

# hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 三元复合物的结构预测\*

冯健男 任蕴芳 倪长源 吴加金 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 通过 Delphi 方法分析人白介素 6 (human interleukin-6, hIL-6) /人白介素 6 受体  $\alpha$  亚基 (human interleukin-6 receptor  $\alpha$  subunit, hIL-6R $\alpha$ ) 复合物、gp130 ( $\beta$  subunit) 的空间构象的表观静电分布, 利用分子对接方法研究 gp130 与 hIL-6/hIL-6R $\alpha$  复合物作用形成三元复合物的空间构象, 经过分子力学优化、分子动力学常温动态模拟借助分子间相互作用 (范德华力、氢键、盐键等)、反应自由能理论探讨 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 复合物稳定构象结合部位的结构域. 分析结果表明, gp130 蛋白表面富集较强的负电势, 复合物 hIL-6/hIL-6R 一侧表面富集较强的正电势, gp130 借助蛋白表面的静电作用结合 hIL-6/hIL-6R 复合物, 介导 hIL-6 信号; hIL-6 中的 helix-C、loop-BC、loop-CD 参与同 gp130 中的 loopEF、linker、loopA'B'、loopB'C'、loopD'E' 作用, hIL-6R 中的 loopA'B'、 $\beta$ -strand E' 参与同 gp130 中的 loopA'B'、 $\beta$ -strand E' 作用.

**关键词** 人白介素 6, gp130, 人白介素 6 受体, 表观静电势, 分子力学, 分子动力学

**学科分类号** Q71

人白介素 6 (hIL-6) 作为调节免疫应答、急性期反应和造血作用的多功能细胞因子, 对不同的靶细胞表现为多样的生物学效应<sup>[1]</sup>. hIL-6 通过与不同功能的跨膜糖蛋白结合刺激活性细胞<sup>[2]</sup>, 人白介素 6 受体  $\alpha$  亚基胞外区 (hIL-6R $\alpha$ ) 特异地识别 hIL-6<sup>[3]</sup>, 形成低亲和力 ( $k_d = 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 复合物, 进而与  $\beta$  链胞外区配基结合域 (gp130) 作用形成高亲和力 ( $k_d = 10^{-10} \sim 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 复合物, 完成信号转导<sup>[4]</sup>. hIL-6 广泛多样的生物学功能的发挥, 是与 hIL-6 结合细胞膜表面受体 hIL-6R 并借助 gp130 将信号传递到细胞内部密不可分的. 因此, 了解 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 复合物间的相互作用, 对于深入了解配基、受体结构功能关系具有重要的指导意义.

Savino 等<sup>[5]</sup>通过结构对比、功能分析, 认为三元复合物 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 与生长激素与受体作用形成的 hGH·(hGHRbp)<sub>2</sub><sup>[6]</sup> 复合物具有结构、拓扑同源性; Salvati 等<sup>[7]</sup>、Grotzinger 等<sup>[8]</sup>依据生长激素与受体 hGH·(hGHRbp)<sub>2</sub><sup>[6]</sup> 复合物的 X 射线晶体结构, 通过主链碳原子的迭加拟和分别构建了 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 空间构象.

Xu 等<sup>[9]</sup>利用多维核磁共振技术解析获得了稳定的 hIL-6 三维空间构象, Bravo 等<sup>[10]</sup>通过 X 射线晶体衍射技术解析获得了 gp130 三维结构. 本文依据实验获得的 gp130 的空间结构数据, 以及借助分子对接 (docking) 方法获得的 hIL-6/hIL-6R 复合物

模型<sup>[11]</sup>, 通过探讨 hIL-6/hIL-6R 复合物、gp130 表观静电势的分布, 分析静电互补、分子间氢键作用、疏水氨基酸间作用, 利用分子对接 (docking) 方法, 经分子力学、分子动力学优化获得三元复合物 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 空间稳定结构, 并结合实验结果验证理论模型的合理性.

## 1 理论方法

以实验获得的 gp130 的空间结构为模板, 构建 gp130 的理论三维空间构象. 在 CVFF 力场下, 利用分子力学 (discover) 程序, 经过最陡下降 (能量收敛判据设定为 0.42 kJ/mol)、共轭梯度 (能量收敛判据设定为 0.084 kJ/mol)、牛顿力学 (能量收敛判据设定为 0.0042 kJ/mol) 依次进行能量最小化, 获得 gp130 稳定的空间构象.

在 CVFF 力场下, 选择介质腔模型, 选定统一的差分网格 ( $65 \times 65 \times 65$ ), 所研究的蛋白质 (hIL-6/hIL-6R、gp130) 被认为是具有低介电常数的介质腔 (介电常数设定为 2), 浸在具有高介电常数的介质水中 (介电常数设定为 80). 介质腔中包含有形式电荷, 水中含有电解质, 其对电场的屏蔽效应由 Debye-Huckel 离子氛理论描述 (一般地,

\* 国家自然科学基金 (39980036) 和军事医学科学院创新启动基金资助项目.

Tel: (010) 66931324, E-mail: wujj@hic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1999-07-22, 修回日期: 1999-12-16

离子强度设定为 0.145)。利用 Delphi 程序通过求解 Poisson-Boltzmann 方程分析 hIL-6/hIL-6R、gp130 的表观静电势分布情况。

通过分析复合物 hIL-6/hIL-6R、gp130 表观静电分布, 探讨 hIL-6/hIL-6R 与 gp130 结合部位在空间结构、静电作用互补性, 利用分子对接 (docking) 方法确定 hIL-6/hIL-6R 与 gp130 最佳作用取向, 结合分子力学、分子动力学优化获得的三元复合物的稳定构象。

## 2 结果与讨论

利用同源模建原理, 以实验获得的 gp130 晶体结构为模板构建 gp130 的理论空间构象。构建的理论构象在 CVFF 力场下, 经过最陡下降 (收敛判据为 0.42 kJ/mol, 优化步骤为 23 000 步)、共轭梯度 (收敛判据为 0.084 kJ/mol, 优化步骤为 18 000 步)、牛顿力学 (收敛判据为  $0.42 \times 10^{-2}$  kJ/mol, 优化步骤为 24 000 步) 方法进行能量的分子力学优化, 获得的稳定理论构象见图 1。

