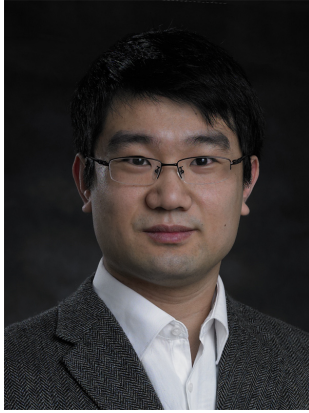


DOI: 10.11844/cjcb.2013.06.9001

领域前沿 · 中国



张鹏, 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所研究员。2007年中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所毕业, 获理学博士学位, 荣获中科院院长奖学金。2008年2月–2010年9月在美国普林斯顿大学分子生物学系从事博士后研究工作。期间解析了核黄素ECF转运蛋白S组分RibU的晶体结构(Zhang *et al.* Nature, 2010), 首次报道了ECF转运蛋白结合底物的独特方式。2010年10月至今担任中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所研究员, 继续从事ECF转运蛋白跨膜转运机制的研究。2011年获上海市浦江人才计划支持, 2012年入选中科院上海生命科学研究院S类人才。最新研究工作解析了第一个叶酸ECF转运蛋白复合体的晶体结构, 提出了ECF转运蛋白跨膜转运机制的工作模型(Xu *et al.* Nature, 2013)。

叶酸ECF转运蛋白的结构和转运机制

许可 赵琴 张鹏*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

Structure and Mechanism of a Folate Energy-coupling Factor Transporter

Xu Ke, Zhao Qin, Zhang Peng*

(Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白是存在于所有生物体中的最大的一类转运蛋白家族, 主要功能是利用水解ATP的能量来驱动物质跨膜运输。根据物质转运的方向将ABC转运蛋白分为内向转运蛋白(importer)和外向转运蛋白 exporter)。ABC转运蛋白家族在组成上非常保守: 两个跨膜蛋白(transmembrane domains, TMDs)组成物质跨膜转运的通道, 两个ATP结合蛋白(nucleotide-binding domains, NBDs)位于细胞膜内侧行使ATP水解酶的功能, 为物质的转运提供能量。除此以外, 内向转运蛋白在膜外还存在

一个底物结合蛋白(solute-binding protein, SBP), 负责底物的识别与向跨膜蛋白的递呈^[1-2]。根据目前已经解析的ABC转运蛋白的结构, 科学家提出了一个“两种状态”的模型来描述内向转运蛋白的转运机制: 膜结合蛋白二聚体在接受膜外底物时采取“V”型构象, 而释放底物到细胞内时采取“∧”型构象, ATP的水解驱动两种构象的转化^[3-11]。

能量耦合因子型(energy-coupling factor, ECF)转运蛋白属于一类新的ABC内向转运蛋白, 由负责底物识别与结合的跨膜S蛋白(EcfS)与负责ATP水解与能量传递的能量耦合模块(energy-coupling module)组成, 其中能量耦合模块是由一个跨膜的T蛋白(EcfT)以及两个ATP结合蛋白(EcfA与EcfA')构成^[12-14]。尽管与经典的ABC转运蛋白存在一些相似

*通讯作者。Tel: 021-54924219, E-mail: pengzhang01@sibs.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54924219, E-mail: pengzhang01@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2013-05-09 15:50

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130509.1550.004.html>

性, ECF转运蛋白明显拥有自己独特的结构与功能特征。底物结合蛋白SBP的缺失让我们可以轻易地将ECF转运蛋白从经典的ABC内向转运蛋白中区分出来^[15]。从之前已经报道的S蛋白RibU与ThiT的结构中, 可以清楚地看到底物核黄素与硫胺素的结合位点^[16-17]。然而, 在发挥生物功能的转运蛋白复合体中, 四个蛋白组分具体是如何装配以及通过怎样的机制实现物质的跨膜转运依然不清楚。最近, 我们解析了一个分辨率为3Å的来自乳酸菌的叶酸ECF转运蛋白复合体的结构^[18]。以此结构为基础我们提出了ECF转运蛋白实现跨膜转运独特的分子模型: 即底物的转运可通过S蛋白在膜内的构象扭转来实现。

