量子化学計算による酵素の反応解析

吉澤 一成

Analysis of Enzymatic Reactions by Quantum Chemical Calculations

Kazunari Yoshizawa

*Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University;
744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan.*

(Received April 12, 2012)

Density functional theory (DFT) is now extensively used as a research tool for the investigation of structure and reactivity of biological systems; however, its high computational demands still restrict the applicability of DFT to systems of a few tens up to one hundred atoms. A combined quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) approach is applicable as an important method to study whole enzyme systems more than ten thousands atoms. We have investigated methane monooxygenase, dopamine β -monooxygenase, tyrosinase, B12 dependent diol dehydratase, *etc.* using DFT and QM/MM calculations. In particular, we have done some computational mutation analyses about the amino acid residues at the active site of diol dehydratase. Our DFT and QM/MM calculations can correctly describe the structures and activation barriers of intermediates and transition states in the protein environment, and therefore, we successfully revealed the catalytic role of amino acid residues at the active site of diol dehydratase. Predicted relative activities of mutants are consistent with experimentally observed reaction rates. These results encourage us to apply QM/MM research to enzymatic reactions, functional analysis of active-site residues, and rational design of enzymes with new catalytic functions.

Key words—computational mutation; density functional method; metalloenzyme; quantum chemistry; quantum mechanical/molecular mechanical method

1. はじめに

密度汎関数計算により酵素や触媒の反応機構が詳しく議論できるようになった。10 年程以前には考えられなかった進歩である。さらに量子力学と分子力学を組み合わせた、いわゆる QM/MM 計算により、1 万原子を超える酵素の大規模量子化学計算も現実化している。本稿では、これまでに行ったメタン酸化酵素やドーパミン酸化酵素の研究、さらには B12 関連酵素を取り上げ人工変異による反応設計などについて紹介する。ここでは、これらの研究例を概観するとともに量子化学計算を使った酵素研究の将来展望について考察したい。

筆者は、恩師である福井謙一先生とノーベル賞を分け合った、コーネル大学のロアルド・ホフマン先

生の研究室に留学する機会を得て、新たに金属酵素の構造と反応性の理論的研究を始めることにした。それまでは、 π 共役系化合物の電子物性の研究を行っていた。物性研究から酵素研究へと大きくシフトしたのである。現在の研究は、研究室のメンバーの協力の下に、物性研究 3 割、酵素触媒研究 7 割といった感じであろうか。酵素の量子化学研究を始めるきっかけになったのは、Rozenzweig らによる可溶性メタンモノオキシゲナーゼの X 線構造解析で、ネイチャーに掲載された論文である。¹⁾ この酵素はアルカン類の中でも飛び抜けて不活性なメタンを常温常圧でメタノールに変換する。福井先生の研究室の名称が炭化水素物理化学講座であったということも思い出されて、この酵素の構造と機能に強く惹かれた。当初はメタンと反応する直接の活性構造が分かっていなかったが、そのような状況下で拡張ヒュッケル計算を使ってこの酵素の構造とメタンに対する反応性の予測を行った。²⁻⁴⁾

量子化学の分野でも 1995 年頃から密度汎関数理

九州大学先端物質化学研究所 (〒819-0395 福岡市西区元岡 744 番地)

e-mail: kazunari@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 131 年会シンポジウム S39 で発表したものを中心に記述したものである。

論 (DFT) が使えるようになり, 筆者らはメタンモノオキシゲナーゼ, シトクローム P450, ヘムオキシゲナーゼ, フェニルアラニンヒドロキシラーゼ, ドーパミン β モノオキシゲナーゼ, チロシナーゼ, ジオールデヒドラターゼ, デハロゲナーゼなどの構造活性相関の理論的研究を行うことができた. さらに, 量子力学と分子力学を組み合わせた, いわゆる QM/MM 計算により, 1 万原子を超える酵素の大規模量子化学計算を行った. QM/MM 計算を使えば不完全ながらも酵素の全原子を考慮することができる.

2. メタン酸化酵素及び関連する触媒反応

メタンは極めて強い C-H 結合 (104 kcal/mol), 構造の高対称性に起因する双極子モーメントの欠如, 及び低い酸性度と塩基度などに由来して極めて反応性に乏しい炭化水素と言える.^{5,6)} メタンの化学修飾は現代化学の目指す最重要課題の 1 つに数えられている. Figure 1 に示すように, アルカンの C-H 結合エネルギーと HOMO-LUMO ギャップにはよい相関がある.⁷⁾ HOMO-LUMO ギャップの大きさは分子の堅さの尺度であり, メタンは極めて強い分子であると言える. このメタンを常温・常圧でメタノールへと変換する酵素がメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) である.⁸⁻¹¹⁾ MMO はメタンを唯一のエネルギー源あるいは炭素源とするメタン資化細菌に含まれる金属酵素である. MMO には, 細胞質

Fig. 1. C-H Bond Energies vs. HOMO-LUMO Gaps of Small Alkanes at the B3LYP/6-311++G** Level of Density Functional Theory

に存在し可溶性の sMMO と細胞内膜に含まれる膜結合型の pMMO が知られている. sMMO の酵素機能には鉄 2 核構造を有する活性中心が深く関与していることが明らかにされている.

メタンからメタノールへの反応機構のヒントは, ベルリン工科大学のグループによって研究されていた FeO^+ 活性種とメタンとの気相反応にあるように思われた.¹²⁾ DFT 計算の結果, メタンは配位不飽和な FeO^+ と反応し, 二段階でメタノールに変換されることが分かった (Fig. 2).¹³⁻¹⁵⁾ この機構では, C-H 結合活性化の段階でラジカル種が生じない. この反応過程では 4 重項と 6 重項が関与し, このスピנקロスオーバーにより C-H 結合の活性化エネルギーが実質的に低下している. スカンジウムから銅に至る, 一連の遷移金属オキソ種のメタンに対する反応性を計算し, 鉄, ニッケル, 銅がメタン-メタノール変換に対して高い反応性と選択性を有することを明らかとした.^{7,15)}

筆者はこの機構をメタンモノオキシゲナーゼに応用しようと考えた. 鉄 2 核構造を活性中心に有する可溶性の sMMO はこれまで比較的良好に研究されている. 様々な中間体のうち, メタンと直接反応してメタノールに変換するのは Q と呼ばれる中間体である. EXAFS 測定から中間体 Q は, カルボキシレートを経橋配位子として有する $\text{Fe}_2(\mu\text{-O})_2$ 型のダイヤモンド構造をとっているものと推定されている.¹⁶⁾ 中間体 Q に対する EXAFS の結果には興味深い点いくつか含まれている. そのうちの 1 つは, この 2 核構造の鉄イオンが 6 配位に飽和していないというものである. EXAFS 測定によれば, 1 つの鉄には平均して 4.5 個の酸素あるいは窒素が配位し

Fig. 2. Energy Diagrams (in kcal/mol) for the Methane Hydroxylation by FeO^+ in the Quartet and Sextet States

ている。筆者らはこの中間体 Q に上述の非ラジカル機構を適用した。反応の初期段階で、メタンは配位不飽和の鉄イオンに弱く結合し、興味深いメタン錯体を形成する (Fig. 3 の左の反応機構)。⁷⁾ この後、メタンの 1 つの水素原子がオキシ種に引き抜かれヒドロキシ中間体が生成する。さらに生成したヒドロキシ中間体はメチル基の転位を経て、メタノール錯体へと変化し、これからメタノールが遊離する。この反応機構によれば、メタンはラジカル中間体を経ることなくメタノールへ変換される。その後、この機構での水素引き抜き段階の速度論的同位体効果の計算も行ったが、実験結果とよい一致を示すことが分かった。¹⁷⁾ もちろん、非ラジカル機構以外にもいくつかの機構が提案されているが、^{18–20)} 実験的な情報も少ない状況でどれが正しいものかは分かっていない。

最近、解像度はかならずしも高くないが、膜結合型の pMMO の X 線構造が解かれ、単核銅、二核銅及び単核亜鉛からなる 3 つの金属活性点を持つことが明らかとなった。²¹⁾ 亜鉛は結晶化緩衝液に由来するので、筆者らは単核銅サイト及び二核銅サイトに注目し、X 線構造解析を基にした DFT 及び QM/MM 計算を行い、反応中心は二核銅活性点にあるのではないかと提案している。²²⁾ Figure 4 には最初の中間体である $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ペルオキシ種と $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$ ペルオキシ種を示す。これから、さらに O–O 結合が解離して、 $\text{Cu}_2(\mu\text{-O})_2$ 型のジオキシ種が生成すると考えられる。その際に銅の価数は $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ 及び

$\text{Cu}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{III}}$ となる。活性種とメタンとの反応性を調べるために C–H 結合解裂の活性化エネルギーを比較した。その結果、 $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ のジオキシ状態は比較的容易にメタンの C–H 結合を活性化できる。これに対して、 $\text{Cu}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{III}}$ のジオキシ状態は C–H 結合に対する反応活性が低く、C–H 結合を解裂できないことが分かった。

3. ドーパミン酸化酵素の活性種と反応機構

ドーパミン β モノオキシゲナーゼ (DBM) はドーパミンをノルエピネフリンに水酸化する酵素であり、生命維持において非常に重要な役割を果たしている。^{23–25)} 反応物であるドーパミンは血圧を低下させ、生成物であるノルエピネフリンは血圧を上昇させる作用があるため、DBM の活性阻害は高血圧症の治療法として注目されている。DBM はサブユニット当たり 2 つの銅原子を含んだ二量体や四量体を形成している。Figure 5 に示すように、DBM は反応の際に 2 つの電子とプロトンをアスコルビン酸から受け取ると考えられている。銅イオン間にスピン結合が観測されないため、2 つの銅イオンは少なくとも 4 Å 以上離れている。この結果は、チロシナーゼやヘモシアニンにみられる二核構造が DBM には存在しないことを示唆する。DBM の 2 つの銅中心は別々の役割を担う。第一のサイト (Cu_A) はアスコルビン酸と結合し、アスコルビン酸から第二のサイト (Cu_B) へ電子伝達を行い、 Cu_B 中心は基質の結合や水酸化を行うと言われている。

この Cu_B サイトの活性種として、銅ヒドロパーオキシ種、銅スーパーオキシ種、銅オキシ種が提案

Fig. 3. Proposed Mechanisms for Methane Hydroxylation by sMMO

Fig. 4. The Dicopper Site of pMMO and Its Possible Peroxo Forms

(a) X-ray structure, (b) $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{II}}$ peroxo species, and (c) $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ peroxo species.

されている (Fig. 6). ここでは銅オキソ種と称しているが、そのスピン密度分布から、 $\text{Cu}^{\text{III}}-\text{O}^{2-}$ というよりは $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{O}^{\cdot-}$ がより妥当な電子配置と考えられる. 現在までにこれらの活性種による様々な反応機構が提案されているが、その反応機構を十分説明するには至っていない. このような状況下で、銅ヒドロパーオキシ種が活性種ではないかと考えられたり、また、DFT 計算により銅スーパーオキシ種が活性種であることが提案されていた.²⁶⁾ そこで、筆者らは DBM の 3 種の活性種の構築を行い、それらの反応性を理論的に研究することにした.^{27,28)} この酵素の X 線構造解析はなされていない

Fig. 5. Hydroxylation of Dopamine to Norepinephrine

Fig. 6. Possible Intermediates for Dopamine β -monooxygenase

ので、親類筋に当たる PHM (peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase) の X 線構造解析を基にして、DBM の 3 次元構造を構築した. DBM と PHM はアミノ酸配列において 30% の相同性を持つ. 2 つの酵素のアミノ酸配列にこの程度の相同性があれば、構造の分かっている酵素の 3 次元構造に基づいて、構造の分かっている酵素の構造をホモロジーモデリングから再現できる. さらに量子力学と分子力学を融合させた QM/MM 法の 1 つである ONIOM 法²⁹⁾により DBM の構造 (約 5000 原子) を最適化した. これにより、水素原子を含むすべての原子の 3 次元構造が X 線構造解析の結果を使うことなく構築できた.^{27,28)}

Figure 7 は計算から得た DBM の 3 種の活性種を示す. ドーパミンのベンジル位の水素引き抜きの活性化エネルギーを計算したところ、パーオキシ種は 40 kcal/mol, スーパーオキシ種は 23 kcal/mol, オキシ種は 5 kcal/mol であることが分かった. この結果から、スーパーオキシ種やパーオキシ種は真の活性種の前駆体ではないかと考えられる. この活性サイトでは基質のドーパミンを水素結合ネットワークにより固定し、立体特異的な反応が可能になっている. DBM の銅酸素活性種によるドーパミン水酸化の反応機構を Fig. 8 に示す. はじめに銅酸素活性種がドーパミンのベンジル位の水素原子を引抜き、ラジカル中間体を形成する. ベンジラジカルは比較的安定な遊離基であるため、この活性化エネルギーが低いのは妥当な結果である. 生じたベンジラジカルがヒドロキシル基と再結合し、生成物錯

Fig. 7. QM/MM-optimized Structures for (a) End-on Cu^{II} -superoxo Species, (b) Cu^{II} -hydroperoxo Species, and (c) Cu^{II} -oxo (or $\text{Cu}^{\text{III}}-\text{O}^{\cdot-}$) Species

Fig. 8. Possible Mechanism for the Conversion of Dopamine to Norepinephrine

体が生じる。最近、伊東らは単核銅錯体による様々な基質の酸化反応を観測し、その活性種は銅オキソ種ではないかと報告している。³⁰⁾

量子化学計算では実験で捕捉することの困難な不安定中間体や遷移状態の構造とエネルギーを予測することができる。特筆すべきは、QM/MM 計算によれば X 線構造解析の行われていない酵素についてもその詳細な 3 次元構造が得られ、反応機構の研究が可能になる点である。これは最近の量子化学計算の進歩を示す一例である。膜結合型の酵素のように構造解析が困難な酵素の構造活性相関の研究に、量子化学計算は有効なツールとなる。

4. チロシナーゼの反応機構

メラニンとは生体内で紫外線を吸収し、細胞を保護する働きをする重要な色素である。このメラニン生成は、まず、チロシンがチロシナーゼによりドーパキノンに転化されることで始まる。³¹⁾ ドーパキノンは化学的反応性が高いので、酵素の力を借りることなく次々と酸化、重合し、メラニンとなる。このように、チロシナーゼはチロシンをドーパキノンに転化させる役割を持つメラニン合成に必要な酸化酵素である。杉山らはチロシナーゼの結晶化に成功し、X 線構造解析により酵素の三次元構造を明らかにした。³²⁾ チロシナーゼの活性サイトには二核の銅原子が存在し、各銅原子に対してそれぞれヒスチジンが 3 つ配位していることがわかる。また、それらのヒスチジンは、 α -ヘリックス及び β -シート構造をとっているため、タンパク質内に強く固定されている。しかし、His54 だけは α -ヘリックス構造も β -シート構造もとっておらず、他のヒスチジンに比べ構造による束縛が少ないため、その役割が注目されている。本研究では、チロシナーゼの X 線構造解析を基に大規模な量子化学計算 (約 4300 原子) を

行い、その反応機構を詳細に議論した。³³⁾

まず、チロシナーゼの X 線構造解析を基に計算モデルを構築した。最初に、酵素反応とは直接関係しない ORF タンパクと硝酸イオンは除外した。酵素の原子数は約 4300 個であり、活性サイトの原子数は約 100 個である。酵素全体を、量子力学計算のみで計算するのは非常に困難であるため、QM/MM 法を用いた。酵素の総電荷は +2、スピン多重度は開殻 1 重項状態を考慮した。Figure 9 に計算により求めたチロシナーゼの活性中心に酸素分子が付加したパーオキシ体の構造を示す。この構造は杉山らの X 線構造解析の結果とよく一致している。

計算により得られたチロシナーゼの反応機構を Fig. 10 に示す。まず、チロシンがチロシナーゼの活性サイトに配位して **1** を形成する。次に、チロシンの水酸基の水素がチロシナーゼのペルオキシ基へ転移して **2** を形成する。さらに、ペルオキシ基が開裂して **3** を形成する。そして、酸素のラジカルとフェニル基のラジカルが結合して **4** を形成する。その後、フェニル基の水素がヒスチジン残基へ転移して **5** を形成する。最後に、His54 へ転移した水素が水酸基へ転移して **6** を形成する。QM/MM 計算により、このような詳細な反応解析が可能になる。ペルオキシ基の開裂反応 (**2**→**3**) が律速段階で、活性化エネルギーは約 14.9 kcal/mol であることが分かった。この活性化エネルギーから推定される反応速度定数は、実験から得られたものとよく一致している。

