

生物大分子结构的 X 射线衍射分析(三)

胰岛素的分子和晶体结构

王大成 梁栋材

(中国科学院生物物理研究所)

成功地运用X射线衍射分析技术测定的蛋白质和核酸分子的结构,至今已在一百以上,包括酶、氧化还原蛋白、运载和贮存蛋白、激素蛋白、抗体蛋白、光合作用蛋白、肌肉蛋白、毒蛋白等。这里选择胰岛素作一介绍,因为它是一种很小但又很典型的蛋白质,通过它可以了解蛋白质三维结构的一般情况;同时,有关胰岛素的研究又是我国较有成效、较为系统且目前仍在继续深入的一项研究课题。

胰岛素是一种典型的蛋白质激素，1921—1922年由 Banting 和 Best 首次提纯。半个多世纪以来，在医学实践的推动下，胰岛素得到了广泛深入的研究，使蛋白质研究领域一些重大的突破（如一级结构测定，人工合成等），常常与胰岛素的研究密切相关。

我国科学工作者在 1965 年首次用化学方法全合成具有全部生物活力的结晶牛胰岛素。1967 年夏,中国科学院物理研究所、生物物理研究所、北京大学和其它有关单位的科学工作者,开始了用 X 射线衍射分析技术测定胰岛素三维结构的研究。当时大家都缺乏经验,但群策群力,发扬社会主义大协作的精神,经过艰苦努力,用 3 个重原子衍生物,以多对同晶置换途径,先后于 1970 年、1971 年和 1973 年获得分辨率为 $4\text{ \AA}$ 、 $2.5\text{ \AA}$ 和 $1.8\text{ \AA}$ 的结果,去年又进行了深入的结构精化(晶体学修正)研究。与此同时,著名晶体学家、诺贝尔奖金获得者 D. C. HodgRin 领导的英国牛津小组,也先后在 1969 和 1971

年报道了他们获得的 2.8 Å 和 1.9 Å 分辨率的研究结果。

胰岛素分子的构象

胰岛素分子由A、B两条多肽链构成；A链含21个氨基酸残基，B链含30个氨基酸残基。A链与B链间有两对二硫键（A7—B7，A20—B19），A链内部有一对二硫键（A6—A11），它

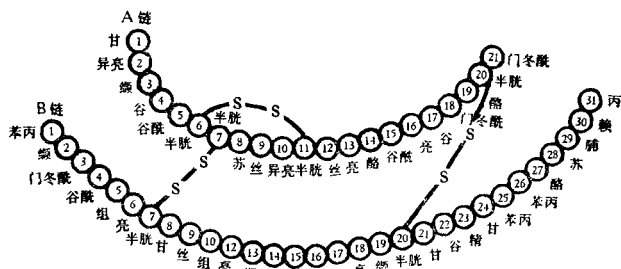


图1 猪胰岛素分子的化学结构

们像三把锁一样将 A、B 链维系起来。图 1 是猪胰岛素分子的化学结构。

胰岛素是较早获得可供 X 射线衍射分析用单晶体的蛋白质之一。1926 年, Abel 首次获得胰岛素三方晶系(菱面体)晶体。但随后用纯胰岛素不能重复这一结果,直到 Scott 发现, 锌离子的存在是胰岛素结晶的必要条件。以后发现, 铁、钴、镍、镉等金属离子都可促使胰岛素晶体生长, 但以锌为最佳。由于含锌量的不同, 三方胰岛素晶体实际上有两种形式: (1) 每六个胰岛素分子含二个锌离子, 称为三方二锌胰岛素; (2) 每六个胰岛素分子含四个锌离子, 称为三方四锌胰岛素。它们各自的晶胞参数见表

1. 我国科学工作者和牛津小组用于测定的是取自猪胰脏的三方二锌胰岛素单晶。图 2 是其放大的照片。1976 年,三方四锌胰岛素晶体的结构也被测定,除 B 链氨端肽段外,分子其余部分的构象与三方二锌胰岛素大体相同。这里将只介绍三方二锌胰岛素晶体结构。

表 1 二锌和四锌胰岛素晶体的晶胞参数和溶剂含量

晶 体	$a_H(\text{\AA})$	$c_H(\text{\AA})$	$a_R(\text{\AA})$	α_R	溶剂含量
二锌胰岛素	82.5	34.0	49.0	114.8°	30%
四锌胰岛素	80.7	37.6	48.2	113.4°	34%

