

บทความวิจัย

สาเหตุของความจำเพาะเจาะจงของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ ในมนุษย์: ทำไมฮีแมกกลูตินิน H1 ยึดเกาะกับตัวรับแบบ S26G ดีกว่าแบบ S23G

Source of The Receptor Recognition Specificity on Human Influenza A Virus: Why Hemagglutinin H1 is Better Bind by S26G than S23G Receptor

บรรณวัฒน์ ไตวิเวก¹ และ พนิดา กังซุน^{2*}

Borvornwat Toviwek¹ and Panita Kongsunc^{2*}

บทคัดย่อ

จากการศึกษาในระดับโมเลกุลเพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างและพลังงานยึดจับของระบบ Human(H1)-S23G และ Human(H1)-S26G ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน พบว่ามุมทอร์ชันของระบบ Human(H1)-S26G จะเกิด 1 conformation ซึ่งเป็น cis conformation ในขณะที่ระบบ Human(H1)-S23G จะเกิด 2 conformation โดยในช่วงแรกเป็น trans เมื่อเวลาผ่านไป พยายามปรับให้เป็น cis conformation พันธะไฮโดรเจนของระบบ Human(H1)-S23G เกิดน้อยกว่าของระบบ Human(H1)-S26G โดยพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล SIA ของระบบ Human(H1)-S23G กับกรดอะมิโน K142 และ G225 ของเอนไซม์ HA หายไปเมื่อเทียบกับระบบ Human(H1)-S26G รวมถึงพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล GAL ของระบบ Human(H1)-S23G กับกรดอะมิโน D222 ในขณะที่ระบบ Human(H1)-S26G เกิดถึง 6 พันธะ ซึ่งจากผลการคำนวณที่พบนี้สามารถสรุปได้ว่าฮีแมกกลูตินิน H1 ยึดเกาะกับตัวรับแบบ S26G ได้ดีกว่าตัวรับแบบ S23G ยืนยันผลสรุปนี้ด้วยค่าพลังงานยึดจับ ($\Delta G_{\text{binding}}$) ของ human(H1)-S26G จะมีพลังงานที่ต่ำกว่าระบบ human(H1)-S23G ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับแบบ S26G แข็งแรงกว่าตัวรับแบบ S23G

คำสำคัญ: ฮีแมกกลูตินิน ตัวรับ ไข้หวัดใหญ่ ความจำเพาะเจาะจง โมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน

¹ นิสิตสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

² อ.ดร., สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93110

* Corresponding author: e-mail : panita487@hotmail.com

Abstract

To examine the influence of the recognition specificity of HA on receptor, molecular dynamics simulations of the enzyme HA subtype H1 bound to two receptor, Human(H1)-S23G and Human(H1)-S26G complexes, were carried out. It appears that 1 conformation of cis and 2 conformations (trans appears at first and cis appears later) for conformation for Human(H1)-S26G and Human(H1)-S23, respectively. The number of H-bond of Human(H1)-S26G is more than Human(H1)-S23G system in which a strong interaction between the K142 and G225 of HA and the SIA molecule of receptor was disappeared in Human(H1)-S23G complex. In addition, none H-bond between the D222 of HA and the GAL molecule for Human(H1)-S23G complex appears this H-bond appears 6 bonds for the Human(H1)-S26G system. From the calculation, it can be concluded that H1 is better bound to S26G receptor than those of S23G receptor confirmed by the lower $\Delta G_{\text{binding}}$ of Human(H1)-S26G than Human(H1)-S23G system.

Keywords: Hemagglutinin, receptor, Influenza virus A, recognition specificity, molecular dynamics simulations

