• 研究论文 •

人参 β -香树素合成酶同源模建及高通量虚拟筛选抑制剂的研究

詹冬玲^a 王 嵩^{*b} 韩葳葳^c 刘景圣^{*a}

(^a 吉林农业大学食品科学与工程学院 长春 130118)

(^b 吉林大学理论化学研究所理论化学计算国家重点实验室 长春 130061)

(^c 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室 长春 130023)

摘要 人参 β -香树素合成酶(β -AS)能催化氧鲨烯环化生成齐墩果烷型皂苷, 从而减少植物固醇的生成量, 有助于获得高效的人参皂苷。因 β -AS 的三维结构是未知的, 我们以氧鲨烯环化酶为模板, 对 β -AS 进行三维结构搭建。以抑制剂 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 为先导化合物, 通过 AutoDockvina 进行分子对接, 选取结合能量最低的新化合物进行研究。研究表明: 新抑制剂 8442257 比先导化合物 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 的抑制效果更好。Leu287 与新抑制剂结合时能量最低, 是重要的残基位点; Ser413 和 Trp613 通过氢键与新抑制剂结合, 在抑制过程中起重要作用。我们的研究结果为人参 β -香树素合成酶抑制剂的研究提供一个有利的依据。

关键词 同源模建; β -香树素合成酶; 虚拟筛选; 分子对接

Study of Homology Modeling and High-throughout Screening of a New Inhibitor of Panax β -AS

Zhan, Dongling^a Wang, Song^{*b} Han, Weiwei^c Liu, Jingsheng^{*a}

(^a College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

(^b State Key Laboratory of Theoretical and Computational Chemistry, Institute of Theoretical Chemistry, Jilin University, Changchun 130061)

(^c Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract β -Amyrin synthase from *P. ginseng* (β -AS) catalyzes the biosynthesis of the cyclization of oxidosqualene into Oleanane-type saponins, thereby reducing the amount of steroid formation. However, the 3D structure of β -AS has not been firmly established. To finding the novel inhibitors, a 3D structure model of β -AS protein was constructed based on the structure of the template human oxidosqualene cyclase. After virtual screening technique of β -AS, a novel natural compound (8442257) has been found with the lowest affinity energy. Then we identify that Leu287 is the most important anchoring residues for binding with 8442257 because it has strong vdW interaction with inhibitor. Ser413 and Trp613 are important residues because they make hydrogen bonds with inhibitor. Our results may be helpful for further experimental investigations.

Keywords homology modeling; β -amyrin synthase; virtual screening; molecular docking

人参皂苷(Ginsenoside)是五加科(Araliaceae)植物人参(*Panax ginseng*)和西洋参(*Panax quinquefolium*)的主要

活性成分, 具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用^[1,2], 已成为医药、食品、轻工等行业的重要原料。人参皂苷属于三

* E-mail: liuj1007@vip.sina.com.cn

Received August 31, 2011; revised November 10, 2011; accepted November 23, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31070638), Natural Science Foundation of Jilin province (Nos. 20101552, 201015109) and Doctoral Fund of Ministry of Education (No. 20090061120101).

国家自然科学基金(No. 31070638)、吉林省自然科学基金(Nos. 20101552, 201015109)和教育部博士点专项基金(No. 20090061120101)资助项目。

萜类物质,与植物甾醇共享前期代谢途径:通过 2,3-氧化角鲨烯环化步骤进入三萜代谢分支途径,在三萜碳环骨架复杂修饰的基础上形成人参皂苷.在人参体内 2,3-氧化角鲨烯流向 3 条代谢途径,一条是合成固醇类物质,另外两条是合成皂苷类物质(达玛烷型皂苷和齐墩果烷型皂苷),而环阿齐醇合成酶(CS),达玛烯二醇合成酶(DS)和 β -香树素合成酶(β -AS)分别控制 2,3-氧化角鲨烯流向达玛烷型皂苷和齐墩果烷型皂苷合成途径^[3,4].从以上的分析可知,人参皂苷和固醇来源于同一前体,而 β -AS 又是固醇合成的关键酶,因此通过抑制 β -AS 酶的活性可以抑制人参固醇合成,从而可使更多的前体流向皂苷的合成途径,进而提高皂苷的生物合成水平.目前人参 β -AS 的基因已被克隆(GeneBank: AB009029)^[4].但是其三级结构仍然没有被解析.

近年来发展的计算机辅助药物设计方法^[5,6]与传统的抑制剂筛选相比具有投入少、周期短、操作简单等优点.本文通过同源建模的方法构建 β -香树素合成酶的三维结构,以抑制剂 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 为先导化学物,在数据库中筛选出一种新的性能良好的抑制剂.

