

研究报告

人白介素 6 受体结合功能域的构效关系研究*

冯健男 任蕴芳 李 松¹⁾ 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 以分子对接 (docking) 方法研究人白介素 6 受体胞外区配基结合功能域“WSXWS”区氨基酸残基定点突变对受体与配基人白介素 6 结合时的相互作用能量、分子间相互作用的影响, 从分子力学、分子动态学分析了人白介素 6 受体胞外区功能域关键氨基酸残基在受体与配基结合中的构象变化以及与人白介素 6 间的相互作用。

关键词 人白介素 6 受体, 人白介素 6, 分子对接, 功能域

学科分类号 Q71

人白介素 6 (hIL-6) 的异常表达及人白介素 6 受体 (hIL-6R) 的高丰度与临床诸多疾病如多发性骨髓瘤、类风湿性关节炎、骨质疏松等有着密切关系。hIL-6 与具有高亲和力的 hIL-6R 结合, 经过细胞内信息传递, 增强或抑制某些基因的表达, 从而完成其生物效应, 因此, hIL-6 与 hIL-6R 间相互作用的研究不仅具有生物学意义, 在临床医学上也将具有极其重要的价值^[1~4]。

Yawata 等^[5]通过对 hIL-6R 氨基酸进行点突变, 观察到 hIL-6 胞外区功能域中某些关键氨基酸残基定点突变前后的受体-配基结合及其信号转导能力的变化。本文以 Yawata 等^[5]的实验为依据, 借助 SGI 图形工作站从理论上分析 hIL-6R 及其突变体 (MuhIL-6R) 与 hIL-6 间相互作用, 以复合物氢键数目、结合能量 (包括 Van der Waals 能及库仑能) 作为判别标准, 解释了 hIL-6R 胞外区“WSXWS”功能域突变前后与 hIL-6 相互作用改变的根源, 以期对小分子 hIL-6R 拮抗剂的设计提供思路。

1 理论方法

蛋白质所具有的功能在很大程度上取决于其空间结构, 因此对蛋白质空间结构的研究在蛋白质工程中有着极其重要的意义^[6]。借助计算机数值模拟获得生物大分子结构、动力学、热力学方面的信息, 以及研究这些信息与生物功能之间的关系, 不仅为实验研究生物分子性质、功能提供了理论依据, 而且为天然生物大分子的改性和基于受体结构

的药物设计提供了理论指导。同源模建获得的人白介素 7 及其突变体分别与人白介素 7 受体作用, 从理论上预测了其作用效果, 为实验提供了依据及合理解释^[7]。

分子力学方法通过适当力场下分子能量的计算与构象调整, 优化初始分子结构。考虑到蛋白质分子的柔性, 必将使其存在各种旋转位垒, 分子力学方法下无法获得蛋白质分子整个构象空间中的能量最低构象, 最近发展起来的分子动力学方法, 克服了上述缺点, 在经典力场下搜索其构象空间得到能量最小的优势构象。分子动力学模拟已成为研究蛋白质、核酸结构与功能的有力工具^[8]。

对于蛋白质与受体间相互作用的理解和研究是合理进行蛋白质工程研究的必不可少的步骤, 通过蛋白质分子间存在的相当显著的空间及电荷的互补性, 利用分子对接 (docking) 方法研究蛋白质与受体的作用机制、直观考察蛋白质与受体结合部位空间上的互补性、计算相互作用能量。

2 结果与讨论

2.1 hIL-6 与 hIL-6R 相互作用

借助 SGI 图形工作站, 利用 Insight II (95.5) 软件通过同源模建的方法构建 hIL-6R 三维结构。选取的同源蛋白为已知的人生长因子受体三维晶体

* 国家自然科学基金资助项目 (39480025)。

¹⁾ 军事医学科学院药物毒物研究所, 北京 100850。

Tel: (010) 66931324; E-mail: jiannanfeng@hotmail.com

收稿日期: 1998-11-05, 修回日期: 1999-02-08

结构 (PDB 库号: 3HHR, X 射线晶体结构数据, 分辨率为 0.28 nm), 通过多序列比较确定的保守区及环区, 为 hIL-6R 相应的氨基酸序列赋坐标, 经过初始结构调整, 得到 hIL-6R 的初始三维结构。

选定 CVFF 力场, 利用 Discover3 程序包^[9]在分子力学方法下经过 18 000 步、20 000 步、15 000 步 (收敛判据: 41.8 J/mol), 依次通过最陡下降、共轭梯度 (Polak-Ribiere 方法)、牛顿力学 (Broyden、Fletcher、Goldfarb、Shanno [BFGS] 方法) 分别进行能量优化; 得到的构型经过常温分子动力学动态模拟, 搜索其构象空间, 经分子力学优化得到常温稳定三维立体结构。图 1 给出了以生长因子受体为同源蛋白的 hIL-6R 的理论模建三维结构。



图 1 以生长因子受体为模板经过优化获得的人白介素 6 受体三维结构

通过 PDB^[10] 数据库提供的 hIL-6 三维 NMR 结构模型 (PDB 库号: 1IL6), 利用分子对接 (docking) 方法, 借助人生长因子与其受体间的相互作用结构 (PDB 库号: 3HHR, X 射线晶体结构数据, 分辨率为 0.28 nm; 1AXI, X 射线晶体结构数据, 分辨率为 0.21 nm), 将 hIL-6 与 hIL-6R 对接形成复合物。形成的复合物经过分子力学优化 (依次通过最陡下降、共轭梯度、牛顿力学方法)、分子动力学动态模拟得到稳定结构。图 2 给出了 hIL-6 与 hIL-6R 作用的复合结构。

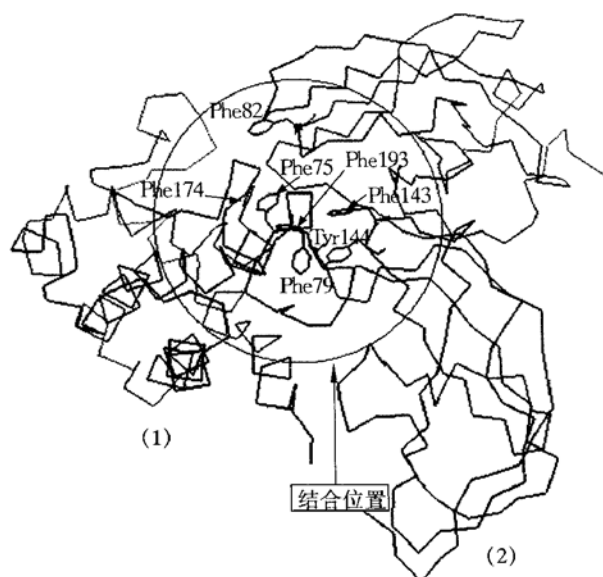


图 2 利用分子对接方法获得的人白介素 6 与人白介素 6 复合物结构

(1) 人白介素 6; (2) 人白介素 6 受体。Phe: 苯丙氨酸; Tyr: 酪氨酸。

hIL-6 与 hIL-6R 相互作用过程中形成 27 条分子间氢键 (因篇幅关系, 本文未列出形成的氢键情况)。从图 2 分析可以看出, hIL-6 与 hIL-6R 结合位点借助亲和力作用方式完成相互作用, 二者结合没有共价键的形成, 而是由特定部位间的短程分子力相互作用结合。hIL-6 与 hIL-6R 结合位点在空间上紧密接触, 决定于它们之间的空间互补结构, 从而体现其特异性。hIL-6 与 hIL-6R 间相互作用方式体现在: a. 正负电荷间的盐键作用: hIL-6 中的 Asp27 与 hIL-6R 中的 Arg147 (主链碳原子间距离 $r(C_{\alpha}-C_{\alpha}) = 0.84 \text{ nm}$)、hIL-6 中的 Arg180 与 hIL-6R 中的 Glu192 ($r(C_{\alpha}-C_{\alpha}) = 0.68 \text{ nm}$)、hIL-6 中的 Arg183 与 hIL-6R 中的 Asp167 ($r(C_{\alpha}-C_{\alpha}) = 1.24 \text{ nm}$) 形成静电作用; b. 氢键作用: hIL-6 中的 Ser23、Gln76、Arg180、Gln184 以及 hIL-6R 中的 Asn50、Ser51、Ser81、Leu109、Tyr137、Tyr144、Arg145、Arg147、Asp167、Gln169、His171、Glu192、Gln195 作为正电荷质子给体, hIL-6 中的 Glu24、Asp27、Ala69、Glu70、Cys74、Gln76、Ser77、Arg180、Leu182、Gln184、Met185 及 hIL-6R 中的 Gly107、Arg145、Gln169、Glu191、Glu192、Gln195 作为提供强负电性的受体, 通过静电作用形成分子间氢键作用; c. 范德华 (Van der waals) 力作用: 图 2 可以看出, hIL-6 中的 Phe79 与 hIL-6R 中的 Phe143、

