

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成23年度採択分

平成26年5月30日現在

研究課題名（和文） **特異なクラスター活性中心をもつ
酸化還元金属酵素の生物無機化学**
研究課題名（英文） **Bioinorganic Chemistry of Oxidoreductases
having Unique Active Site Clusters**

研究代表者

巽 和行 (TATSUMI KAZUYUKI)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・特任教授



研究の概要：ニトロゲナーゼ、光化学系 II、アセチル CoA シンターゼ、ヒドロゲナーゼ、特異な鉄硫黄タンパクなどの特異なクラスター活性中心の化学合成を行い、化学特性を明らかにするとともに、生化学分野と共同して酵素機能の解明に資する学術基盤を確立する。

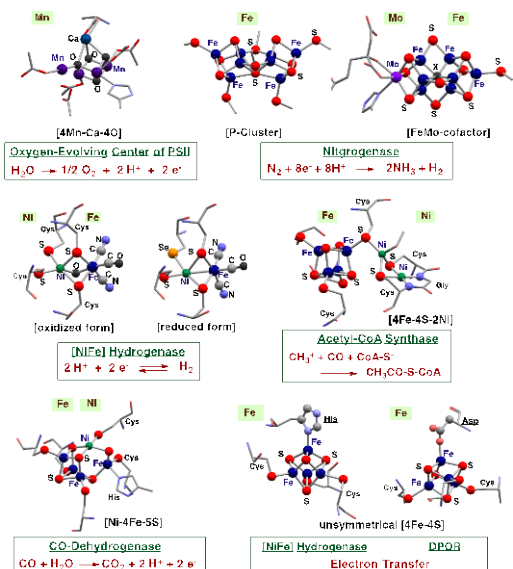
研究分野：生物無機化学、金属錯体化学、有機金属化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：ニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ、光化学系 II 酸素発生中心、金属酵素

1. 研究開始当初の背景

生命活動は自然の巧みな仕組みによって維持されている。その駆動力の一つが金属酵素/金属タンパク質であり、活性中心に存在する微量の金属元素が優れた酵素機能の中核的役割を担う。とりわけ、空気中の窒素分子を温和な条件下でアンモニアに変換するニトロゲナーゼ、光合成で水分子を酸素に変換する光化学系 II、補酵素 A をアセチル化して炭素固定反応を担うアセチル CoA シンターゼ、水素を可逆的にプロトンと電子に変換するヒドロゲナーゼなど、複雑でユニークな金属クラスター活性中心が基質活性化機能を担う酵素群の生化学研究が最近漸く進展し、活性中心の構造-機能相関に関する化学研究の必要性が強く認識されるようになった。



2. 研究の目的

本研究では、これら特異な金属クラスターを活性中心に持つ酸化還元金属酵素に注目し、我々が独自に開拓した非極性溶媒中での多核カルコゲニド錯体合成法などを駆使しつつ、これまで困難と考えられていた金属酵素クラスター活性部位の化学合成に挑戦し、酵素機能の発現機構の解明をめざす新たな生物無機化学を展開することを目的とする。

3. 研究の方法

本課題では、クラスター活性中心をもつ金属酵素の生物無機化学研究を新たに展開する。まず、非極性溶媒中での不安定金属クラスター合成法を発展させ、複雑な金属酵素クラスター活性中心の化学合成をめざす。

活性中心モデルクラスター化合物の電子状態と化学特性を明らかにするとともに、生物無機化学と生化学分野との共同研究によって、活性中心の生合成過程および酵素機能の発現機構を解明する学術基盤を確立する。さらに、自然に巧みな仕組みに習う環境調和型高機能触媒の開発に資する基礎研究を展開する。

4. これまでの成果

本課題研究は予想を上回るペースで進展し、ニトロゲナーゼ活性中心の研究などで期待以上の成果が得られた。成果の概略を以下に示す。

1) チオラートとスルフィドのみで架橋されたニトロゲナーゼ P-クラスターの配位環境をほぼ再現するモデルクラスターを構築した。興味深い事に、新モデルクラスターにおいても鉄原子の酸化数は 2Fe(III)-6Fe(II)

であり、提案されているニトロゲナーゼ P-cluster の酸化状態よりも2電子少ない。ニトロゲナーゼ P-cluster の鉄酸化状態の再考を促す重要な発見である。

2) キュバン型[4Fe4S]クラスターからニトロゲナーゼ P-クラスター骨格[8Fe7S]へのクラスター拡大反応がおこる事を初めて見出した。さらに、一つの Fe-S 結合が切断された酸化型 P-クラスター骨格の構築に成功した。

3) ニトロゲナーゼ FeMo-cofactor のモデルとなる、酸素原子を内包した[Fe₈S₆O]型クラスターを合成した。また、FeMo-cofactor の鉄が外部基質を捕捉する機構を推測するために有用な知見も得た。

4) 超高酸化型[4Fe4S]クラスターである[Fe₄S₄{N(SiMe₃)₂}]₄が供与性配位子(ピリジン誘導体)の存在下で容易に[2Fe2S]クラスターに解裂することを見出した。この反応は可逆的におこり、生体内でも[4Fe4S]クラスターから[2Fe2S]クラスターが生成する可能性を初めて示すとともに、最も安定とされるキュバン型[4Fe4S]クラスターの骨格変換に関する常識を覆した。

5) アポ型タンパクと鉄硫黄モデルクラスターの融合による人工酵素構築の一環として、鉄硫黄クラスターをニトロゲナーゼのアポタンパク apo-NifDK へと導入した。また再構成 NifDK がアセチレンのエチレンへの還元を触媒することが明らかになった。一方、ニトロゲナーゼと類似の蛋白構造を持つ光非依存型 Pchlide 酸化還元酵素のアポ体と鉄硫黄クラスターを融合すべく、2アミノ酸残基をシステインに置き換えたミュータントを合成した。

6) かさ高いアルコキシド/シロキシドを補助配位に用い、マンガンアミド錯体を前駆体とする我々独自の有機溶媒中での自己集積反応を開拓し、一連の Mn/O, Mn/OH, Mn/Ca/O クラスターの合成に成功した。特に、Mn(II)とCa(II)が共存したり、お互いに置換されたりするなどの重要な発見があった。

7) 還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位モデルとなる Fe-Ni 錯体を、Fe(II)錯体と Ni(0)錯体の反応によって達成した。新規 Fe(II)-Ni(0)錯体は、還元型活性部位に特徴的な短い Fe-Ni 距離だけでなく、各金属の配位数や配位構造も非常によく再現する。ヒドロゲナーゼの機能を再現するプロトン化反応も進行することがわかった。

8) アセチル CoA 合成酵素に存在するニッケル二核錯体のモデルとして、実際の酵素活性中心に近いテトラアニオン性 N2S2 配位子 mbea を導入した二核ニッケルモデル錯体を合成した。末端ニッケル上にメチル基とチオラートを併せ持つ錯体の合成に成功し、X線構造解析でその構造が酵素活性中心に極め

て類似していることを明らかにするとともに、酵素機能を再現する触媒反応サイクルを構築した。

5. 今後の計画

研究の基本方針および研究計画・方法は当初計画から際立った変更はない。研究方法の微調整と、予想以上の研究進捗があったために必要となった新たな追加研究計画項目のみを以下に示す。

1) 光化学系 II 酸素発生中心モデルに関する新たな研究方針(高酸化型 Mn/Ca/O(or OH)クラスターの合成)

2) 酸素耐性型[NiFe]ヒドロゲナーゼに特有な[4Fe3S]型クラスターの合成と機能解明

3) アセチル CoA 合成酵素活性部位の機能再現: ジアミドジチオラート配位子の利用

4) 化学合成した活性中心クラスターとタンパクを組み合わせた人工酵素の構築(モデルクラスターを用いた apo-NifDK の再構成)

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

(1) K. Tanifuji, N. Yamada, T. Tajima, T. Sasamori, N. Tokitoh, T. Matsuo, K. Tamao, Y. Ohki, K. Tatsumi, "A Convenient Route to Synthetic Analogues of the Oxidized Form of High-Potential Iron-Sulfur Proteins", *Inorg. Chem.* 53, 4000-4009 (2014).

(2) Y. Ohki, K. Tatsumi, "New Synthetic Routes to Metal-Sulfur Clusters Relevant to the Nitrogenase Metallo-Clusters" *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 639, 1340-1349 (2013).

(3) S. Ohta, Y. Ohki, R. E. Cramer, and K. Tatsumi, "A Nitrogenase Cluster Model [Fe₈S₆O] with an Oxygen Unsymmetrically Bridging two Proto-Fe₄S₃ Cubes: Relevancy to the Substrate-Binding Mode of the FeMo-cofactor", *Inorg. Chem.*, 51, 11217-11219 (2012).

(4) Y. Ohki, K. Tanifuji, N. Yamada, M. Imada, T. Tajima, and K. Tatsumi, "Synthetic Analogues of [Fe₄S₄(Cys)₃(His)] in Hydrogenases and [Fe₄S₄(Cys)₄] in HiPIP Derived from All-Ferric [Fe₄S₄{N(SiMe₃)₂}]₄", *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 108, 12635-12640 (2011).

(5) Y. Ohki and K. Tatsumi, "Thiolate-Bridged Iron-Nickel Models for the Active Site of [NiFe] Hydrogenase", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 973-985 (2011).

(受賞等)

平成 20-26 年 日本学術会議会員

平成 25-26 年 日本学術会議第 3 部副部長

平成 23 年 5 月 名誉博士号

ドイツ・ミュンスター大学

平成 23 年 2 月 サイボルト賞

ドイツ研究振興会

平成 24-25 年 国際純正・応用化学連合

(IUPAC) 会長

平成 25 年 4 月 文部科学大臣表彰

(科学技術賞)

平成 25 年 6 月 日本学士院賞