中 国 科 学

1990 年 6 月　　B 辑　　第 6 期

中等分辨率的白鲢鱼胰岛素的晶体结构

李志伟　毕汝昌　赵宝光

（中国科学院生物物理研究所，北京 100080）

严友为　方继康

（中国科学院上海生物化学研究所，上海 200031）

摘　要

胰岛素结构和功能研究的一条重要途径是分析来源于不同种属的胰岛素的结构。基于用分子置换法获得的白鲢鱼胰岛素正交晶体结构模型，使用 2.8 Å 分辨率衍射强度数据和约束参数最小二乘法，对处于不同结晶环境的 6 个白鲢鱼胰岛素分子进行了晶体学修正。胰岛素结构的比较研究表明，6 个白鲢鱼胰岛素分子具有非常相似但不等同的三维结构，它们的结构类似于已知的三方二锌猪胰岛素结构，但某些局部构象有明显的差异。

关键词：胰岛素结构，白鲢鱼胰岛素，蛋白质修正

自 20 年代从小牛胰腺首次提取胰岛素以来，对胰岛素的结构和功能做了相当多的研究，3 个研究组分别解得了原子分辨率的猪胰岛素三维结构[1-3]。这些研究结果为了解胰岛素的结构特征和性质积累了丰富资料，也在一定程度上为理解胰岛素的结构和功能关系奠定了基础。然而，鉴于这一多肽激素生物功能的复杂性，尚存在许多问题有待进一步研究和解决。

表 1　胰岛素的氨基酸序列

A 链	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
白鲢鱼	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	His	Lys	Pro	Cys	Ser	Ile	Phe	Glu	Leu	Gln	Asn	Tyr	Cys	Asn
猪								Thr	Ser	Ile			Leu	Tyr	Gln		Glu				
粘盲鳗										Arg				Tyr	Asn						
B 链	−1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
白鲢鱼	Asn	Ala	Gly	Ala	Pro	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cys
猪	—	—	Phe	Val	Asn										Glu						
粘盲鳗	—	—	Arg	Thr	Thr	Gly					Lys	Asp			Asn				Ile	Ala	
B 链	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31									
白鲢鱼	Gly	Asp	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Pro	Lys	—	—									
猪		Glu									Ala	—									
粘盲鳗		Val						Asp		Thr	Lys	Met									

本文 1989 年 7 月 28 日收到，1989 年 11 月 23 日收到修改稿。

在胰岛素的结构和功能研究中，一条重要研究途径是分析来源于不同种属的胰岛素的结构和功能．目前仅测定了两种氨基酸序列差异较大的胰岛素的三维结构，即哺乳动物猪和原始的脊椎动物粘盲鳗胰岛素的三维结构．这两种胰岛素在进化上距离甚远，难以从极其相似的三维结构理解其生物活性上的明显差别[4]．白鲢鱼胰岛素是从白鲢鱼的胰岛分离出来的胰岛素，其氨基酸序列与猪和粘盲鳗胰岛素都有较大差异(表 1)，但其生物活性与猪的接近而远大于粘盲鳗胰岛素[5]．白鲢鱼胰岛素结晶于一种正交晶型，已应用分子置换法解得了这种正交晶体的结构模型[6,7]．本文将叙述对该模型已完成的中等分辨率的晶体学修正及其结果，并就胰岛素的结构及其与功能的关系进行讨论．

一、晶体学修正

白鲢鱼胰岛素正交晶体的空间群为 $P2_12_12_1$，其晶胞参数为 $a = 96.73$ Å，$b = 57.74$ Å，$c = 53.88$ Å，每个晶体学不对称单位含由 6 个分子构成的六聚体[6]．在 Philips PW1100 四圆衍射仪上，用一个晶体 ($0.5 \times 0.3 \times 0.2 mm^3$) 收集了 2.8 Å 分辨率的数据，共 7893 个独立反射数据经 Lp 因子和吸收校正[6]．

依据旋转和平移研究解得的取向和平移参数[7]，将三方二锌猪胰岛素六聚体(其中分子 2，4，6 为三方二锌猪胰岛素分子 1，而分子 1，3，5 为三方二锌猪胰岛素分子 2)[8]置于白鲢鱼胰岛素正交晶胞里．从这样得到的结构模型去除肽段 A8—A10 和 B1—B4 残基的所有原子以及其他替换残基除 CB 以外的侧链原子，剩下的 6 个不完整分子共 1926 个原子则成为待修正的初始结构模型．