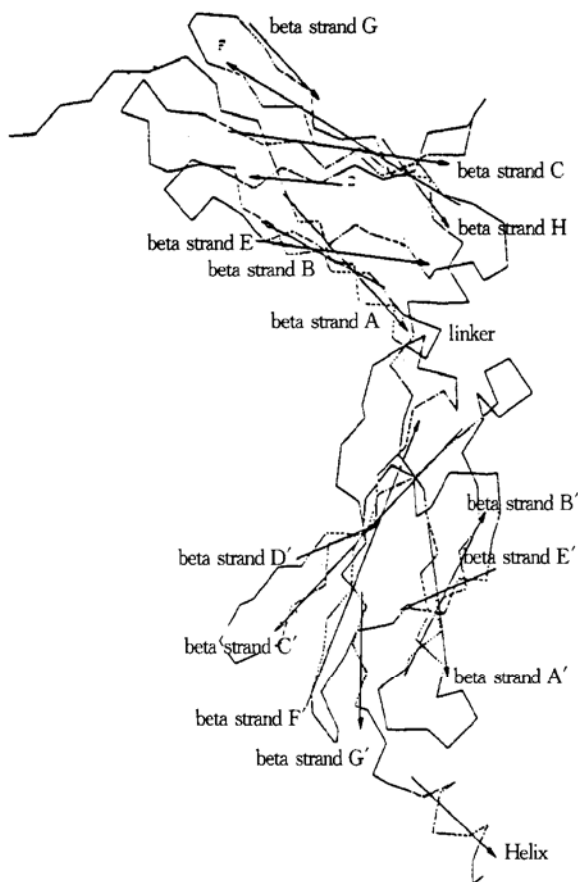


图 1 以实验获得的 gp130 晶体结构为模板构建的常温稳定的 gp130 理论模型

从图 1 可以看出, 稳定 gp130 构象由上下两个  $\beta$  折叠桶构成,  $\beta$  折叠上桶由八个反平行的  $\beta$  折叠片层 (分别定义为:  $\beta$ -strand A (Lys130 ~ Asn137)、 $\beta$ -strand B (Met142~ Asp147)、 $\beta$ -strand C (Asn157 ~ Glu163)、 $\beta$ -strand D (Lys168 ~ Lys175)、 $\beta$ -strand E (Ser181~ Val184)、 $\beta$ -strand F (Ile194 ~ Glu201)、 $\beta$ -strand G (Lys206 ~ Thr208)、 $\beta$ -strand H (Ile212~ Phe214)) 构成,  $\beta$  折叠下桶由七个反平行的  $\beta$  折叠片层 (分别定义为:  $\beta$ -strand A' (His226 ~ Ile231)、 $\beta$ -strand B' (Leu240 ~ Thr245)、 $\beta$ -strand C' (Leu255 ~ Thr263)、 $\beta$ -strand D' (Ser270~ Ile272)、 $\beta$ -strand E' (Ser283 ~ Val286)、 $\beta$ -strand F' (Glu294 ~ Lys303)、 $\beta$ -strand G' (Ala317~ Ile320) 构成。上下  $\beta$  折叠桶通过 linker 区 (Asp215~ Pro107) 连接, linker 区包含短的  $\beta$ -strand (Val220~ Lys221)。蛋白质 gp130 的 C 端含有 1 个短的  $\alpha$  螺旋。为了进一步验证 gp130 理论预测构象的合理性, 利用 profile-3D 对 gp130 的预测结构进行了构象的兼容性检测, 结果表明组成 gp130 的所有氨基酸残基构象合理, 理论预测的 gp130 结构可靠。利用构象迭合方法, 理论预测 gp130 空间构象主链碳原子  $C_{\alpha}$  与实验晶体构象  $C_{\alpha}$  迭合的均方根位移 RMS = 0.102 nm。

通过求解非线性 Poisson-Boltzmann 方程, 利用 Delphi 程序对 IL-6/IL-6R 复合物、gp130 表面的静电分布进行分析。分析结果表明, gp130 上下两个  $\beta$  折叠桶表面分布较强的负电势; IL-6/IL-6R 复合物中 IL-6 一侧表面分布较强的正电势。遵循表观静电的相互吸引, 观察 IL-6/IL-6R 复合物与 gp130 结构上的空间互补关系, 利用分子对接 (docking) 方法探讨 gp130 与 IL-6/IL-6R 复合物间的相互作用。

对接后形成的三元复合物 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 在 CVFF 力场下, 经过最陡下降 (收敛判据为 0.42 kJ/mol, 优化步骤为 35 000 步)、共轭梯度 (收敛判据为 0.084 kJ/mol, 优化步骤为 48 000 步)、牛顿力学 (收敛判据为  $0.42 \times 10^{-2}$  kJ/mol, 优化步骤为 45 000 步) 方法进行能量的分子力学优化, 获得低能量构象。选定 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ ·gp130 复合物作用区作为构型优化范围, 其余区域固定, 在 CVFF 力场、300 K 温度下进行 5 000 ps 常温动力学动态模拟, 使得选定的构型优化范围具有足够的动能去克服各种旋转位垒, 每隔 100 ps

选出一个构象进行分子力学优化, 获得的 50 个构象中分析能量轨迹确定对应的最稳定三元复合物

hIL-6·hIL-6Rα·gp130 构象. 图 2 给出了稳定的三元复合物 hIL-6·hIL-6Rα·gp130 的结构模式.

