

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2009
 課題番号： 19550004
 研究課題名 (和文) プロスタノイド合成酵素による反応機構に関する理論的研究
 研究課題名 (英文) Theoretical Studies on Mechanisms of Prostanoid Biosyntheses
 研究代表者
 森 聖治 (MORI SEIJI)
 茨城大学・理学部・准教授
 研究者番号： 50332549

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、生化学的、薬学的に重要なプロスタグランジン H₂からの異性化によるプロスタノイド類の生合成反応機構をモデル化し、量子化学計算によって検討した。プロスタグランジン D₂/E₂の生成では、求核的に起きる2通りの反応機構が考えられるのに対し、トロンボキサン、プロスタサイクリンの生成では、シトクロム P450 が関与し、ラジカル中間体の生成と一電子移動を伴う反応機構を経由することを示した。一電子移動反応についても、分子軌道法で説明できることを示した。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we conducted quantum chemical calculations for model reaction mechanisms of prostanoid formation reactions, which are important in biochemistry and pharmaceutical sciences. Whereas prostaglandin D₂/E₂ biosyntheses pass through two possible nucleophilic mechanisms, thromboxane and prostacyclin syntheses go through radical intermediate formation and single electron transfer. The single electron transfer step can be rationally explained by molecular orbital theory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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: プロスタノイド、プロスタグランジン D₂ 合成酵素、プロスタサイクリン合成酵素、トロンボキサン合成酵素、シトクロム P450、UB3LYP 密度汎関数法、エンドペルオキシド、反応機構

1. 研究開始当初の背景

プロスタノイド類は生物の発育や生命維持に関わる重要な生理活性有機化合物であり、プロスタグランジン(PG) G₂ (PGG₂), プロス

タグランジン H₂を経由して、PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGF_{2αβ}, PGI₂, トロンボキサン A₂ (TxA₂)などがある(図1)。プロスタノイドはアラキドン酸から、細胞内で合成される。こ

これらの化合物はプロスタノイドの種類によって異なる生理活性をもつ。研究開始の2007年までに、PGD₂合成酵素(PGDS)、ミクロソームPGE₂合成酵素(mPGES-2)の構造が明らかにされた。これらプロスタノイド合成酵素の構造決定や反応機構の解明は、新薬の開発に重要な役割を果たすはずであるが、現在立ち遅れている。アレルギー反応に関与する造血器型プロスタグランジンD₂合成酵素(hematopoietic PGD₂ synthase: H-PGDS)やプロスタグランジンE₂合成酵素(PGES)はグルタチオン(L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH)要求性酵素である。その立体構造はショウジョウバエ、ラット、ヒトからそれぞれ得られ、いくつか知られている。この触媒機構は明らかになっていない。PGD₂と同様にPGH₂からの異性化で生じるトロンボキサンA₂(TxA₂)は、血小板凝集作用や血管や気道などの平滑筋収縮作用などを示し、それ自身は不安定ですがTxB₂に変わる。PGH₂からの異性化で生じるプロスタサイクリン(PGI₂)はTxA₂と反対の生理活性を持つ。

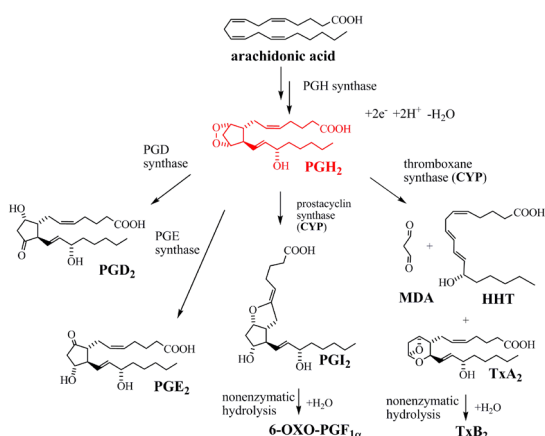


図1 アラキドン酸代謝経路

アレルギー性鼻炎の鼻詰まりの原因物質の一つとされている PGI₂合成酵素(PGIS)や TxA₂合成酵素(TXAS)にはシトクロム P450が含まれる。これらの酵素は酸素添加反応ではない珍しいシトクロム P450である。反応機構はすでに提唱されている (Ullrich and Brugger, *Angew. Chem.* **33**, 1911 (1994)) が、電子状態などの詳細は不明であり、推定の域を出ていない。とくに TxA₂合成に関わる鉄の役割など電子状態については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、プロスタグランジン類やトロンボキサン類の生合成反応機構を、計算化学の見地から解明することを目的とする。本研究では、いままでの申請者の人工的有機合成反応から生体内の合成反応に展開し、PGDS, PGES, PGIS, TXAS による PGD₂, PGE₂,

PGI₂, TxA₂の生合成反応機構を、(a)量子化学的、(b)分子ドッキング法などの計算化学的手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PGD₂, PGE₂の生合成反応の研究では、PGH₂を2,3-dioxabicyclo[2.2.1]heptane、グルタチオンをメタンチオラートイオン、PGD₂/PGE₂を3-hydroxycyclopentanoneにそれぞれモデル化した系で計算を行った。構造最適化には、密度汎関数法のmPW1LYP/6-31+G(d,p)を用いた。さらに最適化した構造に対してB3LYP法、MP2法、CCSD(T)法でエネルギー一点計算を行った。(2) シトクロム P450のモデルとして中心鉄にポルフィリン環とSHを配位させたモデルを用い、プロスタグランジン H₂のモデルとして、エンドペルオキシドの置換体モデルを用いた。(図2(a)) 基底関数は構造最適化、基準振動解析、Kohn-Sham分子軌道解析にBII(FeにLAN2DZ、SH基および中心鉄に隣接原子に6-31G(d)、そのほかの原子に3-21G)を用いた。エネルギー一点計算にはBI(FeにSDD、そのほかの原子に6-311+G(d))を用いた。開殻系であるのでS=1/2、S=3/2、S=5/2について検討した。また、本反応の対象である開殻六配位鉄錯体はいくつかの電子配置を取り得るため、それらについても検討した。(図2(b))

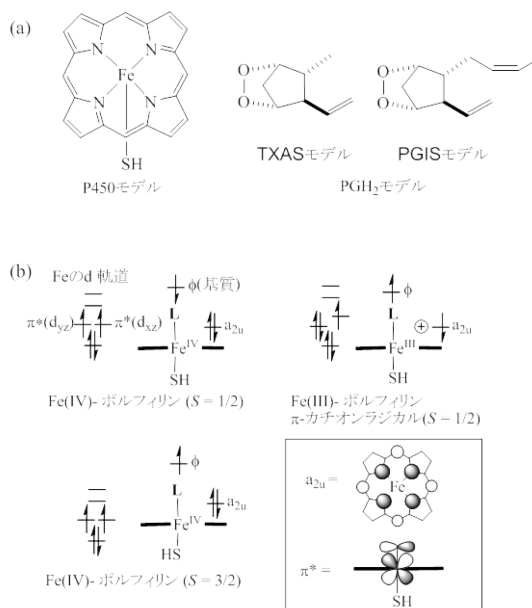


図2 計算モデルとヘムの電子状態

4. 研究成果

本研究では、生化学的、薬学的に重要な酵素によるプロスタノイド類の生合成反応機構を、密度汎関数法などの計算化学的手法を用いて明らかにした。成果は以下の通りである。(1) アレルギー反応に関与する造血器型プロスタグランジンD₂合成酵素(PGDS)では、グ

ルタチオンがチロシン残基によって脱プロトン化すること、その周りの水分子は、チロシン水溶液ほどの親水的な環境ではなく疎水的な環境にあることを紫外共鳴ラマンスペクトルと、モデル化合物である MeS およびそれに水クラスターが結合した種の量子化学計算の 2 つの方法によって明らかにした。この結果をもとに、PGD₂、PGE₂ への異性化反応機構を検討した。プロスタグランジン H₂ からの PGD₂、PGE₂ への異性化反応機構は、メタンチオラートイオンがプロスタグランジン H₂ のプロトンを引き抜くと同時に協奏的にエンドペルオキシドの酸素-酸素結合が開裂する一段階反応 (path A) と、エンドペルオキシド酸素に脱プロトン化されたグルタチオンが求核攻撃する機構 (path B) の二通りが考えられる (図 3)。Path B では、2 段階で進行する。前者の機構のほうが活性化エネルギー

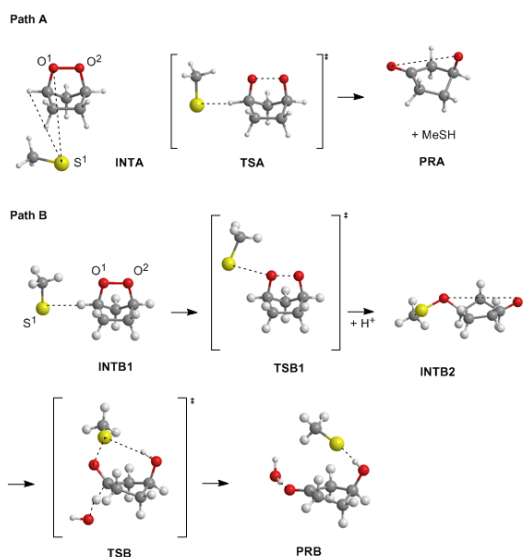


図 3 量子化学計算による PGH₂ から PGD₂/PGE₂ モデルの生成機構

は低い、後者の場合、生成するアルコキシドイオンが対イオンである H⁺ などによって安定化されれば、その後の OH⁻ の攻撃による活性化エネルギーが高くない (9 kJ/mol 程度) ことを示した。水和を考慮しても、上記二種類の機構の活性化エネルギーは、生理条件下でも十分反応が進行するほど小さな値であった。一方、基質である PGH₂ と H-PGDS の結合状態の molecular docking simulation を AutoDock 3.0 を用いて検討したが、部位特異的突然変異実験によって予想される触媒ポケットに入った構造が得られなかった。

(2) シトクロム P450 によるプロスタグランジン H₂ の異性化反応機構: トロンボキサン合成酵素 (TXAS) によるトロンボキサン A₂ 合成 (図 4) および、プロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) によるプロスタサイクリンの

合成のモデル反応機構 (図 5) を UB3LYP 密度汎関数法により検討した。三価の鉄を経

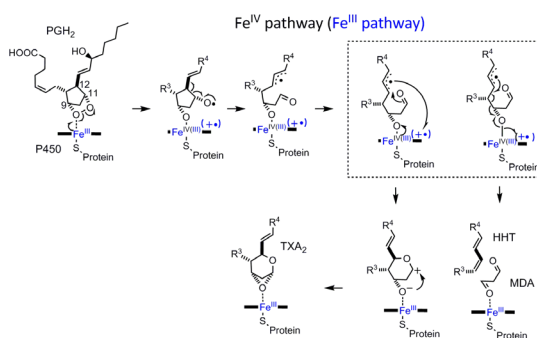


図 4 トロンボキサン合成の反応機構

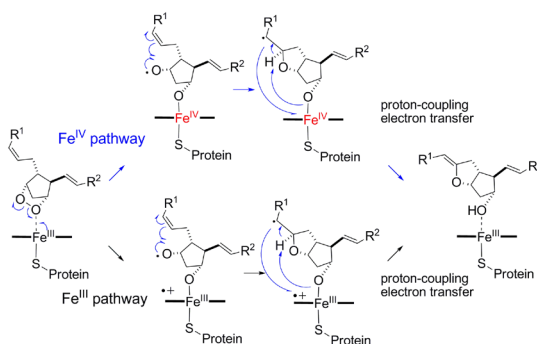


図 5 プロスタサイクリン合成の反応機構

由するよりも、酸素-酸素のホモリティック開裂によりいったん四価になってから、オレフィン部位へのラジカル付加による炭素ラジカルの生成、炭素ラジカルから鉄への一電子移動により三価にもどる経路のほうがエネルギー的に多少安定であることを、いずれの反応の場合にも示した。また、前者では、一電子移動と C-O 結合生成、後者ではプロトン移動が一電子移動を伴うプロトン共役一電子移動 (proton-coupled electron transfer, PCET) が起きることを分子軌道解析によって明らかにした。全体としては、いずれの反応も、基質とヘムが結合した後は、酸素-酸素開裂が律速段階であることを示した。鉄-ポルフィリンの役割を明らかにするために、前者のトロンボキサン合成反応機構について、P450 モデルを除き PGH₂ モデルのみでこの C-O 結合段階を検討したところ、双極イオン中間体ではなくビラジカル中間体を形成し、その活性化エネルギーは 100 kJ/mol ほどであった。一方、ヘムが存在する場合の C-O 結合段階の活性化エネルギーは 20.4~29.5 kJ/mol と低かった。これらの結果より、TXA₂ 生成には一電子移動が可能な触媒が必要であることが示された。プロスタサイクリン合成においては、2008 年にプロスタサイクリン合成酵素の結晶構造解析が明らかにされたので、酵素の効果を検討するために、トリプトファン の 272 番目の残基

などを含めた量子化学計算を行った。その結果、PGH₂モデル化合物とP450モデルが結合した6配位錯体では6重項が安定だったが、トリプトファンのアミノ酸残基などを含めると、二重項が最もエネルギー的に安定になることが分かった。6配位鉄錯体が低スピンであるという実験結果と矛盾しない。

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3件)

- ① Yoshiko Uchida, Yoshihiro Urade, Seiji Mori, Takamitsu Kohzuma, UV Resonance Raman Studies on the Activation Mechanism of Human Hematopoietic Prostaglandin D₂ Synthase by a Divalent Cation, Mg²⁺, *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 331-340
- ② Tetsuya K. Yanai, Seiji Mori, Density Functional Studies on Isomerization of Prostaglandin H₂ to Prostacyclin Catalyzed by Cytochrome P450, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4464-4473.
- ③ Tetsuya K. Yanai, Seiji Mori, Density Functional Studies on Thromboxane Biosynthesis: Mechanism and Role of the Heme-Thiolate System, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1900-1911.

[学会発表] (計10件)

- ① 内記 達哉, 山口 直人, 高田 俊和, 高妻 孝光, 坂田 文彦, 森 聖治, プロスタグランジン H₂ からプロスタグランジン D₂ への異性化反応に関する理論的研究 : 塩基と水分子が反応性に与える影響, 分子科学討論会 2009, 名古屋, 2009年9月21-24日。1P115
- ② Seiji Mori, " Important insight into Reaction Mechanisms of Organic Syntheses and Biosyntheses from View of Computational Chemistry", The International Symposium on Theory of Molecular Structure, Function and Reactivity ,Celebrating Prof. Morokuma's 75th birthday , July 20 2009, Kyoto, Japan (invited).

- ③ Seiji Mori, Tetsuya K. Yanai, "Unusual Reactions Catalyzed by Cytochrome P450: Density Functional Studies on Prostaglandin H₂ Isomerizations" ,16th International Conference on Cytochrome P450, June 21-25 2009, Nago, Okinawa, Japan.(P-56)
- ④ Tetsuya K. Yanai, Seiji Mori, "Unusual Reactions Catalyzed by Cytochrome P450: Density Functional Studies on Prostaglandin H₂ Isomerizations" , 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, November 10-13, 2008, Jeju, Korea.
- ⑤ Seiji Mori, "Theoretical studies on Isomerization of Prostaglandin H₂", 6th China-Japan Crossover Science Symposium, Zhengzhou, China, Oct 23-27, 2008.(invited lecture)
- ⑥ 森 聖治, 野内 哲也, シトクロム P450 によるプロスタサイクリン生合成のモデル反応機構に関する理論的研究、第58回錯体化学討論会、金沢、2008年9月20-22日
- ⑦ 野内哲也, 森 聖治, シトクロム P450 モデルによる、トロンボキサン生合成反応機構の理論的研究、第57回錯体化学討論会、名古屋、2007年9月25日、1Ea-15.
- ⑧ Seiji Mori, Tetsuya Yanai, Naoto Yamaguchi, Takamitsu Kohzuma, Toshikazu Takada, and Fumihiko Sakata, Theoretical Studies on Model Reaction Mechanisms of Prostanoid Syntheses, Third Asian-Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry, Sep 22-25 (Sep 24), 2007, Beijing, China (invited lecture)
- ⑨ 山口 直人, 森 聖治, 高妻 孝光, 高田 俊和, 坂田 文彦, プロスタグランジン D₂/E₂ 合成酵素反応機構のモデル系に関

する理論的研究（茨城大院・理工 1, NEC
ソフト 2, 茨城大・理 3, NEC, 2P080,
分子科学討論会 2007, 2007 年 9 月 18 日,
仙台

- ⑩ Seiji Mori, Naoto Yamaguchi, Takamitsu
Kohzuma, Toshikazu Takada, Fumihiko
Sakata: Theoretical studies on model
reaction pathways of prostaglandin D₂/E₂
synthases, International Conference on
Heteroatom Chemistry-8, Aug 12-16 2007,
Riverside, CA, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ipc.ibaraki.ac.jp/~smori>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 聖治 (MORI SEIJI)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：50332549