
- [19] Wu J, Yan Z, Li Z, *et al.* Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. Science, 2015, **350**(6267): aad2395
- [20] Wu J, Yan Z, Li Z, *et al.* Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. Nature, 2016, **537** (7619): 191–196
- [21] Fill M, Copello J A. Ryanodine receptor calcium release channels. Physiological Reviews, 2002, 82(4): 893–922
- [22] Zhao Y T, Valdivia C R, Gurrola G B, et al. Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 54–58
- [23] Efremov R G, Leitner A, Aeberold R, Raunser S. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. Nature, 2015, 517(7532): 39–43
- [24] Zalk R, Clarke O B, des Georges A, et al. Structure of a mammalian ryanodine receptor. Nature, 2015, 517(7532): 44–49
- [25] Yan Z, Bai XC, Yan C, et al. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. Nature, 2015, 517(7532): 50–55
- [26] Wei R, Wang X, Zhang Y, et al. Structural insights into Ca-activated long-range allosteric channel gating of RyR1. Cell Res, 2016, 26(9): 977–994
- [27] Bai X C, Yan Z, Wu J, *et al.* The Central domain of RyR1 is the transducer for long-range allosteric gating of channel opening. Cell Res, 2016, 26(9): 995–1006
- [28] des Georges A, Clarke OB, Zalk R, et al. Structural basis for gating and activation of RyR1. Cell, 2016, 167(1): 145–157
- [29] Peng W, Shen H, Wu J, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. Science, 2016, 354(5310): 301–312
- [30] Marx S O, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 2000, 101(4): 365–376
- [31] Xiao B, Sutherland C, Walsh M P, Chen S R. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca-release channel

(ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). Circ Res, 2004, **94**(4): 487–495

- [32] Guo T, Cornea R L, Huke S, et al. Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks. Circ Res, 2010, 106(11): 1743–1752
- [33] Fan G, Baker M L, Wang Z, et al. Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. Nature, 2015, 527(7578): 336–341
- [34] Puteney J W. Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium, 1986, 7(1): 1–12
- [35] Zhang S L, Yu Y, Ross J, et al. STIM1 is a Ca sensor that activates CRAC channels and migarates from the Ca store to the plasma membrane. Nature, 2005, 437(7060): 902–905
- [36] Liou J, Kim M L, Heo W D, et al. STIM is a Ca sensor essential for Ca-store-depletion-triggered Ca influx. Current Biology, 2005, 15(13): 1235–1241
- [37] Roos J, DiGregorio P J, Yeromin A V, et al. Stauderman KA. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca channel function. Journal of Cell Biology, 2005, 169(3): 435–445
- [38] Yeromin A V, Zhang S L, Jiang W, et al. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. Nature, 2006, 443(7108): 226–229
- [39] Prakriya M, Feske S, Gwack Y, et al. Orail is an essential pore subunit of the CRAC channel. Nature, 2006, 443(7108): 230–233
- [40] Vig M, Peinelt C, Beck A, et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca entry. Science, 2006, 312(5777): 1220–1223
- [41] Zhang C, Miller C L, Brown E M, Yang J J. The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 14–27
- [42] Prakriya M, Lewis R S. Store-operated calcium channel. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1383–1436
- [43] Hou X, Pedi L, Diver M M, et al. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. Science, 2012, 338(6112): 1308–1313
- [44] Pan Z, Ma J J. Open Sesame: treasure in store operated calcium entry pathway for cancer therapy. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 48–53
- [45] Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, et al. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. Cancer cell, 2014, 26(1): 19–32
- [46] Puato M, Faggin E, Favaretto E, et al. Prevalence of fetal-type smooth muscle cells in the media of microvessels from hypertensive patients. Hypertension, 2004, 44(2): 191–194
- [47] De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. Annual Review of Biochemistry, 2016, 85(85): 161–192
- [48] Jian C S, Hou T T, Yin RK, et al. Regulation of superoxide flashes by transient and steady mitochondrial calcium elevations. Science China Life Sciences, 2014, 57(5): 495–501
- [49] Kamer K J, Mootha V K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015,

16(9): 545-553

- [50] Nita L I, Hershfinkel M, Sekler I. Life after the birth of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCLX. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 59–65
- [51] Oxenoid K, Dong Y, Cao C, et al. Architecture of the mitochondrial

calcium uniporter. Nature, 2016, 533(7602): 269-273

[52] Song Z X, Chen Q, Ding Q, et al. Function of Ca²⁺-/calmodulindependent protein kinase IV in Ca-stimulated neuronal signaling and behavior. Science China Life Sciences, 2015, 58(1): 6–13

Recent Research Progress of Ca²⁺ Permeable Channels^{*}

FAN Xue-Xin, YANG Lei, XIANG Bin, WANG Shi-Qiang** (State Key Laboratory of Membrane Biology, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Ca^{2+} is a universal intracellular messenger playing important roles in nearly all biological processes. Recent studies of structural biology have resolved near-atom-resolution structure of many Ca^{2+} permeable ion channels in their different open/close states. These advances have revealed the molecular mechanisms for the channel construction, operation, function and regulation, and provide a fundamental basis for understanding the process of Ca^{2+} signaling and related diseases.

Key words Ca²⁺ signaling, TRP channels, voltage-gated Ca²⁺ channels, ryanodine receptors, store-operated Ca²⁺ entry, mitochondrial unipoter **DOI**: 10.16476/j.pibb.2016.0365

^{*} This study was supported by the State Major Research and Development Program (2016YFA0500401), National Natural Science Foundation of China (31630035, 81370203, 81461148026, and 31327901) and the Project of Beijing Municipal Science and Technology Commission (Z141100000214006).
**Corresponding author.

Tel: 86-10-62755002, E-mail: wsq@pku.edu.cn

Received: November 21, 2016 Accepted: December 15, 2016