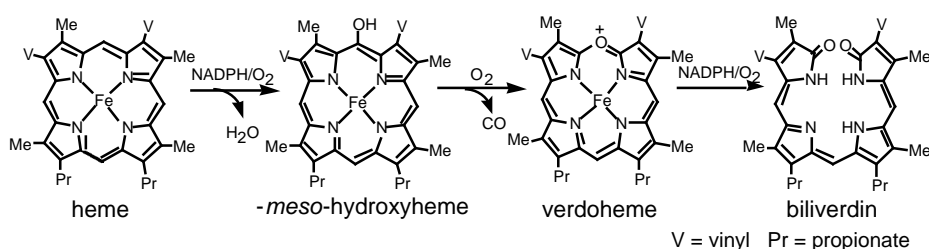


1D18 ヘムオキシゲナーゼによるヘムの代謝機構に関する理論的研究

(九大先導研) 蒲池高志, 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。下に示すように、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(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 (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。



【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 Fe には TZV 基底を、残り全ての原子に D95 基底を用い、さらに 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 -2、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。QM/MM 計算には ONIOM 法を用い、MM のパラメーターに AMBER96 を使用した。全ての計算には Gaussian03 を用いた。

【結果と考察】 Fig. 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過程を示す。ヒドロパーオキソ種の最適化構造の O-O 結合長は 1.449

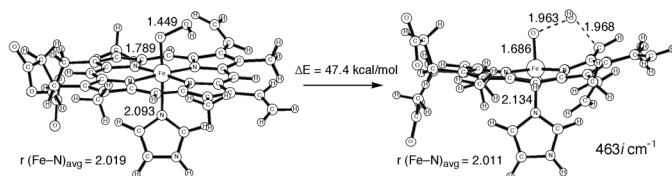


Figure 1. Computed energetical changes in heme oxidation by an iron-hydroperoxo species with protoporphyrin IX in the doublet state. Energy in units of kcal/mol and bond distances in units of Å.

であり、この O-O 結合の開裂と distal 酸素と位の炭素間の結合生成が同時におこる協奏的な反応

により OH 基が 位の炭素に転移する。しかし、この遷移状態における活性化エネルギーは 47.4 kcal/mol と酵素反応としては高いものとなった[2]。これは従来提案されてきた反応機構に見直しを迫る結果といえる。

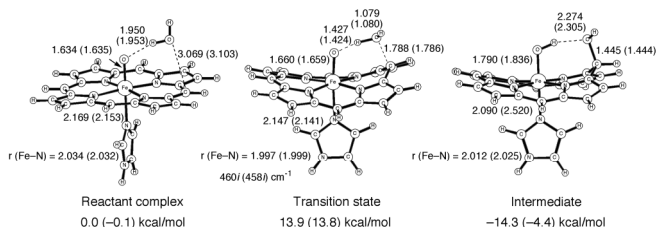


Figure 2. Computed geometrical and energetical changes in heme oxidation by an iron-oxo species with the aid of a water molecule in the doublet (quartet) state. Energy in units of kcal/mol and bond distances in units of Å.

ここで我々はシトクロム P450をはじめ多くのヘム酵素の反応で活性種として働くオキシ種についても解析を行った。その結果、Fig. 2 に示すように distal 酸素と 位の炭素間に橋渡しする水分子を置くことでこの反応の活性化エネルギーが 13.9 kcal/mol まで低下することが明らかとなった[3]。この反応機構において反応性の高いオキシ配位子が攻撃するのは 位の炭素ではなく水分子であり、この水分子の O-H 結合の開裂と酸素と 位の炭素間の結合生成が同時におこる協奏的な反応が起こることが判明した。

Sugishima 等が決定した HO の X 線構造に基づき、全原子(約 4000 原子)を含む現実モデルを構築し、QM/MM 法を用いてヒドロパーオキシ種およびオキシ種と周辺タンパク環境の相互作用について考察した。その結果、Sugishima 等が予測したように活性中心近傍に Arg136、Asp140 および幾つかの水分子からなる水素結合のネットワークが存在しており、これが酸素の O-O 結合を活性化するために重要であることが示された。これらの計算結果から我々は Fig. 3 に示すような新たな反応機構を提案した。

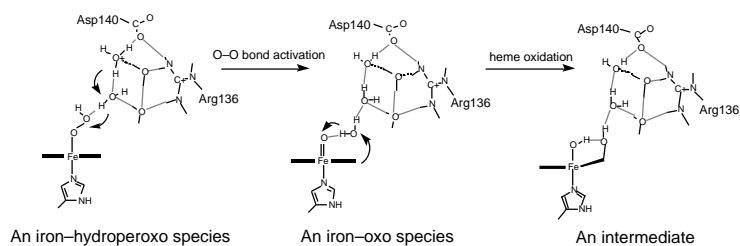


Figure 3. A proposed mechanism of heme oxidation by HO.

- [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.; Shestakov, A. F.; Yoshizawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3672.
- [3] Kamachi, T.; Yoshizawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10686.
- [4] Sugishima, M.; Sakamoto, H.; Higashimoto, Y.; Omata, Y.; Hayashi, S.; Noguchi, M.; Fukuyama, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45086.