

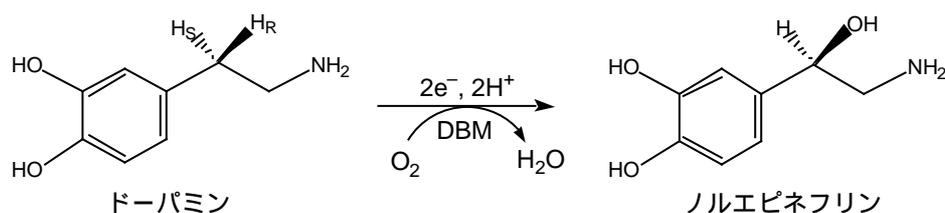
2P065

ドーパミン β -モノオキシゲナーゼによる C-H 結合活性化機構に関する理論的研究

(九大・先導研) 木原直樹, 蒲池高志, 塩田淑仁, 吉澤一成

【序論】 ドーパミン β -モノオキシゲナーゼ(DBM; EC 1.14.17.1) は活性サイトひとつあたり 2つの銅原子を含んでおり、それらの銅中心は単核で存在している(Cu_A, Cu_B)。Scheme 1 に示すように、DBM はドーパミンのベンジル位にある *pro-R*、*pro-S* と呼ばれる 2種類の水素原子のうち、*pro-R* の水素原子のみを立体特異的に水酸化し、ノルエピネフリンに変換する。

Scheme 1



ドーパミンの水酸化を行う銅-酸素活性種には、銅-スーパーオキシ、-ヒドロパーオキシ、-オキシ種の 3つの候補があるが、それらの中でも銅-スーパーオキシ種がドーパミンの水素原子引き抜きを行う活性種として有力であることが報告されている[1]。しかし、残念なことに、DBM の立体構造は明らかとなっていないため、銅の活性サイト近傍のアミノ酸残基がこの反応に果たす役割について議論を行うことはできていない。そこで、本研究では、DBM の立体構造を相同性 29.5%のペプチジルグリシン β -ヒドロキシレイティングモノオキシゲナーゼ (PHM; EC 1.14.17.3) からホモロジーモデリングにより予測し、quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM)法により、活性中心だけでなく、タンパク質全体を考慮した計算を行った。また、QM/MM 計算の QM 領域だけを切り出したモデルを用いてドーパミンの水酸化の過程を密度汎関数法により解析を行った。

【計算方法】 DBM の立体構造は PHM を鋳型としてホモロジーモデリングにより作成した。QM/MM 計算を行うために、この立体構造に水素原子をつけ、QM 領域を固定したまま MM 計算により構造の緩和をはじめに行った。QM/MM 計算は Gaussian 03 プログラムに含まれる ONIOM(IMOMM)法より実行した。QM 領域はドーパミンと銅イオンとそれに配位した His415、His417、Met490 とした。計算方法は密度汎関数法の一つである B3LYP 法を用い、基底関数は銅原子には TZV、スーパーオキシ、ヒドロパーオキシ、オキシ配位子、銅原子に直接配位する原子には D95*、残りの原子は D95 を用いた。MM 計算には Amber force field(Amber96)を用いた。

また、QM/MM 計算の QM 領域だけを切り出したモデルを用いてドーパミンの C-H 結合活性化および酸素リバウンド機構についても考察を行った。すべての構造は B3LYP/6-31G*レベルで最適化を行い、振動解析によりそれぞれの状態が妥当であることを確認した。構造最適化後、B3LYP/TZV レベルで 1 点計算を行い、B3LYP/6-31G*レベルのゼロ点補正のエネルギーを加えた。

【結果と考察】

ホモロジーモデリングにより作成した DBM の立体構造から、ドーパミンの水酸化を行う Cu_B には His415、His417、Met490 が配位していることが分かり、この結果は DBM の銅の配位環境を示すスペクトルの情報と一致していた。ドーパミンは周辺アミノ酸残基の Glu268、Glu369、Tyr494 と水素結合しており、これらの水素結合によりドーパミンの位置が固定されることで、ドーパミンの *pro-R* の水素原子が立体選択的に引き抜かれることが明らかとなった。QM/MM 計算により得られた銅-スーパーオキシ、-ヒドロパーオキシ、-オキシ種の構造を図 1 に示す。

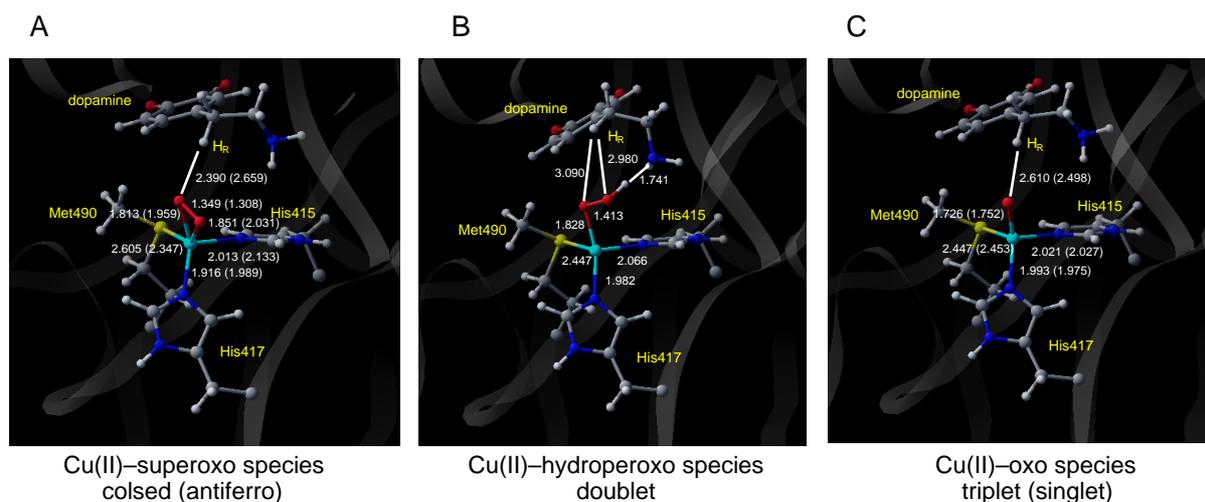


Figure 1. Optimized structures of three putative oxidants for the hydroxylation of dopamine by DBM. (A) The Cu(II)-superoxo species. (B) The Cu(II)-hydroperoxo species. (C) The Cu(II)-oxo species.

QM/MM 計算の QM 領域のみを切り出したモデル計算から、銅-ヒドロパーオキシ種は不活性な化学種であることが判明したため、活性種の候補から外した [2]。銅-スーパーオキシ種によるドーパミンの水素原子引き抜きの活性化エネルギーは 14 kcal/mol となり、水素原子引き抜き後に生じる銅-ヒドロパーオキシ種のドーパミンラジカルへのリバウンドの活性化エネルギーは 9.7 kcal/mol となった。このモデル計算では、ドーパミン自身の回転やドーパミンのヒドロキシル基と配位子のイミダゾールとの間に水素結合が生成されたため、QM/MM 計算の構造から大きく異なるものとなった。このことからドーパミンとその周辺アミノ酸残基間の水素結合はこの反応の制御に不可欠であると考えられる。銅-オキシ種による水素原子引き抜きの活性化エネルギーは 3.8kcal/mol、リバウンドの活性化エネルギーは 6.5 kcal/mol となり、銅-オキシ種は最も高い反応性を有していることが判明した。仮に銅-ヒドロパーオキシ種の O-O 結合が周辺タンパクにより有効に活性化されるのであれば、銅-オキシ種が活性種になると考えられる。

【参考文献】

1. Francisco, W. A.; Blackburn, N. J.; Klinman, J. P. *Biochemistry* **2003**, *42*, 1813.
2. Chen, P.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4991.