

生长素受体 TIR1 与四种生长素分子间相互作用的分子对接研究

贾雪冰, 王 腾, 孙宏伟
(南开大学化学学院, 天津 300071)

摘要 依据生长素分子的分类以及生长素活性的不同, 选取四种生长素分子 IAA, 1-NAA, 2,4-D, 2-NAA 分别与生长素受体分子进行分子对接计算研究. 对生长素受体分子进行逐级对接计算. 首先, 通过分子对接计算研究辅酶 InsP₆ 以及中心水分子在生长素反应中的重要作用; 其次, 比较受体大分子完全刚性以及活性残基部分柔性的两种情况下的分子对接结果, 说明 AutoDock4 实现了受体分子活性残基的部分柔性而使对接结果更加合理, 进而使用 AutoDock4 方法对 TIR1-Auxins 体系进行对接计算; 最后, 对 TIR1-Auxins-Aux/IAA 体系进行分子对接计算, 结果表明, 生长素配体分子作为“分子胶水”直接与受体大分子 TIR1 以及底物多肽 Aux/IAA 形成强的弱相互作用, 如氢键作用、疏水相互作用, 促进了受体 TIR1 与 Aux/IAA 底物之间的结合, 进而说明氢键作用和疏水相互作用等弱相互作用对于生长素分子的活性具有很大的影响.

关键词 分子对接; 生长素; F-盒式蛋白质 TIR1; 氢键作用; 疏水相互作用

中图分类号 O641 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)S0-0009-07

生长素是最早被发现的一种植物激素, 也是最早应用于生产生活中的一类激素物质. 生长素对于调节植物生长、细胞分裂、器官形成以及植物开花结果等起着重要的作用, 因此对于生长素反应机理的研究引起各个领域研究人员的关注^[1~3]. 2005年, Dharmasiri 等^[4]和 Kepinski 等^[5]的研究确定了生长素受体为一种 F-盒式蛋白质 TIR1^[4,5], 这一发现极大的促进了对生长素的研究. 2007年, 郑宁等^[6]解析出 TIR1-ASK1 两种具有蘑菇状外形的蛋白质复合物和 TIR1-ASK1-IAA7 与三种生长素复合物的单晶结构(图 1), 为在化学领域更深入地研究生长素提供了依据.

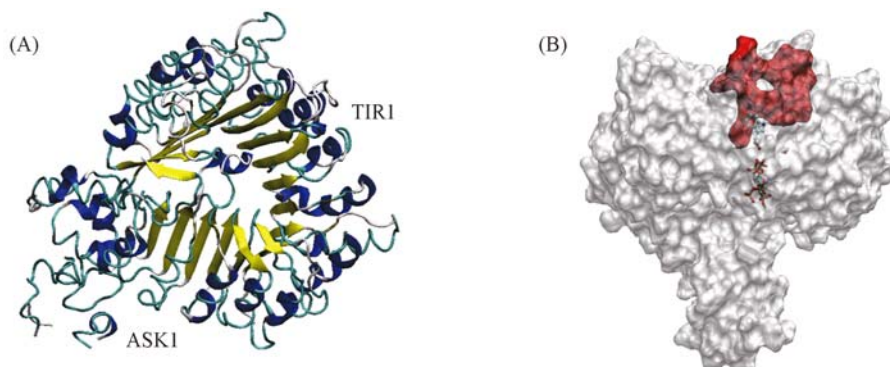


Fig. 1 Crystallographic structure of the F-box protein TIR1 (PDB Entry Code 2P1M(A) and the mushroom shape of TIR1

The red color symbolizes IAA7.

目前已知的生长素反应机理中, 生长素分子直接与 TIR1 蛋白质发生作用, 而 ASK1 蛋白质与生长素分子没有直接的作用. 生长素分子与 TIR1 相结合的位置是 TIR1-ASK1 复合物的区域 II, 即一个具有疏水性的活性口袋的底部, 而该口袋的顶部有 Aux/IAA 多肽覆盖. 生长素分子就是处在 TIR1 与 Aux/IAA 所形成的口袋中, 作为“分子胶水”加强了 TIR1 与 Aux/IAA 之间的结合力, 并且促进 Aux/

收稿日期: 2009-07-28.

