

## 2.5 埃分辨率胰岛素晶体结构的研究\*

胰岛素结构研究组

### 提 要

用X射线衍射法测定了猪胰岛素三方二锌晶体结构。所需相角数据是用多对同晶置换加反常散射法计算的。得到了令人满意的2.5 Å分辨率电子密度图,显示出胰岛素分子结构的许多细节。与1969年英国牛津小组发表的结果作了比较,其中A<sub>1</sub>至A<sub>16</sub>的构型及联结胰岛素六聚体的两个锌离子间的距离有显著差别。

### 一、引 言

伟大导师恩格斯在《反杜林论》一书中指出：“生命是蛋白体的存在方式”。现在已知,无论在什么地方,生命总是与蛋白质和核酸这两类基本物质相联系。因此,开展蛋白质与核酸的研究工作具有重大意义。在我们伟大领袖毛主席和党中央的亲切关怀下,我国科学工作者高举毛泽东思想伟大红旗,于1965年9月,在世界上首次用化学方法全合成了具有全部生物活力的蛋白质——结晶牛胰岛素<sup>[1]</sup>。人工合成蛋白质的成功,标志着人类在认识生命、揭开生命奥秘的伟大历程中又迈进了一大步;同时,也有力地推动了我国对蛋白质和核酸的研究。测定胰岛素晶体结构的课题就是在这一基础上提出的。我们希望,胰岛素空间结构的测定,能有助于深入研究它的生物化学性质及其在机体内调节新陈代谢的作用原理。

在毛主席革命路线指引下,在我国无产阶级文化大革命的有力推动下,从1967年夏开始,我们在条件和经验都很不够的情况下,逐步建立了必需的实验与分析技术,制备出几个质量较好的胰岛素重原子衍生物,解决了测定胰岛素晶体结构的关键问题。1970年9月,我们先得到了4 Å分辨率的结果,接着在1971年1月得到了2.5 Å分辨率的结果;经过进一步修正和完善,在中国共产党诞生五十周年的前夕,胜利完成了2.5 Å分辨率的全部研究工作。这是一项社会主义大协作的成果,本工作是在中国科学院物理研究所进行的,参加这项工作的有中国科学院物理研究所、生物物理研究所、上海生物化学研究所和北京大学,先后参加过这项工作的还有中国科学院原计算技术研究所、上海有机化学研究所和华东物质结构研究所。

天然胰岛素的结晶首先是由阿贝尔(J. J. Abel)于1926年获得的<sup>[2]</sup>。英国牛津大学霍奇金(D. C. Hodgkin)教授等从三十年代开始测定胰岛素三方二锌晶体的结构。美国哥伦比亚大学劳(B. W. Low)等对无锌胰岛素正交晶体的结构也进行了多年研究。牛津小组曾于1969年11月初步报道了2.8 Å分辨率的研究结果<sup>[3]</sup>。

\*1971年8月1日收到。

## 二、方 法

### 1. 重原子衍生物的制备

在前期工作中, 我们曾对胰岛素多种晶系的晶体作过一些研究。鉴于三方二锌猪胰岛素晶体容易长大, 也较稳定, 适于制备重原子衍生物, 我们选定它作为结构测定对象。研究用的猪胰岛素制剂是由上海生物化学制药厂、北京大学制药厂和武汉制药厂提供的。

三方二锌晶体所属空间群为  $R\bar{3}$ 。每个  $R$  格子晶胞含六个胰岛素分子和两个锌离子; 每个结晶学不对称单位含两个胰岛素分子。 $H$  格子晶胞参数为  $a_H=82.7 \text{ \AA}$ ;  $c_H=34.0 \text{ \AA}$ 。

同晶置换法<sup>[4]</sup>所需重原子衍生物是我们自己制备的。几年来, 我们曾较为系统地探索过用化学反应的方法制备胰岛素的重原子衍生物, 迄今没有取得成功。我们现在使用的胰岛素重原子衍生物, 是参照希里克儒尔(J. Schlichtkrull) 给出的条件<sup>[5]</sup>, 先获得足够大的单晶后, 用浸泡法制得的。浸泡采用  $0.05M$  醋酸缓冲液。

牛津小组在 1966 年和 1967 年曾报道过他们用浸泡法制备了脱锌加铅胰岛素等重原子衍生物<sup>[6,7]</sup>。我们在开始工作时, 注意到了这些报道。经过一系列实验和分析, 我们发现, 铅离子直接泡入二锌胰岛素晶体所引起衍射强度的变化与脱锌加铅基本上是一样的; 而由于用络合剂 EDTA 脱锌这一步对晶体质量有影响, 所以我们选用直接引进铅离子的胰岛素重原子衍生物(铅-胰岛素)作为分析对象, 确定了它的重原子参数。

伟大领袖毛主席指出: “在生产斗争和科学实验范围内, 人类总是不断发展的, 自然界也总是不断发展的, 永远不会停止在一个水平上。”我们经常学习这一教导, 不断探索新的重原子衍生物。早期的实验表明, 汞离子 ( $Hg^{++}$ ) 对胰岛素晶体作用强烈, 只要极微量(十万分之几克分子浓度), 就足以破坏晶体。这启示我们, 合成一些汞的化合物, 适当减小其被络合能力, 可能是有希望的。事实上, 在测定其它许多蛋白质的晶体结构时, 汞化合物的应用常常很成功。较为系统的研究使我们找到了一个很好的试剂——汞(I)。用汞(I) 浸泡胰岛素晶体得到的衍生物——汞(I)-胰岛素, 分辨率比母体还高, 衍射强度变化大, 晶体质量好, 在我们的结构测定中起了主要作用。

在确定了上述两个重原子衍生物的重原子参数后, 我们发现, 铅-胰岛素中最主要一套重原子的座标与汞(I)-胰岛素中重原子座标之间最小距离只有  $4 \text{ \AA}$  左右。我们考虑, 如果把这两种试剂引入同一晶体, 由于重原子相距较近, 就可能发生相互影响, 打破原来的平衡关系, 产生某些新的衍射特点。据此, 我们设计了一系列实验, 用一个与汞(I) 相似的试剂汞(II), 同铅离子一起引入胰岛素晶体, 获得了汞(II)-铅-胰岛素, 基本上证实了我们原先的设想。三个重原子衍生物的制备条件见表 1。

除上面提到的三个衍生物外, 我们还得到了铀盐胰岛素等十几个重原子衍生物, 它们均因质量较差而未予利用。

计算结果表明, 所用的三个衍生物质量是好的, 这使我们得到了一套令人满意的 2.5

Å分辨率电子密度图。在建立了胰岛素分子的立体结构模型后,可以看出重原子在胰岛素晶体中的络合点是合理的。它们分布在两个区域:一个是在三重轴周围,由B<sub>13</sub>谷氨酸和B<sub>10</sub>组氨酸、B<sub>9</sub>丝氨酸等残基组成的极性空腔;另一个是在六聚体表面,由A<sub>17</sub>谷氨酸、A<sub>4</sub>谷氨酸残基以及B链末端氨基等组成的稍拥挤的空间。两套汞原子的位置,满足非结晶学二重对称,有B<sub>13</sub>谷氨酸羧基氧和B<sub>10</sub>组氨酸咪唑环上的第五位氮参与配位,附近环境也十分理想,足以说明这个衍生物质量的优越。铅原子的分布对非结晶学二重对称有显著偏离,位置均在一些羧基附近。其中最主要的一套在B<sub>13</sub>谷氨酸羧基的另一个氧附近,这可以说明汞与铅之间的竞争络合现象。由于与铅离子络合的某些羧基可能参与晶体中次级键的形成,因此铅离子的进入对晶体结构会有一些影响。实验表明,当铅离子的浸泡浓度进一步提高时,对晶体有些破坏作用。

表1 重原子衍生物制备条件

| 样品名称        | 试剂  |  |
|-------------|---|--|
| 铅-胰岛素       | PbAc <sub>2</sub>   | 10 <sup>-2</sup> M, pH5.65, 三天   |
| 汞(I)-胰岛素    | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> HgCl  | 8 × 10 <sup>-4</sup> M, pH6.38, 两周   |
| 汞(II)-铅-胰岛素 | $\begin{matrix} \text{CH}_3 > \text{CHHgCl} \\ \text{CH}_3 \\ \text{PbAc}_2 \end{matrix}$ | 汞(II)8 × 10 <sup>-4</sup> M, pH6.38 先泡一天;<br>汞(II)8 × 10 <sup>-4</sup> M 与铅 10 <sup>-2</sup> M 混合液, pH5.65, 续泡三天 |

## 2. 衍射强度数据的收集和处理

胰岛素晶体及其重原子衍生物晶体的三维衍射强度数据是在线性衍射仪上,用CuK<sub>α</sub>射线,以c<sub>0</sub>轴为旋转轴,分层收集的。考虑到对c方向三个等效衍射点强度数据取平均值,不仅能减小计数等实验误差,而且对R<sub>3</sub>空间群还能初步校正晶体对X射线的吸收。因此,对母体收了半球数据,对衍生物收了全球数据。2.5 Å分辨率的独立衍射点共计3,062个。反常散射数据取自同一个晶体。收集数据时,每个晶体衍射强度的衰减量控制在15%以下。为了统一和补充,还收集了部分以a<sub>0</sub>轴为旋转轴的数据。

