SARS-CoV-2与受体ACE2独特的相互作用与结合/解离过程

刘深鑫, 张博, 刘迎春, 王琦*

浙江大学化学系, 杭州 310027

*通讯作者, E-mail: qiwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2021-12-15; 接受日期: 2022-02-17; 网络版发表日期: 2022-04-12

国家自然科学基金(编号: 21673206)资助项目

摘要 2019年12月由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染导致的肺炎(COVID-19)疫情大规模爆发, 并于2020年3月被世界卫生组织宣布为全球大流行。其显著的传染性和致死率对全人类的生命安全构成了巨大的威胁, 迫切需要从分子层面上了解并掌握病毒的感染/传播行为。新冠病毒和2003年爆发的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(SARS-CoV)同属于蝙蝠SARS样冠状病毒(SARSr-CoV)物种, 其表面刺突糖蛋白具有高度的同源性, 它们侵入人体细胞的关键步骤同为表面刺突蛋白的受体结合域(RBD)部分和血管紧张素转化酶2 (ACE2)的结合, 许多实验工作报道了SARS-CoV-2拥有比SARS-CoV更强的结合能力。为了进一步诠释实验结果, 本工作对这两种病毒的野生型RBD (RBD_{WT})和ACE2的结合进行了分子动力学模拟、拉伸分子动力学模拟和伞状取样, 结果表明, β -loop区的不同行为导致关键结合残基和相互作用的不同, 并进一步导致结合/解离机制的不同, SARS-CoV-2-RBD和ACE2的结合亲和力是SARS-CoV-RBD的约30倍。

关键词 SARS-CoV-2, SARS-CoV, 拉伸分子动力学, 伞状取样, 关键结合残基, 结合自由能

1 引言

2019年12月由新型冠状病毒(SARS-CoV-2, 以下部分简称为SARS-2)感染导致的肺炎(COVID-19)疫情大规模爆发后, 迅速在全世界范围内广泛传播, 引发了一起严重的全球性公共卫生突发事件^[1-3]。与2003年具有10%高致死率的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒即非典病毒(SARS-CoV, 以下部分简称为SARS)相似, 感染SARS-CoV-2的患者也会出现从轻微发热、干咳、头痛到严重的多器官衰竭、呼吸道疾病和

肺炎等一系列症状^[3]。截至2021年12月10日, SARS-CoV-2在全球已经感染了2亿6700多万人, 导致520多万人死亡, 平均致死率约为2% (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>)。

两种冠状病毒的共性也表现在对人体的感染途径上, 这是因为冠状病毒包膜表面的刺突糖蛋白(S蛋白)在病毒侵入靶细胞过程中与作为受体的血管紧张素转化酶2 (ACE2)的结合发挥了重要作用^[4]。S蛋白是三个单体蛋白组成的同源三聚体, 每个单体蛋白由被切割

引用格式: Liu S, Zhang B, Liu Y, Wang Q. The unique interactions and binding/unbinding process between SARS-CoV-2 and receptor ACE2. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 721-730, doi: [10.1360/SSC-2021-0249](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0249)

的S1亚基和S2亚基形成非共价结合^[5,6]。先前的低温电子显微镜研究表明, 具有受体结合区(RBD)的远端S1亚基与细胞受体ACE2的结合将S2亚基锚定在细胞膜上, 随后酶催化S蛋白在S2'位点进一步裂解导致S1脱落, 激活S2从融合前体的亚稳定态经历不可逆结构重排转变为稳定态并和细胞膜融合, 最终导致病毒进入靶细胞^[5-9]。所以, RBD与ACE2的受体识别与结合是冠状病毒侵入靶细胞的第一步也是最关键一步, 决定了病毒的传染性、发病机制和宿主范围^[10]。Walls等^[11]和Tian等^[12]的体外结合实验发现, 两种S蛋白的RBD与ACE2的结合亲和力都保持在低nmol L⁻¹范围内, 表明RBD是冠状病毒中的关键功能结构域。

