

21 世纪的生物学

生物膜膜蛋白三维结构研究的现状与展望

杨福愉 张旭家

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

1 生物膜膜蛋白三维结构研究的重要性与迫切性

细胞是生命的基本结构与功能单位。细胞的外周膜与细胞内的膜系统称为生物膜。细胞的能量转换、信息识别与传递、物质运送和分配等基本生命现象都与生物膜密切相关。生物膜是由蛋白质、脂类以及碳水化合物等组成的超分子体系,膜蛋白是膜功能的主要体现者。生物膜膜蛋白可分为外周膜蛋白和内在膜蛋白,后者约占整个膜蛋白的 70%~80%,它们部分或全部嵌入膜内,有的则是跨膜分布,如受体、离子通道、离子泵、膜孔、运载体(transporter)以及各种膜酶等等。象水溶性蛋白质一样,要深入了解膜蛋白的功能必须解析它们的三维结构。第一个水溶性蛋白质——肌红蛋白的三维结构的解析是由英国 Kendrew 于 1957 年用 X 射线衍射法完成的,从而使他获得了诺贝尔奖。随着相关技术的日益改进与发展,迄今蛋白质解析出具有原子分辨率的三维结构已达 13 000 个左右,而且正以 2000 个/年的速率递增。但是其中内在膜蛋白只有 26 个左右(根据 2000 年 6 月的统计),换言之,仅占有已经解析出三维结构的蛋白质的 0.2%。

2000 年 6 月 26 日参加人类基因组国际合作项目的各国于同一时间正式宣布全长约 30 亿个核苷酸的人类基因组序列工作框架图已经绘制完成。人们预计,在 2001 年 6 月将基本完成全序列的测定。人类在跨入 21 世纪的时候,生命科学正在迎来一个重要而崭新的时代——后基因组时代。后基因组研究的范围异常广泛,但人们首先感兴趣的无疑是那些能编码并表达为蛋白质产物的基因,在人类基因组中,编码蛋白质的基因确切总数至今还有不同说法。据最新报道,估计有 10~14 万。很显然要阐明生命本质必须对这批大量蛋白质的结构与功能

进行研究,这是蛋白质组学研究的任务。蛋白质分子正确的三维结构是行使正常功能的必要条件,因此随着基因组功能研究的深入,以研究这批大量蛋白质三维结构为目标的结构基因组学(Structural Genomics)也随之诞生,面对这样宏伟而艰巨的任务,对参与的结构生物学家、生物化学家和生物物理学家来说,都是一个严峻的挑战。他们必须发展并解决规模化、高批量、自动化克隆基因、表达蛋白、生长晶体、测定蛋白质三维结构的新方法、新途径。从 1998 年开始美、英、德、日等国有关科学家已相继召开多次研讨会以讨论结构基因组研究的战略与战术。一个在规模和影响上都足以与人类基因组计划相比拟的新的跨国重大科学工程即将正式启动。但值得注意的是,据估计,人类基因组编码并表达的 100 000~140 000 蛋白质中约有 1/4 为内在膜蛋白(其他模式生物的基因组所表达的蛋白质中内在膜蛋白也占相似比例)。根据前述,当今水溶性蛋白质与内在膜蛋白在解析三维结构的数量方面还存在很大的差距,因此,在开展结构基因组研究时,如果对膜蛋白三维结构的解析也要象水溶性蛋白质那样做到高批量、规模化等显然是没有基础的,也是不现实的。据报道,美、英、日、德等国科学家在讨论结构基因组学研究规划时对此也没有提出比较具体的方案。因此,内在膜蛋白三维结构的研究必须加强,争取在方法上有新的突破,否则势将成为结构基因组研究中的“瓶颈”。此外,从应用角度考虑,内在膜蛋白三维结构的解析与医、药的关系尤为密切。有人估计 50% 受体可能是药物的靶子,内在膜蛋白的异常与囊性纤维变性(cystic fibrosis 一种遗传性疾病)、癌症、甚至老年痴呆症、帕金森氏症(Parkinson's disease)等有关,因此内在膜蛋白三维结构的解析无疑对新药的发现、设计、筛选都有很大的作用。

