

钼氧转移酶与氧迁移反应

娄福艳 鲁晓明* 宋富根

(首都师范大学化学系 北京 100037)

摘 要 钼氧转移酶可以催化生物体内的氧迁移反应。本文介绍了钼氧转移酶的基本分类、钼氧转移酶的喋呤辅因子以及氧迁移反应,概述了钼氧转移酶的活性端结构、钼氧转移酶的催化机理和氧迁移反应过渡态的研究近况。

关键词 钼氧转移酶 氧迁移反应 喋呤辅因子

Molybdenum Oxotransferase and Oxo-transfer Reaction

Lou Fuyan, Lu Xiaoming*, Song Fugen

(Department of Chemistry, Capital Normal University Beijing 100037)

Abstract Oxo-transfer reaction is catalyzed by molybdenum oxotransferase. This paper introduces the types and the classification of molybdenum oxotransferase, pterin cofactor of the oxomolybdoenzyme and oxo-transfer reaction. The current research state about oxotransferase catalysis mechanism and the transition state during the oxo-transfer reaction have been reviewed.

Key words Molybdenum oxotransferase, Oxygen atom transfer reactivity, Pterin cofactor

自 20 世纪 50 年代起,研究发现除固氮酶外,生物体内还存在另一类酶,包括黄嘌呤氧化酶、硝酸盐还原酶、亚硫酸盐氧化酶和醛氧化酶等,均含有金属钼组分。1995 年,从波谱分析主要是从钼的 EXAFS 和 EPR 谱中得到钼氧转移酶活性端的结构信息,尔后分别测得此类钼酶的活性部位几乎均是以单核钼为配位中心的小分子配合物(该小分子配合物被命名为活性结构因子)。此类含钼的酶可以催化氧迁移反应,因而被称为钼氧转移酶。研究钼氧转移酶和其活性端结构以及其催化的氧迁移反应,有助于了解钼氧转移酶与生物大分子的作用部位和作用机理,为仿生合成钼氧转移酶的活性结构因子、更好地利用和开发钼氧转移酶活性结构因子的生化特性奠定基础。

1 钼氧转移酶的分类

1.1 钼氧转移酶定义

钼氧转移酶存在于大多数的有机体内,对有机体内的碳、氮、硫等元素的新陈代谢起重要作用^[1]。迄今为止所发现的钼氧转移酶,绝大多数在其活性部位内都有一个或两个含有二硫烯基团的配体与钼配位,有的钼氧转移酶还键合一个或两个终端氧配位原子^[2]。大多数的钼氧转移酶在其活性部位都存在 Mo=O 双键结构单元,因此又被称为氧钼酶。由于它们催化可以指向

娄福艳 女, 24 岁, 硕士生, 现从事钼配合物的合成与性质研究工作。*联系人, E-mail: lu-xiaoming@263.net

2003-08-27 收稿, 2003-12-22 接受

底物或从底物出发的氧迁移反应，如前所述，也被称为氧转移酶。不过，有一些多硫化物的还原酶如甲酸盐脱氢酶，并不能催化氧迁移反应；而还有一些酶，并不含有 $\text{Mo}=\text{O}$ 基团，但习惯上仍称为钼氧转移酶^[1]。

1.2 钼氧转移酶分类

Hille^[1]在多年对钼酶研究的基础上，把钼氧转移酶分为三大类：黄嘌呤氧化酶、亚硫酸盐氧化酶和 DMSO 还原酶。其基本分类如图 1 所示。

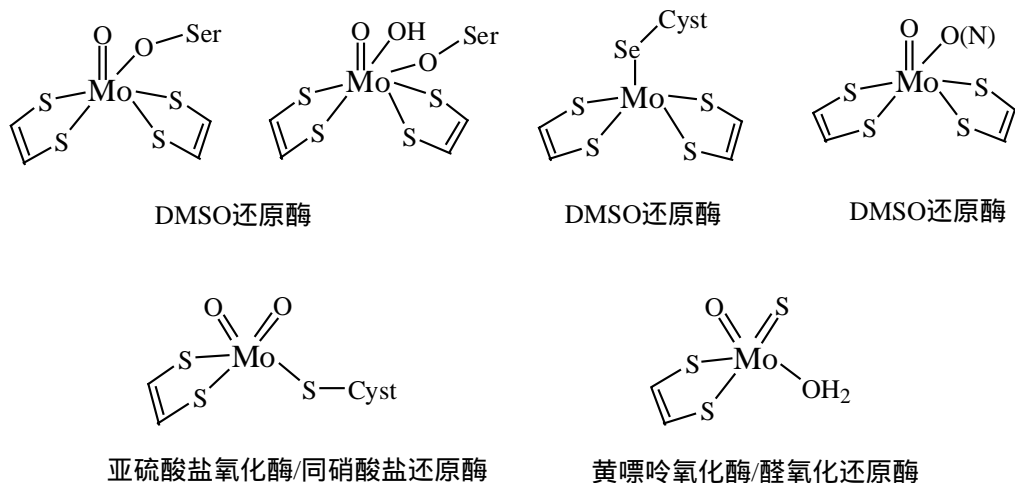


图 1 钼氧转移酶的分类

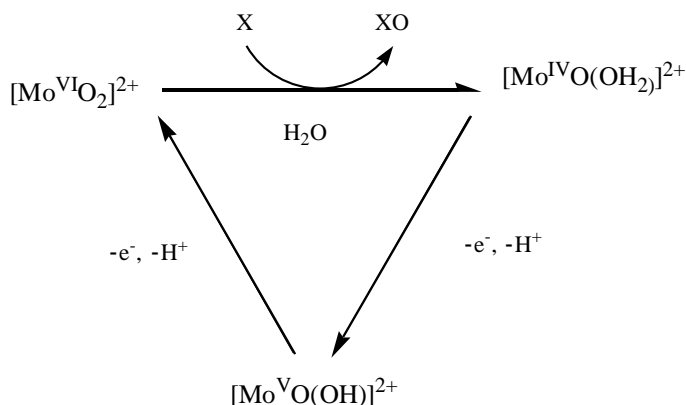
Fig.1 The classification of molybdenum oxotransferase

(1) DMSO 还原酶包含的钼氧转移酶种类很多，研究较多的有 DMSO 还原酶本身、三甲胺氮氧化还原酶(TMAOR)、异硝酸盐还原酶和甲酸盐脱氢酶。DMSO 还原酶的活性部位含有一个 $\text{Mo}=\text{O}$ 单元，两个喋呤辅因子通过其二硫烯侧链与金属钼中心配位形成两个五元环。DMSO 还原酶只具有一个氧化还原活性中心即钼配位中心。此类酶在可见/近红外区域有较强的吸收，可以利用这些吸收来研究钼中心反应的动力学机理。(2) 亚硫酸盐氧化酶主要包括亚硫酸盐氧化酶和同硝酸盐还原酶，这些酶的活性部位含有一个 MoO_2 单元，即有两个终端 $\text{Mo}=\text{O}$ 双键结构，单个喋呤辅因子通过其二硫烯侧链与金属钼中心配位。亚硫酸盐氧化酶均催化杂原子上的或指向杂原子的氧迁移反应。(3) 黄嘌呤氧化酶包括黄嘌呤氧化酶和醛氧化还原酶，其活性部位含有一个 $\text{Mo}=\text{O}$ 单元和一个 $\text{Mo}=\text{S}$ 单元，单个喋呤辅因子通过其二硫烯侧链与金属钼中心配位，可催化羟化反应。

2 钼氧转移酶催化的氧迁移反应

2.1 钼氧转移酶催化循环

人们对钼氧转移酶的物理化学性质进行了一系列的研究，总结出了催化反应的催化循环过程。Xiao 等^[3]通过图 2 简单地描述了模拟氧转移酶的物理化学性质的催化循环过程，当加入底物 X 和 H_2O 之后， $[\text{Mo O}_2]^{2+}$ 被还原变成 $[\text{Mo O}(\text{OH}_2)]^{2+}$ ，同时底物 X 被氧化生成氧化产物 XO。 $[\text{Mo O}(\text{OH}_2)]^{2+}$ 又通过一个单电子过程被氧化为 $[\text{Mo O}(\text{OH})]^{2+}$ ，然后进一步失去一个电子和一个质子被氧化为 $[\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2]^{2+}$ 。

图 2 钼氧转移酶的催化循环^[3]Fig.2 Catalytic cycle of molybdenum oxotransferase^[3]

2.2 氧迁移反应

2.2.1 氧迁移反应的基本类型 不同种类的酶，由于活性部位结构的不同，催化的氧迁移反应也不相同。一些已知的钼氧转移酶，包括黄嘌呤氧化酶、亚硝酸盐还原酶和亚硫酸盐还原酶都含有一个相似的钼活性中心，能催化如下所示的一类反应^[4]：



其中 X 是接受氧原子和给出氧原子的底物。

那些不包含硫氧基团的钼转移酶催化的氧迁移反应则为^[5]：

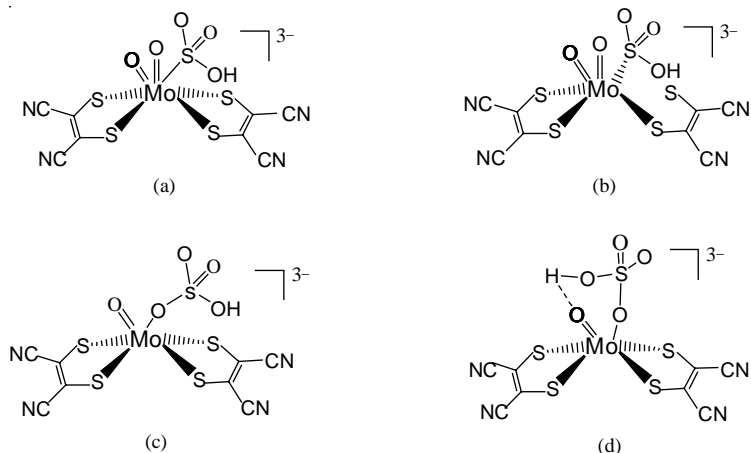


其中 X 为任意底物，L 为配体。

2.2.2 氧迁移反应的模拟体系 人们利用 XAS、IR、EPR、NMR 和电化学等手段对在生物体内的钼氧转移酶催化的反应进行了一系列的研究，模拟了很多类似的体系。

Pietsch 等^[6]从理论上研究了 Xiao 等提出的能够模拟钼氧转移酶物理化学过程的最简单的循环(图 2)。他们的研究表明：主要的氧原子迁移通过过渡态发生，先驱氧在这些化合物的活性中发挥重要作用，其结论与 Rappe 等的结论^[7]一致。同时，还有人对类似体系的联合过渡态进行了分析，这些结果与 Pietsch 提出的过渡态理论相吻合。

Deeth 等^[8]对模拟亚硫酸盐氧化酶的试验模型进行了研究。他们利用密度函数和扩展的休克尔计算方法研究了 $[MoO_2(mnt)_2]^{2-}$ 和 HSO_3^- 的反应，提出了三种可能的反应机理，所形成的可能中间体如图 3 所示：(1) HSO_3^- 中的 S 进攻亚硫酸盐氧化酶上活性部位的钼中心，形成七配位的过渡态(a)和(b)；(2) HSO_3^- 中的 S 直接进攻亚硫酸盐氧化酶上活性部位的终端氧原子(c)；(3) HSO_3^- 中的 S 进攻终端氧原子， HSO_3^- 中的 OH 与另一个终端氧形成氢键。研究表明，硫原子上的电子对进攻终端氧原子，形成一个能垒为 89.9kJ/mol 的六配位的过渡态，而硫原子上的电子对直接进攻钼中心时，尽管得到相同的产物，但该情况下的能量比直接进攻氧形成的过渡态的能量至少高 50.2kJ/mol。

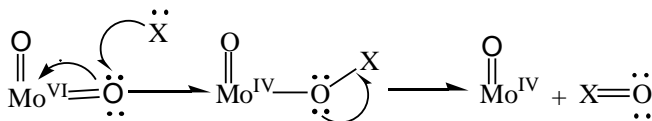
图 3 $[\text{MoO}_2(\text{mnt})_2]^{2-}$ 和 HSO_3^- 反应的可能的中间体^[8]Fig.3 Some possible intermediates for the reaction between $[\text{MoO}_2(\text{mnt})_2]^{2-}$ and HSO_3^- ^[8]

Inscore 等^[9]对另一个类似体系的电子吸收和磁循环二色性分析发现,在含有二硫烯基团的配体的体系中,存在两个由配体向金属转移电子的低能量键。他们的研究结果同样表明,先驱氧是非常重要的,因为它控制了钼的已填充 d 电子的 d 轨道的方向,进而影响配体的 S 原子与 Mo 配位成键的程度。

Holm 等对逆向氧迁移反应的模拟体系进行了研究,他们利用 ^{18}O 为标记,研究了一系列不同底物的氧迁移反应,每种底物都展现了二级动力学,并有较负的活化熵。这同样说明在反应机理的速率控制步骤存在联合的过渡态。

Thomson 等^[4]利用密度函数理论研究了具有亚氢硫醇盐螯环配体的二氧化钼配合物的模拟体系,其研究结果和 Holm 等^[10]的研究结果一致。而且,他们认为氧转移酶的催化循环是一个经由联合过渡态的二级反应,他们还给出了理论上的每一步反应的吉布斯自由能,该数值和实验值几近相同。

2.2.3 氧迁移反应机理 尽管人们已经对不同种类的酶所催化的氧迁移反应进行了研究,提出了过渡态假设和二级反应的机理。然而,对具体催化反应的机理的仍然难以确定。Holm 等^[11]根据对逆向氧迁移反应的研究,提出了图 4 所示的一个氧迁移反应的可能机理。底物 X 靠近 $\text{Mo}(\text{O})_2$ 配合物中的一个氧,形成一个底物-氧 δ 键即 X - O 键, $\text{Mo}=\text{O}$ 双键中的 π 键电子向钼金属离子中心的迁移削弱了 $\text{Mo}=\text{O}$ 双键,同时,氧原子从钼原子上离开,形成 $\text{Mo}(\text{O})$ 和 OX 。

图 4 氧迁移的可能机理^[11]Fig.4 The possible mechanism of the oxo-transfer^[11]

3 氧迁移反应中钼氧转移酶的活性部位

由于蛋白质的敏感性和脆弱性,使对钼氧转移酶中活性部位的研究相当困难。主要的研究

手段为蛋白质的晶体结构的测定、X 射线吸收和 EXAFS 研究。而对酶的 X 射线结构分析可能会导致酶活性部位的改变, 而且在对蛋白质进行结晶的过程中也很难说不改变钼氧转移酶活性部位的结构。

3.1 钼酶活性部位的结构

钼酶辅因子的概念在 30 多年前首先被 Paterman 等^[12]提出。他们对一系列缺乏钼的硝酸盐还原酶和黄嘌呤氧化酶的变异细胞的活性进行研究, 证明这两种酶含有同样的辅因子。Nason 等^[13]基于对从变异的菌株中得到的缺乏钼的亚硝酸盐还原酶改组的研究支持了这个结论。随之, 对其它的氧转移酶如甲酸盐氧化酶、亚硫酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶中的辅因子的研究也得出同样的结论: 单核钼氧转移酶都有一个或两个与金属钼直接配位的喋呤二硫烯辅因子, 其结构如图 5 所示, 它们和不同的底物反应表现出不同的活性。

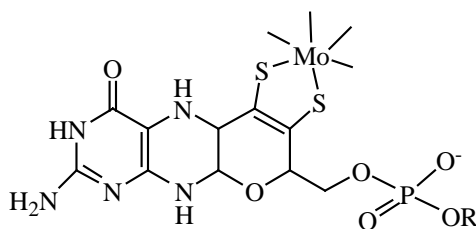


图 5 钼氧转移酶的喋呤辅因子的结构^[1]

Fig.5 Structure of the pterin cofactor in molybdenum oxotransferase^[1]

Rajagopalan 等^[14-16]率先对喋呤辅因子进行了研究, 通过对钼氧转移酶的蛋白质晶体结构的测定发现: 喋呤辅因子由一个和钼中心直接成键的喋呤[2-氨基-4(1H)喋呤二酮]构成, 喋呤中包含一个具有二硫烯功能的吡喃环, 它在酶中对钼中心起到一个二齿配体的作用, 在这些酶中, 磷酸盐基团直接和一个核苷酸相连。

蛋白质晶体结构表明^[17], 亚硫酸盐氧化酶家族和黄嘌呤氧化酶家族的每一种酶只有一个和金属钼相连的喋呤辅因子, 而 DMSO 还原酶和甲酸盐脱氢酶则为两个喋呤辅因子与同一个钼相配位。

喋呤辅因子很难从与之相连的蛋白质上分开, 不过, Davies 等^[17]合成了这一类的物质, 并进行了波谱学和电化学性质的测定。

3.2 钼氧转移酶活性部位尚待进一步研究的问题

尽管对钼酶辅因子的结构以及对结构和功能之间的联系的研究取得了一定的进展^[18,19], 但 Gsrton 等^[20-22]在研究的过程中却发现在 DMSO 还原酶家族的喋呤辅因子仍然存在有很多未解决的问题。比如在晶体状态时, 氧化状态和还原状态的酶的喋呤-二硫烯配体是不对称配位的; 而在溶液中, 根据 EXAFS 和共振的拉曼光谱推断配位却是高对称性的。同样, 晶体状态和溶液中氧转移酶的喋呤-二硫烯配体的配位模式也不相同。除此之外, 相同和相似的酶的晶体结构与从 EXAFSA 推断出来的结构也不吻合。

3.3 钼氧转移酶活性结构因子钼配合物的仿生合成和表征

由于钼氧转移酶的活性部位对钼氧转移酶的性质相当重要, 目前关于钼氧转移酶活性结构因子的仿生配合物的合成已有报道, 这些配合物的配体从四个单齿配体到一个四齿配体, 钼金

属离子的价态由低价 Mo()至高价 Mo()。Donahue 等^[23]合成了一系列与氧钼酶活性部位结构相似的氧钼二(二硫烯)配合物,并对它们进行了质谱、晶体学、IR、电化学、UV/Vis、EPR 和 ¹H 以及 ¹³C NMR 谱的研究。Holm 等^[24,25]合成了一系列与 DMSO 还原酶家族的钼酶活性部位结构相似的钼配合物,并对它们进行了 X 射线吸收、XAS、EXAFS 和一些物理性质的研究。同时, George 等^[26]也对 DMSO 还原酶家族的活性部位结构相似的钼配合物进行了 EPR 和 XAS 的研究。这些研究结果,对于研究钼氧转移酶的结构与生物活性、研究钼氧转移酶与生物大分子的作用部位和作用机理、开发和利用钼氧转移酶的活性结构因子的生化功能具有重要的意义。

参考文献

- [1] R Hille. Chem. Rev., 1996,96: 2757~2816.
- [2] A S McAlipine, A G McEwan, S J Bailey. Mol. Biol., 1998, 275: 613~617.
- [3] Z Xiao, C G Young, J H Enemark et al. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114: 9194~9195.
- [4] L M Thomson, M B Hall. J. Am. Chem. Soc., 2001, 123: 3995~4002.
- [5] B E Schultz, S F Gheller, R H Holm et al. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115: 2714~2722.
- [6] M A Pietsch, M B Hall. Inorg. Chem., 1996, 35: 1273~1278.
- [7] A K Rappe, W A Goddard. J. Am. Chem. Soc., 1982, 104: 3287~3294.
- [8] A Thapper, R J Deeth, E Nordlander. Inorg. Chem., 1999, 38: 1015~1019.
- [9] F E Inscore, R McNaughton, B L Westcott. Inorg. Chem., 1999, 38: 1401~1410.
- [10] R H Holm, B E Schultz. Inorg. Chem., 1993, 32: 4243~4247.
- [11] R H Holm, J M Berg. Acc. Chem. Res., 1986, 19: 363~370.
- [12] J A Pateman, D J Cove, D B Robert. Nature., 1964, 201: 58~60.
- [13] K Y Nason, P A Ketchum, H Y Cambrier. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 66: 1016~1023.
- [14] J L Johnson, B E Hainline, K V Rajagopalan. J. Biol. Chem., 1980, 255: 1783~1786.
- [15] J L Johnson, B E Hainline, K V Rajagopalan et al. J. Biol. Chem., 1984, 259: 5414~5422.
- [16] E C Taylor, P S Ray, K V Rajagopalan et al. J. Am. Chem. Soc., 1989, 111: 7664~7665.
- [17] E S Davies, R L Beddoes, D Collison et al. J. Am. Chem. Soc., Dalton Trans., 1997, 3985~3995.
- [18] R Hille. J. Biol. Inorg. Chem., 1996, 1: 397~404.
- [19] M J Romao, R Huber. Struct. Bonding., 1998, 90: 69~95.
- [20] S D Garton, J Hilton, H Oku et al. J. Am. Chem. Soc., 1997, 119: 12906~12916.
- [21] A S McAlpine, A G McEwan, A L Shaw et al. J. Biol. Inorg. Chem., 1997, 2: 690~701.
- [22] F Schneider, R Huber, H Schindeline et al. J. Mol. Biol., 1996, 263: 53~69.
- [23] J P Donahue, C R Goldsmith, R H Holm et al. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120: 12869~12881.
- [24] K B Musgrave, B S Lim, R H Holm et al. Inorg. Chem., 2000, 39: 263~273.
- [25] K M Sung, R H Holm. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124: 4312~4320.
- [26] G N Gorge, J Hilton, C Temple et al. J. Am. Chem. Soc., 1999, 121: 1256~1266.