

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410066

研究課題名(和文) アセチルCoA合成経路を担う鉄・ニッケル酵素をモデルとする炭素固定反応の開拓

研究課題名(英文) Carbon Fixation Reactions Modeling Iron/Nickel Enzymes Included in Acetyl CoA Pathway

研究代表者

松本 剛 (Matsumoto, Tsuyoshi)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・准教授

研究者番号：50311717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然界の炭素固定を担う金属酵素COデヒドロゲナーゼ(CODH)およびアセチルCoA合成酵素(ACS)の活性中心モデルを構築し、反応検討によって酵素反応機構解明を進めた。CODHについては独自に開発した三座チオラート配位子を利用し、CODH活性中心のモデルとなる[4Fe-5S-Ni]クラスターの構築に成功した。ACSについてはテトラアニオン性のジアミドジチオラートmbpaをもつニッケル二核錯体を合成し、酵素基質であるメチルカチオン、CO、チオラートからアセチルチオエステルを合成するモデル反応を達成し、アセチルCoA合成経路の反応機構解明を大きく前進させ、新たな炭素固定反応の端緒を拓いた。

研究成果の概要(英文)：Model studies of CO dehydrogenase (CODH) and acetyl CoA synthase (ACS) were conducted to elucidate the unrevealed mechanism of the carbon fixation process of acetyl CoA pathway in nature. As a CODH active site model, a novel [4Fe-5S-Ni] cluster was synthesized by utilizing our unique tridentate thiolate ligands. For our model studies of ACS, a series of dinuclear nickel complexes having tetra-anionic diamido-dithiolate ligand "mbea" modeling the plausible intermediates included in the ACS catalytic pathway was synthesized, and the thioester formation reaction modeling the ACS was accomplished. The results considerably contribute to elucidate the ACS reaction mechanism, and provide clues to the development of new carbon fixation reactions.

研究分野：生物無機化学

キーワード：ニッケル酵素 アセチルCoA合成酵素 COデヒドロゲナーゼ 炭素固定 モデル研究

1. 研究開始当初の背景

自然界の炭素固定を担う経路のひとつに Wood-Ljungdahl 経路 (アセチル CoA 経路) が知られている。この経路では、2 分子の二酸化炭素がそれぞれ異なるプロセスで還元され、一方の二酸化炭素は多段階の酵素還元反応によってメチルコバラミンのメチル基へ変換され、もう一方の二酸化炭素は、CO デヒドロゲナーゼによって 1 段階で一酸化炭素に還元される。両者はアセチル CoA 合成酵素によってアセチル基に変換されると同時に CoA の末端チオラートがアセチル化され、アセチル CoA が生成する。このように CODH や ACS の生化学的機能は知られているが、その詳細な活性中心の構造や化学反応過程はほとんど未解明である。酵素の活性中心構造は結晶構造解析によって明らかにされつつあるが、その大多数は酵素機能を示さない失活状態の構造であり、触媒反応機構に手がかりを与えるデータは極めて限定的である。主に EPR スペクトル等による解析も行われているが、CODH や ACS のような電子スピンを持たない種が触媒種として提案されている系では有効な手法とはならない可能性が高い。そのような系で期待されるアプローチが、モデル錯体による研究である。錯体化学の合成手法に有機金属化学の観点を導入し、合理的設計に基いてモデル反応を検討し、反応中間体を観測、もしくは単離して、酵素反応の機構を明らかにできれば、従来とは異なる炭素固定触媒の開拓に繋げることが可能となる。

CO-デヒドロゲナーゼ(CODH)とアセチル CoA 合成酵素(ACS)の研究の現状：アセチル CoA を合成するこれらの酵素は、連続する 2 つの反応をそれぞれ担っており、両酵素は複合体を形成していることが構造解析によって明らかにされている (Fontecilla-Camps ら, 2003 年)。CODH は 2 つのプロトンと電子を用いて CO₂ を CO に還元し、ACS はメチルコバラミンのメチル基と、CODH で合成された CO を利用して CoA をアセチル化し、アセチル CoA を合成する。CODH の活性中心には右図のような複雑な Fe/Ni/S クラスタ骨格が存在し、基質結合部位はニッケルで、隣接する鉄ヒドロキシ部位が反応に関与すると考えられている。