2 解析内在膜蛋白三维结构的方法与困难

2.1 方法

当前测定蛋白质三维结构的主要手段为: X 射线晶体衍射法, 电子晶体学方法和核磁共振波谱法 (NMR) (表 1). 其中 NMR 方法目前只适用于分子质量小于 35 ku 的蛋白质, 对于非水溶性的内在膜蛋白来说更有其局限性. 但该方法仍在不断摸索中. 迄今, X 射线晶体衍射仍然是内在膜蛋白获得高分辨率三维结构的主要方法. 但其前提条件必须获得高质量的单晶. 水溶性蛋白质的结晶主要靠亲水与亲水的相互作用, 由于内在膜蛋白的疏水表面以及在膜上不均一的取向, 使三维结晶极为困难. 这是制约内在膜蛋白三维结构解析的因素之一. 另外一条途径是电子晶体衍射方法. 由于电子与物质

的相互作用远远大于 X 射线, 因此很薄和较小的二维晶体也可应用这一方法. 二维晶体的形成主要靠疏水-疏水相互作用, 鉴于内在膜蛋白的疏水性, 与三维晶体相比较, 二维晶体较易形成. 一般将内在膜蛋白分离纯化后重组于脂双层, 使其形成二维晶体. 之后应用电子显微镜将二维晶体经低剂量的电子束辐射, 收录其电子衍射强度和相位信息, 再经图象处理进行三维重建从而解出其三维结构. 一般讲, 用这一方法只能得到中 (约 0.8 nm)、低 (1.5~ 2.0 nm) 分辨率的结果. 但从 90 年代以来由于技术的改进, 有些内在膜蛋白 (如, 嗜盐菌菌紫质^[1], 植物捕光复合体 II^[2]) 应用电子晶体衍射方法也能确定接近原子分辨率 (0.34 ~ 0.35 nm) 的三维结构, 但需要较长时间.

表 1 解析内在膜蛋白三维结构的主要方法

方 法	样 品	分辨率	蛋白质含量	分子质量
X 射线晶体衍射	三维晶体	约 0.35 nm	20~ 40 μg/次	
电子晶体学	二维晶体	约 0.8 nm	5 μg/次	
	单颗粒	< 2.0 nm	0.3 μg/次	> 500 ku
核磁共振	溶液状态 (¹³ C, ¹⁵ N 标记)	> 0.35 nm	0.5 mg/次	< 40 ku

2.2 困难

研究内在膜蛋白三维结构的困难主要可归纳为如下几点:

(1) 天然内在膜蛋白含量低, 如一些跨膜受体蛋白的含量为微克数量级. 加之, 应用基因工程方法大量表达内在膜蛋白也存在着很大的困难, 因此, 迄今为止已解析精细结构的主要是天然富含的内在膜蛋白, 如, 牛心线粒体细胞色素 c 氧化酶^[3]、细胞色素 bc₁ 复合体^[4,5]、植物捕光复合体^[2]、紫色细菌光合反应中心^[6]、嗜盐菌菌紫质^[1,7]、细菌膜孔蛋白等.

(2) 内在膜蛋白的分离、纯化比较困难, 只有用较剧烈的条件 (如, 去垢剂、有机溶剂、超声波等) 才能将它们溶解下来. 分离后一旦将去垢剂或有机溶剂全部除去, 很容易聚为不溶性的物质.

(3) 内在膜蛋白晶体生长困难, 因为无论是电子晶体学方法还是 X 射线晶体学方法, 都需要内在膜蛋白的二维或三维晶体, 晶体的生长成了目

前解析内在膜蛋白三维结构的“瓶颈”.

3 内在膜蛋白三维结构的研究进展

与水溶性蛋白质相比较, 内在膜蛋白三维结构解析的进展相当缓慢, 但近一二年来这方面的进展有明显加快的趋势. 下面拟从几个方面来举例说明:

a. 线粒体内膜与能量转换有关的共有 5 个膜蛋白复合体 (图 1): NADH-辅酶 Q 氧化还原酶 (复合物 I), 琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶 (复合物 II), 辅酶 Q-细胞色素 c 还原酶 (复合物 III, 又称 bc₁ 复合物), 细胞色素 c 氧化酶 (复合物 IV) 以及 ATP 合酶 (复合物 V, 又称 F₀F₁-ATPase). 迄今, 复合体 VI、复合体 III、复合体 V (F₀F₁-ATP 酶) 的 F₁ 都已获得原子分辨率的三维结构分析结果. 一旦线粒体内膜 5 个复合体的三维结构的解析全部完成, 无疑人们对线粒体内膜的能量转换 (氧化磷酸化) 将会获得一个全面、深入的认识.

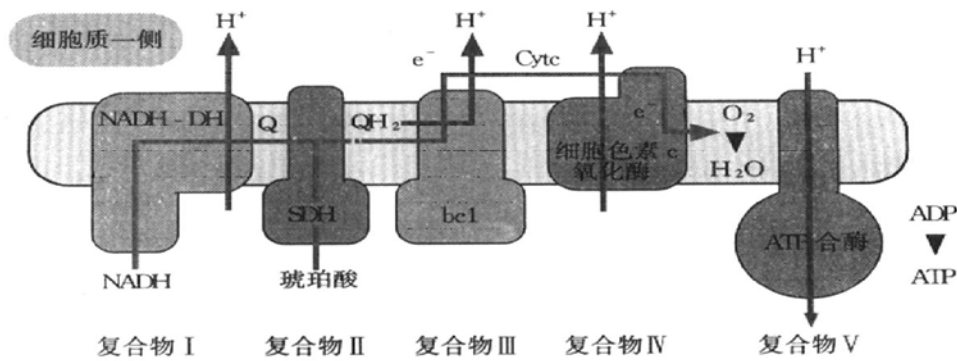


图1 线粒体内膜参与氧化磷酸化的5个复合物
主要显示线粒体内膜分布有5个复合物，但不确切反映电子传递的具体途径。

b. 细菌系列膜孔蛋白 (porin) 及运载体 (transporter) 三维结构的解析

从1990年开始，一些细菌外膜膜孔蛋白较高分辨率的三维结构的解析不断获得成功，并发现它们具有跨膜β折叠结构的特征。它们一般含有由16~18个β折叠组成的β桶结构。后来还发现由8个β折叠组成的最小β桶结构，即*E. coli*的细胞膜膜蛋白OmpA^[8]。近年还测定了分布于革兰氏阴性细菌外膜上的转运体 (transporter): Fep A (ferric-enterochelin/entereobaction permease)^[9]和Fhu A (ferric-hydroxamate uptake)^[10]含有22个跨膜的β桶结构，是迄今发现的最大跨膜β桶结构 (表2和图2)。过去认为，跨膜膜蛋白都呈现α螺旋结构，现在发现有一类跨膜膜蛋白呈现β桶结构，它们大都分布于细菌外膜，线粒体膜和叶绿体膜。



图2 大肠杆菌*E. coli*外周膜内在膜蛋白Fep A三维结构
它由22个跨膜β折叠组成桶形结构，是迄今发现最大的跨膜β桶结构，分辨率0.3 nm。

表2 已解析的高分辨率 (≤0.35 nm) 的内在膜蛋白

内在膜蛋白	分辨率/nm
与光合作用有关的内在膜蛋白	
Reaction center (<i>R. viridis</i>) ^[16]	0.3
Reaction center (<i>R. sphaeroides</i>) ^[111]	0.28
Light harvesting complex (<i>R. acidophila</i>) ^[12]	0.25
Light harvesting complex (<i>R. molischianum</i>) ^[113]	0.24
Light harvesting complex (Bean) ^[2]	0.35
组成电子传递链的内在膜蛋白	
Fumarate reductase complex (<i>E. coli</i>) ^[14]	0.33
Fumarate reductase complex (<i>W. succinogenes</i>) ^[15]	0.22
Cytochrome c oxidase (<i>P. denitrificans</i>) ^[16]	0.28
Cytochrome c oxidase (Bovine heart) ^[3]	0.28
Cytochrome bc1 complex (Bovine heart) ^[4,5]	0.29
Cytochrome bc1 complex (Chicken heart) ^[17]	0.30
光驱动的离子泵	
Bacteriorhodopsin (<i>H. halobium</i>) ^[1,18]	0.25
Halorhodopsin (<i>H. salinarum</i>) ^[7]	0.18
离子泵	
SR Ca ²⁺ -ATPase ^[19]	0.26
与G蛋白偶联的受体(G protein-coupled receptors, GPCR)	
Rhodopsin (牛) ^[20]	0.28
通道(channels)	
K ⁺ channel (<i>S. lividans</i>) ^[21]	0.34
Mechanosensitive channel (<i>M. tuberculosis</i>) ^[22]	0.35
细菌外膜膜孔(pore)运载体(transporter)、转位酶(translocase)	
Porin (<i>R. capsulatus</i>) ^[23]	0.30
Porin OmpF(<i>E. coli</i>) ^[24]	0.24
Porin (<i>R. Blastica</i>) ^[25]	0.20
Porin (<i>P. denitrificans</i>) ^[26]	0.31
Maltoporin (<i>E. coli</i>) ^[27]	0.31
Maltoporin (<i>S. typhimurium</i>) ^[28]	0.24
Sucrose-specific porin (<i>S. typhimurium</i>) ^[29]	0.24
FepA (ferric enterochelin permease, <i>E. coli</i>) ^[9]	0.30
FhuA (ferric hydroxamate uptake, <i>E. coli</i>) ^[10]	0.30
TolC (<i>E. coli</i>) ^[30]	0.28
其他	
Prostaglandin H ₂ synthase ^[31]	0.32
OmpA (<i>E. coli</i>) ^[8]	0.25
OMPLA (<i>E. coli</i>)	0.21
(outer membrane phospholipase A) ^[32]	