应用约束参数最小二乘修正程序 PROLSQ[9]，基于现有的 2.8 Å 分辨率强度数据，对白鲢鱼胰岛素晶体结构进行了晶体学修正．修正过程中，除按约束值对立体化学做了制约，还按非晶体学对称性对其相关的 6 个独立分子做了约束．每一阶段修正收敛后，都要根据电子密度图对计算程序不能纠正的结构模型的较大误差进行调整．在修正初期，先后用 9.5—3.5 Å 和 6—3.5 Å 分辨率数据，将上述结构模型做了初步结构修正，对于数据中的较强反射计算的晶体学 R 因子下降到 0.32．在以后的修正过程中，对结构模型做了 5 次较大的调整．首次调整，因那时还不具备图象系统，是将用初步修正的模型算得的 2Fo—Fc 电子密度图部分地画在玻璃板上，从中找出 A8—A10 大部分原子的倾向性位置，并将它们增加到下阶段的结构修正中．然后，基于 6—2.8 Å 分辨率数据用 PROLSQ 程序修正结构模型，直到收敛再调整模型误差．以后四次较大的模型调整，是在 Evans 和 Sutherland PS300 彩色图象系统上用 FRODO程序[10] 完成的．主要的模型重建工作，一是调整包括 A8—A10 在内的已有原子的位置误差，二是寻找和确定短缺的 B 链 N 端的 6 个残基和其他替换残基的侧链，后 4 次大的调整共增加 304 个原子．用 PROLSQ 共进行了 70 多轮修正，用 5536 个较强的反射最后算得的 R 值为 0.21，按分辨率壳层的 R 值分布示于表 2 中．最后得到的白鲢鱼胰岛素六聚体结构模型包括 2328 个非氢原子，B 链 N 端尚有分子 3 和分子 5 的 B-1 到 B3 以及分子 6 的 B-1 到 B1 共 13 个残基因密度表现不好而未能确定位置坐标．

结构修正过程中，当原子坐标和整体温度因子 B 修正到 R 值低于 0.30 以后，开始尝试单个原子各向同性 B 因子的修正．这时，整体温度因子修正收敛后再做一两轮单个 B 因子的修正，所产生的结构扰动可能有助于原子跳出某些误差陷阱．在所用分辨率数据的情形里，做单

个原子温度因子的修正是危险的，因此对B值的变化做了较严格的制约，有时根据原子B值的合理性而决定增值的多少或做适当的人工调整.修正中一般将温度因子的低限值取为2 Å^2，最后的R因子则是令B的低限值为5 Å^{2}时计算得到的，只有极少数原子的B值大于30 Å^2。最后的主链原子平均B值随残基序号的变化也表现出一定的合理性，肽链末端残基的平均B值一般偏高。在修正的最后阶段，还对溶剂分子的辨认做了尝试。根据2Fo — Fc电子密度图，将锌离子附近的少数密度峰做为可能的水分子加入结构模型进行修正，所得结构参数基本上合理，它们之间或与蛋白质残基原子间可形成氢键网络。

