中 国 科 学(B 辑)
第 29 卷 第 4 期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1999 年 8 月

生物合理设计光系统 II 抑制剂研究*
——Ⅷ. 丙烯酸酯(酰胺)类化合物的分子设计、合成及其生物活性研究

刘华银 沙印林 谭惠芬 杨华铮**
(元素有机国家重点实验室, 南开大学元素有机化学研究所, 天津 300071)
来鲁华
(分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京大学物理化学研究所, 北京 100871)

摘要 运用分子模拟方法研究了丙烯酸酯(酰胺)类化合物与 D1 蛋白间的相互作用. 结果表明它们的结合主要包括: 氢键相互作用, van der Waals 力相互作用及 π-堆积相互作用. 发现化合物分子中酯键醇基部分中电负性原子能否与 D1 蛋白 SER 268 形成氢键作用是其表现出良好抑制活性的重要因素. 因此推测 D1 蛋白中 SER 268 可能是另一重要的结合位点. 在此基础上设计并合成了新型结构的丙烯酸酯(酰胺)类化合物. 生物活性测定结果表明, 它们如期表现出良好的 Hill 反应抑制活性.

关键词 光系统 II 丙烯酸酯 分子模拟 分子设计 Hill 反应抑制活性

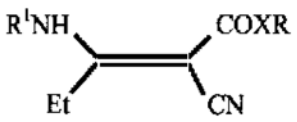
光合作用是植物特有而重要的生理生化现象, 选择光合作用作为除草剂的作用靶标是当今世界创制无公害农药的需要. 近年来, Deisenhofer 等人[1] 采用 X 射线衍射法成功地解析了紫色菌光合作用中电子传递系统 L 蛋白的立体结构, 这一研究成果使得基于受体模型设计新型光合作用抑制剂具有了希望.

已经证实, 许多除草剂是抑制或阻碍光合作用光系统 II(PS II) 电子传递的药剂, 它们竞争性地替换 PS II 中与 D1 蛋白结合着的质体醌 Q_B, 导致电子传递受阻, 从而使光合作用过程中断[1, 2]. 根据紫色菌光反应中心 L 蛋白结构, 我们采用同源建模方法, 构建了高等植物豌豆(*Pisum sativum*) 光合反应中心 D1 蛋白的三维结构模型, 选择质子、水、甲基、氨基等探针, 采用格点扫描方法, 考察了活性区域的电性、氢键、立体作用特征分布等, 验证了 D1 模型的合理性[1)].

在众多 PS II 抑制剂中, 丙烯酸酯 **1** 是一类具有较高活性的化合物(如表 1 所示). 有关文

1998-07-13 收稿, 1998-12-18 收修改稿
* 国家自然科学基金(批准号: 29702006, 29832050) 及天津市自然科学重点基金资助项目
** 联系人
1) 沙印林. 基于植物光合反应中心 32kdal(D1) 蛋白结构的光合系统 II 电子传递抑制剂设计、合成及生物活性研究. 南开大学博士学位论文, 1996

表 1 丙烯酸酯(酰胺)类化合物结构及其对 Hill 反应抑制活性 pI_{50} 值[4]



1

编号	R^1	XR	pI_{50}
1a	p_ClC_6H_4	OC_2H_4OEt	5.70
1b	p_$ClC_6H_4CH_2$	OC_2H_4OEt	8.20

献报道, 该类化合物在结构上细微的变化常对其抑制活性产生显著影响[3,4]. 可以认为丙烯酸酯类化合物是一类十分有效的, 用以探索抑制剂小分子与 D1 蛋白相互作用特征的, 确定活性口袋模型的"探针".

因此, 我们选择丙烯酸酯类化合物作为研究对象进行分子模拟研究, 根据搭建的配体与受体结合模型及文献报道的活性数据(如表 1 所示), 探索研究 D1 蛋白的活性位点. 研究结果表明, SER 268可能是另一重要位点, 在丙烯酸酯中醇部分子结构中, 若引入一电负性原子则可能与 SER 268 侧链羟基氢形成氢键作用, 从而进一步降低了配体与受体相互作用的能量, 对活性的提高有利. 同时这类化合物分子中苯环与氨基间插入亚甲基使苯环与一 sp^3 杂化碳原子相连, 苯环具有一定的自由旋转能力, 从而分子能更适宜地与受体大分子相互作用, 这也可能对活性的提高有显著作用. 为此我们设计合成了多个丙烯酸酯(酰胺)类似物, 生物活性测定结果表明, 符合上述结构要求的化合物均显示出良好的 Hill 反应抑制活性. 以上研究对进一步寻找新型光合作用抑制剂具有一定的指导意义.

