

# 烟曲霉羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶的三维同源结构建模及其分子对接研究<sup>①</sup>

孙彬<sup>1</sup> 刘敏<sup>1</sup> 侯状<sup>2</sup>

(1.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059;2.沈阳药科大学 制药工程学院,辽宁 沈阳 10016)

**摘要** 探究烟曲霉羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶活性位点的结构特征,首次采用同源建模的方法构建了烟曲霉羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶的三维结构,并通过 Ramachandran 和 Profile-3D 图验证了模型的可靠性.然后,利用已知的共结晶配体结构,准确定位了 14 $\alpha$ -去甲基化酶的活性位点,让伏立康唑与靶点进行对接.通过柔性分子对接方法首次阐明了 14 $\alpha$ -去甲基化酶抑制剂与靶酶活性位点的相互作用模式,明确了 14 $\alpha$ -去甲基化酶与该类抑制剂结合时起重要作用的氨基酸残基.本研究为基于烟曲霉 14 $\alpha$ -去甲基化酶三维结构的药物靶点设计提供重要的参考信息,同时也为抗真菌药的发展奠定坚实的理论基础.

**关键词** 真菌感染;烟曲霉;羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶;同源建模;分子对接

**中图分类号** O641

**文献标识码** A

近年来,随着长期和广泛使用各类广谱抗生素、免疫抑制剂,以及环境不断恶化等现实问题,出现致病真菌感染疾病的现象急剧增加,对人类的健康构成了严重威胁<sup>[1,2]</sup>.其中曲霉菌常以寄生腐物的形式广泛存在于自然环境中,已发现能够引起人类感染的曲霉菌约有 20 多种,尤以烟曲霉菌最为常见<sup>[3]</sup>.目前,烟曲霉菌已成为仅次于白色念珠菌的一种广泛存在的条件致病性真菌<sup>[4,5]</sup>.研究发现,它能够代谢产生某些致病成分和毒素引起机体的损伤,同时降低机体的防御能力,以有利于曲霉菌的扩散和感染,长期可以发展成侵袭性曲霉病,严重时甚至会导致死亡<sup>[6]</sup>.麦角甾醇作为真菌细胞膜的重要组成部分,在临床上可以通过阻断麦角甾醇的合成达到治疗该类真菌疾病的目的.通过对麦角甾醇合成机理进行分析发现,限速酶 14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)在麦角甾醇合成过程中发挥十分重要的作用,如果其活性一旦受到抑制,则会阻断麦角甾醇的合成,从而使一些上游组分和有毒中间体(如 14 $\alpha$ -甲基固醇等)在细胞内不断蓄积,最终会导致细胞膜改变和内容物渗出,引起烟曲霉菌死亡<sup>[7]</sup>.

在这些 CYP51 抑制剂中,唑类抗真菌药是一类十分重要的麦角甾醇生物合成抑制剂,如氟康唑、酮康唑、咪康唑等,它们大多已开发多年,能够与 14 $\alpha$ -去甲基酶(CYP51)结合,阻断麦角甾醇的生物合成,其中的伏立康唑在最新公布的治疗侵袭性曲霉真菌疾病的治疗指南中被作为首选用药<sup>[8]</sup>.因此,这些唑类 CYP51 抑制剂在一线抗曲霉真菌治疗中得到了最为广泛的应用,但是这些 CYP51 抑制剂同时存在着易出现肝毒性和耐药性的现象,尤其是对于耐药性的这一缺点,一旦产生,就极难克服<sup>[9,10]</sup>.因此,药物研发人员迫切希望不断探究 CYP51 的活性位点以及与 CYP51 抑制剂的相互作用方式来指导新型 CYP51 抑制剂结构的开发与设计,以解决真菌耐药性和肝毒性问题,这些工作能够有效的帮助我们在治疗真菌性疾病的过程中发挥作用.

在这个研究中,我们选取了曲霉种属中的一种代表性的致病曲霉真菌(烟曲霉菌, *Aspergillus fu-*

① 收稿日期:2018-05-26

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81703357);山东省自然科学基金项目(ZR2017BH102);抗体药物协同创新中心及纳米药物与释物系统工程中心资助

通讯作者:孙彬,男,汉族,博士,副教授,研究方向:药物化学,E-mail:goengoy@163.com.

migatus) 作为研究对象, 利用同源建模的方法首先构建烟曲霉菌 CYP51 的三维晶体结构, 并进行分子动力学模拟, 然后对选择的最终模型进行验证, 最后通过分子对接的方法考察了 CYP51 抑制剂<sup>[11,12]</sup>与烟曲霉菌 CYP51 的结合模式, 以期为基于烟曲霉菌 CYP51 靶点的药物设计开发提供思路。

## 1 方法与材料

### 1.1 设备与仪器

所有的研究均在 Dell Precision 工作站上进行, 主要包括同源建模、分子动力学优化、同源模型验证以及分子对接等工作。相关程序为 Discovery Studio 3.0-Create Homology Models, SYBYL-Modeller<sup>[9]</sup>, Simulation protocols 和 LibDock<sup>[13,14]</sup>。

### 1.2 同源建模

首先需要确定烟曲霉菌 CYP51 的氨基酸一级结构序列, 在这个研究中我们选择了瑞士生物信息研究所的“蛋白专家分析系统”(www.expasy.org)作为信息来源, 用“Cytochrome P450 14- $\alpha$  sterol demethylase”作为关键词进行搜索氨基酸数据库(Swiss-Prot/TrEMBL), 可以得到烟曲霉菌 CYP51 的氨基酸结构序列(编号 Q9P8R0)<sup>[15]</sup>, 它由 515 个氨基酸残基构成, 其详情如图 1。

Aspergillusfumigatus	M	V	P	M	L	W	L	T	A	Y	M	A	V	A	V	L	T	A	I	L	L	N	V	V	Y	O	L	F	F	R	L	W	N	R	T	E	P	P	M	V	F	H	W	V	F	L	G	S	T	I	S	Y	G	
Aspergillusfumigatus	I	D	P	Y	K	F	F	F	A	C	R	E	K	Y	G	D	I	F	T	F	I	L	L	G	O	K	T	T	V	Y	L	G	V	O	G	N	E	F	I	L	N	C	K	L	K	D	V	N	A	E	E	V	Y	S
Aspergillusfumigatus	P	L	T	T	P	V	F	G	S	D	V	V	Y	D	C	P	N	S	K	L	M	E	O	K	K	F	I	K	Y	G	L	T	Q	S	A	L	E	S	H	V	P	L	I	E	K	E	V	I	D	Y	L	R	D	S
Aspergillusfumigatus	P	N	F	O	G	S	S	C	R	M	D	I	S	A	A	M	A	E	I	T	I	F	T	A	A	R	A	L	Q	G	O	E	V	R	S	K	I	T	A	E	F	A	D	I	Y	H	D	I	D	K	G	F	T	P
Aspergillusfumigatus	I	N	F	M	L	P	W	A	P	L	P	H	N	K	R	D	A	A	H	A	R	M	R	S	I	Y	V	D	I	I	N	Q	R	R	L	D	G	D	K	D	S	Q	K	S	D	M	I	W	N	L	M	N	C	
Aspergillusfumigatus	T	Y	K	N	G	O	O	V	P	D	K	E	I	A	H	M	M	I	T	L	M	A	G	O	H	S	S	S	S	I	S	A	W	I	M	L	R	L	A	S	O	P	K	V	I	E	E	L	Y	Q	E	Q	L	
Aspergillusfumigatus	A	N	L	G	P	A	G	P	D	G	S	L	P	P	L	Q	Y	K	D	L	D	K	L	P	F	H	Q	H	V	I	R	E	T	L	R	I	H	S	S	I	H	S	I	M	R	K	V	K	S	P	L	P	V	
Aspergillusfumigatus	G	T	P	Y	M	I	P	P	G	R	V	L	L	A	S	P	G	V	T	A	L	S	D	E	H	F	P	N	A	G	C	W	D	P	H	R	W	E	N	O	A	T	K	E	Q	E	N	D	E	V	V	D	Y	G
Aspergillusfumigatus	Y	G	A	V	S	K	G	T	S	S	P	Y	L	P	F	G	A	G	R	H	R	C	I	G	E	K	F	A	Y	V	N	L	G	V	I	L	A	T	I	V	R	H	L	R	L	F	N	V	D	G	K	K	G	V
Aspergillusfumigatus	P	E	T	D	Y	S	S	L	F	S	G	P	M	K	P	S	I	I	G	W	E	K	R	S	K	N	T	S	K																									