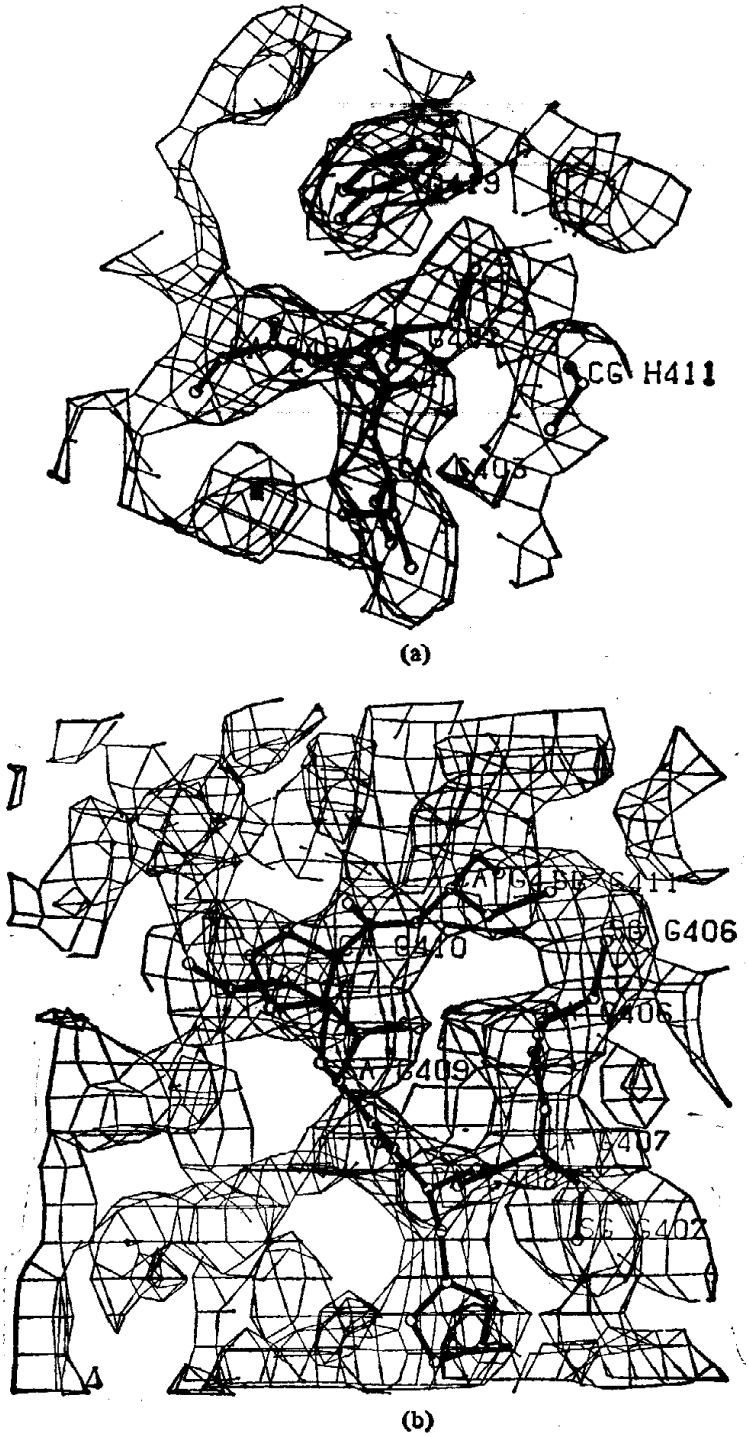


图1　白鲢鱼胰岛素分子4部分结构的电子密度图

表 2 修正的统计数据

原子总数: 2328		分辨率	反射数	分壳R值
对约束值的 r. m. s. 偏离		6.0—5.0	509	0.236
键长 (Å)	0.017(0.03)*	5.0—4.5	452	0.201
键角距离 (Å)	0.049(0.05)	4.5—4.0	725	0.182
平面 1—4 距离 (Å)	0.028(0.04)	4.0—3.5	1141	0.192
平面制约 (Å)	0.033(0.04)	3.5—3.0	1728	0.216
手性中心制约 (Å^3)	0.182(0.15)	3.0—2.8	981	0.232

* 括号内为修正时所用的σ值.

表 2 给出白鲢鱼胰岛素结构修正的统计数据. 从修正的指标来看, 所得结构模型的立体化学是合理的. 在最后的电子密度图上,绝大多数残基有较好的表现. 图 1 给出分子 4 A1—A3 及 A 链小环 A6—A11 的电子密度图,所用结构因子 F_c 是用排除 A1—A11 整个肽段全部原子后的模型计算的.

二、结果和讨论

1. 结构的一般描述

在正交晶体里, 白鲢鱼胰岛素六聚体的堆积方式不同于胰岛素六聚体在其他已知晶体里的情形, 而且处于不对称单位里的 6 个独立分子与相邻六聚体的接触情况也是不相同的. 在三方二锌猪胰岛素晶体中, 相邻六聚体不同分子间较紧密接触分别存在于 B5His 间、B 链 C 端残基间及 B27Thr 和 A18Asn 等残基之间[3]. 在白鲢鱼胰岛素正交晶体里, 这些相应残基部位的相邻六聚体间接触情况发生了变化,例如,分子 4 A18Asn 的侧链占有了相邻另一六聚体分子 5 B5His 侧链附近的空间,使该 B5 侧链转向其自身分子,与相邻分子不再有较紧密的接触; 缺失 B30 的白鲢鱼胰岛素中, 分子 4 的 B29 与相邻六聚体的分子 2 A1 和 B27 残基有较近接触,可能形成氢键或极性作用.

