

MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制

邓东*, 颜宁

清华大学清华-北大生命联合中心/医学院/结构生物学中心, 生物膜和膜工程国家重点实验室, 北京 100084

* 联系人, E-mail: dengd16@tsinghua.edu.cn

2015-01-08 收稿, 2015-01-20 接受, 2015-02-04 网络版发表

摘要 MFS (major facilitator superfamily) 转运蛋白家族是目前已知的最大的膜转运蛋白家族之一. 该家族膜转运蛋白广泛存在于整个生物界, 其功能也与很多生命活动现象息息相关. 作为膜转运蛋白, 其基本功能是协助完成物质的跨膜转运. 为了更好地理解 MFS 超家族蛋白如何实现物质的跨膜转运, 科研人员致力于对其进行结构生物学研究. 至今为止, 总共有 16 个 MFS 超家族蛋白成员的结构得到解析. 有限的结构信息可以提供一些线索, 帮助我们理解跨膜物质转运的机制. 本文除了介绍 MFS 超家族蛋白结构生物学和转运机制的研究进展外, 还通过对已有结构和转运机制的介绍, 实现对将来研究的展望.

关键词

MFS 蛋白家族
转运蛋白
结构生物学

1 膜转运蛋白的分类及 MFS 超家族蛋白的介绍

细胞膜是由磷脂双分子层构成的疏水膜结构, 它将细胞与外界环境分隔开, 为维持整个细胞处在一个相对稳定的状态提供了必要的帮助, 但同时也为细胞自身与外界的物质和信息交换提出了巨大的挑战. 众所周知, 即使最简单的生物体都需要进行信息和物质交换, 而对于多细胞组成的动物、植物个体来说更是离不开这样的交换体系以维持整个个体的稳态. 正如前面所提到的, 细胞膜是一个疏水膜结构, 除了少部分疏水小分子外, 大部分分子都无法跨膜. 为了接受这些水溶性的分子, 生物体进化出了膜受体蛋白和膜转运蛋白等: 对于位于细胞膜上的受体蛋白而言, 它们会感受到外界刺激和信号分子, 从而引起自身的变化并将信号传递进细胞内, 例如 G 蛋白偶联受体 (G Protein Coupling Receptor, GPCR); 而膜转运蛋白 (transporter) 和通道蛋白 (channel) 则可以帮助那些不能经自由扩散进出细胞的物质完成跨膜运输.

根据转运蛋白转运方式的不同, 将膜转运蛋白分为被动转运蛋白和主动转运蛋白. 被动转运蛋白 (passive transporter), 也叫做协助转运蛋白 (facilitated transporter), 它们帮助底物顺着电化学梯度 (electrochemical gradient) 完成跨膜运输; 主动转运蛋白 (active transporter) 则是对应被动转运而言, 在其转运过程中需要消耗能量. 根据能量的来源不同, 主动转运蛋白又可分为初级主动转运蛋白 (primary active transporter) 和次级主动转运蛋白 (secondary active transporter). 初级主动转运蛋白中常见的供能方式是由细胞内 ATP 水解直接为转运过程提供能量. 例如 ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter), 也可能由 NADH 或者光能直接提供能量; 而次级主动转运蛋白又可称为偶联转运蛋白 (coupled transporter) 或者共转运蛋白 (cotransporter), 它的转运要借助一种离子或者分子的电化学梯度, 完成另一种物质的转运. 在次级转运蛋白的研究过程中, 人们为了更形象地描述转运蛋白, 又根据两种物质转运方向是否相同, 将其分为同向转运蛋白 (symporter) 和反向转运蛋白 (antiporter) (图 1).

引用格式: 邓东, 颜宁. MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制. 科学通报, 2015, 60: 720–728

Deng D, Yan N. Structural basis and transport mechanism of the major facilitator superfamily (MFS) transporter (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 720–728, doi: 10.1360/N972015-00024

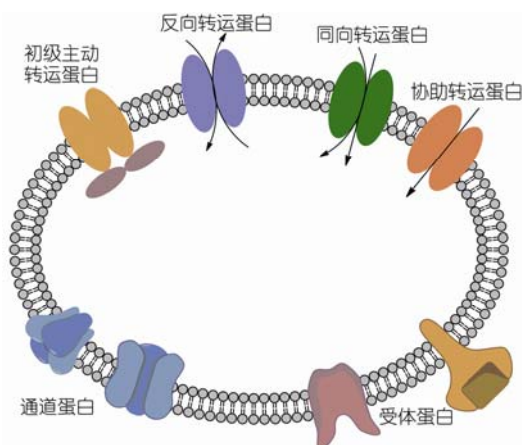


图 1 (网络版彩色)主要膜转运蛋白的分类. 细胞膜表面的膜蛋白包括通道蛋白, 受体蛋白以及转运蛋白等. 转运蛋白可以分为协助转运蛋白和主动转运蛋白; 主动转运蛋白分为初级主动转运蛋白和次级主动转运蛋白; 次级主动转运蛋白可分为同向转运蛋白和反向转运蛋白

