

2P127 密度汎関数法によるエクストラジオールジオキシゲナーゼの Fe(II) 活性中心への酸素付加過程についての研究

(名工大院・工¹、スタンフォード大・化²、岐阜大・地域科学³)

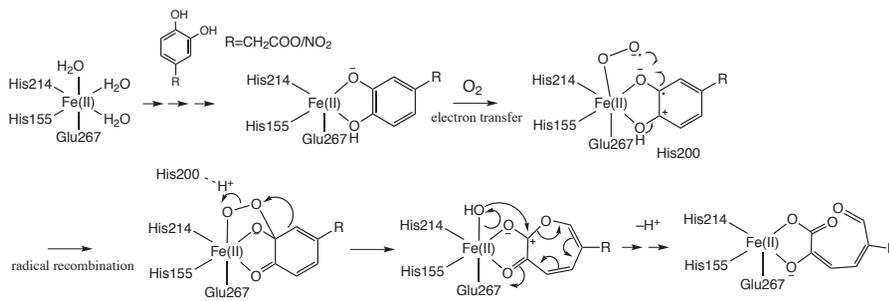
○和佐田 (筒井) 祐子¹、Kyle David Sutherlin²、和佐田 裕昭³、Edward I. Solomon²

Density Functional Study of O₂-Binding to the Fe(II) Active Site of Extradiol-Cleaving Dioxygenase
(Nagoya Inst. Tech.¹, Stanford Univ.², Gifu Univ.³)

○Yuko Wasada-Tsutsui¹, Kyle David Sutherlin², Hiroaki Wasada³, Edward I. Solomon²

【はじめに】 エクストラジオールジオキシゲナーゼは土壤中での芳香族化合物の生分解過程で、ジヒドロキシベンゼンを二つの水酸基の外側に位置する C—C 結合で開環して直鎖カルボン酸を生成する酵素である。活性中心にある Fe(II) は活性が高く、酸素の付加に続く酸素の活性化過程をスペクトルにより確認することが難しい。従来、鉄は二価のまま全反応が進むとされていたが¹⁾、メスバウアー

スペクトルと DFT 計算から活性中心で O₂⁻ が end-on 付加し、基質カテコールがカテコレートジアニオンとして Fe(III) イオンに配位していると報告されてい



スキーム 1 カテコール誘導体の酸化開環過程の推定反応機構¹⁾

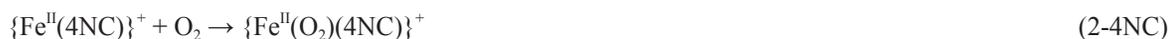
る²⁾。一方、不活性基質を用いた結晶構造では、O₂⁻ が side-on 付加し、基質がセミキノラジカルとして Fe(II) イオンに配位した構造が報告されている³⁾。このため、結晶構造の side-on 錯体が反応の中間体であるか否かが問題になっている。

本研究では、エクストラジオールジオキシゲナーゼの Fe(II) 活性中心への O₂ 付加過程における O₂ 付加エネルギーの意味を O₂ の配位構造との関連から密度汎関数法を用いて解析する。さらに、アミノ酸残基の役割および side-on 構造の安定化要因を解析する。ここでは O₂ 付加過程の概略を述べる。

【方法】 鉄イオンおよびカテコール基質として 4-nitrocatechol (4NC)、第一配位圏および第一配位圏と水素結合したアミノ酸残基からなる酵素活性中心についてのクラスターモデルを用いる。電子状態計算は BP86 汎関数に 10% の Hartree-Fock 交換積分を混合したハイブリッド関数を用いた。基底関数には鉄および O₂ に 6-311G(d)、基質およびアミノ酸残基に 6-31G(d) を用いた。タンパク質環境は誘電率 4.0 の PCM で近似した。電子状態計算には Gaussian09 rev. C.01 および D.01 を用いた。

また各種実験から酸素は基質付加後に結合し、水和状態には付加しないことが知られている。酸素付加過程を (1) 水の解離および (2) 酸素付加の二段階に分けて酸素の結合の強さおよび反応全体の進みやすさについて考察した。さらに、基質から酸素への、プロトン化した His200 の水素結合移動における電子状態変化についても考察した。

4NC 存在時



三水和休止状態



【結果および考察】 図 1 に 4NC 結合時の酸素未付加錯体 $\{\text{Fe}^{\text{II}}(4\text{NC})\}^+$ 、side-on 型酸素付加錯体 $\{\text{Fe}^{\text{II}}(\text{O}_2)$

(4NC)⁺のS=2構造を示した。基質のHis200が結合した水酸基が、酸素付加に伴いGlu267のシス位に移動し、プロトン化したHis200はO₂に移動する。基質のない二水和物{Fe^{II}(H₂O)₂}⁺では、4NCと異なりHis200が水分子に水素結合したままでプロトン化しないため、O₂⁻の負電荷を水素結合により中和できない。この結果表2に示すように、基質結合型のS=3のend-on錯体は、休止状態のS=3のside-on錯体よりも酸素との結合が安定となる。酸素付加段階は吸エルゴン反応であるが、表1に示すように水解離段階のエントロピーの効果を加えると、基質結合型に対する酸素付加反応が水和休止状態よりも起こりやすくなる。

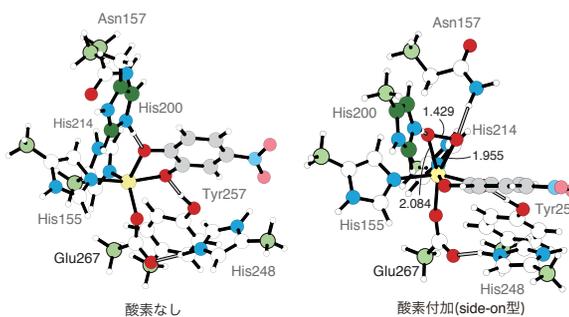


図1 4NC錯体の酸素付加前後の最適化構造(S=2)

表1 水解離段階のエネルギー、エンタルピーおよび自由エネルギー^{a)}

反応	ΔE (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
$\{\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3\}^+ + 4\text{NC} \rightarrow \{\text{Fe}(4\text{NC})\}^+ + 3\text{H}_2\text{O}$	+5.1	+0.9	-17.7
$\{\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3\}^+ \rightarrow \{\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2\}^+ + \text{H}_2\text{O}$	+8.0	+5.0	-3.1

表2 O₂付加段階のエネルギー、エンタルピーおよび自由エネルギー^{a)}

反応	S ^{b)}	O ₂ 結合	ΔE (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
$\{\text{Fe}(4\text{NC})\}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \{\text{Fe}(\text{O}_2)(4\text{NC})\}^+$	2	side-on	+0.8	+1.4	+11.4
	3	end-on	-7.5	-6.8	+11.1
$\{\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2\}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \{\text{Fe}(\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2\}^+$	2	end-on	-2.1	+0.2	+8.3
	3	side-on	-6.5	-3.8	+1.9

a) 298.15 K, 1 atm. b) 生成物のS値。

side-on錯体について、基質からO₂へのHis200を伴うプロトン移動のエネルギーおよび電子配置の変化を図2に示す。プロトン化したHis200の移動に伴い、基質4NCのπ軌道からFeO₂面に垂直なπ*軌道へとα電子が移動して4NCがカテコレートジアニオンからセミキノラジカルアニオンに、O₂が超酸化物イオンから過酸化イオンに変化する。一方end-on型ではこの電子移動が起こらない。

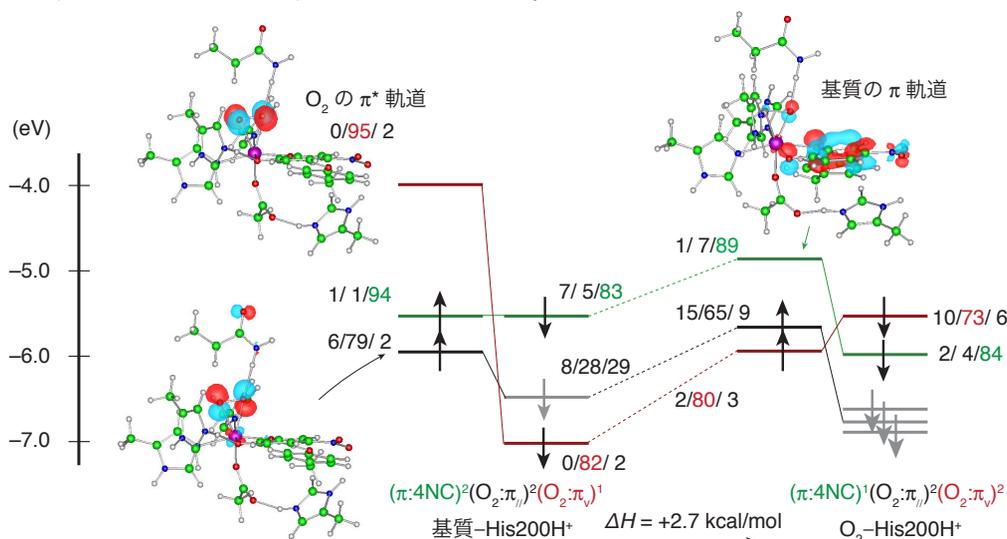


図2 基質からO₂へのHis200を伴うプロトン移動のエンタルピー変化と電子配置(S=2)

【参考文献】

- 1) M. M. Mbughuni, et.al. *Biochemistry* **50**, 10262-10274, 2011.
- 2) G. J. Christian, S. Ye, F. Neese *Chem. Sci.* **3**, 1600-1611, 2012.
- 3) E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb *Science* **316**, 453-457, 2007.

軌道に占める百分率: 3d/O₂/4NC