构成六聚体的 6 个白鲢鱼胰岛素分子的三维结构相似而不等同. 如果不考虑部分密度表现较差的分子 1 和构象变化较大的肽链末端残基, 用优化重叠方法对每两个分子算得的 CA 原子位置的均方根偏离均在 0.58—0.88 Å 范围内. 6 个白鲢鱼胰岛素分子都具有与三方二锌猪胰岛素分子相同的结构特征,但某些局部构象发生了或大或小的变化,特别是在肽链的端部和一级结构不同的部位. 将每个白鲢鱼胰岛素分子分别与三方二锌猪胰岛素的两个独立分子进行优化重叠比较,其等效 CA 原子位置的均方根偏离一般在 0.55—0.84 Å 之间. 在目前的结构分析水平,还不能断定这 6 个白鲢鱼胰岛素分子与哪个三方二锌猪胰岛素分子(后文中简称二锌猪胰岛素分子)更相似.

2. 单体分子

如果将肽链主链的构象进行分段优化叠合比较, 则可以发现白鲢鱼胰岛素分子与二锌猪胰岛素分子的结构差异主要在 A 链头部、A 链小环和 B 链头尾部等胰岛素构象柔性较大的部位,而形成二级结构的肽段,如 B9—B19 和 A12—A19 螺旋以及 B24--B26β 结构,则具有较稳定的构象. 下面主要以白鲢鱼胰岛素分子 4 为例,来说明白鲢鱼胰岛素单体分子的结构. 图 2 表示出白鲢鱼胰岛素分子 4 的三维结构沿 c 轴方向的投影. 象二锌猪胰岛素分子的结构那

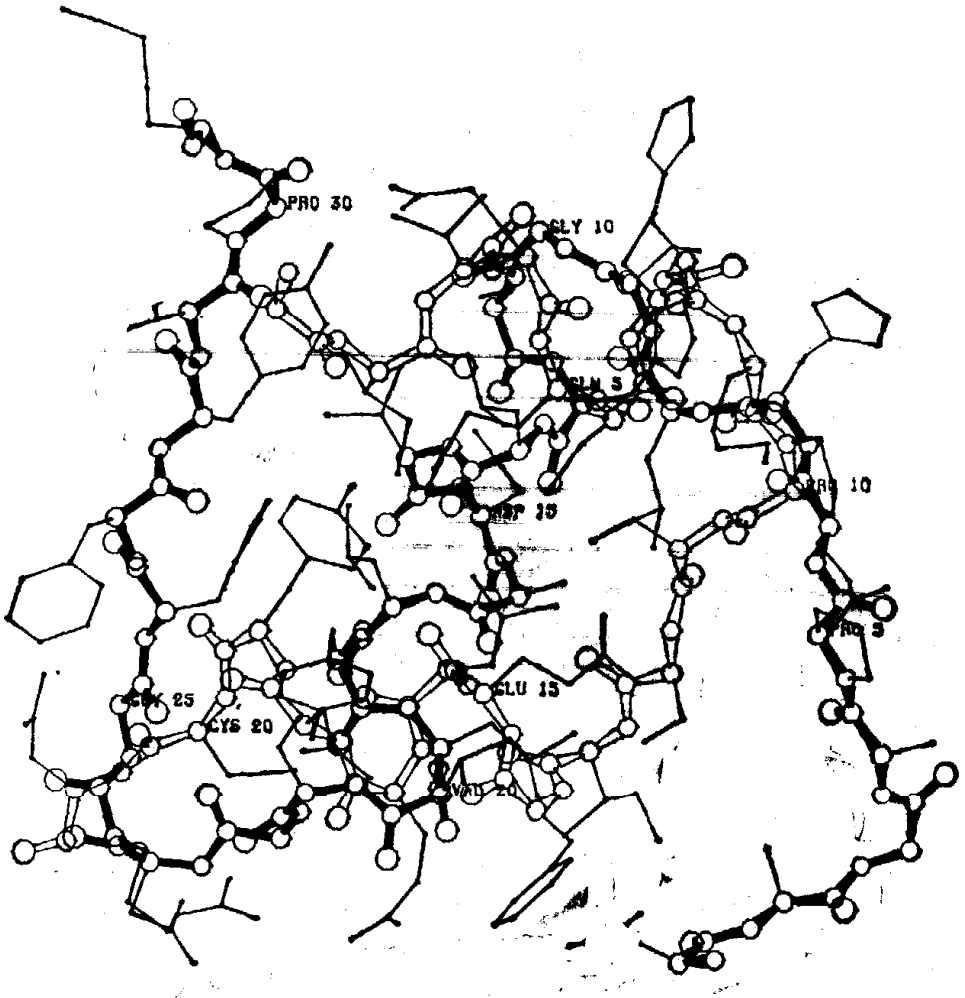


图 2　白鲢鱼胰岛素分子 4 沿 c 方向的投影
（空心线为 A 链，实心线为 B 链）

样，由 3 个二硫桥（A6—A11，A7—B7 和 A20—B19）联系在一起的 B 链 α 螺旋和 A 链两段较松散的螺旋构成分子的骨架，B 链两端较伸展的肽段借助 B8 和 B21 两处的肽链转折包卷在分子表面。

图 3 是白鲢鱼胰岛素分子 4 同二锌猪胰岛素分子 1 的主链叠合图。可以看出，A 链 N 端残基的构象差异较大。白鲢鱼胰岛素分子 4 的 A 链 N 端与 B 链 C 端彼此更加靠近，其 A1Gly 氨基伸向原二锌猪胰岛素分子 1 B30Ala 羧基所处的空间，A2N 和 B27O 间能够成氢键联系。在电子密度图上，A 链小环中的 3 个替换残基 A8His，A9Lys 和 A10Pro 具有相应的密度表现（图 1(b)），Pro 的五元环凸向分子表面，A9Lys 的侧链的密度不清楚与其活动性较大相关。A6—A11 肽段走向与二锌猪胰岛素的差别主要发生在 A10Pro 附近，在白鲢鱼胰岛素各分子间也有差异。A12—A19 的松散螺旋也包含几个替换残基，其中 A13Ile，A15 Glu 和 A17 Gln 的侧链基本上仍取二锌猪胰岛素里相应残基的方位，只有 A14 Phe 的苯环绕 CA—CB 键转动到其羰基氧一方，白鲢鱼胰岛素六聚体的其他分子中也有类似转动现象。

相对来讲，白鲢鱼胰岛素的 B 链构象与二锌猪胰岛素的更相似（图 3(b)），主要差异发生在 B 链 N 端残基，虽然 B 链 C 端的构象也有变化。B 链 N 端较猪胰岛素多出两个残基，而且 B3 换成了 Pro。在目前的电子密度图上，分子 4 的 B 链 N 端肽链走向从 B3 起明显偏离二锌猪胰岛素相应残基的位置，而后在 B1 Gly 处形成一个缓慢的转折，B-1 Asn 残基几乎占

