

文章编号: 1004-0374(2010)03-0224-05

细胞凋亡的结构生物学研究进展

施一公

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要: 在多细胞生物体内, 细胞会发生编程性死亡(即细胞凋亡), 使得细胞数量得到精确调控。细胞凋亡调控的异常与癌症、自身免疫病、神经退行性疾病等疾病密切相关。在过去的二十年里, 人们详细地研究了参与细胞凋亡调控的分子机制。该文综述了近年来利用结构生物学手段, 对参与细胞凋亡调控的分子, 主要是Caspase 和与Caspase 活性调控直接相关的蛋白功能的研究进展。

关键词: 细胞凋亡; 机制; 结构生物学; Caspase

中图分类号: Q255; Q617 **文献标识码:** A

Mechanisms of programmed cell death through structural biology

SHI Yi-gong

(College of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Cells undergo programmed cell death (apoptosis) in all multicellular organisms. Alternations in apoptotic pathways have been implicated in many types of diseases in human, including cancers, autoimmune diseases, and neurodegenerative disorders. In the past two decades, the molecular mechanisms of apoptosis have been extensively studied. In this paper, author reviews the progress in the studies of molecular functions of proteins involved in apoptosis regulations, mainly Caspases and Caspase-regulating proteins, using structural biology approaches.

Key words: apoptosis; mechanism; structural biology; Caspase

1 细胞凋亡调控机制研究背景

在动物体内, 细胞数量需要被精确控制。如果细胞增殖过度, 则造成癌症; 如果细胞凋亡过度, 则可引起神经退行性疾病诸如阿尔茨海默氏症。

细胞凋亡的有关知识, 了解得最清楚的就是在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)中。人们可以精确描述线虫中1 090个细胞的发育命运和其中的凋亡事件, 其中有131个细胞在特定的位置和时间发生编程性死亡, 留下成体线虫共959个细胞。在20世纪80~90年代, 麻省理工的Horvitz研究组进行的遗传学研究表明, 有4个基因共同严格控制了线虫中的细胞编程性死亡, 它们是*egl-1*、*ced-9*、*ced-4*和*ced-3*^[1]。*ced-3*编码一个半胱氨酸蛋白酶CED-3, 特异性针对天冬氨酸残基, 称为Caspase。与所有的Caspase一样, CED-3的

这种活性必须受到调控, 它被CED-4激活, 发生自身切割。CED-4的功能又被CED-9所抑制, 而CED-9又被EGL-1抑制, 这样就形成了一个精确的调控系统。

在哺乳动物细胞中, 凋亡的机制更为复杂。有两种被详细研究了细胞凋亡途径: 一条是外源性的途径, 由胞外“死亡配体”(death ligand)触发“死亡受体”(death receptor), 进而通过级联反应激活Caspase-8——外源性途径的起始Caspase; 另一方面, 许多细胞凋亡由细胞内部事件, 如DNA损伤等压力而触发(内源性途径), 激活Caspase-9。在它们被激活后, Caspase-8、-9将激活下游效应Caspase, 如Caspase-3、-7等。下游的这些Caspase被激活, 进而最终杀死细胞。

本文主要集中讨论另外一条途径——内源性途

径的机制，这其中的大部分机制研究都是由德州西南医学中心王晓东完成的。内源性途径指由于DNA损伤等事件触发，细胞内部的凋亡信号传递到线粒体，这时，通过存在于线粒体外膜上的BCL家族蛋白，将细胞色素C释放出来。一旦被释放到胞质中，细胞色素C就与一个大的蛋白Apaf-1相互作用，使后者发生构象变化，成为激活的形式，再与辅因子ATP(或dATP)结合，形成凋亡复合体(Apoptosome)。这是一个七聚体，Acehan等^[2]通过电镜的方法报道了它的整体结构。

