

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18750011
 研究課題名（和文） 生体分子による金属活性中心の電子状態および反応の制御に関する理論的研究
 研究課題名（英文） Theoretical study of the electronic structure of the active site of metalloproteins
 研究代表者
 鷹野 優 (TAKANO YU)
 大阪大学・蛋白質研究所・助教
 研究者番号：30403017

研究成果の概要：遷移金属蛋白質の機能制御機構を明らかにするため、多核遷移金属中心をもつ酸素運搬蛋白質であるヘモシアニンおよびヘムエリスリンに対して理論計算(密度汎関数法)を用いて、周りの蛋白質により活性中心の電子構造がどのように制御されているかを調べた。その結果、蛋白質により誘起される活性中心の構造ゆがみ、活性中心に配位するアミノ酸残基の電子構造の双方が電子構造を制御し、そのバランスにより機能発現に至っていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	300,000	4,000,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：電子状態・量子化学・生体分子・遷移金属

1. 研究開始当初の背景

計算化学では実験では測ることのできない速い生体反応の中間体および遷移状態を求め、可視化することができるという利点を持っている。しかしながら理論化学・計算化学では、本来生体物質の機能などを理論的に取り扱うために反応中心の電子状態に加え、活性中心の構造を制御する生体分子の挙動を考慮に入れなければならない。周りの生体分子は反応中心の構造を制御するので、その挙動を理論計算により調べる必要がある。しかし、金属が関与する生体物質に関する理論的研究をそのような方針で行っている研究

に関してはほとんどなかった。

特に本研究で対象となる軟体動物や甲殻類の血液に含まれる酸素運搬蛋白質であるヘモシアニンに関してはE. I. Solomonが酸素との結合解離に対する量子化学計算(Metz and Solomon (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4938–4950)が行われているが、二核銅中心に配位するヒスチジンをNH₃に換えた最小モデルを用いており、さらには本申請で着目している種による配位環境の違いに関する研究は皆無であった。

また、ヘムエリスリンに対してはR. A. Friesner (Wirstam et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**,

125, 3980–3987), E. I. Solomon (Brunold and Solomon *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8288–8295)のように理論的研究が報告されているが蛋白質がどのように電子構造に影響しているかについては研究はなされていなかった。

2. 研究の目的

蛋白質等の生体分子と相互作用することで、金属は酵素反応や神経伝達等の生命活動に重要な役割を果たしている。従って金属と生命活動との相互関係を明らかにすることは生命現象に関する理解を深めるだけでなく、新しい物質・薬剤設計に大きく寄与すると考える。しかしながら金属を含む生体分子は複雑な電子状態を示す。そこで強相関係の研究で得られた知見を基にして理論計算を用いた金属と生体分子の相互作用の分子レベルでの解明を目指す。

具体的には以下のことを行う。

(1)ヘモシアニンの活性中心における配位子の影響

ヘモシアニンは軟体動物や甲殻類の血液に含まれる酸素運搬蛋白質である。その金属活性中心にはtypeIIIと呼ばれる銅二核中心があり、6個のヒスチジンが配位している。これまで理論計算ではヒスチジンをNH₃に換えた最小モデルを用いられてきたこと、またモデル錯体による研究では配位子によってその電子構造や機能に影響があることが報告されているが、その詳細な電子構造への影響等は調べられていない。そこで理論計算により配位子による金属活性中心への影響を調べ、アミノ酸残基の二核銅中心への配位がヘモシアニンの機能にどのような変化をもたらすのか、その配位環境の変化が銅二核中心の電子構造にどのように影響するかを明らかにする。

(2)ヘムエリスリンの機能制御機構

ヘムエリスリンとメタンモノオキシゲナーゼはその金属活性中心が二核のノンヘム鉄からできており、配位環境も μ -oxo酸素架橋がありヒスチジンやグルタミン酸が配位している等非常に類似している。しかしながら、ヘムエリスリンは数種の海洋性無脊椎動物に含まれる酸素運搬蛋白質であり、メタンモノオキシゲナーゼはメタンからメタノールへの酸素化を触媒する酵素であり、それらの機能は全く異なる。そこで配位環境のわずかな変化がどのようにして機能の大きな変化に至るのかを理論計算により調べる。

3. 研究の方法

多核金属蛋白質の活性中心の化学結合様式を

密度汎関数法により詳細に調べるためには汎関数の適切な選定が重要である。その指標として活性中心の磁氣的相互作用に着目した。まずは様々な汎関数を用いて磁氣的相互作用を計算し、実験で得られた値と比較したところ、二核の金属活性中心ではBHandHLYP法が最良の汎関数であることがわかった。それを酸素運搬蛋白質であるヘムエリスリン、ヘモシアニンの酸素結合脱離時における金属活性中心に適用した。次にこれを用いて得られたヘムエリスリン、ヘモシアニンの酸素結合脱離時の電子状態に対する自然軌道解析およびeffective bond order解析を行うことで蛋白質がどのように多核金属蛋白質の活性中心の電子構造や化学結合様式に影響を与え、機能を制御しているかを調べた。

4. 研究成果

(1)ヘモシアニンの活性中心における配位子の影響

酸素運搬蛋白質であるヘモシアニンの可逆的な酸素結合能に関して密度汎関数法を用いて調べた。ヘモシアニンは軟体動物や甲殻類の血液に含まれ、その活性中心は二核の銅イオンを含みヒスチジンが3個ずつ配位している。以前の我々の研究(Takano et al. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *335*, 395-403)ではヒスチジンをアンモニアに置換した従来の理論計算モデルではその酸素の結合エネルギーが小さいこと、一方初めてヘモシアニンの酸素結合構造(Cu(μ - η^2 : η^2 O₂)Cu構造)を再現した合成モデル[Cu(HBpz₃)₂(O₂)] (HBpz₃ = hydrotris{3,5-diisopropyl-pyrazolyl}borate) (Kitajima et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8975-8976)では不可逆的に酸素を結合することから、銅イオンの配位子が酸素結合の制御に重要であると考えられる。そこで、銅イオンの酸素結合における配位子の効果を明らかにするため、様々な配位子を用いたヘモシアニンのモデルを考え密度汎関数法による理論計算を実施し配位子効果を調べた。配位子としてはアンモニア、ヒスチジンの側鎖であるメチルイミダゾール、HBpz₃を用いた。その結果、ヘモシアニンでは μ - η^2 : η^2 O₂架橋配位子を介した σ 型の軌道相互作用をしていること、配位子は銅イオンの軌道エネルギーを制御しており、アンモニア、メチルイミダゾール、HBpz₃の順に酸素結合に関わる銅のd軌道エネルギーが酸素のLUMOに近づいていった。この軌道エネルギーの準位が近づくほど酸素との軌道相互作用が大きくなり酸素結合性に違いが生じていることがあきらかとなった。ヒスチジンは結合できないアンモニアモデルと不可

逆な結合をするHBp_{z3}モデルの中間にあり、このことが可逆的な酸素結合を発現するものと考えられる。また、ヘモシアニンのモデル錯体の電子構造をBHandHLYP法を用いて調べた所、同酸素間の結合距離や構造ゆがみが銅と酸素の結合性に大きく影響を与えていることが明らかとなった。

(2)ヘムエリスリンの機能制御機構

生体は、呼吸や光合成などの生命維持に必要とされる機能を実現するために微量の金属を利用している。その際、周りの蛋白質が配位することで金属の持つ特性を制御しており、その機構を明らかにすることは生命現象の理解に重要である。

そこで、まず、海棲無脊椎動物に含まれる酸素運搬蛋白質であり、二核の鉄活性中心をもつヘムエリスリン(Hr)の活性中心が蛋白質のつくる構造歪みや静電相互作用によりどのような影響を受けるのかを密度汎関数法を用いて調べた。

Thermite dyscritum Hr の X 線結晶構造解析のデータ(PDB ID: 1HMO (酸素結合型)、1HMD (酸素非結合型))をもとに、二核鉄活性中心に配位するヒスチジンをメチルイミダゾールに、アスパラギン酸とグルタミン酸を酢酸イオンに置き換えたモデルを構築した。

BHandHLYP 法による計算の結果、ヘムエリスリンの二核鉄活性中心では μ -O および μ -OH 架橋配位子を介した σ 、 π 型の軌道相互作用、配位している Asp や Glu のカルボキシル基を介した δ 型の軌道相互作用をしていること、その相互作用の大きさが $\sigma > \pi \gg \delta$ となっていることが明らかとなった。また構造最適化した結果と比較すると、X 線結晶構造を用いたものの方が活性中心で強い軌道相互作用を示すことがわかった。このことから周りのタンパク質は活性中心の構造をひずませることで軌道相互作用の強さを制御しており、タンパク質により誘起される活性中心の構造ゆがみが活性中心の電子構造に大きく影響し機能発現を導くのに寄与していると推測される。

次に蛋白質環境の静電相互作用による効果を調べるため、分極連続対近似(PCM)(比誘電率 4.0)および点電荷近似を使った。蛋白質の点電荷には、AMBER96 force field のものを用いた。

その結果、Hr の酸素結合に関わる鉄の d 軌道の軌道エネルギーと酸素の *軌道の軌道エネルギーの差を算出したところ、PCM や点電荷近似により蛋白質の静電場の効果が入れることで、軌道エネルギーの差が減少した。このことから、蛋白質がつくる静電場は、d 軌道の軌道エネルギーを上昇させ、鉄と酸素

の軌道相互作用を強めると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

K. Koizumi, K. Yamaguchi, H. Nakamura, Y. Takano, "Theoretical studies on electronic structure and magnetic properties of mixed-valence uteroferrin active site", *Int. J. Quantum Chem.*, in press, 2009. 査読有

Y. Takano, H. Nakamura, "Electronic structures of heme *a* of cytochrome *c* oxidase in the redox states -Roles of Propionate and Formyl Groups in Electron Transfer-", *J. Comput. Chem.* in press, 2009. 査読有

Y. Takano, K. Koizumi, H. Nakamura, "Theoretical studies of the magnetic couplings and the chemical indices of the biomimetic models of oxyhemocyanin and oxytyrosinase", *Inorg. Chim Acta* in press, 2009. 査読有

K. Koizumi, K. Yamaguchi, H. Nakamura, Y. Takano, "Hybrid-DFT study on electronic structures of the active site of sweet potato purple acid phosphatase -The origin of stronger antiferromagnetic couplings than other purple acid phosphatase-", *J. Phys. Chem. A* 113, 5099-5104, 2009. 査読有

H. Yamasaki, Y. Takano, H. Nakamura, "Theoretical investigation of the electronic asymmetry of the special pair cation radical in the photosynthetic type-II reaction center", *J. Phys. Chem. B*, 112, 13923-13933, 2008. 査読有

Y. Takano, H. Nakamura, "A Theoretical Approach to a Novel Pathway of Proton Translocation of Cytochrome *c* Oxidase.", *AIP Conf. Proc.* 1046, 60-63, 2008. 査読無

Y. Takano, H. Isobe, K. Yamaguchi, "Theoretical studies on electronic structures and chemical indices of the active site in oxygenated and deoxygenated hemerythrin", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 81, 91-92, 2008. 査読有

H. Yamasaki, H. Nakamura, Y. Takano, "Theoretical analysis of the electronic asymmetry of the special pair in the photosynthetic reaction center: Effect of the protein environment and structural asymmetry", *Chem. Phys. Lett.* 447, 324-329, 2007. 査読有

M. Shoji, H. Isobe, Y. Takano, Y. Kitagawa, S. Yamanaka, M. Okumura, K. Yamaguchi, "Theory of chemical bonds in metalloenzymes. IX. Theoretical study on the active site of the ribonucleotide reductase and the related species", *Int. J. Quant. Chem.* 107, 3250-3265, 2007. 査読有

Y. Takano, K. Yamaguchi, "Hybrid density functional study of ligand coordination effects on

the magnetic couplings and the dioxygen binding of the models of hemocyanin", *Int. J. Quant. Chem.* 107, 3103-3119, 2007. 査読有

Y. Takano, H. Nakamura, "Quantum mechanical study of the proton transfer via a peptide bond in the novel pathway of proton translocation of cytochrome *c* oxidase.", *Chem. Phys. Lett.*, 430, 149-155, 2006. 査読有

[学会発表](計16件)

鷹野優・小泉健一・山口兆・中村春木、"ヘムエリスリンの活性中心の電子構造への蛋白場の影響"、第9回蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本全日空ホテルニュースカイ

鷹野優・小泉健一・山口兆・中村春木、"タンパク質がつくる静電場のヘムエリスリンの活性中心の電子構造への影響"、日本化学会第89回春季年会、2009年3月30日、日本大学

Yu Takano, Haruki Nakamura, "Density functional study of the roles of heme side chains and axial ligands", 49th Sanibel Symposium, 2009年2月27日、The King and Prince Golf & Beach Resort, Georgia

鷹野優・小泉健一・山口兆・中村春木、"酸素運搬タンパク質ヘムエリスリンの活性中心の電子構造に関する理論的研究"、スーパーコンピュータワークショップ2009、2009年1月19日、分子科学研究所

鷹野優・小泉健一・山口兆・中村春木、"金属蛋白質の多核活性中心の電子構造および化学結合様式に関する理論的研究—酸素運搬蛋白質ヘムエリスリンへの適用—"、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月5日、博多国際会議場

鷹野優・小泉健一・山口兆・中村春木、"ヘムエリスリンの活性中心の化学結合様式に関する理論的研究"、第2回分子科学討論会2008福岡、2008年9月27日、博多国際会議場

鷹野優・山口兆・中村春木、"酸素運搬タンパク質ヘムエリスリンの活性中心の電子構造および化学結合様式に関する理論的研究"、第102回触媒討論会、2008年9月25日、名古屋大学

Yu Takano, Kizashi Yamaguchi, and Haruki Nakamura, "Electronic Structures and Chemical Indices of the Active Site of Oxygenated and Deoxygenated Hemerythrin", WATOC2008, 2008年9月14日、Sydney

鷹野優・小泉健一・山口兆・中村春木、"酸素運搬蛋白質ヘムエリスリンの化学結合様式に関する理論的研究"、次世代生命体統合シミュレーション研究開発プロジェクト分子ス

ケール研究開発チーム成果発表会

鷹野優・山口兆・中村春木、"ヘムエリスリンの活性中心の電子構造および化学結合様式に関する理論的研究"、第8回蛋白質科学会、2008年6月11日、タワーホール船堀

Yu Takano, Haruki Nakamura, "Theoretical study of the roles of heme side chains and axial ligands", 48th Sanibel Symposium, 2008年2月26日The King and Prince Golf & Beach Resort, Georgia

Yu Takano, Haruki Nakamura, "Molecular orbital study of the proton transfer through a peptide bond -A theoretical approach to a novel pathway of proton translocation of cytochrome *c* oxidase-, ICCMSE2007, 2007年9月26日, Marbella Corfu Hotel, Greece,

鷹野優・中村春木、"チトクロムc酸化酵素のheme aの酸化還元における電子構造変化とプロトン移動との関係"、第1回分子科学討論会2007仙台、2007年9月18日、東北大学

Yu Takano, Kizashi Yamaguchi, "The Nature of the Copper-Oxygen Bonds in Hemocyanin by Hybrid DFT Calculation of Effective Exchange Integrals and Dioxygen Binding Energy via Ligand Coordination Effects", 47th Sanibel Symposium, 2007年2月25日、The King and Prince Golf & Beach Resort, Georgia

鷹野優・中村春木、"分子軌道法によるチトクロムc酸化酵素の新しいプロトン輸送経路の考察"、分子構造総合討論会2006、2006年9月23日、静岡グランシップ

Yu Takano, Haruki Nakamura, "Quantum mechanical approach to a novel pathway of proton translocation of cytochrome *c* oxidase", Material-oriented Quantum Chemistry, 2006年5月28日、Osaka

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷹野 優 (TAKANO YU)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号：30403017

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：