

# 流感病毒 M2 质子通道抑制机理的计算化学模拟和理论分析\*

## Theoretical Study and Computational Chemistry Modeling for the Inhibition Mechanism of M2 Proton Channel in Influenza A Virus

秦艳<sup>1</sup>, 谢能中<sup>1</sup>, 杜奇石<sup>1,2</sup>, 黄日波<sup>1</sup>

QIN Yan<sup>1</sup>, XIE Neng-zhong<sup>1</sup>, DU Qi-shi<sup>1,2</sup>, HUANG Ri-bo<sup>1</sup>

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 2. 美国戈登生命科学研究所, MA 02478, USA)

(1. State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China. 2. Gordon Life Science Institute, 53 South Cottage Road, Belmont, MA, 02478, USA)

**摘要:**【背景】A 型流感病毒的 M2 质子通道蛋白的 X-ray 和 NMR 结构已于 2008 年测定, 并成为发展抗流感的重要药物靶标, 但学术界对于抑制剂的作用机理尚有争论。【方法】用 SYBYL 软件作 M2 通道蛋白与金刚烷胺抑制剂的对接计算, 在可能的对接位点(Asp-44, Trp-41, His-37)上用精确的量子化学方法计算对接能, 并根据结构化学和物理化学的原理分析抑制剂的作用机理。【结果】计算了金刚烷胺与 M2 质子通道的多个可能的结合位点的结合能, 包括 His-37, Trp-41 和 Asp-44。【结论】金刚烷胺对 M2 的抑制是一个动态过程, 可能有多个位点结合。金刚烷胺穿透细胞膜后在通道出口与 Asp-44 形成盐桥, 质子流使盐桥解离, 金刚烷胺再进入通道与芳香氨基酸 Trp-41(或 His-37) 形成阳离子- $\pi$  键。

**关键词:** 流感病毒 金刚烷 M2 质子通道 抑制机理

**中图分类号:** O641.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2014)04-0289-05

**Abstract:**【Background】The structure of M2 proton channel in influenza A virus has been solved in 2008 by using X-ray and NMR, which is a drug-target for inhibitor design. However, so far the inhibition mechanism is not very clear.【Methods】The possible binding sites of amantadine in M2 channel are determined by using docking calculations. Then the binding energies are calculated by using higher level quantum chemical calculations.【Results】The accurate binding energies at the sites His-37, Trp-41, and Asp-44 are calculated.【Conclusion】This inhibition of amantadine to M2 channel is a dynamic procedure. After the amantadine penetrates the cell membrane it binds at the Asp-44 through salt-bridge interaction. The salt-bridge may be broken in the proton flow, then amantadine comes in the channel, and binds at the aromatic amino acid Trp-41 (or His-37) with the cation- $\pi$  interaction.

**Key words:** influenza A virus, amantadine, M2 proton channel, inhibition mechanism

收稿日期: 2014-10-10

作者简介: 秦艳(1982-), 女, 助理研究员, 主要从事蛋白质结构和生物质酶解技术的研究。

\* 国家自然科学基金项目(31370716 和 31360207)资助。

【研究意义】A 型流感是对人类威胁最大的流行性疾病之一, 每年都在人群和家禽、家畜中有不同

程度的发生。近5年H5N1和H7N1流感病例在我国不断出现<sup>[1,2]</sup>,每年冬春季在华东、华中和华南的养鸡场都有H5N1和H7N1禽流感发生,造成家禽死亡或被大量捕杀,对公共卫生和饲养业都造成重大损失。为应对A型流感的大规模爆发,研发新的抗流感病毒药物仍迫在眉睫<sup>[3]</sup>。【前人研究进展】2008年NATURE报道了A型流感病毒的M2质子通道蛋白的两个三维结构,这两个M2结构分别用X射线衍射法(X-ray)<sup>[4]</sup>和核磁共振法(NMR)<sup>[5]</sup>测定(图1)。这一具有里程碑意义的成果为新型流感病毒抑制剂的设计提供了新的靶标和结构基础。然而并列发表在NATURE上的这两篇论文却给出了不同的抑制剂结合位点。在DeGrado<sup>[4]</sup>的研究小组测定(用X-ray法)的M2通道蛋白的晶体结构里,抑制剂金刚烷胺结合在M2通道内部,位于丝氨酸Ser-31和组氨酸His-37之间的位置。金刚烷胺在通道内以物理方式堵塞M2质子通道。在Chou<sup>[5]</sup>的研究小组测定(用NMR法)的M2的溶液结构里,抑制剂金刚烷胺处于M2通道外部靠近通道出口的位置,其亲水的药效团氨基( $-NH_3^+$ )与天冬氨酸Asp-44的羧基( $-COO^-$ )形成盐桥,疏水的金刚烷基夹裹在M2通道与细胞膜之间。在这一结构里金刚烷胺通过变构机制(Allosteric regulation)抑制质子的流通。【本研究切入点】这两篇关于M2质子通道的论文在NATURE发表后,关于金刚烷胺与M2通道的结合位点和抑制机理引发了广泛的讨论<sup>[6-9]</sup>。在2010年的1篇综述论文里,James Chou教授认为抑制剂在受体蛋白里可能不止1个结合位点,在不同的阶段,抑制剂的结合位点可能会发生转移。虽然Chou教授的这一观点被普遍接受,但金刚烷胺类抑制剂与M2通道的结合与转移的详细过程尚不清楚。【拟解决的关键问题】采用计算化学和理论分析的方法探讨金刚烷胺抑制剂在M2通道中的结合与转移的机制,其结论可能对新型流感病毒抑制剂的设计有帮助。

