

# 以结核分枝杆菌丙氨酸消旋酶为靶点的抗结核药物筛选及其与 D-环丝氨酸的共结晶

马娟娟<sup>1,2</sup> 张国防<sup>1,2</sup> 陈帅<sup>2,3</sup> 姚丽娜<sup>2,3</sup> 刘祥<sup>2\*</sup>

(1. 天津科技大学 天津 300457)

(2. 天津国际生物医药联合研究院 天津 300457)

(3. 南开大学 天津 300071)

**摘要:**【目的】阐释结核分枝杆菌丙氨酸消旋酶原有抑制剂 D-环丝氨酸的作用机制, 建立丙氨酸消旋酶抑制剂的高通量筛选模型, 并用此模型筛选到新的抑制剂分子。【方法】将结核分枝杆菌中丙氨酸消旋酶基因克隆到 pET-28a 表达载体中, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中得到可溶性的大量表达。表达后的蛋白质通过镍离子亲和层析和阴离子交换层析得到纯化, 一方面将纯化后的蛋白和 D-环丝氨酸共结晶以解析其抑制剂作用的分子机制。另一方面建立并优化丙氨酸消旋酶抑制剂的高通量筛选体系, 用 D-环丝氨酸验证体系的可行性并用该体系筛选本实验室药物库中的 384 种小分子片段、792 种化合物及 2 200 种中药样品。【结果】得到的共晶晶体衍射能力 2.50 Å, 晶体空间群为  $P4_12_12$ , 晶胞参数  $a=b=163.92$  Å,  $c=57.44$  Å。结构分析表明, D-环丝氨酸进入活性位点之后与磷酸吡哆醛相互作用形成磷酸吡哆胺, 使得磷酸吡哆醛的 C4' 原子与 K42 之间的相互作用被破坏, 从而改变了结核分枝杆菌丙氨酸消旋酶的活性中心氢键网络。同时经 D-环丝氨酸验证建立的抑制剂筛选体系可行, 获得阳性化合物分子 2 个。【结论】依据我们所建立的高通量筛选体系可以有效地为结核分枝杆菌丙氨酸消旋酶筛选到可信的抑制剂分子。

**关键词:** 结核分枝杆菌, 丙氨酸消旋酶, 抗结核药物, D-环丝氨酸, 药物筛选, 蛋白质结晶

## Anti-tuberculosis drug screening of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* and its co-crystallized with D-cycloserine

MA Juan-Juan<sup>1,2</sup> ZHANG Guo-Fang<sup>1,2</sup> CHEN Shuai<sup>2,3</sup> YAO Li-Na<sup>2,3</sup> LIU Xiang<sup>2\*</sup>

(1. Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology & Medicine, Tianjin 300457, China)

(3. Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of this work was to investigate the inhibition mechanism of

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31200641); 国家生物医药国际创新园专项项目(No. 10ZCKFSY08600, 11ZCKFSY06900, 11ZCKFSY06300)

\*通讯作者: Tel: 86-22-65378882; ✉: xiang.liu@htmdc.org

收稿日期: 2013-10-16; 接受日期: 2013-12-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

D-cycloserine (DCS) on alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* ( $\text{Alr}_{Mtb}$ ), and build up a high-throughput screening assay to screen for new inhibitors of  $\text{Alr}_{Mtb}$ . **[Methods]** The  $\text{Alr}_{Mtb}$  gene was cloned into pET28a vector and over-expressed in soluble form in *E. coli* strain BL21(DE3). The protein was purified using  $\text{Ni}^{2+}$ -chelating chromatography followed by anion exchange chromatography. The  $\text{Alr}_{Mtb}$  protein was co-crystallized with DCS to make clear of the inhibitory mechanism. In addition, a high-throughput screening assay for new inhibitors was set up in order to obtain new anti-tuberculosis drugs that inhibited  $\text{Alr}_{Mtb}$  activity. About 384 small-molecule fragments, 792 chemicals and 2 200 components of traditional Chinese Medicine were tested in this assay where DCS was used as the positive reference. **[Results]** The protein crystals of  $\text{Alr}_{Mtb}$ -DCS complex diffract to 2.5 Å. The space group of the crystals is  $P4_12_12$  with cell parameters  $a=b=163.92$  Å,  $c=57.44$  Å. In the  $\text{Alr}_{Mtb}$ -DCS structure model, DCS was shown to react with PLP and formed a new molecule PMP. This process disrupted previous interaction between the C4' atom of PLP and Lysine 42 in  $\text{Alr}_{Mtb}$  and thereby changed the hydrogen bonding network in the active site. Via the high-throughput screening assay, we successfully identified two new inhibitors of  $\text{Alr}_{Mtb}$ . **[Conclusion]** The high-throughput inhibitor screening assay we built is an effective and powerful method for the identification of new inhibitors of  $\text{Alr}_{Mtb}$ .

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Alanine racemase, Anti-tuberculosis drugs, D-Cycloserine, Drug screening, Protein crystallization

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染引起的严重危害人类健康的传染病,也是目前单一致病菌感染导致病死率最高的疾病,影响着世界三分之一人口的健康<sup>[1]</sup>。特别是伴随日益增加的人口流动、艾滋病的流行、结核杆菌与艾滋病毒等病原体共感染等问题,以及由于药物滥用而产生的多重耐药性(Multi-drug-resistant, MDR)结核杆菌和广泛耐药性(Extensively-drug-resistant, XDR)结核杆菌感染,使得全球结核病发病率呈现不断上升的趋势<sup>[2]</sup>。因此,结核病对人类的生命威胁仍旧十分严峻,所以开发新的抗结核分枝杆菌药物迫在眉睫。

在结核分枝杆菌中,细胞壁主要是由肽聚糖、阿拉伯半乳聚糖和霉菌酸等物质通过共价键连接成的网状复杂结构。由于其组成成分及合成途径是结核杆菌特有的,在哺乳动物细胞中不存在,因此阻碍细胞壁的形成是目前开发抗结核分枝杆菌药物的主要着眼点<sup>[3]</sup>。丙氨酸消旋酶(EC5.1.1.1)(Alanine racemase, Alr)在结核杆菌中以磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5'-phosphate, PLP)为辅酶催化 L-丙氨酸和 D-丙氨酸的转化,而 D-丙氨酸是细菌细胞壁中肽聚糖的组成成分<sup>[4]</sup>。因丙氨酸消旋酶是细菌细

胞壁合成过程中必不可少的<sup>[5]</sup>,同时,由于在结核分枝杆菌里只有一种丙氨酸消旋酶<sup>[6]</sup>,且该酶是分枝杆菌生长所必需而人类所缺少的<sup>[7]</sup>,因此一直以来丙氨酸消旋酶是一个抗结核杆菌的重要靶点。目前,大多已知的丙氨酸消旋酶抑制剂,如 D-环丝氨酸(D-Cycloserine, DCS)等,或是底物类似物,或作用于酶上的辅基磷酸吡哆醛,对其他磷酸吡哆醛依赖酶也有抑制作用,缺乏特异性<sup>[8]</sup>。这也是针对丙氨酸消旋酶的结核病药物开发的主要瓶颈之一<sup>[9]</sup>。因此,寻找特异性丙氨酸消旋酶抑制剂是抗结核药物开发的研究基础。

本研究中将结核分枝杆菌中的丙氨酸消旋酶基因构建到大肠杆菌中,经表达纯化获得具有活性的丙氨酸消旋酶蛋白。一方面通过结构生物学手段将丙氨酸消旋酶与 DCS 共结晶,获得丙氨酸消旋酶原有抑制剂的分子基础。另一方面,构建丙氨酸消旋酶的高通量药物筛选模型并用 DCS 验证该体系的可行性,通过对天津市国际生物医药联合研究院高通量药物筛选中心药物库中的 3 376 种化学小分子进行初筛和复筛,获得比现有阳性药物抑制效果更好的两种抑制剂。这些研究结果为抗结核药物的发现和研究提供了实验基础和结构基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株和载体: 菌株: 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)均为本实验室保藏; 载体: pET-28a 为本实验室保藏; 基因: 结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 由南开大学结构生物学实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA 聚合酶(Fast PFU enzyme)、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司; ÄKTA 层析系统, GE Healthcare; JN-3000 低温高压超声细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Rigaku X-ray 衍射仪, Rigaku; Fluoroskan Ascent 荧光分析, Thermo; Mosquito 自动化晶体筛选机器人, TTP LABTECH; Nunc96 孔板, Thermo。

D-丙氨酸、L-丙氨酸和 NAD 购自 Sigma 公司; 丙氨酸脱氢酶(Alanine dehydrogenase)来自于枯草芽孢杆菌, 本实验中自己表达纯化; D-环丝氨酸购自上海生工生物工程公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 丙氨酸消旋酶( $Alr_{Mtb}$ )基因重组质粒的构建及其表达: (1)  $Alr_{Mtb}$  基因的体外扩增及原核表达载体的构建: 利用目前网络数据库查询结核分枝杆菌 H37Rv 中  $Alr_{Mtb}$  的序列(GenBank 登录号 AF172731), 经 Smart 网站预测 N 端前 10 个氨基酸不是蛋白的功能域, 故截掉前 10 个氨基酸。设计适当的引物, 引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 序列如下: 上游: 5'-CGGGA TCC(*Bam*H I)CTCGCCGAGGCCATG-3'; 下游: 5'-CCGCTCGAG(*Xho* I)TCAACGGTTTTTCAGCC TCGCG-3'。

以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, PCR 反应扩增出目的基因片段, 扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 进行回收纯化。然后进行目的基因片段双酶切(*Bam*H I/*Xho* I), 将酶切后胶回收的产物与 pET-28a (已经用 *Bam*H I/*Xho* I 切好)载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接 (16  $^{\circ}$ C, 6 h), 连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 然后涂布于含有 1 mmol/L 卡那霉素的 LB 平板上,

37  $^{\circ}$ C 培养 14 h, 筛选重组子, 提取质粒, 双酶切鉴定插入片段后, 测序验证序列的正确性。

(2)  $Alr_{Mtb}$  蛋白的表达纯化: 将序列正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 涂布于含有 1 mmol/L 卡那霉素的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 10 h, 挑取转化子在 5 mL 含 1 mmol/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37  $^{\circ}$ C 培养 4 h 至  $OD_{600}=0.8$ , 取 200  $\mu$ L 菌液作为诱导前样, 在剩余的菌液中加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 于 37  $^{\circ}$ C 诱导 3 h 后, 取 200  $\mu$ L 菌液作为诱导后样, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)检测  $Alr_{Mtb}$  在 BL21(DE3)中的表达情况。

试表达成功, 挑取转化子在含 1 mmol/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}=0.8$ , 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 16  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜诱导表达。用离心分离的方法收集菌体, 并用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl 重悬菌体, 使用超低温高压细胞破碎仪裂解细胞, 裂解液于 15 000 r/min 离心 30 min, 让上清液过  $Ni^{2+}$ -NTA 琼脂糖柱 3 遍, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl、50 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl、250 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白, 目的蛋白洗脱液浓缩并换 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl 缓冲液 1 次, 进一步浓缩后采用 KTA 系统进行蛋白的分离纯化, 以 1 mL 预装 RESOURCE<sup>TM</sup> Q 柱作为纯化介质, 用 50 mmol/L 到 300 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)梯度洗脱目的蛋白, 收集洗脱峰浓缩后换 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl 缓冲液 1 次, 再次浓缩至一定体积后用 BCA 试剂盒测定蛋白质的浓度, 并用液氮速冻于 -80  $^{\circ}$ C 保藏。

1.2.2 蛋白结晶及数据收集: (1)  $Alr_{Mtb}$  与 DCS 的共结晶: 将  $Alr_{Mtb}$  与 DCS 按 1 : 5 的摩尔比混合, 在冰上孵育 1 h, 然后进行结晶条件的筛选, 应用 Mosquito 晶体筛选机械手进行了 Hampton Research 公司的 Index I & II、SaltRx I & II、

Crystal screen I & II、PEG/ion screen I & II、Crystal Screen cyro I & II、Wizard I & II & III & IV等结晶条件的筛选,结果在 PEG/ion screen I 28号条件下长出了晶体。通过生长条件的优化,最终在 11% PEG400、0.2 mol/L 醋酸钙(pH 7.0)池液条件下蛋白浓度为 10 g/L 时,16 °C 下通过坐滴生长方式获得了衍射比较好的晶体。

(2) 数据收集:收集晶体衍射数据前,配制结晶池液加 20%的甘油作为防冻液,用 Loop 环将晶体捞出,并在防冻液中停留 3 s 左右。所有的数据都是在天津国际生物医药联合研究院高通量药物筛选中心的 X 光衍射仪(Rigaku Micor Max 007HF)收集,收集数据的温度是-173 °C,使用 R-AXIS HTC (Rigaku)探测器,使用 HKL2000<sup>[10]</sup>软件包进行初步处理,采用 CCP4<sup>[11]</sup>进行相位解析和结构修正,采用 Coot<sup>[12]</sup>对结构进行手动调整。文章中结构展示图是用 Pymol 制作。

**1.2.3 高通量药物筛选:** (1)  $Alr_{Mtb}$  活性测定:由于还原态的 NADH 在 340 nm 波长处有最大光吸收,而氧化态的  $NAD^+$  的最大光吸收在 260 nm 处。伴随着  $NAD^+$  到 NADH 这一反应的进行,反应体系在 340 nm 波长下的光吸收值会不断增大,其数值可通过分光光度计或酶标仪测得。酶活测定的原理(图 1A)是通过检测反应体系在 340 nm 波长下的光吸收值变化来反映体系中 NADH 的生成量,进而反映出  $Alr_{Mtb}$  催化活性大小。由于反应体系中涉及

到  $Alr_{Mtb}$  和 L-丙氨酸脱氢酶两种酶,为了排除 L-丙氨酸脱氢酶引起的假阳性现象,实验中设置阳性对照组,即让反应从第二步开始(图 1B)。本研究中将已报道的体系<sup>[13]</sup>进行了优化,经优化后的酶活测定体系包括 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.9)、200 mmol/L NaCl 缓冲液,0.3 mmol/L NAD,125 nmol/L  $Alr_{Mtb}$ ,0.8 mmol/L D-丙氨酸,625 nmol/L L-丙氨酸脱氢酶,总体积 100  $\mu$ L。实验中先将缓冲液、 $Alr_{Mtb}$ 、NAD、L-丙氨酸脱氢酶按一定的量混合,转移到 Nunc96 孔板,加入底物 D-丙氨酸在 Fluoroskan Ascent 进行荧光分析。

(2) 高通量药物筛选模型的验证及抑制剂的筛选:用已建立的酶活体系测定 DCS 及实验室库里的小分子对  $Alr_{Mtb}$  的抑制情况,方法是在酶活测定体系的基础上,再加 1  $\mu$ L 的 DCS (1 mmol/L)或库里的其它小分子,25 °C 孵育 5 min,加底物用 Fluoroskan Ascent 酶标仪测定反应的荧光值(总体积还是 100  $\mu$ L)。同时设定对照组,用 1  $\mu$ L DMSO 代替 1  $\mu$ L 的化合物。每个化合物平行测定 3 次。利用函数 Slope 计算反应速率,对照组的反应速率为  $V_0$ ,加入药物组的反应速率为  $V_i$ 。剩余活性  $R_a = V_i/V_0 \times 100\%$ ,抑制率  $I_r = (1 - V_i/V_0) \times 100\%$ 。对抑制率大于 80%的样品进行复筛。复筛得到的抑制率在 85%以上的化合物用 100% DMSO 进行 2 倍浓度梯度稀释,共稀释 12 个浓度点。然后以化合物浓度的对数值为横坐标,以  $V_i/V_0$  为纵坐标,利用

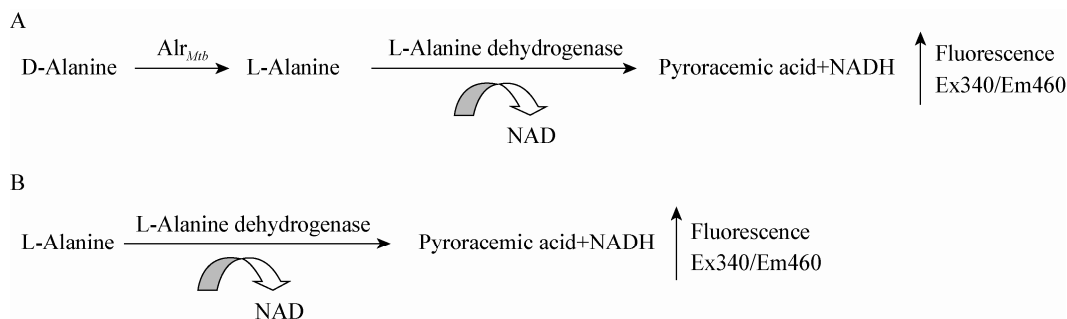


图 1 筛选 *Mycobacterium tuberculosis* 丙氨酸消旋酶特异性抑制剂的 HTS 检测

Figure 1 HTS assays for screening  $Alr_{Mtb}$ -specific inhibitors

注: A: 偶联的  $Alr_{Mtb}$  测定; B: 偶联酶 L-丙氨酸脱氢酶测定。

Note: A: Coupled alanine racemase assay; B: L-Alanine dehydrogenase coupling enzyme assay.

软件 GraphPad Prism 5 作出化合物浓度的对数值与剩余活性值的曲线, 并计算出化合物的  $IC_{50}$  值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原核表达载体的构建

构建的表达载体经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的电泳结果如图 2 所示, 与预期结果相符, 目的 DNA 片段与  $Alr_{Mtb}$  基因实际大小(1 125 bp)一致。经 DNA 测序结果证明,  $Alr_{Mtb}$  基因序列和插入载体的方向均无误, 重组质粒 pET-28a- $Alr_{Mtb}$  构建成功。

### 2.2 重组 $Alr_{Mtb}$ 的表达与纯化

转入 pET-28a- $Alr_{Mtb}$  的 BL21(DE3) 菌株经过异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷 (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 的诱导, 目的蛋白丙氨酸消旋酶得到大量表达(图 3)。菌体破碎后先用镍亲和柱富集纯化, 然后用 ÄKTA 系统进行凝胶排阻层析纯化, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果表明纯化后的蛋白纯度达到 95%。

### 2.3 $Alr_{Mtb}$ 与 D-环丝氨酸的共结晶

$Alr_{Mtb}$  与 DCS 在 16 °C 结晶 结晶实验 2 d 后, 可获得多边形、深黄色晶体。在 -173 °C 温度下用 Rigaku 旋转阳极 X 射线铜靶发生器 MicroMax-007HF (电压 40 kV, 电流 30 mA, 波长  $\lambda=1.54$  Å) 进行数据收集, 获得了最高分辨率为 2.50 Å 的  $Alr_{Mtb}$  与 DCS 的共晶结构 相关的数据信息见表 1。

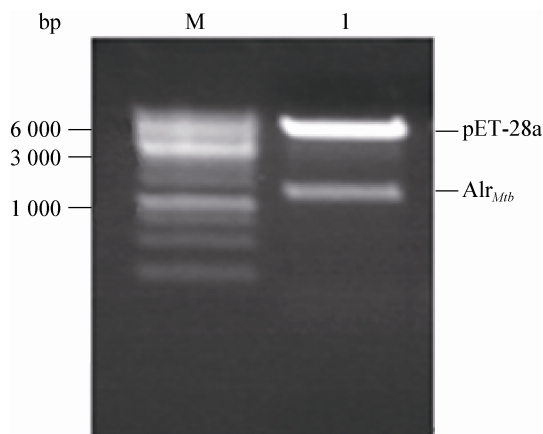


图 2 重组质粒 pET28a- $Alr_{Mtb}$  双酶切鉴定  
Figure 2 Double digestion of recombinant plasmid pET28a- $Alr_{Mtb}$

注: M: DNA marker; 1: 重组质粒 pET28a- $Alr_{Mtb}$ 。

Note: M: DNA marker; 1: Recombinant plasmid pET28a- $Alr_{Mtb}$ 。

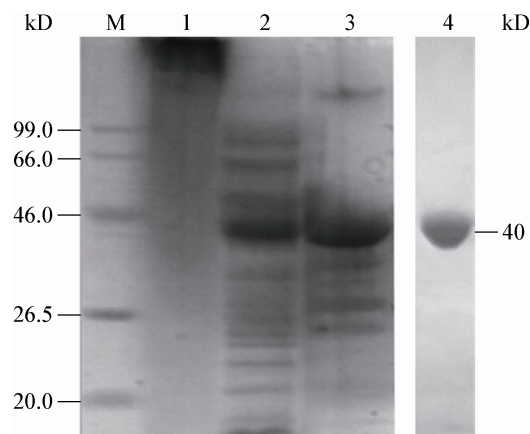


图 3 纯化后的目的蛋白 SDS-PAGE 图

Figure 3 The purification of  $Alr_{Mtb}$  expressed in *E. coli*

注: M: 蛋白 Marker; 1: 离心后沉淀; 2: 离心后上清; 3: 纯化后  $Alr_{Mtb}$ ; 4: 结晶用  $Alr_{Mtb}$ 。

Note: M: Protein marker; 1: Sediment fraction after centrifugation; 2: Supernatant fraction after centrifugation; 3: Purified  $Alr_{Mtb}$ ; 4: Purified  $Alr_{Mtb}$  for crystallization.

表 1  $Alr_{Mtb}$ -DCS 晶体数据收集统计  
Table 1 Data collection and statistics from crystallographic analyses

晶体名称 Crystal name	$Alr_{Mtb}$ -DCS
Wavelength (Å)	1.54
Space group	$P4_12_12$
Cell dimension a, b, c (Å)	163.92, 163.92, 57.44
Resolution (Å)	50.00–2.50 (2.54–2.50)
Rsym <sup>a</sup> (%)	9.0 (25.3)
Mean I/σI	47.1 (9.3)
Completeness (%)	99.7 (93.5)
Redundancy	27.2 (19.9)
Refinement	
Resolution range (Å)	50.00–2.50
Number of reflections	27 479
Rwork <sup>b</sup> /Rfree <sup>b,c</sup> (%)	19.0/25.1
No. of protein residues	744
No. of atoms	5 780
No. of ligands	4
Rms. deviation d	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (Å)	1.294

Note: <sup>a</sup>:  $R_{sym} = \sum |I_{obs} - I_{avg}| / \sum I_{obs}$ ; <sup>b</sup>:  $R_{work, free} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum |F_{obs}|$ ; <sup>c</sup>:  $R_{free}$  values are calculated for a randomly selected 5% of the data that was excluded from the refinement.

以  $\text{Alr}_{Mtb}$  单体为模型(PDB ID:1XFC), 通过分子置换的方法, 解析丙氨酸消旋酶  $\text{Alr}_{Mtb}$  和 DCS 的共晶结构。其中在一个不对称单元内含有由两个首尾相接的  $\text{Alr}_{Mtb}$  单体分子组成的同源二聚体, 且在每个单体的活性中心都含有一个磷酸吡哆醛(PLP)和一个 DCS。通过与  $\text{Alr}_{Mtb}$  母体结构比较可知,  $\text{Alr}_{Mtb}$ -DCS 复合物结构并没有较大变化(主链  $\text{C}_\alpha$  的 R.M.S.D.数值为 0.3 Å), 即从整体上由两个结构域组成, 分别是 N 端结构域(从 10 位到 246 位), 由 8 对  $\alpha/\beta$  折叠形成桶状结构, C 端结构域(从第 247 位到第 381 位), 主要由多个  $\beta$  折叠组成<sup>[14]</sup>(图 4A)。

与只结合了 PLP 的母体蛋白质结构相比, 二者保持相同点在于共晶结构中 PLP 磷酸基团的 O 同样与 S213、Y364、Y46 相互作用形成氢键网络, 同时 PLP 的六元环与 H172 产生  $\pi$ - $\pi$  效应; 二者主要不同之处在于  $\text{Alr}_{Mtb}$ -DCS 复合体结构中 PLP 的 C4 原子通过与 DCS 的氨基基团相互作用取代了母体  $\text{Alr}_{Mtb}$  中 PLP 的 C 原子和 K42 侧链氨基之间的相互作用<sup>[15]</sup>。其中 S213、Y364、Y46、K42、R140、H172 位于同一个单体, 而 R140、C318 和 Y271

位于另外的一个单体上。通过电子密度图可见, DCS 在进入活性位点之后, 与 PLP 相互作用而形成了磷酸吡哆胺(Pyridoxamine-5-phosphate, PMP), 使得 PLP 的 C4'原子与 K42 之间的相互作用被破坏, 从而改变了  $\text{Alr}_{Mtb}$  活性中心的氢键网络, 抑制其活性的发挥(图 4B)。目前已经在多个结构中发现 DCS 与 PLP 相互作用形成 PMP 现象的存在<sup>[15-17]</sup>。

DCS 是 D-丙氨酸的环状结构类似物, 和其人工合成的 L 型异构体都是丙氨酸消旋酶不可逆的抑制剂<sup>[18]</sup>。但由于其缺乏特异性的作用位点而引起毒性未能在临床上广泛应用, 仅作为二线抗菌药物使用, 对结核病的疗效较差, 单用可产生耐药性。虽然有关环丝氨酸对丙氨酸消旋酶的抑制机制在嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)<sup>[15]</sup>、薰衣草链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)<sup>[16]</sup>和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)<sup>[17]</sup>等菌种中都已阐明, 但截止到目前在结核分枝杆菌中未有相关报道, 因此通过结构生物学手段阐明结核分枝杆菌中 DCS 与丙氨酸消旋酶的作用机制, 可为发现特异性丙氨酸消旋酶抑制剂提供研究基础。

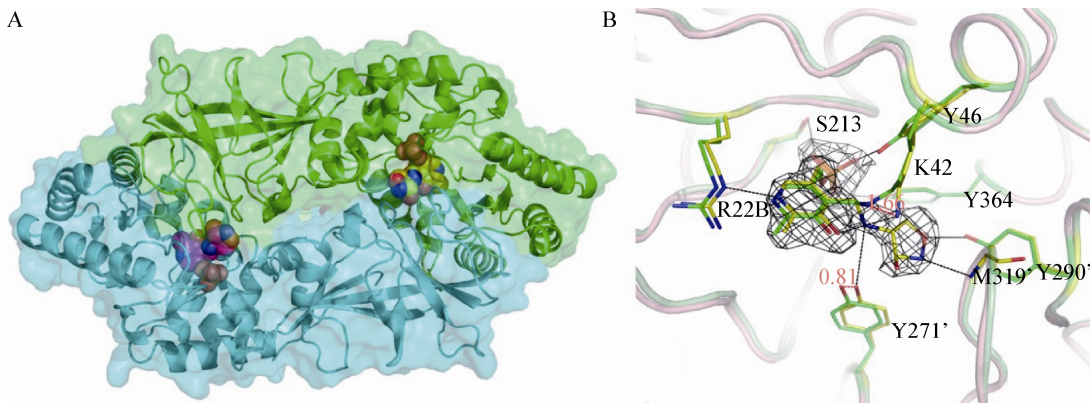


图 4  $\text{Alr}_{Mtb}$  二聚体结构和  $\text{Alr}_{Mtb}$  母体结构活性中心(残基和 PLP 的 C 原子为绿色)与  $\text{Alr}_{Mtb}$ -DCS (残基和 PLP 的 C 原子为黄色)活性中心结构比对图(2Fo-Fc 密度图, 1.0  $\sigma$ )

Figure 4 The dimer model of  $\text{Alr}_{Mtb}$ , superposition of the active site from  $\text{Alr}_{Mtb}$  (the color of  $\text{C}_\alpha$  atom and PLP in green) and  $\text{Alr}_{Mtb}$ -DCS (the color of  $\text{C}_\alpha$  atoms and PLP in yellow)(The 2Fo-Fc density map, 1.0  $\sigma$ )

注: A:  $\text{Alr}_{Mtb}$  二聚体结构; B:  $\text{Alr}_{Mtb}$  母体结构活性中心(残基和 PLP 的 C 原子为绿色)。

Note: A: The dimer model of  $\text{Alr}_{Mtb}$ ; B: Superposition of the active site from  $\text{Alr}_{Mtb}$  (The color of  $\text{C}_\alpha$  atom and PLP in green).

根据丙氨酸消旋酶的晶体结构<sup>[14]</sup>, 在底物进入活性位点时还需经过一个保守的入口通道, 所以抑制剂有 3 种途径可以抑制酶的活性。一方面可以直接占据活性位点使酶失活, 另一方面可以阻止同源二聚体的形成而抑制酶的活性, 同时还可以占据通往活性位点的通道口而使酶失活, 这 3 种可能的验证都需要得到酶与抑制剂的共晶结构, 这也为基于结构的药物设计提供了依据。

## 2.4 高通量抑制剂筛选

**2.4.1 Alr<sub>Mtb</sub> 活性测定:** 酶活测定结果显示(图 5), Alr<sub>Mtb</sub> 具有较高的活性, 可用于后续高通量药物的筛选。并从酶活测定图可以看出, 加入丙氨酸消旋酶的实验组荧光值明显比没加此酶只从第二步反应开始的阳性对照组低, 说明第一步为限速步骤。

**2.4.2 样品筛选结果:** 将阳性药 DCS 加入酶活体系(图 6A), 测荧光值并计算得其抑制率为 92.3%, 假阳性率 15.1%,  $IC_{50}=0.4686 \mu\text{mol/L}$ , 结果显示在该酶活体系中 DCS 对 Alr<sub>Mtb</sub> 有较好的抑制作用, 该体系可以用于筛选丙氨酸消旋酶的抑制剂。

本研究共筛选了天津市国际生物医药联合研究院高通量药物筛选中心实验室 384 种小分子片

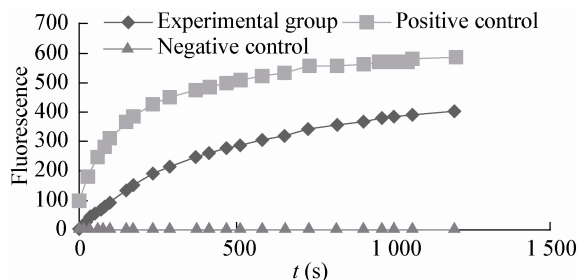


图 5 酶活测定图

### Figure 5 Enzymatic assays

注: 实验组: 加了 Alr<sub>Mtb</sub>; 阳性对照组: 不加 Alr<sub>Mtb</sub>, D-丙氨酸用 L-丙氨酸代替; 阴性对照: 不加 Alr<sub>Mtb</sub>.

Note: Experimental group: Added Alr<sub>Mtb</sub>; Positive control: Without Alr<sub>Mtb</sub>, D-Alanine is replaced by L-Alanine; Negative control: Without Alr<sub>Mtb</sub>.

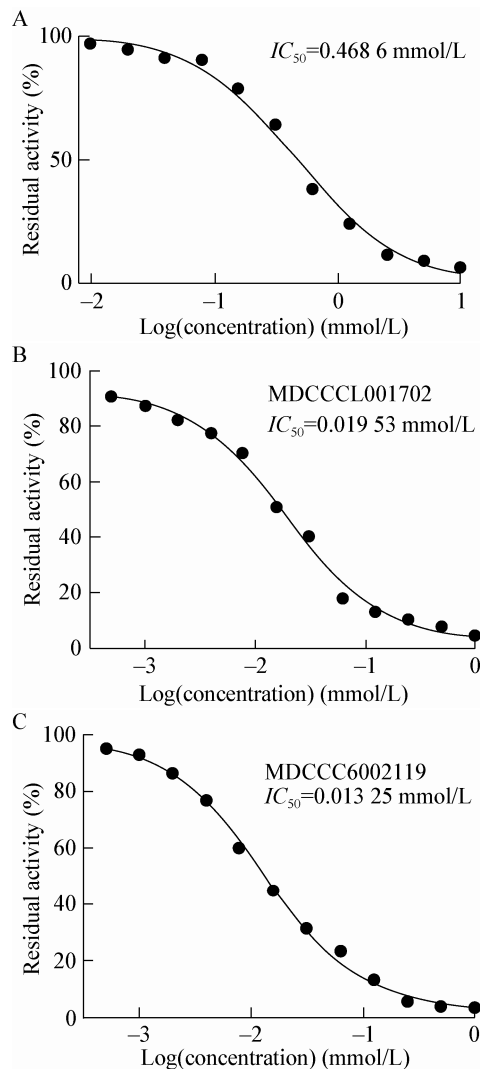


图 6  $IC_{50}$  曲线图

### Figure 6 Curves of $IC_{50}$

注: A: DCS  $IC_{50}$ ; B: 化合物 MDCCCL001702  $IC_{50}$ ; C: 化合物 MDCCCL002119  $IC_{50}$ .

Note: A:  $IC_{50}$  of DCS; B:  $IC_{50}$  of compounds MDCCCL001702; C:  $IC_{50}$  of compounds MDCCCL002119.

段, 792 种化合物及 2 200 种中药单体以及组分, 经过初筛和复筛, 获得两个比较好的抑制剂(表 2, 图 6B、C)。

DCS 作为丙氨酸消旋酶的阳性药, 在研究中构建的高通量抑制剂筛选体系中对丙氨酸消旋酶有抑制作用, 说明所建立的高通量抑制剂筛选模型是有效的。从得出的  $IC_{50}$  数值可以看出, 得到的

表 2 阳性样品抑制率  
Table 2 Inhibition rate of positive samples

抑制剂 Inhibitors	抑制率 Inhibition rate (%)	假阳性率 False positive rate (%)	IC <sub>50</sub> (mmol/L)
DCS	92.3	15.1	0.468 6
MDCCCL001702	94.2	6.2	0.019 5
MDCCCL002119	95.4	5.2	0.013 3

两种化合物在该体系中对丙氨酸消旋酶的抑制作用比 DCS 好。由于 Alr<sub>Mtb</sub> 活性中心序列在不同细菌中是比较保守的<sup>[6]</sup>, 因此本实验中建立的以 Alr<sub>Mtb</sub> 为靶点的药物筛选模型有可能筛选到对多种病原菌都有效的广谱抗生素。

基于在蛋白结晶部分提到的丙氨酸消旋酶抑制剂可能的抑制途径假设, 我们希望通过共结晶的方式获得抑制剂和 Alr<sub>Mtb</sub> 蛋白复合体模型并对抑制机理进行进一步的研究, 但是截止于目前还没有获得共晶结构。推测原因可能是由于这两种化合物的结构(因目前还处于探索研究阶段, 所以在文中给出化合物结构)比 D-环丝氨酸结构复杂, 很难通过保守的通道进入丙氨酸消旋酶的活性中心。需要通过 Alr<sub>Mtb</sub> 蛋白同源二聚体间出现较大的构象改变才能容纳新筛选到的抑制剂分子, 而我们将新抑制剂分子浸泡 Alr<sub>Mtb</sub> 蛋白晶体后出现晶体损坏, 无法进行数据收集的情况有一定的吻合度。同时, 这种构象改变也造成新抑制剂分子和丙氨酸消旋酶共晶晶体生长条件与其和 D-环丝氨酸共晶晶体生长条件差别较大, 需重新对共结晶条件进行摸索。基于上述原因, 后续的共结晶实验仍在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] 李冬, 李卓荣. 抗结核药物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(1): 35-41.
- [2] Bocchino M, Sanduzzi A, Bariffi F. *Mycobacterium tuberculosis* and HIV co-infection in the lung: synergic immune dysregulation leading to disease progression[J]. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 2000, 55(5): 381-388.
- [3] 姜智勇. 抗结核杆菌新药发现靶点蛋白的研究进展[J]. *生物物理学报*, 2011, 27(10): 828-838.
- [4] 刘晓琴, 石亚伟. 菌药物治疗疾病的新靶位——丙氨酸消旋酶[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(2): 104-108.
- [5] Lambert MP, Neuhaus FC. Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W[J]. *Journal of Bacteriology*, 1972, 110(3): 978-987.
- [6] Strych U, Penland RL, Jimenez M, et al. Characterization of the alanine racemases from two *Mycobacteria*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 196(2): 93-98.
- [7] Milligan DL, Tran SL, Strych U, et al. The alanine racemase of *Mycobacterium smegmatis* is essential for growth in the absence of D-alanine[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 8381-8386.
- [8] 王敏兰, 石亚伟. 以丙氨酸消旋酶为靶标的中药抗菌成分的初步筛选[J]. *现代医药卫生*, 2013, 29(7): 966-970.
- [9] 宋艳丽, 康文艺. 抗耐药结核杆菌药用植物成分研究进展[J]. *中成药*, 2010, 32(2): 273-277.
- [10] Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode[S]. *Methods in Enzymology*, 1997, 276: 307-326.
- [11] Collaborative Computational Project Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography[S]. *Acta Crystallographica Section D*, 1994, 50: 760-763.
- [12] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics[S]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2004, 60: 2126-2132.
- [13] Anthony KG, Strych U, Yeung KR, et al. New classes of alanine racemase inhibitors identified by high-throughput screening show antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): 1-8.
- [14] LeMagueres P, Im H, Ebalunode J, et al. The 1.9 Å crystal structure of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* contains a conserved entryway into the active site[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(5): 1471-1481.
- [15] Fenn TD, Stamper GF, Morollo AA, et al. A side reaction of alanine racemase: transamination of cycloserine[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(19): 5775-5783.
- [16] Noda M, Matoba Y, Kumagai T, et al. Structural evidence that alanine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(44): 46153-46161.
- [17] Priyadarshi A, Lee EH, Sung MW, et al. Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1794(7): 1030-1040.
- [18] Caceres NE, Harris NB, Wellehan JF, et al. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(16): 5046-5055.