

《物理学报》创刊 90 周年·封面文章

利用冷冻电镜研究蛋白质机器的非平衡统计物理*

杨添¹⁾ 欧阳颀^{1)2)†}

1) (北京大学物理学院, 北京 100871)

2) (北京大学定量生物学中心, 北京 100871)

(2024 年 4 月 29 日收到; 2024 年 5 月 29 日收到修改稿)

对蛋白质机器的完整描述应包括其微观结构、热力学和动力学性质与工作机制。最近兴起的冷冻电镜技术为蛋白质热力学与动力学的研究提供了全新的机遇。目前已经有一些工作不仅利用冷冻电镜技术解析蛋白质的高分辨率结构, 还结合数据处理方法来分析蛋白质的构象分布并进一步推测其热力学性质。然而, 利用冷冻电镜技术直接对蛋白质的动力学过程作观测与定量分析的方法还在发展的初级阶段。本文选取了一个理想的蛋白质系统, 即蓝藻生物钟蛋白 KaiC 对冷冻电镜分析蛋白质非平衡过程的可能性进行探索。基于已有的实验数据, 将蓝藻生物钟蛋白 KaiC 的平衡态统计物理模型推广至非平衡态, 对 KaiC 蛋白处于非平衡态时的动力学特征进行预测。基于动力学预测结果, 本文揭示了冷冻电镜技术具有分析蓝藻生物钟蛋白的非平衡过程的可能, 为进一步的冷冻电镜实验提供了理论依据。

关键词: 蛋白质动力学, 非平衡态统计物理, 冷冻电镜**PACS:** 87.15.-v, 87.16.A-, 87.64.Ee, 05.70.Ln**DOI:** 10.7498/aps.73.20240592

1 引言

蛋白质在细胞中发挥着重要的作用, 大部分细胞功能的实现都依赖于蛋白质。在生命科学领域, 人们常通过结构功能关系对蛋白质进行研究, 该方法在一定程度上可以对蛋白质工作机制做出解析。然而, 从物理学的角度来看, 蛋白质可以视为一个高自由度的动态微观分子机器, 其构象空间十分庞大。蛋白质在发挥功能时其结构不是固定不变的, 而是具有不同时间尺度的构象变化以及存在许多中间态。因而, 对蛋白质的完整描述应不只是其孤立的结构, 还应该包括其热力学和动力学性质的描述^[1-4]。理论上通过分子动力学模拟方法可以对蛋白质的热力学与动力学进行直接研究, 但该方法受限于蛋白质的复杂度和时间尺度。

蛋白质在工作时一般是处于非平衡态的, 例

如 ATP Synthase 通过利用电化学梯度差来驱动蛋白质的机械转动以合成 ATP; ATPase 通过水解 ATP 离开热力学平衡态以实现物质转运、信息传递和物质合成等功能^[5,6]。近 20 年, 介观统计物理取得了一系列进展, 为研究生物系统的统计物理和动力学规律提供了理论依据^[7-9], 特别是涨落耗散定律和随机热力学等理论的发展, 为蛋白质机器热力学与动力学的研究提供了分析工具。基于单分子实验技术, 人们可以利用随机热力学理论分析蛋白质的热力学和动力学性质^[10,11]。虽然非平衡态物理理论方法取得了较大的进展, 但这些研究工作在生物系统中的应用还局限在一些复杂度较小的体系, 在更实际的生物体系中的应用还有待推广完善^[12]。

近几年, 冷冻电镜技术的迅速发展给蛋白质机器的研究提供了新的机遇^[13]。区别于 X 射线衍射法和核磁共振方法, 冷冻电镜可用于解析蛋白质天然状态的高分辨结构, 且不受限于蛋白质的尺度

* 国家自然科学基金 (批准号: 12090054) 资助的课题。

† 通信作者。E-mail: qi@pku.edu.cn

大小. 冷冻电镜技术之一为单颗粒冷冻电镜, 该方法将大量的蛋白质分子快速冷冻, 然后利用透射电镜获取单个蛋白质分子的二维投影, 最后通过数据处理方法重构出蛋白质的三维结构^[14]. 从统计物理的角度来看, 冷冻的蛋白质样品即为一个蛋白质的系综, 包含蛋白质的组分信息和构象信息^[15,16]. 随着技术的发展, 当前冷冻电镜领域已经发展出若干数据处理方法来分析蛋白质样品的组分和构象的异质性^[17–19]. 即利用冷冻电镜不仅能重构出蛋白质高分辨率的结构, 还有潜力重构出蛋白质结构系综的分布.

在冷冻电镜样品制备过程中, 蛋白质分子在大约微秒时间尺度内被冻住, 因而理论上讲时间尺度大于微秒的构象变化都能通过冷冻电镜进行分析. 当前已经有一些研究利用冷冻电镜对蛋白质的构象分布进行分析. 例如 Huang 等^[20]对 p97 同源六聚体蛋白的关键结构域的构象分布进行分析, 发现其亚基之间无协同相互作用. Roh 等^[21]对 GroEL 同源十四聚体蛋白结构进行分析, 发现每个单体存在 3 种主要构象. 这 3 种构象在之前已经通过 X 射线方法被解析, 而该研究利用冷冻电镜进一步得到了 3 种构象在蛋白质复合物上的分布, 为蛋白质功能研究提供了更丰富的信息. 类似地, Zhao 等^[22]利用冷冻电镜对 MmCpn 同源十六聚体结合 ATP 分子的情况进行解析, 得到了 ATP 分子在每个亚基上的分布, 为该蛋白质水解 ATP 的机制提供了分子层面的证据. 除此之外, 目前正在发展的时间分辨冷冻电镜通过对冷冻样品制备过程进行精准控制, 以实现毫秒量级的反应过程进行分析^[23]. 例如最近 Bhattacharjee 等^[24]基于微流控制系统对冷冻电镜样品制备过程进行优化, 实现了对核糖体的毫秒量级的工作过程的动力学分析. 此外还有一些研究基于传统样品制备方法对分钟量级的反应过程进行分析, 并根据不同构象在不同反应时刻的分布对蛋白质的工作机制进行研究^[25,26]. 这些研究展现了应用冷冻电镜不仅能得出蛋白质分子不同构象的高分辨率结构, 还能得到蛋白质的构象分布, 甚至得到在不同反应时间的构象分布^[16].

