

分子生物物理：一个迅速发展的学科领域

Molecular Biophysics: A Rapid Development Branch of Science

王大成

(中科院生物物理研究所, 教授)

分子生物物理是介于分子生物学、生物化学和生物物理学之间的边缘性学科, 其中心内容是在三维水平研究生物大分子的结构及其与生物功能的关系。尽管生命现象绚丽多彩, 生命机体千差万别, 但它们具有共同的物质基础——以蛋白质(包括酶)和核酸为主要内容的生物大分子。现在知道, 与非生命物质比较, 以蛋白质和核酸为代表的生物大分子在结构上的一个重要特点, 就是其特定的三维结构(空间结构)对其功能具有极大的重要性。可以说, 没有特征的空间结构就没有复杂的蛋白质和核酸的生物功能。因此, 要了解各种生物学过程, 深入探讨生命活动的本质规律及其实际应用, 对生物大分子三维结构的认识极为重要。事实上, 作为现代生物学主流的分生物学的发展和生物大分子三维结构研究的进展几乎是相伴而行的。研究和测定生物大分子三维结构的各种方法和技术, 完整、精确、实时(动态)地测定各种重要生物大分子的三维结构, 在三维水平上研究蛋白质、核酸等重要生物大分子的结构与功能的关系, 以探讨各种重要生命活动的本质及其在生物技术发展中的可能应用, 所有这些构成了分子生物物理研究的主要内容。本文主要就这一分支学科的一些前沿领域的现状及近期发展趋势, 作一介绍。

一、生物大分子的晶体结构研究

迄今, 测定生物大分子完整和精确的三维结构最主要的方法, 是以X射线衍射技术为基础的晶体结构分析。自1960年首次测定肌红蛋白的晶体结构以来, 以多对同晶置换法为中心的生物大分子晶体结构测定方法和技术从完善、成熟, 进入了广泛应用的阶段。目前, 已测定一批蛋白质、核酸和多糖的晶体结构, 使一些重要生命现象的分子机理得到阐明。它们对其他一些研究领域也产生

了重大影响, 并构成第二代遗传工程——蛋白质工程诞生和发展的重要基础。截至1990年4月的统计, 在原子分辨水平解析结构, 并将原子坐标存入国际数据库的生物大分子总数是535, 其中蛋白质488, 核酸37, 多糖10。此外, 还有相当数量已经测定的结构, 由于具有实际应用价值等方面的原因, 结果尚未公布。彩图1是我国科学工作者以高分辨率测定的胰岛素晶体结构。近年来, 由于方法和技术的新发展, 结构测定的速度明显加快。可以预期, 生物大分子的晶体结构数在今后几年内会迅速增加, 对其他有关研究领域的影响和作用也将迅速扩大。

近年来, 这一领域影响重大的研究成果主要包括:

1. 第一个膜蛋白(紫菌光合作用中心)的晶体结构被测定(见彩图2), 细菌光合作用光反应的分子机理得到阐明。由于光合作用在整个生命循环中的重要地位以及膜蛋白结构测定的开创性, 该项研究获得1988年诺贝尔奖。

2. 首批动物感染病毒(人感冒病毒、口蹄疫病毒)的晶体结构被测定(见彩图3), 病毒感染及其免疫逃避的结构基础得到了解, 由此开创了抗病毒药物设计的新方向, 并对病毒的疫苗设计提供了新希望。由于病毒病(从常见的感冒到艾滋病)至今在医学临床上还是束手无策的, 由此开辟的病毒结构、病毒药物和疫苗设计的研究正在成为新的研究热点。

3. 一些抗体——抗原复合物的晶体结构得到阐明(见彩图4), 导致人新型抗体(如抗T细胞的单克隆抗体)的设计和构建获得成功;同时, 首次测定人白细胞抗原HLA-A₂的晶体结构(图1), 使细胞调节的免疫反应的分子基础得到阐明。这两方面构成了对免疫反应结构机理的深刻了解, 具有重要的医学应用前景。此外, 在核酸—蛋白复合物结构研究方面也有重要突破, 这将在本文的第

三部分中述及。

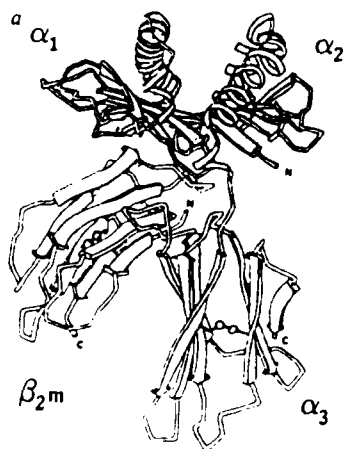


图1 人 I 类组织相容性抗原HLA—A2的三维结构。抗原辨识和结合位置在钳型的两螺旋之间，它们分属 α_1 和 α_2 结构域

这一领域今后发展，主要将集中在下述一些方面：

1. 研究蛋白质和核酸结晶的规律，寻求更多更快更好地获得生物大分子单晶体的方法与技术。目前生物大分子的晶体生长在相当程度上仍依赖于经验和“手艺”，已经成为结构测定的主要限速因素。如化学结构已知的蛋白质已经上万，但能获得单晶体的却只有几百。所以，这方面的研究进展将对开创生物大分子晶体结构研究的新局面产生重要影响。

2. 发展衍射数据快速收集方法。X射线单晶衍射数据的收集是决定晶体结构测定速度和精度的另一关键环节。继70年代和80年代初期出现计算机控制的衍射仪和回摆底片法之后，近期又发展出了各种类型的面探测器和同步辐射光源。在转靶X光机上，面探测器可使数据收集速度提高1~2个数量级。同步辐射光源的运用已影响到整个X射线晶体学，就像激光的出现对光学领域的影响一样。特别是劳埃照像术的应用，使在极短时间($10^{-6} \sim 10^{-9}$ 秒)内完成衍射数据的收集成为可能，从而正在克服晶体结构静态特征这一致命弱点。

3. 蛋白质动态结构的研究。现在已经肯定，蛋白质分子的运动性是其基本属性之一，具有重要的结构和功能意义。因此，准确测定蛋白质分子的构象运动，了解运动与功能的关系，建立真实意义的蛋白质动力学，是一个重要的研究方向。

4. 膜蛋白、病毒、核酸—蛋白复合物、脂—蛋白复合物等重要生物大分子的三维结构研究。这些都与更复杂更重要的生命活动相关，需要应用更新的方法和技术，是以对象而言的重大研究课题。

5. 与蛋白质工程相结合，研究新水平的蛋白质结构—功能关系。通过蛋白质工程途径可以获得各种改性和变构的突变体蛋白质，研究它们的结构与性能，可以前所未有的深度了解蛋白质结构与功能的关系。

二、生物大分子的溶液结构研究： 二维和三维核磁共振结构分析

由于溶液体系更加接近于生理状态，而且无须通过结晶这一困难环节，所以准确测定溶液状态下生物大分子的三维结构具有十分重要的意义。长期以来，在这方面缺乏有效的方法。最近十年，随着高分辨率核磁共振谱仪(目前已达500和600MHz)的出现，二维核磁共振(NMR)结构分析技术迅速发展，已经成功地用于测定较小蛋白质的完整溶液结构。这是目前能测定高分辨率溶液结构的唯一方法，它在晶体结构分析之外开辟了测定蛋白质三维结构的第二条重要途径。迄今，用二维核磁共振方法已测定了20多个不同的球蛋白溶液结构，它们的分子量都在20 000Da(道尔顿)以内。在这些结构中，约有一半目前还没有相应的晶体结构。另有20多个多肽分子的二维核磁共振结构也已被测定。

二维核磁共振结构解析应用于较大分子量(>20 000Da)的蛋白质，目前在方法和技术上仍有一系列困难有待解决。同时，按照对一个普遍适用的成熟方法的要求，也还存在不少问题。因此，其近期的发展主要将有两个方面：

1. 使小蛋白质二维核磁共振结构分析方法常规化、一般化，达到成熟和广泛应用的水平。目前，即使对小于20 000Da分子量的蛋白质，结构解析的成功率也因具体对象和条件不同而有很大差异，使其应用受到很大限制。

2. 发展三维核磁共振波谱分析技术，提供测定中等大小(20 000~30 000Da)蛋白质溶液结构的方法。研究较大蛋白质的主要困难是，二维谱中交叉峰重叠，使谱的指认难于运用二维法完全解析。将二维解析扩展到三维是提高分辨率最直接的办法。目前，已有同核三维核磁共振谱分析的初步报道。异核三维核磁共振分析与同位素标记相结合，已用于27 500Da蛋白质的研究，分辨率大为提高。三维核磁共振分析对研究大分子量蛋白质的溶液结构显示了很大的应用前景。

核磁共振方法在生物大分子体系的应用，今后将不仅限于溶液结构测定，下述两方面近期亦可望获得迅速发展：

1. 用于蛋白质动力学研究。核磁共振有可能在 10^{-9} 秒(弛豫测量)到千秒(酰胺交换)的时间

范围内提供蛋白质动力学信息,实现这一可能性的技术途经和实际应用正在开发中。

2. 用于蛋白质折叠研究。二维核磁共振技术与抗体跟踪等方法相结合可形成一种强有力的手段,用以辨识蛋白质折叠过程中的中间体,并确定其结构特征,这对研究折叠的基本分子机理极为重要。

三、核酸与蛋白质的专一辨识和相互作用

以核酸为载体的遗传密码的发现及其与生命机体的生长、发育、繁殖的本质关系的阐明,是20世纪最重大的科学成就之一,构成现代生物学发展的主要基石。关于遗传密码复制、转录、翻译过程中的详细分子机制,目前尚待查明。其中,核酸(包括DNA和RNA)与蛋白质的专一辨识和相互作用处于研究的中心地位。近年来这方面研究已取得重要进展,并将继续作为研究前沿受到重视。

DNA—蛋白质 对所有的细胞生物功能来说,DNA—蛋白质的专一辨识和相互作用起着关键作用。过去几年,以一系列DNA结合蛋白及其与相应DNA片段复合物的三维结构测定为基础,人们对上述过程的分子机理已有了相当多的了解,阐明了一些与基因复制、限制、DNA超结构有关的一些蛋白质的三维结构,如E.Coli DNA聚合酶I、限制性内切酶EcoRI、组蛋白及其复合物等。但了解得最为详细的还是一系列基因转录调节蛋白及其与DNA的复合物(见彩图5)。目前,至少已测定了7个阻遏蛋白及其与相应DNA(操纵基因)片段复合物的三维结构。精确的空间结构图揭示出DNA与蛋白质辨识和相互作用的主要情况,包括:

1. 蛋白质以一种结构模块“螺旋—转折—螺旋”与DNA相辨识和结合(图2);

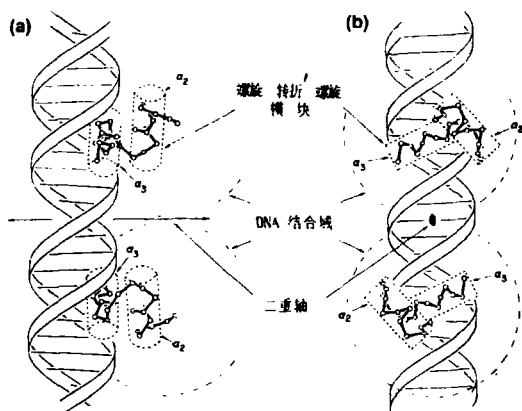


图2 基因调控蛋白的“螺旋—转折—螺旋”模块与DNA的专一辨识和结合

2. α_3 螺旋用其特征的氨基酸侧链与DNA主槽中的核苷酸进行专一辨识和结合,作用力包括氢键、盐键和范氏作用;

3. DNA主要以B型构象参与结合,但在结合过程中有扭转变形(图3);

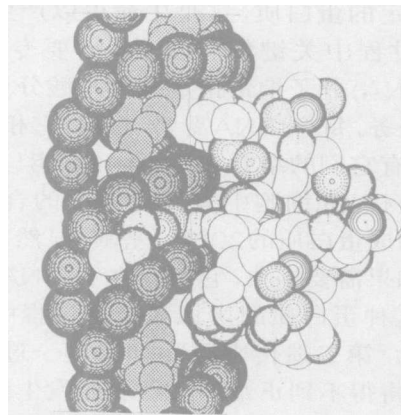
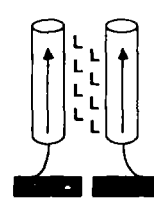
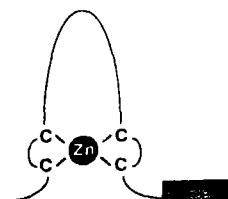
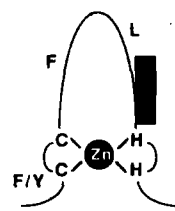
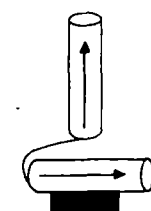


图3 DNA主要以B型构象与蛋白质结合,但分子骨架需发生扭转变形。图中可见DNA骨架的弯曲

4. 对DNA结合蛋白的更广泛研究显示,真核生物转录调控蛋白与DNA辨识和结合的模式包括三种类型(图4):(1)螺旋—转折—螺旋(两段螺旋被一 β 转折分开,其中一段为辨识螺旋);(2)锌指模块(单个锌离子与半胱氨酸和组氨酸配位,其间有肽段像手指一样伸出,又分为二种亚型);(3)亮氨酸拉链式模块(在两段螺旋对侧相间排列4~5个亮氨酸残基,疏水侧链交错对插形成拉链式结构)。

螺旋—转折—螺旋

Cys—His锌指模块



Cys—Cys锌指模块

亮氨酸拉链模块

图4 蛋白质与DNA专一辨识和结合三类(四种)结构模式,阴影部分为与核酸结合位置

上述关于DNA与蛋白质相互辨识和作用的知识,对了解复杂的基因调控过程正产生重要影响

响。

RNA—蛋白质 核糖核酸(RNA)是另一类重要的核酸物质,许多重要生命过程的机理都涉及RNA与蛋白质的相互作用。在遗传密码控制下,规定的氨基酸按特定的序列在核糖体上连接“装配”成指定的蛋白质,这是生命得以产生的基础。在这一过程中关键的一步是,需要专一的转移RNA(tRNA)分子携带指定的氨基酸分子。为了执行这一任务,每个tRNA需要一种与它相匹配的合成酶,只有它们的结合才使得tRNA能与正确的氨基酸相连接。在细胞中有20种不同的合成酶各自相应于构成蛋白质的20种氨基酸。显然,遗传密码的翻译如果需要字典,它就存在于tRNA与其氨酰合成酶这种蛋白质的辨识和作用过程中,有时也将这称为“第二遗传密码”。如果这一过程发生差错,细胞将得不到正常的蛋白质而发生混乱,从而使生命遭到破坏。那么,一个特定的tRNA合成酶(如tRNA^{Gln}—合成酶,它以携带谷氨酰胺的tRNA分子为专一作用对象)如何保证它只结合自己的作用对象(如tRNA^{Gln})而不会“张冠李戴”?其奥秘就存在于这两者(tRNA—酶)的专一辨识和作用之中。科学家为探索这一奥秘已经历了近30年,最近已获得突破性进展。1989年底美国耶鲁大学的steitz小组首次测定了tRNA^{Gln}—合成酶与tRNA^{Gln}复合物的晶体结构,使人们首次直接“看到”这两种分子之间的结合与作用,从而使这二者间专一辨识的机理开始得到了了解(见彩图6)。最近第二种这类复合物(tRNA^{Asp}—合成酶与tRNA^{Asp}的复合物)的精确结构也得到阐明。这为“第二遗传密码”的解译奠定了坚实的基础。