## 1 研究方法

计算化学和分子模拟是研究复杂化学和生物学问题的重要方法<sup>[11-14]</sup>,它的最大优点是用计算机模拟实验中难以实现的各种复杂的细微过程,从理论上探讨可能的反应机制和过程细节。本文首先用分子对接的方法探索金刚烷胺(或金刚烷乙胺)在M2质子通道蛋白中的可能的结合位点,然后用高档量子化学方法计算各结合位点的结合能。根据能量数

据和理论分析,推导金刚烷胺在M2通道内的结合位点和迁移过程。

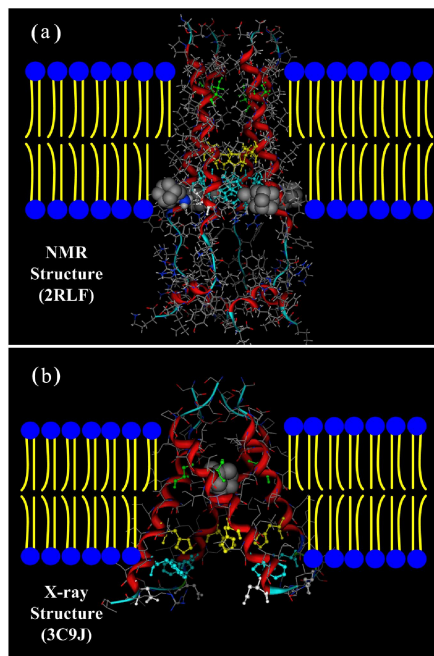


图1 (a)流感病毒的M2质子通道蛋白的溶液NMR结构(PDB代码:2RLF)。(b)流感病毒的M2质子通道蛋白的X-ray结构(PDB代码:3C9J)。

Fig. 1 (a)The solution NMR structure of M2 proton channel of influenza A virus (2RLF). (b)The X-ray crystal structure of M2 proton channel of influenza A virus (3C9J).

金刚烷胺与M2质子通道的对接计算采用Tripos公司的SYBYL-X1.1软件进行。由于对接计算与起始位点的选择有密切关系,故采用文献[6,7,15]中介绍过的几个关键氨基酸位点作为起始的试探位点,包括Ser-31、His-37、Trp-41和Asp-44。选用SYBYL提供的Surflex-Dock对接计算方法,计算中采用M2蛋白与金刚烷胺的柔性对接,并在打分函数中加入各种非共价键作用的成分。在对接计算的结构基础上,进一步用高档量子化学方法MP2/6-311+G(d,p)和CCSD/6-311+G(d,p)计算精确的配体-受体结合能。为简化计算量,在量子化学计算中只计算活性氨基酸与金刚烷胺间的作用能。作用能按(1)式定义,

$$\Delta E(a-b) = E(a-b) - [E(a) + E(b)], \quad (1)$$

其中 $E(a-b)$ 是氨基酸-金刚烷胺复合物的能量, $E(a)$ 和 $E(b)$ 分别是氨基酸和金刚烷胺单体的能量。对接计算在曙光5000工作站上完成,复杂量子化学计算在天津天河一号超级计算机上(TH-1A super computer)完成(www.nssc-tj.gov.cn)。

## 2 结果与分析

文献报导过的金刚烷胺与 M2 质子通道蛋白的可能结合位点有 4 个 (Ser-31、His-37、Trp-41 和 Asp-44), 4 个氨基酸的位置参见图 2。

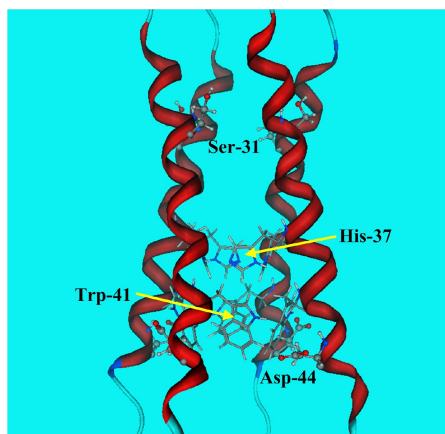


图 2 金刚烷胺在 M2 质子通道蛋白的 4 个可能的氨基酸结合位点 (Ser-31、His-37、Trp-41、Asp-44) 的位置。

Fig. 2 Positions of four possible binding sites (Ser-31, His-37, Trp-41 and Asp-44) of amantadine in M2 proton channel of influenza A virus.

### 2.1 金刚烷胺与 M2 质子通道的对接计算

在图 1 所示的 M2 质子通道的两个结构中, X-ray 法测定的 M2 结构 (PDB 代码 3C9J) 是一个不完全的通道结构, 缺少通道的底座部分, 通道呈开放的喇叭口状。NMR 法测定的 M2 溶液结构 (PDB 代码 2RLF) 是一个完整的通道结构, 包括跨膜部分、膜外的开口和膜内的基座部分。本文基于 M2 的 NMR 结构 2RLF, 在 4 个活性位点 Ser-31、His-37、Trp-41 和 Asp-44 上作对接计算。表 1 列出了得到酸性氨基酸 Asp 和 His 以及碱性的金刚烷胺和金刚烷乙胺的酸电离常数 (pKa)。

表 1 天冬氨酸、组氨酸和金刚烷胺的酸电离常数\* (pKa)

Table 1 The acidic dissociation constants (pKa) of Asp, His and amantadine)

Name	Code	pKa
Histidine	His, H	6.08
Aspartic acid	Asp, D	3.90
金刚烷胺	Amd	9.00
Amantadine monotherapy		
金刚烷乙胺	Rmd	10.40
Amantadine ethylamine		

\* [http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_pKa\\_calculations](http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_pKa_calculations)

在图 2 中, Ser-31 位于 M2 通道跨膜区的上部, 其官能团羟基 ( $-OH$ ) 朝向通道外。金刚烷胺是碱性分子 ( $pKa \approx 9.00$ ), 在细胞内其氨基应是质子化的 ( $-NH_3^+$ ), 无法与 Ser-31 的羟基形成氢键。虽有

文献[4,16]分析 Ser-31 是金刚烷胺的可能结合位点, 我们认为 Ser-31 不像是合适的结合位点。

His-37 位于 M2 通道的中部, 4 个芳香环侧链构成一个网兜状。如果金刚烷胺能够进入通道内部, 其质子化的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 可与 His-37 的芳香环形成很强的阳离子- $\pi$ 键。由于金刚烷胺的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 与 4 个 His-37 的芳香环形成阳离子- $\pi$ 键, 其作用能会很强。

酸性的天冬氨酸 Asp-44 位于 M2 通道的出口, 跨膜区的末端, 其官能团羧基 ( $-COO^-$ ) 朝外。如果金刚烷胺穿透细胞膜, 来到 Asp-44 的位置, 金刚烷胺的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 有可能与 Asp-44 的羧基形成盐桥。因而 Asp-44 是金刚烷胺可能的结合位点。

色氨酸 Trp-41 是最大的芳香氨基酸, 由一个六元环和一个五元环构成。由于色氨酸 Trp-41 的侧链截面积最大, 形成了 M2 通道的最狭窄处。色氨酸 Trp-41 的截面和天冬氨酸 Asp-44 的截面之间的通道空间狭小, 金刚烷胺不可能从通道内部与 Trp-41 形成阳离子- $\pi$ 键作用。如果金刚烷胺穿透细胞膜, 则有可能从 M2 通道的出口处进入, 与 Asp-44 的侧链形成阳离子- $\pi$ 键。

在以上 4 个结合位点作对接计算, 得到的对接结构示于图 3。

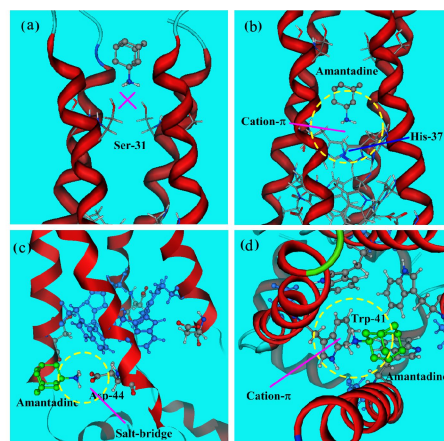


图 3 (a) 金刚烷胺的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 与 Ser-31 的羟基 ( $-OH$ ) 不可能形成氢键。(b) 金刚烷胺的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 与 4 个 His-37 的芳香环侧链形成阳离子- $\pi$ 键。(c) 金刚烷胺的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 与 Asp-44 的羧基形成盐桥。(d) 金刚烷胺的氨基 ( $-NH_3^+$ ) 与 Trp-41 的芳香环侧链形成阳离子- $\pi$ 键。

Fig. 3 (a) Protonated admantadine cannot form hydrogen bond interaction with Ser-31. (b) Admantadine forms cation- $\pi$  bond with four His-37. (c) Admantadine forms salt-bridge with Asp-44. (d) Admantadine forms cation- $\pi$  bond with Trp-41.

## 2.2 金刚烷胺与氨基酸位点结合能的量子化学计算

用量子化学 CCSD/6-311+G(d,p) 方法计算在前节分析的 3 个可能的氨基酸位点(His-37, Trp-41, Asp-44)上金刚烷胺与 M2 质子通道的结合能, 作用结构示于图 4, 结合能列于表 2。

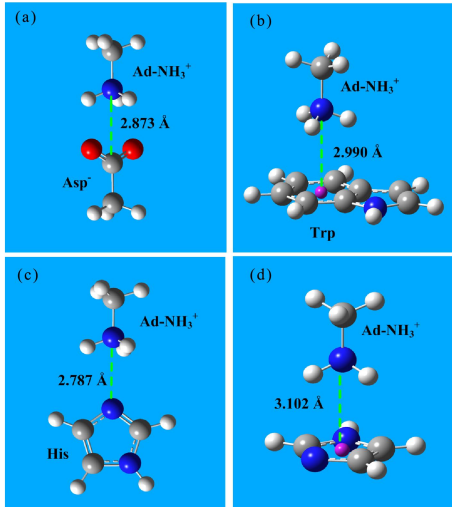


图 4 (a)金刚烷胺(Ad-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)与 Asp-44 的盐桥作用。(b)金刚烷胺(Ad-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)与 Trp-41 的阳离子- $\pi$ 键作用。(c)金刚烷胺(Ad-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)与 His-37 的盐桥作用。(d)金刚烷胺(Ad-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)与 His-37 的阳离子- $\pi$ 键作用。

Fig. 4 (a) The salt-bridge between adamantane and Asp. (b) The cation- $\pi$  bond between adamantane and Trp. (c) The salt-bridge between adamantane and His. (d) The cation- $\pi$  bond between adamantane and His.

在图 4(a)中金刚烷胺的氨基(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)与 Asp-44 的羧基(-COO<sup>-</sup>)形成稳定的盐桥, 作用能高达 -497.7 kJ/mol。图 4(b)中金刚烷胺的氨基(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)与 Trp-41 的芳香环侧链的阳离子- $\pi$ 作用能为 86.41 kJ/mol。组氨酸既是酸性氨基酸, 又是芳香氨基酸, 金刚烷胺与组氨酸 His-37 可形成盐桥作用表 2 金刚烷胺与 M2 通道蛋白的三个结合位点(His-37, Trp-41, Asp-44)的结合能。

Table 2 Binding energies of adamantane at three binding sites (His-37, Trp-41, Asp-44) of M2 proton channel

Interaction pair	B3LYP/6-311+G(d,p)				CCSD/6-311+G(d,p)			
	Gaseous phase		Aqueous phase		Gaseous phase		Aqueous phase	
	$\Delta E_{s-b}$ kJ/mol	Bond Å	$\Delta E_{s-b}$ kJ/mol	Bond Å	$\Delta E_{s-b}$ kJ/mol	Bond Å	$\Delta E_{s-b}$ kJ/mol	Bond Å
Salt-bridge								
Ad-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Asp <sup>-</sup>	-494.3	2.884	-33.17	2.999	-497.7	2.873	-37.64	2.992
Ad-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -His	-89.10	2.793	-11.50	2.901	-93.13	2.787	-15.93	2.893
Cation- $\pi$								
Ad-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -Trp	-71.53	2.990	-12.678	3.043	-86.41	2.903	-16.75	2.990
Ad-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -His	-39.99	3.072	-7.142	3.101	-50.28	3.051	-11.78	3.083

或阳离子- $\pi$ 作用。在图 4(c)中金刚烷胺与组氨酸 His-37 形成的盐桥作用能为 93.13 kJ/mol。在图 4(d)中金刚烷胺与组氨酸 His-37 形成的阳离子- $\pi$ 作用能是 50.28 kJ/mol。这几种作用能都远远高于普通氢键的能量( $\sim 20$  kJ/mol)。

## 3 结论

根据以上计算结果和理论分析可知, 金刚烷胺与 M2 质子通道的可能结合位点是 His-37、Trp-41 和 Asp-44, 金刚烷胺与 M2 质子通道结合的机制可能有两种。一种是 DeGrado 研究组提出的机制: 金刚烷胺从通道开口处进入通道, 与 His-37 可形成阳离子- $\pi$ 作用(或盐桥作用)。另一种是 James Chou 研究组提出的机制: 金刚烷胺首先在细胞膜与 M2 通道之间穿透细胞膜, 然后在通道出口处与 Asp-44 形成强大的盐桥, 或与 Trp-41 形成阳离子- $\pi$ 作用。

在 DeGrado 机制中, 由于金刚烷胺与 4 个 His-37 形成阳离子- $\pi$ 作用(或盐桥作用), 作用能会很强, 但这两种作用都受环境的 pH 值的影响。在酸性环境中, 组氨酸也会质子化(His<sup>+</sup>), 组氨酸质子化后不会再与金刚烷胺形成吸引的阳离子- $\pi$ 作用(或盐桥作用)。M2 蛋白是质子通道, 很有可能是酸性环境。

在 James Chou 的机制中, 类似于洗涤剂分子(detergent like compound)的金刚烷胺有穿透细胞膜的能力, 来到 M2 通道的出口处。金刚烷胺在通道出口处首先与 Asp-44 形成强大的盐桥。但盐桥会在质子流中分解, 解离后金刚烷胺进入通道, 与 Trp-41 形成阳离子- $\pi$ 作用。阳离子- $\pi$ 作用在酸性环境中仍然有较强的作用能(表 2)。

## 参考文献:

- [1] Du Q S, Wang S Q, Chou K C. Analogue inhibitors by modifying oseltamivir based on the crystal neuraminidase structure for treating drug-resistant H5N1 virus [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 362: 525-531.
- [2] Wang S Q, Du Q S, Huang R B, et al. Insights from investigating the interaction of oseltamivir (Tamiflu) with neuraminidase of the 2009 H1N1 swine flu virus [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 386: 432-436.
- [3] De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(12): 1015-1025.
- [4] Stouffer A L, Acharya R, Salom D, et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel [J]. *Nature*, 2008, 451: 596-599.
- [5] Schnell J R, Chou J J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus [J]. *Nature*, 2008, 451: 591-595.
- [6] Huang R B, Du Q S, Wang C H, et al. An in-depth analysis of the biological functional studies based on the NMR M2 channel structure of influenza A virus [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377: 1243-1247.
- [7] Chen J G, Zhu W L, Wang Y L, et al. The open-close mechanism of M2 channel protein in influenza A virus; A computational study on the hydrogen bonds and cation- $\pi$  interactions among His37 and Trp41 [J]. *Sci China Ser B-Chem*, 2008, 51(8): 768-775.
- [8] Gu R X, Liu L A, Wei D Q, et al. Free energy calculations on the two drug binding sites in the M2 Proton Channel [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 10817-10825.
- [9] Balannik V, Carnevale V, Fiorin G, et al. Functional studies and modeling of pore-lining residue mutants of the influenza A virus M2 ion channel [J]. *Biochemistry*, 2010, 49: 696-708.
- [10] Pielak R M, Chou J J. Influenza M2 proton channels [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-biomembranes*, 2011, 1808(2): 522-529.
- [11] Du Q S, Liu P J, Deng J. Empirical correction to molecular interaction energies in density functional theory (DFT) for methane hydrate simulation [J]. *J Chem Theory Comput*, 2007, 3(5): 1665-1672.
- [12] Du Q S, Li D P, Liu P J, et al. Molecular potential energies in dodecahedron cell of methane hydrate and dispersion correction for DFT [J]. *J Mol Graphics and Modelling*, 2008, 27: 140-146.
- [13] Patchkovskii S, Tse J S. Thermodynamic stability of hydrogen clathrates [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 14645-14650.
- [14] Cao Z, Tester J W, Trout B L. Computation of the methane-water potential energy hypersurface via ab initio methods [J]. *J Chem Phys*, 2001, 115: 2550-2559.
- [15] Du Q S, Huang R B, Wang S Q. Designing Inhibitors of M2 Proton Channel against H1N1 Swine Influenza Virus [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(2): e9388.
- [16] Wang J, Wu Y b, Ma C L, et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus [J]. *PNAS*, 2013, 110(4): 1315-1320.

(责任编辑:尹 闯)