

·基础研究·

基于泛基因组学和消减蛋白质组学挖掘新型 抗诺卡氏菌药物靶点

黎尔彤, 苏雅琳, 刘文彬, 金小宝

(广东药科大学基础医学院/广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】诺卡氏菌是一种病原体,可引起人体的机会性感染,呈全球性分布。近年来发现诺卡氏菌对常用药物已产生耐药性,因此,挖掘新抗诺卡氏菌药物靶点、开发新药物具有迫切需求。【方法】取 GenBank 数据库中 31 株诺卡氏菌的全基因组序列,利用 BPGA 进行泛基因组学分析,利用消减蛋白质组学筛选药物靶点。在此基础上,同源建模预测靶点蛋白的 3D 结构,采用 DrugBank 对靶点蛋白进行潜在药物的预测,并使用分子对接技术验证药物与靶点的结合活性。【结果】31 株诺卡氏菌的泛基因组中有 1 421 个核心蛋白,消减蛋白质组学分析获得 15 个候选药物靶点蛋白。其中,OG1493 蛋白的理化性质(氨基酸数目、分子量、等电点、总平均亲水性、脂肪指数和不稳定性指数 II 等)最符合作为靶点蛋白的理化性质。运用 DrugBank 数据库筛选出 Adenosine-5'-Rp-Alpha-Thio-Triphosphate、alpha,beta-Methyleneadenosine 5'-triphosphate、Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate Ester、Radicicol、2-Hydroxyestradiol、p-Coumaric acid、Ethylmercurithiosalicylic acid 等 7 个化合物可能会针对该靶点蛋白发挥抗诺卡氏菌作用,分子对接结果显示靶点与化合物结合力良好。经实验验证发现根赤壳霉素可能是针对该靶点的抗诺卡氏菌药物。【结论】泛基因组学和消减蛋白质组学可应用于挖掘新型抗诺卡氏菌药物靶点。

关键词:诺卡氏菌;泛基因组学;消减蛋白质组学;核心基因;药物靶点

中图分类号:R3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2023)06-0974-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0611

Mining Novel Anti-*Nocardia* Drug Targets Based on Pan-genomics and Subtractive Proteomics

LI Er-tong, SU Ya-lin, LIU Wen-bin, JIN Xiao-bao

(School of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: JIN Xiao-bao; E-mail: jinxf2001@163.com

Abstract:【Objective】*Nocardia* is an apathogen that causes opportunistic infections in humans and has a global distribution. In recent years, resistance of *Nocardia* to commonly used drugs have been observed, highlighting the urgent need for the identification of new drug targets and the development of novel antimicrobial agents against *Nocardia*.【Methods】Thirty-one complete genome sequences of *Nocardia* strains were retrieved from the GenBank database. Pan-genomic analysis was performed using BPGA, and drug target candidates were screened using subtractive proteomics. Homology modeling was employed to predict the 3D structures of target proteins, and potential drugs targeting these proteins were predicted using DrugBank. Molecular docking techniques were utilized to validate the binding activity between the drugs and target proteins.【Results】The pan-genomic analysis of the 31 *Nocardia* strains revealed 1 421 core proteins. Fifteen candidate drug target proteins were identified through subtractive proteomics analysis. Among them, the physicochemical proper-

收稿日期:2023-06-01

基金项目:广东省公益研究与能力建设项目(2017A020211008);广东省普通高校基础研究与应用基础项目(2018KZDXM041)

作者简介:黎尔彤,第一作者,研究方向:病原生物学, E-mail: liertong0110@126.com;金小宝,通信作者,博士,教授, E-mail: jinxf2001@163.com

ties of the OG1493 protein (such as amino acid count, molecular weight, isoelectric point, grand average of hydropathicity, fat index, and instability index II) were found to be most suitable for a drug target protein. Using the DrugBank database, seven compounds, namely Adenosine-5'-Rp-Alpha-Thio-Triphosphate, alpha, beta-Methyleneadenosine 5'-triphosphate, Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate Ester, Radicol, 2-Hydroxyestradiol, p-Coumaric acid, and Ethylmercurithio-salicylic acid were identified as potential compounds capable of exerting anti-*Nocardia* effects by targeting this protein. Molecular docking results indicated a strong binding affinity between the target protein and these compounds. The experimental result showed that that Radicol could be a potential antibacterial drug targeting this particular protein.【Conclusion】 Pan-genomic analysis and subtractive proteomics are valuable approaches for mining novel anti-*Nocardia* drug targets.

Key words: *Nocardia*; pan-genomics; subtractive proteomics; core gene; drug target

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(6): 974-982]

诺卡氏菌是一种病原体,呈全球性分布,发病率逐年上升,给水产养殖业造成严重的经济损失^[1],同时可引起人体的机会性感染^[2]。虽然诺卡氏菌对正常人群危害较小,但是免疫缺陷患者一旦感染可导致死亡率急剧增加^[3-4]。近年来研究者们对临床分离得到的诺卡氏菌进行了耐药性分析,发现该菌已对常用药物磺胺甲恶唑和甲氧苄啶产生了耐药性^[5]。因此,需要寻找新的抗菌药来对抗耐药性诺卡氏菌。随着测序技术、基因组学以及蛋白质组的迅速发展^[6-8],能够发现基因组中重要的蛋白质。泛基因组学可获得菌株的核心基因组数据^[9-12],而消减蛋白质组学可对复杂蛋白质混合物进行减法排除^[12-13],筛选目的蛋白。将两者相结合,在计算机辅助药物筛选的帮助下^[14-15],可能有助于新抗菌药物靶点的挖掘。本研究使用了泛基因组分析、消减基因组学和计算机辅助药物筛选相结合的方法筛选诺卡氏菌基因组中的潜在药物靶点,并且使用分子对接来验证有潜力的抗菌药,以辅助抗诺卡氏菌病药物的开发。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 基因组数据的采集 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 提供的 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中检索诺卡氏菌基因组数据,以 GenBank 格式下载共获得 31 株诺卡氏菌的完整基因组序列。

1.1.2 菌株来源 由本实验室前期分离的^[16]诺卡氏菌 W4-20-4。

1.2 方 法

1.2.1 诺卡氏菌的泛基因组分析 利用细菌全基因组分析软件对 31 株诺卡氏菌的全基因组进行泛基因组分析。利用 USEARCH 软件以 50% 序列同源性为截断值,构建诺卡氏菌核心基因组;利用 MUSCLE 软件对核心基因进行串联比对;运用 Guplot 软件绘制泛基因组与核心基因组点图;通过 COG 注释对所有核心基因、附属基因和独特基因进行功能分析。与核心基因组相关的蛋白质序列用于随后的药物靶点筛选。

1.2.2 核心基因功能分析 使用 COG 数据库对 31 株诺卡氏菌菌株核心蛋白编码基因功能进行注释。通过比对可以将某个蛋白序列注释到一个 COG 中,每一簇 COG 由直系同源序列构成,从而可以推测该蛋白序列的功能。

1.2.3 消减蛋白质组学筛选核心蛋白基因 对 31 株诺卡氏菌菌株的核心蛋白组分别进行非人同源性蛋白、必需蛋白和毒力蛋白的消减蛋白质组学筛选,取三类蛋白交集为候选蛋白。为了避免药物对人类的副作用,药物靶点必须与人体蛋白不具有同源性,因此运用 NCBI 的 BLASTp 工具,以 E 值 $<1 \times 10^{-3}$ 从诺卡氏菌核心蛋白中筛选非人同源性蛋白 (non-homologous protein, NHP);必需基因是指从古生物、细菌和真核生物收集的经过实验验证的生存所必需的关键基因,以 E 值 $<1 \times 10^{-4}$ 和 bit 值 >100 从必需基因数据库 (database of essential gene, DEG) (<https://tubic.org/deg/public/index.php>) 筛选诺卡氏菌必需蛋白;以 E 值 $<1 \times 10^{-4}$ 从毒力因子数据库 (virulence factors of bacterial pathogens, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) 中筛选诺卡氏菌的毒力相关因子。

1.2.4 候选蛋白的理化性质预测和筛选 根据氨基酸数目、分子量、等电点(isoelectric point, pI)、总平均亲水性(grand average of hydropathicity, GRA-VY)、脂肪指数、不稳定指数 II 和亚细胞定位等理化参数,进一步筛选诺卡氏菌的药物靶点蛋白。通过 ProtParam 平台 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对候选蛋白的理化性质进行预测。使用 CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) 和 PSORT (<https://www.psort.org/psortb/>) 进行蛋白质亚细胞定位。

1.2.5 靶点蛋白模型的构建 使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 根据目标蛋白质的序列进行同源建模。检索序列同源性经比对后结果在 40% 以上的蛋白作为同源蛋白,并在此基础上同源建模获得蛋白质的 3D 结构。通过 Ramachandran plot 对蛋白质 3D 结构进行合理性验证。

1.2.6 潜在药物的预测和分子对接验证 采用 DrugBank 平台 (<https://go.drugbank.com>) 对靶点蛋白进行潜在药物的预测。应用 Discovery Studio 2.5 软件中的 Dock Ligand (Libdock) 对接方法将潜在药物与靶点蛋白进行分子对接验证, LibDock Score 分数越高,靶点和分子间结合更紧密。

1.2.7 潜在药物的成药性和吸收、分配、代谢、排泄、毒性 (ADMET) 性质预测 潜在药物化合物转换为 smile 文件,分别输入 PreADMET (<https://pre-admet.qsarhub.com/>)、pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm>)、ProTox (<https://tox-new.charite.de/prottox/>) 和 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), 来预测生物活性化合物的药物相似性和 ADMET 特性。

