

学校编码: 10384 分类号_密级
学号: S200425077 UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

细胞色素 P450 催化对-甲硫醚-N, N-二甲基苯胺发生硫氧化
的密度泛函理论研究

**DFT Study of the S-oxidation of *p*-methylthio-*N,N*-
dimethylaniline by Cytochrome P450**

张 弛

指导教师姓名: 吴 玮 教授

专 业 名 称: 物理化学

论文提交日期: 2008 年 7 月

论文答辩时间: 2008 年 7 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2008 年 06 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2008年 6月 2日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ()，在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要.....	i
Abstract.....	1
第一章 绪论.....	1
1.1 细胞色素 P450 的发现及命名.....	1
1.2 P450 的分子结构及其功能.....	2
1.3 P450 的生物催化循环过程.....	3
1.4 P450 的回弹反应机理和双态反应性.....	6
参考文献.....	9
第二章 计算方法.....	12
2.1 密度泛函理论(DFT)方法简介.....	12
2.1.1 Thomas-Fermi 理论.....	12
2.1.1 Hohenberg-Kohn 定理.....	13
2.1.2 Kohn-Sham 方程.....	13
2.1.3 局域密度近似.....	18
2.1.4 梯度校正.....	18
2.1.5 杂化交换-相关泛函.....	19
2.2 溶剂效应的理论计算.....	20
参考文献.....	19
第三章 P450 活性物种 Cpd I 催化 S-氧化的 DFT 研究.....	21
3.1.1 Cpd I 简介.....	21
3.1.2 P450 催化 p-methylthio-N,N-dimethylaniline 的科研背景.....	23
3.2 理论计算细节.....	24
3.3 结果和讨论.....	25
3.3.1 气态反应及结构优化.....	27
3.3.2 氢键及介质极化对反应的影响.....	28
3.4 结论.....	31
参考文献.....	33
第四章 P450 氧化剂 Cpd 0 催化 S-氧化的 DFT 研究.....	34
4.1 Cpd0 介绍.....	34

4.2 理论计算细节.....	36
4.3 结果和讨论.....	37
4.3.1 Cpd 0 的 O-O 键均裂机制下参与的硫氧化反应.....	39
4.3.3 极端酸性条件下 Cpd 0 参与的硫氧化反应.....	39
4.4 结论.....	44
参考文献.....	46
总 结.....	47
在学期间论文情况.....	48
致 谢.....	49

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Abstract in Chinese	i
Abstract in English	1
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Discovery and Denomination of P450	1
1.2 Molecular Structures and Functions of P450	2
1.3 Biocatalytic Cycle of P450.....	3
1.4 Rebound Mechanism and Two-State Reactivity	6
References.....	9
Chapter 2 Computatioanl Methods	12
2.1 Brief Introduction of DFT.....	12
2.1.1 Thomas-FermicTheory.....	12
2.1.1 Hohenberg-Kohn Theorem	13
2.1.2 Kohn-Sham Equation.....	13
2.1.3 Local Density Approximation.....	18
2.1.4 Gradient Correction.....	18
2.1.5 Hybrid Functionals.....	19
2.2 Theoretical Calculations of Solvation Effect	17
References.....	19
Chapter 3 DFT Study of the Sulfoxidtaion of p-MT-DMA by Cpd I 21	
3.1.1 Cpd I Introduction.....	21
3.1.2 Backgroud of sulfoxidation of <i>p</i> -MT-DMA	23
3.2 Computational Methods.....	24
3.3 Results and Discussion.....	25
3.3.1 Sulfoxidaiton by Cpd I.....	27
3.3.2 The effect of H-bond and solvation	28
3.4 Conclusions.....	31
References.....	33
Chapter 4 DFT Study of the Sulfoxidation of p-MT-DMA by Cpd 0 34	
4.1 Introduction.....	34
4.2 Computational Methods.....	36
4.3 Results and Discussion.....	37
4.3.1 Sulfoxidation by Cpd 0 though O-O cleavage	39
4.3.2 Sulfoxidation by Cpd 0 under the Extrem Acid Conditions.....	39
4.4 Conclusions.....	44

References.....	46
Summary.....	47
List of Publications.....	48
Acknowledgement.....	49

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

细胞色素 P450 酶是自然界中最万能的生物酶之一。它利用生物体内的分子氧和两种还原等价物，催化多种底物发生单加氧化反应，具有保护生物体免受外源化学物质侵害，代谢药物和合成重要生命物质的功能。虽然经过多年可观的努力，P450 还存在许多未解决的具有急切挑战性的问题。本文采用密度泛函理论方法研究了 P450 催化底物 *p*-methylthio-*N,N*-dimethylaniline (*p*-MT-DMA) 的反应机理。

计算研究了 Cpd I 和 Cpd 0 催化下的 *p*-MT-DMA 发生硫氧化的反应机制过程，结果表明 Cpd I 催化硫氧化反应具有低自旋选择性，反应能垒仅为 8.3 kcal/mol (E1)/3.8 kcal/mol (E2)，说明 Cpd I 在硫氧化反应中活性很高，催化的反应速率极快。而 Cpd 0 通过分步的 O-O 键均裂/ O_d 进攻的硫氧化反应需要跨越第一步至少 29.0 kcal/mol (E1)/20.6 kcal/mol (E2) 的能垒，相对 Cpd I 而言，Cpd 0 的活性显得很弱，对应的反应速率约比 Cpd I 的慢 8 个数量级。此外 Cpd 0 通过 O-O 键均裂产生活性自由基物种的反应还受到其它平行反应的有效竞争，因此我们认为，在原态的 P450 中对 S-氧化起作用的活性物种是 Cpd I，Cpd 0 的作用可以忽略。

关键词： 细胞色素 P450；密度泛函理论计算；S 氧化。

Abstract

Cytochrome P450 is one of the most versatile enzymes in nature. It uses dioxygen and two reducing equivalents to catalyze the monooxygenation reactions of wide variety of substrates so that can function as oxidant that safeguards organisms against exnobiotics, metabolizes drugs, and leads to biosynthesis of vital compounds. There still remain mechanistic uncertainties and long-standing unresolved issues which pose tantalizing challenges to mechanistic chemistry although a few decades of considerable effort has been dedicated to elucidate the mechanisms of P450 catalyzed reactions. A DFT calculations were carried out for the study of sulfoxidation by the enzyme cytochrome P450 by taking *p*-methylthio-*N,N*-dimethylaniline (*p*-MT-DMA) as substrate.

Calculations compared the sulfoxidation of *p*-MT-DMA by the the high-valent oxo-ferryl species, known as Compound I (Cpd I), and the precursor species, so called Compound 0 (Cpd 0). It has been revealed that when taking Cpd I as the oxidant , it will go through low spin (LS) states, and the barrier of the bond activation transition state in LS is 8.3 kcal/mol (E1)/3.8 kcal/mol (E2). Our results demonstrate that Compound I leads to an extremely fast process, while Compound 0 will be at least six orders of magnitude slower. We suggest that most likely, thiafatty acids promote Compound I formation. In this manner we provides a clear answer to a major mechanistic of sulfoxidation of *p*-MT-DMA.

第一章 绪论

细胞色素 P450 酶系是自然界中最具有催化作用的生物催化剂。该酶系的主要特点是，底物的广谱性，能作用于许多结构不同的物质，尤其是能催化各种外源化合物，包括其它生物来源和人工合成的化学品的生物转化^[1]。细胞色素 P450 家族成员之间的一级结构差异较大，但空间结构却有着较大的相似性，广泛分布于哺乳动物、鱼类、软体动物、细菌、寄生虫、酵母、真菌、昆虫以及植物等不同种生物中，构成了自然界生物酶中的一个功能独特的超家族。^[2-5]

