

科技评论

为什么 AlphaFold 不能取代实验结构生物学？ ——AI 结构预测的准确性探讨

何欣恒, 李俊睿, 徐华强*

摘要 人工智能的飞速发展给生物学研究带来了深远影响,其中,AlphaFold2在蛋白质结构预测领域引发了革命性的突破。评估了 AlphaFold2 对 G 蛋白偶联受体(GPCR),结构预测的可靠性,凭借其对于蛋白质三维结构的高度准确预测。然而,在实际应用中,AlphaFold2 的预测结果并非在所有场景下都足够精确。以 GPCR 为例,这类重要的药物靶点参与了广泛的生理过程,其结构研究对理解功能机制和药物开发具有重要意义。结果表明,尽管 AlphaFold2 能够准确捕捉 GPCR 整体骨架的主要特征,但其预测模型在胞外域与跨膜域的组装、配体结合口袋的形状,以及信号传导界面的构象等方面,与实验解析的高分辨率结构存在显著差异。这些差异限制了 AlphaFold2 模型在 GPCR 功能研究和基于结构的药物设计中的应用能力。因此,尽管 AlphaFold2 为结构预测提供了强大的工具,但其在特定场景下的局限性表明,AI 结构预测作为一种辅助工具,尚不能完全取代实验结构生物学,需要联合使用以辅助药理学研究和药物设计。

关键词 AlphaFold2;蛋白质结构预测;结构生物学;冷冻电镜;G 蛋白偶联受体;药物设计

1 AlphaFold 与结构生物学

近年来,人工智能(artificial intelligence, AI)以惊人的速度发展,改变了我们生活和科学研究的许多方面。2024 年诺贝尔物理学奖和化学奖双双花落 AI 领域,

物理学奖突出“科学如何应用于 AI,改变 AI”,而化学奖突出“AI 如何改变科学和人们的认知”。本文将探讨获得 2024 年诺贝尔化学奖的蛋白质结构预测工具 AlphaFold 和传统的结构生物学方法的异同。

AlphaFold 是由 DeepMind 公司开发的 AI 模型,能够根据蛋白质的氨基酸序列预测其三维结构。蛋白质就像是生命体内的小

机器,它们的结构决定了功能。了解蛋白质的结构对于药物研发以及理解生命过程非常重要。AlphaFold 的出现,让人们看到了快速预测蛋白质结构的可能性。

截至目前,AlphaFold 的 3 个主要版本是 AlphaFold1、AlphaFold2 和 AlphaFold3,各自代表了从基础探索到高精度预测和复合体建模的逐步演进(表 1)。AlphaFold1 于 2018 年推出,采用卷

中国科学院上海药物研究所,
上海 201203

收稿日期:2024-10-29;修回日期:2024-12-11

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFC2703105);国家自然科学基金项目(32130022,82121005);中国科学院战略性先导科技计划项目(XDB37030103);上海市科技重大专项(2019SHZDZX02)

作者简介:何欣恒,博士研究生,研究方向为计算生物学和结构生物学,电子信箱:he-xinheng@foxmail.com;徐华强(通信作者),研究员,研究方向为核激素受体、肝脏生长因子(HGF)及其受体 Met 酪氨酸激酶、G 蛋白偶联受体(GPCR)和植物激素等的结构和药物研发,电子信箱:eric.xu@simm.ac.cn

引用格式:何欣恒,李俊睿,徐华强. 为什么 AlphaFold 不能取代实验结构生物学? ——AI 结构预测的准确性探讨[J]. 科技导报, 2025, 43(2): 14-21;

doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2024.11.01606

表1 3代 AlphaFold的核心差异对比

版本	架构特点	关键技术	应用和性能
AlphaFold1	卷积神经网络	序列对齐信息、物理化学约束	精度有限,局限于简单蛋白
AlphaFold2	Transformer+图神经网络	Evoformer、结构模块、注意力机制	精度接近实验水平,适用于广泛单体蛋白预测
AlphaFold3	Pairformer+扩散模型	蛋白质与DNA、RNA、配体、离子等相互作用预测,翻译后修饰影响	提高复合物预测精度,助力药物设计和生物学研究