1.2.8 抗菌活性实验验证 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定参照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 指南中描述的微量稀释法。诺卡氏菌 W4-20-4 过夜培养至对数生长期,使用 ISP1 培养液调整至 OD₆₀₀ 为 0.08~0.13。将药物用培养液倍比稀释^[17] 为 1 024~0.002 μg/mL 浓度的药液。在 96 孔板中分别加入 100 μL 菌液和药液, 28 °C 培养 24 h。根据肉眼查看溶液是否浑浊,各孔中加入 10 μL 0.5% 无菌 TTC 溶液, 28 °C 孵育 1 h, 以含药培养液上无变红色的完全抑制诺卡氏菌生长的药物浓度判定为 MIC, 每组浓度 3 次重复。

2 结果

2.1 诺卡氏菌全基因组的泛基因组学分析

从 NCBI 数据库中共下载了 31 株诺卡氏菌的全基因组数据,相关详细信息见附表。对菌株的全基因组序列进行泛基因组分析,共发现 41 369 个基因家族(泛基因组),其中含有 1 421 个核心基因。图 1(A) 表示 31 株诺卡氏菌基因组的泛-核心图。X 轴表示基因组的数量,而 Y 轴表示基因家族的数量,绘制拟合曲线方程: $f(x) = 6287.79 \cdot x^{0.530958}$ 。随着基因组数量的增加,泛基因组的大小增加,而核心基因组的大小减少,因此,可以推测诺卡氏菌的泛基因组是开放的。1 421 个核心基因的 COG 注释如图 1(B) 所示。COG 将 1 421 个核心基因编码蛋白的功能分为 20 类,与一般功能预测 (general function prediction only) 相关的蛋白编码基因最多,占 COG 注释核心基因总数的 13.01%; 其次为氨基酸的转运和代谢 (amino acid transport and metabolism) 相关的蛋白编码基因,占基因总数的 9.2%; 第三为脂质转运与代谢 (lipid transport and metabolism) 相关的蛋白编码基因,占基因总数的 8.61%。



附表
Appendix table

2.2 消减蛋白质组学预测诺卡氏菌药物靶点

对诺卡氏菌的 1 421 个核心蛋白进行消减蛋白质组学分析,以获得候选蛋白。图 2 所示,在 1 421 个诺卡氏菌核心蛋白中,893 个蛋白属于非人同源性蛋白; 40 个属于毒力相关蛋白; 835 个属于必需蛋白,取三类蛋白的交集,获得 15 个候选药物靶点蛋白。表 2 为 15 个药物靶点的详细理化性质。通过筛选发现,OG1493 蛋白最符合靶点蛋白的理化性质:氨基酸数目 > 100,分子量低 < 75.0 ku, pI 值低, GRAVY 值为负值,蛋白质脂肪指数高,不稳定指数 II < 40,因此综合分析选择 OG1493 蛋白进行下一步的研究。

2.3 OG1493 蛋白的同源建模与合理性验证

PDB 数据库无 OG1493 蛋白的晶体结构,因此使用 SWISS-MODEL 对 OG1493 蛋白进行同源建模,以同源性 > 40% 的大肠杆菌 LxpC 蛋白 (PDB ID: 4MDT) 为模板,进行同源建模,得到蛋白 3D 结构,如图 3(A) 所示,红色表示 α-螺旋,蓝色表示 β-折

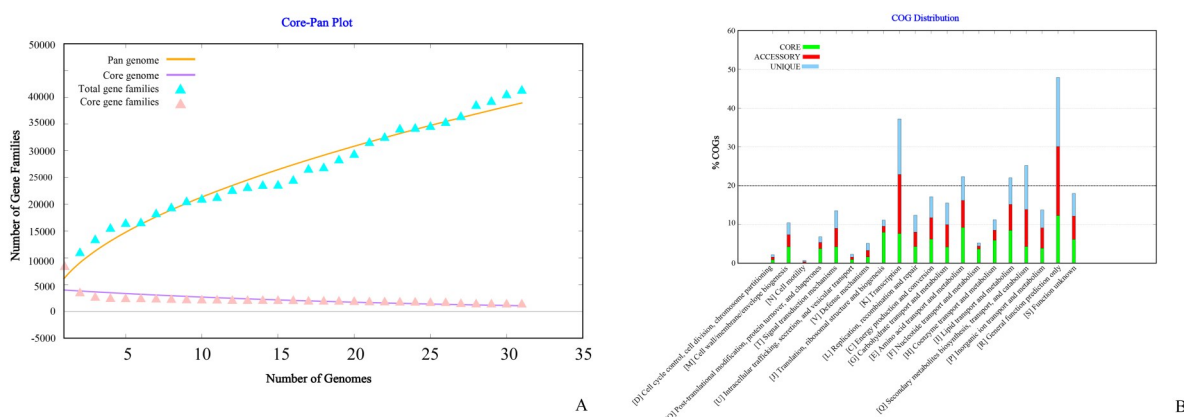


图1 泛基因组分析(A)和核心基因组 COG 功能注释(B)

Fig. 1 Pan-genomic analysis (A) and Core-genomic COG function annotation (B)

叠,绿色表示β-转角,灰色表示无规则卷曲。Ramachandran plot 结果如图 3(B)所示,模型有 93.15% 的残基处于允许区,超过 90.0%,表明该蛋白质建模良好,符合立体化学能量规则。

采用 DrugBank 平台,依据蛋白质序列对靶点蛋白 OG1493 预测了 7 种潜在的抗诺卡氏菌化合物,通过文献调研发现 Phosphoaminophosphonic_Acid-Adenylate_Ester、Radicicol、p-Coumaric_acid 和 Ethylmercurithiosalicylic_acid 均为已知抗菌化

合物,见表 3。

2.4 预测药物的分子对接和抗菌活性验证

7 种潜在的抗诺卡氏菌化合物与 OG1493 蛋白进行对接验证,对接评分如表 3 所示。为了方便观察与分析靶点蛋白和化合物之间的相互作用,将上述对接结果进行二维可视化分析。在所有的化合物-靶点相互作用分析中,发现 OG1493 蛋白与腺苷 5'-Rp-α-硫代三磷酸、α,β-亚甲基腺苷 5'-三磷酸、磷酸氨基磷酸腺苷酸酯和根赤壳霉素的对接

表 2 诺卡氏菌药物靶点蛋白的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of *Nocardia* drug target proteins

ID	Gene	Amino acid count/n	Molecular weight/kDa	pI	GRAVY	Fat index	Instability index II	Sub-cellular localization
OG1180	<i>prrA</i>	255	27.60447	5.90	0.053	103.61	26.31	cytoplasm
OG2225	<i>purC</i>	317	35.12656	5.42	-0.373	79.40	33.54	cytoplasm
OG282	<i>eccC4</i>	1362	147.83474	5.69	-0.117	91.31	46.50	cytomembrane
OG1124	<i>eccB3</i>	579	61.01783	9.17	-0.165	88.65	43.68	cytomembrane
OG1828	<i>sigA/rpoV</i>	519	57.52152	5.21	-0.652	78.73	52.11	cytoplasm
OG1899	<i>devR/dosR</i>	239	25.57810	5.62	-0.086	98.28	47.55	cytoplasm
OG2296	<i>mprB</i>	515	54.87588	6.91	-0.036	97.83	43.23	cytoplasm
OG596	<i>icl</i>	687	74.69208	5.28	-0.183	86.70	28.07	cytoplasm
OG1359	<i>sigH</i>	303	33.53394	4.61	-0.665	70.00	38.06	cytoplasm
OG2085	<i>sigF</i>	183	19.99359	6.83	-0.380	86.45	51.43	cytoplasm
OG3928	<i>sigM</i>	235	25.80311	8.43	-0.370	84.47	58.83	cytoplasm
OG3211	<i>devR/dosR</i>	314	33.96914	8.96	-0.136	93.60	33.63	cytoplasm
OG4031	<i>caeA</i>	555	58.32833	4.64	-0.168	83.26	29.31	cytoplasm
OG1493	<i>senX3</i>	534	57.36962	5.48	-0.073	87.75	37.66	cytomembrane
OG823	<i>mprA</i>	255	28.53562	5.90	-0.116	112.35	52.99	cytoplasm

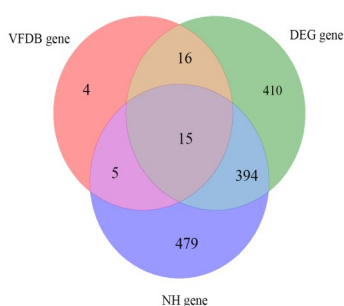
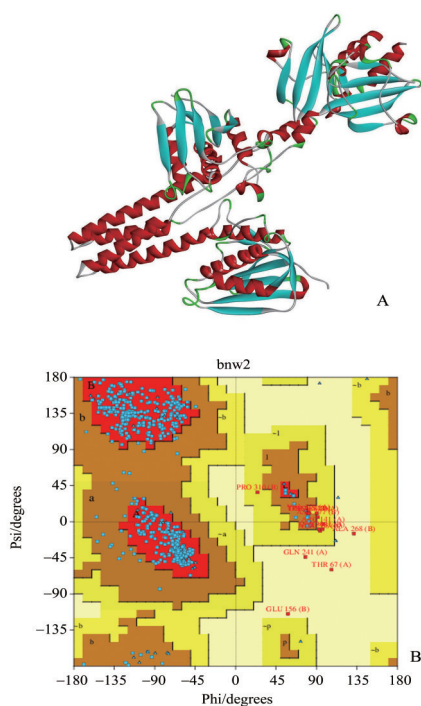


图2 VFDB、DEG和NH共同筛选诺卡氏菌药物靶点
Fig. 2 Screening of *Nocardia* drug targets by VFDB, DEG and NH gene



A: 3D structure of OG1493 protein; B: Ramachandran plot of OG1493 protein.

图3 OG1493蛋白结构预测与验证

Fig. 3 Structure prediction and verification of OG1493 protein

分数均大于100,其中,腺苷5'-Rp- α -硫代三磷酸与OG1493蛋白具有最高的结合分数,为132.576,具有较好的结合活性。

附图展示的是7种潜在的抗诺卡氏菌化合物与OG1493蛋白的对接结果二维图,配体和受体之间存在强的相互作用,主要作用类型包括常规氢键、碳-氢键、 π 键、 $p-\pi$ 共轭效应和疏水作用等。以根赤壳霉素为例,在附图A中,根赤壳霉素与蛋白OG1493的残基SER186形成普通氢键,与

GLY361形成碳-氢键,具有很强的氢键作用;残基LEU364、VAL185、LEU189和MET230与根赤壳霉素形成4个烷基键;根赤壳霉素与一些疏水氨基酸如ILE368、GLY365、GLU233、GLU188、LEU189、HIS184和GLY360形成范德华力,存在很强的疏水作用。以上结果说明根赤壳霉素对OG1493受体蛋白存在较强的相互作用。



附图

Appendix figure

MIC是指微生物在特定生长环境下培养一段时间,可抑制某种微生物明显增长的最低药物浓度,用于定量测定抑菌物质的体外抗菌活性。本研究中抗菌活性实验结果证实,根赤壳霉素对诺卡氏菌具有抗菌活性,最低抑菌浓度(MIC)为1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 药物分子的成药性和ADMET分析

在这项研究中,Lipinski's Rule of Five被用来预测生物活性化合物的类药物性质。根据Lipinski的五法则,一个最有可能被开发为口服活性药物的候选分子应该满足一定的标准,包括分子量小于500 ku、不超过10个氢键、不超过5个氢键供体,以及 $M\text{LogP}<4.15$ 。如表4所示,在7种潜在的抗诺卡氏菌化合物中,对香豆酸、根赤壳霉素和硫柳汞没有违任何一条Lipinski规则,具有良好的成药性;磷酸氨基磷酸腺苷酸酯违反了两条以上Lipinski规则,成药性不佳。

药代动力学是指药物进入体内后的行为,ADMET参数是影响其药代动力学的因素。药物分子的ADMET参数如表5所示。对香豆酸、根赤壳霉素和硫柳汞的Caco2渗透性均在0.9以上,表明上述化合物可能适合于口服给药。血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)在维持中枢神经系统(central nervous system, CNS)的稳态中起着至关重要的作用,根赤壳霉素和磷酸氨基磷酸腺苷酸酯均无法穿透血脑屏障。对香豆酸、根赤壳霉素、磷酸氨基磷酸腺苷酸酯和硫柳汞均对Metabolism中所述的5种细胞色素酶没有抑制作用,表明这些化合物不影响其他药物的代谢。对香豆酸、根赤壳霉素和磷酸氨基磷酸腺苷酸酯的口服急性毒性均为Class 4以上,均具有较好的口服安全性。

表3 OG1493蛋白的药物预测
Table 3 Drug prediction of OG1493 protein

Compound	Name	LibDock score	Function
Adenosine-5'-Rp-Alpha-Thio-Triphosphate	腺苷 5'-Rp- α -硫代三磷酸	132.576	
alpha,beta-Methyleneadenosine 5'-triphosphate	α, β -亚甲基腺苷 5'-三磷酸	129.166	
Phosphoaminophosphonic_Acid-Adenylate_Ester	磷酸氨基磷酸腺苷酸酯	126.169	anti-microbial ^[18]
Radicalol	根赤壳霉素	107.449	anti-microbial ^[19]
2-Hydroxyestradiol	2-羟基雌二醇	93.085	
p-Coumaric_acid	对香豆酸	71.391	anti-microbial ^[20]
Ethylmercurithiosalicylic_acid	硫柳汞	59.937	anti-microbial ^[21]

表4 Lipinski类药分析
Table 4 Lipinski's rule of five analysis

Compound	Molecular formula	Lipinski's Parameters				Violations
		Molecular Weight (g/mol)	MLogP	H-Bond Donor	H-Bond Acceptor	
p-Coumaric_acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	1.28	2	11	0
Radicalol	C ₁₈ H ₁₇ ClO ₆	364.78	1.67	2	6	0
Phosphoaminophosphonic_Acid-Adenylate_Ester	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ O ₁₂ P ₃	506.20	-4.38	8	16	3
Ethylmercurithiosalicylic_acid	C ₉ H ₁₀ HgO ₂ S	382.83	2.52	1	2	0

3 讨论

泛基因组是指某一个物种所有存在的基因,它包括核心基因组、特有基因组和非必须基因组,由 Tettelin 等^[22]在 2005 年提出。近年来,泛基因组在基因功能挖掘和药物靶点预测中发展迅速,为新抗菌靶点和药物的发现提供了新思路^[23]。Dar 等^[24]通过对结核分枝杆菌进行泛基因组分析,发现了 8 个新抗菌药物靶点并预测了 5 个药物先导化合物;Basharat 等^[25]通过对假结核耶尔森菌的 23 个全基因组序列进行了泛基因组分析,发现了 85 个药物靶点,并结合靶点蛋白的理化性质最终筛选出一个靶点蛋白(MdtC),并针对 MdtC 预测了多个药物先导化合物。本研究对 31 株诺卡氏菌的全基因组序列进行了泛基因组分析,共发现 41 369 个基因家族(泛基因组),其中共有 1 421 个核心基因。随着基因组数量的增加,泛基因组的大小增加,而核心基因组的大小减少,发现其基因组为开放型,说明诺卡氏菌的基因组在未来还会发生变化,同时也说明

诺卡氏菌具有相对较高的遗传多样性。

为了对诺卡氏菌进行预防和控制,本研究针对诺卡氏菌核心基因进行了药物靶点的筛选。与人类同源的抗菌药物靶点,会增加药物对人类产生不良反应的概率,因此鉴定为人类同源物的蛋白应被排除^[26];必需基因是指对病原体生存至关重要的基因^[27],药物分子靶向此类蛋白可有效增加抗菌活性;毒力蛋白由来自 25 种病原菌的 4 类毒力因子组成,分别为进攻性、防御性、非特异性和毒力相关调节蛋白,有助于细菌调节或逃避宿主防御机制,并可能促进发病^[28]。经过上述三种蛋白消减筛选,鉴定出 15 个潜在的抗诺卡氏菌候选蛋白。除此之外,药物靶点必须符合某些理化特征:Golchha 等研究表明靶点蛋白氨基酸数量不少于 100 个^[29];Chawley^[30]和 Gashaw^[31]等研究表明低分子量蛋白(<75.0 ku)可增加靶蛋白的可及性,认为低分子量蛋白是良好的药物靶点;Solanki^[32]和 Chang^[33]等研究显示,药物更易结合低等电点的蛋白,GRAVY 的负值表示药物靶点的亲水性好,较高的蛋白质脂肪

表5 药物分子的ADMET分析
Table 5 ADMET analysis of drug molecules

Parameter	p-Coumaric_acid	Radicicol	Phosphoaminophosphonic_Acid-Adenylate_Ester	Ethylmercurithiosalicylic_acid
Absorption (A)				
Caco2 permeability	1.21	0.962	-0.806	1.631
Distribution (D)				
BBB permeability	Yes	NO	NO	Yes
Metabolism (M)				
CYP1A2 inhibitor	No	No	No	No
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No
Excretion (E)				
Clearance	0.622	0.312	-0.356	-0.954
Renal OCT2 substrate	No	No	No	No
Toxicity (T)				
AMES toxicity	No	No	No	No
Hepatotoxicity	No	Yes	No	No
Skin Sensitisation	No	No	No	No
Oral Toxicity (LD ₅₀)/(mg/kg)	2 850	300	11 250	75
Acute oral toxicity	Class 5	Class 4	Class 6	Class 3

指数表示热稳定性高,不稳定指数 II >40 的蛋白被认为是不稳定的。Gong^[34]和Kumar^[35]等研究表明靶蛋白和非靶蛋白之间的一个主要区别是:靶蛋白更可能存在于胞膜上,大多数药物通过与膜蛋白相互作用而达到治疗效果,因此所有胞内和胞外分泌蛋白也被排除在本研究之外。最终发现了一个最优靶点蛋白 OG1493,该蛋白是一种 senX3 蛋白^[36]。

近年来研究发现 senX3 是 *KatG* 基因的调控蛋白,*KatG* 基因用于编码氧化氢酶-过氧化物酶,*KatG* 基因表达上调,可使结核分枝杆菌对异烟肼的敏感度增加^[37]。结核分枝杆菌 Pst 系统通过抑制 SenX3-RegX3 双组分系统的激活,增强结核分枝杆菌对抗生素利福平的敏感性。此外, senX3 基因缺陷可导致结核分枝杆菌对小鼠的毒力显著下降^[38]。因此,蛋白 OG1493 可能是一种的潜在的抗菌靶点。

在此基础上,运用 drugbank 平台预测了 7 种针对该靶点的潜在抗诺卡氏菌化合物,并通过文献调

研发现,所预测的四种化合物均具有抗菌作用^[18-21]。此外,对化合物的分子对接活性和成药性进行了预测。分子对接^[39]在新药开发领域发挥重要作用,可以模拟受体和配体之间的相互作用,灵敏性高,预测性强,如席晓萌等^[40]运用分子对接推测出 ARG1591、ARG1410 和 GLU1397 可能为 α -葡萄糖苷酶的活性位点残基,进一步筛选出 9 个可以起到较强抑制作用的黄酮类化合物。本文分子对接结果以根赤壳霉素为例,根赤壳霉素与蛋白 OG1493 的残基 SER186、GLY361 之间具有很强的氢键作用;残基 LEU364、VAL185、LEU189 和 MET230 与根赤壳霉素形成烷基键;根赤壳霉素与一些疏水氨基酸如 ILE368、GLY365、GLU233、GLU188、LEU189、HIS184 和 GLY360 存在很强的疏水作用,说明根赤壳霉素对 OG1493 受体蛋白存在较强的相互作用。

药物开发是一个耗时且昂贵的过程,在研发早

期对化合物的成药性评价有助于提高研究效率。本研究发现根赤壳霉素完全符合 Lipinski 规则,不穿透血脑屏障,口服毒性小,具有较好的成药性。根赤壳霉素可能是一种潜力的抗诺卡氏菌药物。根赤壳霉素是一种来源于 *Hypomyces subiculosus* 和 *Pochonia chlamydosporia* 的天然产物,一般认为其可通过抑制 Hsp90 分子伴侣发挥抗癌作用,最新研究发现^[19]其对海洋分枝杆菌和白色念珠菌均有杀菌活性,最低抑菌浓度(MIC)分别为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和

44 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。本研究经实验验证,根赤壳霉素对诺卡氏菌有抑制作用,最低抑菌浓度(MIC)为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

综上所述,本文通过泛基因组学和消减蛋白质组学预测了一种新的抗诺卡氏菌药物靶点,并发现根赤壳霉素可能是针对该靶点的抗菌药物。本研究首次将泛基因组学和消减蛋白质组学技术运用于抗菌靶点的预测和开发中,为抗菌药物的开发提供了一种新思路。

参考文献

- [1] Del Rio-Rodríguez RE, Ramirez-Paredes JG, Soto-Rodríguez SA, et al. First evidence of fish nocardiosis in Mexico caused by *Nocardia seriolae* in farmed red drum (*Sciaenops ocellatus*, Linnaeus)[J]. J Fish Dis, 2021, 44(8): 1117-1130.
- [2] Martínez-Barricarte R. Isolated nocardiosis, an unrecognized primary immunodeficiency? [J]. Front Immunol, 2020, 11: 590239.
- [3] Lv HY, Chen MY, Ji YQ, et al. A rare case of a subcutaneous abscess caused by *Nocardia cyriacigeorgica* in an immunocompetent patient [J]. Infect Drug Resist, 2023, 16(6): 263-268.
- [4] El Chediak A, Triozzi JL, Schaefer H, et al. Disseminated nocardiosis in kidney transplant recipients: a report of 2 cases [J]. Kidney Med, 2022, 4(12): 100551.
- [5] Wang H, Zhu Y, Cui QZ, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance profiles of the *Nocardia* species in China, 2009 to 2021 [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0156021.
- [6] Nouioui I, Cortes-Albayar C, Neumann-Schaal M, et al. Genomic virulence features of two novel species *Nocardia barduiliensis* sp. nov. and *Nocardia gipuzkoensis* sp. nov., isolated from patients with chronic pulmonary diseases [J]. Microorganisms, 2020, 8(10): 1517.
- [7] Toyokawa M, Taniguchi M, Uesaka K, et al. Complete genome sequence of multidrug-resistant strain *Nocardia wallacei* FMUON74, isolated from a sputum culture [J]. Microbiol Resour Announc, 2020, 9(47): e01022.
- [8] Xu S, Li ZP, Huang YM, et al. Whole genome sequencing reveals the genomic diversity, taxonomic classification, and evolutionary relationships of the genus *Nocardia* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(8): e0009665.
- [9] Anani H, Zgheib R, Hasni I, et al. Interest of bacterial pangenome analyses in clinical microbiology [J]. Microb Pathog, 2020, 149: 104275.
- [10] Cai QM, Huang YC, Zhou L, et al. A complete genome of *Nocardia terpenica* NC_YFY_NT001 and pan-genomic analysis based on different sources of *Nocardia* spp. isolates reveal possibly host-related virulence factors [J]. Infect Drug Resist, 2022, 15(12): 7259-7270.
- [11] 方源, 谢柏盛, 黄婷, 等. 34株假单胞菌的泛基因组分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27(4): 1031-1038.
- [12] Fang Y, Xie BS, Huang T, et al. Pan-genomic characteristic of 34 *Pseudomonas* strains [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2021, 27(4): 1031-1038.
- [13] Uddin R, Siraj B, Rashid M, et al. Genome subtraction and comparison for the identification of novel drug targets against *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis* [J]. Pathogens, 2020, 9(5): 368-373.
- [14] Uddin R, Siddiqui QN, Azam SS, et al. Identification and characterization of potential druggable targets among hypothetical proteins of extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (XDR KZN 605) through subtractive genomics approach [J]. Eur J Pharm Sci, 2018, 114(10): 13-23.
- [15] Duarte Y, Márquez-Miranda V, Miossec MJ, et al. Integration of target discovery, drug discovery and drug delivery: a review on computational strategies [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2019, 11(4): e1554.
- [16] Chen X, Yan CC, Zhang X, et al. Drug-target interaction prediction: databases, web servers and computational models [J]. Brief Bioinform, 2016, 17(4): 696-712.
- [17] 王影姣. 美洲大蠊肠道内生放线菌的多样性研究 [D]. 广东药科大学, 2016.
- [18] Wang YJ. The diversity research of periplaneta americana intestinal endogenous actinomycetes [D]. Guangdong Pharm Univ, 2016.
- [19] Caso Coelho V, Pereira Neves SD, Cintra Giudice M, et al. Evaluation of antimicrobial susceptibility testing of *Nocardia* spp. isolates by broth microdilution with resazurin and spectrophotometry [J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 330-332.
- [20] Setzer MS, Sharifi-Rad J, Setzer WN. The search for herbal antibiotics: an in-silico investigation of antibacterial phytochemicals [J]. Antibiotics (Basel), 2016, 5(3): 30-33.
- [21] Cadelis MM, Li SA, van de Pas SJ, et al. Antimicrobial natural products from plant pathogenic fungi [J]. Molecules, 2023, 28(3): 1142-1145.
- [22] Li J, Zhao N, Xu RY, et al. Deciphering the antibacterial activity and mechanism of p-coumaric acid against *Allicyclobacillus acidoterrestris* and its application in apple juice [J]. Int J Food Microbiol, 2022, 378: 109822.
- [23] 何鹏, 梁争论. 硫柳汞防腐剂在用人疫苗中的应用 [J]. 中

- 国生物制品学杂志, 2013, 26(9): 135-143.
- He P, Liang ZL. Application of thimerosal as a preservative to vaccines for human use[J]. Chin J Biol, 2013, 26(9): 135-143.
- [22] 赵永兵. 泛基因组学分析方法开发及应用[D]. 中国科学院北京基因组研究所, 2014.
- Zhao YB. Development and application of pan-genomics analytical method[D]. Beijing Institute of genome research, Chinese Academy of Sciences, 2014.
- [23] Muzzi A, Masignani V, Rappuoli R. The pan-genome: towards a knowledge-based discovery of novel targets for vaccines and antibacterials [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(12): 429-439.
- [24] Dar HA, Zaheer T, Ullah N, et al. Pangenome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals core-drug targets and screening of promising lead compounds for drug discovery[J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(11): 819-833.
- [25] Basharat Z, Jahanzaib M, Yasmin A, et al. Pan-genomics, drug candidate mining and ADMET profiling of natural product inhibitors screened against *Yersinia pseudotuberculosis* [J]. Genomics, 2020, 113(1): 238-244.
- [26] Gul H, Ali SS, Saleem S, et al. Subtractive proteomics and immunoinformatics approaches to explore Bartonella bacilliformis proteome (virulence factors) to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine [J]. Infect Genet Evol, 2020, 85: 104551.
- [27] Luo H, Lin Y, Gao F, et al. DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(D1): D574-D580.
- [28] Chen LH, Yang J, Yu J, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(4): D325-D328.
- [29] Golchha NC, Nighojkar A, Nighojkar S. Redefining genomic view of *Clostridioides difficile* through pangenome analysis and identification of drug targets from its core genome [J]. Drug Target Insights, 2022, 16(8): 17-24.
- [30] Chawley P, Samal HB, Prava J, et al. Comparative genomics study for identification of drug and vaccine targets in *Vibrio cholerae*: MurA ligase as a case study[J]. Genomics, 2014, 103(1): 83-93.
- [31] Gashaw I, Ellinghaus P, Sommer A, et al. What makes a good drug target? [J]. Drug Discov Today, 2011, 16(7): 1037-1043.
- [32] Solanki V, Tiwari V, et al. Subtractive proteomics to identify novel drug targets and reverse vaccinology for the development of chimeric vaccine against *Acinetobacter baumannii* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9044.
- [33] Chang KY, Yang JR. Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70166.
- [34] Gong J, Chen Y, Pu F, et al. Understanding membrane protein drug targets in computational perspective [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(5): 551-556.
- [35] Kumar A, Ahmad A, Vyawahare A. Membrane trafficking and subcellular drug targeting pathways [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 629.
- [36] Rang J, He H, Chen J, et al. SenX3-RegX3, an important two-component system, regulates strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis in *Saccharopolyspora pogona* [J]. iScience, 2020, 23(8): 101398.
- [37] Namugenyi SB, Aagesen AM, Elliott SR, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PhoY proteins promote persister formation by mediating Pst/SenX3-RegX3 phosphate sensing [J]. mBio, 2017, 8(4): e00494.
- [38] Glover RT, Kriakov J, Garforth SJ, et al. The two-component regulatory system senX3-regX3 regulates phosphate-dependent gene expression in *Mycobacterium smegmatis* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(15): 5495-5503.
- [39] 吴坚, 薛晓燕, 王丽芳, 等. 分子对接方法应用与发展 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(12): 80-81.
- Wu J, Xue XY, Wang LF, et al. Application and development of molecular docking methods [J]. Asia-Pac Trad Med, 2013, 9(12): 80-81.
- [40] 席晓萌, 姜云鸽, 王琳, 等. 基于分子对接技术探究黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的机制 [J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2021, 34(12): 525-531.
- Xi XM, Jiang YH, Wang L, et al. The mechanism of flavonoid inhibition on α -glucosidase was investigated based on molecular docking technique [J]. J Yunnan Nation Univ (Nat Sci Edi), 2021, 34(12): 525-531.

(编辑 孙慧兰)