本文选取一个反应时间尺度远大于秒量级的蓝藻生物钟蛋白体系来探索利用冷冻电镜研究蛋白质非平衡过程的可能性. 虽然已经有研究利用冷冻电镜对处于平衡态的蓝藻生物钟蛋白的构象进行了统计分析, 但该体系能否进一步用于研究蛋白

质的非平衡过程还仍不清楚. 本文将基于以往的冷冻电镜实验结果, 利用一个非平衡态统计物理模型对蓝藻生物钟蛋白的动力学过程进行预测. 我们的研究表明蓝藻生物钟蛋白系统是研究蛋白质非平衡过程的理想模型.

2 蓝藻生物钟蛋白作为一个理想模型

蓝藻细胞存在稳定的昼夜节律. 该节律是由 3 个核心蛋白质相互作用而实现的^[27,28]. 如图 1(a) 所示, 蓝藻生物钟的核心蛋白包括 KaiA, KaiB 和 KaiC^[29,30]. 该生物钟的时刻主要由 KaiC 蛋白的磷酸化程度表征, 该蛋白具有 ATPase 活性, 需通过水解 ATP 发挥作用. KaiC 为同源六聚体蛋白, 在其 C II 结构域存在两个磷酸化位点 S431 与 T432. 以往的生化实验表明 KaiC 蛋白的磷酸化与去磷酸化的顺序为: ST→SpT→pSpT→pST→ST^[31]. 在白天时, KaiA 与 KaiC 的 C 端结合以促进 KaiC 的自磷酸化; 而在夜晚时, KaiB 会与 KaiC 的 N 端结合, 同时还会通过结合 KaiA 来抑制 KaiA 对 KaiC 的作用, 以帮助 KaiC 的去磷酸化. 将这 3 个蛋白以一定的比例混合并提供 ATP, 在体外也能实现稳定地磷酸化节律^[27,28]. 能在体外发挥功能的特点使得蓝藻生物钟蛋白可作为一个理想系统来研究蛋白质的非平衡过程^[32–34].

早期一些研究根据生化实验推测位于 KaiC 的 C II 结构域的 A-loop (氨基酸 486–497) 存在两种构象, 并且这两种构象与 KaiC 的磷酸化与去磷酸过程高度相关^[35,36]. 虽然之前已有若干结构研究对不同条件下的 KaiC 的晶体结构进行解析, 但并未发现与 KaiC 的磷酸化状态相关的显著构象变化, 并且这些晶体结构的 A-loop 区域均为相似的构象. 2022 年, Furuike 等^[37]通过大量晶体结构研究发现 S431 位点的磷酸化状态与其附近的 T416–H429 片段的构象相关, 但并未观测到与 A-loop 区域相关的构象变化. 除此之外, Han 等^[38]利用冷冻电镜对模拟完全去磷酸化状态的 KaiC 突变体 KaiC-AA 和模拟完全磷酸化状态的 KaiC 突变体 KaiC-EE 进行了结构解析, 观察到了 A-loop 的构象变化. 如图 1(b) 所示, KaiC-AA 六聚体的 C II 结构域的中心孔的孔径显著大于 KaiC-EE 六聚体的中心孔距. 通过进一步的分析, 该研究发现 KaiC-AA 中心孔较大是由于其 A-loop 区域的电子密度

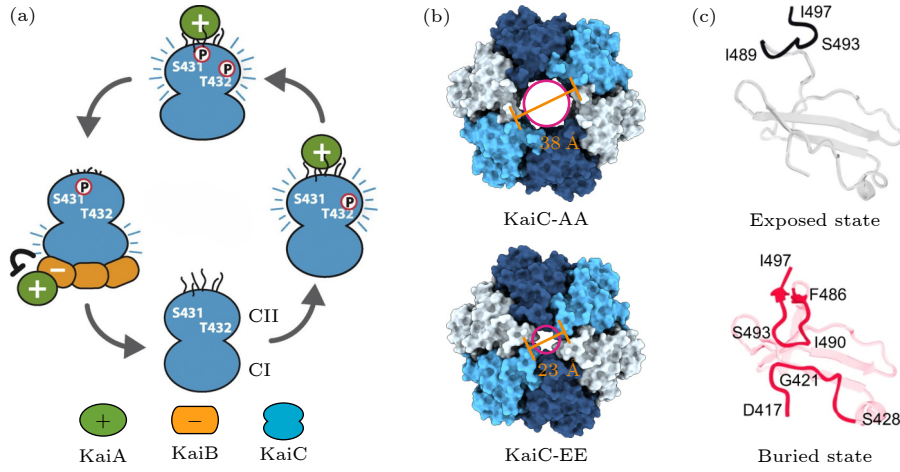


图 1 蓝藻生物钟蛋白 (a) 蓝藻生物钟核心蛋白的工作过程示意图^[29,30]; (b) KaiC-C II 结构域的冷冻电镜结构的表面示意图, KaiC-AA 六聚体中心孔径比 KaiC-EE 大^[38]; (c) A-loop(氨基酸 486-497) 的两个构象, 暴露态 (exposed state) 和埋藏态 (buried state)

Fig. 1. Overview of cyanobacterial oscillator: (a) A cartoon illustration of cyanobacterial oscillator^[29,30]; (b) space-filling depictions of structures of KaiC viewed from the C II side, the central pore diameter of KaiC-AA is larger than that of KaiC-EE^[38]; (c) two conformations of A-loop region, exposed state and buried state.

较弱, 这表明在 KaiC-AA 中, A-loop 动态变化较大. 而在 KaiC-EE 中, 其中心孔距较小是由于其 A-loop 区域的结构固定. 如图 1(c) 所示, 通过对 KaiC 的单体做更精细的分类, 该研究发现在两种样品中, A-loop 区域均存在两种构象: 埋藏态 (buried state) 和暴露态 (exposed state). 埋藏态的 A-loop 构象与以往晶体结构相似, 具有 U 形结构, 与 422-loop (氨基酸 417-428) 存在一定的相互作用. 而暴露态的 A-loop 无稳定的结构, 此时 422-loop 也无稳定的构象. 在另一个冷冻电镜研究中, Swan 等^[39]对 KaiC-AE 和 KaiC-EA 进行结构解析, 也发现了 A-loop 的两种构象, 但该研究未对 A-loop 的分布进行分析.

在 Han 等^[38,40]的研究中, 他们还对冷冻电镜中蕴含的蛋白质的构象分布信息进行了深入挖掘, 并结合统计物理方法揭示了 KaiC 亚基之间存在协同相互作用. 结合冷冻电镜的构象分类策略, 该研究对 A-loop 的构象在六聚体上的分布进行了统计, 得到如图 2 所示的两种突变体 A-loop 的构象分布. 进一步地, 该研究利用统计物理模型对 A-loop 的构象分布进行拟合. 该研究假设: 1) 六聚体的构象可用 $s = (s_1, s_2, \dots, s_6)$ 表示, 其中 $s_i = -1$ 表示单个亚基 A-loop 的构象为埋藏态, $s_i = 1$ 时为暴露态; 2) 只考虑最近邻亚基之间的相互作用 J ; 3) 不同磷酸化状态的蛋白的外场 B 不同. 基于这些假设, 六聚体的哈密顿量可写为

$$H = -B \sum_i s_i - J \sum_i s_i s_{i+1}. \quad (1)$$

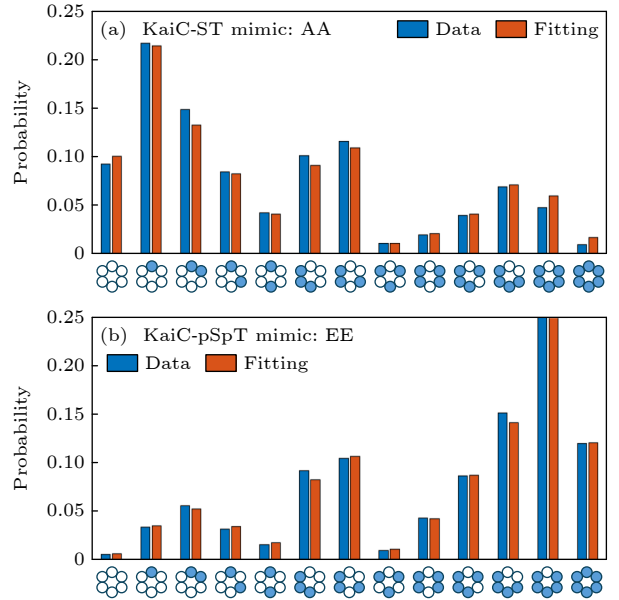


图 2 冷冻电镜解析的蓝藻生物钟蛋白 KaiC 的 A-loop 分布^[38] (a) KaiC-AA 的 A-loop 的构象分布, 横坐标代表六聚体的 13 种构型, 空白圆圈表示暴露态, 蓝色填充圆圈表示埋藏态; (b) KaiC-EE 的 A-loop 的构象分布

Fig. 2. A-loop conformational distribution of KaiC hexamers^[38]: (a) Conformational distribution of KaiC-AA hexamer, where 13 configurations are drawn within the x axis, un-filled circle represents exposed state and blue-filled circle represents buried state; (b) conformational distribution of KaiC-EE hexamer.

该研究发现 Ising 模型能高度拟合实验数据, 并得到 $J = 0.14 \pm 0.07$, $B_{AA} = 0.19 \pm 0.04$, $B_{EE} = -0.25 \pm 0.04$ (取等效热能 $k_b T = 1$, 本文后续相同). 由于近邻相互作用系数 $J > 0$, 则该结果说明六聚体的最近邻亚基之间存在协同效应. 结合冷冻电镜

方法, 该研究不仅从原子层面揭示了蓝藻生物钟蛋白 KaiC 的 A-loop 的两种构象, 并且利用蛋白质构象的分布对蛋白质亚基之间的相互作用进行了定量刻画.