叶酸ECF转运蛋白复合体由叶酸结合蛋白FolT(EcfS)、EcfT、EcfA与EcfA'四种蛋白组成, 我们重组表达并纯化了该复合体, 通过体内和体外转运实验证实了其叶酸转运活性, 通过蛋白质晶体学的方法解析了分辨率为3Å的晶体结构。结构确证了ECF复合体中各组分的化学计量学(Stoichiometry)比例为1:1:1:1, 即ECF转运蛋白功能复合体是由各一分子的EcfS蛋白、EcfT蛋白、EcfA蛋白与EcfA'蛋白组成, 解决了这一长期以来困扰着人们的问题。在该复合体中, EcfA与EcfA'蛋白形成异二聚体, 没有ATP结合, 其结构与经典的ABC转运蛋白中的NBDs结构十分相似; 叶酸结合蛋白FolT与EcfT蛋白形成跨膜的异二聚体, 与经典ABC转运蛋白复合体的跨膜蛋白有着显著的差异。

与ECF转运蛋白中其他三个组分不同, EcfT蛋白是一个全新的结构。EcfT蛋白结构由8个 α 螺旋组成, 其中3个膜内的 α 螺旋CH1-3处于N端4个 α 螺旋TM1-4与C端的 α 螺旋TM5之间, R1与R2 loop连接CH2/CH3和CH3/TM5。整个EcfT蛋白呈“L”型构象, 5个跨膜 α 螺旋与膜内3个 α 螺旋近似垂直, 分别形成L型的长臂和短臂。

FolT的结构由6个 α 螺旋组成, 通过与之前解析的S蛋白单体RibU和ThiT的结构比较^[16-17], 在FolT上与EcfT蛋白相互作用的区域附近发现了一个口袋, 口袋周围的氨基酸在很多物种中都是高度保守的, 推测其可能就是底物叶酸结合的位点。但是在这个口袋中我们没有看到叶酸的电子云密度, 这点也在液相串联质谱检验底物时得到了确认, 这提示我们这个结构代表了不结合底物的状态。在经典的ABC

转运蛋白中, 跨膜蛋白与细胞膜呈垂直状态; 而在叶酸ECF转运蛋白复合体结构中, 跨膜蛋白FolT与膜平面近似呈20度夹角并斜插入细胞膜中, 叶酸的结合口袋面向膜内。在两个异二聚体FolT/EcfT与EcfA/EcfA'之间存在一个大的凹槽, 与预测的叶酸结合口袋相连, 推测为底物叶酸进入膜内的通道。

EcfA蛋白与EcfA'蛋白与经典的ABC转运蛋白的NBDs相似, 由 α 螺旋结构域、RecA结构域和C端结构域组成, 与ATP结合/水解相关的Walker A/B motifs、Q/D loops、LSGGQ motif和His switch都比较保守。将我们获得的结构与麦芽糖ABC转运蛋白NBD二聚体的结构进行比较, 发现叶酸ECF转运蛋白结构中EcfA与EcfA'蛋白更接近开放构象。因此, 我们推断我们获得的结构处于将底物释放到膜内后的内向型构象(inward-facing state)(图1)。

叶酸ECF转运蛋白复合体结构的解析, 揭示了四个不同组分间相互作用的方式。在组成叶酸ECF转运蛋白的四个组分中, FolT与EcfT蛋白有着非常紧密的相互作用, FolT蛋白躺在呈L型的EcfT蛋白的短臂上, 二者通过氢键以及大量的疏水作用力形成异二聚体。EcfA蛋白与EcfA'蛋白则通过RecA结构域和C端结构域相互作用形成另一异二聚体。来自EcfT蛋白的两个 α 螺旋CH2-3与EcfA/EcfA'蛋白表面凹槽形成的相互作用的界面是稳定这两个异二聚体的主要作用力, 也是负责将EcfA/EcfA'蛋白分解ATP产生的构象变化传递到EcfS/EcfT蛋白的结构基础, 这一点与经典的ABC转运蛋白有着显著不同。虽然EcfT蛋白在不同物种中的同源性非常低, 但是CH2-3却呈现出高度的保守性, 这提示我们, ECF转运蛋白可能采用了一套相同的能量耦合与传递模式。

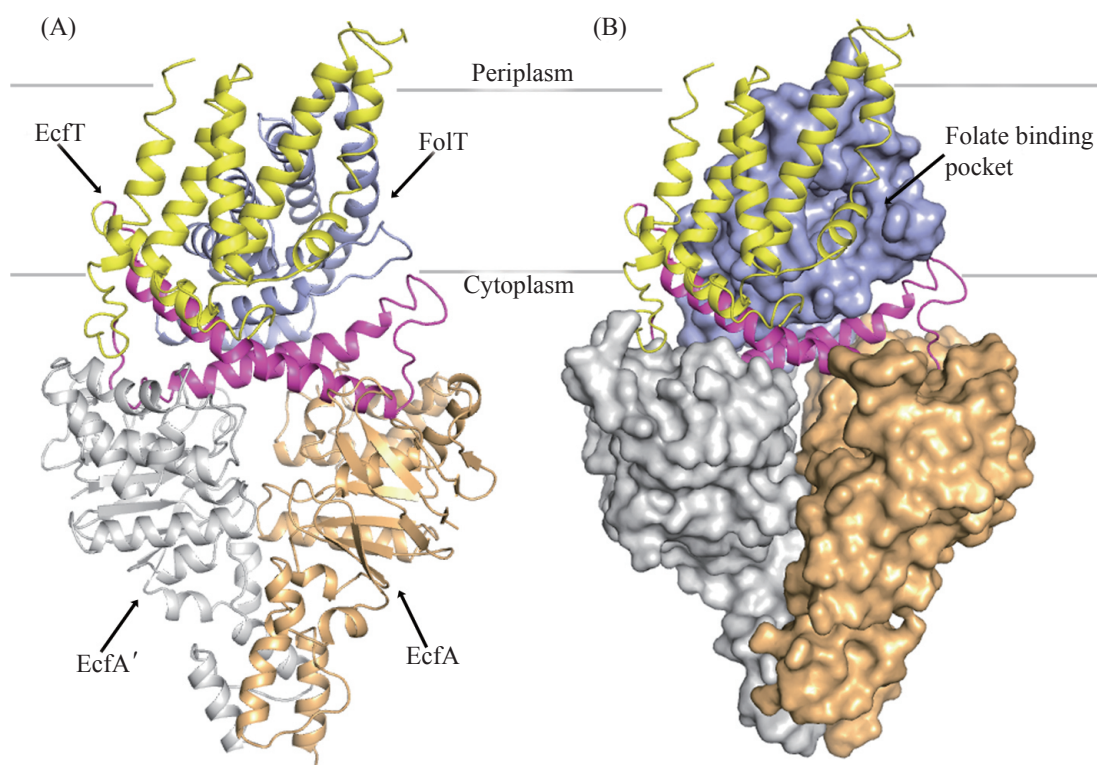
EcfT蛋白位于膜内侧的两个 α 螺旋CH2-3呈X型, 二者之间存在疏水作用力和氢键相互作用, 稳定了X型构象。CH2-3主要依靠疏水作用力嵌入到EcfA蛋白与EcfA'蛋白 α 螺旋结构域与RecA结构域形成的表面凹陷中。连接CH2和CH3的R1 loop上存在一个保守的Arg185, 与EcfA蛋白上保守的Asp106形成氢键与盐桥, 而连接CH3与TM5的R2 loop上同样存在一个保守的Arg226, 与EcfA'蛋白上同样保守的Asp102以氢键与盐桥的形式相互作用。这两个Arg在不同物种的EcfT蛋白中严格保守, 前后紧随两个短侧链的氨基酸, 根据之前的报道这两个Arg对于维持ECF转运蛋白的稳定性以及转运活性都非

常重要^[19]。从结构分析中, 我们推测这两个Arg可以像“锚”一样锚定CH2与CH3, 从而将EcfA与EcfA'蛋白的构象改变通过EcfT蛋白传递到FolT, 对于叶酸ECF转运蛋白的能量耦合与传递起非常重要的作用, 因此, 我们将其命名为XRX motifs。

以往ECF转运复合体S蛋白的生化与结构的报道都显示S蛋白对底物有很高的亲和力^[16-17,20-22]。在我们获得的FolT蛋白单体中, 同样检测到了叶酸的结合; 然而在对叶酸ECF转运复合体结构与功能的分析过程中, 我们发现复合体中检测不到叶酸的结合。体外的脂质体实验证实我们所获得的复合体具有转运叶酸的生物活力, 所有这些现象提示叶酸ECF转运蛋白在溶液中至少存在另外一种可以结合叶酸的构象——outward-facing构象。由此, 我们提出了叶酸ECF转运蛋白的转运模型: 在outward-facing构象时, FolT的6个 α 螺旋与膜垂直, 底物结合口袋面向膜外实现底物的识别与结合; ATP水解后, EcfA与EcfA'蛋

白的构象的改变通过EcfT蛋白的CH2-3传递到FolT, 从而引起FolT的翻转, 底物结合口袋朝向膜内, 从而将叶酸释放到胞内, 进入inward-facing构象, 也就是我们结构所呈现的构象。在ATP重新结合或者水解后, 转运蛋白又重新回到outward-facing构象。

这是迄今第一个ECF型ABC转运蛋白复合体的结构, 也是叶酸跨膜转运蛋白的首个结构。这一研究进展使人们对ABC转运蛋白跨膜转运的机理有了全新的认识: 物质的转运不但可以通过跨膜蛋白“V”型构象到“^”型构象的变化来进行, 还可以通过跨膜蛋白的翻转来实现; 同时该模型的提出也为人们理解维生素(特别是叶酸)如何实现跨细胞膜转运的过程迈出了一大步。因为ECF转运蛋白主要存在于厚壁菌门, 包括很多致病菌与益生菌, 因此该结构的解析为新型抗生素与益生菌的设计开辟了一条新路。



A: 叶酸ECF转运蛋白结构的飘带模型。FolT、EcfT、EcfA与EcfA'分别用亮蓝色、黄色(CH2-3紫红)、金色以及灰色显示; B: FolT、EcfA与EcfA'的表面模型展示, 图示叶酸可能的结合口袋。

A: a ribbon representation of the structure of the folate ECF transporter viewed in parallel to the membrane. FolT, EcfT, EcfA and EcfA' are labeled and colored light blue, yellow (CH2 and CH3 are magenta), gold and grey, respectively; B: FolT, EcfA and EcfA' shown as a surface model in the same orientation as in A. The possible folate-binding pocket is indicated.

图1 叶酸ECF转运蛋白的结构(根据参考文献[18]修改)

Fig.1 Overall structure of the folate ECF transporter(modified from reference [18])

参考文献 (References)

- 1 Higgins CF. ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 67-113.
- 2 Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(3): 218-27.
- 3 Locher KP, Lee AT, Rees DC. The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 2002; 296(5570): 1091-8.
- 4 Hvorup RN, Goetz BA, Niederer M, Hollenstein K, Perozo E, Locher KP. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* 2007; 317(5843): 1387-90.
- 5 Hollenstein K, Frei DC, Locher KP. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* 2007; 446(7132): 213-6.
- 6 Oldham ML, Khare D, Quioco FA, Davidson AL, Chen J. Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* 2007; 450(7169): 515-21.
- 7 Oldham ML, Chen J. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* 2011; 332(6034): 1202-5.
- 8 Khare D, Oldham ML, Orelle C, Davidson AL, Chen J. Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Mol Cell* 2009; 33(4): 528-36.
- 9 Oldham ML, Davidson AL, Chen J. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 2008; 18(6): 726-33.
- 10 Kadaba NS, Kaiser JT, Johnson E, Lee A, Rees DC. The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: Structure and allosteric regulation. *Science* 2008; 321(5886): 250-3.
- 11 Gerber S, Comellas-Bigler M, Goetz BA, Locher KP. Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science* 2008; 321(5886): 246-50.
- 12 Rodionov DA, Hebbeln P, Eudes A, ter Beek J, Rodionova IA, Erkens GB, *et al.* A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J Bacteriol* 2009; 191(1): 42-51.
- 13 ter Beek J, Duurkens RH, Erkens GB, Slotboom DJ. Quaternary structure and functional unit of energy coupling factor (ECF)-type transporters. *J Biol Chem* 2011; 286(7): 5471-5.
- 14 Erkens GB, Majsnerowska M, ter Beek J, Slotboom DJ. Energy coupling factor-type ABC transporters for vitamin uptake in prokaryotes. *Biochemistry* 2012; 51(22): 4390-6.
- 15 Eitinger T, Rodionov DA, Grote M, Schneider E. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: Diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35(1): 3-67.
- 16 Zhang P, Wang J, Shi Y. Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature* 2010; 468(7324): 717-20.
- 17 Erkens GB, Berntsson RP, Fulyani F, Majsnerowska M, Vujicic-Zagar A, ter Beek J, *et al.* The structural basis of modularity in ECF-type ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18(7): 755-60.
- 18 Xu K, Zhang M, Zhao Q, Yu F, Guo H, Wang C, *et al.* Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*. *Nature* 2013; doi: 10.1038/nature12046.
- 19 Neubauer O, Alfandega A, Schoknecht J, Sternberg U, Pohlmann A, Eitinger T. Two essential arginine residues in the T components of energy-coupling factor transporters. *J Bacteriol* 2009; 191(21): 6482-8.
- 20 Hebbeln P, Rodionov DA, Alfandega A, Eitinger T. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(8): 2909-14.
- 21 Duurkens RH, Tol MB, Geertsma ER, Permentier HP, Slotboom DJ. Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU. *J Biol Chem* 2007; 282(14): 10380-6.
- 22 Berntsson RP, ter Beek J, Majsnerowska M, Duurkens RH, Puri P, Poolman B, *et al.* Structural divergence of paralogous S components from ECF-type ABC transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(35): 13990-5.