

酵母 AHAS 酶与磺酰脲类抑制剂作用模型的分子对接研究

李 琼¹, 陈沛全^{1,2}, 陈 兰¹, 孙宏伟^{1,2}, 沈荣欣¹, 赖城明¹, 李正名¹

(1. 南开大学化学学院, 2. 南开大学科学计算研究所, 天津 300071)

摘要 基于酵母乙酰羟酸合成酶(AHAS)与磺酰脲类抑制剂复合物的晶体结构,用分子对接方法对 AHAS 与 5 个磺酰脲类抑制剂相互作用的方式进行了系统的分子对接研究. 晶体复合物对接和假复合物对接两种模式对接的结果基本相同,并与实验结果吻合. 在进一步的对接中逐级考虑了辅酶 FAD 和 TPP 的影响,结果表明,辅酶 FAD 和 TPP 的加入,对 AHAS 酶与磺酰脲类抑制剂的结合顺序基本没有影响. 其中 FAD 的加入使 AHAS 与抑制剂的结合更加稳定,这主要是由于抑制剂的 R₂ 取代基与 FAD 中的平面基团 Flavin 环间存在的范德华相互作用所致;抑制剂与 TPP 间存在的静电相互作用可能是加速 TPP 降解的原因.

关键词 酵母乙酰羟酸合成酶(AHAS); 对接; 磺酰脲; 作用模型

中图分类号 O641 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)08-1552-04

乙酰羟酸合成酶(AHAS)是植物和微生物中支链氨基酸合成的关键酶. AHAS 抑制剂的研究已成为新型、高效、低毒除草剂开发的主流. AHAS 抑制剂主要有磺酰脲类、咪唑啉酮类、磺酰胺类和嘧啶水杨酸类^[1],研究主要集中在实验^[2-4]和虚拟筛选^[5]上. 酵母 AHAS 的晶体结构(1JSC)^[2]中含 AHAS 二聚体、2 分子辅酶 FAD、2 分子 TPP(thiamine pyrophosphate)和 2 个 Mg²⁺. 2 个活性位点分别位于酶相对的两侧,每个活性位点都与 2 个单体氨基酸残基相接. Duggleby 等^[4]制得 5 种磺酰脲类抑制剂与酵母 AHAS 的复合晶体^[6],提供了抑制剂与 AHAS 结合位点与结合模式的信息. 本文用分子对接方法系统研究了 AHAS 与磺酰脲抑制剂的作用方式,建立了一个 AHAS 与磺酰脲抑制剂作用的模型.

1 计算方法

用 Jackal 软件^[7]添加 5 个复合物晶体结构(1NOH, 1T9A, 1T9B, 1T9C, 1T9D)中缺失的残基和侧链. 5 个配体小分子均为磺酰脲类抑制剂,其典型结构由芳基、磺酰脲桥及杂环 3 部分组成,如图 1 所示. 配体小分子的结构均取自复合物的晶体数据,采用 Quacpac 软件^[8]添加氢原子,并赋予 Gasteiger-

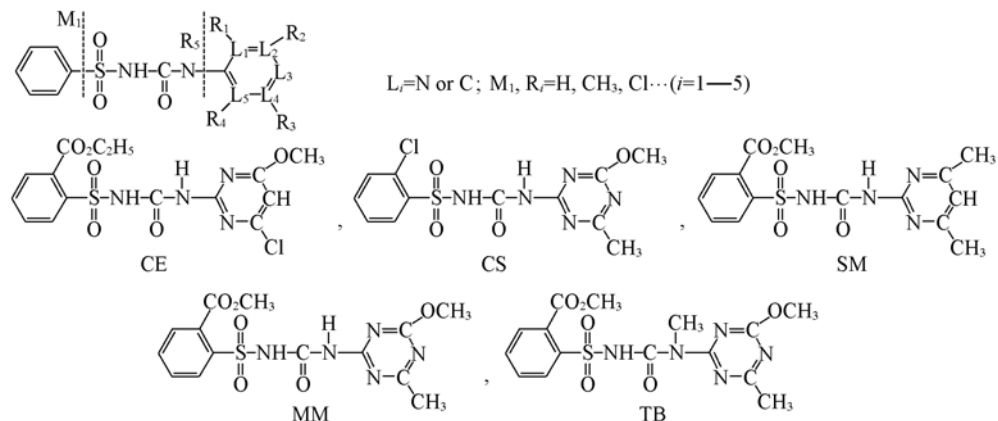


Fig. 1 Structures of sulfonylureas inhibitors

收稿日期: 2006-10-31.