1 理论方法

1.1 同源建模

SWISS-MODEL^[7,8](同源建模法)是一项预测蛋白质三级结构的服务,它利用同源建模的方法实现对一段未知序列三级结构的预测.一般由如下四步完成:(1)从待测蛋白质序列出发,搜索蛋白质结构数据库,选定其中一个作为待测蛋白质序列的模板;(2)待测蛋白质序列与选定的模板进行再次比对,插入各种可能的空位使两者的保守位置尽量对齐;(3)建模:调整待测蛋白序列中主链各个原子的位置,产生与模板相同或相似的空间结构;(4)利用能量最小化原理,使待测蛋白质侧链基团处于能量最小的位置.

1.2 分子动力学模拟

在初始的三维结构基础上,利用 GROMACS4.5.3 程序对其进行了分子动力学 6 ns (MD)模拟,在模拟过程中使用了周期性边界条件和 amber 力场,并用 PME (particle meshewald)计算体系的静电相互作用.考虑到溶剂化效应,初始结构外加入了 0.8 nm 的 TIP3P 水分子层,并置于周期性盒子当中.用 Na^+ 平衡蛋白质中的负电荷.能量最小化后,在最初的 0.05 ns 的 MD 模拟中将温度从 0 K 提升到 298 K,采用 Langevin 温度平衡方法,然后进行 6 ns MD 模拟使体系达到平衡,选取平均构象做为下一步研究体系.

1.3 分子对接

以 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 为先导化合物在 ZINC 数据库中 (<http://zinc.docking.org/index.shtml>) 搜索小分子配体衍生物,然后用 Autodockvina 软件对这些化合物进行虚拟筛选. Autodockvina^[9]的精度、速度以及使用的便利性要优于 AutoDock 4.0^[9,10].用 Autodockvina 进行对接,最后得到能量打分最低的小分子,我们选取能量最低的化合物 (zinc_8442249),用 Gaussian 03 的 PM3 方法将结构进行优化^[11,12]. Affinity^[13]是商业半柔性的分子对接程序,在对接过程中,底物与设定酶的部分残基可以移动,酶的其他部分则固定不动.在蒙特卡罗构象搜寻的步骤中,将默认的 100 步最小化提高到 1000 步,每个搜寻到的构象会在 298 K 的恒温条件下做 1000 ps 的分子动力学模拟后再进行能量最小化.在最终得到的 10 个最优构象中,选取能量最低的构象作为进一步研究的对象. Ludi 是一种的全新蛋白配体设计工具,已广泛地被生化公司和科研机构使用,其特点是以蛋白质三维结构为基础,通过化合物片段自动生长的方法产生候选的配体先导化合物. Ludi 打分可以评估受体和配体的结合强弱^[14].

2 结果与讨论

2.1 同源建模

将 β -AS 蛋白序列提交到 Swiss-model 自动比较蛋白建模服务器上,通过程序自动选择了同样在甾族化合物骨架形成中起重要作用的人氧化鲨烯环化酶的晶体结构 1W6J 为模板^[15],序列相似性为 41%,直接生成了 β -AS 的初始三维结构,整个体系包含 753 个残基.

2.2 动力学模拟

在 6 ns 的 MD 模拟过程中 RMSD 随时间变化曲线如图 1 所示,由图 1 可见, β -AS 体系 RMSD 在 2 ns 之后趋于不变(0.35),体系已经稳定.最终得到的 β -AS 的三维结构见图 2. 图 2 为 β -AS 的表面静电势,中间凹槽部分就是抑制剂结合的部位.

QMEAN Z-scores^[16]表示蛋白稳定性的预测.经过分子动力学模拟之后,该结构 Z-scores 值为 -6.16,说明 β -AS 结构稳定.

图 3 显示的 Profiles-3D 的分值.经过分子动力学优化后,各残基的兼容性均有所提高.而对于最终的 β -AS 结构,其所有残基的得分均大于 0,说明所有的残基都处于合理的位置.通过 VADAR 对优化的结构的二面角进行评估.由图 4 中可见,752 个残基的二面角所决定的构象大部分都落在合理的区域内(红色和黄色区域).表 1 列出的是 VADAR 对二级结构,氢键和二面角的评

图 1 6 ns 均方根偏差

Figure 1 RMSD from 6 ns MD simulation

图 2 β -AS 的三级结构Figure 2 Final structure of β -AS 图 3 β -AS 的 Profiles-3D 打分Figure 3 Profiles-3D score of β -AS

估, 由表 1 可见, 预测的结果和已知实验的结果都比较吻合. 经过两种不同的评估方法验证, 说明 β -AS 的结构是可靠的.

