

2E16

炭素-ハロゲン結合の酵素的活性化機構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¹、蒲池 高志¹、下道 治¹、栗原 達夫²、
実森 啓二²、江崎 信芳²、吉澤 一成¹

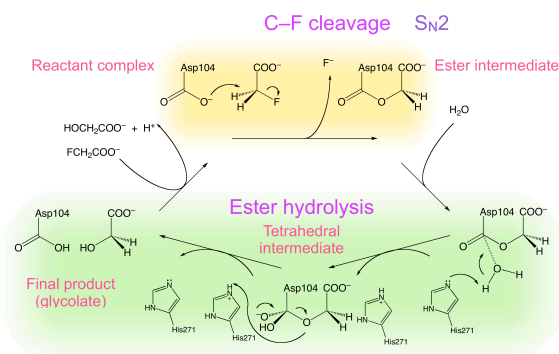
1. 緒言

有機ハロゲン化合物は数多く合成され、除草剤から殺虫剤、合成樹脂、さらには溶剤に至るまで用途は幅広い。しかしながら、多くは生物に有害であり環境汚染の原因となるものである。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体内に取り込まれるとクエン酸回路を阻害する最も毒性の強い化合物の一種である。

脂肪族化合物中の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り、化学的に安定な結合である。C-F結合を選択的に切断する酵素は、既知の加水分解酵素のうち、フルオロ酢酸の脱フッ素化反応を触媒するフルオロ酢酸デハロゲナーゼ(EC 3.8.1.3)のみが知られている。

栗原らは*Burkholderia* sp. FA1からフルオロ酢酸デハロゲナーゼを単離することに成功し、立体構造を明らかにした¹⁾。また、この酵素はフルオロ酢酸に対して特異的に作用する一方で、他のハロ酢酸の脱ハロゲン反応に対してはほとんど触媒活性を示さないことが報告されている。彼らによって提案されている反応機構をScheme 1に示す。

まず、活性点近傍のAsp104が基質の α -炭素を求核攻撃し、 S_N2 機構によってハロゲンが脱離しエステル中間体が生成する。その後、His271による塩基触媒作用によって水分子が活性化され、水分子がカルボニル炭素を求核攻撃することによって加水分解反応が進行し、生成物としてグリコール酸を与える。また、X線結晶構造解析から、Arg105とTrp150がハロゲンを引き寄せている事が示唆されている。



Scheme 1 Total FD reaction scheme: fluoride is eliminated from fluoroacetate and glycolate is produced as a final product.

本研究では、DFT計算によりフルオロ酢酸デハロゲナーゼによるフルオロ酢酸の脱ハロゲン化反応の機構について理論的解析をおこなった。また、QM/MM計算を用いてより厳密に計算を行うとともに、酵素-基質複合体の構造について検討した。

2. 計算手法

提案されている反応機構をもとに反応過程におけるエネルギー変化を評価した。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水溶媒を明示的に含めたQM/MM計算を行った(Fig. 1.)。QM領域には基質と反応に関与する活性点近傍の Asp104、Arg105、Arg108、His149、Trp150、Tyr212、His271の7残基を含めた。MM領域には活性中心から半径30Å以内に5787分子のTIP3Pモデルの水分子を加え、反応中間体および遷移状態の構造最適化計算を行った。QM領域の構造最適化にはB3LYP法を用いた。基底関数はSV(P)を用いた。スピン多重度は一重項状態とした。QM/MM計算はChemShellインターフェースを用いて行い、QM領域にはTurbomole、MM領域にはDL_POLYを用いた。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。

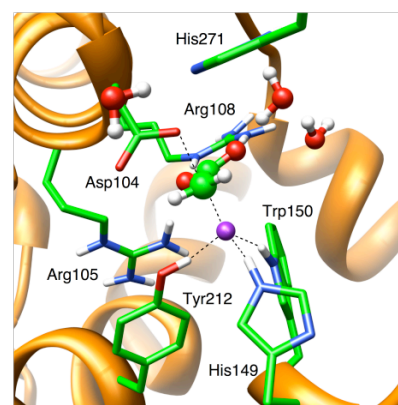


Fig. 1. The optimized structure of the transition state for fluorine replacement calculated with QM/MM method.

エステル加水分解反応に関しては、活性点近傍のGly33、Phe34、Asp104、Arg105、Asp128、His271の一部をモデル化し、末端原子位置の固定を行ったクラスターモデルでの計算を行った。構造最適化にはB3LYP法、基底関数として6-31G*を用いた。エネルギー計算には基底関数6-311++G**を用いた。スピン多重度は一重項状態とした。

3. 結果

計算結果から、フッ素脱離反応過程について、フルオロ酢酸の活性化エネルギーが2.7 kcal/molであることが判明した。この事から、Trp150 と Tyr212 がフッ素と水素結合を形成する事によりフッ素の脱離を容易にし、 S_N2 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。非常に低い活性化エネルギーから分かるように、フルオロ酢酸デハロゲナーゼの活性点は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、また、エステル加水分解過程では、活性化エネルギーが22.4 kcal/molである事が判明した。以上の結果から、律速過程はエステル加水分解であることが明らかになった2)。

4. 引用文献

- 1) K. Jitsumori, R. Omi, T. Kurihara, A. Kurata, H. Mihara, I. Miyahara, K. Hirotsu, N. Esaki, *J. Bacteriol.* **191**(2009), 2630.
- 2) T. Kamachi, T. Nakayama, O. Shitamichi, K. Jitsumori, T. Kurihara, N. Esaki, K. Yoshizawa, *Chem. Eur. J.* **15**(2009), 7394.