

分子置换法与胰岛素结构

毕 汝 昌

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

分子置换是研究蛋白质空间结构的重要方法。用此法成功地测定了不同胰岛素及类似物的结构,同时也显示了该方法应用中的问题。从这些结构测定总结出可能使这类分析顺利进行的一些经验。

在晶体学研究中,利用结构在不同晶体学环境的相似性测定或改善位相的各种技术,统称为分子置换法。由于这种方法具有明显的优点和相当的潜力,自六十年代初提出以来,已逐渐发展为测定蛋白质空间结构的重要手段,其应用日益广泛,已有百多个成功的例子。目前,分子置换法主要用于研究分子对称性,测定类似结构,改进位相和确定重原子位置。在今后的生物大分子空间结构的研究里,至少有两个原因会导致分子置换法的作用进一步增大。一是它的优越性更能体现在日益增多的大的复杂结构的测定中,因为晶体学不对称单位含有的相同或相似结构越多,独立衍射数据的多余度就越大。近几年,借助电子密度平均改进位相的方法显示了越来越大的威力。二是由于蛋白质三维结构相似性的普遍存在和蛋白质工程等技术的发展,会有越来越多的相类似结构需要测定。

深入研究某个或某类蛋白质结构时,常需要测定与已知结构相类似的未知结构。应用分子置换法完成这类结构测定的步骤一般为:先确定分子在未知晶胞里的取向,然后确定分子的位置,进而用已知结构置换未知结构的办法得到晶体结构的模型,最后通过结构修正的途径获得未知结构的精确信息。

胰岛素是研究得最早和最广泛的一种蛋白

质。伴随着蛋白质研究的进展,这个小蛋白质常被选为研究的突破口或检验方法的研究对象。分子置换法的早期研究里,胰岛素晶体也被做为实验对象,并取得了成功^[1]。为了研究胰岛素的结构及其与功能的关系,继用同晶置换法测定猪胰岛素晶体结构之后,对不同晶型、不同种属和化学修饰胰岛素开展了结构研究。这些胰岛素类似结构的测定大都避开了制备重原子衍生物的困难途径。进行其中重要的结构测定时,由于晶型不同或局部构象变化较大,几乎都首先尝试了分子置换法,并先后成功解得了粘盲鳗胰岛素,无锌立方晶型胰岛素,去五肽胰岛素和白鲑鱼胰岛素的结构模型^[2-5],而且通过结构修正获得了去五肽胰岛素的高分辨率结构^[6]。

虽然,分子置换法的技术和应用取得了很大进展,但仍存在不少问题。本文试图根据以此法测定不同胰岛素或类似物结构的实践,来分析此法应用中的一些问题,并就计算条件的准备和参数的选择总结一些经验。

分子取向的测定

不同晶体学环境里的分子的相对取向,通常可用旋转函数^[7]计算得到。旋转函数分析基于分子的帕特逊函数具有特征的分布。在晶体的帕特逊函数里,晶胞中不同取向的分子的自

身向量群, 分别以相应的取向分布在以原点为球心, 分子最大线度为半径的球体内。按定义, 旋转函数为两个相对旋转的帕特逊函数的乘积, 在以原点为球心的球体内的积分。当旋转角度等于分别属于两个帕特逊函数的相同或相似分子的相对取向时, 该函数的值最大。如果被旋转的那个帕特逊函数的分子取向是已知的, 就能解得未知晶胞里相似分子的绝对取向。

旋转函数的计算方法有几种。用帕特逊函数直接计算, 比换算到衍射数据进行, 速度要慢得多, 而且需要较大的计算机内存。快速旋转函数^[9]的出现, 使旋转函数的计算速度大大加快, 计算精度也有所提高。我们曾先后用经典和快速的计算方法, 对去五肽胰岛素的结构进行了分析, 后者比前者至少要快两个数量级。目前, 大多数蛋白质晶体学实验室和研究组都采用 Crowther 编写的快速旋转函数程序解决分子的取向问题。