基金项目: 国家高新技术研究发展专项经费(批准号: 2006AA10A213)资助.

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

IAA 多肽的降解实现生长素反应^[2]. 在生长素受体的单晶结构中存在辅酶 InsP_6 (Inositol hexakisphosphate). InsP_6 在细胞反应中经常作为磷酸盐的储备, 而在生长素反应中 InsP_6 作为受体蛋白质 TIR1 的辅酶起到重要的作用.

生长素以及生长素类似物种类繁多, 依据其产生来源以及生长素活性等可以有多种分类. 本文依据生长素分子的分类及活性选取了 4 种生长素分子: 天然生长素 IAA (吲哚-3-乙酸) 以及人工合成生长素 1-NAA (1-萘乙酸)、2,4-D (2,4-二氯-苯氧乙酸)、2-NAA (2-萘乙酸), 通过分子对接计算探讨生长素分子与 TIR1 受体蛋白质之间的相互作用.

1 计算方法

受体 TIR1 以及生长素分子 IAA, 1-NAA, 2,4-D 的初始构型来自于晶体结构, 其 PDB 代号分别是 2P1M, 2P1P, 2P1O, 2P1N. TIR1-ASK1 复合物中 ASK1 链与配体分子没有直接产生作用, 因而利用 Swiss-PDBViewer^[7] 软件去除 ASK1 链, 并且补充 TIR1 中缺失的残基; 同时受体结构中还包括辅酶 InsP_6 以及中心水分子. 对配体分子的初始构型采用 Gaussian 03^[8] 软件在 B3LYP/6-31G* 水平上进行几何构型优化, 配体分子的几何构型倾向于翘起的构型 (The tilted conformer)^[9].

分子对接计算分别采用 AutoDock3 和 AutoDock4 程序^[10], 对接计算采用 Lamarckian 遗传算法 LGA^[11], 遗传算法的种群数为 150, ga_num_evals 设置为 25000000, 即至少使用 2.5×10^7 个函数进行能量估计. 对接计算基于的受体格点间距为 0.0375 nm, 格点盒子大小为 $60 \times 60 \times 60$ 点 ($2.25 \text{ nm} \times 2.25 \text{ nm} \times 2.25 \text{ nm}$), 盒子中心为配体分子的几何中心. 计算配体小分子与受体蛋白之间氢键作用和范德华作用的参数形式分别采用 12-10 和 12-6 Lennard-Jones 参数形式, 以基于格点的半经验结合自由能函数作为能量打分函数^[12,13]. 计算在 298.15 K 下进行 100 次独立对接, 对接结果所依据的分簇标准是最大的 RMSD 为 0.250 nm. 2007 年发布的 AutoDock4 程序在 AutoDock3 的基础上发展出新的力场、引用更为精细的原子类型使得电荷的分配更为合理, 补充了依据原子电荷的溶剂化函数^[12], 更为重要的是, AutoDock4 程序允许受体大分子的活性残基具有完全的柔性^[13], 使对接计算的模型更接近实际. 并且在对接结果中 AutoDock4 提供了受体大分子与配体分子体系更多的能量信息.

如图 2 所示, 在 AutoDock4 对接中设置 TIR1 中的柔性残基 Ser438 (B)、Arg403 (B) 的柔性部分; 图 3 为 AutoDock3 以及 AutoDock4 计算中配体分子的柔性部分.