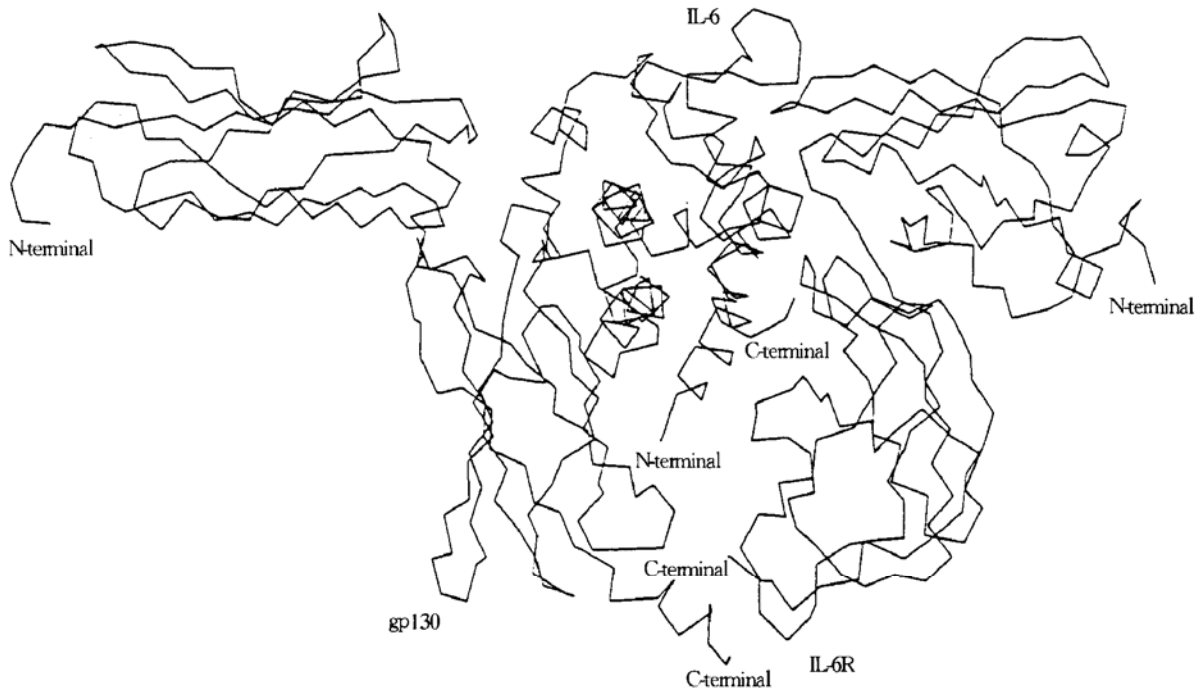


图 2 利用分子对接经分子力学、分子动力学优化获得的稳定三元复合物 hIL-6·hIL-6Rα·gp130 结构

利用计算机分子图形学技术, 在 Insight II (95.5) 界面下, 分析稳定的三元复合物 hIL-6·hIL-6Rα·gp130 中 hIL-6·hIL-6Rα 与 gp130 相互作用的氨基酸残基. 分别选定 hIL-6·hIL-6Rα、gp130 作为亚单元中心, 确定相应的范德华相互作用区域为 0.4 nm, 静态研究相应的 gp130、hIL-6·hIL-6Rα 与亚单位中心作用残基. 分析结果表明, 在三元复合物中, hIL-6 参与 gp130 相互作用的氨基酸残基区域为: loopBC (Glu100~Glu110)、helixC (Glu111~Lys130)、loopCD (Thr139~Gln153); hIL-6R 参与 gp130 相互作用的氨基酸残基分布区域为: loopA' B' (Arg229~Arg232)、β-strand E (Cys277~His280); gp130 中参与同复合物 hIL-6·hIL-6Rα 相互作用的氨基酸残基分布区域为: loopEF (Val189~Asn193)、linker (Val217~Lys221)、loopA' B' (Ser233~Ser238)、loopB' C' (Asn246~Ile254)、loopD' E' (Asp276~Ser282)、β-strand E' (Ser283~Val286).

借助 Insight II (95.5) 图形界面, 利用分子间氢键形成理论探讨 gp130 与 hIL-6·hIL-6Rα 间的相互作用. 从图 2 及三元复合物间形成的分子间氢键可以看出, gp130 信号转导 hIL-6·hIL-6Rα 复合物过程中, 主要通过分子间氢键、静电互补完成分

子间相互作用.

通过距离矩阵学、分子图形学技术, 借助蛋白质表面的亲疏水性、组成蛋白的残基可及性, 探讨 gp130 与 hIL-6·hIL-6Rα 结合区域氨基酸残基间的相互作用. gp130 β 折叠上桶氨基酸残基 Val189、Tyr190、Phe191、Val192 (loopEF), linker 区残基 Val217、Tyr218, 与 IL-6 中的残基 Thr143、Thr144、Ala146、Leu148、Leu149、Thr150、Leu152 (loopCD) 通过范德华分子间力形成疏水域; gp130 C 端残基 Ala326、Ala328、Ala330、Ala131、Ala333, 与 IL-6R 残基 Pro321、Pro231、Trp315、Thr267 通过疏水作用相互靠近, 围成疏水域; 两疏水域围成疏水腔, 稳定三元复合物. 疏水腔内 gp130 残基 Lys250 与 IL-6 残基 Glu100 (主链碳原子 C<sub>α</sub> 距离为 0.787 nm)、gp130 残基 Asp276 与 IL-6 残基 Lys129 (C<sub>α</sub> 距离为 0.709 nm)、gp130 残基 Glu275 与 IL-6 残基 Lys130 (C<sub>α</sub> 距离为 0.888 nm) 通过侧链盐桥完成静电作用; gp130 残基 Glu234 与 IL-6R 残基 His280 (C<sub>α</sub> 距离为 1.275 nm)、gp130 残基 Glu235 与 IL-6R 残基 His280 (C<sub>α</sub> 距离为 1.449 nm)、gp130 残基 Lys250 与 IL-6 残基 Glu110 (C<sub>α</sub> 距离为 1.110 nm)、gp130 残基 Lys250 与 IL-6 残基

