

2P118

再構成ミオグロビンにおける $\text{CH}_3\text{-Co(III)}$ 結合の生成と
メチル転移反応の理論的研究

(九大先導研¹・阪大院工²) ○澤田明純¹・蒲池高志¹・
森田能次¹・大洞光司²・林高史²・吉澤一成¹

Theoretical study on the formation of a $\text{CH}_3\text{-Co(III)}$ bond and reaction
mechanism of transmethylation in reconstituted myoglobin

(IMCE, Kyushu Univ.;¹ Graduate school of Engineering, Osaka Univ.²)

○SAWADA, Akiyoshi;¹ KAMACHI, Takashi;¹ MORITA, Yoshitsugu;¹ OOHORA, Koji;²
HAYASHI, Takashi;² YOSHIZAWA, Kazunari¹

【序】金属酵素は、種々の金属錯体あるいは金属イオンを補欠分子として、水中、常温、常圧という温和な条件下で、高効率に様々な物質変換を行う。なかでも、生体内で安定なコバルト-炭素結合を生成するコバラミンを補欠分子として有するコバラミン依存型酵素は、代謝に関わるメチル基転移反応を加速する触媒である。メチル基転移酵素に分類されるメチオニン合成酵素は、メチルコバラミンを補欠分子として、ホモシステインからメチオニンへの分子変換の触媒として働く。この触媒反応では、コバルト 1 価種とメチルコバラミンが重要な中間体として知られている。しかしながら、コバルト 1 価種は、非常に反応性が高く、X 線結晶構造解析は達成されておらず、また酵素が関与するメチル基転移反応のメカニズムはまだ不明瞭な点が残されている。そこで酵素モデルとしてコバルトテトラデヒドロコリン (Co(TDHC)) を含む再構成ミオグロビンが構築された (Figure 1)。¹ ヘムポケット中では $\text{Co}^{\text{I}}(\text{TDHC})$ と CH_3I が反応しメチル錯体が生成し、タンパク質内でメチル基転移反応が観測された。有機溶媒中では同様の反応が進行しないことからタンパク質マトリクス効果が示唆された。そこで本研究では、酵素モデルのヒスチジン軸配位子(His93)に着目し、 $\text{CH}_3\text{-Co}$ 結合の生成とメチル基転移反応のメカニズムについて密度汎関数法を用いて理論的に考察した。

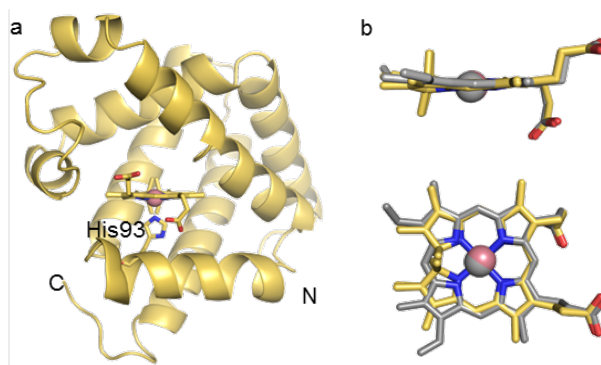


Figure 1. (a) Crystal structure of rMb($\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC})$). (b) Superimposed structures (top and side views) of the cofactors in rMb($\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC})$) (yellow stick) and native myoglobin (PDB ID: 2V1K) (gray stick).

【計算方法】計算モデルとしては、 $\text{Co}(\text{TDHC})$ の側鎖の置換基を水素に置換した $\text{Co}(\text{TDHC}')$ を用いた (Figure 2)。計算プログラムに Gaussian09 を使い、計算レベルは BP86 とした。今回は全ての原子に 6-31G*基底を用いて構造最適化を行った。構造最適化後に行う振動解析では、遷移状

態に虚の振動数がひとつ存在することを確認した。続いて、最適化構造での一点計算によりエネルギープロファイル作成のためのエネルギーを算出した。計算レベルではBP86として、基底関数には全ての原子に6-31G*基底を用いた。全ての反応熱および活性化エネルギーには零点エネルギーによる補正を加えた。

一点計算においてはタンパク質環境の溶媒効果の影響を調べるために気相中とタンパク質中の場合において、反応熱および活性化エネルギーを求めた。タンパク質中の溶媒効果は、TURBOMOLEプログラムのconductor-like screening model49 (COSMO)により取り込み、計算レベルはBP86/SV(P)を用いてエネルギーを求めた。また、タンパク質中の誘電率はこれまでの研究で一般的に使用されている $\epsilon = 4.0$ とした。

【結果と考察】 His93 軸配位子 (イミダゾール) が配位した場合と配位していない場合の $\text{CH}_3\text{-Co}^{\text{III}}(\text{TDHC}')$ 錯体の不均一結合解離エネルギー (BDE) を求めた。メチル化された $\text{Co}(\text{III})$ 錯体の BDE はイミダゾールが配位することで増加した。このことから、ミオグロビン中の His93 配位子が $\text{CH}_3\text{-Co}(\text{III})$ 種の安定化に寄与していると考えられる。

次にメチル基転移反応に関して、軸配位子が解離しながらメチル基が転移する協奏的な反応機構と、まず軸配位子が外れ、5配位のメチル錯体中間体を経てメチル基が転移する段階的な反応機構について、DFT 計算により比較検討した

(Figure 2)。各段階の構造を最適化し、メチル基転移反応のエネルギーダイアグラムを得た。協奏的な反応機構のエネルギー障壁は 20.2 kcal/mol であった。一方、段階的な反応機構では、まずコバルトに配位したイミダゾールが比較的小さなエネルギー障壁 (4.9 kcal/mol) を超え、中間体である 5 配位メチル錯体が生成する。次に、メチル基が上側のイミダゾールへと転移する。この時のエネルギー障壁は 13.6 kcal/mol であり、協奏的な反応機構と比べると活性化エネルギーが小さくなることが明らかとなった。以上の計算結果より、His 軸配位が外れることでメチル基転移反応が促進されることが支持された。²

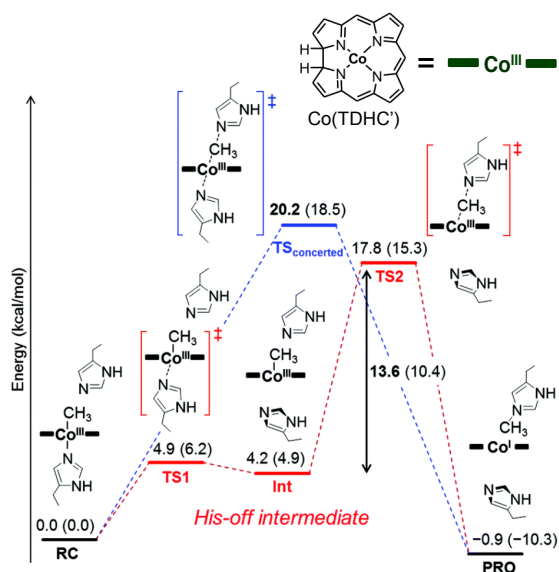


Figure 2. Energy diagrams for the transmethylation by $\text{Co}(\text{TDHC}')$. The relative energies in parentheses include the effect of a dielectric constant of 4.0.

[1] T. Hayashi, Y. Morita, K. Oohora, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 12560.

[2] Y. Morita, K. Oohora, A. Sawada, K. Doitomi, J. Ohbayashi, T. Kamachi, K. Yoshizawa, Y. Hisaeda, and T. Hayashi, *Dalton Trans.*, **2016**, 45, 3277.