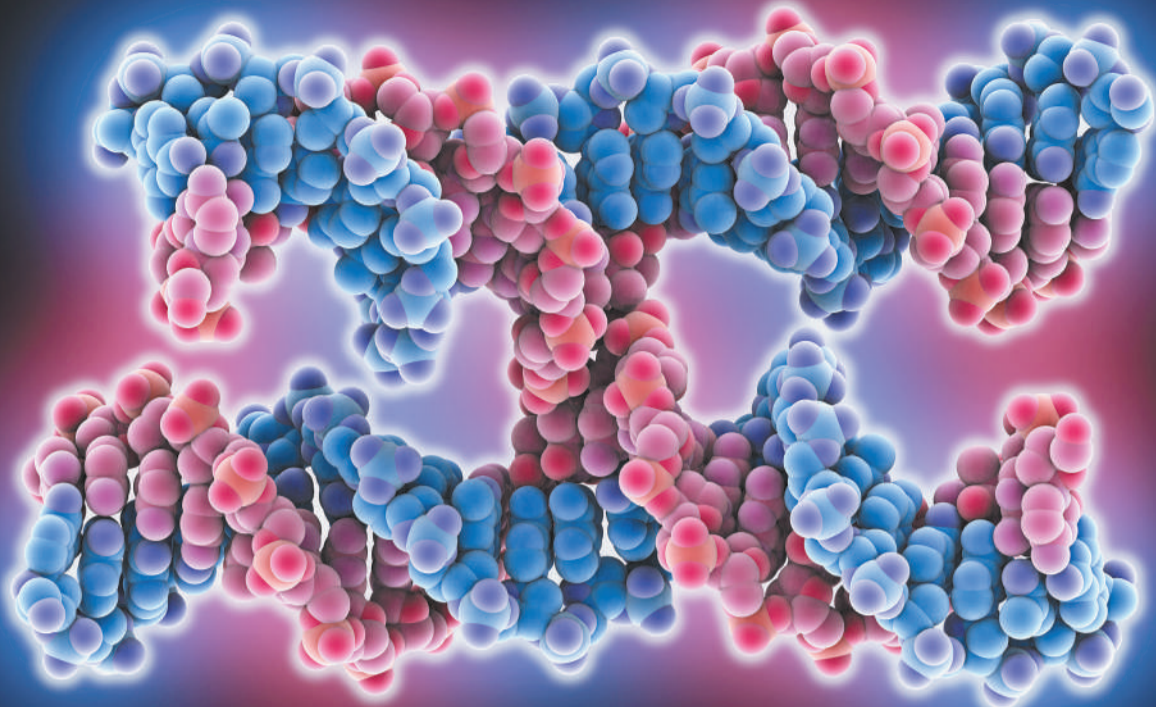


视觉中国



酶与底物的过招可追溯千万年,却始终无从参透。近日,施一公研究团队分别在《自然》和《科学》上发表文章,报道了人源 γ -分泌酶识别两种不同底物的高分辨率结构,继报道 γ -分泌酶蛋白本身的结构之后,更进一步还原生命物质间的“过招故事”。

施一公团队顶级期刊连续发文—— 直击生命大分子过招中的力与美

本报记者 张佳星

冰封王座,一片莹蓝。
两名柔术高手的过招被定格在镜面般的冰层中。一束电子射来,击打在冰雕表面,它们弹跳开的轨迹将被高灵敏的感光元件捕获,上万倍地放大影像呈现出生命蛋白纠缠的力与美。

曙光出现在“半胱氨酸交联”上

冷冻电镜的发明,让人们可以直观地“看到”微小的蛋白分子,而要看到它们的相互作用,却并不容易。这就好比拍照时的静态和抓拍,前者随时可以“咔嚓”,后者却讲究个时机。而酶与底物相互靠近到“过招”再到分离(结合—酶切—解离),是高度动态的过程,这意味着抓拍的时机极难获得。

怎么办?好的摄影师将促成最自然的“摆拍”,在这里是想尽办法获得酶与底物的复合物。“我们尝试过很多方法把它们‘撮合’到一起。”杨光辉说,最常用的是把它们的基因整合到一个质粒中,然后转入实验用的细胞中,使 γ -分泌酶和底物同时分别表达,“我们想既然它们都在一起了,肯定会相互作用的,有可能获得结合的复合物。”

最常用的方法并没有奏效,从培养细胞中提取的蛋白并没有出现复合物的影子。既然制造机会不行,那就只能“拉郎配”了。随后团队将酶和底物的基因直接“嫁接”到同一个表达区域里,强制性地希望两者成为一个整体,

引入突变完成结对“摆拍”