SARS-CoV-2和SARS-CoV之间在用于冠状病毒物种分类的ORF1ab中7个保守复制酶结构域内的氨基酸序列具有94.4%的相同性, 表明这两种病毒同属于蝙蝠SARS样冠状病毒(SARSr-CoV)物种, 其表面刺突糖蛋白具有高度的同源性^[13], 但是包括学界等社会各界普遍认为SARS-CoV-2具有更强的传染性。Lan等^[14]通过体外结合实验在相同的实验条件下测得SARS-CoV-2和SARS-CoV的RBD与ACE2的解离平衡常数 K_D 分别为4.7和31.6 nmol L⁻¹, 近似可得SARS-CoV-2-RBD与ACE2的结合亲和力是SARS-CoV-RBD的6.8倍; Walls等^[9]、Wang等^[15]和Shang等^[10]也进行了亲和力对比, 他们的结果分别是4.2、3.1和4.2倍; Wrapp等^[6]和Lei等^[16]的对比结果则是22.2和15.8倍, 他们的差距可能来源于实验方法的不同。这些结果符合SARS-CoV-2导致更多病例的事实, 一定程度上解释了其为什么更具有传染性。

除了实验和临床研究的巨大进展外, 还有一些分子模拟(MD)工作也从微观角度上研究了RBD和ACE2之间的相互作用。蛋白质间的相互作用可通过结合/解离自由能来评价, 计算自由能的常见方法有自由能微扰(FEP)、热力学积分(TI)、分子力学/泊松-玻尔兹曼(广义玻恩)表面积(MM/PB(GB)SA)和伞状取样等^[17]。FEP和TI方法适用于差别较小的体系间的自由能计算, 不适用于大分子结合/解离这种构象变化巨大的过程^[18,19]。MM/PB(GB)SA是计算结合自由能方面最快速且常用的方法, 缺点是在熵效应和去溶剂化自由能的计算等方面存在限制, 导致其应用于高电荷体系的大分子体系时精度可能会很差^[20,21], 一些工作甚至得出SARS-CoV-2和ACE2的结合亲和力比SARS-CoV

低^[22,23]的结论, 这与当前主流研究结果相悖。伞状取样方法使用偏置的谐振势强制增加高自由能区域内体系的取样, 根据得到的概率密度分布来求解自由能, 可以得到自由能数据随反应坐标的变化趋势, 精确度非常高, 被广泛用于研究DNA、RNA和蛋白质等大分子的构象变化和相互作用^[17]。目前关于伞状取样用于对比计算SARS-CoV(-2)-RBD和ACE2的结合自由能的工作较少, 因此在本工作中将通过拉伸分子动力学(SMD)模拟两种野生型RBD和ACE2结合的体系及其解离过程, 应用伞状取样方法计算RBD和ACE2的结合自由能, 研究两者相互作用和结合/解离过程及差异, 解释SARS-CoV-2传染性更强的原因。

2 模拟体系与方法

本工作模拟的两个蛋白质复合体系分别是SARS-CoV-2-RBD/ACE2和SARS-CoV-RBD/ACE2, 两种RBD均为野生型, 它们的初始结构信息来自于RCSB蛋白质数据库(Protein Data Bank), PDB编号分别是6M0J^[14]和6ACK^[7], 如图1所示。所有体系的模拟均使用Gromacs 5.0软件^[24]和Amberff99SB-ILDN力场^[25], 模拟轨迹和构象的可视化使用VMD软件^[26]实现。模拟的时间步长为2 fs, 使用LINCS约束算法来约束所有涉及氢原子的键, 使用三维周期性边界条件并设置盒子边界到复合物的最小距离大于1 nm, 使用粒子网格Ewald (PME)方法计算长程静电相互作用, 使用12-6 Lennard-Jones势能函数来描述非键原子之间的范德华相互作用。