5. 計算ミューテーションの可能性

ビタミン B12 は生体内に取り込まれると、アデノシルコバラミンに変換され、十数種の酵素の補酵素として働くことが知られている。このうちジオールデヒドラターゼは、1,2-プロパンジオールなどの主に炭素数 4 以下のジオールの脱水反応を触媒する

Fig. 9. QM/MM-optimized Structure for the Peroxo Species of Tyrosinase

Fig. 10. Possible Mechanism for Tyrosine to Dopaoquinone by Tyrosinase

酵素である。この酵素による反応は、アデノシルコバラミン中の Co-C 結合が均等に開裂することにより始まる (Fig. 11).³⁴⁾ これにより生じたアデノシルラジカルが基質の 1 位の炭素から水素を引き抜き、1,2-diol radical が生成する。その後、水酸基の転移から 1,1-diol radical を経てアルデヒドと水分子に分解される。この酵素の発見以来、1970 年代後半までに集中的に研究がなされ、以上のような大まかな反応機構や、反応全体の同位体効果 ($k_H/k_D=10$) より、反応の律速段階は水素引き抜きであるということが分かっている。加えて、 K^+ 又はこれと同程度のイオン半径を持つモノカチオンが、ホロ酵素の形成及び酵素反応の進行に必須であることが知られている。

Fig. 11. Minimal Reaction Mechanism of Diol Dehydratase
(a) Homolytic cleavage of the Co-C bond in adenosyl cobalamin. (b) Dehydration by the enzyme. AdoCH₂=adenosyl group. TS=transition state.

虎谷らはジオールデヒドラターゼの X 線構造解析を行い、基質 1,2-プロパンジオールはアデノシルコバラミン中の Co 原子から 11.7 Å の距離にある K⁺ イオンに配位していることを見出した。³⁴⁾ 筆者のグループではこの X 線構造に基づき、全原子 (約 13500 原子) を含む現実モデルを構築し、QM/MM 計算を用いてこの反応の理論的解析を行った。³⁵⁾ さらに、活性部位アミノ酸残基の反応への寄与を推定するため、活性部位残基のいくつかを置換することで変異体モデルを構築し、それらの触媒機能を考察した。³⁶⁾

この反応において重要なアミノ酸残基と考えられてきた His143 を Ala に置換した変異体 His143Ala 及び、Glu170 を置換した Glu170Gln, Glu170Ala, さらに Glu170 と Glu221 の両方を置換した Glu170Ala/Glu221Ala の 4 つの変異体についてその触媒機構を明らかにした。Figure 12 に QM/MM 計算により得られた 4 つの変異体の構造を示す。これらの変異体についても、野生型と同様に基質から 1,1-diol radical への転換は水素引き抜きと水酸基転移の二段階で進行すると考え、Table 1 に野生型とこれらの変異体酵素の反応活性をまとめた。^{36,37)} Glu170Gln

変異体での水酸基転移の活性化エネルギー (TS2) は 17.4 kcal/mol となり、野生型での活性化エネルギー 11.5 kcal/mol に比べて、大きく上昇することが判明した。実験的にもこの変異体は野生型の 1% 以下の活性しかないことが知られており、この高い活性障壁が反応の進行を妨げていると考えられる。計算から得られた構造から、野生型においては Glu170 が 1 位の水酸基からのプロトンを引き抜くことで遷移状態を安定する (pull effect) のに対して、Glu143Gln 変異体では導入された Gln は弱い塩基であるため基質との相互作用が弱い。これが変異体での反応性低下の直接的原因であることが判明した。

Table 1. Calculated Barrier Heights (kcal/mol) in the Catalysis of Diol Dehydratase and Its Mutants

	TS1	TS2	TS3	relative activity (exp)
Wild type	13.6	11.5	17.9	1.0(1.0)
His143Ala	11.7	16.4	19.6	6.3×10^{-2} (1.6×10^{-2})
Glu170Gln	12.5	17.4	21.6	2.5×10^{-3} (2×10^{-4})
Glu170Ala	10.0	11.4	20.9	7.6×10^{-3} ($< 1 \times 10^{-4}$)
Glu170Ala/Glu221Ala	15.7	23.4	14.8	4.1×10^{-9} (N.A.)

Fig. 12. QM/MM-optimized Structures of Mutants of Diol Dehydratase
PDO=propane diol.

Fig. 13. X-ray Structure of the Substrate Binding Site of Diol Dehydratase

これまで行った QM/MM 計算によるジオールデヒドラターゼの活性中心における K^+ -O の平均結合距離は $2.8 \text{ \AA}$ であった。一方、X 線結晶構造におけるそれは $2.4 \text{ \AA}$ であり (Fig. 13), $0.4 \text{ \AA}$ という大きな違いがみられた。この結果から、筆者らは活性中心の金属イオンは K^+ ではなく、別の金属イオンなのではないかと考え、QM/MM 計算を用いて金属イオンの同定を行った。金属イオンとしては K^+ と周期表で近隣に位置する Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} を考えた。Table 2 に示すのは QM/MM 計算によって最適化された活性中心の金属イオンと配位酸素の結合距離と RMS (実験値と計算値の誤差) である。³⁸⁾ これまで中心金属と考えられてきた K^+ の場合における RMS は 0.49 であったが、 Ca^{2+} の場合の RMS が 0.11 と K^+ の場合よりも小さくなった。また、 Na^+ と Mg^{2+} の場合は Gln141 が金属イオンに配位せず六配位構造をとったため、RMS が大きくなった。この計算結果から中心金属は Ca^{2+} ではないかと提案した。最近、虎谷らによる EDTA の吸着実験によって金属イオンは Ca^{2+} であることが確認された。³⁹⁾ この結果に基づいて、本酵素の反応性の再検討も行っている。⁴⁰⁾ その結果については改めて報告することにする。

6. おわりに

以上のように、いくつかの酵素を対象とした DFT 及び QM/MM 計算により、反応活性種の推定、反

Table 2. QM/MM Optimized Metal-Oxygen Bond Lengths ($\text{\AA}$) in the Substrate-binding Site

	K^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	X-ray
O1 (PDO)	3.022	2.795	2.309	2.683	2.50
O2 (PDO)	2.983	2.642	2.206	2.602	2.48
Gln141	3.278	5.441	3.908	2.552	2.40
Glu170	2.661	2.268	2.069	2.296	2.36
Glu221	2.575	2.270	2.030	2.298	2.25
Gln296	2.751	2.334	2.119	2.389	2.39
Ser362	2.649	2.593	2.174	2.370	2.38
RMS ^a	0.49	1.15	0.61	0.11	

^a RMS errors from experimental values.

応機構の提案、活性部位アミノ酸残基の評価を行うことができた。X 線構造解析や分光測定などの実験から不安定な反応活性種の推定を行うことは困難なため、量子化学計算によるこれらの研究は極めて有効である。特に、ジオールデヒドラターゼについては量子化学計算に基づく酵素変異という新しい試みに挑戦し、活性部位アミノ酸残基の機能解析と変異型酵素の活性予測を行った。その予測は実際に構築した変異型酵素の活性測定の結果とよい一致を示した。これらの成果は、量子化学による精密反応機構の研究を大いに勇気づけるものである。近い将来、量子化学的アプローチによる創薬研究も可能になるのではないかと期待される。次世代スパコン「京」により、酵素全体を量子力学的に取り扱うことが可能になれば、計算精度と信頼性は著しく向上すると期待される。

謝辞 本研究を推進するにあたり、科学研究費補助金、九州大学 G-COE プロジェクト、ナノテク支援プロジェクト、統合物質創製化学推進事業、JST-CREST など文部科学省関連の研究支援に厚く御礼申し上げる。

REFERENCES

- 1) Rosenzweig A. C., Frederick C. A., Lippard S. J., Nordlund P., *Nature*, **366**, 537–543 (1993).
- 2) Yoshizawa K., Hoffmann R., *Inorg. Chem.*, **35**, 2409–2410 (1996).
- 3) Yoshizawa K., Yamabe T., Hoffmann R., *New J. Chem.*, **21**, 151–161 (1997).
- 4) Yoshizawa K., Ohta T., Yamabe T.,

- Hoffmann R., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12311–12321 (1997).
- 5) Yoshizawa K., Ohta T., Yamabe T., *Nippon Kagaku Kaishi*, **1998**, 451–459 (1998).
- 6) Yoshizawa K., *Kagaku Kogyo*, **50**, 552–561 (1999).
- 7) Yoshizawa K., *Acc. Chem. Res.*, **39**, 375–382 (2006).
- 8) Lippard S. J., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **27**, 344–361 (1988).
- 9) Feig A. L., Lippard S. J., *Chem. Rev.*, **94**, 759–805 (1994).
- 10) Lipscomb J. D., *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 371–391 (1994).
- 11) Wallar B. J., Lipscomb J. D., *Chem. Rev.*, **96**, 2625–2657 (1996).
- 12) Schröder D., Schwarz H., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **34**, 1973–1995 (1995).
- 13) Yoshizawa K., Shiota Y., Yamabe T., *Chem. Eur. J.*, **3**, 1160–1169 (1997).
- 14) Yoshizawa K., Shiota Y., Yamabe T., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 564–572 (1998).
- 15) Shiota Y., Yoshizawa K., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12317–12326 (2000).
- 16) Shu L., Nesheim J. C., Kauffmann K., Münck E., Lipscomb J. D., Que L., *Science*, **275**, 515–518 (1997).
- 17) Yoshizawa K., Yumura T., *Chem. Eur. J.*, **9**, 2347–2358 (2003).
- 18) Siegbahn P. E. M., Crabtree R. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3103–3113 (1997).
- 19) Basch, H., Mogi K., Musaev D. G., Morokuma K., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7249–7259 (1999).
- 20) Dunietz B. D., Beachy M. D., Cao Y., Whittington D. A., Lippard S. J., Friesner R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2828–2839 (2000).
- 21) Lieberman R. L., Rosenzweig A. C., *Nature*, **434**, 177–182 (2005).
- 22) Yoshizawa K., Shiota Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9873–9881 (2006).
- 23) Ljones T., Skotland T., “Copper Proteins and Copper Enzymes,” Vol. 2, ed. by Lontie R., CRC Press, Boca Raton, 1984, pp. 131–157.
- 24) Eipper B. A., Stoffers D. A., Mains R. E., *Annu. Rev. Neurosci.*, **15**, 57–85 (1992).
- 25) Klinman J. P., *Chem. Rev.*, **96**, 2541–2561 (1996).
- 26) Chen P., Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4991–5000 (2004).
- 27) Kamachi T., Kihara N., Shiota Y., Yoshizawa K., *Inorg. Chem.*, **44**, 4226–4263 (2005).
- 28) Yoshizawa K., Kihara N., Kamachi T., Shiota Y., *Inorg. Chem.*, **45**, 3034–3041 (2006).
- 29) Maseras F., Morokuma K., *J. Comput. Chem.*, **16**, 1170–1179 (1995).
- 30) Kunishita A., Ishimaru H., Nakashima S., Ogura T., Itoh S., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4244–4245 (2008).
- 31) Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T. E., *Chem. Rev.*, **96**, 2563–2605 (1996).
- 32) Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H., Sugiyama M., *J. Biol. Chem.*, **281**, 8981–8990 (2006).
- 33) Inoue T., Shiota Y., Yoshizawa K., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 16890–16897 (2008).
- 34) Toraya T., *Chem. Rev.*, **103**, 2095–2127 (2003).
- 35) Kamachi T., Toraya T., Yoshizawa K., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16207–16216 (2004).
- 36) Kamachi T., Toraya T., Yoshizawa K., *Chem. Eur. J.*, **13**, 7864–7873 (2007).
- 37) Toraya T., Kamachi T., Yoshizawa K., *Seikagaku*, **80**, 132–138 (2008).
- 38) Kamachi T., Takahata M., Toraya T., Yoshizawa K., *J. Phys. Chem. B*, **113**, 8435–8438 (2009).
- 39) Toraya T., Honda S., Mori K., *Biochemistry*, **49**, 7210–7217 (2010).
- 40) Kamachi T., Doitomi K., Takahata M., Toraya T., Yoshizawa K., *Inorg. Chem.*, **50**, 2944–2952 (2011).