1 实验

1.1 计算方法

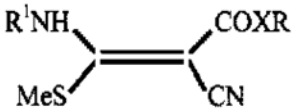
实验采用豌豆(*Pisum sativum*)光合反应中心 D1 蛋白模型. 为了研究的方便, 在该模型中, 只选取与 Q_B 结合有关的残基(由 HIS 195 到 GLY 285), 其他残基省略. 分子模拟研究在 SGI 图形工作站进行, 所用的分子模拟软件为 Tripos 公司的 SYBYL 软件包. 利用 DOCKING 软件将抑制剂分子置于 D1 蛋白结构模型中进行对接, 受体中 SER 264 是公认的结合位点[5,6], 故设置抑制剂分子与模型中 SER 264 形成氢键. 电荷设置采用 Gasteiger-Hückel 方法, 用 Tripos 力场进行配体与受体间相互作用能量优化, 具体计算采用最陡下降(Stepest descents)和共轭梯度(Conjugate gradients)方式, 非键相互作用距离限制在 1.20 nm 之内, 最终得到 RMS 值小于 2.09 $kJ\cdot mol^{-1}\cdot nm^{-1}$ 的复合物模型. 在已经建立的复合物模型的基础上, 运用 Leapfrog 软件, 以 Guide/ Dream 方式进行设计分子, 得到分子结构及其与 D1 蛋白的结合能量.

所设计的丙烯酸酯(酰胺)类化合物 **2** 的结构, 计算的小分子与受体相互作用的结合能量及所测它们对 Hill 反应抑制活性 pI_{50} 值如表 2 所示.

1.2 合成方法

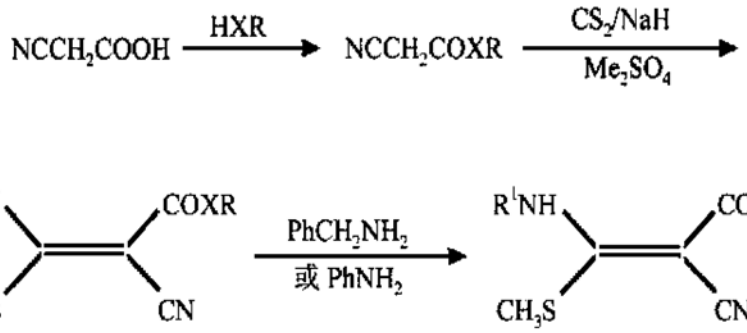
所设计化合物的合成路线如图 1 所示. 参照前文[7]报道的方法, 将氰基乙酸甲氧基乙酯、氰基乙酸乙氧基乙酯、α-氰基乙酰-N-(甲氧基乙基)胺和 α-氰基乙酰-N-(甲氧基丙基)胺分别与氢化钠、二硫化碳和硫酸二甲酯反应, 得到 2-氰基-3, 3-二甲硫基丙烯酸酯或酰胺, 再分别与苄胺或苯胺反应[8]即得所设计的化合物 **2a**~ **2f**.

表 2　所设计的丙烯酸酯(酰胺)类化合物结构、结合能量和对 Hill 反应抑制活性 pI_{50}值以及相应的相关方程、方程的相关系数



2

编号	R^1	XR	结合能 / kJ·mol^{-1}	相关方程	r 值	pI_{50}
2a	C_6H_5	OC_2H_5	- 370.10	Y= 5.0567+ 1.1203X	0.99	5.93
2b	$C_6H_5CH_2$	OC_2H_5	- 410.73	Y= 6.3829+ 1.1332X	0.99	6.66
2c	$C_6H_5CH_2$	OC_2H_4OMe	- 607.48	Y= 9.8265+ 2.1517X	0.98	7.73
2d	$C_6H_5CH_2$	OC_2H_4OEt	- 632.94	Y= 14.1935+ 3.2963X	0.99	8.30
2e	$C_6H_5CH_2$	NHC_2H_4OMe	- 564.47	Y= 8.1899+ 1.6468X	0.99	7.42
2f	$C_6H_5CH_2$	NHC_3H_6OMe	- 483.92	Y= 7.7411+ 1.5467X	0.98	7.28