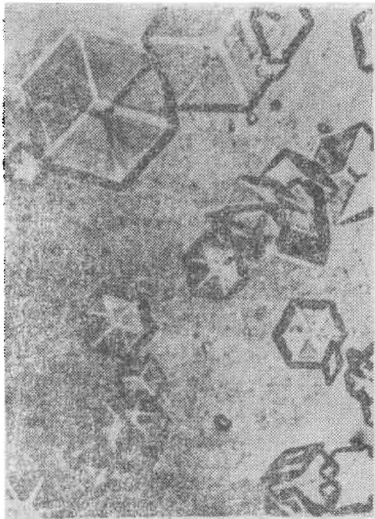


图 2 三方二锌胰岛素晶体

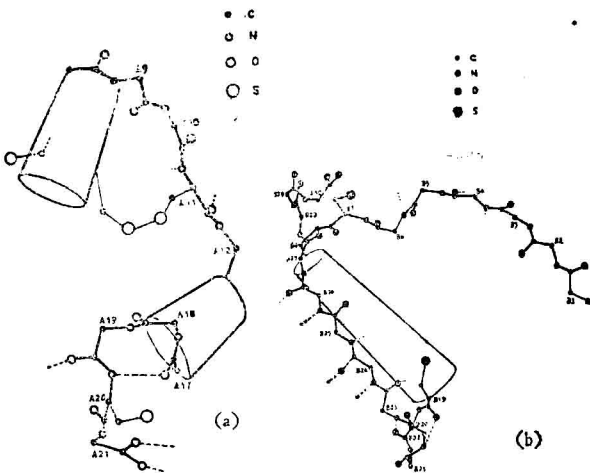


图 3 胰岛素分子 A 链和 B 链的构象
(a) A 链 (b) B 链

胰岛素分子象一个底面直径 20 Å 高 23 Å 的秃顶锥体。A 链自身是一个卷缩和致密的单

位, 含有两段螺旋, A1—A9 是一非标准 α 螺旋, A12—A17 是一不规则 3_{10} 螺旋。(图 3a) 一对二硫键位于两段螺旋之间 (A6—A11), 是稳定 A 链结构的一个重要因素。B 链的氨端和羧端都比较舒张, 中部 B9—B19 是一段很好的 α 螺旋, 羧端 B24—B26 取 β 折叠构象(图 3b)。

形成胰岛素分子时, B 链从三面将 A 链包围起来(图 4), 两对链间二硫键和一些氢键将两条肽链“锁接”在一起。一些疏水侧链基团集合在一起形成一个疏水内核位于分子中心(包括 A16、B11、B15 亮氨酸, B24 苯丙氨酸以及

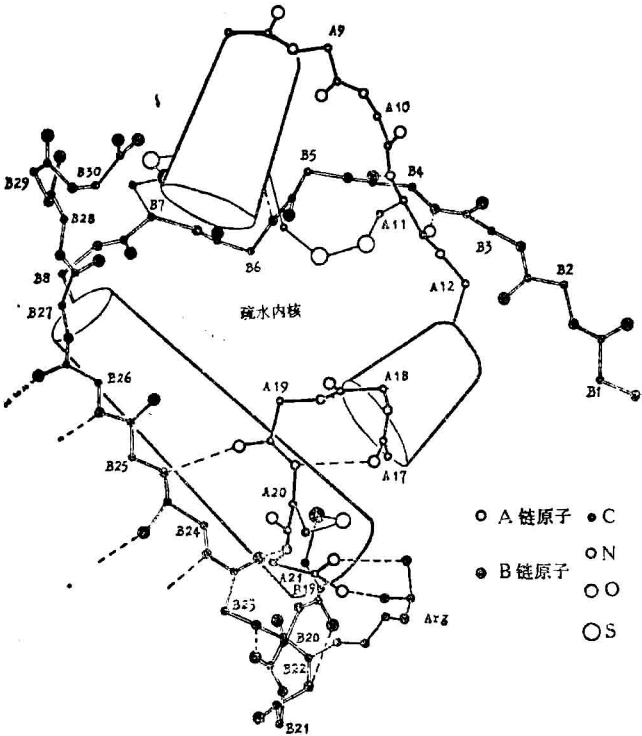


图 4 猪胰岛素分子的主链构象

图中以圆桶代表螺旋, A, B 链分别以单实线和双线区分, 虚线表示氢键。

A2 异亮氨酸)(图 4), 这些对分子三维结构的稳定都具有重要意义。同时, 分子的特征三维折叠还使分子的极性基团间形成复杂的氢键网络, 其中大约 1/3 处于螺旋结构中。处于非螺旋区的氢键, 它们对于 B 链羧端 (B20—B26) 肽段的特征折叠和 A—B 链间的正确相关, 有重要作用。图 5 是包含全部主、侧链的胰岛素分子的原子结构模型。从图可见所有