对SARS-2-RBD/ACE2和SARS-RBD/ACE2两个复合物体系分别进行MD模拟。两个复合物体系在分别用乙酰基(ACE)和甲氨基(NME)对N端和C端进行封端后, 用SPC水模型溶剂化, 并用氯化钠中和。首先用最陡下降算法将体系能量最小化至收敛, 然后先后在NVT和NPT系综下预平衡0.1和1 ns, 预平衡中对蛋白质的重原子施加1000 kJ mol⁻¹ nm⁻²的约束以防止结构发生错误漂移。最后进行时长100 ns的分子动力学模拟, 对于成品的MD模拟(包括之后的SMD模拟和伞状取样MD模拟)均通过Nose-Hoover方法在310 K下分别对ACE2、RBD和溶剂三者进行温度耦合、Parrinello-Rahman方法在1 bar (100 kPa)下进行压力耦合, 温度和压力耦合常数分别为0.5和1 ps, 范德华作用和静电作

图 1 SARS-CoV-2-RBD/ACE2复合物(PDB ID: 6M0J) (a)和 SARS-CoV-RBD/ACE2复合物(PDB ID: 6ACK) (b)的晶体结构(网络版彩图)

Figure 1 Crystal structures of SARS-CoV-2-RBD/ACE2 complex (PDB ID: 6M0J) (a) and SARS-CoV-RBD/ACE2 complex (PDB ID: 6ACK) (b) (color online).

用的截断距离都设置为1.4 nm, 并对ACE2离结合区较远(与RBD的距离大于2 nm)一侧的15条 α 螺旋的首个 α -C原子进行1000 kJ mol⁻¹ nm⁻²的约束。

通过SMD模拟SARS-2-RBD/ACE2和SARS-RBD/ACE2两个复合物体系的解离过程, 将前一步MD模拟中的稳定构象作为SMD的初始构象。将ACE2质心到RBD质心的向量对齐盒子的z轴并在z方向上加长5 nm用于后续拉伸, 同样用SPC水溶剂化和氯化钠中和, 同样进行能量最小化和预平衡后进行时长50 ns的SMD模拟。SMD模拟中, 同样限制ACE2离结合区较远一侧的15个 α -C原子, 对RBD进行整体拉伸, 拉伸方向为RBD/ACE2质心所在的z方向, 弹簧劲度系数为1000 kJ mol⁻¹ nm⁻², 拉伸速率为0.1 nm ns⁻¹, 即预计在50 ns时间内拉伸5 nm。

利用伞状取样计算SARS-2-RBD/ACE2和SARS-RBD/ACE2两个复合物体系结合/解离过程中沿拉伸方向(z方向)的平均力势(potential of mean force, PMF), 一维反应坐标的PMF即自由能曲线。以RBD/ACE2质心间在z方向上的距离为反应坐标, 以0.1 nm为间隔从4.6到9.4 nm之间取46个窗口, 再额外从结合最紧密的区域取7个窗口。每个窗口进行预平衡后作为初始构象分别进行20 ns的MD, 步骤与SMD中整体相同, 唯一不同在于将拉伸速率改为0, 目的是为了让RBD被限制在定义好的窗口之中。得到的所有窗口的分布数

据用于伞状取样, 通过加权直方图方法(WHAM)工具进行处理^[27]。

3 结果与讨论

3.1 两种RBD和ACE2的相互作用

分别对两个RBD/ACE2的结合体系进行了100 ns的MD模拟并对相互作用进行了分析, 如图2所示。图2a展示了两RBD和ACE2的相互作用, 其中SARS-2-RBD和ACE2的静电相互作用能和范德华相互作用能分别为-570.7 (± 69.4)和-333.5 (± 23.0) kJ mol⁻¹, 而对于SARS-RBD和ACE2则为-479.4 (± 90.9)和-315.6 (± 34.1) kJ mol⁻¹, 可以发现RBD和ACE2的结合是由静电作用驱动的, 而SARS-2-RBD和ACE2的静电作用又要强于SARS-RBD (差距约-91.3 kJ mol⁻¹), 这支撑了SARS-2-RBD/ACE2结合能力更强的事实。以-10 kJ mol⁻¹为标准对RBD整体的静电作用进行能量分解, 得到了图2b中的关键结合残基(以下简称关键残基)及其静电作用, 它们的分布如图2c所示。可以发现SARS-2-RBD和SARS-RBD分别有13和12个关键残基, 其中Lys417和Arg426这两个碱性残基分别和ACE2具有最强的静电相互作用(-148.6 (± 38.9)和-155.8 (± 49.1) kJ mol⁻¹), 这是因为ACE2的酸性残基Asp30/Glu329分别和Lys417/Arg426形成了氢键和盐桥相互作用。

将SARS-2-RBD (Thr333-Gly526, 194)与SARS-RBD (Cys323-Gly512, 190)的残基序列进行对比发现190个叠合残基里突变49个、增加1个; 而大部分突变和增加(35个和1个)发生在RBM区域, 如图2d所示, 黑色实线框表示保守残基, 红色实线框表示RBM区域。RBM区域位于RBD的 $\beta 4$ 与 $\beta 9$ 片层之间(SARS-2-RBM: Ser438-Gln506, 69; SARS-RBM: Thr425-Gln492, 68), 是大部分关键残基所在的区域, 在和ACE2的结合中起主要作用^[9,10,14], 可以发现SARS-2-RBD除了Lys417以外的其他12个关键残基以及SARS-RBD的所有12个关键残基全部位于RBM区域。在RBM如此重要的结合区内却有近一半残基发生了突变, 这或许是两种RBD和ACE2相互作用存在差异的原因。SARS-2-RBD/SARS-RBD的这些关键残基中, 有6对具有相同位点和相同残基(Tyr449/Tyr436、Leu492/Leu478、Gly496/Gly482、Thr500/Thr486、Gly502/Gly488、Tyr505/Tyr491), 2对具有相同位点和相近生理性质残基(Gln493/Asn479、

图 2 两种RBD/ACE2间的总相互作用能(a)和关键残基上的静电相互作用能(b)。两种RBD/ACE2结合界面关键残基的分布(c)以及两种RBD部分残基序列的叠合(d)。SARS-CoV-2-RBD和SARS-CoV-RBD中的关键残基分别用红色点和淡蓝色点表示(网络版彩图)

Figure 2 (a) Total interaction energy between RBDs and ACE2 and (b) Coulomb interaction energy on key residues. (c) Distribution of the key residues at two RBD/ACE2 binding interfaces and (d) partial residue sequence alignment of RBDs. Key residues in SARS-CoV-2-RBD and SARS-CoV-RBD are indicated by red dots and light blue dots, respectively (color online).

Asn501/Thr487, 侧链都具有亲水性基团), 一对具有不同位点但均作为碱性残基与ACE2有接近的相互作用(Lys417/Arg426), 这些接触位点与之前的研究和预测相符合^[14], 对于两者其余的特有残基, SARS-RBD的全部3个关键残基(Trp476、Asp480、Tyr481)均位于其他关键残基附近(Leu478~Tyr491), SARS-2-RBD也有1个关键残基(Gln498)被其他关键残基所包围(Leu492~Tyr505), 这些残基密集分布在两种RBD的相同结构域中, 可以认为它们的作用被平均化了, 这块结构域作为一个整体具有相近的功能; 如图2b~d中红色虚线框所示, SARS-2-RBD最后的3个特有关键残基(Ala475、Glu484、Asn487)位于远离其他残基的 β 6与 β 7片层及之间的loop区(Tyr473~Tyr489, 17, 取名为 β -loop区), 这3个残基和ACE2的静电相互作用能之和约为 $-89.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, 与SARS-2-RBD/SARS-RBD和

ACE2的静电相互作用能之差接近(约 $-91.3 \text{ kJ mol}^{-1}$), 而SARS-RBD在其 β -loop区(Phe460~Tyr475, 16)内和ACE2没有显著相互作用。

与SARS-RBD β -loop区内的16个残基叠合比较, SARS-2-RBD的残基发生突变11个、增加1个, 几乎完全改变的残基序列使结构出现差异, SARS-RBD在这片区域只有loop区而SARS-2-RBD出现了 β 6与 β 7片层, 如图2c, d所示。这可以归因为Tyr473/Phe460和Gln474/Ser461位点变化导致的侧链基团亲水性的变化, 尤其是苯丙氨酸到酪氨酸的变化促进了二级结构的稳定^[28], 另一方面, 碱性的关键残基对Lys417/Arg426均和ACE2的酸性残基形成了氢键和盐桥, 可观的静电相互作用和稳定的结合使其具有锚定邻近原子结构的作用, 但Lys417与 β -loop区的空间距离比Arg426与 β -loop区近了很多, 在一定程度上限制了SARS-2-RBD的 β -

loop区的柔性^[29,30].

