

# 从 2009 年诺贝尔化学奖看同步辐射装置和技术在生物化学研究中的重要作用

董宇辉<sup>†</sup>

(中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

**摘要** 文章介绍了获得 2009 年诺贝尔化学奖的原核细胞核糖体结构解析的历程. 在这个历时 20 年的探索过程中, 同步辐射装置起到了重要的作用. 同步辐射这种大型的科学装置为前沿的科学研究提供了不可缺少的支撑, 文章通过核糖体结构解析的过程, 阐述了这种支撑所具有的明显的地域特征.

**关键词** 核糖体, 结构解析, 同步辐射, 蛋白质晶体学

## The 2009 Nobel Prize in Chemistry and the importance of synchrotron radiation technology in biochemistry

DONG Yu-Hui<sup>†</sup>

(Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** The determination of the structure of prokaryote ribosome, which was awarded the 2009 Nobel price in Chemistry, is reviewed. In the 20-year long history of this effort, synchrotron radiation facilities played an essential role. Such large scale scientific facilities are now indispensable in frontier research. Through the example of ribosome, the regional features of the support provided by synchrotron radiation is described.

**Keywords** ribosome, structure determination, synchrotron radiation, protein crystallography

2009 年的诺贝尔化学奖授予了 Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz 和 Ada E. Yonath 三位科学家, 以表彰他们在核糖体结构和功能方面做出的贡献. 这是继 1962 年球蛋白结构, 1988 年光合作用中心结构, 1997 年 ATP (三磷酸腺苷) 合酶结构, 2003 年钾离子通道结构, 2006 年 RNA 聚合酶结构后, 诺贝尔化学奖再一次授予结构生物学的研究工作.

核糖体(ribosome)是生物细胞内负责合成蛋白质的地方. 细胞核中的遗传密码储存在细胞核或者核区(一些细菌没有明确的细胞核, 只有一个 DNA 很集中的核区)中的 DNA 序列中. 首先要经过一个转录(transcription)过程, 把 DNA 的序列转移到信使 RNA(mRNA)上. mRNA 携带着密码序列来到细胞质内, 核糖体负责识别 mRNA 上的序列, 根据这个序列来合成相应的蛋白质, 这个过程称为蛋白质的翻译(translation). 细胞的转录过程由 Roger Kornberg 阐明, 他因此获得了 2006 年诺贝尔化学

奖, 今年的化学奖则授予了核糖体的研究.

DNA(基因)  $\xrightarrow{\text{转录}}$  RNA(信使 RNA, mRNA)  $\xrightarrow{\text{翻译}}$  蛋白(多肽序列)

图 1 生物体内遗传信息传递的中心法则: 由 DNA 携带的基因信息通过转录拷贝到信使 RNA 中, 核糖体根据信使 RNA 携带的信息翻译出相应的蛋白质(图片修改自诺贝尔奖网页中关于 2009 年化学奖的科学背景介绍文件: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2009/sci.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/sci.html))

核糖体如何识别 mRNA, 如何召集携带氨基酸的 tRNA(转运 RNA), 如何把各个氨基酸根据序列连接起来, 以及蛋白质的合成怎样开始, 怎样延续, 怎样结束并释放合成的蛋白质等这一系列问题, 无疑是生物学中非常基本的科学问题, 它们能够提供蛋白质合成这一基本生命过程的精确、完整的图像,

2009-11-25 收到

<sup>†</sup> Email: dongyh@ihep.ac.cn

同时也牵涉到相关的抗生素药物研制。

回答这些问题,必须获得包括核糖体以及核糖体结合上各种各样的 mRNA, tRNA, 控制蛋白翻译的起始因子(initiation factor)、延长因子(elongation factor)以及释放因子(release factor)等各种各样的 RNA 和蛋白质而形成的复合物的结构. 这些结构必须具有足够的分辨率,才能在原子水平上解释核糖体的工作原理。

