

## 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

(阪大蛋白研\*・阪大極限センター\*\*) ○鷹野優\*、小泉健一\*、山口兆\*\*、中村春木\*

【序】 $\mu$ -O や  $\mu$ -OH 架橋された二核鉄活性中心は、海棲無脊椎動物の酸素運搬に用いられるヘムエリスリンやメタンをメタノールに転換するメタンモノオキシゲナーゼなど多くの金属タンパク質で見られる。これらのタンパク質は類似の活性中心を持つにもかかわらず、ヘムエリスリンは酸素の運搬、メタンモノオキシゲナーゼは酸素の添加と異なる機能を示している。この違いは活性中心の配位環境により制御されているが、その詳しい制御機構は明らかにされておらず、その解明は二核鉄活性中心を利用した酵素のデザイン等、新しい触媒設計に関して重大な知見を与えるものと考えられる。

一般に金属と生体分子との相互作用を理論的に解明するためには金属の複雑な電子状態とそのまわりに配位している生体分子と一緒に取り扱う必要がある。しかしながら、系のサイズが大きく多様な電子状態を示すため理論計算による取り扱いが難しい。

そこで多核金属タンパク質の活性中心の化学結合様式を密度汎関数法(DFT)により詳細に調べるためのスキームを提案した。それを酸素運搬タンパク質ヘムエリスリンの酸素結合状態、非結合状態における金属活性中心に適用することで、配位環境がどのように金属活性中心の電子構造や化学結合様式に影響するのかを調べた[1]。

【計算方法】 酸素結合型(oxy 型)、非結合型(deoxy 型)ヘムエリスリンのモデルとして、海棲無脊椎動物である *Themiste dyscritum* ヘムエリスリンの X 線結晶構造解析のデータ(PDB ID: 1HMO (oxy 型)、1HMD (deoxy 型)[2]をもとに、二核鉄活性中心に配位するヒスチジン(His25, His54, His73, His77, His101)をメチルイミダゾールに、アスパラギン酸 Asp106 とグルタミン酸 Glu58 を酢酸イオンに置き換えたものを用いた(図)。

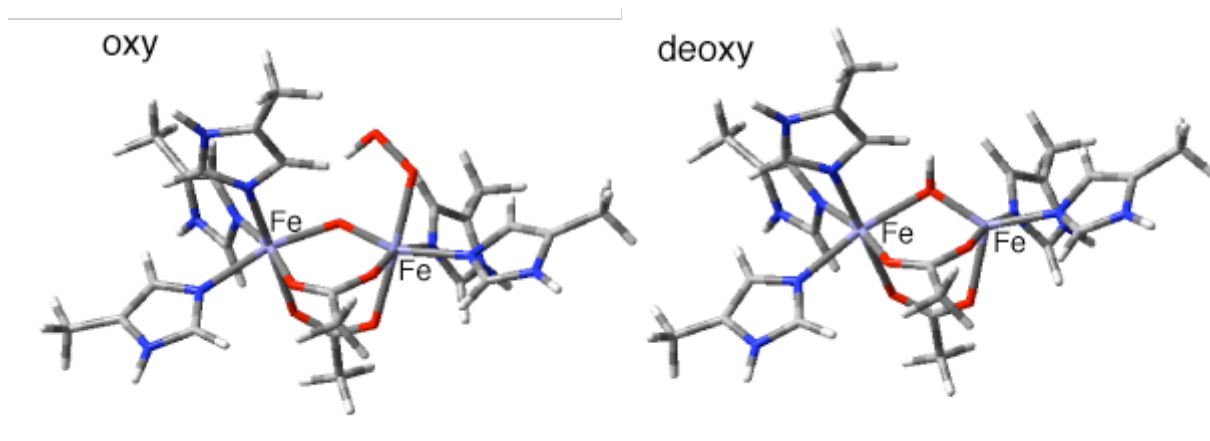


図 oxy 型、deoxy 型ヘムエリスリンのモデル

それらに対して、基底関数として鉄イオンには Tatewaki–Huzinaga の 533(21)/53(21)/(41)[3]に Hay の d の diffuse 関数[4]を加えたものを、炭素、窒素、酸素には 6-31G(d)を、水素には 6-31G を用いて、Hartree–Fock(HF)法、pure DFT である BLYP 法、HF 法と DFT のハイブリッドである B2LYP 法、B3LYP 法、B3LYP\*法による計算を行った。

すべての計算には Gaussian03[5]を用いた。

【結果・考察】多核金属タンパク質の活性中心を密度汎関数法を用いて取り扱うためには汎関数の適切な選定が重要であり、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、実験値と比較したところヘムエリスリンの二核鉄活性中心の理論的取り扱いには B2LYP 法が最良の汎関数であることがわかった。次に B2LYP 法を用いてヘムエリスリ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 解析を行ったところ、ヘムエリスリンの二核鉄活性中心では  $\mu$ -O および  $\mu$ -OH 架橋配位子を介した  $\sigma$ 、 $\pi$  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  $\delta$ 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（表）。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（表）。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。

表. Effective bond order of oxygenated Hr (OxyHr) and deoxygenated Hr (DeoxyHr).

Hr	Structure	$\sigma$	$\pi$	$\delta$
OxyHr	X-ray	<b>0.23</b>	<b>0.15</b>	<b>0.01</b>
	Opt	<b>0.18</b>	<b>0.13</b>	<b>0.01</b>
DeoxyHr	X-ray	<b>0.12</b>	<b>0.06</b>	<b>0.01</b>
	Opt	<b>0.06</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>

#### 【参考文献】

1. Y. Takano, H. Isobe, K. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 81 (2008) 91.
2. M. A. Holmes, I. Le Trong, S. Turley, L. C. Sieker, R. E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 583.
3. H. Tatewaki, S. Huzinaga, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 339.
4. P.J. Hay, *J. Chem. Phys.* 66 (1977) 4377.
5. M.J. Frisch et al., Gaussian03, Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA.