

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655049

研究課題名（和文） 二酸化炭素を還元する酵素モデルの構築

研究課題名（英文） Construction of enzyme models reducing carbon dioxide

研究代表者

岡村 高明 (OKAMURA TAKA-AKI)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90252569

研究成果の概要（和文）：二酸化炭素を還元するギ酸デヒドロゲナーゼはタングステン・モリブデン酵素の一種である。これらの酵素はモリブドプテリンと呼ばれる特異なジチオレン配位子を有している。本研究では、非常に嵩高い置換基と NH \cdots S 水素結合を持ちトルエンに可溶なモデル錯体を合成した。活性な金属中心を疎水的空間で囲む事で、ミセル水溶液中でも安定に存在できることが明らかとなった。従来のモデル錯体では困難だった基質の還元反応にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Formate dehydrogenase, which reduces carbon dioxide, is one of tungsten- and molybdoenzymes. These enzymes contain unique dithiolene moieties called molybdopterin cofactor. In this work, toluene-soluble model complexes having super-bulky substituents and NH \cdots S hydrogen bonds were synthesized. The active molybdenum site was stabilized by hydrophobic surroundings even in aqueous micellar solution. The model complex successfully reduced substrates which are hardly reducible by known models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎科学・無機化学

キーワード：生物無機化学、酵素モデル、水素結合、タングステン、モリブデン

1. 研究開始当初の背景

近代の産業化による二酸化炭素濃度の上昇は、温暖化など地球規模で解決すべき問題であり、その問題解決は人類にとって急務だと言われている。植物などが行う光合成は、光エネルギーを使って二酸化炭素を糖に変換し、化学エネルギーとして貯蔵し利用できる。これを人工系で実現することは容易な事ではないが、ある種のギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) が行っているように二酸化炭素をギ酸に還元できれば化学エネルギーとして貯蔵・再利用が行える。FDH はタングステンまたはモリブデン含む酵素である。何れも二つのジチオレン配位子を有しており、モリブ

デン酵素の分類によれば DMSOR 還元酵素 (DMSOR) ファミリーに属する。これらの構造モデルの報告例はあるが酵素反応の再現には至っていないのが現状である。

申請者は、これまでに DMSOR ファミリーのモデルとして4つの分子内 NH \cdots S 水素結合を有するベンゼンジチオラート配位子持つモノキソモリブデン (IV) モデル錯体 (NEt₄)₂[Mo^{IV}O{1,2-S₂-3,6-(RONH)₂C₆H₃}₂] (R = CH₃, *t*-Bu, CF₃, Ph₃C) を系統的に合成し、DMSOR の基質でもあるトリメチルアミン・*N*-オキシド (Me₃NO) の還元反応が NH \cdots S 水素結合により加速される事を明らかにしている。まず、Me₃NO が四角錐構造の頂点

にあるオキソ配位子のトランスに弱く配位して八面体の中間体を形成し、トランス-シス異性化と同時に $\text{Mo}=\text{O}$ 結合が形成されシスジオキソモリブデン(VI)錯体を生じる。また、R を非常に嵩高くする ($\text{R} = \text{CPh}_3$) と 4 価錯体の構造が歪みシス位から基質が直接攻撃する。この反応は中間体を経ず反応速度が 1 桁以上も速い (*Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 895)。即ち、立体構造の歪みが $\text{Mo}^{\text{IV}}\cdots\text{O}$ 結合から $\text{Mo}^{\text{VI}}=\text{O}$ 結合への変換反応を促進していると言える。

2. 研究の目的

ギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) の活性部位は疎水的環境にあり基質の結合や水素結合などの弱い相互作用が効果的に作用していると考えられる。また、FDH の活性部位にはチオラート(S)やセレンラート(Se)のように酸素より塩基性が高い配位子が存在し、近傍のアミノ酸残基側鎖のプロトンを捕捉し、基質へヒドリドとして移動する事で二電子還元反応を行っていると考えられる。

