

# 乙型肝炎病毒表面抗原三维结构的同源模建及功能预测

周小平, 张沐新, 王广树, 杨晓虹  
(吉林大学药学院, 长春 130021)

**摘要** 结合生物信息学方法及分子模拟手段, 通过同源模建方法构建了乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg) Pres12 的三维空间结构, 并结合生物实验在分子水平上探讨了乙型肝炎病毒表面抗原 Pres12 作为抗乙型肝炎病毒重要靶标的机理. 研究表明, HBsAg 三维空间结构是由构型性的 Pres1 和线性的 Pres2 组成, 此结构由疏水氨基酸形成 3 个  $\alpha$ -螺旋结构及 Loop 结构域, 并且 N 端由 Pres1 中残基构成了一个开裂, 形成了 HBsAg 可能的活性部位. 静电势分析结果证实, N 端可能的活性部位具有较大的静电势分布, 因而具有与受体细胞蛋白相互作用的能力, 这为 HBV 病毒抑制剂药物分子的设计提供了有益帮助.

**关键词** 乙型肝炎; 表面抗原; 同源模建; 分子对接; 静电势

中图分类号 O629.7 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2010)04-0742-04

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)作为慢性病毒性肝炎和肝硬化的主要致病原因, 与肝癌的发生有着密切的关系<sup>[1,2]</sup>. HBV 是部分双链的 DNA 病毒, 病毒基因组约 3.2 kb 大小, 含有 S, C, P 和 X 4 个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 分别编码为外膜蛋白、核壳蛋白、DNA 多聚酶和 X 蛋白. S 区的开放阅读框又分为 S 基因、前 S2 区(PreS2)和前 S1 区(PreS1), 并各有其起始密码子 ATG. HBV 病毒吸附肝细胞膜主要与病毒外膜的 3 个蛋白[大蛋白(LHBs)、中蛋白(MHBs)和主蛋白(SHBs)]相关, 这 3 个蛋白分别含有各自起始密码子的氨基端, 同时具有共同的羧基末端和终止密码子. 主蛋白由 S 基因编码, 含有 226 个氨基酸; 中蛋白由 S 及 PreS2 基因区编码, 含有 281 个氨基酸; 大蛋白由 PreS1, PreS2 和 S 片段组成<sup>[3,4]</sup>. 由于 PreS1 在不同亚型病毒中基因片段大小不同, 因此大蛋白的大小为 389 或 400 个氨基酸不等. HBV 前 S1 区在前 S2 区上游, 全序列都位于病毒颗粒外表. HBV 的 S 蛋白含有两段信号肽序列, 信号肽 II 插入内质网膜, 其后的亲水序列暴露在病毒颗粒表面, 是 HBsAg 的主要抗原表位; 信号肽 I 近氨基端插入内质网膜, 其后的亲水序列保留在胞浆内, 在病毒出芽后仍在毒粒内部<sup>[5]</sup>. PreS1 和主蛋白是构型性的, 而 PreS2 则是线性的. 从病毒颗粒的构型可以看出, HBV 大蛋白和中蛋白在肝细胞表面受体和 HBV 作用时, 是与细胞接触的前哨, 较之主蛋白, 前 S 区更有可能作为病毒吸附肝细胞膜的吸附蛋白, 介导病毒附着和侵入细胞. 前 S 区同时具有多种生物学功能和较强的免疫活性, 研究提示前 S 区与病毒的感染、复制和病毒颗粒的装配密切相关, 尤其在参与病毒与宿主细胞的相互作用中发挥至关重要的作用. 因此对 PreS1 和 PreS2 抗原及相关受体的研究正成为 HBV 与靶细胞作用研究的热点领域<sup>[6~8]</sup>.

## 1 材料和方法

乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg) Pres12 的氨基酸序列由 174 个氨基酸组成<sup>[9]</sup>, 其氨基酸序列从 GenBank 获得: >HBV HBsAg pres12 174aamgaplsttrrgmqnlsvpnplgffpdhqlldplfransspdwdfntnkdswpmankv-gvgygpgftpphgllgwsppaaqglvltlpadpppastnrrsgrkptvspplrdthpqamqwnstqfhlqalldprvralyfpaggssstgtnpaptiasltssif-sktgppamn. 用多序列比对程序 BLASTP 进行序列分析比对. 选择较高准确度的 Swiss Model Server 程序

收稿日期: 2009-04-25.

基金项目: 国家科技部支撑计划(批准号: 2006BAI06A18-19)资助.

联系人简介: 杨晓虹, 女, 教授, 主要从事药物化学及天然药物化学成分与活性方面的研究. E-mail: xiaohongyang88@126.com

预测其二级结构<sup>[10-12]</sup>,在此基础上,同时运用同源建模方法,即在蛋白质结构数据库(Brookhaven Protein Data Bank, PDB)中搜索同源蛋白<sup>[13]</sup>;用同源蛋白结构叠加以确定 SCR 区和 Loop 区;模建蛋白与同源蛋白序列联配,以确定模建蛋白的 SCR 区和 Loop 区;给模建蛋白 SCR 区赋予空间坐标;模建 Loop 区;安装侧链.使用 Insight II 程序包构建其三维空间结构,运用分子动力学计算手段进行结构优化,结合静电势分析等对所得平衡构型进行活性位点搜索及潜在功能分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 序列分析比对

序列相似性搜索工具 BLASTP 建立在严格的统计学基础上,广泛应用于蛋白质序列的相似性搜索比对<sup>[14]</sup>.以其对 HBV 表面抗原 Pres12 氨基酸序列进行数据库搜索,结果表明,已知蛋白质结构数据库中只有 1CJH(PDB ID)与 Pres12 蛋白是具有一定序列同源性的蛋白质.膜蛋白非常难于分离提纯和结晶,与几万种水溶性蛋白结构相比,膜蛋白可用的晶体结构实验数据太少,需要利用生物信息学方法结合分子模拟手段模建和研究 HBsAg 的 Pres12 分子结构.分析序列组成的特点可知,在 HBsAg 的 Pres12 中,前 S1 区域中的氨基酸组成多为疏水的氨基酸,具有典型的疏水区段特征,因此 S1 区很有可能形成构型性的空间三维结构,从而具有一定的活性部位与宿主细胞蛋白相互作用. S2 区具有较多的亲水性基团,易形成线性的空间结构与细胞磷脂层中的 S 蛋白相连接.

### 2.2 二级结构预测

选择较高准确度的 Swiss Model Server 程序预测二级结构,结果如图 1 所示.可以看出, Pres12 的分子结构中以 Loop 结构域为主,另外还有 3 个  $\alpha$ -螺旋结构,且螺旋结构主要集中在分子结构的前端,这与实验报道的 S1 区是构型性的及 S2 区是线性的相吻合<sup>[5,7,8]</sup>.

### 2.3 三维结构模建及溶液平衡构象模拟

结合序列比对和二级结构预测结果,运用同源建模方法,使用 Insight II 生物模拟软件程序搭建了 HBsAg 的 Pres12 的三维空间初始结构.对于初始模建的蛋白模型,其骨架和侧基显然未能处于最优构象,故运用分子力学和分子动力学计算手段进行三维结构优化计算.首先采取最陡下降法优化 500 fs;再用共轭梯度法优化 500 fs;设置 pH = 6.0,然后再包裹 2 层厚度为 1 nm 的水分子层,并固定外层水分子,以保证在升温退火模拟过程中蛋白质分子在水溶液环境中有足够的构象转变空间;最后在 CVFF 力场作用下用 Discover 3 模块优化<sup>[15,16]</sup>.由 600 K 缓慢降至 300 K,降温梯度为 100 K,鉴于没有较好的模建模板,所以共进行 1 ns 的退火模拟,每步平衡温度循环中分子动力学计算后均设置分子力学计算<sup>[17]</sup>.冷却后即在 0 K 条件下进行 5 ps 分子力学优化.能量收敛后 HBsAg 的 Pres12 最终构象用于后续分析结构.最终水溶液中 HBsAg 的 Pres12 平衡构象如图 2 所示.

优化后的构象用 Profile3D 模块进行评价<sup>[18]</sup>,结果如图 3 所示.综合得分为 67.82,远高于平均值 35.47.由图 3 可以看出,大部分残基的模拟是合理的,仅有 His128 和 Gln129 残基模拟的合理性较差,这可能是因为在模拟过程中这些疏水性残基未能与溶剂进行很好的隔离.但这些残基远离 Pres12 的活性位点,所以它们的不合理模拟并不影响后续的研究.在分子动力学模拟过程中,势能随时间的变化见图 4,结果显示,体系能量收敛,体系达到平衡.

### 2.4 活性功能分析

分子动力学研究结果表明,分子除螺旋和折叠结构外,还含有大量的无规卷曲区,即 Loop 区,倾向于产生球状构象,这种球状构象具有高度的特异性,与蛋白质的生物活性密切相关.本文模建结果及 CD 谱实验分析结果均显示,在 Pres12 蛋白分子结构中,Loop 区占有较大比例,并且 C 端结构较为灵活复杂,提示应对 Pres12 蛋白平衡构象进行可能的活性位点搜索和功能分析.

本文使用 Insight II 软件中的 Binding Site 模块对 Pres12 蛋白平衡构象进行活性位点搜索.在 S1 区搜索得到一个由十几个氨基酸残基组成的近似椭球形的三维劈裂.其中包含残基 21~47 组成的多肽,这与实验结果一致<sup>[5,7,8]</sup>.根据诱导契合原理,如果能找到一种药物,可以与这个口袋发生作用,就有可能使 HBV 病毒 HBsAg,甚至是整个 HBV 病毒粒子发生结构乃至功能上的改变.

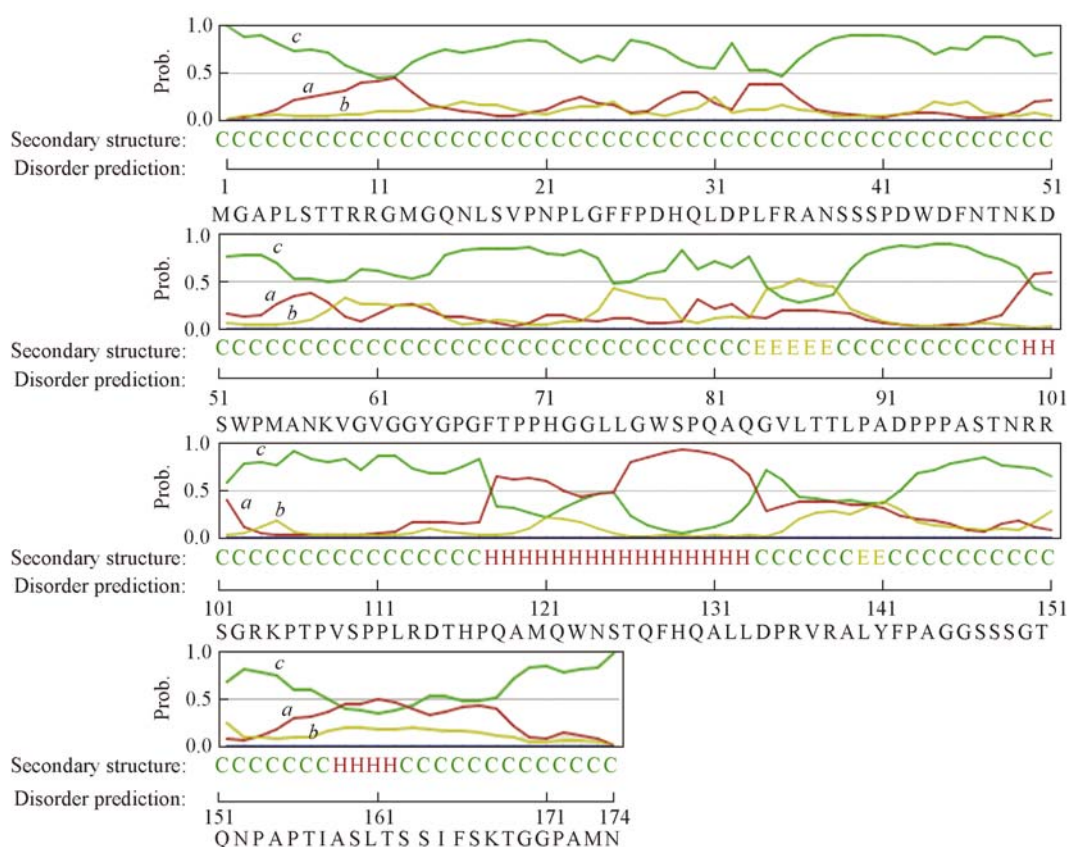


Fig. 1 HBsAg Pres12 Swiss Model Server prediction result

a. Helix(H); b. Extended- $\beta$ (E); c. Coil(C).

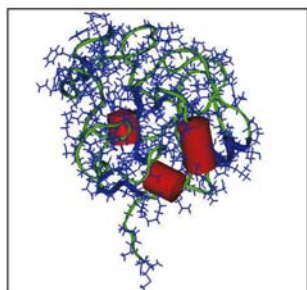


Fig. 2 Equilibrium conformation of Pres12 (pH = 6.0)

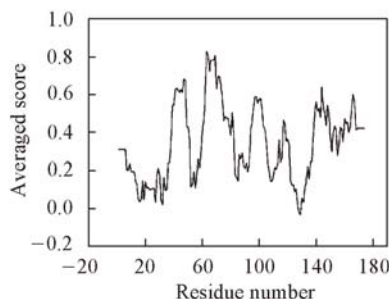


Fig. 3 Profile 3D evaluation of modeling of Pres12

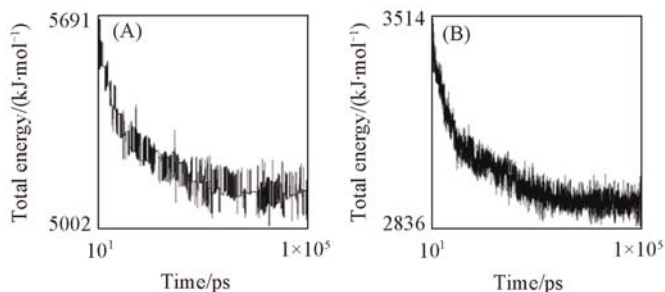


Fig. 4 Variation of the total energy (A) and total potential energy (B) during the 100 ps of MD on the HBsAg (Pres12)

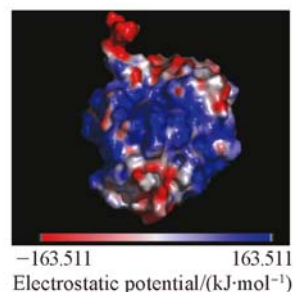


Fig. 5 Electrostatic potential distribution of HBsAg (Pres12)

为了进一步探索 Pres12 的 S1 区域潜在的活性及功能, 采用 Delphi 模块, 通过有限差分方法求解 Poisson-Boltzmann (P-B) 方程对 Pres12 分子进行静电势分析, 结果如图 5 所示. 在图 5 中, 红色代表负电区域, 蓝色代表正电区域, 白色代表中性区域. 可以看出, Pres12 分子的 S1 区活性口袋区域为主要静电势分布区, 所含氨基酸残基显示出较大的电荷沉积, 可作为结合受体的主要部位. 这一活性部位

有着较强的结合受体或与其它蛋白相互作用的能力,结合同源模建和活性位点搜索结果,发现 S1 区三维劈裂是一个可能的活性部位,该活性口袋可能的活性残基为 21~47 肽段等,这与实验中测定的表面抗原的活性位点一致.因此,研究结果为 HBsAg 分子实验结构的测定提供了理论模型和参考,并验证了实验中报道的活性残基,为 HBV 病毒抑制剂药物分子的设计提供了有益的帮助.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Som inskaya I. , Paulij W. , Jansons J. , *et al.* . J. Immunol. Methods[J] , 2002 , **260**(1/2) : 251—261
- [ 2 ] Seeger C. , Mason W. S. . Microbial. Molec. Biol. Rev. [J] , 2000 , **64**(1) : 51—68
- [ 3 ] Chouteau P. , Le Seyee J. , Cannie I. , *et al.* . J. Virol. [J] , 2001 , **75**(23) : 11565—11572
- [ 4 ] Milich D. R. . Immunol. Rev. [J] , 1987 , **99** : 71—103
- [ 5 ] WANG Lian-Ying(王连英) , JI Xiao-Hui(纪小会) , YUAN Hang(袁航) , *et al.* . Acta Chimica Sinica(化学学报) [J] , 2002 , **60**(12) : 2115—2119
- [ 6 ] Davis H. L. , Schirmbeck R. , Reimann J. , *et al.* . Hum. Gene. Ther. [J] , 1995 , **6**(11) : 1447—1456
- [ 7 ] Geissler M. , Tokushige K. , Chante C. C. , *et al.* . Gastroenterology[J] , 1997 , **112**(4) : 1307—1320
- [ 8 ] Michel M. L. , Davis H. L. , Schleef M. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J] , 1995 , **92**(12) : 5307—5311
- [ 9 ] Sambrook J. , Fritsch E. F. , Maniatis T. . Molecular Cloning[M] , New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: E.5
- [ 10 ] Zdobnov E. M. , Apweiler R. . Bioinformatics[J] , 2001 , **17**(9) : 847—848
- [ 11 ] Ward J. J. , Sodhi J. S. , McGuffin L. J. , *et al.* . J. Mol. Bio. [J] , 2004 , **337**(3) : 635—645
- [ 12 ] Jones D. T. . J. Mol. Biol. [J] , 1999 , **292**(2) : 195—202
- [ 13 ] Zhang Z. , Schwartz S. , Wagner L. , *et al.* . J. Comput. Biol. [J] , 2000 , **7**(1/2) : 203—214
- [ 14 ] Altschul S. F. , Madden T. L. , Schaffer A. A. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 1997 , **25**(17) : 3389—3402
- [ 15 ] Discover 3 User Guide[CP] , San Diego CA: MSI, Accelrys Inc. , 1999
- [ 16 ] GUO Chong-Zhi(郭崇志) , XUAN Zhen-Yu(宣振宇) , CHEN Run-Sheng(陈润生) , *et al.* . Chin. J. Biochem. Mol. Bio. (中国生物化学与分子生物学报) [J] , 2002 , **18**(4) : 499—505
- [ 17 ] JIANG Tao(江涛) , XU Ying(徐鹰) , ZHANG Michael Q. . Current Topic in Computational Molecular Biology(计算分子生物学前沿课题) [M] , Beijing: Tsinghua University Press, 2002: 503—524
- [ 18 ] Luthy R. , Bowie J. U. , Eisenberg D. . Nature[J] , 1992 , **356**(6364) : 83—85

## Homology Model and Functional Prediction of the Three Dimensional Structure of HBsAg of Hepatitis Virus

ZHOU Xiao-Ping, ZHANG Mu-Xin, WANG Guang-Shu, YANG Xiao-Hong\*

(School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract** When hepatitis B virus(HBV) conduct the planting process into normal liver cell, hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) plays an important role during this process, but its crystal structure information has not been reported in the Protein Data Bank. In order to make further research about the structure and function of HBsAg, we constructed the three dimensional structure of HBsAg Pres12 using biology information homology model methods, and explored the mechanism as an important antiviral target at the molecular level by molecular simulation method. The results showed that the three dimensional structure of HBsAg consist the conformational Pres1 and the linear Pres2, three  $\alpha$ -helixes and some loop region consist the whole structure, at the same time, some amino residues in the N-terminal of Pres1 make a cleft which forms the potential active site domain. The electrostatic analysis confirmed that, the N-terminal potential active site possess bigger electrostatic distribution and may have the ability to interact with recipient cell protein, this study will provide useful information for the design of anti-HBV drug molecules.

**Keywords** Hepatitis B; Surface antigen; Homology modeling; Molecular docking; Electro-static potential

(Ed. : H, J, Z)