

用三十年的探索 阐述一段瞬间发生的过程

◎陈培华 孙坚原

摘取 2013 年度的诺贝尔生理学或医学奖桂冠,靠的不是一蹴而就的幸运发现,而是长达三十多年之科学探索。从神经科学探索的角度看,本届的三位获奖者以卓越的远见和判断力、勇气和洞识,探寻了突触囊泡释放相关分子的过程及作用机理,他们的探索成了一个传奇。人类对神经信息处理的理解,因他们的努力而得以深化。

2013年的诺贝尔生理学或医学奖授予了发现调控细胞囊泡运输系统的关键蛋白质及其工作机制的三位科学家——罗思曼(J. E. Rothman)、谢克曼(R. W. Schekman)和聚德霍夫(T. C. Südhof)。熟悉诺贝尔奖历史的人会发现,这已是第四次对有关囊泡研究的科学家颁发生理学或医学方面的诺贝尔奖了,而前三次分别在 1970 年、1974 年与 1999 年。

从突触囊泡的动力学角度看,囊泡融合是发生于瞬间(小于 1 毫秒)的事件;然而对突触囊泡融合机制的揭示,则经历了漫长而艰苦的探索。正如获奖者之一的罗思曼所说,这不是一夜之间的发现。

囊泡研究的源头

囊泡究竟是什么?为什么对囊泡的研究受到如此的重视?其实,囊泡就是直径几十纳米到数百纳米的膜结构。生物体都是由细胞构成的,生物膜将细胞或其中的细胞器分隔成空间相对独立的“围城”,膜上有大量的通道蛋白质可以允许低价离子等小分子出入;而像蛋白质、脂类,特别是神经递质、激素等大量的重要大分子,则主要通过囊泡来进行运输。囊泡膜的主要成分是与其它生物膜类似的磷脂、糖脂和胆固醇,因此既可以通过出芽而从其他生物膜分离,独立形成可容纳大分子的“包裹”,也可以通过其他生物膜的融合将自己变成其他细胞器或细胞膜的一部分。在神经系统中特别在神经突触上,突触囊泡通过与神经细胞膜的融合,释放神经递质,从而介导神经信息的传递。

自 20 世纪初期开始,神经科学家们逐渐发现神经元间有解剖学意义上的联系,并称之为突触。他们认定突触是神经信息传递的特殊构造,突触将神经化学信号或电信号从上游的神经元传递到下游的另一个神经元。但在相当长的时期里,人们对神经信息的传递方式不甚明了。1950 年代初,卡茨(B. Katz)在蛙神经-肌肉接头的研究上取得两项重要成果。一是发现神经突触的电信号传输是以量子化方式进行的,二是发现神经递质的释放与钙离子高度相关。虽然卡茨预言突触信号的量子化是因“包裹化”(package)神经递质的释放所致,但是作为电生理学家的卡茨无法给出明确的解剖结构基础。

囊泡概念的提出是一个转折点。通过电子显微镜观察,帕拉德(G. Palade)在细胞内发现了囊泡结构,并提出囊泡运输是细胞内物质交换与细胞分泌之主要途径。得知帕拉德在神经终末发现大量突触囊泡,卡茨异常欣喜,随即完整阐述了以突触囊泡释放神经递质为结构基础的突触信息量子化传递的理论——神经元兴奋引发钙离子流入神经终末,进而触发突触囊泡与神经细胞膜融合,释放神经递质。释放出来的递质继而与突触后受体结合,引发下一级神经元兴奋性或抑制性的反应,从而完成神经信息的传递。为此,卡茨获得了 1970 年的诺贝尔生理学或医学奖。而帕拉德也因为揭示了核糖体和内质网合成蛋白质的过程,以及细胞蛋白质的囊泡运输途径,于 1974 年被授予诺贝尔奖。

在他们具有里程碑意义的工作之后,人们提出了进一步的问题:囊泡是如何从细胞膜形成的,又如何与目标生物膜融合?这些问题无疑具有重要意义。然而要回答这些问题,对于当时的细胞生物学家和神经科学家来说极具挑战性,甚至被认为是不可能的。在 1970 年

陈培华,博士后;孙坚原,研究员;中国科学院生物物理研究所,北京 100101. jysun@ibp.ac.cn

Chen Peihua, Postdoctor; Sun Jianyuan, Research Professor; Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101.

代,连在动物细胞中表达克隆的基因都无法做到,而要成千上万的突触分子中“钓”到相关的蛋白质,几近于天方夜谭。

囊泡运输及膜融合: 罗思曼与谢克曼胜利会师

这时,罗思曼、谢克曼相继“出道”了。罗思曼于1976年从哈佛医学院获得博士学位,1978年得到斯坦福大学的教职;谢克曼于1974年获得斯坦福大学博士学位,1976年任职加州大学伯克利分校。和大多数初出茅庐的年轻助理教授一样,他们渴望成功、不怕失败。在他们看来,越是困难的课题就越有吸引力,只要它是重要的。

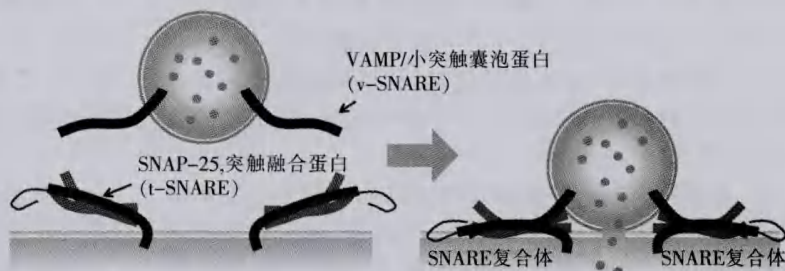
面对经过上亿年进化而来的生命体系,罗思曼和谢克曼不约而同地决定从简单的生物系统入手。罗思曼的思路是将囊泡运输过程分解到一系列基本的生化反应,然后在试管里进行系统重组;而谢克曼的策略则是在酵母上进行基因突变,再通过观察酵母细胞的囊泡运输是否异常,进行相关基因的筛选。当他们的课题开始实施时,大多数科学同行是持怀疑态度的,而他们选择了坚持——就像谢克曼在诺贝尔奖的授奖典礼上提到的,他们愿意“赌一把”。他们并不是盲目的,他们的研究策略基于对进化的信念:生命现象中的重要机制都是保守的。这一理念的建立与酶学大师、1959年诺奖得主科恩伯格(A. Kornberg)密切相关。罗思曼说科恩伯格使他坚信,无论多么复杂的生物学问题,生物化学最终都可以成功地解决,并提供可靠的分子机制。谢克曼则更是在科恩伯格实验室学习期间,借鉴同行凯恩斯(J. Cairns)在大肠杆菌上用基因突变方法验证DNA聚合酶存在的思路。

在同行们的争议之中,谢克曼开始了第一次实验。他和同事们诱导出温度敏感的突变体,可通过升高温度使相应的蛋白质丧失功能,以此筛选出酵母囊泡与细胞膜融合所需的关键基因。这一策略的逻辑很简单:囊泡运输系统对酵母的生存至关重要,相关基因的突变将干扰囊泡运输而引起致死表型,同时通过电子显微镜也将能观察到囊泡分布的异常。例如,调控囊泡融合基因的突变将导致酵母内大量囊泡的积累,以及细胞停止生长(死亡)。得益于酵母细胞上遗传学操作的简易性以及成功的策略,谢克曼筛选出了23个囊泡运输的关键基因,其中包括与细胞膜融合相关的13个基因,并直接导致相应蛋白质的发现,从而为揭示融合的分子机制提供了重要洞见。需要指出的是,

即使在简单且易于遗传学操作的酵母中,这个实验室仍先后用了将近二十年的时间,才完成对23个基因的筛选。

几乎在相同的时期,罗思曼研究组在将哺乳动物细胞破碎后提取囊泡而得的试管系统上,开始了对囊泡运输相关蛋白质的研究。首要目标是摸索出一个可以用来检测囊泡运输的试管系统。在那个时候,人们还不能在动物细胞中表达所克隆的基因,他们只能通过水泡性口炎病毒(VSV)表达蛋白质。他们把来自两种细胞的囊泡加以混合:其中一种囊泡作为供体,来自经VSV感染后只含有缺少一个基本转移酶而呈不完整组装蛋白质的细胞;另一种囊泡作为受体,来自没有VSV感染但包含了放射性标记转移酶的细胞。如果携带VSV感染蛋白质的囊泡能够在试管内与受体囊泡融合,那么融合后的囊泡中放射性标记的转移酶可与所融合囊泡中缺少一个基本转移酶的蛋白质结合而完整装配,这样,囊泡的运输都能通过检测试管中预定的放射性的完整蛋白质来检测。他们由此成功地建立了一个可用来研究囊泡运输的试管系统,在一些实验中检测到了囊泡的融合。成功不仅因为建立起了一个系统,而且因为就此揭示了一个基本现象并解答了人们的疑问——囊泡的运输依赖于膜和相关膜蛋白的内在化学特异性,而不取决于囊泡在细胞内的相对空间关系。罗思曼随之开始大规模梳理参与囊泡出芽及融合的蛋白质。

揭示膜融合原理之重要发现始于1987年。罗思曼实验室发现,试管内的囊泡运输能被低浓度的巯基烷基化试剂的N-乙基马来酰亚胺(NEM)所阻断。他们纯化了NEM的目标蛋白质,将其命名为N-乙基马来酰亚胺敏感因子(NSF),并发现足够多的NSF可以缓解甚至去除NEM的阻断作用。当罗思曼追寻编码NSF的基因时,他发现这是一个酵母基因SEC18的哺乳动物同系物,在谢克曼早期的实验中已经分离得到,因此他们把这个蛋白质改名为NSF/sec18p(即sec18基因的相应蛋白质)。这是两个独立研究组的遗传学和生物



囊泡融合的SNARE模型 v-SNARE蛋白和t-SNARE蛋白通过形成复合体而拉近囊泡膜与细胞膜,导致两层膜的融合。

化学研究的第一次交汇,不仅令人惊叹,更令人振奋。它显示了:即使在酵母和哺乳动物这样的远缘生物体中,NSF/sec18p蛋白的作用对囊泡融合也同样是必要条件;它还印证了:囊泡运输系统在自然进化中具有保守性。谢克曼和罗思曼在NSF/sec18p蛋白的探索中会师,令众多的怀疑者为之折服。

在后续的研究中罗思曼发现,虽然融合需要NSF,但是这个蛋白质自身不能直接调控膜的融合,而是通过与另一个蛋白质的结合在膜融合中起作用。那个蛋白质被命名为可溶性NSF附着蛋白(SNAP)。可喜的是,它与谢克曼筛选的另一个基因SEC17的相应蛋白质殊途同归。为了深入挖掘SNAP和NSF是如何工作的,罗思曼开始寻找SNAP的膜受体,并统称为SNARE。按照罗思曼的思路,在囊泡上一定存在一个或多个直接参与囊泡融合的细胞SNARE蛋白,他称之为v-SNARE;而在细胞膜上也一定存在作为v-SNARE结合目标的SNARE蛋白,他称之为t-SNARE。他推测两类蛋白质的结合通过形成复合体来拉近囊泡膜与细胞膜,就像缠绕收紧分别与船和岸上锚桩相连的缆绳,最后在一定条件下使两层膜相融合。这就是在揭示膜融合机制上具有里程碑意义的SNARE假说。按照这个思路,罗思曼很快发现了第一个t-SNARE蛋白——SNAP-25/Sec9p。不久,斯坦福大学的谢勒(R. Scheller)发现了另一个t-SNARE蛋白——突触融合蛋白-1 (syntaxin-1)/Sec5p;随后又在鳗上发现了v-SNARE蛋白——VAMP/Sec22p。罗思曼进一步证明这些SNARE蛋白可形成复合体,直接参与膜融合,从而完整揭示了囊泡融合的关键蛋白质及其工作机制。

突触囊泡的融合:

聚德霍夫揭开钙离子触发机制

跟罗思曼和谢克曼相比,聚德霍夫是后来者。他于1982年获格丁根大学医学博士学位,1983年到美国得克萨斯大学西南医学中心,在诺贝尔生理学或医学奖获得者布朗(M. Brown)和戈尔茨坦(J. Goldstein)指导下从事博士后研究。1980年代后期他留在该校任教,开始了突触囊泡融合的分子生物学机制研究。他的切入点是回答10年前人们的质疑:从单细胞生物甚至试管系统得到的发现,是否适用于哺乳动物,特别是哺乳动物的中枢神经系统?

聚德霍夫的研究策略是将生物化学和分子生物学技术结合起来,研究突触囊泡活动及其相关的功能蛋白质。首先,他从哺乳动物(大鼠)的大脑中分离得到v-SNARE蛋白,并命名为小突触囊泡蛋白(synaptobrevin,谢勒称之为VAMP)。随后他证实,神经

递质释放阻断剂肉毒杆菌毒素和破伤风毒素是通过剪切SNARE复合体的三个组分蛋白质上的位点来实现的,从而为SNARE模型提供了最重要的支持证据。然而他清楚地认识到,罗思曼的SNARE模型所阐述的以秒甚至分钟计的动力学机制与以毫秒计的神经突触囊泡融合动力学,有着巨大的差别,神经递质的释放一定有独特的快速释放机制,即钙离子触发机制。

作为一名神经科学家,聚德霍夫更想揭示的是决定神经信号传递的快突触囊泡融合的确切机制。在他看来,卡茨有关量子化突触传递及其钙依赖性的发现是伟大的,但这不是一个辉煌时代的尾声,而应该是新时代的开端,也就是一个阐明突触传递分子生物学原理之新纪元。他认为,有关突触传递分子生物学机制的核心问题,在于钙离子如何触发囊泡与神经终末在毫秒时间尺度内的融合。

从钙离子内流到神经递质释放之间仅有小于1毫秒的延迟,不允许蛋白质与蛋白质的多级相互作用发生,因此聚德霍夫设想,应该只有小数目的分子或可能只是单一分子传感钙离子,触发突触囊泡融合。沿着这个思路,他开始了对神经递质释放的钙感受器的探索。重要的时刻发生于1990年,聚德霍夫克隆了突触结合蛋白-1(synaptotagmin-1, *syt-1*),并发现这个蛋白质有三个生物化学特性:首先它是囊泡膜蛋白,其次它能与钙离子结合,此外这个蛋白质还能与SNARE复合体结合。聚德霍夫由此推测*syt-1*及其家族蛋白质可能就是苦苦追寻了多年的突触囊泡融合的钙离子传感器。之后的二十多年中,他结合结构生物学、生物化学、遗传学、电生理学、生物物理学等多学科交叉的研究手段,多角度、多层次、系统地进行论证。他的实验室创建了大量*syt-1*敲除或基因突变的小鼠,并通过在体动物实验揭示:(1)*syt-1*敲除后快速的神经递质释放消失;(2)基因突变会改变内源性*syt-1*的钙亲和性,可以同样程度地改变快速神经递质释放的钙依赖性;(3)在*syt-1*敲除背景的神突触上表达外源性*syt-1*蛋白,可以恢复神经递质的快速释放。所有的证据都指向一个结论:*syt-1*蛋白是触发突触囊泡融合的钙离子传感器。除此之外,聚德霍夫还证实,突触结合蛋白家族的*syt-2*和*syt-9*蛋白也具有与*syt-1*蛋白相似的钙离子传感功能。

如果你现在打开经典的神经科学教科书,你会读到类似这样的一小段文字:“在静息状态下,突触囊泡与突触前膜接触,部分SNARE组分蛋白质相互结合形成复合体。当神经细胞兴奋时,钙离子由突触前膜上的通道流入后与作为钙离子传感蛋白的突触结合蛋白

结合,结合了钙离子的突触结合蛋白迅速改变 SNARE 复合体的构象,触发突触囊泡与突触前膜的融合,快速释放神经递质。”——这就是 2013 年获奖的三位科学家对人类知识宝库的奉献。他们以三十年坚持不懈的探索,为我们阐述了突触囊泡融合中瞬间发生的过程。

- [1] Katz B. On the quantal mechanism of neural transmitter release. Nobel Lecture, 1970-12-12.
 [2] Palay S L, Palade G E. The fine structure of neurons. J Biophys Biochem Cytol, 1955, 1: 69-88.
 [3] Novick P, Field C, Schekman R. Identification of 23 complementation

- groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. Cell, 1980, 21: 205-215.
 [4] Weber T, Zemelman B V, McNew J A, et al. SNARE pins: minimal machinery for membrane fusion. Cell, 1998, 92: 759-772.
 [5] Südhof T C, Baumert M, Perin M S, et al. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*. Neuron, 1989, 2: 1475-1481.
 [6] Südhof T C. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. Nat Med, 2013, 19: 1227-1231.

关键词: 诺贝尔生理学或医学奖 囊泡 突触 SNARE 蛋白 突触结合蛋白

跟踪·扫描

嫦娥三号漫步月球

[本刊讯] 2013 年 12 月 14 日 21 时 11 分,嫦娥三号月球探测器在月球虹湾西经 19.51°、北纬 44.12°成功软着陆,它是中国首个在地球以外天体实施软着陆的航天器。这是 1976 年苏联月球 24 号无人巡视器在月球软着陆 37 年后,人类再次发射航天器在月球软着陆,中国成为世界上第三个实现航天器月球软着陆,第二个完成无人巡视探测勘察月球任务的国家。

嫦娥三号月球探测器由着陆器和巡视器组成,起飞重量 3780 千克。它在登月前经历了发射段、地月转移段、环月段和动力下降段等阶段。在地月转移段的 5 天飞行中,它进行了 2 次中途修正,于 12 月 6 日 17 点 53 分通过 7500 牛变推力发动机的近月制动,进入 100 公里×100 公里的环月圆轨道。12 月 10 日 21:20 分,嫦娥三号按照预设指令成功点火,21:24 分,进入 15 公里×100 公里的月球椭圆轨道,嫦娥三号在后 4 天的绕月中更加准确地对预订着陆点进行勘察测量。12 月 14 日 20 点 59 分,嫦娥三号在距离嫦娥二号预选的着陆区虹湾区域 400 公里时,开始启动 7500 牛变推力发动机的动力下降程序。它利用微波测距敏感器、激光测距敏感器进行对月测距测速;利用光学成像敏感器在接近段进行粗避障;利用激光三维成像敏感器在悬停段进行精避障,经过 720 秒的缓慢动力控制下降,嫦娥三号的相对速度从 1.7 公里/秒逐渐减为 0,在距月面 3~4 米时发动机关机,着陆器进行

自由落体,完成月面安全软着陆。登月后,经过 6 个多小时的月球工作状态准备,转移机构运动到位,玉兔号巡视器(月球车)缓缓从转移机构驶离,于 15 日 4 时 35 分驶上月面,开始了为期 3 个月的月球无人巡视探测勘探活动。

与嫦娥一号、二号相比,嫦娥三号月球探测器的技术跨度大、设计约束多、结构更复杂。“玉兔号”巡视器由上海宇航系统工程研究所牵头研制,重约 140 千克,由 8 个分系统组成。着陆器是为了实现月面软着陆任务而专门量身定做的新型航天平台,共有 11 个分系统。在月昼期间,着陆器在原地进行科学探测,巡视器进行巡视勘察。月夜期间,二者都要断电休眠。对在月球环境中生存的嫦娥三号来说,保温至关重要,嫦娥三号配备了核能电池(放射性同位素温差电池),电池中的钷 238 金属块释放出的热量经过温差热电转换器转换成电流,能充分满足整器的温度需求。这是我国首次将核能技术应用于航天器,我国成为继美俄之后世界第三个将核动力应用于太空探测的国家。度过月夜后,二者通过光伏太阳能电池自主唤醒,继续实施探测任务。着陆器在月面的工作时间是一年,巡视器在月面的工作时间是三个月。

在嫦娥三号装备的多种科学探测仪器中,有三台仪器将在世界范围内完成开创性工作:一是安装在着陆器顶部的近紫外光学望远镜,它主要监测致密双星、活动星系核、短周期脉动变星等,这是国际上首次利用月基光学望远镜进行重要天体光变的长期连续监测和低银道带的巡天观测;二是安装在着陆器顶部的极紫外相机,它

对地球周围的等离子体层产生的 30.4 纳米辐射进行全方位、长期的观测研究,这是国际上首次在月面上利用极紫外相机对地球空间等离子体层实施大视域一次性的极紫外成像,从整体上探测太阳活动和地磁扰动对地球空间等离子层极紫外辐射的影响,研究等离子层在空间天气过程中的作用;三是安装在月球巡视器底部的测月雷达,它将完成世界首次直接探测 30 米深度内月壤层结构和厚度以及数百米深度内月亮浅层结构的任务。

嫦娥三号担负着中国探月工程“绕、落、回”三步走战略二期“落”的工程目标任务,起着承前启后的关键作用。嫦娥三号任务的三大工程目标是:突破月球软着陆、月面巡视勘察等关键技术,提升航天技术水平;研制月球软着陆探测器和巡视探测器,建立地面深空站,具备月球软着陆探测的基本能力;建立月球探测航天工程基本体系。

2013 年 12 月 2 日 1 时 30 分,嫦娥三号月球探测器在西昌卫星发射中心由长三乙增强型火箭发射升空。长三乙增强型火箭是长征系列火箭中运载能力最强的“大力士”,它把嫦娥三号直接精准地送入近地点约 200 公里、远地点 38 万公里的地月转移轨道,起飞推力达到 600 吨,这是长征三号乙火箭运载能力的极限。为完成长途跋涉的运送任务,长三乙运载火箭一、二级及助推器发动机进行了一系列可靠性增长改进,特别是实施了三级级氢氧贮箱减重方案,首次使用新型机械壁板钣,贮箱成功减重 50 千克,火箭的运载能力和入轨精度得以大幅提高。(赵金才)