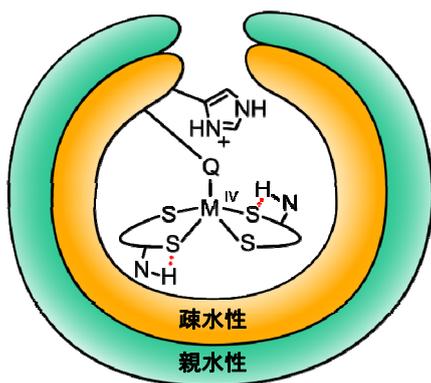


図1. FDH ($\text{M} = \text{W}, \text{Mo}$; $\text{Q} = \text{S}, \text{Se}$) 及び DMSOR ファミリー ($\text{M} = \text{Mo}$, $\text{Q} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$) の概念図。ヒスチジン側鎖は必須ではない。

本研究では、分子内 $\text{NH}\cdots\text{S}$ 水素結合と非常に嵩高い置換基を有する配位子を用いて疎水的環境を持つモデル錯体を合成し、活性部位の安定化、基質結合能の向上と基質の活性化、 $\text{NH}\cdots\text{S}$ 水素結合による反応制御を行い、二酸化炭素をギ酸に還元できる酵素モデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

モデル錯体としては、低原子価が比較的安定なモリブデン錯体を用いる。まず、立体的な要因を排除し、モリブドプテリンと同様に二つのチオラート (S) のうち片方にだけ水素結合した配位子を合成し、 $\text{NH}\cdots\text{S}$ 水素結合の効果を水素結合の強さと定量的に比較し評価する。配位子としては図2の2種類 (A, B) を検討する。嵩高い置換基を持つ配位子

については、十分に活性部位を取り囲むために 2 つの置換基を導入した配位子 (C) を用いる。

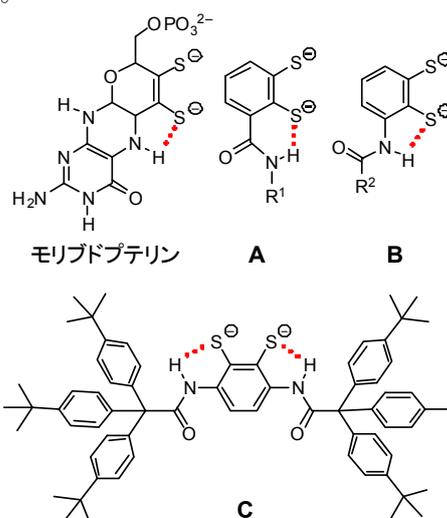


図2. モリブドプテリンとモデル配位子 A-C ($\text{R}^1 = t\text{Bu}, \text{Ph}$; $\text{R}^2 = \text{CH}_3, t\text{Bu}, \text{CF}_3, \text{Ph}_3\text{C}, (4-t\text{BuC}_6\text{H}_4)_3\text{C}$)。

配位子 A, B については、モノオキソモリブデン(IV)錯体を合成し、 Me_3NO との反応によりジオキソモリブデン(VI)錯体を得る。水素結合の様式、置換基 R^1, R^2 の違いによるスペクトル、構造、物性の差、 Me_3NO との反応性の違いを定量的に明らかにする。密度汎関数法(DFT)を用いた理論計算により電子状態、構造、物性値の評価や反応中間体、反応機構の解析を行う。

配位子 C については、A, B と同様のモノオキソモリブデン(IV)錯体を合成すると共に、より塩基性が高いと考えられるモノスルフィド、モノセレンド錯体の合成を行う。また、酵素の還元型に見られるようにオキソ配位子を持たないデソキソモリブデン(IV)錯体の合成も行い、物性、安定性、反応性を調べる。

4. 研究成果

(1) 配位子 A を持つモリブデン酵素モデル錯体の合成と性質

$\text{R}^1 = t\text{Bu}$ の時、モノオキソモリブデン(IV)錯体はトランス体のみが単結晶として単離され、X線解析により構造を決定した。この結晶を室温で重アセトニトリルに溶解し ^1H NMR を測定するとトランス体のみが観測された。溶液状態で加熱すると徐々に異性化し、最終的にトランス:シス = 1:1 の混合物を与えた。二つの異性体では Me_3NO の還元反応において反応速度に有意な差は無く、ジオキソモリブデン(VI)錯体を生じた(図3)。生成物の異性体は幾つか考えられるが、二つのオキソ配位子のトランス位にあるチオラートが $\text{NH}\cdots\text{S}$ 水素結合を形成した異性体のみが

存在し、ラマンスペクトルと IR の結果から NH \cdots S 水素結合がトランス影響を介し、Mo^{VI}=O 結合を安定化していることが明らかとなった。DFT による理論計算の結果もこれを支持した。

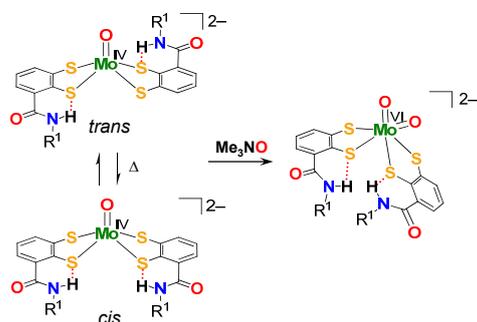


図 3. 配位子 **A** を持つモノオキソモリブデン(IV)錯体及びジオキソモリブデン(VI)錯体。

これまでの研究から NH \cdots S 水素結合は Mo(IV/V)の酸化還元電位を正側にシフトさせ、Me₃NO の還元反応を加速すると考えられてきた。IR の結果は、強い水素結合の形成を示したにも拘わらず、酸化還元電位の正側シフトや反応の加速は予想に反して小さく、酸化還元電位の測定や反応に用いた *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)中では NH \cdots S 水素結合が有効に作用していない事を示唆する結果となった (*Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 11688)。

これは、非極性溶媒中や固体状態では安定に形成された NH \cdots S 水素結合が DMF のような極性溶媒ではアミド基が回転することで水素結合が切断されると解釈された。より酸性度が高く、共鳴構造を取りやすいアニリドを用いることで水素結合が安定化すると予想し、図 4 の配位子により錯体を合成した。

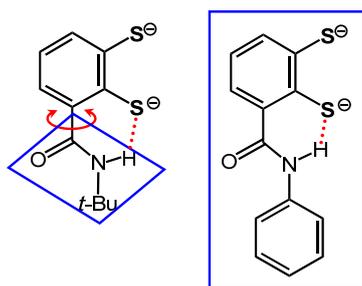


図 4. アミド基が回転する柔軟な構造の配位子 **A** (R¹ = *t*-Bu)とアニリド骨格の導入による平面性と剛直性の向上。

R¹ = Ph ではモノオキソモリブデン(IV)錯体は結晶性が悪く、結晶としては単離できなかったが、¹H NMR の結果は、トランスとシスの 1:1 混合物として純度良く単離できていることを示した。固体状態での IR の結果は R¹ = *t*-Bu の時に比べ NH \cdots S 水素結合が 1 割程度強

くなっている事を示したが、酸化還元電位のシフトは 1.5 倍、Me₃NO の還元反応の反応速度は 4-5 倍も加速した。この結果はアニリドにすることで DMF 中でも安定して水素結合が形成されている事を示した。一方で、モノオキソモリブデン(IV)錯体の重ジクロロメタン中での NH の ¹H NMR シグナルは温度変化が小さく水素結合の存在を示したが、重アセトニトリルでは低温で高磁場し、重 DMF 中では線幅の広いピークのみを与えた。即ち、アニリドの立体障害と強い NH \cdots S 水素結合により、Mo-S 結合が解離しやすくなり、極性溶媒中では NMR のタイムスケールに比べ速い解離反応が有る事も明らかとなった (*Dalton Trans.* **2013**, *42*, 7569)。

(2) 配位子 **B** を用いた NH \cdots S 水素結合とモリブデン酵素モデルの反応性との相関関係に関する系統的研究

A に比べ剛直な構造で安定して NH \cdots S 水素結合を形成できる **B** を用いてモデル錯体の合成を行った。この配位子の特徴として R² を変える事で NH \cdots S 水素結合の強さを系統的に変化させる事が可能である。また、従来の 4 つの NH \cdots S 水素結合を持つ錯体に比べ、数を半分にした事で立体障害の影響を排除でき、定量的な評価が実現可能となった。

