

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18750048

研究課題名（和文）金属酸素活性種が関与する酵素反応の全原子計算

研究課題名（英文）QM/MM study on the oxygen active species in metalloenzymes

研究代表者

蒲池 高志 (KAMACHI TAKASHI)

九州大学・先導物質化学研究所・学術研究員

研究者番号：40403951

研究成果の概要：本研究では量子化学計算を用いて、金属酵素活性種が有する特殊な電子状態や反応性を解析した。特に QM/MM 法を用いた計算から、酵素全体の影響を考慮したより現実に近い検討を行った。これらの成果により、これまで 9 報が学術論文誌に掲載された。また、国内外の学会で積極的に発表を行い高い評価を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
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・無機化学

キーワード：量子化学・酵素反応・遷移状態

1. 研究開始当初の背景

現代化学においても最も困難な命題のひとつとされる不活性炭化水素の化学修飾は生体内で様々な金属酵素により分子状酸素を酸化剤として高効率に触媒されていることが知られている。これらの酵素の活性中心には鉄、銅、マンガンなどの遷移金属が存在しており、アルカンの C-H 結合活性化のような化学的に困難な反応を生理的な条件下で失敗なく繰り返し行っている。これらの反応機構が解明されれば高機能人工触媒の開発も夢ではなく、化学、生物学、農学、医学といった多くの分野の研究者がこれら金属酵素の研究を行っている。

2. 研究の目的

金属酵素のメカニズムを探るためには不安定中間体や遷移状態の情報を得ることが不可欠であるが、それらを実験から探ることは困難である。量子化学計算はこれらの解析をする上で最適な選択肢である。量子化学計算には大型で高価な実験装置や試薬を使う必要がなく、危険を全く伴わないうえに、量子力学の原理により、計算機上あらゆる分子の本質的挙動を容易に再現できるため、実験的には検討困難な反応の検討や詳細な電子的特性の評価が可能となる。本研究では金属酵素の全原子を考慮した大

規模量子化学計算を実行することで、これらの酵素が生体内で実現している原子レベルの精緻な活性機構とその電子のおよび量子的特性について理論的に明らかにする。

3. 研究の方法

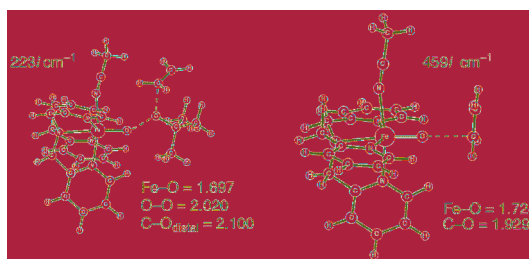
本研究では近年注目を集めている QM/MM 法により、酵素全原子を含む量子化学計算を行う。QM/MM 法とは基質と相互作用する活性部位近傍は量子力学に則り、その周辺は古典的に記述する近似方法であり、化学現象の起こる部位を高精度に取り扱い、周辺は近似法により高速に計算することが可能になる。

4. 研究成果

(1) ビタミン B12 依存型酵素の反応機構に関する理論的研究：コバラミンの関与する B12 依存型酵素の反応では、Co-C 結合がホモリティックに開裂することにより生成する炭素ラジカルがその反応において主役を演ずると考えるのが一般的である。ところが、最近 Buckel らは B12 依存型酵素のひとつであるメチルコバラミンではコバラミンが反応に直接関与するのではないかと興味深い考察を行っている。もしこの提案が正しいとすれば、ラジカル酵素の代表と認識されている多くの B12 依存型酵素の反応機構を見直す必要が生ずる。そこで我々は Co-C 結合が開裂すると同時に基質の水素原子を引き抜くような遷移状態が存在するのではないかと予想し、詳細な反応経路解析を行った。その結果 C-H 結合の開裂とリボースへの移動が協奏反応として起こることを確認した。しかも、この遷移状態は、Co-C 結合がホモリティックに開裂後に生成した炭素ラジカルが基質の水素原子を引き抜く反応よりも 7 kcal/mol もエネルギー的に有利であることが分かった。(Angew. Chem. Int. Ed. 46, 980, (2007).)

(2) アルキルペルオキシ鉄(III)錯体の反応性に関する理論的研究：ヘムや非ヘム鉄酵素による触媒反応において生成する反応性中間体は、生物無機化学や生化学の分野で熱心に研究されている。これらの研究を通じてヘム、非ヘムの鉄オキシ中間体は様々な炭化水素の酸化反応に対して重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、Nam らとの共同研究により、非ヘム鉄錯体 (TPA)Fe(ClO₄)₂ を用いたオレフィンの酸化反応に関して実験と DFT 計算の両面からその理論的解析を行った。アルキルペルオキシ錯体 [(TPA)Fe^{III}-OO*t*-Bu] がエチレンを直接酸化する反応経路と O-O 結合のラジカル的な開裂を経て生成したオキシ錯体が反応活性種となるふたつの反応経路についてそのエネルギー変化を解析した。下図にアルキル

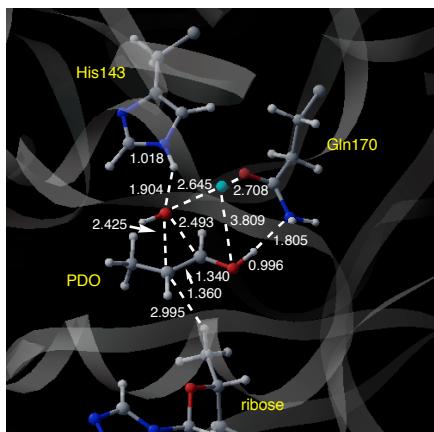
ペルオキシ錯体とオキシ錯体がエチレンを酸化する過程の遷移状態の最適化構造を示す。計算の結果、反応の初期段階である O-O 結合開裂の活性化エネルギーは 24.5 kcal/mol であり、アルキルペルオキシ種が直接反応する場合の活性化エネルギー 44.0 kcal/mol より低いことが判明した。このため、鉄オキシ種の生成が速やかに進行するものと予想される。つづくエチレンの酸化過程では、活性化エネルギーの高い第一段階目の C-O 結合の生成が律速であることが示唆された。この反応経路は P450 の反応と類似しており、実験結果も考慮すると非ヘムのアルキルペルオキシ鉄錯体もまた有用な酸化剤となりうると判明した。また、アルキルペルオキシ錯体の第 6 配位子が O-O 結合の活性化に大きく影響を与えることを明らかにした。(Angew. Chem. Int. Ed. 46, 2291, (2007).)



(3) QM/MM 法によるジオールデヒドラターゼ変異体の反応性解析：ビタミン B12 は生体内に取り込まれると、アデノシルコバラミンに変換され、十数種の酵素の補酵素として働く事が知られている。近年、Toraya、Yasuoka らはジオールデヒドラターゼの X 線構造解析を行い、基質 1,2-プロパンジオールはアデノシルコバラミン中の Co から約 11.7 Å の距離にある K⁺ に配位していることを見出した。以前我々のグループではこの X 線構造に基づき、全原子(約 13500 原子)を含む現実モデルを構築し、QM/MM 法を用いてこの反応の理論的解析を行った。本研究では活性部位アミノ酸残基の反応への寄与を推定するため、活性部位残基のいくつかを置換することで変異体モデルを構築し、それらの触媒機能を考察した。

この反応において重要なアミノ酸残基と考えられてきた His143 を Ala に置換したジオールデヒドラターゼ変異体 His143Ala および、Glu170 を置換した Glu170Gln、Glu170Ala、Glu170Ala/Glu221Ala の合計四つの変異体について QM/MM 計算によりその触媒機構を明らかにした。これらの変異体についても、野生型と同様に基質から 1,1-diol radical への転換は水素引き抜きと水酸基転移の二段階で進行する。下図に Glu170Gln 変異体での水酸基転移の遷移状態の最適化構造を示す。このとき活性化エネルギーは 17.4 kcal/mol となり、野生型での活性化エネルギー 13.6 kcal/mol に

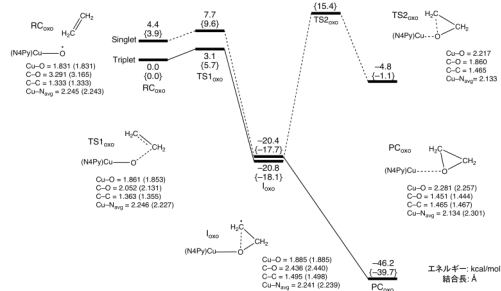
比べて、大きく上昇することが判明した。実験的にもこの変異体は野生型の1%以下の活性しかないことが知られており、この高い活性障壁が反応の進行を妨げていると予想される。野生型においてはGlu170が1位の水酸基からのプロトンを引き抜くことで遷移状態を安定する(pull effect)のに対して、Glu143Gln変異体では、導入されたGlnは弱い塩基であるため基質との相互作用が弱い。これが変異体での反応性低下の直接的原因であることが判明した。(Chemistry – A European Journal, 13, 7864, (2007).)



(4) 銅(II)ヒドロペルオキシ錯体によるエチレンのエポキシ化反応に関する理論的研究: 銅ヒドロペルオキシ種およびオキシ種は、ドーパミン-β-モノオキシゲナーゼ(DBM)をはじめとする酵素の活性中心に含まれ、重要な役割を担っていると考えられている。この反応活性部を模した錯体は有用な触媒となることが期待されるものの、その反応性および反応機構の詳細は未だ解明されていない。そこで本研究では、密度汎関数法に基づく解析によりN,N-bis(2-pyridyl-methyl)-N-bis(2-pyridyl)methylamine (N4Py)を配位子とする銅錯体(N4Py)Cu-OOHによるエチレンのエポキシ化反応の理論的解析を行うことを目的とし、ヒドロペルオキシ錯体が直接基質を酸化する反応経路と、O-O結合のラジカル的開裂を経て生成したオキシ錯体が基質を酸化する反応経路について、それぞれエネルギー変化の検討を行った。

銅ヒドロペルオキシ種[(N4Py)Cu-OOH]⁺による反応では、エチレンの炭素が近位酸素と結合するものと、遠位酸素と結合するものの2つの反応経路を考慮した。前者の活性化エネルギーは26.3 kcal/molであり、後者では39.7 kcal/molである。一般に、単核銅活性酸素錯体は低温条件下でのみ存在する。そのため、活性化エネルギーの高いこれらの反応は、進まないと考えられる。

銅オキシ種[(N4Py)Cu=O]⁺によるエチレンのエポキシ化反応のエネルギーダイアグラムを図1に示す。反応の初期状態において、銅-オキシ種とエチレン分子は反応物錯体(RC_{oxo})を形成する。このとき、3重項および開殻1重項状態の2つの電子状態が存在し、3重項状態が4.4 kcal/molだけ安定である。また、3重項(1重項)状態の銅および酸素原子のスピン密度はそれぞれ、0.6(-0.6)と1.3(0.7)である。RC_{oxo}は、酸素原子とエチレンの炭素原子が共有結合を形成する遷移状態(TS1_{oxo})を経てラジカル中間体(I_{oxo})となる。この過程は、活性障壁が3重項と1重項状態それぞれ3.1および3.3 kcal/molであり、およそ20 kcal/molの発熱過程である。I_{oxo}は3重項と1重項状態のエネルギーが非常に近い。これは、スピン多重度を定める炭素上の不対電子が、銅原子に対して磁気的影響をほとんど及ぼさないからである。I_{oxo}において、酸素原子が不対電子を有する炭素と共有結合を形成し、閉環すると、生成物(PC_{oxo})となる。この過程の活性障壁は、3重項状態では31.7 kcal/molであるが、1重項状態では無障壁である。以上より、この反応は発熱的で活性障壁が非常に低いため、銅-オキシ種は高い反応性を持つことが明らかとなった。しかし、銅-ヒドロペルオキシ種と銅-オキシ種のエネルギー差を見積もったところ、後者が40.2 kcal/mol不安定であった。従って、銅-ヒドロペルオキシ種から銅オキシ種の生成は通常困難であると考えられる。(The Journal of Physical Chemistry A 112, 13102, (2008).)



(5) ビタミンB12由来の酵素であるジオールデヒドラターゼには、中心金属としてK⁺イオンを含む、ふたつのサイトの存在が確認されている。ひとつは、基質が取り込まれ、反応が進行するサイト(基質結合部位)、もうひとつは、アデノシルコバラミンのアデニン部位が結合するサイト(アデニン部結合部位)である。この実験では、基質結合部位における金属-酸素の平均結合長は約2.4 Å、アデニン部結合部位では約2.9 Åとなっており、大きな差異が見られる。一方、典型的なK-O結合の長さは2.8 Åであり、過去に我々

が行った計算で求められた K-O 結合長についても、X 線構造における基質結合部位に比べて長いものとなった。以上のことから、我々はこれら金属イオンの再同定を理論的に行うことにした。

B3LYP/SV(P)レベルの計算における、基質結合部位の中心金属-酸素結合長を求めた。RMS 値を比較すると、Ca²⁺を中心金属イオンとした場合に最も小さくなっており、0.1 Å の誤差は X 線構造と非常によく合致している範囲だと言える。また、アデニン部結合部位では、K⁺イオンの場合に RMS 値が最小となった。以上から、アデニン部結合部位では従来通り K⁺イオンが存在していると考えられるが、基質結合部位の金属イオンとしては Ca²⁺イオンが最も妥当であり、理論的計算が X 線構造解析の結果を正すこととなった。

(*The Journal of Physical Chemistry B* in press.)

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 9 件)

- (1) P. M. Kozlowski, T. Kamachi, T. Toraya, K. Yoshizawa, *Angewandete Chemie International Edition*, **46**, 980, (2007). 査読有
- (2) M. S. Seo, T. Kamachi, T. Kouno, K. Murata, M. J. Park, K. Yoshizawa, W. Nam, *Angewandete Chemie International Edition*, **46**, 2291, (2007). 査読有
- (3) K. Yoshizawa, T. Nakayama, T. Kamachi, P. M. Kozlowski, *The Journal of Physical Chemistry A* **111**, 852, (2007). 査読有
- (4) T. Kamachi, T. Toraya, K. Yoshizawa, *Chemistry – A European Journal*, **13**, 7864, (2007). 査読有
- (5) T. Kamachi, T. Nakayama, K. Yoshizawa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **81**, 1212, (2008). (BCSJ Award Article) 査読有
- (6) A. Staykov, T. Kamachi, T. Ishihara, K. Yoshizawa, *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 19501, (2008). 査読有
- (7) T. Kamachi, Y.-M. Lee, T. Nishimi, J. Cho, K. Yoshizawa, W. Nam, *The Journal of Physical Chemistry A* **112**, 13102, (2008). 査読有

(8) T. Kamachi, M. Takahata, T. Toraya, K. Yoshizawa, *The Journal of Physical Chemistry B* in press. (Journal Cover) 査読有

(9) T. Kamachi, T. Nakayama, O. Shitamichi, K. Jitsumori, T. Kurihara, N. Esaki, K. Yoshizawa, *Chemistry – A European Journal*, in press. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- (1) Takashi Kamachi and Kazunari, Yoshizawa
“Water-assisted oxo mechanism for heme metabolism”
XIIth International Congress of Quantum Chemistry, Kyoto May 21st 2006.
- (2) Takashi Kamachi, Tetsuo Toraya, Kazunari, Yoshizawa
“Theoretical Study on the Mechanism of Catalysis of Coenzyme B₁₂-Dependent Diol Dehydratase”
EUROBIC 2006, Portugal July 2nd 2006.
- (3) 蒲池高志、虎谷哲夫、吉澤一成
“QM/MM 法によるジオールデヒドラターゼ変異体の反応性解析”
分子構造総合討論会 2006、静岡、2006 年、9 月 20 日
- (4) 蒲池高志、吉澤一成
“ジオールデヒドラターゼ変異型酵素の反応性に関する理論的解析”
第 9 8 回触媒討論会、富山、2006 年、9 月 26 日
- (5) 蒲池高志、虎谷哲夫、吉澤一成
“ジオールデヒドラターゼ変異型酵素の反応性に関する理論的解析”
日本化学会西日本大会 2006、沖縄、2006 年、11 月 18 日
- (6) 蒲池高志、虎谷哲夫、吉澤一成
“ジオールデヒドラターゼ変異型酵素の反応性に関する理論的検討”
日本化学会第 87 春季年会、大阪、2007 年、3 月 25 日
- (7) T. Kamachi, P. M. Kozlowski, T. Toraya, K. Yoshizawa
“Stabilization of Substrate Radicals by Cob(II)alamin in Coenzyme B12 Dependent Mutase. An Insight from DFT Calculations”
International Conference on Biological Inorganic Chemistry 13 th, Vienna July 15th 2007.
- (8) 蒲池高志、村田幸司、向野智久、W. Nam、吉澤一成
“アルキルペルオキシ鉄(III)錯体の密度汎関数法による反応性解析”
分子科学討論会 2007、仙台、2007 年、9 月

17日

(9) 蒲池高志、村田幸司、向野智久、W. Nam、吉澤一成

"アルキルペルオキシ鉄(III)錯体の反応性に関する理論的研究"

日本化学会第88春季年会、東京、2008年、3月26日

(10) 蒲池高志、Kozlowski Pawel、虎谷哲夫、吉澤一成

"ビタミンB12依存型酵素の反応機構に関する理論的研究"

分子科学討論会2008、福岡、2008年9月24日

(11) T. Kamachi, P. M. Kozlowski, T. Toraya, K. Yoshizawa

"Theoretical Study on the Mechanism of Catalysis of Coenzyme B₁₂-Dependent Glutamate Mutase"

Asian Biological Inorganic Chemistry Conference 4th, Jeju November 10th 2008.

(12) 蒲池高志、Kozlowski Pawel、虎谷哲夫、吉澤一成

"ビタミンB12依存型酵素の反応性に関する理論的研究"

日本化学会第89春季年会、船橋、2009年、3月27日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲池 高志 (KAMACHI TAKASHI)

九州大学・先導物質化学研究所・学術研究員

研究者番号：40403951