中 国 科 学

1991年7月 B 辑 第7期

胰岛素分子与其受体结合的可能机制*

梁栋材 常文瑞 张季平 万柱礼

(中国科学院生物物理研究所，北京 100080)

摘 要

以最小二乘叠合技术和图象显示技术对DPI、二锌胰岛素及其他一些衍生物结构进行了深入的比较和分析，确认与受体分子的结合相互作用是发生在胰岛素分子的一个两性表面上，其中部是由许多疏水残基构成的面积约150 Å^{2}的疏水表面，而一些极性基团在其周围构成亲水带区．疏水表面通常被运动性很大的B链羧端肽段所覆盖，不受极性溶剂分子的干扰．两性表面在方位上与分子在二体中的缔合面构成约20°的夹角．Al-L-Trp胰岛素及Al-D-Trp胰岛素结构详细的比较结果，既很好地解释了两者在生物活性上的显著差异，又进一步确认了我们所提出的胰岛素分子与其受体结合的作用模型．

关键词：胰岛素结构与功能，胰岛素分子与其受体结合模型

胰岛素分子复杂的生物功能是通过它与受体的结合来实现的，因而，胰岛素分子与其受体的结合和相互作用机制的研究成为探讨胰岛素结构与功能关系的核心和关键．多年来，人们在不同领域以各种手段探讨胰岛素结构与功能关系，如不同种属的胰岛素研究；化学或酶修饰胰岛素研究；各种合成和半合成胰岛素的研究；类胰岛素多肽包括IGF1，IGF2，MSA，relaxin等的研究以及突变胰岛素的研究等．至今构成胰岛素分子的90%的残基都已分别做过不同的修饰和取代．这些研究结果为认识和探讨其结构与功能关系积累了大量数据．胰岛素三维结构的确定为结构与功能关系的研究提供了真正的基础．研究的焦点自然首先集中于胰岛素分子与受体结合和作用机制．1971年中国胰岛素研究小组曾对胰岛素分子与其受体结合的区域提出过建议[1,2]，随后北京胰岛素结构研究组在完成1.8Å分辨率三方二锌胰岛素晶体结构测定之后也指出，形成二聚体时分子的结合面是胰岛素分子与其受体相结合的可能部位．而这一结合部位主要是B链羧端和B链α螺旋段所构成的分子表面，即主要由B24-Phe，B25-Phe，B16-Tyr和B12-Val等疏水残基所组成的表面[3]．此后，在X射线分析、热力学和圆二色性的研究基础上对胰岛素与其受体的结合相互作用机制曾作过许多的讨论[4－8]．然而，迄今为止所提出的与受体结合的模型[9]并没有实质性的变化，基本上都是以B链羧端伸展肽段

本文1990年1月17日收到，1990年9月20日收到修改稿．

*国家自然科学基金和中国科学院重大科研资助项目．

的残基为中心的疏水区和伴随着其周围的一些极性残基所构成的二体缔合面. 也就是说所有这些模型都没有摆脱二锌胰岛素二聚体所形成的结构特征的影响,即以在二聚体结构所看到的,包括构成反平行 β 结构的 B 链羧端在内的胰岛素分子在二聚体中的缔合面作为它与受体分子结合的结合面.

尽管胰岛素受体的一级结构已被测定,某些关于胰岛素受体的 $\alpha_2\beta_2$ 亚基结构模型也已提出并得到普遍承认. 但是,由于至今尚未得到胰岛素受体,特别是胰岛素与其受体的复合物的三维结构数据,这就使得从空间结构角度认识和阐明胰岛素分子与其受体的结合作用机制缺乏最直观的结构基础. 本文下述所给出的探讨是基于已揭示的基本实验事实和结果:即胰岛素分子是以单体形式与其受体结合并相互作用的;胰岛素分子与其受体的识别、结合和相互作用必然伴随着一系列的构象变化;对胰岛素分子三维特征结构及其运动特征的认识以及胰岛素及其各种衍生物的结构比较的结果. 近十年来,本实验室在测定一系列各种不同的胰岛素衍生物晶体结构的基础上,以最小二乘叠合技术和图象显示技术对它们的结构进行深入的比较和分析,着重从空间结构的角度探讨胰岛素分子与其受体结合的可能机制.

一、胰岛素分子与其受体的结合面

去 B 链羧端五肽(B26 — 30)猪胰岛素(简称 DPI)是一个重要的胰岛素衍生物. 它是至今已测定空间结构的胰岛素衍生物中唯一以单体形式存在并保持较高胰岛素生物活性的分子结构. 本实验室在测定并在 1.5Å 高分辨率精化了 DPI 的分子结构之后[10],对 DPI 分子结构的特征以及它与胰岛素衍生物的构象差异进行了广泛的比较. 如图 1 所示,与二锌胰岛素结构比较结果表明,虽然 DPI 分子中许多的侧链甚至一些主链与二锌胰岛素结构存在着明显的结构差异,然而 DPI 分子仍保持着胰岛素分子的特征三维结构要素,这是为什么 DPI 分子仍保留着较高生物活力的重要原因.

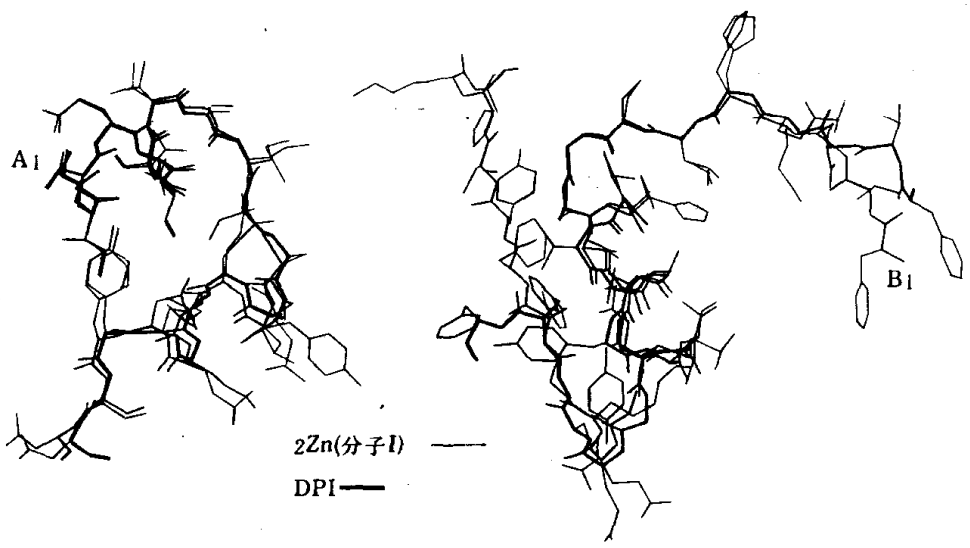


图 1 DPI 分子(粗线)和三方二锌胰岛素分子 I 的 A 链和 B 链分别叠合比较

在 DPI 分子结构被测定之后,我们发现由于胰岛素分子切除了 B 链羧端的五个残基,DPI 分子的结构出现了一个面积很大的两性表面[11]. 如图 2 所示,这个两性表面的中部是由疏水

残基的侧链基团所构成的疏水平面，其面积约为 150Å^2，而分布在此疏水面周围的是一些亲水残基的极性和带电荷的侧链基团，它们构成两性表面的亲水区域带．我们认为，DPI 分子中这一两性表面可能是胰岛素分子与其受体分子结合相互作用的重要表面．此表面与上述各种建议的受体作用区域——二体内分子间的缔合面的重要差别是在于：首先，我们所看到的表面