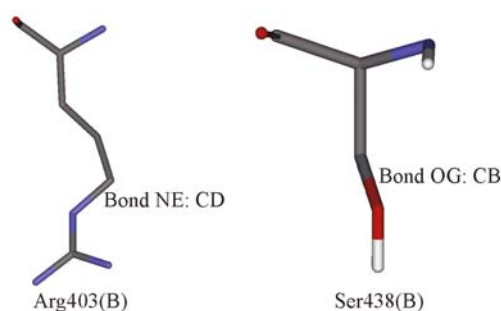


Fig. 2 Flexible parts of the active residues in the receptor TIR1

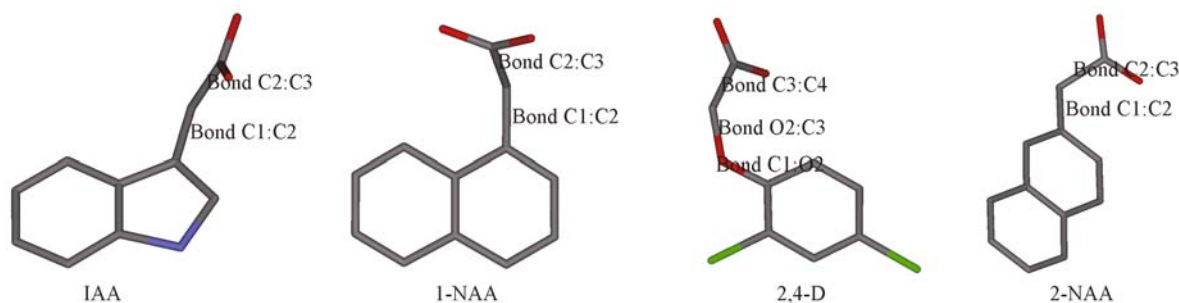


Fig. 3 Flexible parts of the auxin ligands

2 结果与讨论

2.1 辅酶以及中心水分子的作用

辅酶 InsP_6 与生长素分子没有直接的作用, 但是其在生长素反应机理中有着重要的作用; 而且在生

长素活性位点处始终会有一个水分子称之为中心水分子, 我们采用 AutoDock3 对二者在生长素反应中的作用进行分子对接计算研究. 辅酶 InsP_6 的结构来自 PDB 代码为 2P1P 的生长素受体分子 TIR1 与 IAA 复合物的单晶结构, 它与 TIR1 之间有很强的氢键相互作用(图 4).

对 TIR1-IAA 体系进行对接计算发现 InsP_6 在空间位置上处在生长素活性口袋附近并且其位置是一个非活性口袋的入口处(图 5). 在没有辅酶的情况下, IAA 在对接时进入一个非活性口袋中; 而辅酶 InsP_6 恰好在该非活性口袋的入口处, 由于空间效应可以使 IAA 对接到活性位点上. 在研究中心水分子的对接计算中, 从图 6 可以看到由于中心水分子与 IAA 羧基上的氧原子有氢键作用, 进而影响了 IAA 与 TIR1 结合时的构型: 中心水分子不存在时对接得到的 IAA 的构型与晶体结构的取向有很大的不同; 而考虑到中心水分子进行的对接计算得到的 IAA 构型与晶体结构相一致.