Figure 1 (Color online) The classification of transporter protein. On cell membrane, there are transporters, receptors, channels, etc. Transporters can be classified into facilitator (uniporter) and active transporter. Active transporters consist of primary active transporter and secondary transporter. The symporter and antiporter belong to the secondary transporter

1993年, 在众多膜蛋白中, 人们发现一大类转运蛋白具有12次跨膜螺旋结构域, 他们定义了这个蛋白超家族为MFS (major facilitator superfamily)^[1]. 当时被归入MFS超家族的膜转运蛋白包括药物抗性蛋白(drug-resistance proteins)、糖协助转运蛋白(sugar facilitators)、三羧酸循环中间产物协助转运蛋白(facilitators for Krebs cycle intermediates)、磷酸酯/磷酸反向转运蛋白(phosphate ester-phosphate antiporters)和寡聚糖/质子共转运蛋白(oligosaccharide-H⁺ symporters). 随着人们对膜转运蛋白研究的不断深入, MFS超家族(TCID: 2.A.1)不断壮大, 新增了许多成员, 根据蛋白质行使的功能以及序列同源性, 目前MFS超家族可以分为82个家族^[2].

所有MFS超家族的蛋白组成了目前已知最大的转运蛋白家族之一^[3]. 到目前为止, 已经有1万多个来自不同物种的膜蛋白基因被定义到其中. MFS超家族蛋白可以转运单糖、多糖、氨基酸、多肽、维生素、酶辅因子、药物分子、发色团、碱基等众多小分子^[4-7].

MFS超家族蛋白不但在众多的物质转运中起到至关重要的作用; 同时一些蛋白还与病毒入侵、病菌抗药性等免疫学问题密切相关^[8]. 因此MFS超家族蛋白的结构生物学研究意义便显得非同寻常, 这些研

究不但可以丰富我们对于膜蛋白结构的认识, 同时也能为进一步研究膜蛋白转运机制提供坚实的理论基础.

2 MFS超家族蛋白结构生物学研究的历史

为了更好地理解膜蛋白如何行使功能, 最好的研究方法就是解析其原子分辨率的结构. 比如通过对钾离子通道的结构生物学研究, 我们认识了钾离子通道如何完成钾离子选择^[9]; 通过对人肾上腺素受体的结构生物学研究, 我们知道了GPCR如何激活下游G蛋白^[10]. 要想从分子层面研究膜转运蛋白的转运机制, 也需要对其进行系统的结构生物研究. 第一个膜蛋白结构得到解析已经过去了约30年. 在这30年间, 人们解析得到的序列独特的膜蛋白结构还只有区区500多个(<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>), 这大大低于人们的预期. 即使近几年来新型膜蛋白结晶方法LCP (lipidic cubic phase)^[10]以及冷冻电子显微镜技术(Cryo-EM)^[11-13]蓬勃发展, 目前解析的MFS超家族膜蛋白也仅有16个(表1), 尤其是对真核生物MFS超家族的膜蛋白的结构研究更是近两年来才取得了突破^[14-17].

从20年前, 人们就致力于对MFS超家族的转运蛋白进行结构生物学研究. 但对于膜转运蛋白这样处在高度动态状态下的分子来说, 要想获得其原子分辨率的结构是十分困难的. 直到2002年, 第一个MFS转运蛋白家族成员OxIT^[18]的低分辨率结构才被解析. 虽然通过二维晶体的电子衍射解析得到的OxIT结构其分辨率只有6 Å, 但是从电子密度中我们可以清晰地分辨出OxIT具有12次跨膜结构域, 从而证实了对MFS超家族蛋白拓扑结构的预测. 而第一次得到的高分辨率结构是2003年解析的乳糖转运蛋白LacY^[19]以及磷酸-3-甘油转运蛋白GlpT^[20], 这2个结构都具有12次 α -跨膜螺旋结构域, 并呈现出向胞内开放的构象. EmrD^[21]是药物分子转运蛋白, 它的结构呈现与LacY和GlpT完全不同的闭合构象(occluded conformation). 而岩藻糖转运蛋白FucP的结构则呈现出向胞外开放的状态^[22]. 在接下来的几年间, PepT_{so}^[23], PepT_{st}^[24]蛋白结构相继被解析, 属于同一蛋白家族(proton-dependent oligopeptide transporter family)的GkPOT^[25]更是达到了1.9 Å的高分辨率. 在2012年, 第一个属于糖转运蛋白家族(sugar porter family)的木糖/质子共转运蛋白XylE^[26]在结合

表 1 已知晶体结构的 MFS 超家族膜转运蛋白
Table 1 The MFS transporters of known structure

蛋白	功能	蛋白亚家族	物种	PDB代码	最高分辨率 (Å)	发表 时间
LacY	Lactose/H ⁺ symporter	Oligosaccharide: H ⁺ Symporter (OHS)	<i>Escherichia coli</i>	1PV6; 1PV7; 2CFQ; 2CFP; 2V8N; 2Y5Y; 4OAA	2.95	2003
GlpT	Glycerol-3-phosphate Transporter	Organophosphate: Pi antiporter (OPA)	<i>Escherichia coli</i>	1PW4	3.3	2003
EmrD	Multidrug transporter	Drug: H ⁺ Antiporter-1 (DHA1)	<i>Escherichia coli</i>	2GFP	3.5	2006
FucP	<i>L</i> -fucose/H ⁺ symporter	Fucose: H ⁺ Symporter transporter	<i>Escherichia coli</i>	3O7Q; 3O7P	3.1	2010
PepTso	Oligopeptide-proton symporter	Proton-dependent Oligopeptide transporter	<i>Shewanella oneidensis</i>	2XUT	3.6	2011
PepTst	Oligopeptide-proton symporter	POT	<i>Streptococcus thermophilus</i>	4APS	3.30	2012
XylE	Xylose/H ⁺ symporter	Sugar porter(SP)	<i>Escherichia coli</i>	4GBY; 4GBZ; 4GC0; 4JA3; 4JA4; 4QIQ	2.60	2012
PipT	High-affinity phosphate transporter	Phosphate: H ⁺ Symporter (PHS)	<i>Piriformospora indica</i>	4J05	2.90	2012
NarU	Nitrate transporter	Nitrate/nitrite porter (NNP)	<i>Escherichia coli</i>	4IU8; 4IU9	3.01	2013
NarK	Nitrate/nitrite exchanger	NNP	<i>Escherichia coli</i>	4JR9; 4JRE	2.60	2013
GkPOT	Proton-dependent oligopeptide transporter	POT	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	4IKV; 4IKW; 4IKX; 4IKY; 4IKZ	1.90	2013
YajR	Drug efflux transporter	DHA1	<i>Escherichia coli</i>	3WDO	3.15	2013
GlcPse	Glucose/H ⁺ symporter	SP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4LDS	3.20	2013
MelB	Na ⁺ /melibiose symporter	Sodium: galactoside symporter	<i>Salmonella typhimurium</i>	4M64	3.35	2014
NRT1.1	Nitrate transporter	NRT1/PTR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4CL4; 4CL5; 4OH3	3.25	2014
GLUT1	Glucose transporter	Sugar transporter	<i>Homo sapiens</i>	4PYP	3.17	2014

底物向胞外半开放状态下(outward-facing, partially occluded conformation)的结构被解析, 随着另外2个处在不同构象下的XylE结构被解析后^[27,28], XylE成为了第一个多种不同构象结构得到解析的MFS超家族蛋白成员. 同时由于XylE与人源葡萄糖转运蛋白GLUTs具有较高的序列同源性, 它已经作为新的模式蛋白系统被用于研究糖转运蛋白. 陆续被解析的MFS超家族的膜蛋白还有GlcP_{se}^[29], NarK^[30], NarU^[31], YajR^[32], MelB^[33], 进一步丰富了对MFS超家族蛋白结构的认识. 而在2013年以前, 所有的MFS超家族的蛋白结构都是来自原核生物, 2013年人们才得到第一个真核生物的MFS蛋白结构PipT^[14]. 2014年年初解析的NRT1.1^[15,16]的结构为研究硝酸根离子的转运机制提供了强大的结构基础. 首个人源MFS超家族转运蛋白GLUT1^[17]结构在2014年得到解析, 该工作被视为是整个膜转运蛋白结构生物学领域中里程碑式的工作.

3 MFS 超家族转运蛋白的结构特征

MFS超家族的成员蛋白大多由400~600个氨基酸残基组成, N和C端都位于胞内. 蛋白二级结构预测提示其大多具有12次α-螺旋跨膜结构域, 其他一些具有14或者24次α-螺旋的则可能是进化过程中以12次跨膜α-螺旋为基础产生的^[34]. 这种独特的折叠方式也被命名为“MFS fold”^[35~37]. 在“MFS fold”中, 12次α螺旋可以分为2个结构域: N端结构域和C端结构域. 每个结构域都由6个α-螺旋组成, 虽然2个结构域中氨基酸序列只有很低的序列同源性, 但从结构上观察2个结构域呈现二次轴对称(two-fold pseudosymmetry). 同时MFS超家族蛋白的结构和序列分析提示可能存在3次跨膜重复构成的特性^[38], 结构和功能分析都支持MFS蛋白每个结构域都是以3+3反转重复(inverted 3+3 repeats)的组成(图2)^[39,40]. 更有意思的是, 研究发现一类只有3次跨膜结构域的糖转运蛋白

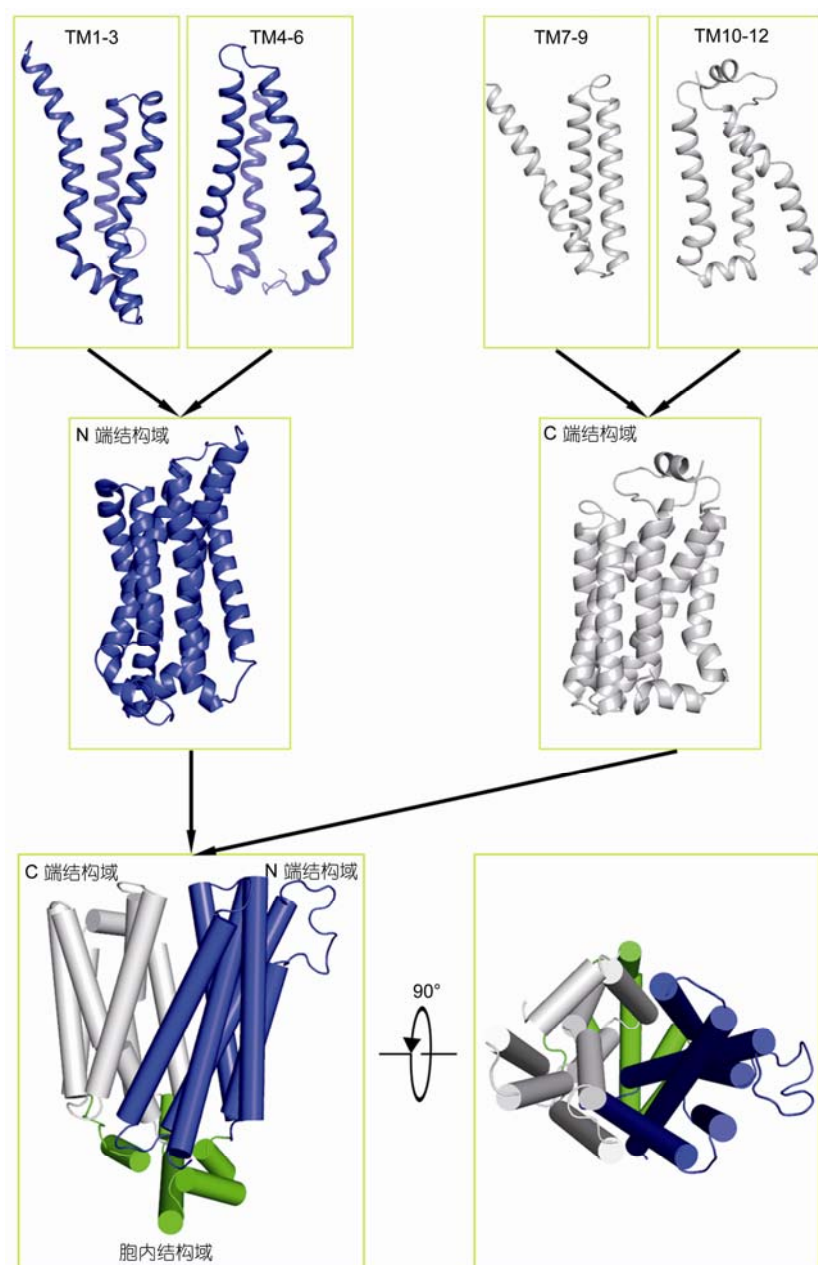


图2 (网络版彩色)MFS 超家族蛋白结构特征. 图中显示的是属于 MFS 蛋白家族的 XylE 的结构(PDB 代码: 4GC0). XylE 具有经典的 12 跨膜螺旋的 MFS fold. 其中跨膜螺旋 TM1-3 和 TM4-6 形成“3+3”反转重复, 构成了 XylE 的 N 端结构域; 跨膜螺旋 TM7-9 和 TM10-12 也具有类似反转重复特性, 它们构成了 XylE 的 C 端结构域; 部分 MFS 家族转运蛋白像 XylE 一样还存在胞内结构域

Figure 2 (Color online) The structural features of MFS transporter. The structure of Proton-xylose symporter XylE (PDB code: 4GC0) is shown. XylE has the typical 12 transmembrane helices, which is known as MFS fold. The transmembrane helices TM 1-3, TM 4-6, TM 7-9, and TM 10-12 are invert repeats. Both N domain and C domain contain six transmembrane helices, which are composed of “3+3” invert repeats. In some cases, such as XylE (PDB code: 4GC0) shown here, the MFS proteins also have intracellular domains

SemiSWEET^[41], 它们在细胞膜上可能形成多聚体行使功能. 可能从进化上来讲, MFS超家族蛋白是由3次跨膜蛋白融合形成.

除了跨膜结构域外, 部分MFS超家族蛋白还具

有胞内结构域. 以XylE^[26]和GLUT1^[17]为例, 在胞内区域还存在几个由 α -螺旋组成的胞内结构域(图2). 螺旋中的多个带电荷氨基酸残基会与跨膜结构域上的氨基酸残基产生相互作用, 底物转运实验也已经

证实这些位置上的突变会影响转运^[26]. 进行序列比对发现, 这些氨基酸残基在所有的糖转运蛋白中都十分保守, 说明这个结构域在该家族中保守, 并发挥重要功能.

4 MFS超家族蛋白的转运机制

MFS超家族蛋白的转运过程, 可以笼统地使用20世纪60年代提出的交替开放模型(alternating access model)^[42]来解释(图3). 根据交替开放模型, 转运蛋白能够在向胞外开放和向胞内开放的构象之间变化. 整个转运过程正是在这样的构象变化中完成的, 转运蛋白上的底物结合位点暴露在细胞膜的不同侧, 底物从细胞膜的一侧结合到蛋白上, 而从另一侧被释放^[38]. 当底物结合时可以引起盐桥弱化, 使底物结合产生的能量驱动蛋白的构象变化^[43]. 目前对转运机制研究得较为清楚的是乳糖转运蛋白LacY. 通过晶体结构, 科研人员也捕捉到了LacY向胞内开放的状态^[19]. 同时, 科研人员使用多种生物物理学及生物化学的方法, 包括双电子共振(double electron-electron resonance)实验^[43]、色氨酸荧光(tryptophan fluorescence)实验^[44]、定向烷基化(site-directed alkylation)^[45,46]、定向硫醇交联实验(site-directed thiol cross-linking)^[47]都证明LacY还存在一个向胞外开放的构象. 在转运过程中, LacY从向胞外开放到向胞内开放会发生较大的构象变化^[48,49], 这些都与交替开放模型吻合. 但LacY到底如何向胞外开放? 回答这个问题还是需要对其进行进一步的结构生物学研究. 近期通过引入2个色氨酸突变将LacY的N和C端结构

域撑开的方法, 研究人员也只获得了LacY向胞外半开放的晶体结构^[50]. 对于LacY而言, 向胞外开放的构象可能极不稳定, 会在极短的时间内完成构象变化到闭合状态. 当然, MFS超家族的其他蛋白成员结构为交替开放模型提供了很好的证据: FucP^[22]呈现向胞外开放的构象; XylE^[26-28]则获得了处在多种不同构象下的晶体结构.

MFS超家族转运蛋白包含共转运蛋白(co-transporter)和协助转运蛋白(facilitator). 共转运蛋白(co-transporter)在转运底物过程中需要借助其他物质的参与, 其中质子共转运蛋白的转运机制的研究较为透彻. 比如LacY, FucP, XylE都是共转运蛋白, 它们在转运乳糖、岩藻糖和木糖的过程中都需要利用膜两侧的质子浓度梯度所提供的势能驱动, 完成底物在胞内的积累. 因此, 质子在转运过程中起到了非常重要的作用.

在对LacY进行的大量生物化学研究中表明, 质子的协同运输过程中, 一些重要的氨基酸残基参与了质子传递的过程^[51]. LacY中第269位的谷氨酸(Glu269)(图4)在LacY处在向胞外开放构象下被质子化, 然后乳糖分子会结合到蛋白上的底物结合位点, 诱导Glu269上的质子发生传递, 使其转移到第325位谷氨酸(Glu325)上. 与此同时, 这一过程驱动蛋白发生构象变化, 使蛋白呈现向胞内开放状态, 底物释放后Glu325上的质子也随之释放, 蛋白在这种状态下不稳定, 随即恢复到面向胞外状态, 完成一个转运循环^[52-54].

在对另一个质子同向转运蛋白FucP^[22]的研究过

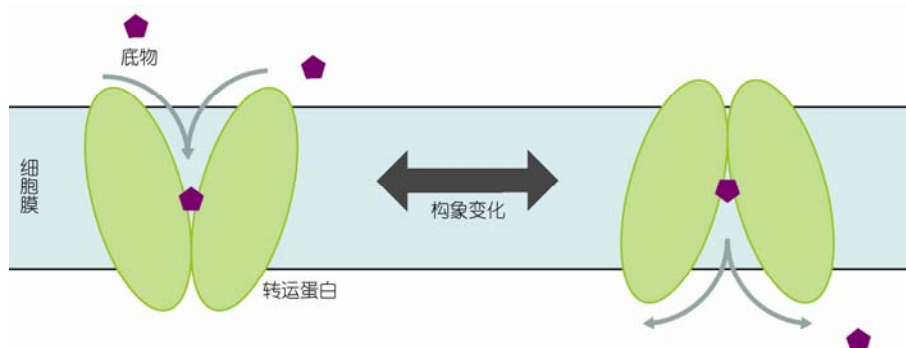


图3 (网络版彩色) 转运蛋白的交替开放式工作模型. 膜转运蛋白存在至少向胞外和胞内两种构象, 将底物结合位点分别暴露在细胞内外两侧实现对底物的跨膜转运

Figure 3 (Color online) The alternating access model for transport cycle. At least two conformations for transporters are existed on cell membrane. To deliver substrate across the hydrophobic membrane, the transporter switches the conformation from the one that facilitates substrate binding in extracellular side to another one that can release the substrate into intracellular side, *vice versa*

程中发现, 位于转运通道中的两个酸性氨基酸Asp46以及Glu135可能与LacY中的2个酸性氨基酸一样, 在底物转运过程中可以被质子化和去质子化, 引起蛋白的构象变化, 完成底物转运(图4).

XylE蛋白需要质子进行共转运的机制则可能有所不同. 研究发现, XylE中第27位的天冬氨酸(Asp27)与质子协助转运有关^[55]. 将Asp27突变成天冬酰胺Asn或者丙氨酸Ala后, 并不会对底物的逆流转运实验(counterflow assay)产生影响, 但在活细胞中突变体蛋白不能完成底物转运. 有意思的是在XylE的高分辨率晶体结构中, Asp27与第133位精氨酸(Arg133)形成静电相互作用, 如果将Arg133突变成组氨酸His、亮氨酸Leu、色氨酸Trp都会影响XylE的转运活性^[26]. 而Asp27侧链的质子化可能会造成其局部的构象变化, 使其与Arg133不适合形成氢键(图4).

除了共转运蛋白, MFS超家族还存在一类协助转运蛋白. 我们近期完成结构解析的人源葡萄糖转运

蛋白GLUT1^[17]正是最重要的协助转运蛋白之一. 由于GLUT1与XylE具有较高的序列同源性, GLUT1的N端结构域和C端结构域与来自XylE的2个结构域都十分相似. 2个结构上相似的蛋白却以2种不同的方式进行转运, 这对我们研究和认识质子共转运的机制有很大帮助. 在GLUT1的序列中与XylE序列中第27位的天冬氨酸(Asp27)对应的第29位氨基酸被天冬酰胺取代, 这个突变刚好可以模拟天冬氨酸(Asp)质子化的状态. Asn29没有与Arg126(对应XylE的Arg133)形成氢键. 这就释放了Arg126, 其与来自C端结构域的Try292形成阳离子- π 键相互作用(cation- π interaction).

目前, 我们认为XylE的转运过程是: 当XylE处在向胞外开放时, Asp27很容易被质子化, 质子化的天冬氨酸会引起与它相互作用的氨基酸残基侧链发生构象变化, 与此同时, 底物分子(木糖)可以进入底物结合位点; 与蛋白结合的底物分子可以诱导蛋白发生较大构象变化, 使蛋白从向胞外开放变成向胞

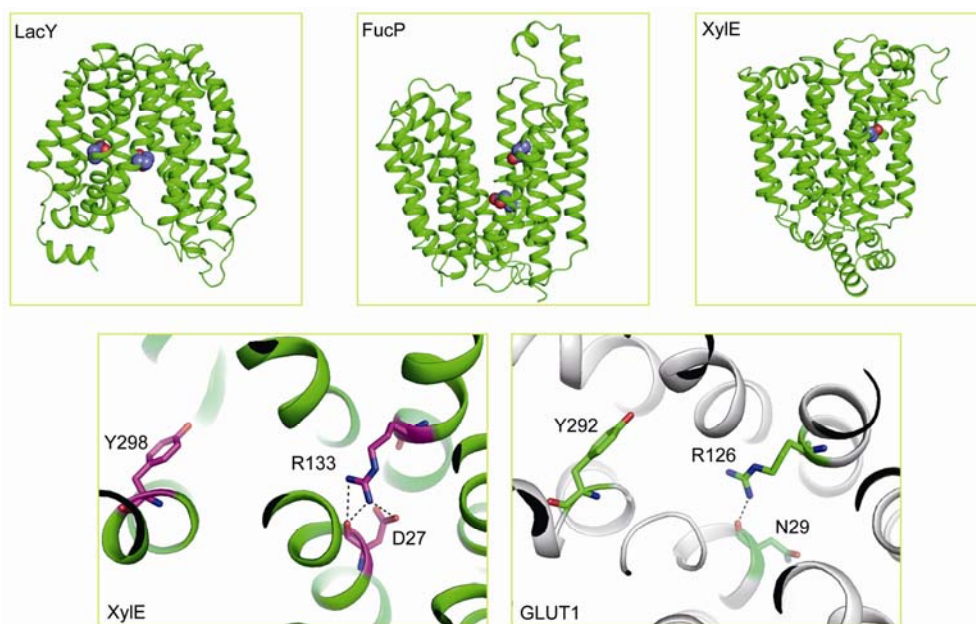


图4 (网络版彩色)MFS超家族蛋白的质子共转运及协助转运的分子基础. LacY, FucP, XylE三个质子共转运蛋白中, 完成质子转运过程中可以被质子化的关键氨基酸使用球形模型突出显示; GLUT1是协助转运蛋白, 其细菌同源蛋白XylE为质子共转运蛋白, XylE中D27侧链与R133形成氢键, 而对应GLUT1中N29可以模拟XylE中D27质子化状态, 在GLUT1结构中N29侧链不能与R126形成氢键, 从而释放R126与远端的Y292形成cation- π 相互作用. 同时由于GLUT1的晶体结构(PDB代码: 4PYP)为向胞内开放, 而XylE的晶体结构(PDB代码: 4GC0)呈现面向胞外的构象. 这也可以有助于进一步解释质子共转运的分子机制

Figure 4 (Color online) The molecular basis of proton symport and uniport of MFS transporter. The well-studied MFS proton symporters LacY, FucP, and XylE are shown here. The key residues for proton translocation and coupling are shown in spheres. GLUT1 and its bacterial homolog XylE are uniporter and proton symporter, respectively. XylE (PDB code: 4GC0) presents outward-facing conformation and GLUT1 (PDB code: 4PYP) presents the inward open conformation. The side chain of Asp27 interacts with Arg133 in XylE while the Asn 29 in GLUT1, which mimics the protonation state of Asp27 in XylE, alternates the conformation and releases the Arg126 (corresponding to Arg133 in XylE). As a result, Arg126 forms cation- π interaction with Try292 (corresponding to Try298 in XylE). Distinct conformations of these two proteins also suggest the transport mechanism

内开放;随后底物从蛋白上结合位点脱离, Asp27也去质子化, 此时构象变得不稳定, 蛋白恢复向胞外开放状态. 如果Asp27不能去质子化, 即使底物从蛋白脱离也不能使蛋白完成空转, 将稳定在向胞内开放状态.

而GLUT1是一个协助转运蛋白(uniporter/facilitator), 它就像一直处于质子化状态下的质子共转运蛋白^[17]. 底物结合和释放已经可以起到诱导蛋白构象变化的作用, 不需要质子参与. 这其中的原因可能是GLUT1各种不同构象之间的能垒都较低, 自由热运动就足以完成构象变化, 即使没有底物存在, GLUT1也处在一个高度动态的状况下, 底物的出现便能够诱导整个过程.

GLUT1的生理功能是维持细胞膜两侧的葡萄糖浓度平衡. 当两侧葡萄糖浓度等同时, GLUT1同样可能对葡萄糖分子进行转运, 完成类似交换. 而从进化上讲, 对于哺乳动物这样的多细胞生物来说, 更多的是需要整个生命体内部的稳态和平衡, 像GLUT1这样的协助转运蛋白更有利于个体的生存;而对于大肠杆菌这样的单细胞来说, 它们的生存环境本身充满了严酷的竞争, 像XylE这样的共转运蛋白可以帮助他们从贫乏的外界摄取更多的营养物质.

5 研究展望

16个MFS超家族蛋白成员的晶体结构中绝大多数的分辨率都较低, 要更好地认识和理解这些蛋白

的转运机制还需要获得分辨率更高、氨基酸侧链和水分子等信息更清晰的结构. 在已有的针对MFS超家族蛋白的研究中, 只有针对XylE的研究得到了多种构象下的结构. 为了更好地理解交替开放模型, 还需要更多的特定构象下的结构信息.

研究已经发现膜蛋白可以结合脂类物质调节膜蛋白的结构和功能^[56], 而上述大多数结构都是在去垢剂环境中获得. 在结构生物学研究中, 可以更多地进行在脂分子环境中的结晶尝试, 这也有助于得到蛋白在不同构象下的结构;同时可以利用已有的蛋白结构进行分子动态模拟(molecular dynamic simulation), 将蛋白还原到膜结构中, 通过计算机模拟研究蛋白的转运过程.

对于转运蛋白来说, 质子或离子共转运的机制一直是研究的热点. XylE和GLUT1主要的区别正是质子共转运和协助转运, 2个蛋白的结构解析为我们理解其内在分子机制提供了极大的帮助. 如果能将XylE转变成协助转运蛋白或者将GLUT1转变成质子共转运蛋白, 就能够很好地进一步解释2种不同的转运机制.

目前MFS超家族依然有十几个功能未知的亚家族蛋白的转运底物尚未确定, 而通过已知MFS超家族蛋白的结构为模板进行同源建模, 可以对其功能的研究起到辅助作用. 并且, 随着人们对MFS超家族蛋白研究的逐渐深入, 在不久的将来这些膜蛋白的神秘面纱一定能被揭开.

参考文献

- 1 Marger M D, Saier M H Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18: 13–20
- 2 Saier M H Jr, Reddy V S, Tamang D G, et al. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: D251–D258
- 3 Reddy V S, Shlykov M A, Castillo R, et al. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J*, 2012, 279: 2022–2035
- 4 Chen D E, Podell S, Sauer J D, et al. The phagosomal nutrient transporter (Pht) family. *Microbiology*, 2008, 154: 42–53
- 5 Lorca G L, Barabote R D, Zlotopolski V, et al. Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: Comparative genomic analyses. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768: 1342–1366
- 6 Yen M R, Chen J S, Marquez J L, et al. Multidrug resistance: Phylogenetic characterization of superfamilies of secondary carriers that include drug exporters. *Methods Mol Biol*, 2010, 637: 47–64
- 7 Saier M H Jr, Paulsen I T. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol*, 2001, 12: 205–213
- 8 Manel N, Battini J L, Taylor N, et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene*, 2005, 24: 6016–6025
- 9 Doyle D A, Morais C J, Pfuetzner R A, et al. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 1998, 280: 69–77
- 10 Rasmussen S G, Devree B T, Zou Y, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011, 477: 549–555

- 11 Lu P, Bai X C, Ma D, et al. Three-dimensional structure of human gamma-secretase. *Nature*, 2014, 512: 166–170
- 12 Liao M, Cao E, Julius D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 2013, 504: 107–112
- 13 Cao E, Liao M, Cheng Y, et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 2013, 504: 113–118
- 14 Pedersen B P, Kumar H, Waight A B, et al. Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter. *Nature*, 2013, 496: 533–536
- 15 Sun J, Bankston J R, Payandeh J, et al. Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature*, 2014, 507: 73–77
- 16 Parker J L, Newstead S. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature*, 2014, 507: 68–72
- 17 Deng D, Xu C, Sun P, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*, 2014, 510: 121–125
- 18 Hirai T, Heymann J A, Shi D, et al. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 597–600
- 19 Abramson J, Smirnova I, Kasho V, et al. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, 2003, 301: 610–615
- 20 Huang Y, Lemieux M J, Song J, et al. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, 2003, 301: 616–620
- 21 Yin Y, He X, Szweczyk P, et al. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312: 741–744
- 22 Dang S, Sun L, Huang Y, et al. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature*, 2010, 467: 734–738
- 23 Newstead S, Drew D, Cameron A D, et al. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J*, 2011, 30: 417–426
- 24 Solcan N, Kwok J, Fowler P W, et al. Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *EMBO J*, 2012, 31: 3411–3421
- 25 Doki S, Kato H E, Solcan N, et al. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 11343–11348
- 26 Sun L, Zeng X, Yan C, et al. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature*, 2012, 490: 361–366
- 27 Quistgaard E M, Low C, Moberg P, et al. Structural basis for substrate transport in the GLUT-homology family of monosaccharide transporters. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 766–768
- 28 Wisedchaisri G, Park M S, Iadanza M G, et al. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. *Nat Commun*, 2014, 5: 4521
- 29 Iancu C V, Zamoan J, Woo S B, et al. Crystal structure of a glucose/H⁺ symporter and its mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17862–17867
- 30 Zheng H, Wisedchaisri G, Gonen T. Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature*, 2013, 497: 647–651
- 31 Yan H, Huang W, Yan C, et al. Structure and mechanism of a nitrate transporter. *Cell Rep*, 2013, 3: 716–723
- 32 Jiang D, Zhao Y, Wang X, et al. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 14664–14669
- 33 Ethayathulla A S, Yousef M S, Amin A, et al. Structure-based mechanism for Na⁺/melibiose symport by MelB. *Nat Commun*, 2014, 5: 3009
- 34 Saier M H Jr. Genome archeology leading to the characterization and classification of transport proteins. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 555–561
- 35 Boudker O, Verdon G. Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31: 418–426
- 36 Forrest L R, Kramer R, Ziegler C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807: 167–188
- 37 Shi Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys*, 2013, 42: 51–72
- 38 Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38: 151–159
- 39 Madej M G, Dang S, Yan N, et al. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 5870–5874
- 40 Madej M G, Kaback H R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E4831–E4838
- 41 Xuan Y H, Hu Y B, Chen L Q, et al. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E3685–E3694
- 42 Jardetzky O. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, 1966, 211: 969–970
- 43 Smirnova I, Kasho V, Choe J Y, et al. Sugar binding induces an outward facing conformation of LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16504–16509
- 44 Smirnova I, Kasho V, Sugihara J, et al. Probing of the rates of alternating access in LacY with Trp fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21561–21566
- 45 Kaback H R, Dunten R, Frillingos S, et al. Site-directed alkylation and the alternating access model for LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 491–494

- 46 Jiang X, Nie Y, Kaback H R. Site-directed alkylation studies with LacY provide evidence for the alternating access model of transport. *Biochemistry*, 2011, 50: 1634–1640
 - 47 Zhou Y, Nie Y, Kaback H R. Residues gating the periplasmic pathway of LacY. *J Mol Biol*, 2009, 394: 219–225
 - 48 Smirnova I, Kasho V, Kaback H R. Real-time conformational changes in LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 8440–8445
 - 49 Majumdar D S, Smirnova I, Kasho V, et al. Single-molecule FRET reveals sugar-induced conformational dynamics in LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12640–12645
 - 50 Kumar H, Kasho V, Smirnova I, et al. Structure of sugar-bound LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1784–1788
 - 51 Kaback H R. Structure and mechanism of the lactose permease. *C R Biol*, 2005, 328: 557–567
 - 52 Kaback H R, Sahin-Toth M, Weinglass A B. The kamikaze approach to membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 610–620
 - 53 Smirnova I N, Kasho V, Kaback H R. Protonation and sugar binding to LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 8896–8901
 - 54 Smirnova I, Kasho V, Sugihara J, et al. Role of protons in sugar binding to LacY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 16835–16840
 - 55 Madej M G, Sun L, Yan N, et al. Functional architecture of MFS D-glucose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 719–727
 - 56 Laganowsky A, Reading E, Allison T M, et al. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*, 2014, 510: 172–175
-

Structural basis and transport mechanism of the major facilitator superfamily (MFS) transporter

DENG Dong & YAN Nieng

Center for Life Sciences, School of Medicine, Center for Structural Biology, State Key Laboratory of Bio-membrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

The MFS (major facilitator superfamily) transporter family is one of the largest membrane protein families. Transporters of this family are expressed widely across different species, from bacteria to human. The main function of these transporters is to deliver substrates across the cell membrane. To better understand the transport mechanism, extensive structural investigations have been carried out over the last decade. Although the structures of only 16 MFS members have been elucidated to date, the limited structural information has provided some useful clues to enable interpretation of the transport mechanism. This review not only discusses the structural and molecular basis for MFS transport, but also outlines future research prospects in this field.

major facilitator superfamily (MFS), transporter, structural biology

doi: 10.1360/N972015-00024