在 Han 等^[38,40] 研究中, 通过定点突变将 KaiC 蛋白质的磷酸化水平固定, 然后利用冷冻电镜对处于平衡态的蛋白质进行结构解析以及构象分布统计, 其分析结果显然服从平衡态统计物理规律. 然而, 蓝藻生物钟蛋白在实际工作时处于非平衡态, 其磷酸化状态在周期性地变化, 如何通过冷冻电镜测量其非平衡态的构象分布, 并由此得到其非平衡态的统计物理规律是一个需要解决的问题. 同时, 在冷冻电镜样品制备过程中, 蛋白质经历了微秒尺度地快速降温过程, 在该过程中, 处于非平衡态的蛋白质是否会弛豫到平衡态? 在此, 我们基于 KaiC 平衡态的构象分布结果以及一些已知的生化实验, 将 KaiC 的平衡态 Ising 模型推广至非平衡态 Ising 模型. 基于非平衡 Ising 模型, 将对处于非平衡态的 KaiC 蛋白质动力学进行预测, 并分析冷冻电镜解析其非平衡过程的可能性.

3 蓝藻生物钟蛋白 KaiC 的非平衡态 Ising 模型

在 Ising 模型的框架下, Han 等^[38,40] 对外场 B 处于极值点时的 A-loop 的分布进行了测量. 当磷酸化水平随时间变化时, 外场 B 也应随时间变化, 其哈密顿量可以写为

$$H(t) = -B(t) \sum_i s_i - J \sum_i s_i s_{i+1}. \quad (2)$$

当外场随时间变化时, 利用主方程形式将更易于研究含时系统的动力学行为^[41,42]. 非平衡 Ising 模型的主方程可写为

$$\begin{aligned} & \frac{dp(s_1, \dots, s_i, \dots, s_N; t)}{dt} \\ &= - \sum_i w_i(s_i) p(s_1, \dots, s_i, \dots, s_N; t) \\ &+ \sum_i w_i(-s_i) p(s_1, \dots, -s_i, \dots, s_N; t), \quad (3) \end{aligned}$$

其中单个亚基的构象跳转概率 w_i 为

$$w_i(s_i) = \frac{1}{2} \alpha \left[1 - \frac{\gamma}{2} s_i (s_{i+1} + s_{i-1}) \right] (1 - \beta s_i), \quad (4)$$

其中 α 为单个亚基随机改变构象的本底速率. 利

用细致平衡条件可以推出等效相互作用 γ 和等效外场 β 与 J 和 B 的关系为

$$\gamma = \tanh(2J), \quad (5)$$

$$\beta = \tanh(B). \quad (6)$$

则单个亚基的构象均值可定义为

$$m(t) = \sum_i s_i p(s_1, \dots, s_i, \dots, s_N; t). \quad (7)$$

对于 KaiC 六聚体, 理论上存在 $2^6 = 64$ 种构象, 当考虑六聚体存在 C6 对称性后, 可将构象数目简化到 13 种. 则方程 (3) 可简化为 13 维的线性方程组:

$$\frac{d\mathbf{p}(t)}{dt} = \mathbf{A}(t) \cdot \mathbf{p}(t), \quad (8)$$

其中向量 $\mathbf{p}(t) = [p_1(t), p_2(t), \dots, p_{13}(t)]^T$, 13 个概率依次对应图 2 横坐标中的 13 种六聚体构型的概率; 矩阵 $\mathbf{A}(t)$ 可由 (4) 式得到. 简化后的主方程 (8) 可直接利用常微分方程数值计算方法进行模拟, 本文采用 MATLAB 中的 ode45 微分方程求解器进行数值模拟.

由于生物钟的周期固定不变, 本文时间单位均以周期 T 为基准. 当外场形式取 $B(t) = \cos(2\pi t/T)$ 时, 数值模拟结果如图 3 所示. 从模拟结果中可以看出, 当外场随时间变化后, 构象均值的极值大小以及极值点的位置会受 α 与 J 的影响. 其中一个显著的特征为: 当 α 减小时, 构象均值的极值点会滞后于外场极值点, 即外场与构象之间存在磁滞效应. 当体系为二聚体 ($N = 2$), 且外场 $B(t) = B_{\text{amp}} \sin(2\pi t/T)$ 较小时, 可解析推导出单个亚基的构象均值为

$$m(t) = (1 + \gamma) \cdot \cos \phi \cdot B_{\text{amp}} \cdot \sin(2\pi t/T - \phi), \quad (9)$$

$$\tan \phi = \frac{2\pi}{\alpha T (1 - \gamma)}. \quad (10)$$

从 (10) 式可以看出, 当外场随时间变化后, 构象的均值与外场不是直接的线性关系, 而是存在相位差 ϕ . 该相位差与外场周期 T 和单个亚基构象变化的本底速率 α 的乘积相关, 且受亚基之间最近邻相互作用 β 影响. 如图 4 所示, 通过随机模拟对六聚体 ($N = 6$) 系统的相位延迟进行分析, 并与 (10) 式的结果进行对比可发现在很大参数范围内, (10) 式对六聚体系统依然成立.