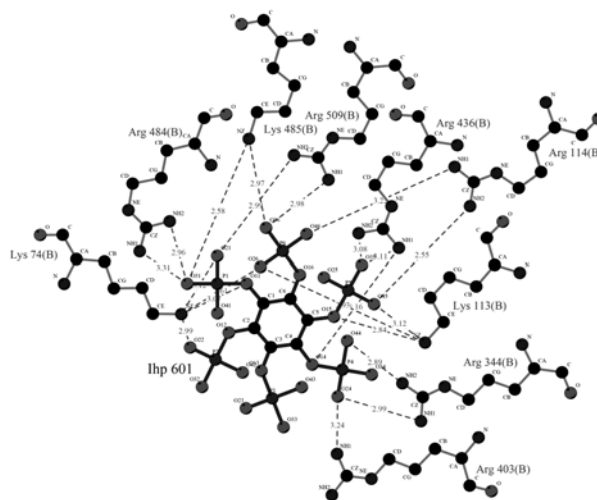


Fig. 4 2D scheme of interactions between InsP_6 as a co-factor of TIR1 and TIR1

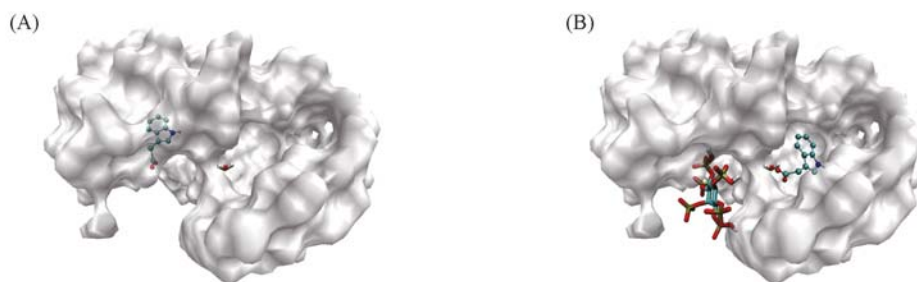


Fig. 5 Overall view of TIR1-IAA complex

(A) The docked position of IAA without co-factor InsP_6 in an inactive pocket; (B) the docked position of IAA with co-factor InsP_6 in an active pocket

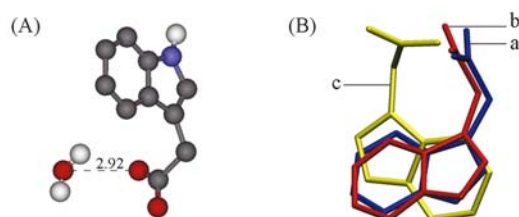


Fig. 6 Hydrogen bond between center water and IAA(A) and comparison of the best conformers of IAA without center water and with center water(B)

The orthogonal views of IAA. (A) The blue is the crystallographic structure; (B) the red is the best conformer with center water; (C) the yellow is the best conformer without center water.

在此基础上, 实验中对接体系包括受体大分子 TIR1、生长素配体分子、辅酶 InsP_6 以及中心水分子.

2.2 受体大分子 TIR1 与 IAA, 1-NAA, 2,4-D, 2-NAA 四个体系的对接结果

2.2.1 受体大分子 TIR1 完全刚性以及活性残基部分柔性两种情况的比较 使用相同的计算条件以及相同的配体柔性部分的选取, 分别利用 AutoDock4 以及 AutoDock3 对受体大分子 TIR1-生长素配体分子这一体系进行分子对接计算. AutoDock4 实现了受体大分子 TIR1 在活性口袋处的活性残基 Arg403(B), Ser438(B) 的部分柔性; 而 AutoDock3 中的受体大分子以及辅酶 InsP_6 采用完全的刚性.

表 1 中列出了四种生长素分子对接计算得到的最低能量构型与晶体结构比较的 RMSD 值以及结合

自由能量.

Table 1 Docking results of AutoDock4 and AutoDock3

	AutoDock4		AutoDock3	
	Free energy of binding/(kJ · mol ⁻¹)	RMSD* /nm	Free energy of binding/(kJ · mol ⁻¹)	RMSD/nm
IAA	-28.32	0.17087	-36.33	0.24929
1-NAA	-29.08	0.08644	-36.41	0.18726
2,4-D	-25.73	0.31346	-32.43	0.31553
2-NAA	-25.90	—	-32.56	—

* RMSD calculated between the lowest energy conformer in the cluster and the crystallographic structure.

通过比较 AutoDock 3 与 AutoDock 4 的计算结果可以看出, 四个生长素分子通过 AutoDock4 计算得到的最低能量构型与晶体结构比较的 RMSD 值均比 AutoDock3 计算得到 RMSD 值小, 表明 AutoDock4 计算得到的生长素配体分子构型更接近于晶体结构. 图 7 显示出 AutoDock 4, AutoDock 3 计算得到的 IAA 最低能量构型与晶体结构的 3D 图示比较. 由于 AutoDock4 实现了受体大分子的部分柔性, 其结果在配体分子构型以及结果分析上更具优势.

2.2.2 AutoDock4 计算 TIR1 与 IAA, 1-NAA, 2,4-D、2-NAA 四个体系的相互作用 实验中所选取的四个生长素配体分子根据生物活性分属不同的类别. IAA 是天然生长素, 在较宽的浓度范围($10^{-8} \sim 10^{-4}$ mol/L) 内均具有很强的生长素活性; 1-NAA、2,4-D 是人工合成生长素; 2-NAA 具有非常低的生长素活性, 并且具有一定的抑制植物生长的特性^[9]. 实验中测得 IAA, 1-NAA, 2,4-D 几种生长素分子的 IC₅₀ 值分别为 0.12, 1.3, 1.4 μm^3 , 可知它们的生长素活性顺序为 IAA > 1-NAA > 2,4-D. 表 2 分别给出了几种生长素与受体蛋白质 TIR1 的 100 次独立对接结果中的分簇信息以及结合自由能量的信息, 通过分子对接计算来说明影响各种生长素活性的关键因素.