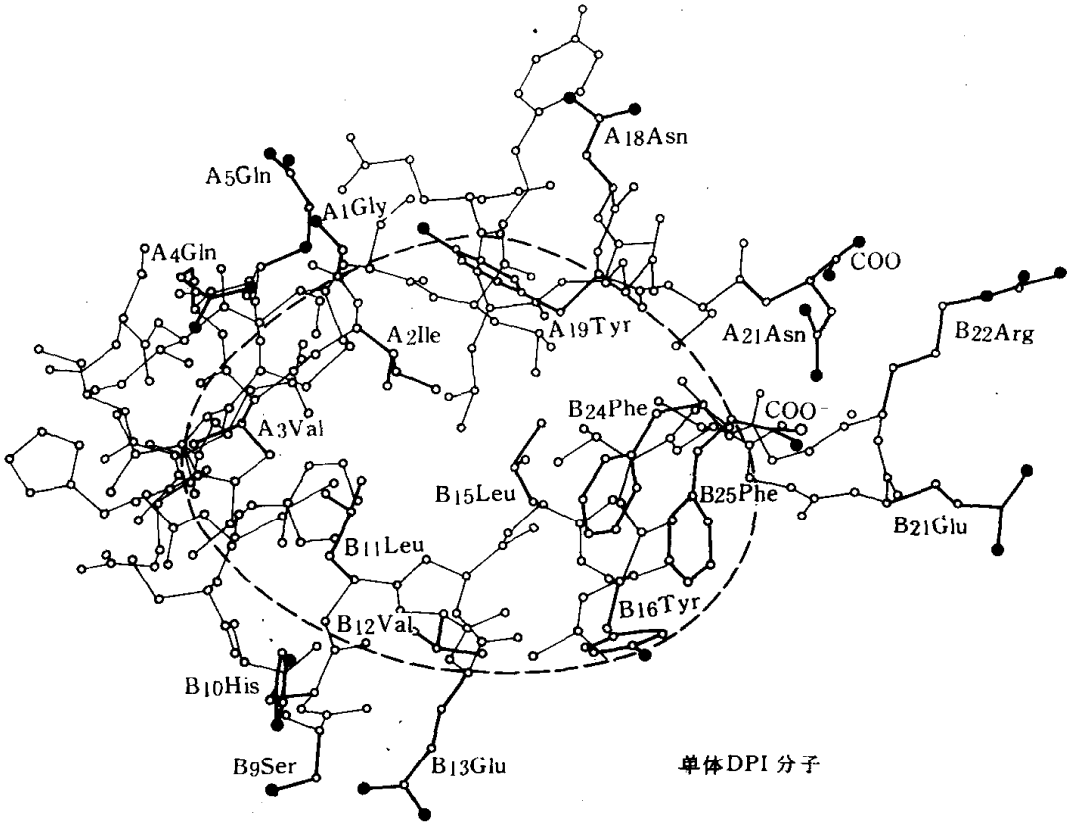


图 2　DPI 分子上的两性表面

（中部由疏水残基构成的疏水平面（以虚线表示），其周围由极性和带电基团构成亲水区域带）

是在二锌胰岛素分子中处于 B 链羧端后面的一个表面，而不是包括 B 链羧端在内的表面．二锌胰岛素二体中两个分子的缔合面是以 B 链羧端 β 反平行的结合面为分界线的，它与 DPI 分子的两性表面在方位上很不相同，它们之间大约构成 20° 左右的夹角（图 3）．其次，DPI 分子的两性表面与二体中的分子缔合面在残基组成和残基性质上也有明显不同，它尽管也保留了原来二体缔合面的一部分残基，但由于 B26 — 30 残基被切除，原来被这段肽段所覆盖的疏水残基在 DPI 分子中得以暴露并加入疏水表面，从而构成两性表面．此外，此两性表面既包含了不变残基和保守残基，但所涉及的残基却十分广泛．详细的结构比较表明，DPI 分子的两性表面与二锌胰岛素分子结构中位于 B 链羧端后面的相应的表面具有十分相似的构造．虽然在 DPI 分子中位于两性表面中部的疏水平面，在组分上有少许差别，但其疏水平面的面积仍然保持大约 150Å^2，而其构造也基本保持不变，亲水表面的组分及构造与二锌胰岛素分子十分相近．也许正因如此，DPI 仍可保持着相当高的胰岛素生物活力．

通过对 DPI、二锌胰岛素、四锌牛胰岛素以及其它修饰胰岛素的结构比较研究，不难发现，只要将分子中的 B 链羧端残基从分子表面移开或切除，所有具有生物活性的胰岛素及其衍生物的分子都拥有与 DPI 分子十分相似的两性表面．基于上述的研究结果，我们认为：与受体

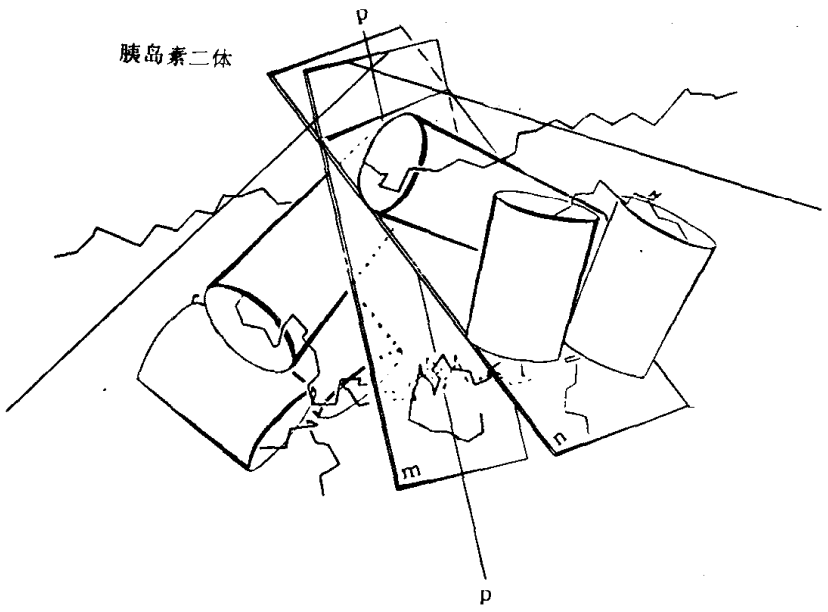


图 3 三方二锌胰岛素二体中分子I 与分子 II 的缔合面(m)和 DPI 分子的两性表面(n)在分子 I 中的示意表达
(m 与 n 面之间的夹角约为 20°)

分子的结合相互作用将主要发生在胰岛素分子的一个表面上. 胰岛素分子的这一相互作用表面由两部分组成. 作用表面的中部是一个面积很大的约 150Å^2 的疏水表面,主要由 A2-Ile, A3-Val, A19-Tyr, B11-Leu, B12-Val, B15-Leu, B16-Tyr, B24-Phe, B25-Phe 可能还有 B26-Tyr 等残基所组成,在图 4 中以虚线给出了这一疏水平面. 围绕这一疏水平面周围是极

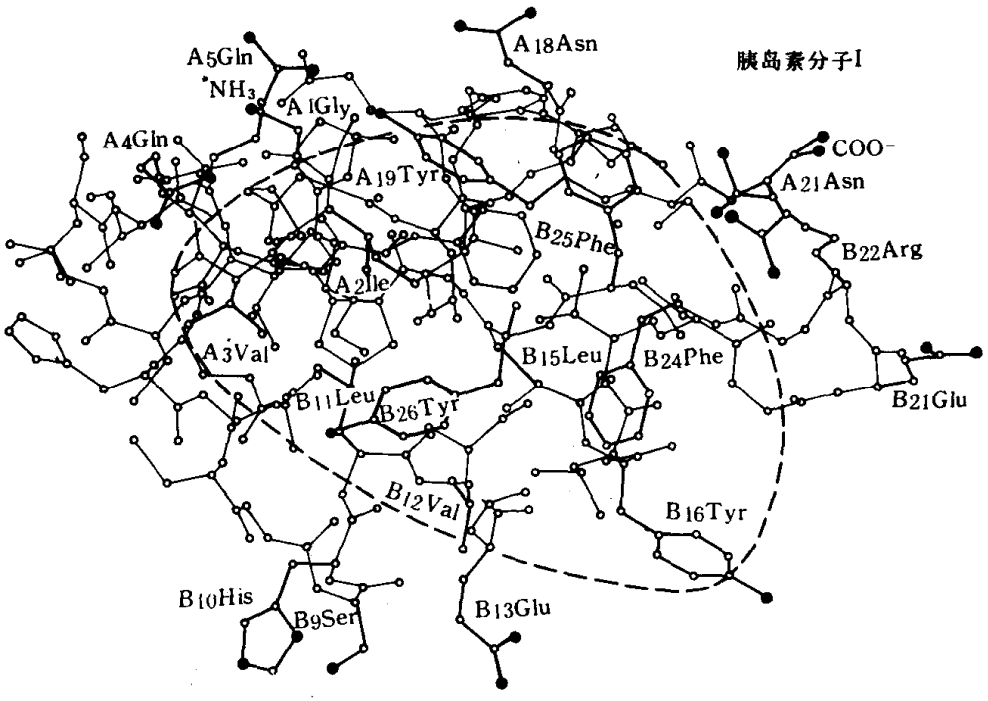


图 4 建议的胰岛素分子与其受体分子的结合作用面

性和带电荷的基团，构成了这一作用表面的亲水部分．如图 4 所示，它们主要是 A1-Gly 的 α 氨基、A4-Glu，A5-Gln，A18-Asn，A21-Asn，B9-Ser，B10-His，B13-Glu，B21-Glu，B22-Arg 等残基的侧链基团以及 B 链羧端的羧基．

二、胰岛素分子与其受体结合作用的可能机制

上述我们所讨论的作用表面在三方 2Zn 胰岛素的六体结构中，其疏水平面的相当大的一部分是被B 链羧端伸展肽段所覆盖．显然，在极性溶剂中或在生理条件下已被解聚的胰岛素单体分子，其 B 链羧端伸展肽段已不再受构成二体时的反平行 β 结构中 4 个氢键(图 5所示)所约束，从而具有更大的运动性和更大的运动自由度，因而它将会比在二聚体中观察到的更加紧

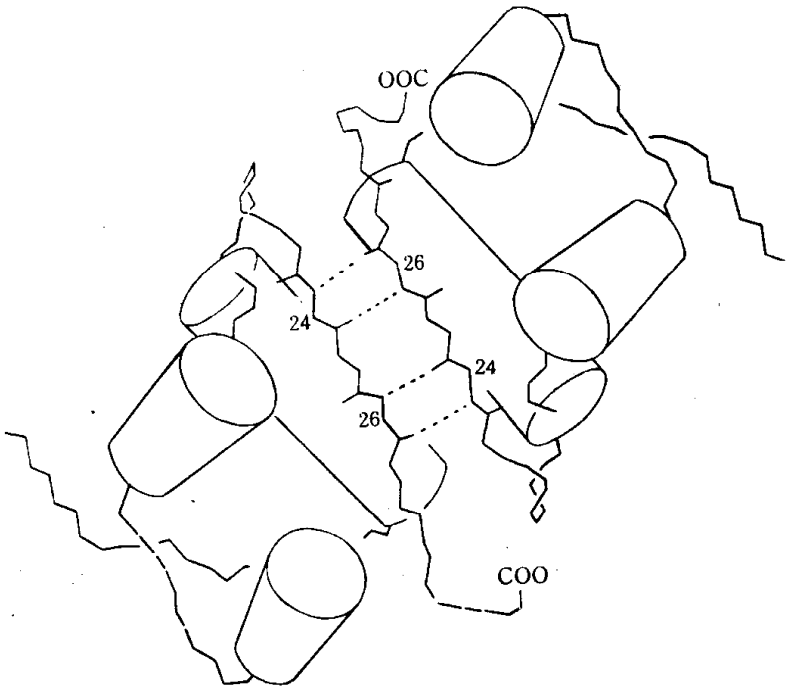


图 5　三方二锌胰岛素二体中分子间由B 链羧端构成反平行 β 结构的四个氢键示意图

密地靠着疏水平面，使疏水面得到更好的保护不受极性溶剂分子的侵扰，并从而构成了单体分子自身的疏水内核．同样，当胰岛素单体分子与其受体分子接近的时候，运动自由度很大的 B 链羧端肽段将从原有位置上摆开，从而使被它覆盖的疏水平面得以完全暴露，于是构成了以在 DPI 分子上所看到的两性表面为基础的胰岛素分子与其受体的结合面．而胰岛素分子中 B 链羧端伸展肽段具有很大的运动性和运动自由度早已从溶液构象研究和晶体结构分析的结果中得到了证实．图 6 给出了我们实验室已测定结构的二锌猪胰岛素、四锌牛胰岛素和其他衍生物分子 I 和分子 II 的叠合比较结果．从图 6 可以得知，就在晶体内紧密堆积的环境下并受到构成二体的反平行 β 结构中 4 个氢键的制约，胰岛素分子的 B 链羧端肽段也可以出现高达 5 — 6Å以上的移动．

从作用机制上，基于对胰岛素分子与受体结合面的认识我们可以设想：单体胰岛素分子到达并靠近其受体分子时，具有运动性很大的 B 链羧端伸展肽段，其中包括 B30-Ala，B29-Lys，B28-Pro，B27-Thr 也许还有 B26-Tyr 等残基，将通过铰键肽 B24 从上述胰岛素分子的两性表

