

## 2P100 エクストラジオールジオキシゲナーゼの酸素活性化におけるアミノ酸残基の影響についての理論的研究

(岐阜大・地域科学<sup>1</sup>、名工大院・工<sup>2</sup>、スタンフォード大・化<sup>3</sup>)

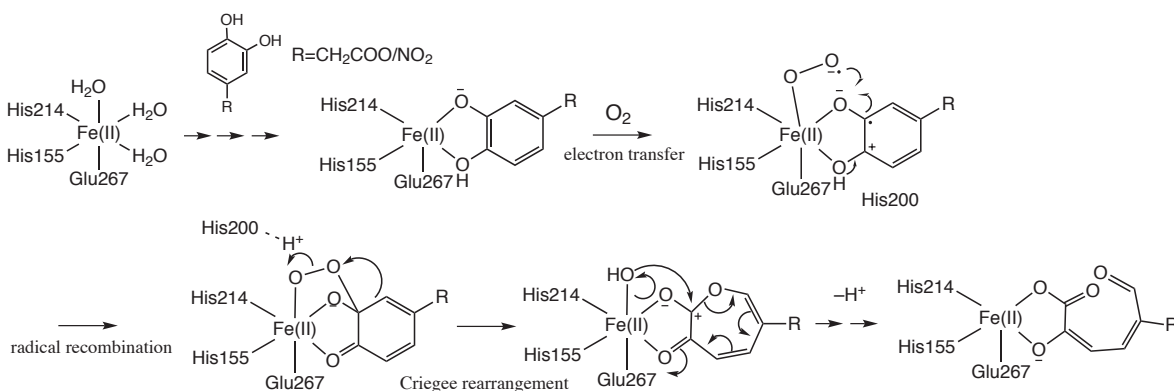
○和佐田 裕昭<sup>1</sup>、和佐田 (筒井) 祐子<sup>2</sup>、Kyle David Sutherlin<sup>3</sup>、Edward I. Solomon<sup>3</sup>

Density functional study of an effect of amino-residues on O<sub>2</sub>-activation to the Fe(II) active site of extradiol-cleaving dioxygenase

(Gifu Univ.<sup>1</sup>, Nagoya Inst. Tech.<sup>2</sup>, Stanford Univ.<sup>3</sup>)

○Hiroaki Wasada<sup>1</sup>, Yuko Wasada-Tsutsui<sup>2</sup>, Kyle David Sutherlin<sup>3</sup>, Edward I. Solomon<sup>3</sup>

**【はじめに】** エクストラジオールジオキシゲナーゼは土壌中での芳香族化合物の生分解過程の途上で、ジヒドロキシベンゼンを二つの水酸基の外側の 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。酵素活性中心には、Fe(II) に二つのヒスチジン残基と一つのグルタミン酸またはアスパラギン酸残基が配位した 2-His-1-carboxylate facial triad と呼ばれる構造がある。スキーム 1 に示すように、



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<sup>1)</sup>

反応は基質と酸素の付加で始まり、酸素の架橋に続いて Criegee 転位が起こったのち、加水分解反応でムコン酸アルデヒドに開環する<sup>1)</sup>。酸素付加段階では Fe(II) イオンにまず基質が付加したのち酸素が付加することが各種実験から知られている<sup>2)</sup>。

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) 活性中心に対する酸素付加が基質付加前ではなく、後に起こる要因を解明するために、O<sub>2</sub> の配位構造および電子状態に対するアミノ酸残基の役割について密度汎関数法により解析する。

**【方法】** 二つのエクストラジオールジオキシゲナーゼ、homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase (HPCD, EC 1.13.11.15) と 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase (DHBD, EC 1.13.11.39) とに注目した。HPCD では酸素がグルタミン酸残基の *trans* 位に<sup>3)</sup>、DHBD ではヒスチジン残基の *trans* 位に配位する<sup>4)</sup>。基質として反応の遅い 4-nitrocatechol(4NC) を用い、基質が結合した活性状態と二個の水分子が配位した休止状態について、酸素付加エネルギーを反応 (1) および反応 (2) について検討した。