去五肽胰岛素系由酶解切除胰岛素分子 B 链 C 端五肽得到。它失去了形成胰岛素二聚体的能力, 在获得的单斜晶体里以单体形式存在。作者在国外工作期间, 应用快速旋转函数对这类晶体做了分析^[4]。较系统的计算表明, 旋转函数的质量在很大程度上取决于所用参数和模型的选择。图 1 说明下述几点对于旋转函数图的质量是至关重要的。第一, 积分半径的改变可导致不同面貌的图。合适的积分半径能较多地包括分子内的自身向量峰而排除分子间的交叉向量峰的干扰, 一般应小于分子的最短线度而不大于其 $1/3$ 。第二, 用于计算的强度数据的变化对图的质量会有较大影响。选用的数据分辨率壳层不应过窄。不同壳层数据给出吻合一致的解是判断其真伪的一个重要依据。采用锐化因子校正数据的办法, 能使起较大作用的强点较均匀的分布, 也才能真正达到提高分辨率的目的。第三, 对所用已知结构模型的选择和处理也是相当重要的。模型原子的取舍原则是去掉那些涉及构象可能发生变化的原子或残基。舍掉分子表面的侧链和较活动的肽段通常是有利的, 但丢掉太多的原子, 比如去掉所有侧

链原子, 又可能会降低图的信噪比。分子置换法要求已知结构同未知结构相似, 但对需求的相似程度很难做出定量分析。显然, 在这里空间结构的相似性比氨基酸序列的等同性更为重要。凝乳酶和一种已知结构的胃蛋白酶的序列等同性只有 20% 左右, 这两个结构的交叉旋转函数分析也获得了成功。然而在 $4Zn$ 和 $2Zn$ 胰岛素结构之间, 虽然氨基酸序列没有发生任何变化, 但由于分子构象发生了较大变化^[9], 旋转函数分析取得成功的希望则很小。

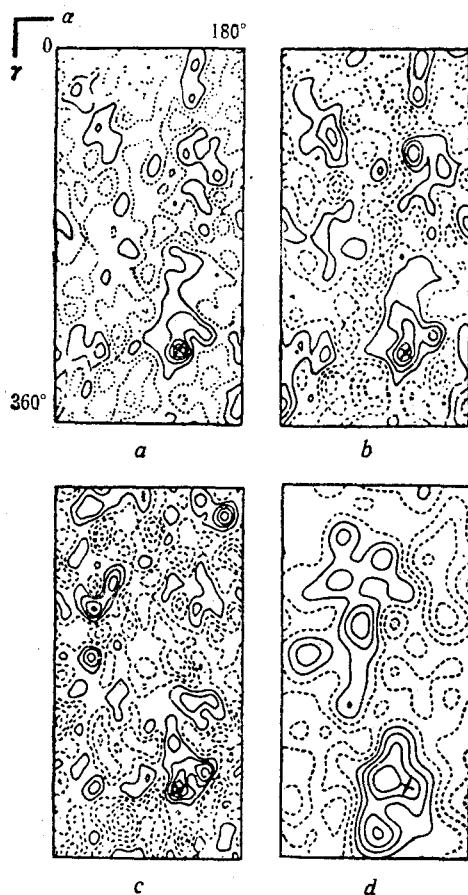


图 1 去五肽牛胰岛素与已知模型的交叉旋转函数截面图

计算条件: (a) 最佳条件; (b) 同 (a), 但用较小的积分半径; (c) 同 (a), 但所用模型分子仅包括主链原子; (d) 同 (a), 但用过低分辨率的数据。

白鲢鱼胰岛素的氨基酸序列, 同猪胰岛素相比, 变化近三分之一, 但仍能形成胰岛素六聚体。用该种胰岛素培养的正交晶体的一个不对称单位含有一个六聚体。用快速旋转函数对该

晶体的研究^[40]表明,这较分析去五肽胰岛素容易。经过结构修正的去五肽胰岛素的结构,除个别部位外,与胰岛素的结构很相似,因而结构差异对旋转函数的计算结果不应产生多大影响。分析难易的原因看来主要有两点。一点是去五肽胰岛素晶体内分子堆积比白鲢鱼胰岛素晶体密得多,去五肽胰岛素单斜晶体的含水量接近蛋白质晶体含水量的下限,而白鲢鱼胰岛素正交晶体的含水量则为 50% 以上。另一点是做为搜索单位的模型结构的形状明显不同,去五肽胰岛素用的单体分子呈狭长的无规状,白鲢鱼胰岛素情形中使用的是桔子状的六聚体。这样,在去五肽胰岛素的旋转函数计算中,无论怎样选择积分半径,都难以排除较多的分子间交叉向量峰的干扰作用。这时积分半径小的变化可能导致旋转函数图的较大变化(见图 1b)。另外,用不同模型算得的交叉旋转函数结果(图 2),也体现了无用的向量峰的影响。在这些计算里,以狭长状的单体分子做为已知模型,势必把六聚体内不同单体间的交叉向量峰包括在积分球体内,使信噪比降低。

