

# 反枝苋乙酰乳酸合成酶与烟嘧磺隆分子 结合模式分析及抗性位点预测

杨冬臣, 霍静倩, 张哲, 齐萌, 张金林\*

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071000)

**摘要:** 为研究反枝苋对乙酰乳酸合成酶 (ALS) 抑制剂的抗性机制, 本研究根据反枝苋的 ALS 氨基酸序列, 利用同源建模的方法构建了其三维结构, 并采用分子对接和分子动力学模拟的方法预测了反枝苋 ALS 与烟嘧磺隆分子的结合模式。根据结合模式对已报道的 Pro 197 和 Trp 574 等位点突变产生抗性的原因进行了分析。结果发现: Pro 197 和 Trp 574 等位点的残基与烟嘧磺隆分子之间存在重要的疏水作用和  $\pi$ - $\pi$  作用等其他相互作用, 或该位点的残基具有特殊结构影响着通道形状。分析表明, ALS 与烟嘧磺隆之间的氢键、疏水作用等非共价相互作用以及通道形状的改变都有可能影响二者结合稳定性, 从而使杂草产生抗性。基于此结论, 本研究预测 Val 196、Met 200、Phe 206 和 Lys 256 突变同样可能使杂草对 ALS 抑制剂敏感度发生变化。本研究利用计算机模拟技术分析了 ALS 抗性机制, 为抗性除草剂的分子设计提供了指导。

**关键词:** 反枝苋; 乙酰乳酸合成酶; 烟嘧磺隆; 靶标抗性; 同源建模; 分子动力学

中图分类号: O629.8;S481.4 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2019)01-0026-09

## Binding modes of acetolactate synthase with nicosulfuron in *Amaranthus retroflexus* L. and potential resistance sites prediction

YANG Dongchen, HUO Jingqian, ZHANG Zhe, QI Meng, ZHANG Jinlin\*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, Hebei Province, China)

**Abstract:** In order to study the resistance mechanism of *Amaranthus retroflexus* L. to acetolactate synthase (ALS) inhibitor, homologous modeling was conducted to construct the three-dimensional structure of ALS based on its amino acid sequence of *Amaranthus retroflexus* L.. Molecular docking and molecular dynamics simulations were used to predict the binding mode between the ALS of *Amaranthus retroflexus* L. and nicosulfuron. Based on the binding mode, analysis of the resistance reason at the reported mutations of Pro 197, Trp 574 and other sites indicated the existence of important hydrophobic interactions,  $\pi$ - $\pi$  interactions and other interactions between the residues of the above site and nicosulfuron, or special structures of the residues that affected the channel shape. Analysis shows that non-covalent interactions between the ALS and nicosulfuron, such as hydrogen bonding and

收稿日期: 2018-10-11; 录用日期: 2018-11-12.

基金项目: 国家自然科学基金 (31471786).

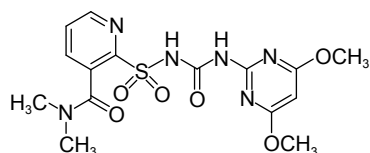
作者简介: 杨冬臣, 男, 在读硕士研究生, E-mail: 15232893896@163.com; \*张金林, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 教授, 主要从事农药学的教学科研工作, E-mail: zhangjinlin@hebau.edu.cn

hydrophobic interactions, and changes in the channels shape might affect the binding stability and cause the weeds resistance. These results predicted that the mutations at Val 196, Met 200, Phe 206 and Lys 256 might also change the sensitivity of weeds to ALS inhibitors. In this study, the ALS resistance mechanism was analyzed using computer simulation techniques, and the results provided a reference for the design of anti-resistant herbicides.

**Keywords:** *Amaranthus retroflexus* L.; acetolactate synthase; nicosulfuron; target resistance; homologous modeling; molecular dynamics

乙酰乳酸合成酶 (ALS, EC 4.1.3.18), 又称乙酰羟酸合成酶 (AHAS, EC 2.2.1.6), 是催化 3 种支链氨基酸生物合成途径中第一阶段的关键酶<sup>[1]</sup>, 广泛存在于植物、细菌、真菌以及藻类等体内<sup>[2-3]</sup>, 是商品化的磺酰脲类和咪唑啉酮类等多种绿色除草剂的重要靶标<sup>[4]</sup>, 以此为靶标设计的抑制剂对哺乳动物安全<sup>[5]</sup>。

随着 ALS 抑制剂类除草剂的长期和大量使用, 很多杂草已对该类除草剂表现出不同程度的抗性 & 交互抗性<sup>[6]</sup>, 如作为中国玉米田主要杂草之一的反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L., 已经出现了对磺酰脲类和咪唑啉酮类等多种 ALS 抑制剂的抗性群体<sup>[7]</sup>。研究表明, 杂草对 ALS 抑制剂产生抗性是由于 ALS 中某些氨基酸突变引起的<sup>[8]</sup>, 突变类型多, 抗性发展快。根据 2018 年 4 月抗性杂草国际调查网站 (<http://www.weedscience.org/>) 公布的数据, 已报道的 ALS 抗药性突变位点有 8 个, 分别是第 122 位丙氨酸 (Ala 122)、第 197 位脯氨酸 (Pro 197)、第 205 位丙氨酸 (Ala 205)、第 376 位天冬氨酸 (Asp 376)、第 377 位精氨酸 (Arg 377)、第 574 位色氨酸 (Trp 574)、第 653 位丝氨酸 (Ser 653) 和第 654 位甘氨酸 (Gly 654), 共 26 种突变类型, 其中涉及反枝苋的有 5 个位点 5 种突变类型, 已明确对磺酰脲类除草剂产生抗性的突变类型有 2 个<sup>[9-10]</sup>。笔者以反枝苋 ALS 和烟嘧磺隆 (结构式见图式 1) 为研究对象, 对其产生抗性的原因进行了较为详细的分析, 以期为其他抗性杂草的综合治理提供参考。



