

## 膜結合型メタンモノオキシゲナーゼのペルオキシ状態に関する理論的考察

(九大先導研) ○糸山修平・土井富一城・蒲池高志・塩田淑仁・吉澤一成

## A theoretical study of peroxo state of particulate methane monooxygenase

(IMCE, Kyushu Univ.) ○ITOYAMA, Shuhei; DOITOMI, Kazuki; KAMACHI, Takashi; SHIOTA, Yoshihito; YOSHIZAWA, Kazunari

**【序】** メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)は不活性なメタンをメタノールに転換する酵素であり、可溶型の sMMO と膜結合型の pMMO の2つの型が知られている。sMMO の構造は X 線結晶構造から鉄二核の活性中心を持つことが明らかになっており、その反応性についても多くの研究がなされている。いっぽうで、pMMO は sMMO にくらべて研究例が少なく、その詳細な反応性は明らかとなっていない。

近年、pMMO の X 線結晶構造解析と分光学的手法及び理論的手法により pMMO の活性中心は銅二核サイトであることが明らかとなり、酸素が銅二核サイトに配位したことを示す UV-Vis スペクトル<sup>1</sup>も得られている。しかしながら、pMMO の銅二核サイトに酸素が配位した peroxo 状態の X 線結晶構造はいまだに得られておらず、その詳細な構造は明らかとなっていない。

本研究では、QM/MM 法を用いて pMMO の resting 状態について計算を行った後、その構造をもとにして peroxo 状態の計算を行い、pMMO の peroxo 状態について予測した。本発表では計算で得られた peroxo 状態の構造と他の  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo-Cu}^{\text{II}}_2$  種の X 線結晶構造と比較し、pMMO の peroxo 構造について議論する。

**【計算方法】** pMMO の X 線結晶構造(1YEW)をもとに Discovery Studio を用いて QM/MM 計算の初期構造を作成した。QM/MM 計算のインターフェイスとして Chemshell を使い、QM 領域に TURBOMOLE、MM 領域に DL-POLY をそれぞれ用いた。QM 領域の計算において、汎関数に B3LYP-D、BP86-D、B97-D、M06-D を使い、基底関数に TZVP を用いた。MM 領域の計算において CHARMM 力場を用いた。QM 領域には二核の銅および His33, Glu35, His137, His139, Tyr374 を含めた。最適化する領域には二核の銅原子から半径 10 Å 以内の残基を含めた。

**【結果】** pMMO の resting 状態について、本研究では  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$  状態と  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$  状態の2つの状態を考慮した。各電子状態について4つの汎関数 B3LYP-D、BP86-D、B97-D、M06-D で計算し、その最適化構造を pMMO の X 線結晶構造と比較した。Table 1 に各汎関数における  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$  状態と  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$  状態の Cu-Cu 間距離を示す。pMMO の X 線結晶構造(1YEW)の銅二核サイトの Cu-Cu 間距離は 2.59 Å である。Table 1 から  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$  状態と  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$  状態それぞれの Cu-Cu 間距離を比較すると  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$  状態より  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$  状態のほうが約 0.1 Å ずつ長い。また、 $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$  状態のほうが X 線結晶構造の値に近いことから、pMMO の Resting 状態は  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$  状態と考えられる。これは pMMO の X 線結晶構造の EPR<sup>2</sup> の結果を支持している。

**Table 1. Optimized Cu-Cu distances in the resting state of the dicopper site of pMMO**

Functional	$\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$	$\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$
B3LYP-D	2.50	2.62
BP86-D	2.47	2.57
B97-D	2.49	2.56
M06-D	2.49	2.56

Resting 状態で得られた構造に二つの酸素原子を加えて pMMO の peroxo 状態を B3LYP-D/TZVP レベルで計算した。Peroxo 状態の三重項状態と開核一重項状態を計算したところ、三重項状態のほうが開核一重項状態よりエネルギーが 3.7 kcal/mol 高く、pMMO の peroxo 状態は開核一重項状態で存在していることが明らかとなった。これは、pMMO が ESR 不活性であることを支持している。計算によって得られた peroxo 状態の構造を Figure 1 に示す。pMMO の peroxo 状態の構造は Cu-Cu 間距離が 3.63 Å、O-O 間距離が 1.46 Å、Cu-O-O-Cu の二面角が 159.8° であり、他の  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo-Cu}^{\text{II}}_2$  種の値と非常に近い値を示している。また、この最適化された peroxo 状態の構造について TDDFT 計算を行ったところ、実験的に得られている UV-Vis スペクトルと非常に近いスペクトルが得られた。これらの結果から計算で得られた peroxo 状態の構造は真の pMMO の peroxo 状態であると提案する。

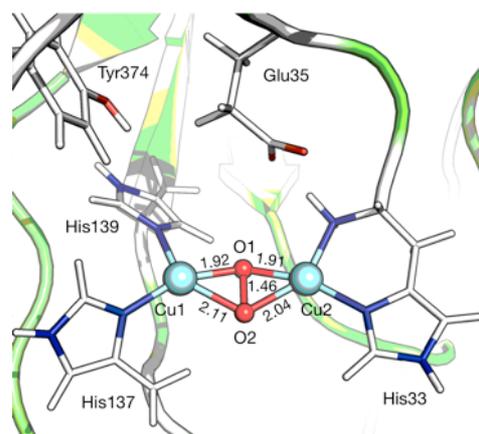


Figure 1. The optimized structure of peroxo state of pMMO

### 【参考文献】

- 1) Culpepper, M. A.; Cutsail, G. E.; Hoffmann, B. M.; Rosenzweig, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7640.
- 2) Smith, S. M.; Rawat, S.; Telser, J.; Hoffmann, B. M.; Stemmler, T. L.; Rosenzweig, A. C. *Biochemistry* **2011**, *50*, 10231.