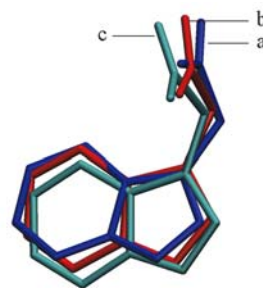


Fig. 7 Comparison of the lowest energy conformers of AutoDock4 and AutoDock3 and the crystallographic structure

The orthogonal views of IAA. a. The Blue is the crystallographic structure; b. the Red is the lowest conformer of AutoDock4 with c. the Cyan of AutoDock3.

Table 2 Information about clusters of docking*

Ligand	Cluster number/	No. in the best cluster	Mean binding energy/(kJ · mol ⁻¹)	Estimated inhibition constant K_i (298.15 K)/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
IAA	1/2 (96%)	91	-26.86	11.03
1-NAA	1/4 (96%)	52	-26.44	8.19
2,4-D	1/6 (57%)	6	-22.33	31.37
2-NAA	1/8 (35%)	19	-24.55	29.32

* The numbers in parentheses presented the percentage of the best cluster out of 100 runs.

从 4 种生长素分子的分簇情况(表 2) 可以看到, IAA 与 1-NAA 的 100 次独立对接中构型变化比较稳定, 最佳类簇中的次数占绝大部分的比例; 2,4-D 以及 2-NAA 的对接结果是分簇多而且最佳类簇所占比例不大, 说明配体在与受体分子相结合时的复合物的稳定性不好, 并且结合对接得到的最佳类簇中的平均结合自由能绝对值的大小顺序 IAA > 1-NAA > 2,4-D, 可以得到与实验值非常一致的生长素活性顺序, 即 IAA > 1-NAA > 2,4-D. 对于 2-NAA, 已经知道其生长素活性低而带有一定的抑制生长素活性的特性, 从对接计算得到的抑制常数 K_i 可以说明这一点. 抑制常数 K_i 代表着抑制能力的大小, 是药物设计中一项重要指标. 从抑制常数 K_i 值可以看到, 相比较其它的生长素分子, 2-NAA 的抑制生长素活性的能力很明显, 即 2-NAA 与生长素受体分子 TIR1 仍然具有一定的结合能力, 但是其生长素活性要小于 IAA 以及 1-NAA. 在 100 次独立对接中 IAA, 1-NAA, 2,4-D 全部都能对接到活性口袋中, 但是 2-NAA 的 100 次对接计算中有 2 次没有对接到活性位点上而是进入非活性口袋中, 这样 2-NAA 与受体大分子 TIR1 结合时不能完全在生长素活性位点上发挥作用, 使得 2-NAA 的生长素活性很弱.

表 3 列出了最低能量构型与晶体结构比较得到的 RMSD 值以及 AutoDock4 计算结合自由能的方法

Table 3 Energy results ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) of docking

Ligand	IAA	1-NAA	2,4-D	2-NAA
The lowest binding energy ^a	-28.32	-29.08	-25.73	-25.89
(1) Final intermolecular energy	-29.87	-30.25	-28.24	-27.61
(2) Final total internal energy	-1.38	-1.34	-2.01	-1.13
(3) Torsional free energy	2.30	2.30	3.41	2.30
(4) Unbound system's energy	-0.63	-0.21	-1.05	-0.54
vdW + Hbond + desolv. energy	-16.84	-17.18	-15.71	-17.68
Electrostatic energy	-0.46	-0.42	-1.09	-0.21
RMSD ^b /nm	0.17087	0.08644	0.31346	—

a. The lowest binding energy = (1) + (2) + (3) - (4); *b.* RMSD calculated between the lowest energy conformer in the best cluster and the crystallographic structure.

