



神经电信号和运动肌细胞之间的桥梁

——烟碱型乙酰胆碱受体通道(NAChR)

谢宁 展永 安海龙 卓益忠

烟碱型乙酰胆碱受体(NAChR)是通过打开或关闭一个跨膜生成孔的门来控制神经和肌肉细胞间的电信号。这个通道是由两部分组成的:直接面向通道的内环(inner ring)是由5个 α 螺旋互相缠绕形成的,它们成放射状地排列,这样就为离子形成了一个逐渐变窄的通道。这个通道的外环(outer ring)是由15个 α 螺旋互相缠绕形成的,它们的作用是将内环和外部的油脂层隔离开来。通道的“门”是一个位于细胞膜中间的一个压缩的疏水性区域(constricting hydrophobic girdle),它是靠内环相邻的螺旋之间的微弱作用力而形成。当乙酰胆碱配体进入配体结合部位(the ligand-binding domain)时,它就将蛋白质侧链的螺旋向通道入口相反的方向扭动,这种扭动就被传入内部螺旋,从而打开了这个压缩的疏水性区域的结构,也就实现了打开通道的目的。

这个通道是由两部分组成的:直接面向通道的内环(inner ring)是由5个 α 螺旋互相缠绕形成的,它们成放射状地排列,这样就为离子形成了一个逐渐变窄的通道。这个通道的外环(outer ring)是由15个 α 螺旋互相缠绕形成的,它们的作用是将内环和外部的油脂层隔离开来。通道的“门”是一个位于细胞膜中间的一个压缩的疏水性区域(constricting hydrophobic girdle),它是靠内环相邻的螺旋之间的微弱作用力而形成。当乙酰胆碱配体进入配体结合部位(the ligand-binding domain)时,它就将蛋白质侧链的螺旋向通道入口相反的方向扭动,这种扭动就被传入内部螺旋,从而打开了这个压缩的疏水性区域的结构,也就实现了打开通道的目的。

一、关于离子通道的基本知识

通道蛋白(channel protein)是横跨细胞膜的亲水性通道,它允许适当大小的离子顺浓度梯度通过,故又称离子通道。有些通道蛋白形成的通道通常处于开放状态,如钾泄漏通道,允许钾离子不断外流。有些通道蛋白平时处于关闭状态,即“门”不是连续开放的,仅在特定刺激下才打开,而且是瞬时开放瞬时关闭,在几毫秒的时间里,一些离子、代谢物或其他溶质顺着浓度梯度自由扩散通过细胞膜,这类通道蛋白又称为门通道(gated channel)。

一个离子通道含有4个主要功能部分:亲水性孔道、门控感受器、偶联单位和调节部位。偶联单位把感受器与实际的孔偶联在一起,把感受器的活化传到孔道。调节部位影响信号从感受器传到孔的效率。

离子通道具有三个显著特征:一是离子选择性,离子通道对被转运离子的大小与电荷都有高度的选择性;二是高速转运特性,神经细胞膜上的离子通道可高速通过离子,单个通道最高转运速度可达 10^8

个/秒;三是离子通道是门控的,即离子通道的活性由通道开或关两种构相所调节,并通过开关应答于适应的信号。多数情况下,离子通道呈关闭状态,只有在膜电位变化,化学信号或压力等刺激后才开启形成跨膜的离子流。

根据门控机制,门通道可以分为四类(图1):配体门通道(ligand gated channel)、电位门通道(voltage gated channel)、环核苷酸门通道(Cyclic Nucleotide - Gated Ion Channels)和机械门通道(mechanosensitive channel)。不同通道对不同离子的通透性不同,即离子选择性(ionic selectivity)。这是由通道的结构所决定的,只允许具有特定离子半径和电荷的离子通过。根据离子选择性的不同,通道可分为钠通道、钙通道、钾通道、氯通道等。但通道的离子选择性只是相对的而不是绝对的,比如,钠通道除主要对 Na^+ 通透外,对 NH_4^+ 也通透,甚至于对 K^+ 也稍有通透。电压门控通道根据最易通过的离子可命名为电压门控钠通道、钾通道和钙通道等。配体门控通道,通常按配体,尤其是神经递质名称命名,如谷氨酸受体通道和本文章将要详细介绍的乙酰胆碱受体通道等。

