

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20557

研究課題名(和文) 窒素還元酵素に固有なFe/Mo-S-Cクラスターの構造・機能相関

研究課題名(英文) Structure-function relationships of a Fe/Mo-S-C cluster unique to N₂-reducing enzymes

研究代表者

谷藤 一樹 (Tanifuji, Kazuki)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：80911776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自然界での窒素固定を担う酵素の活性中心に着目し、この遷移金属、硫黄、炭素からなるクラスター(FeMoco)がどのような構造によって窒素分子を還元できるのか明らかにしようとして試みた。当初の計画は、特にFeMocoの中心原子として存在する炭素に着目したモデル分子の合成により、Fe-C-Fe型の構造を再現するものであった。目的とした配位子は合成できたものの、錯形成の段階で分解が進行したと考えられる結果が得られた。一方で、その無機骨格に着目して簡略化した構造モデルを用いて、窒素分子の捕捉と触媒的な還元反応(窒素シリル化反応)に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、FeMocoの特異な分子構造に基づいてその構造-機能相関に関する知見を得ようと試みた。特にFe-C-Fe構造に着目したアプローチでは有益な知見は得られなかったものの、金属-硫黄の部分構造に着目したアプローチにより、窒素分子の捕捉と還元を達成した。これまで化学合成した金属-硫黄クラスターを用いて窒素分子の触媒的還元成功した例は知られておらず、今回の成果は、「クラスターを用いた不活性小分子の還元反応」の端緒を切り開いたものと考えられる。またここで達成した触媒回転数は既報の錯体触媒と比較しても高く、今後の検討により窒素分子から異なる有用分子への変換反応へも展開できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the active center of enzymes responsible for biological nitrogen fixation, aiming to elucidate how this cluster (FeMoco) consisting of transition metal, sulfur, and carbon can reduce dinitrogen molecules. Our original plan was to replicate the Fe-C-Fe partial structure through the synthesis of a model complex or clusters with particular interest in the central carbon atom of FeMoco. Although the desired ligand was synthesized, it is believed that decomposition proceeded at the stage of complexation. Meanwhile, using a simplified structural model focusing on its inorganic framework, we succeeded in capturing nitrogen molecules and catalytic dinitrogen reduction reaction (silylation reaction).

研究分野：錯体化学

キーワード：窒素固定 鉄 モリブデン 硫黄 炭素 クラスター

1. 研究開始当初の背景

窒素固定は大気中の窒素分子 (N_2) を生物が利用可能なアンモニア (NH_3) へ還元する、重要な窒素源供給反応である。自然界では、窒素還元酵素であるニトロゲナーゼがこの反応を担っており、窒素分子は固有の鉄、モリブデン、硫黄、炭素からなるクラスター (FeMoco, Fig. 1) によって捕捉・還元される。FeMoco はそれ自身が補酵素として珍しい 8 核のクラスターであり、特に中心の 6 配位型炭素原子は他に類を見ない構造である。最近になって、FeMoco はその骨格の中央部分に位置する 2 つの鉄に結合した硫黄原子を脱離させ、窒素分子を結合させるサイトを生じることが明らかになりつつある (Fig. 1)。この提案されている反応機構は、現在も活発な議論の渦中にあるが、硫黄原子が取り除かれた 2 つの鉄間をつなぐ炭素原子は、配位子としての立体構造や電子的効果の両面からその窒素還元触媒としての働きを支えるものと考えられている。

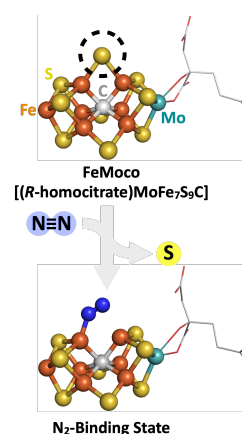


Fig. 1. 窒素還元酵素の活性中心である FeMoco の休止状態 (上, PDB ID: 3U7Q) と提案されている窒素分子結合状態 (下, PDB ID: 6UGO)。

2. 研究の目的

本研究では、FeMoco という特異な補酵素による窒素分子の還元が、この補酵素のどのような構造要素によって達成されているか、という問いにアプローチしようと考えた。この問いは、近年急速に進みつつあるニトロゲナーゼによる窒素分子還元機構の解明と合わせて、FeMoco に特徴的な構造のモデル化とその反応性、物性調査によって回答できると考えられる。本研究では特に、中心炭素原子に関連するモデル分子の合成を試みるとともに、FeMoco の構造を簡略化したクラスター錯体を用いた窒素分子の捕捉と触媒的還元反応の検討を行った。

3. 研究の方法

近年のニトロゲナーゼに対する結晶構造解析によれば、FeMoco は無機骨格の中心部分に存在する 2 つの鉄原子の間に窒素分子を結合させる (Fig. 1 下)。そこで本研究では、この構造に基づいて、鉄-炭素-鉄部位 (1) と立方体型 $[Fe_3S_3C]$ 部位 (2) の 2 つの特徴を抽出し、それぞれに関連するモデル分子の合成とその反応性の検討を目指した。

鉄-炭素-鉄部位の合成においては、特に硫黄原子が脱離したあとの 2 つの鉄原子が、擬四面体型の配位構造を取っており、炭素原子によって架橋され、かつ互いに向かい合った配位座を有する点が重要であると考えた。この仮説に基づいて、ビス (ピラゾリル) ポレート部位を有する配位子を新たに設計し、2 核鉄錯体の合成を試みた。

一方、立方体型 $[Fe_3S_3C]$ 部位に関連して、安定な $[Mo_3S_4Fe]$ クラスターを用いた窒素分子の捕捉と触媒的還元反応を検討した。金属-硫黄クラスターは一般に還元的な条件下で凝集しやすく、窒素分子を結合させられるような配位サイトを作るのは難しい。しかし、タンパク質はこのようなクラスターを、内部のキャビティに取り込んで孤立させることにより、クラスター同士が凝集しないような戦略をとっていると考えられる。この点を踏まえ、クラスターに立体的に大きな配位子を導入することによって、凝集を避けつつも窒素分子の配位サイトとなる金属の反応性を維持しようと考えた。

4. 研究成果

(1) FeMoco の鉄-炭素-鉄部位を模倣する 2 核鉄錯体合成の試み

上述の仮説に基づき、Fig. 3 に一般式で示したビス (ピラゾリル) ポレート部位を 2 つ有する配位子を設計した。2,6-ジブロモトルエンを出発に、ハロホウ素化により BBr_2 基を導入して結晶化により生成物を単離した。Br をアミノ基へ置換して再度結晶化により生成物を単離した後、有機リチウム試薬を作用させてホウ素上に炭化水素置換基を付加した。得られた生成物にピラゾール試薬を必要量作用させて加熱還流したところ、白色固体が得られた。NMR スペクトルの結果から、ターゲット化合物の生成が示唆されたが、この化合物は結晶化することができず、X 線結晶構

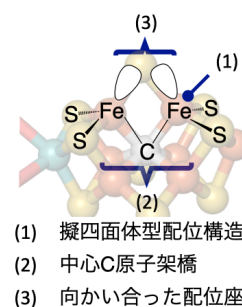


Fig. 2. FeMoco の鉄-炭素-鉄部位を再現する配位子のデザイン戦略。

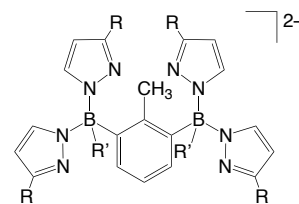


Fig. 3. 本研究でデザインした配位子。

造解析による分子構造の決定には至らなかった。そこでこの段階での同定に見切りをつけ、ハロゲン化鉄導入による錯化の検討を行った。有機溶媒中で配位子とハロゲン化鉄を反応させたところ、室温下一晩の反応で溶液は変色し、錯形成を支持する結果が得られた。常磁性化合物の生成が NMR より確認されたものの、生成物の完全な同定には至らなかった。反応混合物を抽出した溶液の結晶化を試みたところ、唯一分子構造が決定できたのは、配位子のビス（ピラゾリル）ボレート部位がベンゼン環から切り出されたと推測される化合物に鉄が結合した錯体であった。ホウ素-炭素結合は比較的安定で切断されないと考えていたが、鉄を導入する過程で配位子が反応してしまう可能性が強く示唆された。

(2) 立方体型[Fe₃S₃C]部位を模倣する金属-硫黄クラスターの合成と反応

FeMoco が窒素分子を結合させた構造は、左半分を切り取れば[Fe₃S₃C]という組成からなる立方体型のクラスターと見ることができる。これに基づいて、比較的安定で堅牢なクラスターとして知られる[Mo₃S₄]三核クラスターに対して、FeMoco と同様に鉄原子を反応サイトとして取り込ませ、その反応性を検討した (Fig. 4)。モリブデン上に導入したシクロペンタジエニル配位子 (Cp^R) は、かさ高い置換基を有しており、クラスター間の凝集を抑えることで導入した鉄原子の小分子に対する反応性を維持している。窒素雰囲気下でこれらのクラスターを還元したところ、窒素分子が鉄に結合した化合物が単離でき、いくつかは結晶構造解析によって分子構造を決定した。また ¹⁵N ラベル化と NMR、赤外吸収分光などの結果から、結合している窒素分子はたしかに反応雰囲気から取り込まれていることが明らかになった。その反応性の検討として、まず窒素分子のアンモニアへの還元反応を試みたが、触媒的なアンモニアの生成は見られなかった。一方、窒素還元反応の一種として知られるシリル化反応においては、最大で 248 当量のシリルアミン (N(SiMe₃)₃) が生成することが明らかになった。さらに反応系中においてクラスター種が触媒として働くことを確認するため、擬似的な反応条件下において混合物に一酸化炭素を作用させて中間体のトラップを試みたところ、低収率 (~10%) ながら [Mo₃S₄Fe(CO)] のクラスターが得られた。これらの結果はスペクトル測定、理論計算による電子状態に関する考察とともにまとめ、*Nature* 誌に発表 (*Nature* 2022, 607, 86–90.) し、多数の新聞やウェブメディアに取り上げられるなど、大きな注目を集めた。これまで化学合成した金属-硫黄クラスターを用いて窒素分子の触媒的還元に成功した例は知られておらず、今回の成果は、窒素分子のシリル化反応であるため、ニトロゲナーゼとは反応機構が異なると考えられるものの、「クラスターを用いた不活性小分子の還元反応」の端緒を切り開いたものと考えている。

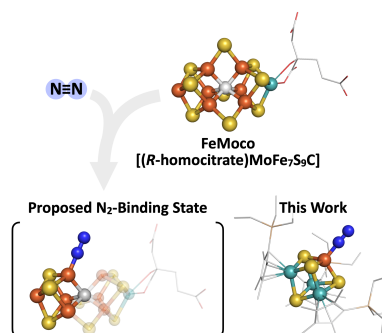


Fig. 4. 本研究で模した FeMoco の部分構造 (下段左) と研究に用いた立方体型 [Mo₃S₄Fe] クラスター (下段右) . 各原子の色は Fig. 1 と同様.

