

B9(Ser→Asp)人胰岛素突变体 0.20 nm 分辨率晶体结构研究 ——一种速效胰岛素的结构特征*

刘新奇^① 曾宗浩^① 张 英^① Jan Markussen^② 王大成^{①**}

(^①中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ^② Novo Nodisk A/S, Novo Alle 1, Denmark)

摘要 报道了运用 X 射线分析技术, 在 0.20 nm 分辨率测定了 B9(Ser→Asp)的正交晶型的晶体结构. 精化后的模型显示, B9(Ser→Asp)二聚体的分子骨架与天然胰岛素基本相同, 但局部构象有差别, 特别在 B9Asp 突变位点附近的侧链构象有较大变化, 残基 B9, B13, D9, D13 的 4 个羧基互相排斥, 使二聚体内分子间界面上的空间和电荷互补性都遭到严重破坏, 从而造成在生理条件下胰岛素二聚体的不稳定, 及其在生理条件下的强烈单体化趋向. 这些变化构成了 B9(Ser→Asp)的速效性的主要结构基础. 另外, B 链 N 端肽段呈开放状态, 可能代表低聚或单体状态下胰岛素的一种新构象状态.

关键词 速效胰岛素 晶体结构 X 射线分析

胰岛素是一种重要的蛋白质激素. 很多实验证实, 胰岛素分子具有复杂的自聚合特性, 在不同的 pH, 离子强度和蛋白浓度下, 可以单体、二聚体、六聚体等状态存在. 皮下注射的胰岛素制剂, 开始是以六聚体形式存在的. 进入体内后, 六聚体先解聚成二体, 然后二体解聚成单体, 以单体形式发挥生物学活性^[1]. 实验证明, 胰岛素的解聚过程是限制胰岛素吸收速度的关键步骤. 运用蛋白质工程途径, 使注射胰岛素主要以单体形式存在, 或使其从六体解聚为单体的过程缩短, 即可制备速效胰岛素^[2,3]. 因此, 研究形成胰岛素不同聚合状态的调控因素, 以及各类聚合体的准确结构特征, 十分重要.

影响胰岛素聚合的主要是那些处于分子间相互作用界面上的残基, 包括 B8, B9, B12, B13, B16, B23-28 等. B9(Ser→Asp)人胰岛素突变体是一种具有速效性的 DNA 重组产品. B9 位的修饰研究最多, 因为它既处于二聚体分子的界面上, 又对生物活力没有关键影响. 在天然胰岛素中, B9 是中性氨基酸 Ser, Brange 等人将它替换成酸性氨基酸 Asp, 使其产生速效效应^[4]. 试验证明, 在中性条件下, 重组突变体 B9(Ser→Asp)人胰岛素(以下简称 B9D HI)在体内的吸收速度比天然胰岛素快 3 倍, 并保持了 79% 的体内(MBGA)活力^[4], 是一种很有前途的速效胰岛素制剂. 同时, 这是首次报道胰岛素独立二聚体的正交晶体结构.

1999-02-10 收稿, 1999-06-14 收修改稿

* 国家“八六三”高技术研究计划和国家攀登计划 A(95-Yu-34)资助项目

** 联系人

1 材料与方法

1.1 样品和结晶

B9D HI 突变体为通过蛋白质工程途径制备的 DNA 重组产品,由丹麦 NOVO 研究所提供^[4]. 晶体生长采用微量过饱和静置法,是在含柠檬酸、氯化镉、丙酮、二甲基甲酰胺的的结晶母液中培养的,溶液的 pH 值为 4.3. 晶体属正交晶系,空间群 $P2_12_12_1$,每一不对称单位中含两个分子. 晶胞参数为 $a = 4.522$ nm, $b = 4.681$ nm, $c = 5.164$ nm. 但是,在中性条件下,不能获得结晶;即使在 Zn^{2+} 和酚基存在下,也极难获得含六聚体的三方晶体.

1.2 衍射数据收集和处理

晶体衍射数据是在室温下(20℃)在 SIEMENS X-200 型面探测器上收集的. 运用 XENGEN 软件包^[5]处理数据. 总计观测到 24 744 个衍射点,合并后的独立衍射点为 10 384 个, $R_{merge} = 5.73\%$,数据完整度为 97.39%.

1.3 结构解析和修正

结构运用分子置换法解析,并用分子动力学模拟退火制约修正加以精化. 采用天然三方二锌猪胰岛素(PDB 数据库,4ins)^[6]的二聚体作为初始模型,去掉柔性较大的 B1-B4 肽段,用 CCP4 的 AMoRe 软件作分子置换. 由旋转函数和平移函数的结果得到初始模型,然后运用 Xplor 程序进行修正. 修正结果总结如表 1.

表 1 结构修正结果

分辨率	1.0~0.20 nm, 2.0 σ 截段
晶体学 R 因子	0.1675
自由 R 因子	0.207 4
参加结构修正的独立衍射点数	6 927
非氢原子数	978
蛋白质	814
水	164
立体化学参数	
键长均方偏差/nm	0.0009
键角均方偏差/(°)	1.371
二面角均方偏差/(°)	25.34
不当挠角/(°)	0.700
平均 B 因子/nm ²	0.253 8
蛋白质	0.225 8
水	0.392 7

2 结果

2.1 所获结构模型的质量

结构修正的最后晶体学 R 因子为 16.75%;用随机选取的 10%的数据计算的自由 R 因子值为 20.74%. 根据 Luzzati 统计估算出模型原子位置的平均偏差为 0.02 nm. 用 PROCHECK 程序作主链二面角分析,有 95.3%的残基落在 Ramachandran 构象图的最适区,4.7%的残基落在允许区. 电子密度图清晰可靠. 在 $2Fo-Fc$ 图上,两个分子的 B9Asp 密度都表现良好(图 1).

这些指标显示,所获结构模型的精度和立体化学合理性都很高。

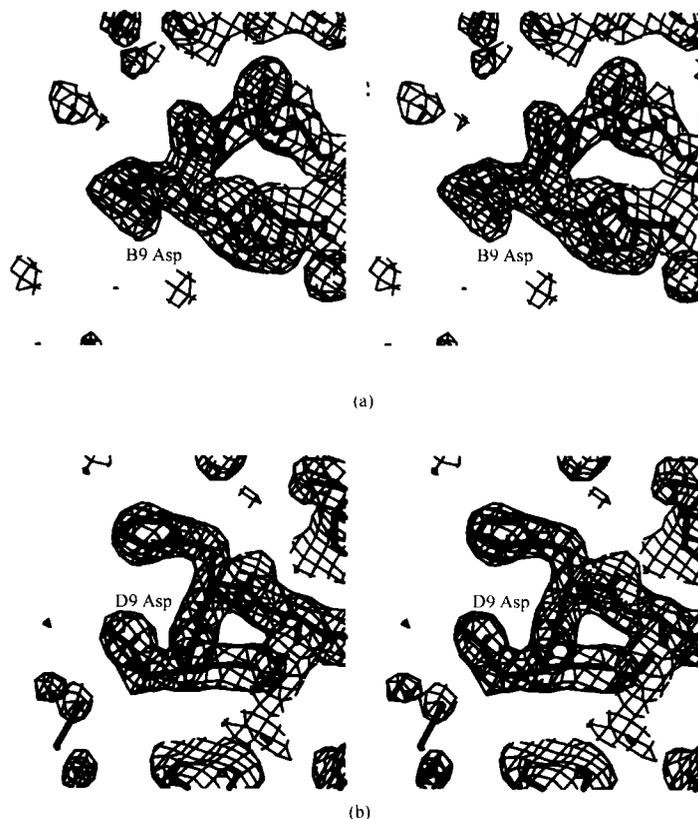


图 1 B9Asp 的 $(2F_o - F_c)$ 电子密度图(轮廓线密度为 1σ)

2.2 晶胞中的堆积

与天然胰岛素在三方二锌晶体中以六聚体堆积的方式不同,B9D HI 在正交晶胞中以二聚体作为基本单位堆积(图 2). B9D HI 二聚体在正交晶胞中的堆积有两个特点:第一,独立二聚体内的两个 B9D HI 分子(分别称为分子 1 和分子 2)在整个晶体中是交错排列的. 因此,与分子 1 相邻的全部是分子 2;反之亦然,与分子 2 相邻的全部是分子 1. 第二,B9D HI 二聚体间相互接触的部位主要由相邻单体的界面组成,在图 2 中标示为 L 和 M. 在 L 界面包含残基 A10-A17,B2-B4, B6, B10, B14, B17-B18;在 M 界面上的残基有 A1, A4-A5, A15, A18-A21, B25, B29-B30. 这种堆积方式是胰岛素正交晶体所特有的。

2.3 B9D HI 二聚体的结构特征

在正交晶体中,B9D HI 以独立二聚体的形式存在,没有进一步的聚合. 这是首次在晶体中观察到独立的胰岛素二聚体. 与六聚状态中的天然胰岛素二聚体比较(见图 3),其主要构象差异出现在 B 链 N 端. 除去末端残基 B1-B4 和 B29-B30,两者之间主链的 r. m. s. 偏差为 0.141 nm,侧链的 r. m. s. 偏差为 0.214 nm.

作为独立的聚合体,与 2Zn 胰岛素六体中的二聚体比较起来,B9D HI 二聚体具有以下特征:

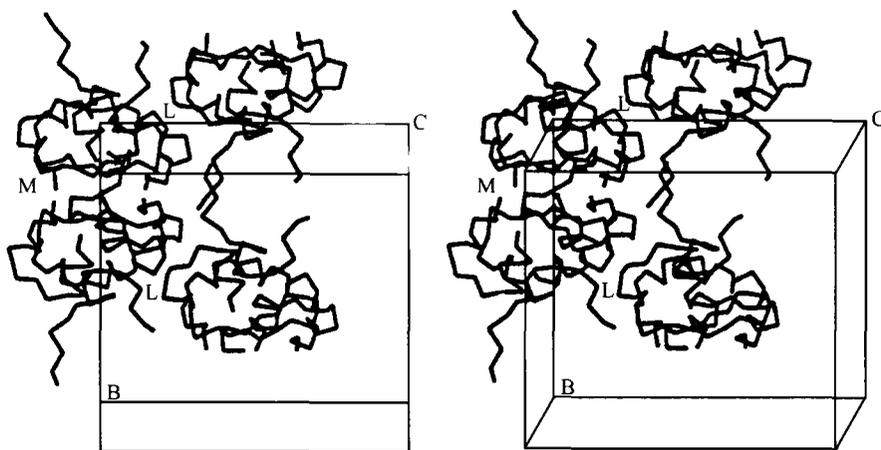
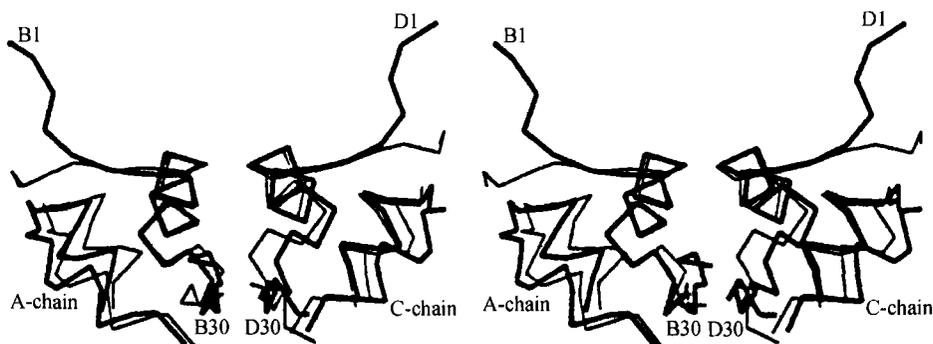


图 2 B9D HI 二聚体在正交晶胞中的堆积

图 3 B9D HI 二聚体(粗线)与三方二锌胰岛素二聚体(细线)的 C_{α} 最佳叠合图

(1) B 链 N 端肽段 B1-B6 构象发生显著变化, B1Phe 的 C_{α} 原子移到了一个新的位置, 两者偏差大约 1.98 nm. B 链 N 端从单体的其它部分向外伸出, 从而近似地与 A 链中间肽段 (A8-A12) 垂直(图 3). 这种 B 链 N 端的构象与本实验室已经解析的 B9E HI 正交晶体相同, 与以前在 B 链 C 端去五肽胰岛素(DPI)^[7]和去七肽胰岛素(DHPI)^[8]晶体结构中观察到的 N 端肽段结构也极其类似. 这看来是 B 链 N 端肽段的一种特定构象, 它不同于已知的 T 态、R 态和 R' 态^[9,10], 与分子主体也无任何作用, 呈现出一种较自由的开放状态.

(2) B9D HI 二体中的 2 个分子更加对称, 并均类似于二锌胰岛素中的分子 1. 在二锌胰岛素二体中, 残基 A1-A5 和 B25Phe 的侧链是两个主要的不对称部分. 在 B9D HI 中, 两分子的 A1-A5 均采取在二锌胰岛素二体中分子 1 的更不规则的螺旋构象. 两分子的 B25Phe 侧链不同于 2Zn 胰岛素二体, 它们呈近似对称, 苯环沿着肽链走向而伸向 B26Tyr. 这可能与 B25Phe 侧链运动性较大有关^[11]. 另外, 在 2Zn 胰岛素分子 1 中 B25 NH 和 Y19 O 之间的氢键不再形成, 其距离由 2Zn 胰岛素的 0.316 nm 变成了 0.393 nm.

2.4 二聚体内界面残基 B9 和 B13 处的构象变化

在 B9 和 B13 位置,与 2Zn 胰岛素相比,局部构象发生了很大变化. 在 B9D HI 二体中,由于 B9 残基由体积较小且不带电荷的 Ser 突变成了体积较大且带负电的 Asp,局部的空间相互作用和电荷相互作用都发生了很大变化. 4 个羧基侧链,包括 2 个 B9Asp 及 2 个 B13Glu,在空间上相距很近. 在生理条件下,它们都带负电荷而相互排斥,从而造成局部构象的不稳定,使其空间取向重新调整. 结果首先使分子 2 上的 D13 Glu 的侧链在来自相邻分子突变残基 B9Asp 侧链的范德华和静电排斥作用以及分子堆积的影响下显著改变构象,由指向二体接触面转而指向分子外表面,由此使对聚合有重要稳定作用的 B13 和 D13 侧链之间的氢键也随之被破坏. 同时,在分子 2 中,由于 D9Ser 替换成 Asp,此残基与 B13 Glu 侧链相互靠近,两个羧基氧原子之间形成氢键. 这些作用是重排后 B9,B13 局部构象的稳定因素. 在二体形成表面上,B9 和 B13 残基间不再保持良好的空间和电荷互补性,彼此距离已经超过了范氏作用范围(图 4(a)). 而在天然二聚体中,这部分是镶嵌互补的(图 4(b)). 显然,比之于天然胰岛素二聚体,B9D HI 二聚体是一个不稳定的聚合形式.

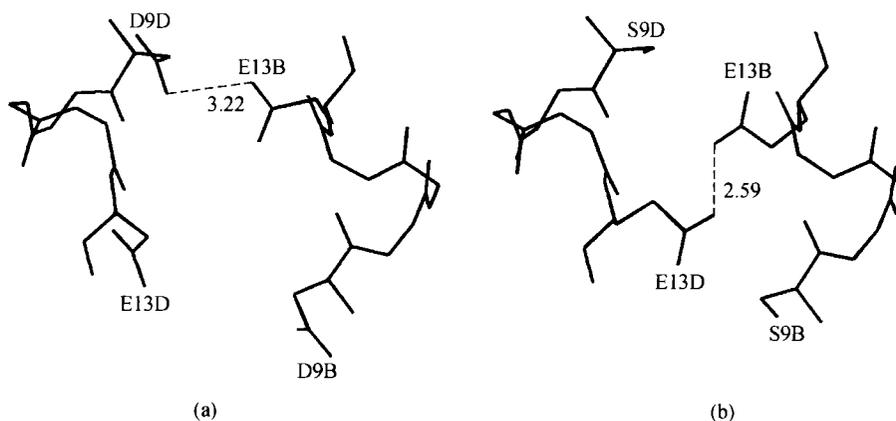


图 4 B9D HI(a)在三方二锌胰岛素二聚体(b)内部的分子间界面
距离单位: nm

3 讨论

3.1 形成单体和产生速效的必要条件

在分子界面引入负电荷基团,使其通过相互排斥作用有利于单体的形成,从而产生速效效应,这是构建速效胰岛素的基本设计思想. 但从 B9D HI 的晶体学研究指出,真正实现这一点,是要具备一定条件的. 事实上,当介质的 pH 值低于取代残基(Asp 或 Glu)的 pK 值时,残基侧链将质子化,从而不再荷负电,这时分子间的排斥作用减弱,仍可形成聚合体,如本文报道的 B9D HI 的二聚体结构. 实际上,在有 Zn^{2+} 和酚基的存在下,即使在碱性(pH = 8.5),也可以培养出三方四锌晶体(未发表资料). 在这种条件下,B9D HI 也可形成六聚体,只不过这种晶体极为脆弱,分辨率很低,显示聚合体是很松散的. 这些情况表明,B9D HI 在具有荷电残基修饰的必要条件之后,只有在接近中性和没有强烈聚合因素的充分条件下,才能以单体形式存在而

产生速效效应。

3.2 速效制剂与聚合体

B9D HI 显示的这种产生速效效应的外在必要条件,对实用的速效制剂的制备具有重要意义。在实用中,胰岛素单体是很不稳定的,因此以单体形式存在的速效胰岛素难于保存。本文报道的 B9D HI 正交晶体结构显示,在酸性条件下或有 Zn^{2+} 和酚基存在时,B9D HI 可以形成聚合体,虽然在晶体中这种聚合体内部的相互作用是微弱的(见图 4),因而也是不稳定的。另外,在 B9 位由 Ser 突变成 Asp 后,若形成六聚体,则在六聚体中心约 0.4 nm 的空腔内,除原来的六个 B13Glu 外,又多了 6 个 B9 Asp,这 12 个羧基侧链在空间和电荷上互相排斥,使六聚体很难稳定。事实上,在 Zn^{2+} 和苯酚存在时,虽然也能得到 T_3R_3 型的六聚体晶体,但晶体不稳定,衍射能力很差,这从另一方面说明 B9D HI 即使形成六聚体也是不稳定的。显然,一旦条件(如 pH)稍有变化,这种聚合体极易解聚。根据这种结构机理,可以控制条件将 B9D HI 制备成聚合体制剂以利于保存。当这种制剂注射进入体内时,由于 pH 值迅速变为中性,或聚合因素的排除,原来不稳定的突变聚合体将比正常的胰岛素聚合体更迅速地解聚成单体,从而产生速效效应。这为实用型速效胰岛素的制备提供了原理和具体途径。

3.3 新的 N 端肽段构象状态

现在知道,六聚状态中的胰岛素存在两种构象状态: T 和 R。T 态和 R 态的主要构象差别出现在 B 链 N 端肽段,它在 T 态中是 β 折叠,在 R 态中是 α 螺旋。本文报道的独立二聚体中观察到的 N 端肽段的构象既不是 β 折叠也不是 α 螺旋,它与分子主体无任何次级作用,是一种开放型(open)状态(见图 3)。与其他二聚体胰岛素(如正交 B9E HI,四方 B9D HI)比较,其 N 端构象与本文报道的基本相同。与迄今为止已知的胰岛素修饰物(如 DPI, DHPI)的晶体结构比较,它们的 N 端肽段构象也相似。因此,这里观察到的 B9D HI 中 N 端肽段的开放型构象可能代表了胰岛素分子在低聚或单体中的构象状态,我们在这里称之为 O 态(open state)。

参 考 文 献

- 1 Brader M L, Dunn M F. Insulin hexamers: new conformations and applications. *TIBS*, 1991, 16: 341 ~ 345
- 2 刘滨,梁镇和,唐月华,等. 胰岛素蛋白质工程: [B9Glu]人胰岛素. *生物化学与生物物理学报*, 1996, 28(3): 245 ~ 248
- 3 梁镇和,刘滨,唐月华,等. 胰岛素蛋白质工程: [B9Glu, B10Asp]人胰岛素. *生物化学与生物物理学报*, 1996, 28(5): 447 ~ 451
- 4 Brange J, Ribel U, Hansen J F, et al. Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature*, 1988, 333: 679 ~ 682
- 5 Howard A J, Gilliland G L, Finzel B C, et al. The use of an imaging proportional counter in macromolecular crystallography. *J Appl Cryst*, 1987, 20: 383 ~ 387
- 6 Baker E N, Blundell T L, Cutfield J F, et al. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Phil Trans Roy Soc ser B*, 1988, 319: 369 ~ 456
- 7 Brange J, Dodson G G, Edwards D J, et al. A model of insulin fibrils derived from the X-ray crystal structure of a monomeric insulin (Despentapeptide insulin). *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1997, 27: 507 ~ 516
- 8 Bao S J, Xie D L, Zhang J P, et al. Crystal structure of desheptapeptide (B24-B30) insulin at 1.6 Å resolution: implications for receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2975 ~ 2980
- 9 Bently G, Dodson E J, Dodson G G, et al. Structure of insulin in 4-zinc insulin. *Nature*, 1976, 261: 161 ~ 168
- 10 Derewenda U, Derewenda Z, Dodson E J, et al. Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*, 1989, 338: 594 ~ 596
- 11 Mirmira R G, Tager H S. Disposition of the phenylalanine B25 side chain during insulin-receptor and insulin-insulin interactions. *Biochemistry*, 1991, 30: 8 222 ~ 8 229