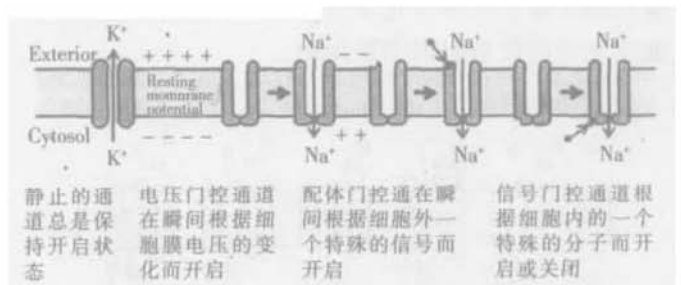


图1 离子通道的分类

二、烟碱型乙酰胆碱受体通道的结构

对烟碱型乙酰胆碱受体通道这种跨膜信号的传递方式的研究,最早是从对运动神经纤维末梢释放的乙酰胆碱(Ach)如何引起它所支配的骨骼肌细胞兴奋的研究开始的。早已知道,当神经冲动到达神经末梢处时,先是由末梢释放一定数量的Ach分子,后者再同肌细胞膜上称为终板(指有细胞膜上同神经末梢相对的那部分膜,其中所含膜蛋白与一般肌

细胞膜蛋白不同)处的"受体"相结合,引起终板膜产生电变化,最后引起整个肌细胞的兴奋和收缩。由于神经-肌接头处的"受体"也可同烟碱相结合,因而过去在药理学分类中称它为N-型ACh受体。80年代后期,我国学者李镇源发现 α -银环蛇毒同N-型受体有极高的特异性结合能力,又有人发现一些电鱼的电器官中有密集的这种受体蛋白质分子存在;再依靠70年代以来蛋白质化学和分子生物学技术的迅速发展,目前不仅已将这种蛋白质分子提纯,而且基本上搞清了它的分子结构和它们在膜中的存在形式。原来它是由4种不同的亚单位组成的五聚体蛋白质(图2),总分子量约为290kd;每种亚单位都由一种mRNA编码,所生成的亚单位在膜结构中通过氢键等非共价键式的相互吸引,形成一个结构为 $\alpha_2\beta\gamma\delta$ 的梅花状通道样结构(图2,A和B),而其中的两个 α -亚单位正是同两分子ACh相结合的部位,这种结合可引起通道结构的开放,其几何大小足以使终板膜外高浓度的 Na^+ 内流,同时也能使膜内高浓度的 K^+ 外流,结果是使原来存在两侧的静息电位近于消失,亦即使该处膜内外电位差接近于0值,这就是终板电位,于是完成了ACh这种化学信号的跨膜传递,因为肌细胞后来出现的兴奋和收缩都是以终板电位为起因的。所以,可以说,烟碱型乙酰胆碱受体(NAChR)通道是连接神经信号和肌肉运动的一个桥梁,一个枢纽。没有NAChR,就不能完成烟碱型乙酰胆碱这种神经化学信号的跨膜传递,也就不能完成神经控制肌肉细胞运动。

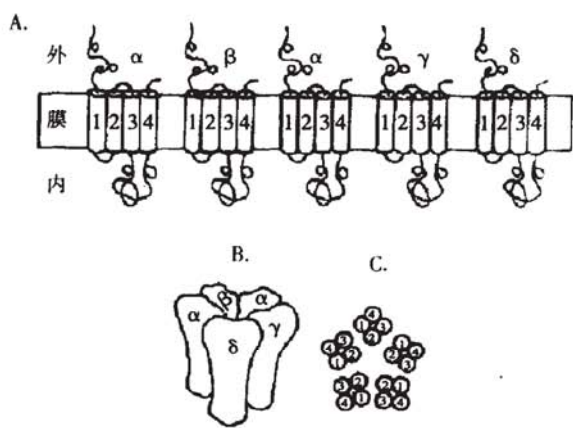


图2 N-型ACh门控通道的分子结构示意图

A: N-型ACh门控通道的5个亚单位和它们所含 α -螺旋在膜中存在形式的平面示意图;B:5个亚单位相互吸引,包绕成一个通道样结构;C:在跨膜通道结构中,各个亚单位所含 α -螺旋在通道结构中的位置