神经网络处理多重序列比对数据,并结合物理化学约束预测蛋白质三维结构,但在复杂和长链蛋白中精度有限^[1]。AlphaFold2在2020年问世,使用Transformer和图神经网络相结合的架构,通过Evoformer模块整合序列信息并直接优化原子坐标,大幅提高了预测精度,在单体蛋白结构预测中接近实验解析水平^[2]。AlphaFold3于2024年推出,作为DeepMind公司在蛋白质结构预测领域的最新突破,相较于前2代模型实现了显著的功能扩展和性能提升,其模型架构引入了全新的“Pairformer”模块,进一步提升了AlphaFold2中的Evoformer模块。同时结合扩散模型,从原子点云的初始状态出发,迭代生成分子结构的三维表示。这一创新极大地提高了复杂生物分子建模的效率和精度,且能够预测带配体的复合物结构^[3]。

传统上,结构生物学使用实验手段来解析蛋白质的三维结构,主要方法有以下几种。

X射线晶体学:这是最早也是最常用的方法。研究人员首先需要让蛋白质形成晶体,这就像把很多相同的蛋白质整齐地排列在一起。然后,用X射线照射这些晶体,得到衍射图样,通过解析这些图样计算出蛋白质的三维结

构。这一过程非常复杂,需要大量的时间和精力,尤其是培养出合适的蛋白质晶体并不容易,并且某些蛋白质无法在任何条件下结晶,限制了晶体学对蛋白结构的研究^[4]。

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR):这种方法利用原子核在磁场中的特性。研究人员将蛋白质溶解在溶液后放入强大的磁场中,然后测量原子核的信号。通过这些信号,可以推断出蛋白质的结构和动态信息。NMR适用于研究小型蛋白质,并且可以观察到蛋白质在溶液中的自然状态。但是,对于分子量较大的蛋白复合体,NMR的方法并不适用^[5]。

冷冻电子显微镜(cryo-electron microscopy, Cryo-EM):这是近年来迅速发展的技术。研究人员将蛋白质快速冷冻,保持其天然状态,然后在电子显微镜下观察。电子显微镜能提供非常高的分辨率,甚至可以看到单个原子的排列。但总体上精度不如晶体学研究,仅是在部分结构中达到了近原子分辨率。Cryo-EM特别适合研究大型的蛋白质复合物,但设备昂贵,操作也需要高超的技术^[6]。

这些传统方法虽然精确可靠,但过程繁琐,耗时耗力,需要

丰富的经验和技术支持。因此,当AlphaFold这样的AI工具出现后,一些人开始思考:既然我们可以快速预测蛋白质结构,传统的实验方法是否还有必要呢?

虽然AlphaFold在很多情况下能给出较为准确地预测,但它也有局限性。首先,蛋白质并不是一成不变的,它们会随着环境的变化而改变构象。AlphaFold对于这种动态变化的预测能力有限。其次,许多蛋白质需要与其他分子相互作用才能发挥功能,形成复杂的复合物。预测这些复合物结构,对AlphaFold来说仍然是巨大的挑战。因此,AI的预测结果可能依然需要通过实验来确保其准确性。

作为结构生物学的研究者,徐华强团队深入对比了结构预测工具和实验结构,并发文^[7]比较了AlphaFold预测的G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GP-CR)结构与实验解析的结果。研究发现,虽然AI预测有一定的准确性,但在关键细节上仍然存在差异。例如,某些重要的活性部位,预测结果可能并不准确。这些细微的差别,对于药物设计和功能研究可能会产生重大影响。

AlphaFold的出现是科学发展的重要里程碑,为我们提供了强大的工具。然而,它并不能完

全取代传统的结构生物学方法。实验验证和深入研究仍然是理解生命奥秘的关键,在研究中,我们需要拥抱新技术,但也要意识到其局限性。

2 GPCR 与 AlphaFold2

GPCR 是一种通过 G 蛋白传导信号的受体,广泛表达于细胞膜表面,负责将胞外信号传递到细胞内部。人类能看到东西、闻到味道,甚至感受到情绪波动,如开心和难过,GPCR 都在其中扮演着关键角色。正因如此,它成为了现代药物设计中最重要靶点之一,美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的药物中约有 1/3 都作用于 GPCR,其年销售额超过 1 万亿美元^[8]。

尽管 GPCR 的重要性不言而喻,但由于其高度复杂的结构和在激活时产生的显著动态变化(图 1),解析 GPCR 的高分辨率结构一直是生物学上的重大挑战。传统的 X 射线晶体学技术和近年来兴起的 Cryo-EM 技术虽然取得了一些突破,但获得高分辨率的 GPCR 结构仍然是一个耗时且成本高昂的过程。这一技术瓶颈限制了对 GPCR 功能的深入理解,阻碍了新药开发^[9-10]。

在这一背景下,DeepMind 公司开发的 AlphaFold2 为 GPCR 结构预测带来了革命性的突破。AlphaFold2 在蛋白质结构预测竞赛中表现出色,展示了接近实验精度的预测效果。AlphaFold2 的成功不仅证明了 AI 在生物学研

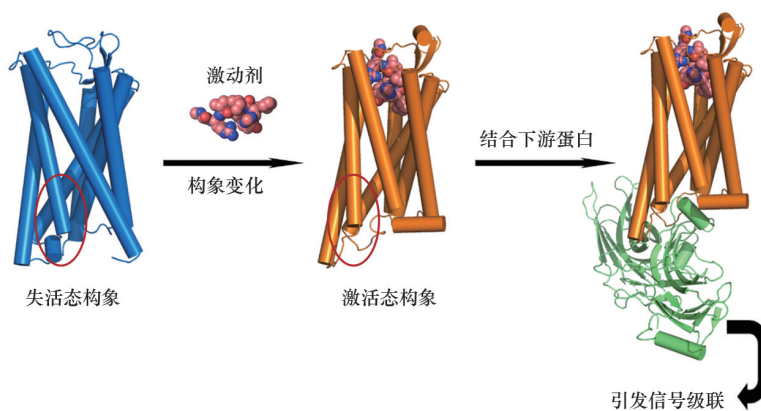


图 1 GPCR 的激活机制,红圈表示激活过程中发生主要变化的跨膜螺旋 6

究中的巨大潜力,也为 GPCR 相关的药物设计和功能研究提供了强有力的工具。

然而,尽管 AlphaFold2 在结构预测方面取得了一定成就,它在取代传统结构生物学方法上仍面临不少局限。本文选取了 AlphaFold2 发表后的 29 个 GPCR 结构,使用 AlphaFold2 折叠了它们的预测模型,并与实验结构进行比较和评测。由于这些蛋白不在训练集中,这排除了 AlphaFold2 预测时参考训练集数据的可能。

3 整体结构区别: AlphaFold2 是个好导航,但可以更好

在细胞生物学的世界里,蛋白质像一台复杂的机器,每个零件都至关重要。GPCR 作为细胞表面的受体,更像是传递外界信号的特工。AlphaFold2 则是高科技的导航系统,能够预测这些特工的“路线”,帮助科学家理解它们的工作方式。但是,就像导航软件提供的路线与实际道路可能存在差异一样,我们仍然需要结

合实际的情况来作出正确的判断。

GPCR 由 7 段跨膜螺旋组成,就像一条包含 7 个关键路段的复杂路线。这些螺旋在细胞膜中各自“行驶”。螺旋 1~4 像在主干道上稳定前进的车辆,而螺旋 5~7 则像是在交通状况变化时出现的绕行路线,随着激活状态的变化而表现出更多的“动态”。AlphaFold2 在捕捉这条“路线”的整体布局上表现得相当不错。我们评测的这些蛋白整体均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 仅为 1.64 Å,显示出 AlphaFold2 在解读 GPCR 复杂结构上的精确度。

然而,真正的挑战并不在于稳定的 7 次跨膜区域。当这些 GPCR 带上巨大的“附加装置”——大型的细胞外结构 (extracellular domain, ECD) 时,AlphaFold2 的预测就像是试图将一辆装满货物的卡车通过一个狭窄的隧道。这些 ECD 结构的预测误差通常会增大,因为 ECD 和跨膜区域 (transmembrane domain, TMD) 之间的相对位置预测不够准确,就像货车与隧道未能正确对齐一

样。例如,结合了 semaglutide 的胰高血糖素样肽-1 受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP1R), 其整体误差达到了惊人的 3.92 Å。在甲状旁腺激素 2 受体 (parathyroid hormone 2 recep-

tor, PTH2R) 和激活态的黄体生成素/绒毛膜促性腺激素受体 (luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, LHCGR) 中, 也出现了整体 RMSD 大于分开计算的 RMSD 的问题。对于在训练集中

不常见的失活态 LHCGR, 整体 RMSD 竟然达到了 6.08 Å, 超过了 2 根半氢键的长度, 这表明二者的差异极大, 类似于按照 AlphaFold 的导航在高速公路上误入了逆行车道(图 2)^[7]。

