

## 1P092

### フルオロ酢酸デハロゲナーゼによるハロゲン脱離反応に関する理論的研究

(1九大先導研、2京大化学研) ○中山 智則<sup>1</sup>、蒲池 高志<sup>1</sup>、実森 啓二<sup>2</sup>、

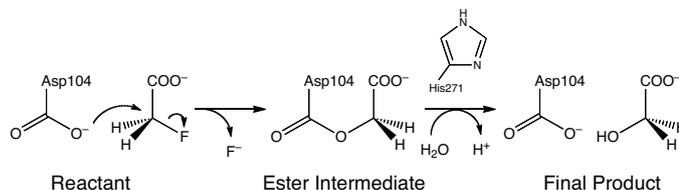
栗原 達夫<sup>2</sup>、江崎 信芳<sup>2</sup>、吉澤 一成<sup>1</sup>

[tomo2378@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp](mailto:tomo2378@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp)

## 緒言

有機ハロゲン化合物は天然物・合成物ともに、幅広く知られており除草剤から殺虫剤、合成樹脂、さらには溶剤に至るまで幅広く利用されている。しかしながら、生物に有害なものも多く存在し、環境汚染の原因となることもある。微生物中に存在する脱ハロゲン化酵素は炭素-ハロゲン結合を切断し、有機ハロゲン化合物を無害化する作用がある。中でもフルオロ酢酸はアフリカなどに分布する一部の植物や、一部の放線菌によって合成される、数少ない天然有機フッ素化合物の1つである。このフルオロ酢酸は、フッ素の小さな原子半径により、細胞内でエネルギー源となる酢酸とよく似た挙動を示し、TCA回路中に取り込まれる。しかしながら、代謝される過程で生成するフルオロクエン酸は、クエン酸の代謝に関与するアコニターゼによって代謝されることはなく、酵素中に停滞する。これにより、アコニターゼが拮抗的に阻害されることにより失活し、細胞のエネルギー生産が阻害される。これはTCA回路に依存する生物全てに影響し、きわめて強い毒性を持つことが知られている。このフルオロ酢酸に含まれる

C-F結合は天然化合物のうちで最も解離エネルギーが高い結合の一つであることが知られている。現在知られている酵素の中でも唯一フルオロ酢酸デハロゲナーゼ(EC3.8.1.3)のみ、フルオロ酢酸の脱フッ素化反応に特異的な活性を持つ。



**Scheme** 予想される全反応機構。まずAsp104の求核攻撃によりF<sup>-</sup>が脱離し、次いでHis271が塩基として作用することにより水分子が付加し、最終生成物であるグリコール酸が生成する。

近年栗原らにより土壌細菌の一種である*Burkholderia* sp. FA1からフルオロ酢酸デハロゲナーゼが単離され、一次構造が明らかになった<sup>1</sup>。この酵素はフルオロ酢酸に対して特異的に作用し、C-F結合を切断することにより、フルオロ酢酸を無害な生成物へと転換することが報告されている。X線結晶構造解析から明らかになった酵素活性点の構造から<sup>2</sup>、活性点周辺にあるArg105とTrp150がハロゲンを引き寄せ、Asp104が求核剤として作用していると示唆されている(Scheme)。

## 計算方法

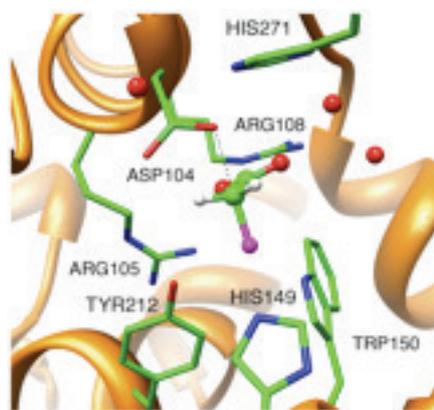
本研究では、フルオロ酢酸デハロゲナーゼによるフルオロ酢酸の脱フッ素化反応機構の詳細を明らかにすることを目的として、量子化学計算を用いて酵素反応の解析を行った。高精度に酵素-基質複合体における活性点近傍の構造を明らかにするため溶媒水分子を明示的に含め、QM/MM法を用いて反応各段階の中間体、遷移状態の構

造最適化を行い、エネルギー変化について検討を行った。(Fig. 1.)。

QM領域には基質に加えて反応に関与する活性点近傍の7残基 (Asp104、Arg105、Arg108、His149、Trp150、Tyr212、His271)および周辺の水分子を含め、MM領域には残りの酵素全体に加え、半径30Å以内に1930分子のTIP3Pモデルの水分子を配置した。エステル加水分解反応に関しては、加水分解の中間体である四面体中間体の安定化に関係するoxyanion holeを考慮するために、新たに活性点近傍の3残基(Gly33、Phe34、Asp128)をモデルに加えた。QM領域の構造最適化はB3LYP法を用いて行い、基底関数にはSV(P)を適用した。スピン多重度は一重項とした。MM領域には力場パラメータの一つであるCHARMm力場を用いた。計算プログラムとしてQM領域にはTURBOMOLE、MM領域にはDL\_POLYを用いた。QM/MM計算はChemShell<sup>3</sup>インターフェースを用いた。

## 結果

反応中間体および遷移状態の構造最適化計算を行い、反応過程におけるエネルギー変化を評価した結果、フッ素脱離反応過程について、フルオロ酢酸からのフッ素脱離に対する活性化エネルギーが2.7 kcal/molであることが判明した。酵素の影響を考慮しない気相反応に相当する、酢酸イオンとフルオロ酢酸との2分子の小規模なモデルでは、S<sub>N</sub>2反応の活性化エネルギーが18.7 kcal/molであることから、本酵素の反応活性点はC-F結合を活性化する能力が非常に強いことが明らかになった。また、遷移状態の構造(Fig.)から、Arg105とArg108が基質のカルボキシル酸素と水素結合を形成する事により基質を固定し、His149とTrp150とTyr212がハロゲンと水素結合を形成する事によりハロゲンの脱離を容易にし、S<sub>N</sub>2反応の活性化エネルギーが低下する事が明らかとなった。また、エステル加水分解過程では、His271が塩基触媒として作用することにより周辺水分子が活性化されることにより進行し、水分子の付加に対する活性化エネルギーが22.5 kcal/molである事が判明した<sup>4</sup>。



$$E_a = 2.7 \text{ kcal/mol}$$

Fig. QM/MM 計算で求められたC-F結合解裂の遷移状態の構造

## References

- 1) T. Kurihara, T. Yamauchi, S. Ichiyama, H. Takahata, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B*, **2003**, *23*, 347.
- 2) K. Jitsumori, R. Omi, T. Kurihara, A. Kurata, H. Mihara, I. Miyahara, K. Hirotsu, N. Esaki, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 2630
- 3) ChemShell, a Computational Chemistry Shell, see [www.chemshell.org](http://www.chemshell.org)
- 4) T. Kamachi, T. Nakayama, O. Shitamichi, K. Jitsumori, T. Kurihara, N. Esaki, K. Yoshizawa, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7394