

4P111 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タンパク質環境の役割についての理論的研究

(名工大¹・工¹、スタンフォード大²・化²、岐阜大³・地域科学³)

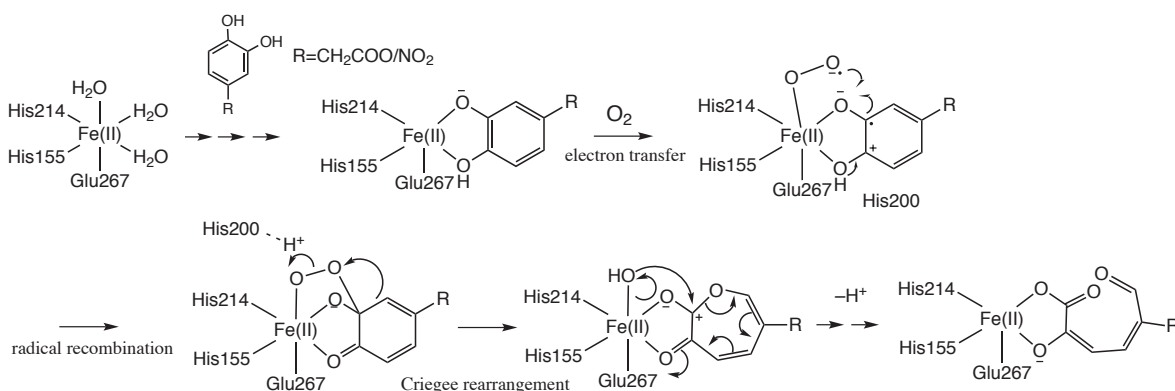
○和佐田 (筒井) 祐子¹、Kyle David Sutherlin²、和佐田 裕昭³、Edward I. Solomon²

Density functional study of the role of protein environment effective in the O₂ activation of extradiol-cleaving dioxygenase in the active state

(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】 非ヘム鉄では、酸素および鉄中心の酸化還元に伴う電子の授受における電荷の大きな変化を、周囲のアミノ酸残基との間のプロトン移動や水素結合で緩和して反応障壁を低減していることが知られている。本研究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) 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

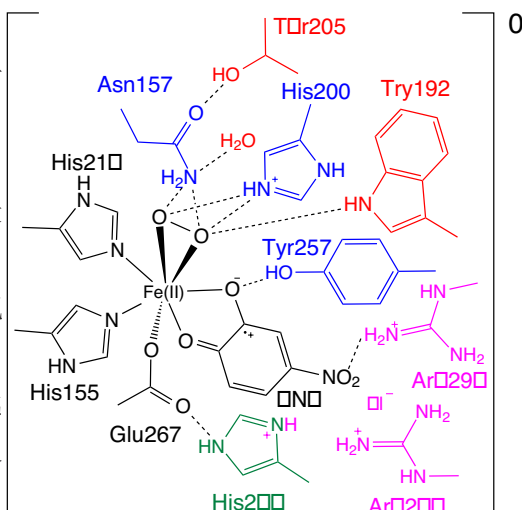


スキーム 1 カテコール誘導体の酸化開環過程の推定反応機構¹⁾

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¹⁾。反応の遅い 4-ニトロカテコール基質での酸素付加体では、両方の酸素が鉄と結合した side-on 付加構造が X 線構造解析により確認されているものの²⁾、side-on 酸素付加体の後続の反応経路における役割については解明されていない。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付加した酸素の電子配置が、Asn157 の配向により制御され、第三配位圏にある Asn157 と水分子がこれを決定していることを示し、計算上活性な中間体として指摘されている end-on 構造³⁾ との関係について考察する。

【方法】 酸素の配位構造の安定性と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、酸素との反応でスピン状態の変化を必要としない $S=2$ の状態について比較した。酸素およびカテコール基質への水素結合および静電相互作用が酸素付加構造に及ぼす影響を解明するために、第一配位圏および第二配位圏との主要な水素結合ネットワーク上の第二、第三配位圏のアミノ酸残基および水分子からなる、ペプチド鎖を省略したクラスターモデルを用いた。スキーム 2 に示した、2-His-1-carboxylate facial triad と酸素との水素結合が明らかな Asn157、プロトン輸送に関わる His200、これ

までの研究から side-on 配位構造に不可欠なことがあきらかになっている His248 を基本構造とし、基質酸素に参与するとしてやや遠い Try192、Asn157 に水素結合している水分子と Thr205、基質カテコールに参与する Arg243 と 293 との相互作用を計算した。結晶構造²⁾のアミノ酸の炭素を固定して、誘電率 4.0 の PCM をタンパク質環境とした密度汎関数法により構造最適化した。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、プロトン化した Arg243 と 293 に取り込まれた塩化物イオンが強く静電反発するため、Arg243 と 293 を導入したモデルでは His248 をプロトン化して電荷の影響を弱めた。



スキーム 2 クラスターモデルの構成。Arg243 および Arg293 導入時のみ塩素イオンと His248 のプロトンを導入した。

【結果および考察】 いずれのモデルにおいても、超酸化

物が end-on 配位した構造が過酸化物が side-on 配位した構造よりも 4 から 5 kcal/mol 安定であることが示された。しかし、図 1 に示すように、これらの構造では Asn157 の配向が大きくずれており、いずれも結晶構造よりも遠位酸素が基質カテコールから遠く、後続する架橋反応に不利であると考えられた。Asn157 が結晶構造に近い配向を保つように最適化された安定構造では、酸素が基質に近づくが、超酸化物の酸素の正孔は図 1 に示すように Fe—O 結合に平行な π^* 軌道であり、通常の end-on 配位構造および先に計算された end-on 配位構造とは異なっていた。この電子配置では陰イオン性の基質の π 電子系との反発は緩和されるものの、鉄 (III) 中心に対する強い電子供与は期待できないためやや不安定であると考えられた。この結果から、後続反応を円滑に進めるには、Asn157 が酸素 π^* の電子対の向きを水素結合で制御する必要があることが示唆された。

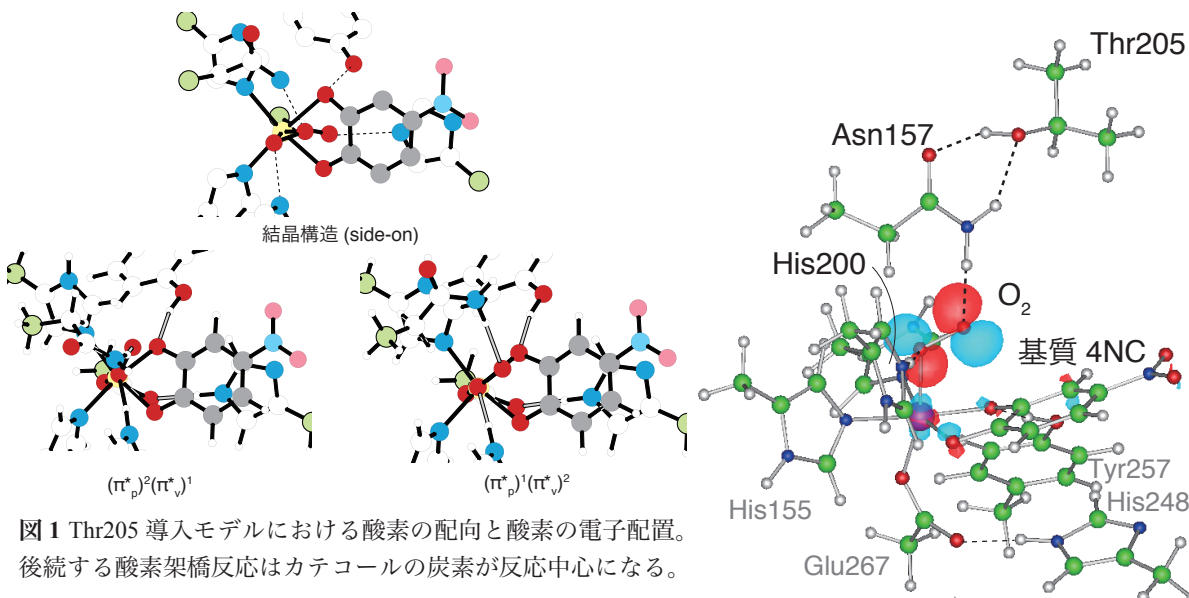


図 1 Thr205 導入モデルにおける酸素の配向と酸素の電子配置。後続する酸素架橋反応はカテコールの炭素が反応中心になる。

【参考文献】

- 1) M. M. Mbughuni, *et.al. Biochemistry* **50**, 10262-10274, 2011.
- 2) E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb *Science* **316**, 453-457, 2007.

図 2 酸素上の正孔の軌道 (α LUMO)。Asn157 は節面上で直交する酸素の π^* 電子対と水素結合している。