

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288032

研究課題名(和文) 次亜塩素酸錯体の反応性と反応選択性の分子機構の解明及びそれに基づく制御法の開発

研究課題名(英文) Reactivity and Selectivity of Hypochlorite Adducts of Metal Complexes

研究代表者

藤井 浩 (Fujii, Hiroshi)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：80228957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸化反応や生体防御過程の鍵となる次亜塩素酸錯体の生成機構や反応性に関する研究を行った。次亜塩素酸の生成過程を解明するため、酵素活性中間体モデル化合物を合成し、それと塩素イオンとの反応を研究した。その結果、次亜塩素酸を合成する酵素がもつ活性部位のシステイン配位やヘムとアミン酸の共有結合によるひずみが次亜塩素酸生成反応の鍵となっていることを明らかにした。次亜塩素酸錯体の反応性を解明するため、シス位とトランス位の配位子の電子供与性効果を研究した。その結果、シス位配位子とトランス位配位子の効果が反応性に対して逆の傾向を示すというたいへん興味深い結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we studied how hypochlorous acid is produced from the reaction of a high-valent oxoiron complex with chloride. This study points out that the key factor to produce hypochlorous acid is the reactivity of the high-valent oxoiron intermediate that is controlled by unique coordination structures of the active sites in the enzymes. In addition, we studied how the reactivity of the hypochlorite adduct complex is controlled. The most important factor to control the reactivity of the complex is electron donor ability from the cis- and trans-ligands. Interestingly, the electron donor effect of these two ligands show different trend to the reactivity.

研究分野：生物無機化学

キーワード：heme salen hypochlorite chloroperoxidase myeloperoxidase chloride oxidation chlorination

1. 研究開始当初の背景

次亜塩素酸(HClO)は、非常に強い酸化力をもった不安定な分子であり、漂白剤や殺菌剤などに使用されている。また次亜塩素酸は、多くの遷移金属錯体を使った酸化反応にも広く使用されている。さらに驚くべきことに次亜塩素酸は、我々を含む多くの生物の体内でも作られ生体防御に利用されている。次亜塩素酸はそれ自体でも酸化能力を有するが、金属錯体と反応することにより塩素カチオン、塩素ラジカル、活性酸素種などの多様な活性種を作り出すことができる。従って次亜塩素酸イオン(OCl⁻)が金属錯体に配位した次亜塩素酸錯体は、次亜塩素酸の働きを理解するための鍵化合物であるが、その高い反応性のためほとんど研究がなされていない。例えば次亜塩素酸遷移金属錯体は、我々が知る限りこれまでに報告例がない。また、なぜ金属錯体の種類により次亜塩素酸から生成する活性種が変わるのか、金属錯体のどのような因子が活性種の生成を制御しているのかといった基礎的な多くの問題は、未解明のままである。一方、白血球(好中球)内には、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)というヘムを活性部位にもつ酵素が存在し、塩素イオンと過酸化水素から次亜塩素酸を合成している。白血球は、体内に侵入したバクテリアを包摂し、MPOが合成した次亜塩素酸を使って撃退するのである。MPOがどのようにして次亜塩素酸を合成しているのかという問題は、化学者のみならず生物、医学など多くの分野の研究者が注目する課題である。我々はこれまで、生体内で次亜塩素酸の合成に関与する酵素をモデル錯体により研究してきた。その結果、次亜塩素酸錯体を研究する手がかりとなる2つの成果を得ることができた。

(1) 次亜塩素酸錯体の生成 これまでの研究から、MPOは過酸化水素と反応してcompound-1と呼ばれる鉄4価オキソポルフィリンカチオンラジカル錯体を生成した後、これが塩素イオンと反応して鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体となり次亜塩素酸を合成していると提案されている。しかしこの反応機構は、鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体が不安定なため、compound-1が反応中に生成すること以外、未解明のままであった。我々は、低温下compound-1モデル錯体を使って塩素イオンとの反応を追跡することに成功した。その結果、compound-1モデル錯体はプロトン非存在下では塩素イオンと反応し鉄4価オキソヘム錯体と塩素ラジカルを生成すること、トリフルオロ酢酸(TFA)存在下では鉄3価メソ-クロロイソポルフィリン錯体を生成すること、これらの反応により種々の有機物の塩素化反応が起こることを明らかにした。

