

角鲨烯合成酶抑制剂的高通量虚拟筛选

詹冬玲¹, 韩葳葳², 刘景圣¹

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 长春 130118; 2. 吉林大学 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130012)

摘要:以 SQS 抑制剂 CP-320473 为先导物, 在 60% 结构相似性的基础上, 先通过 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 再选取结合能量最低的新化合物进行分子对接研究. 结果表明: zinc_8442249 比先导化合物 CP-320473 的抑制效果更好; SQS 活性位点的 Lys52 通过与氢键与抑制剂结合, 在抑制过程中具有重要作用.

关键词:角鲨烯合成酶; 高通量虚拟筛选; 分子对接; 抑制剂

中图分类号: Q66 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2012)02-0361-04

High-Throughout Screening with Computer of a New Inhibitor of Human Squalene Synthase

ZHAN Dong-ling¹, HAN Wei-wei², LIU Jing-sheng¹

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: On the basis of a structural similarity of 60%, we took the SQS inhibitor CP-320473 as a lead compound to perform molecular docking by AutoDock Vina. In the end, the new compound with the lowest binding energy with SQS was selected for further investigation. The docking results show that the new compound (named zinc_8442249) is a better inhibitor than CP-320473. Lys52 is important in inhibition as it forms a hydrogen bond.

Key words: squalene synthase; high-throughout screening; docking; inhibitor

角鲨烯合成酶(SQS)是人体内胆固醇合成、代谢中的一种重要酶, 它能催化两分子法呢基二磷酸(FPP), 经还原性二聚作用, 产生中间体前角鲨烯二磷酸. 在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的还原作用下, 前角鲨烯二磷酸生成角鲨烯, 再经进一步反应生成胆固醇^[1-2]. 因此, 抑制 SQS 的活性, 就能减少角鲨烯的生成量, 从而降低胆固醇水平; 同时角鲨烯合成酶的催化反应在合成类异戊二烯的分支途径后, 所以 SQS 抑制剂对类异戊二烯的合成没有影响. 因此, SQS 已成为治疗高脂血症和冠状动脉心脏病的作用靶点, 其抑制剂的研究已成为降血脂药物研制的重要方向^[3]. 目前已研发的 SQS 小分子抑制剂均存在不同程度的毒副作用, 因此有待于进一步的化学修饰. 计算机辅助药物设计依据对分子理化性质如分子极性、所带电荷、水溶性和分配系数等参数的计算分析, 可以在计算机上方便、快捷地建造、分析和修改分子结构, 并利用三维技术实时显示其立体结构, 推算出各种低能构象, 进行构象分析与酶模型相结合, 对药物分子进行定量设计. 根据软药原理对先导化合物进行结构改造,

收稿日期: 2011-08-08.

作者简介: 詹冬玲(1977—), 女, 汉族, 博士, 讲师, 从事生物化学的研究, E-mail: zdlgale@126.com. 通讯作者: 韩葳葳(1973—), 女, 汉族, 博士, 副教授, 从事计算生物学的研究, E-mail: weiweihan@jlu.edu.cn; 刘景圣(1964—), 男, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 从事食品资源深加工的研究, E-mail: liujsl007@vip.sina.com.cn.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 31070638)和吉林省自然科学基金(批准号: 201015109).

先获得候选化合物,再通过系统软件对分子的理化参数进行分析,确立筛选依据,可获得安全有效的药物分子.

本文以角鲨烯合成酶(SQS)^[4](PDB code 1EZf)的一种抑制剂 N-{2-[反-7-氯-1-(2,2-二甲丙基)-5-萘亚甲基-2-氧代-1,2,3,5-四氢苯并[1,4-氧杂吡庚因]-乙酰}-天门冬氨酸(CP-320473)结构作为先导化合物,使用 AutoDock Vina 软件^[5]进行高通量虚拟筛选,以寻找高效低毒的新抑制剂化合物.

1 理论方法

先以 CP-320473 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 AutoDock Vina 软件^[5-6]对这些化合物进行虚拟筛选.用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,利用其 grid box 把网格的间隔设为 1,最后得到能量得分最低的小分子.选取能量最低的化合物(zinc_8442249),用 Gaussian03PM₃ 方法将其进行结构优化^[7-8].

Affinity^[9]是商业的半柔性分子对接程序,在对接过程中,底物与设定的酶部分残基可以移动,酶的其他部分则固定不动.在 Monte Carlo 构象搜寻步骤中,将默认的 100 步最小化提高到 1 000 步,每个搜寻到的构象会在 298 K 的恒温条件下做 1 000 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分子对接研究的对象.

本文采用 Ludi 打分系统,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药物的先导化合物.Ludi 打分可以评估受体和配体的结合强弱.

2 结果与讨论

2.1 高通量虚拟筛选

角鲨烯合成酶具有完全的 α 螺旋构象,螺旋分 3 层,结构如图 1 所示.由图 1 可见,整个蛋白只有一个结构域,中间有个通道凹槽,而 CP-320473 位于凹槽中间.

以 CP-320473 为先导化合物,采用 60% 的结构相似度,通过建立的筛选策略进行筛选,从 zinc 数据库的 1 300 多万小分子中筛选出 100 个小分子,使用 AutoDock Vina 软件对这 100 个小分子分别与角鲨烯合成酶进行分子对接.最终得到能量得分处于前 8 位的小分子,结果列于表 1.筛选出来的 8 种小分子与 SQS 酶复合物的对接如图 2 所示;筛选出来 8 种小分子抑制剂的结构如图 3 所示.

表 1 配体对接得分排名

Table 1 A ranked score of docked ligands

配体	zinc_8442249	zinc_8442247	zinc_8442261	zinc_8442243	zinc_8442245	zinc_8442248	zinc_8442242	zinc_8442260
得分	-12.2	-11.9	-11.5	-11.5	-11.5	-11.5	-11.2	-11.0

综上所述,选择能量得分最低的小分子抑制剂 zinc_8442249(分子式为 C₃₀H₃₀ON₂),对其进一步研究.

2.2 分子对接

先通过 Binding-Site 模块进行抑制剂部位的搜索,结合已知的实验数据,预测 SQS 抑制剂结合位点的残基,包括 Thr50-Phe54 和 Tyr73;再用 Gaussian03 PM₃ 方法对 CP-320473 和新抑制剂 zinc_8442249 进行结构优化;最后用 Affinity 软件对接.表 2 列出了这两种抑制剂与酶的相互作用能.由表 2 可见,CP-320473 与酶的相互作用能(-57.53 kJ/mol)比 zinc_8442249 与酶的相互作用能(-163.65 kJ/mol)高,表明后者与酶形成的复合物更稳定,不易脱去,能更好地抢占空间,抑制酶的催化反应发生.Ludi 的得分(CP-320473: 499; zinc_8442249: 751)也说明 zinc_8442249 是更好的抑制剂.

表 2 抑制剂与 SQS 对接的总能量、范德华力、静电作用力和 Ludi 得分

Table 2 Total energy(E_{total}), van der Waal energy(E_{vdw}) and electrostatic(E_{ele}) between inhibitors and SQS with Ludi score

配体	$E_{vdw}/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$E_{ele}/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$E_{total}/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	Ludi 得分
zinc_8442249	-75.16	-88.49	-163.65	751
CP-320473	-55.47	-2.06	-57.53	499

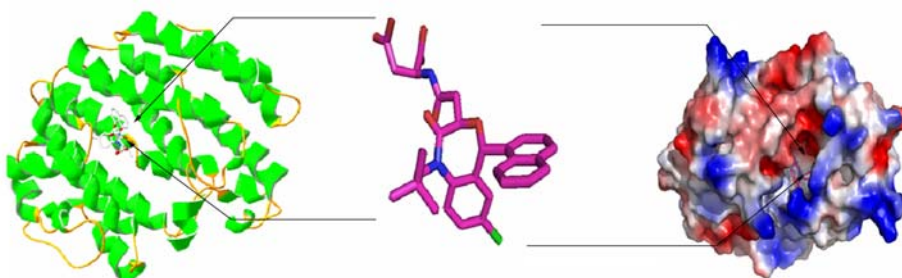


图1 CP-320473-SQS 复合物

Fig.1 CP-320473-SQS complex

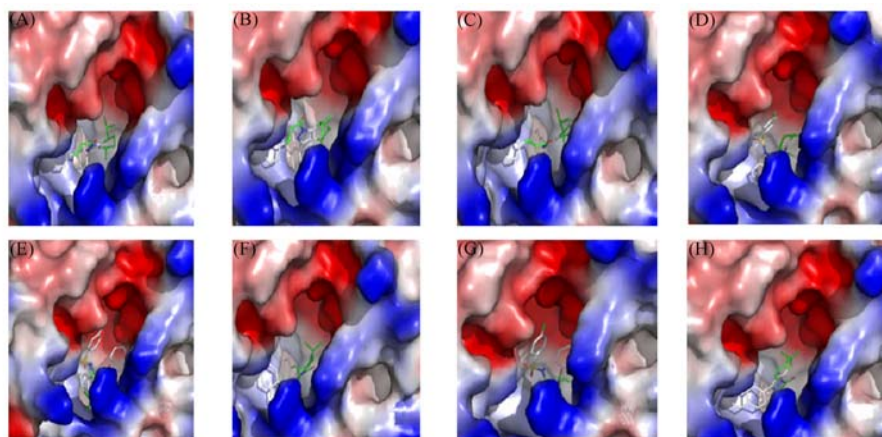


图2 8种抑制剂-SQS复合物

Fig.2 Eight docked inhibitor-SQS complexes

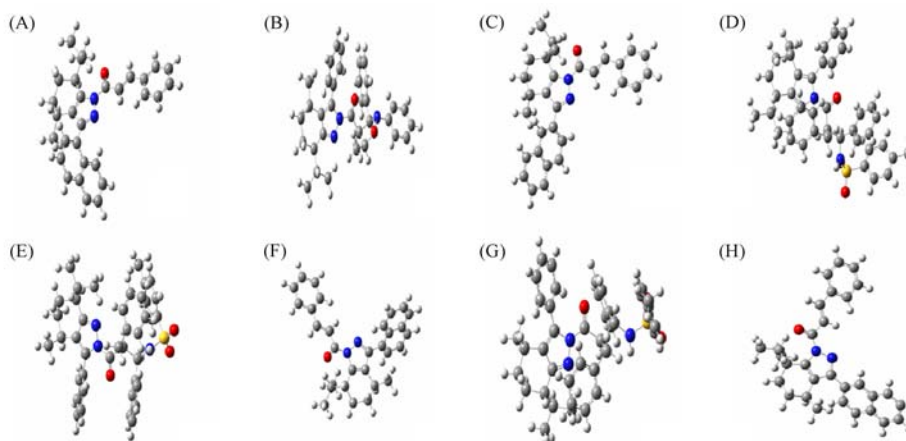


图3 8种抑制剂的3D结构

Fig.3 3D structure of eight inhibitors

氢键对分子的结构和功能,尤其是酶与抑制剂的结合过程具有重要作用.图4为SQS活性位点的部分残基与zinc_8442249的作用结果.由图4可见,zinc_8442249羟基上的氧与K52的咪唑部分形成2个氢键,因此K52具有稳定zinc_8442249的作用.K52残基位于凹槽的中心部位,是高度保守的,因此在SQS中具有稳定抑制剂的作用.

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SQS的口袋较大,涉及的氨基酸残基较多,与zinc_8442249之间的总相互作用能小于 -3 kJ/mol的残基及其相互作用能列于表3.由表3可见,Lys52与SQS形成氢键的残基相互作用能特别是静电相互作用较大.Pandit等^[4]认为,SQS的中心凹槽埋于里面,只有一个瓣状的尾部露在外面,周围都是疏水的残

基. 由表3可见, Ser51, Ser53, Phe54 和 SQS 残基的静电相互作用很大, 计算结果与实验相符. Phe73, Arg77, Ile215, Arg218, Ala57, Val58 也与抑制剂有较大的静电相互作用; Tyr179, Leu211, Pro292, Leu183, Phe288 与抑制剂的相互作用主要是库仑力.

综上所述, 从氢键和相互作用能两方面看, SQS 活性位点的 Lys52 对抑制剂 zinc_8442249 都具有重要作用.

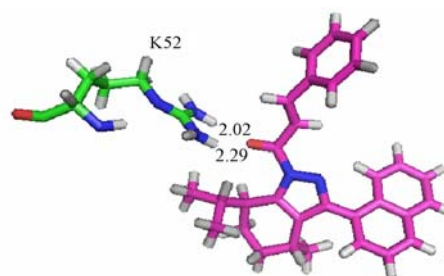


图4 zinc_8442249 与 SQS 间的氢键

Fig. 4 Hydrogen bond between zinc_8442249 and SQS

表3 H-89-1 与 SQS 部分位点氨基酸残基的作用总能量、范德华力和静电作用力

Table 3 Total energy (E_{total}), van der Waal energy (E_{vdw}) and electrostatic (E_{ele}) between H-89-1 and each of individual residues of SQS

残基	$E_{vdw}/$ (kJ · mol ⁻¹)	$E_{ele}/$ (kJ · mol ⁻¹)	$E_{total}/$ (kJ · mol ⁻¹)	残基	$E_{vdw}/$ (kJ · mol ⁻¹)	$E_{ele}/$ (kJ · mol ⁻¹)	$E_{total}/$ (kJ · mol ⁻¹)
Ser51	-5.87	-37.73	-31.86	Leu211	-5.64	-0.54	-6.18
Phe73	-7.86	-18.50	-26.36	Arg218	-0.15	-5.56	-5.71
Phe54	-7.57	-15.43	-23.00	Pro292	-3.53	-1.99	-5.52
Ser53	-1.18	-19.24	-20.42	Leu183	-3.49	-1.49	-4.98
Arg77	-2.91	-16.54	-19.45	Phe288	-5.62	1.39	-4.23
Ile215	-2.55	-7.64	-10.19	Ala57	-0.23	-3.22	-3.45
Arg52	-2.93	-6.74	-9.67	Val58	-0.59	-2.51	-3.43
Tyr179	-5.70	-1.27	-6.98				

参 考 文 献

- [1] Urbina J A, Concepcion J L, Caldem A, et al. In Vitro and in Vivo Activities of E5700 and ER-119884, Two Novel Orally Active Squalene Synthase Inhibitors, against *Trypanosoma cruzi* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2379-2387.
- [2] Ishihara T, Kakuta H, Moritani H, et al. Syntheses of 3-Ethylidenequinuclidine Derivatives as Squalene Synthase Inhibitors. Part 2: Enzyme Inhibition and Effects on Plasma Lipid Levels [J]. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11(17): 3735-3745.
- [3] Ishihara T, Kakuta H, Moritani H, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Quinuclidine Derivatives Incorporating Phenothiazine Moieties as Squalene Synthase Inhibitors [J]. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 2004, 52(10): 1204-1209.
- [4] Pandit J, Danley D E, Schulte Gle, et al. Crystal Structure of Human Squalene Synthase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(39): 30610-30617.
- [5] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading [J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
- [6] Huey H, Morris G M, Olson A J, et al. A Semi-empirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation [J]. J Comp Chem, 2007, 28(6): 1145-1152.
- [7] HAN Wei-wei, ZHOU Yi-han, YAO Yuan, et al. Computational Studies on Bergaptol *o*-Methyltransferase from *Ammi majus* L: The Substrate Specificity [J]. Polymer, 2006, 47(23): 7953-7961.
- [8] HAN Wei-wei, LI Ze-sheng, ZHENG Qing-chuan, et al. Toward a Blueprint for β -Primeverosidase from Tea Leaves Structure/Function Properties: Homology Modeling Study [J]. J Theore Com Chem, 2006, 5(1): 433-446.
- [9] HAN Wei-wei, WANG Ye, LUO Quan, et al. Insights into a 3D Homology Model of Arylesterase: The Key Residues upon Protein-Ligand Docking and MM-PBSA Calculations [J]. Journal of Theoretical and Computational Chemistry, 2011, 10(2): 165-177.

(责任编辑: 单 凝)