○活性状態



○休止状態



4NC は pH 7.5 の溶液中ではモノアニオンとして存在する。また、Fe(II) の第二配位圏には二個のヒス

チジン残基が存在するので、第一配位圏との水素結合におけるプロトン化の影響を考慮する必要がある。これをふまえて、第二配位圏の His248 がプロトン化した状態とプロトン化していない互変異性体の両方について酸素付加エネルギーを比較した。

酵素活性中心について、第一配位圏および第一配位圏との水素結合があるアミノ酸残基からなる、ペプチド鎖を省略したクラスターモデルを用いた。結晶構造<sup>3)</sup>のアミノ酸のβ-炭素を固定して最適化した。第一配位圏による鉄—酸素結合に対する直接的な影響と、第二配位圏による水素結合などによる二次的な相互作用を評価するために、上記の第二配位圏までを含むクラスターモデルに加えて、第一配位圏のみのクラスターモデルについて酸素付加エネルギーを評価した。

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汎関数を用い、基底関数には鉄およびO<sub>2</sub>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モデルで近似した。電子状態計算にはGaussian09 rev. D.01を用いた。

**【結果および考察】** 図1にHPCDのHis248がプロトン化した活性状態と休止状態の最安定酸素付加構造をスピン状態とともに示した。活性状態では酸素はend-on配位、S=2状態が安定であり、休止状態ではside-on配位、S=3状態が安定である。His248プロトン化状態では、アミノ酸残基の配向はX線構造<sup>3)</sup>に類似するが、酸素付加エネルギーは休止状態の方が活性状態よりも酸素付加が起こりやすいことを示す。

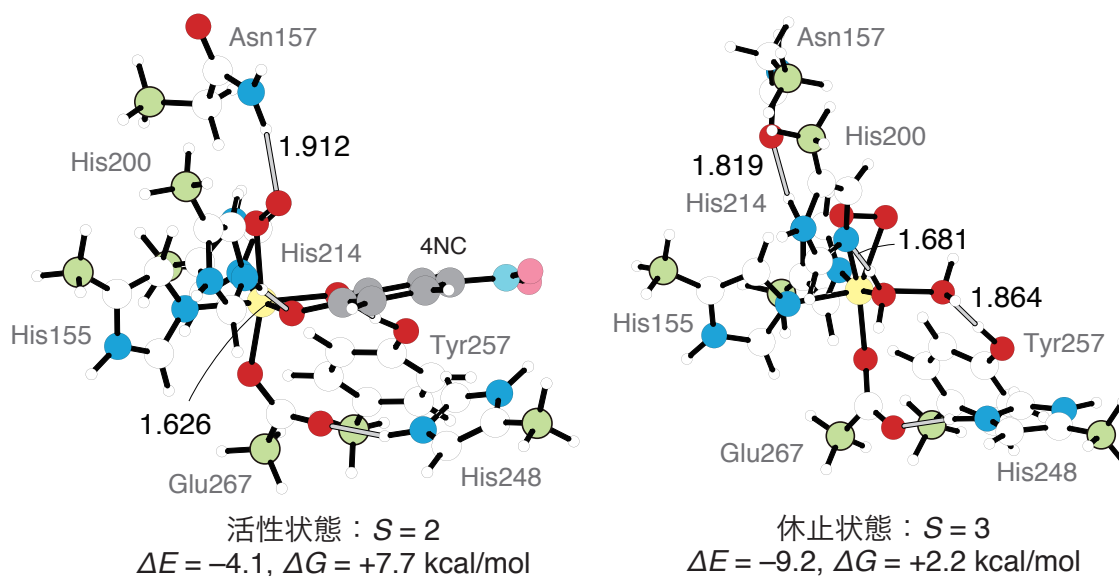


図1 活性状態と休止状態の最安定酸素付加構造。固定した炭素を緑で示した。

His248互変異性体との比較によるプロトン化および第二配位圏による水素結合が酸素付加エネルギー、酸素配位構造、電子状態に及ぼす影響、DHBDとHPCDとの違いなどについては、当日発表する予定である。

#### 【参考文献】

- 1) M. M. Mbughuni, *et.al. Biochemistry* **50**, 10262-10274, 2011.
- 2) H. H. Tai, C. J. Sih *J. Biol. Chem.* **245**, 5072-5078, 1970.
- 3) E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb *Science* **316**, 453-457, 2007.
- 4) M. I. Davis, *et.al. J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11214-11227, 2003.