极性侧链都分布在分子的表面，它们与环境中溶剂分子的作用增加了稳定分子结构的因素。

非极性基团，两个非极性表面靠拢形成一个相对紧密堆积的疏水区，构成二聚体的疏水内核。此外，还有一些其它基团和水分子形成的氢键，也是稳定二聚体的重要因素。

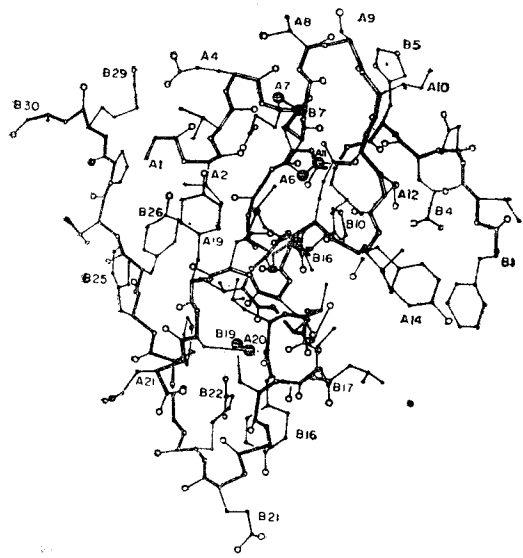


图 5 胰岛素单体的原子结构

聚合物及其在晶体中的堆积

在三方二锌晶体的结晶 pH6.4 条件下，胰岛素以聚合状态存在。在晶胞一个对称独立单位中，含有一个二聚体，一个局部二重轴穿过其中心将二聚化的两个胰岛素分子关联起来（图 6）。三个二聚体围绕着处于晶体学三重轴上的二个锌离子，构成一个胰岛素六聚体（图 6）。

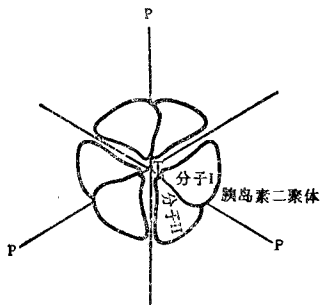


图 6 晶胞中胰岛素聚合体的排布

P 为穿过二聚体中心的局部二重轴，
T 为垂直于纸面的晶体学三重轴。

在形成二聚体时，分子的接触部位主要在 B 链。稳定二聚体的作用主要有两个方面，其一是两个分子的 B 链羧端肽段以逆平行排布互相靠拢，形成 β 折叠层，在 B24—B26 间产生 4 对氢键，其二是在单体的接触界面上都是一些

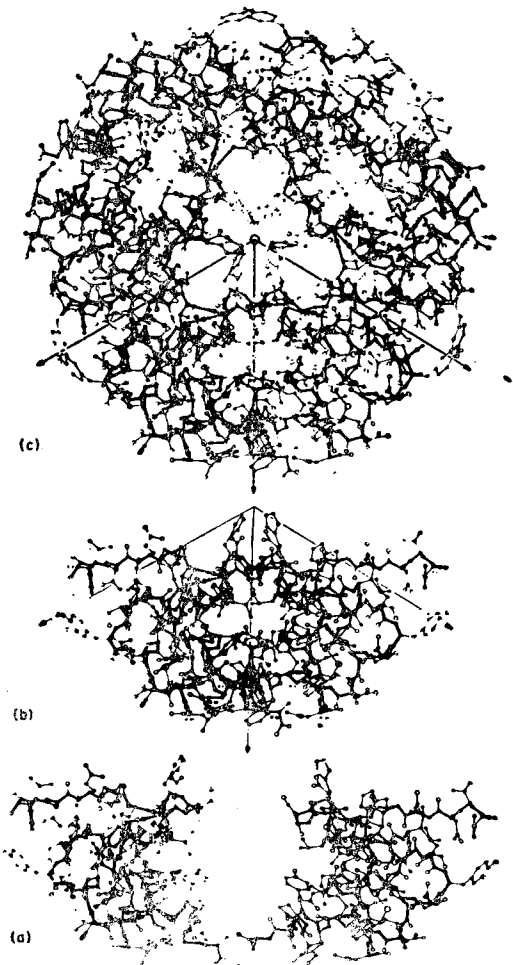


图 7 胰岛素的单位 (a)，二聚体 (b) 和六聚体 (c)
(取自 Blundell, T. L. and Johnson, L. N.: *Protein Crystallography*)

三个二聚体被三重轴上两个锌离子联接在一起，构成六聚体。直接与锌离子配位的，是 B 链第 10 位组氨酸残基的第三位氮。除锌离子的作用外，稳定六聚体的因素主要是二聚体之间存在的一些次级键。整个六聚体似一直径 50 Å 高 34 Å 的扁球，是三方二锌胰岛素晶体的基本重复单位。图 7 示出了从胰岛素单体形成二聚体、六聚体的过程。

三方晶体中存在着三重轴和三重螺旋轴两

种对称元素。它们作用于胰岛素六聚体，使大量胰岛素六聚体形成满足这一对称要求的密堆积，产生出菱面体型的单晶体。

晶体环境中的水

水是活细胞中含量最丰富的成份，具有重要的结构和功能作用。所以，研究重要生命物质中水的结构和作用，十分重要。具有活性的天然蛋白质，无论是酶、激素，传输蛋白还是结构蛋白，都是包含着水和溶剂体系在内的复杂的分子体系。蛋白质分子是这个体系的基本组成部分，水是这个体系的必要组成部分。同时，在蛋白质分子的折叠过程里，水和溶剂与蛋白质的相互作用也具有重要影响。显然，对蛋白质分子特征构象的形成和稳定，对于蛋白质功能的正常发挥，水的存在都是基本因素。所以，了解蛋白质中水的结构和作用，是全面认识蛋白质的一个重要方面。

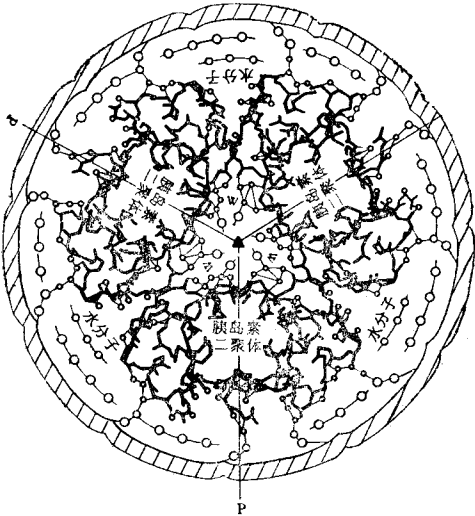


图8 胰岛素晶体中水的分布

这是一个单胞(R格子)的内容沿三重轴方向的投影，包含一个胰岛素六聚体(以粗实线示出其肽链骨架，侧链未画出)和大约840个水分子(以圆圈示出部分作代表)，P是穿过二聚体中心的非晶体学二重轴。最小的圆圈代表结合水，它们以单一式、桥式或网络式与胰岛素分子结合；逐渐增大的圆圈表示热运动越来越大，与胰岛素分子已无专一结合，构成围绕胰岛素分子的局部有序水合层。二聚体内部和单体内部，都没有水分子。

用晶体学技术修正后的精化的胰岛素晶体结构，显示出水分子主要分布在胰岛素分子的

上下部表面和有较大空隙的分子间部位(如三重轴周围)，但在二聚体和单分子内部都没有水分子。它们大体可以分为二类，一类与胰岛素分子或彼此之间有氢键作用，比较有序，呈结合状态，可称为结合水；另一类与胰岛素分子无专一性作用，在晶体环境中围绕蛋白质分子形成局部有序的“水合层”(图8)。结合水约占晶体中水含量的三分之一，它可能与水合层也有一

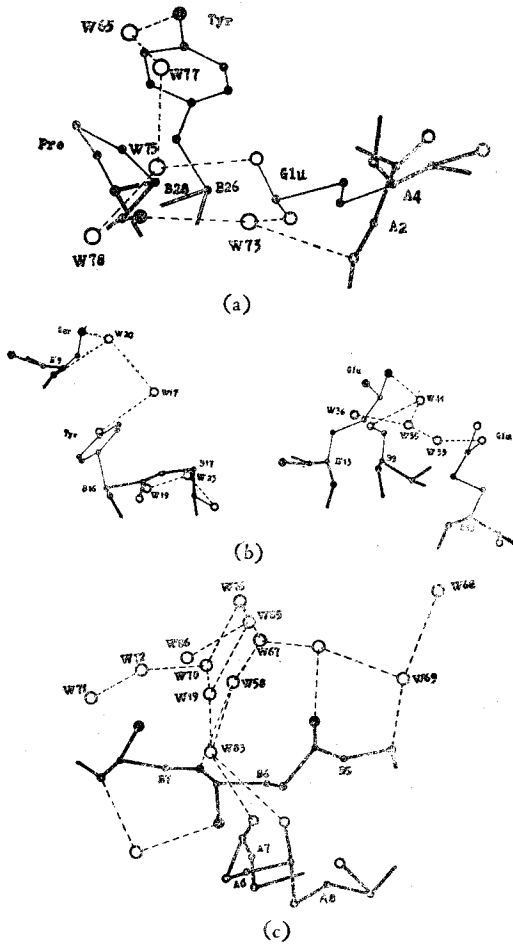


图9 与胰岛素分子结合的一些水分子

(a) 结合在 A、B 链之间；(b) 结合在二聚体内两个单体之间；(c) 一个水网络。

定交换；水合层可通过结合水在胰岛素分子表面一些特定部位形成“抛锚点”(参见图 9C)，这可能是它与蛋白质分子相作用的一条途径。

结合水与胰岛素分子作用的方式可分为三类：单个水分子与单个蛋白质极性基团的原子结合；单个水分子与两个或多个蛋白质极性基团的原子结合形成水桥；多个水分子与多个蛋白质极性基团的原子形成网络状结合。这三者数量的比大体是 1:2:7。图 9 示出了一些实例。

水的存在对胰岛素分子的静力学和动力学特征看来都很重要。仔细的分析表明，胰岛素分子中未能以自身的原子形成给体—受体配偶的极性基团，而都趋于结合水分子来配对。换言之，胰岛素分子表现出最大限度结合水的倾向。可能在其它蛋白质中，情况也是如此。由于水的参与，使整个分子体系的能量降得更低，有利于三维结构的稳定。一些水分子结合在胰岛素分子的 A、B 链之间(图 9a)，对 A、B 链的正确三维相关有所贡献；另一些水分子结合在胰岛素二聚体的两个单体之间(图 9b)，是胰岛素二聚化的一个稳定因素。此外，水分子对胰岛素六聚体的稳定也有重要作用。在晶胞中形成六聚体时，沿三重轴方向不超过 10 Å 距离的空腔里集中了六个谷氨酸(B13)的 γ -羧基，在结晶条件(pH6.4)下它们应是荷负电的(谷氨酸 γ -羧基的 PK 值为 4.25)，因而造成一个电荷密度较高的区域，这对胰岛素六聚体是一个不稳定因素。大量水分子出现在这里，可以对电荷起疏导作用，有助于聚合体的稳化。从以上情况可看出，水分子对胰岛素分子特征构象的稳定及其二聚化、六聚化，都有重要作用。

三维结构与生物学功能

胰岛素分子精细的三维结构知识为探讨其结构—功能关系，奠定了良好基础。激素的生物学效应通常是极其复杂的，胰岛素实际上也具有多种生理功能。但近些年的研究表明，这些效应的原发作用是激素与其受体分子间的结合，激素分子在这里作为第一信使触发随后发生的复杂生理过程。因此，了解与这种原初

反应有关的情况，就成为一个重要环节。运用亲和标记技术，已在脂肪细胞、肝细胞等一些靶细胞膜上发现和提取了胰岛素的受体，并证明它是由两个 α 和两个 β 亚基组成的糖蛋白；同时，关于胰岛素与其受体间作用的一些特性也进行了不少研究。综合这些研究资料，应用已获得的胰岛素分子的三维结构特征，已经提出胰岛素与其受体发生原发作用的可能部位。

在长期的进化过程中，不同种属间胰岛素分子的一级结构发生了相当变化，但是，在已研究过的 20 多个种属的胰岛素分子中，仍有一半左右的氨基酸残基在分子中的排列顺序保持不变，或者只作保守替换(如 A4 和 B13 可为谷氨酸或门冬氨酸，恒为酸性；B5 可为组氨酸或精氨酸，恒为碱性；B25 可为苯丙氨酸或酪氨酸，均有一个苯环，等等)。生物化学研究指明的许多对胰岛素的结构和功能很重要的残基，一般都属于这些不变残基或保守残基。经过大自然千百万年的选择和淘汰，这些残基居然恒在不变，意味着它们一定具有特殊的重要性。但在分子的一级结构中，它们的分布杂乱无规，未能提供了解其重要性的线索。在测定胰岛素分子的三维结构后发现，这些不变和保守残基在三维折叠中明显地集中于三个区域：(1) 分子内核，全部是疏水残基，包括亮氨酸—A16，B11，B15，缬氨酸—B18，异亮氨酸—A2 和半胱氨酸—A6，A11，亮氨酸—A13，B6，丙氨酸—B14 以及半胱氨酸—A20，B19 也部分参与其内；(2) 构成二聚体时单体分子互相接触的表面(只涉及 B 链 C 端和螺旋部分，参见图 7)，也全部是疏水残基，主要包括苯丙氨酸—B24，B25，缬氨酸—B12 和酪氨酸—B16 的苯环部分；(3) 一个主要由 A 链的头部和尾部残基组成的分子表面，全部是极性残基，包括甘氨酸—A1，谷酰胺—A5，酪氨酸—A19 和门冬酰胺—A21。不变和保守残基的这种特征三维排布，提供了解开它们重要性之谜的钥匙，也显示出胰岛素原发作用的可能部位。

上述区域(1)的重要性显然主要是结构上的，这些残基共同组成分子的疏水内核，是维持

分子三维结构的稳定所必不可少的。区域(2)、(3)则可能是胰岛素的功能部位,关于胰岛素类似物结构与功能关系及其与受体结合的研究表明,苯丙氨酸—B24 以及一定程度上还有 B25 的苯环, B20—B24 肽链的特征折叠,对胰岛素与受体的作用是极其重要的。一些研究还表明,胰岛素与其受体结合不涉及共价键,作用可能是疏水性和集合性的。这使得我们有相当理由推测,区域(2)可能是胰岛素分子与其受体结合的部位,其结合方式可能类似于单体胰岛素形成二聚体的方式。区域(3)可能参与结合,也可能通过某种极性的或电的作用对信息传递负有更多责任。

要真正查明胰岛素三维结构与功能的关系,直接证实上述推想,尚需更深入的研究,结构测定只是第一步。在这方面,胰岛素具有特殊的困难,因为它作为一种激素,作用机理不象酶那样清楚,至今也还得不到如酶—底物复合物这样良好的研究材料以直接确定活性部位和作用过程。我国上海生化所、动物所和生物物理所的部分科学工作者近些年围绕着胰岛素的作用原理开展了深入研究,获得了一系列具有

不同生物活力的胰岛素类似物和不同种属胰岛素,研究了它们与受体结合的关系。如去 B 链羧端五肽胰岛素的活力降为自然胰岛素的 80 %,去 B 链羧端六肽胰岛素的活力有更严重损失,而去 B 链羧端七肽胰岛素的活力完全丧失。我们认为,通过测定上述和其它一系列活性敏感的胰岛素类似物的三维结构,配合不同种属胰岛素结构和其它方面的工作,是研究胰岛素三维结构与功能关系的良好途径。目前,已经获得了一些重要类似物的单晶体,这方面的研究工作正在全面展开。与此同时,还在努力将母体胰岛素结构的分辨率提高到 1.25 Å,以为结构—功能关系的研究建立更精确的基础。同时通过对晶体中水结构的了解,把我们关于蛋白质的知识扩展到蛋白质分子与其周围环境的关系上去。

如果说,胰岛素的人工合成和晶体结构测定是我国关于胰岛素研究的第一、二战役,那么,现在进行的结构与功能关系的研究就是第三战役。可以预期这一战役也一定能在我们的国度里取得良好战果。

【全文完】

勘 误

1982 年第 3 期“腺苷酸环化酶的激活”一文附图有误,更正如下:

