

サレン鉄錯体を用いたカテコールジオキシゲナーゼのモデル研究：鉄に配位した水分子が構造と機能に及ぼす効果について

○倉橋拓也[†]、織田賢二[‡]、杉本学[#]、小倉尚志[‡]、藤井浩[†]

[†]分子科学研究所&岡崎統合バイオサイエンスセンター、兵庫県立大学[‡]、熊本大学[#]
kurahasi@ims.ac.jp, hiro@ims.ac.jp

Protocatechuate 3,4-dioxygenase (3,4-PCD) は芳香族化合物の生分解において重要な働きを担う酵素で、カテコールをイントラジオール型に酸化開裂してジカルボン酸を生成する。3,4-PCD の活性部位は、図1に示すように単核 Fe(III) に二つのヒスチジン残基 (His460 と His462) とチロシン残基 (Tyr408 と Tyr447)、及び外部配位子として OH が配位して、特異な三方両錐型構造を形成している。酵素反応はカテコールが鉄イオンに配位することで開始されるが、外部配位子の OH だけでなく Tyr447 も脱離し、さらに配位構造が三方両錐型から四方錐型へと変化する。この独特な活性部位構造や基質結合様式は 3,4-PCD に特徴的なもので、His₂Asp/Glu の配位構造を共通して持っている他の単核鉄酸化酵素と大きく異なっている。私たちは 3,4-PCD がなぜこのような特異な活性部位構造を持ち、それが酵素機能にどう関連しているのかに焦点を当て、詳細なモデル研究を行った。

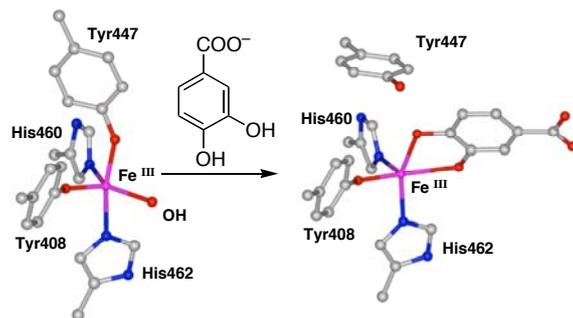


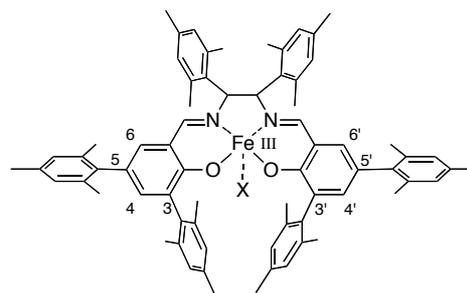
図1 3,4-PCD と 3,4-PCD-カテコール複合体

3,4-PCD 活性部位の構造を再現するために、N₂O₂ 配位のサレン錯体を用いて一連のモデル錯体を構築した(図2)。なかでも錯体**3**は外部配位子として水分子が Fe(III) 中心に配位して 3,4-PCD と類似した構造を持つが、非常に興味深いことに平面構造をとりやすいサレン錯体が 3,4-PCD 類似の三方両錐型にひずんでいることがわかった。このひずみの要因を追究するために、一連のサレン錯体の結晶構造を詳細に比較検討した。外部配位子の効果を検討したところ、配位子の分光化学系列に従って OH₂ (**3**) > OEt (**2**) > Cl (**1**) の順にサレン錯体のひずみが解消され、四方錐型に近い構造をとることがわかった。また立体障害のより小さいサレン Fe(III) 錯体に関しても全く同様な配位子-ひずみの相関関係が観察された (**6** > **5**)。したがって単核 Fe(III) 中心のひずみは立体的な要因によるものではなく、電子的要因であることが示唆された。一方中心金属が Fe(II) や Mn(III) である場合はこのようなひずみが全く観測されず、外部配位子の電子的効果は Fe(III) 中心に特有の現象であること

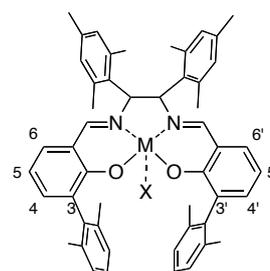
もわかった。さらに DFT 計算を実施したところ、高スピン Fe(III)中心について実験結果と全く同様な配位子効果が再現された。以上の結果より錯体 **3** が三方両錐型にひずんだ最も大きな要因は、高スピン Fe(III)中心に水分子が配位したことによる電子的効果であると推測された。

モデル錯体の溶液構造を種々の分光測定により検討した。錯体 **3** は可視領域に二つの LMCT バンドを示し、フェノレート C-O 伸縮振動に由来する二つのラマンバンドを与えた。これは錯体 **3** が溶液中においても三方両錐型にひずんでおり、二つのフェノレートが非等価であることを示唆している。また ESR スペクトルを測定したところ、錯体 **3** は 3,4-PCD と同様に $g=9.2$ 、 4.3 にシグナルを与えた。NMR スペクトルを -70°C で測定すると、二つのフェノレートの ^1H NMR シグナルが二本に分裂した。この分裂の幅は結晶構造で見いだされたひずみの大きさに対応して、**3** > **2** > **1** の順であった。以上の結果より結晶構造で見いだされたひずみが溶液中でも保持されていることが強く示唆された。

3,4-PCD の活性部位近傍の構造を詳しく眺めても、特異な三方両錐型構造を保持する水素結合等は見当たらない。また基質、阻害剤などが結合することで 3,4-PCD は柔軟に活性部位構造を変化させる。このことから私たちは 3,4-PCD の活性部位でも今回モデル系で明らかにした外部配位子の電子効果が働いている可能性が高いと考えている (図 3)。本講演では水分子の電子効果について詳述するとともに、3,4-PCD の触媒サイクルにおいて水分子の果たす役割を議論したい。



1 (X = Cl), 2 (X = OEt), 3 (X = OH₂), 4 (X = OH)



5 (X = Cl, M = Fe^{III}), 6 (X = OMe, M = Fe^{III}),
7 (X = OH₂, M = Fe^{III}), 8 (X = HOMe, M = Fe^{II}),
9 (X = BF₄, M = Mn^{III})

図 2 サレンモデル錯体

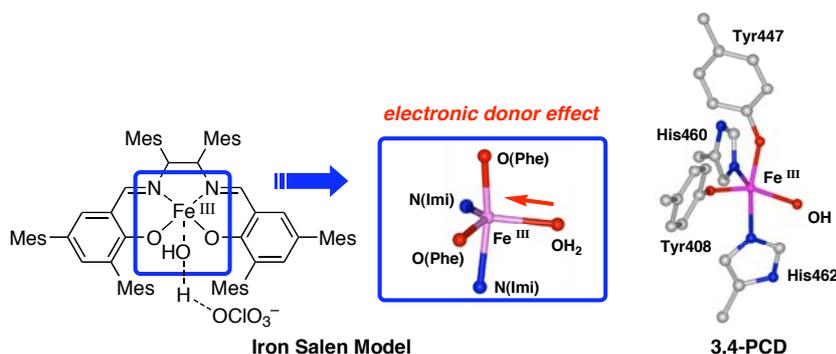


図 3 サレンモデル錯体と 3,4-PCD 活性部位の比較