Tyr144 侧链芳香环作用, 稳定复合物结构; hIL-6 中的 Phe75 插入 hIL-6R 中的 Phe82、Phe193 中, 侧链苯环的侧平行易于 $\pi\pi$ 超共轭形成, hIL-6 中的 Phe174 靠近 hIL-6R 中的 Phe193 而完成相互作用; hIL-6 与 hIL-6R 结合部位外围形成较强的疏水区 (一侧为 hIL-6 中的 Leu65、Pro66、Met68、Leu166、Phe171、Phe174 与 hIL-6R 中的 Phe82、Gly105 构成; 另一侧为 hIL-6 中的 Ile26、Ile30、Ala181 及 hIL-6R 中的 Gly78、Phe143、Met164、Leu168 构成), 从而稳定复合物结构. 分析结果表明, hIL-6 通过 HelixA、LoopAB 以及 HelixD 与 hIL-6R 相互作用, 与实验结果一致^[11].

通过 docking 程序包分析 hIL-6 与 hIL-6R 相互结合的 Van der waals 势、静电能量 (库仑能), Van der waals 势包括分子间的排斥能、色散能 (取向能及诱导能与分子的极性有关, 蛋白质分子结构复杂, 一般认为属非极性分子), 计算 hIL-6 与 hIL-6R 结合能 (结合能= Van der waals 势+ 静电能). 表 1 列出了复合物蛋白质分子相互作用的能量.

表 1 人白介素 6 与人白介素 6 受体作用能

kJ	
相互作用能	能量值
范德华 (Van der waals) 能	- 885. 633
排斥能	893. 480
色散能	- 1779. 113
静电能	- 970. 487
结合能	- 1749. 600

从表 1 给出的 hIL-6 与 hIL-6R 蛋白质间的相互作用能可以看出, 静电能量与 Van der waals 能量大体相当. 组成 Van der waals 势的排斥能及色散能分别反映了 hIL-6 与 hIL-6R 作用过程中结构空间之间的排斥及互补关系. 由表 1 可以看出, 静电效应在 hIL-6 与 hIL-6R 特异性结合的过程中起着举足轻重的作用.

2.2 hIL-6 与 MuhIL-6R 相互作用

结合 Yawata 等^[5]的实验, 利用模建的 hIL-6R 三维结构, 对 hIL-6R 胞外区配基结合功能域“WSXWS”区残基进行定点突变: (I) Val185 → Met, Gln186 → His; (II) Arg188 → Gly; (III) Glu192 → Ala, Phe193 → Ile; (IV) Gly196 → Val, Glu197 → Asp; (V) Trp198 → His, Ser199 → Ala; (VI) Ser199 → Ala, Ser202 → Ala; (VII) Glu201 →

Asp, Trp202 → Arg. 七种突变体经过分子力学能量最小化获得稳定构象. 通过突变体与 hIL-6R 叠代 (superimpose) 图分析可以看出, 突变体结构与图 1 给出的 hIL-6R 三维模建构型走向一致, 主链大体一致.

利用分子对接方法, 通过分子力学最小化、分子动力学动态模拟得到 hIL-6 与 MuhIL-6R 相互作用复合物的稳定结构. 为节省篇幅, 本文未给出 hIL-6 与 MuhIL-6R 作用复合物结构图.

相对于图 2, 分析 hIL-6 与 MuhIL-6R 作用复合物结构可以看出: 七种突变体与 hIL-6 作用时, 相对于 hIL-6 与 hIL-6R 之间作用, 侧链芳香环之间的超共轭效应不存在, 从而削弱了 Van der waals 力; 疏水区域难于包裹结合部位, 结合部位的亲水残基裸露, 降低了复合物的热稳定性; 带电氨基酸间的盐键作用减弱, 降低静电作用. 可以预测, 七种突变结构与 hIL-6 间的相互作用较 hIL-6 与 hIL-6R 间的作用将减弱, 形成的复合物结构难以稳定存在.

为了更准确地研究突变结构与 hIL-6 间作用静电的变化, 利用 Insight II (95.5) 软件分析七种突变体与 hIL-6 作用的复合物分子间形成氢键情况. 表 2 列出了七种突变体复合物形成分子间氢键的数目 (为节省篇幅, 分子间氢键性质 [给体、受体原子及相应的键长、键角] 未列出).

表 2 人白介素 6 与人白介素 6 受体突变体相互作用形成氢键数目

突变体	分子间氢键数
人白介素 6 受体	27
V185 → M, Q186 → H	9
R188 → G	17
E192 → A, F193 → I	16
G196 → V, E197 → D	14
W198 → H, S199 → A	20
S199 → A, S202 → A	14
E201 → D, W202 → R	14

从表 2 可以看出, 相对于 hIL-6 与 hIL-6R 间形成的氢键数目, 突变体复合物蛋白质分子间氢键数目明显减少, 表明分子间的氢键作用减弱, 分析七种突变体与 hIL-6 作用时发现, 七种突变体几乎与 hIL-6 的 Helix A 无氢键作用. 氢键数目的减少, 氢键作用的减弱, 更清晰地反映了突变体与 hIL-6

间静电作用的减弱. 突变体 (I) 与 hIL-6 形成氢键能力最弱, 反映二者间的静电作用将很弱.

