

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.08.006

人酪氨酸酶的同源模建研究

周游¹, 王远强², 何清秀²

1. 西南大学 生物技术学院, 重庆 400715; 2. 重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054

摘要: 酪氨酸酶是皮肤黑色素生物合成过程中的限速酶, 其抑制剂作为皮肤脱色剂具有重要的商业价值。目前尚无可用的人酪氨酸酶晶体结构, 极大地限制了人酪氨酸酶抑制剂的研究。以人酪氨酸酶相关蛋白-1 的晶体结构为模板, 利用同源模建法对人酪氨酸酶的三维结构进行了模拟, 采用分子对接对曲酸与人源模型和蘑菇酪氨酸酶的结合模式进行比较。随后采用分子动力学方法获得了稳定的复合物结构以获得更详细的信息。该研究为接下来的人酪氨酸酶抑制剂的虚拟筛选打下了基础, 也为基于曲酸结构开发更高效的人酪氨酸酶抑制剂提供了思路。

关键词: 人酪氨酸酶; 人酪氨酸酶相关蛋白-1; 同源模建; 分子动力学

中图分类号: Q503

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2020)08-0042-07

酪氨酸酶(tyrosinase, EC 1.14.18.1)是一种广泛分布于自然界的多功能铜离子金属酶, 是黑色素生物合成过程中的限速酶。目前已知酪氨酸酶负责催化黑色素生物合成途径中的前两步: 催化酪氨酸发生羟化反应生成 L-3, 4-二羟基苯丙氨酸以及催化氧化 L-3, 4-二羟基苯丙氨酸生成多巴醌^[1]。已知酪氨酸酶与一些因皮肤色素沉积而产生的问题如老年斑、雀斑、炎症后黑变病等关系密切^[2]。因此, 酪氨酸酶抑制剂可作为皮肤脱色剂或美白化妆品成分等应用于医药、化妆品等领域。目前已有许多天然或化学合成来源的酪氨酸酶抑制剂如氢醌、曲酸和熊果苷等被报道, 但活性均十分有限, 其中一些酪氨酸酶抑制剂如氢醌还存在安全性问题^[3]。因此, 寻找和开发高效安全的酪氨酸酶抑制剂具有十分重要的意义。

迄今为止已有 *Streptomyces castaneoglobisporus* (链霉菌), *Bacillus megaterium* (巨大芽孢杆菌), *Agaricus bisporus* (双孢蘑菇), *Citrobacter intermedius* (柠檬酸杆菌)等几十种来源的酪氨酸酶的蛋白晶体结构被报道。对人源酪氨酸酶晶体结构的研究已有初步报道, 但受限于分辨率尚无法应用^[4]。总体而言, 酪氨酸酶的结构分为 3 个部分: 中央域, N-端域, C-端域。中央域为保守结构域, 含有两个相邻的 Cu^{2+} , 分别与 3 个组氨酸残基配位, 另有 1 个内源桥基将这 2 个 Cu^{2+} 联系在一起^[5]。在酪氨酸酶抑制剂的研究中, 商业化的双孢蘑菇酪氨酸酶通常作为蛋白模型用于体外筛选和抑制活性评价, 但其与人酪氨酸酶蛋白的氨基酸序列一致性仅为 12%, 且研究表明化合物对双孢蘑菇酪氨酸酶的抑制活性与对人酪氨酸酶的抑制活性存在较大偏差^[6-8]。因此, 构建有效可靠的人酪氨酸酶同源模型将有利于开展基于结构的虚拟筛选, 以及对人源酪氨酸酶活性抑制剂的结合模式和构效关系进行研究。

1 方 法

1.1 同源模建

对三维结构未知的蛋白而言, 根据具有同源性且已有三维结构的模板蛋白进行同源模建是最为可靠的

收稿日期: 2020-05-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81803367)。

作者简介: 周游(1984-), 男, 博士, 讲师, 主要从事药物化学与药物设计的研究。

结构预测方法^[9]. 本研究中人源酪氨酸酶的氨基酸全序列(P14679, 529AA)从 UniProtKB 数据库(<http://www.uniprot.org>)获取, 同源模建模板使用人酪氨酸酶相关蛋白-1 的晶体结构(PDB ID: 5M8M)^[10]. 同源模建过程如下: 1) 使用蛋白质结构预测软件 MODELLER 9.24 对人酪氨酸酶蛋白与模板蛋白的一级序列(P17643, 537AA)进行序列比对^[11]; 2) 以模板蛋白的 X 射线衍射结构为模板生成 10 个模型结构, 并以 DOPE 得分进行排序; 3) 同源模建过程中保留金属离子和配体分子(曲酸); 4) 选择 DOPE 得分最高的模型结构作为同源模建的最优结构, 并将配体锌离子(Zn^{2+})替换为铜离子(Cu^{2+}), 将其用于后续的分对接与分子动力学模拟研究.

