

科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21750063

研究課題名 (和文) 銅タンパク質による酸素活性化と量子化学計算の新展開

研究課題名 (英文) Activity of copper enzymes and new development of quantum calculation

研究代表者

塩田 淑仁 (SHIOTA YOSHIHITO)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：70335991

研究成果の概要 (和文)：

メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) は不活性なメタンをメタノールに転換する酵素で、可溶型の sMMO と膜結合型の pMMO の2つの型が知られている。sMMO は X 線構造解析から鉄活性中心の構造が明らかにされ、その反応メカニズムは明らかにされつつある。それに対して、pMMO に関する研究例は少なく、pMMO の X 線構造解析から二核銅及び単核銅を活性点に有する多核の金属活性点を持つことが明らかとなったものの、その活性化の仕組みや反応機構は分子レベルでは未だによく分かっていない。我々は、X 線構造のモデル計算の結果から二核銅酸素錯体の電子状態が+1 価と+2 価の混合原子価のときにメタンと効率よく反応することを明らかにした。最近の分光学的研究からも二核銅錯体が反応の活性部位であることが明らかになり、その反応機構や膜タンパク中での挙動に注目が集まっている。

研究成果の概要 (英文)：

Methane hydroxylation at the dinuclear copper site of particulate methane monooxygenase (pMMO) is studied by using density functional theory calculations. The electronic, structural, and reactive properties of a possible dinuclear copper species (μ -oxo)(μ -hydroxo) $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ are discussed with respect to the C-H bond activation of methane. We propose that the Tyr374 residue in the second coordination sphere of the dicopper site donates an H atom to the μ - η^2 : η^2 -peroxo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ species and the resultant (μ -oxo)(μ -hydroxo) $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ species is able to hydroxylate methane. This species for methane hydroxylation is more favorable in reactivity than the bis(μ -oxo) $\text{Cu}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{III}}$ species. The H-atom transfer or proton-coupled electron transfer from the tyrosine residue can reasonably induce the O-O bond dissociation of the μ - η^2 : η^2 -peroxo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ species to form the reactive (μ -oxo)(μ -hydroxo) $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ species, which is expected to be an active species for the conversion of methane to methanol at the dicopper site of pMMO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：生物無機化学

1. 研究開始当初の背景

遷移金属元素は、触媒では活性点として、生体内では酵素の活性中心として働き、高い選択性や温和な条件で反応をコントロールし、極めて高効率で物質の変換を行っている。このように遷移金属元素は微量ながら、触媒や酵素の活性点できわめて重要な役割を果たしている。それらの反応は一見すると単純な反応であっても複雑な素反応の組み合わせで進行していると考えられている。そのため、反応機構を明らかにするためには、素反応レベルでの理解を欠かすことができない。しかし、優れた実験手法を用いたとしてもその反応機構を実験的手法のみで完全に解明することは困難であり、理論化学、特に量子化学計算のサポートが必要とされている。

遷移金属元素は配位環境によりことなるスピン多重度を持つうえに、電子相関を取り込まねば、計算結果は実験結果にたいする再現性をもたない。そのため、信頼性の高い計算法（CCSD 法など）では計算可能な原子数 10 数個程度に制限されてしまう。このような理由から金属錯体による反応の理論的アプローチは極めて限定されたモデルを使った議論にとどまっている。しかしながら、近年の急速なコンピューターの進歩や、新しい計算手法の発展に伴って、適切なモデル化を行うことにより、金属活性点での遷移状態の電子構造を糸口に複雑な触媒反応や生体内反応を解き明かすチャンスが到来したといえる。

2. 研究の目的

本課題は理論的手法を用いて酸化酵素の金属活性点の酸素活性化メカニズムを解明し、その酵素反応に応用可能な量子化学的手法を確立することである。主に銅二核の活性中

心をもつ酸化酵素であるチロシナーゼと pMMO を理論的に解析し、酸素活性化及び C-H 結合活性化のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 計算方法 本研究は理論的手法を用いて、化学反応解析をおこなう。解析手法として量子化学理論の一種である密度汎関数法を使用する。X線結晶構造を用いて、単核と二核モデル行い活性点での反応機構について検討した。

(2) 計算環境 計算資源として安価なパソコンを使用し、基本ソフトにはフリーである LINUX を用いておこなう。インテル製プロセッサは安価であるがワークステーションの CPU としての基本性能は十分で、本研究課題で 2005 年発売の数千万円規模の計算機と同等の理論研究の環境が得られる。量子化学計算ソフトのライセンスは既に取得済みでコンピューターの設定、量子化学計算ソフトのインストールは申請者本人が行う。

4. 研究成果

メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) は不活性なメタンをメタノールに転換する酵素で、可溶性の sMMO と膜結合型の pMMO の 2 つの型が知られている。sMMO は X 線構造解析から鉄活性中心の構造が明らかにされ、その反応メカニズムは明らかにされつつある。それに対して、pMMO に関する研究例は少なく、pMMO の X 線構造解析から二核銅及び単核銅を活性点に有する多核の金属活性点を持つことが明らかとなったものの、その活性化の仕組みや反応機構は分子レベルでは未だによく分かっていない。

我々は、X 線結晶構造を用いて、単核と二核モデルでの金属オキソ種の安定性を調べた。銅の単核サイト上で $[\text{CuO}]^+$ の生成は 17.8

kcal/mol の吸熱反応であるのに対して、二核銅活性点での $[\text{Cu}_2\text{O}_2]^+$ の生成は 60.9 kcal/mol の発熱反応となった。我々は金属オキソ種を生成しやすい二核銅が活性点であると決定した。

最近の分光学的研究からも二核銅錯体が反応の活性部位であることが明らかになり、その反応機構や膜タンパク中での挙動に注目が集まっている。特に活性中心の二核銅酸素錯体がどのような電子状態のとき効率的なメタン酸化触媒になるかという点に興味を持たれる。

さらに DFT 計算の結果から二核銅酸素錯体の電子状態が+1 価と+2 価の混合原子価のときにメタンと効率よく反応することを明らかにした。このとき、2 段階協奏機構で反応が進行する。pMMO の $[1-^3\text{H}_1, ^2\text{H}_1]\text{ethane}$ の実験から 100% 立体保持で $\text{KIE}(k_{\text{H}}/k_{\text{D}}) = 5.2 \pm 0.7$ であることが報告されている。我々の提案する機構も立体保持を支持している。さらに DFT から計算された $\text{KIE}(k_{\text{H}}/k_{\text{D}})$ は 6.8 であり、実験結果をよく説明できる。C-H 結合開裂に必要な活性化エネルギーは 17 kcal/mol となった。この反応性の高さは $\text{bis}(\mu\text{-oxo})\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ 錯体の架橋酸素上にあるスピン密度と関係している。このスピン密度は銅の+2 価に由来し、架橋酸素によるメタンの C-H 結合開裂を仲立ちする。 $(\mu\text{-oxo})$ $(\mu\text{-hydroxo})\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ 錯体も銅の+2 価を含むため同様の反応性を示すと予想される。一方、二核銅酸素錯体の電子状態が+2 価と+2 価を出発点にすると生成する $\text{bis}(\mu\text{-oxo})\text{Cu}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{III}}$ 錯体は基底状態が閉殻一重項になりそのままでは C-H 結合を活性化できない。メタンを水酸化できるようになるために、 $\text{bis}(\mu\text{-oxo})\text{Cu}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{III}}$ 錯体は 1 電子受け取るか、架橋 Cu-O 結合を切断して活性な単核状態の CuO^+ となる必要がある。

今後の展開としては本研究を周辺タンパクの効果をとり込んだ大規模計算を行うことで酵素反応の特徴を明らかにしていきたい。

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 17 件)

1. DFT Study of the Mechanism for Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase (sMMO): Effects of Oxidation State, Spin State, and Coordination Number, S.-P. Huang, Y. Shiota, K. Yoshizawa, *Dalton Trans.*, 42, 1011-1023 (2013). 査読有
2. Theoretical study of oxidation of cyclohexane diol to adipic anhydride by $[\text{Ru}(\text{IV})(\text{O})(\text{tpa})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex (tpa = tris(2-pyridylmethyl)amine), Y. Shiota, J. M. Herrera, G. Juhász, T. Abe, S. Ohzu, T. Ishizuka, T. Kojima, K. Yoshizawa, *Inorg. Chem.* 50, 6200-6209 (2011). 査読有
3. Theoretical study of the mechanism of valence tautomerism in cobalt complexes, D. Sato, Y. Shiota, G. Juhász, K. Yoshizawa, *J. Phys. Chem. A* 114, 12928-12935(2010). 査読有
4. Theoretical study of thermal spin transition between the singlet state and the quintet state in the $[\text{Fe}(\text{2-picolylamine})_3]^{2+}$ spin crossover system, Y. Shiota, D. Sato, G. Juhász, K. Yoshizawa, *J. Phys. Chem. A* 114, 5862-5869 (2010). 査読有
5. Comparison of the reactivity of $\text{bis}(\mu\text{-oxo})\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ and $\text{Cu}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{III}}$ species to methane, Y. Shiota, K. Yoshizawa, *Inorg. Chem.* 48, 838-845 (2009). 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. Theoretical study of the methane hydroxylation by pMMO Yoshihito Shiota, Gergely Juhász, and Kazunari Yoshizawa, P450 シンポ、2012年12月2日、福岡
2. Co 錯体の原子価互変異性に関する理論的研究 塩田淑仁 佐藤大介 ゲルゲイ ユハース 吉澤一成 錯体討論会、2012年9

月21日、富山

3. 銅二核活性点におけるメタン活性化の理論的研究 塩田 淑仁、ゲルゲイ ユハース、吉澤 一成 触媒討論会 2012年9月25日、福岡

4. 銅二核活性点におけるメタン酸化反応に関する理論的研究 塩田 淑仁、ゲルゲイ ユハース、吉澤 一成 2012年3月27日、春季年会

5. 銅二核活性点におけるメタン酸化反応に関する理論的研究 塩田 淑仁、ゲルゲイ ユハース、吉澤 一成 酸化反応討論会 2011年11月3日 大阪

6. Theoretical Study of the Mechanism of Valence Tautomerism in Cobalt Complexes, Yoshihito Shiota, Daisuke Sato, Gergely Juhasz, and Kazunari Yoshizawa, 第7回物理化学国際会議, 2011年9月3日 東京

7. 銅二核錯体上での酸素活性化に関するチロシン残基の役割に関する理論的研究, 塩田淑仁 ゲルゲイ ユハース 吉澤一成, 第108回触媒討論会、2011年9月20日 北見

8. 高原子価金属オキソ種の電子状態とその反応性に関する量子化学計算, 塩田淑仁 計算化学談話会, 招待講演, 2011年1月5日 福岡

9. Theoretical Study of Spin Transition between the Singlet State and the Quintet State in the $[\text{Fe}(\text{2-pic})_3]^{2+}$ Spin Crossover System (2-pic:2-picolyamine), 塩田淑仁 佐藤大介 ゲルゲイ ユハース 吉澤一成, 第60回記念錯体化学 OSAKA 国際会議, 2011年9月28日 大阪

10. 金属酵素による酸素活性化機構に関する理論的研究, 塩田 淑仁, 堀 一則, 吉澤 一成, 堀 一則, 分子科学討論会, 2011年

9月15日 大阪

11. 金属錯体のスピン交差に関する理論的研究, 塩田淑仁 佐藤大介 ゲルゲイ ユハース 吉澤一成, 理論化学討論会, 2011年5月24日 札幌

12. 二核銅活性点を有するメタン酸化酵素のQM/MM計算, 塩田淑仁 堀一則 吉澤一成, 日本化学会春季年会 2010年3月24日 大阪

13. 膜結合型メタンモノオキシゲナーゼの銅活性点に関する理論的研究, 塩田淑仁 堀一則 吉澤一成, 分子科学会 2009年9月 大阪 名古屋

14. 銅二核活性点をもつ酵素の触媒機構に関する理論的研究, 塩田淑仁 吉澤一成, 理論化学討論会 2009年5月28日 東京

[その他]

ホームページ等

<http://trout.scc.kyushu-u.ac.jp/yoshihito/shiota.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 淑仁 (SHIOTA YOSHIHITO)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号: 70335991

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: