

## 金属酵素による酸素活性化機構に関する理論的研究

(九州大学・先導研) ○塩田 淑仁, 堀 一則, 吉澤 一成

【序】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、さらに、分光学的手法や理論的手法からも、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、銅活性点をもつ 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(文献 1)。我々は、X 線構造のモデル計算の結果から反応中心は二核銅活性点であると提案してきた(文献 2, 3)。特に活性中心の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 DFT 計算から明らかにした。最近の分光学的研究(文献 4)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。本研究では、QM/MM 法を用いてタンパクの効果を取り込み、pMMO の二核銅活性点だけでなく、約 6000 原子の周辺部位を含む精密なモデルで大規模計算を実行し、活性種の構造とそのメタンとの反応性について理論的に考察した。

【計算方法】QM/MM 法は、計算モデルを QM 領域と MM 領域に分割し、中心部分を QM 法、周辺部分を MM 法で計算する方法である。今回は IMOMM 法を用いて、銅活性点近傍の QM 領域を B3LYP 法で、周辺アミノ酸残基の MM 領域を Amber96 力場でエネルギー  $E(\text{IMOMM})$  を最適化し安定構造を得た。

$$E(\text{IMOMM}) = E(\text{QM 領域} : \text{B3LYP}) + E(\text{MM 領域} : \text{Amber96}) - E(\text{QM 領域} : \text{Amber96})$$

計算モデルは図 1 に示すように、QM 領域を銅原子に直接配位している三つの His および近傍に位置するチロシン、グルタミン酸、基質のメタンとし、それ以外を MM 領域とした。QM 領域の原子数は 70、全体の原子数は 6009 となった。計算モデルは X 線結晶構

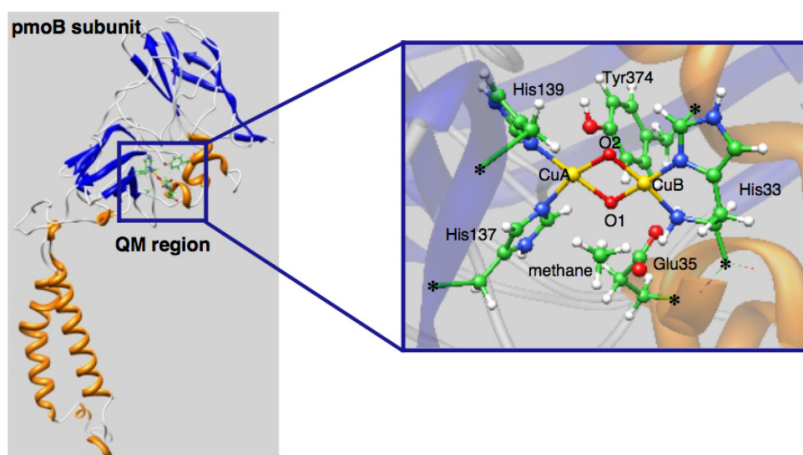


図 1. QM/MM モデルの pMMO 活性点近傍 (QM 領域)

造解析の結果に、水素原子をつけて構築した。次に MM 計算により水素原子の位置を安定化させた後、QM/MM 計算を実行した。計算プログラムには GAUSSIAN03 を用いた。QM 領域の計算方法は Becke3LYP 法、基底関数は銅の基底関数には Wachters-Hay 基底、銅以外には D95\*\*基底を用いた。活性点の銅酸素錯体は  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}$  の状態を考慮した。スピン多重度は 2 重項状態とした。

**【結果】** オキシ錯体にメタンが挿入されて反応物錯体 **1** が生成し、**TS1** を経由してメタンの C-H 結合が開裂する。C-H 結合と O-H 結合の長さは 1.380、1.150Å と遷移状態として妥当な値を示した。(図 2) この時の活性化エネルギーは 21.9 kcal/mol となった。次に、メチルラジカルが片方の銅原子に配位することでメチル中間体 **2** を生成し、エネルギーは 13.3 kcal/mol 安定化する。メチル中間体 **2** から遷移状態 **TS2** を経由して  $-(\text{OCH}_3)$ -架橋を有するメトキシ中間体 **3** を形成する。活性化エネルギーは 6.7 kcal/mol となり、**TS2** における Cu-C と C-O 結合距離は 1.994、2.195Å となった。さらに、メトキシ中間体 **3** の相対エネルギーは -34.2 kcal/mol とかなり安定となった。 $\text{Cu}_2\text{O}_2$  骨格の組み替えによりメトキシ中間体 **3** から  $-(\text{OCH}_3)$ -架橋が解裂して、代わりに  $-(\text{OH})$ -架橋の中間体 **4** を形成する。この活性化エネルギーは 7.3 kcal/mol となった。最後に、中間体 **4** の  $-(\text{OH})$ -架橋から水素が  $\text{Cu}-\text{OCH}_3$  へ転位する遷移状態 **TS4** を経由してメタノール錯体 **5** を形成する。酸素架橋の段階では、9.0 kcal/mol 安定化した。さらに、メタノール生成段階での活性化エネルギーは 11.8 kcal/mol であった。これらの解析から律速段階は第一段階の水素引抜き段階となった。この結果は pMMO によるエタンの酸化実験で水素の速度論的同位体効果が観測されていることと良い一致を示す。今回の QM/MM 計算で明らかにした反応機構は、活性化エネルギーが 21.9 kcal/mol と低く、温和な条件下でもメタンからメタノールへの転換反応が起きることを示す。

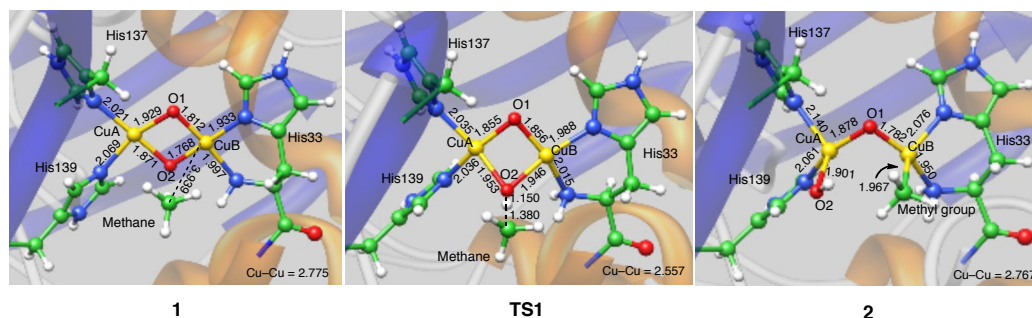


図 2. メタンの C-H 結合解離反応の反応物(1)、遷移状態(TS1)、中間体(2)。

### 【参考文献】

- (1) Lieberman, R. L.; Rosenzweig, A. C. *Nature* **2005**, 434, 177.
- (2) Yoshizawa, K; Shiota, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9873.
- (3) Shiota, Y.; Yoshizawa, K. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 838.
- (4) Balasubramanian, R.; Smith, S. M.; Rawat, S; Yatsunyk, L. A.; Stemmler, T. L.; Rosenzweig, A. C. *Nature* **2010**, 465, 115.