核糖体分子量高达 250 万道尔顿(dalton, 1dalton=1u, u 为原子质量单位),其实是一个完整的亚细胞器. 原核生物(指那些没有形成细胞核,遗传物质集中在一个比较确定的核区中的生物. 主要是一些细菌)的核糖体称为 70S 核糖体,它由两个亚基 50S 和 30S 组成. 真核生物(指细胞中具有细胞核的生物,高等生物包括人类就属于真核生物)的核糖体称为 80S 核糖体,由 60S 和 40S 两个亚基组成. 1980 年代,人们对这么大的分子(其实是一个亚细胞器)能否结晶,能否衍射,得到晶体衍射后解析结构遇到的相位问题能否解决,以及这么复杂的结构是否能够解析出来还不清楚。

1980 年,Ada Yonath 及其合作者获得了来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)50S 核糖体亚基的三维晶体,这是一个巨大的进步<sup>[1]</sup>。

Yonath 的研究组随后在 1984 年获得了嗜热脂肪芽孢杆菌的 50S 核糖体亚基三维晶体的晶体学数据<sup>[2]</sup>. 他们使用同步辐射蛋白质晶体学方法获得了 50S 核糖体亚基的晶体衍射,这些衍射实验是在欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory, EMBL)在汉堡的德国电子同步辐射装置(Deutsches Elektronen-Synchrotron, DESY)上的实验站进行的,表明像核糖体这样的亚细胞器也是能够结晶并且可以获得衍射数据的. 当然这时候的衍射数据质量很差,不足以解析结构。

紧接着, Yonath 研究组报道了来自另一种细菌,即嗜盐死海古菌(*Haloarcola marismortui*)的 50S 核糖体亚基晶体的电子衍射结果<sup>[3]</sup>. 随后他们又获得了嗜盐死海古菌的 50S 核糖体亚基晶体的 6Å 衍射数据,初步定出了其晶体学参数<sup>[4]</sup>. 这些衍射实验也是在同步辐射上完成的。

1987 年,苏联的一个研究组获得了来自极端嗜热菌(*Thermus thermophilus*)的 70S 核糖体和 30S 亚基的晶体,并进行了电子衍射<sup>[5]</sup>,同年 Yonath 研究组也报道他们获得了同样的 30S 核糖体亚基晶体<sup>[6]</sup>。

这些早期的工作表明核糖体确实可以结晶,而且能够获得衍射数据,这当然需要利用同步辐射这样的强光源. 但当时衍射的分辨率还是太低(10Å 左右),无法获得原子分辨率的结构。

1991 年, Yonath 研究组经过仔细的制备,嗜盐死海古菌的 50S 核糖体亚基晶体衍射能力达到 3Å<sup>[7]</sup>,这又是一个巨大的突破,表明核糖体及其亚基不仅可以结晶,而且还可以获得原子分辨率的衍射数据. 同样,这些衍射实验全部都是在同步辐射上进行的. 晶体衍射能力的成功提高,得益于晶体学的快速冷冻技术(由 Garman 在 1999 年提出)、抑制辐射损伤的技术(由 Yonath, Pope 等人在 1989 年提出)等关键技术出现,以及 CCD 探测器的应用(2009 年物理奖金的一半就授予了 CCD 的发明者)、自动化晶体学实验的实现,以及波长可调的同步辐射光源和利用同步辐射波长可调发展出来的反常散射相位解析技术(由 Hendrickson, Holmes, Rosenbaum 和 Phillips 等人在 1997—1998 年间提出)的使用. 在 2009 年诺贝尔化学奖的公告材料中,明确指出了同步辐射的贡献:

“There were also other technical improvements that made ribosome crystallography feasible. Among these were the introduction of CCD area-detectors for precise and automated analysis of X-ray diffraction patterns and tunable synchrotron radiation sources for optimal use of anomalous scattering for phase determination.”(还有其他的一些技术进展使得核糖体晶体结构解析成为可能,其中包括 CCD 面探测器,精确和自动的 X 射线衍射分析和波长可调的同步辐射的应用,可以利用反常散射来确定相位.)

在获得核糖体晶体的进展中,Ada Yonath 无疑起到了关键的作用。

Ada Yonath 的努力解决了高质量核糖体晶体的制备问题. 结构解析的另一个关键问题是相位问题,它是由 Thomas Steitz 带领他的研究团队解决的. 他们首先解决了古菌 *Haloarcola marismortui* 的 50S 核糖体亚基晶体的衍射相位问题. 参照 Joachim Frank 利用冷冻电镜(cryo-EM)解出的低分辨 50S 核糖体亚基结构,结合多对同晶置换和同步辐射的反常散射方法,Steitz 的得意门生 Nenad Ban 解出了 50S 核糖体亚基 9Å 分辨率的结构<sup>[8]</sup>. 这个结构揭示了核糖体中 RNA 的结构,更重要的是,这个结果表明核糖体的晶体衍射相位问题是能够解决的. 这些衍射实验是在美国的国家同步

辐射光源(National Synchrotron Light Source, NSLS)上进行的。

1999年, Ban把50S核糖体亚基结构的分辨率提高到了 $5\text{\AA}$ <sup>[9]</sup>。同一年 Ramakrishnan 的研究组解出了极端嗜热菌的30S核糖体亚基的 $5.5\text{\AA}$ 分辨率的结构<sup>[10]</sup>。从 Nature 杂志在同一期上先后刊登了两个组的研究论文(article), 可以看到两个组的竞争何其激烈, 要知道当年 Nature 杂志每期也就刊登两篇研究论文而已。Steitz 研究组的结构是在 NSLS 同步辐射装置的 X12B 和 X12C 线站上获得的, Ramakrishnan 研究组的结构是在 NSLS 同步辐射装置的 X18B 和 X25 蛋白质晶体学线站上获得的。NSLS 作为当时世界上最好的同步辐射装置之一确实为这个问题的解决提供了非常有力的支持。

Ada Yonath 的研究组也在这一年的年底发表了极端嗜热菌的30S核糖体亚基的 $4.5\text{\AA}$ 分辨率的结构<sup>[11]</sup>。他们的结构解析利用了德国电子同步辐射装置(DESY), 美国康奈尔高能同步辐射光源(Cornell High Energy Synchrotron Source, CHESS), 欧洲同步辐射装置(European Synchrotron Radiation Facility, ESRF) 和美国的先进光子源(Advanced Photon Source, APS) 等几个同步辐射装置。

同一年, Noller 研究组发表了极端嗜热菌的70S核糖体的 $7.8\text{\AA}$ 的结构<sup>[12]</sup>。这些结构是在美国的先进光源(Advanced Light Source, ALS)和斯坦福同步光源(Stanford Synchrotron Light Source, SSLS)这两个同步辐射装置上进行的衍射实验, 相位问题是用多波长反常散射(Multi-wavelength Anomalous Dispersion, MAD)解决的, 最重要的 MAD 相位解析用的数据是在 ALS 同步辐射装置上完成的。

这些进展虽然非常令人振奋, 但是结构的分辨率还是不高, 不足以提供原子水平的结构信息来揭示核糖体的工作机制。

2000年, Thomas Steitz 研究组的 Nenad Ban 和 Poul Nissen 给出了嗜盐死海古菌的50S核糖体亚基高达 $2.4\text{\AA}$ 分辨率的晶体结构<sup>[13,14]</sup>, 这些结构是在 NSLS 和 APS 这两个同步辐射装置上解出的。同样, Science 在同一期刊登了这个研究组的两篇文章, 足见此工作的重要性。还要指出的一点就是, Ban 和 Nissen 解析的不是一个结构, 而是50S核糖体亚基结合了不同的 RNA 和多肽的结构, 这些高分辨率的结构清楚地揭示了核糖体发挥功能的机制。

同时 Ramakrishnan 研究组报道了极端嗜热菌的30S核糖体亚基的 $3.0\text{\AA}$ 分辨率的结构<sup>[15]</sup>, 这些

结构是在 NSLS, ESRF, APS 三个同步辐射装置上解析的。Yonath 研究组也报道了同一个核糖体亚基的 $3.3\text{\AA}$ 结构<sup>[16]</sup>, 这一系列的结构是欧洲分子生物学实验室在汉堡 DESY, ESRF 的线站, 美国的 CHESS, APS 等同步辐射装置上获得的。Ramakrishnan 和 Yonath 两个研究组分别报道了同一个东西不同分辨率的结构, 在原子水平上这两个结构有些不同的地方。这些不一致在 Yonath 研究组随后的一篇文章得到了解释<sup>[17]</sup>, 他们解析了极端嗜热菌的30S核糖体亚基结合不同的核酸、蛋白质的系列结构, 这些结构的解析分别在 DESY, APS 和 ESRF 这三个同步辐射装置上完成。

2001年, Yonath 研究组还报道了来自耐辐射奇球菌(Deinococcus radiodurans)的50S核糖体亚基的高分辨率结构<sup>[18]</sup>, 在这些结构的解析过程中, 他们利用 DESY 同步辐射装置上的线站进行晶体筛选, 最后的数据在 ESRF 和 APS 上收集。这个核糖体结构非常适合于后续的抗生素药物的筛选。

2001年, Noller 研究组报道了极端嗜热菌的70S核糖体的 $5.5\text{\AA}$ 分辨率的结构<sup>[19]</sup>, 其结构数据是在两个同步辐射装置 ALS 和 SSLS 上获得的。在随后的一篇文章中<sup>[20]</sup>, Ramakrishnan 研究组报道了30S核糖体亚基如何辨认 tRNA 的机制。2005年, Cate 研究组报道了来自大肠杆菌(Escherichia coli)的70S核糖体 $3.5\text{\AA}$ 的高分辨率结构<sup>[21]</sup>, 这些结构是在 ALS 同步辐射装置上完成的。

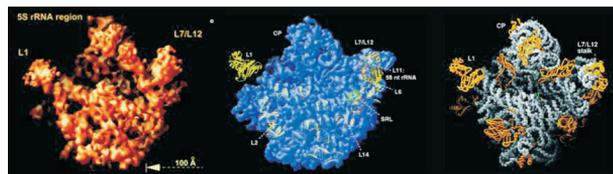


图2 50S核糖体亚基的高分辨率结构解析历程: 左图为 $9\text{\AA}$ 分辨率的结构, 1998年得到解析; 中间为 $5\text{\AA}$ 分辨率的结构, 1999年得到解析; 右图为 $2.4\text{\AA}$ 分辨率的结构, 2000年得到解析。这些结构都是由 Nenad Ban 完成的(图片来自诺贝尔奖网页中关于2009年化学奖的科学背景介绍文件: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2009/sci.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/sci.html))

到此为止, 整体的70S核糖体以及50S, 30S两个亚基都获得了高分辨率的结构, 在这些结构的基础上, 核糖体的工作机制终于得到阐明, 相应的药物研发也蓬勃发展起来。

整个核糖体结构和功能的研究, 从1980年 Ada Yonath 获得晶体开始, 持续到2001年系列高分辨的结构出现, 经历了20多年的时间。在这个过程中, 同步辐射发挥了关键性的作用。不论是早期的晶体

筛选,晶体生长条件的优化,还是后来的相位问题的解决,高分辨率数据的获取,没有同步辐射是完全不可能的.这些研究不是仅仅解析一两个结构就能完成的,而是要解析一系列的结构.为取得这些结果,几乎耗费了世界上很多顶尖研究组的全部精力,正是依靠同步辐射装置强大的支持,得益于其他领域迅速发展的各种技术手段,问题才得以最后解决.

在解析核糖体系列结构的过程中,同步辐射为结构生物学家提供了非常重要的技术支持,这种支持具有明显的区域性. Ada Yonath 任职于以色列魏兹曼研究所 (Weizmann Institute, Israel), Venkatraman Ramakrishnan 任职于英国剑桥的 MRC 分子生物学实验室 (MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, UK), 他们的工作基本上是在欧洲的同步辐射装置 (如 DESY, ESRF) 上完成的,特别是最后的决定性的数据是在 ESRF 上完成的. 同样 Thomas Steitz 任职于耶鲁大学,他的工作 (以及其他美国研究组的工作) 基本上在 NSLS, APS 等美国的同步辐射装置上完成. 对于 Thomas Steitz 来讲, NSLS 和耶鲁的近距离为他们的结构解析带来了极大的便利. Harry Noller 在加州大学圣克鲁兹分校工作,他们的工作则借助于附近的 ALS 和 SSLS 两个同步辐射装置. 来自于加州伯克利的 Jamie Cate 也一样利用 ALS 和 SSLS 来解析结构.

像核糖体这样的高难度结构解析,研究者和同步辐射装置的工作人员之间的合作十分重要. Venkatraman Ramakrishnan 甚至把晶体“借用”给 ESRF 的工作人员来改善在线的晶体质量筛选. 应当看到,这些研究者在借助同步辐射完成研究课题的同时,也对同步辐射的实验技术提高做出了贡献, Ada Yonath 和 Venkatraman Ramakrishnan 是 ESRF 的长年用户,正是他们的课题需要,使得蛋白质晶体学的自动化、样品在线质量筛选等技术在 ESRF 发展起来. 这种设备、方法和科学目标紧密结合的方式是解决重大前沿科学问题最有效的方式,是一种双赢的格局. 由于需要同步辐射装置上的工作人员和研究者紧密合作,较近的空间距离、方便灵活的实验时间是必须的. 这些经验值得我们借鉴.

从诺贝尔奖设立 100 多年的历史观察,这个奖首先关注的是基础科学问题的解决. 真核生物的核糖体结构的解析固然有利于理解人类的生命现象,但原核生物核糖体结构和功能的阐明是深入理解蛋白质合成这样一个基本的生物学过程的重要进展.

在生物进化程度上,虽然人类和大肠杆菌等细菌相差甚远,但在合成蛋白质这一步上是差不多的. 核糖体的结构的解析还提供了抗生素药物研发的另一个有效途径,对于人类健康具有重要的意义,所以 2009 年的诺贝尔奖授予了原核生物核糖体的研究.

回顾历史,参与这项研究的人实在太多了,研究历程也足够漫长. 我们在祝贺 Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz 和 Ada E. Yonath 三位获得诺贝尔奖的同时,也对为解决这个问题做出巨大贡献而最后没有获奖的 Harry Noller, Jamie Cate, Joachim Frank 以及 Nenad Ban, Poul Nissen 等人表示敬意. 作为物理学工作者,在赞扬这些持之以恒的值得尊敬的生物化学家的同时,当然也为物理学工作者能为他们解决这个重大课题提供同步辐射光源装置和有关技术,并与他们紧密合作感到骄傲.

### 参考文献

- [1] Yonath A, Mussig J, Tesche B *et al.* *Biochem. Int.*, 1980, 1:428
- [2] Yonath A, Bartunik H D, Bartels K S *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1984, 177:201
- [3] Shevack A, Gewitz H S, Hennemann B *et al.* *FEBS Lett.*, 1985, 184:68
- [4] Makowski I, Frolow F, Saper M A *et al.* *Mol. Biol.*, 1987, 193:819
- [5] Trakhanov S D, Yusupov M M, Agalarov S C *et al.* *FEBS Lett.*, 1987, 220:319
- [6] Glotz C, Mussig J, Gewitz H S *et al.* *Biochem. Int.*, 1987, 15:953
- [7] von Bohlen K, Makowski I, Hansen H A *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1991, 222:11
- [8] Ban N, Freeborn B, Nissen P *et al.* *Cell*, 1998, 93:1105
- [9] Ban N, Nissen P, Hansen J *et al.* *Nature*, 1999, 400:841
- [10] Clemons W M, Jr May J L, Wimberly B T *et al.* *Nature*, 1999, 400:833
- [11] Tocilj A, Schlunzen F, Janell D *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1999, 96: 14252
- [12] Cate J H, Yusupov M M, Yusupova G Z *et al.* *Science*, 1999, 285:2095
- [13] Ban N, Nissen P, Hansen J *et al.* *Science*, 2000, 289:905
- [14] Nissen P, Hansen J, Ban N *et al.* *Science*, 2000, 289:920
- [15] Wimberly B T, Brodersen D E, Clemons W M *et al.* *Nature*, 2000, 407:327
- [16] Schlunzen F, Tocilj A, Zarivach R *et al.* *Cell*, 2000, 102:615
- [17] Pioletti M, Schlunzen F, Harms J *et al.* *Embo J.*, 2001, 20:1829
- [18] Harms J, Schlunzen F, Zarivach R *et al.* *Cell*, 2001, 107:679
- [19] Yusupov M M, Yusupova G Z, Baucom A *et al.* *Science*, 2001, 292:883
- [20] Ogle J M, Brodersen D E, Clemons W M *et al.* *Science*, 2001, 292:897
- [21] Schuwirth B S, Borovinskaya M A, Hau C W *et al.* *Science*, 2005, 310:827