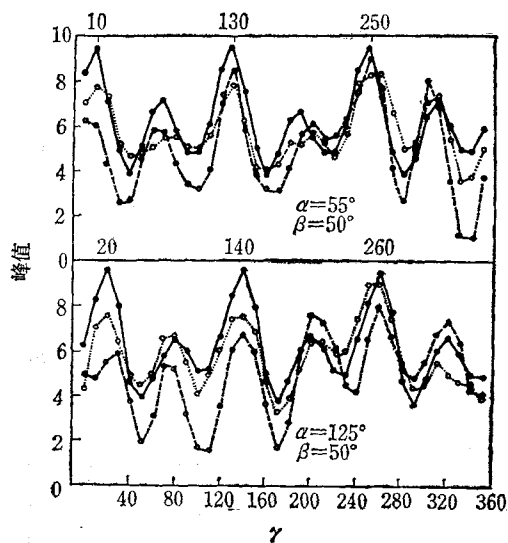


图 2 白鲢鱼胰岛素与已知模型交叉旋转函数计算结果
模型分别用 2Zn 猪胰岛素六聚体 (●——●) 二聚体 (○·····○) 和单体 (●——●) 构成

旋转函数图的复杂性常导致分析的失败。如果拥有处于不同晶体学环境的几个结构相类

似的分子,进行相关分析是必要的。对去五肽胰岛素应用分子置换的结构测定^[41]中,拥有包括不同晶型在内的几个晶体学不等价的相似分子,利用几套数据间的交叉分析和相互验证,对正确测定分子的取向提供了极有利的条件,才使这一困难的分析获得成功。

分子堆积模型的确定

在确定分子取向的基础上,测定分子在晶胞里位置的方法可分为三类。一类是利用帕特逊函数性质,例如将某对称元素相关的结构间的交叉向量峰重叠比较,T 和 Q 函数就是基于此种思想设计而成的平移函数^[11,12];第二类是用尝试法计算结构振幅,然后算得 R 因子或相关系数进行比较;第三类是考虑分子堆积的合理性,如合理的结构模型要求分子或寡聚体分布较均匀,它们之间不应相互穿插。根据这类必需条件可以设计不同的重叠函数,用于排除众多的可能性或选择正确的解。这些方法各有利弊,第二类方法分析简单,但计算费用大,其计算速度较 T 函数通常要慢百倍。有时需要联合应用两种以上的方法,才能得到正确的平移参数。

去五肽牛和羊胰岛素的结构测定^[4],采用了 R 因子搜索法。值得一提的是去五肽牛胰岛素单斜晶体的不对称单位含有两个分子,即使在这样复杂的情形里,应用 R 因子搜索法也能够确定分子的位置。

为解决白鲢鱼胰岛素的平移问题,运用了 T 函数和 R 因子两种方法^[3]。首先尝试了速度快的平移函数,计算中除去无用的分子内的自身向量峰有助于提高信噪比,但这时需要的比例因子的估算应基本上是正确的。计算所用的数据分辨率对 T 函数的计算结果也有影响,较宽的分辨率壳层是有益的。为了进一步肯定平移函数给出的解,只用 R 因子进行了搜索。鉴于用三维数据计算的速度太慢,先试用结构投影的二维数据进行计算是有利的。在我们分析的情形里,这样做可使计算时间节省百倍以上,而且效果出乎预料得好。有时仅用一百多个数

据就能得到正确的二维平移参数。平移问题的解决,除与使用的强度数据及参数有关外,还依赖于所用已知结构的精度和第一步测定的取向参数。我们的实验表明,将测定的取向在尤拉角系统的两个角度上各偏离 1° ,仅导致平移参数在一个方向上移动 $0.2\text{ \AA}$,这对往后的计算不会产生明显的影响。

获得分子在晶胞里的取向和位置之后,用已知结构置换未知晶胞里的相似结构,从而得到能够提供初始位相信息的结构模型。为使以后的结构分析工作进行顺利,进一步考察和确认所得模型的正确性是值得的。对于正确的结构模型,相对低的R值是必需的,但分子堆积的合理性往往更能鉴别真伪。在去五肽胰岛素和白鲑鱼胰岛素的分子置换研究中,对这样建造的模型首先计算了分子间的紧密接触点数。计算结果指出,只有少数原子间距离小于范德华作用距离,而且其中多数又位于构象容易发生变化的区域。模型的最后确认都是通过傅里叶图的分析来完成的。用去掉某些原子基团或残基的初始结构模型算得的位相,与观测结构振幅做傅里叶综合。在这样得到的密度图上,如果那些不参加位相计算的基团或残基及其与周围的合理联系能基本上显示出来,这将为模型的正确性提供较客观的证据。

精确结构信息的获得

结构修正是获得未知结构精确信息的手段。如果初始结构模型是正确的,而且达到一定精度,那么结构模型的晶体学修正能够给出未知结构同已知结构的差异。

对初始模型不做任何人工调整,而先用计算程序进行修正是有利的。这样做一方面可用初步修正的办法改进分子的取向和平移参数,另一方面初步修正过的原子坐标参数能为计算电子密度提供改进的位相信息,使密度图易于分析。一些分子置换研究里,晶体学修正前先对分子的取向和位置做了修正。在这方面,限定和约束最小二乘刚体修正^[3]显示了优越性,能够用低分辨率数据修正分子的方位。从某种

程度上讲,其他修正程序也能够起这种作用。运用快速傅里叶最小二乘法对去五肽胰岛素进行初步结构修正^[4]时,曾人为地将分子的位置稍许移动,修正结果表明该程序具有纠正这种不正确位移的能力。

仅基于用分子置换法得到的初始位相信息,通过结构修正是能够获得精确结构的。粘盲鳗胰岛素的晶体结构最初是用分子置换法测定的,但后来加进了同晶置换位相信息,才完成了较高分辨率的结构修正。诚然,同晶置换或其它实验方法提供的独立位相信息,非常有益于获得正确的结果,但能否只靠已知的相似结构,用修正手段得到精确的结构呢?在过去相当长一段时间内,晶体学界不少人对此存有疑虑。然而,相继出现的越来越多的成功例子做出了肯定的回答。去五肽胰岛素的结构测定就是一个很好的例子。用分子置换法测定的去五肽牛和羊胰岛素晶体结构,分别修正到了 $1.5\text{ \AA}$ 和 $2.1\text{ \AA}$ 分辨率。与 2Zn 猪胰岛素的结构相比较,这些结构表现出明显的差异,其残基B25和肽段B1—B4发生了显著变化;其它的结构特点则与 2Zn 猪胰岛素分子I更相似。这里,较大的结构差异正体现了分子置换法的解题能力,而与分子I更相似的结果也非偶然,是与其它结构分析的结论相一致的,说明分子I的结构是胰岛素分子的较稳定的基本形式。对这些结构测定可靠性更客观的评价还来自用不同方法独立测定结果的比较。去五肽猪胰岛素的结构是利用反常散射数据解出来的^[14],同用分子置换法解得的去五肽牛和羊胰岛素的结构极为相似。

参 考 文 献

- [1] Dodson, E. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **16**, 227, 1966.
- [2] Cutfield, J. F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **87**, 23, 1974.
- [3] Bentley, G. A. et al.: *J. Mol. Biol.*, **125**, 387, 1978.
- [4] Bi Ru-chang et al.: *Acta Cryst.*, **B39**, 90, 1983.
- [5] 赵宝光等:《中国科学》, B辑, 第5期, 446, 1985.
- [6] Bi Ruchang et al.: *Contributions to Crystallography* (Ed. C. N. R. Rao), pp. 183, Indian Academy of Sciences, Bangalore, 1983.
- [7] Rossmann, M. G. et al.: *Acta Cryst.*, **15**, 24, 1962.
- [8] Crowther, R. A.: *The Molecular Replacement Method*

(Ed. M. G. Rossmann), pp. 173, Gordon and Breach, New York, 1972.

[12] Tollin, P.: *Acta Cryst.*, **21**, 613, 1966.

[13] Sussman, J. L. et al.: *Acta Cryst.*, **A33**, 800, 1977.

[14] Stuart, D. 等:《中国科学》, B辑, 第1期, 24, 1984.

[9] Bentley, G. A. et al.: *Nature*, **261**, 166, 1976.

[10] 严友为等:《中国科学》, B辑, 第10期, 897, 1984.

[11] Crowther, R. A. et al.: *Acta Cryst.*, **23**, 544, 1967.

[本文于1986年7月12日收到]

科技消息

高级保健饮料——蛋白多维汽水

以大豆蛋白的酶解物为基料, 辅以一般汽水的添加剂(不需要色素)配制而成的高级保健饮料——蛋白多维汽水, 其主要特点是富含人体必需的各种氨基酸和其他氨基酸。此外, 还含有一定量的各种维生素及人体必需的矿物质和微量元素。作为甜味剂的蔗糖已被水解为单糖, 即葡萄糖和果糖。这些丰富的营养物质均溶于水, 易被人体吸收利用, 特别有利于老、幼、病、弱者及孕妇的营养需求。它能加速运动员的体力恢复, 可为体力和脑力劳动者迅速补充能量, 提高劳动效率。

在生产工艺方面, 突破了现有文献资料及专利资料的框框, 有所创新: 制备酶不用丙酮等有机溶剂即可得到大量的有活性的酶, 使成本大大降低; 以新的酶解法水解大豆蛋白, 所得

产物不带任何苦味; 另外, 用工业上的压滤法代替实验室中的离心法和纸滤法进行酶解产物与料渣的分离, 为该饮料的工业规模生产解决了关键性的技术问题。

蛋白多维汽水的研制成功, 已经过卫生部门检定合格, 并通过中国科学院新技术开发局组织的技术鉴定, 获得与会专家及饮料生产技术人员的好评, 并建议作为保健饮料进行工业化生产, 投放市场。目前已开始向国内饮料厂家有偿转让技术。我国是大豆生产国, 用大豆生产“蛋白多维饮料”, 原料充足, 成本低廉, 加之工艺简单, 便于技术推广, 适应市场需求, 因而有广阔的发展前景。

[生物物理研究所 邢国仁报道]

“抗癌长生灵”临床前研究

抗癌新药——“抗癌长生灵”是从传统中药蚌肉和蚌泪中提取的有效成分。

试验表明, 它对小白鼠腹水肝癌(H₂₂)和艾氏腹水癌(乳腺癌)具有显著疗效, 瘤重抑制率可达30—69.2%。在体外试验中, 它可以抑制肿瘤细胞的DNA聚合酶 α 。

用兔和豚鼠所做的试验表明, “抗癌长生灵”无刺激、无溶血作用, 不引起过敏反应。给兔进行静脉注射, 对呼吸系统、循环系统和神经系统无有害影响。用兔和狗做的亚急性试验(称体重、血液检验和组织学检查等)未见明显毒性。用微生物做试验, 其致突变作用为阴性。其不引起小鼠骨髓多染性红细胞的微核率升高。小白鼠半致死量为4.02—5.86克/公斤(体重)。总起来看, 其毒性很低。

化学分析证明, 其含有多种成分, 但不含大

分子物质。关于抗癌作用的关键成分是什么? 有待进一步研究确定。

蚌类资源国内很丰富, 分布广泛, 且便于人工养殖, 将来可以满足广大患者的需要。

“抗癌长生灵”是疗效明显、毒性很低、原料丰富、制备方法简易的新型抗癌药。

对这一研究工作, 1986年3月8日召开了临床前研究鉴定会, 专家们认为该项科研总体设计符合中医中药原理, 研制技术资料基本齐全, 数据可靠, 制剂工艺合理可行, 质量标准符合要求, 动物试验和临床试用安全有效, 已达到临床前研究标准, 根据“新药审批办法”, “抗癌长生灵”可按中药第二类申报进行临床研究。

[中国科学院生物物理研究所 张贺忠 刘朵花 寇学仲 刘孔林 江苏海安生化药物研究所

宋长生 王宝昌]