

HPPD 酶及其抑制剂构效关系的研究进展

朱有全 胡方中 杨华铮*

(南开大学元素有机化学研究所 有机化学国家重点实验室 天津 300071)

徐海珍

(天津师范大学化学与生命科学学院 天津 300074)

摘 要 植物体中的对羟基苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD)酶对动植物的生长发育起着至关重要的作用。本文综述了 HPPD 酶的晶体结构、作用机制及其抑制剂的作用机制、构效关系。

关键词 对羟基苯基丙酮酸双氧化酶(HPPD) 抑制剂 构效关系

Reviews on 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Enzyme and the Structure-activity Relationships of its Inhibitors

Zhu Youquan, Hu Fangzhong, Yang Huazheng*

(National Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Xu Haizhen

(College of Chemistry and Life, Tianjin Normal University, Tianjin 300074)

Abstract The crystal structure of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase(HPPD) enzyme, mechanism of action of HPPD enzyme and its inhibitors and structure-activity relationships of its inhibitors were reviewed.

Key words 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase(HPPD), Structure-activity relationships, Inhibitor

对羟基苯基丙酮酸双氧化酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)存在于各种生物体中并被提取出来^[1], 它是一种铁-酪氨酸蛋白^[2], 在植物体内可将对羟基丙酮酸(4-hydroxyphenylpyruvate, HPP)催化转化为尿黑酸(2,5-dihydroxyphenylacetate, HGA)^[3], 进而转化为光合作用中电子传递所需要的重要物质质体醌和生育酚^[4,5], 其中质体醌还是影响八氢番茄红素去饱和酶催化的关键辅助因素^[6], 同时, 该酶的抑制剂 NTBC(2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione)临床上已经应用于治疗酪氨酸病, 对人体无不良作用。鉴于其上述重要作用和特点, 使之成为继 ALS、ACC 以及 Prottox 之后的又一新的除草剂靶标酶和临床上治疗酪氨酸病靶标酶^[7]。由于该酶抑制剂用于除草方面时具有广谱、高效、残留低、环境相容性好、使用安全的特点, 且尚未发现有关其抗性的报道^[8], 这更加引起人们对其抑制剂及其构效关系研究的重视, 并进行了广泛的研究。为了使 HPPD 抑制剂的研制更具有针对性, 本文对近年来

朱有全 男, 38 岁, 博士生, 现从事高效 HPPD 酶抑制剂开发及构效关系研究。*联系人

国家自然科学基金资助项目(29832050)

2003-04-22 收稿

有关 HPPD 提纯、晶体结构、在动植物体内的作用机制及其构效关系等方面的研究概况作一综述。

1 HPPD 的提纯和活性分析

纯 HPPD 可以从动物肝、玉米、细菌等生物体中纯化来获得^[9-11]。

HPPD 活性的分析通常采用的方法有：(1)测定 HPP 转化为 HGA 所消耗的氧气量^[12,13]；(2)测定释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 的量^[10]；(3)分光光度法^[11]；(4)用高效液相法测定生成的 HGA 的量^[7,14]。

2 HPPD 的晶体结构

Laurence 等^[15]采用 SIRAS 方法测定了 *Pseudomonas fluorescens* HPPD 的晶体结构。结果显示，该酶以四聚体形式存在且通过两两 N-端相结合形成上下对称的聚合结构，如图 1 所示。每一结构单元都包含有两个重复的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ 结构。正如图 2 所示，酶的活性中心铁离子包含在酶 C-端结构中，分别和 His161、His240 及 Glu322 配位结合。剩余的三个配位轨道正好与底物和氧相结合。HPPD 分子模型的 R_{free} 为 27.6%， R 因子为 21.9%，计算采用的衍射范围为 $20.0\sim 2.4\text{\AA}$ ，测定结果表明，具有非晶体 222 对称性，每个单体表面积为 2600\AA^2 ，晶包中包括 11119 个非氢原子、4 个铁原子、4 个二乙基汞分子、4 个乙酸酯分子和 482 个水分子。晶体属正交晶系，空间群为 $P212121$ ；在 100K 条件下，晶胞参数为 $a=76.60\text{\AA}$ ， $b=142.75\text{\AA}$ ， $c=159.44\text{\AA}$ 。

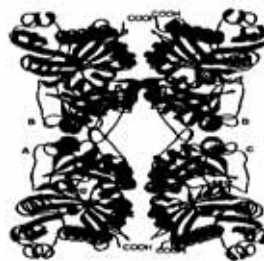


图 1 HPPD 酶蛋白质结构

Fig.1 Ribbon representation of the HPPD tetramer

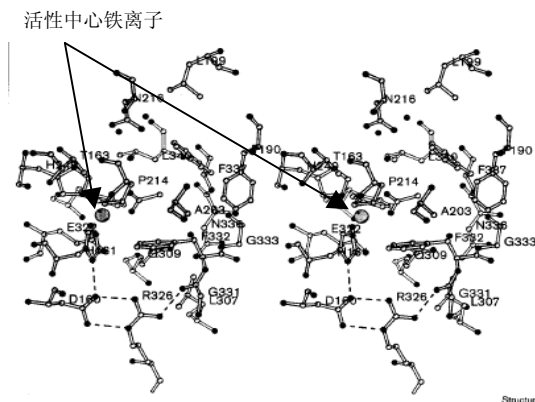


图 2 晶体结构图

Fig.2 The active-site pocket of HPPD

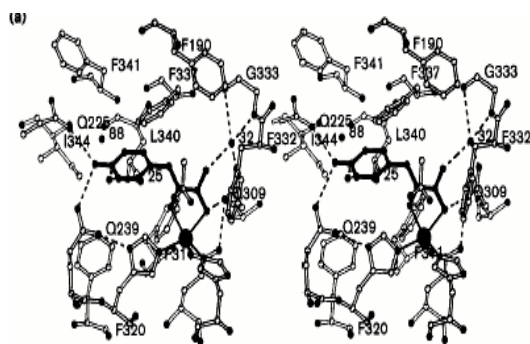
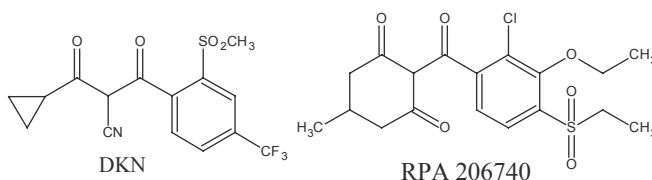


图 3 模拟 HPPD-HPP 络合图

Fig.3 The binding model of HPPD-HPP

由图 1 可以看出，水平方向两个单体呈面背平行结合，上下通过 N-端结合，形成四聚体，四个活性反应中心，当其中一个活性中心与底物结合时，相应会引起酶空间结构的变化，使水平对称的另一活性中心的活性受到影响，活性降低，影响程度视抑制剂与酶结合的程度。这与文献[9]所做的工作相符合：由于 DKN(diketonitrile)与 HPPD 二聚体为紧密结合，严重影响了另一个的活性中心与 DKN 的结合反应，致使其与二聚体 HPPD 的化学计量比为 1/1。而与 HPPD

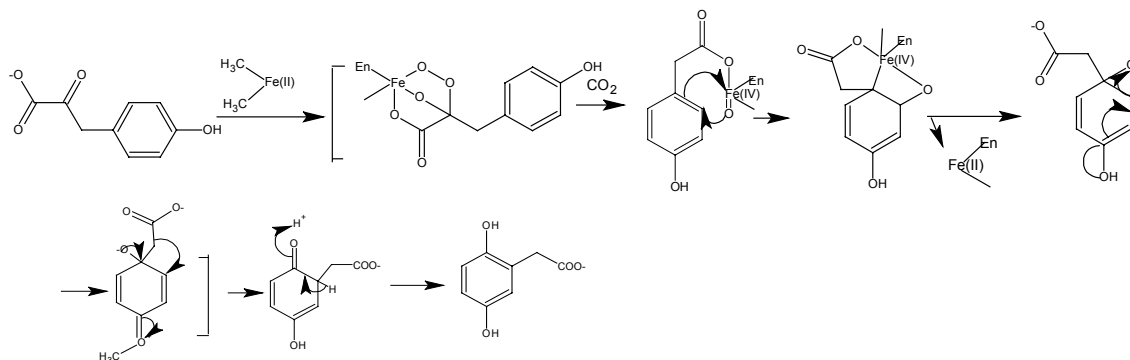
二聚体结合较为松弛的 RPA206740 的实验结果显示,与二聚体的化学计量比为 1.2:0.5,即抑制剂/活性中心的摩尔比为 1.2/1,这就是由于二者的结合能力差,导致蛋白质空间构型变化较小,反应中心趋于全部参与,且抑制剂浓度的提高有利于平衡向络合物方向进行。因此,对酶结构深入的研究,有助于通过有效的抑制剂与酶结合的模拟,针对性地合成抑制剂目标分子,如图 3 所示。