1. บทนำ

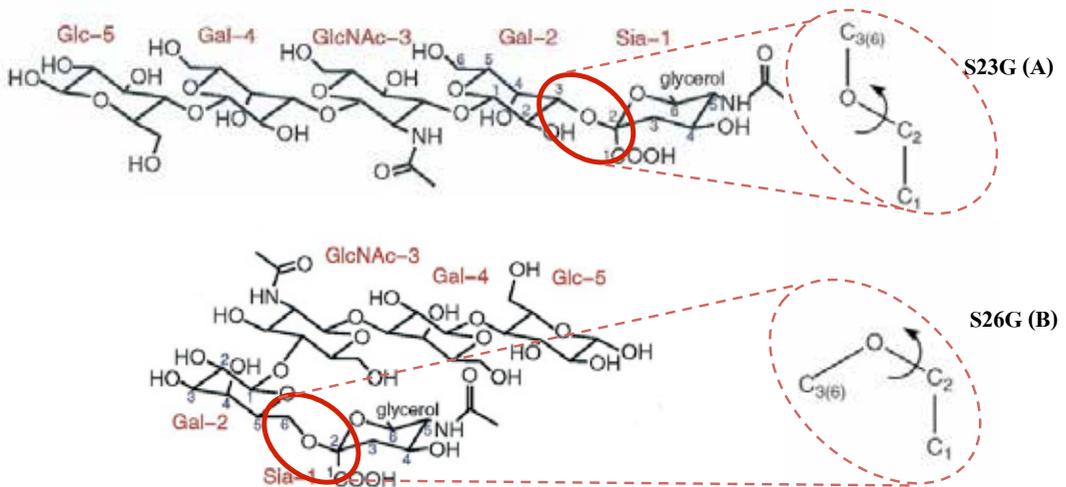
ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza A virus) มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลักษณะเป็นท่อนๆ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Orthomyxoviridae* [1] จากรหัสพันธุกรรม (nucleotide sequence) ของนิวคลีโอโปรตีนและ เมทริกซ์โปรตีนสามารถแบ่งเชื้อไวรัสออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เอ บี และ ซี โดยเชื้อไวรัสในกลุ่ม เอ จะมีการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมค่อนข้างสูง จึงเป็นกลุ่มที่มีการระบาดรุนแรง พบได้บ่อย และก่อให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ชนิดใหม่ๆ เชื้อไวรัสในกลุ่ม บี จัดเป็นอีกกลุ่มที่ทำให้เกิดเชื้อไวรัสไข้หวัดสายพันธุ์ชนิดใหม่ๆ เช่นเดียวกับกลุ่ม เอ แต่มีโอกาสพบค่อนข้างน้อยกว่า ส่วนเชื้อไวรัสในกลุ่ม ซี มักจะก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ แต่ไม่ก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อไวรัส ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นศึกษาเชื้อไวรัสไข้หวัดกลุ่ม เอ ที่บริเวณเปลือกผิวชั้นนอกของอนุภาคไวรัสกลุ่ม เอ จะประกอบด้วยไกลโคโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin, HA) ซึ่งมี 16 ชนิด และนิวรามินิเดส (Neuraminidase, NA) ซึ่งมี 9 ชนิด ดังนั้นในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่กลุ่ม เอ ทุกครั้งจะต้องมีการระบุทั้งชนิดของ HA และ NA ควบคู่ [2] กัน เช่น H1N1 H3N2 หรือ H5N1 เป็นต้น

กระบวนการเพิ่มจำนวน (replication) ของเชื้อไข้หวัดนั้น เริ่มต้นจากไกลโคโปรตีน HA ของอนุภาคไวรัสยึดเกาะกับตัวรับของโฮสต์ คือ sialic acid ที่พบบนเมมเบรนของเซลล์เยื่อทางเดินหายใจ การยึดเกาะนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง กล่าวคือ หากโปรตีน HA จับกับตัวรับบนผิวของโฮสต์ได้ เชื้อจะแพร่เข้าสู่ร่างกายโฮสต์ได้ง่าย มีการกระจายของเชื้ออย่างรวดเร็ว ในทางตรงกันข้าม หากไกลโคโปรตีน HA ไม่สามารถยึดเกาะกับตัวรับบนผิวของโฮสต์ได้ การแพร่เข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสก็จะไม่เกิดขึ้น สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลักษณะของตัวรับที่ประกอบไปด้วยน้ำตาล 5 โมเลกุลคือ sialic acid; SIA, galactose ;GAL, N-actyl glucosamine ;NAG และ glucose; GLC การยึดเกาะระหว่างโมเลกุล HA และตัวรับบนผิวของโฮสต์นั้นแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ การยึดเกาะกับตัวรับของโฮสต์ที่มีกรดไซแอลิกเชื่อมต่อกับน้ำตาลกาแลคโตสแบบแอลฟา 2,3 (S23G) และแบบแอลฟา 2,6 (S26G) (รูป 1)