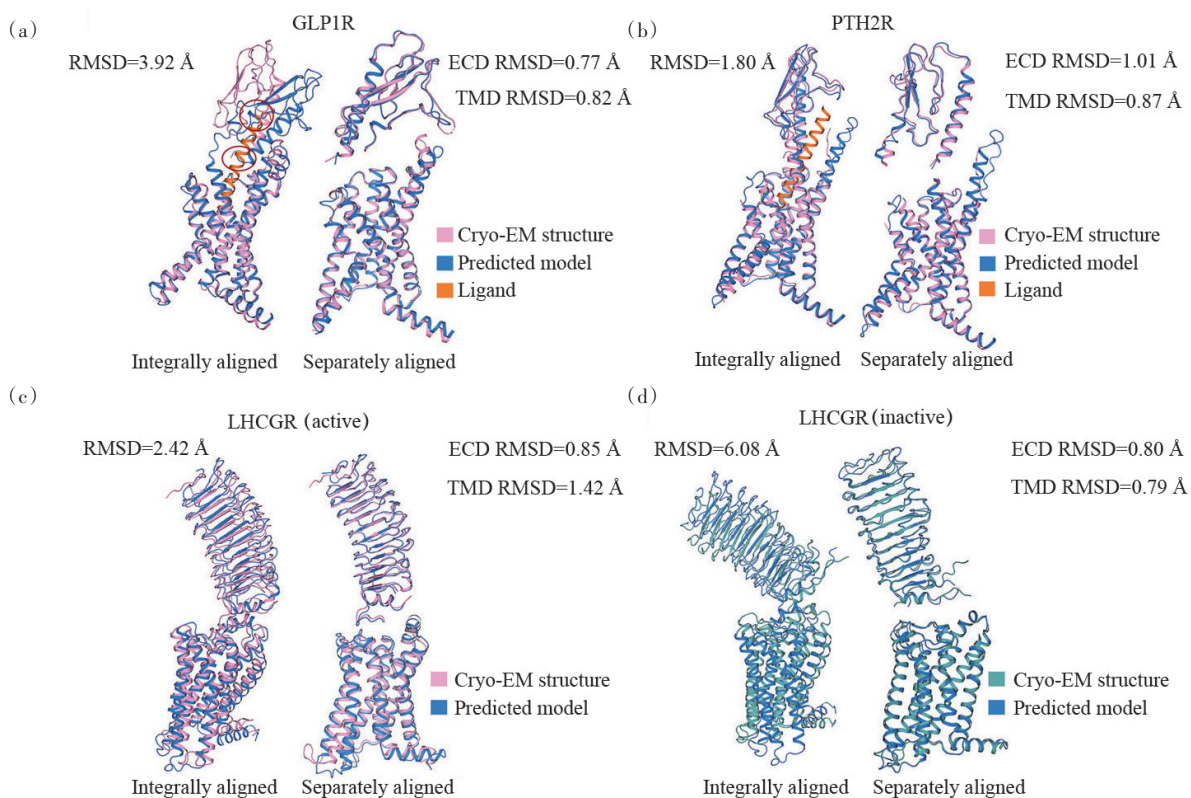


图2 具有大型胞外结构域的预测模型和实际结构对比

4 关键药物作用位点: AlphaFold2 无法指引 重要路口的方向

GPCR 就像一座繁忙的城市中心, 而小分子药物就是来自各地的游客, 试图找到这座城市中最关键的交汇点——正构位点。在这里, 小分子与 GPCR 的互动就像是在重要的路口触发了交通信号, 进而改变了细胞内的“交通

流向”, 对细胞功能产生重大影响。因此, 准确了解这个关键“路口”的结构, 对于基于结构的药物设计和功能研究至关重要。

在本文评估的 29 个 GPCR 结构中, 有 4 个是与小分子配体结合的受体。结果显示, 尽管 AlphaFold2 预测的 GPCR 主链结构与实验数据非常相似 (平均主链 RMSD 仅为 0.89 Å), 但一些关键残基的侧链却出现了显著差异,

导致侧链 RMSD 高达 1.90 Å, 整体原子 RMSD 为 1.52 Å。为了评估这些差异对药物设计的影响, 笔者使用了最常见的配体结合预测方法——基于 AlphaFold2 预测结构的分子对接。这也是在使用 AlphaFold2 模型进行药物设计时的常用步骤, 这种对接如果能重现结果, 说明 AlphaFold2 模型可以用于药物设计, 但很遗憾, 大部分对接都不能重现结果(图 3)^[7]。

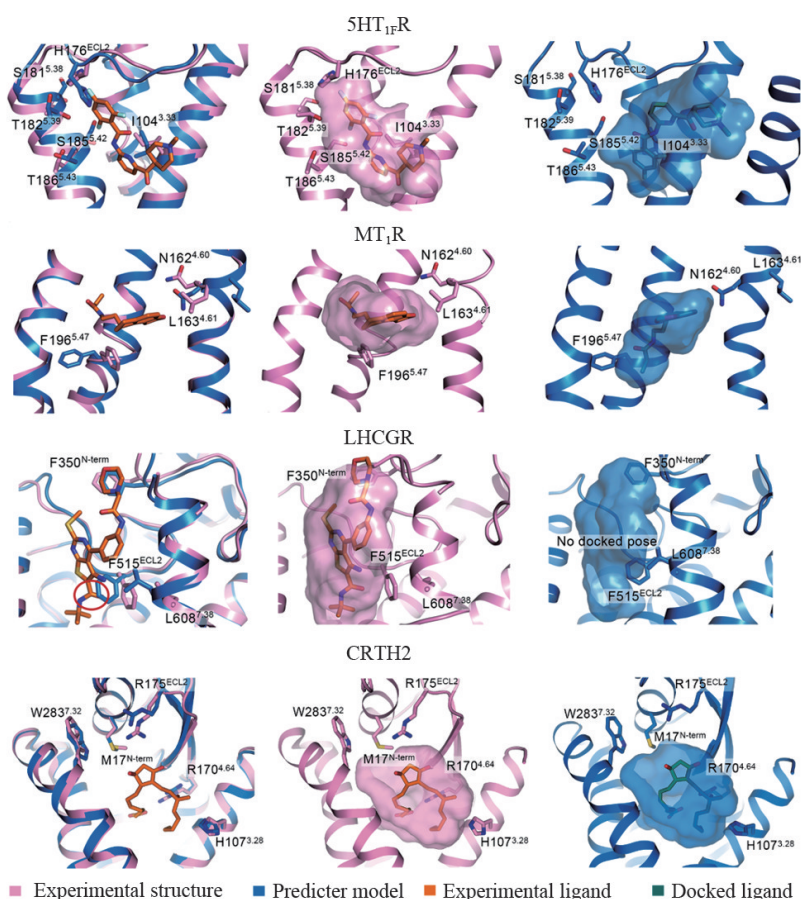


图3 AlphaFold2预测模型和电镜结构在小分子配体口袋上的对比

在5-羟色胺1F受体(5-hydroxytryptamine receptor 1F, 5H-T_{1F}R)的案例中,AlphaFold2预测的侧链排列出现了偏差,就像导航错误地引导车辆进入了狭窄的街道。一些侧链朝向细胞膜的中心“转向”,使得原本宽敞的“道路”变得拥挤不堪。这种变化阻碍了三氟苯环与H176^{ECL2}的相互作用,导致分子对接生成的小分子结合姿态与实验结构大相径庭,RMSD达到了7.15 Å,也完全没有重现相互作用。

在褪黑素受体1A(melatonin receptor 1A, MT₁R)的案例中,F196^{5.47}的侧链向外“偏航”,形成了一个意外的“隧道”,使得小分子更深入地“驶入”了受体内部。

此外,其他几个残基的侧链也发生了调整,导致对接后的小分子朝着TM螺旋束的中心移动,最终RMSD为4.79 Å。这就好比导航引导我们进入了一条未知的地下通道,偏离了预期的路线。

在LHCGR的案例中,尽管主链结构差异很小,侧链的不同却成为了关键的“路障”。F515^{ECL2}的侧链插入了TM5和TM7之间的“通道”,改变了顶部“交叉口”的环境,导致小分子配体甚至无法在预测模型中成功被对接。如果基于这些结构进行药物设计,结果可能就像是在堵塞的道路上行驶,无法到达目的地。

当然,在2型辅助T细胞上表达的趋化受体同源分子(chemoat-

tractant receptor-homologous molecule expressed on T-Helper type 2 cells, CRTH2)的案例中,预测模型与实验结构在正构位点的主链和侧链都高度一致,对接结果也显示小分子的预测结合姿态与实验数据几乎完全吻合,RMSD仅0.90 Å。然而,这种理想情况并不能在所有预测模型中得到保证。

5 TM6-TM7: 复杂多变的导航路线, AlphaFold2 往往难以把握

在GPCR的世界中, TM6和TM7这两段跨膜螺旋就像是细胞信号传递中的关键“交通枢纽”。它们并非固定不变的“道路”,而是会根据需要进行动态调整,为重要的下游信号分子(如G蛋白等)提供畅通的“通行路径”,确保它们能够顺利“抵达”目的地。然而,实验结构和预测模型在这些关键“路段”上往往存在显著差异,AlphaFold2在预测这些变化时也确实面临挑战,相关结果在图4^[7]中展示。

首先,研究这些“交通枢纽”在细胞外侧区域的差异发现,有些GPCR在预测模型中的TM6-TM7构象与实验结果有较大出入,误差超过2 Å。例如,在ghrelin受体和抗利尿激素受体(vasopressin receptor 2, V₂R)的“地图”中,这些关键“路段”的偏差分别达到了3.08 Å和2.83 Å,仿佛导航系统给出了与实际道路不符的指引。

在GLP1R和PTH2R的模型中, TM6和TM7被预测为“向上抬升”,与实验结构形成鲜明对比。

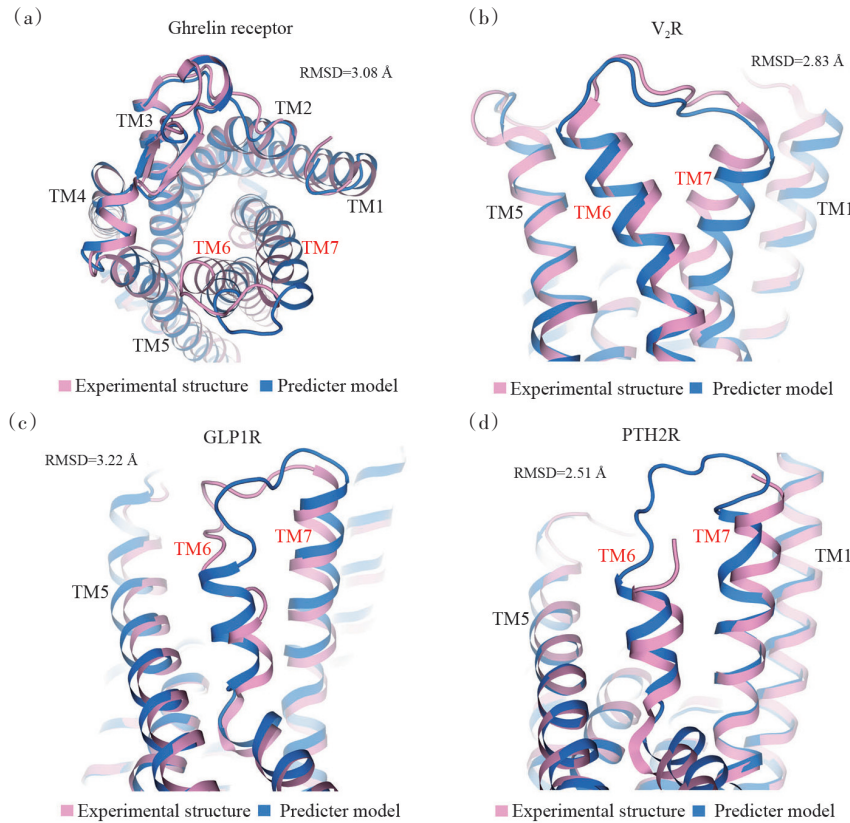


图4 AlphaFold2预测模型和电镜结构在胞外关键激活螺旋上的对比

这种“向上”的变化就像导航错误地显示了一座不存在的高架桥，导致原本应该“通行”的小分子无法正确“到达”结合位点，这对药物设计来说是个重大障碍。

同样地，细胞内区域的情况也值得关注(图5)^[7]。通过测量TM6的开启程度，我们可以了解这些GPCR在细胞内侧为蛋白结合伙伴预留的“通行空间”有多大。有趣的是，不同类型的GPCR在预测模型中预留的“空间”差异明显。对于没有结合G蛋白的A类GPCR，预测结构中预留的“空间”比实验结构更多，仿佛导航显示的道路比实际的更宽敞。而对于已经结合G蛋白的A类GPCR，预测结构中预留的“空间”却更少，像是AlphaFold2引导我们进

入了一条狭窄的单行道，导致下游蛋白的“行驶”受阻。

相比之下，B1类GPCR的预测模型与实验结构几乎完全一致，说明AlphaFold2在这部分的“地图绘制”非常准确。这可能是因为训练数据中包含了较多的激活态B类GPCR结构，就像导航系统在这些区域的数据更加丰富且可靠。

另外需要注意的是，某些A类GPCR的胞内环区3(intracellular loop 3, ICL3)在预测模型中被“描绘”成了一段长长的“直路”，这与实验结构中的“蜿蜒小路”大相径庭。例如，5HT_{1F}R和胆囊收缩素受体1(cholecystikinin A receptor, CCKAR)就出现了这种情况，就好比导航错误地告诉我们前方是一条笔直的大道，实际上却是一段曲折的山路。

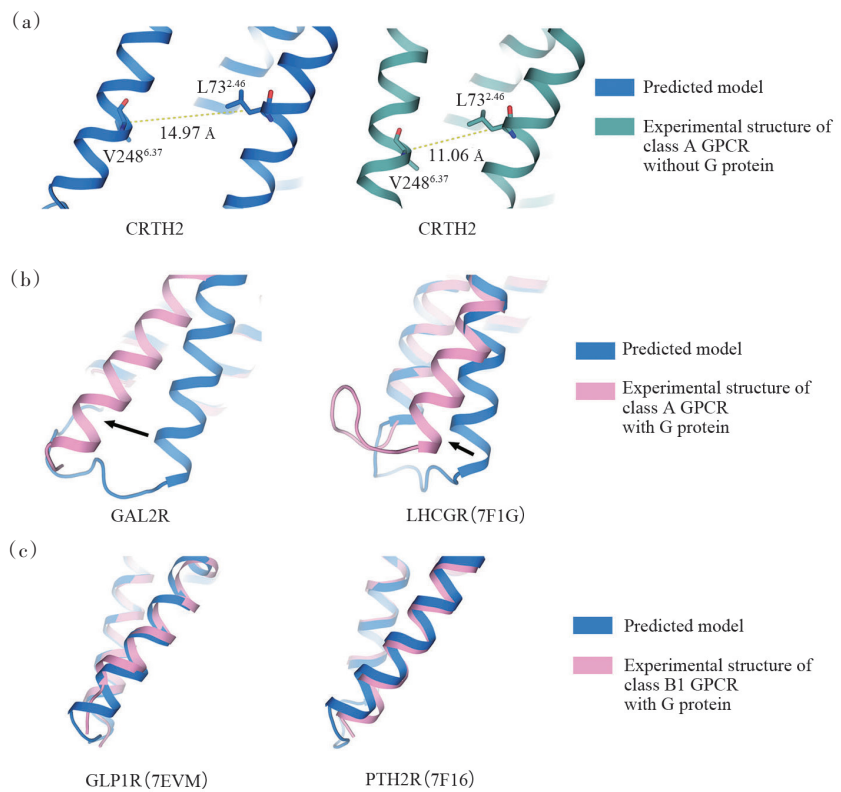


图5 AlphaFold2预测模型和电镜结构在胞内关键激活螺旋上的对比

6 蛋白结构预测的误差:为什么 AlphaFold2 有时会“迷路”?

在 AlphaFold2 的视角中,GP-CR 蛋白就像一张复杂多变的地图,但有时它会在某些关键区域给出与实际情况不符的“导航指引”。这些预测模型中不同的 ECD 和 TMD 的组合,就好比导航系统生成了与真实道路不一致的路线,虽然有时与驾驶者(科学家们)的预期不符,但也可能揭示了一些尚未被发现的、短暂存在的“道路”状态。

例如,在 GLP1R 的案例中,预测的 ECD-TMD 结构阻碍了肽的结合。这种误差可能是由于 AlphaFold2 在训练过程中缺乏足够的配体信息,导致无法准确重现有利于肽结合的特定 ECD-TMD 构象,就像导航系统的地图数据不完整,无法提供最佳路线。

预测与小分子结合的 GPCR 结构时,尽管主链的预测准确度达到 1 Å 左右,但这和 GPCR 本身的保守性关系很大。AlphaFold2 在预测与配体相互作用的“结合口袋”结构时仍面临挑战。更糟糕的是,在 LHCGR 的案例中,预测模型甚至未能形成适合小分子对接的“停靠点”,就如同导航缺少了关键的目的地信息,让旅程无法完成。如果基于这样的“地图”去设计药物,无异于在错误的地点寻找目标。

对于 TM6 螺旋的预测,AlphaFold2 似乎倾向于产生一种介于激活态和非激活态之间的“平均”构象。这种数据偏差导致的

预测结果,就像导航系统给出了 2 条路线的折中方案,但其实只有 2 条道路可以走,中间这条路是不稳定,走不通的。此外,ICL3 区域的预测也常常出现过长的螺旋结构,而在实验结构中,这些区域通常是灵活多变的。这可能是因为 AlphaFold2 从包含骨限制性干扰素诱导跨膜蛋白样(bone-restricted interferon induced transmembrane protein-like, BRIL)融合蛋白的非天然 GPCR 结构中学习。

7 未来研究,要谨慎使用 AI 模型

通过这些例子,我们认识了 AlphaFold2 在 GPCR 结构预测中的局限性,作为从提出到获得诺贝尔奖的最快例子之一,AlphaFold2 为研究领域带来了革命性的变化,但仍不能忽视其潜在的问题。在未来的研究中,科学家们需要谨慎地使用这些预测模型,结合实验结构生物学的方法,进行配体结合位点和激活机制的相关验证,以为真实的药物设计提供参考。AlphaFold2 为我们提供了探索蛋白质结构奥秘的工具,但同时也提醒我们,在拥抱新技术的同时,仍需脚踏实地,通过实验发现真实蛋白构象,共同绘制出更精确的蛋白质“路线图”。

参考文献(References)

[1] Senior A W, Evans R, Jumper J, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning[J]. *Nature*, 2020, 577(7792): 706-710.

- [2] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [3] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500.
- [4] García-Nafria J, Tate C G. Cryo-electron microscopy: Moving beyond X-ray crystal structures for drug receptors and drug development[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2020, 60: 51-71.
- [5] Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, et al. GPCR drug discovery: Integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18(1): 59-82.
- [6] Duan J, He X H, Li S J, et al. Cryo-electron microscopy for GPCR research and drug discovery in endocrinology and metabolism[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2024, 20(6): 349-365.
- [7] He X H, You C Z, Jiang H L, et al. AlphaFold2 versus experimental structures: Evaluation on G protein-coupled receptors[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2023, 44(1): 1-7.
- [8] Hauser A S, Attwood M M, Rask-Andersen M, et al. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(12): 829-842.
- [9] Fan W J, Xu Y W, He X H, et al. Molecular basis for the activation of PAF receptor by PAF[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(7): 114422.
- [10] Zhu K F, Yuan C, Du Y M, et al. Applications and prospects of cryo-EM in drug discovery[J]. *Military Medical Research*, 2023, 10(1): 10.

Why AlphaFold cannot replace structural biology: An exploration of the accuracy of AI-based structure prediction

HE Xinheng, LI Junrui, XU Huaqiang*

Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China

Abstract The rapid development of artificial intelligence has profoundly impacted biological research, with a revolutionary breakthrough achieved by AlphaFold2 in the field of protein structure prediction. The reliability of AlphaFold2 for predicting the structure of GPCR was evaluated in this paper. Due to its highly accurate predictions on protein three-dimensional structures, AlphaFold2 has been widely applied to the structure study of proteins of unknown functions, complex protein complexes, and drug targets. However, in practical applications, the predictions from AlphaFold2 are not always sufficiently precise across all scenarios. For instance, in the case of G protein-coupled receptors (GPCRs), which belongs to a critical class of drug targets being involved in a wide range of physiological processes, structural research is essential for understanding their functional mechanisms and drug development. The results indicate that while AlphaFold2 has accurately captured the main features of the overall GPCR backbone, its predictive models exhibit significant discrepancies compared to experimentally resolved high-resolution structures. These discrepancies are particularly evident in the assembly of extracellular and transmembrane domains, the shape of ligand-binding pockets, and the conformations of signaling interfaces. Such limitations have constrained the applicability of AlphaFold2 models in GPCR functional studies and structure-based drug design. Therefore, although AlphaFold2 has provided a powerful tool for structure prediction, its limitations in specific scenarios suggest that AI-based structure prediction, as an auxiliary tool, cannot fully replace experimental structural biology. A combined approach remains necessary to support pharmacological research and drug design.

Keywords AlphaFold2; protein structure prediction; structural biology; cryo-electron microscopy; G protein-coupled receptors; drug design ●



(责任编辑 徐丽娇)