Asp141 ( $C_{\alpha}$  距离为 1.115 nm)、gp130 残基 Lys250 与 IL-6 残基 Glu111 ( $C_{\alpha}$  距离为 1.208 nm)、gp130 残基 Lys250 与 IL-6 残基 Glu107 ( $C_{\alpha}$  距离为 1.536 nm) 通过静电吸引形成分子间力; gp130 与 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  复合物通过极性氨基酸相互靠近形成分子间氢键稳定三元复合物。

为了更为直观地研究 gp130 与 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  间的相互作用, 借助分子对接方法, 利用反应自由能理论计算 gp130 与 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  相互作用能量。表 1 给出了以理论预测得到的稳定三元复合物结构为基础的相互作用能量值 (范德华作用包括构象排斥与色散作用)。

表 1 gp130 与 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  相互作用能量

gp130 与 hIL-6·hIL-6R $\alpha$ 作用方式	能量值/kJ·mol <sup>-1</sup>
范德华作用	- 752.653
构象排斥	843.272
色散作用	- 1595.924
静电作用	- 1055.930
总能量	- 1808.583

从表 1 可以看出, gp130 与 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  结合过程中, 静电作用起着举足轻重的作用。hIL-6 与 hIL-6R 结合后使得复合物 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  表观静电分布增强, 特别是与 gp130 作用一侧相对于单体 hIL-6、hIL-6R 相同位置处的正电分布增强, 更加有利于与 gp130 作用。gp130 与 hIL-6、hIL-6R 中疏水残基间的相互作用稳定了三元复合物的构象。

Yawata 等<sup>[12]</sup> 借助分子生物学实验技术研究 hIL-6R 点突变体的生物学功能发现, hIL-6R 配基结合功能域中的  $\beta$ -strand E' (Cys277~ Asp281) 对于 hIL-6·hIL-6R $\alpha$  与 gp130 分子间作用起着至关重要的作用: 当 hIL-6R 进行点突变 His280 → Ile、双突变 His280 → Ser、Asp281 → Gly 后, 突变体均保持与 hIL-6 的结合作用 (点突变后作用稍有加强, 双突变下降 20%), 却完全丧失与 gp130 的作用。为了进一步验证理论预测构象的合理性, 以双突变 (His280 → Ser、Asp281 → Gly) 构象分析进行了探讨。双突变后的 mhIL-6R 与 hIL-6 作用形成二元复合物 hIL-6·mhIL-6R, 表观静电分布表明, hIL-6·mhIL-6R 相对于 hIL-6·hIL-6R, 与 gp130 结合一侧的正电分布弱。与 gp130 进行分子对接经过分子力学优化、分子动力学动态模拟后获得稳定三元

复合物 hIL-6·mhIL-6R·gp130 构象, 利用分子间氢键形成理论、反应自由能理论分析发现, 相对于 hIL-6·hIL-6R·gp130, hIL-6·mhIL-6R·gp130 复合物中形成的分子间氢键数目显著减少, 仅为 5 条; gp130 与 hIL-6·mhIL-6R 相互作用自由能下降为 - 538.658 kJ/mol, 其中范德华作用能量为 - 338.020 kJ/mol, 静电能仅为 - 200.638 kJ/mol。分子间氢键、静电作用、范德华作用的明显降低, 表明 gp130 已经无法与 hIL-6·mhIL-6R 结合, 与实验结果一致。

### 3 结 论

具有细胞因子受体家族结构特征的 gp130, 不能直接与配基 IL-6 结合。在生理情况下, IL-6 与 IL-6R 结合后与 gp130 结合形成高亲和力的结合位点, 并通过 gp130 传递信号。利用表观静电势分布, 借助分子对接方法、计算机图形学技术, 通过距离矩阵学、反应自由能、分子间氢键形成理论从理论上探讨 gp130 参与高亲和力受体形成及信号转导 hIL-6 结合区域特点, 为深入探讨细胞因子受体结构功能关系、研究细胞因子受体不同亚单位共用链特征提供了理论依据, 同时为进一步从受体结合、信号转导阐明细胞因子生物学活性的相似性和差异性建立了新的研究手段。

### 参 考 文 献

- 1 Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 1993, **54** (1): 1~ 78
- 2 Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*, 1994, **76** (2): 253~ 262
- 3 Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, *et al*. Cloning and expressing of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*, 1988, **241** (4867): 825~ 828
- 4 Hibi M, Murakami M, Saito M, *et al*. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 1990, **63** (6): 1149~ 1157
- 5 Savino R, Lahm A, Salvati A L, *et al*. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J*, 1994, **13** (6): 1357~ 1367
- 6 de Vos A M, Ultsch M, Kossiakoff A A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 1992, **255** (5042): 306~ 312
- 7 Salvati A L, Lahm A, Paonessa G, *et al*. Interleukin-6 antagonism by soluble IL-6 receptor alpha mutated in the predicted gp130-binding interface. *J Biol Chem*, 1995, **270** (20): 12242~ 12249
- 8 Grotzinger J, Gunther K, Wollmer A, *et al*. The family of the IL-6 type cytokines specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1997, **27**

- (1): 96~ 109
- 9 Xu G Y, Yu H A, Hong J, *et al.* Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol*, 1997, **268** (2): 468~ 481
  - 10 Bravo J, Staunton D, Heath J K, *et al.* Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J*, 1998, **17** (6): 1665 ~ 1674
  - 11 冯健男, 任蕴芳, 沈倍奋. 人白介素 6 与其受体结合特定结构的预测. *中国科学 C*, 2000, **30** (4): 349~ 355  
Feng J N, Ren Y F, Shen B F. *Science in China (Series C)*, 2000, **30** (4): 349~ 355
  - 12 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

**Structural Prediction on the Compound hIL-6• hIL-6R $\alpha$ • gp130.** FENG Jiar-Nan, REN Yun-Fang, NI Chang-Yuan, WU Jiar-Jin, SHEN Bei-Fen (*Beijing Institute of Basic Medical Sciences. Beijing 100850. China*).

**Abstract** According to the surface electronic potential distribution of the compound hIL-6/hIL-6R and gp130 was analyzed by the program Delphi, the

space conformation of the tertiary compound hIL-6• hIL-6R•gp130 is studied with Docking method. The stable structure of the tertiary compound is obtained during the optimization with molecular mechanics and molecular dynamics at normal temperature. The binding domain of the stable compound was discussed by intermolecular force (including Van der Waals force, hydrogen bond, salt link, etc) and reaction free energy theory. The results showed that the surface of gp130 enriches negative charges whereas the compound hIL-6/hIL-6R positive charges, gp130 combines hIL-6/hIL-6R with surface electrostatic interaction for transduction signal, helix-C, loopBC, loopCD in hIL-6 participate in the interaction with the regions loopEF, linker, loopA' B', loopB' C', loopD' E' in gp130, and the regions loopA' B',  $\beta$ -strand E' in hIL-6R are interacted with the regions loopA' B',  $\beta$ -strand E' in gp130.

**Key words** human interleukin-6, gp130, human interleukin-6 receptor, surface electrostatic potential, molecular mechanics, molecular dynamics

## 欢迎订阅 2001 年《细胞与分子免疫学杂志》

《细胞与分子免疫学杂志》原名为《单克隆抗体通讯》，1985 年创刊，1996 年更为现名。该刊由中国免疫学会和第四军医大学共同主办，中国免疫学会副理事长、第四军医大学金伯泉教授任主编。

该刊系中国科技论文统计与分析源期刊，中国科学引文数据库来源期刊，美国《化学文摘》刊源，已入选 2000 年版《中文核心期刊要目总览》基础医学类核心期刊。该刊兼顾学术性和实用性，主要栏目有：专家论坛，细胞免疫学，分子免疫学，临床免疫，肿瘤免疫，单克隆抗体，技术和方法，综述与信息等。主要读者为免疫学及相关学科的研究院所、大专院校、各医院和卫生防疫工作人员。

该刊为双月刊，国际标准大 16 开 (A4)，每期 100 页，定价仍为 8.00 元(全年 48.00 元)。全国各地邮局均可订阅，邮发代号：52-184。

该刊通讯地址：(邮编 710032) 陕西省西安市第四军医大学《细胞与分子免疫学杂志》编辑部；电话：(029) 3374550；E-mail: immuedit@fmmu.edu.cn