R′ = Ph, $PhCH_2$; XR= OEt, OC_2H_4OMe, OC_2H_4OEt, NHC_2H_4OMe, $NHCH_2CH_2CH_2OMe$

图 1　所设计化合物的合成路线

1.3　生物活性测定

于温室下栽培豌豆, 在苗龄 20 d 时, 精选其壮叶, 洗净, 预冷. 叶绿体悬浮于提取液中, 调节浓度至叶绿体含量在 0.15~ 0.20 mg chl./mL, 制成叶绿体悬浮液. 按前文[9]报道中的方法测定化合物对 Hill 反应的抑制活性. 通过化合物的处理浓度与放氧活性间的关系曲线, 计算出化合物抑制 Hill 反应 50% 时的摩尔浓度(以 pI_{50}表示, pI_{50}= - $lgIC_{50}$). 所测得化合物 **2a~ 2f** 的抑制 Hill 反应活性值以及相应的相关方程、方程的相关系数如表 2 所示.

2　结果与讨论

2.1　复合物模型研究

图 2 显示化合物 **1b** 在 Q_B 结合部位中的结合情况. 此图除表明化合物中羰基上的氧原子与 SER 264 侧链羟基上氢形成氢键, 与文献[5, 6]报道结果一致外, 同时亦表明: 氰基上的氮原子与 LEU 271 主链酰胺上氢形成氢键; 酯基侧链上氧原子与 SER 268 侧链羟基氢形成氢键. 很显然, 正是由于该化合物与 D1 蛋白 Q_B 结合部位间具有较强的氢键相互作用, 使得其结合增强, 表现在该化合物抑制 Hill 反应活性上, 比其他酯基侧链上不存在电负性杂原子的衍生物具有较高的活性. 这可以说明, 丙烯酸酯类化合物中酯基侧链是否含有较强电负性基团或原子对其生物活性可能具有很重要的影响.

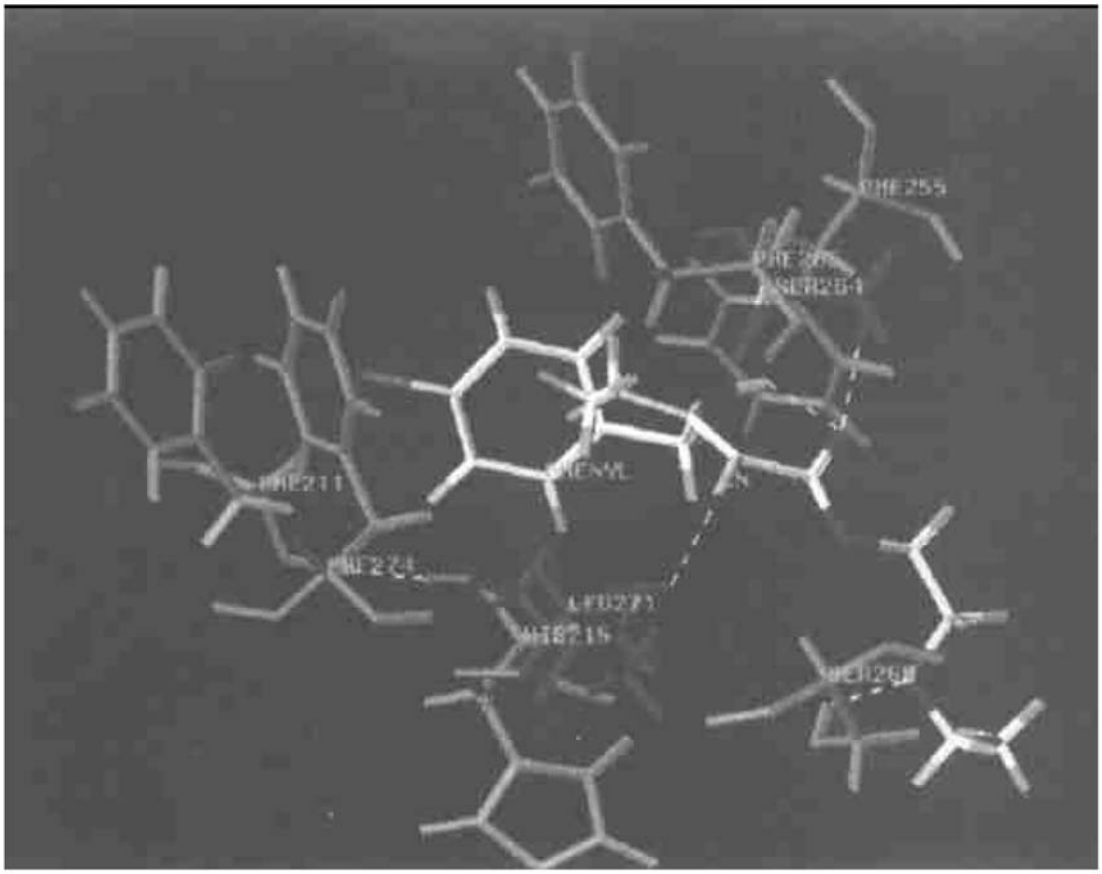


图 2 化合物 **1b** 与豌豆 D1 蛋白相互作用复合物模型简图

该化合物与 PHE 211, PHE 255, PHE 265 及 PHE 274 间存在 van der Waals 力相互作用和 π 堆积相互作用, 并与 SER 264, SER 268 和 LEU 271 间存在氢键相互作用

所得模型还表明, 丙烯酸酯类化合物 **1b** 中的苯环靠近由残基 PHE 211, PHE 255, PHE 265 和 PHE 274 形成的口袋, 其间产生 van der Waals 力相互作用和 π 堆积相互作用. 作用大小同苯环与相邻氨基间是否存在亚甲基有关. 与化合物 **1a** 相比, 化合物 **1b** 中苯环与相邻氨基间插入一个亚甲基, 由于与一 sp^3 杂化碳原子相连, 苯环能自由旋转, 致使它能更深地进入上述“口袋”, 更适宜地与受体口袋匹配, 增强了小分子与 D1 蛋白间的 van der Waals 力相互作用和 π 堆积相互作用, 其 Hill 反应抑制活性(pI_{50}= 8.20) 明显高于苯环直接与氨基相连的化合物 **1a** (pI_{50}= 5.70) . 由此可见, 含有苄胺基结构的丙烯酸酯类化合物能很好地与 D1 蛋白相互作用, 从而表现出良好的生物活性.

总之, 在这类丙烯酸酯类化合物中, 酯基侧链含有较强电负性原子或基团, 及含有苄胺基结构的丙烯酸酯类化合物能很好地与 D1 蛋白相互作用, 从而表现出较好的抑制活性. 在此基础上, 我们搭建丙烯酰胺化合物 **1c** (R^1= p_$ClC_6H_4CH_2$, XR= NHC_2H_4OEt) 与 D1 蛋白的复合物模型. 其结合情况如图 3 所示. 丙烯酰胺衍生物 **1c** 具备化合物 **1b** 与 D1 蛋白相互作用所有必需的结合特征, 即酰胺基侧链含有较强电负性氧原子, 和含有苄胺基结构. 因而可以预言, 该化合物也应具有一定的 Hill 反应抑制活性.

2.2 分子结构与抑制活性关系

基于以上分子模拟研究, 依据甲硫基是乙基的生物等排体的思想, 我们设计并合成了化合物 **2c**~ **2f**, 同时对照合成了酯基侧链没有电负性基团的化合物 **2a** 和 **2b**, 测定的 Hill 反应抑制活性结果表明, 除化合物 **2a** 和 **2b** 的抑制活性如预期一样较低外(pI_{50}= 5.93 和 6.66) , 其他所

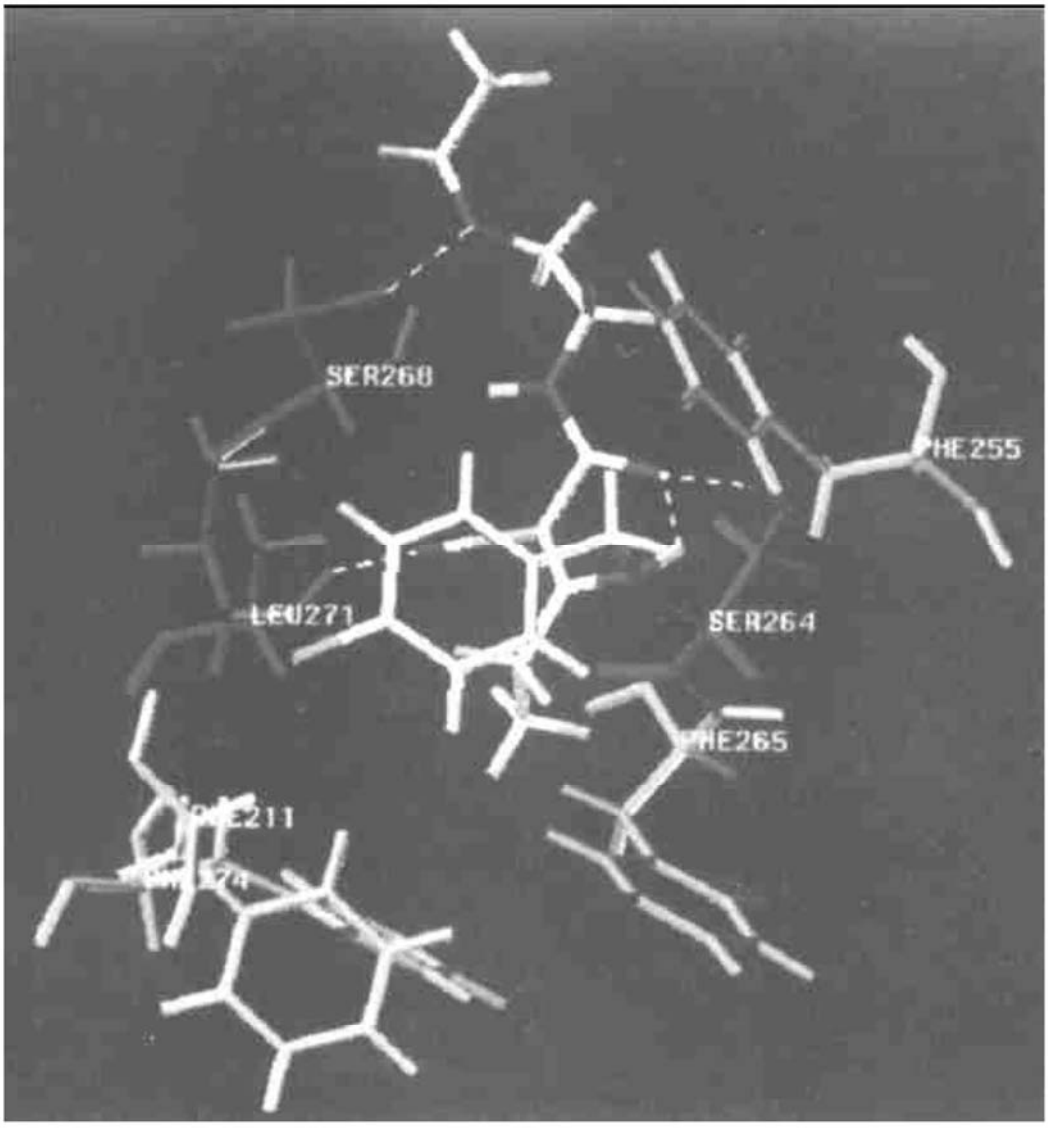


图 3　化合物 **1c** 与豌豆 D1 蛋白相互作用复合物模型简图

该化合物与 PHE 211, PHE 255, PHE 265 及 PHE 274 间存在 van der Waals 力相互作用和 π-堆积相互作用, 并与 SER 264, SER 268 和 LEU 271 间存在氢键相互作用