1.2 分子对接

本研究使用 SYBYL-2.1 软件的 Biopolymer 程序对同源模建的最优结构进行预处理, 主要包括加氢、加电荷、通过能量优化修复残基可能存在的原子间碰撞. 基于配体分子定义并生成结合位点, 将曲酸分子重新对接回结合位点. 分子对接使用 SYBYL-X 2.11 软件的 Surflex-Dock GeomX(SFXC)程序, 对接得分表示为 $-\log_{10}(K_d)$, 对接参数设置如下: “配体初始构象数量”设置为 10, “片段最大构象数量”设置为 20, “分子最大可旋转键”数量设置为 100, 对接过程选中“对接前优化”“对接后优化”“分子碎片化”和“柔性格点”选项. “启动基于密度搜索的旋转叠合”设置为 9, “叠合的旋转数量”设置为 12.

1.3 分子动力学模拟

本研究使用 Amber 程序^[12-15]对 1.2 中获得的人酪氨酸酶-曲酸复合物进行分子动力学以获得其稳定构象. 详细过程如下: 1) 在动力学文件准备过程中, 人酪氨酸酶蛋白使用 AMBER ff14SB 力场, 曲酸配体分子使用 AM1-BCC 原子电荷和 GAFF 力场参数, 金属离子及其连接的氨基酸的力场参数和电荷由 MCPB.py 程序产生; 2) 将复合物溶于 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液中, 包括 18 381 个水分子, 50 个 Na^+ 和 49 个 Cl^- , 体系大小为 $\sim 91 \text{ \AA} \times 91 \text{ \AA} \times 91 \text{ \AA}$. 3) 系统首先经过多步能量最小化以避免可能的原子碰撞, 随后从 0 K 加热到 300 K 并始终保持在 300 K 进行平衡和采样, 在加热、平衡和采样阶段的时间步长为 2 fs, 体系采用周期性边界条件和常温常压系综(NPT). 体系压力通过各向异性调整并保持 1 个标准大气压, 调整时间为 1 ps; 体系温度通过 Langevin 动力学进行调整, 调整频率为 2 ps; 长程静电力用 PME 方法处理, 体系原子间相互作用计算截断值为 10 \AA ; 所用涉及氢原子的共价键使用 SHAKE 算法进行限制. 系统采样间隔为 100 ps. 4) 最后, 使用 MM/PBSA 方法计算结合自由能, 并计算关键残基与配体的相互作用. 使用拉氏图对进行分子动力学模拟之后获得的稳定构象进行分析, 判断结构的合理性.

2 结果与分析

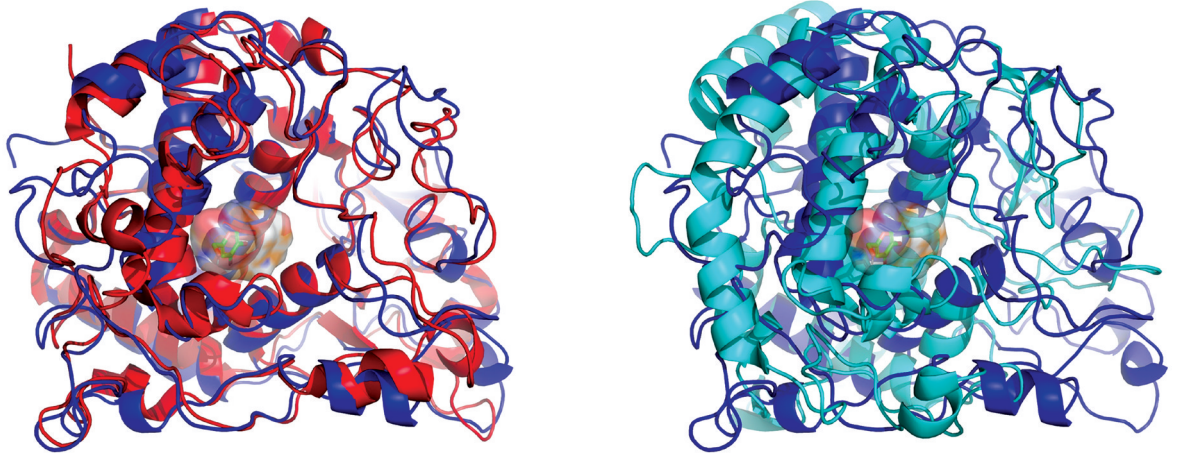
2.1 同源模建结果与分析

由于人酪氨酸酶蛋白结晶困难, 至今尚无可用的蛋白晶体结构被报道. 虽然商业化蘑菇酪氨酸酶被广泛应用于酪氨酸酶抑制剂的活性筛选, 但其与人源蛋白的一致性仅为 12%, 以其为模板难以获得可靠有效的人酪氨酸酶同源模型. 2017 年, Lai 等^[10]报道了人酪氨酸酶相关蛋白-1 (tyrosinase related protein-1) 的三维结构(PDB ID: 5M8M, 分辨率 2.65 \AA), 其与人酪氨酸酶蛋白的序列一致性为 40%. 以此蛋白为模板可以构建更为可靠的人酪氨酸酶的三维结构模型, 但文献调研发现目前尚无相关报道. 根据模型结构的 DOPE 得分, 我们选择 1 号模型结构为最优结构. 与模板结构的叠合结果显示二者具有良好的相似度($RMSD = 1.328$), 结合位点基本重合(图 1a). 而 1 号模型结构与蘑菇酪氨酸酶的三维结构(PDB ID: 2Y9W)叠合结果显示二者存在较大差异($RMSD = 11.477$), 结合位点也发生了偏移(图 1b).

2.2 分子对接结果与分析

使用 SYBYL-2.1 软件的 Biopolymer 程序对同源模建获得的最优结构进行预处理, 主要包括加氢、加电荷、通过能量优化修复残基可能存在的原子间碰撞, 并通过 PROCHECK 程序^[16]评估模型结构的立体化学参数(如分子中的键长、键角以及二面角的分布, 尤其是蛋白质多肽链二面角 ψ 和 ϕ 是否位于合

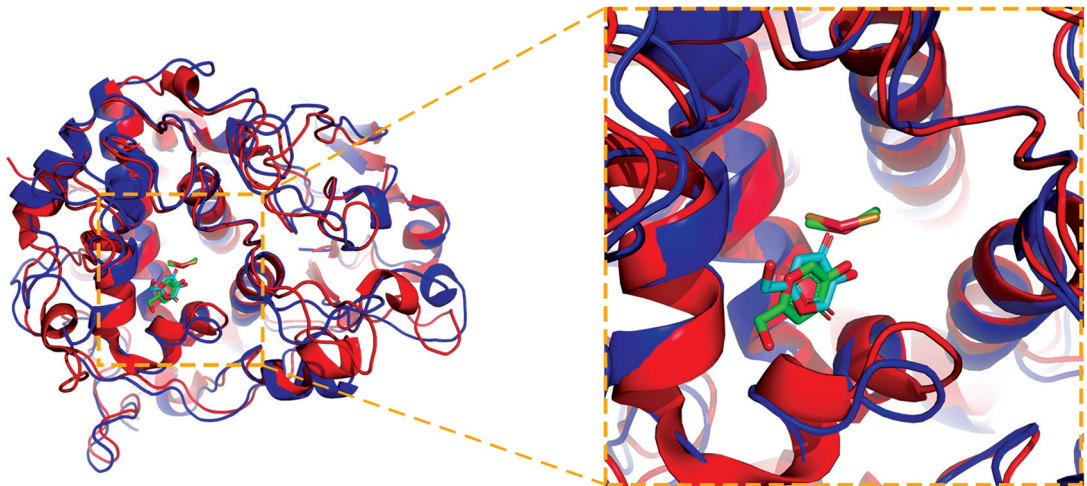
理区域)。分析显示同源模建蛋白 82.1% 的氨基酸残基落入最佳区域 (Most favoured region), 17.4% 的氨基酸残基落入允许区域 (Allowed regions), 仅有 0.5% 的氨基酸残基位于不允许区域 (Disallowed regions), 说明模建结构氨基酸的空间构象较为合理, 可以用于进行接下来的分子对接。基于配体分子定义并产生结合位点后, 我们将曲酸分子重新对接回人酪氨酸酶同源模型中, 与模板蛋白 (PDB ID: 5M8M)、蘑菇酪氨酸酶 (PDB ID: 2Y9W) 的晶体结构进行叠合比较分析。图 2 显示模板蛋白与同源模型活性位点内的曲酸分子基本重合, 表明二者的结合位点基本一致。而曲酸分子在蘑菇酪氨酸酶与同源模型活性位点中的结合构象则存在明显差别, 同时能清楚地看到二者的结合位点发生了偏移 (图 3)。具体情况如图 4 所示: 曲酸与模型结构的活性位点存在 3 个较强的氢键相互作用, 分别是 5 位羟基与桥基氧的氢键相互作用 (2.9 Å)、4 位羰基与 Ser386 间的氢键相互作用 (3.0 Å)、2 位羟甲基与 Ser381 间的氢键相互作用 (3.1 Å)。而在蘑菇酪氨酸酶的结合位点中, 曲酸分子发生翻转, 2 位羟甲基与桥基氧 (3.3 Å)、Asn260 的羰基 (3.1 Å)、Glu256 的羧基 (3.5 Å), 5 位羟基与 Asn260 主链上的羰基间形成了较强氢键, 而 4 位羰基并未与残基形成分子间的相互作用。



(a) 同源模建结构(蓝色)与酪氨酸相关蛋白-1晶体结构(红色)叠合

(b) 同源模建结构(蓝色)与蘑菇酪氨酸酶蛋白结构(青色)叠合

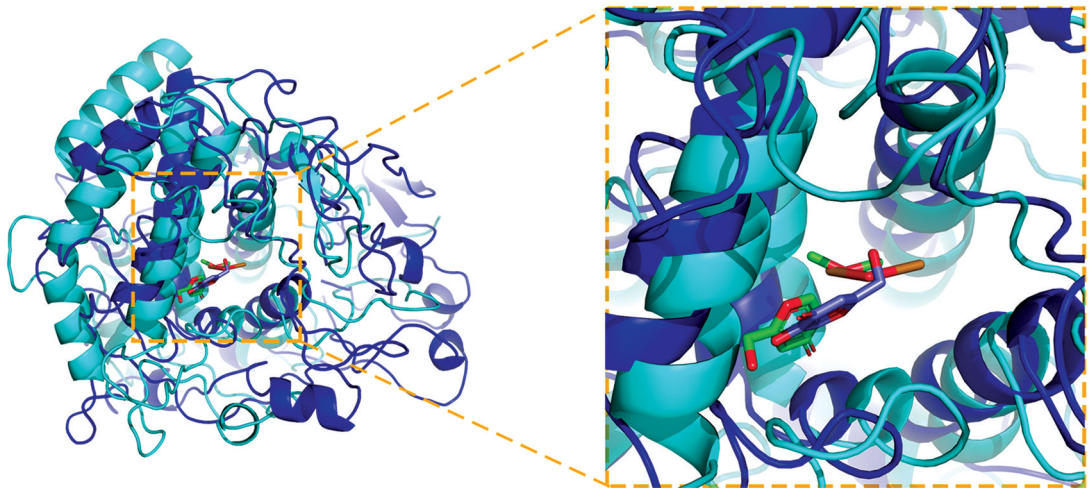
图 1 同源模型与模板蛋白的叠合分析



(a) 分子对接后的人酪氨酸酶同源模型(蓝色)与酪氨酸酶相关蛋白-1(红色)的叠合

(b) 结合口袋内的曲酸分子

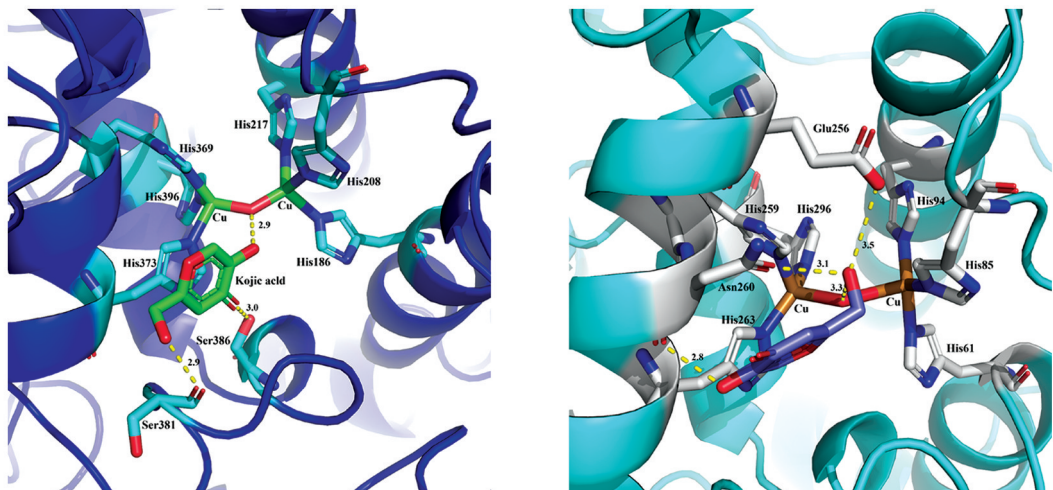
图 2 叠合分析一



(a) 分子对接后的人酪氨酸酶同源模型(蓝色)与蘑菇酪氨酸酶(青色)的叠合

(b) 结合口袋内的曲酸分子

图 3 叠合分析二



(a) 曲酸分子与人酪氨酸酶结合模式图

(b) 曲酸分子与蘑菇酪氨酸酶结合模式图

图 4 曲酸分子与酪氨酸酶结合模式图

2.3 分子动力学模拟与结合自由能分析

为了获得模建人酪氨酸酶蛋白与曲酸分子的稳定复合物,我们以分子对接构象为初始构象,进行 130 ns 的分子动力学模拟,结果见图 5a。分子动力学模拟过程中,在 100 ns 之后,复合物主链原子的误差在 2.0 \AA 附近波动,而曲酸分子的误差在 0.5 \AA 上下波动,说明复合物结构已达到稳定。拉氏图(图 5b)显示稳定后的人酪氨酸酶蛋白结构其构象合理性得到进一步提高,落入合理区域(Favoured region)的氨基酸残基达到 95.4%,此外有 3.9%的氨基酸残基落入接受区域(Allowed region),仅有 0.7%的氨基酸残基落入不允许区域(Outlier region)。具体分析发现落入不允许区域的氨基酸分别为 Pro332, Thr291, Pro388,均为不影响曲酸结合的非关键氨基酸。一般情况下,若 90%以上的氨基酸残基落入合理区域,则认为蛋白质模型的质量是可靠的。图 6 显示,200 ns 后,除 C 端个别氨基酸之外,绝大多数氨基酸的误差在 $1 \sim 2 \text{ \AA}$ 范围之后,表明同源模建的蛋白结构比较稳定。进一步分析结合位点的关键氨基酸波动,发现关键氨基酸的波动均在 1 \AA 范围之内,表明结合位点同样非常稳定。

