

• 研究论文 •

脒类 KARI 酶抑制剂的分子对接和 3D-QSAR 研究

王宝雷 王建国 马 翼 李正名* 李永红 王素华

(南开大学元素有机化学研究所元素有机化学国家重点实验室 天津 300071)

摘要 对设计合成的 20 个单脒类化合物的水稻 KARI 酶体外抑制活性和体内除草活性进行了分子对接和三维定量构效关系研究. 前者采用 AutoDock3.0 方法, 研究发现化合物活性变化趋势与分子对接计算结果基本一致, 通过分析化合物 **9** 与 KARI 酶活性氨基酸残基结合模式发现, 残基 Glu319, Asp315, Glu496, Gly253, Met254, Cys517 等对氢键和静电相互作用以及疏水作用都有重要贡献; 后者研究采用比较分子力场分析(CoMFA)方法, 结果表明立体场和静电场对活性的贡献分别为 67.8% 和 32.2%, 交叉验证系数 $r_{cv}^2 = 0.774$, 非交叉验证 $r^2 = 0.999$, $F = 1593.134$, 标准偏差 $s = 0.036$, 所建立的 3D-QSAR 模型对化合物除草活性具有较好的预测能力. 两种方法研究结果为进一步设计合成更高活性的 KARI 酶抑制剂提供了指导.

关键词 KARI 酶; 分子对接; 三维定量构效关系

Molecular Docking and 3D-QSAR Research of Amidines of KARI Inhibitor

WANG, Bao-Lei WANG, Jian-Guo MA, Yi

LI, Zheng-Ming* LI, Yong-Hong WANG, Su-Hua

(National Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Institute of Elemento-Organic Chemistry,
Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The molecular docking and three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) of 20 monoamidine compounds synthesized were studied according to their rice KARI inhibitory (*in vitro*) and herbicidal (*in vivo*) activity. For the former, an AutoDock3.0 method was used. It was found that the trend of activity change of compounds is accordant with the results from AutoDock calculations. The binding pattern of compound **9** with KARI active residues was also analyzed, and the result shows that several residues (Glu319, Asp315, Glu496, Gly253, Met254, Cys517, etc.) have very important effect on hydrogen bond, electrostatic and hydrophobic interactions. For the latter, the comparative molecular field analysis (CoMFA) was adopted. The result shows that the contributions of steric and electrostatic fields to the activity are 67.8% and 32.2% respectively. The cross-validated r_{cv}^2 and the relation coefficient r^2 for the model established are 0.774 and 0.999 respectively, with the F value of 1593.134 and the standard deviation (s) of 0.036. The result indicates that the 3D-QSAR model is significant and has good predictability. The research results provided useful guidance for designing more potent KARI inhibitors prior to their synthesis.

Keywords KARI; molecular docking; three-dimensional quantitative structure-activity relationship

Ketol-acid reductoisomerase (KARI)同 ALS 酶一样 是支链氨基酸生物合成途经中的一个关键酶, 也可作为

* E-mail: nkzml@nk.sina.net

Received September 14, 2005; revised October 17, 2005; accepted March 9, 2006.

国家重点基础研究发展计划(No. 2003CB114406)和科技部国际合作重点(No. 2004DFA01500)资助项目.

绿色除草剂的作用靶点, 目前据此来设计此类抑制剂的研究不多见^[1]. 迄今为止, 所报道的 KARI 酶抑制剂种类和数量稀少^[2~4], 这些抑制剂表现的共性是对离体 KARI 酶(*in vitro*)具有较高的抑制活性, 而对植株活体(*in vivo*)抑制微弱. 因此 KARI 酶抑制剂的研究空间较为广阔. 我们曾在 KARI 酶复合物晶体结构基础上进行计算机辅助分子设计^[5], 通过虚拟筛选的方法发现了一个新颖结构的 KARI 酶抑制剂双脒 **A**(图 1), 并在其结构基础上进行了改造和优化, 设计合成出一系列活性较好的单脒类化合物(**1~20**, 图 1). 为了进一步研究其构效关系以设计并寻找更高活性的 KARI 酶抑制剂, 本文同时从生物受体和小分子抑制剂出发来进行直接和间接药物设计研究, 对设计合成的 20 个 KARI 酶抑制剂化合物进行了分子对接和三维定量构效关系研究(3D-QSAR), 其中前者采用 AutoDock3.0 方法, 后者采用目前广泛使用的比较分子立场分析(CoMFA)方法. 研究结果将为今后的 KARI 酶抑制剂设计工作提供参考信息.

1 研究方法

分子对接法是基于生物受体三维结构的药物设计方法之一, 是将小分子配体放置于受体的活性位点处, 并寻找合理的取向和构象使得配体与受体的形状和相互作用达到最佳匹配. 配体和受体的结合强弱取决于结合过程中自由能的变化, 如 Eq. (1)所示^[6]:

$$\Delta G_{\text{binding}} = RT \ln k_i \quad (1)$$

其中, k_i 是药物与受体的结合常数. 配体与受体的相互作用包括静电作用($E_{\text{electrostatic}}$)、范德华作用(E_{vdw})和氢键相互作用($E_{\text{H-bond}}$), 其中氢键作用部分可以包含在静电作用能中. 目前有多种程序, 如 DOCK^[7], GOLD^[8], FlexX^[9], AutoDock^[10]等可用于此类研究. 本文工作采用 AutoDock 分子对接程序. AutoDock^[11,12]是 Olson 小组开发的一个快速柔性配体整体分子自动对接程序. 3.0 以前版本采用经验势函数为评价函数, AutoDock3.0 开始采用经验结合自由能为评价函数. 该程序考虑了小分子

配体的柔性, 在进行配体取向和构象搜寻时, 采用模拟退火(stimulated annealing, SA)和 Lamarckian 遗传算法(LGA)来寻找最优结合取向和构象, 计算结果较为准确可靠, 得到了广泛的应用. AutoDock 的特点是可以计算结合自由能, 对接一个典型的药物分子大约需要 15 min, 虽然不适用于较大数据库搜寻, 但对于本文中的系列脒类分子的对接是可行的, 而且运算结果有望更为精确.

CoMFA 方法是研究系列化合物三维定量构效关系最为标准和通用的方法. 其基本原理是: 系列化合物由于结构相似, 往往以相同方式作用于受体的结合部位, 配体和受体之间存在着非键相互作用力, 其作用强弱的变化来自于每个化合物周围分子静电场和立体场的变化. CoMFA 能够充分考虑分子的三维结构信息, 通过计算分子周围一定范围内三维空间中假想网状格点上的立体场和静电场参数, 再用偏最小二乘法(PLS)寻找这些三维特征信息与化合物活性的联系. 这是一种基于小分子结构的间接药物设计方法, 我们试图从 20 个化合物的除草活性数据入手来进行归纳统计分析, 找到较为可靠的优化模型, 以此作为指导来设计活性更高的 KARI 酶抑制剂.

本论文的研究工作采用 Tripos 公司的 Sybyl 6.9 软件包, 在 SGI Fuel 工作站上完成. 水稻 KARI 酶离体抑制试验在澳大利亚昆士兰大学 Duggleby 教授分子生物学实验室完成. 对于活体除草活性测试采用常用的油菜平皿法和稗草小杯法^[13]在南开大学生测室完成. 油菜法除草活性测试结果见表 1.

1.1 AutoDock3.0 分子对接研究

将 20 个合成的分子及双脒分子 **A** 在 Sybyl 中构建 MOL2 数据库, 并给分子加氢、加电荷. 其中电荷采用的是 Gasteiger-Marsili 电荷. KARI-IpOHA 复合物晶体结构在蛋白质数据库(PDB)中的序号是 1yve^[14], 是一个双二聚体, 即有四个单体, 分别为 I, J, K, L 四条链, 为处理方便, 删除了其中的 J, K, L 三条链及其包含的抑制剂 IpOHA, 删除所有 NADPH, Mg^{2+} 及 H_2O , 进而对

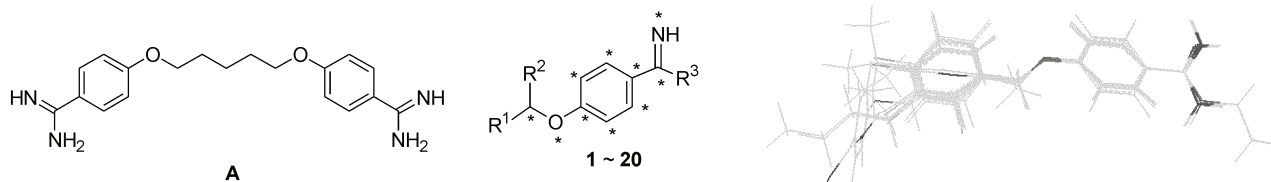


图 1 KARI 酶抑制剂的分子结构和化合物分子的叠合方式

Figure 1 The structure of KARI inhibitor and superposition modes of compounds

表 1 化合物 A 和 1~20 的生物活性数据
Table 1 Biological activity data of compounds A and 1~20

Compd.	R ¹	R ²	R ³	<i>In vitro</i> activity <i>k_i</i> on rice KARI/ (10 ⁻⁶ mol•L ⁻¹)	<i>In vivo</i> activity/(% inhibition)	
					Rape root test (10 μg•mL ⁻¹)	Rape root test (100 μg•mL ⁻¹)
1	H	H	NH ₂	>2085.1	6.9	48.5
2	CH ₃	H	NH ₂	>1905.2	18.5	57.1
3	CH ₃	CH ₃	NH ₂	>1666.8	34.2	76.2
4	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	NH ₂	3531.0±581.6	44.9	94.0
5	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂	H	NH ₂	1359±125.7	53.4	95.2
6	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₂	H	NH ₂	190.0±83.4	20.4	94.0
7	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH ₂	H	NH ₂	61.0±21.0	30.1	96.3
8	CH ₂ =CH	H	NH ₂	>1711.3	17.2	73.7
9	2,4-Cl ₂ Ph	H	NH ₂	142.4±11.4	33.7	95.2
10	2-Py	H	NH ₂	>649.1	0	44.6
11	<i>m</i> -Cl-Ph	H	NH ₂	213.4±19.27	31.9	95.2
12	<i>o</i> -F-Ph	H	NH ₂	964.9±83.87	28.0	87.3
13	<i>p</i> -Cl-Ph	H	NH ₂	411.7±47.31	19.0	92.1
14	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₂	H	OCH ₂ CH ₃	—	0	3.2
15	Ph	H	OCH ₂ CH ₃	—	0	9.1
16	<i>m</i> -Cl-Ph	H	OCH ₂ CH ₃	—	0	14.3
17	CH ₃ CH ₂	H	NH ₂	>1665.1	30.3	88.5
18	Ph	H	NH ₂	>1379.8	35.1	95.2
19	<i>p</i> -(CH ₃) ₃ C-Ph	H	NH ₂	—	0	7.1
20	2,4-Cl ₂ Ph	H	OCH ₂ CH ₃	—	0	2.5
A	—	—	—	382.4±25.5 ^a	62.9	90.9

^a *k_i* on *E. coli* KARI.

lyve 单链加氢原子(essential only)和加载电荷(kollman all). 对接时选取原复合物中 IpOHA 的结合部位为活性位点中心, 产生大小为 6 nm×6 nm×6 nm 的盒子, 步长(spacing)为 0.0375 nm, 对接采用计算最为准确的 Lamarckian 遗传算法(LGA), 每个化合物产生 10 个对接构象, 根据每个构象的结合方式和结合能选择合适的构象进行研究. 其余计算参数采用程序默认值. 计算结果见表 2, 其中 E_{dock} 为对接的能量, 是分子间作用能和小分子内能之和. E_{inter} 为分子间相互作用能, E_{tors} 为配体的扭转自由能. ΔG 是预测的结合自由能($T=298.15$ K).

