

分子密堆积法及其在 B 链羧端去六肽 (B25—30) 胰岛素结构测定中的应用*

任 重 梁 栋 材 **

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

摘 要

基于分子密堆积原理我们定义了一个能够表达在单位晶胞中对称相关分子之间堆积相容性的密堆积函数, 并在计算机上模拟晶格中的分子密堆积, 同时计算该函数在分子的每个旋转及平移位置的值, 使分子密堆积定量化。这一方法不仅可以从多个旋转函数或平移函数峰中判断出一个正确的解, 而且可能独立地、定量地和快速地解决一些特殊的旋转及平移问题。用已知结构 B 链羧端去五肽胰岛素作为例子检验了分子密堆积法及其程序的有效性, 并用分子密堆积法独立地解决了未知结构 B 链羧端去六肽胰岛素的平移问题。*R* 因子搜索等方法证实了密堆积法的解的正确性。分子密堆积法可以作为一种既相对独立于分子置换法又与之相辅相承的方法。

关键词: 分子密堆积法, B 链羧端去六肽胰岛素

分子置换法^[1] 经过众多实验室的实践已经发展成为一种成熟的大分子结构测定方法, 它主要依靠旋转函数及平移函数来求解未知晶体结构中分子相对于已知结构模型的取向和位置关系, 但是旋转函数和平移函数的计算结果信噪比不高, 鬼峰较多, 特别是在分子较小且在晶格内堆积紧密的情况下, 更难于解释, 而且通常与积分半径和衍射数据分辨率关系密切, 因而从众多的旋转或平移函数峰中寻找正确的解往往有一定的困难。在这种情况下考虑分子密堆积条件往往是一条可行的途径, 而且, 多数分子置换问题都有其自身的特殊性, 尤其是在研究了待测定结构的晶胞特征及其微观空间对称性之后, 我们常常会发现若干约束条件, 从而使问题局限在较小的范围内, 进而我们可以在此有限的范围内求出问题的最佳解。

Китайгородский 对有机分子在晶格中的密堆原理曾作过详细的论述和分析^[2]。以往在生物大分子结构测定中特别是一些胰岛素衍生物和不同种属胰岛素的初步晶体学研究中, 我们曾运用分子密堆积原理, 对 Bo-(L-Met) 胰岛素^[3]、des-(B1-2) 胰岛素^[4]、蛇胰岛素^[5] 和鸭胰岛素^[6] 等分子在晶格中的取向和密堆积进行过分析研究, 对于 B 链羧端去七肽胰岛素(DHPI) 的分子置换法结果的合理性曾作出了正确的判断^[7]。然而, 过去国内外对于分子密堆积原理的

本文 1990 年 9 月 14 日收到。

* 国家自然科学基金和中国科学院重点资助项目。

** 联系人。

运用只限于定性的或半定量的分析,至今以计算机模拟为手段作定量的密堆积计算方面的研究尚未见报道.

一、原理、方法和程序

生物大分子在晶体生长过程中,由于分子的无规则热运动,会自动地选取一种系统能量最低的方式堆积在晶格中. 分子在晶体生长过程中总是选取与各相邻分子具有尽量多的次级键接触,并从而使占有其平均空间最小. 对于生物大分子来说,分子间接触所形成的次级键可以是盐键、氢键、对离子的络合键,而大量的将是非极性的 Van der Waals 键接触. 均一分子的这种堆积方式的选择必然导致分子在晶体排列的三维周期性(晶格)和分子之间排列的对称相关性(晶体内部的微观对称性). 在特定的晶体生长条件下,分子所选取的系统能量最低的紧密排列方式将几乎是唯一的. 显然,在特定条件下培养出来的单晶体,表达其内部点阵特征的平移群和点阵六个参数,以及表达分子在排列堆积中对称等效相关的微观空间对称类型(空间群)将充分地表达了此特定分子在特定条件下的最紧密堆积方式. 在生物大分子晶体结构测定中,当考虑分子置换问题时,在充分了解模型分子的特征,特别是其几何特征(形状和大小)和分子表面电荷分布特征的基础上,对其特定的晶胞参数和空间对称性的详尽研究,将大大有助于我们获得被置换后的模型分子在晶胞中的正确的排布方式. 分子密堆积原理的运用不但可以对常规的分子置换法所获得的解的合理性做出正确的判断,在许多情况下,分子密堆积原理的定量运用,可以将常规的分子置换法中旋转函数和平移函数的两个三阶问题降阶为二阶或一阶的计算.

分子排列的“不相容”原则是分子密堆积法的重要原则之一,即特定的模型分子在特定晶胞内对称相关地排布,其合理的方式必定是分子间既拥有尽量多的接触,但却不能存在相互重叠交盖. 无论是检验分子密堆积的合理性还是寻找合理的分子密堆积,我们都以计算机模拟为手段模拟晶格中的分子密堆积情况,并计算单位晶胞或一个不对称单位中的分子体积来表达分子密堆积的合理程度.

我们在正交坐标系中旋转模型分子,在晶体学坐标系中平移模型分子,利用对称操作推导出在一个晶胞中堆积的所有模型分子,取一个或若干个不对称单位计算其中的体积,我们称作密堆积函数. 当两个或多个对称等效的分子相互交盖时的共同部分在体积计算中不重复进行,这是一个以模型分子的取向及平移位置为变量的函数,其值反映了密堆积的合理程度.

计算程序 PMPM 和 MPM 用 FORTRAN 语言写成,分大范围搜索(SEARCH)和局部修正(REFINE)两种方式. 首先在可能的范围内以比较大的步长搜索密堆积函数的极大值,然后以若干个极大值的分子取向和位置为初值,用可变多面体法^[8]最优化程序 FLESIM 修正分子取向和位置,得到若干个合理的密堆积模型并画出分子密堆积草图(MPM 流程如图 1 所示).

二、应 用

1. 去五肽胰岛素

1.5 Å 分辨率的 B 链羧端去五肽(B26—30)胰岛素(DPI)晶体结构的结果^[9]已经精确地反映了 DPI 分子在晶胞中取向和位置的客观情况,当然也处在最佳的密堆积位置上. DPI 晶体的空间群为 C2, 坐标系原点在二次旋转轴上,DPI 的分子在晶胞中的位置处在 4 个二次

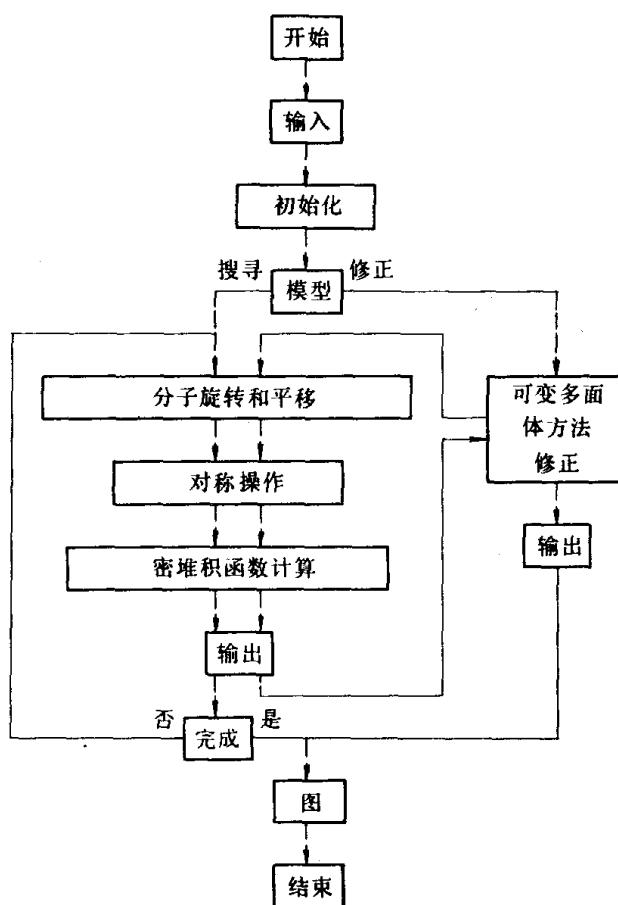


图1 分子密堆积法计算程序 MPM 流程图

旋转轴之间，而与二次螺旋轴 2_1 有一定程度的相交。假设将 DPI 分子模型在与二次旋转轴垂直的 ac 平面上作任何平移，都将导致等效分子之间的冲突，即产生密堆积的不合理。我们期

