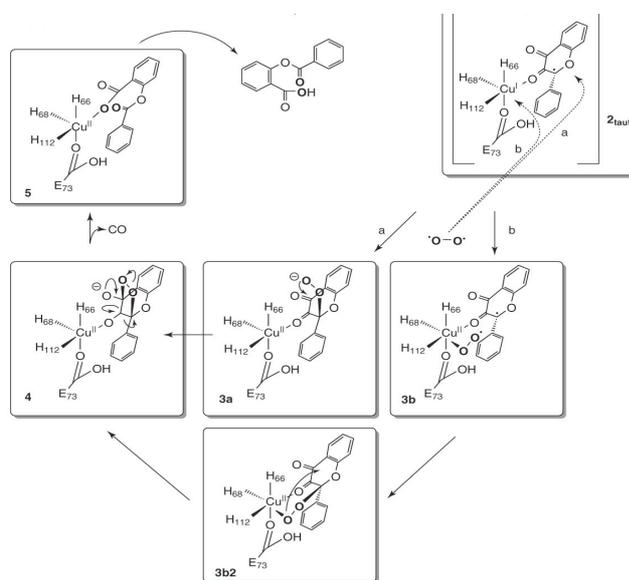


(阪大院・理<sup>1</sup>, 阪大未来戦略機構<sup>2</sup>)○齋藤 徹<sup>1,2</sup>, 北河 康隆<sup>1</sup>, 川上貴資<sup>1</sup>, 山中秀介<sup>1</sup>, 奥村光隆<sup>1</sup>**Theoretical study on reaction mechanism of copper-containing dioxygenase**(Graduate School of Science, Osaka Univ.<sup>1</sup>, Institute for Academic Initiatives, Osaka Univ.<sup>2</sup>)○Toru Saito<sup>1,2</sup>, Yasutaka Kitagawa<sup>1</sup>, Takashi Kawakami<sup>1</sup>,Shusuke Yamanaka<sup>1</sup>, Mitsutaka Okumura<sup>1</sup>

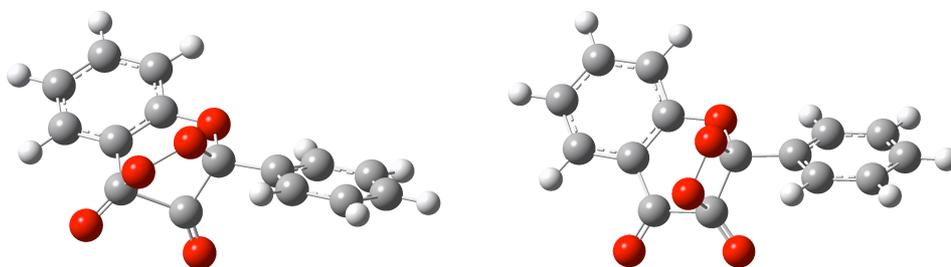
**【序】** Quercetin Dioxygenase は基質である Quercetin を酸化し芳香環を開裂する酵素である。活性部位は Type II 銅であり, 3つのヒスチジン(His66, His68, His112)とグルタミン酸(Glu73)が配位している。Steiner らは X線結晶構造解析から, Scheme 1のような2通りの反応機構を提唱している[1]。これらの主な違いは, 反応において酸素分子がCuに結合するか否かである。つまり, 反応の第一段階において酸素分子が(a) 基質との結合

**Scheme 1.** Steiner らによる反応機構[1].(a) 基質による O<sub>2</sub> の活性化, (b) Cu による O<sub>2</sub> の活性化

あるいは (b)金属との結合のどちらの機構で活性化されるかが後の反応経路を大きく左右するため非常に重要である。同様のことは鉄を活性部位に含む他のジオキシゲナーゼにも言える。Steiner らやモデル錯体を用いた研究を行っているグループは(a)を支持している[2]。一方, Siegbahn は活性部位を切り出したモデルによる QM 計算を行い, 酸素分子の活性化に Cu が関与する機構(b)の方が有利であると報告している。本研究では QM/MM 計算を用いて反応開始時における Cu(II)-Quercetin から Cu(I)-Quercetin<sup>•</sup> (**2<sub>taut</sub>**) が生じる過程, 酸化反応機構(a), (b)のどちらが有利かについて主に着目し, 後の反応機構についても検討した。

**【計算】** 初期構造には酵素・基質複合体の X 線結晶構造(PDB code: 1H1I, 1.8Å)を用いた. MODELLER (ver 9.11), CHARMM プログラム(ver c38b2)を用いて水素原子等を追加し, QM/MM モデルを構築した. QM 計算は Gaussian 09 プログラムを用いて, UB3LYP/SVP レベルで行った. MM 計算には DL\_POLY プログラム(CHARMM22 力場)をあてた. 構造最適化は DL-FIND[4] を用いた. 以上の QM/MM 計算は ChemShell プログラム(ver. 3.5)を用いて行った [4]. 比較のため, QM 領域のみを切り出したモデル(QM-only)の計算も行った.

**【結果・考察】** QM-only, QM/MM の両モデルから, 反応の第一段階の酸素分子の活性化機構は(b)金属との結合により進む方が有利であることが分かった. また, QM-only と QM/MM は異なる反応機構を与えた. 例えば, QM-only モデルでは(a), (b)とも反応中間体である endoperoxide **4** よりも安定であるものの生成物を与えない 1,2-dioxetane が得られる (Figure 1). この副反応はモデル錯体を用いた反応では見られるが[2], タンパク質では起こらない. Cu に配位しているカルボニル基が, 隣のカルボニル基よりも O<sub>2</sub> による求核攻撃を受けやすいことが主な原因と考えられる. 一方, QM/MM モデルでは Quercetin-Cu 間の電荷移動の過程において Cu-O (Quercetin) 結合が解裂するため 1,2-dioxetane が生成する反応とも競合せず, endoperoxide 中間体のみを与える. つまり, 周囲のタンパク質が選択的な反応に効いていることが示された. 計算結果の詳細は当日報告する.



**Figure 1.** endoperoxide (左)と 1,2-dioxetane(右)

### 【参考文献】

- [1] R. A. Steiner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 16625 (2002); R. A. Steiner, *In Encyclopedia of Inorganic and Biorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd (2013).
- [2] J. S. Pap et al. *Coord. Chem. Rev.* 254, 781 (2010).
- [3] P. E. M. Siegbahn, *Inorg. Chem.* 43, 5944 (2004).
- [4] J. Kästner et al. *J. Phys. Chem. A* 113, 11856 (2009).
- [5] Chemshell, a Computational Chemistry Shell; Science&Technology Facilities Council: Swindon, UK; [www.chemshell.org](http://www.chemshell.org)