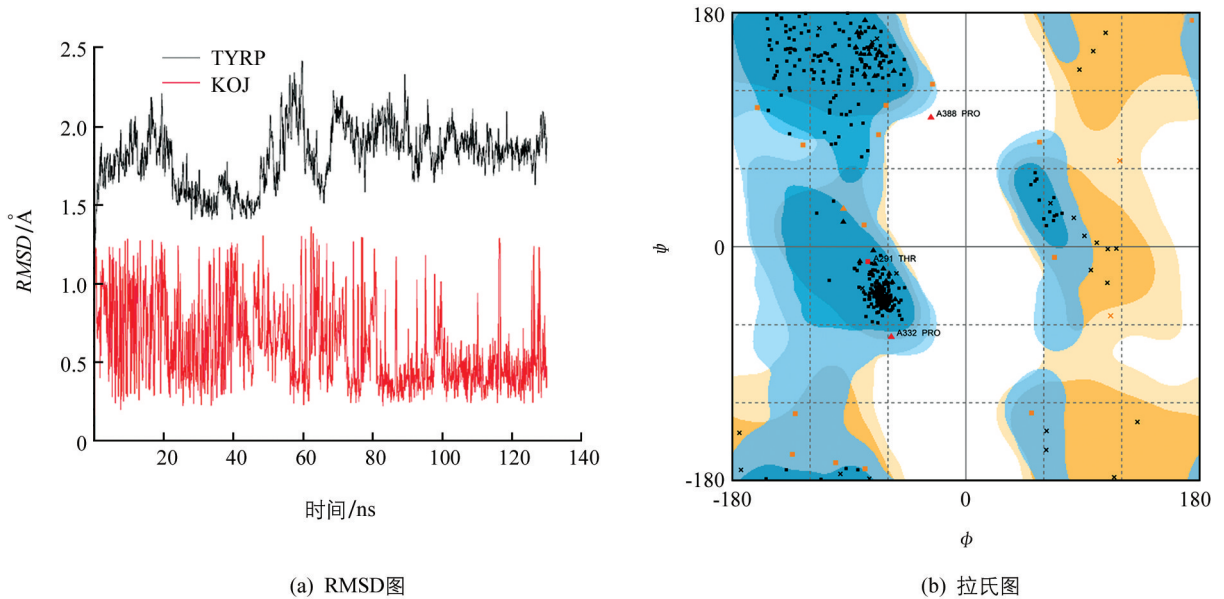


图 5 同源模建结构 130 ns 分子动力学模拟

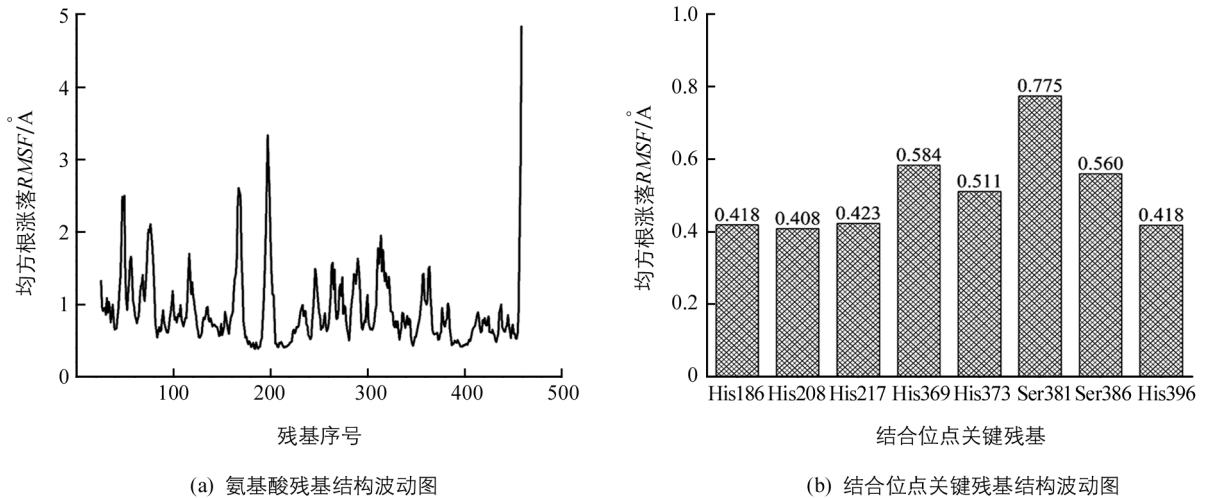


图 6 同源模建结构 200 ns 之后的氨基酸结构波动图

我们使用 MM/GBSA 方法对曲酸与人酪氨酸酶相互作用中的潜在关键氨基酸做了进一步分析, 图 7 显示 His208, His369, His373 和 Ser381 同配体曲酸的相互作用能较低, 主要来自范德华力和静电相互作用的贡献。而 His186, Ser386 同曲酸的相互作用能并不理想, 主要受极性溶剂化的影响, 接下来在对曲酸的结构修饰改造中可进行改善。

在通过动力学获得人酪氨酸酶与曲酸分子的稳定复合物之后, 我们再次对曲酸分子与酶的结合模式进行分析(图 8)。在经过

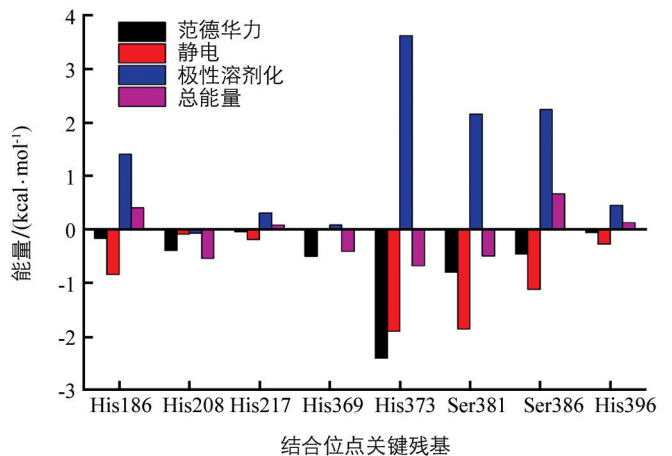
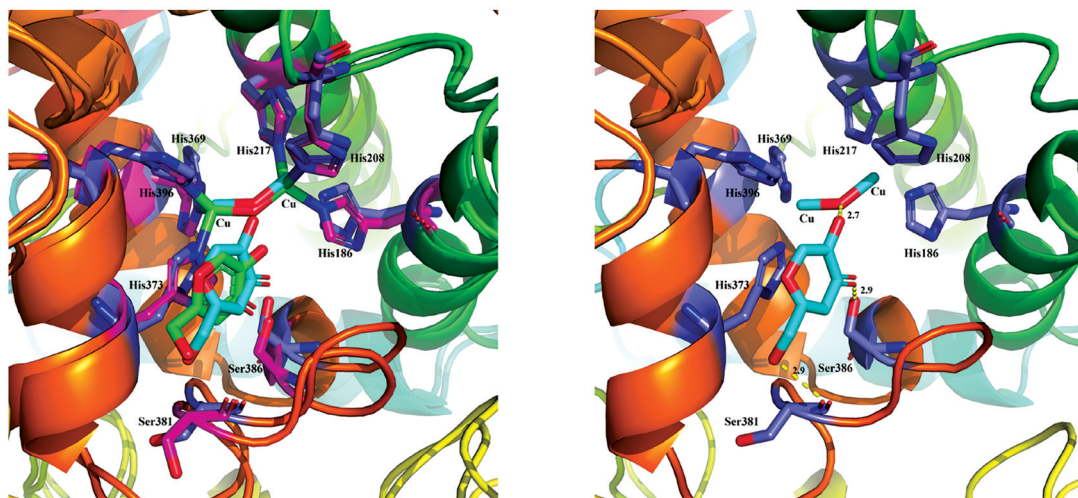


图 7 结合位点关键残基能量贡献图

130 ns 的分子动力学之后, 稳定复合物中的曲酸分子与其初始结构的芳香环能够较好的重合, 但 2 位羟甲基的取向变化相对较大; 与铜离子形成络合结构的组氨酸和水分子基本没有发生变化, 由于 Ser381 与

Ser386 处于 loop 区, 位移较为明显. 对比分子动力学前后(图 8a 和图 8b)发现, 曲酸与水分子(2.9 \AA vs 2.7 \AA)以及关键氨基酸 Ser386(3.0 \AA vs 2.9 \AA)、Ser381(3.3 \AA vs 2.9 \AA)所形成的氢键基本未变, 说明曲酸分子与水分子以及与上述关键氨基酸残基间具有稳定的相互作用.



(a) 分子动力学模拟前的结合模式

(b) 分子动力学模拟后的结合模式

图 8 人酪氨酸酶与曲酸结合模式图

3 结 论

人酪氨酸酶作为限速酶在皮肤黑色素生物合成过程中扮演着非常重要的角色, 无可用的晶体结构的现状阻碍了人酪氨酸酶抑制剂的研究和皮肤脱色剂以及美白化妆品等的开发. 本研究基于人酪氨酸酶相关蛋白-1 的氨基酸序列及晶体结构, 采用同源模建方法构建人酪氨酸酶的三维结构. 通过 DOPE 打分选择最优结构并进行蛋白准备后, 再通过 PROCHECK 程序对模型结构的质量进行评估. 在此基础上, 我们通过分子对接, 比较分析了曲酸与人源酪氨酸酶以及蘑菇酪氨酸酶的结合模式, 并通过分子动力学方法获得了稳定的曲酸-人酪氨酸酶复合物, 对曲酸的结合构象以及活性位点内的潜在关键氨基酸残基、关键分子间相互作用进行了研究. 本研究为接下来的人酪氨酸酶抑制剂虚拟筛选提供了可靠的结构模型, 同时也为基于曲酸开发更为高效的人酪氨酸酶抑制剂提供了思路.

参考文献:

- [1] 李 溯, 丁劲松. 黑色素生物合成与酪氨酸酶抑制剂的研究进展 [J]. 中中药学, 2013, 11(4): 278-282.
- [2] 姚 彬, 张莉莉, 任 清. 皮肤黑色素的形成及美白剂美白机制 [J]. 北京日化, 2007(2): 18-22.
- [3] 陈永红, 邹志飞, 王 岚, 等. 曲酸对动物的毒性研究及安全性评价 [J]. 食品科学, 2007, 28(9): 536-540.
- [4] DOLINSKAM B, WINGFIELD P T, SERGEEV Y V. The Purification of Recombinant Human Tyrosinase from Insect Larvae Infected with the Baculovirus Vector [J]. Current Protocols in Protein Science, 2017, 89(1): 1-12.
- [5] ISMAYA W T, ROZEBOOM H J, WEIJN A, et al. Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone [J]. Biochemistry, 2011, 50(24): 5477-5486.
- [6] HA Y M, PARK Y J, LEE J Y, et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 2-(substituted Phenyl)thiazolidine-4-carboxylic Acid Derivatives as Novel Tyrosinase Inhibitors [J]. Biochimie, 2012, 94(2): 533-540.
- [7] VONTZALIDOU A, ZOIDIS G, CHAITA E, et al. Design, Synthesis and Molecular Simulation Studies of Dihydrostilbene Derivatives as Potent Tyrosinase Inhibitors [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(17): 5523-5526.
- [8] CHANG T S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(6): 2440-2475.

- [9] CHOTHIA C, LESK A M. The Relation between the Divergence of Sequence and Structure in Proteins [J]. The EMBO Journal, 1986, 5(4): 823-826.
- [10] LAI X L, WICHERS H J, SOLER-LOPEZ M, et al. Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(33): 9812-9815.
- [11] ŠALI A, BLUNDELL T L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints [J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 234(3): 779-815.
- [12] ZHANG W, HOU T J, QIAO X B, et al. Parameters for the Generalized Born Model Consistent with RESP Atomic Partial Charge Assignment Protocol [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2003, 107(34): 9071-9078.
- [13] HORNAK V, ABEL R, OKUR A, et al. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2006, 65(3): 712-725.
- [14] ROE D R, CHEATHAM T E III. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013, 9(7): 3084-3095.
- [15] MILLER B R III, MCGEE T D Jr, SWAILS J M, et al. MMPBSA. py: an Efficient Program for End-State Free Energy Calculations [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012, 8(9): 3314-3321.
- [16] LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S, et al. PROCHECK: a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures [J]. Journal of Applied Crystallography, 1993, 26(2): 283-291.

Homology Modeling of Human Tyrosinase

ZHOU You¹, WANG Yuan-qiang², HE Qing-xiu²

1. School of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

Abstract: Tyrosinase is responsible for the rate-limiting step in melanin synthesis in mammalian skin. Potent human tyrosinase inhibitors are of important commercial value as a skin-depigmenting agent. So far, no crystal structure for full length human tyrosinase is available, which hinders the study of human tyrosinase inhibitors. In this study, a homology model of the 3D structure of human tyrosinase was built by means of the homology modeling method. The recently obtained crystal structure of human tyrosinase-related protein-1, which has high identity (40%) to the human enzyme, was used as the template. The molecular docking approach was employed to compare the binding modes of kojic acid with those of human enzyme and mushroom tyrosinase. Then, the molecular dynamics method was used to obtain the stable structure of the complex for more detailed information. It is estimated that this research lays a foundation for further virtual screening for human tyrosinase inhibitors and provides useful information to modify the structure of kojic acid for the development of more potent human tyrosinase inhibitors.

Key words: human tyrosinase; human tyrosinase-related protein-1; homology modeling; molecular dynamics