基金项目: 国家“八六三”计划(批准号: 2006AA10A213)和南开大学“南开之星”高性能计算项目资助.

联系人简介: 孙宏伟(1966 年出生),男,博士,教授,主要从事分子模拟及结构化学研究. E-mail: sunhw@nankai.edu.cn

Marsilli 电荷, 将其作为分子对接中配体的初始构型.

对上述体系进行了两种模式的对接: (1) 复合物分子对接, 即对接中的受体和配体均直接取自晶体结构; (2) 假复合物分子对接, 即受体选用 1N0H 的蛋白质, 而配体取自其它晶体中相应部分. 除这两种模式外, 还将受体分子加入了辅酶 FAD 和 TPP. 由于复合物晶体结构中只有 1N0H 的蛋白质结构含有一分子完整的 TPP (理论上应有两分子 TPP), 故在第一种对接模式中, 没有考虑 TPP 的影响.

分子对接采用 Autodock 3.0 程序进行, 受体格点盒子为边长 2.25 nm 的立方体, 格点间距 0.375 nm. 复合物分子对接时, 盒子中心位于抑制剂的中心; 假复合物分子对接时, 盒子中心位于 1N0H 复合物晶体中抑制剂 CE 的中心. 氢键和范德华相互作用分别采用 12-10 和 12-6 Lennard-Jones 参数形式. 运用 Lamarckian 遗传算法 LGA, 将局部能量搜索与遗传算法相结合, 以半经验势函数作为能量打分函数, 对小分子构象和位置进行全局搜索, Population 为 150, ga_num_evals 设置为 10^6 . 进行 100 次独立对接, 选择均方根偏差 RMSD < 0.05 nm 作为评价标准聚类. 计算在“南开之星”超级计算机上完成.

2 结果与讨论

2.1 复合物分子对接

受体和配体小分子的结构分别取自 5 个补齐蛋白质链的复合物晶体中的相应部分, 并考虑了辅酶 FAD 在对接过程中的影响. 对接模式、对接结果列于表 1, 加入辅酶 FAD 前后的两种对接结果与晶体中小分子的叠合图见图 2. 从表 1 的计算结果可以看出, 对接能量最低的构型与晶体结构的 RMSD 值在 0.036 ~ 0.082 nm 之间, 因此, 使用 Autodock 3.0 的分子对接结果, 可以很好地重现这 5 个磺酰脲分子与 AHAS 的作用方式. 加入辅酶 FAD 对整个对接结果影响不大, 两种情况下, 小分子构型基本没有发生变化; 但是加入辅酶 FAD, 使 5 个复合物对接更加稳定.

Table 1 Molecule docking results obtained from the calculation with autodock 3.0 package

Ligand	Dock Mode	No. of cluster	No. in the best cluster	Docked energy* / (kJ · mol ⁻¹)	Intermolecular energy / (kJ · mol ⁻¹)	Internal energy of ligand / (kJ · mol ⁻¹)	RMSD / nm	K _i	
								Calcd.	Exp.
CE	I	1/9	77/100	-48.28(-49.41)	-47.20	-2.22	0.0528		
		FAD	1/2	98/100	-50.42(-50.79)	-47.28	-3.51	0.0368	
	II	1/9	77/100	-48.28(-49.41)	-47.20	-2.22	0.0528	3.63×10^{-7}	
		FAD	1/2	98/100	-50.42(-50.79)	-47.28	-3.51	0.0368	3.50×10^{-7}
	FAD + TPP	1/1	100/100	-50.38(-50.79)	-47.37	-3.43	0.0422	3.36×10^{-7}	
	CS	I	1/1	100/100	-38.74(-38.79)	-37.78	-1.00	0.0803	
FAD			1/1	100/100	-40.08(-40.12)	-39.16	-0.96	0.0816	
II		1/14	26/100	-40.38(-41.53)	-39.63	-0.96		1.59×10^{-6}	
		FAD	1/13	42/100	-41.38(-41.63)	-40.63	-1.00		1.06×10^{-6}
FAD + TPP		1/10	33/100	-41.38(-41.63)	-40.71	-0.92		1.02×10^{-6}	
SM		I	1/2	98/100	-45.90(-46.07)	-43.35	-2.72	0.0658	
	FAD		1/1	100/100	-46.65(-46.82)	-44.02	-2.80	0.0642	
	II	1/10	86/100	-46.02(-46.61)	-43.85	-2.76		4.88×10^{-7}	
		FAD	1/10	87/100	-46.49(-47.07)	-44.27	-2.80		4.08×10^{-7}
	FAD + TPP	1/8	79/100	-46.44(-46.99)	-44.31	-2.68		4.01×10^{-7}	
	MM	I	1/1	100/100	-45.65(-45.77)	-43.18	-2.60	0.0535	
FAD			1/1	100/100	-46.82(-46.99)	-44.52	-2.43	0.0644	
II		1/30	40/100	-46.28(-46.86)	-44.15	-2.72		7.27×10^{-7}	
		FAD	1/30	47/100	-47.28(-47.82)	-45.27	-2.51		4.62×10^{-7}
FAD + TPP		1/27	41/100	-47.28(-47.99)	-45.48	-2.51		4.25×10^{-7}	
TB		I	1/2	99/100	-51.17(-51.34)	-47.53	-3.81	0.0496	
	FAD		1/1	100/100	-52.38(-52.55)	-48.87	-3.68	0.0482	
	II	1/13	79/100	-49.33(-50.04)	-46.11	-3.98		5.63×10^{-7}	
		FAD	1/12	78/100	-50.41(-51.30)	-47.28	-4.02		3.52×10^{-7}
	FAD + TPP	2/13	63/100	-50.46(-51.00)	-47.12	-3.90		3.70×10^{-7}	

* Average energy of the best cluster(the lowest docked energy).

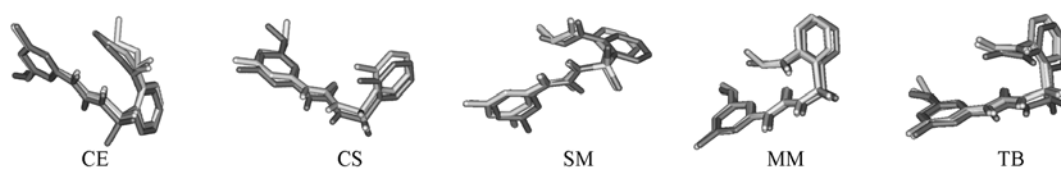


Fig. 2 Overlay of five sulfonylurea inhibitors

2.2 假复合物分子对接

2.2.1 两种对接模式的比较 假复合物分子对接的受体取自 1N0H 复合物晶体, 并逐级考虑辅酶 FAD 和 TPP 的影响. 5 个配体小分子初始构型分别来自 5 个晶体复合物中的相应部分. 对比表 1 中计算结果可知, 在对接过程中采用何种受体模型, 对对接结果基本上没有影响. 分析这 5 个复合物的对接结果可知, 5 个结构中, 磺酰脲抑制剂的结合位点的残基在空间构象上非常相似, 表明 AHAS 在结合不同的磺酰脲类抑制剂时, 其结合位点的构型未发生太大的变化, 即磺酰脲上的取代基不影响其与 AHAS 的结合模式. 表 1 同时列出了实验测定的抑制常数 $K_i^{[4]}$ 及分子对接预测的 K_i 值. 实验测定的结合能力顺序为 $CE > MM > SM > TB \approx CS$, 假复合物的 3 种对接计算的结合能力大小顺序为 $CE > SM > TB > MM > CS$, $CE > TB > SM \approx MM > CS$ (受体中含 FAD) 及 $CE > TB > SM \approx MM > CS$ (受体中含 FAD 和 TPP), 在结合能力预测方面, 分子对接和实验测定结果基本吻合. 进一步说明应用 Autodock 3.0 的 LGA 算法及其评价函数, 能有效地重现磺酰脲类抑制剂与 AHAS 的作用模式和结合强弱程度.