本文计算了两种RBD骨架原子到各自初始构象的均方根偏差(RMSD)和均方根涨落(RMSF), 如图3所示. 纵向对比图3a~c中的RMSD可以看到两种RBD的 β -loop区的偏差均比RBD和RBM区整体更大, 说明 β -loop区结构的变化比其他区域更大; 横向对比发现SARS-2的RBD、RBM尤其是 β -loop区的偏差均比SARS更小, 说明SARS-2-RBD整体结构更为稳定. 为方便显示, 图3d中的RMSF将SARS-2-RBD的残基序列叠合到SARS-RBD之上, 进一步说明了两种RBD β -loop区的局部柔性和SARS-2-RBD的整体稳定性. β -loop区作为突出于RBD表面的一块区域本来就相对柔性, 而二级结构的变化进一步加大了柔性的差异, 使得这片区域成为SARS-2-RBD相比SARS-RBD和ACE2结合的最大独特之处, 预计将在结合/解离过程中发挥重要作用.

3.2 两种RBD和ACE2的结合/解离过程

本文分别对两个稳定结合的RBD/ACE2体系以

0.1 nm ns⁻¹的拉伸速度沿质心方向(z 方向)进行50 ns的SMD模拟, 图4展示了拉伸过程中RBD/ACE2间质心在 z 方向上的距离和弹簧所受拉力的变化. 图4a中对角线表示虚拟弹簧点和ACE2质心间的 z 距离, 所以线条和对角线的差值就是虚拟弹簧点和RBD质心间的 z 距离即弹簧的伸缩距离, 对应于图4b中弹簧所受到的拉力. 把SARS-2-RBD和ACE2拉开所需的最大拉力($F_{\max}$)比SARS-RBD更大(约548.6和473.1 pN), 说明SARS-2-RBD与ACE2的亲合性更高; 如果将弹簧所受拉力对拉伸距离做积分就可以得到弹簧把RBD拉开所作的功(W_{neq}). 两种RBD分别在253.0和236.8 kJ mol⁻¹左右, 由于这个功是非平衡过程的功所以不能直接等价于RBD和ACE2的结合能, 但16.2 kJ mol⁻¹的差值仍然能说明SARS-2-RBD与ACE2的结合强度要高于SARS-RBD^[31,32].

图5a将质心拉伸过程中ACE2分别与SARS-2-RBD和其13个关键残基间的静电相互作用的变化进行比较, 结果表明SARS-2-RBD的13个关键残基基本上可以代表其与ACE2的相互作用, 在结合/解离过程

图3 SARS-CoV-2和SARS-CoV的RBD (a)、RBM (b)和 β -loop (c)区的RMSD; (d) SARS-CoV-2-RBD和SARS-CoV-RBD的RMSF (网络版彩图)

Figure 3 RMSD of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in RBD (a), RBM (b) and β -loop (c) area. (d) RMSF of SARS-CoV-2-RBD and SARS-CoV-RBD (color online).

图4 SMD模拟中RBD/ACE2质心间z距离(a)和虚拟弹簧受到拉力(b)的变化(网络版彩图)

Figure 4 Change of z-distance between the center of mass (COM) of RBD/ACE2 (a) and tension of the virtual spring (b) in SMD simulations (color online).

图5 SMD模拟中SARS-CoV-2-RBD/ACE2间(a)和SARS-CoV-RBD/ACE2间(b, c, d)静电相互作用能的变化(网络版彩图)

Figure 5 Change of Coulombic interaction energy between SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a) and SARS-CoV-RBD/ACE2 (b, c, d) in SMD simulations (color online).

中发挥主要作用, 其他部分的参与微弱; 但是SARS-RBD的12个残基则不能完全代表其与ACE2的作用, 因为在质心拉伸的15~25 ns中, RBD的静电作用出现了最大有近 -200 kJ mol^{-1} 的降低, 而12个残基的静电相互作用总和在15 ns前已经归零, 如图5b所示, 这说明有其他残基在结合/解离过程中发挥了作用. 仍然以 -10 kJ mol^{-1} 为标准对SMD中SARS-RBD整体的静电

作用进行能量分解, 可以得到额外的6个残基 Asp463、Lys465、Leu472、Asn473、Cys474和 Tyr475, 它们和ACE2的静电相互作用总和十分吻合RBD的波谷, 如图5c所示; 将这6个残基和12个关键残基的静电相互作用相加得到图5d, 此时就可以代表全拉伸过程中SARS-RBD和ACE2的相互作用. 值得注意的是, SARS-RBD额外的6个残基全部位于 β -loop区

图 6 SMD模拟中SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a)和SARS-CoV-RBD/ACE2 (b)构象的变化(网络版彩图)

Figure 6 Conformational changes of SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a) and SARS-CoV-RBD/ACE2 (b) in SMD simulations (color online).

(Phe460-Tyr475), 说明这部分虽然在之前的MD中始终没有显示出和ACE2显著的相互作用, 却在SMD拉伸的后半段和ACE2发生了结合与解离。

通过图6a, b的截图可以进一步证实 β -loop区在解离过程中的不同行为。拉伸过程中RBD和ACE2结合界面的作用残基就像拉链一样按从下部到上部的顺序被逐渐拉开, 然后会在RBD的相对柔性的 β -loop区出现较长时间的黏连并最终被拉开。这里从下到上的方向就是沿着ACE2表面的 α 1螺旋从C端到N端的方向, 上部残基即 β -loop区的接触残基, 而其他接触残基统称为下部残基。不同之处在于, SARS-2-RBD上部的 β -loop区始终和ACE2保持相互作用并在下部残基全部脱离之后再被拉开; 而SARS-RBD上部的 β -loop区起初和ACE2没有接触, 在下部逐渐被拉开的过程中由于RBD构象变化反而出现了和ACE2的相互作用, 经历了一个接触残基由下部到上部的替换过程后才最终被拉开, 如图7所示。考虑到蛋白质中柔性较大的区域和配体往往会有更大概率接触和更长时间的停留, 通常在蛋白质-配体的解离过程中最后脱附、结合过程中最先吸附^[33,34], 所以我们认为在RBD和ACE2的结合过程中 β -loop区因其更大的柔性会率先和ACE2接触, 要达到稳定的结合构象就势必要经历与解离过程相反的步骤, 对于SARS-RBD有一个接触残基从上部 β -loop

图 7 SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a)和SARS-CoV-RBD/ACE2 (b)结合/解离过程的示意图(网络版彩图)

Figure 7 Diagram of SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a) and SARS-CoV-RBD/ACE2 (b) binding/unbinding process (color online).

区到下部的转换, 而对于SARS-2-RBD就是一个下部接触残基单纯增多的过程, 如图7中反方向所示。

本文最后对两种RBD-ACE2复合物的解离过程进行了伞状取样并计算了其PMF曲线, 如图8所示, 反应坐标是RBD与ACE2质心间在 z 方向上的距离。由此得到SARS-2-RBD/ACE2和SARS-RBD/ACE2的结合自由能分别是 -110.0 ± 4.0 和 $-101.2 \pm 5.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ 。两者之差($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$)为 8.8 kJ mol^{-1} , 根据 $\Delta G_{\text{bind}} = -RT \ln K_A$ 的关系式换算可得, 前者与ACE2的结合平衡常数(K_A)是后者的30.4倍, 即SARS-2-RBD与ACE2的结合能力是SARS-RBD的30.4倍, 这和Wrapp等^[6]和Lei等^[16]的结果非常接近, 他们在体外结合的实验中分别得到了

图8 SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a)和SARS-CoV-RBD/ACE2 (b)解离过程的PMF与反应坐标的函数

Figure 8 PMFs as a function of the reaction coordinate for unbinding process of SARS-CoV-2-RBD/ACE2 (a) and SARS-CoV-RBD/ACE2 (b).

22.2倍和15.8倍的亲和力差别, 换算成结合自由能差 $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ 分别是8.0和7.1 kJ mol^{-1} 。值得说明的是, 1~2 kJ mol^{-1} 的结合自由能差应在计算的误差范围之内, 这里的指数关系放大了这种差别^[32]。

4 结论

本文使用MD、SMD模拟和伞状取样分别研究了SARS-2-RBD/ACE2和SARS-RBD/ACE2间的相互作用和结合/解离过程及其差异, 为解释SARS-CoV-2的高传染性提供了有力的依据。研究发现, RBD和ACE2的结合是由静电相互作用驱动的, SARS-2-RBD和SARS-RBD相互作用的差异来源于残基序列突变导致的接触残基不同, 并且通过能量分解找到了在结合中起主要作用的关键残基。SARS-RBD十分柔性的 β -loop区虽然在解离过程中保持长时间的黏连, 但进入

稳定结合状态时也因此不能和ACE2有显著相互作用。与SARS-RBD相比, SARS-2-RBD的 β -loop区由于残基序列的变化产生了二级结构上的差异, β 片层支撑了 β -loop区的构象的稳定性, 使其提供了与ACE2接触的额外的关键残基和更强的相互作用, 在解离过程中同样保持了长时间的黏连状态。

不同相互作用和结合/解离方式的出现表明了 β -loop区在RBD中的重要性, 而SMD和伞状取样的结果展示了这种差异对RBD/ACE2结合强度的影响。本文中计算得到的SARS-2-RBD/ACE2和SARS-RBD/ACE2的结合自由能分别为约-110.0和-101.2 kJ mol^{-1} , 存在约30倍的亲和性差异, 与实验结果基本一致, 充分解释了SARS-CoV-2具有高传染性的原因。此外, 关键残基的识别和特殊 β -loop区的发现也为抗体开发和药物设计提供了新的思路, 对各种变异毒株的研究值得更具有针对性的深入。

致谢 感谢中国科学院超级计算环境ScGrid (<http://www.cngrid.org>)的支持。

参考文献

- 1 Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. *N Engl J Med*, 2020, 382: 727-733
- 2 Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. *Nature*, 2020, 579: 265-269
- 3 Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. *Lancet*, 2020, 395: 497-506
- 4 Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. *Nature*, 2003, 426: 450-454