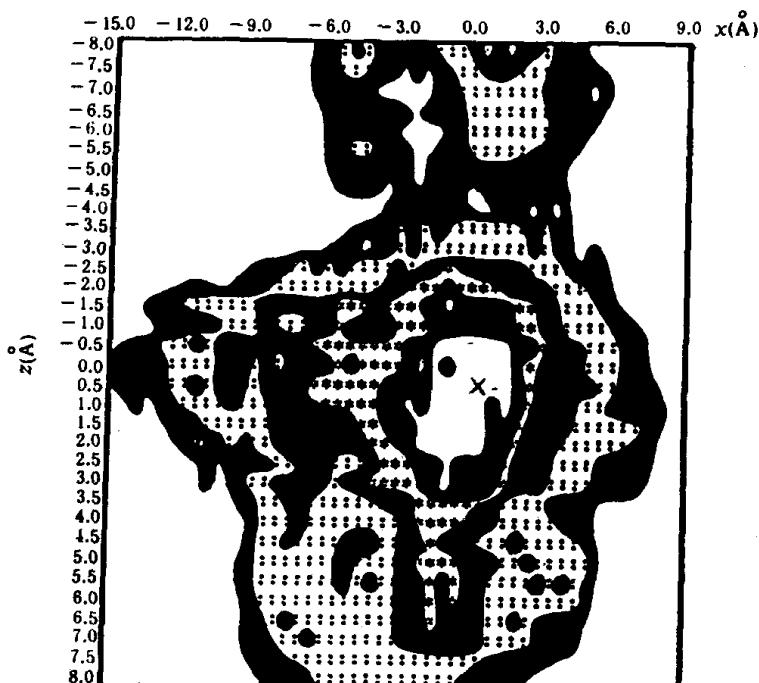


图2 DPI 的二维密堆积函数

(图中 \times 表示最高峰位置)

望 DPI 的密堆积函数能够准确地检验出密堆积的合理性。

图 2 是沿着 C2 空间群二次旋转轴方向的两维 ac 平面平移域上的密堆积函数图, 其最高峰非常接近于原点, 也就是说 DPI 分子在已测定的晶体结构中所处的位置的密堆积函数值最大, 这意味着我们的计算结果与实际情况是相符合的。

这一结果说明密堆积函数相当精确地反映了分子模型在晶格中堆积的合理性, 同时这一结果也是对计算程序的一个很好检验。反过来, 对于一个未知结构的晶体结构, 通过计算一个已知结构的类似物或衍生物在未知结构的密堆积函数图, 并从中得到最佳的堆积位置, 便有可能解决其分子置换问题。

表 1 DHI 和 DPI 晶胞参数的比较

	空间群	Z	$a(\text{\AA})$	$b(\text{\AA})$	$c(\text{\AA})$	$\alpha(^\circ)$	$\beta(^\circ)$	$\gamma(^\circ)$	$V(\text{\AA}^3)$
DHI	C ₂	4	42.6	37.8	27.2	90.0	125.4	90.0	35700
DPI	C ₂	4	58.56	27.70	23.99	90.0	100.6	90.0	38250
DIFF			-16.0	10.1	3.2	0.0	24.8	0.0	-2550(-7.14%)

2. 去六肽胰岛素

未知结构 B 链羧端去六肽(B25—30)胰岛素(DHI)的晶体也属于 C2 空间群^[10], 每个不对称单位只包含一个分子, 这与 DPI 是一致的, 但是 DHI 晶体的晶胞参数与 DPI 有很大差别, a 轴相差 16 Å (27.3%), 尤其是 β 角增大了 25°(24.7%)(表 1)。

显然, DHI 与 DPI 的晶体并不是同晶型, 因而, DHI 结构的测定不可能用同晶差值 Fourier 方法解决。可行的途经无非是多对同晶置换, 或者分子置换。我们灵活运用了旋转函数和分子密堆积法, 顺利地解得 3 Å 分辨率 DHI 的可靠结构。

如果只从二次旋转轴 2 的分布来看, 分子在晶胞中的堆积有两种可能性, 如图 3 所示。因为, DHI 分子的最小线度为 21 Å 左右, 而晶胞的 b 轴只有 37.8 Å, 分子不可能正好位于二次螺旋轴 2, 穿过其中心的位置(图 3(a))上。分子密堆积的定性分析结果可以判断, 图 3 中的(b)所示的堆积是合理的。在用旋转函数基本确定了 DHI 分子相对于 DPI 分子的旋转角之后, 由于晶胞中与 b 轴平行的二次轴为单向轴, 我们只需要在非常有限的二维 ac 平面上计算分子平移的密堆积函数即可得到模型分子在晶胞的坐标系中正确的坐标位置。但为再次显示密堆积函数的合理性我们取了较大计算范围(图 4)。

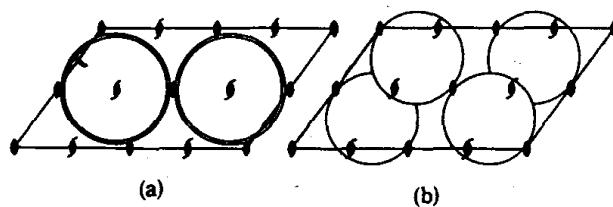


图 3 DHI 分子在其晶胞中的可能堆积方式(a)和最佳堆积方式(b)

取图 4 中的最高峰位置为平移问题的解, 以密堆积函数作为判断值, 对分子的精确取向(步距 0.5°)及平移位置(步距 0.2 Å)进行交叉逼近, 从而获得最佳的解。此时 DHI 模型分子在晶胞中的堆积情况如图 5 所示, 各对称分子基本上没有交盖, 说明该旋转及平移的解至少从密

堆积考虑是合理且最佳的。

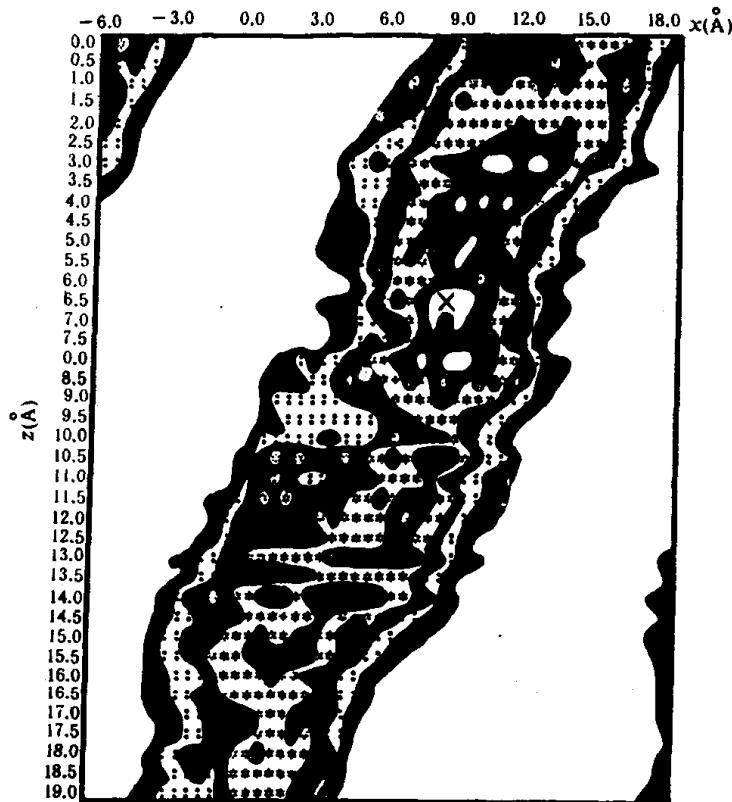


图4 DHI 的二维堆积函数
(图中 \times 表示最高峰位置)

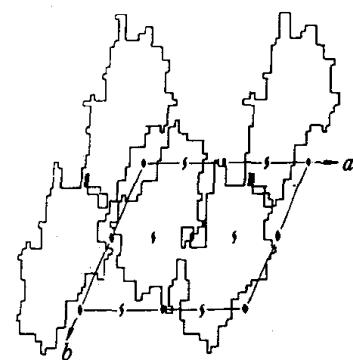


图5 DHI 模型分子在其晶胞
中的最佳堆积情况

以上述旋转及平移所解出的结果，并借用 DPI 分子结构模型计算可靠性因子 R 为 0.476，接着用下山法作旋转及平移的 R 因子精确搜索，即沿着 R 因子下降的方向搜索下一个旋转平移位置，结果 R 因子迅速降至 0.371。两轮能量制约的最小二乘修正(EREF)使 R 因子进一步降至 0.300。第一套电子密度图也显示了结构的可靠性。3 \AA 分辨率的 DHI 分子结构模型经两次人工调整及精化，最终 R 因子为 0.223，键长与标准值的均方根偏差为 0.045 \AA 。有关 DHI 结构研究的详细结果，将另文报道。

最近，具有空间群为 $P2_13$ 的 Bo-(L-Met)-Ins 的结构测定工作，也在我们实验室成功地运用分子密堆积法使常规的分子置换法降阶为一维的旋转计算和一维的平移计算问题，快速可靠地解决了该结构的初始相位^[11]。

三、讨 论

分子置换法和密堆积法都是为了解决两种晶胞之间相同或相似的结构单元的相互关系问题，但是它们所遵循的基本原理是完全不同的。分子置换法是与 X 射线衍射有关的一种方法，而密堆积法则从晶体学最基本的密堆积原理出发，与 X 射线衍射强度数据无关。

分子置换法和密堆积法都不能直接求出置换的最佳位置和堆积的最佳方案，而都需要在三维空间中作旋转及平移的进一步精化搜索。

对于模型分子的旋转平移这样一个高阶问题,由于分子置换法采用了 Patterson 函数作为结构的特征函数,成功地将问题降阶为两个三阶问题而成为一种能够实际应用的有效方法。密堆积法没有一个普遍的降阶方法,而是在充分了解待测结构的晶胞特征以及详细分析所属空间群的微观空间对称性的前提下,根据模型分子的几何形状和大小等结构特征进行堆积试验和推理,按照微观空间对称元素的位阻大小具体分析各种情况,使问题降阶,从而利于实际应用。密堆积法常常可以根据具体情况将旋转或平移问题降阶为平方问题甚至是线性问题。

分子置换法用模型函数和目标函数的叠合程度来标志置换的合理性,而密堆积法则用对称相关的分子在晶胞中所占有的体积来表示密堆积的合理性。

分子置换法的困难在于常常难以将分子间矢量和分子内矢量完全分开,这样就使得分子置换法不可避免地会产生背景峰的影响和干扰,在计算条件选择不当时背景峰的影响甚至相当大,使得正确的峰被掩盖。对于胰岛素及其系列物来说,由于它们分子小,分子内矢量与分子间矢量的比就更小。同样的原因,含水少、堆积紧密的晶体作分子置换法将会更为困难。分子不规则,偏离球体越大则越不易选取合适的积分半径,分子置换法也将较为困难。而分子置换法的这些困难正是密堆积法的有利之处。密堆积法对于堆积紧密、含水少的晶体尤为适用,因它在堆积紧密的情况下对称分子之间有更多的机会处于不相容状态,这就容易排除更多的堆积可能性。模型分子越不规则,线度比越大,越容易检验出堆积的不相容。

另外,晶胞内的对称性越高,不具平移操作性质的对称元素越多,给密堆积的限制条件就越多,密堆积法的运用也越容易。

我们相信作为晶体学经典的密堆积原理在生物大分子晶体学中同样会有其充分的应用价值。它不仅仅限于用粗略的椭球堆积的方法去大致地验证分子置换法的结果,而且可以借助计算机模拟的手段进行精确的、大规模的、定量的堆积试验,从而成为一种既相对独立于分子置换法又与之相辅相承的,既古老又崭新的方法。DHI 分子置换问题的解决就是第一个成功的例子。

参 考 文 献

- [1] Rossmann, M.G. (Ed), *The Molecular Replacement Method*, Sci. Publishers, 1972.
- [2] Китайгородский, А.И., *Органическая кристаллохимия*, Изд. АН СССР, Москва, 1955.
- [3] 梁栋材、万柱礼,生物化学与生物物理学报,14(1982),5:449—452.
- [4] 万柱礼、梁栋材,结构化学,1(1982),1:39—44.
- [5] 梁栋材等,中国科学B辑,1983,9:811—815.
- [6] 楼美珍,科学通报,32(1987),14:1099—1100.
- [7] 王大成等,中国科学B辑,1988 7:709—718.
- [8] Himmelblau, D.M., *Applied Nonlinear Programming*, Mc Grawhill Book Company, N. Y., 1972.
- [9] 戴金壁等,中国科学B辑,1986, 10:1043—1053.
- [10] 万柱礼等,中国科学B辑,1990,1:33—36.
- [11] 宋海卫等,中国科学B辑,1991,10: