

文章编号: 1674-2869(2018)04-0360-06

小菜蛾 GluClR 同源模建及与阿维菌素类化合物的对接

巨修练, 王天华, 徐闻曦, 胡琦薇, 舒启超, 郑小娇, 刘根炎
武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430205

摘要: 阿维菌素类生物杀虫剂作用于谷氨酸门控氯离子通道受体(GluClR), 该受体是杀虫剂的重要作用靶标之一, 对其深入研究, 可以开发新型杀虫剂。为研究阿维菌素类杀虫剂的作用机理, 开发更高效、安全的阿维菌素衍生物。本研究以实验解析得到的秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) GluCl 三维结构为模板(PDB: 3RHW), 同源模建了小菜蛾(*Plutella xylostella*) GluCl 受体三维结构, 将模建的小菜蛾 GluCl 受体分别与阿维菌素(AVM)、伊维菌素(IVM)及埃玛菌素(EMA)进行分子对接。结果表明, 这三个化合物对接模式相近, 主要是糖环部分嵌入受体 M1 与 M2 亚基之间, 埃玛菌素与小菜蛾 GluCl 受体对接打分明显优于伊维菌素和阿维菌素。本研究结果对阿维菌素的进一步衍生化具有理论指导意义。

关键词: 谷氨酸门控氯离子通道; 阿维菌素; 同源模建; 分子对接; 生物农药

中图分类号: R914.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2018.04.002

Homology Modeling of Glutamate-Gated Chloride Channel Receptor of *Plutella Xylostella* and Docking with Avermectins

JU Xiulian, WANG Tianhua, XU Wenxi, HU Qiwei, SHU Qichao, ZHENG Xiaojiao, LIU Genyan

School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: Glutamate-gated chloride ion channel receptor (GluClR) is one important target of insecticides. Avermectins are widely used as bio-pesticides in the world due to its high efficacy, low toxicity and high selectivity. To explore the action mechanism of avermectins and develop more effective avermectin derivatives, the model of the glutamate-gated chloride ion channel of *Plutella xylostella* was built by homology modeling with the 3D structure of *Caenorhabditis elegans*'s glutamate-gated chloride ion channel as a template. Then it was docked with avermectin, ivermectin and emamectin respectively. The results indicated that the docking modes of avermectins were similar and the sugar ring inserted the M1 and M2 subunits of *Plutella xylostella* GluClR, meanwhile, the docking score of emamectin was higher than that of evermectin and avermectin. These studies provided theoretical guidance for further derivatization of avermectin.

Keywords: GluCl; avermectins; docking; homology modeling; bio-pesticide

阿维菌素是通过土壤放线菌发酵得到的大环内酯类药物(图1), 这种药物从根本上降低了河盲症和淋巴丝虫病的发病率, 对其它寄生虫疾病也有出色的防控效果, 发明该化合物的美国科学家

威廉·C·坎贝尔、日本科学家大村智于2015年获得诺贝尔生理学及医学奖。阿维菌素类化合物在防治农业害虫方面也有突出的效果, 特别是对小菜蛾、甜菜夜蛾等难防治的害虫也具有突出的防

收稿日期: 2017-03-07

作者简介: 巨修练, 博士, 教授, 博士研究生导师。E-mail: xiulianju2008@aliyun.com

引文格式: 巨修练, 王天华, 徐闻曦, 等. 小菜蛾 GluClR 同源模建及与阿维菌素类化合物的对接[J]. 武汉工程大学学报, 2018, 40(4): 360-365.

效。研究表明阿维菌素类化合物作用于谷氨酸门控氯离子通道受体 (glutamate-gated chloride ion channel receptor, GluClR), GluClR 与甘氨酸受体 (glycine receptor, GlyR)、 γ -氨基丁酸受体 (GABA_AR、GABA_cR)、及组氨酸门控氯离子通道受体 (histidine-gated chloride ion channel receptor, HisClR) 同属于抑制性阴离子通道受体, 是半胱氨酸环配体门控离子通道受体超家族中的重要一大类, 具有重要的研究价值。该家族的成员还包括烟碱乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)、5-羟色胺 3 受体 (5-hydroxytryptamine type3 receptor, 5-HT₃R) 等激动性阳离子通道受体^[1]。研究表明, GluClR 仅在无脊椎动物和软体动物神经及肌肉细胞中被发现。GluClR 介导快速的