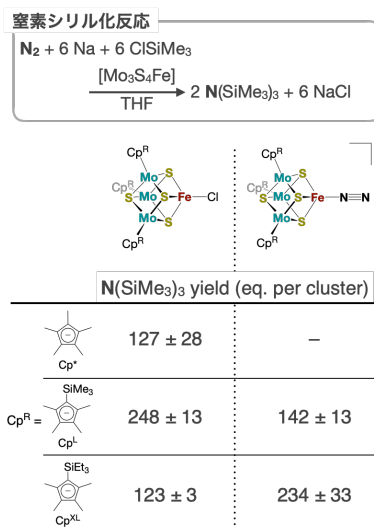


Fig. 5. 窒素分子のシリル化反応のスキーム (上段) と各クラスター触媒を用いた反応から得られたシリルアミンの生成当量 (下段) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohki Yasuhiro, Munakata Kenichiro, Matsuoka Yuto, Hara Ryota, Kachi Mami, Uchida Keisuke, Tada Mizuki, Cramer Roger E., Sameera W. M. C., Takayama Tsutomu, Sakai Yoichi, Kuriyama Shogo, Nishibayashi Yoshiaki, Tanifuji Kazuki	4. 巻 607
2. 論文標題 Nitrogen reduction by the Fe sites of synthetic [Mo ₃ S ₄ Fe] cubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 86 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04848-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanifuji Kazuki, Sakai Yuta, Matsuoka Yuto, Tada Mizuki, Sameera W. M. C., Ohki Yasuhiro	4. 巻 95
2. 論文標題 CO Binding onto Heterometals of [Mo ₃ S ₄ M] (M = Fe, Co, Ni) Cubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1190 ~ 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanifuji Kazuki, Ohta Shun, Ohki Yasuhiro, Seino Hidetake	4. 巻 475
2. 論文標題 Activation of unsaturated small molecules by bio-relevant multinuclear metal-sulfur clusters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Coordination Chemistry Reviews	6. 最初と最後の頁 214838 ~ 214838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccr.2022.214838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuki Tanifuji, Kenichiro Munakata, Ryota Hara, Keisuke Uchida, Mizuki Tada, Roger E. Cramer, W. M. C. Sameera, Tsutomu Takayama, Yoichi Sakai, Shogo Kuriyama, Yoshiaki Nishibayashi, Yasuhiro Ohki
2. 発表標題 Nitrogen Reduction by the Fe Sites of Cuboidal [Mo ₃ S ₄ Fe] Clusters
3. 学会等名 第67回有機金属化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Tanifuji, Kenichiro Munakata, Ryota Hara, Keisuke Uchida, Mizuki Tada, Roger E. Cramer, W. M. C. Sameera, Tsutomu Takayama, Yoichi Sakai, Shogo Kuriyama, Yoshiaki Nishibayashi, Yasuhiro Ohki
2. 発表標題 Catalytic N ₂ Reduction Using the Fe Sites of [Mo ₃ S ₄ Fe] Cubes
3. 学会等名 第71回錯体化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Sakai, Mayu Fujisawa, Kazuki Tanifuji, Mizuki Tada, Yasuhiro Ohki
2. 発表標題 Synthesis of Cubic [Mo ₃ S ₄ Co] Clusters and Its Application to N ₂ Reduction
3. 学会等名 第67回有機金属化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井優太, 藤澤真由, 谷藤一樹, 唯美津木, 大木靖弘
2. 発表標題 [Mo ₃ S ₄ Co]クラスターを反応点とする配位子置換反応とN ₂ 還元反応
3. 学会等名 第71回錯体化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷藤一樹
2. 発表標題 遷移金属-硫黄クラスターの生合成と触媒活性に関する研究
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Tanifuji, K. Munakata, Y. Matsuoka, R. Hara, K. Uchida, M. Tada, R. E. Cramer, W. M. C. Sameera, T. Takayama, Y. Sakai, S. Kuriyama, Y. Nishibayashi, Y. Ohki
2. 発表標題 Catalytic Dinitrogen Silylation Using the Fe Sites of [Mo ₃ S ₄ Fe] Cubes
3. 学会等名 第68回有機金属化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Tanifuji, K. Munakata, Y. Matsuoka, R. Hara, K. Uchida, M. Tada, R. E. Cramer, W. M. C. Sameera, T. Takayama, Y. Sakai, S. Kuriyama, Y. Nishibayashi, Y. Ohki
2. 発表標題 N ₂ -reducing Activity of the Fe Sites of [Mo ₃ S ₄ Fe] Cubes
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Atomically precise nanochemistry (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Tanifuji, A. J. Jasniewski, D. Villarreal, M. T. Stiebritz, C. C. Lee, J. Wilcoxon, Y. Ohki, R. Chatterjee, I. Bogacz, J. Yano, J. Kern, B. Hedman, K. O. Hodgson, R. D. Britt, Y. Hu, M. W. Ribbe
2. 発表標題 Tracing the Sulfur Incorporation into the Nitrogenase Cofactor Precursor via Semi-Synthetic Approach
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷藤一樹
2. 発表標題 窒素を還元するクラスターの生物無機化学
3. 学会等名 第34回生物無機化学夏季セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷藤一樹
2. 発表標題 窒素を還元するクラスターの化学-生合成から反応まで-
3. 学会等名 有機化学学生ウェビナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Matsuoka, Y. Sakai, M. Tada, K. Tanifuji, Y. Ohki
2. 発表標題 Coordination of CO onto Cubic [Mo ₃ S ₄ M] (M = Fe, Co, Ni) Clusters Bearing Mo-Cp Moieties
3. 学会等名 第31回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 優首, 坂井優太, 唯 美津木, W. M. C. Sameera, 谷藤 一樹, 大木 靖弘
2. 発表標題 かさ高いCp配位子を有するキュバン型[Mo ₃ S ₄ M]錯体 (M = Fe, Co, Ni) のCO配位挙動
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ハワイ大			
スリランカ	コロンボ大			