しかし、そのモデル構築は困難を極めていた。Holm らはニッケル 1 つと鉄 3 つを含むキューバン型 [NiFe₃S₄] 骨格の構築を行っているが、反応に関与すると予想される部分構造を持たないため、反応機構に関する知見は得られておらず、複雑な骨格がその機能発現において果たす役割は未だ不明で

ある。一方我々はこれまでの検討において、[3Fe-4S] クラスタと Ni/Fe 二核錯体の反応を検討し、CODH と同様の [NiFe₃S₄] の組成をもつクラスタ生成を示唆する結果を得ている。本研究課題では、この知見をもとに CODH のモデル構築から機能解明までを実現したい。

一方 ACS のモデル研究は、これまでの申請者らの検討によって大きく前進した。酵素の活性中心は二核ニッケル錯体と [Fe₄S₄] クラスタから成り、一見、単純な構造に見える (右図) が、その二核ニッケル錯体の構築自体が予想以上に困難であった。Holm, Darensbourg, Rauchfuss, Riordan (米国)、および Schröder (英国) らも ACS 活性中心モデル錯体の合成を精力的に行っているが、二核ニッケル部分を構造的に再現する錯体が合成されているのみで、反応検討に資する化合物は合成されていない。一方、申請者らはニッケル二核錯体を用いた ACS のモデル反応を世界に先駆けて実現し、反応機構解明につながる成果を 2009 年の PNAS 誌に報告した。その論文の反響は大きく、その前後、三度にわたる生物無機化学国際会議(ICBIC)で招待講演を行う機会も得た。しかし本論文は ACS 反応機構のひとつの可能性を示したに過ぎない。本研究課題では、これまでの知見をもとに飛躍的に発展させ、ACS の酵素反応全容を解明し、さらに反応の触媒化への端緒を拓きたい。本反応は CO を基質とする酢酸合成にも関連し、安価なニッケルを用いた炭素固定反応の開拓は、実用的にも重要と考えられる。

2. 研究の目的

上記の鉄・ニッケルを活性中心にもつ 2 つの金属酵素は、今後のエネルギー利用の観点から極めて重要な化学反応を担っている。申請者はこれまで CODH, ACS のモデル研究を継続的に行い、上記のように CODH についてはモデルクラスタを構築する手がかりを得、ACS では酵素と同様の二核ニッケル錯体を用いて反応機構解明につながるモデル反応を一部達成している。

そこで本研究課題では、これまでの知見をもとに研究を飛躍的に発展させ、錯体化学と有機金属の知識を駆使し、ACS, CODH の機能解明を通じて触媒反応への展開に繋がる知見を得たい。CODH については、複雑な [NiFe₄S₄] 骨格全体を構築することにこだわらず、実際に酵素反応に必要な部位を見極め、単純化したモデル錯体を用いて機能発現をめざしたい。ACS については、真の活性種のニッケルの酸化数の同定、またそれに関連してニッケルに結合している

[Fe₄S₄]クラスターの役割を解明すると同時に、反応基質の作用機序解明を行い、いかに酵素が活性中心の失活を防ぎながら触媒反応を実現しているのか、実現可能な反応サイクルを提示し、さらにはニッケルを用いた酢酸合成触媒反応の開発への端緒を拓きたい。

以上に記した CO₂ 還元を担う酵素は、ここ数年間ようやく研究が開始された分野であり、またそのモデル錯体研究も大部分が端緒についたばかりである。特にニッケル酵素の研究は不思議なことにほとんど手つかずの状態にある。自然界の生命の営みを明らかにするという学術的観点からだけでなく、安価なニッケルがいかに小分子活性化反応に貢献できるかを明らかにすることは、工業化学的にも重要である。CO₂ を有用な分子に変換して固定化するという課題に新たなヒントを与えるこれらのニッケル酵素に対して、錯体化学、有機金属化学の観点からの貢献が求められており、本研究課題の継続的な遂行によって世界をリードすることは極めて重要と考えられる。

3. 研究の方法

アセチル CoA 合成酵素(ACS)のモデル研究については本研究開始時までに一定の成果が得られており、本研究ではそれを踏まえて以下の課題に取り組んだ。(1)二核ニッケルモデル錯体にテトラアニオン性の N₂S₂ 配位子を導入し、モデル反応を達成する；(2)酵素反応の基質作用順序を明らかにするモデル錯体を合成し反応を検討する；(3)実際の酵素と同様に [Fe₄S₄] クラスターを二核ニッケル部位と連結し、その電子状態を明らかにし、酵素反応に及ぼす影響を明らかにする；(4)触媒反応への応用的展開に必要な指針を見いだす。

CO デヒドロゲナーゼ(CODH)のモデル研究にはこれまでも継続的に取り組んできたが、その進捗は困難を極めていた。しかしごく最近、[3Fe-4S]クラスターと Ni/Fe 錯体の反応から [NiFe₃S₄] クラスターの生成が示唆され、本研究課題での進展が多いに期待される。検討課題は、(1)モデルとなる [NiFe₄S₄] クラスターを構築する；(2)反応に関与すると考えられる二核 Ni/Fe 部位に焦点を絞ったモデル錯体を構築する；(3)モデル錯体を用いて反応機構を明らかにする。研究体制としては、本研究代表者の指示のもと今後3年間、毎年大学院生3名が本研究に携わる予定である。得られた化合物の同定に必要な各種スペクトル測定装置は、すでに所属研究室に存在し、いつでも利用可能である。特に、X線構造解析が構造決定に有効であると考えられるが、ごく微小な結晶でも構造解析できる最先端の単結晶

X線構造解析装置も複数台所有しており、効率よく構造決定を行える環境にある。また物性面での測定については、学科内共通機器として保有する磁化率測定装置 (SQUID)、EPR、NMR を使用できる。反応追跡に必要な質量分析装置や GC なども整っている。

モデル錯体を合成した後、反応を検討する段階では、それぞれの酵素の生化学研究を行っている研究者とのディスカッションが必要不可欠になってくる。すでに予備検討段階において、タンパク結晶構造解析を中心に研究を進めている Fontecilla-Camps (仏)、Dobbek (独)、Thauer, Shima (独)ら、また本酵素の生化学研究で世界をリードする Lindahl, Ragsdale (米)らと意見交換を適宜行っており、今後もその進捗にあわせて議論を継続する。

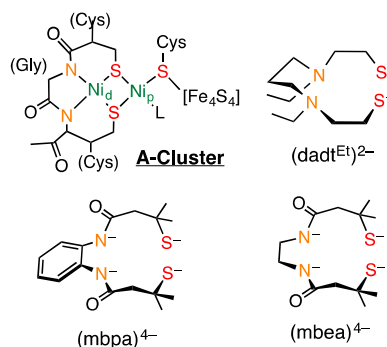
4. 研究成果

(1)アセチル CoA 合成酵素のモデル研究

アセチル CoA 合成酵素(ACS)は下記の反応を触媒する。

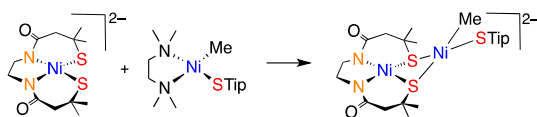


活性中心(A-Cluster)に存在するニッケル二核錯体部位には、Cys-Gly-Cys 由来の2つのアミドと2つのシステインチオラートがテトラアニオン性 N₂S₂ 配位子として結合している。当初、N₂S₂ 配位子としてジアニオン性の dadt^{Et} を用いて ACS モデル研究を進め、その後、電子状態が実際の酵素により近いテトラアニオン性ジアミドジチオラート配位子 mbpa を進めてきたが、生成物の結晶性が悪く、構造解析が難しかった。そこで、mbpa のフェニレン架橋部をエチレン架橋に変えた mbea を用い、検討を行った。

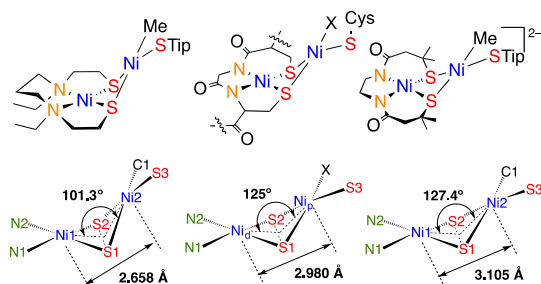


mbea 配位子を有するニッケル(II)単核錯体 [Ni(mbpa)]²⁻ (1)に、メチル基とチオラートを併せ持つニッケル(II)錯体 (tmeda)Ni(Me)(STip)を加えたところ、mbea のチオラート部分で2つのニッケルが架橋された Ni(II)-Ni(II) 二核錯体

[Ni(mbea)Ni(Me)(STip)]²⁻(2)が得られた。



X線構造解析の結果、錯体2はA-clusterと同様に架橋チオレート部分で折れ曲がった構造をとり、その二面角は127.4°でA-clusterの値(125°)と極めて近い(下図中央と右)。一方、先に合成したdadtEt配位子をもつ類縁化合物(下図左)の二面角は101.3°と小さく、mbea配位子がより実際の酵素をよく再現するモデルであることがわかる。



錯体2はACSの3つの反応基質のうちメチル基とチオレートを有し、酵素反応の中間体のひとつと考えられる。そこで2にCOを作用させたところ、アセチルチオエステル MeC(O)STipが80%の収率で得られ、同時に還元状態の[Ni(mbea)Ni(CO)]²⁻が生成した。これらの結果は、2がACS触媒サイクルの中間体モデルであることを示す結果であり、ジアミドジチオレート配位子をもつニッケル二核錯体を用いてモデル反応を達成した初めての例である。

次に、生化学研究から提案されているもうひとつの基質作用機序、すなわちメチルカチオンの次にCO、その後チオレートが作用する機構の可能性を探った。酵素還元状態 Ni^{II}-Ni⁰モデル錯体 [Ni^{II}(mbea)Ni⁰(cod)]²⁻とアセトニトリルの酸化的付加で得られた Ni^{II}-Ni^{II}錯体 [Ni(mbea)Ni(Me)(CN)]²⁻(3)を用いた。錯体3の末端ニッケル上にはシアノ基が強固に結合しており、チオレートを加えても配位しなかったが、チオレート存在下でCOを加えるとアセチルチオエステルが生成し、酵素モデル反応が進行することがわかった。この結果は、提案されているいずれの作用機序でも酵素反応が進行しうることを化学実験的に示した初めての成果である。

(2) CO デヒドロゲナーゼ(CODH)のモデル研究：独自に開発した三座チオレート配位

子 TefpS3 を導入した[4Fe-4S]クラスターとニッケル錯体の連結により、CODHの活性中心に存在する Fe/Ni/S クラスターの合成を検討した。1つの鉄上にSH基を導入した。このSH基を足がかりとしてTp*基を補助配位子とするNi錯体 Tp*Ni(OH)を作用させたところ、[4Fe-4S]クラスターとニッケル錯体がスルフィドで架橋された[4Fe-5S-Ni]錯体の合成に初めて成功し、その構造をX線解析によって明らかにした。

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3件)

- (1) “[3:1] Site-Differentiated [4Fe-4S] Clusters Having One Carboxylate and Three Thiolates”, Terada, T.; Hirabayashi, K.; Liu, D.; Nakamura, T.; Wakimoto, T.; Matsumoto, T.; Tatsumi, K., *Inorg. Chem.* 2013, 52, 11997-12004, 査読有
DOI: 10.1021/ic4017596.
- (2) “Heterolytic Activation of Dihydrogen Molecule by Hydroxo-/Sulfido-Bridged Ruthenium-Germanium Dinuclear Complex. Theoretical Insights”, Ochi, N.; Matsumoto, T.; Dei, T.; Nakao, Y.; Sato, H.; Tatsumi, K.; Sakaki, S. *Inorg. Chem.* 2015, 54, 576-585, 査読有
DOI: 10.1021/ic502463y.
- (3) “Supramolecular Porphyrin-Based Metal-Organic Frameworks with Fullerenes: Crystal Structures and Preferential Intercalation of C70”, Ohmura, T.; Usuki, A.; Mukae, Y.; Motegi, H.; Kajiya, S.; Yamamoto, M.; Senda, S.; Matsumoto, T.; Tatsumi, K., *Chem. Asian J.* 2016, 11, 700-704, 査読有
highlighted in the inside cover.
DOI: 10.1002/asia.201501422

[学会発表](計25件)

- (1) “Model Studies on Nickel Enzymes Relevant to Autotrophic Carbon Fixation”, T. Matsumoto, The 15th Joint Seminar University of Münster-Nagoya University, May 20-21, 2013, Nagoya.
- (2) “Synthesis of [Ni-Ni] and [Ni-S-Fe4S4] complexes Modeling Acetyl CoA Synthase Active Site”, T. Matsumoto, R. Osu, Y. Ozawa, T. Terada, K. Tanaka, K. Tatsumi, 16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC16), July 22-26, 2013, Grenoble, France.
- (3) 「嫌気性生物の炭素固定に関わる金属酵素のモデル研究」松本 剛, 錯体化

- 学若手の会夏の学校 2013, 2013年8月8-11日, 札幌(招待講演)
- (4) 「アセチル CoA 合成酵素の反応中間体モデルとなるメチル基とチオラートを併せもつ二核ニッケル錯体」大須理恵・小澤由佳・松本 剛・巽 和行、錯体化学会第 63 回討論会、2013 年 11 月 2-4 日、那覇
 - (5) 「三座チオラート配位子を導入した [1:3]不均等配位[4Fe-4S]クラスターおよび CO デヒドロゲナーゼ活性中心モデルの合成」田中香帆・中村友彦・寺田玲季・松本 剛・巽 和行、錯体化学会第 63 回討論会、2013 年 11 月 2-4 日、那覇
 - (6) 「三座チオラート配位子とクロリドが配位した [4Fe-4S]²⁺ クラスターと水素化ホウ素ナトリウムの反応」寺田玲季・松本 剛・巽 和行、錯体化学会第 63 回討論会、2013 年 11 月 2-4 日、那覇
 - (7) アセチル CoA 合成酵素の中間体モデルとなるジアミドジチオラート型 mbea 配位子を持つ二核ニッケル錯体、大須理恵・小澤由佳・唯 美津木・大木靖弘・巽 和行・松本 剛、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27-30 日、名古屋
 - (8) 三座チオラート配位子をもつ鉄硫黄クラスターへのニッケル錯体の導入: CO デヒドロゲナーゼ活性中心モデル錯体の構築、田中香帆・寺田玲季・松本 剛・巽 和行、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27-30 日、名古屋
 - (9) “Model Studies on Nickel Enzymes Playing Key Roles in Autotrophic Carbon Fixation”, T. Matsumoto, *EMTECH, Universiti Putra Malaysia (UPM) – University Of Hyogo (UH), Japan Joint Colloquium 2014*, May 26-27, 2014, Putra, Malaysia (Keynote Lecture).
 - (10) “Synthesis and Reaction of Dinuclear Nickel Complexes Modeling Intermediates in the Enzymatic Cycle of Acetyl CoA Synthase”, R. Osu, Y. Ozawa, Y. Ohki, T. Matsumoto, and K. Tatsumi, XXXVI International Conference on Organometallic Chemistry (ICOMC 2014), 札幌, July 13-18, 2014.
 - (11) 「アセチル CoA 合成酵素の反応中間体モデルとなるジアミドジチオラート型 mbea 配位子をもつ二核ニッケル錯体の合成と反応」大須理恵・大木 靖弘・唯 美津木・巽 和行・松本 剛、錯体化学会第 64 回討論会、2014 年 9 月 18—20 日、東京。
 - (12) 「かさ高い terphenyl 基をリン上に導入したジホスフィン配位子を有する単核ニッケル錯体の合成と反応」鈴木 宏徳・唯 美津木・大木 靖弘・松本 剛、錯体化学会 第 64 回討論会、2014 年 9 月 18-20 日、東京
 - (13) “Dinuclear Nickel Complexes Supported by Diamido-dithiolate “mbea” Modeling Acetyl CoA Synthase”, R. Osu, Y. Ozawa, Y. Ohki, M. Tada, K. Tatsumi, T. Matsumoto, The 18th Joint Symposium, University of Münster and Nagoya University, Nov 27-29, 2014, Münster, Germany
 - (14) “Synthesis of Dithiolato-Bridged (CO)_x/(CN)_y Fe-Ni Complexes as Structural Models for the Active Site of [NiFe] Hydrogenase”, Z. Li, T. Matsumoto, Y. Ohki, K. Tatsumi, 日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26-29 日、船橋
 - (15) 「Terphenyl 基をリン上に導入したジホスフィン配位子を有するニッケル錯体」, 鈴木宏徳、唯 美津木・大木靖弘・松本 剛、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26-29 日、船橋
 - (16) 「ジアミドジチオラート配位ニッケル二核錯体の合成とアセチル CoA 合成酵素のモデル反応」, 大須理恵、小澤由佳、唯 美津木・大木靖弘・巽 和行、松本 剛、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26-29 日、船橋
 - (17) “Model Studies on Acetyl CoA Synthase”, T. Matsumoto, 6th International IMBG Meeting, Chemistry & Biology of Iron-Sulfur Clusters, September 15-18, 2015, Villard de Lans, France (Invited Lecture).
 - (18) “Synthesis of [8Fe-7S] Clusters Having Sterically Demanding Thiolates: An Optimal P-Cluster Model of Nitrogenase”, G. Moula, A. Nagasaki, Y. Ohki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, 錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21 日-23 日、奈良
 - (19) “Synthesis and Reactions of Dithiolate-Bridged Heterobimetallic Iron(Carbonyl/Cyanide)-Nickel Complexes in Relevance to the Active Site of [NiFe] Hydrogenase”, M. Bose, Z. Li, Y. Ohki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, 錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21 日-23 日、奈良
 - (20) “Dithiolato-Bridged (Carbonyl/Cyano) Iron-Nickel Complexes Bearing Hydride as a Model of [NiFe]Hydrogenase Active Site”, Z. Li, Y. Ohki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, 錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21 日-23 日、奈良
 - (21) 「酢酸銅(II)-テトラピリジルポルフィン錯体の C70 分子認識能」, 大村 哲賜・臼杵 有光・千駄 俊介・松本 剛・巽 和行、錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21 日-23 日、奈良

- (22) “Model Studies on Acetyl CoA Synthase catalyzing CO₂ fixation in organisms”, T. Matsumoto, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii (Invited Lecture).
- (23) “Synthesis of Dithiolate-Bridged Iron(Carbonyl/Cyanide)-Nickel Complexes and their Reactions Modeling the [NiFe] Hydrogenase Active Site”, M. Bose, Z. Li, Y. Ohki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, The 5th International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis, Jan 29-30, 2016, Nagoya.
- (24) “An Optimal P-Cluster Model of Nitrogenase having Sterically Demanding Thiolates”, G. Moula, A. Nagasaki, Y. Ohki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, The 5th International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis, Jan 29-30, 2016, Nagoya.
- (25) “Synthesis of Dithiolato-Bridged (Carbonyl/Cyano)Iron-Nickel Complexes Bearing Hydride as a model of [Ni/Fe] hydrogenase active site”, Z. Li, Y. Ohki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, The 5th International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis, Jan 29-30, 2016, Nagoya.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 剛 (MATSUMOTO TSUYOSHI)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生

命分子研究所・准教授

研究者番号：50311717

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし