

结构生物学研究在中国

摘要 1970年代初期,中国科学工作者测定了亚洲地区第一个蛋白质晶体结构——猪胰岛素三方二锌晶体结构,成为中国结构生物学历史发展的起点。进入新世纪,该学科领域已进入国际前沿,展现出快速发展态势,正在迎来发展新时期。本篇评述包含“历史发展”,“现代化实验设施建设”和“深入生命世界,走进国际前沿——近年代表性研究成果集萃”三个主题节段,以较全视野反映结构生物学研究在中国的发展历程。

关键词 结构生物学, 历史回顾

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00240

I 历史发展

王大成

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

I 1 历史的起点

45年前,1969年1月,在中国科学院物理研究所组建了一个以测定猪胰岛素晶体结构为目标的协作研究组,后正式定名为“北京胰岛素结构研究组”。当时参加这一协作组的主要单位有中国科学院物理研究所(下称物理所)、生物物理研究所(下称

生物物理所)、上海生物化学研究所(下称生化所)、北京大学化学系和生物系。在随后的日子里,这个研究组在极为困难的工作条件和复杂的社会政治环境中,艰苦奋斗,群策群力,相继在分辨率4 Å(1970年)、2.5 Å(1971年)、1.8 Å(1974年)测定猪胰岛素三方二锌晶体结构^[1-3](图1),在国内外产生重要影响。胰岛素晶体结构测定是我国第一个解析的蛋白质三维结构,也是当时亚洲第一个、国际上少数成功解析的生物大分子三维结构,成为结构生物学研究在中国历史发展的起点。以此为发端,我国结构生物学工作者不畏艰辛,在坚持与开拓中奋力前行,推动我国结构生物学研究不断深入生命世

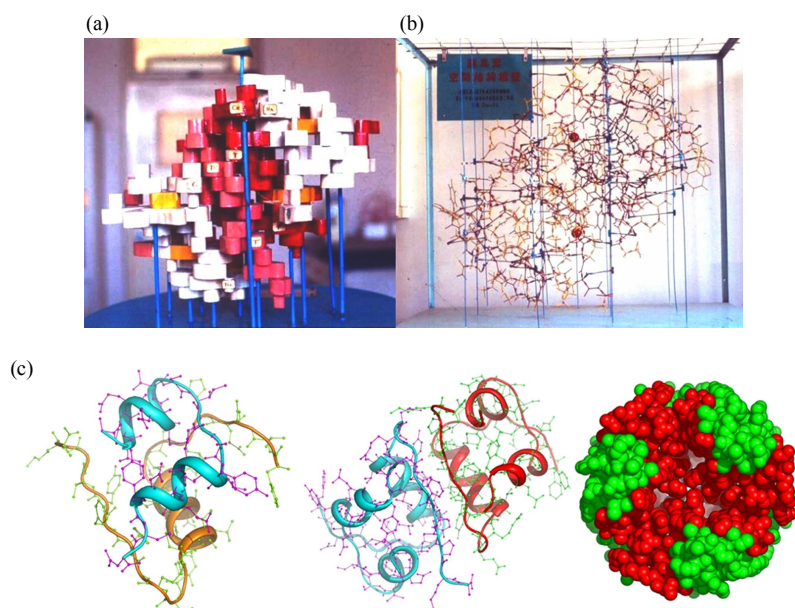


图1 基于4 Å分辨率 (a) 和1.8 Å分辨率 (b) 的胰岛素二聚体结构模型,以及在晶体中的胰岛素单分子、二聚体、六聚体结构 (c)

界, 走进国际前沿, 已经成为我国生命科学中一个欣欣向荣的重要前沿学科。

我国猪胰岛素晶体结构测定的特殊研究历程及其所取得的成功, 反映了我国早期结构生物学工作者的执着与坚韧, 集体的智慧与才智。开拓进取不畏艰难, 群策群力紧密合作, 追求科学不拘私利, 是这一段历史、这一代人留下的精神。历史不会重复, 但应该记忆, 因为历史的经验和教训值得记取, 历史的精神需要传承和发扬。

作为我国生物物理学科发展的一个重要组成部分, 在纪念《生物化学与生物物理进展》(下称《进展》)创刊 40 周年之际, 简要回顾这一段研究历史, 重温其中蕴含的精神与体验, 谨表对《进展》的贺忱, 以及对参加猪胰岛素晶体结构研究全体成员的历史致意。

艰难中抉择 挑战下立题

1965 年, 我国科学工作者通过化学途径在实验室合成了具有充分生物活力的结晶牛胰岛素, 在世界上首次完成了一类蛋白质的人工合成, 在国内外产生重要影响。为了进一步拓展在这一科学方向上的成就, 深入研究胰岛素的结构与功能关系, 并建立我国的蛋白质三维结构研究基础, 1966 年初, 我国学术界提出了“测定胰岛素晶体结构”的研究课题, 并得到当时国家科学技术委员会的首肯。但很快由于“文化大革命”兴起, 国内政治形势急剧变化, 文化、教育、科研和社会生产受到严重冲击, 该项课题几经起伏, 直到在 1969 年 1 月, 组建了胰岛素晶体结构研究协作组, 集体挂靠在中国科学院物理所, 当时称为“691 连队”, 后正式定名为“北京胰岛素结构研究组”, 自此, 胰岛素晶体结构研究得以全面展开。当时参加这一协作组的主要单位有中国科学院物理所、生物物理所、上海生化所、北京大学化学系和生物系。先后参加过部分工作的还有中国科学院计算技术研究所、上海有机化学研究所(下称有机所)和华东物质结构研究所。

在立题当时, 这项研究面临一系列严重困难。20 世纪 50 年代末 60 年代初, 英国剑桥的 John C. Kendrew 和 Max F. Perutz 相继运用 X 射线衍射分析测定肌红蛋白(1958 年)和血红蛋白(1960 年)晶体结构, 开辟了蛋白质三维结构研究的新时期, 并因此获得 1962 年的诺贝尔奖。当时, 这方面的研究尚属前沿科学难题, 对实验设施、技术方法、专业知识和经验都有很高要求。我们在当时处于一个完全封闭和落后的环境中, 缺乏必需的设施和技

术, 如适用于蛋白质晶体的 X 射线衍射仪, 大量计算分析所需的大型计算机, 同时对整个复杂的过程缺乏经验。在这种情况下, 完成研究目标是一项严峻挑战。研究组没有动摇, 没有退缩, 而是将这一研究看作是对一个科学前沿的攻坚, 迎着挑战确立课题。自此以后, 全体参加人员在明确重要科学目标的激励下, 群策群力, 矢志以赴, 克服了各种物质条件困难和社会政治环境干扰, 直到取得最后成功。在这一过程中一批青年科学工作者表现出对重要科学目标的追求, 不畏艰难开拓进取的精神, 值得感佩和发扬。

群策群力 无私合作

面对当时的各项研究难题, 这个研究群体以各学科专业人员的密切合作、集体智慧、勤奋踏实、不拘私利的精神和行动, 逐一攻克。这个研究群体前后有数十人参加, 也有相当大的流动性, 但核心力量是稳定的, 在此基础上建立的组织结构有利于群策群力和个人智慧的发挥。当时按照专业领域和工作性质将全体人员分成 4 个大组: 结晶与衍生物制备, 衍射相位解析, 结构分析与模型构建, 仪器技术与衍射数据收集与分析。每个大组按分工有自己的专题组, 不定期经常性讨论各自的专业问题, 各大组间一周开一次综合交流会, 讨论解决相互关联的问题和总体安排。对出现困难的关键问题即时组织“攻关组”, 同时, 工作人员完全按需分配, 没有人考虑过其所承担的工作在今后的成果中占有什么位置, 无私合作。由此形成了一个既能发挥个人的积极性和创造性, 又有利于群策群力形成集体智慧的工作机制, 对在缺乏经验的情况下, 以集体智慧解决各项研究难题发挥了重要作用。

因地制宜 化解难题

地下室充作结晶恒温间

优质蛋白质结晶的培养和生长, 需要恒温、恒湿、无震作为基本的环境条件, 但在当时没有这种设施和条件。研究人员将结晶实验放在实验楼的地下室, 并特制水泥台放置结晶制剂, 以保证恒定的结晶条件(图 2)。正是在这样简陋的条件下, 结晶与重原子衍生物小组培养出优质的三方二锌胰岛素晶体, 成功制备 3 种高质量重原子衍生物(汞-, 铅-, 汞-铅-胰岛素), 建立了结构解析的重要基础。在随后的结果对比中, 英国 Hodgkin 教授明确肯定我方的重原子衍生物及以此为基础解析的胰岛素结构比她们所获结果更好, 更精确。

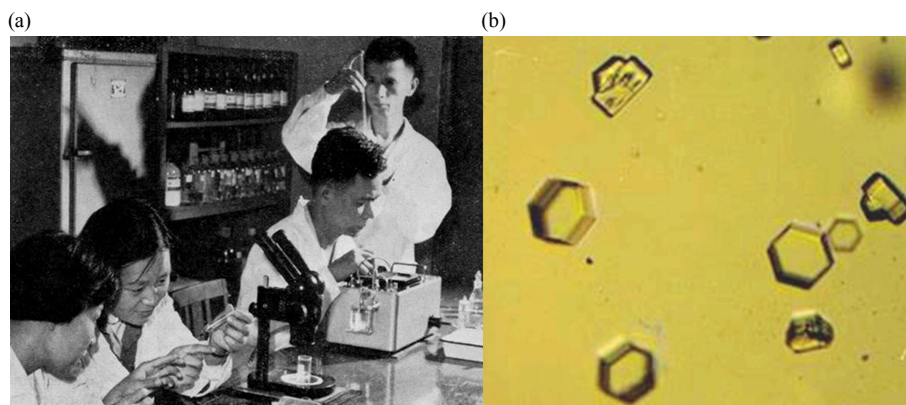


图2 研究人员在地下实验室进行结晶和重原子衍生物制备实验 (a) 及其所获晶体 (b)

手动电动齐上阵，协助数据收集和计算分析

在胰岛素结构解析过程中，需要对母体和各种衍生物晶体数以万计的衍射点进行记录和强度测定，工作量极大。开始没有相应设备，只能用手照相法进行，十分困难。随后，原由物理所订货的一台英国进口线形衍射仪拨归研究组用，可以自动进行单点测定，数据收集 24 h 连续工作，记录和测量一套完全的衍射数据及完成处理所需时间常以月计。各种计算所需的大量成套计算程序，需完全由自己编写，组内计算数学的专业人士为此付出了辛勤劳动。由于协作组拥有优秀的数、理、化多学科专业人员，这一系列难题逐一得到解决。面对大量的计算分析，最初没有大型计算机，大家用计算尺、手摇计算机、电动计算机进行计算，十分艰辛，后来联系到国防科委一院的大型通用计算机才使情况有了基本改善。

手绘“电子云”，玻板建晶胞

结构分析的最后结果是计算出组成胰岛素分子所有原子在晶体空间中的电子云密度分布，作为原

子/分子像分析确定其空间位置，进而建立胰岛素分子的三维结构模型。这是一项工作量极大和综合性很强的工作，现在都是以程序化、数字化和高度自动化的方式完成，十分简捷快速。在当时，没有自动化程序和相应的绘图设备使用，完全是用手工，将电子密度按晶胞分层分格，按空间格子点计算其电子密度并以数字记录，然后用手填写在带有晶格的图纸上，用手勾画出等密度线，再用手复制按晶格分层的玻璃板上，最后按距离比叠合玻板构成模拟晶胞，据此通过分析其中的电子云分布，确定组成原子的空间坐标，测定其三维结构(图 3)。如一套 2.5 Å 分辨率的电子密度图，需要对分布在 60 个晶胞截面上的 40 万格子点完成上述过程，这是一个极为浩繁的工作，当时有成批的北大同学结队前来帮忙，才使工作得以顺利进行。在此基础上，要用手从看得见却摸不着的“晶胞”中确认、测定组成原子的空间坐标，不仅工作量大，且有许多技术问题，都是由研究人员自行设计解决。

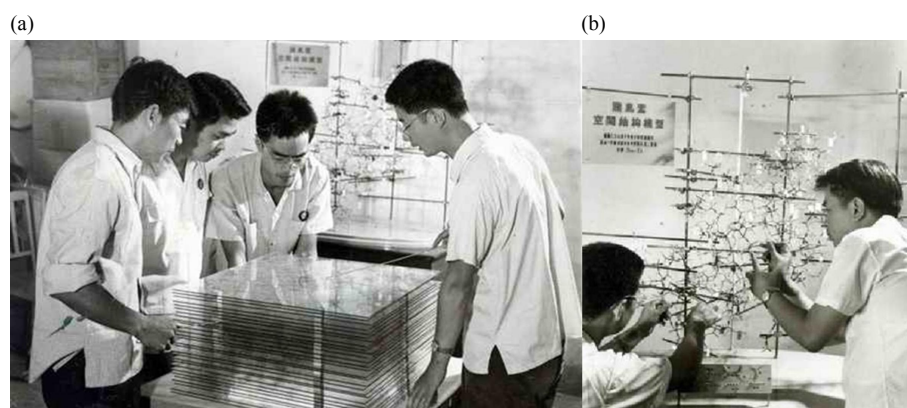


图3 研究人员在玻璃板构建的晶胞前进行三维电子密度图分析 (a) 和基于分析结果搭建胰岛素空间结构模型 (b)

研究结果与影响

测定的猪胰岛素三方二锌晶体结构在晶胞中的独立单位为二聚体, 通过三重对称构成六聚体. 1971 年 7 月, 中国科学院在北京国务院第一招待所主持召开了为期一周的胰岛素晶体结构研究成果鉴定会, 研究成果通过了卢嘉锡、唐有祺、邢其毅等 70 位专家的严格审核. 同期,《人民日报》、《光明日报》在头版头条报道, 邮政部专门发行一张以胰岛素晶体结构模型为主题的邮票, 作为当时基础科学研究的代表性成果(图 4). 由于当时全国学术期刊都处于停刊状态,《中国科学》英文版以“试刊”方式于 1972 年发表 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率的研究结果, 随后, 在 1973 年、1974 年报道了 $1.8 \text{ \AA}$ 分辨率的结果. 当时唯一的英文对外刊物 *China Reconstructs* 对这一工作也做了详细报道.



图 4 《人民日报》、《光明日报》分别以头版头条报道胰岛素晶体结构研究成果. 1976 年邮政部门发行以胰岛素晶体结构研究成果为主题的邮票

《中国科学》及有关报章的报道, 为当时国门紧闭的中国取得的这项科学成果开启了一扇窗户. 英国牛津大学教授、1966 年诺贝尔奖获得者 Dorothy C. Hodgkin 从事胰岛素晶体结构研究近 30 年后, 于 1969 年 11 月在《自然》杂志(*Nature*)发表了牛胰岛素晶体结构, 分辨率为 $2.8 \text{ \AA}$. 在得知消息后急切要求造访北京胰岛素结构研究组, 并于 1972 年访问北京, 历时一周. 在这期间她将牛津小组已取得的结果和关键资料带到北京胰岛素结构研究组, 一一对比(图 5), 具体深入了解研究过程, 讨论共同感兴趣的问题. 北京胰岛素晶体结构研究经历了又一次高水平专业同行的严格鉴定. 她对我国这项研究有文字记载的评价, 反映在她随后在第 9 届国际晶体学会(1972 年 8 月, 东京)专门为介绍中国胰岛素晶体结构研究所作的大会报告中, 大会会刊在



图 5 牛津小组和日本同行访问北京胰岛素结构研究组时对胰岛素晶体结构研究结果进行“一对一”的深入比较和讨论

右排中为 Hodgkin 教授, 后为牛津小组主要成员 T. Blundell; 中为日本名古屋大学教授 N. Sakabe; 左排为中方人员梁栋材, 王大成, 戴金壁

头版头条以该期约 1/2 的篇幅详细报道了她的报告内容^[4]. 其报告的标题是 "Standards There As High As Achieved Elsewhere", 开宗名义第一句话就是: “北京以国际上其他地方达到的同样高水平, 完成了对一个重要蛋白质胰岛素的晶体学分析”. 并指出, “他们通过严格控制温度和振动生长出十分漂亮的大晶体, 成功制备了优于牛津的重原子衍生物”, “获得的 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率电子密度图明显优于牛津小组的 $2.8 \text{ \AA}$ 结果”, 在条件方面, “除了一台线性衍射仪来自英国外, 其他技术需求都是自行解决的, 令人惊异”, “他们获得了很有意义的研究成果, 这是一项令人印象深刻的工作”, “我看到了一个热情而智慧的青年科学家群体, 他们不顾前几年中国的特殊形势, 做了非常踏实的工作……显然, 他们已经具备蛋白质 X 射线分析的足够知识和经验”. 晚些时候, Hodgkin 教授再次访华, 亲临考察了我们 $1.8 \text{ \AA}$ 分辨率的研究结果和论文后, 署名在 *Nature* 杂志撰文评述^[5]指出, “北京小组获得的 $1.8 \text{ \AA}$ 分辨率的胰岛素电子密度图是目前通过实验确定的最精确的结构图, 可能今后也就保持在这一水平”. 日本晶体学家渡边得之助在阅读了 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率的中文论文之后致信北京胰岛素结构研究组, 在表示钦佩的同时, 要求全文翻译此论文为日文在日本刊出, 认为“将论文内容介绍给日本可以对基础科学的进展做出贡献, 并且将开辟中日两国科学工作者协作的道路”. 在此前后时期, 英美等国的知名蛋白质晶体学实验室的许多权威学者都来访问过北京胰岛素结构研究组. 与此同时, 研究组的骨干也开始分别到国际知名实验室进行访

问、交流、合作研究,英国牛津大学 David Phillips 实验室还派遣人员来北京作博士后研究,推动我国结构生物学研究走向国际。

以此为发端,我国结构生物学工作者不畏艰辛,在坚持与开拓中奋力前行,推动我国结构生物学研究不断深入生命世界,走进国际前沿,使其已经成为我国生命科学中一个欣欣向荣的重要前沿学科。

I 2 学科建设与发展

建立基于学科方向的研究基础

随着猪胰岛素晶体结构研究任务的完成,以有限目标牵引构成的临时性“北京胰岛素结构研究组”已无存在必要,面临解体。中国科学院从学科发展考虑,将该研究组中物理所的主要成员与生物物理所成员一并划归生物物理所(图 6)。稍后,委任梁栋材先生负责组建了一个以学科发展方向为基础的研究室,称为七室。当时的人员有 37 名,来自物理、化学、生物物理、工程技术等不同专业,各自都有不同的学科发展倾向。在这种复杂情况下,梁栋材先生以前瞻的科学视野,审时度势,排除各种干扰,确定以蛋白质晶体学为学科基础,以生物大分子的三维结构及其与功能关系为主要研究方向。研究室也从初期的七室定名为“蛋白质晶体学研究室”,奠定了我国结构生物学早期发展的学科基础。同时,建立了 5 个研究组,包括蛋白质结构/功能、生物小分子结构、仪器与技术等方面,构成了一个合理和开放发展的研究格局。这个研究集体的作用和影响不断扩大,一批批研究生从这里培养成专业人才,走向四方;一批研究骨干成长为业绩显著的专家学者,其中四人先后当选为中国科学院院士,他们在中国结构生物发展历程中发挥了,并继续发挥着重要作用。1989 年作为一个重要学科方向,与生物物理所生物酶学研究室和膜生物学研究室共同组建成为生物大分子国家重点实验室。与此同时,其他一些单位也开始组建主要以蛋白质晶体学为基础的研究组,包括:中国科学院生化所、有机所、福建物质结构研究所(下称物构所)、北京大学化学系和生物系、中国科技大学生物系、中国医学科学院药物所等。到 1980 年代中后期,相关研究组大体可以 10 计,分别分布在中国科学院、高等院校和中国医学科学院,显示这一研究领域已成为重要学科方向立足于我国的主要科研和教学体系。回顾在学科发展早期组建的七室/

蛋白质晶体学研究室,作为我国第一个结构生物学研究基地,在人才培养,技术方法建立和推广,经验积累和传播等方面,对我国结构生物学早期和现今的发展都具有重要影响。



图 6 在中国科学院生物物理所组建最早的结构生物学研究组,其中 4 人先后当选为中国科学院院士

从后排至前排左起:饶子和^{1,2)},吴柏牧,梁栋材²⁾,王大成²⁾,李家瑶,万柱礼¹⁾,戴金壁,常文瑞²⁾,楼美珍,李密¹⁾,牛立文¹⁾,张季平,窦士琦,李素英¹⁾(¹⁾时为研究生;²⁾后当选为中国科学院院士)

在这一时期,结构研究与生物功能研究的联系微弱,主要研究对象多为有地域特色的功能蛋白质,如天花粉蛋白、江浙蝮蛇神经毒素、东亚钳蝎神经毒素、植物抗真菌蛋白、抗病毒蛋白、抗肿瘤蛋白等,以及一些重要酶分子。其间特殊中药功能分子天花粉蛋白晶体结构是我国第二个解析的新蛋白质结构(中国科学院有机所夏宗芴研究组,物理所潘克桢研究组,生物物理所董贻诚研究组合作完成)。梁栋材先生领衔研究组,一方面将胰岛素晶体结构解析推进到超 1.2 Å 高分辨率,同时在测定猪胰岛素晶体结构的基础上,继续研究其结构与功能关系,通过化学修饰制备一系列活性不同的修饰物,通过其系列性三维结构解析,在精确结构与不同生物活性的比较中,揭示胰岛素分子与受体结合的可能结构基础,这在当时对于推动结构测定与功能解析密切结合的方向有重要影响。在此基础上,胰岛素蛋白质工程也成为当时国内蛋白质工程领域的重要研究课题,通过测定 15 种突变体的晶体结构阐释长效、速效、高效人胰岛素的结构机制,提

出增加寡聚稳定性以产生长效性原理, 成功构建长效人胰岛素实验室样品, 成绩突出, 获得联合国工业发展组织(UNIDO)研究基金, 以及知名胰岛素生产公司 NOVO 肯定。

与国际科学领域发展同行 进入结构生物学新时代

国际生命科学进入 1990 年代, 一个重要的发展是结构生物学时代的降临。1993 年, 英国《自然》杂志 (*Nature*) 首次召开以结构生物学为名的主题学术会议, 宣称结构生物学时代已经开始, 并正在发展成为生命科学中重要的前沿学科。生物大分子及其复合物的完整、精确和实时(动态)三维结构是结构生物学研究的主要基础, 其主要的技术方法包括 X 射线晶体学(蛋白质晶体学), 多维核磁共振波谱学与低温电子显微术。以胰岛素晶体结构为发端的我国蛋白质晶体学, 当时已有较深厚的基础和广泛的应用。进入 1990 年代, 从事生物大分子核磁共振波谱研究的实验室先后在中国科技大学、中国科学院上海有机所、长春应用化学研究所建立起来; 生物大分子结构的低温电镜三维重构研究也在清华大学、北京大学医学部、中国科学院生物物理所先后开展起来, 为推动我国结构生物学的全面发展建立了新的坚实基础。1995 年, 中国生物物理学会分子生物物理专业委员会、中国晶体学会生物大分子专业委员会与国家自然科学基金委员会生命科学部联合召开了以“结构生物学现状与展望”为主题的学术讨论会, 成为我国第一次全国性结构生物学学术会议。来自全国 20 个研究单位 140 余位会议代表参与会议, 发表了 90 篇研究论文。随后, 1999 年在张家界召开了第二次全国性结构生物学学术会议, 邀请了许多海外学者参加。在此基础上, 向国家基金委呈送了“推动我国结构生物学跨世纪发展”的学科建议, 促使国家基金委决定将结构生物学研究列入“倾斜性”支持项目, 确定了这一研究领域在国家基础研究资助和学科发展中的重要位置, 为我国结构生物学的进一步发展创造了有利条件。2004 年、2005 年, 生物物理所常文瑞研究组和清华大学饶子和研究组分别解析了来自菠菜的捕光蛋白复合物 II^[6]和猪心线粒体呼吸链复合物 II^[7]的高分辨率晶体结构, 实现了我国膜蛋白三维结构解析零的突破, 是这一时期的代表性研究成果。

走进国际前沿 开拓发展新时期

进入新世纪, 通过千人计划、百人计划、长江学者选聘等人才计划, 引进了一批海外中青年杰出

科学家, 结合国内已有基础, 在我国构成了一支极富活力和创造性, 以中青年为主体的结构生物学研究队伍。与此同时, 我国现代化结构生物学研究设施的建设有了重大进展, 上海第三代同步辐射及其生物大分子线站在 2009 年建成并投入使用, 高性能冷冻电镜和核磁共振仪等国际先进设备的引进, 以及综合性国家蛋白质科学研究设施的组建, 构成了具有国际先进水平的实验平台。这两方面的结合, 推动我国的结构生物学研究形成一个快速发展的态势。一方面, 结构生物学研究不断深入联系各种重要生命活动, 解析其相关的复杂结构, 并与生物功能研究有机结合, 推动对重要生命活动规律的认识达到新的深度。我们在关于生物膜蛋白、遗传信息转录与复制、感染与免疫、生物医药相关等方面的结构生物学研究, 都显示出我国结构生物学研究与重要生命活动联系的层次在不断深入和拓展。另一方面, 我国结构生物学的研究成果和质量都有大幅度提高, 受到国际学术界高度关注和肯定的越来越多。以通信作者单位为我国大陆的统计显示, 我国结构生物学研究(含晶体, 核磁, 电镜结构)发表在《细胞》(*Cell*)、《自然》(*Nature*)、《科学》(*Science*)杂志上的论文, 在 2000~2009 年的 10 年间共有 12 篇, 在 2010~2014 年间增至 40 篇, 是过去 10 年的 3.3 倍。其中, 2012~2014 年发表 30 篇, 占 75%。这些情况从一个侧面显示, 我国结构生物学研究正迎来一个快速发展的新时期, 其前端已进入国际前沿。一些近年来有代表性的研究成果, 集萃反映在后面的《Ⅲ 深入生命世界, 走进国际前沿》主题节段中。

在这一期间, 先后在 2010 年 3 月和 2013 年 3 月召开了第三届(海南三亚)和第四届(重庆)中国结构生物学学术讨论会, 集中反映了我国结构生物学领域在新时期欣欣向荣的现状和全新的发展态势。第三届大会在海南三亚召开(图 7), 与上届会议已时隔 10 年。参会代表 220 余人, 包含了来自全国 36 个单位的 66 个研究组, 基本涵盖了当时我国结构生物学领域的主要研究群体, 会议举办了 6 场大会报告, 30 个专题报告, 60 余项墙报展。第四届会议参会代表 280 余人, 包含全国 54 个单位的 110 个研究组, 接受论文 124 篇。3 年间, 从事结构生物学研究的单位和研究组都有超过 50% 的大幅度增加, 显示出这一研究领域在国内的快速发展。这两次会议以全新的视野呈现了我国结构生物学的研究现状, 会议口头报告的主题内容大多涉及一些重要的生物学重大问题, 如生物膜蛋白、遗传



图7 第三届中国结构生物学学术讨论会与代表合影 (2010年3月, 海南三亚)

信息的转录与复制、感染与免疫、生物医学等, 其中相当部分已取得具有国际先进水平的研究成果, 表明我国结构生物学的研究前端已进入国际前沿, 并正以新的深度和广度与有关生物学重大问题密切结合. 透过这些情况充分显示, 我国的结构生物学研究已稳步进入国际前沿, 正以坚实步伐进入具备实力推动大范围原始创新发展的新阶段, 开拓中国结构生物学发展的新时期.

II 实验设施建设与新方法新技术

II 1 中国现代化结构生物学实验设施建设

秦文明¹⁾ 李娜¹⁾ 姚德强¹⁾

叶盛²⁾ 张荣光^{1,2)}

¹⁾中国科学院上海生命科学研究院,

国家蛋白质科学中心(上海), 上海 200031;

²⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

结构生物学研究有着不同于其他生物学研究领域的显著特点, 即高度依赖于大型乃至超大型的实验设施. 如果相关实验设施的建设水平落后, 就会成为制约结构生物学发展的瓶颈. 上海同步辐射光源建成以后, 我国的结构生物学实验设施逐步进入了现代化建设的快车道. 特别是随着国家蛋白质科学中心(上海)的“五线六站”工程的建成, 一系列达到了国际先进水平的相关实验设施即将投入使用, 为我国结构生物学界进一步取得高水平的研究成果创造了条件.

同步辐射光源

X射线晶体学作为结构生物学最主要的研究手段, 具有核磁共振和冷冻电镜三维重构等其他方法所不具备的优势. 近10年来, 同步辐射光源由于亮度高、波长可调等优点, 已经成为X射线晶体学使用的主要X射线源, 由此解析的新晶体结构占每年提交新结构的80%以上.

我国第一台同步辐射设施是北京同步辐射装置, 属于第一代同步辐射光源(高能物理研究与同步辐射共用环形加速轨道), 由北京正负电子对撞机(BEPC)于1999年经改造升级而成. 其用于生物大分子晶体学研究的光束线站, 在BEPC改进与未来发展专项资金的支持下于2003年建成并通过验收. 由于一代光源的技术限制, 机时和性能还远远不能满足结构生物学研究的需求.

2004年, 经国务院批准, 属第三代同步辐射光源的上海同步辐射装置开始开工建设, 并于2007年底实现电子储存环调试出光. BL17U1是上海光源首批线站中唯一的生物大分子晶体学光束线站, 于2009年3月获得了首张蛋白质晶体衍射图. 自2009年5月上海光源BL17U1正式对用户开放以来, 该线站每年供光超过4000h, 产生的衍射数据已解析了超过1000个晶体结构, 其中包括一批发表在顶级国际学术期刊上的研究成果.

生物大分子晶体学线站

近年来, 我国的结构生物学研究队伍迅速发展壮大, 已经有近200个课题组. 相较之下, 国内唯一的一条第三代光源晶体学线站已经远远不能满足

相关科研需要. 2008 年, 国家发改委批准建设“国家蛋白质科学研究设施”, 其中一个重要组成部分就是依托上海光源建设新的光束线站, 用于满足蛋白质三维结构测定、蛋白质结构的动态过程研究, 以及功能成像分析等科研需求, 统称“五线六站”工程.

在新建设的五条光束线站中, 有三条用于生物大分子的单晶衍射分析, 即生物大分子晶体学线站, 分别用于满足不同类型的实验需求. 其具体的技术特点如下: a. BL18U 蛋白质微晶体结构线站, 针对蛋白质等生物大分子的微小晶体进行结构测定, 光斑尺寸可以聚焦到 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 以下, 能够对微米级的晶体进行有效的衍射分析(图 8); b. BL19U1 蛋白质复合物晶体结构线站, 针对蛋白质复合物等晶胞较大的晶体进行结构测定, 光束的垂直和水平方向发散角均小于 0.1 毫弧度, 能够在大晶胞晶体产生的密集衍射点进行有效处理; c. BL17B 高通量晶体结构线站, 具有高度自动化的硬件和软件配置, 能够实现快速、规模化、高效率的晶体筛选与结构测定, 可用于常温晶体筛选以及浸泡法药物筛选等领域.

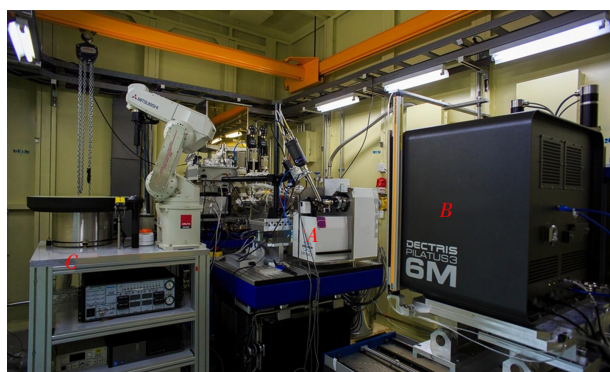


图 8 晶体学实验站主要设备

A: MD2 衍射仪系统, B: Pilatus3-6M 探测器, C: ACTOR 自动上样机械手.

基于同步辐射的生物大分子晶体学实验技术手段虽然已经相对较为成熟, 但其发展仍是日新月异. 上述三条生物大分子晶体学光束线站在设计和建设的过程中不断根据国际上的发展态势进行方案调整, 吸收了最前沿的技术方法, 其中包括: 性能先进的自动化晶体上样机械手, 高整合度、高精度的 MD2 衍射仪, 高收集速度的第三代 Pilatus 6M 探测器等. 这些技术设备的使用一方面提高了系统的自动化水平, 为远程数据收集提供了可能, 另一

方面大大提高了系统可靠性和数据精度, 使线站的整体性能达到了国际先进水平.

小角散射线站

小角 X 射线散射是一种方兴未艾的结构生物学研究手段, 能够反映传统结构生物学研究手段所无法体现的、处于更接近天然状态下的生物大分子结构动态特性. 虽然有着分辨率不高等固有问题, 但小角 X 射线散射成为传统高分辨率结构生物学研究手段的有益补充, 甚至解决了很多与结构动态研究有关的关键问题, 从而成为结构生物学研究不可或缺的一种新工具.

在前述国家蛋白质科学中心“五线六站”工程中, 基于上海光源的 BL19U2 线站是一条专门应用于生物大分子样品的小角 X 射线散射线站, 也是国内首条该类线站, 主要用于开展针对溶液状态生物大分子的结构生物学研究, 同时还具备针对结构动态变化过程的研究能力. BL19U2 在设计上主要考虑了生物溶液样本小角散射实验的特殊性, 针对线站的前端区、光学棚屋、以及实验棚屋内的关键部件与仪器进行了科学合理的设计(图 9).

线站前端区采用波荡器 U20 产生低发散度高亮度的 X 光, 保证了装置测试所需的小样品用量以及利用装置开展时间分辨测量的可行性. 经聚焦后, 聚焦光斑尺寸可以达到 $0.34\ \text{mm} \times 0.11\ \text{mm}$. 较小的光斑尺寸保证了样品池可选用内径较小的石英毛细管, 减少了管壁等因素造成的背景杂散射, 同时降低了对样品量的要求. 该线站的实验站配备了自动样本装置, 避免人为误操作的同时, 提高了有限机时的使用效率. 实验站内配备的探测器是 Pilatus 1M, 有效信号接收面积大、本底噪声低、读取速度快, 既保证了数据精度, 又为高时间分辨率的动态研究提供了可能.

自由电子激光

自由电子激光是在同步辐射技术上衍生而来的一种人造光源, 可以产生像激光一样具有相干性的 X 射线, 并且有着极高的亮度和极短的脉冲时间. 理论上, 利用硬 X 射线波段的自由电子激光照射生物大分子的单颗粒即可进行结构测定, 既无须结晶, 也无须在低温环境下进行数据收集. 目前, 美国、日本等国家已经建成了自由电子激光装置, 虽然还不能直接进行单分子的三维重构, 但已经可以对纳米尺度的微晶进行结构测定, 实际验证了相关技术的可行性. 显然, 自由电子激光将成为结构生

物学十分重要的下一代研究手段。

与同步辐射类似，自由电子激光也是造价昂贵的超大型实验装置，需要从国家层面进行立项、研究与建设。我国的硬 X 射线波段自由电子激光实验设施建设尚未开始，不过已引起各领域科研技术

人员的高度关注，相关的理论和装置研究也正在进行中。毋庸置疑，自由电子激光必然是我国结构生物学研究设施在现代化建设道路上的下一个重要目标。

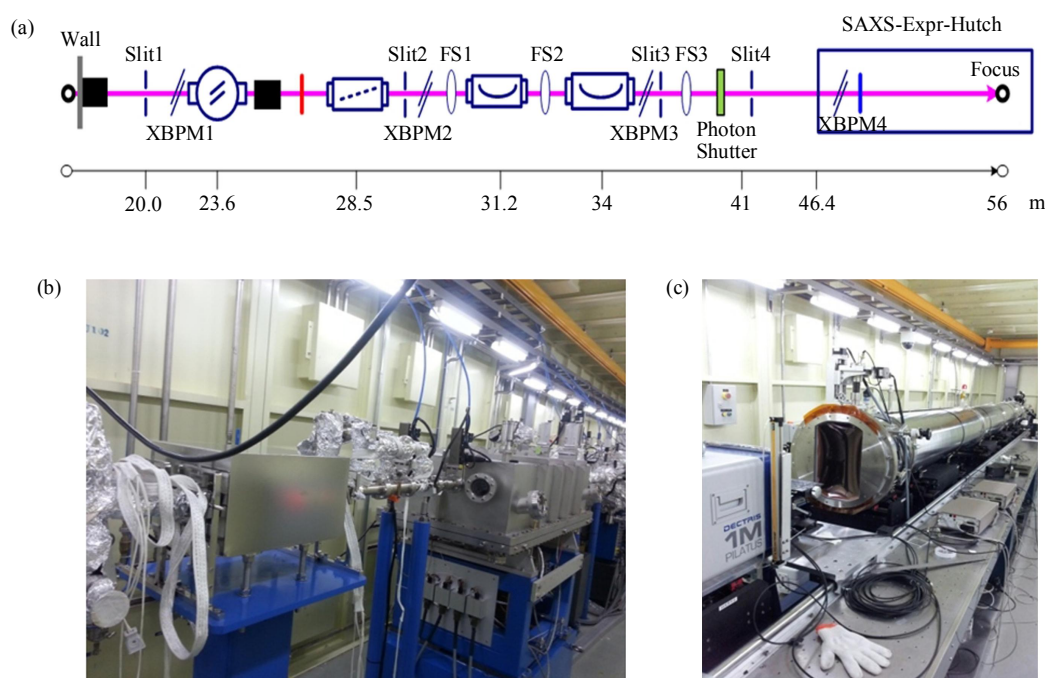


图9 基于上海同步辐射光源建成的生物小角散射专用光束线 BL19U2

(a) BL19U2 光束线整体布局图。(b) BL19U2 光束线光学栅屋实景图。(c) BL19U2 光束线实验栅屋实景图。

II 2 冷冻电镜三维重构技术及其在中国的发展

朱 平

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

近年来，冷冻电镜三维重构技术在生物大分子及其复合物的结构解析中发展迅速，并正在向近原子分辨率取得重要突破，引起了研究者的极大关注。利用冷冻电镜技术进行三维结构解析的主要方法有：单颗粒分析方法、电子断层成像方法和电子晶体学方法。对于高对称病毒样品的单颗粒三维重构，美国 UCLA 周正洪研究组的三维重构分辨率已经达到 $3.3 \text{ \AA}$ ^[9]。在这种分辨率下，建立基于冷冻电镜密度图的独立原子模型已经成为可能。近两年，随着直接电子探测器在低温电镜上的应用，对于病毒样品的重构分辨率已经达到 $2.6 \text{ \AA}$ 左右，而对于一些不具有对称性的大分子复合体，如核糖体等，冷冻电镜三维重构分辨率也在迅速提高，局部

分辨率达到了 $3.2 \text{ \AA}$ 左右^[9]，其中一个标志性的工作是美国 UCSF 程亦凡研究组和 Julius 组合作，利用冷冻电镜单颗粒方法解析在疼痛和热知觉感知中起重要作用的离子通道膜蛋白 TRPV1 的 $3.4 \text{ \AA}$ 分辨率结构^[10]。最近，还有一个值得注意的发展是利用电子显微镜收集细小微晶的衍射图谱并采用和 X 射线晶体学类似的方法进行生物大分子三维结构解析^[11]。

我国在电子显微学研究方面有很好的基础和相当的积累。在郭可信、李方华等老一辈科学家的带领下，中国科学家在电子显微学领域取得了一系列的丰硕成果。虽然高性能低温电子显微设备的缺乏曾经对冷冻电子显微学在中国的开展产生了很大的制约，但即使在比较艰苦的条件下，中国科学家在冷冻电镜三维重构领域也取得了一批重要成果，比如清华大学隋森芳院士研究组对大肠杆菌蛋白转运 SecYEG-SecA 系统、大肠杆菌分子伴侣酶 DegP、细胞内囊泡转运系统相关蛋白结构等的一系列研究

成果^[12-15], 以及中山大学张景强教授、北京大学医学部尹长城教授和美国 Rice 大学 Tao 研究组合作利用冷冻电镜和 X 射线晶体学技术对戊肝病毒的结构研究等^[16].

受益于近年来国家对冷冻电子显微学的重要前景的重视, 以及对低温电镜设备及其他科研投入的增多, 中国已经具备了很好的契机来开展冷冻电子显微学方面的工作. 中国的冷冻电镜研究者通过组织举办以郭可信电子显微学暑期讲习班等为代表的系列高水平学术会议, 推动了冷冻电子显微学在中国的发展, 并在国际同行中产生了较大影响. 目前, 中国的冷冻电子显微三维重构的研究正在快速发展, 并已经产生了一系列重要成果, 如清华大学施一公研究组和英国 MRC 实验室 Scheres 研究组合作关于与阿尔茨海默病相关的人源 γ 分泌酶复合物(γ -secretase)的精细三维结构解析(图 10a)^[17], 隋森芳研究组关于囊泡和靶膜融合相关 SNARE 复合体及 ATP 酶形成的 20S 复合体结构研究(图 10b)^[18], 王宏伟研究组关于 RNA 干扰以及 RNA 降解相关生物大分子复合体的研究(图 10c)^[19-20], 高宁研究组和雷建林研究组关于核糖体组装相关复合物的结构研究(图 10d)^[21-22], 中国科技大学蔡刚研究组关于转

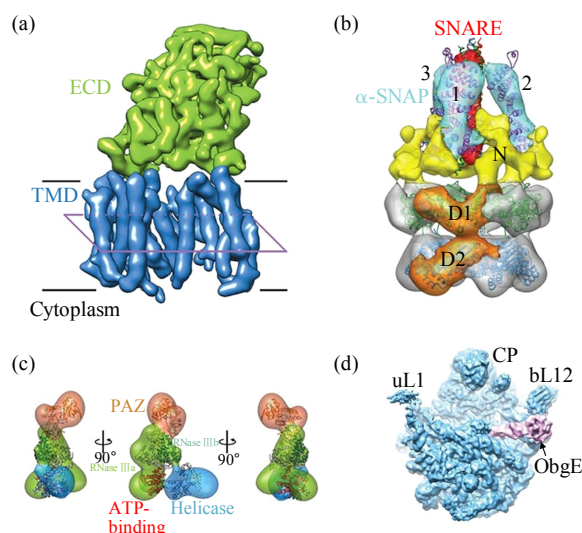


图 10 冷冻电镜三维结构研究 (清华大学)

录中介体的结构研究^[23], 中国科学院生物物理所朱平研究组和李国红研究组合作关于 30 nm 染色质左手双螺旋高级结构研究(图 11a)^[24], 孙飞研究组结合 X 射线晶体学和冷冻电镜三维重构关于 II 型分子伴侣(图 11b)^[25]和兔出血症病毒的三维结构研究(图 11c)^[26], 以及朱平研究组关于双链 RNA 病毒转录前后的近原子分辨率结构研究(图 11d)^[27-28]等. 随

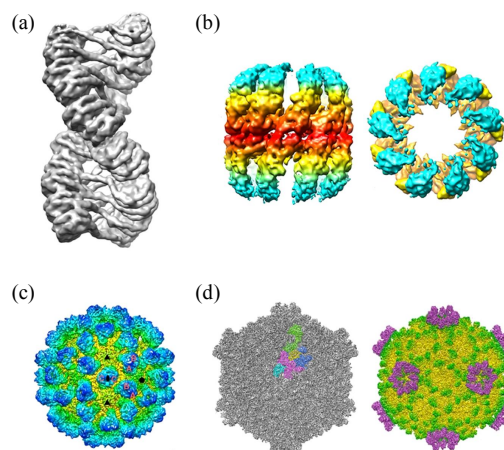


图 11 冷冻电镜三维结构研究 (中国科学院生物物理所)

着北京和上海分别建设的国家蛋白质科学研究基础设施的落成, 数十台先进的电子显微镜的购置和安装, 中国的冷冻电子显微三维重构研究将会在结构解析研究领域内具有较大的影响.

II 3 生物核磁共振波谱技术

施蕴渝

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

生物核磁共振波谱学是结构生物学的重要部分. 核磁共振波谱技术用于生物学研究始于 20 世纪 50 年代. 由于生物大分子高度复杂, 其真正作为结构生物学的重要方法, 归功于瑞士科学家 R.R. Ernst 和 K. Wütrich 在二维核磁共振波谱理论与实验方面的贡献, 两人先后获得诺贝尔化学奖. 20 世纪 70 年代末、80 年代初, 中国一批年轻学者赴海外留学, 学习了生物核磁共振波谱学, 特别是学习了多维核磁共振波谱的理论与方法, 他们是中国科学院长春应用化学研究所的裴奉奎, 吉林大学的袁祖文, 中国科学院物理所的孟庆安, 华东师范大学的黄永仁, 中国科学院上海有机所的王琦文. 1981 年华东师范大学的邬学文先生举办全国多维核磁共振波谱学习班, 由 Ernst 教授亲临授课 2 周. 1980 年代中期, 中国科学技术大学施蕴渝、生物物理所王金凤从国外回来, 当时, 无论是仪器, 还是经费都难以支持开展生物核磁研究, 但中国科学技术大学生物系在 1980 年代中期开始对本科生及研究生开设生物核磁共振波谱的本科生及研究生课程. 20 世纪 90 年代生物物理所王金凤, 中国科学技术大学施蕴渝、吴季辉, 上海有机所吴厚

铭开始开展生物大分子核磁共振波谱实验工作。这代表了我国最早的一批用核磁共振波谱方法进行结构生物学研究的实验室。21世纪初,一批年轻的优秀科学家先后回国。首先是2001年夏斌、金长文回到北京大学,建立北京核磁共振中心。其后是林东海(2003年,中国科学院上海药物研究所),胡红雨(2003年,上海生化所),颜贤忠(2003年,军事医学科学院),涂晓明(2005年,中国科学技术大学),曹春阳(2006年,上海有机所),刘扬中(2006年,中国科学技术大学),田长麟(2008年,中国科学技术大学),赵欣(2008年,华东师范大学),许琛琦(2009年,上海生化所),王俊峰(2009年,合肥强磁场研究中心),唐淳(2009年,中国科学院武汉数学物理研究所),温文玉(2009年,复旦大学),冯巍(2009年,生物物理所),杨俊(2010年,中国科学院武汉数学物理研究所),张钠(2010年,合肥强磁场研究中心),姚礼山(2010年,中国科学院青岛能源研究所),苏循成(2010年,南开大学),李从刚(2011年,中国科学院武汉数学物理所),周政(2011年,生物物理所),胡凯峰(2012年,中国科学院昆明植物研究所),王申林(2013年,北京大学),欧阳波(2013年,上海蛋白质科学中心)。国内生物核磁共振队伍迅速扩大,目前国内做结构生物学研究的核磁共振研究组已经超过25个。仪器设备得到很大改善,特别是国家上海蛋白质科学中心,以及北京核磁共振中心的建立提供了很好的实验平台。目前国内的研究工作涉及蛋白质、核酸及其复合物的结构、动力学、分子间相互作用。研究工作涉及表观遗传调控,膜蛋白(包括膜离子通道、淋巴细胞的信号转导、GPCR等),细胞极性调控及细胞内分子马达货物运输,细胞信号传导及细胞非对称分裂调控,病原菌相关蛋白,能源微生物与能源植物蛋白质等;还有一部分研究组主要开展核磁共振方法学研究,如非均匀采样快速多维谱数据采集技术,顺磁标记, ^{19}F 非天然氨基酸标记,蛋白质动力学等。过去几年,我国科学家在 *Cell*, *Gene & Dev.*, *PNAS*, *JACS*, *Angew Chem Int Ed Engl*, *JBC* 等学术期刊发表了一批论文。中国科学家活跃在国际磁共振波谱的各种会议上。生物磁共振研究成员过去主要是中国物理学会下属的磁共振波谱学会成员。为了加强生物磁共振研究方面的学术交流,2014年4月中国生物物理学会生物磁共振专业委员会成立。相信在未来几年中国生物核磁共振波谱学,包括磁共振结构生物学,将会有更好的发展。

III 深入生命世界, 走进国际前沿

2010~2014年间,以结构生物学为主题,我国学者为通讯作者,已在 *Cell*、*Nature*、*Science* 发表40篇研究论文,从一个侧面反映该学科领域正进入一个快速发展时期,其前端已进入国际前沿。此节段以有限篇幅集萃展示近年来部分有代表性的研究成果。

III 1 膜蛋白结构生物学研究

跨膜转运和信号传递相关蛋白

施一公

(清华大学生命学院, 北京 100084)

我国在膜蛋白结构生物学研究领域起步相对较晚,但起点相对较高。2004年、2005年,生物物理所常文瑞研究组和清华大学饶子和研究组分别解析了来自菠菜的捕光蛋白复合物II^[6]和来自猪心的呼吸链复合物II^[7]的高分辨率晶体结构。自2009年以来,我国结构生物学家在跨膜转运蛋白(transporters)、通道蛋白(channels)、膜整合蛋白酶(intramembrane proteases)以及G蛋白偶联受体(GPCR)等主要膜蛋白领域做出一系列具有重要国际影响的工作,现就前三类膜蛋白的结构研究进展简要总结如下。

跨膜转运蛋白

跨膜转运蛋白根据能量耦合方式不同,可以简单划分为初级、次级主动转运蛋白和协助扩散转运蛋白。

在初级主动转运蛋白(primary active transporters)研究中,清华大学施一公研究组、杨茂君研究组以及中国科学院上海植物生理生态研究所的张鹏研究组选取利用ATP水解能量转运底物的能量耦合因子转运蛋白(ECF transporters)进行了一系列开创性的结构生物学研究^[29-32],并提出与以往大不相同的转运模型。

次级转运蛋白(secondary active transporters)和协助扩散转运蛋白(facilitators)种类繁多,在多种生理过程中发挥作用。施一公研究组针对细菌抗酸系统的转运蛋白进行了系统研究,先后解析了氨基酸逆向转运蛋白AdiC和GadC处于三种不同转运状态的晶体结构^[33-35],为阐明APC(amino

acid/polyamine/organocation)转运蛋白超家族的结构与机理打下重要基础, 并为理解细菌及癌细胞的抗酸机制提供重要线索. AdiC 的晶体结构是我国第一次利用重组表达蛋白获得的膜蛋白结构.

清华大学颜宁研究组针对 MFS(major facilitator superfamily)超家族糖转运蛋白展开系统研究, 先后

解析岩藻糖转运蛋白 FucP、木糖转运蛋白 XylE 以及人源葡萄糖转运蛋白 GLUT1 这三类 MFS 家族蛋白处于不同构象的晶体结构^[36-38], 在该领域产生重要国际影响(图 12). 生物物理所张凯研究组还解析了 MFS 超家族多药抗性蛋白 YajR 的晶体结构^[39].

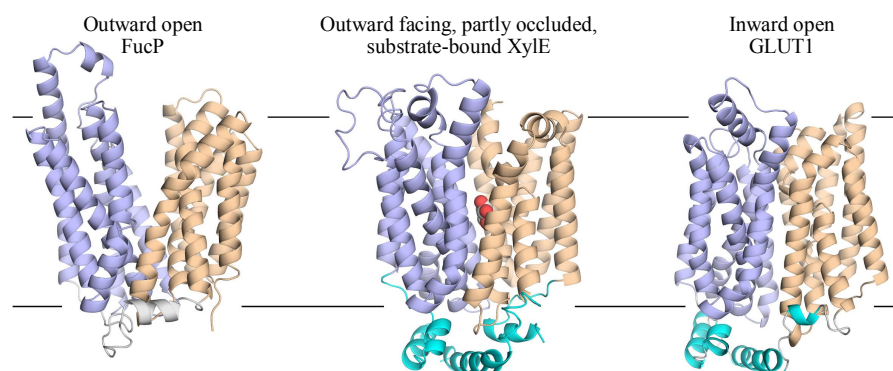


图 12 颜宁研究组解析了 MFS 超家族糖转运蛋白 FucP、XylE 和 GLUT1 处于不同构象的晶体结构

FucP: 大肠杆菌岩藻糖质子共转运蛋白(PDB 代码: 3O7Q); XylE: 大肠杆菌木糖质子共转运蛋白(PDB 代码: 4GBY); GLUT1: 人源葡萄糖转运蛋白(PDB 代码: 4PYP).

此外, 颜宁研究组 2011 年解析了尿嘧啶转运蛋白 UraA 的晶体结构, 首次揭示出内膜蛋白跨膜区 β 折叠片的存在^[40], 为研究膜蛋白折叠提供重要线索.

通道蛋白

2009 年, 施一公和颜宁研究组合作解析了甲酸通道蛋白 FocA 的结构, 第一次揭示出与水通道具有相同折叠方式的膜蛋白结构, 为理解膜蛋白的进化和折叠提供重要线索^[41]. 2012 年, 颜宁研究

组捕获了细菌电压门控钠离子通道 Na_vRh 处于失活状态的晶体结构^[42], 杨茂君研究组报道了机械门控阴离子通道 MscS 的结构^[43].

膜整合蛋白酶

蛋白受控膜内水解是近 20 年来发现的一个重要生理过程, 膜整合蛋白酶负责在疏水的磷脂双分子层内切割跨膜蛋白, 完成信号传递. 根据活性位点的不同, 膜整合蛋白酶主要分为金属蛋白酶 S2P (site-2 protease) 家族、丝氨酸蛋白酶 Rhomboid 家

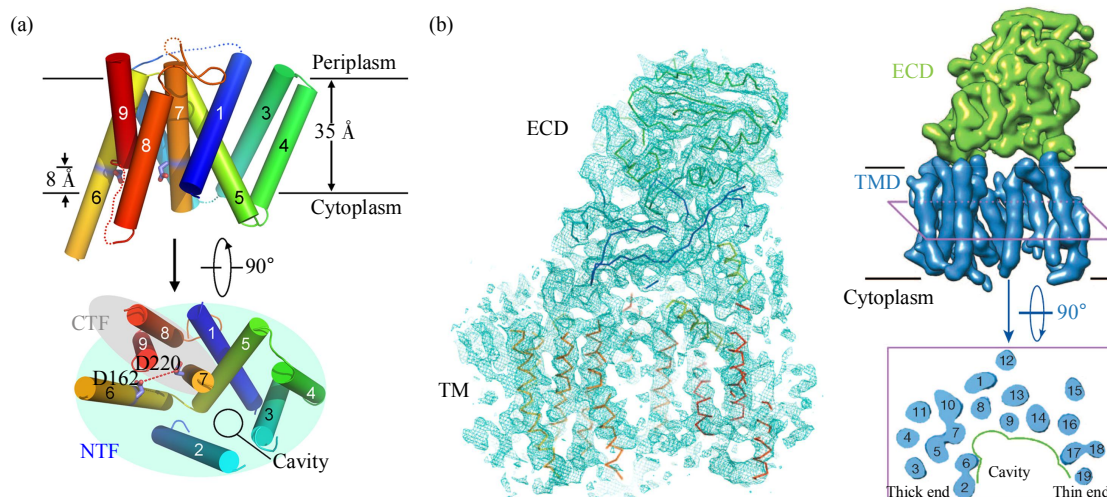


图 13 施一公研究组解析了早老素 (presenilin) 古细菌同源蛋白 mmPSH 的晶体结构 (PDB 代码: 4HYG), 并通过冷冻电镜方法获得了人源 γ -分泌酶复合物的三维结构

族以及天冬氨酸蛋白酶 Presenilin(早老素)和 SPP (single peptide peptidase). 施一公研究组继在普林斯顿大学解析出 Rhomboid 和 S2P 的细菌同源蛋白结构之后, 在清华大学经过数年攻坚, 先后报道了 Presenilin 古细菌同源蛋白 mmPSH 的晶体结构^[46]和人源 γ 分泌酶复合物的三维结构^[17](图 13), 确立了我国在膜整合蛋白酶结构生物学的领导地位.

这一系列工作进一步巩固了我国膜蛋白结构生物学在国际上的重要地位.

能量代谢、脂类合成及物质转运相关膜蛋白的结构与机制研究

柳振峰 张 凯

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

生物膜的形成是生命进化过程中的一个标志性事件, 它使得细胞新陈代谢中的一系列生物化学反应过程得以在生物膜所包裹的有限空间中高效地进行, 并从本质上区别于一般的化学反应. 生物膜不仅作为细胞或细胞器的物理屏障, 而且镶嵌在其中

的各种膜蛋白使得生物膜具备了进行能量代谢(光合膜蛋白复合物和呼吸酶复合物)、物质跨膜转运和交换(转运膜蛋白和通道膜蛋白等)、感受外界刺激信号和实现信号的跨膜转导(受体膜蛋白)以及膜蛋白和膜脂生成等一系列基础生物学功能. 对参与其中的关键膜蛋白的结构与功能研究不仅将使我们深入理解重要生命活动的分子机制和运作规律, 而且为针对特定疾病的药物研发提供直接的作用靶点(如 G 蛋白偶联受体和离子通道等). 中国科学院生物物理研究所作为我国最早开展膜蛋白结构和功能研究的科研单位, 对上述各大类重要膜蛋白开展了系统、深入的研究, 并取得了一系列重要成果.

2004 年生物物理所常文瑞院士研究组发表的光合膜蛋白——菠菜主要捕光复合物 LHC-II 的晶体结构^[6]和 2005 年饶子和院士研究组发表的线粒体呼吸酶复合物 II 的晶体结构(图 14)^[7]实现了中国膜蛋白结构生物学研究领域零的突破, 是两个重要的里程碑式工作. 进而, 捕光复合物 CP29 的晶体结构研究工作的发表(常文瑞组), 深入探讨了光合作用能量吸收和调节的分子基础^[49]. 随后, 一系列重组膜蛋白的结构研究工作在生物物理所全面展

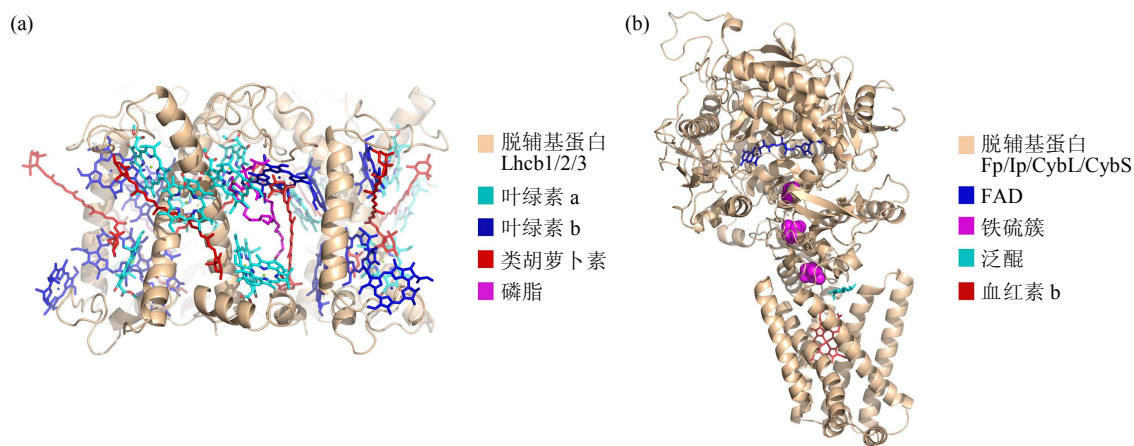


图 14 菠菜主要捕光复合物 LHC-II (a)和线粒体呼吸酶复合物 II (b)的晶体结构

开, 并取得了重要进展. 在转运蛋白方面, CaiT 转运蛋白(江涛组)^[46]、MFS 家族转运蛋白(张凯组)^[39,47]和外膜自转运蛋白 BrkA(孙飞组)^[48]等晶体结构相继发表, 对转运蛋白的底物识别、构象变化和能量偶联等相关的机制进行了深入的探讨. 脂类被认为是组成生命体的四大基础生物分子(蛋白质、核酸、糖和脂类)之一, 通过解析磷脂生物合成途径中的两个关键膜内酶(PgpB(张凯组)^[49]和 Cds(柳

振峰组)^[50]的结构和作用机制, 展示了磷脂这一重要生物分子在膜上的复杂装配过程及分子机理. 脂多糖是细菌外膜的重要组成, 负责脂多糖跨外膜转运的 LptD-LptE 复合物被认为是抗菌药物的重要靶标, 高分辨率 LptD-LptE 复合物晶体结构的解析(黄亿华组)^[51]将为设计新型抗菌药物提供新思路(图 15).

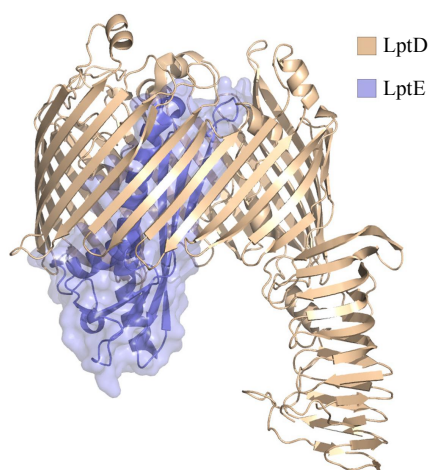


图 15 协助脂多糖插膜的 LptD-LptE 复合物晶体结构

近年来, 中国科学院上海药物研究所在 G 蛋白偶联受体结构研究方面取得了一系列有显示度的重要成果^[52-54], 在相关领域处于国际领先水平. 清华大学的膜蛋白研究团队也已发展为中国结构生物学的一支劲旅, 近年来硕果累累. 在可以预见的将来, 膜蛋白结构研究方面人们将重点关注与人类健康和疾病息息相关的膜蛋白及复合物, 以及在重要生物学或生理过程中发挥关键作用的膜蛋白结构和功能研究. 人们将充分利用包括冷冻电镜技术在内的多种前沿技术手段, 加快膜蛋白复合物结构研究的步伐. 利用单分子方法研究膜蛋白的动态结构变化是对晶体学所提供的静态结构的重要补充和发展, 在该方向上的研究也将会呈现长足的进步.

III 2 遗传信息转录、复制翻译中的结构生物学

30 nm 染色质左手双螺旋高级结构解析

朱 平

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

人类基因组计划完成后的一个重要生物学问题是: 人体内 200 多种具有相同基因组, 但形态和功能迥异的细胞的命运是如何决定和分化的? DNA 是遗传信息的载体, 但某一种基因是否表达, 或者在哪些细胞中表达, 染色质的空间结构及动态变化则起到了非常重要的作用. DNA 缠绕在组蛋白上形成的核小体以何种方式组装形成 30 nm 染色质高级结构, 以及该结构受什么因素调控一直是研究者希望获得的信息, 也是现代分子生物学的基本问题之一. 由于缺乏一个系统性的、合适的手段和体

系, 这个问题一直困扰了研究者 30 余年, 对于 30 nm 染色质纤维的高级精细结构组成仍然具有较大的争议.

近年来, 冷冻电镜(cryo-EM)技术在结构生物学领域发展迅速, 为研究 30 nm 染色质的高级结构及其调控机制提供了一个合适的研究工具. 最近, 生物物理所朱平研究组、李国红研究组、许瑞明研究组合作利用染色质体外组装和冷冻电镜三维重构方法, 获得了一个具有较高分辨率的 30 nm 染色质三维重构结果, 发现 30 nm 染色质具有一种与 DNA 右手双螺旋结构类似的左手双螺旋高级结构, 在 30 nm 染色质纤维高级结构这一问题上取得了较为重要的进展^[24]. 李国红研究组依据多年来在 30 nm 染色质和表观遗传学方面的研究, 建立了一套染色质体外重建和分析平台, 获得了适合高分辨率研究的高度均一的 30 nm 染色质样品; 朱平研究组依靠在冷冻电镜高分辨率结构解析方面的长期积累, 利用冷冻电镜单颗粒三维重构方法获得了由 12 个和 24 个核小体组成的 30 nm 染色质纤维的高分辨率三维重构结果. 一直从事 X 射线晶体学和表观遗传学结构机理等方面研究的许瑞明研究组协助构建了 30 nm 染色质高级结构模型. 他们解析的结构(图 16)显示: 30 nm 染色质纤维以 4 个核小体为基本结构单元; 结构单元之间通过相互扭曲折叠形成一个左手双螺旋高级结构; 四聚核小体结构单元之间的空隙可能是组蛋白修饰、染色质重塑等重要表观遗传现象发生的调控控制区域. 同时, 该研究还揭示连接组蛋白 H1 在单个核小体内部及核小体单元之间的不对称分布及相互作用促成了 30 nm 高级结构的形成, 明确了连接组蛋白 H1 在 30 nm 染色质纤维形成过程中的重要作用.

表观遗传及其调控机制的研究主要集中在染色质 DNA 甲基化和组蛋白变体以及甲基化、乙酰化、磷酸化修饰等方面. 表观遗传信息建立后, 通常认为是通过影响染色质高级结构或者在效应蛋白的帮助下影响染色质高级结构的动态变化, 来实现对基因表达的调控. 然而, 由于染色质本身的高级结构并未得以解析, 表观遗传信息如何影响染色质的高级结构就知之更少. 30 nm 染色质纤维的左手双螺旋高级结构的解析^[24], 为继续研究表观遗传信息对 30 nm 染色质结构的影响提供了较好的基础, 使得研究者有望回答染色质修饰(包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰)、染色质变体组成等一系列表观遗传信息对 30 nm 染色质纤维的结构影响, 明确其结构动态变化在基因转录调控中的作用机理.

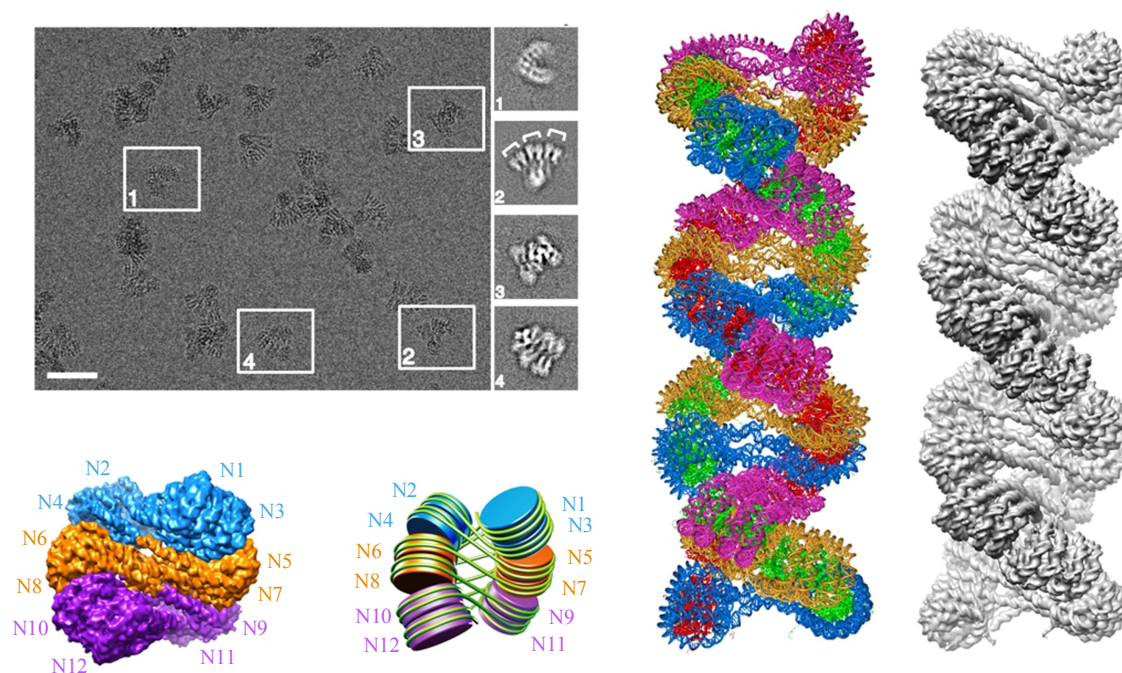


图 16 30 nm 染色质冷冻电镜三维重构及左手双螺旋高级结构模型^[24]

表观遗传的结构机理研究

杨 娜 许瑞明

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

表观遗传是真核细胞生物体普遍存在的现象, 是指基因序列没有发生变化而有稳定表型的生物学现象。研究表明, 表观遗传主要是由于 DNA 甲基化修饰、组蛋白上的各种修饰, 以及组蛋白变体的掺入等因素导致染色质空间结构的变化, 进而引起基因表达状态的变化。表观遗传在细胞命运决定、干细胞重编程过程中的调控功能及其分子机制是现代生命科学领域的一个研究热点, 具有重大和深远的科学意义。

中国科学院生物物理所近年来在表观遗传的结构机理研究中取得了一系列成绩。以真核生物染色质基本结构单元核小体为载体, 系统地开展了核小体组装、修饰和识别的结构机理研究: 核小体的正确组装需要组蛋白伴侣对组蛋白的正确识别和递放。染色质一些特殊部位往往存在特征的组蛋白变体, 特异的组蛋白伴侣对这些组蛋白变体的识别决定了核小体的组装通路以及染色质的动态结构变化。此部分已取得的研究成果包括染色质着丝粒区特征组蛋白变体 CENP-A 与组蛋白伴侣 HJURP 的识别、基因转录活性区域伴侣 DAXX 对变体 H3.3 的特异识别以及启动子区域伴侣 Anp32e 识别

H2A.Z 变体并将其从核小体中去除的机制^[55-57]。核小体修饰主要由一系列的组蛋白修饰酶和 DNA 甲基化酶催化完成, 这些修饰酶是表观遗传信息的书写者。生物物理所研究人员先后解析了多种组蛋白修饰酶的晶体结构, 系统地研究了它们的催化机制、底物特异性以及酶活性调控的结构机理, 其中包括首个精氨酸对称双甲基化酶结构 PRMT5、首个 H3K36 位点赖氨酸甲基化酶 NSD1, 以及对 Sirtuins 去乙酰化酶家族从酵母到人同源物的系统研究等。同时分析了它们在多种疾病中, 如肿瘤、发育迟缓、神经退行性疾病、心脑血管疾病等可能的作用机制, 为针对这些酶的药物设计奠定了结构基础^[58-61]。核小体修饰的识别蛋白是表观遗传信息的传递者, 是它们将不同位点、不同形式的表观遗传修饰所携带的生物学信息传递到下游的效应分子, 行使表观遗传的生物学功能。许瑞明研究组围绕 DNA 的甲基化修饰和组蛋白的甲基化修饰, 开展了 SRA 结构域蛋白特异识别羟甲基化 DNA, 以及多种 Tudor 结构域蛋白识别组蛋白赖氨酸和精氨酸甲基化修饰的结构机理研究^[62-65]。同时在核小体层次上的修饰和识别研究中, 建立并完善了核小体外重构平台, 系统地开展了以核小体为底物的修饰酶以及识别蛋白与核小体的相互作用研究, 解析了核小体识别蛋白与核小体复合物的晶体结构(图 17)^[66]。

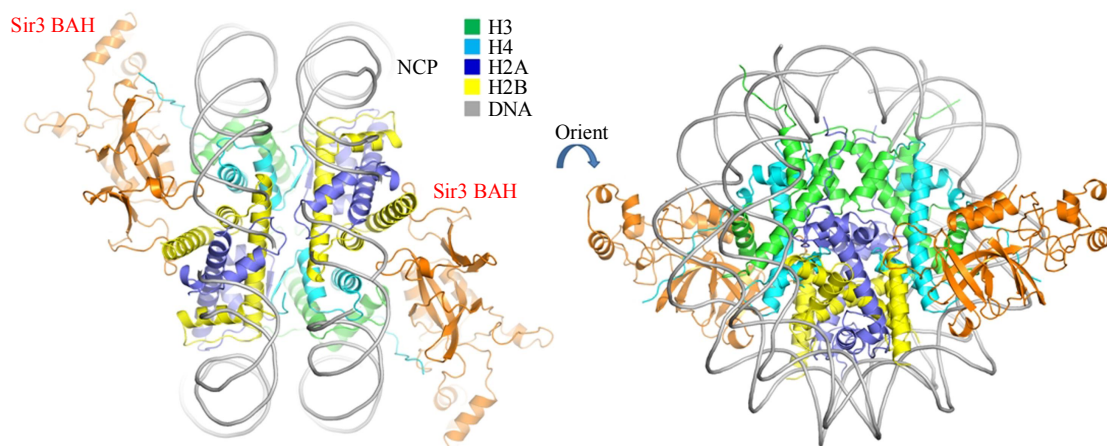


图 17 酵母 N 端乙酰化修饰的 Sir3 BAH 结构域与核小体 (NCP) 复合体的晶体结构图^[66]

2 个 Sir3 BAH 蛋白(橙色)对称地结合在一个核小体的两侧. 核小体 DNA 用灰色表示, 组蛋白 H3/H4/H2A/H2B 分别用绿色、青色、蓝色和黄色表示.

另外, 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所近年来在染色质端粒酶复合体、白血病致病蛋白 MLL 组蛋白甲基转移酶复合体的结构与功能研究中也取得了亮点成果. 端粒酶是一种自身携带 RNA 模板的逆转录酶, 在端粒长度平衡的维持中起到重要作用, 端粒酶活性的增强将导致细胞的永生化和肿瘤的形成. 上海生化细胞所的研究人员成功地解析了鱼类端粒酶 RNA 与端粒逆转录酶 RNA 结合结构域复合体的晶体结构^[67], 揭示了端粒酶催化蛋白亚基与 RNA 亚基之间的识别机制, 为进一步解析端粒酶全酶结构奠定了基础, 也为治疗端粒相关疾病的新型药物研发开辟了新的方向.

染色质高级结构的形成和动态变化是真核生物基因表达调控的关键手段, 通过蛋白质与核小体相互作用的结构生物学研究, 理解核小体组装和排布的调控机制、核小体修饰和识别对染色质高级结构的影响, 将为我们理解真核生物基因表达调控这一基本生命过程提供重要依据. 虽然核小体的晶体结构已经解析了 17 年^[68], 解析蛋白质与核小体复合体的晶体结构仍然是极具挑战性的工作. 由于核小体体外组装复杂繁琐, 结晶实验对样品的要求高, 已解析的核小体-蛋白质复合体的晶体结构屈指可数^[66,69-70], 目前还没有 1 例修饰酶与核小体复合体的晶体结构被解析; 另外, 组蛋白修饰过的核小体与相应的识别蛋白的复合物结构也没有解析. 这些将是未来表观遗传的结构生物学研究的挑战和热点.

核糖体在 mRNA 上移位的结构解析和机制研究

秦燕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

核糖体是所有生物体中最重要的复合物之一, 它是蛋白质翻译工厂, 将信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 所携带的遗传信息翻译成蛋白质, 从而完成分子生物学“中心法则”里由 RNA 到蛋白质这一过程. 在翻译过程中, 核糖体结合在 mRNA 上, 沿着 mRNA 的 5'→3' 方向移动, 每一步的步长是一个密码子, 催化核糖体这个动作的酶叫做核糖体延长因子 G 蛋白 (elongation factor G, EF-G). 核糖体的准确移位具有非常重大的意义, 因为移动过程直接决定 mRNA 上的读码框, 继而决定所生成的蛋白质的序列, 最终决定蛋白质的功能. 但是, 核糖体是如何准确移位的? 其结构特征和分子机理是怎样的? 都是悬而未决的重要生物学问题.

不久前, 秦燕等发现了核糖体移位过程中一个非常有趣的现象, 核糖体可以在 mRNA 上倒退, 即沿着 3'→5' 方向退一步, 他们同时发现了催化核糖体倒退的酶, 把它命名为核糖体延长因子 4 (elongation factor 4, EF4)^[71]. 最近, 利用 X 射线晶体衍射和荧光能量共振转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 等技术, 秦燕研究组解析了核糖体在翻译过程中移位的结构, 并深入研究了该过程的分子机制. 他们发现, 核糖体移位过程中

EF-G 与核糖体解码中心的作用是限速步骤, 直接决定移位的速度^[72]. 他们的研究结果表明, EF-G 的催化中心其实在核糖体的解码中心内, 核糖体之所以一步一停, 正是由于转运 RNA(transfer RNA, tRNA)与 mRNA 形成的密码子 - 反密码子双螺旋被核糖体的解码中心包裹住了, 而打开这个包裹, 正

是 EF-G 所完成的工作(图 18). 同时, 该研究还发现, EF-G 打开包裹后, 核糖体的小亚基要发生一个大的构象变化, 即头部的转动, 从而允许 tRNA 和 mRNA 穿过小亚基, 完成一个完整的脚步. 同时, 他们还研究了 EF4 催化核糖体倒退的机理, 找到了其中的秘密, 这个工作正在整理发表中.

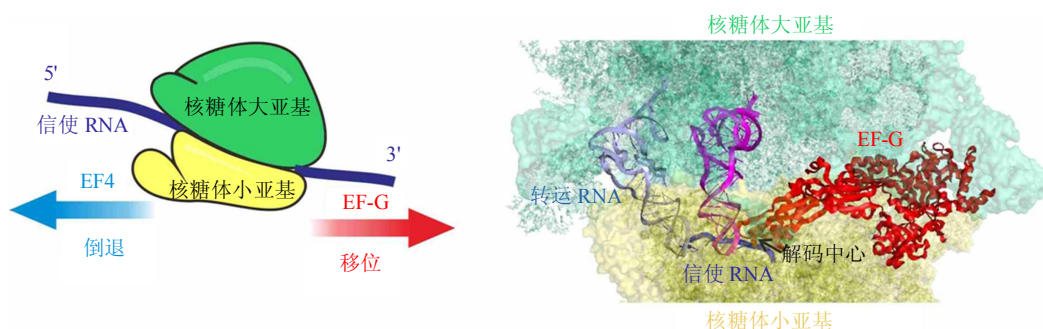


图 18 EF-G 和 EF4 催化核糖体在 mRNA 上移位结构模型和分子机理^[72]

核糖体不仅功能重要, 其对生物进化发展也具有重要的意义. 进化学中始终有一个悬而未决的核心问题: 物种开始分类前的最后一个共同的祖先, 也就是现在地球上所有生物的共同祖先(last universal common ancestor, LUCA), 到底是谁? 随着生命科学的进步, 越来越多的证据指向核糖体, 第一个拥有完整核糖体的生物, 即它的核糖体包含大小 2 个亚基、分别执行肽酰转移和解码功能, 可能就是 LUCA. 有趣的是, 秦燕组的研究显示, EF-G 和 EF4 是进化中同时出现的 2 个因子^[71], 它们在核糖体出现之日起, 就承担着推、拉核糖体的工作, 它们在 LUCA 中的贡献, 将是很有趣的待解之谜.

非编码 RNA 与 DNA 损伤应对

王艳丽 江 涛

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

核酸是构成生命最基本的物质, 可分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两类. DNA 是储存、复制和传递遗传信息的主要物质; RNA 则包括两类, 即作为蛋白质合成的模板 mRNA 和广泛存在的具有调控等功能的非编码 RNA.

近十几年来, 国内的多个科研单位均开展了核酸相关的结构生物学研究, 并取得了丰硕的研究成

果^[24,55,73-75]. 其中, 非编码 RNA 的调控机制和 DNA 损伤应对机制的研究也取得了重要成果.

非编码 RNA 调控机制

在人类转录组中, 只有 2%~3%是 mRNA, 其余都是不能编码蛋白质的非编码 RNA. 非编码 RNA 在基因的表达调控中具有重要的功能, 近年来, 我国科学家通过结构生物学的研究加深了人们对非编码 RNA 作用机理的理解.

RNA 干扰现象是由双链 RNA 诱发的、高效特异性降解同源 mRNA 的现象. 最近发现原核生物存在类似真核生物的 RNA 干扰现象. 王艳丽实验室报道了细菌的 Argonaute 与 DNA 向导链 - 靶 DNA 链的晶体结构, 揭示了 Argonaute 的作用机理^[76]. 最近又报道了原核生物中另一种 RNA 介导的获得性免疫机制, 即 CRISPR/Cas 系统中的 Cascade 复合物的晶体结构, 揭示了 crRNA 介导的识别外源核酸的作用机理^[77](图 19a).

H/ACA 和 C/D RNA 主要参与核糖体 RNA 的修饰和加工. 北京生命科学研究所叶克穷实验室解析了来源于古细菌和酵母的 H/ACA RNP 晶体结构, 并进行了生化分析^[78-81], 他们还解析了一个来源于古细菌的 C/D RNP 及其结合底物的晶体结构, 解释了 C/D RNA 如何引导底物进行特异位点修饰的分子机理^[82](图 19b).

在真核生物中, mRNA 与 tRNA 的加工成熟需

要经历一个非常复杂的剪切和拼接过程. 清华大学施一公实验室首次报道了 Lsm2-8 蛋白质复合物自组装的晶体结构及其特异识别 U6 小核 RNA 3' 端序列的分子机制^[83](图 19c). 生物物理所许瑞明实

验室以及中国科技大学的课题组也在 mRNA 的剪切成熟方面取得了重要成果^[84-85]. 上海生化所则对 tRNA 合成进行了深入细致的研究^[86].

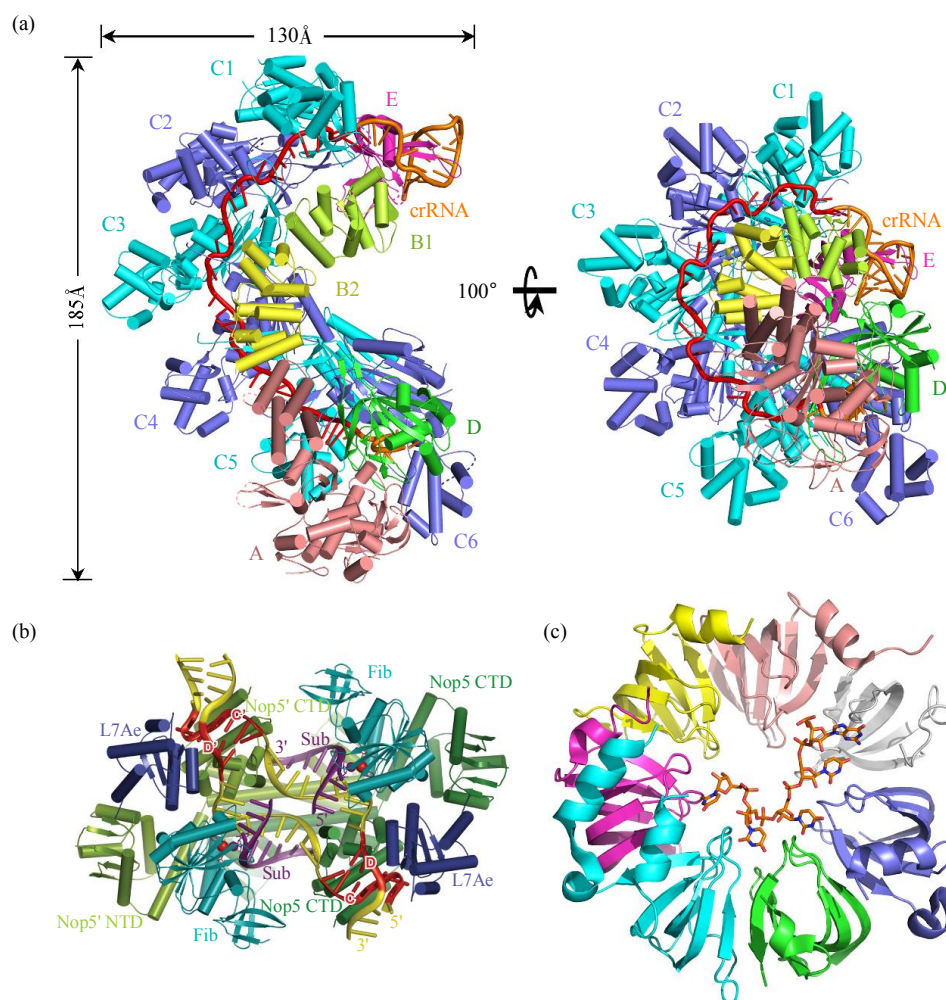


图 19 非编码 RNA 与蛋白质的复合物结构

(a) Cascade 复合物的晶体结构; (b) C/D RNP 结合底物的晶体结构; (c) Lsm2-8 复合物结构

DNA 损伤应对

生物体基因组受到损伤是导致癌症和其他一些恶性疾病的主要致病因素, 因而维持基因组的稳定性对于生命体非常重要. 基因组稳定性的维护是由一个庞大的蛋白质网络协同完成的. 近些年来, 国内针对 DNA 损伤应对开展了广泛而深入的结构生物学研究, 取得了众多的研究成果.

a. 各类重要的 DNA 单链损伤修复酶的结构. 生物物理所解析了 Hnt3^[87]、3'-5'ExoX^[88]、5'-3'-EXO^[89]等损伤修复剪切酶的结构, 揭示了它们对于不同损伤底物特异性要素的识别机制, 阐述了

其造成相关疾病的结构基础.

b. 双链断裂相关复合体的结构. 生物物理所和浙江大学分别解析了 RecOR 复合物^[90]以及 SOSS1 复合物^[91]的结构, 使得人们对于双链断裂这一最为严重的 DNA 损伤修复机制有了更加深入的认识.

c. 重要遗传疾病相关的大型修复复合物. 以 DNA 范可尼贫血症通路相关蛋白复合体为例, 该复合体由 FANCM、FAAP24 等十余个蛋白组成, 行使从感知到修复的系列功能. 2012 年, 中国科技大学、上海生化所和生物物理所分别完成了对

FANCM-MHF^[92]、FANCM-FAAP24^[93]复合物的结构研究, 以及对 FAAP24 与 DNA 相互作用^[94]的研究。

除了以上几个主要的研究方向, 国内众多科研单位还在 DNA 拓扑异构酶^[95]、端粒相关修复因子^[96]等相关领域取得了重要的研究成果。

在过去的几十年中, 我国核酸相关的结构生物学研究蓬勃发展, 随着单分子方法等多种前沿技术手段的发展, 现在国内该领域的结构生物学研究已经逐步深入到了一个研究对象大型化、复杂化和动态化的新阶段。

III 3 感染与免疫相关结构生物学研究

囊膜和非囊膜病毒结构生物学研究

李雪梅 王祥喜

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

病毒性传染病长期以来严重威胁着人类的健康, 也是影响社会稳定、经济发展和国家安全的重

大问题。病毒是结构最为简单的完整生命单位, 可以通过少量蛋白质完成完整生命活动, 因而也成为研究基础生物学问题的有力工具和理想对象。从分类角度, 病毒可分为有包膜病毒和无包膜病毒。饶子和研究组以重大传染性疾病病原体——囊膜病毒(SARS-CoV 冠状病毒、流感病毒、布尼亚病毒等)和非囊膜病毒(手足口病毒、甲型肝炎病毒等)为研究对象, 开展关键靶点蛋白质及全病毒颗粒的结构和功能研究, 取得一批重要的、具有国际影响力的原创性研究成果, 为病毒感染机制以及传染病的防治研究提供了极为重要的实验基础和理论依据。

囊膜病毒转录与复制机理的结构基础研究

重症急性呼吸综合症(SARS)爆发期间, 饶子和研究组率先解析出 SARS 冠状病毒的第一个蛋白质结构——主蛋白酶(nsp5)及其与抑制剂复合物的晶体结构。随后, 相继解析出了非结构蛋白 nsp7 和 nsp8 十六聚体超复合物等 30 多个 SARS-CoV 及其他冠状病毒蛋白质及复合体的晶体结构^[97-100], 为揭示冠状病毒的转录复制机制及抗病毒药物的研制奠定了关键的生物学基础(图 20)。该研究组是目前

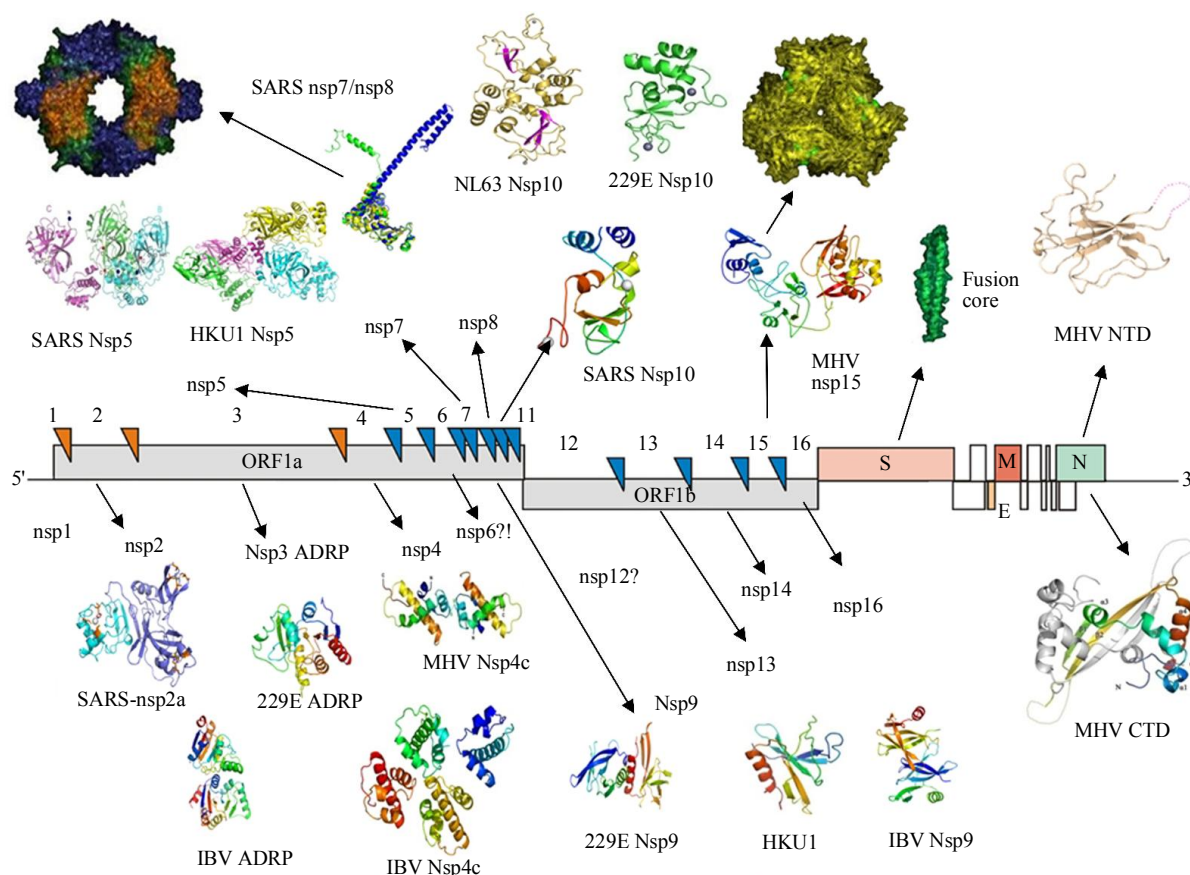


图 20 SARS 冠状病毒转录与复制机理的结构研究: nsp5 (PDB 代码 1UJ1); nsp10 (PDB 代码 2G9T), nsp15 (PDB 代码 2GTH); nsp7&nsp8 supercomplex (PDB 代码 2AHM) 等

国际上冠状病毒蛋白质结构与功能研究最为活跃的研究组之一。

流感病毒肆虐全球, 饶子和研究组与生物物理所刘迎芳研究组合作, 在国际上率先揭示了禽流感病毒(H5N1/Guangdong/1/96)聚合酶关键部分 PA 亚基 C 端结构域与 PB1 多肽复合体以及聚合酶功能部分 PA 亚基 N 端结构域的精细三维结构, 对揭示禽流感病毒聚合酶作用机制以及开展针对流感病毒药物设计工作具有十分重要的意义^[75,101]。

非囊膜病毒全颗粒的结构研究

手足口病和病毒性肝炎是我国新发病例数最多的传染病之一。

通过与中国药品生物制品检定院以及牛津大学等单位合作, 饶子和研究组解析了 EV71 成熟病毒和未成熟两种截然不同的全病毒颗粒的高分辨率晶体结构^[102](图 21), 此后又获得 CVA16 三种不同生命周期的全颗粒晶体, 并解析了小核糖核酸病毒科

第一个高分辨率的脱衣壳中间体结构(CVA16)的晶体结构^[103], 解析了 EV71 病毒颗粒与 6 种抑制剂分子的复合物晶体结构, 并根据复合物结构设计了 2 种新型高效抑制剂分子, 为抗手足口病有效药物的开发提供了重要的结构基础和研发方向^[104]。为阐述手足口病毒入侵宿主细胞的机制, 解析了手足口病毒共同受体 SCARB2 在中性和酸性两种条件下的晶体结构, 揭示了受体在不同环境下所经历的 pH 依赖的构象改变, 启动了病毒脱衣壳过程的发生机制^[105]。

2014 年, 基于手足口病毒一系列工作基础, 饶子和研究组解析了甲型肝炎病毒 HAV 成熟病毒和空心病毒的晶体结构(图 21)^[106], 甲型肝炎病毒具有多种独特的性质, 在小 RNA 病毒科中具有非常特殊的地位。甲型肝炎病毒结构的解析在小 RNA 病毒研究领域中具有里程碑的意义。

这一系列工作进一步巩固了我国病毒结构生物学在国际上的重要地位。

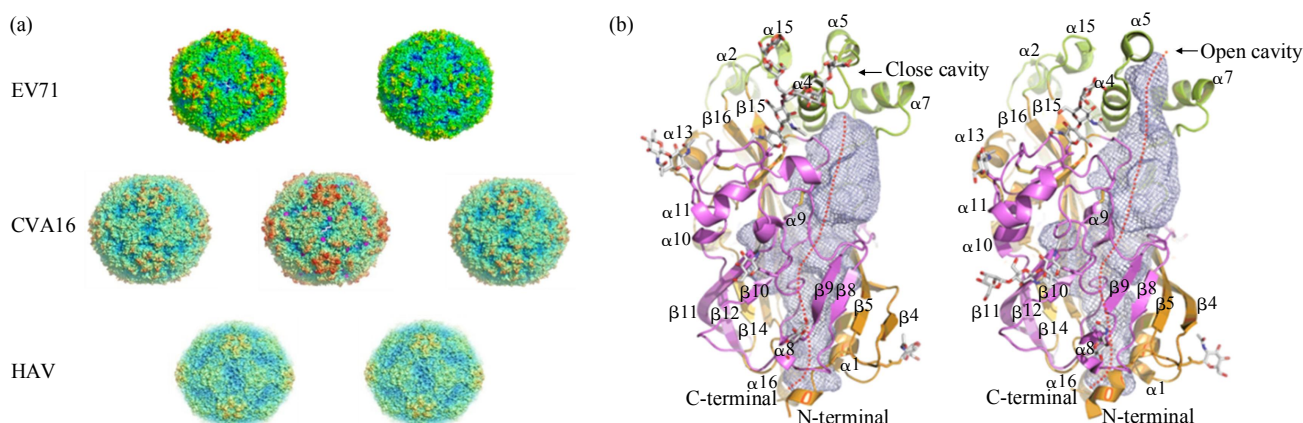


图 21 手足口病毒、甲肝病毒全病毒颗粒的晶体结构

(a) EV71 成熟病毒颗粒(左)(PDB 代码 3VBH); EV71 空心病毒颗粒(右)(PDB 代码 3VBO); CVA16 脱衣壳中间体颗粒(中)(PDB 代码 4JGY); HAV 成熟病毒颗粒(左)(PDB 代码 4QPI); HAV 空心病毒颗粒(右)(PDB 代码 4QPG)。 (b) 手足口病毒功能性受体 SCARB2 在中性(左)(PDB 代码 4TVZ)和酸性(右)(PDB 代码 4TW0)环境下的晶体结构。

流感病毒结构生物学

高 福 施 一

(中国科学院北京生命科学研究所, 北京 100101)

结构生物学致力于研究生命系统中的大分子及其复合物的三维原子结构细节, 它所提供的结构信息给生物学带来了巨大革命, 给相应的生物学功能提供了原子水平的分子机理和更加深入可靠的认识, 让人们戴上了一副“特殊眼镜”来看到生命过

程。1953 年 DNA 双螺旋原子模型是其标志性成果, 其深远影响直到今天仍在继续。通观结构生物学的发展历程, 也是众多科学领域交叉融合、科学家精诚合作的成功典范, 物理学、化学、生物学、医学、计算机科学及其他学科的相互交叉渗透与合作成就了今天的结构生物学, 使其不仅停留在学术活动层面, 而且已经成为药物研究及生物技术领域的重要基础。

近年来, 中国结构生物学领域蓬勃发展, 在多个生命科学分支都有精彩工作呈现, 在流感病毒研

究领域,更是走在世界前沿。

流感病毒跨种间传播机制研究是流感疫情科学预判和科学防控的理论基础。高福研究组利用结构生物学技术和生物物理技术等手段对 H1N1、H5N1、H7N9、H10N8、H13N6 和 H16N3 等流感病毒的受体结合特性进行了系统研究,在跨种间传播分子机制研究领域获得重大突破性进展。在国际上,率先阐明了 H7N9 禽流感病毒能够感染人是由于获得人源受体结合能力及其结构基础^[107];揭示了 HA 蛋白上的几个突变使高致病性 H5N1 禽流感病毒获得空气传播能力的分子机制^[108]。概括地说,禽流感病毒受体结合特性为禽源受体偏好性,而人流感病毒为人源受体偏好性;禽流感病毒要突破种间屏障感染人必须发生受体结合偏好性转变或者至少获得人源受体结合能力,这种偏好性转变是由病毒表面血凝素蛋白(HA)受体结合位点的关键氨基酸决定,其关键氨基酸在不同亚型之间存在差异,这一概念的阐明对于流感病毒的防控具有重要理论价值(图 22)。高福研究组长期以来也从事流感病毒表面神经氨酸酶(NA)抑制剂对抗流感病毒感染的分子基础研究,为 NA 抑制剂的开发设计提供了必要的理论指导^[109-113]。

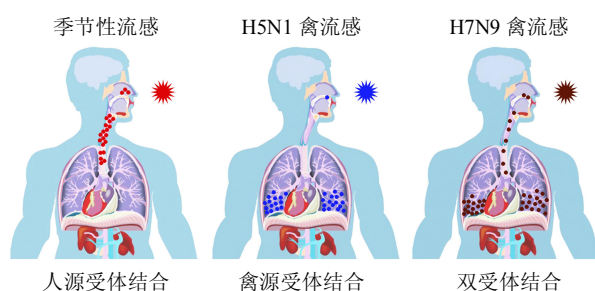


图 22 不同类型流感病毒的受体结合特性

此外,中国科学院广州生物医药与健康研究院刘劲松在国外工作期间解析了流感病毒 NS1 蛋白 RNA 结合域的高精度三维晶体结构,回国后也在继续相关工作^[114]。

新的流感病毒蛋白陆续被发现(如 PA-X 等^[115]),并且部分已知流感病毒蛋白的高精度三维结构信息缺乏(如完整聚合酶复合物(PA/PB1/PB2)和全长 NS2 蛋白等),流感病毒的结构生物学研究将要在未来几年面临新的挑战,期待越来越多的中国结构生物学家能够加盟该领域。

结构免疫学领域的代表性成果

刘迎芳

(中国科学院生物物理研究所,北京 100101)

近些年来结构免疫学发展迅猛,国内在该方向的研究主要集中在天然免疫领域。天然免疫系统可以在病原入侵的第一时间发挥抗感染作用。宿主细胞通过模式识别受体(pattern-recognition receptor, PRR)识别病原体的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP),激活下游调控通路,进而激活 I 型干扰素、炎症因子和众多细胞因子的表达,形成天然免疫反应,并激活获得性免疫。近些年来,我国的结构免疫学研究人员在该领域取得了全面的研究进展。

常见的 PAMP 包括细菌表面多糖、病毒包膜磷脂和核酸等,已发现的模式识别受体主要有 TLR、RLR、NLR 和 DNA 受体等。柴继杰课题组及其合作者解析了拟南芥 PRR 蛋白 AtCERK1 与几丁质的晶体结构^[116],以及 FLS2 和 BAK1 与细菌鞭毛蛋白保守基序 flg22 的三元复合物晶体结构,从而揭示了这些 PRR 被 PAMP 识别并激活的分子机制^[117];该研究组还解析了小鼠 NOD 样受体 NLRC4 在 ADP 存在状态下的单体结构,通过分析其各个结构域之间的相互作用关系(图 23a),阐明了这一蛋白的自抑制机制^[118];刘志杰课题组报道了 AIM2 和 p202 与双链 DNA 的晶体结构,提出 p202 抑制 AIM2 介导的炎症小体信号通路的分子

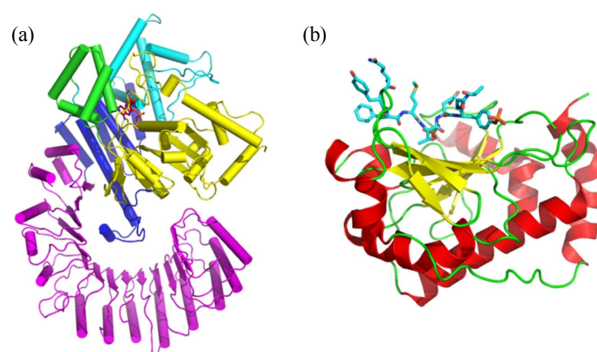


图 23 小鼠 NLRC4 在 ADP 介导下的自抑制构象(a)^[118]和沙门氏菌磷酸丝氨酸裂解酶 SpvC 与其底物 MAPK 多肽的复合体结构(b)^[130]

(a) PDB 代码 2Q8Y. 其中 ADP 用红色显示; NLRC4 的 NBD、HD1、WHD、HD2 和 LRR 结构域分别用黄色、绿色、青色、蓝色和紫色表示。(b) PDB 代码 4KXF. 图中红色、黄色和绿色表示 SpvC 的螺旋、折叠和 loop 结构; MAPK 多肽用青色表示。

机制^[119]. Plus sterols stanols esters RLR 被胞内 RNA 激活后, 通过 MAVS/IPS-1/Cardif/VISA 信号通路激活 NF- κ B、IRF3/7 的转录. 刘迎芳课题组与程根宏研究组合作研究了其中重要接头蛋白 TRAF3 的结构, 并研究了其底物识别特异性的分子机制^[120]. 同样, 双链 DNA 也会被相应受体识别, 激活 STING/MITA 信号通路, 从而促进 I 型干扰素分泌. 刘志杰、苏晓东等研究组的研究人员解析了 STING 蛋白羧基端结构域与 c-di-GMP 的复合物晶体结构, 阐明了 STING 形成活性二聚体的机制^[121-122]. 上述工作为理解天然免疫信号通路的调控机制打下了基础.

天然免疫信号分子如干扰素等, 可以激活数以千计的炎症因子、细胞因子的表达, 从而对细胞活动进行全方位的调控. 王新泉课题组报道了炎症因子 IL-1 β 与其受体 IL-1RII 和 IL-1RAcP 所组成的三元复合物的晶体结构^[123]; 随后, 他们又报道了 IL-33 与其受体的晶体结构^[124]. 该项工作揭示白介素结合并激活其受体的结构机理; 天津大学于晓芳与其合作者报道了抗 HIV 蛋白 SAMHD1 与 dGTP/dATP 的复合物晶体结构, 由此揭示了 dGTP 依赖性四聚体 SAMHD1 作为脱氧核苷三磷酸酶 (dNTPase) 的活化机制^[125]; 刘迎芳及其合作者、杨茂军等课题组陆续报道了 ZAP、ISG54、ISG58、TRIM 等干扰素诱导蛋白的结构和抗病毒机制^[126-129]. 在长期的进化过程中, 宿主发展出强大的免疫系统对病毒进行绞杀, 同时病毒也发展出各式各样的武器对天然免疫系统发起攻击. 我国的结构生物学家就此开展了一系列研究. 例如, 邵峰、王大成等合作揭示了沙门氏菌磷酸丝氨酸裂解酶 SpvC 可以作为与其底物 MAPK 的多肽的复合体结构(图 23b), 揭示了这一蛋白通过去除 MAPK 的磷酸化, 从而使其失活的机制^[130]; 柴继杰等报道了

细菌效应蛋白 AvrPto 和植物中对应的抗性蛋白 Pto 的复合物晶体结构, 基于该结构和相关实验结果, 提出了 AvrPto 通过解除 Pto 对防御响应的抑制引发疾病抗性的机制^[131]. 篇幅所限, 以上所述还未完全涵盖国内结构免疫学方面的所有成果.

病原菌效应蛋白与宿主相互作用的结构生物学研究

邵 峰

(北京生命科学研究所, 北京 102206)

通过分泌效应蛋白阻断或调节宿主免疫防御相关通路是革兰氏阴性病原菌普遍采用的毒力机制. 寻找效应蛋白的宿主靶蛋白并阐明其作用的结构机理对于理解病原菌致病和建立有效防治手段有重要意义. 以北京生命科学研究所邵峰课题组为主的一系列系统研究填补了我国在该方面的空白, 在国际上产生广泛影响.

志贺氏痢疾杆菌的 OspF 及其家族效应蛋白具有全新的磷酸化苏氨酸裂合酶活性, 通过消去反应不可逆地“去磷酸化”MAPK 中的磷酸化苏氨酸, 导致激酶永久失活和宿主炎症通路的阻断^[132-133]. 邵峰课题组在上述前期工作基础上继续测定了酶和磷酸化多肽底物复合物的晶体结构, 揭示这类酶具有全新的折叠模式(图 24a), 其对 MAPK 的识别是模拟了宿主的作用方式, 同时也揭示 p38 是 OspF 在感染中的首选靶点. 基于结构的酶学分析展示该酶是利用一个赖氨酸作为碱来起始催化和一个组氨酸作为酸来稳定反应过渡态并实现磷酸基团离去, 拓宽了对酶和酶催化机制的认识, 为设计抗感染小分子提供了结构基础^[130].

泛素通路也是效应蛋白的重要潜在作用靶点. 肠致病大肠杆菌的 Cif 效应蛋白能够阻断宿主细胞

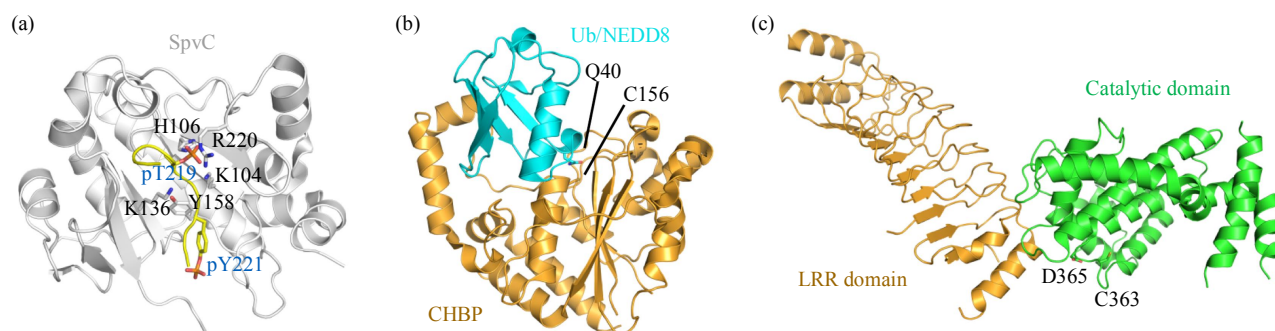


图 24 病原菌效应蛋白作用于 MAPK 和泛素通路的结构基础

(a) SpvC 磷酸化苏氨酸裂合酶与多肽底物复合物结构(PDB 代码: 2Q8Y). (b) CHBP 与泛素 /NEDD8 复合物结构(PDB 代码: 4HCN and 4HCP). (c) IpaH 泛素连接酶结构(PDB 代码: 3CVR).

周期. 类鼻疽菌的 CHBP 与 Cif 同源, 其晶体结构显示这类效应蛋白具有木瓜蛋白酶样的折叠模式和催化活性^[134]. Cif 和 CHBP 通过特异性识别泛素和类泛素蛋白 NEDD8 使其发生脱氨化修饰而抑制宿主泛素化通路, 这是首次发现效应蛋白直接作用于泛素蛋白^[135]. CHBP 与泛素及 NEDD8 复合物结构解析揭示了其识别泛素/NEDD8、实现位点特异性脱氨修饰的结构基础^[136](图 24b), 为泛素化研究提供了一个新的视角和研究工具. 另外, 邵峰课题组通过解析晶体结构发现痢疾杆菌效应蛋白 IpaH 定义了一大类在病原菌中保守的新型泛素连接酶, 其折叠方式和已知的两类泛素连接酶不同^[137](图 24c). 基于结构的分析发现 IpaH 催化区域中一个天冬氨酸的突变能使 IpaH 变成硫酯键水解酶, 提示这类泛素连接酶可能起源于细菌的硫酯键水解酶.

调节 Rab 家族小 G 蛋白是胞内菌阻断或利用宿主膜泡运输的有效手段. 肺炎军团菌在感染早期

通过激活 Rab1 来招募内质网来源的膜泡, 在其自身膜泡成熟后则需要失活 Rab1, 分别由 SidM 和 LepB 所实现. SidM 以及 SidM/Rab1 复合物的结构解析(图 25a)揭示了 SidM 同时具有 guanine nucleotide exchange factor 和 GDI displacement factor 两个活性的结构机制^[138]. LepB 及其与 Rab1 复合物结构则显示 LepB 具有全新的 GAP (GTPase-activating protein) 折叠模式(图 25b), 其催化 Rab1 GTP 水解是模拟了 RasGAP 的作用机制^[139]. 痢疾杆菌的 VirA 效应蛋白对其在宿主细胞内存活必不可少, 该功能可被肠致病大肠杆菌的 EspG 所替换. VirA 和 EspG 也具有 RabGAP 活性^[140]. 与 Rab1 的复合物的晶体结构显示 VirA 家族也具有独特的折叠模式(图 25c), 它们模拟宿主 TBC-GAP 的“催化双指”机制失活 Rab1, 分别实现痢疾杆菌对自噬通路和肠致病大肠杆菌对炎症因子分泌的阻断^[140]. 该研究解决了在这两种致病菌研究中遗留了多年的一个难题.

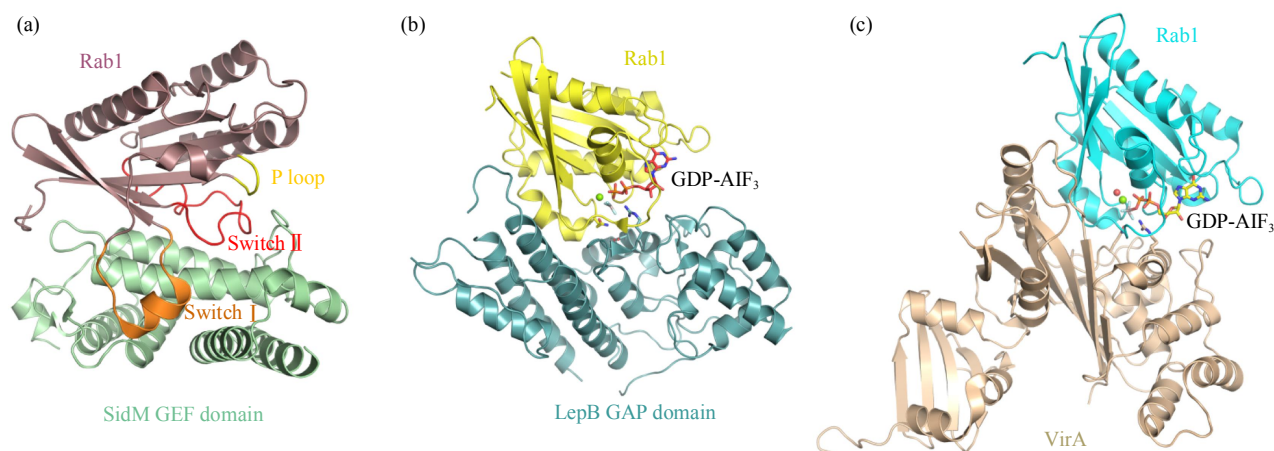


图 25 病原菌效应蛋白调节 Rab1 小 G 蛋白的结构基础

(a) SidM 与 Rab1 复合物结构及激活 Rab1 的机制(PDB 代码: 3L0I). (b) LepBGAP 结构域-Rab1-GDP-AIF₃ 复合物结构及失活 Rab1 的机制(PDB 代码: 4JVS). (c) VirA-Rab1-GDP-AIF₃ 复合物结构及失活 Rab1 的机制(PDB 代码: 4FMB).

结构生物学使我们对病原菌和宿主相互作用的理解深入到了原子水平, 也给我们认识更多新的生化机制和宿主本身的生化过程提供了诸多难得的机会^[141]. 鉴于很多效应蛋白只在结构或是关键的催化结构上模拟宿主活性, 结构生物学也逐渐成为病原菌和宿主相互作用研究中具有引领作用的研究手段.

药物靶标蛋白质的结构生物学研究

吴蓓丽

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

随着结构生物学研究方法与技术的精进及其对生命活动研究层次的不断深入和拓展, 与疾病和医药相关的结构生物学研究已经成为生物医药研究的一个重要领域. 近年来, 中国科学院上海药物研究

所(下称上海药物所)针对与人体重大疾病相关的药物靶标蛋白质结构生物学研究, 及以此为基础的功能研究和新配体发现, 取得了一系列重要研究成果, 为深入理解相关疾病发生、发展的分子机制和探索新的疾病治疗手段, 打下了坚实的基础。

GPCR 结构生物学研究

G 蛋白偶联受体(GPCR)是人体内最大的受体蛋白家族, 是重要的药物靶标, 约 50%上市药物以 GPCR 为靶点。上海药物所徐华强、赵强、吴蓓丽等研究组成功建立了具有国际先进水平的 GPCR 结构生物学技术平台, 近 3 年内测定了 5- 羟色胺受体、胰高血糖素受体、趋化因子受体和嘌呤能受体等多个重要 GPCR 受体的晶体结构(图 26), 实现了我国 GPCR 晶体结构测定零的突破。其中, 5- 羟色胺受体 5-HT_{1B} 和 5-HT_{2B} 的晶体结构阐明了 5- 羟色胺受体 - 配体结合和特异性

信号传导机制, 为靶向该类受体的药物研发奠定了重要的结构生物学基础^[142-143]。胰高血糖素受体 GCGR 跨膜结构域的晶体结构是 B 类 GPCR 研究领域的突破性进展, 为研究胰高血糖素在 2 型糖尿病等疾病的病理生理机制中发挥的重要作用提供了新的线索^[144]。趋化因子受体 CCR5 与抗艾滋病病毒药物马拉维若的复合物晶体结构, 第一次阐明了马拉维若在抗病毒过程中的变构调节机制, 为研发高特异性的新型变构调节药物铺平了道路^[54](图 27)。嘌呤能受体 P2Y₁₂R 分别与激动剂和拮抗剂结合的复合物晶体结构揭示了这种受体分子与不同种类药物分子的相互作用机制, 将极大地推动新型抗血栓药物的研发^[52-53]。上述研究成果分别发表在《自然》(*Nature*)和《科学》(*Science*)上, 在国际学术界和医药界产生了广泛的影响, 被认为是抗偏头痛、糖尿病、艾滋病和心血管疾病药物研发的里程碑。

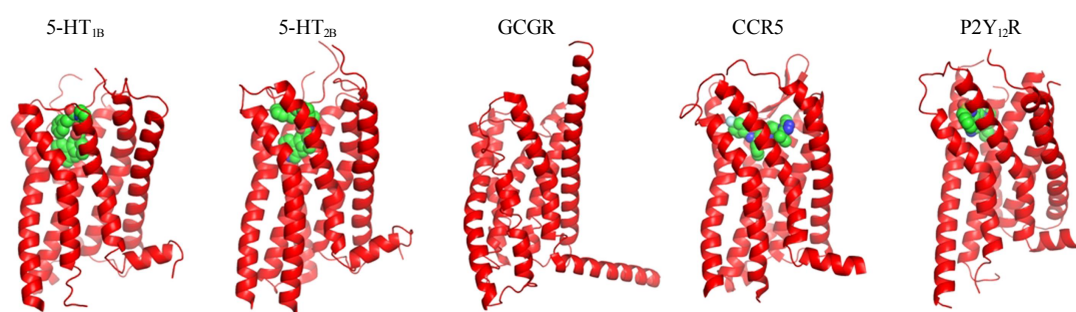


图 26 解析的 GPCR 晶体结构

从左向右依次为 5- 羟色胺受体 5HT_{1B}、5HT_{2B}、胰高血糖素受体 GCGR、趋化因子受体 CCR5 和嘌呤能受体 P2Y₁₂R。

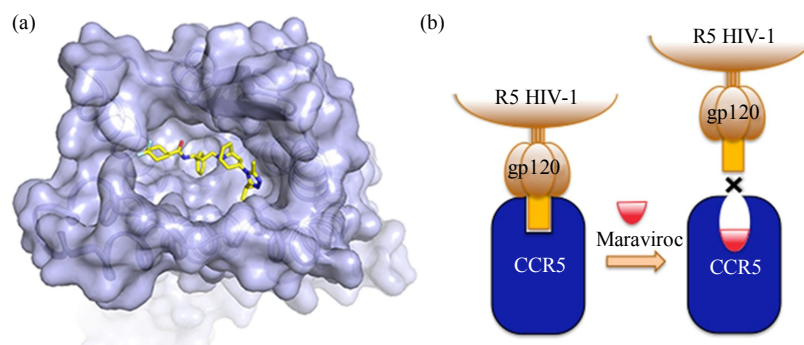


图 27 趋化因子受体 CCR5 与抗艾滋病病毒药物马拉维若的复合物晶体结构

(a) CCR5 的配体结合口袋。CCR5 以蓝色螺旋和表面表示, 配体马拉维若用黄色棍棒表示。(b) 马拉维若(Maraviroc)的变构调节机制。R5 HIV-1 是以 CCR5 为共受体的艾滋病病毒; gp120 为艾滋病病毒表面的一种糖蛋白, 可与 CCR5 相互作用。马拉维若的结合位点不同于病毒的主要结合位点, 该药物分子通过将 CCR5 的构象稳定在非活性状态的间接机制抑制 CCR5 与病毒的结合。

基于三维结构的新药物靶标确证

上海药物所杨财广研究组在基于新策略的抗菌新靶标确证研究中充分运用结构生物学技术, 例

如: 表皮葡萄球菌 AbfR 蛋白的晶体结构结合质谱鉴定分析阐明了转录调控蛋白通过活性 Cys 氧化修饰感应信号转导的分子机制^[145]; 绿脓杆菌 MexR

蛋白氧化态的晶体结构明确阐明了 MexR 感应氧化胁迫、启动抗生素外排泵的分子机理^[146](图 28)。此外,首次解析了具有新构象的金黄色葡萄球菌 ClpP 水解酶的晶体结构,揭示了致病力调控蛋白

质 ClpP 识别底物蛋白质的功能与机制^[147]。这些结果为旨在调控细菌致病性新策略下,促进有别于传统抗生素作用机制的抗菌感染新类型药物研究奠定了基础。

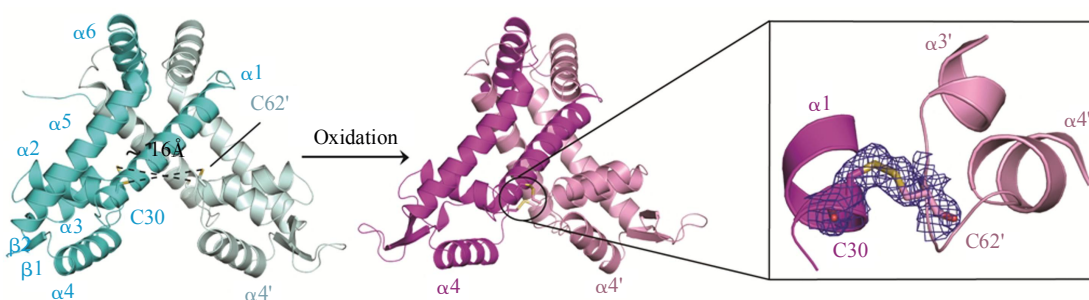


图 28 绿脓杆菌外排泵转录调控因子 MexR 感应氧化生成分子间的二硫键

由上海药物研究所杨财广研究员提供。

基于结构生物学的药物研发

在基于结构生物学的药物研发方面,上海药物所已取得了较大的进展。李扬研究组建立了完善的离子通道结构生物学研究技术平台,针对一系列与重大疾病相关的离子通道(如 KCNQ2、KCNQ4 等)开展结构生物学研究。根据已知的离子通道三维结构(如 MthK 钾通道, TtMscS 阴离子通道),进行结构与功能研究,基于计算机配体虚拟筛选,寻找药效团并进行定量构效分析^[43,148]。许叶春研究组针对阿尔茨海默症、肿瘤以及肺动脉高压等疾病相关的多个药物靶标开展基于结构的药物设计。解析多个活性化合物与靶标结合的复合物晶体结构,发现有利于化合物结合的靶标蛋白质的功能构象,基于此设计得到活性提高的新化合物,再次解析新化合物与靶标蛋白质的复合物晶体结构,阐明构效关系。通过该过程的循环并结合热力学、动力学行为研究以及计算机辅助药物分子设计方法,快速发现先导化合物甚至候选药物^[149-151]。

上列与药物靶标相关的结构生物学研究成果,对于深入了解重要药物靶标蛋白在疾病发生过程中发挥作用的分子机制,以及大幅度提高以蛋白质为靶点的药物研发的效率,具有重要的理论和应用意义。

参考文献

- [1] 北京胰岛素结构研究组. 2.5 埃分辨率胰岛素晶体结构研究. 中国科学, 1972, **15**: 3-20
The Peking Insulin Structure Research Group. Sci Sin, 1972, **15**: 3-20
- [2] 北京胰岛素结构研究组. 胰岛素晶体结构研究——1.8 埃分辨率电子密度图的计算. 中国科学, 1973, **16**: 93-95
The Peking Insulin Structure Research Group. Sci Sin, 1973,

- 16**: 93-95
- [3] The Peking Insulin Structure Research Group. Studies on the insulin crystal structure: The molecule at 1.8 Å resolution. Sci Sin, 1974, **17**: 752-777
- [4] Hodgkin D C. Visit to Peking: Standards there as high as achieved elsewhere. Crystal, 1972, **2**: 1-3
- [5] Hodgkin D C. Chinese work on insulin, Nature, 1975, **255**: 103
- [6] Liu Z, Yan H, Wang K, *et al.* Crystal structure of spinach major harvesting light complex at 2.72 Å resolution. Nature, 2004, **428**(6980): 287-292
- [7] Sun F, Huo X, Zhai Y, *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. Cell, 2005, **121** (7): 1043-1057
- [8] Zhang X, Jin L, Fang Q, *et al.* 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. Cell, 2010, **141**(3):472-482
- [9] Amunts A, Brown A, Bai X C, *et al.* Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. Science, 2014, **343**(6178): 1485-1489
- [10] Liao M, Cao E, Julius D, *et al.* Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature, 2013, **504**(7478): 107-112
- [11] Shi D, Nannenga B L, Iadanza M G, *et al.* Three-dimensional electron crystallography of protein microcrystals. Elife, 2013, **2**: e01345
- [12] Wang H W, Chen Y, Yang H, *et al.* Ring-like pore structures of SecA: implication for bacterial protein-conducting channels. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(7): 4221-4226
- [13] Wu Y, He Y, Bai J, *et al.* Visualization of synaptotagmin I oligomers assembled onto lipid monolayers. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(4): 2082-2087
- [14] Jiang J, Zhang X, Chen Y, *et al.* Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(33): 11939-11944
- [15] Shen Q T, Bai X C, Chang L F, *et al.* Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(12): 4858-4863
- [16] Guu T S, Liu Z, Ye Q, *et al.* Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(31): 12992-12997
- [17] Lu P, Bai X C, Ma D, *et al.* Three-dimensional structure of human γ-secretase. Nature, 2014, **512**(7513): 166-170
- [18] Chang L F, Chen S, Liu C C, *et al.* Structural characterization of full-length NSF and 20S particles. Nat Struct Mol Biol, 2012, **19**(3): 268-275
- [19] Taylor D W, Ma E, Shigematsu H, *et al.* Substrate-specific

- structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(6): 662–670
- [20] Liu J J, Bratkowski M A, Liu X, *et al*. Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by EM. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(1): 95–102
- [21] Guo Q, Yuan Y, Xu Y, *et al*. Structural basis for the function of a small GTPase RsgA on the 30S ribosomal subunit maturation revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(32): 13100–13105
- [22] Feng B, Mandava C S, Guo Q, *et al*. Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol*, 2014, **12**(5): e1001866
- [23] Wang X, Sun Q, Ding Z, *et al*. Redefining the modular organization of the core Mediator complex. *Cell Res*, 2014, **24**(7): 796–808
- [24] Song F, Chen P, Sun D, *et al*. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science*, 2014, **344**(6182): 376–380
- [25] Huo Y, Hu Z, Zhang K, *et al*. Crystal structure of group II chaperonin in the open state. *Structure*, 2010, **18**(10): 1270–1279
- [26] Wang X, Xu F, Liu J, *et al*. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog*, 2013, **9**(1): e1003132
- [27] Cheng L, Sun J, Zhang K, *et al*. Atomic model of a cypovirus built from cryo-EM structure provides insight into the mechanism of mRNA capping. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(4): 1373–1378
- [28] Yang C, Ji G, Liu H, *et al*. Cryo-EM structure of a transcribing cypovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(16): 6118–6123
- [29] Zhang P, Wang J, Shi Y. Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature*, 2010, **468**(7324): 717–720
- [30] Wang T, Fu G, Pan X, *et al*. Structure of a bacterial energy-coupling factor transporter. *Nature*, 2013, **497**(7448): 272–276
- [31] Xu K, Zhang M, Zhao Q, *et al*. Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*. *Nature*, 2013, **497**(7448): 268–271
- [32] Yu Y, Zhou M, Kirsch F, *et al*. Planar substrate-binding site dictates the specificity of ECF-type nickel/cobalt transporters. *Cell Res*, 2014, **24**(3): 267–277
- [33] Gao X, Lu F, Zhou L, *et al*. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science*, 2009, **324**(5934): 1565–1568
- [34] Gao X, Zhou L, Jiao X, *et al*. Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature*, 2010, **463**(7282): 828–832
- [35] Ma D, Lu P, Yan C, *et al*. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature*, 2012, **483**(7391): 632–636
- [36] Dang S, Sun L, Huang Y, *et al*. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature*, 2010, **467**(7316): 734–738
- [37] Sun L, Zeng X, Yan C, *et al*. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature*, 2012, **490**(7420): 361–366
- [38] Deng D, Xu C, Sun P, *et al*. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*, 2014, **510**(7503): 121–125
- [39] 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**(36): 14664–14669
- [40] Lu F, Li S, Jiang Y, *et al*. Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, 2011, **472**(7342): 243–246
- [41] Wang Y, Huang Y, Wang J, *et al*. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 2009, **462**(7272): 467–472
- [42] Zhang X, Ren W, DeCaen P, *et al*. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature*, 2012, **486**(7401): 130–134
- [43] Zhang X, Wang J, Feng Y, *et al*. Structure and molecular mechanism of an anion-selective mechanosensitive channel of small conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(44): 18180–18185
- [44] Li X, Dang S, Yan C, *et al*. Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature*, 2013, **493**(7430): 56–61
- [45] Pan X, Li M, Wan T, *et al*. Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, **18**(3): 309–315
- [46] Tang L, Bai L, Wang W H, *et al*. Crystal structure of the carnitine transporter and insights into the antiport mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(4): 492–496
- [47] Zhao Y, Mao G, Liu M, *et al*. Crystal Structure of the *E. coli* Peptide Transporter YbgH. *Structure*, 2014, **22**(8): 1–9
- [48] Zhai Y, Zhang K, Huo Y, *et al*. Autotransporter passenger domain secretion requires a hydrophobic cavity at the extracellular entrance of the beta-domain pore. *Biochem J*, 2011, **435**(3): 577–587
- [49] Fan J, Jiang D, Zhao Y, *et al*. Crystal structure of lipid phosphatase *Escherichia coli* phosphatidylglycerophosphate phosphatase B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(21): 7636–7640
- [50] Liu X, Yin Y, Wu J, *et al*. Structure and mechanism of an intramembrane liponucleotide synthetase central for phospholipid biosynthesis. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4244
- [51] Qiao S, Luo Q, Zhao Y, *et al*. Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature*, 2014, **511**(7507): 108–111
- [52] Zhang J, Zhang K, Gao Z G, *et al*. Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature*, 2014, **509**(7498): 119–122
- [53] Zhang K, Zhang J, Gao Z G, *et al*. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*, 2014, **509**(7498): 115–118
- [54] Tan Q, Zhu Y, Li J, *et al*. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*, 2013, **341**(6152): 1387–1390
- [55] Hu H, Lin Y, Wang M, *et al*. Structure of a CENP-A-histone H4 heterodimer in complex with chaperone HJURP. *Genes & Development*, 2011, **25**(9): 901–906
- [56] Liu C P, Xiong C, Wang M, *et al*. Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(12): 1287–1292
- [57] Mao Z, Pan L, Wang W, *et al*. Anp32e, a higher eukaryotic histone chaperone directs preferential recognition for H2A.Z. *Cell Res*, 2014, **24**(4): 389–399
- [58] Sun L T, Wang M, Lv Z, *et al*. Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(51): 20538–20543
- [59] Qiao Q, Li Y, Chen Z, *et al*. The structure of NSD1 reveals an autoregulatory mechanism underlying histone H3K36 methylation. *J Biol Chem*, 2011, **286**(10): 8361–8368
- [60] Min J R, Landry J, Sternglanz R, *et al*. Crystal structure of a SIR2 homologue-NAD complex. *Cell*, 2001, **105**(2): 269–279
- [61] Hsu H C, Wang C L, Wang M, *et al*. Structural basis for allosteric stimulation of Sir2 activity by Sir4 binding. *Genes & Development*, 2013, **27**(1): 64–73
- [62] Zhou T, Xiong J, Wang M, *et al*. Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Mol Cell*, 2014, **54**(5): 879–886
- [63] Liu H, Wang J Y, Huang Y, *et al*. Structural basis for methylarginine-dependent recognition of Auberger by Tudor. *Genes & Development*, 2010, **24**(17): 1876–1881
- [64] Ren R, Liu H, Wang W, *et al*. Structure and domain organization of *Drosophila* Tudor. *Cell Res*, 2014, **24**(9): 1146–1149
- [65] Yang N, Wang W, Wang Y, *et al*. Distinct mode of methylated lysine-4 of histone H3 recognition by tandem tudor-like domains of Spindlin1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(44): 17954–17959
- [66] Yang D, Fang Q, Wang M, *et al*. Nalpha-acetylated Sir3 stabilizes the conformation of a nucleosome-binding loop in the BAH domain. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(9): 1116–1118
- [67] Huang J, Brown A F, Wn J, *et al*. Structural basis for protein-RNA recognition in telomerase. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(6): 507–512
- [68] Luger K, Mader A W, Richmond R K, *et al*. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997, **389**(6648): 251–260
- [69] Makde R D, England J R, Yennawar H P, *et al*. Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature*, 2010, **467**(7315): 562–566
- [70] Armache K J, Garlick J D, Canzio D, *et al*. Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 2011, **334**(6058): 977–982
- [71] Qin Y, Polacek N, Vesper O, *et al*. The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. *Cell*, 2006, **127**(4): 721–733

- [72] Liu G, Song G, Zhang D, *et al.* EF-G catalyzes tRNA translocation by disrupting interactions between decoding center and codon-anticodon duplex. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(9): 817–824
- [73] Hu L, Li Z, Cheng J, *et al.* Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell*, 2013, **155**(7): 1545–1555
- [74] Deng D, Yan C, Pan X, *et al.* Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, **335**(6069): 720–723
- [75] Yuan P, Bartlam M, Lou Z, *et al.* Crystal structure of an avian influenza polymerase PA (N) reveals an endonuclease active site. *Nature*, 2009, **458**(7240): 909–913
- [76] Sheng G, Zhao H, Wang J, *et al.* Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**: 652–657
- [77] Zhao H, Sheng G, Wang J, *et al.* Crystal structure of the RNA-guided immune surveillance Cascade complex in *Escherichia coli*. *Nature*, 2014 [Epub ahead of print] (DOI: 10.1038/nature13733)
- [78] Li L, Ye K. Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. *Nature*, 2006, **443**(7109): 302–307
- [79] Duan J, Li L, Lu J, *et al.* Structural mechanism of substrate RNA recruitment in H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase. *Mol Cell*, 2009, **34**(4): 427–439
- [80] Li S, Duan J, Li D, *et al.* Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase. *Genes Dev*, 2011, **25**(22): 2409–2421
- [81] Li S, Duan J, Li D, *et al.* Structure of the Shq1-Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications for H/ACA RNP biogenesis and dyskeratosis congenita. *EMBO J*, 2011, **30**(24): 5010–5020
- [82] Lin J, Lai S, Jia R, *et al.* Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. *Nature*, 2011, **469**(7331): 559–563
- [83] Zhou L, Hang J, Zhou Y, *et al.* Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA. *Nature*, 2014, **506**(7486): 116–120
- [84] Lin P C, Xu R M. Structure and assembly of the SF3a splicing factor complex of U2 snRNP. *EMBO J*, 2012, **31**(6): 1579–1590
- [85] Li H, Tong S, Li X, *et al.* Structural basis of pre-mRNA recognition by the human cleavage factor Im complex. *Cell Res*, 2011, **21**(7): 1039–1051
- [86] Zhou M, Dong X, Shen N, *et al.* Crystal structures of *Saccharomyces cerevisiae* tryptophanyl-tRNA synthetase: new insights into the mechanism of tryptophan activation and implications for anti-fungal drug design. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(10): 3399–3413
- [87] Gong Y, Zhu D, Ding J, *et al.* Crystal structures of aprataxin ortholog Hnt3 reveal the mechanism for reversal of 5'-adenylated DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, **18**(11): 1297–1299
- [88] Wang T, Sun H L, Cheng F, *et al.* Recognition and processing of double-stranded DNA by ExoX, a distributive 3'-5' exonuclease. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(15): 7556–7565
- [89] Yang W, Chen W Y, Wang H, *et al.* Structural and functional insight into the mechanism of an alkaline exonuclease from *Laribacter hongkongensis*. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39** (22): 9803–9819
- [90] Tang Q, Gao P, Liu Y P, *et al.* RecOR complex including RecR N-N dimer and RecO monomer displays a high affinity for ssDNA. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**(21): 11115–11125
- [91] Ren W, Chen H, Sun Q, *et al.* Structural basis of SOSS1 complex assembly and recognition of ssDNA. *Cell Rep*, 2014, **6**(6): 982–991
- [92] Tao Y, Jin C, Li X, *et al.* The structure of the FANCM-MHF complex reveals physical features for functional assembly. *Nat Commun*, 2012, **3**: 782
- [93] Yang H, Zhang T, Tao Y, *et al.* Structural insights into the functions of the FANCM-FAAP24 complex in DNA repair. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(22): 10573–10583
- [94] Wang Y, Han X, Wu F, *et al.* Structure analysis of FAAP24 reveals single-stranded DNA-binding activity and domain functions in DNA damage response. *Cell Res*, 2013, (10): 1215–1228
- [95] Fu G, Wu J, Liu W, *et al.* Crystal structure of DNA gyrase B' domain sheds lights on the mechanism for T-segment navigation. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(17): 5908–5916
- [96] Wan B, Yin J, Horvath K, *et al.* SLX4 assembles a telomere maintenance toolkit by bridging multiple endonucleases with telomeres. *Cell Rep*, 2013, **4**(5): 861–869
- [97] Yang H, Yang M, Ding Y, *et al.* The crystal structures of SARS virus main protease Mpro and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(23): 13190–13195
- [98] Su D, Lou Z, Sun F, *et al.* The dodecamer structure of the SARS coronavirus non-structural protein nsp10. *J Virol*, 2006, **80** (16): 7902–7908
- [99] Xu X, Zhai Y, Sun F, *et al.* A new anti-viral target revealed by the hexameric structure of the MHV coronavirus non-structural protein nsp15. *J Virol*, 2006, **80**(16): 7909–7917
- [100] Zhai Y, Sun F, Li X, *et al.* Structural insights into coronavirus transcription/replication from the crystal structure of the SARS-CoV hexadecameric nsp7 • nsp8 super-complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(11): 980–986
- [101] He X, Zhou J, Bartlam M, *et al.* Crystal structure of the polymerase PA (C)-PB1 (N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*, 2008, **454**(7208): 1123–1126
- [102] Wang X, Peng W, Ren J, *et al.* A sensor/adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(4): 424–429
- [103] Ren J, Wang X, Hu Z, *et al.* Picornavirus uncoating intermediate captured. *Nat Commun*, 2013, **4**: 1929
- [104] De Colibus L, Wang X, Spyrou J A, *et al.* More-powerful virus inhibitors from structure-based analysis of HEV71 capsid-binding molecules. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(3): 282–288
- [105] Dang M, Wang X, Wang Q, *et al.* Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71. *Protein Cell*, 2014, **5**(9): 692–703
- [106] Wang X, Ren J, Gao Q, *et al.* Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature*, 2014[Accepted]
- [107] Shi Y, Zhang W, Wang F, *et al.* Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses. *Science*, 2013, **342**(6155): 243–247
- [108] Zhang W, Shi Y, Lu X, *et al.* An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level. *Science*, 2013, **340**(6139): 1463–1467
- [109] Li Q, Qi J, Zhang W, *et al.* The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(10): 1266–1268
- [110] Vavricka C J, Li Q, Wu Y, *et al.* Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog*, 2011, **7**(10): e1002249
- [111] Li Q, Sun X, Li Z, *et al.* Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(46): 18897–18902
- [112] Vavricka C J, Liu Y, Kiyota H, *et al.* Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors. *Nat Commun*, 2013, **4**: 1491
- [113] Wu Y, Bi Y, Vavricka C J, *et al.* Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Res*, 2013, **23**(12): 1347–1355
- [114] Liu J, Lynch P A, Chien C Y, *et al.* Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**(11): 896–899
- [115] Jagger B W, Wise H M, Kash J C, *et al.* An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 2012, **337**(6091): 199–204
- [116] Liu T, Liu Z, Song C, *et al.* Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science*, 2012, **336**(6085): 1160–1164
- [117] Sun Y, Li L, Macho A P, *et al.* Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex. *Science*, 2013, **342**(6158): 624–628
- [118] Hu Z, Yan C, Liu P, *et al.* Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science*, 2013, **341**(6142): 172–175
- [119] Ru H, Ni X, Zhao L, *et al.* Structural basis for termination of AIM2-mediated signaling by p20. *Cell Res*, 2013, **23**(6): 855–858
- [120] Zhang P, Reichardt A, Liang H, *et al.* Single amino acid substitutions confer the antiviral activity of the TRAF3 adaptor protein onto TRAF5. *Sci Signal*, 2012, **5**(250): ra81
- [121] Ouyang S, Song X, Wang Y, *et al.* Structural analysis of the

- STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. *Immunity*, 2012, **36**(6): 1073–1086
- [122] Huang Y H, Liu X Y, Du X X, *et al.* The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(7): 728–730
- [123] Wang D, Zhang S, Li L, *et al.* Structural insights into the assembly and activation of IL-1 β with its receptors. *Nat Immunol*, 2010, **11**(10): 905–911
- [124] Liu X, Hammel M, He Y, *et al.* Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(37): 14918–14923
- [125] Zhu C, Gao W, Zhao K, *et al.* Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2722
- [126] Chen S, Xu Y, Zhang K, *et al.* Structure of N-terminal domain of ZAP indicates how a zinc-finger protein recognizes complex RNA. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(4): 430–435
- [127] Yang Z, Liang H, Zhou Q, *et al.* Crystal structure of ISG54 reveals a novel RNA binding structure and potential functional mechanisms. *Cell Res*, 2012, **22**(9): 1328–1338
- [128] Feng F, Yuan L, Wang Y E, *et al.* Crystal structure and nucleotide selectivity of human IFIT5/ISG58. *Cell Res*, 2013, **23**(8): 1055–1058
- [129] Li Y, Wu H, Wu W, *et al.* Structural insights into the TRIM family of ubiquitin E3 ligases. *Cell Res*, 2014, **24**(6): 762–765
- [130] Zhu Y, Li H, Long C, *et al.* Structural insights into the enzymatic mechanism of the pathogenic MAPK phosphothreonine lyase. *Mol Cell*, 2007, **28**(5): 899–913
- [131] Xing W, Zou Y, Liu Q, *et al.* The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein Avr Pto. *Nature*, 2007, **449**(7159): 243–247
- [132] Li H, Xu H, Zhou Y, *et al.* The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science*, 2007, **315** (5814): 1000–1003
- [133] Zhang J, Shao F, Li Y, *et al.* A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *cell host microbe*, 2007, **1**(3): 175–185
- [134] Yao Q, Cui J, Zhu Y, *et al.* A bacterial type III effector family uses the papain-like hydrolytic activity to arrest the host cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(10): 3716–3721
- [135] Cui J, Yao Q, Li S, *et al.* Glutamine deamidation and dysfunction of ubiquitin/NEDD8 induced by a bacterial effector family. *Science*, 2010, **329**(5998): 1215–1218
- [136] Yao Q, Cui J, Wang J, *et al.* Structural mechanism of ubiquitin and NEDD8 deamidation catalyzed by bacterial effectors that induce macrophage-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(50): 20395–20400
- [137] Zhu Y, Li H, Hu L, *et al.* Structure of a Shigella effector reveals a new class of ubiquitin ligases. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(12): 1302–1308
- [138] Zhu Y, Hu L, Zhou Y, *et al.* Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional Legionella typeIV effector SidM/DrrA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(10): 4699–4704
- [139] Yu Q, Hu L, Yao Q, *et al.* Structural analyses of Legionella LepB reveal a new GAP fold that catalytically mimics eukaryotic RasGAP. *Cell Res*, 2013, **23**(6): 775–787
- [140] Dong N, Zhu Y, Lu Q, *et al.* Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase to Rab1 inactivation to counteract host defenses. *Cell*, 2012, **150**(5): 1029–1041
- [141] Cui J, Shao F. Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends Biochem Sci*, 2011, **36**(10): 532–540
- [142] Wang C, Jiang Y, Ma J M, *et al.* Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*, 2013, **340** (6132): 610–614
- [143] Wacker D, Wang C, Katritch V, *et al.* Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 2013, **340**(6132): 615–619
- [144] Siu F Y, He M, de Graaf C, *et al.* Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2013, **499** (7459): 444–449
- [145] Liu X, Sun X X, Wu Y C, *et al.* Oxidation-sensing regulator AbfR regulates oxidative stress responses, bacterial aggregation, and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Biol Chem*, 2013, **288**(6): 3739–3752
- [146] Chen H, Yi C, Zhang J, *et al.* Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. *EMBO Rep*, 2010, **11**(9): 685–690
- [147] Zhang J, Ye F, Lan L, *et al.* Structural switches of *Staphylococcus aureus* Clp Protease: a key to understanding protease dynamics. *J Biol Chem*, 2011, **286**(43): 37590–3760
- [148] Shi N, Zeng W, Ye S, *et al.* Crucial points within the pore as determinants of K(+) channel conductance and gating. *J Mol Biol*, 2011, **411**(1): 27–35
- [149] Ren J, He Y, Chen W, *et al.* Thermodynamic and structural characterization of halogen bonding in protein-ligand interactions: a case study of PDE5 and its inhibitors. *J Med Chem*, 2014, **57**(8): 3588–3593
- [150] Ye N, Chen C H, Chen T T, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of a series of benzo [de] [1,7]naphthyridin-7 (8H)-ones bearing a functionalized longer chain appendage as novel PARP1 inhibitors. *J Med Chem*, 2013, **56**(7): 2885–2903
- [151] Liu Y X, Zhang W, Li L, *et al.* Cyanobacterial peptides as a prototype for the design of potent β -secretase inhibitors and the development of selective chemical probes for other aspartic proteases. *J Med Chem*, 2012, **55**(23): 10749–10765

Structural Biology in China

Abstract The determination by Chinese scientists in early 1970s of the crystal structure of rhombohedral 2Zn pig insulin, the first protein crystal structure ever to be solved in Asia, marked the historical beginning of the structural biology research in China. Starting with the new century, research in structural biology in China experiences a rapid progress and facing a new development stage, placing her at the frontier of this field worldwide. This Special Column will conduct a panoramic review of the history and current status of structural biology research in China in three Sections, "The history", "The establishment of modern experimental facilities", and "The representative research fruits in recent years at the international frontier of life sciences".

Key words structural biology, history, modern experimental facilities

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00240