图式 1 烟嘧磺隆结构式

Scheme 1 The structural formula of nicosulfuron

蛋白质晶体学作为研究结构生物学的基本手段和技术, 派生出很多应用性强的分支<sup>[11]</sup>。自 Duggleby 研究组<sup>[12]</sup>在 2001 年首次报道了酵母 ALS 催化亚基晶体结构之后, 来源于酵母和拟南芥的 ALS 催化亚基晶体及其与抑制剂形成复合物的晶体结构相继报道。截至 2018 年 4 月, PDB 晶体库中可以查到的 ALS 晶体及其复合物晶体有 36 种。虽然解析蛋白质结构的技术已取得很大进展, 但此项工程仍是十分费时且费用昂贵<sup>[13]</sup>。目前, 虽然完成测序的蛋白质数量已过 1.3 亿, 但已知三维结构的蛋白质和蛋白质与小分子的复合物结构只有 14.7 万多种, 如果相同蛋白质与不同小分子形成的复合物晶体算是一种, 那么当前已解析的蛋白质结构数量则更少。关于反枝苋 ALS 晶体及 ALS 与烟嘧磺隆复合物的晶体结构尚未见报道。

计算机模拟技术的迅速发展, 为解决当前无法快速获得蛋白质及蛋白质与小分子复合物晶体结构的难题提供了新思路, 其中同源建模和分子对接技术是当前用于研究蛋白质结构与功能最广泛的手段。本研究利用同源建模的方法根据已测序的反枝苋 ALS 氨基酸序列构建出 ALS 三维结构模型, 并通过半柔性分子对接的方法得到反枝苋 ALS 和烟嘧磺隆的复合物虚拟结构。由于在生物体内酶和底物结合过程中, 酶和底物的构象均会受到诱导而发生一定改变形成酶—底物复合物<sup>[14]</sup>, 所以通过半柔性对接得到的虚拟结构与生物体内的实际情况存在一定差异, 因此在分子对接后选取最优的构象进行了分子动力学模拟, 以期得到相对稳定的构象并进行分析。

## 1 试验部分

### 1.1 计算机软件及在线工具

平台: IBM 3300M4 型计算机服务器 (美国 IBM 公司)。

软件: YASARA 17.6.21、Ligplot+、DNAMAN 和 Pymol。

在线工具: 同源模建蛋白质量评估网站 <http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>。

蛋白质数据库: <http://www.uniprot.org/>。

蛋白质晶体结构数据库: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/>。

化学搜索引擎: <http://www.chemspider.com/>。

## 1.2 试验方法

1.2.1 同源模建及评估 反枝苋 ALS 蛋白序列选自 uniprot 数据库 (蛋白编号 Q93XN5, 序列长度 669)。利用 YASARA 中 hm\_bulid.mcr 模块进行同源模建。参数设置: PSI-BLAST 迭代次数设为 3, 模板最大允许  $E$  值 0.5 ( $E$  Value Max), 最大使用模板数量为 5, 每个模板要考虑的模糊对齐最大数量为 5, 建立四聚体模型。

将所建模型上传至 SVAES 蛋白在线评估网站, 从 Procheck<sup>[15]</sup>、Errat<sup>[16]</sup>和 Verify3D<sup>[17]</sup>等方面进行质量评估。其中 Procheck 主要通过检测蛋白质残基之间的角度和整体空间的结构来评估蛋白质结构的立体化学质量。由评估结果生成拉氏图 (Ramachandran Plot), 拉氏图表示各个残基间的 Psi 和 Phi 这 2 个角度是否处于合理区域。根据残基出现在最优区域 (Residues in most favoured regions [A, B, L])、额外合理区 (Residues in additional allowed regions [a, b, l, p])、可接受区 (Residues in generously allowed regions [~a, ~b, ~l, ~p]) 和不合理区 (Residues in disallowed regions) 的数量和百分比评价蛋白质模型质量<sup>[15]</sup>。采用 ERRAT 分析不同原子类型之间非键合相互作用的统计数据, 计算得到 Errat 值, 其值越高越好, 当该值高于 50 时即可认为是高质量模型<sup>[16]</sup>。Verify3D 通过基于残基位置和环境 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、环、极性和非极性等) 分配结构类型, 并将其结果与数据库中良好结构进行比较, 确定原子模型 (3D) 与其自身氨基酸序列 (1D) 的相容性, 当有 80% 以上的残基 3D-1D 平均得分  $\geq 0.2$ , 即表示模型为高质量模型<sup>[17]</sup>。

如果质量评估不能通过, 则用 YASARA 中 md\_refine 模块对所建模型进行 500 ps 结构优化<sup>[18]</sup>。温度设为 298 K, pH=7.0, 水模型密度为 1, 加入  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  中和电荷, 优化力场采用 YASARA2。

1.2.2 分子对接 根据已报道的磺酰脲类除草剂

与拟南芥 ALS 复合物晶体结构的结合位点, 通过蛋白分子叠合预测所建蛋白模型的结合位点所在的区域, 在此区域构建边长为 2 nm (20 Å) 的立方体盒子, 然后对所建蛋白去除不必要的配体并进行加氢优化, 保存结构。

在化学搜索引擎 chemspider 中下载烟嘧磺隆分子的 3D 结构 (CAS: 111991-09-4), 并利用 YASARA 进行能量最小化, 保存为 .PDB 格式。

将上述处理好的蛋白和烟嘧磺隆分子运用 YASARA 中 dock\_run.mcr 模块进行半柔性分子对接, 对接方法使用 “VINA”, 设置对接次数 100, 对接结果根据结合能打分进行排序。

1.2.3 分子动力学模拟 在半柔性分子对接后对其最优构象进行 10 ns 的 MD 模拟, 以便使结果能够更贴近实际。运用 YASARA 中 md\_run 模块进行分子动力学模拟, 其中力场采用 YASARA 2, 以蛋白为中心, 建立  $130 \text{ \AA} \times 130 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA}$  盒子, 以 0.9% 的氯化钠水溶液填充, pH = 7, 温度为 298 K。模拟过程中每隔 25 ps 保存 1 次轨迹快照, 保存格式为 .sim, 其他参数为模块默认参数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 同源模建结果与评估

根据提供的蛋白序列, 采用 YASARA 通过运行 3 次 PSI-BLAST 迭代, 最后根据总体打分选出 4 个晶体结构并以其为模板, 蛋白编号 (PDB ID) 分别为 5WJ1<sup>[19]</sup>、5K2O<sup>[20]</sup>、3EA4<sup>[21]</sup>和 5FEM<sup>[22]</sup> (见表 1)。

已知具有催化活性的 ALS 催化亚基最小单元为二聚体<sup>[23]</sup>, 然而在之前类似的研究中大多以单体进行分子对接和动力学模拟, 因此其方法有待完善。由于目前已解析的拟南芥 ALS 晶体均为四聚体, 因此本文构建的最终模型为四聚体活性亚基 (见图 1), 每个单体的氨基酸序列相同, 包含 4 个黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)、4 个硫铵二磷酸 (ThDP) 分子、4 个镁离子 ( $\text{Mg}^{2+}$ )、4 个 2-环己胺基乙磺酸 (NHE) 分子和 4 个单嘧磺酯分子, 其中前 3 个为蛋白辅因子<sup>[24]</sup>, 后 2 个分别是试剂分子和抑制剂分子。

将最终模型上传至 SAVES, 其评估报告为: 模型 Procheck 评估结果, 最优区域残基占比 91.7%, 额外允许区占比 8.1%, 不合理区为 0.2%, 最优区

表 1 同源模建信息

蛋白编号 PDB ID	总体打分 Total score	BLAST <i>E</i> 值 BLAST <i>E</i> -value	对齐打分 Align score	覆盖率 Cover/%	分辨率 Resolution/Å	备注 Header
5WJ1	1 841.19	0	2 581.0	87	2.52	拟南芥乙酰羟酸合成酶与三唑并嘧啶除草剂五氟磺草胺复合物的晶体结构。 Crystal structure of <i>Arabidopsis thaliana</i> acetohydroxyacid synthase in complex with a triazolopyrimidine herbicide, penoxsulam.
5K2O	1 796.30	0	2 571.0	87	2.87	拟南芥乙酰羟酸合成酶与嘧啶苯甲酸酯除草剂嘧啶硫酸盐复合物的晶体结构。 Crystal structure of <i>Arabidopsis thaliana</i> acetohydroxyacid synthase in complex with a pyrimidinyl-benzoate herbicide, pyriithiobac.
3EA4	1 747.21	0	2 565.0	87	2.80	拟南芥乙酰乳酸合成酶和单嘧磺酯复合物晶体结构。 <i>Arabidopsis thaliana</i> acetohydroxyacid synthase in complex with monosulfuron-ester.
5FEM	827.26	0	1 149.0	85	2.17	酿酒酵母乙酰羟酸合成酶与苄基磺脲的复合物。 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> acetohydroxyacid synthase in complex with bensulfuron methyl

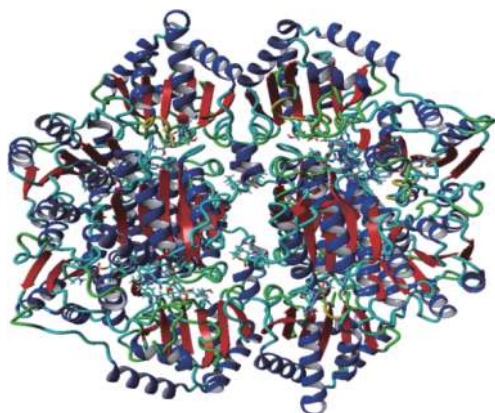


图 1 同源模建所得到的 ALS 三维结构模型

Fig. 1 ALS three-dimensional structure obtained by homologous modeling

域残基高于 90%，此项评估被通过 (见图 2)；模型 ERRAT 打分 97.403，远高于 50，此项评估被通过 (见图 3)；模型 Verify3D 评估，有 90.03% 氨基酸 3D-1D 得分  $\geq 0.2$ ，即通过此项评估 (见图 4)。以上数据表明所建的蛋白模型为高质量模型。

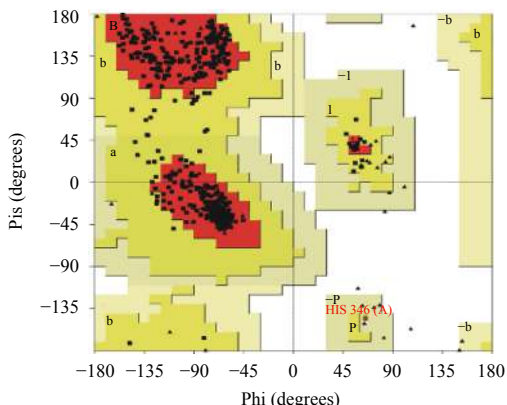


图 2 模型 Procheck 评估结果

Fig. 2 The results of model Procheck evaluation

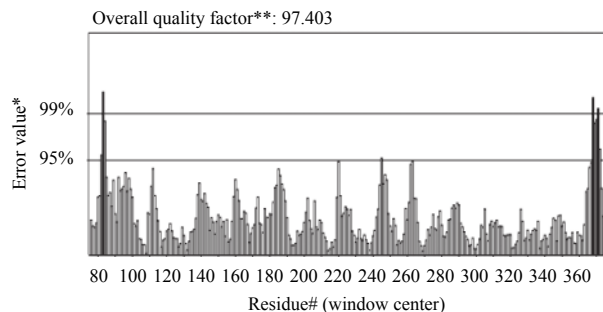


图 3 模型 ERRAT 评估结果

Fig. 3 The results of model ERRAT evaluation

## 2.2 分子对接结果分析

对蛋白质和烟嘧磺隆进行 100 次对接后，依据结合能进行排序，将最佳对接构象与已解析的磺酰脲类化合物与拟南芥 ALS 复合物的晶体进行叠合 (见图 5)，发现烟嘧磺隆在 ALS 催化亚基结合腔中，与其他 7 种磺酰脲类除草剂呈现出十分相近的结合构象，说明对接结果呈现的结合模式比较合理。由图 5 还可以看出：烟嘧磺隆分子的嘧啶环与磺酰脲桥接近共平面，深入空腔内部，吡啶环与磺酰脲桥垂直，在空腔靠外部。

已有研究表明，在 ALS 中的 Glu 144、Gln 207、Gly 121 和 Gly 511 均参与了酶催化反应<sup>[25]</sup>，本研究通过结构分析发现，ALS 的催化部位处在 2 个单体界面处且深埋在晶体结构内部，烟嘧磺隆分子并没有和催化部位结合，而是通过阻断底物通道而抑制酶活性的，这与 Yu 等的研究结果一致<sup>[26]</sup>。

## 2.3 分子动力学模拟

在分子动力学模拟中，RMSD 是衡量分子对接复合物是否达到平衡的重要依据之一<sup>[27-28]</sup>。如图 6 所示：在 0~1 500 ps 内，体系 RMSD 值呈上升趋势；在 1 500~4 000 ps 内，RMSD 值相对稳

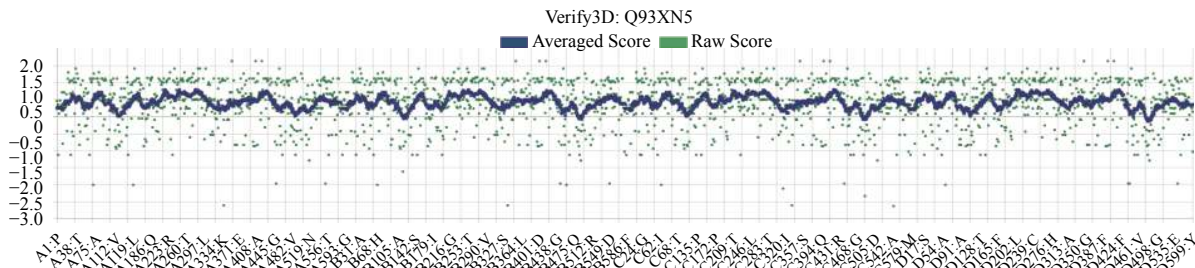
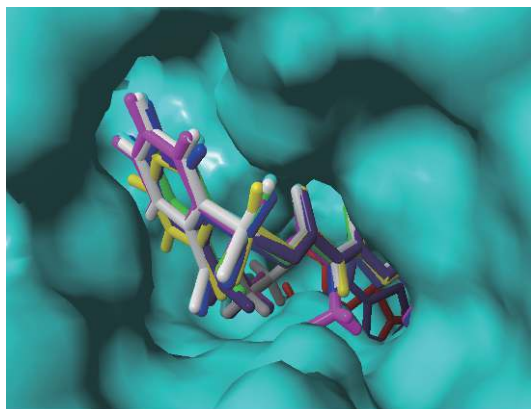


图 4 模型 Verify3D 评估结果

Fig. 4 The results of model Verify3D evaluation



注：红色分子为烟嘧磺隆；黑色、绿色、蓝色、黄色、青色、品红色和灰色分子分别为单嘧磺隆、单嘧磺酯、甲磺隆、氯磺隆、甲嘧磺隆、苯磺隆和氯嘧磺隆。

Note: The red molecule is nicosulfuron, the black, green, blue, yellow, cyan, magenta, and gray molecules are, monosulfuron, monosulfuron-ester, metsulfuron methyl, chlorsulfuron, sulfometuron methyl, bensulfuron, and chlorimuron ethyl, respectively.

图 5 烟嘧磺隆与 ALS 对接结果和已解析的 ALS 晶体复合物结构叠合结果

Fig. 5 The result of molecular docking of nicosulfuron and ALS align with known crystal complexes

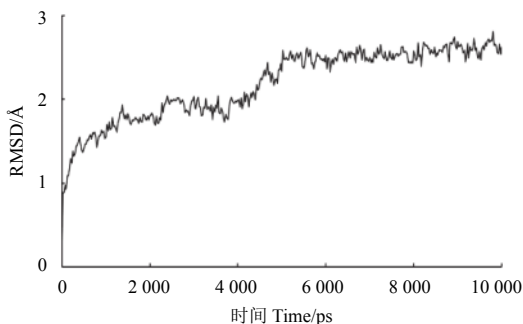


图 6 分子动力学模拟过程中体系 RMSD 值变化

Fig. 6 The RMSD value changes of the system during the simulation

定；在 4 000~5 000 ps 内，RMSD 值又有一个短暂上升；5 000~10 000 ps 内 RMSD 值又相对稳定下来，说明此时体系已经达到动态平衡。

将模拟轨迹文件转换成 .PDB 格式，对 5 000~10 000 ps 内烟嘧磺隆与 ALS 的结合模式进行分析。在 ALS 中，Pro 197、Met 200、Lys 256、Trp

574 和 Ser 653 位于抑制剂结合空腔入口处，Gly 121、Ala 122、Val 196、Ala 205、Phe 206、Gln 207、Arg 377 和 Met 570 等位于结合空腔内部，且分布在烟嘧磺隆周围 (图 7)。

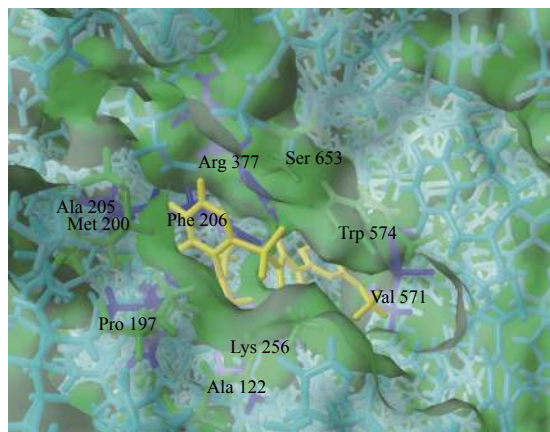


图 7 结合模式的三维视图

Fig. 7 The 3D view of combined mode

对以上结合部位的氨基酸残基在 ALS 中所处位置的二级结构进行分析，结果见表 2。

通过对烟嘧磺隆与 ALS 残基间动态过程中的相互作用进行分析，发现 Arg 377 和烟嘧磺隆的 2 个环之间存在阳离子  $\pi$  键；Phe 206 和 Trp 574 位于烟嘧磺隆中嘧啶环的两侧，同时与嘧啶环形

表 2 ALS 中部分氨基酸残基的二级结构

Table 2 Secondary structure of some amino acids in ALS

残基 Residue	二级结构 Secondary structure	残基 Residue	二级结构 Secondary structure
Gly 121	不规则卷曲 Random coil	Gln 207	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn
Ala 122	不规则卷曲 Random coil	Lys 256	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix
Val 196	不规则卷曲 Random coil	Arg 377	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn
Pro 197	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn	Met 570	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix
Met 200	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn	Trp 574	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix
Ala 205	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn	Ser 653	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn
Phe 206	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn		

成  $\pi$ - $\pi$  相互作用; Gly 121、Ala 122、Val 196、Pro 197、Phe 206、Met 200、Gln 207 和 Met 570 与烟嘧磺隆之间存在至少 2 个以上的疏水相互作用; 在模拟达到平衡后的动态过程中, Lys 256 能够与磺酰脲桥中磺酰基上的氧形成氢键, Arg 377 能够与磺酰脲桥中羰基氧、嘧啶环上甲氧基上的氧以及嘧啶环上氮原子形成氢键, 即在动态过程中, ALS 与烟嘧磺隆之间保持有 3~6 个氢键相互作用 (见图 8)。

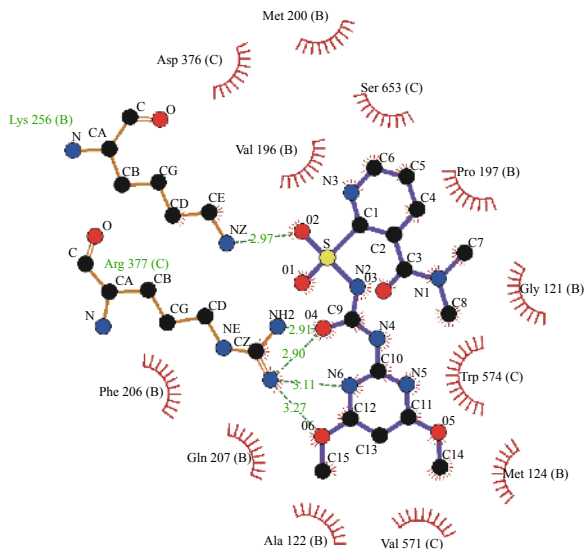


图 8 烟嘧磺隆和 ALS 之间的相互作用

Fig. 8 Interactions between nicosulfuron and ALS at 6 ns

## 2.4 反枝苋对磺酰脲类除草剂产生抗性的原因分析

在所有引起 ALS 产生抗性的突变位点中, 关于 Pro 197 突变报道的最多, 也是突变类型最多样的位点, 该位点的突变赋予 ALS 对磺酰脲类及其他类除草剂产生高水平的抗性<sup>[29]</sup>。McCourt 等研究发现, Pro 197 突变导致反枝苋对磺酰脲类除草剂产生抗性, 是因为 ALS 的氨基酸位于活性位点的入口处, 并被侧链中较大的氨基酸所取代, 进而阻止抑制剂的进入<sup>[30]</sup>。然而在莎草中, P197A 也可引起其对磺酰脲类除草剂产生抗性<sup>[31]</sup>, 但 Ala 的侧链基团是甲基, 比 Pro 还要小, 前面的解释显然不合适。从结构上看, Pro 不同于另外 19 种氨基酸, 它有一个环形的饱和烃侧链结合在  $\alpha$ -碳原子和  $\alpha$ -氨基的氮上, 该环形侧链结构对蛋白质的空间结构有着一定的限制作用, 有时会在肽链中引起一个转折<sup>[32]</sup>, 同时本研究发现, 在 196 位之前的一段氨基酸序列的二级结构为  $\beta$ -折叠, 而

196 位缬氨酸 (Val) 的二级结构为不规则卷曲, 到 Pro 197 则变为  $\beta$ -转角。由此看来, Pro 197 是一个处在特殊位置、具有特殊结构的重要氨基酸, Pro 197 的突变可能会引起其二级结构的改变, 进而导致通道形状变化。

Asp 376 只有一种突变类型, 即谷氨酸 (Glu), 二者都是酸性氨基酸, 区别是 Asp 侧链为  $\beta$ -羧基, Glu 侧链为  $\gamma$ -羧基, 在碳链长度上增加了一个碳, 推测其对 ALS 抑制剂产生抗性的原因是突变后通道变窄, 影响了其与抑制剂的结合。已报道的关于 Trp 574 的所有突变类型对 ALS 抑制剂都表现出高水平抗性, Trp 574 不仅影响着通道的形状, 在除草剂与酶的结合中也起着重要作用<sup>[33]</sup>。Trp 侧链含有一个吲哚基团, 由本研究结果可以看出, Trp 574 的吲哚基团与烟嘧磺隆的嘧啶环之间形成了很强的  $\pi$ - $\pi$  相互作用。Trp 与其他 19 种氨基酸相比侧链基团较大, 其突变后可能会使通道入口变大。笔者推测 Trp 574 突变, 尤其是被侧链基团较小的氨基酸替代后, 抑制剂不能有效地阻碍底物到达活性中心, 因此对抑制剂表现出抗性。

在抗性反枝苋中, 已有 P197L<sup>[9]</sup>和 W574L<sup>[10]</sup> 2 个突变类型被报道。尽管 D376E 突变是否能引起反枝苋对磺酰脲类除草剂产生抗性尚不明确, 但在苋属的鲍威尔苋 *Amaranthus powellii* 中已发现此突变类型对磺酰脲类除草剂产生了高水平抗性<sup>[34]</sup>, 笔者预测, 此突变类型也可能使反枝苋对磺酰脲类除草剂产生抗性。关于反枝苋, 还报道了存在 A122T、A205V 和 S653T 3 种突变类型, 其中 A205V 对磺酰脲类除草剂仍表现敏感, 另外 2 种类型的突变对磺酰脲类的抗性未知, 但是这 3 种突变类型对咪唑啉酮类除草剂均表现出了较高水平的抗性<sup>[10, 35]</sup>。

## 2.5 ALS 其他抗性突变位点分析

除上述报道的在抗性反枝苋中存在的 ALS 突变类型外, 在其他植物中还有很多 ALS 抑制剂类抗性突变类型。Ala 122 突变引起其对抑制剂产生抗性, 可能是由于 Ala 侧链仅有 1 个甲基, 同时所处的位置比较特殊, Ala 122 与催化残基 Gly 121 直接相连, 在蛋白质二级结构方面 113~118 位氨基酸为  $\beta$ -折叠, 119~122 位为不规则卷曲, 123~131 位  $\alpha$ -螺旋, 而 Ala 122 正好处于二级结构改变位点且靠近通道中部, 其突变后可能导

致通道变窄。Arg 377 突变引起的抗性可能是因为 Arg 是重要的结合氨基酸, 由本研究结果可以看出, Arg 和烟嘧磺隆之间存在很强的相互作用, 包括二者间的疏水作用、两个环之间的阳离子  $\pi$  键和与磺酰脲桥之间的氢键作用。Ser 653 处于通道入口处, 尽管 Ser 653 和烟嘧磺隆分子之间存在氢键作用, 但有研究表明, 653 位的突变对磺酰脲类除草剂仍然敏感<sup>[36]</sup>。已报道的关于 653 位的突变均是只对咪唑啉酮类除草剂产生了高水平抗性, 这可能与和咪唑啉酮类除草剂的结合模式有关, 有待进一步验证。

## 2.6 抗性突变位点预测

除上述已报道的位点外, 笔者预测在 ALS 中还有几个位点的氨基酸同样具有重要作用, 它们的突变也存在着对烟嘧磺隆产生抗性或增加其对抑制剂敏感性的可能。在已报道的可以引起抗性的突变位点中, 有 3 个位点处于通道入口处, 即 Pro 197、Trp 574 和 Ser 653。本研究发现, Lys 256 同处于通道入口, 其具有一个含有  $\epsilon$ -氨基的长侧链, 能够与烟嘧磺隆形成氢键从而起到疏水作用。而 Pro 197、Met 200、Lys 256、Trp 574 和 Ser 653 构成了一个近似环形的通道入口, 通过观察范德华表面可以发现, 在其一侧 Lys 256、Trp 574 和 Tyre579 之间也是一个空洞, 整体呈现“哑铃型”空腔(见图 7), Lys 256 和 Trp 574 处于“哑铃”中部, 2 个氨基酸残基末端最近距离为 4.33 Å, 而 2 个氨基酸的  $\alpha$ -碳的距离为 16.13 Å。若 Lys 256 被其他氨基酸替换则会造成空腔变大。因此可以认为, 若 Lys 256 发生突变, 则 ALS 对抑制剂的敏感度将会改变。一方面突变后可能使空腔变大, 更有利于抑制剂进入位点; 另一方面突变后可能使二者的结合能力降低。所以该位点的突变是使反枝苋对烟嘧磺隆产生抗性还是使之更加敏感, 尚不能一概而论。

Phe 206 与 Trp 574 侧链都有芳香环, 处于烟嘧磺隆嘧啶环的两侧, 3 个环构成近似“三明治”结构, 二者与嘧啶环之间都存在  $\pi$ - $\pi$  相互作用, 这种相互作用在 ALS 与烟嘧磺隆结合中有很大贡献。笔者预测, 若 Phe 206 发生突变, 则很可能引起 ALS 对磺酰脲类或其他类 ALS 抑制剂产生抗性, 但尚未有关于此位点突变而引起抗性的报道。笔者认为, 由于 Phe 206 与催化残基 Gln 207 直接相连, 因此该位点突变可能会引起 ALS 活性降低

甚至失活, 影响植物生长, 此观点与 Yu 等<sup>[26]</sup>的报道一致。Val 196 和 Met 200 与烟嘧磺隆分子之间也存在着较强的疏水作用, 其中 Val 196 与已报道的可以产生突变的位点 Pro 197 直接相连, 假设这 2 个位点发生突变可能也会影响其对抑制剂的敏感性。

本研究通过分子模拟预测了可能会引起反枝苋 ALS 对除草剂烟嘧磺隆敏感性发生改变的 4 个突变位点: Val 196、Met 200、Phe 206 和 Lys 256。在前人研究中, Duggleby 研究组利用大肠杆菌诱变表达出 V196M 突变类型, 发现其对磺酰脲类除草剂表现抗性<sup>[37]</sup>, 利用酵母诱变表达出 K256T 突变类型, 其对甲磺隆表现抗性<sup>[38]</sup>; Jung 等利用大肠杆菌诱变表达出 F206H 突变类型, 其对苄嘧磺隆表现抗性<sup>[39]</sup>。本研究利用分子模拟技术验证了前人研究成果, 证实本方法具有一定科学性及其合理性, 可为今后利用抗性变构酶进行虚拟筛选提供参考。

## 3 结论

本研究利用计算机分子模拟的方法探讨了反枝苋对烟嘧磺隆产生抗性的机制, 主要运用了 YASARA Structure 和 logplot+对 ALS 与烟嘧磺隆的结合模式进行了分析, 并得出以下结论:

1) 在反枝苋的 ALS 中存在 P197L 突变类型, 引起植株对烟嘧磺隆产生抗性的原因是 Pro 197 处于活性部位通道入口, Pro 具有特殊结构, 其突变可能会引起二级结构的改变, 进而导致通道形状变化, 影响其与烟嘧磺隆分子的结合。

2) W574L 突变类型会导致烟嘧磺隆与 ALS 的结合稳定性降低, 由此会造成反枝苋对烟嘧磺隆产生高水平抗性。

3) 通过对 ALS 与烟嘧磺隆结合模式的分析, 并结合相似报道, 笔者预测 D376E 突变类型也可能会引起反枝苋对烟嘧磺隆的抗性。

4) 通过对 ALS 与烟嘧磺隆结合模式的分析, 预测 Val 196、Met 200、Phe 206 和 Lys 256 的突变可能会引起 ALS 对磺酰脲类除草剂的敏感性发生改变。

综上所述, 本研究利用分子模拟技术验证了文献报道的相关研究成果, 证实本研究构建的虚拟方法能科学合理地解释文献报道的结果, 可为今后除草剂的抗性筛选提供参考。

## 参考文献 (Reference):

- [1] GARCIA M D, WANG J G, LONHIENNE T, et al. Crystal structure of plant acetohydroxyacid synthase, the target for several commercial herbicides[J]. FEBS J, 2017, 284(13): 2037-2051.
- [2] 陈伟, 魏巍, 周莎, 等. 新型含苯基取代嘧啶基磺酰脲衍生物的设计、合成及生物活性[J]. 高等学校化学学报, 2015, 36(4): 672-681. CHEN W, WEI W, ZHOU S, et al. Design, synthesis and biological activity of novel sulfonylurea derivatives containing phenyl-substituted pyrimidine moiety[J]. Chem J Chinese Univ, 2015, 36(4): 672-681.
- [3] 王建国. 乙酰乳酸合成酶及其抑制剂研究新进展[J]. 农药学报, 2014, 16(4): 367-374. WANG J G. Recent progress on acetohydroxyacid synthase and its inhibitors[J]. Chin J Pestic Sci, 2014, 16(4): 367-374.
- [4] 汪冒君, 宣南霞, 吴军. 乙酰乳酸合成酶与抑制剂ZJ0777及CIE的分子对接和分子动力学模拟[J]. 浙江大学学报(理学版), 2015, 42(6): 709-713. WANG M J, XUAN N X, WU J. Molecular docking and molecular dynamic simulations of inhibitor ZJ0777 and CIE binding to acetohydroxyacid synthases[J]. J Zhejiang Univ (Sci Ed), 2015, 42(6): 709-713.
- [5] NAKKA S, THOMPSON C R, PETERSON D E, et al. Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*)[J]. Weed Sci, 2017, 65(6): 681-689.
- [6] RIAR D S, TEHRANCHIAN P, NORSWORTHY J K, et al. Acetolactate synthase-inhibiting, herbicide-resistant rice flatsedge (*Cyperus iria*): cross-resistance and molecular mechanism of resistance[J]. Weed Sci, 2017, 63(4): 748-757.
- [7] QIN Z, ZHANG J E, JIANG Y P, et al. Invasion process and potential spread of *Amaranthus retroflexus* in China[J]. Weed Res, 2018, 58(1): 57-67.
- [8] 邓维. 抗苯磺隆播娘蒿抗性机理及抗性突变对乙酰乳酸合成酶功能影响[D]. 中国农业大学, 2017. DENG W. The resistance mechanisms of tribenuron-methyl-resistant flaxweed (*Descurainia sophia* L.) and effects of resistance-endowing mutations on ALS functionality[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [9] SIBONY M, MICHEL A, HAAS H U, et al. Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus*: cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides[J]. Weed Res, 2001, 41(6): 509-522.
- [10] MCNAUGHTON K E, LETARTE J, LEE E A, et al. Mutations in *ALS* confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*)[J]. Weed Sci, 2005, 53(1): 17-22.
- [11] 李兰芬, 南洁, 苏晓东. 蛋白质晶体学技术的发展与展望[J]. 生物物理学报, 2007, 23(4): 246-255. LI L F, NAN J, SU X D. Protein crystallography technology: past, present and future[J]. Acta Biophysica Sinica, 2007, 23(4): 246-255.
- [12] PANG S S, GUDDAT L W, DUGGLEBY R G. Crystallization of the catalytic subunit of *Saccharomyces cerevisiae* acetohydroxyacid synthase[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2001, 57(9): 1321-1323.
- [13] 刘吉元. 蛋白质与配体相互作用分子模拟研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014. LIU J Y. In silico study of protein-ligand interactions[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014.
- [14] CLARK A J, TIWARY P, BORRELLI K, et al. Prediction of protein-ligand binding poses via a combination of induced fit docking and metadynamics simulations[J]. J Chem Theory Comput, 2016, 12(6): 2990-2998.
- [15] LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. J Appl Crystallogr, 1993, 26(2): 283-291.
- [16] COLOVOS C, YEATES T O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions[J]. Protein Sci, 1993, 2(9): 1511-1519.
- [17] EISENBERG D, LÜTHY R, BOWIE J U. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles[J]. Methods Enzymol, 1997, 277: 396-404.
- [18] 赵斌, 霍静倩, 邢继红, 等. 拟南芥转酮醇酶蛋白AtTKL1的同源建模及与 $\alpha$ -三聚噻吩结合作用分析[J]. 高等学校化学学报, 2015, 36(4): 682-686. ZHAO B, HUO J Q, XING J H, et al. Homologous modeling of transketolase at TKL1 and its combination with  $\alpha$ -terthienyl in *Arabidopsis thaliana*[J]. Chem J Chinese Univ, 2015, 36(4): 682-686.
- [19] LONHIENNE T, GARCIA M D, PIERENS G, et al. Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(9): E1945-E1954.
- [20] GARCIA M D, NOUWENS A, LONHIENNE T G, et al. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(7): E1091-E1100.
- [21] WANG J G, LEE P K M, DONG Y H, et al. Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase[J]. FEBS J, 2009, 276(5): 1282-1290.
- [22] LONHIENNE T, NOUWENS A, WILLIAMS C M, et al. Commercial herbicides can trigger the oxidative inactivation of acetohydroxyacid synthase[J]. Angew Chem, 2016, 55(13): 4247-4251.
- [23] DUGGLEBY R G, MCCOURT J A, GUDDAT L W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase[J]. Plant Physiol Biochem, 2008, 46(3): 309-324.
- [24] CHIPMAN D, BARAK Z, SCHLOSS J V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998, 1385(2): 401-419.
- [25] XIONG Y, LIU J J, YANG G F, et al. Computational determination of fundamental pathway and activation barriers for acetohydroxyacid synthase-catalyzed condensation reactions of  $\alpha$ -keto acids[J]. J Comput Chem, 2010, 31(8): 1592-1602.
- [26] YU Q, POWLES S B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding[J]. Pest Manag Sci, 2014, 70(9): 1340-1350.
- [27] 张敏, 荆晶晶, 李成涛, 等. 结合分子模拟探讨不同醚键PBS基共聚物的性能与酶催化降解[J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(12):



- 2706-2712.
- ZHANG M, JING J J, LI C T, et al. Performance of PBS-based copolymer containing different ether bond and its enzymatic degradation by molecular simulation[J]. Chem J Chinese Univ, 2014, 35(12): 2706-2712.
- [28] 吕婧, 蒋勇军, 俞庆森, 等. 洋刀豆脲酶与抑制剂相互作用的分子对接和分子动力学研究[J]. 化学学报, 2011, 69(20): 2427-2433.
- LV J, JIANG Y J, YU Q S, et al. Molecular docking and molecular dynamics simulations of inhibitors binding to jack bean urease[J]. Acta Chimica Sinica, 2011, 69(20): 2427-2433.
- [29] KUMAR V, JHA P, GIACOMINI D, et al. Molecular basis of evolved resistance to glyphosate and acetolactate synthase-Inhibitor herbicides in *Kochia (Kochia scoparia)* accessions from montana[J]. Weed Sci, 2017, 63(4): 758-769.
- [30] MCCOURT J A, PANG S S, KINGSCOTT J, et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(3): 569-573.
- [31] NTOANIDOU S, KALOUMENOS N, DIAMANTIDIS G, et al. Molecular basis of *Cyperus difformis* cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides[J]. Pestic Biochem Physiol, 2016, 127: 38-45.
- [32] 王冬梅, 吕淑霞. 生物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- WANG D M, LV S X. Biochemistry[M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [33] POWLES S B, YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides[J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 317-347.
- [34] ASHIGH J, CORBETT C A L, SMITH P J, et al. Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp<sub>376</sub> Glu substitution in *Amaranthus powellii*[J]. Pestic Biochem Physiol, 2009, 95(1): 38-46.
- [35] CHEN J, HUANG Z, ZHANG C, et al. Molecular basis of resistance to imazethapyr in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus L.*) populations from China[J]. Pestic Biochem Physiol, 2015, 124: 43-47.
- [36] WERLE R, BEGCY K, YERKA M K, et al. Independent evolution of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in weedy *Sorghum* populations across common geographic regions[J]. Weed Sci, 2017, 65(1): 164-176.
- [37] HILL C M, DUGGLEBY R G. Mutagenesis of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and characterization of three herbicide-insensitive forms[J]. Biochem J, 1998, 335(3): 653-661.
- [38] DUGGLEBY R G, PANG S S, YU H Q, et al. Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase[J]. FEBS J, 2003, 270(13): 2895-2904.
- [39] JUNG S M, LE D T, YOON S S, et al. Amino acids conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxyacid synthase[J]. Bio J, 2014, 383: 53-61.

(责任编辑: 金淑惠)

## 欢迎订阅 2019 年《农药学学报》

《农药学学报》是由中国农业大学主办、国内外公开发行的农药学综合性学术期刊, 曾荣获“百种中国杰出学术期刊”“中国精品科技期刊”“中国高校百佳科技期刊”“中国国际影响力优秀学术期刊”等称号, 现已入选“中国科技核心期刊”“中文核心期刊要目总览”(北京大学图书馆编)、“中国科技引文数据库”源刊及“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”及“中文精品学术期刊外文版数字出版工程”。主要面向农药和植保专业科研工作者及大专院校师生, 旨在及时、全面报道农药学各分支学科有创造性的最新研究成果与综合评述, 促进农药的原始创新绿色生产及合理使用, 是了解我国农药学研究动态的理想园地。

本刊现设 3 个栏目: 专论与综述、研究论文和研究简报。所发表的论文几乎涵盖了农药学所有分支领域, 主要包括合成与构效关系、分析与残留、环境与毒理、作用机制研究、制剂加工及应用等。

本刊现已被美国《化学文摘, CA》、英国《动物学记录, ZR》和日本“科学技术振兴集团(中国)数据库”(JSTChina)等国际重要检索机构收录; 同时是《中国科学引文数据库》等多家国内重要数据库的来源期刊。

《农药学学报》现为 A4 开本, 双月刊。全国统一邮政发行(邮发代号 2-949), 国内定价为 30 元/期, 全年 6 期共 180 元。订户可通过当地邮局订阅, 也可直接汇款到本刊编辑部订阅(1999~2018 年已出版期刊, 本编辑部还有少量库存, 欢迎联系购买)。

汇款地址: 北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学西校区理学楼 340 室《农药学学报》编辑部

邮 编: 100193 电 话: 010-62733003 E-mail: nyxuebao@263.net

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎刊登广告!