3 HPPD 及其抑制剂在动植物体内的作用机制

HPPD 在人及其它哺乳动物体内的主要作用是促进酪氨酸的代谢,但它还能够催化代谢因富马酸乙酰乙酯酶缺乏活性积累的琥珀酰基乙酰乙酸乙酯等体内物质,形成对肝肾有毒的代谢物(即酪氨酸病产生的根本原因)。HPPD 抑制剂的使用,抑制了催化降解过程的发生,进而抑制了有毒(副)产物的形成,从而达到了治疗疾病的目的^[16]。

HPPD 在植物体内将 HPP 催化转化为 HGA 这一过程可能的反应机制,主要有:(1)Witkop 等^[17]认为,铁离子与氧复合物氧化 HPP 的芳香环,形成过氧化阴离子中间体(该步为关键步骤),然后亲核进攻羧基碳,形成环状的过氧化物,继而脱羧、支链邻位迁移,形成 HGA。该机理对于酚类底物较容易反应,但对于缺电子的苯环来说,难度较大。(2)Hamilton 等^[18-21]认为,金属离子和氧的复合物亲核进攻 α -羰基,生成环状的过氧化物,经脱羧形成四价高配位的铁氧离子,再进攻芳香环形成环氧化物,然后在酶的催化下,羧甲基迁移后形成 HGA。Robert 等^[22]利用电子等排体法,用 NH、S 代替 HPP 中的 CH_2 后,发现它们更倾向于按机理(2)进行。(3)Crouch 等^[3]在(1)、(2)工作基础上,通过大量事实提出较完善的包括了酮酸侧链的氧化脱羧,苯环的羟基化以及羧甲基的 1、2-迁移的反应过程机制。该反应六配位过渡态假设结构也获得 Laurence 等^[15]报道的 HPPD 活性中心配位结构的佐证。

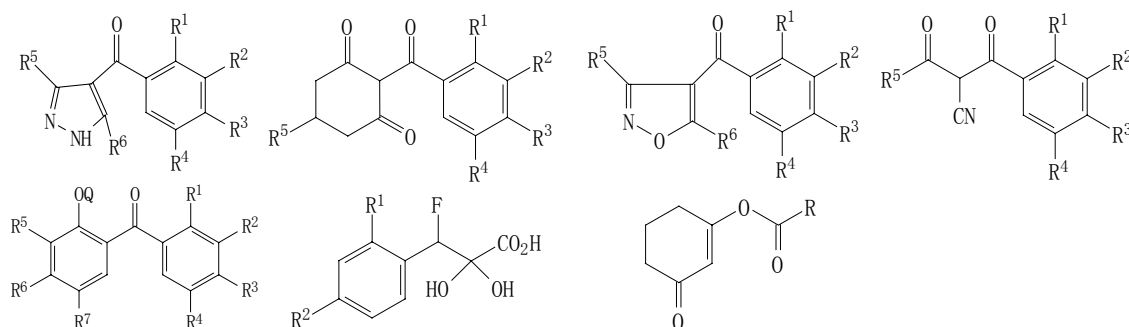


由于 HPPD 抑制剂在植物体内直接抑制了 HPP 转化为 HGA,间接抑制质体醌和生育酚甚至类胡萝卜素的生成,最终导致植物的白化直至死亡。

从 HPPD 抑制剂在动植物体内作用机制可以看出,其对人畜是安全的,发展前景非常广阔。

4 HPPD 抑制剂的构效关系

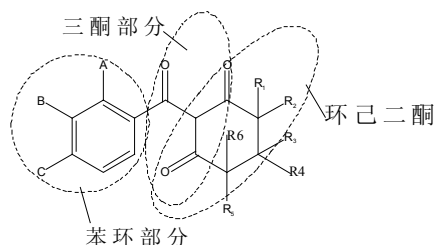
HPPD 抑制剂和 HPP 在作用体系中, 在氧气和铁离子存在下, 竞争性地与 HPPD 活性中心铁离子键合成配合物, 抑制效果与抑制剂和酶的结合程度有关^[18,23,24]。依据现有文献报道, HPPD 抑制剂主要有如下几类。



Lee 等^[25]通过分别在温室和对兔的 HPPD 抑制两方面的广泛筛选发现, 吡咯类、双氰酮类、三酮类、苯甲酰间苯二酚类在水中均能以烯醇形式存在且具有抑制 HPPD 和产生白化症状的作用, 在结构上和间苯二酚类具有极其相似的特点, 通过合成相应的化合物证明苯甲酰烯醇结构是 HPPD 抑制剂的基本结构, 且需具有足够的酸性,

$PK_a < 6$ 。

由于 HPPD 抑制剂起源于三酮类化合物, 对 HPPD 抑制剂构效关系的研究也主要集中于三酮类。影响抑制活性的结构部分可分为: 苯环部分、环己二酮部分、三酮系统和其它等四部分, 如右图所示。



4.1 苯环部分结构上的变化对化合物抑制能力的影响

Lee 等^[26]通过测定一系列的 2, X-二氯化合物和 2, X, Y-三氯化化合物的活性发现, 2,4-二氯代、2,3,4-三氯代模式效果最好, 2,4,5-三氯代效果最差。经进一步对一系列 2-氯(或硝基)-4-取代物(硝基除外)和 2-单取代物研究发现, 4-位取代基的 σ_p 及 2、4 位的 σ_p 之和均与 $\log(LD_{50})$ 呈极好的线性关系, 且斜率 < 0 。这说明引入强吸电子取代基可以获得更加活泼的化合物^[26,27]。

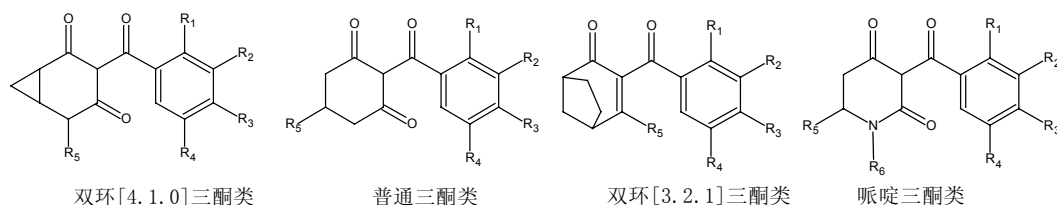
当间位为拉电子基时, 邻位为易离去取代基如氯、硝基、烷基磺酰基等取代基时易发生分子内环化反应, 使间位取代基对抑制剂能力的影响变得比较复杂, 其活性与 σ_p 不存在明显的线性关系。但当间位为像 RO—基团时, 无论从诱导效应还是共轭效应均有利于活性的增加, 随着碳链的长度的增加, 对杂草的活性有明显的增长, 但同时改变了除草图谱, 使选择性降低, 这可能是由于间位化合物与酶有次一级的相互作用, 同时间位取代基的长度对活性也有影响, 这与电子效应无关而是与受体次生结合的结果。

在保持苯环上某一位置的取代基不变的情况下, 随碳链的增长和基团体积的增加, 无论是邻位还是对位, 甲基产物的活性始终比其类似物的要高; 对于间位化合物, 尤其是烷氧基, 从 CH_3O 到 BuO , 对杂草的活性有明显的增长, 但同时改变了除草图谱, 降低了选择性^[26]。当用烷基代替苯基后, 导致活性明显下降^[27]。这说明苯环的存在对抑制剂活性至关重要。

4.2 环己二酮部分对三酮类抑制剂活性的影响

在环己二酮 4-、6-位引入取代基可延缓在 4-、6-位的羟基化和苯甲酰基水解的代谢反应,使植物进行脱毒反应更加困难,相应的除草活性得到提高,这种影响对杂草类比对阔叶类作物影响更加明显^[28]。这一现象并非抑制剂与 HPPD 结合的增强,而是其本身所具有的抑制能力(IC₅₀)所致^[29]。在环己二酮上引入取代基,虽然提高了除草活性,但导致选择性降低,土壤存留期延长。

在结构上其它部分一致的情况下,分别由环己二酮和环戊二酮合成的三酮 HPPD 抑制剂除草活性相似或相同^[30]。

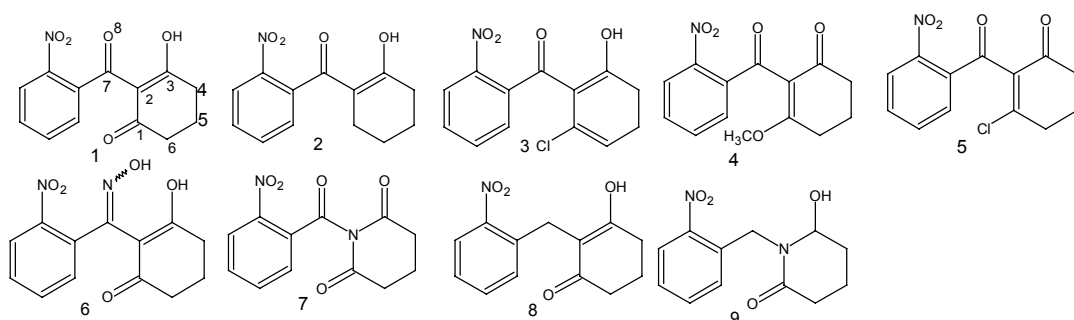


当环己二酮部分由多环体系代替或引入杂原子后,发现:哌啶三酮类 HPPD 抑制剂由于引入氮原子而降低了分子的酸性,相对于其它三种活性较低一些;双环[4.1.0]三酮类 HPPD 抑制剂分子中引入三元环后由于三元环碳原子介于 sp³ 和 sp² 之间,供电子能力趋于减弱,和普通三酮类相比分子酸性较强,活性增高;双环[3.2.1]三酮类由于双环结构影响了烯醇结构的形成,导致活性比普通类略低。当苯环上取代基一致时,四种三酮类 HPPD 抑制剂活性顺序为双环[4.1.0]三酮类>普通三酮类>双环[3.2.1]三酮类>哌啶三酮类^[1]。

当环己二酮取代基被吡唑环代替后,形成吡唑类 HPPD 抑制剂,当通式中 R⁵ 为甲基、乙基或异丙基和 Q 为氢或易离去的基团(如磺酰基集团)时除草活性较高,尤其 R⁵ 为乙基时表现的除草活性更高一些;而当为氢或丙基等基团时,其活性往往很低。

当环己二酮取代基被异噁唑环代替后,形成的异噁唑类抑制剂是通过其相应的活性分解产物二酮腈而起到除草作用的。异噁唑类抑制剂与双酮腈类抑制剂通式中 R⁵ 的不同取代基对其除草活性的影响非常大,为三氟甲基等电子效应参数较大、长度为 1~2 个碳原子或丙基等基团时,他们的除草活性往往较高。二苯酮类抑制剂在通式中 Q 为氢原子或易离去的基团时,易形成活性中间体,相应的除草活性较高。当通式中为氟原子或其它易代谢为羟基的基团时,其除草活性较高。

4.3 三酮系统结构变化对抑制剂活性的影响



通过针对性地合成了下列 1~9 个化合物^[31],结果显示,1~3 对 FeCl₃ 试验呈阳性反应,IC₅₀

值均小于 $1\mu\text{mol/L}$, 说明它们均通过三酮的烯醇异构体与酶结合的亚铁离子紧密结合; 其它化合物均呈阴性反应, 且活性很差。由此可以看出三酮 C-3 上的烯醇氢质子的离去有可能影响分子的三维空间结构, 并直接影响分子与靶酶结合点的结合和对靶酶的抑制, 因此建立了 **1** 和 **4** 的结构模型, 并进行了 X 射线衍射分析。

结果发现, 化合物 **1** 分子中存在着顺式烯醇结构及分子内氢键, 三个羰基处于共平面, C-3 烯醇氢与 C-7 羰基氧呈氢键结合, 二者扭角仅为 1.6° 。当烯醇氢被甲基取代或氯化为化合物 **5** 时, IC_{50} 值增加至 52 或 $64\mu\text{mol/L}$, 此时的化合物 **4** 的构象显示, 由于 7-位羰基与 C-1 羰基及 C-3 上的氧原子的双极排斥而被挤出了 **1**、**3**-二酮系统平面, 且扭角为 58.2° 。此外, 在化合物 **1** 中, C₇-C₂ 的键长为 1.445\AA , 显示该三酮系统的广泛共轭; 但在化合物 **4** 中, 键长为 1.487\AA , 为单键特征。从此也可以说明, C-3 的烯醇氢存在与否则可决定三酮的构象。UV 及极性显示化合物 **1** 的 $\lambda_{\text{max}}=262\text{nm}$, $R_f=0.59$, 化合物 **4** 的吸收波长发生蓝移, $\lambda_{\text{max}}=255\text{nm}$, $R_f=0.17$ 。当羟基被取代或修饰后的化合物中 O(8)-C(7)-C(2)-C(3)均具有较高的扭角($29\sim 61^\circ$), 这是由于分子内两极的排斥, 导致三酮系统的共平面性下降、骨架变形和与 HPPD 酶结合力的下降, 进而显示为活性的降低, 说明分子中烯醇的存在与抑制活性密切相关。尽管化合物 **6** 的扭角为 11.1° , 构象接近所研究的分子模型平面性, 但由于胍基的存在阻止了与酶活性靶位中铁离子的螯合, 进而显示出与酶的低亲和性。该研究结果还表明, 3-位羰基在对 HPPD 抑制中的作用不太明显; 但 7-位羰基的存在与否决定了化合物的活性。尽管化合物 **7** 具有与 NTBC 相同的三酮功能结构, 但由于分子未能构成共平面和形成烯醇, 因而不具有活性。

因此, 从以上研究结果可以看出; 7-位羰基的存在、烯醇的形成能力及三酮系统的共平面性对潜在的 HPPD 抑制剂的效能均具有决定性的作用, 它的存在是抑制剂一个基本特征。

4.4 其它

对三酮类的异构体环己烯-3-酮醇烷基羧酸酯抑制 HPPD 研究表明^[32], 绝大部分化合物的除草活性比较高, 尤其当 R 为环丙烷基时, IC_{50} 为 30nmol/L , 比现已应用于临床的 NTBC 的 $\text{IC}_{50}(40\text{nmol/L})$ 还低。这可能也说明三酮及其异构体与 HPPD 作用时有其相同或相似的地方或在植物体中重新异构化为三酮结构, 且证明酯羰基决定了化合物的抑制活性, 因为是通过它与在酶活性位置的铁离子螯合而起作用^[24]。而烯酮的羰基对活性有增强作用, 这和文献[30]相一致。

在 HPP 羰基的 α 碳上引入强吸电子氟的双羟基氟代产物, 部分化合物为 HPPD 的竞争性抑制剂^[33]。

综上所述有关构效关系的研究工作, 可以得出如下结论:

(1)当 HPPD 抑制剂分子结构中具有异构化为烯醇式异构体的能力或具有烯醇式的等排体及分子 $\text{pK}_a < 6$ (酶反应的最佳条件为 $\text{pH}=7.3$)时, 才有可能具有与 HPPD 活性靶位结合的铁离子配合的能力, 与 HPP 争夺 HPPD, 从而抑制其与酶的结合显示出除草活性。

(2)三酮类抑制剂分子结构中, 苯环上的邻、对位取代基电负性越大, 相应的活性可能越高。环己二酮上增加取代基, 活性增强, 但选择性降低。

(3)HPPD 抑制剂二酮所连羰基对活性至关重要, 如用其它基团代替苯甲酰基, 除个别化合物外, 活性都很差或没有活性。

5 HPPD 酶及抑制剂研究展望

过去的研究使我们对 *Pseudomonas fluorescens* 中的 HPPD 的结构、酶及抑制剂分别在动植物体内的作用机制、抑制剂构效关系有了初步的认识,但对抑制剂与酶如何发生作用、动物与植物体中的酶结构仍然知之甚少。随着科技的进步和科研手段的创新,动植物体中酶结构、抑制剂作用机理的趋于明朗化,新型 HPPD 酶抑制剂的开发将步入一个崭新的快速发展阶段。

参考文献

- [1] 吴彦超, 胡方中, 杨华铮. 农药学报, 2001, 3(3): 1~10.
- [2] F C Bradley, S Lindstedt, J D Lipscomb et al. J. Biol. Chem., 1986, 261(25): 11693~11696.
- [3] N P Crouch, R M Adlington, J E Baldwin et al. Tetrahedron, 1997, 53(20): 6993~7010.
- [4] D L Lee, M P Prisybilla, T H Cromartie et al. Weed Science, 1997, 45(5): 601~609.
- [5] K E Pallett, J P Little, M Sheekey et al. Pestic. Biochem. & Phys., 1998, 62: 113~124.
- [6] 唐除痴, 李煜昶, 陈彬. 农药化学, 天津:南开大学出版社, 1998: 481.
- [7] M Giovanni, E Brian. S M R Tellez et al., Photo, 2002, 59: 281~288.
- [8] 张荣升. 农药译丛, 1999, 21(1): 60.
- [9] G Isabelle, J Dominique, M Michel. Biochemistry, 2000, 39: 7501~7507.
- [10] L Sven, O Birgit, R Marianne. Biochemistry, 1977, 16(15): 3369~3377.
- [11] L Robert, E William. H S H et al. Eur. J. Biochem., 1981, 117: 311~318.
- [12] M K Ellis, A C Whitfield, L A Gowans et al. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1995, 133: 12~19.
- [13] A H Coufal, C Monder. Arch. Biochem. Biophys., 1980, 199: 67~75.
- [14] I Garcia, M Rodgers, R Pepin et al. Plant Physiol., 1999, 119: 1507~1516.
- [15] S Laurence, S Alain, S Denise et al. Structure, 1999, 7: 977~988.
- [16] S Goodwin, B Witkop. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79: 179.
- [17] S Lindstedt, B Odelhog. Methods Enzymol., 1987, 142: 139~142.
- [18] G A Hamilton. Prog. Bioorg. Chem., 1971, 1: 83.
- [19] C W Jefford, P A Cadby. Experientia, 1981, 37: 1134.
- [20] C W Jefford, P A Cadby. Prog. Chem. Org. Nat. Proc, 1981, 40: 191.
- [21] J T Grove, M Van der Puy. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98: 5290.
- [22] A Robert, J R Pascal, A Michael et al. Biochemistry, 1985, 24: 3158~3165.
- [23] M K Ellis, A C Whitfield, L A Gowans et al. Chem. Res. Toxicol., 1996, 9: 24~27.
- [24] M P Prisybilla, B C Onisko, S M Shribbs et al. Proc. British Crop Prot. Conf.-Weeds, 1993, 2: 731~738.
- [25] L L David, M P Prisybilla, T H Cromartie et al. Weed Science, 1997, 45: 601~609.
- [26] D L Lee, C G Knudsen, W J Michaely et al. Pestic. Sci., 1998, 54: 377~384.
- [27] Y L Lin, C S Wu, S W Lin et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters., 2000, 10: 843~845.
- [28] D L Lee, C G Knudsen, J B Tarr et al. Presented at the Second Pan Pacific Conf Pestic Sci 24~27 october 1999, Honolulu.
- [29] M Glynn, W B David, T E Fraser et al. Pest Manag. Sci., 2001, 57: 120~128.
- [30] D L Lee, W J Michaely. USP: 4,681,621.
- [31] C S Wu, J L Huang, Y S Sun et al. J. Med. Chem., 2002, 45: 2222~2228.
- [32] S W Lin, D Y Yang. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9: 551~554.
- [33] T S Ling, S Shiu, D Y Yang. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7: 1459~1465.