

活性酸素種の量子化学的研究

特集 プロジェクト研究

吉岡 泰規*

Quantum chemical study of active oxygen species

Key Words : 活性酸素種, DNA 損傷, 金属酵素, ジオキセタン, 量子化学

はじめに

空気中に含まれる約20%程度の酸素分子は、基底状態が3重項状態のピラジカルであるが、我々が生きていくうえで必要不可欠な化合物であることは、科学者ならずとも万人が知っていることである。しかしながら、その励起状態である1重項酸素分子($^1\text{O}_2$)、さらに1個の電子を受け取った O_2^- は活性酸素と呼ばれ、我々が生きていく上で害をなすものである。最近、TVなどでも健康管理の側面から活性酸素が採り上げられ万人が知るところとなっている。特に、 O_2^- は生体内で生成されその高い活性故に、老化、癌、炎症、血管障害、動脈硬化、肺気腫など多くの疾患の引き金となっている。このように人間の生命活動にとって活性酸素は悪玉の代表のように言われている。しかしその反面、 O_2^- は殺菌作用、情報伝達、古い蛋白質の破壊など生命維持に必要な役割を担っており、適度な量の O_2^- はかえって必要であると付記しなければならない¹⁾。

一方、遺伝子DNAの障害(損傷・切断)は発癌、制癌にかかわっており我々の生活にとっては重要な問題である。このDNAの障害には種々の要因が提案されているが、活性酸素もまたその引き金となっていることが明らかにされている。しかしながら、活性酸素によるDNA鎖の障害部位、障害機構の研

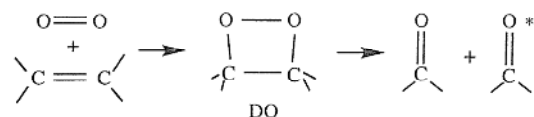
究は多領域(化学、生物、医学など)において精力的に研究がなされているがすべてを解決するまでには至っていない状況である。

本報告では、DNA損傷に直接関与する1重項酸素分子を採り上げ、それと最も基本をなすアルケンとの反応にかんする理論化学的研究を紹介する。さらに、現在研究が進行中であり結論を出すには至っていないが、DNAの1電子酸化に関する量子化学的研究の要点をごく簡単に紹介する。これらに加えて、活性酸素ではないが、生命に必要な酸素分子を水分子に還元する金属酵素シトクロームcオキシダーゼ(CcO)の活性サイトでの反応様式の量子化学的研究も紹介する。以上、3つのテーマに関して概要だけになってしまうが簡単に報告させていただく。

本研究は、科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業の一環である「単一分子・原子レベルでの反応制御」に基づく受託研究契約によるものであり、京都大学大学院工学研究科の斎藤烈教授との共同研究による成果である。

1. ジオキセタンの生成・開裂反応

1重項酸素分子($^1\text{O}_2$)とオレフィン分子との反応は、



1, 2-付加反応によってジオキセタン(DO)が生成し、多くの場合不安定なDOは熱分解によってカルボニル化合物に開裂し場合によっては発光をとまなう。化学式としては簡単な反応であるが、反応機構が未だ明確になっていないのが現状である。そこで、我々は量子化学的手法を用いて反応機構の理論的研究をおこなった。



*Yasunori YOSHIOKA
1950年7月19日生
大阪大学大学院基礎工学研究科・化学系後期課程修了
現在、大阪大学大学院理学研究科化学専攻、助教授、工学博士、量子化学・計算化学
TEL 06-6850-5406
FAX 06-6850-5550
E-Mail yyoshi@chem.sci.osaka-u.ac.jp

1.1 ジオキセタンの生成機構²⁾

オレフィン誘導体の二重結合への¹O₂の付加反応の研究は30年にわたって行われてきているが、3種類の反応様式が知られている。それらは、1) ジオキセタン(DO)を生成する1, 2-付加反応, 2) エン反応, 3) 1, 4-付加によるパーオキシドの形成である。これらの反応様式に対して、ピラジカル機構, 双対イオン機構, 電子移動機構, パーオキシドを経る機構などの反応機構が提案されている。しかしながら、この反応系は溶媒の極性, 導入された置換基などによって反応機構が変化することが実験からも明らかにされている。

それともなって、量子化学に基づく理論研究も古くからなされてきたが、最も単純なエチレン+¹O₂においても、計算方法によって、1, 4-ピラジカル機構とパーオキシドを経る機構との間で二転三転してきている。これは、反応中間体であるピラジカルとパーオキシドの電子状態的確な記述が損なわれているためであり、反応機構が確定しているとは言いがたい状況である。そこで、我々は電子相関を取り入れた高精度理論計算で反応機構の検討を行った。

反応中間体, 生成物の構造最適化に二つの方法を用いた。1) UHF natural orbital complete active space self-consistent field(UNO CASSCF{2, 2})法であり, active spaceとして2個のラジカル軌道とラジカル電子を取り入れた。2) 動的電子相関を取り入れたUHF Møller-Plesset(UMP2)法である。得られた分子構造に対し振動解析を実施し, 安定構造であるか遷移状態であるかを確認した。なお, 基底関数は6-31G*を用いた。

図1は、¹O₂が付加した1, 4-ピラジカル中間体の構造である。ゴーシュ形の¹BR(G2)は本研究で新たに見つかった分子構造であり, ¹BR(G1)が他の構造と比較して最も安定である。これらの構造のエネルギー差は3kcal/mol以内と小さく, 付加したO₂部分はC-Oの結合軸の周りに回転していることがわかる。¹σπ(s-cis)と¹BR(G2)はその回転運動に対する遷移状態に対応している。始原系の¹O₂+H₂C=CH₂から反応中間体である¹BR(G1)にいたる反応経路の遷移状態の構造を示したのが図2である。C-Cの結合距離はG1より短い1.373Åで, C-Oの結合距離はG1より長い1.873Åで, 始原系とG1を結ぶ途中の構造に対応しているのが容易に読

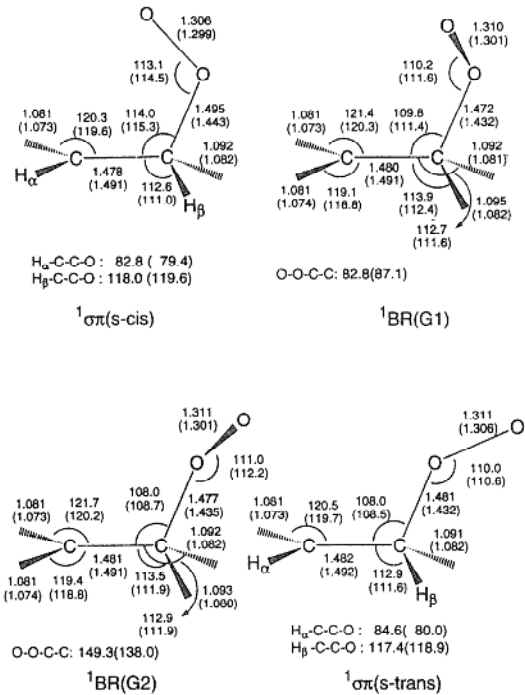


図1 最適化された1, 4-ピラジカル中間体の分子構造

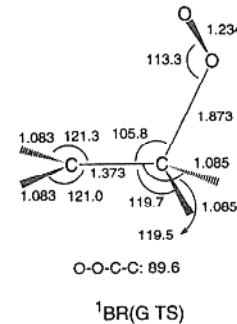


図2 始原系¹O₂+H₂C=CH₂から反応中間体である¹BR(G1)を結ぶ遷移状態の分子構造

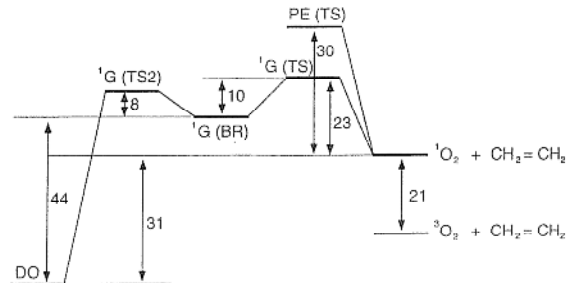


図3 ジオキセタン生成に対する反応経路に沿ったエネルギー図

みとれる。

図3は、構造が求められた反応中間体および遷移

状態を CCSD(T)/6-31G* で再評価した際の反応経路に沿ったエネルギー図である。始原系からゴーシェ形の¹BR(G1)にいたる活性化エネルギーは 23 kcal/mol でパーエポキシドを経る反応経路よりも 7 kcal/mol 低いことから、この反応は 1,4-ピラジカルを経て進行することがわかる。¹BR(G1)からジオキセタン(DO)へは 8 kcal/mol の活性化エネルギーがあり、この反応が 2 段階で進行することもわかった。

1.2 ジオキセタンの開裂機構³⁾

ジオキセタンの熱分解によって 2 個のカルボニル化合物が生成され、そのうちの 1 分子が励起状態として生成し基底状態に戻る際に発光が見られる。その代表的なものは、蛍の光に見られるルシフェリールシフェラーゼ反応による生物発光である(この場合、ジオキセタノンの熱分解)。発光効率、すなわち反応の量子収率は 0.88 と非常に高い。さらにオワンクラゲ、発光バクテリアなどは 0.2 と、生物種からの発光は高効率である。反応機構については、Schuster によって、電子移動を伴って反応が進行するという CIEEL (Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence) 機構⁴⁾ が提案されている。しかしながら、この機構に修正をせまる反応例も見つかっており未だ反応機構が確定していないのが現状である。

我々は半経験的及び非経験的分子軌道法を用いて、種々のジオキセタン誘導体のイオン化ポテンシャルからこれらの反応が電子移動ではなく電荷移動 (Charge Transfer : CT) を伴った CT 機構で進行すると提案した³⁾。さらに、MP2/6-31G* 法を用いてジオキセタンの熱分解反応に対し、反応中間体および遷移状態を検討した。求められた構造に対しさらに MP4/6-31G* 法でエネルギーを再評価したのが図 4 である。この図から、反応は、まず O-O 結合

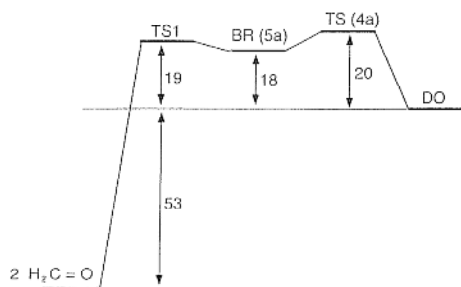


図 4 ジオキセタン熱分解に対する反応経路に沿ったエネルギー図

が切れたピラジカル中間体を経たのち C-C 結合の開裂がおこってホルムアルデヒドが生成される。律速段階は O-O 結合の切断で活性化エネルギーが約 20 kcal/mol と評価された。現在、さらに高精度な方法で反応機構の詳細な検討を加えている。ジオキセタンについても反応機構の解明を行っており、得られた結果を直ちに発表する計画にしている。

2. DNA の 1 電子酸化

光電子移動による DNA の酸化的切断は、-GG- (G: グアニン) 配列に特異的に起こることが報告されている。斎藤グループは、-G- よりも 2 重鎖内でスタックした 5'-GG-3' のほうが酸化電位が低くなることを ab initio MO 計算で示し、さらに 5' 側の G に HOMO が局在することを示し、最も酸化されやすいのが 5' 側の G であることを明らかにした⁵⁾。

そこで、我々は、斎藤グループと共同で、2 重鎖内でスタックした 5'-XGY-3' のイオン化ポテンシャルを 6-31G の基底関数を使って計算した。その結果、5'-GGG-3' が 6.42eV と最も小さく 1 電子酸化を受けやすく、実験結果と良い一致みだ。さらに、3 つのグアニンの反応性の差異を見るべく、1 電子酸化による各グアニンのラジカルカチオンの安定性、引き続いて生成されるラジカルの安定性を HF/6-31G のレベルで計算し解析を行っている。

3. シトクローム c オキシダーゼ (CcO) による酸素分子の還元反応⁶⁾

シトクローム c オキシダーゼ (CcO) は酸素分子を水分子に還元する機能を有した膜貫通型金属酵素であり、その反応活性中心はヘム鉄 a₃ とヒスチジン残基に取り囲まれた銅原子 Cu_B から構成されている。3 年前、阪大蛋白研の月原教授によって、牛心筋の還元型 CcO の構造⁷⁾ が X 線回析から、さらに今年になって酸化型 CcO の構造⁸⁾ が決定された。

一方、量子化学の発展は、遷移金属原子の d-電子の特徴的な振る舞いに対して定性的かつ定量的に信頼性ある議論を可能にしつつある。それにともなって、有機・無機金属錯体、触媒の電子状態およびその反応性、さらに物性としての磁性、スピン状態など、量子化学的研究が活性化してきている。さらに、生物系化合物では、酸素分子の運搬・脱着機能を有するヘモグロビン、ヘモシアニンに対して理論化学

計算が多くなされている。周知のごとく、ヘモグロビンは $[\text{Fe}-\text{O}_2]$ と1核系、ヘモシアニンは $[\text{Cu}-\text{O}_2-\text{Cu}]$ と2核系である。これらに加えて最近、クロロフィルの光合成機構、メタンのメタノールへの酸化反応を触媒するメタンモノオキシナーゼの理論研究が活発化してきている。

そこで、我々は、還元型CcOの構造に基づいて、酸素分子が活性サイトに付加した際の構造と電子状態を量子化学的手法を用いて検討した。この系は、量子化学の立場から見ると、鉄・銅原子を含む異核系であり、そのd-電子のからの電子状態の確立、反応機作の解明が複雑な系である。そのためか、理論化学的研究が見あたらず、我々の研究がCcOに対する初めての挑戦である。

CcOの活性サイトそのものをab initio MO法で系統的に検討するには、現在の計算機をもってしても容易なことではない。そこで我々は、活性サイトが持つ本質的な反応場を損なうことなしに、簡単な活性サイトモデルを構築した。まずヘム a_3 に配位しているヒスチジン残基と Cu_B に配位している3個のヒスチジン残基をアンモニア分子に置き換えた。さらにヘム a_3 のポルフィリン環の窒素原子に対応する箇所にアンモニア分子を配置した。ポルフィリン環のアンモニア分子への置き換えはかなり大胆な側面があるものの、Fe-ポルフィリンおよび $\text{Fe}^{2+}(\text{NH}_3)_4$ をそれぞれ単独で計算したところ、Feの電子状態はかなり良く一致していた。このことから我々が構築したモデルがCcOの活性サイトの反応場を第一次近似としては良く再現していると言える。

計算は、還元型CcOの構造を用い、基底関数としては、Fe, Cu原子にTatewaki-Hujinagaの基底関数を、酸素分子に6-31Gをアンモニアには3-21Gを用いた。反応系のスピン状態が3重項状態である可能性を残しつつも、まず1重項状態を検討した。構造最適化は付加した O_2 分子のみに対して行った。

図5に酸素分子が Cu_B に付加した際の構造(A)とFeに付加した構造(B)を示す。これらの構造で特徴的なことは、 $[\text{a}_3^{2+}-\text{OO}, \text{Cu}_B^{1+}]$ においてO-Oは $1.4e^-$ の電子を獲得しているとともに、その距離は 1.468 \AA と通常の酸素分子と比較して非常に長くなっている。しかしながら月原教授が本年度発表された酸化型CcOにおいても同様に距離が非常に長くなった構造が得られている。

さらに我々は還元反応の初期過程として、プロト

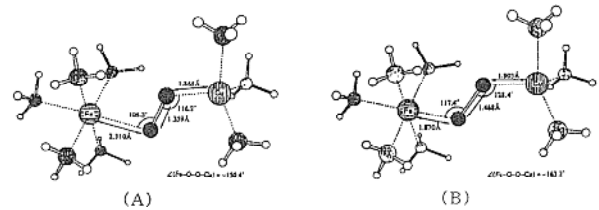


図5 CcOの活性サイトに酸素分子が(A) Cu_B に付加した際の構造と(B) Feに付加した構造

ン付加を考え付加体の構造を決めるとともに相対的なエネルギー関係から反応を考察した。まず酸素分子が Cu_B に付加した $[\text{a}_3^{2+}, \text{OO}-\text{Cu}_B^{1+}]$ が得られる。引き続き酸素分子が活性サイト内で移動した $[\text{a}_3^{2+}-\text{OO}, \text{Cu}_B^{1+}]$ を経るのではなく、プロトン化と酸素分子の移動とが同時に進行し $[\text{a}_3^{2+}-\text{OOH}, \text{Cu}_B^{1+}]$ が形成されるものと結論した。

本報告の研究は、CcOの理論研究における全くの初期段階であり、今後、さらに検討を加えていかなければならない。それには、1) ポルフィリンをあらわに取り入れるなどモデルを改良しより実際の系に近づける、2) 活性サイトのスピン状態の解明、3) 還元反応の全ステップの解明など多くの課題が残されている。我々はこれらの量子化学的手法による理論研究によって進めていくことを考えている。

おわりに

活性酸素種の反応は、単に有機合成化学上の興味だけからではなく、生体内反応として、また環境問題など我々の生活に密着している。ここにとりあげたDNA 1電子酸化の機構は現在非常にホットな話題であり、我等、量子化学屋にとっても非常に興味深い課題である。さらに、金属酵素および蛋白質の電子状態とその機作に関する量子化学的研究はまだまだ始まったばかりであり、量子化学の生体系への展開という意味においても、我々が、まだまだやらなければならない仕事が多く残されているように思える。

謝辞

本研究は、科学技術振興事業団のCRESTによるものであり、研究代表者である京都大学大学院工学研究科の斎藤烈教授との共同研究に基づいています。ここに、斎藤烈教授に深く感謝いたします。CcOに関し貴重なご意見をいただいた大阪大学蛋白質研

究所の月原富武教授に深く感謝いたします。さらに、本研究を通じて終始議論をいただきました山口兆教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 季刊化学総説7「活性酸素種の化学」日本化学会編(1990).
- 2) Y. Yoshioka, T. Tsunesada, K. Yamaguchi, and I. Saito, *Int. J. Quant. Chem.*, 65, 787 (1997).
- 3) Y. Takano, T. Tsunesada, H. Isobe, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, and I. Saito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press (1999).
- 4) J. -Y. Koo and G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2978 (1978).
- 5) H. Sugiyama and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7063 (1996).
- 6) Y. Yoshioka, S. Kubo, K. Yamaguchi, and I. Saito, *Chem. Phys. Lett.*, 294, 459 (1998).
- 7) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science*, 269, 1069 (1995), 272, 1136 (1996).
- 8) S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, Tomizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, and T. Tsukihara, *Science*, 280, 1723 (1998).