衍射强度数据经过L<sub>p</sub>因子、吸收因子(从实验吸收曲线近似求得)校正,并在对等效衍射点数据取平均后,依据a<sub>0</sub>方向数据对c<sub>0</sub>方向各层数据进行统一,得到母体的结构振幅F<sub>p</sub>。

对于衍生物的衍射数据,在上述处理的基础上,又根据统计原理,采取了“对应层靠拢”措施,使得每一层强度的总和同另一半球对应层强度的总和相等。

实践是检验真理的标准。我们对所用衍生物的hk0反常散射数据(同一层数据,不需统一)进行了考察,结果列于表2。从表2可以看出

$$\frac{\sum_{hk} F^2(hk0)}{\sum_{hk} F^2(\bar{h}\bar{k}0)} \approx 1,$$

而且衍射点数越多越接近于1。因此,采取“对应层靠拢”方法是可行的,这有利于提高反常散射数据的质量。

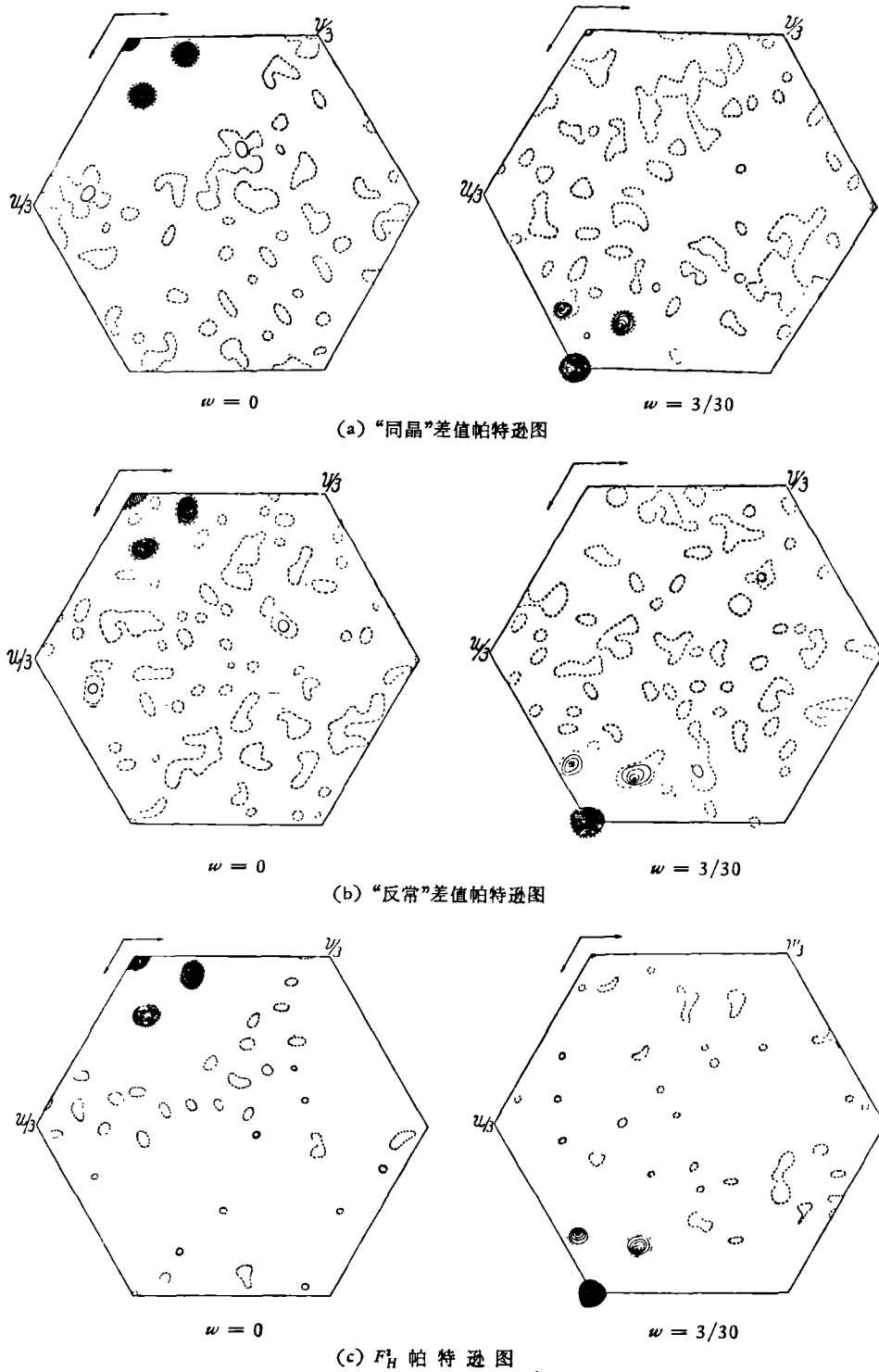


图1 2.5 Å 汞(I)-胰岛素差值帕特逊图

(图中原点峰为 999, 虚线为 10, 轮廓线为 30, 等高线间隔 20; “●”表示峰中心位置)

表 2 各衍生物的  $\sum_{hk} F^2(hk0) / \sum_{hk} F^2(\bar{h}\bar{k}0)$

| 分辨率 \ 衍生物    | 4 Å (65 个衍射点) | 2.5 Å (171 个衍射点) |
|--------------|---------------|------------------|
| 汞 (I)-胰岛素    | 1.041         | 1.004            |
| 铅-胰岛素        | 1.015         | 1.011            |
| 汞 (II)-铅-胰岛素 | 1.032         | 1.016            |

为统一到母体数据的水准, 衍生物数据经母体与衍生物温度因子差值  $B^*$  的校正(即乘以  $e^{-B^* \sin^2 \theta / \lambda^2}$ ,  $B^*$  用威尔逊(Willson)方法求出, 汞 (I)-胰岛素、铅-胰岛素和汞 (II)-铅-胰岛素的  $B^*$  分别为  $2.8 \text{ \AA}^2$ ,  $-1.7 \text{ \AA}^2$  和  $2.5 \text{ \AA}^2$ ), 然后乘以按下式求出的衍生物和母体的比例因子的比值 ( $k_{HP}/k_P$ ), 最后得到衍生物的结构振幅  $F_{HP}$ :

$$\frac{k_{HP}}{k_P} = 2 \frac{\sum_{hkl} F'_{HP} F_P}{\sum_{hkl} F'^2_{HP}} \left\{ 1 - \left[ 1 - \frac{3}{4} \frac{\sum_{hkl} F^2_P \sum_{hkl} F'^2_{HP}}{\left( \sum_{hkl} F_P F'_{HP} \right)^2} \right]^{1/2} \right\},$$

式中  $F'_{HP}$  是未校 ( $k_{HP}/k_P$ ) 的衍生物结构振幅。

### 3. 重原子位置的确定

汞 (I)-胰岛素和铅-胰岛素的重原子位置是通过  $4 \text{ \AA}$  三维差值帕特逊 (Patterson) 图的分析确定的。

分析表明, 汞 (I)-胰岛素晶胞中每个不对称单位的重原子位置只有两个, 占有率较高, 不仅在以  $F^2_H$  (联合同晶和反常强度两种差值计算得到<sup>[6]</sup>) 为系数的帕特逊图中, 而且在系数为  $(F_{HP} - F_P)^2$  的“同晶”差值帕特逊图及系数为  $(F_{(+)} - F_{(-)})^2$  的“反常”差值帕特逊图中, 重原子向量峰都很突出。扩展到  $2.5 \text{ \AA}$  时, 仍然保留这个特点 (图 1)。对于铅-胰岛素, 普通“同晶”差值帕特逊图的背景较高, 给分析工作带来一些困难。反常散射数据的使用在确定重原子位置过程中起了较大的作用, 以  $F^2_H$  为系数算得的帕特逊图容易解释 (图 2), 共得三套重原子位置。

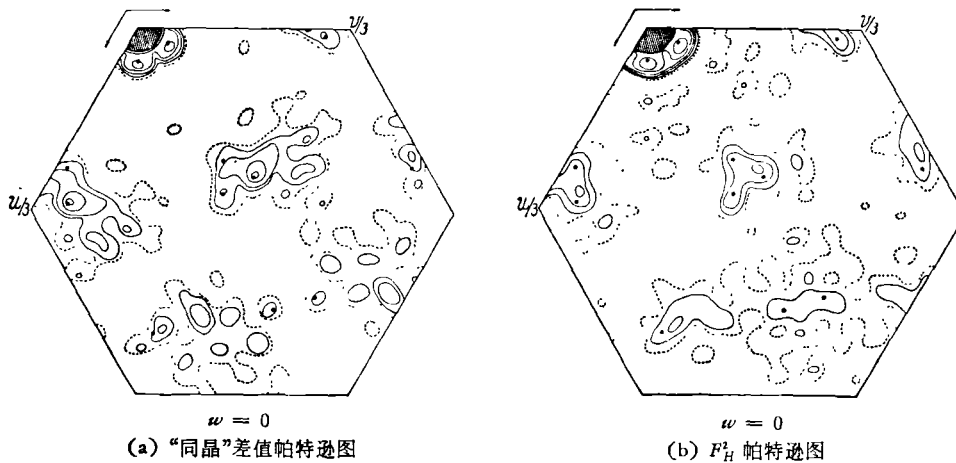


图 2  $4 \text{ \AA}$  铅-胰岛素差值帕特逊图 (说明同图 1)

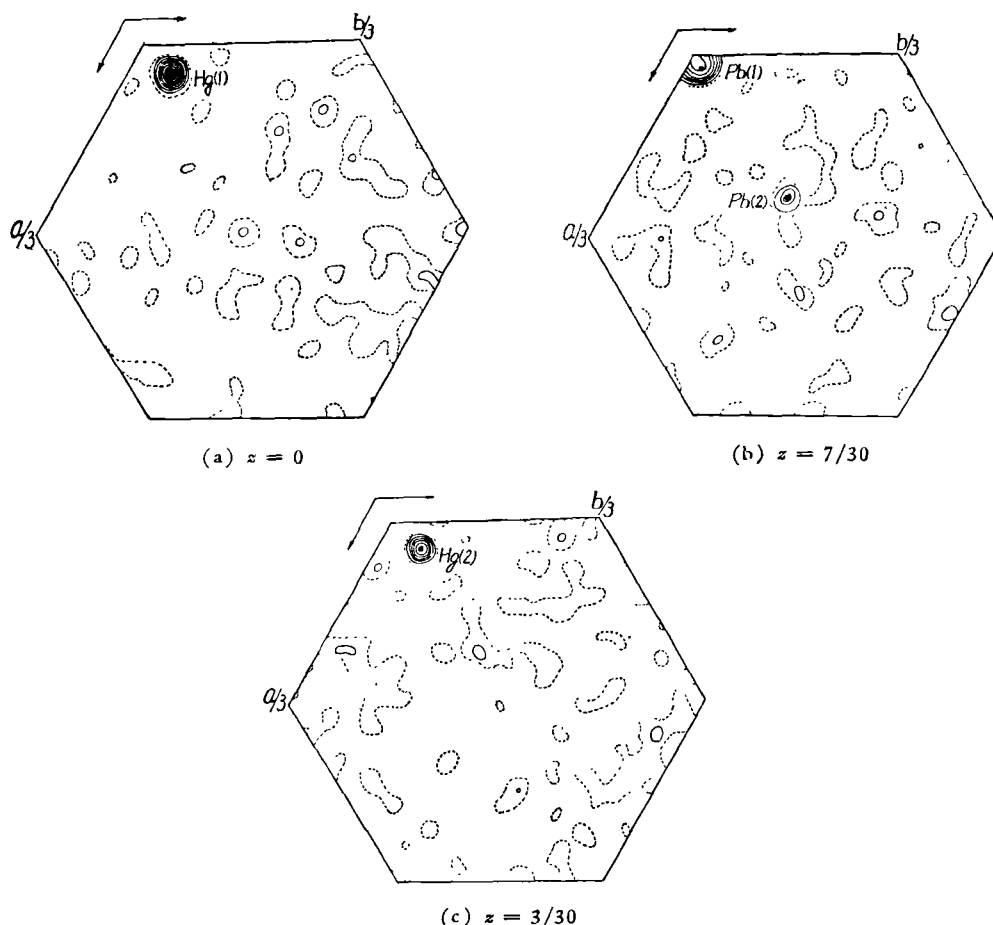


图 3  $4 \text{ \AA}$  汞(II)-铅-胰岛素差值电子密度图(说明同图 1)

利用相关函数和原点函数<sup>[9]</sup>, 确定了以上两个衍生物中重原子分布的绝对构型和重原子坐标原点的相对位置。

汞(II)-铅-胰岛素的重原子位置则是综合分析差值电子密度图(图 3)和差值帕特逊图确定的。

为了检查各个衍生物的重原子“碎片”, 还用  $[F_{\text{HP}} e^{i\alpha_{\text{HP}}} - F_{\text{P}} e^{i\alpha_{\text{P}}}]$  作系数计算了差值电子密度图。式中衍生物结构因子相角初值  $\alpha_{\text{HP}}$  根据已确定的主要重原子参数求出。用这个方法确定了铅-胰岛素重原子“碎片” Pb(4)。

上述各衍生物的重原子参数见表 3。

#### 4. 重原子参数和相角的修正

重原子参数和相角的修正分两个阶段。先以  $F_{\text{H}}$  作为重原子结构振幅的观察值, 用全矩阵最小二乘技术对各衍生物的重原子参数, 即坐标参数  $x_i, y_i, z_i$ , 相对占有率  $N$ , 和各向同性温度因子  $B_i$ , 进行修正。其基本公式为

$$M = \sum_{hkl} W(hkl) [F_H^2 - F_{HC}^2]^2,$$

式中  $F_{HC}$  为不考虑反常散射时重原子结构振幅的计算值, 取权函数  $W(hkl) = 1$ 。全部衍射数据参加修正。

用上述初步修正得到的重原子参数, 再交替进行母体的相角计算和重原子参数(包括下式中的  $K$ ) 的最小二乘修正, 其基本公式是

$$M = \sum_{hkl} W'(hkl) [KF_{HP} - |F_P e^{i\alpha_P} + F'_{HC}|]^2,$$

式中  $F'_{HC}$  是考虑反常散射时重原子结构因子的计算值, 取权函数  $W'(hkl) = m(hkl)$ ,  $m$  是相角的可靠性因子平均值 (Mean figure of merit)。全部衍射点参加修正。交替修正过程中, 母体结构因子的相角用多对同晶置换和反常散射联合概率法<sup>[10]</sup>计算, 取“最佳”相角  $\phi_B$ 。经过三轮循环,  $m$  因子增至 0.855;  $\langle m \rangle$  随  $\sin^2\theta/\lambda^2$  变化情况参看图 4。最后一轮重原子参数及某些误差指标列于表 3 和图 5。从表 3 和图 5 不难看出, 汞 (I)-胰岛素的各项指标均较好。

用上述交替修正得到的  $\phi_B$  计算了“最佳”电子密度图。电子密度图的标准误差  $\sqrt{\langle(\Delta\rho)^2\rangle}$  为 0.21 电子/ $\text{\AA}^3$ 。

以上数据处理等计算工作均在大型通用电子计算机上进行。

表 3 2.5  $\text{\AA}$  分辨率各行生物重原子参数“交替修正”结果及某些误差指标

| 重原子衍生物      | 重原子    | $N$<br>(电子数) | $x$    | $y$    | $z$     | $B$<br>( $\text{\AA}^2$ ) | $R$   | $R'$  | $R_{FH}$ | $E$   | $E'$  |
|-------------|--------|--------------|--------|--------|---------|---------------------------|-------|-------|----------|-------|-------|
| 汞(I)-胰岛素    | Hg(1)  | 45.9         | 0.0527 | 0.0661 | 0.0001  | 19.0                      | 0.072 | 0.193 | 0.336    | 34.38 | 18.31 |
|             | Hg(2)  | 30.1         | 0.0460 | 0.0685 | 0.2394  | 14.9                      |       |       |          |       |       |
| 铅-胰岛素       | Pb (1) | 43.6         | 0.0294 | 0.0285 | 0.0892  | 24.2                      | 0.135 | 0.312 | 0.436    | 64.46 | 22.98 |
|             | Pb (2) | 14.5         | 0.2644 | 0.2831 | 0.0741  | 12.4                      |       |       |          |       |       |
|             | Pb (3) | 7.0          | 0.1608 | 0.3444 | 0.1966  | 34.0                      |       |       |          |       |       |
|             | Pb (4) | 10.2         | 0.0533 | 0.0633 | 0.0095  | 52.6                      |       |       |          |       |       |
| 汞(II)-铅-胰岛素 | Hg(1)  | 50.6         | 0.0530 | 0.0670 | -0.0033 | 18.8                      | 0.105 | 0.222 | 0.391    | 49.51 | 26.53 |
|             | Hg(2)  | 20.0         | 0.0469 | 0.0696 | 0.2385  | 15.2                      |       |       |          |       |       |
|             | Pb (1) | 36.2         | 0.0273 | 0.0253 | 0.0941  | 29.6                      |       |       |          |       |       |
|             | Pb (2) | 13.9         | 0.2649 | 0.2860 | 0.0738  | 17.7                      |       |       |          |       |       |

[注] (1) 偏离因子  $R$ ,  $R'$  和  $R_{FH}$  按下式计算:

$$R = \frac{\sum_{hkl} |KF_{HP} - |F_P e^{i\alpha_P} + F'_{HC}|}{\sum_{hkl} KF_{HP}}, \quad R_{FH} = \frac{\sum_{hkl} |F_H - F_{HC}|}{\sum_{hkl} F_H},$$

$$R' = \frac{\sum_{hkl} ||KF_{HP} e^{i\alpha_{HP}} - F_P e^{i\alpha_P}| - |F'_{HC}|}{\sum_{hkl} |KF_{HP} e^{i\alpha_{HP}} - F_P e^{i\alpha_P}|},$$

式中

$$F_{HC} = \left| \sum_j N_j f_j^0 e^{i2\pi(kx_j + ky_j + lz_j)} e^{-B_j \sin^2\theta/\lambda^2} \right|,$$

$$F'_{HC} = \sum_j N_j (f_j + \Delta f_j) e^{i2\pi(kx_j + ky_j + lz_j)} e^{-B_j \sin^2\theta/\lambda^2}.$$

(2) 同晶置换数据和反常散射数据的标准误差  $E$  和  $E'$  按下式计算:

$$E = \left\{ \frac{\sum_{hkl} [KF_{HP} - |F_P e^{i\alpha_P} + F'_{HC}|]^2}{n} \right\}^{1/2}, \quad E' = \left\{ \frac{\sum_{hkl} [K(F(+)-F(-)) + 2F'_{HC} \sin \nu]^2}{n} \right\}^{1/2},$$

式中

$$F'_{HC} = \left| \sum_j N_j \Delta f'_j e^{i2\pi(kx_j + ky_j + lz_j)} e^{-B_j \sin^2 \theta / \lambda^2} \right|, \quad \sin \nu = \frac{F_P \sin(\alpha_H - \alpha_P)}{|F_P e^{i\alpha_P} + F'_{HC}|},$$

$n$  为衍射点数目。

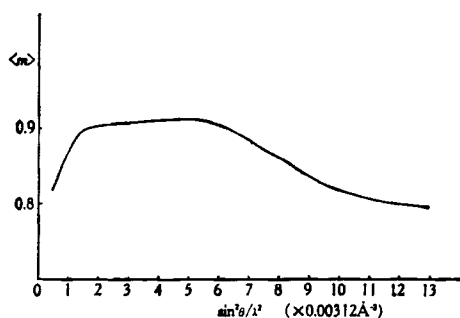


图4  $\langle m \rangle$  随  $\sin^2 \theta / \lambda^2$  变化曲线

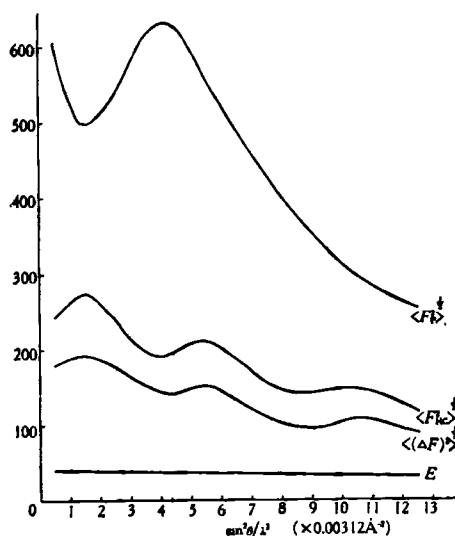


图5 (a) 汞(I)-胰岛素

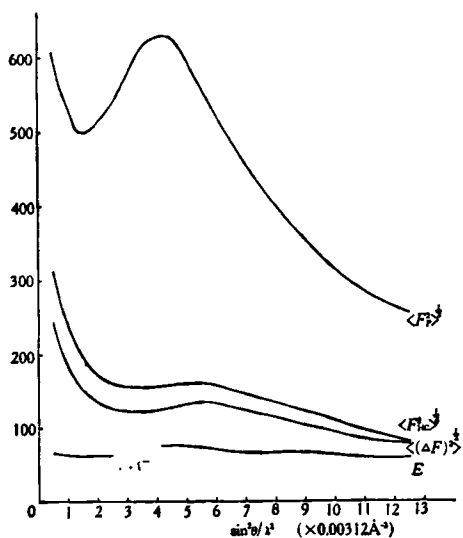


图5 (b) 铅-胰岛素

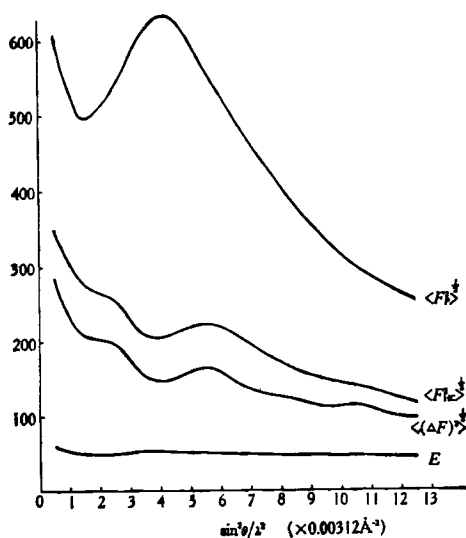


图5 (c) 汞(II)-铅-胰岛素

图5  $\langle F_P \rangle^{\dagger}$ ,  $\langle (\Delta F) \rangle^{\dagger}$ ,  $\langle F'_{HC} \rangle^{\dagger}$  和  $E$  随  $\sin^2 \theta / \lambda^2$  变化曲线



### 三、结 果

#### ——电子密度图及其解释

在进行 2.5 Å 分辨率工作之前,曾算得一套 4 Å 分辨率的电子密度图。对这套图进行综合分析,比较容易地辨认和确定了胰岛素分子在晶体中的配置情况和空间界限。进一步分析,确定了 A, B 两条肽链的基本走向以及胰岛素分子与锌的联结部位。除肽链前部外,这一结果已为 2.5 Å 分辨率的工作所证实。图 6 是根据电子密度图制作的一个不对称单位中两个胰岛素分子的实体模型。

1971 年 1 月,我们用汞(I)-胰岛素和铅-胰岛素 2.5 Å 范围的衍射点,以及汞(II)-铅-胰岛素 4 Å 范围的衍射点,算得一套 2.5 Å 分辨率电子密度图。从这套图确定了胰岛素分子的肽链走向和大多数侧链的空间取向。与牛津小组的结果<sup>[3]</sup>比较,有两个主要差别:一是联结胰岛素分子六聚体的两个锌离子间距离差 2.4 Å;二是 A<sub>12</sub>-A<sub>18</sub> 一段肽链构型及其侧链取向完全不同。此后,我们使用上述三个衍生物 2.5 Å 范围的全部衍射点,同时采取了一些改进措施,又算得一套电子密度图。新图保持了 1 月结果的基本景象,但大多数侧链表现得更清晰,少数原来较差的侧链有较大改进。

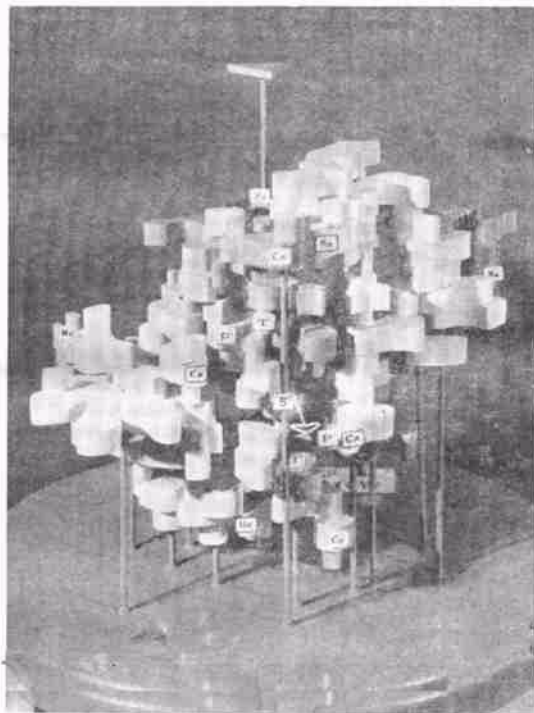


图 6 4 Å 分辨率结构模型

(根据 4 Å 分辨率电子密度图制作,外轮廓线的电子密度值为 0.4 电子/Å<sup>3</sup>, S 为非结晶学二重轴所在位置, N<sub>A</sub>, N<sub>B</sub> 和 C<sub>A</sub>, C<sub>B</sub> 分别表示两个分子 A, B 链的 N 端和 C 端; PT 和 P'T 表示两个分子 B 链后部逆平行区段)

#### 1. 电子密度图

2.5 Å 分辨率电子密度图,垂直于 *c* 方向分成 60 个截面计算,平行于 *a*, *b* 方向的步长为 0.92 Å。将电子密度图以 1 cm = 1 Å 的比例绘制在玻璃板上(外轮廓线取值 0.48 电子/Å<sup>3</sup>, 等密度线间隔取值 0.27 电子/Å<sup>3</sup>),再将这些玻璃板以准确的间距迭合起来,即得三维电子密度图。

在所得到的电子密度图中,三重轴上鲜明地呈现出两个球状峰,它们具有全图最高的

密度值,可以无疑地判定这是两个锌离子。有三团触角状电子密度将每个锌离子与附近的电子密度联结起来,且在其近旁另有三个密度值较低的小峰,显示了锌的配位情况(图7)。

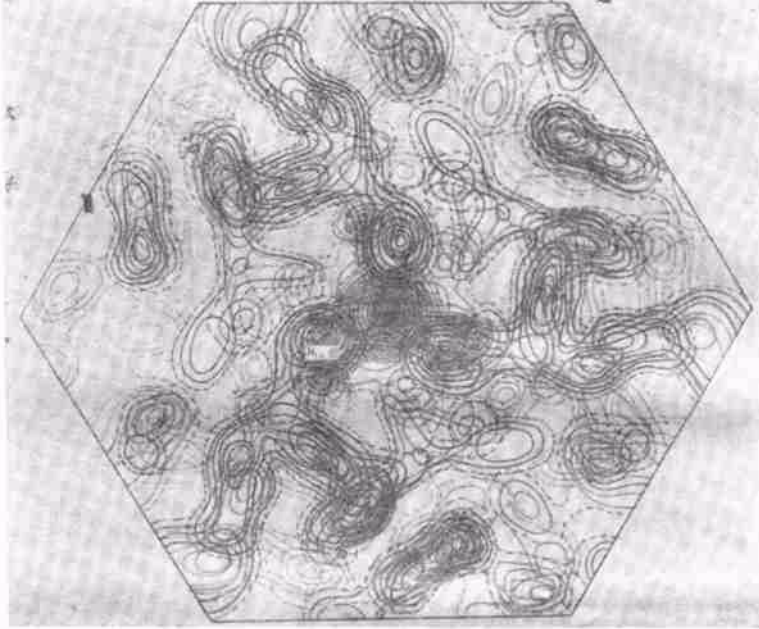


图7 在10—18/60电子密度截面迭合图上表现出来的锌离子的配位情况

连续跟踪高于背景值的电子密度,可以得到A,B链的全部走向。主链区域的电子密度大多在全图的中等值以上。B链中间一段密度呈典型螺旋状扭曲,且峰值较高,中心已经成为空腔(图8)。

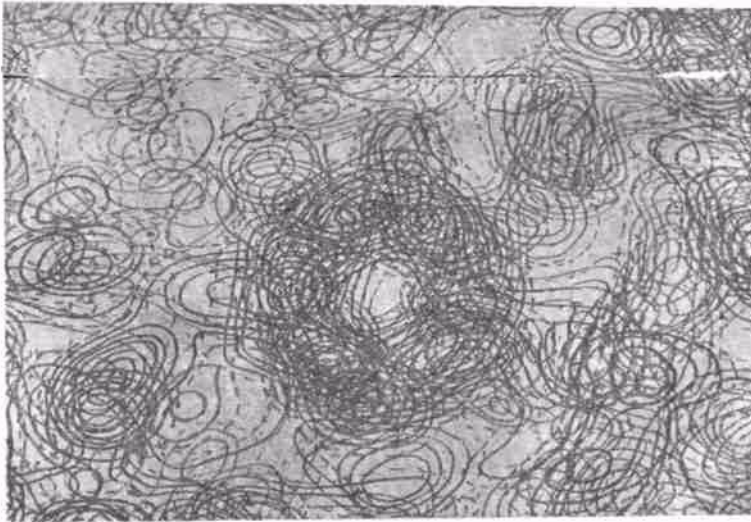


图8 在24—38/60电子密度截面迭合图上,沿螺旋轴方向所看到的 $\alpha$ 螺旋景象

在主链的电子密度跟踪中,有几处电子密度粘连,它给辨认带来一些困难,但经分析可以将疑义排除。



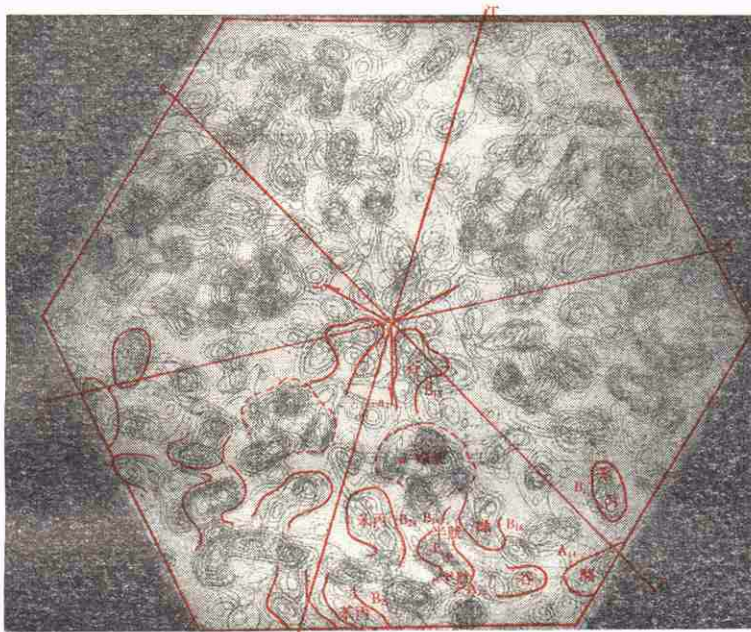


图 9 22—32/60 电子密度截面迭合图  
(图上不仅表现出三重对称性,而且可以看到以 S 和 T 轴相关联的明显的二重对称性)

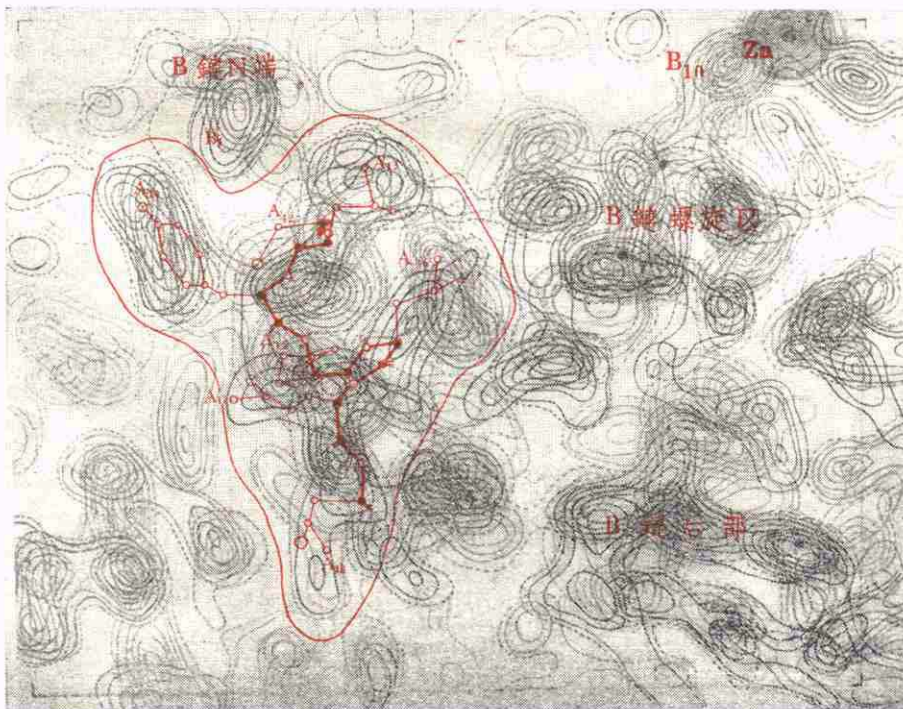


图 10 相应于 A<sub>1</sub>—A<sub>14</sub> 的电子密度截面(12—26/60)迭合图及氨基酸残基的排布

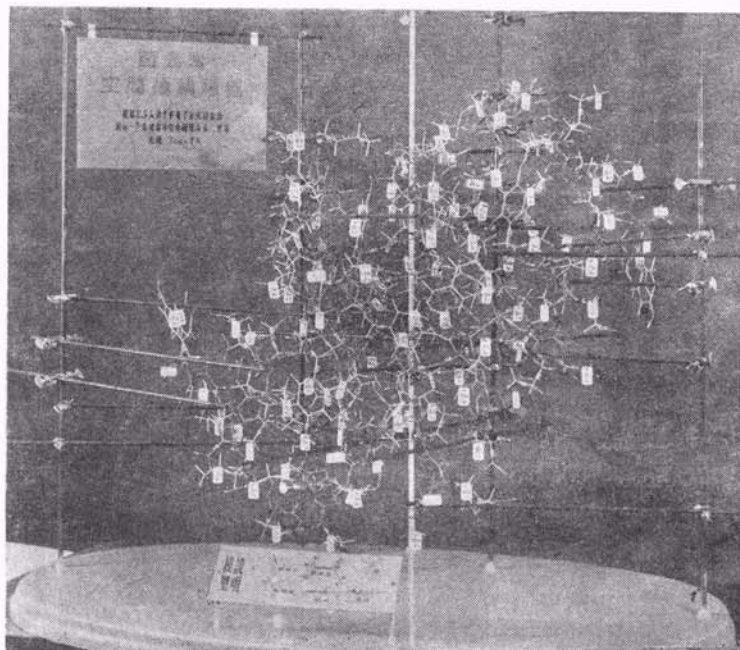


图 11 结晶胰岛素空间结构模型

(根据 2.5 Å 分辨率电子密度图制作,表示一个不对称单位中的胰岛素二聚体。  
照片是顺非结晶学二重轴拍的,β折迭层和两个 B<sub>2</sub> 苯丙氨酸残基在中央)

侧链的辨认比主链复杂,但参照猪胰岛素分子的一级结构<sup>[11]</sup>辨认并不困难。在电子密度图中,全部侧链均有表现,大多数形状和密度表现较好,特别是带芳香环的侧链和三对二硫键表现典型。仅有个别侧链如 B<sub>6</sub> 亮氨酸、B<sub>21</sub> 谷氨酸等取向难于确定。电子密度图的部分实际景象可以从图 9,以及图 7、8 和 10 中看到。

经过分析,初步确定了主链和侧链各主要原子或基团的空间位置。图 11 是在此基础上制作的一个胰岛素二聚体原子模型。

## 2. 胰岛素分子

在一个不对称单位中,从电子密度图容易区分和辨认两个胰岛素分子。在晶体中, B 链靠近三重轴。B<sub>9</sub>—B<sub>19</sub> 呈右手螺旋构型,联结 A, B 链的两个二硫键正好在它的两端。在这一区域里,只有中部大约二圈是标准的 α 螺旋。这段螺旋构成一坚实的骨架,是使这一条较长肽链稳定的基本因素之一。B<sub>1</sub>—B<sub>6</sub> 较舒张,与牛津小组报导的情况虽大体相似,但并不相同,某些侧链的取向似乎相反。在 B<sub>8</sub> 甘氨酸处,肽链呈现一个大的转折,并进入螺旋。不同种属来源的胰岛素 B<sub>8</sub> 甘氨酸均不改变,可以从它对转折形成这段螺旋的意义得到合理解释。B<sub>20</sub>—B<sub>23</sub> 肽链呈 U 形转弯,其中一个分子 B<sub>22</sub>—B<sub>23</sub> 一段与牛津小组结果似有不同,在我们的电子密度图中可以清楚看到 B<sub>22</sub> 精氨酸侧链与 A 链末端羧基有紧密接触。B<sub>24</sub>—B<sub>27</sub> 为一舒张肽段, B<sub>24</sub>, B<sub>25</sub> 和 B<sub>26</sub> 的芳香环都集中分布在这里。B<sub>26</sub> 酪氨酸残基处于



分子内部,似被嵌于一个疏水区里。 $B_{16}$  酪氨酸苯环处于分子内侧,但羟基伸出于分子外,并与另一分子  $B_{26}$  酪氨酸残基和  $B_8$  主链靠近,它较  $B_{26}$  能更多地接触溶剂。 $B_{28}$  脯氨酸环在电子密度图上表现十分清楚,辨认不疑。但  $B_{29}$ — $B_{30}$  一段肽链走向确定较为困难,在电子密度图上可以有两种分析,图 12 给出的是其中之一,它可以使结构模型与电子密度有较好的吻合,但不足的是,由此造成相邻六聚体两个分子 B 链末端在空间上紧密接触,同时使这两个末端羧基和  $A_4$  的羧基彼此靠近,从能量最小原则看,似不甚合理。另一可能是  $B_{30}$  占据  $B_{29}$  侧链所在位置,而将  $B_{30}$  的密度取作  $B_{29}$  侧链,这种排布与电子密度图的吻合情况似不如前,但由此使  $B_{29}$  赖氨酸侧链与  $A_4$  谷氨酸残基接近,可能形成盐键,同时两个 B 链末端错开,这在空间上和能量上均较合理。最后的确定尚待进一步的工作。

A 链较 B 链远离三重轴,它被 B 链从三个方面包围起来,因而较少参与分子间的相互作用。A 链自身是一个卷缩和致密的单位,  $A_1$  处于分子表面,它已为不同大小试剂的取代反应所证实<sup>[12]</sup>,但其周围空间较拥挤,较大基团的取代可能由于破坏其空间构型而导致生物活力下降。 $A_2$ — $A_8$  肽链比较舒张,呈一松散螺旋景象。 $A_6$ — $A_{11}$  二硫键埋藏于分子内部,  $A_8$ — $A_{10}$  小环朝三重轴斜向伸出分子表面。前面已经提到,  $A_{12}$ — $A_{18}$  一段与牛津小组报导明显不同。在我们的电子密度图中,自  $A_{12}$  后肽链扭曲厉害,由于  $A_6$ — $A_{11}$  二硫键辨认不疑,  $A_{14}$  酪氨酸芳香环表现典型,引人注目地伸出在分子表面,而且与以  $T$  轴相关联的对应分子中表现同样典型的  $A_{14}$  酪氨酸残基紧密接触,使我们在确定这一段肽链走向和侧链排布时,没有遇到多大困难。 $A_{12}$ — $A_{18}$  整段看来呈一非标准的右手螺旋构型,图 10 给出了这一段的电子密度截面迭合图及氨基酸残基排布情况。 $A_{19}$  酪氨酸侧链,在一个分子中与  $A_1$  靠近,似以某种方式形成氢键,在另一分子中似乎与  $A_3$  谷氨酰胺的羰基更靠近。 $A_{19}$  酪氨酸苯环处于半暴露状态。

图 12 用投影的方法,给出了不对称单位中两个胰岛素分子的肽链构型和氨基酸残基的空间位置。

在维持分子构型的作用力中,最主要的是两对—S—S—键,通过它们, A, B 两链被牢固地联结在一起。联结  $A_7$ — $B_7$  的二硫键位于分子的表面,而联结  $A_{20}$ — $B_{19}$  的二硫键位于分子内靠近表面的地方。

分子内部为非极性侧链所充满,形成一个疏水核。参与疏水核形成的残基有  $A_{16}$ ,  $B_{11}$ ,  $B_{15}$  亮氨酸,  $B_{24}$  苯丙氨酸以及  $A_2$  异亮氨酸。 $B_{18}$  缬氨酸、 $A_{13}$  亮氨酸和  $B_{14}$  丙氨酸也部分参与了它的形成。这一疏水核的存在,对稳定分子构型有重要作用。

$B_{22}$  精氨酸的胍基与  $A_{21}$  末端羧基有离子键形成,这对稳定 B 链后部构型可能起重要作用;同时,它位于  $A_{20}$ — $B_{19}$  二硫键的外侧,大概也对其有保护作用,从而对整个分子构型的稳定有重要意义。

氢键作用在电子密度图上并不能直接看到,但从电子密度图的分析可以确定它们的存在。分子内似有大量氢键,除上面已谈到的外,  $A_{13}$ — $A_{18}$  似乎有链内氢键形成,而  $B_4$ — $B_7$  与  $A_8$ — $A_{11}$  间有可能形成链间氢键。鉴于我们模型修正工作尚在进行,更详细的结果可望在以后得到。

分子的全部极性侧链分布在分子表面,除参与维持构型的侧链如  $B_{22}$  等外,它们分布在两个比较集中的区域:第一个由  $B_3$  组氨酸、 $B_9$  丝氨酸、 $B_{10}$  组氨酸和  $B_{13}$  谷氨酸等残基

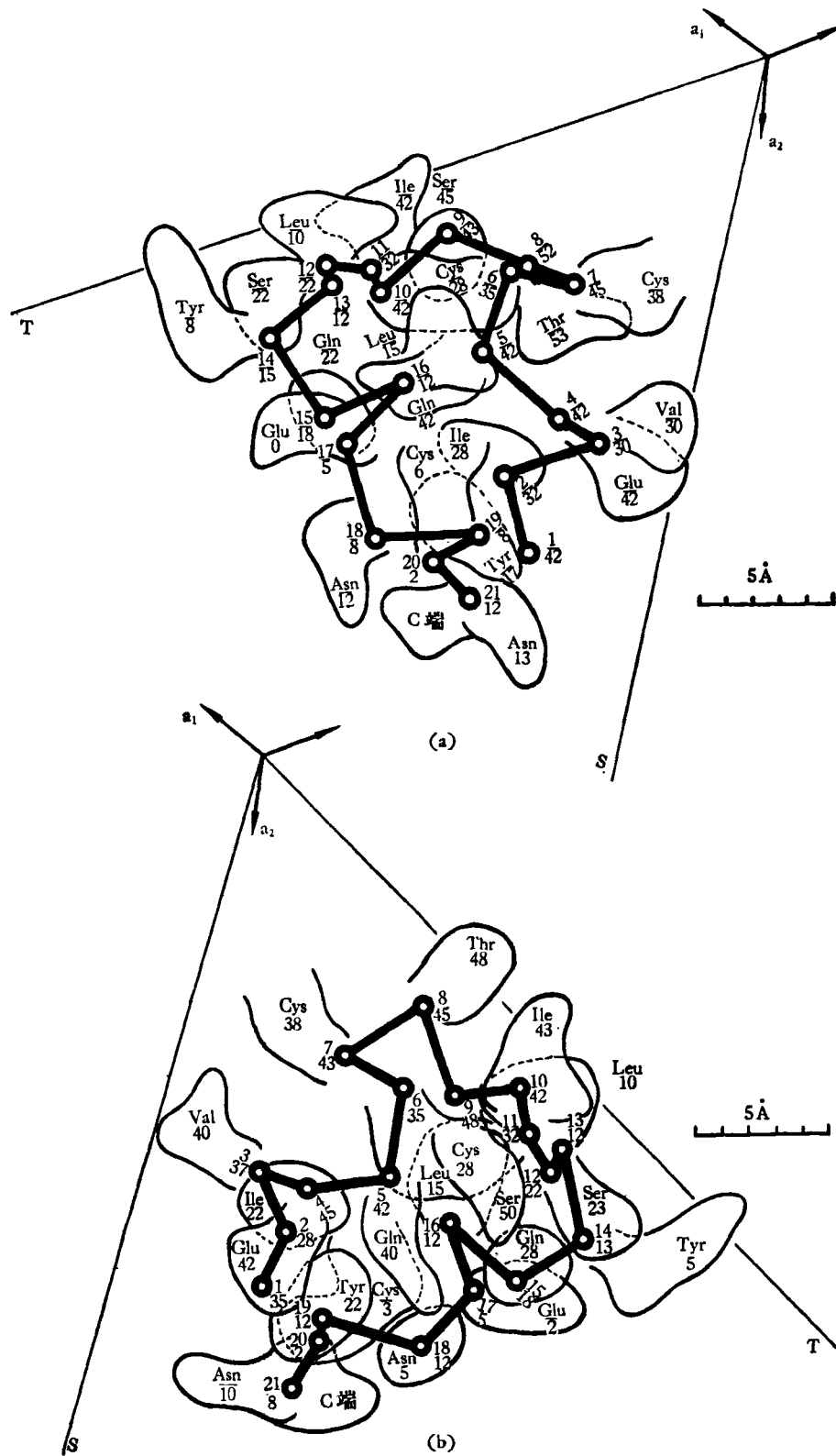
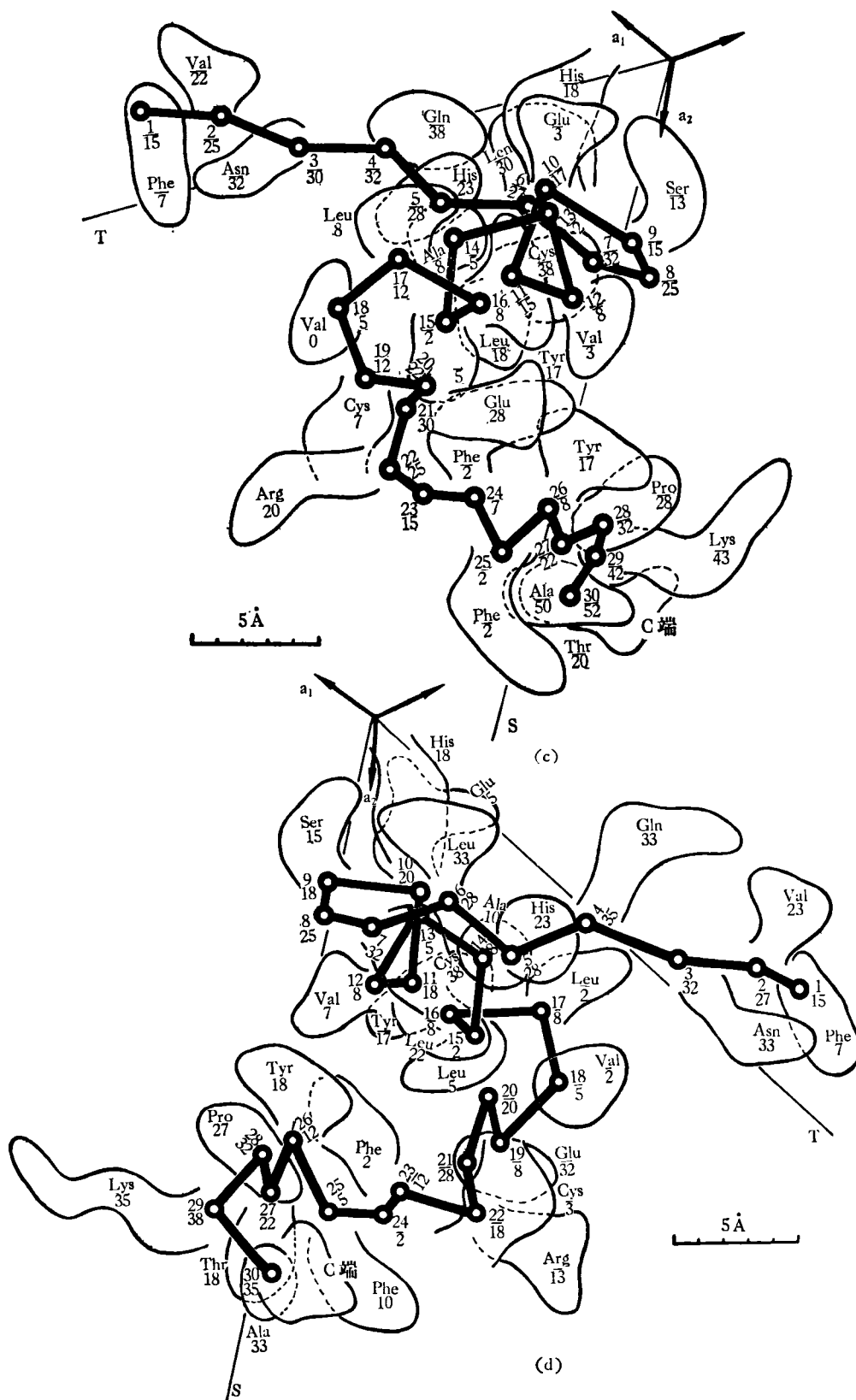


图12 胰岛素分子氨基

【图中给出了二聚体两个分子的 $\alpha$ 碳和侧链沿三重轴的投影,残基下面是它的百分高度(以侧链情况,(c)和(d)表示两



酸残基的空间分布

的中心位置为准);  $\alpha$  碳原子的百分高度标在其序号的下边。(a) 和 (b) 表示两个分子 A 链的情况  
个分子 B 链的情况]

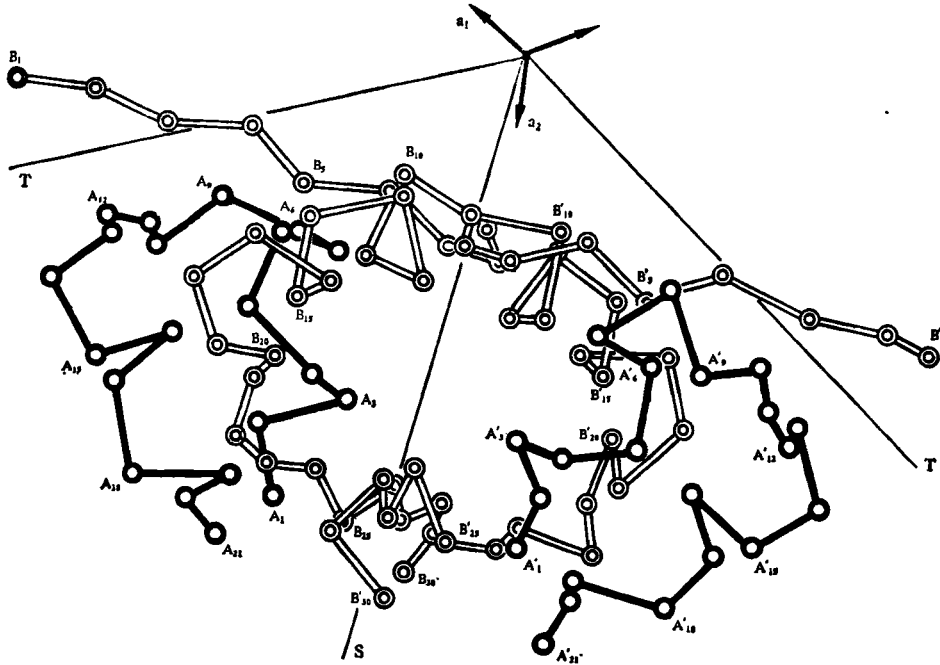


图 13 胰岛素二聚体沿三重轴的投影

(图中给出了 $\alpha$ 碳原子和肽链骨架。黑线表示A链,中空线表示B链,A,B和A',B'分别表示二聚体中两个分子的A链和B链)