用分子生物学实验技术证明,同其他膜结合蛋白质类似,在上述4种不同的亚单位肽链中,都存在有4种主要由20~25个疏水性氨基酸形成的 α -螺旋,因而推测每个亚单位的肽链都要反复贯穿膜4次(图2A),而5个亚单位又各以其第2个疏水性跨膜 α -螺旋构成了水相孔道的"内壁"(图2C)。由上述分子水平的研究成果可以知道,最初将终板膜上完成ACh跨膜信号传递的蛋白质称作"受体"是不符合实际情况的,它们是一种通道样结构,只是在组成通道的蛋白质亚单位中有两个亚单位具有同ACh分子特异地相结合的能力,并能因此引起通道蛋白质的构相变化而使通道开放,然后靠相应离子的扩散而完成跨膜信号传递。因此,这种蛋白质应称为N-型(或烟碱型)ACh门控通道,属于化学门控通道或化学依从性通道中的一种。

可以产生Torpedo电光的(肌肉衍生)电组织富含这种包含NACh受体的细胞膜,并且为生理学和生物化学研究神经传输提供有价值素材的历史已有50多年了。由于电子显微技术的应用,这种孤立的后联合会(postsynaptic)细胞膜对结构分析学也有十分重要的意义。它们可以很容易地被转化成管状晶体(tubular crystals),其中都包含像在vivo中一样排列着的受体(receptors)和介入脂分子(intervening lipid molecules)(如图3),这就使得在近生理学(near-physiological)离子环境下研究不同的基本构型成为可能。可以通过在由电子镜象决定的三维密度图中加入从ACh结合蛋白的同源五聚体AChBP得到的一个 β 折叠核结构来得到一个氨基终端配体结合部位的描述性模型。然而,这些图像的质量和晶格的扭曲变形限制了以前对于这种通道的描述,这种描述仅仅解释了一些通道内部的 α 螺旋折叠。通过在液氮温度下的异常图形,以及利用计算去修正扭曲,已经将分辨率扩展到 4\AA 。在这里介绍一种基于 4\AA 密度图上的通道区域原子模型,并且提出一种对于当ACh结合到受体时通道如何打开的解释。从右图可以看到,受体蛋白从膜的内外两侧呈放射状排列,并且有两个密度同心环,其中环距离为 30\AA 。在顶部是一个独立的受体蛋白,它被圈出来了。跨膜生成通道(上部矩形)和N-终端配体结合部位(下部矩形)组成了一个大的中心前庭。细胞膜内疏水性的核被认为位于密度环的中央。图3为较低分辨率下管状

晶体的切面图。这种具有螺旋对称性的管状晶体是在 *Torpedo marmorata* 细胞膜中得到的。

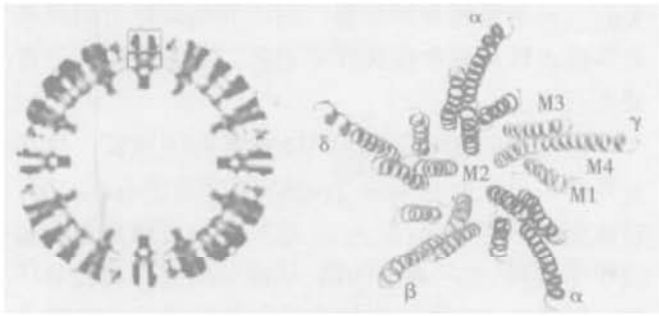


图3 管状晶体的切面

图4 通道的立体图

NACHR 通道对离子形成了一个逐渐变细的路径,它由五个 α 螺旋环绕形成了一个近乎完美的五瓣形,这样每个亚基都成为了一个类似于“螺旋桨推进器”的“刀刃”(图4)。在内部,形成通道的螺旋 M2 相对地向里倾斜一直延伸到膜的中部。相反地,外部的螺旋(M1,M3,M4)相对地向外倾斜,并于中心轴相切。由于 M1 和 M3 以非常有规律的方式扭结在一起,这就形成了一个左手螺旋系统。

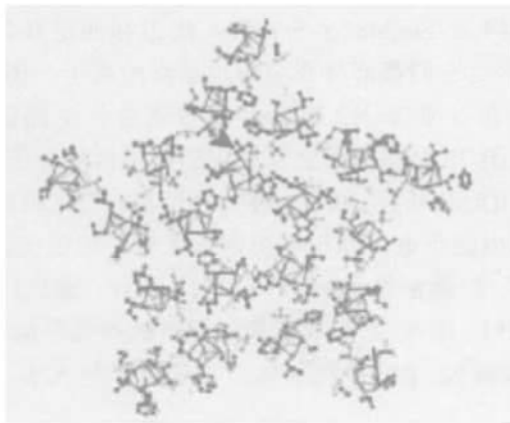


图5 通道的截面图

这些螺旋在细胞外膜逐渐展开(中心距 12.5~15Å),而且可能使得膜外离子横向地进入通道,迂回地通过外部的前庭。通道直径最大的地方位于亚基的分界面处,并且延伸到配体结合部位(图6星号处)。

内层和外层的螺旋在细胞膜中部逐渐分开,在它们之间形成的空间足以和位于中心的孔相比较(图4)。这就是说明,NACHR 通道由两个主要结构域组成:内环(链)(inner ring),它直接与通过中心的离子相接触;另一个是外环(壳)(outer ring)或者称为支架(scaffold),它将内链和外层油脂分开。这种划分与早期的管状晶体实验相吻合,实验说明当受

体被激活时内层部分产生动作而外层不动。图4为从突触间隙处观察到的通道立体图,图5为位于膜中部的五聚体截面图,它被介于其间的空隙分为面向通道和面向脂层的两部分。

ACh 受体族的配体结合部位和跨膜的离子通道部分是由分离的氨基酸序列长链构成。图6为从垂直于受体中心轴方向观察 α 螺旋通道结构与细胞膜表面(断线)和组成配体结合部位的 β 折叠结构;星号代表亚基分界面的打开空间。从结构中可以看出,这两部分的接触面的显著特点是从占主导地位的 β 折叠向 α 螺旋的陡然转变(图6)。然而,奇怪的是,这个接触面不是位于厚度为 30Å 细胞膜外表面,而是位于膜外侧 10Å 处。所以,形成通道的内腔部分要比通常认为的长一些, α 螺旋的 M1~M4 部位都要比细胞膜的疏水性中心区域更长一些。

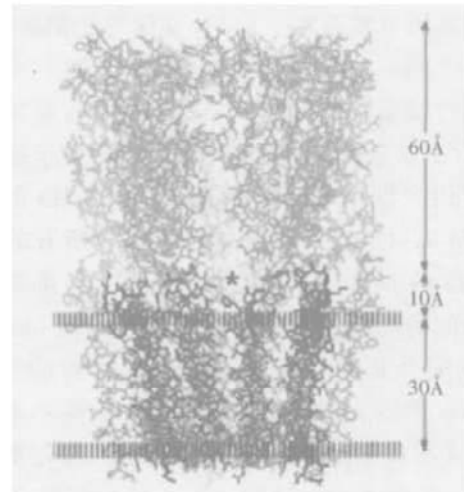


图6 构成 NACHR 的两部分以及它们的分界面

通道的每一个亚基都唯一地同一个蛋白质部位相连接,其中亚基最大的尺寸可以达到 50Å,它们与细胞膜平面或平行或垂直。每个亚基都包含四个膜生成螺旋 M1~M4 和它们之间的连接环(connecting loops),这些螺旋在外膜表面有延伸部分。这种透膜蛋白 M1、M2 和 M4 的底端是由极性或者阴性电核组(α -Asn217 和 α -Asp238: α -Glu241 和 α -Glu262: α -Asp407 和 α -Aly428)为框架组成的。

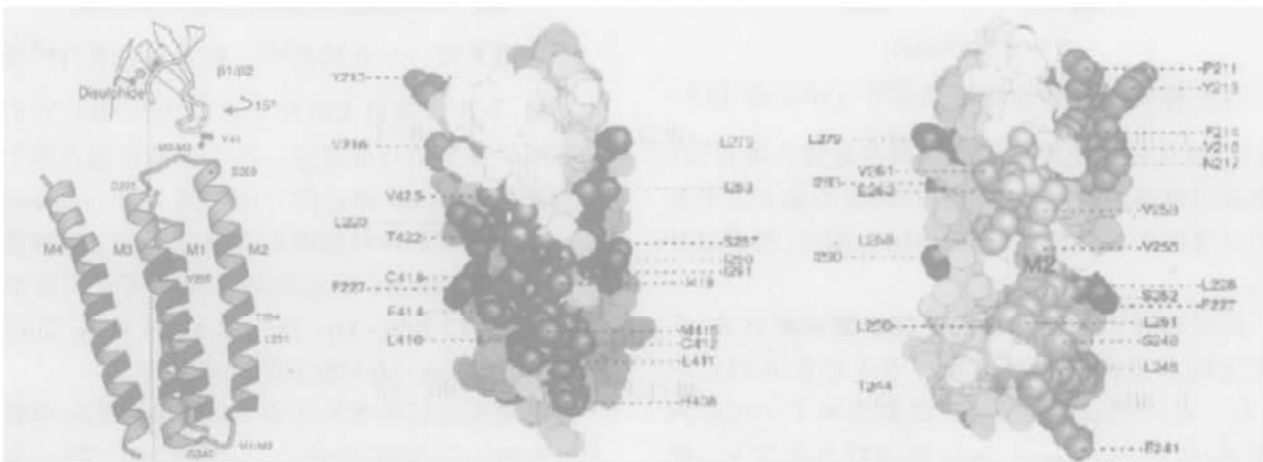
这些亚基折叠类似于在 myohemerythrin 和烟草花叶病毒中发现的“经典”4- α -螺旋捆,序列中相连的螺旋被连续地放在 4- α -螺旋捆的周围(图7a)。这一组螺旋 M1、M3 和 M4 看起来好像是被一串围绕着中心芳香残基(α -phe223)的疏水性侧链固定

在细胞膜上, M2 螺旋同 M1 螺旋和 M3 螺旋间没有范德华力联系, 这表明它与其他螺旋是被充满水的空间隔开的。然而, 有许多紧密的并置存在于 M2 和 M3 的疏水性侧链 (例如 Leu250- Ile296; Leu257- Ile289, 和 Val261- Val285 在 α 亚基上) 以及 M2 和 M1 的疏水性侧链(Leu253- Phe225) 上。这些潜在的联系很可能影响到内部螺旋和外壳中五聚体在闭合时的相对运动。

在结构上将通道划分为面向油和面向水两种面, 这与通过疏水和亲水探针特殊残基得到的实验结果十分吻合。M1、M3 和 M4 上一些面向膜内层的残基被亲水性试剂标记后可以被光激活 (图 7 中深色部分)。其他的面向孔内腔或在膜内层外面的残基被确定为半胱氨酸残基并被水溶性合成微粒标记 (图 7c 中浅色区域)。而且, 一些已查明的亲水性残基分布在 M2 和其他螺旋上, M2 与五聚体的外壳是以很小的作用力联系在一起的, 发现与此相吻合。同样地, M2 上的一些亲水性残基和 M1 上的一个残基也被水溶性微粒标记了(图 7c)。图 7a 为亚基折叠的立体图(α 亚基), 从亚基内表面观察, 位于膜内和膜外的蛋白分别用不同颜色标注。M2~M3 的 loop (α - Val271- α - Gly275) 已被鉴定存在于所有的亚基中; M1~M2 的 loop 还未被很好地证实, 但迹象表明可能有相似的功能。图中同样展示了内层 loop, β 1/ β 2, 以及配合基结合部位的二硫化物桥的 “ γ -loop”。loop 处的 α - Val44 联接入 M2 末端的疏水性腔囊。箭头标明 β 1/ β 2 的 loop 绕穿过二硫化物桥的直线为轴(垂直线)的 15° 旋转, 正是由于这种旋转

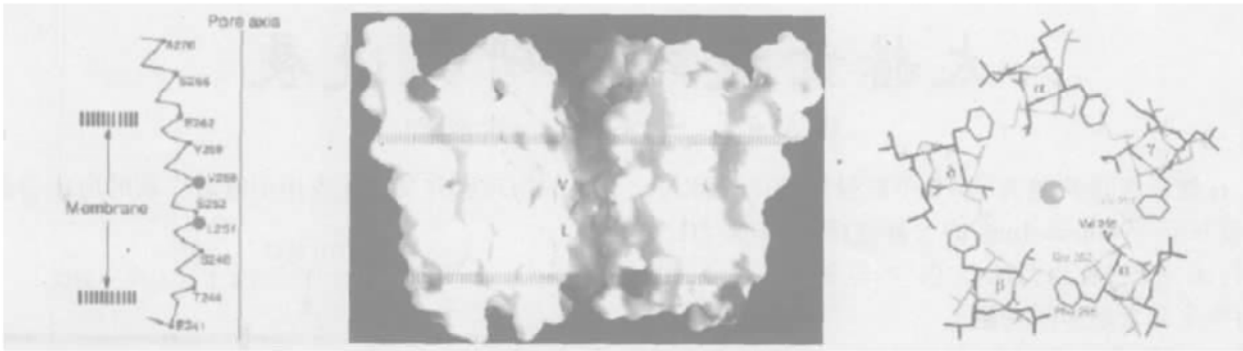
打开了通道。图 7 为 α 亚基的全空间模型, 从孔内 (b 图) 和孔外(c 图) 观察, 标出了与膜表面(断线)相关的一些重要残基的位置, 用不同色调标出的残基是用疏水性和亲水性探针标记的, 或者相应的二者兼而有之。

形成中间传导通道的 M2 螺旋有 40\AA 长 (包括膜外的蛋白), 并且与 α - Pro265 和邻近的 α - Leu251 轻微地扭结在一起(图 8a)。这些螺旋按照同源残基的顺序排列, 面向通道内部, 从而形成特殊的化学环境 (图 8b)。这种环境的原子大部分都是没有极性的, 并且对于散布在其中的离子形成相对惰性的表面, 但是其中有两个氨基酸链 (α - Ser266 和 α - Glu262 链) 包含负电荷基团, 这可能在通道打开时影响到离子传导, 提高局部的阳离子浓度而降低阴离子浓度。电生理学实验上相关的变异可能与这种环链对阳离子运输的影响有很大关系。第三个可能对离子传导有影响负电荷环链是在 α - Glu241 的 “内环” 上, 它是在 M2 螺旋末端的 loop 区域, 并且形成了通道的内膜入口。在一些小的极性残基 (α - Thr244、 α - Ser248、 α - Ser252) 附近和通道开口的压缩部位, 它们都部分或全部地暴露给离子。图 7a 展示了在 α 亚基 M2 螺旋上面向通道各个侧链的位置。图 7b 是将前面亚基移走后通道区域分子表面, 用 GRASP 补偿, 红色(刊出的是黑白图)和蓝色代表相应的负电荷和正电荷密集区域; 黄色代表包含 “门” 的疏水性区域; V 和 L 代表 α - Val255 和 α - Leu251。图 8c 是组成 “门” 的侧链的对称性结构。图 8b 和图 8c 中的蓝色球体代表钠离子的大小 (水合



a. α - 亚基的四个多缩氨基酸序列
 b. α 亚基的全空间模型 (从通道外面观察)
 c. α 亚基的全空间模型 (从通道里面观察)

图 7 通道亚基的氨基酸序列分布图



a. 亚基 M2 螺旋上面向通道各个侧链的位置

b. 通道区域分子表面图 (前面的亚基已移走)

c. 构成门的侧链呈均匀排列

图 8 通道的内层解剖图

离子可能结合在这个区域)。

三、烟碱型乙酰胆碱受体通道的功能特点

配体结合部位的三维折叠亚基位于两个缠绕在一起并且以二硫化物作为“桥”连接的“三明治”式 β 折叠部分。利用 AChBP 结构为模板去解释由电子图得到的图形,知道了 α 亚基的两个“三明治”蛋白在被暴露在配体 Ach5 毫秒后活化并转化成可变序列。这种开启通道的变构相变化引起了内部 β 折叠围绕以穿过二硫化物桥并且与膜表面垂直的轴 15° 旋转。这种 α 亚基内部折叠区域与跨膜生成区域之间的空间关联是由内层区域的刚体与在 4\AA 密度下测得的图像的吻合度所决定的。图 6b 展示了在这一区域相互作用的两个部分。短 loop 与这两个内部 β 折叠飘带(b1/b2; a- Glu 43- a- Gln 46)中的第一个结合的位点是处于下列末端残基, α - Val44, 进入由相对的 M2 螺旋的末端(a- Ser 269- a- Pro 272)残基组成的疏水性“兜”里。

尽管这些有限的分辨率无法完全地解释, 这种 $\beta 1/\beta 2$ loop 和 M2 末端的钉式插口作用展现了两个区域的活动部分的唯一的直接联系, 并且发现当受体被激活时, 它们旋转的方式相同。 α 亚基内部链的旋转运动必须通过这种联系沿着内腔 M2 螺旋与位于膜中部的“门”联系在一起。由于这种有效的联接, M2 必须可以相对于外层蛋白墙自由运动。但这看起来似乎有一些可能, 因为 M2 螺旋与外墙间只有有限的联系作用。同时, 所有的联接 loops 都起始于保守的氨基酸残基(Gly275 和 Gly240, 图 7a), 处于旋转轴附近, 它可以通过增加缩氨酸连接处周围的转动自由性来提高灵活性。

电子显微图表明当受体被激活时通道在细胞膜

中央部位变宽, 这样, 组成“门”的疏水性区域相互分离从而允许离子通过。那么 α 亚基的内部薄片的 15° 旋转是如何与膜生成部位相联系, 并摇动疏水性区域层打开通道呢? 结构上的细节为这种机制提供了一个简单的机械模型(图 9)。首先, 从根本上影响着 α 亚基的配体结合部位的构相变化引起了它们内层薄片的旋转。第二, 内层薄片的旋转通过与它们相联的 M2 螺旋传递给(位于膜中部的)疏水性区域层或说“门”。第三, 内层这种扭曲减弱了将疏水性区域层联系在一起的疏水性边-边作用。于是, 螺旋“倒塌”到外层蛋白壁上, 从而引起一个构相上的疏水性作用的改变, 而这种改变使得离子可以渗入。

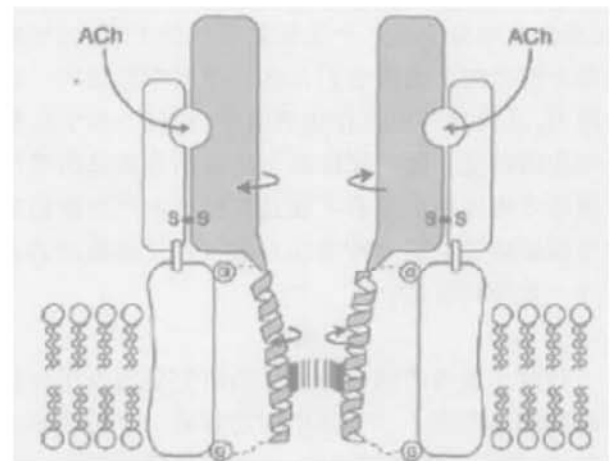


图 9 门开启机制的假设性模型。ACh 与受体结合引起的亚基扭动通过 M2 螺旋被传导到“门”-离子渗透的一个疏水性屏障。这种扭动动摇了“门”, 从而引起螺旋产生构象的变化进而使得离子可以渗入。当开启时螺旋可以自由地移动, 因为它们同外面的蛋白质层分离并且仅通过柔韧的 loop 连接在一起, 其中包括氨基酸残基(G)。S-S 是配合基结合区域的可旋性二硫化物轴, 它被固定在通道外层上。相对移动部位用阴影表示

疏水性区域层的完整性, 像其他的对称性排列一样, 可能是依赖于各组成部分间均等的作用力。从

太赫兹技术的研究进展

程兆华 祝大军 刘盛纲

在波长范围跨越高达 10 个数量级的电磁波段中, 波长介于 $30\ \mu\text{m}\sim 1\text{mm}$ 的太赫兹(Terahertz, THz)辐射, 这一曾被称为“THz 空白”的电磁波段领域, 引起科学家越来越多的兴趣。

太, 是兆兆的英译音, 所以太赫兹辐射又称为 T 射线, 属于远红外、亚毫米波范畴。早在上个世纪初, 科学家就对该波段产生了浓厚的兴趣, “Terahertz”一词首次由弗莱明(Fleming)于 1974 年提出, 以用来描述迈克尔逊干涉仪的光谱线频率范围。但在过去相当长的时间里, 由于缺乏有效的产生和检测方法, 相对成熟的微波和光学技术, 对该波段的研究进展相当缓慢。太赫兹波段作为“电磁波段上最后一块未开垦的处女地”, 甚至被人们称为电磁波谱中的太赫兹空腔(如图 1 所示)。近年来, 由于固态振荡器、量子级联激光器、自由电子激光器和超快激光技术的迅速发展, 为太赫兹脉冲的产生提供了稳定、可靠的激发光源, 使太赫兹辐射机制、检测技术和应用技术研究得到全面发展, 随着新的材料技术提供了更高功率的发射源, 太赫兹技术已经被证明在更加深

入的物理研究及实际应用中有着广阔的应用前景。

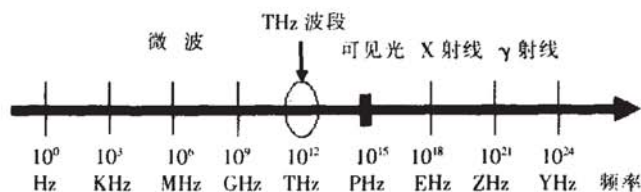


图 1 太赫兹波段在电磁波谱中位置示意图

太赫兹波的特点

太赫兹技术之所以引起广泛的研究, 是由于太赫兹波独特的特点, 随着太赫兹技术的不断进展, 可望广泛地应用于基础科学以及军事国防领域。以下简列一下太赫兹波的特点:

大多数分子均有相应的太赫兹波段的“指纹”特征谱, 研究材料在这一波段的光谱对于物质结构的性质以及揭示新的物质有着重要意义; 介于微波和红外光之间的太赫兹波在应用方面相对与其他的波段的微波、可见光以及 X 射线等, 具有很强的互补性(作为一种电磁波, 金属对它完全透明可作为强力

而, 当这些组分中的一个受到足够强的干扰时, 邻近的部分就会失去维持它们在这一序列中位置的一组作用力, 从而导致相互作用的改变, 而进一步引起整个结构的转变。这种仅仅两个配体结合亚基的动作传递给对称性通道很有可能是解释这种严密而稳定的门控运动机制的一种最佳方案, 并且将激活的亚基分子数降到最低。

四、展望

对离子通道的结构与功能的研究是当今生命科学研究的热点之一, 也是生物物理的一个重要研究方向。这是一个需要用生物、化学和物理的理论及实验手段进行综合研究的重要领域。这一领域不断有令人惊奇的和意想不到的研究成果出现。这些研究成果向以往理论和实验提出了严峻的挑战。我们期望在实验上和技术上能尽快有所突破, 以便获得关于烟碱型乙酰胆碱受体通道的结构及与其通透性有关的更为详尽和直接的实验数据, 来推动研究工作的进一步深入。在理论上, 从实验出发, 结合烟碱

型乙酰胆碱受体通道的三维结构分析它的实际功能机制。随着对这一问题的研究不断取得突破性的进展, 将有助于人们搞清生命中的运动现象的机制。以神经和心肌细胞为例, 目前有关神经和心脏的药物中, 有一半以上都是作用于这些细胞上的特种离子通道而起作用的。因而研究离子通道是认识细胞功能和发明治疗许多严重疾病的特效药物所必不可少的。目前, 对离子通道的研究已成为分子生物学、分子药理学、生物物理学、神经生物学等多种学科的热点。怎样在分子水平上解释它的结构与功能的关系一直是对离子通道研究的热点。离子通道以其独特的魅力吸引着人们参与到对它的研究中来。对这一问题的研究, 有助于人们在分子水平上理解通道蛋白的一些机制, 帮助人们搞清膜的物质、信息输运机制, 深入认识生命活动的本质。

(谢宁、展永、安海龙 天津河北工业大学理学院 300130; 卓益忠 北京中国原子能科学院 102413)