突触传递抑制效应, 调节细胞及机体功能^[2], 与哺乳动物受体比较, GluClR 是研发安全、高效杀虫剂的重要靶标。

无脊椎动物体内的 GluClR 通道均是由像花瓣一样的五个亚基组成, 每个亚基均含有胞内区、跨膜区及胞外区^[3-6]。目前, 还未见报道小菜蛾 (*Plutella xylostella*) GluClR 受体的三维结构实测结果, 本研究采用同源模建的方法, 以实验解析得到的秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) GluClR 蛋白三维结构为模板 (PDB: 3RHW), 构建小菜蛾 GluClR 结构模型, 并将阿维菌素类化合物与其进行对接并与实测活性比较, 研究安全、高效、对人、畜、环境安全, 对害虫活性高的阿维菌素类衍生物提供理论依据。

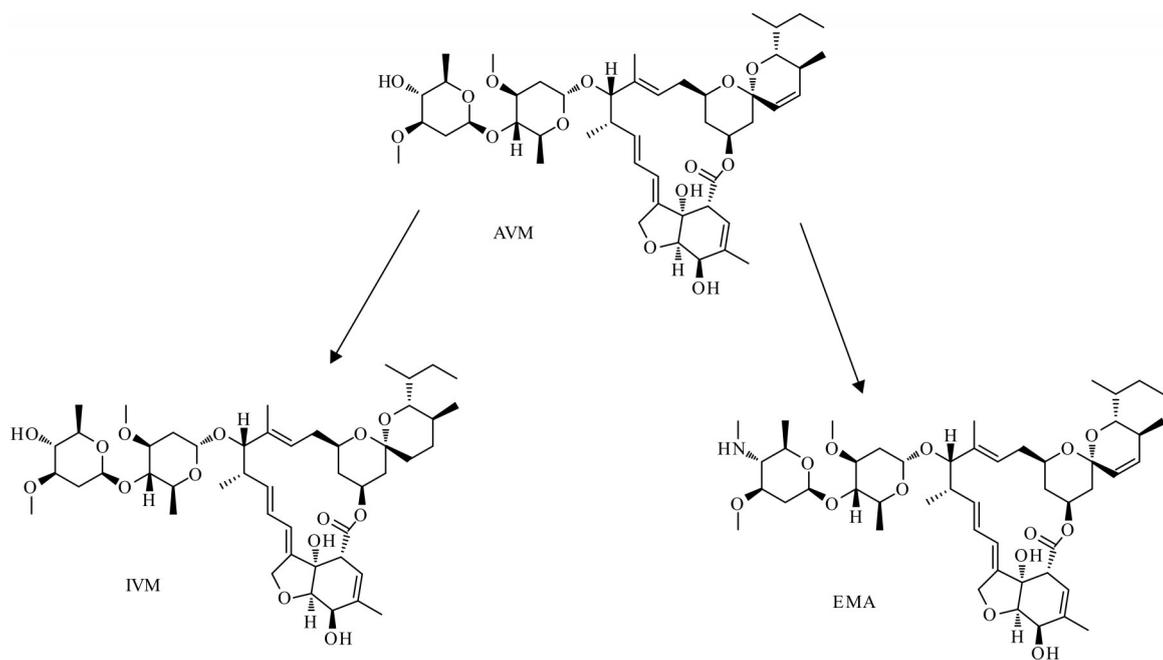


图1 阿维菌素衍生物的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of avermectins derivatives

1 实验部分

1.1 同源模建

通过搜寻 PDB 数据库, 未发现已经解析得到的小菜蛾 GluClR 三维结构, 但在该数据库中寻找发现了一个已经解析的秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 GluClR 三维结构 (PDB ID: 3RHW at 0.326 nm), 可以作为模板。本研究以解析得到的秀丽隐杆线虫的 GluClR 三维结构为同源模建的模板, 采用同源模建的方法构建昆虫小菜蛾 GluClR 的三维结构, 在模型优化的基础上进行分子对接研究。

1.2 选择模板

模建成功的关键是选择合适的模板, 模板蛋白的选择是否合适将直接影响同源模建获得的最终结果, 综合分析模板受体蛋白家族的同源性、完整性及分辨率等因素, 最终选择线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的三维结构蛋白 (PDB ID: 3RHW at 0.326 nm) 作为模板。

1.3 选择序列

为构建目标蛋白 GluClR 的三维结构, 通过 Swiss-Prot/TrEMBL 搜寻, 得到了比较合适的小菜蛾 (*Plutella xylostella*) GluClR 蛋白序列 (GI: 397310811)。通过对模板及构建序列进行比对及

合理编辑,去除与本研究无关的部分膜外区残基。

1.4 亚基构建

通过在SYBYL-X 2.0程序包的Biopolymer模块中采用Needleman & Wunsch方法,将线虫(*Caenorhabditis elegans*)模板序列与昆虫小菜蛾(*Plutella xylostella*)目标蛋白序列进行序列比对生成多序列对比文件后,在ORCHESTRAR模块中导入MSF文件,进行识别并构建结构保守区、结构可变区,添加侧链等^[7-8]。

1.5 亚基组合

GluCIR为同源五聚体结构蛋白,因此,将所构建的亚基依次按一定顺序一一对应叠合到模板的5个亚基上并使用MERGE模块完成亚基的组合即可。

1.6 模型优化

使用分子力学及分子动力学对所构建的小菜蛾GluCIR三维结构进行优化和修正,使模建得到的GluCIR三维结构具有合理性,可以进行下一步研究。首先在AMBER FF99力场下采用共轭梯度法(Conjugate Gradient Method)进行体系的能量优化,使能量梯度最后收敛值小于5 kcal·nm/mol,在此基础上进行分子动力学模拟(dynamics simulation),其中设定300 K恒温,1.01×10⁵ Pa压力,1 fs步长,弛豫1 000 ps进行计算,最终检验模型的稳定性。

1.7 分子对接

分子对接过程的关键是选择合理的受体结合

模式,这将直接影响对接结果。本研究参考模板配体与受体结合位点,采用自定义氨基酸残基模式确定受体结合口袋。在SYBYL-X 2.0程序包的Surflex-docking模块中^[9-10],使用原型分子(protocol)为结合口袋,参数Bloat值和Threshold值确定其结合口袋形状及大小^[11]。

将阿维菌素、伊维菌素、埃玛菌素分别与同源模建得到的小菜蛾GluCIR三维结构进行对接,研究通过生物发酵得到的杀虫剂阿维菌素及其衍生物与昆虫小菜蛾GluCIR的相互作用模式及作用机理。

2 结果与讨论

2.1 同源模建

昆虫小菜蛾(*Plutella xylostella*)GluCIR的亚基序列(GI:397310811)与作为模板的秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)GluCIRA链序列的序列比对结果如图2所示。小菜蛾GluCIR序列与丽隐杆线虫模板序列相似度较高,二者序列同源性为65.12%,而模建研究表明,一般情况下,模板蛋白序列与构建的目标蛋白序列同源性大于30%时,即可以通过同源模建方法获得可靠的目标蛋白三维结构模型^[12]。在本研究中,针对同源模建昆虫小菜蛾的GluCIR三维结构的目的,采用秀丽隐杆线虫GluCIR的三维结构蛋白作为模板是合理可行的。



图2 昆虫小菜蛾与秀丽隐杆线虫的GluCIR序列叠合对比结果

Fig. 2 Sequence comparison of *Plutella xylostella* and *Caenorhabditis elegans* GluCIRs

注:图2中M1(3RHW-A)及M2(MOTH-A)分别为模板序列及构建序列;蓝色背景表示相同的氨基酸残基,红色背景表示不同的氨基酸残基;TM2、TM3、TM4分别代表跨膜区的三个亚基序列。

通过分析,秀丽隐杆线虫的GluCIR为同源五聚体组成的离子通道蛋白受体,5个亚基序列一致。通过二者序列比对、构建结构保守区、结构可变区、侧链和模型优化后,获得了GluCIR其中1个亚基,将模建所得的小菜蛾GluCIR亚基分别叠合到编辑之后的模板的亚基上,组装成为昆虫小菜蛾的GluCIR三维结构模型,结构如图3(a)所示。

相对于同源模建获得的模型,还需对其结构

进行分子力学及分子动力学研究^[13]。在能量优化方面,使用了SYBYL-X 2.0软件包中的Dynamics模块对其进行分子动力学模拟,同源模建所获得的昆虫小菜蛾GluCIR三维结构的势能在10 ps之后逐渐趋于稳定在9 000 kcal/mol左右;昆虫小菜蛾GluCIR三维结构骨架原子的位置相对于模型最初构象的均方根差(root mean square deviations, RMSD)在昆虫小菜蛾三维结构模型中的RMSD值

在最初阶段逐渐上升,在 200 ps 之后,RMSD 值稳定在 0.55 nm 左右,表明体系已趋于稳定,说明该模型在能量上是合理的。在构象研究方面,采用 SYBYL-X 2.0 程序中的 Protein Analyze 模块内 Ramachandran Plot 对同源建模所得到的昆虫小菜蛾 (*Plutella xylostella*) GluClR 三维结构模型的构象进行验证,结果如图 3 (b) 所示,拉氏图 Ramachandran Plot 是组成蛋白质的氨基酸残基理论上可以出现的构象,检测同源建模模型的质量^[11]。本研究中建模所获得的昆虫小菜蛾 GluClR 的三维结构模型的全部氨基酸残基均处于允许区域内,证明该模型在构象上也是合理的,完全可以用于分子对接的下一步研究。

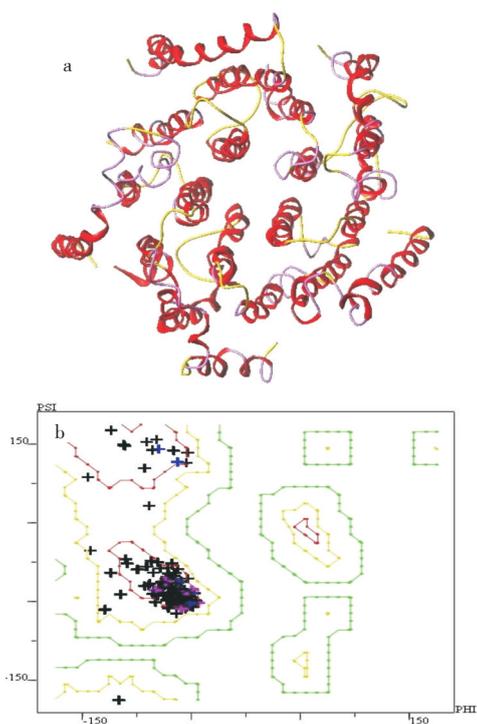


图3 小菜蛾 GluClR:(a)建模结构,(b)模型拉氏图
Fig. 3 (a)The modeling structure and (b)Ramachandran graph of *Plutella xylostella* GluClR

2.2 分子对接

参照文献报道采用残基模式定义结合口袋^[14],残基中包括 A 链的 Tyr4, Leu6, Ile7, Gln8, Ile11, Pro12, Met15, Gln48 及 E 链的 Ala46, Ser50, Asn53, Asp66, Val67, Ter69, Gly70, Leu73, Phe77, 在 Surfex-docking 模块下,活性位点被称为 protomol, threshold 与 bloat 为默认值^[11]。

采用 SYBYL-X 2.0 程序中的 Surfex-docking 模

块进行分子对接研究,cscore 模块会分别对 3 个配体 (EMA、IVM、AVM) 与建模得到的受体对接结果分别进行打分,评价对接结果。最终的总打分将以 $-\lg 10Kd$ 的形式给出, Kd 为配体的解离常数。结合自由能与 Kd 的关系如下:

$$\text{Free Energy of Binding} = RT \ln Kd$$

从以上 3 个化合物与小菜蛾 GluClR 的对接结果来看,Total Score 值从高到低依次为埃玛菌素 (9.60)、伊维菌素 (9.33)、阿维菌素 (8.59),其模拟结果与该类化合物实测对小菜蛾的触杀致死率埃玛菌素 (0.33 mg/g)、伊维菌素 (0.39 mg/g)、阿维菌素 (0.56 mg/g) 一致^[15],如表 1 所示。

表 1 阿维菌素类化合物对昆虫小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 的触杀致死率及对接打分
Tab. 1 Mortality and total score of AVMs to *Plutella xylostella*

化合物	LD_{50} / (mg/g)	对接打分
埃玛菌素	0.33	9.60
伊维菌素	0.39	9.33
阿维菌素	0.56	8.59

埃玛菌素、伊维菌素、阿维菌素与小菜蛾 GluClR 的对接位点及结合模式如图 4 所示。

图 4 表明,阿维菌素类化合物 (EMA、IVM、AVM) 与昆虫小菜蛾 GluClR 的对接模式相似,都是如“楔子”一般嵌入到昆虫小菜蛾 GluClR 的相邻亚基的 TM1 和 TM3 之间的靠近外膜区空隙,并且都是二糖部分完全嵌入空隙之内,如图 4 所示,埃玛菌素 (EMA) 与小菜蛾 GluClR 的对接中,由于二糖部分甲氨基的引入,使氨基与 E/SER50 的羟基氧形成氢键,另外,氨基旁四氢吡喃环上 O 与 E/SER49 侧链羟基 H 形成氢键 [图 4 (a)]。伊维菌素 (IVM) 与该受体的对接中二糖部分末端羟基 H 与 E/SER50 侧链羟基 O 形成氢键,二糖部分末端羟基 H 与 E/ALA46 骨架羰基 O 形成氢键 [图 4 (b)]。而在阿维菌素 (AVM) 与该受体的对接中仅有二糖部分末端羟基 H 与 E/SER50 侧链羟基 O 形成氢键 [图 4 (c)]。Total Score 值从高到低依次为埃玛菌素 (9.60)、伊维菌素 (9.33)、阿维菌素 (8.59),其中埃玛菌素与伊维菌素打分相近且明显大于阿维菌素,其结果与该类化合物对小菜蛾的触杀致死率埃玛菌素 (0.33 mg/g)、伊维菌素 (0.39 mg/g)、阿维菌素 (0.56 mg/g) 的实测活性一致^[15]。

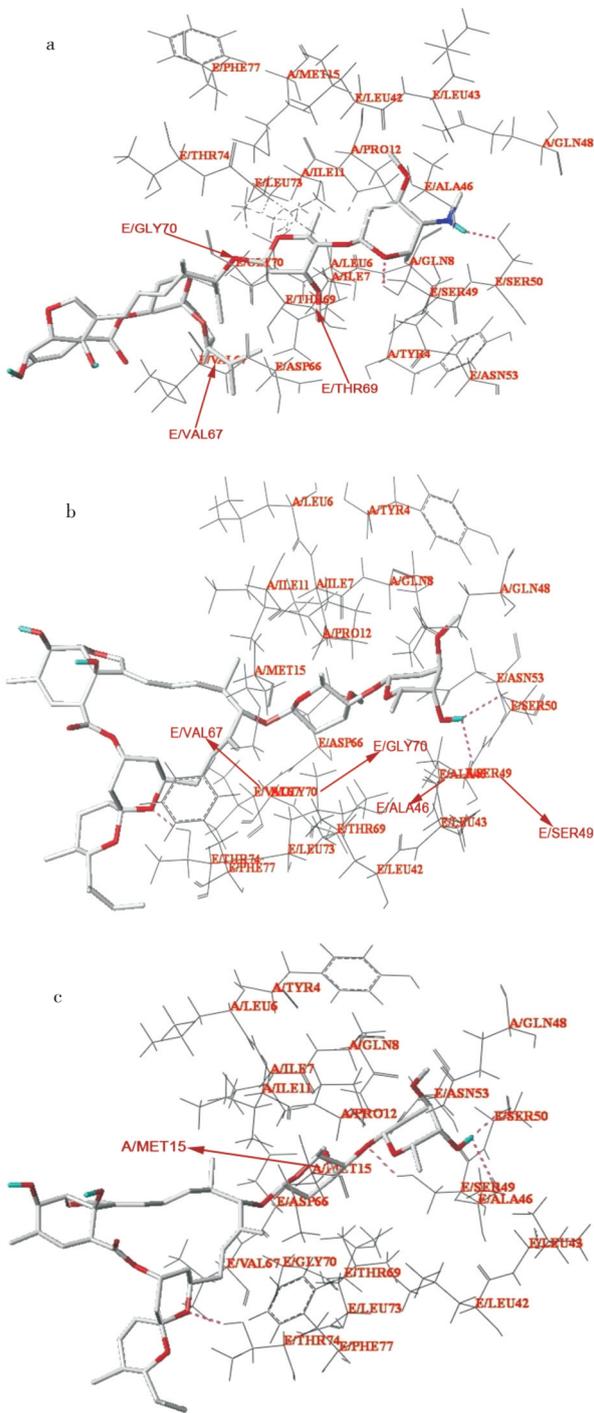


图4 阿维菌素类药物与小菜蛾 GluClR 对接图：
(a)EMA, (b)IVM, (c)AVM

Fig. 4 Docking results of avermectins with GluClR of *Plutella xylostella*: (a)EMA, (b)IVM, (c)AVM

3 结 语

本研究以文献报道的实验解析得到的秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)谷氨酸门控氯离子通道为模板,同源建模了昆虫小菜蛾(*Plutella xylostella*)氯离子通道受体三维结构,经分子力学及分子动力学研究,证明模型的合理性。将建模获得

的小菜蛾氯离子通道受体与阿维菌素类衍生物埃玛菌素、伊维菌素和阿维菌素分别进行分子对接,发现对接打分结果与实测杀虫结果一致。研究结果可为了解作用于 GluClR 杀虫剂的作用机理及设计用于该受体的杀虫剂提供理论依据。

参考文献:

- [1] JANSSEN D, DERST C, BUCKINX R, et al. Dorsal unpaired median neurons of *Locusta migratoria* express ivermectin-and fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels [J]. *Journal of Neurophysiology*, 2007, 97(4): 2642–2650.
- [2] KEHOE J S, BULDAKOVA S, ACHER F, et al. *Aplysia* cys-loop glutamate-gated chloride channels reveal convergent evolution of ligand specificity [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2009, 69(2): 125–141.
- [3] WOLSTENHOLME A J. Glutamate-gated chloride channels [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(48): 40232–40238.
- [4] CHENG M H, COALSON R D. Energetics and ion permeation characteristics in a glutamate-gated chloride (GluCl) receptor channel [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(46): 13637–13643.
- [5] CASIDA J E, EURKIN K A. Pesticide chemical research in toxicology: lessons from nature [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2017, 30(1): 94–104.
- [6] CASIDA J E. Radioligand recognition of insecticide targets [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(13): 3277–3290.
- [7] NEEDLEMAN S B, WUNSCH C D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1970, 48(3): 443–453.
- [8] ZHU Z Y, SALI A, BLUNDELL T L. A variable gap penalty function and feature weights for protein 3-D structure comparisons [J]. *Protein Engineering*, 1992, 5(1): 43–51.
- [9] ZHOU Z Y, FELTS A K, FRIESNER R A, et al. Comparative performance of several flexible docking programs and scoring functions: enrichment studies for a diverse set of pharmaceutically relevant targets [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2007, 47(4): 1599–1608.
- [10] HODNELAND E, TEIGEN K. A simple method to calculate the accessible volume of protein-bound ligands: application for ligand selectivity [J]. *Journal of molecular graphics and Modelling*, 2007, 26(2): 429–433.

- [11] SYBYL software [CP]. Version X 2.0, Tripos Associates Inc, St. Louis, 2016.
- [12] NEEDLEMAN S B, WUNSCH C D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1970, 48(3): 443–453.
- [13] ALPAN R, STEFANO P, MICHAEL P E, et al. Refinement of protein structure homology models via long, all-atom molecular dynamics simulations [J]. *Protein-Structure Function and Bioinformatics*. 2012, 80(8): 2071–2079.
- [14] HIBBS R E, GOUAUX E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor [J]. *Nature*, 2011, 474(7349): 54–60.
- [15] 李惠冬,罗万春. 温度与光照对阿维菌素系列化合物毒力发挥的效应 [J]. *植物保护学报*, 2004, 31(2): 190–198.

本文编辑:张 瑞



(上接第 359 页)

- sulfated zirconia [J]. *Fuel Processing Technology*, 2012, 93(1): 18–25.
- [30] 张伟伟,王建强,韩淑利,等. 杂多酸催化剂在石油炼制中的应用研究进展[J]. *精细石油化工进展*, 2015(3):42–46.
- [31] 陈立东,于博浩,李传鹏,等. 磷钼钒多酸基固体酸催化剂高效加氢精制 FCC 汽油[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2014(3):385–388.
- [32] 傅欲生. 催化剂及助剂在催化裂化中的应用[D]. 济南:山东大学, 2008.
- [33] BESENBACHER F, BRORSON M, CLAUSEN B S, et al. Recent STM, DFT and HAADF-STEM studies of sulfide-based hydrotreating catalysts: insight into mechanistic, structural and particle size effects [J]. *Catalysis Today*, 2008, 130(1): 86–96.
- [34] HAO L, XIONG G, LIU L, et al. Preparation of highly dispersed desulfurization catalysts and their catalytic performance in hydrodesulfurization of dibenzothiophene [J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2016, 37(3):412–419.

本文编辑:张 瑞