凋亡复合体的主要功能是招募Caspase-9的前体Pro-Caspase-9，激活其切割自身的一段序列。值得注意的是，被切下的蛋白片段仍然与Caspase-9的其他部分相互结合，这些组分一同构成了凋亡全酶(Holoenzyme)。相比之下，单独的Caspase-9的催化活性还不到全酶的1%。全酶的结构也用冷冻电镜的方法进行了解析^[2]。凋亡全酶随后招募并切割Caspase-3和Caspase-7，而这两者随后切割细胞中已知超过100种的底物，并导致细胞凋亡。

在哺乳动物细胞中都存在着调控这一过程的一些因子，称为凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)。IAPs能够结合起始Caspase(Caspase-9)和效应型Caspase(Caspase-3、-7)，并由此阻止其酶活性的发挥。人类基因组中存在至少

8个IAPs，包括XIAP、cIAP-1、cIAP-2、Survivin等。在癌症中这些基因的功能都受到影响，因此，这些蛋白可能作为抗癌药物的靶点。IAPs都含有Baculovirus IAP Repeat(BIR)结构域，每个IAP通常含有1~3个BIR结构域，这些BIR结构域的功能不尽相同。例如，XIAP中的BIR3结构域(BIR3)抑制Caspase-9，而其BIR2结构域则抑制Caspase-3。当然，实际上，IAP的功能更为复杂，不仅限于此处描述的功能。

当细胞接到凋亡的信号指令时，凋亡全酶一开始并不会对细胞造成影响，而必须将IAPs的抑制作用解除，这是通过另一种蛋白——Smac(又名Diablo)完成的。Smac平时也存在于线粒体中，在细胞凋亡信号的触发下，线粒体释放出Smac，以促进完成凋亡过程。这样，凋亡过程的调控存在两条途径：线粒体释放出的细胞色素C，参与激活Caspase通路，促进凋亡全酶的组装；而同时线粒体也释放出Smac，解除IAPs对Caspase的抑制，使细胞走向死亡。

对比一些模式生物(线虫、果蝇和哺乳动物)中的凋亡途径(图1)，发现其整体的调控模式较为保守。图中将功能相似的分子以同样的颜色显示。如：哺乳动物Apaf-1与线虫CED-4是功能上的同源物，而Caspase-9则与CED-3功能上地位相似。以

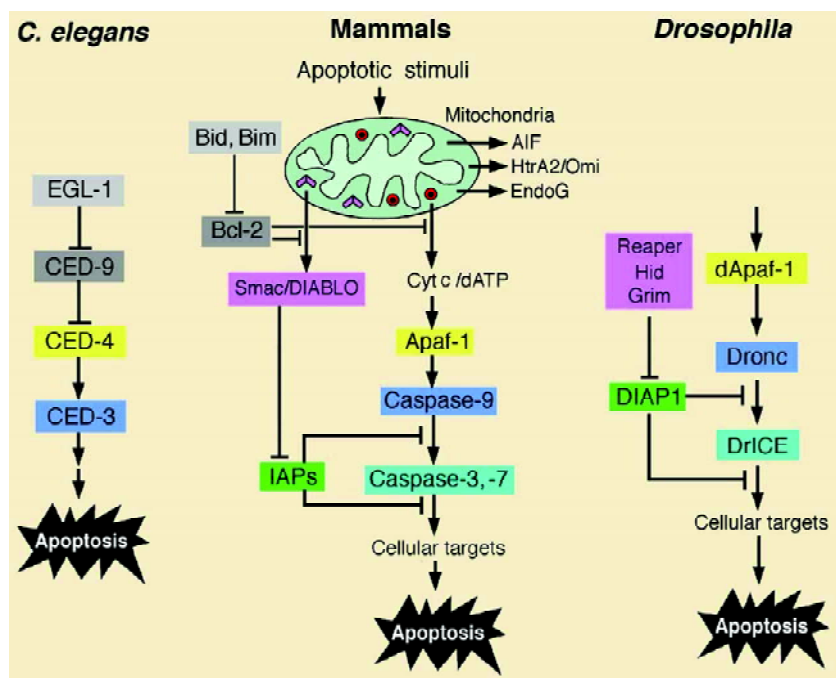


图1 线虫、果蝇和哺乳动物中的凋亡调控途径

上提到的这些调控分子作用模式, 包括其分子结构, 在过去的十年左右时间内, 都被较为详细的研究了。

2 哺乳动物细胞凋亡的结构生物学研究

结构生物学能在原子水平的分辨率上研究蛋白质的结构和相互作用的方式, 对于定量的、精确的研究生命过程中蛋白质发挥功能的方式有独特的优势。在细胞凋亡机制的研究中, 结构生物学也被广泛的应用, 并取得了许多重要的进展。

第一个例子是 Smac 蛋白是如何找到 IAPs 并抑制其功能的。Smac 蛋白由 295 个氨基酸组成, 其中 N 末端 55 个氨基酸编码一段线粒体定位序列 (mitochondria-targeting sequence, MTS), 帮助 Smac 定位到线粒体上。成熟的 Smac 蛋白则不包含这一段序列。2000 年, 施一公实验室解析了 Smac 与 XIAP 的 BIR3 结构域的复合物晶体结构^[3]。结构显示, 成熟 Smac 的 N 末端四个氨基酸 (NH₂-Ala-Val-Pro-Ile), 结合在 XIAP 的 BIR3 结构域上非常保守的一个表面凹槽。考虑到 Smac 对于 XIAP 功能的抑制, 则这种结合方式一定发挥了抑制作用。经过比较发现, Caspase-9 也拥有一个类似的四个氨基酸组成的序列 (NH₂-Ala-Thr-Pro-Phe), 结合于 BIR3 结构域上的这个凹槽, 结合方式也类似。XIAP 通过 BIR3 结构域结合 Caspase-9 以抑制其活性, 而 Smac

则竞争性占据了位点, 使 Caspase-9 进一步活化 Caspase-3、-7 等。这种模式的发现为以 XIAP 为靶点的药物设计提供了很重要的提示, 在过去十年中, 有许多文献都报道了基于四肽类似物小分子的药物设计策略, 作为促凋亡的一种抗癌药物, 其中一些已进入 1、2 期临床试验。

第二个例子是 IAPs 是如何结合并抑制 Caspase-9 的活性的。目前, Caspase 家族蛋白的结构大部分已经被解析。Caspase 家族蛋白的整体结构都比较相似, 且均为同源二聚体的形式, 每个单体由两个亚基 p20 和 p10 组成 (图 2)。仔细比较不同的 Caspase (Caspase-1、-3、-7、-8、-9 等), 其活性口袋周围的拓扑结构 (由 L1、L2、L3 和 L4 四个卷曲组成) 都非常的相似, 而且该结构的维持需要另外一个分子的残基 (即另一个分子的 L2' 区域) 参与。2003 年, 施一公实验室解析了 Caspase-9 结合 XIAP-BIR3 的复合物晶体结构^[4], 阐述了 XIAP 抑制 Caspase-9 活性的分子机制。他们发现, XIAP-BIR3 只结合一个单体的 Caspase-9, 而且这种结合的方式阻止了 Caspase-9 形成任何同源二聚体的可能, 进而阻止 Caspase-9 形成有活性的形式。

第三个例子是 IAPs 是如何抑制效应 Caspase (如 Caspase-3、-7) 的活性的。XIAP 与 Caspase-7 的复合物晶体结构^[5]显示, XIAP 的一段不属于 BIR 结构域的片段结合在 Caspase-7 的活性口袋区域, 占据