これまで定性的に説明してきた水素結合の影響を IR による NH \cdots S 水素結合の強さの評価、酸化還元電位、ラマンによる Mo^{VI}=O 結合の強さの評価、Me₃NO の還元反応の 2 次反応速度解析、DFT を用いた理論計算を用い総合的に考察を行った。

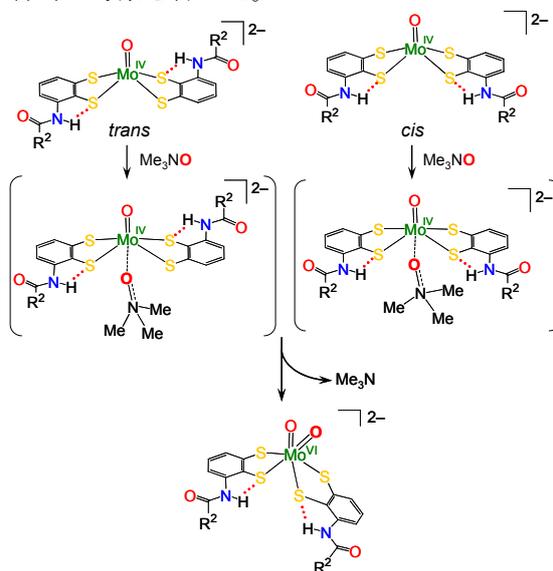


図 5. モノオキソモリブデン(IV)錯体とアミン-N-オキシドとの反応機構。括弧内は反応中間体で NH \cdots S 水素結合により安定化している (特に R² = CF₃ の時)。トランス-シス異性化を経てシスジオキソモリブデン(VI)錯体を与える。

錯体は $R^2 = (4-t\text{-BuC}_6\text{H}_4)_3\text{C}$ のように特に高い場合を除いては、図5のようにトランス体とシス体の混合物として得られた。酸化還元電位、反応速度には両者で有意な差は検出されなかった。NH伸縮振動の値を水素結合をしていない標準サンプルからのシフト値として求め、NH \cdots S水素結合の強度の評価を行った。水素結合の強さとMo(IV)/Mo(V)の酸化還元電位、Mo^{VI}=O結合の強さの間には非常に良い相関が見られた。 $R^2 = (4-t\text{-BuC}_6\text{H}_4)_3\text{C}$ の場合だけが例外的に傾向からずれたが、これは、疎水基による極性の変化や嵩高さによる構造の歪みに由来するものと考えられる。

Me₃NOとの反応は、R = CF₃を除いて、水素結合の強さの順に反応速度が大きく、2次反応で進行した。4つの水素結合を持つ従来の錯体で見られた立体障害が原因となるトランス-シス異性化の律速段階による大幅な反応速度の低下や、構造の歪みによるシス位からの基質の攻撃のように反応経路が変わる事はなく、図5のようなオキソ配位子のトランス位からの攻撃とトランス-シス異性化によるMe₃Nとジオキソモリブデン(VI)錯体の生成と解釈できる。但し、 $R^2 = \text{CF}_3$ の時だけは、中間体が安定化されすぎるため、反応は基質が低濃度の段階で頭打ちとなり、それ以降は基質濃度によらず一定となった。これは、酵素で見られるミカエリス・メンテン型の反応を彷彿とさせ大変興味深い。中間体はDFTを用いた理論計算により最適化構造として求め、水素結合による安定化が裏付けられた。また、これまで提唱されていた嵩高さによる反応律速やシス位からの攻撃によるMe₃NOの還元反応機構についても各段階の最適化構造を計算することで明らかにした(*Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 381)。