表 1 β -AS 的 VADAR 统计
Table 1 VADAR STATS of β -AS

Statistic	Observed	Expected
Helix	353 (46%)	
Sheet	48 (6%)	
Coil	351 (46%)	
Turn	132 (17%)	
Mean hbond distance	2.3 sd=0.4	2.2 sd=0.4
Mean hbond energy	-1.8 sd=1.1	-2.0 sd=0.8
res with hbonds	525 (69%)	564 (75%)
Mean Helix Phi	-62.2 sd=12.8	-65.3 sd=11.9
Mean Helix Psi	-41.9 sd=19.1	-39.4 sd=25.5

2.3 抑制剂结合位点的预测

10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 是与底物 2,3-oxidosqualene 竞争型的抑制剂, 因此抑制剂的结合位点是底物的结合位点. 在甾醇生物合成中的关键酶(包括 β -AS)的氨基酸序列中存在极度保守的部分(例如 Tyr259), 但目前没有其他信息提供活性口袋所处的位置以及组成. 通过 CASTP 模块搜寻活性口袋, 搜寻到一处包含有 Trp259 的位点如图 5 所示, 结合文献[15], 残基数为 Asn122, Pro125, Phe128, Cys260, Tyr261, Arg263, Ala256, Lys257, Met258, Trp259, Cys260, Tyr261, Arg263, Ile369, Cys371, Gln412, Ser413, Phe414, Gln415, Ser416, Trp419, Phe461, Lys462, Tyr465, Arg466, His467, Ile468, Phe475, Ser476, His470, Trp472, Gln473, Val474, Ser475, Gln476, Cys477, Ser524, Leu525, Ala534, Trp535, Glu536, Pro537, Ala545, Asp546, Ile547, Val548, Glu549, His550, Glu551, Tyr552, Val553, Glu554, Cys555, Thr594, Gln595, Met596, Tyr610, Asn612, Trp613, Tyr619, Cys665, Arg668, Val728, Phe729, Met730, Lys731, Leu735 和 Tyr737, 可以确定为活性部位.

2.4 高通量虚拟筛选

β -AS 具有高度特异性, 而抑制剂 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 是与底物 2,3-oxidosqualene 结构相似, 属于竞争型的抑制剂. 图 6(A)为抑制剂 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 的二维结构.

以 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 作为先导化合物通过建立的筛选策略进行筛选, 从 ZINC 数据库的 1300 多万小分子中筛选出来的 120 个小分子中, 使用 AutoDockvina 将 120 个小分子分别与 β -AS 进行分子对接. 选择能量最低的小分子(化合物 8442257, 见图 6(B))做进一步的深入研究. 图 6(C)为 8442257 和酶的对接图,

图4 β -AS 的拉式图Figure 4 Ramachandran plot of β -AS 图5 (A) β -AS 的活性口袋大小和(B) β -AS 的活性口袋残基Figure 5 (A) Pocket size of β -AS and (B) pocket residue of β -AS

由图 6(C)可见, 可以将 8442257 和 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 放在活性位点中. 用 Gaussian03 AM1 方法对其优化结构, 然后用 Affinity 软

件对接. 表 2 中显示的这两种抑制剂与酶的相互作用能. 8442257 与酶的相互作用能(-75.69 kJ/mol)比 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 与酶的相互作用能

图 6 (A)抑制剂 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 的结构; (B) 8442257 的 3D 结构; (C) 8442257 和 β -AS 的分子对接图; (D) 8442257 和活性位点残基 Ser413 和 Trp613 的氢键示意图

Figure 6 (A) Structure of inhibitor 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene; (B) the 3D structure of 8442257; (C) molecular docking of enzyme and 8442257, (D) hydrogen bond between 8442257 and some residues of active site of β -AS

表 2 β -AS 和抑制剂的总的相互作用能、范德华静电作用以及 Ludi 打分

Table 2 Total energy E_{total} , van-der-Waal energy E_{vdw} and electrostatic E_{ele} between inhibitors and β -AS Ludi score

Ligand	$E_{\text{vdw}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{ele}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{total}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	Ludi score
8442257	-73.10	-2.59	-75.69	802
10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene	-64.60	-0.40	-64.26	621

(-64.26 kJ/mol)低,说明前者与酶形成的复合物稳定,而且不容易脱去,能够更好地抢占底物的空间,抑制化学反应的发生. Ludi 的得分(8442257: 802, 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene: 703)也说明 8442257 是比 10-aza-10,11-dihydro-2,3-oxidosqualene 好的抑制剂. 8442257 与 β -AS 酶活性口袋中的部分残基共形成 2 个氢键,从而提高了抑制剂的稳定性. 8442257 与 Ser413 的羧基部分形成 1 个氢键, Trp613 与 8442257 形成了 1 个氢键,所以 Ser413 和 Trp613 在抑制剂 8442257 的识别起到极为重要的作用. 因此它们在 β -AS 中起到稳定抑制剂的作用.