(2) 次亜塩素酸錯体の合成と反応性 我々はこれまで、次亜塩素酸(H-Cl-O)に類似するヨードソベンゼン(Ph-I=O)のような高原子価ヨウ素化合物と不斉マンガンサレン錯体(Jacobsen触媒)との反応を研究してき

た。この研究の中で最近我々は、ヨードソメシチレンが不斉マンガンサレン錯体に配位した錯体の合成、構造解析、不斉選択性の解析に成功した(*Angew. Chemie.*, 2012, 7809)。我々はこの成果を基に、次亜塩素酸錯体の合成条件を検討した。その結果、最近ついに低温下で、鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体の合成に成功した。この錯体は、次亜塩素酸イオンが二つ配位した錯体であること、鉄3価低スピン状態であること、配位した次亜塩素酸イオンは配位によりO-Cl結合が強くなっていること、分解により鉄4価オキソ錯体を生成すること、配位した次亜塩素酸イオンはエポキシ化(Oの転移)と塩素化(Clの転移)の両方の活性を有することを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、研究背景で示した成果を発展させることにより次亜塩素酸に関わる以下の2つの問題を解決し、次亜塩素酸と金属錯体の化学の基盤を構築すること、金属錯体を用いた次亜塩素酸の反応性制御法や新しい酸化反応の開発をめざす。

(1) 次亜塩素酸錯体の生成 研究背景の欄で示した成果は、次亜塩素酸錯体や次亜塩素酸の生成機構を解明する手がかりを与えたが、compound-1モデル錯体と塩素イオンから鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体が生成しているのか、またこの反応においてプロトンがどのような役割を担っているのかという問題を提起した。そこで本研究では、これらの問題を解決するため、以下の2つの問題の研究を行い、鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体や次亜塩素酸の生成過程の分子機構の解明をめざした。

(2) 次亜塩素酸錯体の合成と反応性 先に報告した論文を元に、金属錯体に配位した次亜塩素酸イオンの電子状態や反応性が配位によりどのように変化したか、またなぜそのような変化が行ったのかを種々の分光法や様々な基質との反応を解析することにより明らかにすることをめざした。

3. 研究の方法

研究目的の欄で示した課題を解明するため、具体的に以下の2点に着目して研究を進めた。

(1) 次亜塩素酸錯体の生成

pKaが異なる酢酸誘導体を用いてcompound-1錯体と塩素イオンの反応を種々の分光法を用いて追跡し、反応溶液内のプロトン供与体の酸の強度が反応様式に及ぼす影響を解明する。

鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体が中間体として生成しているのかを低温ストップフローを用いて分光的手法、速度論的手法から検討する。

(2) 次亜塩素酸錯体の合成と反応性

様々なヘムや軸配位子をもつ鉄3価ヘム次亜塩素酸錯体を合成し、配位子が配位した次亜塩素酸イオンの電子構造や反応性にどのような影響を及ぼすかを解明する。

マンガン 3 価および 4 価 Jacobsen 触媒を用いて次亜塩素酸錯体の合成を行う。中心金属イオンの酸化数が次亜塩素酸イオンの電子構造、反応性、不斉選択性に及ぼす影響を解明する。

本研究の中で合成した次亜塩素酸錯体は、単結晶構造解析や EXAFS による構造解析を行い、構造と反応性の関わりについても検討する。これらの研究から、金属錯体の中心金属イオンや配位子がどのように次亜塩素酸の反応性を制御しているのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 次亜塩素酸錯体の生成

compound-1 モデル錯体と塩素イオンの反応から次亜塩素酸イオンが生成しているかをプロトン存在下で反応を行った。酢酸存在下で反応を行った。吸収スペクトルにおいて、酢酸が存在しない条件での反応と大きな違いを観測できなかった。酵素類似の反応をするためには、酸の効果より compound-1 モデル錯体の反応性が大きく影響していることが推定された。この結果は、酵素の特異な配位環境が酵素の特異性と関係していることを示していると考えられる。

compound-1 モデル錯体と塩素イオンの反応をストップフローを用いて追跡した。鉄 3 価ヘムにメタクロロ過安息香酸を加えて compound-1 モデル錯体を生成させた後に塩素イオンを混合した。混合後のスペクトル変化を追跡したが、短寿命な新規な反応中間体の検出には至らなかった。

