

KcsA 通道对 Na^+ 、 K^+ 及 Rb^+ 离子选择性的统计热力学研究 *

安海龙^{1)**} 展 永¹⁾ 张素花¹⁾ 赵同军^{1,2)} 刘金伟¹⁾

(¹⁾河北工业大学理学院, 天津 300130; ²⁾河北工业大学电气学院, 天津 300130)

摘要 钾离子的通透率至少比钠离子的通透率大 10 000 倍, 这个问题至今没有很好地解决. 为了在分子水平阐释钾离子通道的选择性机制, 以 KcsA 钾通道 X 射线衍射结构为基础, 采用密度泛函理论计算了不同离子在离子通道中的位能. 计算结果表明, Rb^+ 离子具有与 K^+ 离子相类似的位能曲线, 但是其在通过程遇到的位垒要比 K^+ 离子的位垒高, 因而所对应的通透率也就小于钾离子的通透率, 而钠离子的通透率仅仅是钾离子通透率的 0.0067%. 文中所涉及的系统仅仅包含 269 个原子, 而用分子动力学虽然也可以得到相近的结果, 但是它的系统大小为 41 000 个原子.

关键词 KcsA 通道, 选择性, 密度泛函理论

学科分类号 Q-0, Q-31

细胞通过脂膜实现内外环境的隔离, 而膜上分布的各种离子通道, 使得细胞可以实现与外界离子和信息的交换. 离子通道在许多细胞活动中都起到关键作用: 它是生物电活动的基础, 对于跨膜电位的建立和维持以及细胞内和细胞间信号的传递都起着重要作用; 离子通道可以调控细胞内 pH 值和离子浓度, 以维持正常的细胞体积及细胞内生物活性分子所要求很窄的 pH 值和离子浓度的范围; 特别是通过改变作为第二信使的钙离子浓度, 来调控各种生化过程. 可见, 生命的很多过程如发育、生长、分泌、兴奋、运动, 甚至于学习和记忆都与离子通道功能的正常发挥有直接联系^[1]. 目前, 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、神经生物学等多学科研究的热点. 大多数离子通道对离子都具有选择性, 而同时对其特异性离子又保持高通透性, 例如钾离子通道可以让 K^+ 以高达 10^8 离子/s 的速率通过^[2], 而略小一点的 Na^+ 却几乎不能通过. 是什么机制使离子通道转导速率如此之快? 离子通道是通过何种机制实现其对不同离子的选择性? 对这个问题的研究, 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.

KcsA 通道对不同离子的选择作用主要发生在选择性过滤器部分. 基因变异学研究发现, 钾离子通道的选择性与位于选择性过滤器部分的氨基酸保

守序列 TVGYG 密切相关: a. 该序列具有高度保守性, 出现在几乎所有具有选择性的离子通道内部; b. 通过基因工程换掉某一个氨基酸以后, 该通道就不再具有选择性. 也就是说, 该序列最终决定了通道是否具有选择性. KcsA 通道 0.32 nm 精细结构的获得, 大大促进了人们对离子通道结构和功能的研究^[3-5]. 这就表明要研究 KcsA 通道对不同离子的选择性, 这 20 个氨基酸组成的 4 个保守序列是关键. 正是由于 20 个氨基酸中羰基氧原子为处在其中的钾离子补偿了其脱水作用造成的能量差, 所以研究通道蛋白尤其是羰基氧原子与不同离子之间的相互作用, 对于从根本上解释 KcsA 通道的选择性具有很大的帮助. 而与离子处于通道内位置相关的位能函数, 恰好能够准确地反映通道与离子间的相互作用. 因此本文研究钠、钾、铷三种碱金属离子与通道的位能曲线, 定性解释 KcsA 通道的选择性.

计算离子与通道位能曲线的方法主要有: PNP (Poisson-Nernst-Planck) 模型、MD(分子动力学)模型和量子化学方法, 这 3 种方法各有自己的理论基础和侧重点.

作为模拟离子通道通透性早期的模型, PNP 模

*国家自然科学基金(10474018, 10375016), 河北省自然科学基金(102001)资助项目和河北省高校重点学科建设项目.

** 通讯联系人.

Tel: 022-26564802, E-mail: hailong_an@163.com

收稿日期: 2004-08-19, 接受日期: 2004-10-30

型形式简单, 考虑了通道的实际形状、研究通道内蛋白质残余电荷的量值和分布、通道两端的电势差和离子浓度差取得了一定进展. 但是同时也具有一定的局限性: 首先 PNP 模型不能准确地计算表面诱导电荷及其引起的自由能势垒, 对于离子通道而言, 离子与通道间的相互作用是不能被忽略的, PNP 模型不但忽略了离子与通道间的相互作用而且没有考虑离子与离子间的相互作用, 准确性令人怀疑^[9].

20 世纪 80 年代初期, 人们开始应用 MD 模型模拟生物分子体系^[7-10]. MD 算法以经典力学中的牛顿第二定律为基础, 采用多体势的负梯度来描述系统中其他粒子对某个粒子的作用. 该算法应用到离子通道领域与 PNP 模型相比, 具有一定的优势: 首先可以通过 MD 模型计算离子通道的 PMF (potential of mean force), 离子穿过通道的力由 PMF 提供, 其极小值对应于结合位点, 极大值对应于势垒; 其次, 利用 MD 计算同价离子选择性机制, 而且应用 MD 可以估算扩散系数和水的介电常数. 应用 MD 模型得到的有关离子通道选择性与通透性的结果与试验符合得很好. 例如: a. MD 模型研究发现, 通道内在中心腔内存在一个钾离子, 在选择性过滤器部分存在两个钾离子, 与实验结果吻合较好^[11-13]; b. 有关钠离子和钾离子的选择性问题, MD 模型利用自由能扰动方法得到分别为 11 kT^[14]、8 kT^[15]和 5 kT^[16], 这基本与实验数据 9 kT 相符.

虽然如此, MD 本身也具有其局限性: a. 不能直接计算得到通道的电导率; b. MD 算法耗时长, 对计算机的计算速度要求很高(例如文献[17]指出, 用 MD 模拟 KcsA 通道的选择性需要考虑大约 41 000 个原子, 需要使用 64 个 CPU 同时进行计算); c. MD 算法不能考虑电子间的相互作用. 而对于离子通道系统, 电子间的相互作用是不可以被忽略的.

需要指出的是在离子通道选择性过滤器这样小尺度(长度为 1.2 nm, 直径为 0.3 nm)的系统内量子效应必须考虑. 所以作者采用了密度泛函(DFT)方法. DFT 以量子力学为基础, 可以研究原子与原子之间的相互作用, 同时也考虑了电子相关能与交换能. 可以更加准确地反映系统的位能. 因此本文采用 DFT 方法计算位能曲线.

通道结构精细程度的不同必然会影响模拟结果的准确性, 本文采用精度为 0.28 nm 的 KcsA 通

道^[18], 着力研究了与通道选择性密切相关的 4 个保守的氨基酸序列——TVGYG. 为了研究 KcsA 通道对不同离子的选择性, 本文模拟了不同的碱金属离子(钠、钾、铷离子)与氨基酸保守序列(TVGYG)之间的相互作用, 模拟过程总共涉及到 20 个氨基酸(图 1). 较好地解释了 KcsA 通道对不同离子的选择性.

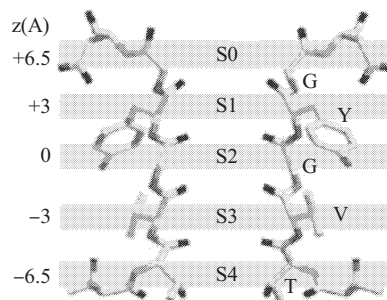


Fig.1 The combined sites of the selectivity filter in KcsA channel by X-ray diffraction ^[17]

Just two subunits are shown

1 模拟方法

1.1 密度泛函理论

密度泛函理论是在 Hohenberg-Kohn 定理和 Kohn-Sham 方法基础上发展起来的一种量子化学计算方法. 密度泛函理论与其他理论方法比较具有如下优势:

a. 密度泛函理论采用泛函方法求解薛定谔方程, 既可以考虑原子与原子间的相互作用, 又可以考虑电子相关, 这有别于在经典物理学基础上发展起来的分子理论方法, 后者只能考虑化学键和原子间的相互作用, 而忽略了电子的作用.

b. 密度泛函理论采用泛函方法求解薛定谔方程, 不同于量子化学计算中的半经验方法, 后者需要输入一些实验或者经验参数, 帮助求解薛定谔方程.

c. 密度泛函方法的计算量仅约正比于 N^3 (N 为体系的电子数), 而不是从头算的 N^4 和 CI 与 MP 的 $N^6 \sim N^8$, 比较适用于计算生物大分子. 对于小分子体系并不能充分体现密度泛函算法的优势, 例如, 对乙烷分子 (8 个原子 18 个电子) 采用密度泛函 B3LYP 和从头算 Hartree-Fock, 其计算机时分别为 14 s 和 37 s. 但是随着研究体系的增大, 从头算的计算量正比于 N^4 而密度泛函的计算量正比于 N^3 , 因此 DFT 越来越普遍地取代从头算法, 用来计算较大分子体系的性质.

本文要研究的体系具有 20 个氨基酸和一个碱金属离子, 共 1 000 余个电子, 20 个氨基酸排列成一个长度约为 1.2 nm, 直径约为 0.3 nm 的通道, 而 Na^+ 、 K^+ 及 Rb^+ 的直径分别为 0.194 nm、0.266 nm 和 0.294 nm. 要计算这样系统的位能, 仅仅考虑原子间的作用能是不够的, 必须考虑电子及电子相关, 同时计算量还要尽可能地小. 因此本文计算采用密度泛函方法.

1.2 基组的选择

密度泛函计算中, 采用由高斯函数组成的基组对体系内的轨道进行数学描述, 大的基组由于对电子在空间上有小的限制而具有更大的精确性, 但是大的基组不可避免地会增大计算量, 一般认为计算量正比于基函数数量的 2.5 次方. 还是以乙烷为例, 采用密度泛函 B3LYP 算法和 6-311G 基组计算机时为 14 s, 而采用 STO-3G 基组计算机时为 9 s; 若采用 Hartree-Fock 方法和 6-311G 基组计算机时为 37 s, 而采用 STO-3G 基组计算机时为 36 s. 注意到乙烷分子只有 8 个原子 18 个电子, 不同的基组计算量就有显著差别, 所以说对于大的系统而言, 基组的选择要慎重.

根据文献[19]给出的选择基组的方案, 结合我们所研究的系统包括 20 个氨基酸、一个碱金属离子, 1 000 余个电子, 钠、钾、铷三种正电离子而且位于元素周期表的第一主族, 所以本文对于铷离子采用 STO-3G 基组, 钠和钾离子都采用了 6-31G 基组. 而且 TVGYG 5 种氨基酸内并不含有氢键、弱相互作用体系, 所以分别采用了 STO-3G 基组, 和 6-31G 基组.

2 结 果

文中计算采用的是 B3LYP-DFT 算法和 STO-3G 与 6-31G 基组, 各种收敛参数均采用 Gaussian 03 程序包的缺省值, 计算结果如图 2~4 所示.

从图 2 可以看出, 对于 Na^+ 离子在选择性过滤器两端的位垒高度大致相同, 在 $x=0$ 处存在位阱, 具有一定的对称性. 根据统计热力学的观点, Na^+ 离子会以更大的几率出现在 $x=0$ 附近, 而且由于两端口位垒高度差为 0.00522 Hartree (1 Hartree = 627.51 kcal/mol), Na^+ 离子跨过位垒进出通道的几率比值约为 2.2, 对称的位能曲线不能保证 Na^+ 离子产生定向流动.

从图 3 可以看出, K^+ 离子在选择性过滤器中

存在 4 个结合位点, 对应于位能曲线的 4 个极小值, 而且 K^+ 离子的位能曲线具有非对称性, 根据统计热力学的观点, K^+ 离子进出离子通道几率的比值几乎为零, 也就是说 K^+ 离子只能通过 KcsA 通道由膜内侧到膜外侧, 这与实验中观察到 KcsA 钾通道为外向整流型钾通道定性吻合.

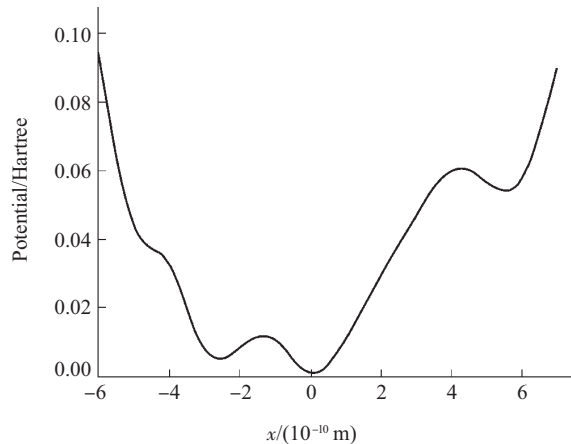


Fig.2 The potential curve of sodium ions combined with the KcsA channel

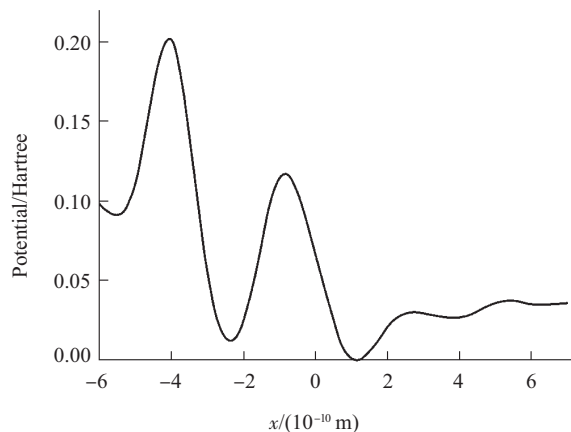


Fig.3 The potential curve of potassium ions combined with the KcsA channel

从图 4 可以看出, Rb^+ 离子具有和 K^+ 离子相类似的位能曲线, 也存在 4 个结合位点, 这与实验中观察到 Rb^+ 离子的半径虽然大于 K^+ 离子, 但是 KcsA 通道对于 Rb^+ 离子也有一定通透性定性的吻合. 非对称的位能曲线保证 Rb^+ 离子和 K^+ 离子只能产生向外的离子流.

根据 Boltzmann 分布, 离子可以跨越高度为 V_B 势垒的几率为:

$$P = \frac{2}{\sqrt{\pi}} (kT)^{-3/2} \int_{V_B}^{\infty} \exp(-E/(kT)) \sqrt{E} dE$$

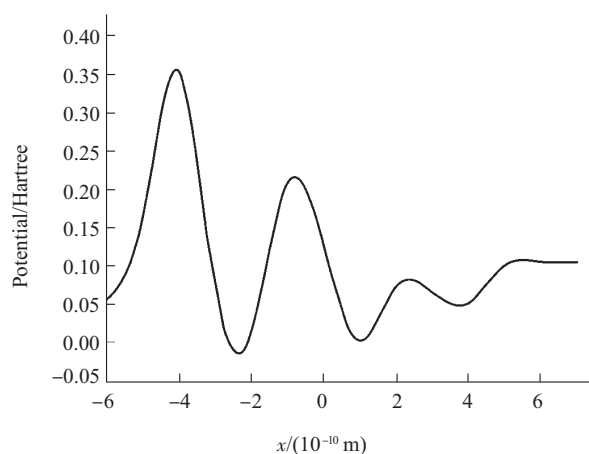


Fig.4 The potential curve of rubidium ions combined with the KcsA channel

参照图 3 和图 4 的结果可以看出, 钠离子和钾离子的位能曲线在 $x=1$ 处, 能量差约为 0.0104 Hartree, 对应通透率的比值为 15 000 倍(温度为 300 K)。

通过本文的研究可以得出以下结论: a. 正如文献[7]所言, 对于钾离子和铷离子, 在钾离子通道选择性过滤器部分存在 4 个结合位点, 分别位于 $x=-6.0$, $x=-2.32$, $x=1.05$, $x=3.83$ (图 3, 4); b. 从统计热力学的角度来看, 位能曲线上的每一个极小值点应该对应于离子的结合位点, 由图 2 可以看出, 钠离子更倾向于位于 $x=0$ (因为位能曲线在该点取得最小值), 而 $x=0$ 对应于选择性过滤器的第二个结合位点, 也就是说钠离子应该更多的停留在第二个结合位点; c. 由图 2 可以看出, 无论从钠离子位能曲线的形状还是位垒的高度, 都不利于钠离子通过通道, 即 KcsA 通道对钠离子不具有通透性, 钠离子的通透率仅仅是钾离子通透率的 0.0067%; d. 对于钾离子和铷离子其位能曲线的形状大致相同, 而铷离子位能曲线的位垒高度要大于钾离子, 也就是说虽然铷离子可以通过 KcsA 通道, 但是其通透性要低于钾离子, 这也与实验定性吻合^[17,20]。需要指出的是本文所研究的系统包含 269 个原子, 而分子动力学的研究系统涉及到 41 000 个原子之多, 本文的计算说明, DFT 方法在更加局域范围更真实反映离子与通道相互作用。这也就从一个侧面证实, 在研究离子通道这样的小尺度系统的时候, 量子效应不能被忽视。而分子动力学恰恰是以经典的牛顿力学为基础, 所以必须考虑更多的原子。

参考文献

- 唐有祺. 生命的化学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 55~58
Tang Y Q. Chemistry of Life. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 1998. 55~58
- Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. Sunderland UK: Sinauer Associates. 3rd. INC. Publishers, 2001. 155~156
- Guidoni L, Torre V, Carloni P. Cloning, expression and sequence analysis of the gene encoding the alkali-stable, thermostable endoxylanase from alklophilic mesophilic *Bacillus* sp. Strain NG-27. FEBS Lett, 2000, **477** (1~2): 37~42
- Allen T W, Chung S H. Brownian dynamics study of an open state potassium channel. Biochim Biophys Acta, 2001, **1515** (2): 83~91
- Mashl R J, Tang Y, Schnitzer J, *et al.* Hierarchical approach to predicting permeation in ion channels. Biophys J, 2001, **81** (5): 2473~2483
- Graf P, Nitzan A, Kumikova M G, *et al.* A dynamic lattice Monte Carlo model of ion transport in inhomogeneous dielectric environments: method and implementation. J Phys Chem B, 2000, **104** (51): 12324~12338
- van Gunsteren W F, Mark A E. Validation of molecular dynamics simulation. J Chem Phys, 1998, **108** (15): 6109~6116
- Allen M P, Tildesley D J. Computer Simulation of Liquids. London: Oxford Univ Press, 1987. 203~205
- Frenkel D, Smit B. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. San Diego: Academic Press, 1996. 156~160
- Rapaport D C. The Art of Molecular Dynamics Simulation. London: Cambridge Univ Press, 1995. 99~103
- Doyle D A, Cabral J M, Pfuetzner R A, *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. Science, 1998, **280** (5360): 69~77
- Morais-Cabral J H, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K^+ selectivity filter. Nature. 2001, **414** (6859): 37~42
- Zhou Y, Morais-Cabral J H, Kaufman A, *et al.* Chemistry of ion coordination & hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. Nature 2001, **414** (6859): 43~48
- Berneche S, Roux B. Energetics of ion conduction through the K^+ channel. Nature, 2001, **414** (6859): 73~77
- Allen T W, Bliznyuk A, Rendell A P, *et al.* The potassium channel: structure, selectivity and diffusion. J Chem Phys, 2000, **112** (18): 8191~8204
- Luzhkov V B, Aqvist J. K^+/Na^+ selectivity of the KcsA potassium channel from microscopic free energy perturbation calculations. Biochim Biophys Acta, 2001, **1548** (2): 194~202
- Domene C, Sansom M S P. Potassium channel, ions, and water: simulation studies based on the high resolution X-Ray structure of KcsA. Biophys J, 2003, **85** (5): 2787~2800
- Zhou M, Morais J H, Mann S, *et al.* Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. Nature, 2001, **411** (6838): 657~661
- 张瑞勤, 步宇翔, 李述汤. 中国科学(B 辑). 2000, **30** (5): 419~427
Zhang R Q, Bu Y X, Li Sh T. Chinese Science (B), 2000, **30** (5): 419~427
- LeMasurier M, Heginbotham L, Miller C. KcsA: it's a potassium channel. J Gen Physiol, 2001, **118** (3): 303~313

Statistic Thermodynamics of The Selectivity of KcsA Channel to Na⁺、K⁺ and Rb⁺ Ions*

AN Hai-Long^{1)**}, ZHAN Yong¹⁾, ZHANG Su-Hua¹⁾, ZHAO Tong-Jun^{1,2)}, LIU Jin-Wei¹⁾

(¹⁾School of Science, ²⁾ School of Electrical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract Potassium is at least 10 000 times more permeant than Na⁺, remaining to be an open question of K⁺ channels. To elucidate the mechanism of ion selectivity at atomic level, the density functional theory was used to calculate the potential on the basis of the X-ray structure of the KcsA K⁺ channel. In the viewpoint of statistic thermodynamics, the two most readily permeant ions, K⁺ and Rb⁺ ions, can pass through the selectivity filter. In contrast, Na⁺ ions, which prefer staying in site 2, can not pass through the channel. The energy barrier difference between the K⁺ and Na⁺ is 27.4 kJ/mol which induced the permeant ratio of 15 000. The energy barrier difference of Rb⁺ ions is higher than that of K⁺ ions which is corresponding to the lower permeant of Rb⁺ ions. The results are qualitatively consistent with the experimental data. It is remarkable that the system, involved in 269 atoms, is much lower than the MD simulation which is about 41 000 atoms.

Key words KcsA channel, selectivity, density functional method

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (10474018, 10375016), The Hebei Provincial Natural Science Foundation (102001) and Subsidization for Construction Term of Key Subjects in Universities and Colleges of Hebei Province.

**Corresponding author . Tel: 86-22-26564802, E-mail: hailong_an@163.com

Received: August 19, 2004 Accepted: October 30, 2004