萤火虫生物发光中加氧反应机理的理论研究

于沫涵^a 程媛媛^b 刘亚军^{*,a}

(^a 北京师范大学化学学院 理论及计算光化学教育部重点实验室 北京 100875)

(^b 东华理工大学 江西省质谱科学与仪器重点实验室 南昌 330013)

摘要 萤火虫生物发光是最常见的生物发光, 在生物和医药等领域已得到重要应用. 发光过程涉及到其活体内的一系列复杂的化学反应. 引起发光的起始反应是单重态荧光素分子与三重态氧气的加成反应. 这是一个自旋禁阻的酶催化反应, 通常效率很低, 但萤火虫是目前将化学能转化为光能最高效的系统. 这个自旋禁阻的反应为什么能高效率发生? 实验研究认为该反应由单电子转移(SET)诱发而发生, 但对反应的详细过程和机理并没有完整的描述. 本工作通过理论计算, 描述了该反应的完整过程, 解释了这个自旋禁阻反应高效发生的原因.

关键词 荧光素; 氧化; 机理; 单电子转移; 密度泛函理论

Mechanistic Study of Oxygenation Reaction in Firefly Bioluminescence

Yu, Mohan^a Cheng, Yuanyuan^b Liu, Yajun^{*,a}

(^a Key Laboratory of Theoretical and Computational Photochemistry, Ministry of Education, College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

(^b Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract As the most common bioluminescence (BL), firefly BL, is of great significance in the fields of biotechnology, biomedicine and so on. The entire BL process involves a series of complicate *in vivo* chemical reactions. The BL is initiated by the enzymatic oxidation of luciferin. This is a spin-forbidden reaction of low efficiency, because that luciferin is in singlet state and O₂ is in triplet state. However, firefly is till-now the most efficient system of converting chemical energy to light energy. Why this spin-forbidden reaction occurs efficiently? A single electron transfer (SET) mechanism has been confirmed on this reaction by experiments. However, there is lack of a complete and detailed description of the mechanism and reaction process. Via a calculation of density functional theory (DFT), this article described the complete process of this reaction. The oxygenation of luciferin is initiated by a SET from singlet L³⁻ to triplet O₂ to form RC³[L²⁻...O₂⁻]. Then the reaction is carried out on the potential energy surface (PES) of triplet state (T₁), on which O₂⁻ performs a nucleophilic attack on C4 of L²⁻. There is an intersystem crossing between the ground (S₀) and T₁ PESs nearby the first transition state (TS1). After the ISC (intersystem crossing), the reaction continuously undergoes on the S₀ PES to produce dioxetanone FDO⁻ via two TSs and two intermediates (Ints). The analysis on electron densities and natural orbitals indicates that there is a quick reaction of biradical annihilation around the ISC. About 11.9 kcal·mol⁻¹ energy is needed to reach the ISC before the whole reaction occurs on the S₀ PES. The highest barrier of the reactions on the S₀ PES is only 4.2 kcal·mol⁻¹. The biradical annihilation around the ISC and the very low energy barriers explain the reason of the spin-forbidden reaction with high efficiency. This study is helpful for understanding the initiation of firefly BL and the other oxygen-dependent BL.

Keywords luciferin; oxygenation; mechanism; single electron transfer; density functional theory

1 引言

生物发光是一种有趣的现象, 给自然界增加了闪亮的色彩^[1,2]. 大多数的发光生物(80%)生存于海洋之中^[3], 而人们最熟知的发光生物是萤火虫(firefly)^[4]. 萤火虫生物发光的光量子产率达 0.41^[5], 已在基因表达、体内成像、药物筛选等生命科学和医学技术领域得到广泛的应用. 萤火虫属于鞘翅目萤科(Lampyrinae)^[6], 目前发

现有超过 2000 种萤火虫广泛分布于世界各地. 经过多年的实验^[7-9]和理论研究^[10-13], 人们认识到萤火虫生物发光的过程包含荧光素(LH₂)催化氧化生成高能中间体、高能中间体解离生成发光体、发光体发出可见光和荧光素分子的再生四个阶段. 后三个阶段的机理得到了详细的理论研究和机理阐释^[14-16], 但第一阶段的反应机理至今仍未有全面可靠的理论研究. 这一氧化反应是萤火虫生物发光, 也是所有氧气依赖型的生物发光体系的

* E-mail: yajun.liu@bnu.edu.cn

Received June 25, 2020; published July 15, 2020.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21673020, 21973005, 21421003).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21673020, 21973005, 21421003)资助.

启动反应. 对该反应的正确认知对所有氧气依赖型的生物发光的机理理解都具有重要意义. 这正是本工作的研究目的.

荧光素氧化生成高能中间体的反应可以细化为两个半反应^[17](图 1): 腺苷化反应和加氧反应. 腺苷化反应在众多生物体系中普遍存在, 已有成熟的实验^[18,19]和理论研究^[20-22], 研究结果一致认为该反应过程为: LH_2 在荧光素酶的催化下与腺苷三磷酸-镁离子复合物(ATP-Mg^{2+})发生 $\text{S}_{\text{N}}2$ 亲核取代反应, 由亲核试剂进攻 ATP 的 α 位点, 脱去焦磷酸-镁离子复合物(PPi-Mg^{2+}), 生成荧光素-腺苷一磷酸复合物(LH-AMP). 其中 ATP 为萤火虫闪烁发光提供能量^[23], Mg^{2+} 用于稳定构象和屏蔽 ATP 中的负电荷^[23]. 加氧反应的大致过程为: LH-AMP 复合物与 O_2 发生加氧反应, 伴随 AMP 的离去, 生成四元环结构的高能中间体即萤火虫 1,2-二氧环丁酮(FDO^-)^[24]. 2015 年, Branchini 等^[25]在萤火虫生物发光的化学模型反应中检测到了超氧负离子($\text{O}_2^{\cdot-}$), 由此提出了萤火虫生物发光由 LH_2 到 O_2 的单电子转移(SET)诱发. 首先荧光素分子的 C_4 位(见图 1)的质子被附近的氨基酸残基脱去而形成 LH_2^- 离子, 这一过程也得到了理论计算的验证^[26]. 随后从 LH-AMP 到 O_2 的 SET 产生 LH-AMP 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 从而诱发之后的加氧反应. 尽管 SET 机理产生 LH-AMP 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 得到很强的实验证据支持, 但随后从 $\text{LH-AMP} + \text{O}_2^{\cdot-}$ 到 FDO^- 的反应过程和路径并没有明确完整的描述. LH-AMP 中苯并噻唑环羟基上的质子(见图 1), 在荧光素酶环境中容易失去^[7,27]. 另外, 实验^[28]和理论计算^[14,15]工作都指认了 FDO^- (苯并噻唑环羟基去质子化)是 LH_2 催化氧化的产物和下一阶段反应-高能中间体解离的反应物. 因此, LH_2 催化氧化反应的实际反应物为 $\text{L}^{2-}\text{-AMP} + \text{O}_2$ (见图 2). AMP 侧链柔性很大且距离反应中心很远, 为了计算的方便, 我们使用去质子化的磺酸基($-\text{OSO}_3^-$)代替 AMP. 本工作最终采用的计算模型为 $\text{L}^{3-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FDO}^- + \text{SO}_4^{2-}$ (见图 2). 目前在真

实蛋白环境计算整个反应过程不现实. 计算考虑了荧光素酶活性口袋的极性, 详见计算方法部分.

2 结果与讨论

三重态的 O_2 分子与单重态的底物分子 L^{3-} 反应, 必须经过自旋翻转, 才会最终得到单重态的产物 FDO^- . 三重态转换为单重态的过程在没过渡金属离子等磁性物质催化的条件下, 只能通过两个二重态的自由基重排的方式生成自旋对称性允许的单重态双自由基. 首先 L^{3-} 的 C_4 位负电荷转移到的 $^3\text{O}_2$ (SET) 形成 L^{2-} 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基对. 这一步已得到证实, 无需进一步计算. 我们要研究的是从 L^{2-} 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 形成的反应复合物 RC 到 FDO^- 的过程. RC 自由基对存在两种形式 $^3[\text{L}^{2-} \cdots \text{O}_2^{\cdot-}]$ 和 $^1[\text{L}^{2-} \cdots \text{O}_2^{\cdot-}]$.

首先以 $^1[\text{L}^{2-} \cdots \text{O}_2^{\cdot-}]$ 作为初始反应物. 在 $^1[\text{L}^{2-} \cdots \text{O}_2^{\cdot-}] \rightarrow \text{FDO}^-$ 的反应过程中, 从 RC 到产物(P)共优化得到两个中间体(Int1 和 Int2)和三个过渡态(TS1、TS2 和 TS3), 见图 3. 频率分析显示 TS1 (-266.6 cm^{-1})、TS2 (-194.2 cm^{-1}) 和 TS3 (-173.5 cm^{-1}) 的唯一虚频分别对应 C_4-O_a 、 C_6-O_b 和 C_6-O_8 键的伸缩振动. 各稳定点的关键几何结构参数见附录数据(SI)中的表 S1. 关键的几何结构参数的变化及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 L^{2-} 两部分电荷变化分别总结在图 4 中. $^1[\text{L}^{2-} \cdots \text{O}_2^{\cdot-}]$ 中 O_a-O_b 键长为 $1.218 \text{ \AA}$, 长于正常的三重态氧气分子 $^3\text{O}_2$ 的键长(约为 $1.205 \text{ \AA}$). $\text{O}_2^{\cdot-}$ 由 L^{3-} 到 $^3\text{O}_2$ 的 SET 刚刚生成时, 其电荷密度 $\rho(\text{O}_2^{\cdot-})$ 应为 -1.00 |e| . 而在 RC 复合物形成过程中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的电荷部分转移给 L^{3-} , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 部分的电荷变为 -0.16 |e| . 结合图 3 和图 4A 可见, 随着反应的进行, C_4-O_a 的键长由 RC 中的 $2.655 \text{ \AA}$ 缩短为 $2.219 \text{ \AA}$, 并伴随 $\text{C}_6-\text{C}_4-\text{O}_a-\text{O}_b$ 二面角向四元环闭合方向的调整, 形成 TS1. RC 和 TS1 的 $\langle S^2 \rangle$ 分别为 0.96 和 0.60 , 说明两者都具有双自由基性质. TS1 之后, 双自由基性质消失. 从 RC 到 TS1 克服 $2.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的能垒之后, C_4-O_a 键长继续缩短, C_6-C_4-

图 1 荧光素酶催化氧化反应阶段的两个半反应

Figure 1 Two half reactions in enzymatic oxygenation of luciferin (LH_2)

图2 采用的计算模型及关键原子标号

Figure 2 Computational model and labels of key atoms

$\text{O}_a\text{-O}_b$ 二面角扭转, 达到 **Int1**. **Int1** 之后 $\text{C}_4\text{-O}_a$ 键长几乎不再变化. 如图 4B 所示, 在此区域内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的电荷 $\rho(\text{O}_2^{\cdot-})$ 约为 -1.15 |e| , 可以说明 **Int1** 就是 C_4^- 过氧键加成离子. 随后 $\text{C}_6\text{-O}_b$ 键长曲线和 $\text{C}_6\text{-C}_4\text{-O}_a\text{-O}_b$ 二面角曲线先快速下降, 之后 $\text{C}_6\text{-O}_b$ 键长曲线趋于平坦, 翻越

$1.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 **TS2** 能垒. $\text{C}_6\text{-C}_4\text{-O}_a\text{-O}_b$ 二面角继续扭转形成四元环结构, 得到 **Int2**. $\text{C}_6\text{-O}_8$ 键长从加氧反应开始就基本保持不变, **Int2** 之后 $\text{C}_6\text{-O}_8$ 键开始断裂, 导致去质子化的磺酸基离去, 经过能垒为 $4.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 **TS3**, 伴随 $\text{C}_6\text{-C}_4\text{-O}_a\text{-O}_b$ 二面角的轻微调整, 最终得到 **P**. 如图 3 所示, 在反应过程中, $L^{\cdot-}$ 电子态的性质也在变化. 不同性质的代表性电子态自然轨道见表 S2. 据自然轨道分析, 反应开始 $L^{\cdot-}$ 为 $^2\Pi_g$ 组态, 随着 $\text{C}_4\text{-O}_a$ 键长的缩短, O_2 分子中单占的 n 轨道与底物分子 $L^{\cdot-}$ 上的轨道接近, 经过 **TS1** 变为闭壳层组态(closed-shell state), 此时所有成键轨道都是双占的. 我们简称为 $^1(^2\Pi_g\text{-O}_2^{\cdot-})/\text{closed-shell}$. 如图 4B, **TS1** 之前, $L^{\cdot-}$ 的电荷向 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 迁移, 随后 $L^{\cdot-}$ 的电荷降为 -1.85 |e| , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 电荷升为 -1.15 |e| . 在 4.292 到 $37.126 \text{ amu}^{1/2}\cdot\text{bohr}$ 区间内, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 电荷一直保持 -1.15 |e| . **TS2** 生成后 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 电荷部分回迁至 $L^{\cdot-}$ 部分, 最终得到产物时 $L^{\cdot-}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 两部分的电荷分别为 -2.42 |e| 和 -0.58 |e| . 当 $^3[L^{\cdot-}\cdots\text{O}_2^{\cdot-}]$ 作为初始反应物时, 反应过

图3 UM06-2X/6-31G**计算的从 $^3[L^{\cdot-}\cdots\text{O}_2^{\cdot-}]/^1[L^{\cdot-}\cdots\text{O}_2^{\cdot-}]$ 到 **FDO** 的反应位能曲线及稳定点的结构. 其中红色、黄色、黑色、蓝色和白色小球分别代表 O、S、C、N 和 H 原子. (ΔG 单位为 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Figure 3 UM06-2X/6-31G** calculated potential energy curve of reaction from $^3[L^{\cdot-}\cdots\text{O}_2^{\cdot-}]/^1[L^{\cdot-}\cdots\text{O}_2^{\cdot-}]$. Here, red, yellow, black, blue and white balls represent oxygen, sulfur, carbon, nitrogen and hydrogen atoms. (The units of ΔG is $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)

图4 UM06-2X/6-31G**计算的O₂^{•-}和L^{•2-}沿IRC的关键几何结构参数和电荷变化

Figure 4 The variation of key geometric parameters and the natural charge distribution on O₂^{•-} and L^{•2-} along the IRC calculated by UM06-2X/6-31G**

程中各稳定点的第一三重态(T₁)能量基于相应的S₀构型进行评估, 见图3. 对于T₁态, 在RC处L^{•2-}同样为²Π_g组态. 随后³[L^{•2-}...O₂^{•-}]在TS1附近出现(n,π^{*})组态的性质. 其中n指O_a和O_b上的p轨道, π^{*}主要分布在L^{•3-}中N=C-C=N共轭结构的反键π轨道. 随着二面角向四元环闭合方向扭转, O₂^{•-}的π^{*}轨道与分布在L^{•3-}上的π轨道耦合, 在Int1形成前表现出(π,π^{*})的性质. 随后C₆-O_b逐渐成键, O₂^{•-}部分电荷回迁至L^{•2-}上, T₁态仍然表现出(π,π^{*})的性质, 这里π和π^{*}轨道都分布在L^{•2-}上. 我们将T₁态简写为³(²Π_g-O₂^{•-})/³(n,π^{*})/³(π,π^{*}). ³[L^{•2-}...O₂^{•-}]比¹[L^{•2-}...O₂^{•-}]的能量低11.9 kcal•mol⁻¹. 在TS1附近S₀态能量下降T₁态能量上升, 两条能量曲线交叉后T₁态能量远远高于S₀态能量. 由于TS1附近S₀态与T₁态能量近简并(在TS1处相差约7.6 kcal•mol⁻¹, 见表S3)而且过TS1后能量更接近, 这意味着在TS1附近存在一个S/T交叉点(intersystem crossing, ISC). 不幸的是, 目前所使用的计算方法不能优化S₀/T₁交叉点. 该体系合理的活化空间大小已超出目前多组态方法的处理能力. 我们在萤火虫生物发光的SET加氧过程中^[29]也遇到类似情况. 但在研究细菌生物发光时, 对于较小体系的类似反应采用多组态计算确实得到了S₀/T₁交叉点^[30]. 从图4可见, 反应从³[L^{•2-}...O₂^{•-}]出发, 先在T₁位能面上进行, 随后经过S₀/T₁交叉点, 沿S₀位能面生成¹FDO⁻.

3 结论

本工作采用密度泛函理论, 首次使用模型分子详细研究了萤火虫生物发光的起始反应-荧光素催化氧化生成高能中间体的步骤. 反应由单重态L^{•3-}到三重态O₂的SET诱发, 先生成RC³[L^{•2-}...O₂^{•-}]. 随后O₂^{•-}亲核进攻L^{•2-}的C₄位, 并在TS1附近经过S₀/T₁的ISC. 之后, 反应沿S₀位能面进行, 经过过渡态TS2和TS3生成FDO⁻. 电子密度和自然轨道结果表明, 在ISC附近发生

双自由基湮灭的快速反应. 反应从三重态位能面开始, 到达ISC约需11.9 kcal•mol⁻¹能量, 随后反应在S₀位能面进行. 在S₀位能面进行的反应最高的能垒仅为4.2 kcal•mol⁻¹. ISC附近的双自由基湮灭和S₀位能面的超低能垒充分说明这个自旋禁阻的反应可以高效率发生. 研究结论对理解萤火虫高效生物发光具有重要的理论意义, 也对理解其它氧气依赖型生物发光体系的起始反应有帮助.

4 计算方法

采用M06-2X^[31]/6-31G**计算. 该级别的密度泛函理论(DFT)^[32,33]计算适合现在的研究体系^[34,35]. 因为所研究的反应涉及到三重态和开壳层单重态的体系, 因此整个反应路径上的稳定点和过渡态的优化和频率分析均使用非限制性开壳层方法结合对称性破损(broken-symmetry, BS)技术. 萤火虫荧光素酶的活性口袋是一个疏水的空腔, Gilson^[36]和Pitera^[37]等分别在1986年和2001年对空腔的静态介电常数(ε)进行了估算, 约为2到4. 在此我们选用二甲亚砜(DMSO)(ε=2.25)用类导体极化连续介质模型(conductor-like polarizable continuum model, CPCM)^[38]来模拟环境的极性. DMSO也是生物发光的实验研究中常用的极性溶剂^[39]. 通过内禀反应坐标(intrinsic reaction coordinate, IRC)计算确定所优化得到的各过渡态正确连接对应的反应物和产物. 反应过程的电荷变化采用了自然布居分析(natural population analysis, NPA). 所有稳定态的能量都进行了零点能校正. 计算使用了Gaussian 09程序包^[40].

References

- [1] Chen, F.; Liu, S.; Duan, X. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 1035 (in Chinese). (陈浮, 刘树深, 段欣甜, 化学学报, **2013**, *71*, 1035.)
- [2] Wilson, T.; Hastings, J. W. *Annu. Rev. Cell. Dev. Bi.* **1998**, *14*, 197.
- [3] Haddock, S. H. D.; Moline, M. A.; Case, J. F. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2010**, *2*, 443.

- [4] Lee, J. *Bioluminescence, the Nature of the Light*, University of Georgia, **2020**, pp. 102~114.
- [5] Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomot, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. *Nat. Photonics* **2008**, *2*, 44.
- [6] Wood, K. V. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 662.
- [7] Ugarova, N. N.; Brovko, L. Y. *Luminescence* **2002**, *17*, 321.
- [8] Schmidt, S. P.; Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1966.
- [9] Day, J. C.; Tisi, L. C.; Bailey, M. J. *Luminescence* **2004**, *19*, 8.
- [10] Navizet, I.; Liu, Y.-J.; Ferre, N.; Xiao, H.-Y.; Fang, W.-H.; Lindh, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 706.
- [11] Orlova, G.; Goddard, J. D.; Brovko, L. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6962.
- [12] Wilsey, S.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Robb, M. A.; Murphy, S.; Adam, W. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 1669.
- [13] Min, C.; Li, Z.; Cui, X.; Yang, X.; Huang, S.; Wang, S.; Ren, A. *Chin. J. Org. Chem.* **2015**, *35*, 432 (in Chinese). (闵春刚, 李作盛, 崔小英, 杨喜昆, 黄绍军, 王绍华, 任爱民, 有机化学, **2015**, *35*, 432.)
- [14] Yue, L.; Liu, Y.-J.; Fang, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11632.
- [15] Yue, L.; Lan, Z.; Liu, Y.-J. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 540.
- [16] Cheng, Y.-Y.; Liu, Y.-J. *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 1720.
- [17] Branching, B. R.; Rosenberg, J. C.; Fontaine, D. M.; Southworth, T. L.; Behney, C. E.; Uzasci, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11088.
- [18] Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2651.
- [19] Westheimer, F. H. *Science* **1987**, *235*, 1173.
- [20] Barrozo, A.; Blaha-Nelson, D.; Williams, N. H.; Kamerlin, S. C. L. *Pure Appl. Chem.* **2017**, *89*, 715.
- [21] Duarte, F.; Åqvist, J.; Williams, N. H.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1081.
- [22] Duarte, F.; Barrozo, A.; Åqvist, J.; Williams, N. H.; Kamerlin, S. C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10664.
- [23] Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed., W. H. Freeman and Company, New York, **2013**, pp. 1370~1380.
- [24] Koo, J.-Y.; Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6107.
- [25] Branchini, B. R.; Behney, C. E.; Southworth, T. L.; Fontaine, D. M.; Gulick, A. M.; Vinyard, D. J.; Brudvig, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7592.
- [26] Berraud-Pache, R.; Lindh, R.; Navizet, I. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 5173.
- [27] Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2385.
- [28] Shimomura, O. In *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, **2006**.
- [29] Ding, B. W.; Liu, Y. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1106.
- [30] Luo, Y.; Liu, Y.-J. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123*, 4354.
- [31] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *120*, 215.
- [32] Perdew, J. P.; Ruzsinszky, A.; Tao, J. M.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Csonka, G. I. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, A1133.
- [33] Dreuw, A.; Head-Gordon, M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4009.
- [34] Boggio-Pasqua, M.; Heully, J.-L. *Theor. Chem. Acc.* **2015**, *135*, 9.
- [35] Ess, D. H.; Cook, T. C. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 4922.
- [36] Gilson, M. K.; Honig, B. H. *Biopolymers* **1986**, *25*, 2097.
- [37] Pitera, J. W.; Falta, M.; van Gunsteren, W. F. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2546.
- [38] Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669.
- [39] Nakatani, N.; Hasegawa, J.-y.; Nakatsuji, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8756.
- [40] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision D*. Gaussian Inc., Wallingford, **2009**.

(Cheng, B.)