(2) 次亜塩素酸錯体の合成と反応性

ポルフィリン配位子からの電子供与性が、次亜塩素酸錯体の安定性や基質との反応性にどう影響するかを図 1 に示すポルフィリンを合成して研究を行った。ポルフィリン配位子に異なる数のフッ素原子を導入して電子供与性を調整した。これらのポルフィリンから合成したヘムに次亜塩素酸イオンを添加し、次亜塩素酸錯体を合成した。吸収スペクトルの時間変化から安定性を評価した。その結果、電子吸引性の低いヘムほど次亜塩素酸錯体が安定であることを見いだした。さらに反応性についても研究した。次亜塩素酸錯体にシクロオクテン、アニソールを添加してエポキシ化反応、塩素化反応の反応性を反応速度から評価した。その結果、電子供与性が高い錯体ほど反応性が高いことが明らかとなった。さらに次亜塩素酸のトランス位に配位する配位子の効果についても検討を行った。トランス位に電子供与性が高い配位子を導入することに成功した。これらの錯体の反応性をポルフィリン配位子の実験と同様に反応速度から反応性を評価した。その結果、トランス位の配位子の電子供与性が低い錯体ほど反応性が高いことが明らかとなった。この結果は、次亜塩素酸錯体の反応性に対して、シス位 (ポルフィリン) 配

位子とトランス位配位子が逆の効果を示すという興味深い結果が得られた。また、この成果から次亜塩素酸錯体の配位子を我々が自在に制御できることを示すことができた。

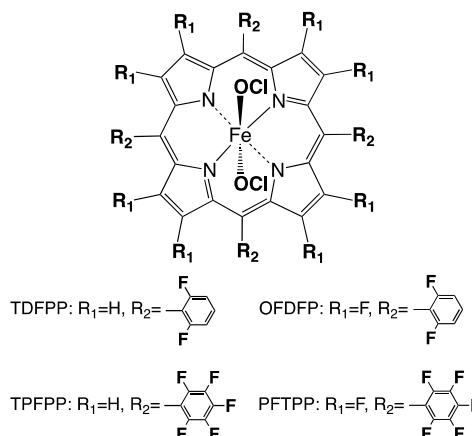


図 1. 本研究で用いたポルフィリン配位子の構造

マンガン 4 価サレン次亜塩素酸錯体の合成を試みた。我々がこれまでに報告したマンガン 4 価サレン塩素錯体からの合成を試みた。次亜塩素酸イオンを添加していくと 2 当量添加するまで吸収スペクトル変化が観測された。この結果は、マンガンイオンに 2 つの次亜塩素酸イオンが配位したことを示した。さらに EPR や NMR の測定を行った結果、マンガンイオンは次亜塩素酸イオンの添加後も 4 課のままであることが明らかとなった。さらにこの錯体にチオアニソールを添加すると反応が起こり、塩素錯体とフェニルメチルスルフォキシドを生成することが明らかとなった。これらの結果から、本研究で非ヘム錯体から初めて次亜塩素酸錯体が合成できたことが示された。この錯体と Jacobsen 不斉エポキシ化反応との関わりを研究した。スチレン誘導体のエポキシ化反応を行った。次亜塩素酸錯体の反応性は、で研究したヘム錯体と比べて非常に低いことが明らかとなった。さらに生成したエポキシ体の不斉収率をガスクロマトグラフを使って測定した結果、Jacobsen 触媒反応から得られる不斉収率よりかなり低いことが明らかとなった。従来、次亜塩素酸錯体が不斉反応の活性種であると提案されていたが、この提案が誤りであることを実験的に証明できた。マンガン 3 価サレン錯体に次亜塩素酸イオンを添加して次亜塩素酸錯体の合成を試みた。吸収スペクトルでは、添加直後にスペクトルが大きく変化してマンガン 4 価錯体を生成していることを示した。この結果は、添加した次亜塩素酸イオンがマンガン 3 価サレン錯体に配位したが、不安定であるため O-Cl 結合が解裂してマンガン 3 価から 4 価に酸化された結果と考えられた。金属イオンの酸化数が高いほど次亜塩素酸錯体が安定化されるという結果を得ることができた。

と で示した鉄3価へム次亜塩素酸錯体とマンガン4価 salen 次亜塩素酸錯体を結晶化するため固体として単離することを試みた。低温でペンタンを加えてしばらく静置すると、赤色の鉄3価へム次亜塩素酸錯体と緑色のマンガン4価 salen 次亜塩素酸錯体をそれぞれ固体として単離できることがわかった。これらの単離した固体が目的の錯体であることは、再溶解した錯体の吸収スペクトルから確認することができた。種々の溶媒条件から結晶化を試みたが、研究期間内では単結晶を得ることができなかった。次亜塩素酸錯体の構造的知見を得るために EXAFS の測定も試みた。凍結溶液の EXAFS 測定を行った。解析の結果、次亜塩素酸錯体の他にそれが分解して生成した高原子価錯体が混在することがわかり、詳細な解析ができなかった。固体に単離したサンプルの方が安定であるため、今後固体のサンプルを用いて EXAFS 測定を試みる予定である。

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 7 件)

Maaya Asaka and Hiroshi Fujii
Participation of Electron-Transfer Process in Rate-Limiting Step of Aromatic Hydroxylation Reactions by Compound I Models of Heme Enzymes
J. Am. Chem. Soc. **2016**, *138*, 8048-8051.
DOI: 10.1021/jacs.6b03223

Toshitaka Matsui, Shusuke Nambu, Celia W. Goulding, Satoshi, Takahashi, Hiroshi Fujii, and Masao Ikeda- Saito
Unique coupling of mono- and dioxygenase chemistries in a single active site promotes heme degradation
Proc. Natl. Acad. Sci. **2016**, *113*, 3779-3784.
DOI: 10.1073/pnas.1523333113

Hiroshi Fujii, Daisuke Yamaki, Takashi Ogura, and Masahiko Hada
The Functional Role of the structure of the Dioxo-isobacteriochlorin Structure in the Catalytic Site of Cytochrome cd1 for the Reduction of Nitrite
Chem. Sci. **2016**, *7*, 2896-2906.
DOI: 10.1039/C5SC04825G

Radhika Narayanan, Archana Velloth, Takuya Kurahashi, Hiroshi Fujii, Masahiko Hada
The Origin of Relative Stability of Di- μ -oxo M-M Chiral Salen Complexes [M-M = Ti(IV)-Ti(IV), V(IV)-V(IV), Cr(IV)-Cr(IV) and Mn(IV)-Mn(IV)]: A

Quantum-Chemical Analysis
Bull. Chem. Soc. Jp. **2016**, *89*, 447-454.
DOI: 10.1246/bcsj.20150393

Zhiqi Cong, Haruki Kinemuchi, Takuya Kurahashi, and Hiroshi Fujii
Factors Affecting Hydrogen-Tunneling Contribution in Hydroxylation Reactions Promoted by Oxoiron(IV) Porphyrin-Cation Radical Complexes
Inorg. Chem. **2014**, *53*, 10632-10641.
DOI: 10.1021/ic501737j

Shinji Aono, Masayuki Nakagaki, Takuya Kurahashi, Hiroshi Fujii, and Shigeyoshi Sakaki
Theoretical Study of One-Electron-Oxidized Mn(III)- and Ni(II)-Salen Complexes: Localized vs. Delocalized Ground and Excited States in Solution
J. Chem. Theory and Comput. **2014**, *10*, 1062-1073.
DOI: 10.1021/ct401014p

Takuya Kurahashi, Masahiko Hada, and Hiroshi Fujii
Di- μ -Oxo Dimetal Core of Mn^{IV} and Ti^{IV} as a Linker Between Two Chiral Salen Complexes Leading to the Stereoselective Formation of Different *M*- and *P*-Helical Structure
Inorg. Chem. **2014**, *53*, 1070-1079.
DOI: 10.1021/ic402572h