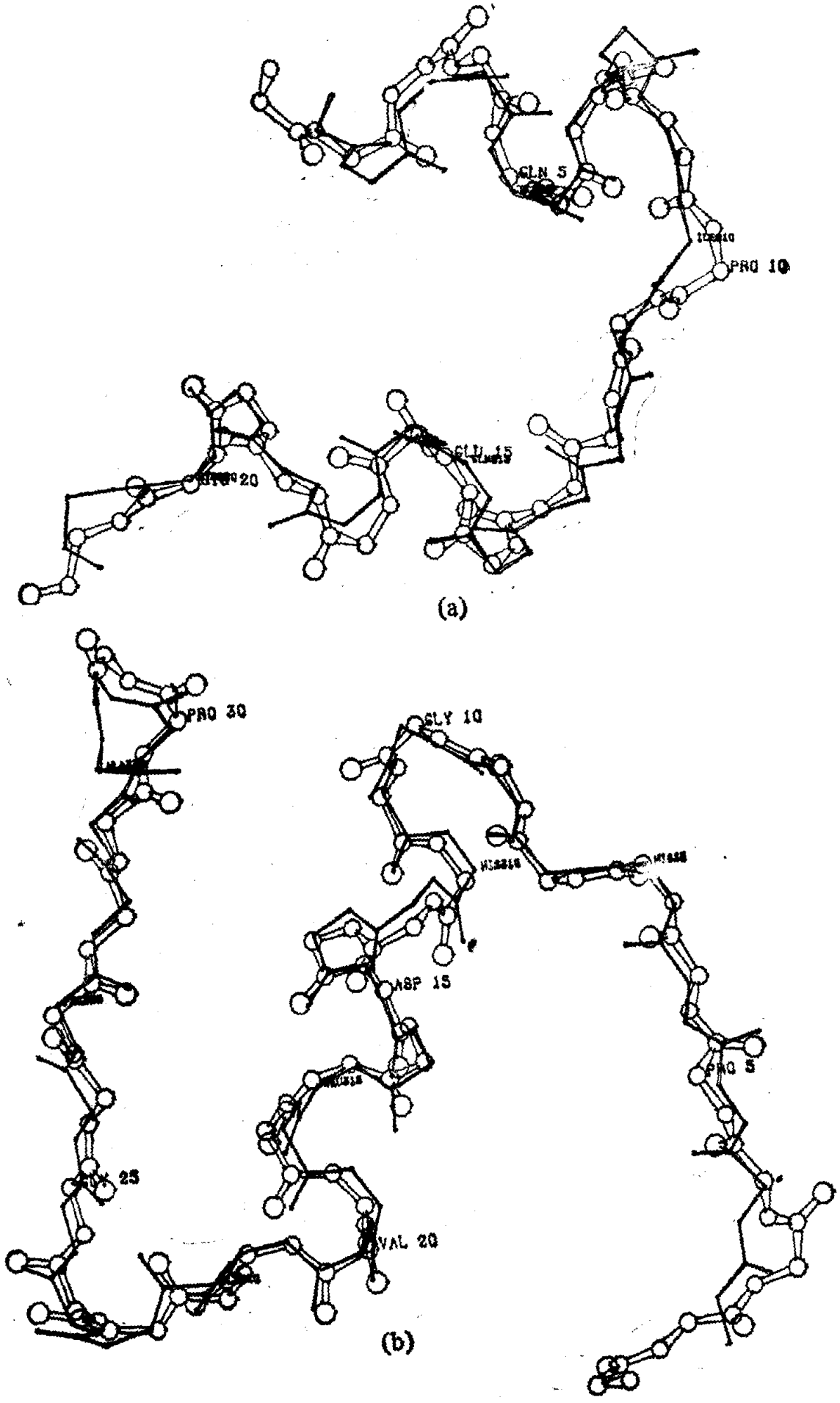


图 3　白鲢鱼胰岛素分子 4（空心线）和三方二锌猪胰岛素分子 1（实线）主链叠合图
（(a),(b) 分别为 A 链和 B 链的叠合图）

据了相应于二锌猪胰岛素 A14 Tyr 侧链的空间。因此，白鲢鱼胰岛素的 A14 Phe 不能采取二锌猪胰岛素中 A14 Tyr 的侧链方位，而是移向该残基羰基氧方向，但仍与 B 链 N 端保持范德华作用。已初步确立的另二个白鲢鱼胰岛素分子 1 和 2 的 B 链 N 端也伸向本分子 A14 侧链附近。

其他分子的 B 链 N 端的一些残基的电子密度表现较差，因而目前难以确定这些肽段的肽链走向。这可能与两个因素有关：一是 B 链 N 端肽段的活动性较大，这已被其他结构研究所证实，本结构测定中已确定的 B 链 N 端残基具有较大的温度因子也说明了这一点；二是数据的误差所致，目前的 2.8 Å 分辨率的结构分析也不可能完全将这一较活动肽段的走向肯定下来。

3. 寡聚体

处于不对称单位里的 6 个白鲢鱼胰岛素分子，构成了具有近似的 32 点群对称性的六聚体：三对相邻分子以局部二重轴相关而成的二聚体，不再象二锌猪胰岛素晶体结构那样由严格的晶体学三重轴相联系，而是由局部三重轴相关联的三个晶体学不等同的二聚体。

白鲢鱼胰岛素二聚体的结构与二锌猪胰岛素二聚体的结构相类似。这两种二聚体中的单体间的结合面上，残基的种类是相同的，而且它们的空间配置方式基本上也是一样的。在二锌猪胰岛素晶体里，以局部二重轴相关的两个独立分子的结构具有明显的差异[8]，通常提起的象征性的差异之一是 B25Phe 等残基的构象变化。已有研究阐明，这种差异起因于六聚体间分子的相互作用[11]。在二锌猪胰岛素晶体里，分属分子 1 和 2 的两个 B5 His 残基堆积时为避免相碰撞，采取了与分子 1 和 2 作用不同的构象，其后果是通过一系列构象变化的传递，最后导致分子 2 的 B25 侧链具有不同于分子 1 的构象。可是，在白鲢鱼胰岛素的正交晶体里，六聚体间的接触完全不同于二锌猪胰岛素晶体里的情形，相应的两个 B5 His 残基并不发生作用，虽然具有不同的构象但不处于类似二锌猪胰岛素的环境里。因此，类似于二锌猪胰岛素晶体里那样的构象变化及其传递不应该发生。然而，在目前得到的白鲢鱼胰岛素晶体结构里，六个分子的 B25 Phe 残基的构象是不相同的，有的与二锌猪胰岛素分子 1 相近，有的则与分子 2 的相类似。这样，导致胰岛素二聚体中两个 B25 残基取不同构象的原因是值得进一步探讨的问题。B25 Phe 残基具有较大的构象可变性，这已为去五肽胰岛素的晶体结构研究所证实[12]，存在的环境影响该残基的构象。分子动力学研究也表明，处于游离状态的二锌猪胰岛素分子 1 和 2 的 B25 侧链取相类似但不同于晶体里的分子 1 或 2 的构象[13]。胰岛素二聚体里两分子的 B25 侧链的不同取向，很可能是在一定环境里存在的较稳定构象亚态的反映。事实上，较精确的结构分析已经能显示出，二锌猪胰岛素分子 2 的 B25 侧链也能处于与分子 1 相近的方位，虽然这一取向的几率远比另一取向低得多[3]。

3 个白鲢鱼胰岛素二聚体能够形成六聚体，其稳定力也和二锌猪胰岛素六聚体相似，除了分别与 3 个分子的 B10 His 配位结合的两个锌离子，还有分子间的相互作用，但作用的具体细节差异很大。目前估算的白鲢鱼胰岛素六聚体中的两个锌离子间距离明显地大于二锌猪胰岛素六聚体中的距离，锌离子与每个分子 B10 His 咪唑环 NE 原子的配位距离也大于后一种情形中的相应距离，而且在目前的电子密度图上只找到了一个可能与锌离子配位的水分子的密度峰。另一方面，与猪胰岛素结构相比较，白鲢鱼胰岛素晶体结构中涉及稳定六聚体的许多残基发生了替换。位于六聚体中央空腔里的 B13 由 Glu 换成了 Asp，6 个 B13 残基的构象显著地偏离局部三重轴对称性，相邻二者间不再发生作用，而是通过水分子与蛋白质残基

相联系。在这种情况下,两个二聚体不大可能象猪胰岛素那样通过 B13 由金属离子联系成四聚体[14]。在二锌猪胰岛素六聚体中,涉及二聚体间稳定作用的残基,有 A13, A14, A17 和 B 链 N 端残基等。在白鲑鱼胰岛素里,这些残基分别换成了 Ile, Phe 和 Gln, 而 B 链 N 端则变化更大。因此,白鲑鱼胰岛素形成六聚体时,类似于猪胰岛素的那些稳定作用不复存在或发生了较大变化。B 链 N 端残基能够与相邻分子的原子形成非键稳定作用,如分子 4 的 B1 和 B-1 等残基能与分子 5 的残基形成氢键。虽然,关于白鲑鱼胰岛素六聚体的稳定力,目前还不能提供更多的细节,但至少有助于进一步认识上述一些作用的重要性。显然,B10 His 与锌离子配位结合对于形成特别是稳定六聚体是至关重要的,因而 B10 为 Asp 的粘盲鳗胰岛素不能形成六聚体。看来,诸如 A13, A14, A17 和 B13 等涉及六聚体稳定作用的残基的改变能够起修饰六聚体聚合性质的作用,以适应其特定生物体内的需要。白鲑鱼胰岛素六聚体结构提供了一个明显的例证,说明这种修饰可以在相当大的程度上进行。

4. 关于结构与功能关系

胰岛素的生物活性依赖于它的氨基酸序列,特别是那些对活性必需的氨基酸的存在。白鲑鱼胰岛素与猪胰岛素都具有迄今发现的对生物活性重要的氨基酸残基,因此它们的生物活性相接近。这样的氨基酸可分为两大类。一类是主要用于维系发挥生物活性所必需的三维结构特征,如形成二硫桥的半胱氨酸和构成疏水内核的残基等。另一类被认为是参与同受体分子相互作用的残基,包括 A 链端部残基和形成二聚体的单体缔合面上大部分疏水残基及其周围一些残基,可能由它们构成与受体结合和作用的部位[15,16]。这些残基中,有的是不可变残基,有的则在迄今发现的高活性胰岛素中也是不变或仅取保守替换的残基。具有极低活性的粘盲鳗胰岛素与猪或白鲑鱼胰岛素相比,氨基酸序列变化都达三分之一以上,而这三者的空间结构却是很相似的。固然,精细结构差异及相关的结构性质变化可能造成它们生物活性的巨大差别,但三者的结构比较已能提供一些线索。粘盲鳗胰岛素与其他二者的差异明显地体现在 B9, B10, B13 和 B21 等残基的非保守替换上。这些残基处于可能的与受体结合和作用部位的边缘,而且对它们的一些替换会导致生物活性的重要变化[17]。因此,这些残基的非保守替换可能是粘盲鳗胰岛素活性极低的重要原因。

如同其他具有生物活性的蛋白质一样,胰岛素的生物活性与其分子的柔性是分不开的。胰岛素比其受体分子小得多,因而最可能的情形是相当多的胰岛素分子的表面残基进入它们间的相互作用之中。这种集合式多点作用借助构象的活动性才能达到高度协调和统一。从 6 个白鲑鱼胰岛素分子及两个二锌猪胰岛素分子间的结构比较得知,其构象可变性较大的主链部位包括分子 A 链 N 端肽段以及与胰岛素免疫性质相关的 A 链小环、B 链 N 端和 C 端残基。为适应所处环境的变化,这些肽段可采取相应的确定构象。A 链 N 端对胰岛素的生物活性是相当重要的,白鲑鱼胰岛素结构分析再次暗示,A 链 N 端的生物学意义应该与它的构象柔性联系在一起。除上面涉及到的残基外,还有一些残基的去除或修饰也可影响胰岛素的活性,其中较突出的是 A8 和 B5 残基。在白鲑鱼胰岛素结构里,这两个残基位于可能的与受体结合和作用部位的同一侧,A8 His 伸出分子表面,并与 B5 His 侧链靠近。但是,白鲑鱼胰岛素似乎同粘盲鳗胰岛素一样,并没有象火鸡胰岛素或 A8His 突变人胰岛素那样具有增强的活性[3,18]。其原因可能有二,一种可能性是鱼胰岛素的其他替换残基 (如荷正电残基 A9 Arg 或 Lys) 影响 A8 His 作用的发挥;另一种可能性则是 A8 His 必须通过其他保守残基才能起作用。这

两种假设都需要构象的可变性为基础方能得到较满意的解释。

林政炯研究员对本工作予以关心和支持，特此致谢。

参 考 文 献

[1] Sakabe, N. et al., in *Structural Studies on Molecues of Biological Interest* (Eds. Dodson, G. et al.), London: Oxford Univ. Press, 1981, 509.

[2] Liang Dongcai et al., in *Molecular Architecture of Proteins and Enzymes* (Eds. Bradshaw, R. A. et al.), Academia Press, 1985, 157.

[3] Baker, E. N. et al., *Phil. Trans. R. Soc.*, London, B319(1988), 369.

[4] Cutfield, J., *J. Mol. Biol.*, 132(1979), 85.

[5] 顾本贤、方继康，生物化学与生物物理学报，14(1982)，1：29.

[6] 严友为、毕汝昌等，中国科学B辑，1984，10：897.

[7] 赵宝光、毕汝昌等，中国科学B辑，1985，5：446.

[8] The Peking Insulin Structure Research Group, *Sci. Sin.*, 17(1974), 752.

[9] Hendrickson, W. A. & Konnert, J. H., in *Biomolecular Structure, Function, Conformation and Evolution*, Oxford, Pergamon Press, 1980, Vol. 1, 43.

[10] Jones, T. A., *J. Appl. Cryst.*, 11(1978), 268.

[11] Chothia, C. et al., *Nature* 302(1983), 500.

[12] Bi, R. C. et al., *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, 92(1983), 478.

[13] Kruger, P. et al., *Eur. Biophys. J.*, 14(1987), 449.

[14] Coffman, F. D. & Dunn, M. F., *Biochem.*, 27(1988), 6179.

[15] Blundell, T. L. et al., *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 13(1982), 141.

[16] 王志珍、梁栋材，生物化学杂志，1985，1：9.

[17] Brange, J. et al., *Nature*, 333(1988), 679.

[18] Pullen, R. A. et al., *ibid.*, 259(1976), 369.