核蛋白体三维结构 核蛋白体是蛋白质生物

合成的主要场所,氨基酸按特定序列装配成为多肽链就在这里进行。要了解这一“生命摇篮”的精细机理,必须阐明核蛋白体的分子结构。核蛋白体是包括复杂的核酸与蛋白质相互作用的超分子体系,一个典型的细菌核蛋白体分子量为230万,大亚基(50s)含35个不同的蛋白质和2个RNA链,小亚基(30s)含21个蛋白质和一个RNA链。最近,活性核蛋白体颗粒已经获得结晶,并已对其三维结构的解析发起攻击,联合晶体学研究和三维重构技术已以低分辨率给出了初步模型。这是90年代可望有突破性进展的重要课题。

此外,蛋白质折叠研究(protein folding,指按编码基因指导合成的线性多肽链自动卷曲形成具有三维结构特征天然蛋白质的过程)、**新型蛋白质的设计与构建**都是处于当前分子生物物理研究前沿的重要研究领域。

结 语

分子生物物理研究在80年代发展迅速,成就突出,它的一些主要前沿已经成为在分子水平上了解一些重要生命现象的本质和机理的关键,并与新一代生物技术(蛋白质工程)的开拓与发展密切相关。近年来,这一分支学科的影响已迅速扩展到分子生物学、免疫学、药理学、合成化学、理论化学、蛋白质工程学等各方面。进入90年代,这一趋势还将继续,分子生物物理研究将面临更多更大的挑战,获得更加迅速发展的新机遇。

(责任编辑 朱世南)

彩图说明

一些重要生物大分子的三维结构 (彩图见封二)

彩图1:我国科学工作者测定的胰岛素(一种激素蛋白质)的晶体结构。一对红绿分子构成一个二聚体,三个二聚体绕着中心的两个锌原子形成一个对称排布的六聚体。

彩图2:紫菌光合作用反应中心蛋白的空间结构。这是首次测定的细胞膜蛋白结构,白、兰、红、黄分别示出碳、氮、氧、硫原子,接近中心的褐色显示出叶绿素等色素基团。光能从分子的顶端(膜外)传递到底部(膜内),转换成化学能供有机体使用。

彩图3:人感冒病毒蛋白的空间结构。这是首次测定的动物感染病毒结构,不同颜色代表构成该蛋白质的4个亚基,彩色球示出了病毒的抗原位置,凹陷峡谷式空

间是病毒与寄主细胞结合部位。

彩图4:(A)首次阐明的抗体—抗原复合物结构。兰、黄色示抗体的重链和轻链,绿色示抗原(溶菌酶分子)。(B)是将抗体和抗原稍拉开后的景象,可以看到这两者的契合就像手伸进手套一样完善。(C)是将二者转90°的景象。

彩图5:一个基因调控蛋白(色氨酸阻遏蛋白)与DNA复合物的三维结构。可以清楚看见蛋白质(右,兰色)表面与DNA大槽相结合的两个部位,它们是二段 α 螺旋。

彩图6:一种转移核糖核酸(tRNA^{Gln})与其氨酰合成酶(tRNA^{Gln}—合成酶)复合物的空间结构。这是首次观察到这类复合物的精细结构,由此揭示的tRNA分子(左上部分)与酶分子(蓝色部分)的结合与作用,对阐明二者的辨识机理(“第二遗传密码”)有重要意义。