

シトクロム c 酸化酵素による一つ目の水分子の 生成機構と電子状態変化

(三重大工) ○吉岡泰規・河合弘子・三谷昌輝

【序】シトクロム c 酸化酵素 (CcO) はミトコンドリア内膜に存在し、酸素分子を水分子に 4 電子還元する反応を触媒する電子伝達系の最終酵素である。この反応機構については、実験サイドから多くの提案がなされているものの未だに確定していないのが現状である。特に、一つ目の水分子の生成機構は百家争鳴の状態にある。我々は、水分子の生成機構の解明と還元過程での電子状態の変化の解明を理論化学計算から試みた。

【活性部位のモデル】CcO の活性部位はヘム a と Cu の遷移金属原子 2 核系から構成され、ヘム a には 1 個のヒスチジンが配位し Cu には 3 個のヒスチジンが配位し、そのうち 1 個のヒスチジンはチロシンと共有結合を形成している。しかしながら、アミノ酸のペプチド結合およびヘムの置換基を含めると非常に大きな系となるため、活性部位の性質を損なわないようにヒスチジン残基はイミダゾール基にチロシンはフェノールに置き換え、ヘムの置換基も還元反応に重要と思われるものを残した。図 1 に生成機構を検討した CcO の活性部位のモデルを示す。

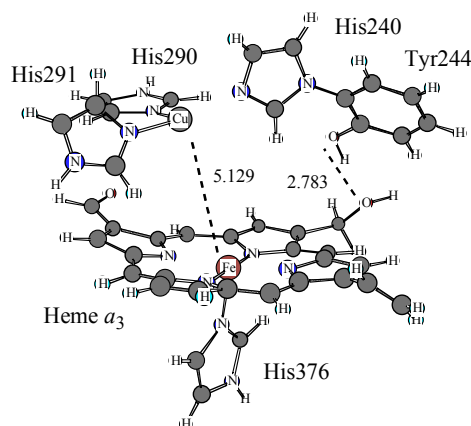


図 1 CcO の活性部位のモデル

【計算方法】生成機構を電子論的な立場から解明する目的で、電子相関効果を取り入れた密度汎関数の B3LYP 法を用いて計算を行った。構造に関しては、酸素分子、水分子、および反応に関与する原子のみを最適化した。電子状態の解析には、自然軌道とそれらの線形結合で得られる局在化したラジカル軌道を用いた。

【結果・考察】図 1 には示されていないが、His290 と Tyr244 との間に同時に水素結合を有する水分子が 1 個存在することが判った。この水分子から Tyr244 の OH、ファルネシルエチル基の酸素原子、さらに、別の水分子へと水素結合のネットワークがあり、K-channel に連結していることが判った。反応は、まず、酸素分子が Fe に結合した Fe-O₂ を形成することから開始されることには意見が一致している。その後、Fe-O₂H が形成されると多くの提案がなされているが、Fe-O₂H

形成の機構は未だに確定していない。我々は、この K-channel からプロトンが供給されると考えるのは合理的であり、His290 と Tyr244 との間の水分子をヒドロニウムイオンに変えて構造の最適化を行った。

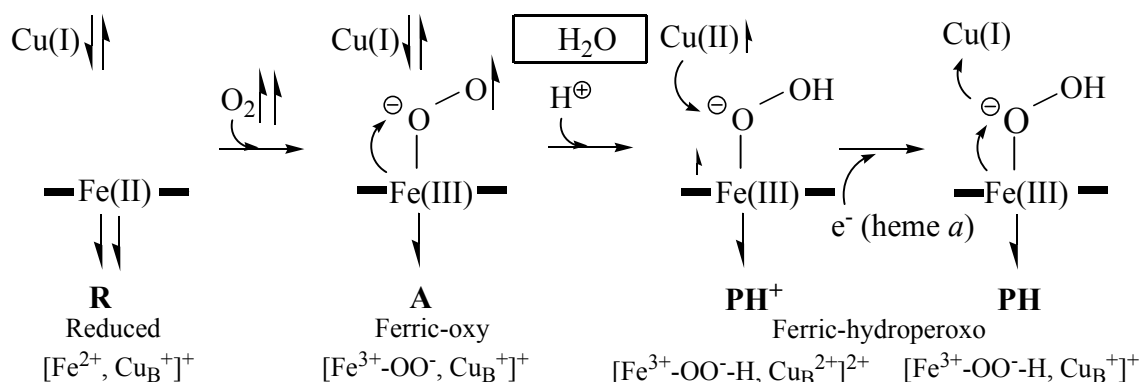


図2 Water-Proton Transport (WPT) 機構

ヒドロニウムイオンは Fe-O-O に接近し、酸素—酸素間の距離が 2.6 Å 付近でプロトン Fe-OO に渡した後、水分子は元の水素結合の位置に戻り Fe-O-O-H (図2の PH^+) が形成されることがわかった。すなわちこの水分子は還元反応に必要な水素イオンを運搬する役割を担っており、WPT 機構と命名した。酸素分子が Fe に結合した A 中間体は、Fe 原子と OO にスピンの局在化した 1 重項ビラジカル状態であり、Fe 原子は 3 価であり、Cu 原子は 1 価である。プロトンが結合した PH^+ 状態は 1 重項ビラジカル状態であるが、down-spin が鉄原子に局在化し up-spin が Cu とポルフィリン環に非局在化し A 中間体とは全く異なる電子状態である。すなわち、Cu 原子から Fe-OOH に電荷移動が起こり、Cu 原子の電子状態は 1 価から 2 価に変化していることが解る。しかしながら Fe 原子の電子状態は変化せず 3 価のままである。この A 中間体から PH^+ 状態への電子状態の変化は、ヒドロニウムイオンが Fe-O-O にプロトンを渡す前後 (2.6 Å) で急激に起こる。 PH^+ 状態から引き続き、活性部位付近に存在するヘム a から電子が供給されるとして活性部位に電子を注入すると、Fe-OOH である 2 重項状態の PH 状態が形成された。この時、注入された電子は PH^+ 状態の Cu とポルフィリン環に非局在化した軌道を占有し Cu 原子は 1 価に復帰する。Fe 原子にはラジカルが局在化した電子状態へと変化する。すなわち、Fe-OO から Fe-OOH を形成する反応には、His290 と Tyr244 との間に存在する水分子が還元反応に必要なプロトンを運搬するという重要な役割を担っている。さらに、Fe 原子は 3 価のまま変化しないが Cu 原子は 1 価から 2 価へ 2 価から 1 価へと変化する。

PH 状態形成後、さらに水分子をヒドロニウムイオンに変えると、Fe-OOH 形成と同様に WPT 機構で Fe-OOH₂ が形成される。この時、 PH^+ 状態とは異なり Cu 原子は 2 価に変化せず 1 価のままである。次に、活性部位に電子を注入すると Fe-OOH₂ から OO 結合が切れ H₂O が形成され水素結合によって保持されながら反応系外へと押し出された。

まとめると、Fe-OO から一つ目の水分子が形成されるには、His290 と Tyr244 との間に存在する水分子がプロトンを 2 回運搬することが重要な要因になっている。