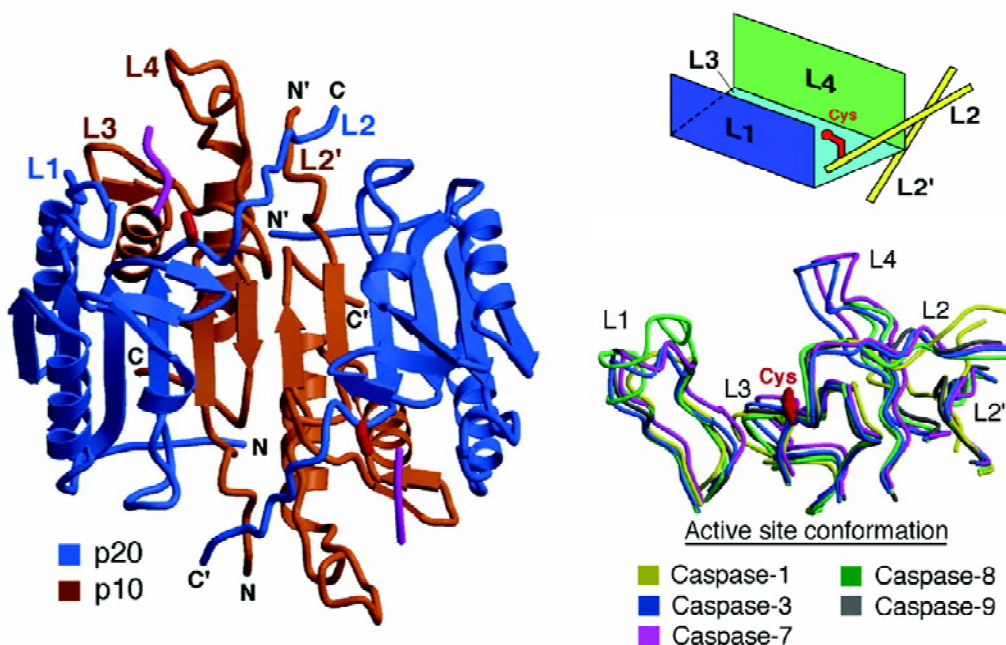


图2 Caspase的整体结构和活性中心的结构

了底物所在的位点，而这段片段又不能被Caspase-7切割，这样就起到了阻止Caspase-7切割其目标底物的效果。

3 线虫细胞凋亡的结构生物学研究

以上讨论的主要是凋亡途径的调节机制，而仍有两个重要的问题没有得到回答：一是起始Caspase和效应Caspase是如何被激活的；二是许多蛋白(包括细胞色素C)是如何从线粒体中被释放出来的：在正常生理条件下，线粒体外膜是不能通透蛋白质或肽段的，而在凋亡信号触发下，线粒体外膜变得对于某些蛋白质具有选择性通透能力。施一公实验室通过结构生物学的方法对以上第一个问题进行了系统的研究。

在之前的研究中，人们已经知道了Caspase-9切割Caspase-3、-7，能够激活后两者的活性，但并不清楚其原因。施一公实验室解析了未被切割的Caspase-7(Caspase-7 zymogen)的晶体结构^[6]，发现未被切割时，L2'片段被限制住，不能去稳定二聚体中另一个分子的活性口袋的结构。在被切割后，L2'片段可以摆动到另一个分子上去稳定其活性口袋。

那么起始Caspase(如Caspase-9)是如何被激活的呢？从结构上看，效应Caspase都是以组成型二聚体存在，而起始Caspase则不同，在溶液中，它们通常以单体形式存在。一种主流的看法认为，起始Caspase的激活需要其二聚化，而这种二聚化则是由距离上的靠近所驱使的。具体来说，Apaf-1组成一个七聚体，而这7个单体每个又招募一个Caspase-9分子，使得Caspase-9单体分子在空间上靠近，局部产生很高的浓度，进而形成二聚体而被激活。

但是人们并不清楚为什么需要7个Apaf-1分子完成这一效应。为了回答这一问题，施一公实验室研究了线虫中细胞凋亡途径中分子的结构和功能。首先他们纯化了EGL-1、CED-9、CED-4(即Apaf-1同源蛋白)和CED-3这四个凋亡调控途径中的重要蛋白，这些纯化得到的蛋白可以在体外完成已经发现的线性调控途径中的反应：如果将CED-4与CED-3以不同比例混合，随着CED-4量的增加，CED-3的自身切割逐渐增多，成为成熟的Caspase；如果加入不同量的CED-9，CED-4的激活效应又会不断被抑制；而在此基础上加入EGL-1，又能抑制CED-9的效应。即这四个纯化的蛋白在体外都是有活性

的，而且在体外能够完全重现这四个蛋白在体内的功能，并不需要别的蛋白辅助^[7]。

在此基础上，他们首先研究了CED-9是如何抑制CED-4对CED-3的激活效应。他们解析了CED-9与CED-4的复合物晶体结构^[7]。晶体结构显示，两个CED-4分子形成一个不对称的二聚体，与一个CED-9分子形成复合物。每一个CED-4分子又分别结合一个ATP和Mg²⁺。根据这个结构，可以对CED-9抑制CED-4功能的机制做两种假设：一是CED-4本身具有ATPase活性，而CED-9抑制了它的ATPase活性。不过经实验检验，第一种假设不太可能成立，因为CED-4虽然结合ATP和Mg²⁺，却不能检测到任何ATPase活性。第二种假设是CED-9将CED-4限制在一种非活性的构象而不能发挥功能。经过凝胶过滤层析分析发现，CED-4自身在溶液中的相对分子质量要大于CED-9/CED-4复合物，提示CED-4本身具有与复合物中不一样的结构组成方式。用冷冻电镜(Cryo-EM)方法分析自由的CED-4结构发现它是一种具有四重对称的结构，可能是一个四聚体，而CED-9结合CED-4后，阻止其形成四聚体，进而抑制其功能。为了验证这一假设，他们将两个CED-4分子的接触面上参与相互作用的残基进行了突变，这样处理后的CED-4丧失了对CED-3的激活效应，证实了CED-9对CED-4效应的抑制是通过限制其形成多聚体的方式达到的。

随后他们研究了EGL-1是如何拮抗CED-9对CED-4的抑制效应的。他们解析了CED-9结合EGL-1的一段片段的复合物的晶体结构^[8]，在结构中EGL-1的片段形成一个 α -螺旋插入到CED-9表面的一个凹槽中，这个凹槽处于CED-9分子结合CED-4的位点的另一侧。将这个结构中的CED-9的结构与CED-9/CED-4复合物中CED-9的结构进行比较发现，CED-9在结合EGL-1时发生了明显的构象变化，而这一构象变化使得参与CED-9/CED-4相互作用的重要残基偏离了其原有的位置，进而阻止了CED-9与CED-4进行结合。通过等热滴定检测(isothermal titration calorimetry, ITC)发现EGL-1结合CED-9的亲和力要明显强于CED-9与CED-4的亲和力。这样，EGL-1的出现会驱使CED-9离开CED-4，从而使得CED-4可以发挥其激活CED-3的效应。

最新的进展则是对CED-4激活CED-3的机制的研究。施一公实验室首先从结构出发，解析了CED-4自身的结构，发现其实CED-4是以四个二聚体，即八聚体的形式存在的，分子中心有一个空

洞, 形成一个漏斗形的分子。不对称二聚体是 CED-4 组成的基本单位。从结构上看, CED-4 分子可以分为“三层”, 第一层由 CARD 结构域组成, 形成了漏斗结构的小口端; 第二层和第三层则在此基础上堆积形成了具有四重对称轴的结构。

对比 CED-4 和其功能上地位相似的 Apaf-1 的结构发现, 虽然 CED-4 的单体和 Apaf-1 单体(处于自抑制状态)整体结构上差别较大, 但组成两者的各个结构域自身却具有相似的结构: 包括 α/β 折叠、HD1 结构域、CARD 结构域和 WHD 结构域。由于这些结构域结构上的高度相似性, 可以从 CED-4 的晶体结构出发, 结合 Apaf-1 的各个结构域的结构和电镜结构, 模拟出 Apaf-1 组成的凋亡复合体的整体结构模型。这一模型与之前人们所认可的模型有明显的差异, 即 Apaf-1 分子是由其 α/β 折叠区域相互作用, 形成一个七聚体, 而不是之前认为的 CARD 结构域。尽管这一模型仍有待进一步确认, 但初步的凝胶过滤层析实验说明这一模型是合理的。

那么 CED-4 是如何激活 CED-3 的。施一公实验室首先通过体外实验确认了 CED-4 能在体外促进 CED-3 zymogen 的自身切割活性, 说明 CED-4 能够促进 CED-3 分子之间的相互作用。而且, 使用纯化得到成熟的 CED-3 进行同样的检测, 则发现 CED-4 同样能促进成熟的 CED-3 对肽段底物的活性, 这提示在 CED-3 zymogen 被 CED-4 激活、自身切割后, 很可能仍然与 CED-4 结合。通过凝胶过滤层析分析发现成熟的 CED-3 确实也能与 CED-4 形成复合物, 经过将 SDS-PAGE 电泳条带进一步进行毛细管电泳分析, 发现 CED-4 与 CED-3 形成复合物时的摩尔比为 4:1, 即 8 个 CED-4 分子结合 2 个 CED-3 分子。通过 ITC 的方法也确认了 CED-4 的八聚体确实能与 CED-3 的二聚体发生 1:1 的相互作用。而在没有 CED-4 存在的情况下, 通常 CED-3 是以单体形式存在的。CED-4 很可能通过结合 2 个 CED-3, 促进其形成二聚体。

通过截去 CED-3 的不同部分的片段, 发现 CED-3 的 L2' 区域对于其结合 CED-4 是必需的, 而且将 CED-3 的 L2' 区域构建到 Caspase-9 的相应部

位, Caspase-9 便也能响应 CED-4 的激活了, 说明 CED-3 的 L2' 对于响应 CED-4 的激活是极其关键的。同时施一公实验室也尝试解析 CED-3/CED-4 复合物的晶体结构, 也得到了复合物的晶体, 晶体的 SDS-PAGE 结果也显示两个蛋白都存在于晶体中, 但在结构中并不能看到 CED-3, 但能推测 CED-3 的结合部位。通过冷冻电镜的分析, 确实能发现在 CED-4 结构的中央孔位置有 CED-3 分子结合。总结起来, CED-4 形成多聚体形式, 其结构中央部分可以结合 2 个分子的 CED-3, 使后者由于距离上的接近而产生二聚化, 进而激活其活性。

通过以上的这些研究, 人们清楚地了解到多细胞生物中参与细胞凋亡调节的蛋白质分子发挥功能的方式, 进而可以帮助人们进一步深入研究细胞凋亡的其他调控机制, 并可基于结构开展以特异性蛋白分子为靶标的药物设计, 为人类健康做出贡献。

[参考文献]

- [1] Liu QA, Hengartner MO. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 887: 92-104
- [2] Acehan DA, Jiang XJ, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome. *Mol Cell*, 2002, 9(2): 423-32
- [3] Wu G, Chai JJ, Suber TL, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, 2000, 408(21): 1008-12
- [4] Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 519-27
- [5] Chai JJ, Shiozaki EN, SrinivasaMS, et al. Structural basis of Caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, 2001, 104(5): 769-80
- [6] Chai JJ, Wu Q, Shiozaki EN, et al. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen. *Cell*, 2001, 107(3): 399-407
- [7] Yan N, Chai JJ, Lee ES, et al. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2005, 437(7060): 831-7
- [8] Yan NG, Gu LC, Kokel D, et al. Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Mol Cell*, 2004, 15(6): 999-1006

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所
孙兵法 编译)