法, (1) 即分子间能量, 包括配体与受体柔性部分的能量, 配体与受体刚性部分的能量以及范德华、氢键、溶剂化和静电作用的能量; (2) 总的内部能量, 由配体能量以及受体能量组成; (3) 扭转自由能; (4) 自由体系能量. 一方面, IAA, 1-NAA 的 RMSD 值小于 0.20 nm, 而 2,4-D 由于可旋转自由度较高使得 RMSD 值较高. 另一方面, 该数据也可以很容易体现出在受体分子与生长素分子相结合时弱相互作用, 如范德华作用、氢键作用对于受体与配体之间的结合力有很大的贡献. 由于活性口袋处的 TIR1 残基 (His 78, Arg 403, Ser 438, Ser 462, Glu 487, Arg 436, Met 460, Lys 485, S462E, Phe 79 以及 Phe 82) 具有较强的疏水性, 因此 TIR1 与生长素分子之间形成较强的疏水相互作用以及氢键作用 (表 4). 图 8 用 Ligplot 2D 图^[14] 表示出活性位点处四种生长素配体分子与 TIR1 活性残基之间的氢键作用和疏水相互作用.

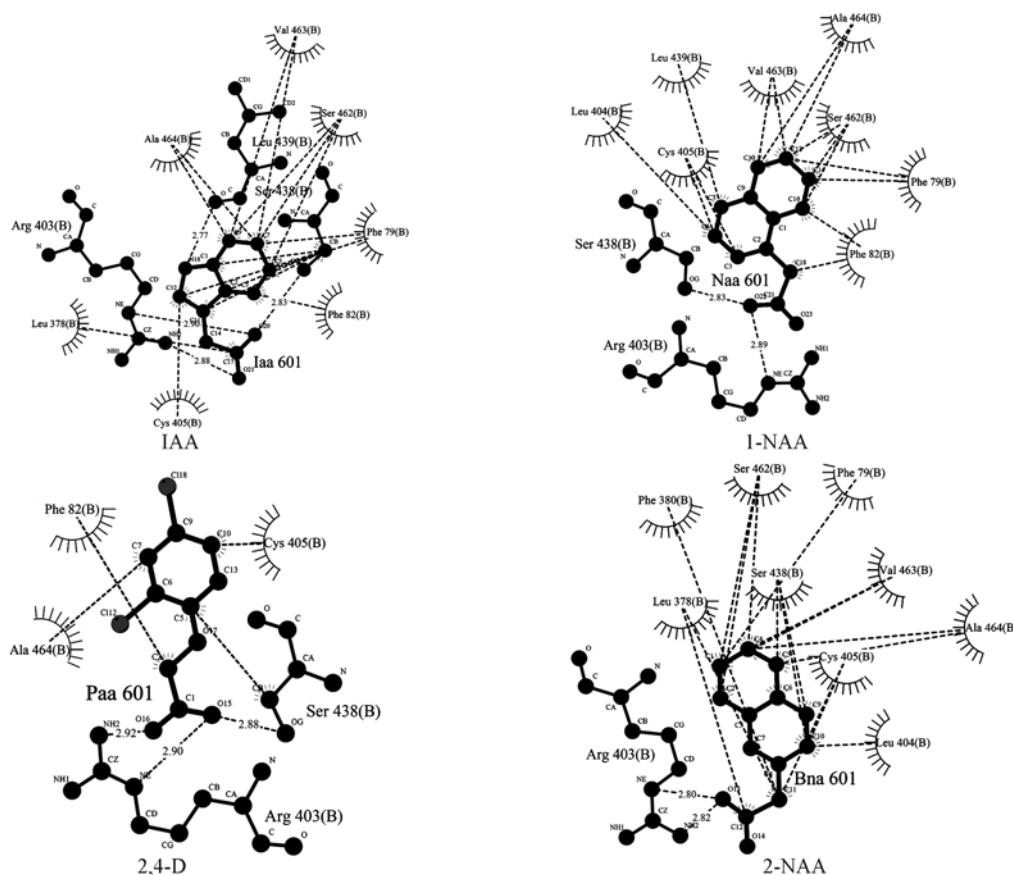


Fig. 8 2D scheme of interactions between auxins and surrounding residues of TIR1 generated by LIGPLOT


 Hydrophobic interaction; the dashed lines represent hydrogen bonds and their lengths.

