

カテコールジオキシゲナーゼの酸素活性化機構に関する理論的研究

○中谷 直輝¹、中尾 嘉秀¹、佐藤 啓文¹、榎 茂好¹

¹京大院・工

【緒言】

土壌バクテリアなどに見られるジオキシゲナーゼは、酸素を利用して種々の芳香族化合物を生分解する酵素として知られている。Fe(II)あるいは Fe(III)錯体を活性中心にもつカテコールジオキシゲナーゼはその典型的な酵素であり、カテコール(1,2-dihydroxylbenzene)およびその誘導体を生分解する。これらの酵素群は、安定な芳香族化合物を生体内の温和な条件下で酸化することができるという点で大きな興味を持たれており、触媒サイクルのメカニズムの解明やバイオミネラルシステムの構築に関する研究が現在盛んに行われてきている。

触媒サイクルのメカニズムに関しては Shiegbahn らによる密度汎関数法を用いた理論研究[1,2]が近年報告されたが、触媒サイクルの初期における酸素活性化のメカニズムについては、詳細は明らかでない。しかしながら、この酸素活性化のプロセスは三重項状態にある不活性な酸素を反応に利用するための重要な知見を含んでいると考えられ、化学的にも工業的にも大変興味深い。

Fe(II)錯体による酸素活性化はポルフィリンなどで知られているが、Fe(III)錯体によるものは、ほとんど報告がない。本研究では、Fe(III)を活性中心に持つカテコールジオキシゲナーゼに着目し、その酸素活性化機構について電子状態に基づいた解析を行い、過去に提案されてきたメカニズムと比較、考察を行った。

【計算】

Figure 1(a)に示したようにカテコールジオキシゲナーゼの X 線構造 (PDB-ID: 3PCL)を元にして Fe(III)、catechol、および第一配位圏のアミノ酸残基を切りだし、計算コスト削減のため Histidine を methyl imidazol で、Tyrosine を *p*-methylphenoxy で置き換えたモデルを作成し、密度汎関数法による構造最適化を行った。汎関数は B3LYP を使い、C、N、H には 6-31G*を、O には 6-31+G*を用い、Fe には(311111/22111/411/1) および内殻 10 電子を Stuttgart/Dresden の有効内殻ポテンシャル(ECP)で置き換えて計算した。

さらに Fe および O₂ に由来するスピン波動関数の多配置性を考慮し、CASPT2 法によりエネルギー変化を求めた。計算コストの問題から、エネルギー計算は最適化構造を元に Figure 1(b)に示すような小さなモデルに置き換えて行った。基底関数は C、N、H には 6-311G*を、O には 6-311+G*を用い、Fe は最適化計算と同じ基底関数を用いた。活性空間には、Fe の 5 つの d 軌道、O₂ の 2 つの π*、および catechol の π (HOMO)を加えた 8 軌道を取り、CASSCF(9,8)計算を行った。

密度汎関数法による構造最適化には Gaussian 03 を、CASSCF/CASPT2 計算には MOLCAS 6.4 プログラムパッケージを用いた。

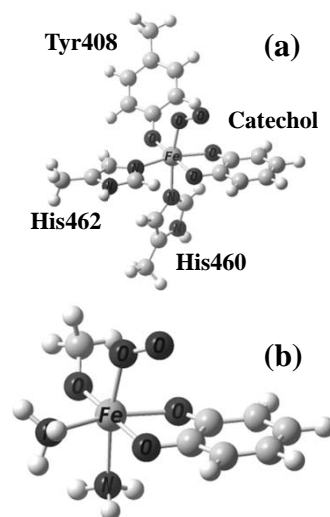


Figure 1. Computational model of catechol dioxygenase. (a) Large model, (b) Small model.

【結果および考察】

密度汎関数法による構造最適化および CASPT2 法によるエネルギー計算から得られた酸素挿入過程におけるエネルギー変化と、反応メカニズムを **Figure 2** および **Figure 3** にそれぞれ示した。スピン状態は、Fe(III)の高スピン状態に基づく6重項状態とO₂の3重項状態との重ね合わせから、全体として8重項、6重項および4重項を考慮すべきであるが、4重項の振る舞いは8重項とよく似ているため、今回は8重項および6重項状態についてのみ結果を示した。

Complex 1: 構造最適化計算から反応前駆体の構造を得ることが出来なかったため、FeとO₂との距離 R_{Fe-O} を3.0 Åに固定して得られた8重項状態の構造を反応前駆体(錯体**1**)とした。錯体**1**では、基底状態においてcatecholがFeを1電子還元しFeは2価の高スピン状態になっていることが示された。

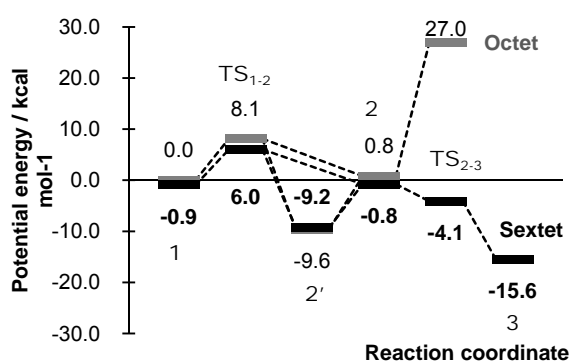


Figure 2. Calculated energy diagrams of dioxygen activation in Fe³⁺ catechol dioxygenases

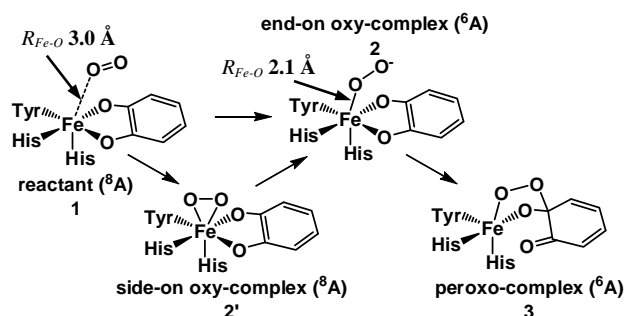


Figure 3. Mechanism of dioxygen activation in Fe³⁺ catechol dioxygenases

錯体**3**においてもFeは3価の高スピン状態になっており、スーパーオキシドとcatecholのスピンが再結合する形で新たにC-O結合が生成することが分かった。ところが、この2つのスピンが平行になっている8重項では、不安定な電子配置しか取ることができないために6重項と比較して大きく不安定化していると考えられる。電子状態の詳細な解析については当日述べる予定である。

錯体**3**においてもFeは3価の高スピン状態になっており、スーパーオキシドとcatecholのスピンが再結合する形で新たにC-O結合が生成することが分かった。ところが、この2つのスピンが平行になっている8重項では、不安定な電子配置しか取ることができないために6重項と比較して大きく不安定化していると考えられる。電子状態の詳細な解析については当日述べる予定である。

以上の議論から、酸素活性化のメカニズムは **Figure 3** に示すように、catecholからFeを介したO₂への電子移動が酸素を活性化し、その後の反応を進行させていると結論できる。

【参考文献】

- [1] Siegbahn, P. E. M., Haefner, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8919-8932.
- [2] Borowski, T., Siegbahn, P. E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12941-12953.

Complex 2: End-on 型のオキシ錯体**2**では R_{Fe-O} が2.3 Åより小さい領域において2価の高スピン状態にあるFeからO₂へ1電子が移動し、O₂がスーパーオキシドになっている。しかしながら、この時の遷移状態の構造は密度汎関数法で求めることが出来なかった。そこで、 R_{Fe-O} を反応座標として構造最適化し、その構造のCASPT2計算から $R_{Fe-O} = 2.4$ Åの構造がTS_{1,2}となることを見出した。また、Side-on 型のオキシ錯体**2'**はFeのd_π軌道とO₂のπ*軌道との相互作用によってFeからO₂へ逆供与が強く、この場合もO₂はスーパーオキシドの性質を持っていることが分かった。さこの**2'**は**1**に比べて10 kcal/mol程度安定であり、酸素活性化のプロセスにおいて安定な中間体になっていると考えられる。

Complex 3: スーパーオキシドがcatecholの1位の炭素に攻撃することによってFeとC1にO₂が架橋したペルオキシ中間体**3**が生成する。密度汎関数法による構造最適化から**2-3**間に遷移状態TS_{2,3}を得たが、このTS_{2,3}はCASPT2計算では錯体**2**よりもエネルギーが低く見積もられた。このことから、実際の遷移状態はEnd-on型の構造に近く、活性化エネルギーは極めて小さいと考えられる。