半胱氨酸交联的难题是,在哪里进行修饰,引入突变。早老素(γ -分泌酶的核心组分)有467个氨基酸,底物有100个氨基酸,如果全部试一遍将是天文数字。“突变引入的位置不恰当,除了可能根本连接不上之外,还可

“酶与底物的相互作用短短一瞬,就好像剪刀剪断绳子的刹那,我们要探知的是这个瞬间的结构和机理。”文章第一作者、清华大学生命科学学院博士后杨光辉表示,人源 γ -分泌酶不仅是阿尔兹海默氏症(俗称老年痴呆症)发病过程中的关键因素之一,还“执掌”着生长、发育相关的Notch信号蛋白的切割工作,稍有差错可能诱发肿瘤。

仍旧没有奏效。“我们还试了很多其他的方法,但获得酶与底物的复合物结构难度非常大。”杨光辉说,“这也是为什么蛋白质复合物结构的解析经常需要数年探索。”

曙光出现在一种被称为“半胱氨酸交联”的方法上。这个复杂的名词在生活中却十分常见,例如烫头发过程中就发生了半胱氨酸交联,卷发后半胱氨酸交联在一起固定发型。它的原理是,在氧化剂存在的条件下,蛋白质中距离足够近的两个半胱氨酸形成二硫键,从而交联在一起。

在博士期间从事过半胱氨酸交联的相关实验,让杨光辉对这一方法十分熟悉,他在与导师沟通实验进展时讨论并提出了这个方法,希望能带来转机。“科研是一个厚积薄发的过程,前面学习到的很多东西,很可能有某一种是攻克其他重要课题时用得着的。”杨光辉始终记得老师施一公的指导,在大量的文献中学习积累、独立思考,才能在遇到困难时,找到正确的思路。

能使得蛋白本身不表达,或者使得蛋白的性质、功能等发生改变。”杨光辉说,在做之前虽然很难说有八成把握,但是过往的积累和思考能够帮助探索加速。

在谜底揭开前,他们并不知道酶和底物

“过招”时哪个部分离得最近。“由于2013年时,我们曾获得了 γ -分泌酶的三维结构,因此对这个酶有一定的了解。”杨光辉说,团队选择了柔性最强的区域。因为酶在进行作用时肯定要发生构象变化,柔性意味着这里是可能的变化区域。

杨光辉还对该区域进行了精细到序列位点的分析,一定程度上预估了酶与底物作用时可能发生什么。通过综合考虑多种信息,最终,团队在酶和底物上分别先挑选了4个位点,以16种组合进行试验,对基因上的点稍作修饰,让部分区域的氨基酸分子表达为半胱氨酸,在氧化环境下,二硫键的吸引力让二者的结合成为可能,复合物也就“摆拍”成型了。就这样通过让蛋白质与底物换各种“摆拍”方式,蛋白质电泳在大小正确的位置上终于有了像模像样的条带。“那是2017年的冬天,我们终于获得了复合物。”杨光辉说,难以置信和兴奋异常结伴而来,让他连着几天也没能睡好,毕竟,

高分辨率结构揭开复合物谜团

施一公团队完成了对 γ -分泌酶与底物Notch的复合物结构解析,分辨率高达2.7埃(1埃等于0.1纳米),这是第一个 γ -分泌酶与底物复合物的高分辨率结构,也是第一个膜蛋白水解酶与底物的复合物结构。利用相似的策略,团队顺利获得了 γ -分泌酶与另一个重要底物淀粉样前体蛋白(APP)的稳定复合物,并获得了其冷冻电镜结构。

在冷冻电镜的高分辨率结构中,一切细节被数万倍放大,相互作用的谜团也被一一揭晓。回过头看时,身为发现者,杨光辉也对生命机理的奇妙感到惊喜:“所谓眼见为实,真的是亲眼见到才敢相信酶和底物是这么作用的。”

“ γ -分泌酶是一个跨膜蛋白,因为细胞膜的主要成分是磷脂,上面的蛋白应该是亲脂不亲水的,而它对底物的切割却需要水解,这是一个矛盾。”杨光辉进一步解释,酶却可以处理得很好。结构显示,在跨膜区靠近细胞内的一侧,早老素通过构象变化,与底物的胞内段形

γ -分泌酶与其底物都是跨膜蛋白,获得它们的稳定复合物是世界级难题。

“不能盲目相信它就是了,虽然蛋白分子大小与期望中的复合物一致,但也要反复求证。”杨光辉说,这是后面实验的基础,如果不对这一步“较真”,后面的实验是有风险的。

根据分子量的初步判断,就好像从两个人的体重分辨。为了在真身显露(上冷冻电镜)之前,再多加几成把握,团队从不同的角度开始验证。

“既然二硫键是在氧化条件下形成的,那么在还原条件下就应该能够解开,分别变成单体。”杨光辉说,实验证明了他们的猜想,变成单体之后的分子量也与早老素和底物的大小一致。

随后,团队还通过免疫印迹、质谱鉴定等方法分别对自己苦苦追寻到的复合物进行考察,最终每一个结果都成功地复合物“加了分”。

成稳定的 β -sheet结构,为稳定底物提供了保证。底物被酶变化出的新结构 β -sheet“锚定”住,同时“解旋”。原先被隐藏在“腹中”的“弱点”一下暴露出来,只等酶切。也正因为解旋的作用,亲水的基团得以出头,推动酶的水解工作完成。这一结构观察第一次直观证明了长久以来膜蛋白水解酶酶切底物时,底物蛋白需要发生解旋的猜想。此外,根据得到的结构,研究组提出了 γ -分泌酶结合底物并依次进行多步酶切的机理:底物的跨膜螺旋随着切割的进行逐步解旋,并与 γ -分泌酶形成新的中间态复合物再次进行切割。

近年来,多数治疗阿尔兹海默症的方法是通过抑制 γ -分泌酶的活性来减少淀粉样沉淀的,然而由于 γ -分泌酶的“一酶多功能”,单纯地对其抑制甚至可能会抑制对Notch的切割,增加患上肿瘤的风险。精细地分析酶对不同底物关键作用位点的功能,将可能研发特异性抑制APP的切割而不影响Notch切割的药物。

封面故事

网状结构形成机制 找到肌球蛋白蛋白

 《细胞生物学》
2019.2

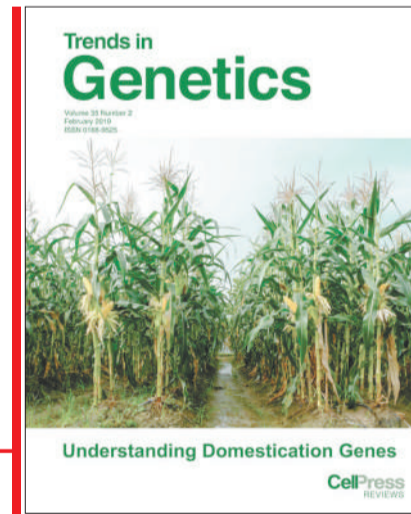

肌球蛋白细胞骨架负责细胞和组织中大多数力驱动的过程,它在适当的时间和地点组合成必要的结构是一个重要课题。新加坡国立大学机械生物学研究所的普丽蒂·阿加瓦尔等研究人员,最近在动物模型中阐明了肌球蛋白调节的分子机制,并找到几个共同原则。肌球蛋白网络结构(决定其功能的重要因素)是肌动蛋白聚合、交联和翻转、局部肌球蛋白激活和收缩性驱动的自组织结果。Rho GTP酶调节剂通过组织特异性表达和亚细胞定位实现时空调控。肌球蛋白结构的亚细胞锚点控制着它们收缩的结果,而分子反馈机制决定了这种调控短暂还是持久。

综合信号通路介导 宿主对抗细菌由

 《微生物学》
2019.2


哺乳动物的免疫系统包括一系列复杂的抗菌机制,但某些病原体还是发展出颠覆性策略来检测、调节或逃避免疫控制和清除。科学家们已经通过宿主免疫学找到细菌发病机制,但在自然感染过程中,细菌和宿主之间的跨界信号传导仍然知之甚少。美国乔治亚大学兽医学院传染病学系的赫斯塔尔等研究人员,通过博德特氏菌感染小鼠的实验模型,发现一个有效的自然宿主感染系统,识别出全新的调控机制,并证明博德特氏菌可以对微环境和炎症状态信号作出反应。

基因功能差异新机制 发现不同农作物

 《遗传学》
2019.2


玉米作为一种具有重要经济价值的模式作物,具有丰富的遗传资源,在揭示驯化和植物改良的遗传途径方面具有重要意义。然而,美国加州大学伯克利分校植物和微生物学系的董朝滨(音译)等研究人员,发现驯化玉米和影响其他禾本科作物产量的一些重要途径。在一些情况下,密切相关的禾本科作物基因之间存在功能差异,似乎不是蛋白质功能的简单差异造成,而是一种调节模式的选择。这表明驯化基因需要放在整个基因组结构和它们所影响的物种特异性过程中进行综合考量,才能对农作物进行基因改进。

(本栏目主持人:陆成宽)

(本版图片除标注外来源于网络)

吹弹可破的婴儿肌肤,脂肪层潜藏抗菌新靶点

第二看台

洪 昀 柯怀鸿 本报记者 谢开飞

婴儿的肌肤不仅似剥了壳的鸡蛋一般“吹弹可破”,而且还能够抵挡致命皮肤病菌感染!但随着年龄增长,这项天然免疫功能将逐渐消失,增加病菌侵害的风险!有无解决办法?

如今,这个疑问有了新答案。国际顶级期刊《细胞·免疫》日前在线发表了厦门大学张凌娟教授团队与加州大学圣地亚哥分校理查德·加罗教授的最新成果,揭秘了人类老化过程中,皮肤如何丢失脂肪细胞并导致天然免疫抗菌能力下降的机制,其中发现的皮肤脂肪细胞的免疫功能调控点,有望成为治疗致命皮肤病菌感染的新药物靶点。

皮下脂肪细胞能对抗超级细菌

皮肤是人体最大的器官,金黄色葡萄球菌(MRSA)是皮肤上最常见的致病菌。近年来,肆虐全球的抗药性金黄色葡萄球菌,已成为最

致命的病原体之一,美国每年因MRSA感染的死亡人数超过两万,中国MRSA感染人数也不断攀升。

张凌娟团队在研究中发现,婴儿皮下有很厚的一层不成熟脂肪,不但让婴儿皮肤看起来丰满有弹性,这层脂肪还有很重要的免疫防护功能,尤其是在婴儿的骨髓和淋巴免疫系统还没发育完全时,这个脂肪层能够保护婴儿皮肤不被某些病原体感染。

“这些感染性的病原体种类繁多,当中就有超级细菌MRSA。”张凌娟告诉记者,在皮肤感受到金黄色葡萄球菌的威胁时,脂肪前体细胞会快速分化,而在脂肪前体细胞转化为不成熟的脂肪细胞过程中,分泌大量抗菌肽蛋白,从而有效地抑制细菌生长。

肥胖的人脂肪也多,是否意味着肥胖能够增强抗菌力?张凌娟强调,只有不成熟的脂肪细胞才有抗菌功能,肥胖让脂肪细胞趋于成熟,反而失去了抗菌能力,并会诱发II型糖尿病。

张凌娟表示,随着年龄增长,这些皮下脂肪将逐渐减少,并在老化后消失殆尽,不但使皮

肤在外观上失去弹性,也让我们失去了来自皮下脂肪细胞的天然抗菌功能,增加被细菌感染

找到抑制脂肪细胞的“元凶”

真皮成纤维细胞是皮肤深处的特化细胞,具备分化成脂肪细胞并产生抗菌肽的能力,能够产生结缔组织并帮助皮肤从损伤中恢复。张凌娟团队在研究中,对不同年龄段的小鼠或人体皮肤的真皮成纤维细胞做了系统分析,测试了它们生成脂肪细胞的潜能。结果显示,老化过程中,皮肤脂肪丢失与真皮成纤维细胞失去脂肪分化能力密切相关。

张凌娟告诉记者,想让这层未成熟脂肪细胞不“退休”,持续“对抗”金黄色葡萄球菌,需找到在发育和老化过程中调控皮下脂肪细胞天然免疫功能的方法。

为了研究真皮成纤维细胞在成长及老化过程中这一功能转变的机制,研究团队对不同年龄段提取的真皮成纤维细胞做了系统的转录组基因测序分析,找到了抑制脂肪细胞生成的“元凶”——

TGF- β 信号通路。即随着年龄增长,TGF- β 信号通路被激活,导致真皮成纤维细胞丧失脂肪分化功能,取而代之的是纤维化功能增加。

找到“病因”,便可“对症下药”。在研究过程中,张凌娟团队发现TGFBR小分子化学抑制剂是TGF- β 信号通路的“克星”。“通过抑制剂来阻断信号通路,能够帮助真皮成纤维细胞恢复分化脂肪细胞的能力,从而增加皮肤对金黄色葡萄球菌的天然免疫抵抗力。”张凌娟说。

试验显示,经过TGFBR抑制剂治疗的成年小鼠,真皮白色脂肪组织层明显扩大,脂肪细胞和抗菌肽都回来了!同时,研究团队通过相关研究,验证了抑制剂对成人恢复真皮成纤维细胞分化脂肪细胞的能力也同样有效。

张凌娟表示,通过了解成长及老化皮下免疫系统变化,以及发现TGFBR抑制剂能够调控皮肤脂肪细胞的免疫功能,也许能成为治疗金黄色葡萄球菌感染的新药物靶点,但要在临床上应用,还有一段很长的路要走。该最新研究成果还为肥胖、糖尿病和自身免疫性疾病等其他疾病的病理、药理及药物研发提供了新思路。


 扫一扫
 欢迎关注
 生物圈1号
 微信公众号