

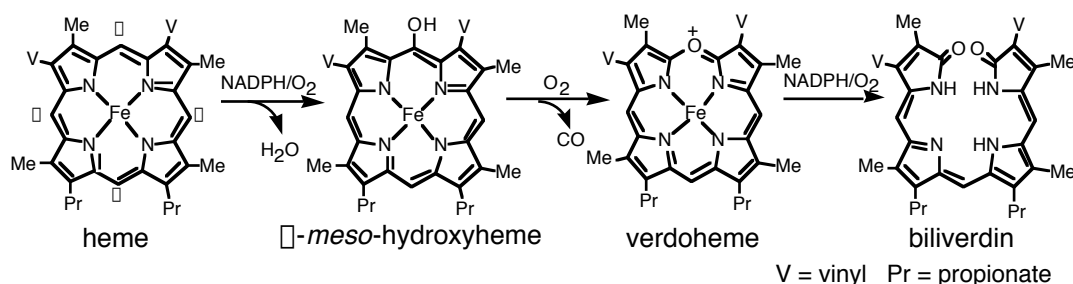
## ヘムオキシゲナーゼによるヘムの代謝機構に関する理論的研究

(九大先導研、Institute of Problems of Chemical Physics<sup>†</sup>)

○蒲池高志、Alexander F. Shestakov<sup>†</sup>、吉澤一成

【序】ヘムオキシゲナーゼはヘムをビリベルジン、CO、鉄とに分解する酸素添加酵素である。動物では鉄のリサイクル、植物では光センサーに重要なピリン類の前駆体であるビリベルジンの生成などの役割を果たしている。Scheme に示すように、本酵素によるヘム分解過程の中間体には□-ヒドロキシヘム、ベルドヘムが知られており、□位の炭素が選択的に酸化される。このようにヘムオキシゲナーゼは酸素添加反応を触媒するにも関わらず単純タンパク質であり、ヘムは基質であると同時に酸素活性化のための補欠分子族として働く。P450 では反応活性種は鉄オキソ種( $\text{Fe(IV)=O}$ )であるが、ヘムオキシゲナーゼの反応ではヒドロパーオキソ種( $\text{Fe(III)-OOH}$ )が反応に関わると考えられてきた。近年、Hoffman 等は EPR、ENDOR の測定からこの反応機構を支持している[1]。本研究では、この反応機構を密度汎関数法を用いて解析を行った。

Scheme



【計算方法】計算方法として密度汎関数法のひとつである B3LYP 法を用いた。基底関数には全ての原子に 6-31G を使い、さらに Fe、O、N、□-carbon には d 型分極を加えた。軸配位子のモデルとしてイミダゾールを採用した。ヒドロパーオキソ種の計算には電荷を 0、スピン多重度を基底状態である 2 重項とし、オキソ種の計算には電荷を 1、スピン多重度には 2 重項と 4 重項のふたつを考慮した。全ての計算には Gaussian98 を用いた。

【結果と考察】図 1 に計算で得られたヘムオキシゲナーゼのヒドロパーオキソ種によるヘムの□-ヒドロキシヘムへの転換反応のエネルギーダイアグラムを示す。ヒドロパーオキソ種の最適化構造(R-hp)の O-O 結合長は 1.446 Å であり、 $\text{CH}_3\text{S}^-$  が配位しているシトクロム P450 のヒドロパーオキソ種のモデル錯体に比べ 0.094 Å 短いものであった。この O-O 結合長の変化は Dawson 等が提案したシトクロム P450 の軸配位

子であるシステインの強い電子供与性のためと考えられる。

反応の初期段階において、ヒドロパーオキシ部の OH 基がヘムの  $\alpha$ -炭素に直接攻撃し、中間体 **I1-hp** が生成する。その後、転移した OH 基の水素が生成したオキシによって引き抜かれる遷移状態 **TS2-hp** を経て、**I2-hp** が生成する。さらに、ポルフィリン上の酸素が  $\alpha$ -炭素から水素を引き抜くことで  $\alpha$ -ヒドロキシヘムが生成する。

また、シトクロム P450 の反応で主な活性種として働く、オキシ種についても解析を行った。図 2 に示すように、ポルフィリンが大きく歪むことで、オキシが  $\alpha$ -炭素と結合し、中間体 **I1-oxo** が生成する。この歪みを緩和するため、Fe–O 結合が開裂する。その後、ヒドロパーオキシ種の場合と同様に生成物に至る。

計算の結果得られた活性化エネルギーはヒドロパーオキシ種、オキシ種ともに 40 kcal/mol ほどと極めて高い。例えばシトクロム P450 の Compound I による強固な C–H 結合の引き抜き反応でさえ半分の 20 kcal/mol ほどである[2]。本研究の結果は従来考えられてきた反応機構について再考を促すものとなった。(J. Am. Chem. Soc. submitted.)

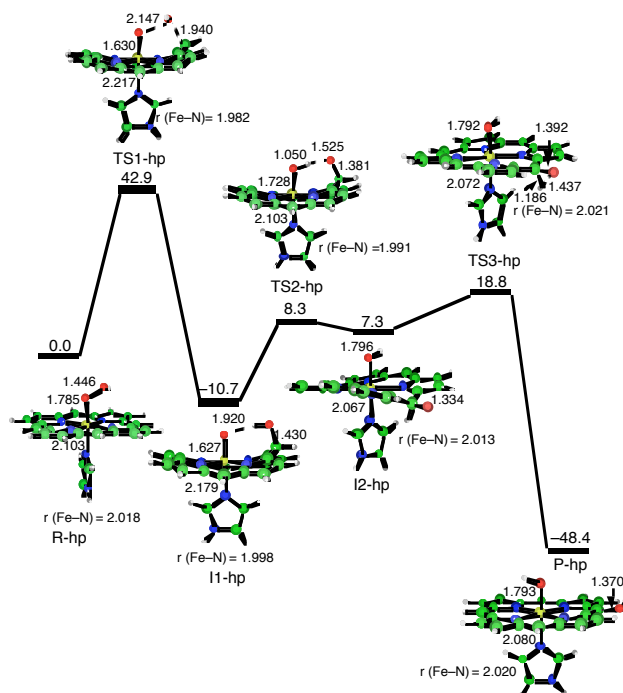


図 1. ヘムオキシゲナーゼのヒドロパーオキシ種によるヘム酸化過程に関するエネルギーダイアグラム。(単位は kcal/mol、Å)

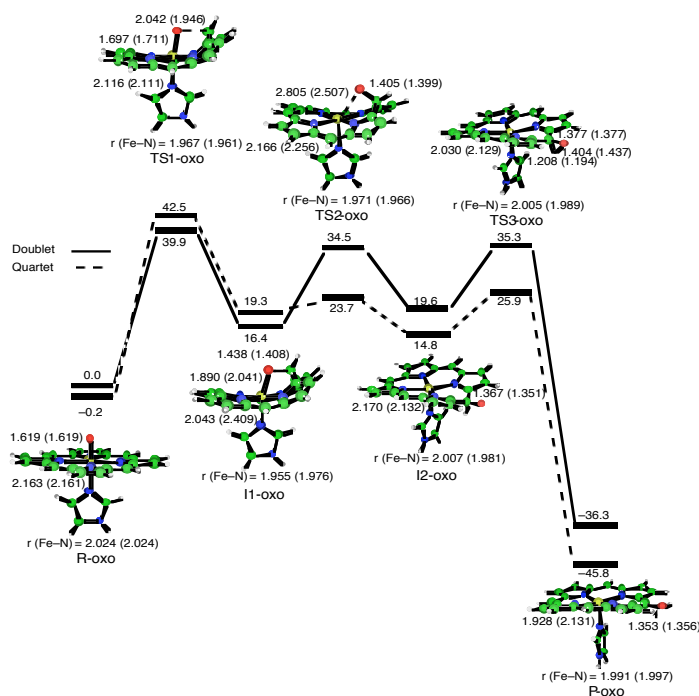


図 2. ヘムオキシゲナーゼのオキシ種によるヘム酸化過程に関するエネルギーダイアグラム。(単位は kcal/mol、Å)

[1] Davydov, R.; Kofman, V.; Fujii, H.; Yoshida, T.; Ikeda-Saito, M.; Hoffman, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1798. [2]

Kamachi, T.; Yoshizawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4652.