

## 2P116 エクストラジオールジオキシゲナーゼの活性状態での酸素活性化に対する水素結合の役割についての理論的研究

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

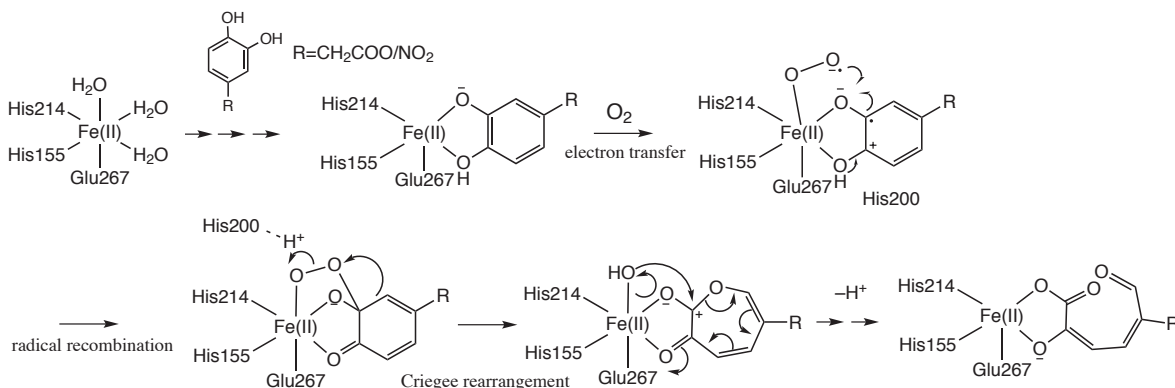
○和佐田 (筒井) 祐子<sup>1</sup>、Kyle David Sutherlin<sup>2</sup>、和佐田 裕昭<sup>3</sup>、Edward I. Solomon<sup>2</sup>

Density functional study of an important role of H-bond network playing in the O<sub>2</sub> activation of extradiol-cleaving dioxygenase in the active state

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

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

**【はじめに】** 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) 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残基が配位した 2-His-1-carboxylate facial triad と呼ばれる類縁の酵素に特徴的な構造がある。スキーム 1 に示すように、反応は基質と酸素の付加で始まり、酸



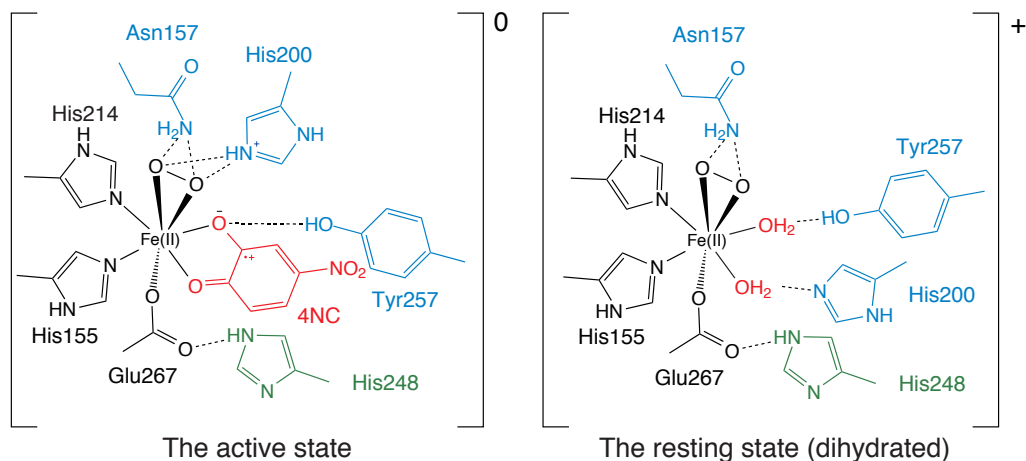
スキーム 1 カテコール誘導体の酸化開環過程の推定反応機構<sup>1)</sup>

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>。酸素付加では Fe(II) イオンに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における基質と酸素の付加の順序が、活性中心の第二配位圏にある His248 のプロトン化状態や Asn157 の水素結合に依存することを示し、酸素付加に及ぼす影響について考察する。

**【方法】** スキーム 2 に示すように、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第二配位圏の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。モデル中の反応が遅い基質 4-nitrocatechol(4NC) は pH 7.5 の溶液中ではモノアニオンとして存在するとした。結晶構造<sup>3)</sup>のアミノ酸の β-炭素を固定して、密度汎関数法により構造最適化した。

基質が 4NC のときの結晶構造では、酸素が中心 Fe(II) イオンに side-on 結合していることが示唆されている。<sup>3)</sup> この構造の安定性を確認して電子状態を解明するために、酸素が end-on および side-on 配位した構造を S=2 および 3 について確認した。また、反応が観測される pH7.5 では、ヒスチジンはプロトン化しないものの、結晶構造の Arg293 のペプチド結合とプロトン化 His248 との間の水素結合を否定できないので、His248 のプロトン化の影響を評価した。



スキーム2 クラスターモデルの構成。青は第二配位圏、緑は His248 である。His248 のプロトン化では、窒素にプロトンが付加して、各モデルの電荷が1ずつ増える。

最適化構造における酸素付加エネルギーを、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、反応(1)および反応(2)で計算し、基質が酸素付加反応を促進するか否かを確認した。

○活性状態



○休止状態



**【結果および考察】** クラスターモデルの最適化構造では、結晶構造とよく似たアミノ酸残基の配向の最適化構造とともに結晶構造からかなりずれたより安定な最適化構造が得られた。結晶構造では、休止状態および活性状態、酸素付加状態、後続の酸素架橋状態で、カテコールと酸素の間のプロトン移動を担っている His200 を除くと、活性中心周辺のアスパラギンやヒスチジンの配向にほとんど変化がなく、さらに外側の配位圏のアミノ酸残基との水素結合距離が維持されている。このように、現実の活性中心の構造は、周囲のアミノ酸との水素結合で作られられた比較的堅固で特殊な環境であると考えられた。酵素活性を議論するには、Asn157-His214 間などのアミノ酸残基間に結晶構造で実在しない水素結合が形成された人工的な安定最適化構造を排除する必要がある。

人工的な安定最適化構造以外についての酸素付加エネルギーから、結晶構造で見られる活性状態の side-on 構造が end-on 構造よりも不安定であることが示された。このことから、結晶構造で観測される side-on 構造は反応の不安定中間体が反応せずに捕捉されているものと考えられた。また、基質付加時に酸素付加しやすくなるのは、His248 がプロトン化されていないときであり、His248 がプロトン化されているときには逆に、休止状態の方が酸素付加しやすいことが示された。このことから、活性中心の His248 は pH から予想されるように、プロトン化されていないと考えられる。プロトン化による配位子上の負電荷の中和が期待できない活性中心では、配位酸素と基質の負電荷と中心イオンの正電荷の分離により、イオン結合で強く結合していると考えられる。

#### 【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.