1.1 细胞色素 P450 的发现及命名

1955 年以前，科学家们认为氧分子在生物体内只有一种功能，即在脱氢酶 (dehydrogenase) 催化脱氢和氧化酶(oxidase)催化氧化反应中作为电子接受体。1955 年，Mason 研究了酚酶催化 3,4-二甲苯酚的氧化反应^[6]，同时 Hayaishi 研究了邻苯二酚酶催化儿茶酚的氧化反应^[7]，他们各自独立地发现结合到有机底物(substrate, S)分子的氧原子是直接来源于反应物中用同位素 ^{18}O 标记的 $^{18}\text{O}_2$ 分子，而不是溶剂中的水分子。Hayaishi 把这些酶称为加氧酶(oxygenase)以区别于其它生物氧化酶。

在 Mason 和 Hayaishi 发现加氧酶之后不久，Garfinkel^[8]和 Klingenberg^[9]于 50 年代中后期，各自在肝微粒体中发现了一种特殊的细胞色素，这一细胞色素含有由含铁血红素和半胱氨酸组成的活性中心，被还原后与 CO 结合可在光谱的 450nm 处出现特征的最大吸收峰。6 年后，Omura 和 Sato^[10]鉴别出这一不同寻常的色素是一种含正铁血红素 IX (如 Figure 1-1) 的特殊的血红素蛋白，类属 b 族细胞色素，他们将其命名为细胞色素 P450 (Cytochrome P450, P-pigment)，以区别于其它 b 族细胞色素。

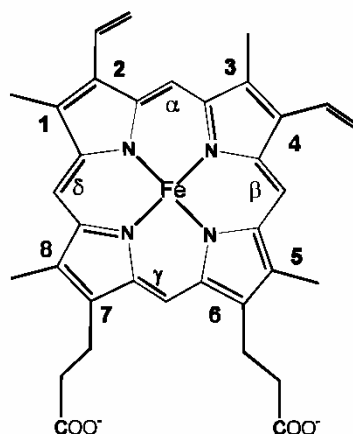


Figure 1-1. Structure of protoheme IX (iron protoporphyrin IX, heme b).

1.2 P450 的分子结构及其功能

生物体中 P450 以膜结合和可溶性两种形态存在^[3]。1975 年 Gunsalus^[10]从假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中发现了可溶性的樟脑羟基化 P450(P450_{cam}), Poulos^[11]等分离纯化 P450_{cam} 获得了第一个 P450 晶体, 并用 X 射线测定出其结构。以 P450_{cam} 为例, P450 酶分子结构特征是: 参与反应的底物与活性中心嵌入在疏水的蛋白质囊腔内, 没有明显地暴露于蛋白质表面, 形成“底物-血红素囊(substrate-heme pocket)”。活性中心存在一个含铁离子的原卟啉所形成的血红素

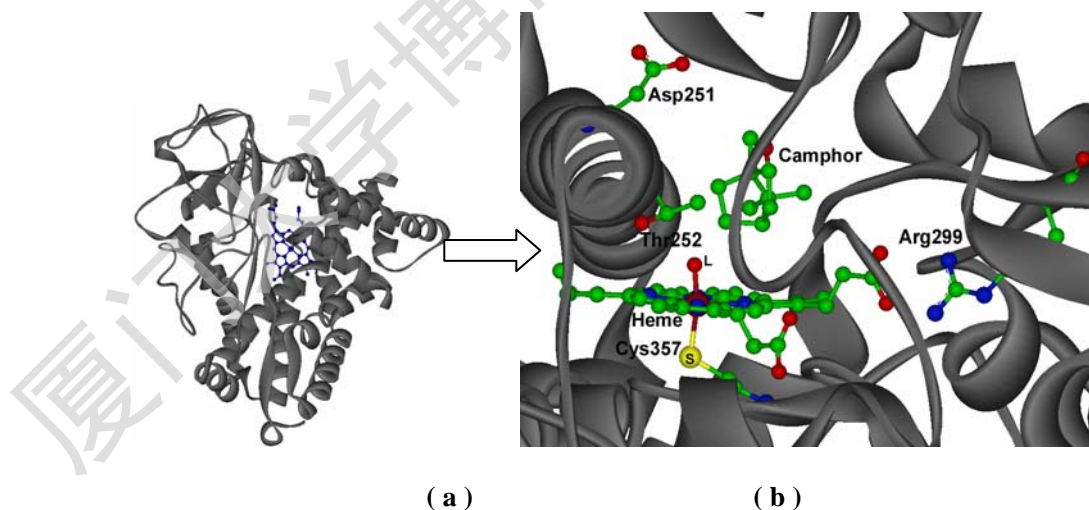


Figure 1-2. Schematic representation of the crystal structures of cytochrome P450_{cam} as taken from the X-ray structure (pdb code: 1DZ9) of Schlichting et al.(a) the heme domain of substrate-free ferric cytochrome P450_{cam} (b) Close-up of the active site of P450_{cam}.

平面。外围蛋白质形成类似三角形的平面, 接近并平行于蛋白质腔内的血红素平面(Figure 1-2a)。活性中心的铁离子除了与卟啉环内的四个氮原子配位外, 还与垂直于卟啉环平面的两个轴向配体配位, 其中最近邻的轴向配体是半胱氨酸

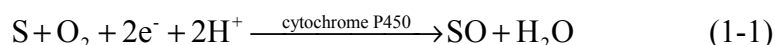
残基 Cys357 的巯基，另外一个远端的轴向配体(Figure 1-2b 中 **L**)在 P450 的催化循环过程中不断变化，当远端配体 **L** 成为端氧原子(oxo)且原卟啉是一个自由基阳离子时，这个物种被称作化合物 I(Compound I, Cpd I)^[12]。由于 P450 催化反应速度极快，所以实验上至今没能直接检测得到 Cpd I，但比较一致的看法是 Cpd I 是 P450 的反应活性物种，而且是已知的自然界中能力最强的氧化剂之一，它能轻松得把端氧原子插入众多有机分子不活泼的化学键，实现有机分子化学键的活化^[13-20]。此外，Figure 1-2b 中标记出了几个紧挨反应活性中心的氨基酸残基，它们对 P450 酶的稳定存在及 P450 整个催化过程都起着至关重要的作用。靠近远端轴向配体 L 的 Asp251(天门冬酸 aspartate, Asp)和 Thr252 (苏氨酸 threonine, Thr) 在质子传输链中起关键作用，它们通过传递质子来活化进入 P450 的氧气分子，最终把氧气分子转变为端氧配体以形成活性物种 Cpd I^[21-27]。原卟啉环的两个丙酸基侧链分别与附近的 Arg299(arginine 精氨酸, Arg)和 Arg112 形成盐桥作用，可影响到 Cpd I 的反应活性^[28]。近端轴向配体 Cys357 的 S 原子与周围 Gly359(甘氨酸 glycine, Gly)、Leu358(亮氨酸 leucine, Leu)形成的 NH---S 氢键对调节 Cpd I 的性质起着十分重要的作用，如果这种氢键作用消失，整个 P450 结构体系将崩溃^[29]。

P450 的功能多样，它参与的众多反应包括饱和烷烃的 C-H 键羟化、烯烃的双键环氧化、N-脱烷基、O-脱烷基、N-氧化、S-氧化、脱氨基、硝基还原、芳香烃氧化等。通过 P450 的单加氧化，使外来的亲脂化合物获得极性基团，增加水溶性，从而易于通过肾脏和胆汁代谢，这是 P450 在人体中的解毒功能^[30]。此外，由于 P450 的催化单加氧化作用很强，可以使一些外源物质经转化后毒性反而增高，如致癌物 3,4-苯并芘、黄曲霉毒素、亚硝胺等，它们经 P450 作用后与 DNA 共价结合而引起基因突变引起组织细胞癌变。从这个意义上说，P450 是“有毒”的^[1,31]，因此深刻了解 P450 的催化反应机理本质，对维护生物机体安全，促进生物体健康发展具有重要意义。

1.3 P450 的生物催化循环过程

P450 可以催化成千上万种反应，甚至对具有相似化学结构的底物也表现

出多种反应类型，因而被人们称为万能的催化剂。P450 催化反应过程涉及多个步骤，典型的反应是通过电子传递系统将分子氧还原：



P450 参与生物催化的总过程可表示为式 1-1(S 为底物)，P450 利用还原型辅酶 NADPH 或 NADH 提供的两个电子，把进入生物体系中分子氧的一个氧原子插入到底物中，剩余的氧原子还原后结合体系中的 H^+ 生成水分子。目前为止，人们一致认为是 P450 生物催化循环过程如 Figure 1-3 所示，其中底物以烷烃 RH 为例：

(1)P450 的休眠态是六配位的 **A**，活性中心卟啉铁为低自旋二重态的正三价铁离子，近端的第五配位体是半胱氨酸巯基的硫，远端的第六配位被可交换的水分子以 $\text{Fe}-\text{O}$ 配位形式占据^[32]。当底物 RH 进入血红素囊并与疏水蛋白结合后，远端水分子脱去，产生远端空缺的五配位正铁-卟啉中间体 **B**。

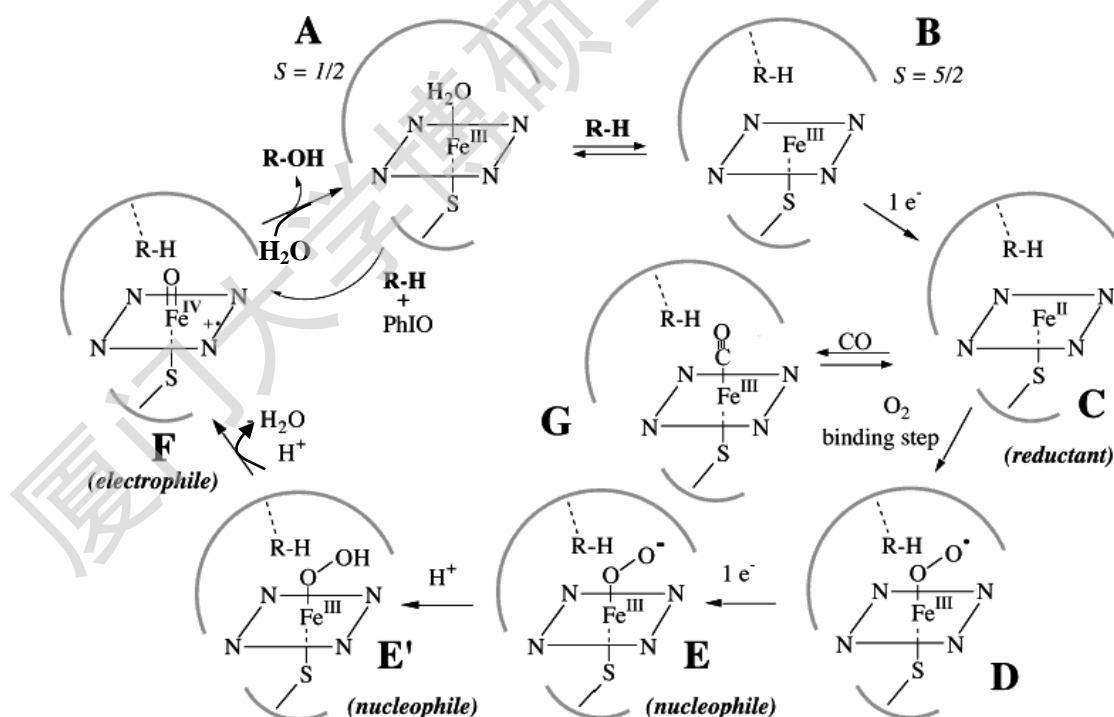


Figure 1-3. Catalytic cycle of cytochrome P450

(2)P450 形成五配位的中间体 **B** 后，以 6 重态的高自旋稳定态^[33, 34]存在，血红素中正铁离子从几乎与卟啉环平行的位置下移至卟啉环平面下方，方便下

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库