分子间的非键相互作用对于确定抑制剂与酶之间的相对位置以及关键残基非常重要,由于 β -AS 的活性口袋较大,涉及氨基酸残基非常多,与 8442257 活性位

点残基之间的总相互作用能小于 -1 kJ/mol 的残基及其相互作用能列在表 3 中. 由表 3 可见,除上述提及的 2 个与 β -AS 形成氢键的残基相互作用能特别是静电相互作用较大外, Leu287, Pro194, Leu285, Gln288, Glu291, Arg206, Glu290, Tyr292, Ile188, Met185, Cys202 也和抑制剂有较大的范德华相互作用. 尤其是 Leu287 和抑制剂的相互作用较大($E_{\text{vdw}} = -9.81$ kJ/mol, $E_{\text{ele}} = -1.16$ kJ/mol, $E_{\text{total}} = -10.97$ kJ/mol).

综上所述,从氢键和相互作用能两个方面来看, Leu287, Pro194, Leu285, Trp613, Gln288, Ser413, Tyr184, Glu291, Arg206, Glu290, Tyr292, Ile188, Met185, Cys202 这 14 个氨基酸残基在 β -AS 中,对抑制剂 8442257 都具有重要的作用. 我们的研究为设计 β -AS 酶专有的抑制剂提供可靠的理论线索.

表 3 抑制剂 8442257 和活性位点残基的相互作用能和范德华静电作用

Table 3 Total energy E_{total} , van-der-Waal energy E_{vdw} and electrostatic E_{ele} between 8442257 and individual residues of β -AS

Residue	$E_{\text{vdw}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{ele}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$E_{\text{total}}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
Leu287	-9.81	-1.16	-10.97
Pro194	-5.88	-0.43	-6.31
Leu285	-6.06	0.08	-7.39
Trp613	0.10	-5.69	-5.59
Gln288	-5.45	-0.07	-5.52
Ser413	-0.09	-5.28	-5.37
Tyr184	-5.09	0.14	-4.94
Glu291	-4.19	-0.12	-4.51
Arg206	-3.17	0.31	-2.86
Glu290	-3.67	-0.01	-3.68
Tyr292	-2.11	-0.23	-3.34
Ile188	-2.33	0.55	-1.78
Met185	-1.47	-0.00	-1.47
Cys202	-0.72	-0.28	-1.00

References

- Zhu, G.-Y.; Li, Y.-W.; Hua, D.-K.; Jiang, Z.-H.; Yu, Z.-L.; Fong, W.-F. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59(1), 200.
- Li, J.; Xie, Z.-Z.; Tang, Y.-B.; Zhou, J.-G.; Guan, Y.-Y. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, 652, 104.
- Han, J.-Y.; In, J. G.; Kwon, Y. S.; Choi, Y. E. *Phytochemistry* **2010**, 71(1), 36.
- Tetsuo, K.; Masaaki, S.; Yutaka, E. *Eur. J. Biochem.* **1998**, 256, 238.
- Zhao, X.; Wang, S.; Xu, X.-H.; Huang, X.-R. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 1835 (in Chinese).
(赵熹, 王嵩, 徐晓华, 黄旭日, 化学学报, **2009**, 67, 1835.)
- Wang, S.; Huang, X.-R.; Gao, X.-F.; Zhao, X.; Sun, C.-C. *Chem. J. Chin. Univ.* **2006**, 27(3), 535 (in Chinese).
(王嵩, 黄旭日, 高雪峰, 赵熹, 孙家钟, 高等学校化学学报, **2006**, 27(3), 535.)
- Kiefer, F.; Arnold, K.; Künzli, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 387.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. *Bioinformatics* **2006**, 22, 195.
- Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455.
- Huey, H.; Morris, G. M.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2007**, 28, 1145.
- Han, W.-W.; Zhou, Y.-H.; Yao, Y.; Li, Z.-S. *Polymer* **2006**, 47, 7953.
- Han, W.-W.; Li, Z.-S.; Zheng, Q.-C.; Sun, C.-C. *J. Theor. Comput. Chem.* **2006**, 5, 433.
- Affinity User Guide, Accelrys Inc, San Diego, USA, **1999**.
- Han, W.-W.; Zhou, Y.-H.; Yao, Y.; Li, Z.-S. *J. Mol. Struct.* **2007**, 815, 87.
- Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D-Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A. *Nature* **2004**, 432, 118.
- Benkert, P.; Künzli, M.; Schwede, T. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 510.

(A1108313 Qin, X.)