c. 链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 钾通道 (KcsA) 的三维结构^[18]

钾离子能够很快地经钾通道通过细胞膜，它在神经传导与植物气孔开闭等过程中都有重要的作用。20 多年以来，应用一系列技术（包括生化，分子生物学和膜片钳 patch clamp 等技术）对于钾通道已经作了大量的研究，积累了很多的资料。对它在膜上的拓扑分布也有了初步的了解。与真核细胞相比较，细菌钾通道的组成与结构要简单得多，但通道主要核心部分的结构基本相似。1998 年美国 MacKinnan 实验室成功获得了链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 钾通道的核心部分的晶体，并用 X 射线衍射得到较高分辨率 (0.34 nm) 的三维结构。图 3 是钾通道 (KcsA) 的三维结构，图 4 是简化的模式图。每一个钾通道 (KcsA) 由四个亚单位组成，每个亚单位含两个跨膜 α 螺旋柱形多肽，其中一个与膜的疏水部分相接触（即图 4 中的周边螺旋 S_1 ），另一个的亲水一侧朝向膜的中间（即图 4 中的内侧螺旋 S_2 ）形成亲水内通道。这样，四个亚单位就组成一个倒锥形的跨膜孔道。此外，靠近内侧一端还有四个环圈结构 (P) 分布于亲水通道的内壁，具有选择性过滤器的作用。每一个 P 的上端为螺旋结构，下端为伸展多肽，它们的羰基 (C=O) 指向孔的中央。当水化的 K^+ 通过通道时，先进行脱水，之后与四个羰基相匹配才得以通过 (图 5)。 Na^+ 的半径 (0.093 nm) 虽

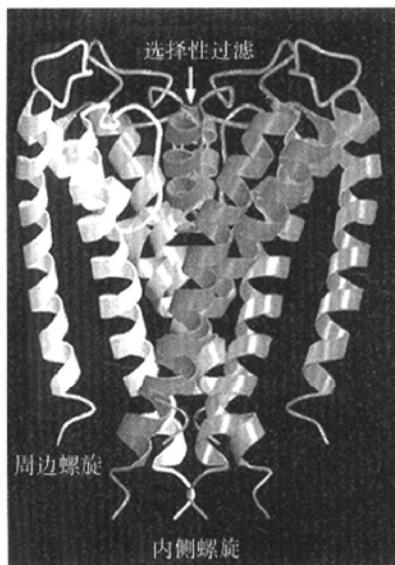


图 3 链霉菌 *S. Lividans* 钾通道 (KcsA) 核心部分的三维结构

钾通道以四聚体存在，每一亚单位由二段 α 螺旋（周边螺旋与内侧螺旋）组成。

较 K^+ (0.133 nm) 要小 0.04 nm，但水化的 Na^+ 脱水后与四个 P 内侧的羰基不能象 K^+ 那样相匹配，因此就不能通过钾通道。这样长期困惑人们的有关钾通道只能通过 K^+ 而不能通过 Na^+ ，即其选择性通透的机理已从结构上得到了较肯定的解释。鉴于细菌钾通道的核心部分结构与真核细胞相应结构有很大的相似性，因此，前者的研究成果对了解后者作用的分子机理也有很大的帮助。最近一二年以来除了钾通道 KcsA 的核心部分结构外，又解析了四个水溶性微区 (domain) 结构，这对 K^+ 通道的作用机理及其调节又有了进一步的认识。在这里，也提示人们，当解析难度较大的内在膜蛋白分子的三维结构时，将完整分子采用分而解之也是可以考虑的一种途径。

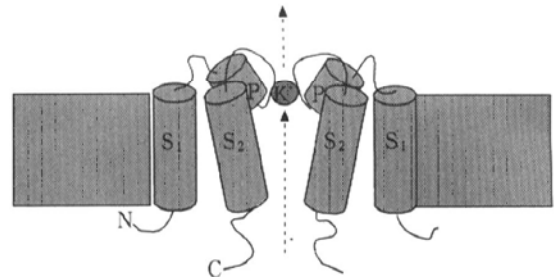


图 4 链霉菌 *S. Lividans* 钾通道 (KcsA) 核心结构的简化模式图

为了简化，只列出两个亚单位。每一亚单位含两个跨膜螺旋结构， S_1 为外周边螺旋， S_2 为内侧螺旋，P 为环圈结构，它们的羰基 (C=O) 指向中央，当 K^+ 通过时与 4 个 P 环圈上的四个羰基相匹配，详见正文。

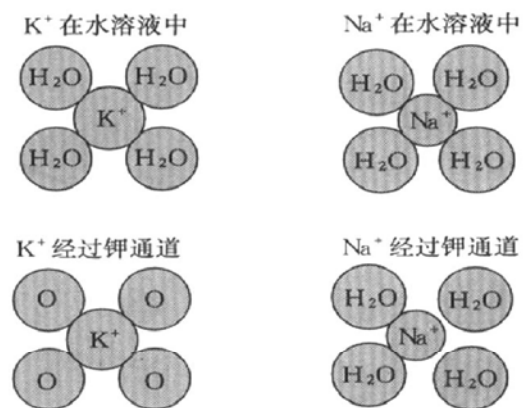


图 5 K^+ 、 Na^+ 在进入钾通道过滤器前后的比较

d. Halorhodopsin (转运 Cl^- 的菌紫质) 三维结构的解析^[7]

嗜盐菌 (*Halobacterium salinarum*) 外周膜含有与视紫质 (rhodopsin) 结构十分相似的四种内在膜蛋白，即菌紫质 (Bacteriorhodopsin, BR)，转运

Cl⁻ 的菌紫质 (Halorhodopsin, HR) 和两种感受菌紫质 (Sensory rhodopsins I 和 II). 这四种内在膜蛋白均拥有 7 个跨膜 α 螺旋片段, 内含吸收光的辅基——视黄醛, 在光的驱动下视黄醛分子进行异构化 (cis → trans), 从而使蛋白质分子构象发生变化并从而产生生物效应, 其中菌紫质是研究较早也较为详尽的一个成员, 在光作用下能驱动 H⁺ 从细胞质向外运送, 产生跨膜 H⁺ 梯度 (图 6). HR 在光作用下能驱动 Cl⁻ 从细胞外向内运送. 对 BR 的结构研究开展较早的英国 Hendersen 和 Unwin 1975 年用电子晶体学方法将 BR 二维晶体的电子衍射结果进行三维重构获得了分辨率为 0.7 nm 的结果, 这是最早获得较高分辨率的三维结构分析结果的内在膜蛋白, 经过 20 余年 Hendersen 改进了技术于 1996 年将 BR 三维结构的分辨率提高至 0.35 nm. 接着 Landau 和 Rosenbusch 将 BR 在脂立方相进行结晶, 成功获得了三维晶体, 运用同步辐射使 BR 的分辨率提高到 0.25 nm. 这就大大加深了人们对 BR 使光能转换为化学能作用机理的认识.

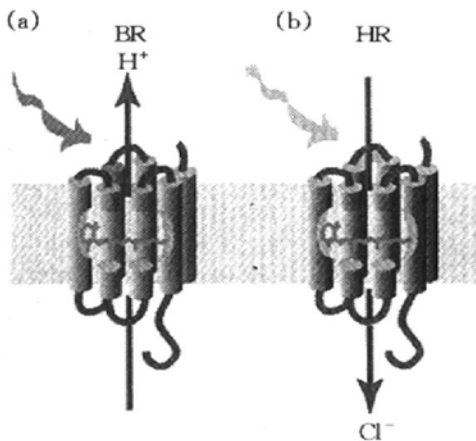


图 6 嗜盐菌细胞膜两种内在膜蛋白
(a) 菌紫质 BR; (b) 运送 Cl⁻ 的菌紫质 HR.

HR 与 BR 在结构上有很多相似之处. 它的功能是在光驱动下能使 Cl⁻ 进入胞内 (图 6). Kolbe 等参照了 BR 在脂立方相中结晶的经验, 使 HR 的三维结晶也获得成功. 从获得分辨率为 0.18 nm 的结构分析结果来看, 它在嗜盐菌外周膜上也呈三聚体 (图 7), 每一单体拥有 7 个 α 螺旋片段, 内含一个 Cl⁻ (在膜表面下 1.8 nm 处, 与 BR 中 H⁺ 所占的位点十分近似). 因而认为 HR 运送 Cl⁻ 的机理与 BR 运送 H⁺ 的机理可能很类似.

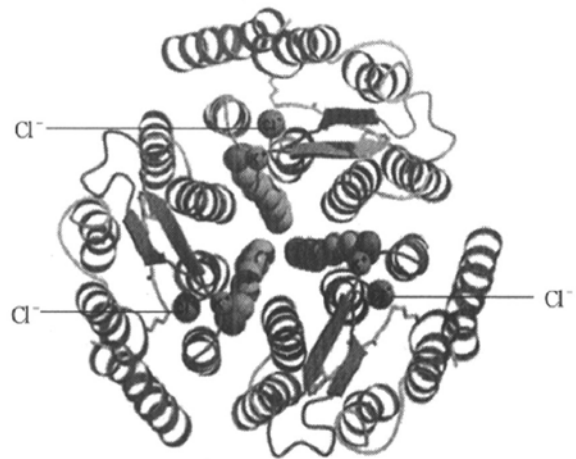


图 7 从细胞外一侧观察到的转运 Cl⁻ 的菌紫质 (Halorhodopsin) 三聚体的三维结构
分辨率: 0.18 nm, 每一单体由 7 个跨膜 α 螺旋片段组成内含一个 Cl⁻.

e. 视紫质 (Rhodopsin) 三维结构的解析^[17]

视紫质位于视杆细胞外周膜, 它接收外界光的刺激使定位于 7 个跨膜 α 螺旋中的视黄醛分子异构化从 11-cis 转变为 all-trans, 导致视紫质整个分子重排并发生外形变化, 进而影响鸟三磷 (GTP) 结合蛋白即 G-蛋白构象发生变化, 从而使信息传递

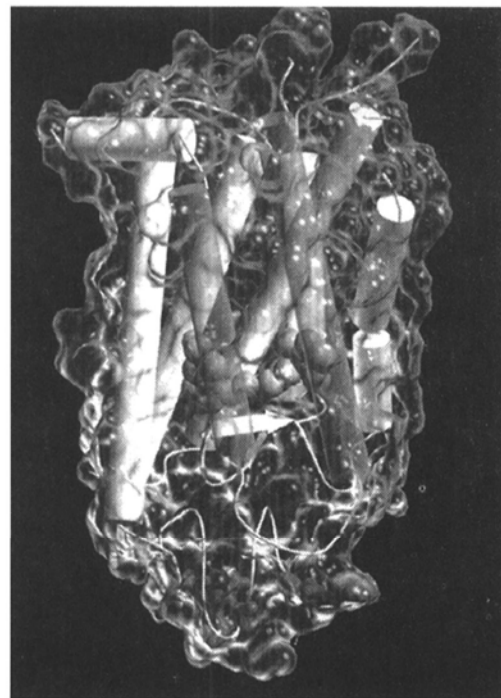


图 8 牛视紫质 (Rhodopsin) 三维结构
分辨率: 0.28 nm.

过程在细胞中进行。视紫质是 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptors, GPCR) 家族成员之一。有人估计人类基因组约有 3% 用于编码这一家族成员, 这足以说明它们的数量十分可观, 凡外界各种刺激因子, 如激素、神经递质、气味、光子等都可以作用于 GPCR, 后者随之与专一的 G 蛋白结合而传递信息。2000 年 Palczewski 等宣布分辨率为 0.28 nm 的视紫质三维结构的解析结果 (图 8), 这对于深入探讨以视紫质为代表的 GPCR 家族在信息传递过程中的详细机理方面具有重要作用。此外, 视紫质三维结晶的成功, 很可能对其他 GPCR 晶体的获得也有一定的启示作用。

4 展 望

回顾蛋白质三维结构解析的历史, 当今内在膜蛋白三维结构解析进展缓慢的情况犹如 20 世纪 70 年代中期可溶性蛋白三维结构解析的处境。当时人们很难设想今天它们竟能达到 7 个左右/天的速率。从可溶性蛋白三维结构解析的历史进程来看, 关键在于技术的创新与改进。结合内在膜蛋白的情况, 要加快三维结构解析的进展, 下述几点是值得注意的。

a. 天然内在膜蛋白一般含量甚微, 因而应用基因工程方法大量表达内在膜蛋白是一个很重要的途径。近年来, 大肠杆菌膜蛋白 OmpA、运载体 Fep A 的三维结构分析都曾应用过这种方法, 但总的来讲, 内在膜蛋白的大量表达还存在着很多困难, 有待进一步研究。

b. 研究内在膜蛋白的三维结构, 关键在于获得合用的晶体 (无论三维还是二维晶体)。这方面近年来有不少探索, 例如; Landau 和 Rasenbusch 提出用模拟的脂立方相 (lipidic cubic phase) 生长膜蛋白的三维晶体。该系统由一定比例的脂、缓冲液和蛋白质组成, 形成一个结构化的、周期性的三维脂排列, 其中充满相互沟通的水通道。在这一体系中膜蛋白镶嵌在膜脂双层中, 与它在生物膜中的构象十分相似。此外, 较多的脂-水界面有利于晶体生成, 脂双层的网状分布则有利于膜蛋白的侧向移动从而促进晶体生长。因此, 该体系为具有疏水特征的膜蛋白的结晶提供了一个新的途径。用该方法获得的菌紫质的三维晶体, 虽然晶体较小 (约 20 μm), 但结合应用第三代同步辐射光源已能解析到 0.25 nm 分辨率的精细结构。2000 年德国 Oesterhelt 实验室又用此方法解析了结构相似的、

转运 Cl^- 的菌紫质 (Halorhodopsin) 的立体结构, 分辨率达到 0.18 nm。至于该方法是否具有广泛的普遍性, 还有待进一步验证。

此外, 诺贝尔奖获得者 Michel 为了解决疏水的内在膜蛋白形成三维晶体的困难, 在解析细菌 *P. denitrificans* 细胞色素 c 氧化酶 (bcOX) 三维结构时提出共结晶的想法。这个酶共有四个亚单位。他提出合成 bcOX 亚单位 II 的单克隆抗体的一个片段 Fv。它具有构象专一性, 与 bcOX 的亚单位 II 的外侧相结合, 使之增加 bcOX 的表面极性, 从而通过亲水-亲水相互作用有利于 bcOX 分子之间形成晶体。这一实验设计果然获得了成功, 结果解析了 bcOX 的高分辨率 (0.28 nm) 的三维结构。但是总的来看, 内在膜蛋白的晶体形成与生长迄今仍然无一定规律可循, 有待多途径继续进行摸索, 在方法上力争创新以便有新的突破。

综上所述, 内在膜蛋白三维结构的研究是生物膜研究的一个难点, 也是当前分子生物学与结构生物学研究重要问题之一。要在这个领域有所突破必须对每一环节进行耐心、细致而深入的探索, 不断积累与总结经验。过去美国评审生物大分子三维结构研究的基金申请时, 一直遵循“无晶体就不能获得资助”的原则。为了鼓励内在膜蛋白三维结构的研究, 从 1998 年开始, 对这方面研究项目的申请已经取消这一原则。

我国膜蛋白三维结构的研究起步较晚, 目前与国际上的差距还较大。近年来, 中国科学院生物物理研究所和清华大学生命科学院对内在膜蛋白的三维结构开始研究, 并取得了一些结果。清华大学生命科学院对蛋白质二维晶体的成长条件做了不少探索; 生物物理研究所与植物研究所光合研究中心协作, 获得了较大尺寸的菠菜和黄瓜捕光色素蛋白外周天线 LHC II 的二维晶体, 得到了二维投影, 并且还获得了低分辨率黄瓜 LHC II 的三维结构。此外, 他们还从猪心线粒体中部分分离、纯化了 ATP 合酶 ($\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$) 的跨膜部分 F_0 , 并得到了它的二维投影及低分辨率的三维结构。最近还安装了适合蛋白质结构研究的电镜 (Philip Tecnai20) 及相应的支持设备, 这样已具备了用电子晶体学方法通过膜蛋白二维晶体继而三维重构解析膜蛋白三维结构的基本条件。

机遇与风险并存, 如果, 有关部门能够对这一重要研究领域给予足够的重视, 投入一定的人力, 给以稳定的支持, 争取在这方面获得具有国际先进

水平的成果, 应该是很有可能的.

参 考 文 献

- 1 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A, *et al.* Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy [J]. *J Mol Biol*, 1990, **213**: 899~ 929
- 2 Kuhlbrandt W, Wang D N, Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 1994, **367** (6464): 614~ 621
- 3 Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, *et al.* Structure of metal sites of oxidised bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 1995, **269** (5227): 1069~ 1074
- 4 Xia D, Yu C A, Kim H, *et al.* Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 1997, **277** (5322): 60~ 66
- 5 Iwata S, Lee J W, Okada K, *et al.* Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science*, 1998, **281** (5373): 64~ 71
- 6 Deisenhofer J, Epp O, Miki K, *et al.* Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature*, 1985, **318** (6047): 618~ 624
- 7 Kolbe M, Besir H, Essen I, *et al.* Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science*, 2000, **288** (5470): 1390~ 1396
- 8 Pautsch A, Schulz G E. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**: 1013~ 1017
- 9 Buchanan S K, Smith B S, Venkatramani L, *et al.* Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol*, 1999, **6**: 56~ 63
- 10 Locker K P, Ree B, Kowbnik R, *et al.* Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structure of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell*, 1998, **95** (6): 771~ 778
- 11 Allen J P, Feher G, Zeates T O, *et al.* Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the protein subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (17): 6162~ 6166
- 12 McDermott G, Prince S M, Freer A A, *et al.* Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature*, 1995, **374** (6496): 517~ 521
- 13 Hu X, Schulten K, Koepke J, *et al.* Structure of the light-harvesting complex-II of *Rhodospirillum molischanum*. *Biophys J*, 1996, **70**: A130
- 14 Iverson T M, Luna-Chavez C, Cecchini G, *et al.* Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*, 1999, **284** (5422): 1961~ 1966
- 15 Lancaster C R O, Kroeger A, Auer M, *et al.* Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å. *Nature*, 1999, **402** (6760): 377~ 385
- 16 Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, *et al.* Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 1995, **376** (6542): 660~ 669
- 17 Zhang Z, Huang L, Shulmeister V M, *et al.* Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. *Nature*, 1998, **392** (6677): 677~ 684
- 18 Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch J P, *et al.* X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science*, 1997, **277** (5332): 1676~ 1681
- 19 Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, *et al.* Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 2000, **406** (6796): 647~ 654
- 20 Palczewski K, Kumasaka T, Hori T. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, **289** (5480): 739~ 745
- 21 Doyle D A, Cabral J M, Pfuetzner R A, *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 1998, **280**: 69~ 77
- 22 Chang G, Spencer R H, Lee A T, *et al.* Structure of the MscL Homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science*, 1998, **282** (5397): 2220~ 2226
- 23 Weiss M S, Wacker T, Weckesser J, *et al.* The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3 Å resolution. *FEBS Lett*, 1990, **267**: 268~ 272
- 24 Cowan S W, Schirmer T, Rummel G, *et al.* Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porin. *Nature*, 1992, **358** (6406): 727~ 733
- 25 Kreusch A, Neubuser A, Schiltz E, *et al.* The structure of the membrane channel porin from *Rhodospseudomonas blasticus* at 2.0 Å resolution. *Protein Sci*, 1994, **3**: 58~ 63
- 26 Hirsch A, Breed J, Saxena K, *et al.* The structure of porin from *Paracoccus denitrificans* at 3.1 Å resolution. *FEBS Lett*, 1997, **404**: 208~ 210
- 27 Schirmer T, Keller T A, Wang Y F, *et al.* Structure basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science*, 1995, **267** (5197): 512~ 514
- 28 Forst D, Welte W, Wacker T, *et al.* Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**: 37~ 46
- 29 Meyer J E, Hofnung M, Schulz G E. Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide. *J Mol Biol*, 1997, **266**: 4761~ 4775
- 30 Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, *et al.* Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, **405** (6789): 914~ 919
- 31 Picot D, Loll P J, Caravito R M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase 1. *Nature*, 1994, **367** (6460): 243~ 249
- 32 Snijder H J, Ubarrexena-Belandia I, Blaauw M, *et al.* Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature*, 1999, **401** (6754): 717~ 721