在分子对接方法下计算了七种突变体与 hIL-6

相互作用能量 (与表 1 列出的关于 hIL-6 与 hIL-6R 相互作用能计算方法相同). 表 3 列出了七种突变体与 hIL-6 相互作用能量.

表 3 人白介素 6 与人白介素 6 受体突变体相互作用能

突变体	范德华能	排斥能	色散能	静电能	总能量
V185→M, Q186→H	- 469.218	407.405	- 876.623	- 356.344	- 825.562
R188→G	- 464.855	482.680	- 947.535	- 773.250	- 1238.105
E192→A, F193→I	- 473.259	442.759	- 916.018	- 552.231	- 1025.490
G196→V, E197→D	- 332.557	340.794	- 673.351	- 585.876	- 918.433
W198→H, S199→A	- 422.015	465.503	- 887.518	- 720.406	- 1142.421
S199→A, S202→A	- 391.571	381.885	- 773.456	- 522.670	- 914.241
E201→D, W202→R	- 428.314	452.391	- 880.705	- 771.188	- 1199.502

从表 3 给出的作用能量可以看出, 对于 hIL-6R 胞外区 “WSXWS” 区域氨基酸点突变产生的七种突变体, 其与 hIL-6 相互作用过程中, Van der waals 力显著下降, 结合总能量明显升高, 复合物稳定性显著下降. 相对于其他突变体, 突变体 (I) 与 hIL-6 间的静电作用很弱, 表明氢键在分子间相互作用中占据重要位置.

3 结 论

从表 2 对比、结合图 2 可以看出, 当 hIL-6R 胞外区 “WSXWS” 功能域氨基酸发生点突变时, 突变氨基酸的空间结构、分子极性、电学性质使得突变体 MuhIL-6R 与 hIL-6 形成复合物时分子间氢键形成能力降低, 分子间超共轭效应消失, 两个蛋白质间的疏水氨基酸围成的疏水结构破坏, 分子间的 Van der waals 作用将显著降低, 从而削弱 MuhIL-6R 与 hIL-6 的结合.

从表 1 与表 3 对比可以看出, hIL-6R 胞外区 “WSXWS” 功能域氨基酸经点突变形成的 MuhIL-6R 与 hIL-6 作用能相对于 hIL-6R 与 hIL-6 作用能明显降低. 相对于 hIL-6R, 七种突变体与 hIL-6 相互作用的 Van der waals 力、静电作用力均下降 (与从图 2 观察、表 1 及表 3 列出的分子间氢键分析获得的结论一致). 七种突变体与 hIL-6 相互作用能量的明显降低, 反映出七种突变体与 hIL-6 结合能力因点突变而削弱, 同时也反映出复合物热稳定性显著降低. 结合能力的削弱、复合物的热力学不稳定性表明七种突变体相对于 hIL-6R, 与 hIL-6 相互作用难以完成.

利用分子对接 (docking) 方法, 借助分子力学、分子动力学方法从理论上探讨 hIL-6 与 hIL-6R 间的相互作用, 为实验提供了合理解释, 为更深入地研究二者的相互作用提供了方法和依据.

参 考 文 献

- 1 Savino R, Lahm A, Giorgio M, *et al.* Saturation mutagenesis of the human IL-6 receptor binding site: implications for its three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (9): 4067~ 4071
- 2 Paonessa G, Graziani R, Ciapponi L, *et al.* Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signaling. *EMBO J*, 1995, **14** (9): 1942~ 1951
- 3 Salvati A L, Lahm A, Paonessa G, *et al.* IL-6 antagonism by soluble IL-6 receptor a mutated in the predicted gp130 binding interface. *J Biol Chem*, 1995, **270** (20): 12242~ 12249
- 4 Ehlers M, Grotzinger J, deHon F D, *et al.* Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *J Immunol*, 1994, **153** (4): 1744~ 1753
- 5 Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, *et al.* Structure function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J*, 1993, **12** (4): 1705~ 1712
- 6 来鲁华. 蛋白质的结构预测与分子设计. 北京: 北京大学出版社 (Lai L H. *Protein Structural Prediction and Molecular Design*. Beijing: Peking University Press), 1993: 1~ 15
- 7 Romano T K, Rolf K, Johannes G, *et al.* Comparison of the 3D models of four different human IL-7 isoforms with human and murine IL-7. *Protein Engineering*, 1998, **11** (1): 31~ 40
- 8 McCammon J A, Harvey S C. *Dynamics of Protein and Nucleic Acids*. London: Cambridge University Press, 1987: 150~ 270
- 9 BIOSYM Technologies, Discover 3 USER GUIDE, 1995
- 10 Protein Data Bank, Chemistry Department Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973, USA, 1997
- 11 吴加金, 雷红星, 杜 勇, 等. 造血细胞因子家族因子的空间结构比较. *中国实验血液学杂志* (Wu J J, Lei H X, Du Y, *et al.* *J Experimental Hematology*), 1998, **6** (2): 111~ 119

The Structure and Activity Studies Based on Combining Functional Domain of Human Interleukin-6 Receptor. FENG Jian-Nan, REN Yun-Fang, LI Song¹⁾, SHEN Bei-Fen (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;* ¹⁾*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Based on molecular docking method, the influence of interaction energy and molecular

interaction between mutated ligand combining functional domain "WSXWS" of human interleukin-6 receptor (hIL-6R) and human interleukin-6 (hIL-6) is studied. The conformation changes on key amino acids of human interleukin-6 receptor when combining with human interleukin-6 and the interactions between human interleukin-6 receptor and human interleukin-6 are analyzed.

Key words human interleukin-6 receptor (hIL-6R), human interleukin-6 (hIL-6), molecular docking, functional domain

肥皂草毒蛋白分离纯化及性质研究

杨元德 周康靖 潘克桢

(中国科学院福建物质结构研究所, 福州 350002)

张蓉真 陈儒明 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福州 350002)

摘要 从肥皂草里分离到三种核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating proteins, RIPs): SO3a、SO3b、SO6。并测定 SO3a、SO3b 的相对分子质量分别约为 22 500、19 400, 等电点都为 8.4 左右。进行了氨基酸组成分析。用激光拉曼光谱初步预测 SO3a 和 SO3b 的二级结构含量。用反相毛细管色谱发现 SO6 含有两个组分, 而 Stripe 等报道 SO6 为单一峰。

关键词 核糖体失活蛋白, 肥皂草毒蛋白, 激光拉曼光谱, 二级结构

学科分类号 Q512.2

核糖体失活蛋白 (RIPs) 是一类作用于真核细胞核糖体, 抑制蛋白质合成的毒素。RIPs 在植物中分布极为广泛。目前已从 50 多种植物中分离到 60 多种不同的 RIPs 或具有 RIPs 活性的粗提物, 除植物外, 主要几种真菌中也发现 RIPs。RIPs 对细胞中蛋白质的生物合成具有强烈的抑制作用, 所以 RIPs 可以用来制造抗病毒制剂^[1]。肥皂草 (*Saponaria officinalis*) 原产于欧洲, 是在我国北方庭院常见的供观赏用的多年生草本植物。Stirpe 等^[2]于 1983 年首次从种子中分离到肥皂草毒蛋白, 是一个单链 RIPs, 不含糖^[3]。肥皂草毒蛋白在植物中含量高, 抑制活性强, 有效组分多, 国内外学者对其进行了多方面的研究, 在分离方法上也不断地改进, 对肥皂草部分组分也进行了晶体培养的尝试^[4,5]。SO3 在肥皂草种子中含量较少, 还没有文献对 SO3 的性质做深入的报道。本实验对 SO3 的两个组分进行了各种物理化学性质的测试, 测定了其氨基酸组成, 并用激光拉曼光谱测定了它们的二

级结构的含量, 用反相色谱发现按前人的方法分离出的 SO6 并不是单一组分。

1 材料与方法

1.1 材料

肥皂草种子购自北京植物园; HPLC 填料: Poros HS, 毛细管反相色谱填料: C-18, ProSpective 产品; Sephacryl S-200, Pharmacia 产品; bis, Fluka 产品; SDS, Serva 产品, 标准蛋白 (牛血清蛋白, 67 000, 卵蛋白, 43 000, 天花粉蛋白, 27 000, 溶菌酶, 14 300), 上海生物化学研究所东风生化试剂厂; 其他试剂均为分析纯。

1.2 氨基酸组分分析

在日本岛津 LC-4A 高效液相色谱仪上进行检测, 对每个峰进行 280 nm 检测。

Tel: (0591) 3712393; E-mail: yyuande@yahoo.com

收稿日期: 1998-11-08, 修回日期: 1999-03-08