Table 4 Reside numbers of hydrogen bonds and hydrophobic interaction

Ligand	Number of hydrogen bond	Number of hydrophobic interaction
IAA	4	8
1-NAA	2	8
2,4-D	3	4
2-NAA	2	9

从4种生长素分子与TIR1形成的氢键作用与疏水相互作用上看, IAA与活性位点处的TIR1活性残基之间形成很强的氢键作用和疏水相互作用, 而1-NAA以及2-NAA与TIR1之间的氢键作用则不如IAA, 因此氢键作用作为强的弱相互作用, 对于生长素分子与受体TIR1形成复合物时的稳定性起到十分重要的作用. 对于2,4-D, 虽然也形成了一定的氢键, 但是与TIR1之间的疏水作用成为制约其生长素活性的可能原因.

2.3 对接计算受体TIR1-生长素配体-Aux/IAA底物多肽的相互作用

通过以上对接计算的结果得到生长素分子与TIR1相互作用是在疏水性口袋的底部, 而Aux/IAA多肽覆盖在该活性口袋的顶部. 生长素反应机理中生长素分子直接作用于受体分子TIR1以及底物Aux/IAA多肽, 其作用就像“分子胶水”加强了TIR1与Aux/IAA之间的结合力^[2]. Aux/IAA多肽中一段疏水性很强的基因序列GWPPV直接与生长素分子相互作用. 采用AutoDock 4方法对TIR1-auxin-IAA7体系进行分子对接计算. IAA7是生长素响应蛋白质(Auxin-Responsive Protein), 即一种Aux/IAA底物多肽; 其初始结构来自单晶结构(PDB代码2P1Q), 在单晶结构中标识为C链.

从生长素分子与IAA7的对接结果(图9和表5)我们可以很容易看到Aux/IAA与生长素分子之间主要的相互作用是疏水相互作用. 此外, IAA以及2,4-D分别与IAA7形成氢键作用. 结合TIR1-auxin体系的对接结果, 可以得到IAA与TIR1以及IAA7都有很强的相互作用; 1-NAA与IAA7之间的结合力不如IAA导致其生长素活性较低; 而2,4-D虽然与IAA7的结合能力较强, 不过其与受体蛋白质TIR1之间的疏水作用不强成为制约其生长素活性的关键原因; 2-NAA与TIR1以及IAA7之间都有一定的结合能力, 不过其对接结果往往簇过多, 配体分子与受体蛋白质形成的复合物的稳定性不高.

Table 5 Reside numbers of hydrogen bonds and hydrophobic interaction between auxins and IAA7 substrate

Ligand	Number of hydrogen bond	Number of hydrophobic interaction	Ligand	Number of hydrogen bond	Number of hydrophobic interaction
IAA	1	2	2,4-D	1	2
1-NAA	0	1	2-NAA	0	1

3 结 论

通过比较计算看出, AutoDock4实现的受体大分子活性残基的柔性对接所模拟的体系更为接近实际体系. 实验中采用AutoDock4分别对于IAA, 1-NAA, 2,4-D, 2-NAA与生长素受体蛋白质TIR1以及生长素响应蛋白质IAA7多肽进行对接计算. 生长素分子IAA以及1-NAA与受体分子TIR1结合的复合物的稳定性要大于2,4-D和2-NAA, 并且2,4-D与2-NAA表现出弱的抑制生长素活性. 而且生长素分子与TIR1之间有很强的弱相互作用, 即氢键作用、范德华相互作用以及溶剂化作用, 并且与IAA7主要形成疏水相互作用. 强的氢键作用使得IAA与TIR1之间有更强的亲和作用; 而制约2,4-D与TIR1之间的结合力的重要因素可能是疏水相互作用. 生长素分子作为“分子胶水”与TIR1以及Aux/

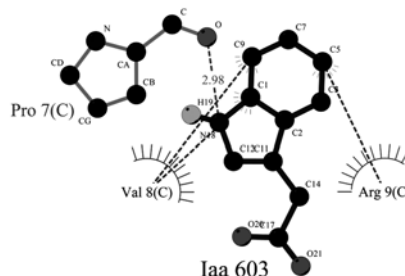


Fig. 9 2D scheme of interactions between auxins and surrounding residues of IAA7 generated by LIGPLOT

Hydrophobic interaction; the dashed lines represent hydrogen bonds and their lengths.

IAA 分别形成很强的疏水相互作用, 大大加强了 TIR1 与 Aux/IAA 之间的结合. 因此, 氢键作用与范德华作用很可能是影响生长素反应机理的重要因素. 目前针对生长素的作用机理的研究仍然在进行, 生长素反应这个复杂的生命过程有待于进一步的探索. 而生长素分子与受体大分子之间的弱相互作用是进一步研究生长素反应机理的一个方向.

参 考 文 献

- [1] Callis J. . Nature[J], 2005, **435**: 436—437
- [2] Guilfoyle T. . Nature[J], 2007, **446**: 621—622
- [3] Napier R. . Annals of Botany[J], 2004, **93**: 227—233
- [4] Dharmasiri N. , Dharmasiri S. , Estelle M. . Nature[J], 2005, **435**: 441—445
- [5] Kepinski S. , Leyser O. . Nature[J], 2005, **435**: 446—451
- [6] Tan X. , Estelle M. , Zheng N. , *et al.* . Nature[J], 2007, **446**: 640—645
- [7] Guex N. , Peitsch M. C. . Electrophoresis[J], 1997, **18**: 2714—2723
- [8] Frisch M. J. , Trucks G. W. , Schlegel H. B. , *et al.* . Gaussian 03, Revision C. 01[CP], Wallingford CT: Gaussian, Inc. , 2004
- [9] Tomić S. , Gabdouliline R. R. , Kojić-Prodić B. , *et al.* . J. Comput. -Aided Mol. Design[J], 1998, **12**: 63—79
- [10] Morris G. M. , Goodsell D. S. , Halliday R. S. , *et al.* . J. Comput. Chem. [J], 1998, **19**: 1639—1662
- [11] Morris G. M. , Goodsell D. S. , Halliday R. S. , *et al.* . J. Comput. Chem. [J], 1998, **14**: 1639—1662
- [12] Huey R. , Morris G. M. , Olson A. J. , *et al.* . J. Comput. Chem. [J], 2007, **28**: 1145—1152
- [13] Morris G. M. , Huey R. , Lindstrom W. , *et al.* . J. Comput. Chem. [J], 2009, **00**: 001—007
- [14] Wallace A. C. , Laskowski R. A. , Thornton J. M. . Protein Engineering[J], 1995, **8**: 127—134

Docking to Explore the Interactions Between the Receptor TIR1 and Four Auxin Plant Hormones

JIA Xue-Bing, WANG Teng, SUN Hong-Wei *

(College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract In this study, according to the classification and activity of auxin plant hormones the authors carry out docking experiments with four auxins, IAA, 1-NAA, 2,4-D, 2-NAA, and the receptor. The docking experiments are implemented step by step. First, the significant of co-factor InsP₆ and center water in the mechanism of auxins are explored by docking; second, the experiments that compared with the docking results of two situations involving fully rigid and selective flexible of active residue of the receptor TIR1 illuminate that selective flexibility docking by AutoDock4 reports more rational results, so that, AutoDock4 dockings are implemented with TIR1-Auxins; third, AutoDock4 docking by TIR1-Auxins-Aux/IAA illuminates that auxin as a molecular glue enhances the interaction between TIR1 receptor and Aux/IAA substrate by the weak interactions, such as hydrogen bond and hydrophobic interaction, furthermore, the weak interactions between receptor protein and ligands greatly influence on auxin activity of auxin ligands.

Keywords Docking; Auxin; F-box protein TIR1; Hydrogen bond; Hydrophobic interaction