2.2.2 抑制剂与 AHAS 的相互作用 图 3(A) 示出用 LigPlot 程序^[9] 分析得到的 5 个抑制剂与 AHAS 之间存在氢键和疏水作用的残基. 可以看出, 抑制剂与 AHAS 结合位点附近的残基产生很强的疏水作用. 从作用模式[图 3(B)] 可看出, 抑制剂正好堵住通向 AHAS 活性位点的通道, 杂环插入到结合位点疏水空腔的底部(活性位点所处的位置), 而芳香环则处于结合位点与溶剂的界面, 且芳香环基本上与活性位点通道相垂直, 有效地阻碍了底物进入酶的活性位点. 杂环基团与磺酰脲桥接近于一个平面, 形成一个较大的共轭体系, 有利于电子传递. 抑制剂 CE 的脲桥 O 及磺基 O 分别可与酶中的 ARG380 及 LYS251 形成 2 个氢键, 其它 4 个分子脲桥部分则只能与 ARG380 形成氢键, 与 LYS251 形成氢键可能是由于 CE 与 AHAS 结合能力较强所致, 这与晶体结构结果一致^[5].

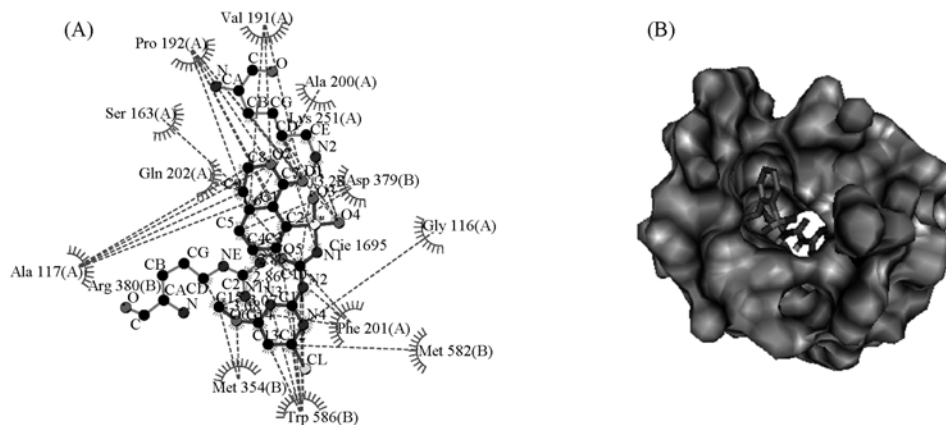


Fig. 3 Interaction information between yeast AHAS(A) and sulfonylurea inhibitors(B)

2.2.3 FAD 和 TPP 的作用 实验结果表明^[11], AHAS 催化过程的第一步就是 TPP 中 C2 的去质子化, 因而 TPP 在催化过程中起着非常重要的作用; FAD 是氧化还原反应中重要的辅酶, 由于在 AHAS 的催化过程中不涉及氧化还原反应, 所以对 FAD 的作用目前还没有统一的解释, 但 FAD 对整个蛋白质结构支撑作用已有共识. 表 2 列出了依次加入 FAD 和 TPP 后, 5 个配体小分子各部分的范德华相互作用和静电相互作用能, 图 4 给出了 5 个配体小分子与 FAD 和 TPP 的空间位置. 对接结果表明, 加入 FAD 对整个体系起稳定作用, 这主要是由于抑制剂 R_2 取代基与 FAD 中平面基团 Flavin 环形成较强的范德华相互作用. 加入 FAD 后, SM 和 CS 的增加了 0.4 kJ/mol, 其它 3 个分子增加 1.0 kJ/mol.

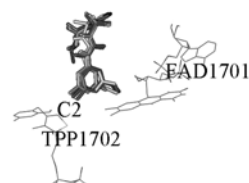


Fig. 4 Relative position of moleculek

Table 2 Interaction energies of yeast AHAS and sulfonylureas inhibitors in different substituents and different acceptor manners