[学会発表](計 29 件)

石水 友梨、藤井 浩 鉄4価ポルフィリン カチオンラジカルによるオレフィンエポキシ化反応における電子移動過程への寄与について
日本化学会第97回春期年会、2017.3.16~219、慶応大学(神奈川)

横田 紗和子、藤井 浩 鉄3価へム次亜塩素酸錯体の O-Cl 結合開裂に対する配位子の効果
日本化学会第97回春期年会、2017.3.16~219、慶応大学(神奈川)

Hiroshi Fujii Mechanism of Aromatic Hydroxylation Reactions by Compound I of Cytochrome P450
8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (Asbic8), December 4-9, 2016, Auckland, New Zealand
(Invited Talk)

荒木 郁子、倉橋 拓也、藤井 浩 マンガン4価 salen 次亜塩素酸イオン付加錯体の同定と反応性の研究
第49回酸化反応討論会、2016.11.12~13、徳島大学(徳島)

福井 奈美、藤井 浩 鉄4価オキソポルフィリン -カチオンラジカル錯体にお

る配位子の構造と反応性の関係
第 49 回酸化反応討論会、2016.11.12~13、
徳島大学(徳島)

浅香 茉彩、藤井 浩 Compound I モデル錯体を用いたチトクローム P450 の芳香環水酸化反応の反応機構の研究

第 66 回錯体化学討論会 2016.9.10~12、福岡大学(福岡)

横田 紗和子、柳澤 幸子、小倉 尚志、藤井 浩 鉄 3 価ヘム次亜塩素酸錯体の反応性に対するポルフィリン配位子と軸配位子の効果

第 66 回錯体化学討論会 2016.9.10~12、福岡大学(福岡)

Hiroshi Fujii The Functional Role of the Dioxo-isobacteriochlorin Structure of the Catalytic Site of Cytochrome cd1 in Nitrite Reduction

42nd International Conference on Coordination Chemistry, July 3-8, 2016, Brest, France

荒木 郁子、倉橋 拓也、藤井 浩 マンガン 4 価サレン次亜塩素酸イオン付加錯体の反応性の研究

日本化学会第 96 回春期年会、2016.3.24~27、同志社大学(京都)

横田 紗和子、藤井 浩 鉄()ヘム次亜塩素酸錯体の反応性に対する配位子の電子吸引性効果

日本化学会第 96 回春期年会、2016.3.24~27、同志社大学(京都)

浅香 茉彩、藤井 浩 鉄 4 価オキソ鉄ポルフィリン カチオンラジカルと芳香環の反応および反応機構

日本化学会第 96 回春期年会、2016.3.24~27、同志社大学(京都)

福井 奈美、藤井 浩 鉄 4 価オキソ鉄ポルフィリン カチオンラジカル錯体のポルフィリンラジカル軌道が反応性に及ぼす影響

日本化学会第 96 回春期年会、2016.3.24~27、同志社大学(京都)

Hiroshi Fujii Electronic Structure of One-electron Oxidized Mixed-Valence Metal Salen Complexes

Pacificchem2015, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

(Invited Talk)

Hiroshi Fujii Molecular Mechanism of Heme Axial Ligand for Controlling the Reactivity of Oxoiron(IV) Porphyrin-Cation Radical Complex

Pacificchem2015, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

(Invited Talk)

藤井 浩、荒木 郁子、福井 郁、倉橋 拓也 マンガン 4 価サレン次亜塩素酸イオン付加錯体の合成と反応性の研究

第 48 回酸化反応討論会、2015.10.23~24、同志社大学(京都)

浅香 茉彩、藤井 浩 Compound I モデル錯体を用いたチトクローム P450 による芳香環水酸化反応の反応機構の研究

第 48 回酸化反応討論会、2015.10.23~24、同志社大学(京都)

横田 紗和子、藤井 浩 ミエロペルオキシダーゼの活性反応中間体としての鉄()ヘム次亜塩素酸錯体の反応性の研究

第 48 回酸化反応討論会、2015.10.23~24、同志社大学(京都)

浅香 茉彩、藤井 浩 高原子価オキソ鉄ポルフィリン錯体による芳香族水酸化反応の反応機構の研究

第 65 回錯体化学討論会 2015.9.21~23、奈良女子大学(奈良)

Hiroshi Fujii How does the axial ligand control the reactivity of high-valent metal oxo complex?