- 5 Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, Wang X. *Cell Res*, 2017, 27: 119–129
- 6 Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. *Science*, 2020, 367: 1260–1263
- 7 Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1007236
- 8 Kirchdoerfer RN, Wang N, Pallesen J, Wrapp D, Turner HL, Cottrell CA, Corbett KS, Graham BS, McLellan JS, Ward AB. *Sci Rep*, 2018, 8: 15701
- 9 Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. *Cell*, 2020, 181: 281–292.e6
- 10 Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. *Nature*, 2020, 581: 221–224
- 11 Walls AC, Xiong X, Park YJ, Tortorici MA, Snijder J, Quispe J, Cameron E, Gopal R, Dai M, Lanzavecchia A, Zambon M, Rey FA, Corti D, Velesler D. *Cell*, 2019, 176: 1026–1039.e15
- 12 Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, Lu L, Jiang S, Yang Z, Wu Y, Ying T. *Emerg Microb Infects*, 2020, 9: 382–385
- 13 Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. *Nature*, 2020, 579: 270–273
- 14 Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. *Nature*, 2020, 581: 215–220
- 15 Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen KY, Wang Q, Zhou H, Yan J, Qi J. *Cell*, 2020, 181: 894–904.e9
- 16 Lei C, Qian K, Li T, Zhang S, Fu W, Ding M, Hu S. *Nat Commun*, 2020, 11: 1–5
- 17 Chen HC, Fu HH, Shao XG, Cai W. *Prog Chem*, 2018, 30: 921–931 (in Chinese) [陈洪川, 付浩浩, 邵学广, 蔡文生. 化学进展, 2018, 30: 921–931]
- 18 Wang J, Deng Y, Roux B. *Biophys J*, 2006, 91: 2798–2814
- 19 Steinbrecher T, Hrenn A, Dormann KL, Merfort I, Labahn A. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 2385–2390
- 20 Rastelli G, Del Rio A, Degliesposti G, Sgobba M. *J Comput Chem*, 2010, 31: 797–810
- 21 Xue W, Liu H, Yao X. *PLoS ONE*, 2014, 9: e90799
- 22 Wang J, Xu X, Zhou X, Chen P, Liang H, Li X, Zhong W, Hao P. *J Gen Virol*, 2020, 101: 921–924
- 23 Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, Zhong W, Hao P. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 457–460
- 24 Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. *SoftwareX*, 2015, 1-2: 19–25
- 25 Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE. *Proteins*, 2010, 78: 1950–1958
- 26 Humphrey W, Dalke A, Schulten K. *J Mol Graphics*, 1996, 14: 33–38
- 27 Hub JS, de Groot BL, van der Spoel D. *J Chem Theor Comput*, 2010, 6: 3713–3720
- 28 Shen HC, Ding JY, Li L, Liu FF. *Acta Physico-Chim Sin*, 2016, 32: 2620–2627 [(in Chinese) [沈洪辰, 丁吉勇, 李丽, 刘夫锋. 物理化学学报, 2016, 32: 2620–2627]]
- 29 Makhatazde GI, Loladze VV, Ermolenko DN, Chen XF, Thomas ST. *J Mol Biol*, 2003, 327: 1135–1148
- 30 Missimer JH, Steinmetz MO, Baron R, Winkler FK, Kammerer RA, Daura X, van Gunsteren WF. *Protein Sci*, 2007, 16: 1349–1359
- 31 Mai BK, Li MS. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410: 688–691
- 32 Nguyen HL, Lan PD, Thai NQ, Nissley DA, O'Brien EP, Li MS. *J Phys Chem B*, 2020, 124: 7336–7347
- 33 Teilum K, Olsen JG, Kragelund BB. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 2231–2247
- 34 Nunes-Alves A, Ormersbach F, Wade RC. *J Chem Inf Model*, 2021, 61: 3708–3721

The unique interactions and binding/unbinding process between SARS-CoV-2 and receptor ACE2

Shenxin Liu, Bo Zhang, Yingchun Liu, Qi Wang^{*}

Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

**Corresponding author (email: qiawang@zju.edu.cn)*

Abstract: After the first large-scale outbreak of pneumonia (COVID-19) caused by novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection in December 2019, it was declared a global pandemic by the World Health Organization in March 2020. Significant infectivity and lethality rate pose a huge threat to the life and safety of all mankind, and we urgently need to grasp the infection/transmission behavior of the virus at the molecular level. Novel coronavirus and the 2003 outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) belong to bat SARS-like coronavirus (SARSR-COV) species, and their surface spike glycoproteins are highly homologous. The key step of their invasion into human cells is the binding of the receptor binding domain (RBD) part of the surface spike protein and human angiotensin converting enzyme 2(ACE2). Many experimental studies have reported that SARS-CoV-2 possesses a stronger binding ability than SARS-CoV. In order to explain the experimental results, molecular dynamics simulations, steered molecular dynamics simulations and umbrella sampling were performed on the binding of wild-type RBD (RBD_{WT}) of the two viruses and ACE2. The results showed that different behaviors of the β -loop region lead to differences in key residues and interactions, and further result in differences in binding/unbinding mechanisms. The binding affinity of SARS-COV-2-RBD and ACE2 is nearly 30 times that of SARS-COV-RBD.

Keywords: SARS-CoV-2, SARS-CoV, steered molecular dynamics, umbrella sampling, key binding residues, binding free energy

doi: [10.1360/SSC-2021-0249](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0249)