1.2 CoMFA 研究

本文采用活性因子作为活性数据进行构效关系研究, 活性因子 $D^{[15]}$ 可由 Eq. (2) 计算得到:

$$D = \lg[a/(100-a)] + \lg M \quad (2)$$

a 是化合物在 100 μg/mL 浓度时对油菜胚根生长的抑制百分率, M 为化合物的分子量.

选取活性因子较高的化合物 9 用 Tripos 力场进行优化, 优化时采用 Powell 方法, 加载 Gasteiger-Marsili 电荷优化 500 轮, 直至达到能量差值为 4.18×10^{-3} kJ•mol⁻¹ 的收敛标准. 分子力场计算以 +1 价 sp³ 杂化的碳原子作为探针, 步长为 0.2 nm, 其余参数均为缺省值. 优化后的构象作为活性构象, 也是模板分子, 其它化合物在此基础上进行取代基变换再优化而得, 从而构建分子库. 叠合时选取图 1 中*标记的原子用 Fit atoms 操作对所有化合物进行叠合.

在 CoMFA 中, 选取移动步长(Grid spacing) 0.2 nm, 采用 tripos 标准力场, 场类型为静电场和立体场, 介电常数与距离有关, 阈值为 30 kJ•mol⁻¹, 其余各参数均用系统默认值得到分子场.

表 2 化合物 AutoDock 与 3D-QSAR 计算结果
Table 2 Calculated results of compounds for AutoDock and 3D-QSAR

No.	AutoDock				3D-QSAR			
	E_{dock}^a	E_{inter}^a	E_{tors}^a	ΔG^a	CoMFA	ED ^b	CoMFA PD ^c	Residue
1	-7.67	-7.82	1.25	-6.57	66	2.150	2.122	0.028
2	-8.31	-8.47	1.56	-6.91	74	2.339	2.399	-0.060
3	-8.27	-8.63	1.56	-7.08	82	2.756	2.747	0.009
4	-9.52	-9.59	2.18	-7.41	88	3.478	3.465	0.013
5	-9.55	-9.59	2.49	-7.10	98	3.611	3.611	0.000
6	-10.91	-11.30	3.11	-8.18	114	3.564	3.586	-0.022
7	-11.79	-11.65	3.42	-8.23	124	3.810	3.815	-0.005
8	-8.73	-8.88	1.87	-7.01	78	2.693	2.671	0.022
9	-11.26	-11.45	1.87	-9.58	108	3.767	3.752	0.015
10	-10.68	-10.57	1.87	-8.70	96	2.262	2.277	-0.015
11	-10.83	-10.77	1.87	-8.90	110	3.713	3.728	-0.015
12	-10.42	-10.52	1.87	-8.65	102	3.225	3.195	0.030
13	-10.56	-10.45	1.87	-8.58	104	3.482	3.482	0.000
14	-11.26	-11.25	3.42	-7.82	134	0.940	0.911	0.029
15	-10.89	-11.06	2.18	-8.88	118	1.407	1.464	-0.057
16	-11.25	-11.33	2.18	-9.15	126	1.684	1.656	0.028
17 ^d	-8.89	-9.13	1.87	-7.26	82	3.137	3.041	0.096
18 ^d	-10.39	-10.39	1.87	-8.52	98	3.651	3.448	0.203
19 ^d	-7.11	-11.83	2.18	-9.65	126	1.333	3.665	-2.232
20 ^d	-11.85	-11.72	2.18	-9.54	126	0.922	1.641	-0.719
A ^d	-8.14	-12.07	4.36	-7.71	150	3.531	3.740	-0.209

^a E_{dock} , E_{inter} , E_{tors} , ΔG : $\times 4.18 \text{ kJ/mol}$; ^b ED=experimental value of D ; ^c CoMFA PD=predictive value of D by CoMFA; ^d test-set compounds for CoMFA.

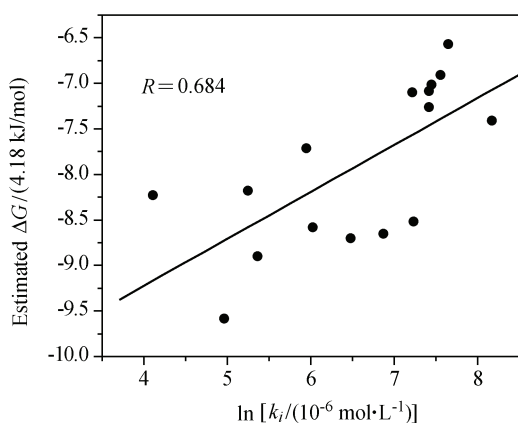


图 2 部分化合物实测 $\ln k_i$ 与对接预测结合能相关图

Figure 2 Correlation of experimental $\ln k_i$ and calculated binding energy of selected compounds

2 结果与讨论

2.1 分子对接

由 AutoDock 分子对接方法计算结果可以看出, 随

着化合物 1~7 中 R^1 取代基碳链的增长, 结合能大体逐渐降低, 应当表现为活性增加的趋势, 9~13, 15, 16, 18~20 取代基中含有芳环, 其结合能也较低, 其中 9 和 19 在 AutoDock 计算中结合能最低, 理论上也会有较高的活性. 通过测试 KARI 活性, 发现化合物 6, 7, 9, 11, 13 活性均较低, 比结构改造前的双胍 A 活性有所提高. 而部分化合物实测 $\ln k_i$ 值与其结合能量也有较好的相关性(图 2, 化合物 1, 2, 3, 8, 10, 17, 18 在所测最高浓度下的抑制率接近 50%, 研究采用该浓度作为近似值进行计算). 从相关系数 $R=0.684$ 来看, 预测的结合自由能与 $\ln k_i$ 值呈现较好的单调性, 说明分子对接计算结果具有一定的可靠性. 需要指出的是, 目前国内外化合物 KARI 酶体外抑制筛选模型还没有完善, 正处于探索阶段, 本研究生测所用 KARI 酶的基因来自水稻, 而分子对接所用的生物大分子是菠菜 KARI 酶, 即所用 KARI 酶来源不同, 可能使得计算结果和实际离体酶生测结果存在一定的误差, 而且有些化合物在测试条件下不能给出很好的结果, 尽管如此, 从高活性化合物 6, 7, 9 和 11 的计算结果对照来看, 还是较为吻合的. 另外从对油菜胚根的生长抑制试验来看, 活性变化趋势和计算结果基

本一致。

一般认为, 小分子抑制剂与靶酶结合, 起主要相互作用的是抑制剂周围一定距离范围内的氨基酸残基, 而这些氨基酸残基可认为是活性残基, 对接时选取小分子中心为活性位点中心进行计算。图 3 为化合物 **9** 与抑制剂周围 0.5 nm 氨基酸残基(活性残基)的对接作用模式, 小分子中脘基 NH_2 上的两个氢与残基 Glu319 和 Asp315 上的氧原子发生了静电和氢键相互作用, 其键长分别为 0.1727, 0.2412 和 0.2156 nm; $=\text{NH}$ 上的氢与残基 Glu496 也存在静电及氢键作用, 键长为 0.2267 和 0.2019 nm; 分子的苯环疏水部分落入由残基 Gly253, Met254, Glu319, Leu323, Cys517, Ser518 等形成的疏水口袋中。对照来看, 由于上述残基的作用, 使化合物 **9** 表现出对 KARI 酶的抑制活性。

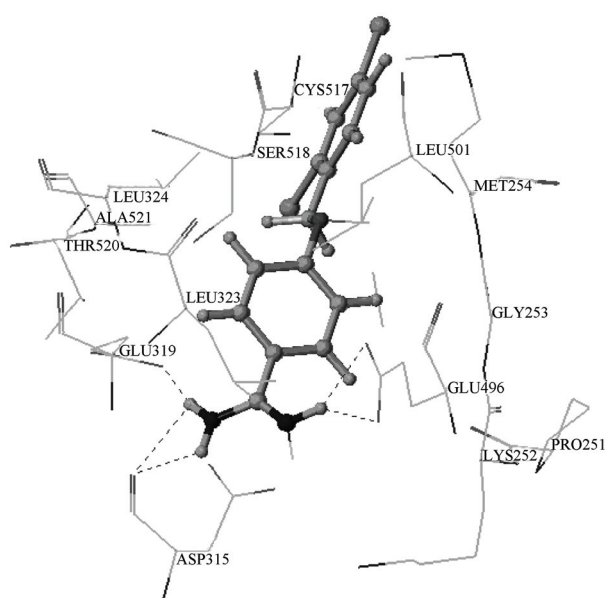


图 3 化合物 **9** 与 KARI 活性残基的对接作用模式

Figure 3 The docking interaction pattern of KARI active residues with compound **9**

2.2 CoMFA 的 PLS 分析

选取 16 个单脘类分子 **1~16** 组成训练集, 化合物 **17~20** 及双脘 **A** 组成测试集进行除草活性 3D-QSAR 研究(表 2)。PLS 分析中, 一般认为交叉验证系数 r_{cv}^2 值大于 0.5 时, 模型具有可信预报能力。我们首先对训练集化合物进行 Leave-one-out 交叉验证, 得到交叉验证系数 $r_{cv}^2 = 0.774$, 说明所建立的模型体系有较好的可预测性。回归计算选取最佳组分数为 6。非交叉验证 $r^2 = 0.999$, $F = 1593.134$ (F 表示判断统计回归的显著性), 标准偏差 $s = 0.036$ 。以上结果表明此模型对同系列分子的活性有较高预测能力。实验所测除草活性与 CoMFA 模型预测活性的结果见表 2。从测试集结果来看, 除化合物 **19** 残

差较大外, 模型对于测试集中其它 4 个化合物的活性预测还是较为准确的。本模型的 QSAR 分析还表明, 立体场和静电场的贡献分别为 67.8% 和 32.2%, 立体场对活性的贡献是主要的。

2.3 三维等值线图显示 QSAR 结果

经 CoMFA 分析, 得到一个彩色的三维等值线模型, 它用不同颜色来表示此系列分子主要空间和静电性能, 我们用模板分子 **9** 作为代表采取 $\text{stdev} \times \text{coeff}$ 方法来加以显示^[16], 见图 4。从图上可以看出, 图 4a 表示围绕在模板分子 **9** 周围的立体相互作用, 减小黄色区域的空间体积, 增大绿色区域的空间体积有助于增加化合物的除草活性, 说明并不是取代基碳链越长或体积越大其活性越好, 其中应当有个最优条件, 经过这样改造的分子能够更加实现与受体的几何匹配。图 4b 表示围绕在模板分子 **9** 周围的静电相互作用, 在红色区域引入负电荷基团, 蓝色区域引入正电荷的取代基有助于增加化合物的除草活性。

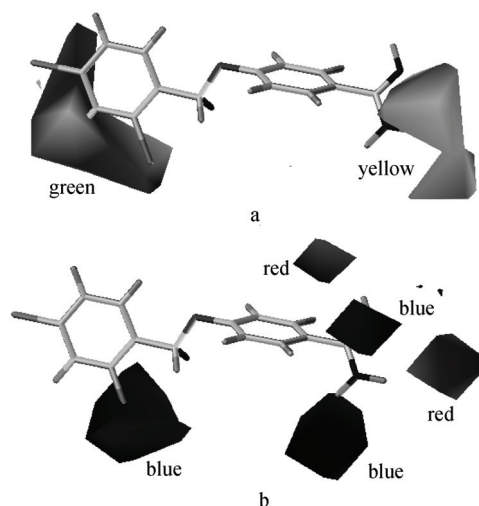


图 4 化合物 **9** 的 CoMFA 模型的立体场(a)和静电场(b)分布图
Figure 4 3D contour plot of the CoMFA steric field map (a) and electrostatic field map (b) for compound **9**

由分子对接和三维定量构效关系研究结果可以从不同角度指导我们设计新型脘类 KARI 酶抑制剂, 例如可以将所设计的抑制剂分子的体积大小、静电性能、结合能量等因素综合进行考虑。

致谢 承澳大利亚 Queensland 大学 R. G. Duggleby 教授给予热情指导, 在此致予深切的感谢!

References

- 1 Wang, B.-L.; Li, Z.-M. *Chin. J. Pesticide Sci.* **2004**, 6(1), 11 (in Chinese).

- (王宝雷, 李正名, 农药学学报, **2004**, 6(1), 11.)
- 2 Schulz, A.; Sponemann, P.; Kocher, H.; Wengenmayer, F. *FEBS Lett.* **1988**, 238, 375.
- 3 Aulabaugh, A.; Schloss, J. V. *Biochemistry* **1990**, 29, 2824.
- 4 Halgand, F.; Vives, F.; Dumas, R.; Biou, V.; Andersen, J.; Andrieu, J. P.; Cantegril, R.; Gagnon, J.; Douce, R.; Forest, E.; Job, D. *Biochemistry* **1998**, 37, 4773.
- 5 Wang, B.-L.; Li, Z.-M.; Ma, Y.; Wang, J.-G.; Luo, X.-M.; Zuo, Z.-L. *Chin. J. Org. Chem.* **2004**, 24(8), 973 (in Chinese).
- (王宝雷, 李正名, 马翼, 王建国, 罗小民, 左之利, 有机化学, **2004**, 24(8), 973.)
- 6 Ewing, T. J. A.; Kuntz, I. D. *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 1175.
- 7 Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. *J. Mol. Biol.* **1982**, 161, 269.
- 8 Jones, G.; Wilett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. J. *Mol. Biol.* **1997**, 267, 727.
- 9 Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 470.
- 10 Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639.
- 11 Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *Proteins* **1990**, 8(3), 195.
- 12 Goodsell, D. S.; Lauble, H.; Stout, C. D.; Olson, A. J. *Proteins* **1993**, 17(1), 1.
- 13 Wang, B.-L.; Duggleby, R. G.; Li, Z.-M.; Wang, J.-G.; Li, Y.-H.; Wang, S.-H.; Song, H.-B. *Pest Manag. Sci.* **2005**, 61, 407.
- 14 Biou, V.; Dumas, R.; Cohen-Addad, C.; Douce, R.; Job, D.; Pebay-Peyroula, E. *EMBO J.* **1997**, 16, 3405.
- 15 Yang, H.-Z.; Wu, Y.; Ren, K.-T.; Zhang, Y.-F. *Chem. J. Chin. Univ.* **1995**, 16(5), 710 (in Chinese).
- (杨华铮, 吴烨, 任康太, 张玉芬, 高等学校化学学报, **1995**, 16(5), 710.)
- 16 Wang, B.-L.; Ma, N.; Wang, J.-G.; Ma, Y.; Li, Z.-M.; Li, Y.-H. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2004**, 20(6), 577 (in Chinese).
- (王宝雷, 马宁, 王建国, 马翼, 李正名, 李永红, 物理化学学报, **2004**, 20(6), 577.)

(A0509149 LI, W. H.; LING, J.)