Inhibitor		VDW/(kJ · mol ⁻¹)			ELEC/(kJ · mol ⁻¹)			Substituent
		FAD	FAD + TPP		FAD	FAD + TPP		
R ₂	CE	-2.97	-3.93	-4.02	-0.33	-0.29	-1.13	OCH ₃
	CS	-3.39	-3.85	-3.85	-0.29	-0.29	-0.75	OCH ₃
	SM	-2.26	-2.68	-2.72	0.08	0.04	0.59	CH ₃
	MM	-2.85	-3.72	-3.68	-0.33	-0.25	-1.46	OCH ₃
	TB	-3.05	-4.14	-4.14	-0.38	-0.25	-1.00	OCH ₃
R ₃	CE	-3.64	-3.60	-3.93	0.00	0.00	-0.59	Cl
	CS	-2.80	-2.80	-3.22	0.00	0.00	0.96	CH ₃
	SM	-3.35	-3.35	-3.51	0.00	0.00	0.54	CH ₃
	MM	-3.22	-3.26	-3.56	0.00	0.00	0.75	CH ₃
	TB	-2.97	-3.05	-3.22	0.00	0.04	0.84	CH ₃

从抑制剂结构可知, 除 SM 的 R₂ 为甲基外, 其余均为甲氧基, 甲基疏水性大于甲氧基, 因此造成范德华相互作用增加的原因并非疏水作用, 而应是 R₂ 的空间取向, 即甲氧基在空间上能更接近 FAD 的 Flavin 环, 进而有利于形成较强的范德华相互作用. TPP 加入与否对总对接能影响不大. TPP 加入后主要与 R₃ 取代基发生作用, 使 CE 与酶静电相互作用加强, 即其静电作用能从 0 变化到 -0.59 kJ/mol, 对其它 4 种抑制剂则减弱, 即从 0 变化到 0.80 kJ/mol. 由于 TPP 本身不稳定^[5], 因此不利的静电作用可能是加速 TPP 降解的原因. 也可能正是这种原因, 只有在 AHAS 与 CE 的复合晶体中可以找到完整的 TPP 分子, 而 AHAS 与其它 4 种抑制剂的复合物晶体中得到的只是 TPP 降解的产物.

参 考 文 献

- [1] Duggleby R. G. , Pang S. S. . J. Biochem. Mol. Biol. [J], 2000, **33**: 1—36
 [2] Pang S. S. , Duggleby R. G. , Guddat L. W. . J. Mol. Biol. [J], 2002, **317**: 249—262
 [3] Pang S. S. , Guddat L. W. , Duggleby R. G. . J. Biol. Chem. [J], 2003, **278**: 7639—7644
 [4] Duggleby R. G. , Pang S. S. , Yu H. , *et al.* . Eur. J. Biochem. [J], 2003, **270**: 2895—2904
 [5] ZHANG Tao(张涛), DONG Xi-Cheng(董喜成), CHEN Hai-Feng(陈海峰), *et al.* . Acta Chim. Sinica(化学学报) [J], 2006, **64**: 899—905
 [6] Jennifer A. McCourt, Pang S. S. , Guddat L. W. , *et al.* . Biochemistry [J], 2005, **44**: 2330—2338
 [7] Petrey D. , Xiang X. , Tang C. L. . Protein: Struc. Func. Genet. [J], 2003, **53**: 430—435
 [8] QuACPAC; OpenEye Scientific Software [CP/OL]. <http://www.eyesopen.com>
 [9] Wallace A. C. , Laskowski R. A. , Thornton J. M. . Prot. Eng. [J], 1995, **8**: 127—134

Molecular Docking Study on Interaction Mode Between Yeast AHAS and Sulfonylureas Inhibitors

LI Qiong, CHEN Pei-Quan, CHEN Lan, SUN Hong-Wei*, SHEN Rong-Xin,
LAI Cheng-Ming, LI Zheng-Ming

(1. Department of Chemistry, 2. Institute of Scientific Computing, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract On the basis of the complex structures of AHAS and sulfonylureas inhibitors, systematic molecule docking study of five sulfonylureas inhibitors to AHAS were performed with autodock 3.0 package. The systematic docking results indicate that two kinds of docking modes are consistent basically each other, and closely correlated with experimental results as well. The further research reveals that the sequence of docking results were not affected *via* the appearance of FAD and TPP. Due to the VDW interaction between R₂ substituent and flavin ring of FAD, the docking complex of inhibitors to AHAS became more stable. It was assumed that the unfavorable electrostatic interaction between the inhibitors and TPP may be the factor which accelerates the degradation of TPP.

Keywords Yeast AHAS; Docking; Sulfonylureas; Interaction mode

(Ed. : H, J, Z)