组成,位于三重轴附近;第二个区域包括A<sub>8</sub> 苏氨酸、A<sub>9</sub>、A<sub>12</sub> 丝氨酸、A<sub>4</sub>、A<sub>17</sub> 谷氨酸、A<sub>15</sub> 谷氨酰胺、A<sub>14</sub>、A<sub>19</sub> 酪氨酸以及B链N端氨基和B<sub>3</sub> 门冬酰胺等残基,它们分布在从A链小环到B链N端的广大范围中。极性基团的这种分布,可能与胰岛素的免疫学和生物化学性质有关。

### 3. 二 聚 体

围绕两个锌离子的六个胰岛素分子两两彼此靠拢,并有次级键相联结,形成三个集合单位——二聚体。图 13 是二聚体两个分子主链沿三重轴的投影。

组成二聚体的两个胰岛素分子彼此非常相似,但并无严格的结晶学等同性。它们被一非结晶学二重轴  $S$  关联起来,该二重轴通过联结二聚体的两个锌离子间的中心位置,垂直于三重轴。

二聚体结构一个最有趣的特征是,每个分子的B<sub>11</sub>、B<sub>15</sub> 亮氨酸、B<sub>12</sub> 缬氨酸和B<sub>24</sub>、B<sub>26</sub> 芳香环组成一个非极性表面;在形成二体时,围绕  $S$  轴两个非极性表面彼此靠拢,形成一个相对紧密堆集的疏水区延伸穿过二体。这些分子间非极性侧链的相互作用,是二聚体形成与稳定的重要因素之一。

二聚体结构另一显著特征是,两个分子B<sub>23</sub>—B<sub>27</sub> 一段以分子间氢键形成一个逆平行 $\beta$ 折迭层,从模型建造确定这里有四对氢键,非结晶学二重轴正好通过这一区域。这是二



体形成的另一重要作用力。

二聚体内这种牢固的结合方式与二聚体在溶液中具有足够的稳定性这一事实是吻合的。

#### 4. 六聚体

三个二聚体被三重轴上两个锌离子联结在一起,组成六聚体。整个六聚体似一直径 50 Å 高 30 Å 的扁平球(图 14)。

联结六聚体的两个锌离子间的距离为 15.4 Å,它们在六聚体形成中起主要作用。分析将胰岛素分子与锌离子联结起来的电子密度图的实际景象,并联系分子的肽链走向,可以判定这是 B 链第十位的组氨酸残基,直接参与配位的为咪唑环上第三位氮。图 7 是在电子密度截面迭合图上所显示出的锌的配位情况。

在六聚体内的三个二体之间存在一些次级键,其中分属不同二聚体两个分子的 B 链末端氨基与 A<sub>17</sub> 谷氨酸的羧基靠近,形成盐键;两个 A<sub>14</sub> 酪氨酸残基靠近,形成氢键。它们对六体的稳定也起一定作用。

胰岛素的作用原理,至今仍不清楚。为解决这个问题,曾有过不少的实验工作和假设,也曾有人提出过几个模型,但都没有为大家满意地接受。2.5 Å 分辨率的晶体结构已经较精细地显示了胰岛素分子的空间结构情况,这就有可能在分子空间结构的基础上阐明一些胰岛素已知的生物化学性质,进而提供研究胰岛素生物活性及免疫性本质的线索。

晶体结构显示出,带有芳香环的 B<sub>24</sub>—B<sub>26</sub> 与其周围 A<sub>1</sub>—A<sub>3</sub>, B<sub>11</sub>, B<sub>12</sub>, B<sub>15</sub> 侧链构成一个穿过二聚体的非极性平面,它们处于单分子表面,形成二聚体时彼此靠拢在二体内构成一个疏水核。由于 A<sub>7</sub>—B<sub>7</sub> 和 A<sub>20</sub>—B<sub>19</sub> 二硫键位于其上下两端,同时 A<sub>21</sub> 末端羧基与 B<sub>22</sub> 精氨酸胍基呈强离子键结合,加之 A<sub>19</sub> 与 A<sub>1</sub> 的氢键作用,从而在空间上维持了该区域的特定构型。由于该区域

包含了许多生化研究所表明与胰岛素活力有关的主要氨基酸残基,我们推测,它可能是胰岛素活力部位之一。一些实验表明,胰岛素的作用可能是影响膜的通透性<sup>[13]</sup>,从而加速葡萄糖等物质的传输;合成工作指出<sup>[14]</sup>,A<sub>2</sub> 异亮氨酸为亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸取代均使活力丢失,而异亮氨酸为缬氨酸替代,则不出现这种情况,A<sub>3</sub> 缬氨酸改为亮氨

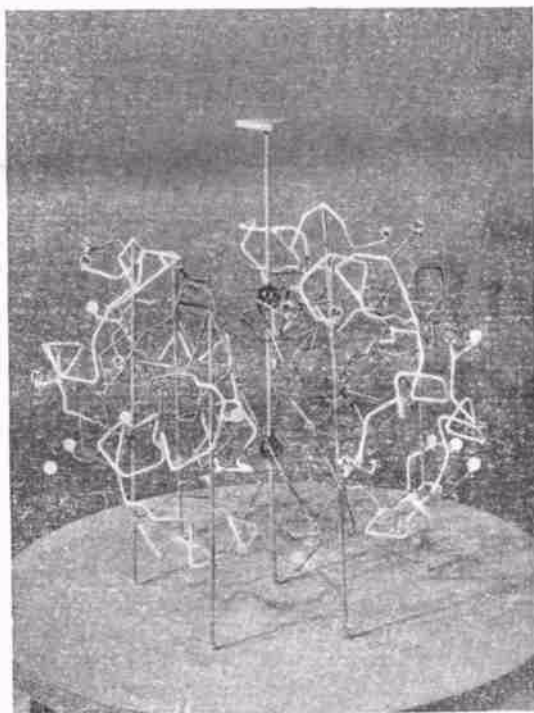


图 14 胰岛素六聚体肽链骨架模型  
(一个二聚体的  $\beta$  折迭层正好在图的中央,两个黑球表示锌离子)

酸、异亮氨酸替代时也表现类似情况,表明该区域构型有一定的几何要求,也表明其作用可能更多地表现为一定的几何嵌合作用。这与该区域的憎水性及膜的脂性是密切相关的。早期曾有不少人设想通过  $A_6-A_{11}$  二硫键与受体的硫-硫交换实现其生物活力。晶体结构清楚地显示出  $A_6-A_{11}$  二硫键处于分子内部,因此这类假说从晶体结构角度看显然是不合理的。

胰岛素分子还具有轻微糜蛋白酶活力<sup>[15]</sup>,并能通过去磷酸化激活数个酶<sup>[16]</sup>。在晶体结构中,一个十分有趣的区域是  $B_5, B_{10}$  组氨酸残基、 $B_{13}$  谷氨酸残基和  $B_9$  丝氨酸残基所形成的一个与某些蛋白水解酶活力中心相似的结构。这一空间构型,可能与胰岛素上述性质有关,这也与  $B_9$  组氨酸和部分羧基对表现胰岛素完整活力是必需的这一事实吻合。

我们准备进一步提高分辨率,以便看到更多的结构细节,同时结合化学合成开展一些结构与功能的研究。我们相信,有关胰岛素结构的研究,胰岛素结构与功能的生物化学研究,以及胰岛素受体的生物学研究,共同携起手来,胰岛素的作用原理可望在不远的将来得到解决。

[后记] 本文投稿以后,看到了牛津小组发表的经进一步修正后的结果<sup>[17]</sup>。在这篇报道里,他们修改了对  $A_{11}-A_{12}$  的原有分析,结果与本文报道的大体一致。

### 参 考 资 料

- [1] 龚岳亭等 科学通报, **11** (1965) 941; 中国科学, **14**, 1710.
- [2] J. J. Abel, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **12** (1926), 132.
- [3] M. J. Adams et al., *Nature*, **224** (1969), 491.
- [4] D. W. Green et al., *Proc. Roy. Soc.*, **A255** (1954), 287.
- [5] J. Sshlichtkrull, *Insulin Crystals*, 1958.
- [6] D. C. Hodgkin et al., *Amer. J. Med.*, **40** (1966), 667.
- [7] M. J. Adams et al., in *Conformation of Biopolymers*, 1967.
- [8] A. K. Singh et al., *Acta Cryst.*, **21** (1966), 279.
- [9] G. Kartha, *Acta Cryst.*, **18** (1965), 749.
- [10] D. M. Blow et al., *Acta Cryst.*, **12** (1959), 794; R. E. Dickerson et al., *Acta Cryst.*, **14** (1961), 1188.
- [11] A. P. Ryle et al., *Biochem. J.*, **60** (1955), 541.
- [12] R. Levine et al., *Recent Progr. Hormone. Res.*, **11** (1955), 343; R. Levine et al., in *On The Nature and Treatment of Diabetes*, 1965.
- [13] V. U. Weber et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348** (1967), 1715.
- [14] P. Reiser, *Amer. J. Med.*, **40** (1966), 759.
- [15] P. J. Randle, in *The Hormones* **11** (1964).
- [16] J. F. Blundell et al., *Nature*, **231** (1971), 506.