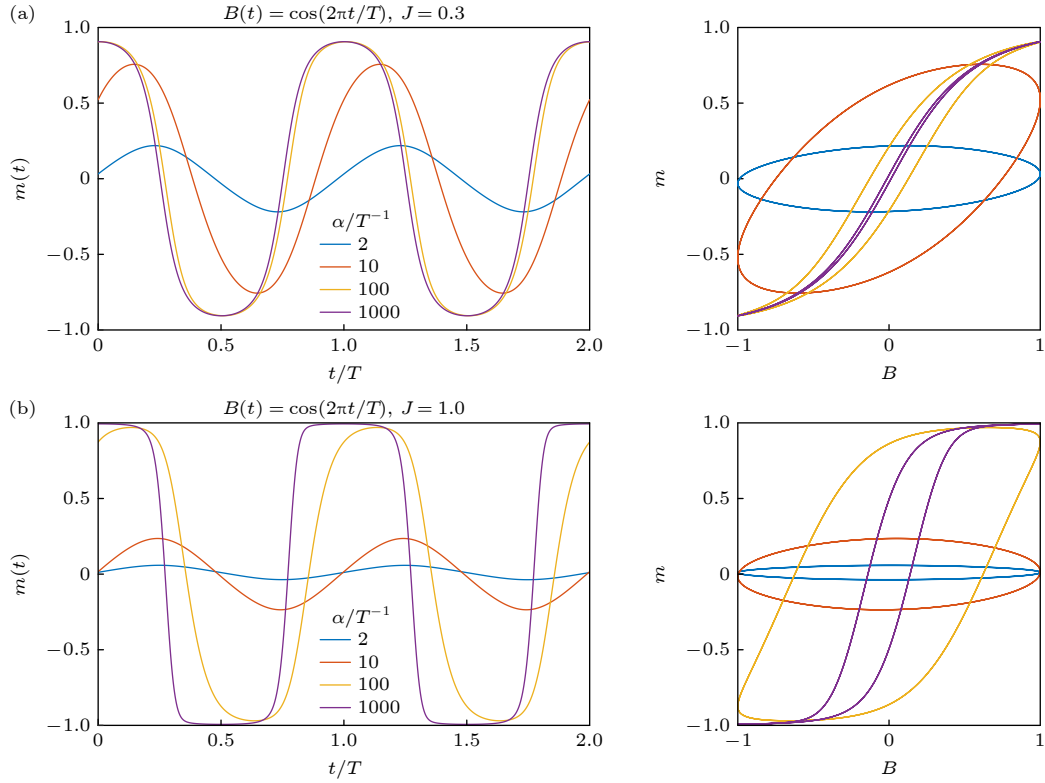


图 3 非平衡态 Ising 模型数值模拟结果 (a) $J = 0.3$ 时, 不同 α 条件下构象均值的演化 (左), 均值 m 与外场 B 的关系 (右); (b) $J = 1.0$ 时, 不同 α 条件下构象均值的演化 (左), 均值 m 与外场 B 的关系 (右)

Fig. 3. Typical numerical simulation results of non-equilibrium Ising model: (a) evolution of $m(t)$ when $J = 0.3$ in various α (left), relation between expectation value m and external field B (right); (b) evolution of $m(t)$ when $J = 1.0$ in various α (left), same as panel (a) (right).

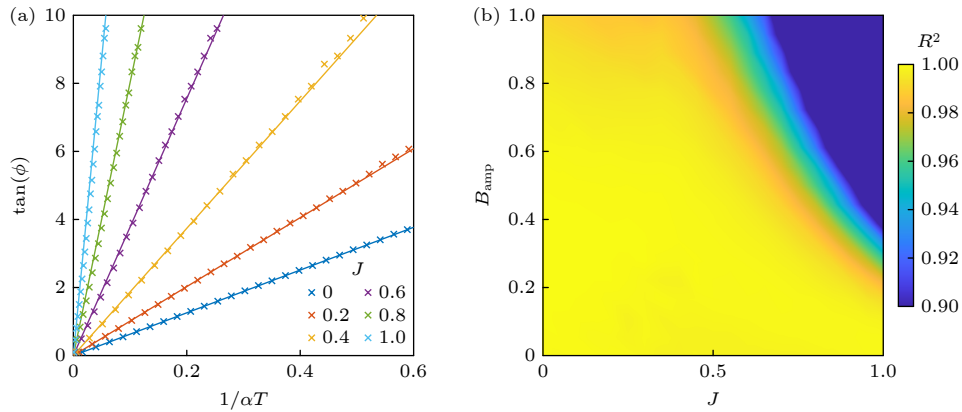


图 4 (10) 式对六聚体系统的适用性验证 (a) 外场振幅 $B_{\text{amp}} = 0.3$ 时数值结果与 (10) 式的拟合, 图中实线为理论结果, 十字叉为数值模拟结果; (b) 不同参数范围时 (10) 式与数值模拟结果的拟合程度

Fig. 4. Validation of applicability of Eq. (10) for the hexamer system: (a) Fitting the Eq. (10) with numerical results when the amplitude of external field B_{amp} is 0.3, here solid curve represents results of the theoretical equation whereas the cross represents numerical results; (b) fitting of the theoretical equation and numerical result in a wide range of parameters.

4 蓝藻生物钟蛋白 KaiC 的动力学模拟

A-loop 是 KaiA 与 KaiC 结合的部分作用位点, 研究表明暴露态的 A-loop 能促进 KaiA 与 KaiC

的结合, 从而提高 KaiC 的 ATPase 活性^[36]. 2007 年, Terauchi 等^[43]对 KaiC 蛋白的若干生化特性进行测量, 发现 KaiC 蛋白磷酸化程度与其 ATPase 活性峰值之间存在约 4 h 的时间延迟. 在 Ising 模型中, 本文假设外场与 KaiC 的磷酸化程度相关, 同

时结合 A-loop 的功能可以推断 A-loop 的构象与 KaiC 的 ATPase 活性相关, 则可以进一步假设构象与外场之间的延迟应类似于磷酸化程度与 ATPase 活性之间的延迟. 利用 (10) 式以及 Han 等 [38,40] 的结果研究, 可以得到 KaiC 蛋白的 α 范围为 $[5.7 T^{-1}, 10.6 T^{-1}]$.

图 5(a) 为 KaiC 蛋白 A-loop 的分布的模拟结果, 其中模拟参数 $J = 0.14$, B 取为

$$B(t) = 0.5(B_{AA} + B_{EE}) + 0.5(B_{AA} - B_{EE}) \cdot \cos(2\pi t/T). \quad (11)$$

从图中可以看出, 当 $\alpha = 5 T^{-1}$ 或 $10 T^{-1}$ 时, p_2 与 p_{12} 的极大值点数值显著小于平衡态 ($\alpha = \infty$) 对应的极值点. 除此之外, 还可观察到 p_2 与 p_{12} 在一个周期内的变化相对于平衡态更平缓. 为进一步对比非平衡态的分布与平衡态分布的特征, 本文利用决定系数 R^2 来衡量不同分布之间的区别. 假设非平衡态与平衡态的分布分别为 $\{p_k(t)\}$ 和 $\{p_k^*(t)\}$, 以及非平衡态分布与外场的时间延迟为 τ . 则两个分布的决定系数 R^2 可定义为

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_k \int_0^T [p_k^*(t) - p_k(t + \tau)]^2 dt}{\sum_k \int_0^T [p_k^*(t) - \bar{p}^*]^2 dt}, \quad (12)$$

$$\bar{p}^* = \frac{\sum_k \int_0^T p_k^*(t) dt}{13T}. \quad (13)$$

图 5(b) 为在外场形式取为 (11) 式时, 不同 α 与 J 条件下非平衡态分布与平衡态分布的决定系数. 从结果中可看出, 随着 α 的减小, 决定系数逐渐减少, 且变化趋势随着 J 的增大而增强. 这说明在外场变化的条件下, 构象与外场之间不但存在时间延迟, 在分布上也存在着显著差异, 并且该差异随着 α 的减小以及 J 的增大而变得更显著. 根据 KaiC 蛋白平衡态的实验结果, 在图 5(b) 中标注出 $\alpha \in [5.7 T^{-1}, 10.6 T^{-1}]$, $J \in [0.1, 0.2]$ 的区域, 不难看出, 在蓝藻 KaiC 蛋白参数范围内, 决定系数 R^2 在 0.94 附近.

以上结果说明当蓝藻生物钟蛋白 KaiC 在处于非平衡态时, 其构象的分布与对应平衡态的构象分布特征有显著区别. 该区别一方面来源于 KaiC 蛋白单体构象变化的速率较慢, 另一方面来源于 KaiC 单体之间存在协同相互作用, 这两个因素共同影响了 KaiC 蛋白的构象对外场的响应速度. 除此之外, 利用单体构象转换的速率可以估算非平衡态 KaiC 蛋白弛豫到平衡态的时间尺度约为小时量级, 该时间尺度远大于冷冻电镜样品制备的时间尺度.

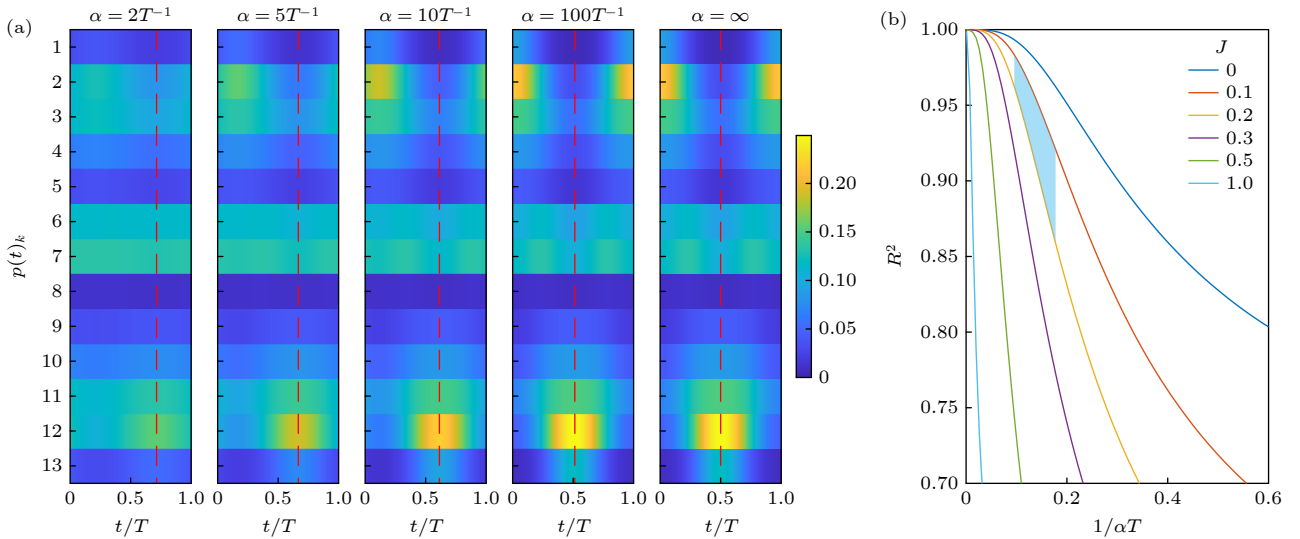


图 5 KaiC 蛋白 A-loop 分布模拟结果 (a) KaiC 蛋白 A-loop 构象分布模拟, 其中序号 1—13 与图 2 中六聚体构型依次对应, 红色虚线为 p_{12} 的极大值对应的位置; (b) 非平衡态分布与平衡态分布的决定系数 R^2 , 蓝色阴影部分为 KaiC 蛋白的参数范围

Fig. 5. Simulation results of A-loop distribution for KaiC hexamers: (a) Evolution of A-loop distribution, where 13 states correspond to the markers drawn in Fig. 2 and red dash represents peak of distribution p_{12} ; (b) R^2 between the non-equilibrium distribution and the corresponding equilibrium distribution, where blue shadow covers the parameter range of KaiC.

5 总结与展望

通过将 KaiC 蛋白的平衡态 Ising 模型推广至非平衡态, 本文发现在非平衡态模型中, 构象的分布与外场之间存在磁滞现象. 首先, 磁滞现象与单体构象变化时间尺度与外场变化时间尺度的比值相关. 当单体构象变化慢时, 磁滞现象越明显. 其次磁滞现象还与单体间的相互作用有关, 单体间相互作用越强, 磁滞效应会越明显. 对于蓝藻生物钟蛋白 KaiC, 本文通过参考以往生化实验结果对 KaiC 单体构象变化的时间尺度进行估算, 发现 KaiC 单体构象变化的时间尺度较慢, 这与 KaiC 的 ATPase 活性相对于其他典型 ATPase 蛋白的活性较低具有一致性^[44]. 另一方面, KaiC 蛋白单体之间的协同相互作用进一步增强其处于非平衡态时的特征, 使其非平衡态的分布与对应的平衡态分布有更显著的区别. 由于 KaiC 从非平衡态弛豫到平衡态的时间尺度远大于冷冻电镜样品制备时间尺度, 则在利用冷冻电镜重构其构象分布时, 应十分接近冷冻前一瞬间的构象分布, 即理论上冷冻电镜可以捕捉到 KaiC 蛋白非平衡态的构象分布. 同时, 结合以上分析可知该构象分布的特征与平衡态的分布特征有显著差异.

当前传统的结构生物学研究还处在利用冷冻电镜纯粹地解析蛋白质的高分辨率结构的阶段, 还未对冷冻电镜数据中包含的蛋白质的热力学与动力学信息进行深入挖掘. 随着冷冻电镜技术的发展, 未来对于蛋白质的结构解析将越来越容易, 冷冻电镜技术的应用不应局限于纯粹的结构解析. Han 等^[38,40]的研究说明冷冻电镜技术可以用于推断蓝藻生物钟 KaiC 蛋白的热力学信息, 本文在此基础上结合非平衡态统计物理模型说明冷冻电镜也具有分析蓝藻生物钟蛋白 KaiC 动力学过程的潜力. 通过对蓝藻生物钟蛋白这一理想系统更进一步的研究, 可以为其他更复杂的蛋白质体系的研究提供范例, 以拓展冷冻电镜的应用范围. 同时, 利用冷冻电镜所测量的信息为蛋白质单分子的构象分布, 还能为非平衡态统计物理的理论发展提供更丰富的实验信息.

参考文献

- [1] Henzler-Wildman K, Kern D 2007 *Nature* **450** 964
- [2] Kern D 2021 *Nat. Methods* **18** 435
- [3] Wei G, Xi W, Nussinov R, Ma B 2016 *Chem. Rev.* **116** 6516
- [4] Motlagh H N, Wrabl J O, Li J, Hilser V J 2014 *Nature* **508** 331
- [5] Dou Y, Dhatt-Gauthier K, Bishop K J M 2019 *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **23** 28
- [6] Brown A I, Sivak D A 2020 *Chem. Rev.* **120** 434
- [7] Fang X, Wang J 2020 *Ann. Rev. Biophys.* **49** 227
- [8] Seifert U 2019 *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.* **10** 171
- [9] Fang X, Kruse K, Lu T, Wang J 2019 *Rev. Mod. Phys.* **91** 045004
- [10] Ciliberto S 2017 *Phys. Rev. X* **7** 021051
- [11] Bustamante C, Yan S 2022 *Q. Rev. Biophys.* **55** e9
- [12] Zhang D L, Ouyang Q 2021 *Entropy* **23** 271
- [13] Frank J 2013 *Biopolymers* **99** 832
- [14] Doerr A 2016 *Nat. Methods* **13** 23
- [15] Sigworth F J 2007 *Nat. Methods* **4** 20
- [16] Bonomi M, Vendruscolo M 2019 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **56** 37
- [17] Wu Z L, Chen E B, Zhang S W, Ma Y P, Mao Y D 2022 *Int. J. Mol. Sci.* **23** 8872
- [18] Scheres S H 2016 *Methods Enzymol.* **579** 125
- [19] Zhong E D, Bepler T, Berger B, Davis J H 2021 *Nat. Methods* **18** 176
- [20] Huang R, Ripstein Z A, Rubinstein J L, Kay L E 2020 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **59** 22423
- [21] Roh S H, Hryc C F, Jeong H H, Fei X, Jakana J, Lorimer G H, Chiu W 2017 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114** 8259
- [22] Zhao Y Y, Schmid M F, Frydman J, Chiu W 2021 *Nat. Commun.* **12** 4754
- [23] Amann S J, Keihlsler D, Bodrug T, Brown N G, Haselbach D 2023 *Structure* **31** 4
- [24] Bhattacharjee S, Feng X, Maji S, Dadhwal P, Zhang Z, Brown Z P, Frank J 2024 *Cell* **187** 782
- [25] Zhang S W, Zou S T, Yin D Y, Zhao L H, Finley D, Wu Z L, Mao Y D 2022 *Nature* **605** 567
- [26] Loveland A B, Demo G, Korostelev A A 2020 *Nature* **584** 640
- [27] Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T 2005 *Science* **308** 414
- [28] Chavan A G, Swan J A, Heisler J, Sancar C, Ernst D C, Fang M, Palacios J G, Spangler R K, Bagshaw C R, Tripathi S, Crosby P, Golden S S, Partch C L, LiWang A 2021 *Science* **374** eabd4453
- [29] Partch C L 2020 *J. Mol. Biol.* **432** 3426
- [30] Swan J A, Golden S S, LiWang A, Partch C L 2018 *J. Biol. Chem.* **293** 5026
- [31] Rust M J, Markson J S, Lane W S, Fisher D S, O'Shea E K 2007 *Science* **318** 809
- [32] Zhang D L, Cao Y S, Ouyang Q, Tu Y H 2020 *Nat. Phys.* **16** 95
- [33] Paijmans J, Lubensky D K, Ten Wolde P R 2017 *PLoS Comp. Biol.* **13** e1005415
- [34] van Zon J S, Lubensky D K, Altena P R, ten Wolde P R 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** 7420
- [35] Kim Y I, Dong G, Carruthers C W, Jr., Golden S S, LiWang A 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** 12825
- [36] Tseng R, Chang Y G, Bravo I, Latham R, Chaudhary A, Kuo N W, Liwang A 2014 *J. Mol. Biol.* **426** 389
- [37] Furuike Y, Mukaiyama A, Ouyang D, Ito-Miwa K, Simon D, Yamashita E, Kondo T, Akiyama S 2022 *Sci Adv* **8** eabm8990
- [38] Han X, Zhang D L, Hong L, Yu D Q, Wu Z L, Yang T, Rust M, Tu Y H, Ouyang Q 2023 *Nat. Commun.* **14** 5907
- [39] Swan J A, Sandate C R, Chavan A G, Freeberg A M, Etwaru

- D, Ernst D C, Palacios J G, Golden S S, Liwang A, Lander G C, Partch C L 2022 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29** 759
- [40] Han X, Wu Z L, Yang T, Ouyang Q 2022 *Chin. Phys. Lett.* **39** 070501
- [41] Glauber R J 1963 *J. Math. Phys.* **4** 294
- [42] Gillespie D T 2007 *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58** 35
- [43] Terauchi K, Kitayama Y, Nishiwaki T, Miwa K, Murayama Y, Oyama T, Kondo T 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** 16377
- [44] Abe J, Hiyama T B, Mukaiyama A, Son S, Mori T, Saito S, Osako M, Wolanin J, Yamashita E, Kondo T, Akiyama S 2015 *Science* **349** 312

The 90th Anniversary of *Acta Physica Sinica*·COVER ARTICLE

Study of non-equilibrium statistical physics of protein machine by cryogenic electron microscopy*

Yang Tian¹⁾ Ouyang Qi^{1)2)†}

1) (School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China)

2) (Center for Quantitative Biology, Peking University, Beijing 100871, China)

(Received 29 April 2024; revised manuscript received 29 May 2024)

Abstract

A comprehensive description of the protein should include its structure, thermodynamics, and kinetic properties. The recent rise of cryogenic electron microscopy (cryo-EM) provides new opportunities for the thermodynamic and kinetic research of proteins. There have been some researches in which cryo-EM is used not only to resolve the high-resolution structure of proteins but also to analyze the conformational distribution of proteins to infer their thermodynamic properties based on data processing methods. However, whether cryo-EM can be used to directly quantify the kinetics of proteins is still unclear. In this work, an ideal protein system, cyanobacterial circadian clock protein, is selected to explore the potential of cryo-EM used to analyze the non-equilibrium process of proteins. Previous research has illustrated that cryoelectron microscope can be used to infer the thermodynamic information about the KaiC protein such as the inter-subunit interaction within the hexamers. Herein, we extend the equilibrium Ising model of KaiC hexamers to a non-equilibrium statistical physics model, revealing the properties of the non-equilibrium process of KaiC hexamers. According to the non-equilibrium model and previous biochemical research, we find that the intrinsic properties of KaiC protein allow its non-equilibrium conformational distribution to be measured by cryo-EM.

Keywords: protein dynamics, non-equilibrium statistical physics, cryogenic electron microscopy

PACS: 87.15.-v, 87.16.A-, 87.64.Ee, 05.70.Ln

DOI: 10.7498/aps.73.20240592

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 12090054).

† Corresponding author. E-mail: qi@pku.edu.cn



利用冷冻电镜研究蛋白质机器的非平衡统计物理

杨添 欧阳颀

Study of non-equilibrium statistical physics of protein machine by cryogenic electron microscopy

Yang Tian Ouyang Qi

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 73, 138701 (2024) DOI: 10.7498/aps.73.20240592

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.73.20240592>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

蛋白质计算中的机器学习

Machine learning for *in silico* protein research

物理学报. 2024, 73(6): 069301 <https://doi.org/10.7498/aps.73.20231618>

低维微纳尺度体系声子热传导和热调控: 来自芯片散热的非平衡统计物理问题

Phononic thermal conduction and thermal regulation in low-dimensional micro-nano scale systems: Nonequilibrium statistical physics problems from chip heat dissipation

物理学报. 2023, 72(23): 234401 <https://doi.org/10.7498/aps.72.20231546>

蛋白质 pK_a 预测模型研究进展

Progress in protein pK_a prediction

物理学报. 2023, 72(24): 248704 <https://doi.org/10.7498/aps.72.20231356>

基于冷原子的非平衡量子多体物理研究

Non-equilibrium quantum many-body physics with ultracold atoms

物理学报. 2023, 72(23): 230701 <https://doi.org/10.7498/aps.72.20231375>

蛋白质基忆阻器研究进展

Research progress of protein-based memristor

物理学报. 2020, 69(17): 178702 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200617>

高分子混合刷吸附/脱附蛋白质的模型化研究

Modeling study of adsorption/desorption of proteins by polymer mixed brush

物理学报. 2021, 70(22): 224701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20211219>