图 1 The amino acid sequence of Aspergillus fumigatus CYP51

接着选择烟曲霉菌的 14- $\alpha$  去甲基酶(CYP51)一级结构序列作为靶标, 需要进一步的确定烟曲霉菌 14- $\alpha$  去甲基酶(CYP51)的同源模板蛋白结构。在 Search Sequences by Similarity 模块中, 导入蛋白晶体数据库 Protein Date Bank(PDB), 再利用 BLAST-Search 程序进行搜索。选择同源性较高的模板序列利用 Align Sequence to Templates 程序进行序列比对, 确定靶标与模板之间的残基匹配。在保留关键配体的基础上, 利用 Build Homology 模块进行烟曲霉菌 CYP51 三维蛋白模型的构建, 最后在 Macromolecules 的模块下的 Prepare Protein 操作界面上进行加氢、补键等化学修饰, 得到目标蛋白的初始结构模型。

### 1.3 分子动力学模拟、能量优化以及模型评估

将构建的烟曲霉菌 CYP51 同源模型随后进行了分子力学和分子动力学的优化。首先需要对模型的结构进行溶剂化操作, 选择 Simulation/Dynamics 模块下的 Solvation 程序, 将添加的溶剂环境以生理盐水作为标准, 在具体操作中, 先将溶液类型选择为 Salt, 浓度的缺省值设置为 0.145。接着, 对整个同源模型的体系进行束缚, 按照 5 个不同的阶段(优化 I Minimization、优化 II Minimization2、升温 Heating、平衡 Equilibration、模拟采样 Production)进行动力学模拟。最后选择稳定后的同源模型进行评估, 主要包括两种方法: 在进行 Ramachandran plot 评估时, 打开 Chart 菜单, 选择 Ramachandran plot 即可。在进行 Profile-3D 评估时, 首先进行 Verify Protein 模块的运算, 运行完毕后, 选择 the Verify Expected High Score 和 Verify Score 区域, 点击 AminoAcid tab, 滚动至 table 的尾列, 点击 Verify Score 的题标选择整列从 menu 中选择 Chart | Line Plot。

### 1.4 分子对接

为了评估唑类抑制剂和靶酶(CYP51)之间的结合模式, 利用 LibDock 方法进行分子对接研究。首

先将选择的对接分子进行能量优化,找到能量最低的构象作为下一步分子对接的起始构象<sup>[16]</sup>。接着,将构建出的同源模型设置为对接受体,通过选择同源模型中的共结晶配体定义活性位点。最后,在 Dock Ligands 模块中选择 LibDock 程序进行分子对接,在设置中分别导入受体蛋白和对接分子,并确认活性位点,其它值设置为默认值即可。

## 2 结果

### 2.1 同源序列比对结果

在构建烟曲霉 CYP51 的同源蛋白模型的过程中,挑选适合的同源模板(Templates)是构建模型成功的关键。采用 BLAST-Search 相似性序列搜索程序对已知的蛋白数据库(Protein Data Bank, PDB)进行搜索,按照打分排名的模板蛋白,识别出同源性较高的一个或多个模板蛋白。详细结果如图 2 和表 1 所示。

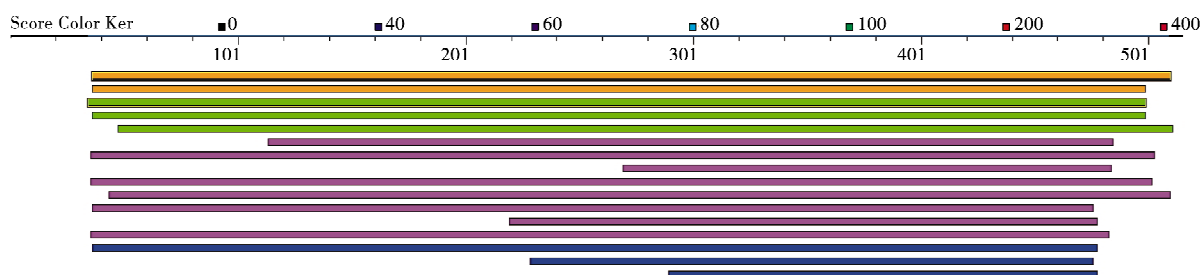


图 2 The BLAST results of *Aspergillus fumigatus* CYP51

表 1 Detailed BLAST results

Accession	Identity	Sequence Length	Bit Score	Positive	E-value	Resolution
3LD6	37%	444	317.005	55	5.25e-87	2.8
3L4D	29%	447	212.616	49	1.44e-55	2.75
2WX2	29%	441	200.675	50	5.26e-52	2.27
3GW9	29%	449	175.252	47	2.60e-44	1.87
2CIB	25%	420	172.555	45	1.71e-43	1.5

按照搜索打分的结果,初步选择了 6 个模板蛋白作为研究对象,它们的 E-value 均小于  $1 \times 10^{-5}$ 。通过对这些模板蛋白的一级序列进行比对发现,这些结构均显示出较高的序列同源性和相近的长度,暗示这些模板蛋白在二级结构和三级结构也具有一定的源性(见表 1)。进一步的分析发现,来自人源性的 14 $\alpha$ -demethylase (Homo sapiens, PDB code: 3LD6)和克氏锥虫的 CYP51(Trypanosoma cruzi, PDB code: 2WX2)在 BLAST 序列比对过程中表现出较高的打分值(317.005, 200.675),同时具有 37%和 29%的序列源性(Sequence identity), E-value 均相对合适,并且分辨率较高。值得注意的是来自克氏锥虫的 CYP51 结晶蛋白(2WX2)带有共结晶配体氟康唑,这为之后活性位点的确立打下了重要的基础。因此,我们最终选择了来自人源性和克氏锥虫的 CYP51 作为烟曲霉菌 CYP51 的同源序列模板。并将这个序列模板与烟曲霉菌 CYP51 的序列进行了多重比对,参数设置选择默认值。如图 3 是多重序列比对结果。

通过不同的颜色对氨基酸残基的保守区域进行划分,浅蓝色代表半保守区域,深蓝色代表保守区域。对烟曲霉菌 CYP51 序列比对结果进行分析发现:它的一级结构序列 104VNAEEVYSPLTTPVFGSDVVY124、188TAARALOGOEVRSKLT203、206EFADLYHDLD KGF218、277LMNCTYKNGOOVPDKIEAHMMI298、358DKLPFHQHVIRETLR373 不仅与同源模板序列表现出较高的序列源性,同时分别对应着活性位点上的关键氨基酸残基。由此可知,活性位点区域的氨基酸残基均表现出一定的保守性,这暗示它们的空间构型可能具有相近的空间分布,从而为烟曲霉菌 CYP51 同源模型的构建打下了理论基础。

### 2.2 同源建模的结果

在构建同源模型的过程中,首先模板蛋白(template)的几何特性会被提取出来,然后利用 PDF(probability density function)函数进行定义,通过对 PDF 函数设置约束条件评价出构建模型的优劣。一

般来说,模型的 PDF Total Energy 参数值越低,说明该模型在同等约束优化条件下表现的越好<sup>[17]</sup>,模型的质量越可靠,其结果如表 2 所示. 因此我们选取 PDP Total Energy 最低的模型 *Aspergillus fumigatus*. M0004 作为最合理的初始模型.