设计化合物的抑制活性 pI_{50}值均在 7.20 以上, 从而证实上述分子设计是成功的. 化合物 **2d** 的活性(pI_{50}= 8.30) 明显高于化合物 **2c**(pI_{50}= 7.73) , 化合物 **2d** 和 **2c** 与 D1 蛋白的结合能量均较化合物 **2a** 及 **2b** 的低, 这表明相应的 D1 蛋白中与酯基相结合的区域具有一定空间性, 同时分子的疏水性作用也可能对活性有一定的影响. 另一方面, 化合物 **2e** 和 **2f** 亦表现出较高的抑制活性, 这表明具备丙烯酸酯类化合物结构特征的丙烯酰胺类化合物也是一类较好的光合作用抑制剂, 同时化合物 **2f**(pI_{50}= 7.28) 的活性低于化合物 **2e**(pI_{50}= 7.42) , 化合物 **2e** 和 **2f** 与 D1 蛋白的结合能量均较化合物 **2a** 及 **2b** 的低, 这表明羰基与侧链杂原子间的距离对化合物抑制活性有一定的影响, 乙撑基的距离比丙撑基的距离要好. 以上结果符合 D1 蛋白模型结构特征.

3　结论

本文运用分子模拟方法研究了丙烯酸酯(酰胺) 类化合物与 D1 蛋白间相互作用. 结果表明它们的结合主要包括: 氢键相互作用, van der Waals 力相互作用和 π-堆积相互作用. 研究认

为 D1 蛋白中 SER 268 可能是另一重要的结合位点. 化合物分子中酯基侧链是否含有电负性和是否具有苄胺基结构是其表现出良好抑制活性的重要因素. 在此基础上设计并合成了新型结构的丙烯酸酯(酰胺)类化合物. 生物活性测定结果表明,它们如期表现出良好的 Hill 反应抑制活性. 同时发现具备丙烯酸酯类化合物结构特征的丙烯酸酰胺类化合物也是一类较好的光合作用抑制剂,值得进一步研究. 以上研究对寻找新型光合作用抑制剂具有一定的指导意义.

参 考 文 献

1 Deisenhofer J, Epp O, Miki K, et al. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of Rhodopseudomonas viridis at 0.3 nm resolution. Nature, 1985, 318: 681

2 Trebst A, Kluth J F, Tietjen K G, et al, Molecular analysis of photosystem Ⅱ inhibition. Pesticide Chemistry: Proceeding of the 7th IUPAC. Hamburg: VCH Publishers Inc Press, 1990. 111

3 Phillips J N, Huppatz J L. Stereospecific inhibitor probes of the PS Ⅱ herbicide binding site. Z Naturforsch, 1987, 42C: 674

4 Phillips J N, Huppatz J L, Cyanoacrylate inhibitors of the reaction Ⅳ. Binding characteristics of the hydrophobic binding domains. Z Naturforsch, 1987, 42C: 679

5 Mackay S P, O'Malley P J. Molecular modelling of the interaction of cyanoacrylate inhibitors with photosystem Ⅱ. Part 1. The effect of hydrophobicity of inhibitor binding. Z Naturforsch, 1993, 48C: 773

6 Mackay S P, O'Malley P J. Molecular modelling of the interaction of cyanoacrylate inhibitors with photosystem Ⅱ. Part 2. The effect of stereochemistry of inhibitor binding. Z Naturforsch, 1993, 48C: 782

7 Liu H Y, Yang G F, Yang H Z, et al. Study on bio_rational design of photosystem Ⅱ inhibitors. Ⅱ. The crystalline and molecular structure of ethyl 3_benzylamino_2_cyano_3_methylthioacrylate. Chem J Chinese Univ, 1998, 19(6): 899

8 Liu H Y, Lu R J, Yang H Z. Convenient synthesis of α-ketoketene N, S_acetal from low nucleophilic arylamine. Synthetic Communications, 1998, 28(21): 3 965

9 Tan H F, Liu H Y, Yang H Z. Identification for activities of new inhibitors in Hill reaction. Plant Physiology Communications, 1998, 34(2): 126