(3) トルエンに可溶なモノオキソモリブデン(IV)錯体、ジオキソモリブデン(VI)錯体およびタングステン誘導体の合成と構造

配位子 **C** を用いてモノオキソモリブデン(IV)、ジオキソモリブデン(VI)錯体およびタングステン誘導体を合成し、単結晶X線解析により構造を決定した。溶液中の構造は¹H NMRにより明らかにした。図6にはタングステン錯体のアニオン部分の構造を示した。何れの場合も嵩高い置換基によりタングステン周辺が囲まれ、結晶構造では、その空間にカウンターカチオンが収まる形で存在している。アニオンとカチオンが静電的相互作用で一体となり、全体として中性の分子として振る舞う事でトルエンのような非極性溶媒に可溶化したと解釈できる。また、結晶中では、カウンターカチオンのCHとW=OがCH \cdots O水素結合を形成していた。モリブデン錯体も同形または類似の構造をとり、同様の相互作用が確認できた。これは、酵素中に見られる

近傍のアミノ酸側鎖との相互作用と関連深く、比較的塩基性の低いオキソ配位子ですらルイス酸との相互作用が期待できる結果と言える。

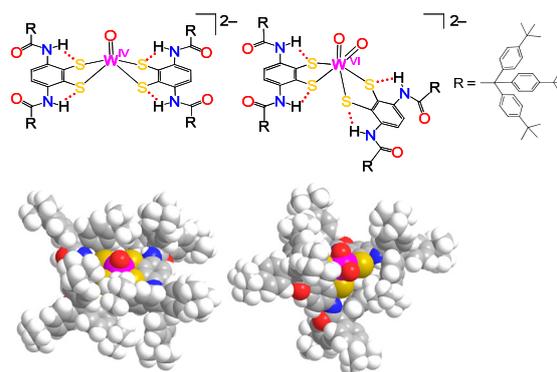


図6. 配位子 **C** を持つモノオキソタングステン(IV)およびジオキソタングステン(VI)錯体の結晶構造 (アニオン部)。

非極性溶媒中では、別々のイオンとしては溶媒和できないため、カウンターカチオンはアニオンの近傍に存在している。ジオキソタングステン(VI)錯体の¹H NMRスペクトルを重アセトニトリル中で測定すると溶液中での速い化学交換により種類の配位子のシグナルしか与えないが、重トルエン中ではシスジオキソの構造に由来する2組の配位子のシグナルとして観測され、これらは、温度の上昇により均一化された。一方、低温では、配位子の動きは制限され、カウンターカチオンとの間にNOE相関が観測され、結晶状態の構造をトルエン溶液中でも維持している事が示された。

(4) トルエンに可溶なモノスルフィドモリブデン(IV)錯体

C を配位子とするモノオキソモリブデン(IV)錯体はアセトニトリル/水混合溶媒中での合成であり、この方法ではモノスルフィドモリブデン(IV)錯体を合成できない。無水で合成を行うために原料錯体として[Mo^{IV}(S-*t*-Bu)₄]を用い、配位子は図7に示した**D**を、硫黄源としてNEt₄SHを用い錯体を合成すると、結晶として単離できた。同様の方法でセレニドの合成を試み、錯形成を示唆する結果は得られたが非常に不安定なうえに溶解度も高いため単離には至らなかった。

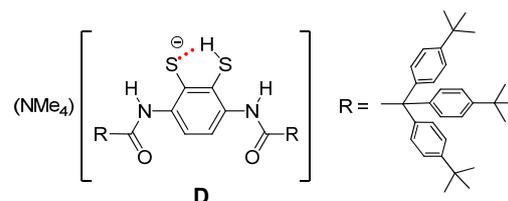


図7. **D** の構造

モノスルフィド錯体のアニオン部分の構造を図8に示した。結晶構造や IR の結果から NH \cdots S 水素結合の存在が確認された。Mo=S は水素結合を持たない類似錯体に比べ明らかに短く NH \cdots S 水素結合により効果的に安定化されている事が示唆された。ラマンスペクトルの結果もこれを支持した。

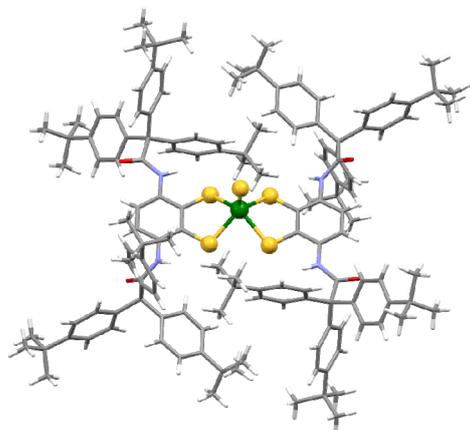


図8. 配位子 C を持つモノスルフィドモリブデン (IV)錯体の結晶構造 (アニオン部)。

(5) トルエンに可溶性なデソキノモリブデン (IV) 錯体の合成と反応性

デソキノモリブデン (IV) 錯体として、オキソ配位子の代わりにシロキソ配位子を持つ錯体を合成した。合成は、モノオキソモリブデン (IV) 錯体のオキソ配位子を (*t*-Bu) $_2$ SiCl でシリル化することで得た。錯体は高収率で結晶として得られ、単結晶 X 線解析で構造を決定した。結晶構造を図9に示した。配位構造は置換基を持たない錯体と概ね一致した。この錯体と Me $_3$ NO を反応させることでオキソシロキノモリブデン (VI) 錯体 (NEt $_4$)[Mo VI O{OSi(*t*-Bu)Ph $_2$ }{1,2-S $_2$ -3,6-[4-*t*-BuC $_6$ H $_4$] $_3$ CCONH} $_2$ C $_6$ H $_2$ }] $_2$] が得られた。

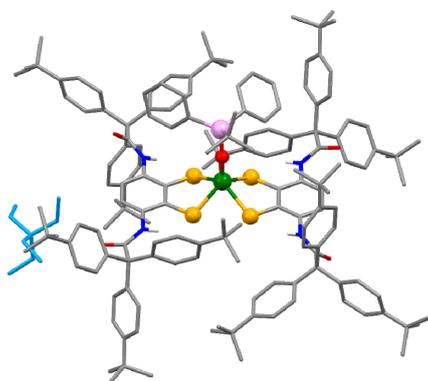


図9. 配位子 C を持つデソキノモリブデン (IV)錯体、(NEt $_4$)[Mo IV {OSi(*t*-Bu)Ph $_2$ }{1,2-S $_2$ -3,6-[4-*t*-BuC $_6$ H $_4$] $_3$ CCONH} $_2$ C $_6$ H $_2$ }] $_2$] の結晶構造。

デソキノモリブデン (IV) 錯体はトルエン

のような非極性溶媒中で Me $_3$ NO と瞬時に反応し、モノオキソモリブデン (VI) 錯体を定量的に与えた。得られた錯体は安定に存在した。置換基を持たないベンゼンジチオラート配位子を持つデソキノモリブデン (IV) 錯体では、Me $_3$ NO に対する反応性が低く、生成したモノオキソモリブデン (VI) 錯体の分解が見られた。以上の結果は、非常に嵩高い疎水的な置換基により錯体の安定性と反応性の向上が同時に行える事を示している。また、トルエン中、ゆっくりではあるが、反応性の低い DMSO を還元できることも明らかとなった。

本錯体は、水溶性ミセル溶液中でも安定に存在し、反応性の高い活性金属中心の周辺を疎水的環境にすることで水などの接近を制限している事を意味している。この事実は、本錯体が酵素に見られる疎水部と親水部で層状に囲まれた活性部位 (図1) の良いモデルであることを示し、今後、水溶性酵素機能モデルへの展開が大いに期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 2 件)

① T. Okamura, K. Kunisue, Y. Omi, and K. Onitsuka, Strong NH \cdots S hydrogen bonds in molybdoenzyme models containing anilide moieties, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 7569–7578. 査読有、DOI: 10.1039/C3DT50139F

② T. Okamura, Y. Ushijima, Y. Omi, and K. Onitsuka, Systematic Investigation of Relationship between Strength of NH \cdots S Hydrogen Bond and Reactivity of Molybdoenzyme Models, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 381–394. 査読有、DOI: 10.1021/ic301597d

③ T. Okamura, M. Tatsumi, Y. Omi, H. Yamaoto, and K. Onitsuka, Selective and Effective Stabilization of Mo VI =O Bonds by NH \cdots S Hydrogen Bonds via *Trans* Influence” *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 11688–11697. 査読有、DOI: 10.1021/ic301597d

[学会発表] (計 1 3 件)

① Y. Hasenaka, T. Okamura, and K. Onitsuka, Synthesis, Structures, and Properties of Molybdo- and Tungstoenzyme Models Having NH \cdots S Hydrogen Bonds in Nonpolar Solvents, International Conference of Bioinorganic Chemistry (ICBIC16), 2013. 7. 23, 25, Alpexpo center of Grenoble, France

② 長谷中祐輝、岡村高明、鬼塚清孝、非常に嵩高い疎水基を有するデソキノ型モリブデン酵素モデル錯体の構造と性質、日本化学会第 93 春季年会、2013. 3. 22、立命館大学 びわこ・くさつキャンパス

③ Yuki Hasenaka, Taka-aki Okamura, and Kiyotaka Onitsuka, Synthesis, Structures, and Properties of Molybdo- and Tungstoenzyme Models Surrounded by Super-Bulky Hydrophobic Substituents, Joint Symposium of 5th International Symposium on Polymer Materials Science (ISPMS' 12) & 8th Osaka University Macromolecular Symposium (OUMS' 12), 2012. 11. 10、大阪大学豊中キャンパス

④ 近江祐依、岡村高明、鬼塚清孝、ベンゼンジチオラートをアミド結合で連結した四座キレート配位子を持つモリブデン酵素モデル錯体の合成、2012. 9. 22、錯体化学会第 26 回討論会、富山大学五福キャンパス

⑤ 長谷中祐輝、岡村高明、鬼塚清孝、分子内 NH \cdots S 水素結合型モノカルコゲニドモリブデン(IV)錯体の合成、2012. 9. 22、錯体化学会第 26 回討論会、富山大学五福キャンパス

⑥ 岡村高明、牛島靖仁、鬼塚清孝、A Series of Molybdoenzyme Models Having Two Intramolecular NH \cdots S Hydrogen Bonds、2012. 6. 1、第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2012)、金沢大学宝町キャンパス

⑦ 長谷中祐輝、岡村高明、鬼塚清孝、Synthesis, Structures, and Properties of Molybdo- and Tungstoenzyme Models in Nonpolar Solvents、2012. 5. 31、第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2012)、金沢大学宝町キャンパス

⑧ 長谷中祐輝、岡村高明、鬼塚清孝、低極性溶媒中におけるデソキノ型モリブデン酵素モデル錯体の合成と性質、2013. 3. 27、日本化学会第 92 春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス

⑨ 近江祐依、岡村高明、鬼塚清孝、二つの分子内 NH \cdots S 水素結合を有するデソキノ W(IV)、モノオキノ W(VI)錯体の合成と性質、2013. 3. 27、日本化学会第 92 春季年会、慶応義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス

⑩ 平野安紀、岡村高明、鬼塚清孝、モノオキノタングステン(VI)ベンゼンジチオラ-

ト錯体における分子内 NH \cdots S 水素結合の影響、2011. 9. 18、錯体化学会第 61 回討論会、岡山理科大学

⑪ 近江祐依、岡村高明、鬼塚清孝、二つの分子内 NH \cdots S 水素結合を持つジオキソタングステン(VI)錯体の合成と性質、2011. 9. 18、錯体化学会第 61 回討論会、岡山理科大学

⑫ 長谷中祐輝、岡村高明、鬼塚清孝、嵩高い疎水基によって囲まれたタングステン酵素モデル錯体の構造と性質、2011. 9. 18、錯体化学会第 61 回討論会、岡山理科大学

⑬ 岡村高明、牛島靖仁、鬼塚清孝、二つの NH \cdots S 水素結合を持つモリブデン酵素モデルの反応機構解析、2011. 9. 17、錯体化学会第 61 回討論会、岡山理科大学

[図書] (計 1 件)

① Taka-aki Okamura, Hitoshi Yamamoto, and Norikazu Ueyama, John Wiley & Sons Ltd., *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State*, (2011), 609-626.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 高明 (OKAMURA TAKA-AKI)

大阪大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90252569