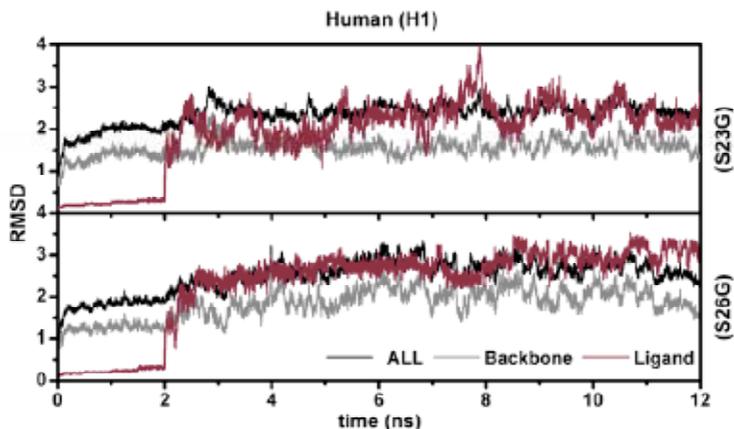
จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

งานวิจัยจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าไกลโคโปรตีน HA จากสายพันธุ์ที่ติดเชื่อในสัตว์ปีกและม้าชอบที่จะจับกับตัวรับแบบ S23G เชื้อไวรัสในมนุษย์จะชอบจับแบบ S26G ส่วนเชื้อไวรัสในสุกรนั้นพบว่าสามารถจับกับตัวรับทั้ง 2 แบบได้ดี ในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนของมนุษย์จะมีตัวรับแบบ S26G เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจึงติดต่อกับคนได้ค่อนข้างยาก ส่วนระบบทางเดินหายใจส่วนล่างของมนุษย์นั้น จะมีตัวรับแบบ S23G ในทางตรงกันข้าม ในระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีกส่วนใหญ่จะมีตัวรับแบบ S23G [2-3] ดังนั้นในสัตว์ปีกจึงมีการติดเชื่อไวรัสไข้หวัดนกได้ง่ายกว่า ได้มีการตั้งสมมติฐานว่าการติดเชื่อข้ามสายพันธุ์จากสัตว์ปีกไปยังมนุษย์น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะการยึดเกาะของโปรตีน HA กับตัวรับจากแบบ S23G เป็นแบบ S26G

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาและเปรียบเทียบการยึดจับระหว่างไกลโคโปรตีน HA ของเชื้อไวรัสที่ได้จากคนสายพันธุ์ H1N1 ที่ระบาดในปี 2009 (huH1/2009H1N1) กับตัวรับที่เป็นแบบทั้งแบบ S23G และ S26G ในระดับโมเลกุล ด้วยโปรแกรมทางเคมีคอมพิวเตอร์ ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน (molecular dynamics simulations) เพื่ออธิบายถึงความเหมือน/ความแตกต่างทางด้านโครงสร้างและคุณสมบัติทาง เช่น ข้อมูลมุมทอร์ชัน พันระไฮโดรเจน พลังงานเสรีเพื่อทำนายการยึดจับของฮีแมกกลูตินินกับตัวรับบนผิวเซลล์แบบ S23G และ S26G ซึ่งความรู้พื้นฐานเหล่านี้สามารถนำไปใช้เพื่อติดตาม การเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ อธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับ โมเลกุลและอาจจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการแพทย์หรือนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบยาต่อไป



รูปที่ 1 โครงสร้าง 2 มิติและนิยามมุมทอร์ชันของตัวรับแบบ (A) S23G และ (B) S26G

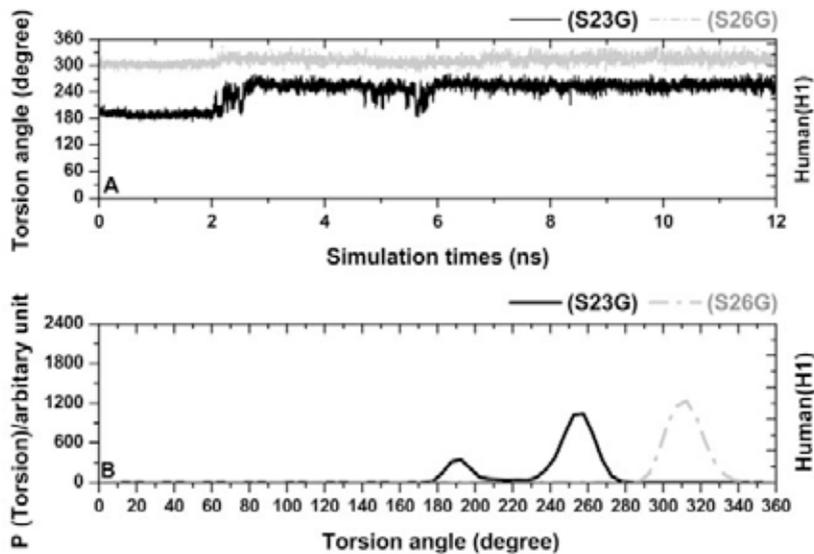


รูปที่ 4 กราฟแสดงค่า Root Mean Square Displacement (RMSD) ของระบบ Human (H1)-S23G และ Human (H1)-S26G โดยพล็อตตั้งแต่ 0-12 ns

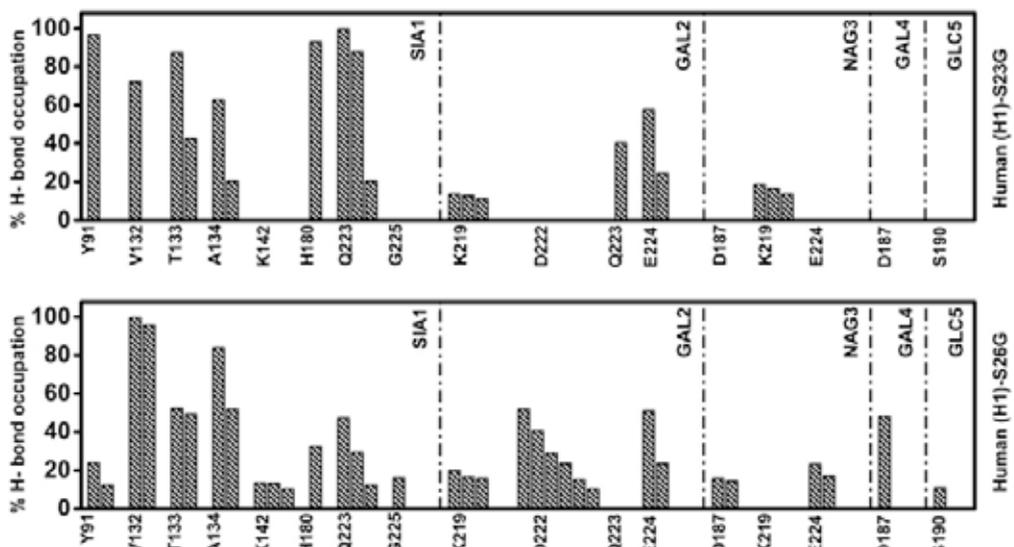
3.2 มุมทอร์ชันที่สำคัญที่ทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อการติดเชื่อระหว่าง HA และ ตัวรับทั้ง 2 แบบ

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่า การยึดจับของ HA และตัวรับมีความจำเพาะค่อนข้างสูง ซึ่งโปรตีน HA ของเชื้อไวรัสในมนุษย์ (H1) จะชอบจับกับตัวรับแบบ S26G ในขณะที่โปรตีน HA ของเชื้อไวรัสในสัตว์ปีก (H5) จะชอบจับกับตัวรับแบบ S23G ดังนั้นเพื่อเข้าใจถึงความจำเพาะเจาะจงของตัวรับที่มีต่อการยึดจับกับฮีแมกกลูตินิน จึงได้ศึกษามุมทอร์ชันที่มีการเชื่อมต่อกันของ กรดไขมันแอลิก กับ น้ำตาลกาแลคโตส ทั้งระบบ S23G และ S26G (นิยามมุมดูได้จากรูปที่ 1) ที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนอยู่กับ HA สายพันธุ์ H1 ดังแสดงในรูปที่ 5 จากการคำนวณพบว่ามุมทอร์ชันของระบบ Human(H1)-S26G จะเกิด 1 พิค (เส้นสีเทา) ที่มุม 312.5 องศา (ดังรูปที่ 5B) เมื่อพล็อตระหว่างมุมทอร์ชันที่เปลี่ยนไปเทียบกับเวลาที่ทำการจำลอง 12 ns ดังรูปที่ 5A (เส้นสีเทา) พบว่าตั้งแต่ 0 ns ถึง 12 ns ไม่มีการบิดไปมาของมุมทอร์ชันเลย แสดงให้เห็นว่าการบิดมุมทอร์ชันของตัวรับแบบ S26G มีลักษณะเป็น cis conformation ที่จำเพาะเจาะจงกับ HA สายพันธุ์ H1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา [3] ส่วนระบบ Human(H1)-S23G จะเกิด 2 พิคโดยมีการบิดของมุมทอร์ชันที่ 187.5 องศา กับ 257.5 องศา ดังรูปที่ 5B (เส้นสีดำ) ซึ่งการบิดที่มุม 257.5 องศา มากกว่า เมื่อมุมทอร์ชันที่เปลี่ยนไปเทียบกับเวลา ดังรูปที่ 5A (เส้นสีดำ) จะเห็นว่าเมื่อเวลา 2.5 ns มุม S23G จะมีการบิดไปที่มุม 257.5 องศา แสดงว่าระบบ Human(H1)-H23G จะมี conformation ในช่วงแรกเป็น trans เมื่อเวลาการทำซิมูเลชันผ่านไปพบว่า ตัวรับแบบ S23G พยายามปรับตัว โดยเกิดพิคที่กึ่งกลางระหว่าง tran conformation กับ cis conformation จากผลการคำนวณที่ได้นี้สามารถอธิบายได้ว่าตัวรับแบบ S23G ไม่เหมาะสมกับสิ่งแควดล้อมหรือบริเวณยึดจับ (binding pocket) ของ HA สายพันธุ์ H1 เมื่อนำตัวรับแบบ S23G มายึดจับกับ HA สายพันธุ์ H1 ก็พยายามปรับตัวเพื่อให้เกิดการยึดจับที่ดียิ่งขึ้นจนเกิดเป็น 2 conformation ดังผลการคำนวณ

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556



รูปที่ 5 มุมทอร์ชันที่สำคัญที่ทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อการติดเชืาระหว่าง HA และ ตัวรับแบบ S23G และแบบ S26G ที่เปลี่ยนไปเทียบกับเวลา 12 ns (A) และ การกระจายของมุมทอร์ชัน (B)



รูปที่ 6 % Hydrogen bond occupation ระหว่างกรดอะมิโนของเฮนไซม์ HA สายพันธุ์ H1 กับตัวรับที่ประกอบด้วย 5 โมเลกุลคือ SIA1-GAL2-NAG3-GAL4-GLC5

3.4 พลังงานในการยึดจับ (Binding energy) ระหว่าง ฮีแมกกลูตินินกับตัวรับบนผิวเซลล์ทั้งสองระบบ

ข้อมูลทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่นิยมใช้ในการบอกอันตรกิริยา (interaction) คือพลังงานเสรีของการยึดจับ (binding energy) โดยจะศึกษาอันตรกิริยาระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับที่เป็นแบบ S23G และ S26G ในการคำนวณพลังงาน จะใช้วิธี MM-PBSA และใช้ snapshot ในช่วง 2.5 ns – 12 ns เก็บมาจำนวน 100 snapshots เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งถ้าค่า binding free energy ระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับบนผิวเซลล์มีค่าเป็นลบแสดงว่า ฮีแมกกลูตินินสามารถเข้าไปยึดจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้ดีและมีความเสถียร ส่วนค่า binding free energy ถ้ามีค่าเป็นบวกแสดงว่าฮีแมกกลูตินินไม่สามารถเข้าไปยึดจับกับตัวรับได้ซึ่ง ผลการคำนวณค่า binding energy ระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับจะแสดงในตารางที่ 1 พบว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับบนสามารถยึดจับกันได้ดีและมีความเสถียรเนื่องจากมีค่าเป็นลบทั้ง 2 ระบบ ส่วนที่เป็น human(H1)-S26G จะมีพลังงานที่ต่ำกว่าระบบ human(H1)-S23G มีค่าพลังงานการยึดจับเท่ากับ -224.54 kcal/mol และ -162.20 kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับบนผิวเซลล์แบบ S26G แข็งแรงกว่า S23G [3] ซึ่งพลังงานที่คำนวณได้ก็สอดคล้องกับผลของทอร์ชันและผลของพันธะไฮโดรเจนระหว่าง HA และ ตัวรับ S23G และ S26G เป็นการยืนยันข้อมูลที่กล่าวไว้ว่าโปรตีน HA ของเชื้อไวรัสในมนุษย์ (H1) จะชอบจับกับตัวรับแบบ S26G มากกว่าตัวรับแบบ S23G

ตารางที่ 1 ค่าพลังงานการยึดจับ (Binding energy) ระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับบนผิวเซลล์ทั้งสองระบบ

	Human(H1)-S23G	Human(H1)-S26G
$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	-162.20 ±24.15	-224.54 ±21.98

4. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในระดับโมเลกุล เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและพลังงานยึดจับระหว่างเอนไซม์ HA ของเชื้อไวรัสที่ได้จากคนสายพันธุ์ H1N1 ที่ระบาดในปี 2009 (huH1/2009H1N1) กับตัวรับที่เป็นแบบ S23G และ S26G ด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน จากการคำนวณพบว่ามุมทอร์ชันของระบบ Human(H1)-S26G จะเกิด 1 conformation ที่มุม 312.5 องศา ซึ่งเป็น cis conformation ในขณะที่ระบบ Human(H1)-S23G จะเกิด 2 conformation ที่มุม 187.5 องศา กับ 257.5 องศา โดยในช่วงแรกเป็น conformation เป็นแบบ trans เมื่อเวลาการทำซิมูเลชันผ่านไปพบว่าตัวรับแบบ S23G พยายามปรับตัวโดยเกิดพิคที่กึ่งกลางระหว่าง tran conformation กับ cis conformation แสดงว่า เมื่อนำตัวรับแบบ S23G มายึดจับกับ HA สายพันธุ์ H1 ก็พยายามปรับตัวเพื่อให้จำเพาะกับ HA สายพันธุ์ H1 มากขึ้น ผลของพันธะไฮโดรเจนของระบบ Human(H1)-S23G จะเกิดน้อยกว่าของระบบ Human(H1)-S26G พันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล SIA ของระบบ Human(H1)-S23G กับกรดอะมิโน K142 และ G225 ของเอนไซม์ HA หายไป เมื่อเทียบกับระบบ Human(H1)-S26G ซึ่ง จะส่งผลโดยตรงต่อกับบิดมุมทอร์ชันของระบบ Human(H1)-S23G รวมถึงพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุล GAL ของระบบ Human(H1)-S23G กับกรดอะมิโนตำแหน่งคือ D222 ของเอนไซม์ HA หายไป ในขณะที่ระบบ Human(H1)-S26G พันธะไฮโดรเจนนี้เกิดถึง 6 พันธะ ค่า binding energy ของ human(H1)-S26G จะมีพลังงานที่ต่ำกว่าระบบ human(H1)-S23G ซึ่ง

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

แสดงให้เห็นว่าการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับแบบ S26G แข็งแรงกว่า S23G ซึ่งพลังงานที่คำนวณได้ก็สอดคล้องกับผลของทอร์ชันและผลของพันธะไฮโดรเจน เป็นการยืนยันข้อมูลที่ว่าโปรตีน HA ของเชื้อไวรัสในมนุษย์ (H1) จะชอบจับกับตัวรับแบบ S26G มากกว่าตัวรับแบบ S23G

5. คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2554 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. **Nat. Rev. Microbiol.** (3), 591-600.
- [2] Steinhauser, D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. **Virology.** (258), 1-20.
- [3] Priyadarzini, R.K.T., Selvin, F.A.J., Gromiha, M., Fukui, K., and Veluraja, K. (2012). Theoretical Investigation on the Binding Specificity of Sialydisaccharides with Hemagglutinins of Influenza A Virus by Molecular Dynamics Simulations. **J. Biol. Chem.** (287), 34547-34557.
- [4] Nunthaboot, N., Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Kaiyawet, N., Decha, P., Sompornpisut, P., Poovorawan, Y., and Hannongbua, S. (2010). Evolution of human receptor binding affinity of H1N1 hemagglutinins from 1918 to 2009 pandemic influenza A virus. **J. Chem. Inf. Model.** (50), 1410-1417.
- [5] Nunthaboot, N., Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Decha, P., Kaiyawet, N., Inthartheep, P., Sompornpisut, P., Poovorawan, Y., and Hannongbua, S. (2010). Molecular insights into receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin. **Monatsh. Chem.** (141), 801-807.