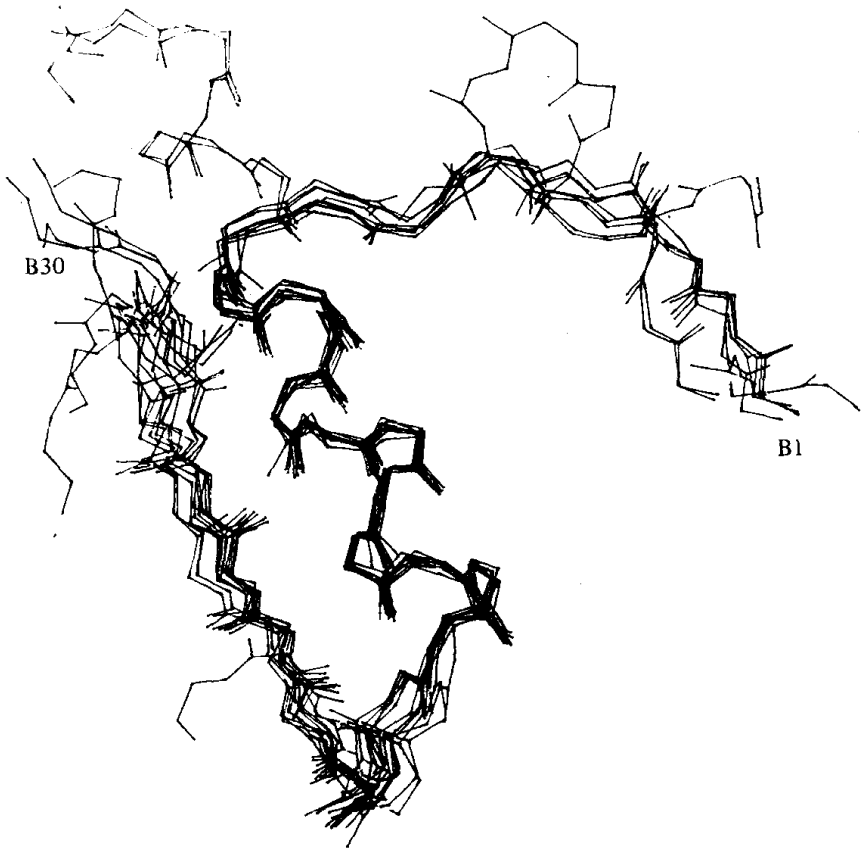


图 6 胰岛素及其衍生物在三方结构中分子I 及分子 II 的 B 链主链
叠合结果,揭示分子的 B 链 N 端和 C 端肽段具有很大的构象运动性

面上移开,从而胰岛素分子的疏水平面完全暴露于受体分子相应的疏水区域. 相互的识别和结合作用将会发生. 我们认为,胰岛素分子与受体的相互作用中除了原发性的疏水作用之外,必然伴随着极性相互作用. 随着疏水的相互作用,亲水的相互作用也将会进行. 分散在疏水平面周围的大多数极性和带电荷基团都是构象运动性很大的长链基团,诸如 B10-His, B13-Glu, B21-Glu, B22-Arg, A4-Glu, A5-Gln 和其他极性侧链. 它们可以在一定范围内调节取向,有点像章鱼的吸盘一样,与受体分子中相应的极性和带电基团靠近并相互作用.

早在 2.4Å 分辨率 DPI 结构测定之后,我们就指出 B24-Phe 和 B25-Phe 是参与受体结合的重要残基,并在与受体识别中可能起重要作用. 可以设想当胰岛素分子靠近其受体分子,在原发性的疏水相互作用的初期,拥有疏水性芳香环的 B24 和 B25,以及 B16,A19 和 B26 等的侧链将会是十分活跃的. 这些残基的侧链在构象上包括其位置和芳香环的取向将会发生适当的改变,以适应其受体分子中同样具有芳香环的相应残基侧链的位置和取向. 我们认为相应残基侧链的芳香环大 π 键之间的相互作用是在胰岛素分子与其受体的相互识别中起着十分关键性作用. B25 和 B24 等残基不但只是上述两性表面中疏水平面的重要组分,在疏水的结合相互相作用中发挥着重要作用,而且在与受体识别过程中也是十分关键的. Tager 等[15]发现在 B25 上由亮氨酸取代苯丙氨酸的人变异胰岛素之后,B25 的重要性已得到证实. 此外,B25-Phe 具有很大的构象运动性也在二锌胰岛素分子 I 和分子 II 的结构比较以及 DPI 的结构

中得到了充分的论证[12]. 这种构象的自由、灵活的运动性显然是胰岛素分子与其受体相互作用所必需.

显然，分子量只有 6700 的胰岛素分子与其庞大的受体分子相互作用中，除了上述两性表面之外，胰岛素分子其他部分的一些残基也可能参予结合和相互作用. 诸如运动性很大的 B 链 N 端伸展肽段有可能锚定在受体的某一特定区域，在相互作用中既表达胰岛素分子的免疫功能同时对生物功能的发挥也起着协同作用等. 然而，上述两性的作用面对于胰岛素分子与其受体无论在识别、结合和相互作用中大概都是必需而且是主导的. 一些胰岛素衍生物的结构分析和结构比较研究结果都表明，对这个作用表面的改变或破坏，势必影响或障碍了分子与受体之间的充分相互作用，导致胰岛素分子的生物活力不同程度的丧失. B 链羧端去七肽(B24 — 30)胰岛素(DHPI)结构分析的初步结果表明，由于 B24 — 30 肽段的切除，随着 B20 — 23 的回折的破坏，分子中的两性表面也就遭到严重破坏. 这就导致 DHPI 的生物活力几乎丧失殆尽.

三、A1-L-Trp 胰岛素和 A1-D-Trp 胰岛素结构的启示

A1-L-Trp 胰岛素和 A1-D-Trp 胰岛素晶体结构的测定和它们的结构比较结果对我们所提出的上述胰岛素分子与其受体结合相互作用的模型提供了进一步的结构依据. 众所周知，将 A1-Gly 从 A 链 N 端切除后，胰岛素分子几乎失去全部活力，以 L- 构型的色氨酸取代 A1 的甘氨酸只有 14% 的天然活力，而 A1-D-Trp 胰岛素分子却保留着高达 82% 的生物活力(表 1). 其它 L- 构型和 D- 构型氨基酸对 A1 甘氨酸的置换，其结果也十分相似. A1-L-Trp 胰岛素和 A1-D-Trp 胰岛素晶体结构已在我们实验室分别在 2.1Å 和 2.2Å 分辨率上被测定，并对

表 1　本实验室已测定结构的胰岛素及其衍生物

胰岛素	空间群	晶胞参数						分辨率	生物活性	
		a(A)	b(B)	c(A)	α(°)	β(°)	γ(°)		脂肪细胞	血糖下降
Porcine 2Zn	R3	82.5	82.5	34.0	90	90	120	1.2Å	100	100
Bovine 4Zn	R3	80.8	80.8	37.4	90	90	120	1.9Å	100	100
DPI	C2	58.7	27.9	24.0	90	100.6	90	1.5Å		24 — 40
DHPI	$P2_12_12_1$	59.2	54.8	23.0	90	90	90	3.0Å		0.1
A1-(L-Trp)	R3	80.3	80.3	37.4	90	90	120	2.1Å	14	
A1-(D-Trp)	R3	78.6	78.6	50.0	90	90	120	2.2Å	82	
B0-(L-Arg)	R3	81.8	81.8	35.0	90	90	120	2.0Å	38.4	
B0-(D-Ala)	R3	82.5	82.5	34.3	90	90	120	1.9Å		65 — 74
B1-(L-Leu)	R3	82.3	82.3	34.3	90	90	120	2.2Å		37

结构进行了精化[13,14]. 详细的结构比较结果指出，A1-L-Trp 和 A1-D-Trp 胰岛素分子不但都很好地保持着上述胰岛素三维空间的特征结构，而且二体中分子 I 之间在空间结构上也十分接近，就像四锌胰岛素分子I 与二锌胰岛素分子 I 之间那样相似. 然而重要的结构差别就在于 A1 残基上的吲朵环在 A1-L-Trp 和 A1-D-Trp 胰岛素分子中的取向绝然不同，如图 7 所示. 而正是这一细小但却十分重要的结构差别致使这两种胰岛素衍生物具有绝然不同的生物活力.

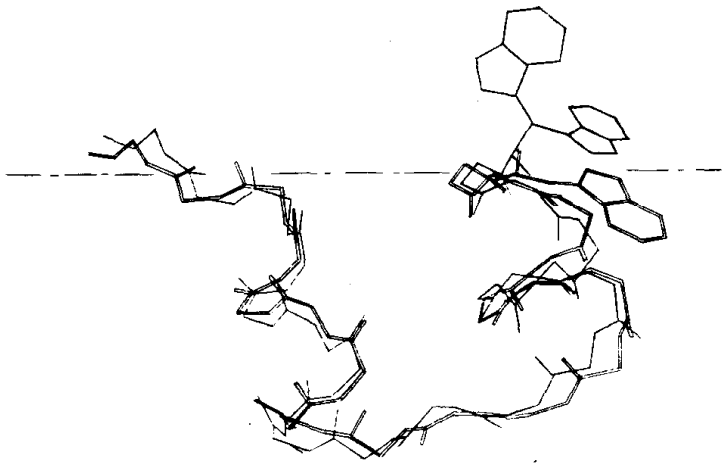


图 7 A1-L-Trp(以单线表示)和 A1-D-Trp(以双线表示)胰岛素分子 I 的 A 链主链叠合结果,揭示两个分子的 A1-Trp 侧链(吲哚)基团的不同取向
(其中虚线示意胰岛素分子与其受体结合作用面的投影)

如图 4 所示,A1 残基正好位于上述与受体相互作用表面的疏水平面的边缘. 带有正电荷的 α 氨基是组成亲水区域的重要基团之一. L-构型色氨酸置换 A1 的甘氨酸之后, L-构型的侧链正好从分子的作用表面向上伸出并指向疏水平面,如图 8 所示. 结构测定和精化结果指出,A1-L-Trp 胰岛素结构中分子I 的吲朵环拥有占有率分别为 0.7 和 0.3 的两个构象位置,分子 II 则只有占有率为 1 的一种构象,它与分子 I 的第一个构象相似. 无论两个构象中任一构象,其结果都严重障碍胰岛素分子中这一两性表面,特别是疏水平面与其受体相应表面的充分接触,从而影响了它们之间充分的相互作用. 与此同时,吲朵环的向上伸出也肯定对带正电荷的 α 氨基起着蔽屏作用,影响它与受体分子中相应基团之间的电荷交换. 而 D-构型色氨酸置换 A1 甘氨酸之后,D-构型的侧链刚好稍朝下方伸向两性表面的边缘(图7). 它既不妨碍疏水平面与受体的疏水相互作用,也不会影响带正电荷的 α 氨基从两性表面向外裸露. 这一研究结果不但指出了 A1 残基,特别是 α 氨基在胰岛素分子结构和功能关系中的重要作用,而对我们上述所提出的作用机制的模型也

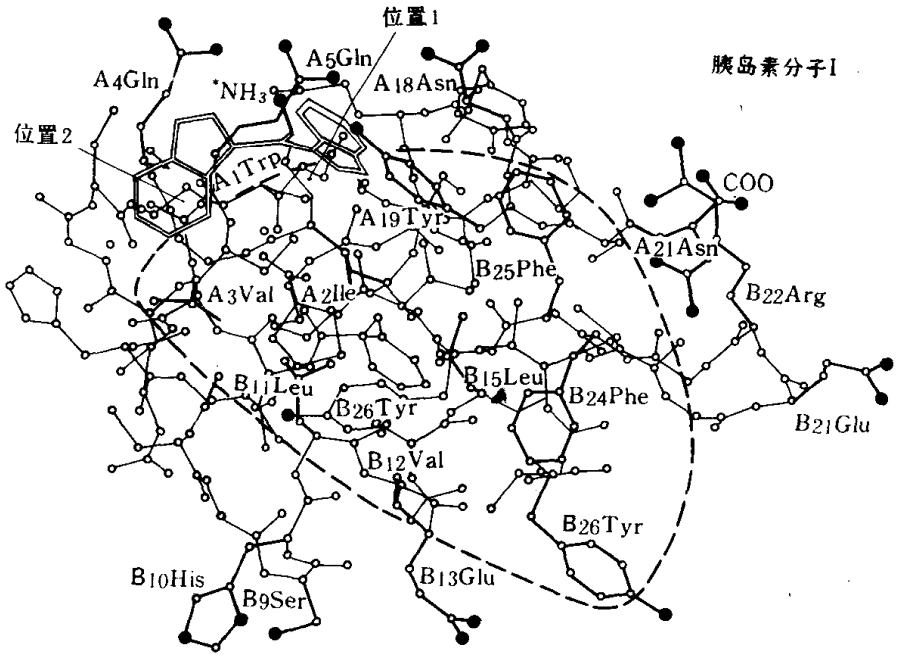


图 8 A1-L-Trp 胰岛素分子 I 中 A1-Trp 残基侧链的两个不同构象位置(以双线表示)均从分子的两性表面向上伸出,并指向疏水平面

是一个十分重要的验证．基于上述有关胰岛素分子与受体的作用表面和相互作用机制的模型，A1-D- 色氨酸胰岛素与 A1-L- 色氨酸胰岛素在生物活力上的显著差异可以从它们 A1 残基在作用表面上的不同构象和取向获得很完满的解释．

尽管对胰岛素分子本身的空间结构已经有了相当精确而详尽的了解，但它毕竟是个分子量只有 6700 的小蛋白，而它的受体却是分子量约 300000 的巨大的膜蛋白分子．作为激素蛋白质，胰岛素具有多种生物功能和非常复杂的发挥生物功能的过程．胰岛素分子对其受体的识别、结合及相互作用将是它发挥生物功能的第一步，也是最重要的一步．我们认为，胰岛素分子固然携带着发挥生物功能的关键的基本信息，但并非全部信息．胰岛素与其受体之间在一定程度上很像钥匙和锁的关系，将钥匙放在锁内，转动钥匙将锁打开之后，钥匙的任务已基本完成，胰岛素分子与其受体识别、结合并相互作用之后，跟随将要发生的一系列生物学事件，其信息将来自已经结合了胰岛素分子的受体，而不再直接来源于胰岛素分子本身了．基于同样的理解，我们认为：对胰岛素的代谢效应，生长效应和协同作用等也不能单从胰岛素分子本身的结构特征来理解．对于胰岛素分子本身来讲，它与其受体的识别、结合和相互作用是它发挥生物功能的极其重要的一步，也许就是最后一步．

参　考　文　献

[1] Insulin Research Group, *Scientia Sinica*, **17**(1974), 6 :779.

[2] Insulin Research Group, *ibid*., **19**(1976), 4 :476.

[3] 北京胰岛素结构研究组，中国科学，1974, 6 :591.

[4] Waelbroeck, M, et al., *J. Biol. Chem*., **254**(1979), 7736.

[5] Waelbroech-Frauman, M., D. Phil. thesis, Universite Catholique De Louvain, Belgium, 1980.

[6] Wood, S. P. et al., *Eur. J. Biochem*., **55**(1975), 531.

[7] Pullen, R. A. et al., *Nature*, **259**(1976), 369.

[8] Blundell, T. L., *TIBS*, **4**(1979), 51.

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

[10] 戴金璧等，中国科学B 辑，1986, 10 :1043.

[11] 梁栋材等，同上，1985, 5 :428.

[12] 常文瑞等，生物化学杂志，**2**(1986), 3 :53.

[13] 万柱礼等，中国科学B 辑，1989, 1 :33.

[14] 万柱礼等，同上，1989, 10 :1041.

[15] Tager, H. et al., *Nature*, **281**(1979), 122 — 125.