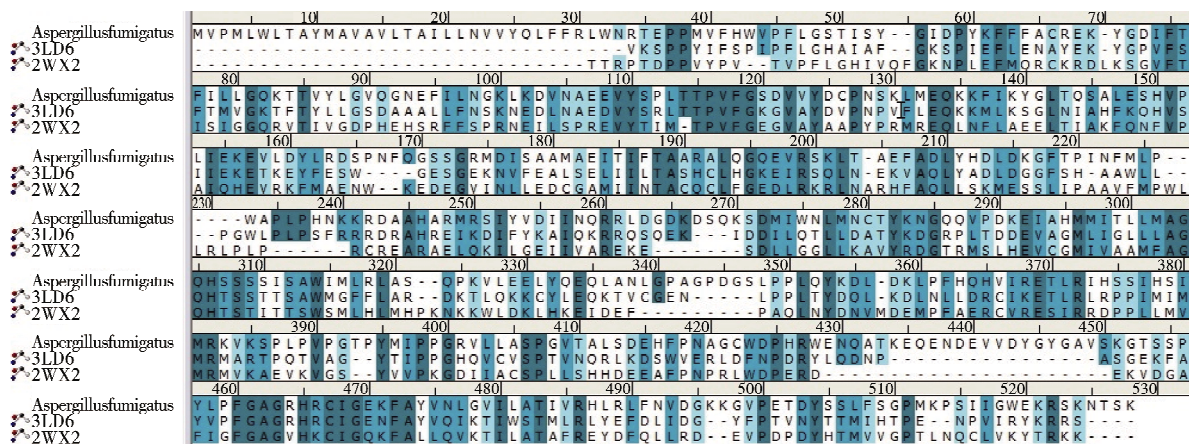


图 3 Sequence alignments of *Aspergillus fumigatus*-, *Homo sapiens* and *Trypanosoma cruzi*-CYP51 with conserved constitution, deep blue; semiconserved constitution, blue

表 2 Model scores

Name	PDF Total Energy	PDF Physical Energy	DOPE Score
<i>Aspergillus fumigatus</i> . M0004	13 982.541 0	1 408.497 2	-52 995.117 2
<i>Aspergillus fumigatus</i> . M0005	14 429.227 5	1 482.965 9	-52 675.011 7
<i>Aspergillus fumigatus</i> . M0002	14 570.584 0	1 589.975 2	-52 399.125 0
<i>Aspergillus fumigatus</i> . M0001	14 958.319 3	2 237.346 9	-53 026.085 9
<i>Aspergillus fumigatus</i> . M0003	15 093.065 4	1 839.084 5	-52 185.757 8

接着,将初始模型进行能量优化和分子动力学模拟,选择了 14 ns-16 ns 对应的结构模型作为最优模型. 因为在此时刻,蛋白质的体系和 RMSD 值分别达到收敛和平衡. 随后,我们将最优结构模型进一步通过拉氏图(Ramachandran)和 Profile\_3D 图进行评估(见图 5 所示). 通过对拉氏图进行分析,处于最佳区域(The most favoured region)和许可区域(Additional allowed regions)的氨基酸残基约占 98.4%,另外还有 1.0%的氨基酸残基处于勉强许可区(Generously allowed regions),而仅有 0.6%的氨基酸残基处于不允许区(Disallowed regions). 值得注意的是模型中处于不允许区的氨基酸残基 Leu226, Ser258 和 Lys483 均分布在远离活性位点区域,对活性位点的空间结构无法产生太大的影响. 而 Profile\_3D 图能够检测出所构建的同源蛋白氨基酸序列是否与其三维结构具有兼容性,实验发现所有残基的分值均在 0.10 以上,具有兼容残基. 以上的验证结果进一步表明构建的烟曲霉 CYP51 同源模型是合理可信的. 模型具体情况如图 4 所示,其空间结构包含有 10 个  $\alpha$  螺旋、8 个  $\beta$  折叠和 9 个  $\gamma$  转角,关键性配体卟啉基团和氟康唑坐落在活性腔区域.

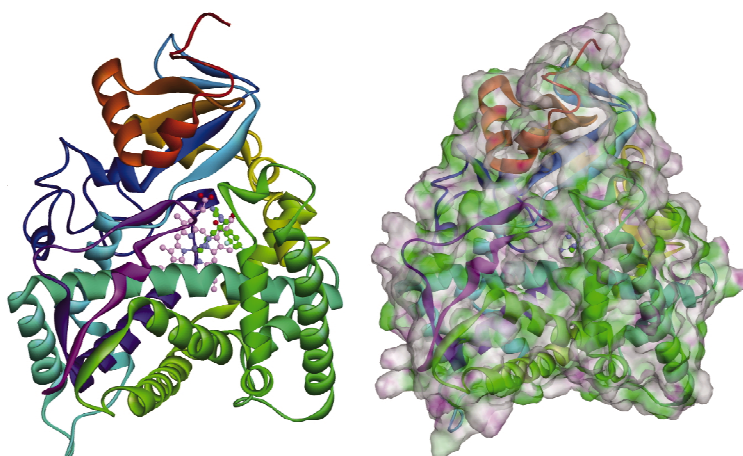


图 4 3D models of *Aspergillus fumigatus* CYP51 by Modeller

### 2.3 伏立康唑与烟曲霉 CYP51 活性位点的相互作用模式

伏立康唑是重要的抗真菌药,在浅层和侵袭性的真菌疾病中均有广泛应用.研究伏立康唑与烟曲霉 CYP51 活性位点的相互作用模式有助于阐明这类唑类化合物与烟曲霉 CYP51 的相互作用机制,为基于烟曲霉 CYP51 靶点的抗真菌抑制剂的发现和结构优化指明方向,同时,也能够为开展全新抗真菌药物设计提供思路.

在建模所得烟曲霉 CYP51 的三维结构基础上,先利用结晶配体氟康唑自动定义出 CYP51 的活性位点,再将伏立康唑对接到活性位点.烟曲霉 CYP51 与抑制剂伏立康唑的对接结果如图 6 所示.

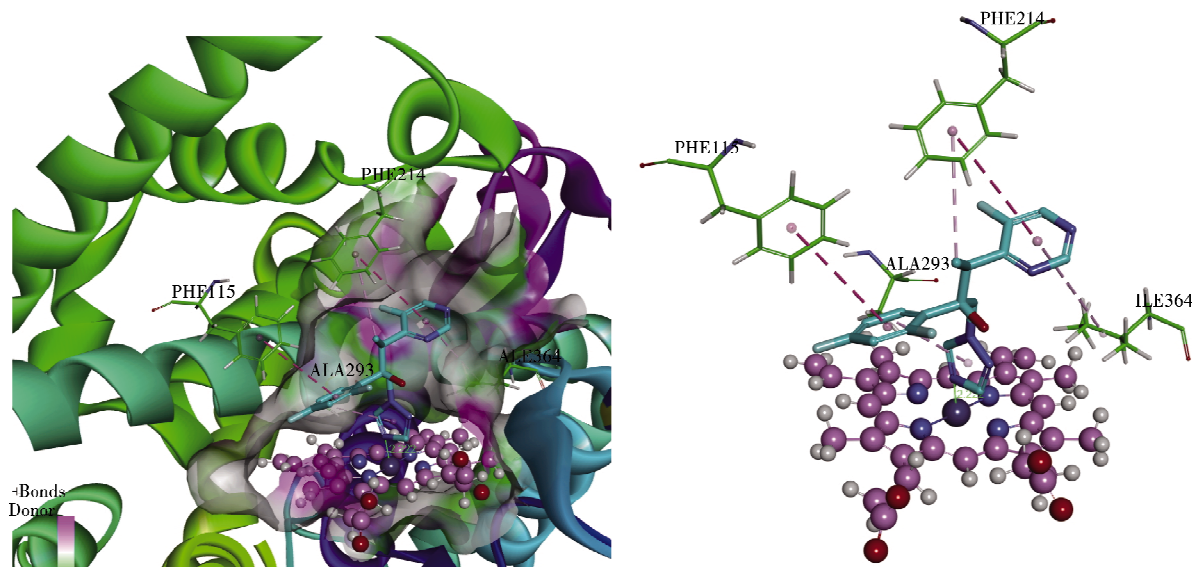
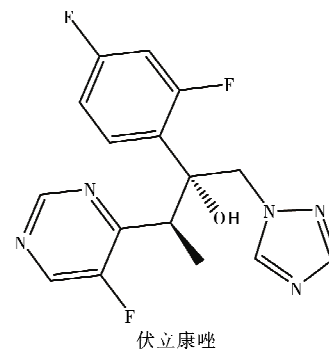


图 6 Docking results of inhibitor voriconazole with *Aspergillus fumigatus* CYP51

通过对结果进行分析可以知道,LibDock Score 的综合打分为 108.302,表明此次的对接结果表现出较大的可信性.在 CYP51 的活性腔周围,广泛分布着疏水性的氨基酸残基,这暗示大多数抑制烟曲霉的唑类化合物表现出疏水的特性.伏立康唑的各部分基团与建模蛋白 CYP51 的结合模式可以划分成 3 个区域:一是唑类基团,它位于活性腔的下部,其中的氮原子可以同位于活性腔底部的血红素形成配位键;二是含氟的苯环基团,它位于活性腔的左下部,能够与疏水氨基酸 Phe118 形成  $\pi$ - $\pi$  相互作用;三是含有甲基取代的嘧啶基团,它位于活性腔的中上部,能够与疏水氨基酸残基 Phe214, Ile364 形成  $\pi$ - $\pi$  相互作用,化合物通过这些疏水作用,进一步增强了化合物与氨基酸残基的结合能力.

## 3 讨论

在这个研究中,按照同源性比对的分析结果,选择来自人源性和克氏锥虫的 CYP51 晶体结构为模板,通过同源建模的方法首次构建了烟曲霉菌 CYP51 的三维蛋白结构,并进行了动力学模拟,最后选择最优的同源模型经 Ramachandran 图和 Profile-3D 图进行验证,其结果都表明模型的合理性.接着将构建的同源模型与 CYP51 唑类抑制剂伏立康唑进行分子对接,其对接结果在分子水平上揭示了配体与受体的结合作用方式.该项研究对于之后进行基于受体的抗真菌 CYP51 抑制剂的药物分子发现和设计等工作具有重要理论指导意义,从而为抗真菌新药的开发打下基础.

## 参 考 文 献

- [1] 戴振国,徐文泉,董华军.抗真菌药的分类及临床应用[J].中国医刊,2007,42(2):58-61.
- [2] 余靓平,谢小云,魏文树,等.抗深部真菌感染药物的特性及临床应用[J].中南药学,2012,10(5):380-384.
- [3] Groll AH, De Lucca AJ, Walsb TI. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics[J]. Trends in Microbiol, 1998, 6 (3): 117-124.

- [4] 南志敏, 王娟, 陈淑云. 烟曲霉感染及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(9): 1320-1320.
- [5] 王菲. 烟曲霉致病因子的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2007, 31(5): 357-359.
- [6] 潘伟华. 抗真菌药物的应用与发展[J]. 世界临床医药, 2014, 35(12): 705-708.
- [7] Xie J, Thellend A, Becker II, et al. Synthesis and evaluation of a C-glycosyl nucleoside as an inhibitor of chitin synthase[J]. Carbohydrate Research, 2001, 334(3): 177-182.
- [8] 张明, 孙文连, 施毅. 烟曲霉对唑类抗真菌药物的耐药性[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(2): 155-159.
- [9] 杨娇艳, 廖明军, 杨劲. 甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)的研究进展[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1681-1688.
- [10] Pfefferle W, Anke II, Bross M, et al. Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Antibiotics, 1990, 43(6): 648-654.
- [11] 孙彬, 刘敏, 赵世振, 等. 白念珠菌几丁质合成酶三维结构的同源建模及其与 FR-900403 的分子对接研究[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(4): 193-197.
- [12] Fiser A, Do RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures[J]. Protein Sci, 2000, 9: 1753-1773.
- [13] 陈凯先, 蒋华良, 嵇汝运. 计算机辅助药物设计—原理、方法及应用[M]. 上海科学技术出版社, 2000.
- [14] 孙彬, 刘敏, 赵世振, 等. 哒嗪酮类(1, 3) - $\beta$ -D-葡聚糖合成酶抑制剂的三维定量构效关系研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2016, 29(3): 39-43.
- [15] Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, et al. The Swiss-Prot protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 365-370.
- [16] 延辉. 七叶苷与牛血清白蛋白相互作用的分子对接研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2014, 27(4): 54-57.
- [17] 王德超. hERG 钾离子通道的药物心脏毒性预测研究[D]. 苏州大学, 2013.

## Homology Modeling of *Aspergillus Fumigatus* CYP51 and Its Molecular Docking Study with Voriconazole

SUN Bin<sup>1</sup> LIU Min<sup>1</sup> HOU Zhuang<sup>2</sup>

(1. Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract** In order to further explore the structural features of the active site of 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of *Aspergillus fumigatus*. Homologous 3D model of *Aspergillus fumigatus* CYP51 was constructed by the protein crystal structure of *Homo sapiens* and *Trypanosoma cruzi*, and the reliability of the model was assessed by Ramachandran plot and Profile-3D analysis. The active site of *Aspergillus fumigatus* CYP51 was defined by the co-crystallized ligand of fluconazole. Finally, the voriconazole was docked to the homology model CYP51. The binding pattern was predicted by the affinity module revealed that important residues interacted with the voriconazole. The study further provided the refinement of CYP51 inhibitor binding interaction that may be used as a basis for new structure-based design efforts and discovery of antifungal agents.

**Key words** fungal infection; *aspergillus fumigatus*; 14 $\alpha$ -demethylase; homology modeling; molecular docking