

内向整流钾离子通道 Kir3. x 的门控机制

张永萍 李南方

摘要 内向整流钾离子通道 Kir3. x 在多种细胞上表达,对控制细胞的电兴奋性起着重要的作用。Kir3. x 通道的“开-关”受多种因素调控。Kir3. x 通道上氨基酸残基特别是调节区域的氨基酸的突变严重影响通道的门控,并与多种疾病的发生有关。细胞内的 pH 值、PIP₂、Gβγ 和 Na⁺ 浓度的变化也影响 Kir3. x 通道的活化。

关键词 内向整流钾离子通道 Kir3. x 氨基酸 突变 门控机制

[中图分类号] R544

[文献标识码] A

内向整流钾离子(inward rectifier K⁺, Kir)通道 Kir3. x(Kir3. 1 ~ 3. 4), 又称 G 蛋白门控的 Kir 通道(G protein-gated Kir channels, K_G), 是 Kir 的成员之一,之所以称为内向整流是由于 K⁺ 在这个通道中外流时,被细胞内的多胺和 Mg²⁺ 通过电压依赖的方式阻滞了孔区, K⁺ 外流被抑制,因此 K⁺ 内流比外流更容易^[1]。其与许多生理过程如心率的调节、神经元的兴奋性及胰岛素的分泌等关系密切, K_G 通道的“开-关”机制及调控一直是研究的热点,随着蛋白质衍射、膜片钳等技术的应用,人们对 K_G 通道“开-关”的门控机制有了更深入的认识。

一、Kir3. x 通道的结构、组成和分布

Kir3. x 通道与其他的内向整流钾离子通道一样,是由两个跨膜域(transmembrane domains, TM1 and TM2)通过细胞外的“孔构成区”(H5)区连接并和细胞浆区域的氨基末端、羧基末端组成^[2]。H5 区为“离子选择器(ion-selectivity filter)”与其他的 K⁺ 通道有着共同指纹序列 T-X-G-Y(F)-G。由于在结构上缺乏电压敏感的 S4 跨膜区,而在电压门控的 K⁺、Ca²⁺ 及 Na⁺ 通道中均存在的 S4 膜电压感受器,所以 Kir3. x 并非受电压门控^[3]。

Kir3. x 通道与其他的内向整流 K⁺ 通道一样,是由同源或异源四聚体构成。也就是 Kir3. 1 和 Kir3. 2, Kir3. 3 或 Kir3. 4 构成同源或异源复合物。这些复合物组成不同的 K_G 通道,并在不同的细胞和组织上功能不同。这 4 个编码人的 Kir3. x 亚单元的蛋白质

是由 393 到 501 个氨基酸组成,并且有近 36% 相同序列,每一个 Kir 亚单元有 2/3 的氨基酸序列在细胞质区域,氨基末端有超过 90 个氨基酸,羧基末端有超过 200 个氨基酸在细胞质区域^[4,5]。在 Kir3. x 家族, Kir3. 1 亚单元是最长的,与其他亚单元仅有 44% 的相同序列。而 Kir3. 2、Kir3. 3 和 Kir3. 4 有 62% 的相同序列。

Kir3. x 通道广泛的分布于大多数的哺乳动物包括人、大鼠和小鼠^[2]。RNA 印迹技术分析人外周和脑组织显示 Kir3. 1 在肾脏、心和脑组织表达,其中脑组织特别是在杏仁核和海马回表达的水平最高, Kir3. 3 被检测到在所有脑组织中高表达,而 Kir3. 4 主要表达在胰腺,较少程度的在心脏、胎盘、肺脏和肾脏以及大脑微量表达^[6]。有 4 种变体的 Kir3. 2 较少地表达在外周,但是在脑特别是黑质、杏仁核和海马回区域呈高水平表达,在这些区域 Kir3. 2c 变体最丰富^[7, 8]。

二、Kir3. x 通道的门控

Kir3. x 功能就是通过 TM 和细胞质孔(cytoplasmic pore, CP)区长 88Å 的 K⁺ 的渗透路径, K⁺ 能否在 Kir 通道中通过,与其门控机制关系密切,晶体结构已揭示有两个 K⁺ 的门控,一个位于 TM 上细胞质一边的螺旋结合交叉区域,一个位于 CP 区域膜面的环,也被称为 G-环^[9]。这些部位与细胞内的 pH 值、Gβγ、PIP₂ 等物质相互作用关系密切;也与其通道上氨基酸位点的排列和突变关系密切。

1. 跨膜区域对 Kir3. x 的门控:(1) TM1 与 Kir3. x 的门控:TM1 涉及了 Kir 的门控。大多数的 Kir 通道可以被细胞内的酸所抑制,然而 pH 值的敏感度却十分的不同,一个决定 pH 值敏感度的关键因素就是 TM1 螺旋结合交叉区域的赖氨酸,在这个位置有赖氨酸的 Kir 通道包括 Kir1. 1、Kir4. 1、Kir4. 2 和 Kir4.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260129)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院高血压研究所

通讯作者:李南方,电子信箱:lnanfang2010@sina.com

1/5.1 显示出 pH 值的高敏感度,而在这个位置缺乏赖氨酸的通道 Kir2.1、Kir3.x 和 Kir6.2 显示出明显的 pH 值敏感度,相反如果在这个位置引入赖氨酸会增加 pH 值的敏感度^[10]。Kir1.1 同源四聚体模型显示 TM1 的 K80(与 Kir3.2 中 TM1 的 N94 相对应)和 TM2 的 A177 在绑定交叉区域通过氢结合,使通道处于关闭状态或非活化状态。TM1 的 K80 所提供的 H 和 TM2 的 A177 形成稳定的连接,使通道处于稳定的关闭状态。Markus 通过分子动力学的模拟发现 TM1 的质子如 H 与 A177 距离如果 $\leq 3.0 \text{ \AA}$ 就可以使通道处于稳定的关闭状态。而突变的 K80 不能提供合适的 H,同时与 A177 的距离增大,因此不能使通道处于稳定的关闭状态,降低了细胞内的 pH 值(intracellular pH, pH_i) 的敏感度,加强酸诱导的通道抑制的恢复和通过 PIP2 抑制的通道的再活化^[11, 12]。Du 等^[13]的研究指出通道与 PIP2 的相互作用越强, Kir 通道的与质子如 H 的相互作用就越少。在 Kir3.2 中, TM1 的 N94 突变成 His 会导致持续通道活化,说明这个氨基酸可能涉及了门控的过程^[14]。滑动螺旋(slide helix)又称 TM0,在细胞质区域,位于 TM1 的末端,与其他 K^+ 通道比较,是 Kir 家族特有的结构^[15, 16]。滑动螺旋位于 TM2 内侧的外部 and TM1 的外侧,并且与 TM1 胞质部分的氨基末端连接。由于滑动螺旋是两亲分子,它可能位于细胞膜的小叶的内侧和细胞质的交界处。在 Kir1.1 和 Kir2.1 的滑动螺旋失去功能的突变已经在人类遗传性疾病被认知。II 型 Bartter 综合征是 V72E 和 D74Y 位点的突变, Andersen 综合征是 Y68D、D71V、D71N、T74A、T75A、T75M、T75R、D78G、D78Y 位点的突变^[17-20]。(2) TM2 与 Kir3.x 的门控: TM2 螺旋在 Kir3.x 的门控中起着很重要的作用。Jin 等已证实在 TM2 的中部高度保守的 G175 氨基酸残基在 $\text{G}\beta\gamma$ 诱导的 Kir3.4 的活化过程中起着关键的作用。他们还发现替换一些 TM2 中低于 G175 并伴有 Pro 的氨基酸残基,将会增加 TM2 螺旋的弹性,从而形成持续活化的通道。这个结果和同源四聚体模型共同显示 Gly 在 TM2 螺旋可能处于枢纽地位允许螺旋可以从渗透路径摆动接受 $\text{G}\beta\gamma$ 的刺激。这个思路与 Jiang 等提出的 KcsA 通道的门控机制相似。在 Kir3.1 通道 S171 替代了 Pro, TM2 螺旋底部的枢纽部分的坚固性丧失,就会瓦解 $\text{G}\beta\gamma$ 诱导的活化门控,这也与上述观点相符合。(3) H5 区的调控: H5 区是细胞外孔的构成区域,又称“离子选择器”,就离子的选择性而言, K_c 通道分

享着 T-X-G-Y/F-G 信号序列,在 weave 小鼠 K^+ 选择性的丢失是由于 Kir3.2 的“离子选择器” G156 到 Ser 的突变造成^[2]。突变之后允许非选择性的阳离子渗透。Kir3.x 通道选择过滤器外部的氨基酸残基也有助于 K^+ 选择。首先 Kir3.1 在 E139 和 R149 的突变, Kir3.2 在 E152 的突变, Kir3.4 在 E145 和 R155 的突变都能明显的导致 K^+ 选择的丢失。分子模型显示这些氨基酸残基可以在离子选择器的后方形形成盐桥可能维持了这个结构坚固性。其次在 Kir3.2 的 TM2, 位于选择过滤器底部的 S177 的替换彻底摧毁了 K^+ 选择,同样的结果发生在 Kir3.1 的 S166 和 Kir3.4 的 A172。

2. 细胞质区域的调节: 细胞质区域主要是 Kir 通道的 N-和 C-端所在,也是 Kir 通道门控的主要部位。其中 $\text{G}\beta\gamma$ 亚单位、PIP2 和细胞内的 Na^+ 相互协调对 Kir3.x 的门控起着重要的作用。(1) 磷脂酰肌醇 4, 5 二磷酸(4, 5-bisphosphate, PIP2): PIP2 是膜锚定的磷脂,是维持大多数 Kir 通道的基本物质, Kir3.x 的门控也依赖于膜的 PIP2 水平, PIP2 的参与可以提高 Kir 通道的电流,也就是使通道活化和处于开放状态,而 PIP2 的耗竭导致通道电流变弱。PIP2 的结合域认为是在 Kir3.x 通道 N-和 C-端。Pegan 等通过三维结构在 Kir2.1 通道识别形似“口袋”的氨基酸残基排列,它们是 5 个 Arg、4 个 Lys 和 1 个 His, 它们可以与 PIP2 结合。最近的研究显示, N-或 C-端的突变会减少 PIP2 的结合。根据 KirBac 的结构这些氨基酸残基之一就是基本保守的 arg, 这个氨基酸位于膜下的 TM2 螺旋。Markus 等推测 kir 通道的活化或开放在于 TM 的螺旋结合交叉区域的 H 结合被终止同时, TM 倾斜后 Kir 通道开放, TM 的倾斜可能与 PIP2 与通道结合导致通道构象改变有关。Matthew 对哺乳动物野生型 Kir3.2 通道的研究,在分辨率为 $3.0 \text{ \AA}$ 的 C8-PIP2 (PIP2 的类似物)存在下, Kir3.2 通道的结构显示 PIP2 脂分子与每个跨膜亚单位结合在跨膜域-细胞质域的附近。带有负电荷的 PIP2 的磷酸盐与一些带有正电荷的氨基酸残基如 Lys64、Lys194、Lys199 和 Lys200 相互结合,而这些氨基酸复合物一般在顺着通道骨架在外部与界面螺旋的连接处,这些氨基酸的电荷在 PIP2 的存在下,可以使蛋白质主链适当的移位,有助于 PIP2 与通道的结合,使通道活化^[13]。(2) $\text{G}\beta\gamma$ 亚单位: Kir3.x 的活化需要偶联白喉毒素敏感的 G 蛋白,离子通道可被与 G 蛋白偶联的第二信使或直接被 G 蛋白激活。 K_c 通道

与 $G\beta\gamma$ 的相互作用是通道活化所必需的。多个研究小组已证明 $G\beta\gamma$ 是 K_c 的激动子,而 $G\alpha$ 可能决定其特异性和开放持续时间。非州爪蟾卵母细胞上过量表达 $G\beta\gamma$ 可提高 Kir3.1/3.4 的基础电流; $G\beta\gamma$ 结合肽或者 $G\alpha - GDP$ 的增加都可抑制 kir 的激动, Kir3.1/3.4 与 $G\beta\gamma$ 共沉淀为 $G\beta\gamma$ 直接激动 Kir 提供了有力的证据。研究人员通过融合蛋白技术进一步发现是 Kir3.1/3.4 的 N - 和 C - 端与 $G\beta\gamma$ 直接结合,插入 Kir3.1 的 COOH 末端去杂交 G 蛋白非敏感的 Kir2.1 可获得被 $G\beta\gamma$ 活化通道。更多的工作主要在于明确 $G\beta\gamma$ 作用于通道的精确位点,也就是影响 $G\beta\gamma$ 结合和 Kir3. x 活化的重要的氨基酸残基,在 Kir3.4 的氨基末端是 H64 ,羧基末端是 L262;在 Kir3.2 是 L344 和 G347。而在 Kir3.1 是 H57、L262、L333 和 E336。在 Kir3.1, H57 在 NH2 的 βA 链, L333 和 E336 在羧基末端 βL 和 βM 链之间的环上。这 3 个 β 链构成了一个 β 片层位于细胞质外部表面并朝向细胞质。Kir3.1 和 Kir3.4 氨基末端和羧基末端协同的相互作用提高了 $G\beta\gamma$ 的结合。荧光能量转移研究已经检测到在 Kir3.1/3.4 异源四聚体在氨基末端和羧基末端诱导了 $G\beta\gamma$ 循环和扩张。 K_c 通道的细胞质区域是 $G\beta\gamma$ 靶,这个区域可能是涉及到通道门控的关键部位。这可能是所有 Kir 通道的共性,这已经通过对观察 $G\beta\gamma$ 不敏感 Kir1.1 和 Kir-Bac3.1 所支持。研究 Kir3. x 通道已经明确在氨基和羧基末端有 2 ~ 3 个分散的 $G\beta\gamma$ 结合片段,导致每个通道共有 8 ~ 12 个推测的 $G\beta\gamma$ 结合片段。在 Kir3.1 和 Kir3.4 上的 3 个氨基酸已经确定对 $G\beta\gamma$ 的结合和功能的传导有很大的影响,两个氨基酸残基是激动剂非依赖影响 $G\beta\gamma$ 的结合:Kir3.4 的 H64 和 L268;Kir3.1 的 H57 和 L262,另一个是激动剂依赖的影响 $G\beta\gamma$ 的结合氨基酸:Kir3.4 的 L399 和 Kir3.1 的 L333。最近已提出 $G\beta\gamma$ 调节 K_c 通道与 PIP2 和细胞内的 Na^+ 的相互协调控制通道的开放。(3)胞内的 $Na^+ : Na^+$ 结合位点是通过包含 Kir3.2 或 Kir3.4 亚单位的 K_c 通道的活化而发现的,也就是通过提高细胞内的 Na^+ ,促进了通道的活化。细胞内的 Na^+ 能够活化 Kir3.2 和 Kir3.4,通过结合接近 PIP2 的 Asp,可能是 Na^+ 屏蔽了 Asp 的负电荷,增加了通道与 PIP2 的亲合力。 Na^+ 的加入也增加了活化的 Kir3.4 通道与 PIP2 的稳定性,但是如果通过磷脂酶删除膜上的 PIP2, Na^+ 的影响会明显的下降。这一点也可以从 Kir3.4 (D223N)通过去除 Asp 的负电荷来了解 Na^+ 的影响。

Na^+ 对活化的 Kir 通道有着很重要的生理功能,可以对过度电兴奋产生负反馈: Na^+ 的进入可以提高细胞内 Na^+ 浓度超出正常范围的 5 ~ 15mmol/L 足以活化 Kir 通道,再一次驱动膜负电位。Kir3.2 的 Asp228 是 Na^+ 相互协调的氨基酸位点,当 Asp 突变成 Asn, Na^+ 的密度在晶体结构不再被观察到。在精确的模型中 Na^+ 不但与羧基端边链的 Asp,也与主链羧基端来自于 Arg230、Asn231 和 Ser232 氧原子相互作用,可能来自于主链羧基端 $\beta E - \beta G$ 环的 Leu275、Val276 和侧面的 His69、His233 参与了 Na^+ 与通道的相互作用,His69、His233 可能也帮助水分子接近这些位点。

通过晶体结构,已经精确的观察整体和部分 Kir 通道的氨基酸与 PIP2、 $G\beta\gamma$ 和 Na^+ 的相互作用。通过 KirBac3.1 揭示通道细胞质域亚单位的重排改变了氨基末端和羧基末端的相互作用。然而调节 K_c 通道的活化和配体诱导的构象的变化具体机制仍需继续阐明。

参考文献

- 1 Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels[J]. Pharmacol Rev, 1998,50(4):723 - 760
- 2 Hibino H, Inanobe A, Furutani K, *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function and physiological roles[J]. Physiol Rev, 2010,90(1):291 - 366
- 3 Bichet D, Haass FA, Jan LY. Merging functional studies with structures of inward - rectifier K (+) channels[J]. Nat Rev Neurosci, 2003,4(12):957 - 967
- 4 Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels[J]. Pharmacol Rev, 1998,50(4):723 - 760
- 5 Zylbergold P, Ramakrishnan N, Hebert T. The role of G proteins in assembly and function of Kir3 inwardly rectifying potassium channels [J]. Channels (Austin), 2010,4(5):411 - 421
- 6 Schoots O, Wilson JM, Ethier N, *et al.* Co - expression of human Kir3 subunits can yield channels with different functional properties [J]. Cell Signal, 1999,11(12):871 - 883
- 7 Lesage F, Duprat F, Fink M, *et al.* Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G - protein coupled K $^{+}$ channels in the brain[J]. FEBS Lett, 1994,353(1):37 - 42
- 8 Isomoto S, Kondo C, Takahashi N, *et al.* A novel ubiquitously distributed isoform of GIRK2 (GIRK2B) enhances GIRK1 expression of the G - protein - gated K $^{+}$ current in Xenopus oocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996,218(1):286 - 291
- 9 Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, *et al.* Structural basis for modulation of gating property of G protein - gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by i/o - family G protein alpha subunit (Galphai/o) [J]. J Biol Chem, 2012,287(23):19537 - 19549
- 10 Rapedius M, Fowler PW, Shang L, *et al.* H bonding at the helix - bundle crossing controls gating in Kir potassium channels[J]. Neuron, 2007,55(4):602 - 614

(下转至第 181 页)