2nd Japan-Germany Joint Symposium, September 20-21, 2015, Nara Women's University, Nara

(Invited Talk)

Hiroshi Fujii Preparation, characterization and Reactivity of Iron(III) Porphyrin Hypochlorite Complexes as Models for Reactive Intermediates in Haloperoxidase

ChemComm Symposium, August 12-14, 2015, Ulsan and Seoul, Korea

(Invited Talk)

⑲ Hiroshi Fujii How does the Heme Axial Ligand Control the Reactivity of High-valent oxoiron intermediates?

IUPAC-2015, August 9-15, 2015, Pusan, Korea

(Invited Talk)

⑳ Maaya Asaka and Hiroshi Fujii Mechanism of Aromatic Hydroxylation by Cytochrome P450 Compound I Model Complexes

RIKEN Symposium "Metals in Biology" in Wako, June 16-17, 2015, RIKEN (Saitama)

㉑ Hiroshi Fujii Role of the Heme Axial Ligand on the Reactivity of High-Valent Oxoiron(IV) Porphyrin Intermediate

227th ECS Meeting, May 25-28, 2015, Chicago, USA

(Invited Talk)

㉒ 藤井 浩 酵素モデル金属錯体を用いた金属酵素の機能発現機構の研究

第 52 回錯体化学若手の会・近畿支部勉強会 2015.6.16、大阪大学

(招待講演)

㉓ 藤井 浩 ハロパーオキシダーゼの活性反応中間体の研究

分子研研究会「生物無機化学の最先端と今後の展望」 2015.1.6~7、岡崎コンファレンスセンター(岡崎)

(招待講演)

㉔ Cong Zhiqi・倉橋拓也・藤井 浩 鉄 3 価ヘム-次亜塩素酸錯体の反応性制御機構の

研究

第 47 回酸化反応討論会、2014.11.14～15、
崇城大学ホール（熊本）

⑳ 杵鞭春樹・Cong Zhiqi・倉橋拓也・藤井
浩 鉄 3 価ポルフィリン-次亜塩素酸イオン
付加錯体の反応性に関する研究

第 64 回錯体化学討論会、2014.9.18～20、中
央大学（東京）

㉑ Hiroshi Fujii Hypochlorite-rion(III)
Porphyrin Complexes as Models for Reaction
Intermediates of Catalytic and Biological
Reactions

41st International Conference on
Coordination Chemistry, July 21-25, 2014,
Singapore

(Invited Talk)

㉒ Hiroshi Fujii Functional Role of
Heme Axial Ligand on the Reactivity of
Oxoiron(IV) Porphyrin π -Cation Radical
Complex

8th International Conference on
Porphyrins and Phthalocyanines, June
22-27, 2014, Istanbul, Turkey

(Invited Talk)

〔図書〕(計 2 件)

藤井 浩 クライトン「生物無機化学」
塩谷光彦 監訳 東京化学同人 第 13 章
「鉄：ほとんどすべての生物にとって必要不
可欠なもの」 pp189～213 翻訳 (2016)

藤井 浩 フロンティア 生物無機化
学 伊東忍、青野重利、林高史編集 三共出
版 第 2 章 02 の運搬・貯蔵・活性化 pp52
～79 (2016)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.chem.nara-wu.ac.jp/~fujii/in
dex.html](http://www.chem.nara-wu.ac.jp/~fujii/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 浩 (FUJII Hiroshi)

奈良女子大学・研究院自然科学系・教授
研究者番号：80228957

(3) 連携研究者

波田 雅彦 (HADA Masahiko)

首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号：20228480

小倉 尚志 (OGURA Takashi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授
研究者番号：70183770

足立 伸一 (ADACHI Shinichi)

大学共同利用機関法人高エネルギー加
速器機構・物質構造科学研究所・教授
研究者番号：60260220