

利用分子接合建立高速虛擬平台用於篩選登革熱蛋白酶抑制劑

研究生：許升耀

指導教授：楊昶良 博士

國立交通大學生物科技研究所 碩士班

中文摘要

登革熱病毒 (dengue virus) 屬於 *Flaviviridae* 之中的 flavivirus，依其抗原性，共可分為四個血清型。病毒粒子具有套膜，為正股 RNA 病毒，其上有一個 ORF。在表現時，會先產生一條 polypeptide，接著再經由病毒或寄主的 protease 切割與修飾，產生 10 個有活性的蛋白質產物，其中，在非結構蛋白中的 NS3 蛋白質，同時具有 Serine protease 及 helicase 的酵素活性，因此，在切割非結構蛋白與病毒複製的過程中，扮演著重要的角色。若能阻斷其功能，應可對病毒之複製有抑制作用，這也是本論文主要想探討與研究的部份。

目前登革熱，並無有效之疫苗，且缺乏專一性治療藥物，因此對患者多採支持性療法。所以，希望能找到一個小分子化合物，能夠與 NS3 protease 的活性結合部位，進行專一性的結合，阻斷原有的生化途徑抑制其酵素活性，而達到抑制病毒複製的效果，進而篩選出可能運用於治療登革熱病毒上的相關藥物。

我們運用分子接合 (Molecular docking) 的方法，依 Lock and Key 的形狀互補與電荷互補的理論，從已知的蛋白質結晶結構，鑑定與分析受質的活性結合區域，接著去 MDDR 藥物資料庫做 docking，利用電腦模擬，來尋找出潛在可能抑制 NS3 protease 的小分子化合物及其兩者之間的最佳的結合模式。依據上述的分析過程，希望能在龐大的資料庫中，找出能與 NS3 protease 之間有最佳結合方式的化合物並建立小量資料庫篩選系統與分析方法。最後可再進一步經由實驗，印證我們的結果。這樣的方法，可以提高藥物研究與開發的速率並降低研究成本。

Applying Molecular Docking on Virtual Screening for the Inhibitors of Dengue Virus NS3 Protease

Student : Sheng-Yao Hsu

Advisor : Dr. Yun-Liang Yang

Institute of Biological science and Technology
National Chiao Tung University

ABSTRACT

Dengue virus is a members of the family Flaviviridae. There are four serotypes for dengue virus. Up to now, there still has no effective vaccine and specified medicine for dengue virus. There is only supportive treatment for patients. The dengue virus is enveloped and contains a single, positive-sense RNA genome about 11 KB which encodes a large polyprotein precursor. Flavivirus is dependent on correct cleavage of this polypeptide and it will produce 10 active protein products. NS3 protein, one of the nonstructure proteins, has enzyme activity of both serine protease and helicase. Thus, it plays an important role in the polypeptide processing and virus replication. If one blocks its function, one may inhibit virus replication, which is the main issue of this study. To reach the goal, I hope that I can find small molecules which can bind the active site of NS3 protease and then inhibit its biological function to reach the purpose of inhibiting the replication of dengue virus. As the first step to screen the leads which can inhibit dengue virus NS3 protease, I use the tool of molecular docking. It is based on the match of small molucules and target proteins. In other words, I use the measure of complement mutual compensation of molecular shape between Lock and Key theory and force-field interaction. Using the computer simulation, I can find the best combining model of chemicals. Counting on the previous process of analysis and enormous database, I aimed to find the potential small molecular hits which can inhibit NS3 protease. In this way, I has show that this method can facilitate the medicine research and innovation to reduce the costs of research.

誌 謝

在交大的碩士生活中，要感謝的人實在很多，首先要感謝我的指導教授，楊昀良博士，從原本作生物實驗的我，中途轉移方向踏入生物資訊的領域裡，在實驗過程中給予許多觀念上的釐清及很多寶貴的建議，使得這篇論文得以順利產生，也謝謝老師在論文校稿時，不厭其煩細心的給予修改與校正，並給予許多的建議，除了在實驗上的學習，在生活處世方面，也有所成長，令我受益良多，感謝老師多年來的指導與鼓勵。

也要感謝交通大學 楊進木博士在Dock領域中的指導與建議，使學生在這領域中有所收穫與進步，並在口試中給予許多寶貴的建議，也感謝其實驗室再威在實驗上的幫助。感謝口試委員 盧錦隆博士抽空來為學生口試，並對所提論文提供的寶貴建議，在此，皆致上由衷的謝意。

感謝清大生科所的耀華，思明在工具軟體的協助、幫忙與相關資料的提供。與及交大管科所剛拿到博士學位的建宏學長在資訊領域裡給予許多的教學，並對於論文提供寶貴的建議。感謝日常生活中的實驗室所有伙伴，杏芳、采瑜、婕琳及學弟妹雅文、錦昇、詠怡..等等，有了你們，實驗生活中增添了許多的樂趣，感謝你們在生活中的幫忙與鼓勵。也要感謝其他實驗室學姐素華、學長乾吉、同學柏文、柏翰、韻舒、俊彥、宗益、勝致..等等，不論喜怒哀樂，這些在生活與實驗中所有陪我一起走過的朋友。

最後，最要感謝的是我最親愛的家人，在精神與物質上給予最大的支持，你們的加油與鼓勵，是我在遭遇挫折時，繼續下去的原動力，感謝你們的多年來的付出與照顧，如今才能順利拿到碩士學位。在此，僅以此文獻給我最摯愛的家人與曾經陪我走過與幫助過我的人。

目 錄

	頁次
中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
圖表目錄	vi
第一章 序論	1
第一節 研究動機	1
第二節 研究目的	2
第三節 研究策略	3
第二章 文獻探討	6
第一節 登革熱病毒探討	6
2.1.1 流行病學	6
2.1.2 病毒學	8
第二節 登革熱 NS3 protease 簡介	9
第三節 登革熱 NS3 protease 活性結合部位的探討	11
第四節 分子接合的簡介	13
第五節 Glide的簡介	15
第六節 高速虛擬藥物資料庫篩選	17

第三章 材料與方法	18
第一節 蛋白質分子受體結構的建立	18
3.1.1 多重序列比對	18
3.1.2 結構重疊比對	19
3.1.3 登革熱 NS3 protease 結構	20
第二節 分子接合的軟體操作流程	20
3.2.1 Receptor preparation	20
3.2.2 Dengue substrate modeling	21
3.2.3 Serine ligand test sets	22
第三節 小量虛擬資料庫的建立	22
第四章 結果	23
第一節 登革熱NS3 protease活性結合部位的鑑定	23
第二節 檢驗工具軟體正確性並驗證模型結構	27
4.2.1 結合部位模型的確認	27
4.2.2 小量資料庫掃描測試	28
4.2.3 抑制劑分析與探討	33
第三節 高速虛擬藥物資料庫掃描	34
第五章 討論	37
第六章 結論	41
參考文獻	42

圖表目錄

頁次

表一、Biological characteristics of flavivirus proteins.....	47
表二、Residues in protease molecules that make interactions with MbBBI	47
表三、Flow chart of flexible docking and VLS procedure	48
表四、Serine ligand test sets.....	49
表五、Serine protease 家族系列之抑制劑與登革熱 NS3 protease 其分子接合排名的結果	50
表六、Serine protease 家族系列之抑制劑與登革熱 NS3 protease 的氫鍵作用位置	51
表七、394 個 MDDR 分子化合物分子結合的結果.....	52
表八、MDDR database screening 其排名在前四十四名的化合物與 登革熱 NS3 protease 的氫鍵作用位置	61
圖一、Cofactor hydrophobicity plots and hypothetical model of NS2B-NS3pro association with membranes	62
圖二、Flavivirus polyprotein processing	62
圖三、Serine protease catalytic mechanism	63
圖四、Glide hierarchical docking strategy	63

圖五、Flavivirus 多重序列比對的結果	64
圖六、Dengue NS3 protease 與 HCV NS3 protease 序列比對結果.....	65
圖七、Dengue NS3 protease 與 HCV NS3 protease 的結晶結構用 Swiss-PdbView 所做的結構重疊之結果	66
圖八、Dengue NS3 protease 與 HCV NS3 protease 的結晶結構用 CE 所做的結構重疊之結果	67
圖九、使用 Swiss-PdbView 比較 Dengue NS3 protease 與 HCV NS3 protease 重疊之結晶結構中的活性部位.....	68
圖十、Dengue NS3 protease 結晶結構 1bef 與 1df9 活性結合部位 結構重疊之比較	69
圖十一、Dengue NS3 protease 與 MbBBI 抑制劑作用的情形	70
圖十二、Dengue NS3 protease 與 MbBBI 抑制劑之間氫鍵的作用情形	70
圖十三、Dengue NS3 protease 與受質 NS2A/2B 作用的情形	71
圖十四、氫鍵在受質 NS2A/2B 與 Dengue NS3 protease 之間的作用 情形	71
圖十五、1a5g_BIC 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	72
圖十六、1a5g_BIC 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形.....	72
圖十七、1ba8_4res 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	73
圖十八、1ba8_4res 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形.....	73

圖十九、1dy9_BOC 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	74
圖二十、1dy9_BOC 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形.....	74
圖二十一、1abj_PHE 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	75
圖二十二、1abj_PHE 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形...	75
圖二十三、1hpg_5res 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	76
圖二十四、1hpg_5res 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形...	76
圖二十五、1a4w_4res 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	77
圖二十六、1a4w_4res 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形...	77
圖二十七、1bmm_MB2 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形.....	78
圖二十八、1bmm_MB2 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形 ...	78
圖二十九、1dy8_CBZ 抑制劑與 Dengue NS3 protease 作用的情形	79
圖三十、1dy8_CBZ 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵的作用情形	79
圖三十一、HIV 抑制劑 1rt1_MKC 與 Dengue NS3 protease 作用情形 ...	80
圖三十二、HIV 抑制劑 1rt1_MKC 與 Dengue NS3 protease 之間氫鍵 的作用情形	80
圖三十三、MDDR_185536	81
圖三十四、MDDR_168500	81
圖三十五、MDDR_205693	82
圖三十六、MDDR_285718	82
圖三十七、MDDR_272830	83