

シトクロム P450cam の化学反応における 環境効果のエネルギー分割解析

(京大福井セ) ○平尾 一、諸熊奎治

【序】金属酵素の強力な触媒機能は、主に金属特有の電子状態と反応中心を取り囲むアミノ酸残基の環境効果によって制御される。これらの因子を詳細に理解することは実験・理論双方にとっての重要課題であるとともに、触媒設計の文脈でも重大な意義がある。本研究で着目した金属酵素のシトクロム P450 (P450 または CYP) は生物界に広く分布するヘム酵素であるが、そのモノオキシゲナーゼ活性は触媒サイクルで生成するオキソ鉄(IV) ポルフィリンカチオンラジカル種、いわゆる compound I (Cpd I) が直接担うと考えられている。Cpd I の分子メカニズムにおいて、鉄の存在がもたらす複数の安定電子状態は反応性の鍵を握っているとみられ、その理論的解明は近年の主要研究課題の一つを形成している [1]。一方、環境効果の理解も同様に重要で、特にそれを直感的に分かりやすい形で理解することには意味があると考えられる。そこで本研究では、ONIOM(QM:MM) の mechanical embedding (ME) scheme 並びに electronic embedding (EE) scheme が有する特性を利用し、P450 反応における環境効果のエネルギー分割解析を試みた。数ある P450 酵素のうち、樟脳の水酸化を司るシトクロム P450cam (P450cam) を扱った (Fig. 1)。

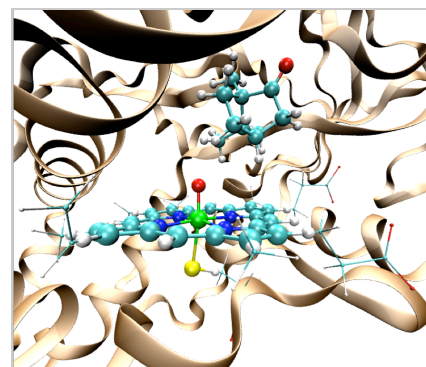


Figure 1. P450cam Cpd I.

【方法と結果】 ONIOM 計算のための QM 領域を定義するにあたり、いくつかの共有結合を切断した。このような場合、系内の領域を Fig. 2a のように分類できる。A は ONIOM で QM 的に扱われる部分、B はそれを取り囲む領域の大部分、C はその他の領域で、切断した共有結合の近傍に位置する。まず、P450cam の X 線結晶構造 (PDB code 1DZ9) から計算のための初期構造を構築した。数段階の分子力学 (MM) 的エネルギー最小化で構造の歪みを取り除いた後、ONIOM(DFT:MM)-ME 法に基づく構造最適化を行い、反応経路上の構造を決定した (Step 1)。Step 1 の計算では、Cpd I に Ref.1 の電荷を割り当て、樟脳の電荷は孤立分子に関して求めた RESP 電荷を用いた。DFT には B3LYP 汎関数、MM には AMBER 力場を用いた。DFT 計算の基底関数には [SDD(Fe), 6-31G*(others)]を用いた。得られた反応座標上の各構造に対して、一連の追

加計算と解析を行った。まず、分極を伴わない気相 QM 波動関数 Ψ_0 から、**A** に属する各原子の RESP 電荷を求めた。得られた電荷を用いて ONIOM-ME 一点計算を行った (Step 2)。次に **B** の点電荷によって分極した QM 波動関数 Ψ_{pol} に基づいて RESP 電荷を求め、この電荷を用いて ONIOM-EE 一点計算を行った。

エネルギー分割解析では、まず Step 2 の状態を用いて、静電相互作用エネルギー (E_{es}) と van der Waals (vdW) 相互作用エネルギー (E_{vdW}) を計算した。 E_{es} は、

$$E_{\text{es}} = \sum_{i \in \mathbf{A}} \sum_{j \in \mathbf{B}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + R_{\text{es}} \quad (1)$$

と定義できる。ただし R_{es} は **A** と **C** の相互作用を表す項である。 E_{es} は、ONIOM-ME 計算で得られる波動関数 Ψ_0 と周囲の点電荷との相互作用を考慮することで、

$$E_{\text{es}} = [E(\Psi_0^{\text{pc}}) - E(\Psi_0)]_{\text{pc} \in \mathbf{B}} + R_{\text{es}} \quad (2)$$

のように計算することもできるが、これら二種類の静電相互作用エネルギーはほぼ同様の傾向を示した (Fig. 2b)。また E_{vdW} は以下の様に定義した。

$$E_{\text{vdW}} = \sum_{i \in \mathbf{A}} \sum_{j \in \mathbf{B}} [A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6] + R_{\text{vdW}} \quad (3)$$

次に Step 2 と 3 の状態に基づいて、分極エネルギー (E_{pol}) を以下の様に定義した。

$$E_{\text{pol}} = E_{\text{ONIOM-EE}} - E_{\text{ONIOM-ME}} \quad (4)$$

このようにして定義した量を反応経路に沿って算出し、P450cam の化学反応に対する各種相互作用項の影響を調べた。方法や結果の詳細については当日議論する。

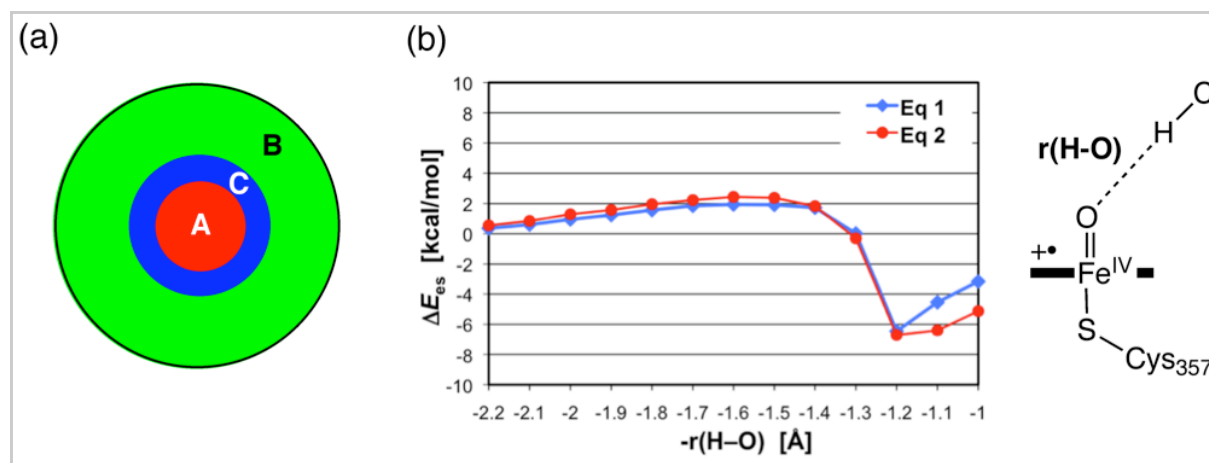


Figure 2. (a) 領域の分類. (b) 水素引き抜きに伴う静電相互作用の変化.

1. Shaik, S.; Hirao, H.; Kumar, D. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 532-542.
2. Schöneboom, J. C.; Lin, H.; Reuter, N.; Thiel, W.; Cohen, S.; Ogliaro, F.; Shaik, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8142-8151.