

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02733

研究課題名(和文)窒素固定化酵素の機構解明に資するMo-Fe-Sクラスターの開発

研究課題名(英文) Synthesis and Reactions of Mo-Fe-S Clusters Toward Understanding of the Mechanism of Nitrogenase

研究代表者

大木 靖弘 (Ohki, Yasuhiro)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：10324394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：窒素固定化酵素ニトロゲナーゼの機能であるN₂の還元反応は、FeMo-cofactorと呼ばれる金属-硫黄クラスターにより触媒される。本研究ではFeMo-cofactorの機能を人工的に再現することを目指し、三角形型のMo-Sクラスター錯体をプラットフォームとして鉄族金属Mの塩化物を取り込ませることで、一連の立方体型クラスター錯体を合成し、金属Mを反応点としてN₂の活性化を検討した。さらに、ニトロゲナーゼのタンパクを扱える生化学者と連携して、人工合成したFe-Sクラスター錯体を用いる選択的なタンパク再構成技術を開発し、ニトロゲナーゼ活性中心の生合成過程に関する重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ニトロゲナーゼの酵素活性中心FeMo-cofactorに関連深いMo-Fe-Sクラスター錯体を合成し、Feを反応点としてN₂を捕捉した。この研究をさらに発展させれば、過去半世紀に渡り検討されてきた一方で誰も実現できていない、金属-硫黄クラスター錯体を触媒とする酵素模倣型のN₂還元反応を実現できる可能性があり、さらには酵素機能を超える人工触媒の開発に向けた端緒が拓かれる。

研究成果の概要(英文)：Biological reduction of nitrogen molecule (N₂) is mediated by nitrogenase enzyme, where a complex metal-sulfur cluster designated FeMo-cofactor is used. Despite of studies on the reactions of synthetic Mo-Fe-S clusters over the past nearly half century, activation and conversion of N₂ on the Fe sites of Mo-Fe-S clusters remain elusive. In this research project, we synthesized a series of triangular Mo-S clusters as platforms to accommodate chlorides of iron-group metals M. The resultant cubic Mo-M-S clusters were subjected to N₂ activation.

We also attempted to apply synthetic Fe-S clusters in biochemical studies, and in collaboration with biochemists, we were able to establish a new protocol to reconstitute proteins with artificial Fe-S clusters. This protocol turned out to be useful to elucidate the biosynthetic pathways of nitrogenase FeMo-cofactor.

研究分野：錯体化学、有機金属化学、生物無機化学

キーワード：鉄 モリブデン 硫黄 ニトロゲナーゼ 窒素固定

1. 研究開始当初の背景

鉄原子(Fe)と硫黄原子(S)を多数組み合わせる生じる Fe-S クラスタ錯体は、細菌から高等動植物まで、ほぼ全ての生物に存在する普遍的な化合物であり、電子伝達物質や遺伝子の発現調節因子、O₂, NO 等のセンサー、あるいは酵素活性中心として、幅広く用いられている。これらの機能は、Fe と S が創り出す多様な幾何構造と密接に関係しており、特に N₂ 等の不活性小分子を還元する酵素活性中心 (図 1) は、Fe 以外の金属元素も取り込んでいる上に構造が複雑なため、酵素反応過程において反応点をどのように生じて基質を還元するか、完全には解明されていない。

研究代表者らは従来研究において、ニトロゲナーゼの構造モデル研究を牽引してきたが(例: *JACS* **2007**, *129*, 10457, *JACS* **2009**, *131*, 13168)、酵素機能の再現すなわち N₂ の捕捉と還元は達成できなかった。また、金属-硫黄クラスタ錯体に N₂ を配位させること自体が容易ではなく、溝部らが 2007 年に初めて報告して以降(*ACIE* **2007**, *46*, 5431)、本研究開始以降の報告まで含めても、これまでに代表者らを含む 2 例しかなく(Ohki, *Nature Commun.* **2018**, *9*, 3200, Suess, *Nature Chem.* **2021**, *13*, 666)、またそれらの配位 N₂ は容易に解離するため変換が困難であった。さらに FeMo-cofactor そのものを用いても、タンパクから有機溶媒へ抽出すると、N₂ を還元できなくなることが知られていた(Smith, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185-186*, 669)。従って、人工設計した金属-硫黄クラスタ錯体を用いて酵素模倣型の窒素還元反応を実現するには、なぜタンパク中でのみ FeMo-cofactor が機能するのか合理的に解釈し、適切な錯体分子設計へと落とし込む必要がある。錯体化学的手段だけでなく、生化学的な知見も組み合わせることが、問題解決の鍵になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、酵素ニトロゲナーゼの構造-機能相関の解明に資する知見を得ることを目的として、独自の金属-硫黄クラスタ錯体の合成と窒素還元反応の検討を第一の目的とした。さらに生化学者と連携し、酵素活性中心の生合成過程に関する知見を明らかにするとともに、機能発現に必要な構造要素を解明することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

ニトロゲナーゼに係る近年の生化学研究成果と独自の考察に基づいて、金属-硫黄クラスタ錯体の設計・合成指針として「位置選択的な反応点の形成」「柔軟な酸化還元を許容すること」を設定した。また、FeMo-cofactor が立方体型の錯体二つを融合させた形であることにも着目して、立方体型 [Mo₃S₄M] クラスタ錯体 (M = Fe を中心とする鉄族元素)を用いることにした。

本研究開始に先立ち、代表者らは立方体型 [Mo₃S₄Ti] 錯体による N₂ の活性化を達成している

(Y. Ohki et al., *Nature Commun.* **2018**, *9*, 3200, 図 2)。二つの立方体型錯体で N₂ 分子を挟んで生成した Ti-N=N-Ti 型クラスタでは、hard な Ti と hard な N が強く結合し、Ti-N 結合の開裂が困難であることと、hard な Ti と soft な S との相性の悪さから、プロトン等の存在下で Ti-N 結合を切断して NH₃ を取り出そうとすると、Ti-S 結合も切断され錯体が分解することが明らかになった。また反応点として用いた Ti は、FeMo-cofactor と無関係でもある。反応点の金属元素をより soft な鉄族元素へと変更することで、N₂ の取り込みは相対的に難しくなるものの、M-N 結合の切断は容易になると期待した。

本研究では、人工合成した金属-硫黄クラスタ錯体による窒素還元機能の実現を目指すことと並行して、実際の酵素ニトロゲナーゼの構造-機能相関の解明に向けて、生化学者との連携も試みた。特に、新しいタンパク再構成法を開発することで、錯体化学に基づく生化学研究への道筋を切り拓くことにした。

ニトロゲナーゼ

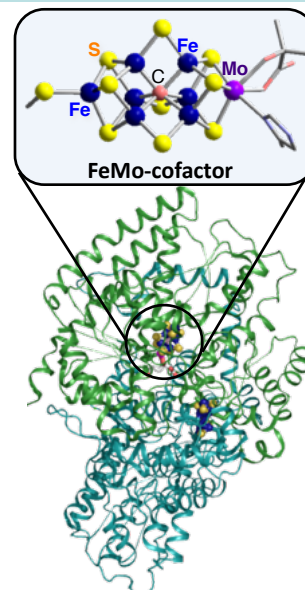
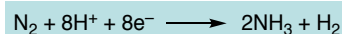


図 1. 自然界で窒素を還元する酵素ニトロゲナーゼのタンパクと活性中心 FeMo-cofactor。FeMo-cofactor は構造が複雑であるため、原子レベルで構造が解析されてもなお、構造-機能相関が完全には解明できていない。

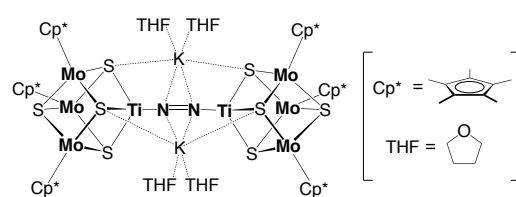


図 2. 二つの立方体型 [Mo₃S₄Ti] クラスタによる N₂ の活性化

4. 研究成果

(1) かさ高い配位子を Mo 上に持つ立方体型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{M}]$ クラスター錯体 (M = Fe, Co, Ni)の合成と N_2 活性化

本研究では、種々のシクロペンタジエニル(Cp^{R})配位子を Mo に結合させた $[\text{Mo}_3\text{S}_4]$ 三核クラスター錯体を合成し、これをプラットフォームとして金属 M を取り込ませて立方体型の金属-硫黄クラスターを合成するルートを設定した。まず、新たな配位子として $\text{C}_5\text{Me}_4\text{R}$ (R = SiMe_3 (Cp^{I}), SiEt_3 (Cp^{XL})) を用いて半サンドイッチ型錯体 $\text{Cp}^{\text{R}}\text{MoCl}_4$ を $\text{Mo}(\text{CO})_6$ から 3 段階で合成し、続く複数段階の変換反応を経てカチオン性三核錯体 $[\text{Cp}^{\text{R}}_3\text{Mo}_3\text{S}_4]^+$ へ誘導した。カチオン性三核錯体は、段階的な還元をへて中性、アニオン性へと変換でき、うちアニオン性錯体は種々の金属ハロゲン化物と反応することを見出した。これらの三核錯体の合成法や分光データに基づく同定、酸化還元挙動や構造についてまとめ、さらに、三核錯体をプラットフォームとして Fe を取り込ませた立方体型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{Fe}]$ クラスター錯体の合成と同定まで含めて研究成果をまとめ、*Inorg. Chem.*誌に発表した (図 3 : *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 5230-5240)。データ収集のために実施した ^{57}Fe メスバウアー分光測定は大同大学 (酒井陽一教授、高山努教授) との共同研究として、一連の生成物の結晶構造解析は Roger E. Cramer 教授 (ハワイ大学 (米国)) との共同研究として、また分光データと Fe 酸化状態の関係を議論するための理論計算は W. M. C. Sameera 博士 (北大低温研およびコロンボ大 (スリランカ)) との共同研究として進めた。塩化鉄の代わりに塩化コバルトや塩化ニッケル-DME 付加体を用いることで、立方体型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{M}]$ クラスター錯体(M=Co, Ni)も合成した (論文準備中)。

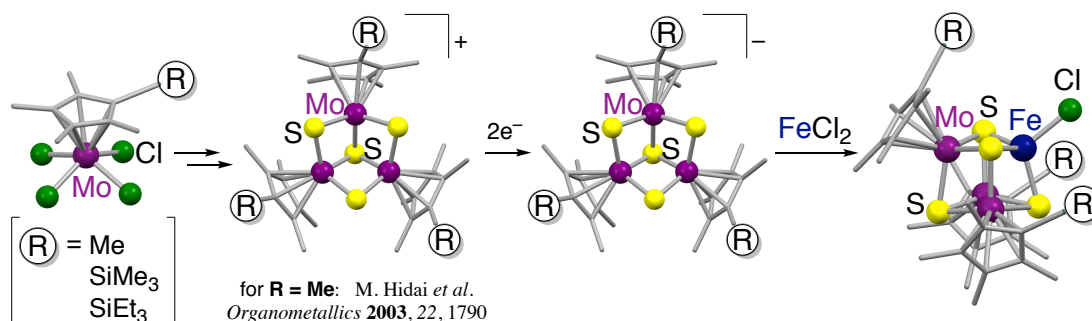


図 3. 半サンドイッチ型 Mo 錯体を出発とする三核 $[\text{Mo}_3\text{S}_4]$ 錯体の合成と段階的な還元および塩化鉄との反応による立方体型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{Fe}]$ クラスター錯体の合成

(C_5Me_5)Mo 部位を持つ立方体型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{Fe}]$ クラスター錯体を N_2 雰囲気下で試薬還元したところ、2つの立方体の Fe で N_2 を挟んだ Fe-N=N-Fe 型クラスター錯体が生成した。この錯体は図 2 に示す Ti-N=N-Ti 型クラスター錯体の類縁体であることを X 線結晶構造解析により分子構造を確認し、また反磁性であったことから NMR スペクトルでも同定した。 ^{15}N 同位体標識したサンプルを用意して ^{15}N NMR を測定し、気相の N_2 が錯体に取り込まれていることを証明した。 ^{57}Fe メスバウアー分光測定の結果を理論計算の結果と照合し、金属の電子状態の評価も検討した。その結果、錯体の基底状態が $S = 0$ であり、NMR 測定の結果と矛盾しないことが確認できた。構造データとメスバウアー分光の結果、理論計算の結果から、得られた Fe-N=N-Fe 錯体の鉄は Fe(II) 状態であると帰属した。Mo-Fe-S クラスター錯体の Fe による N_2 活性化は、過去半世紀近く実現できていなかった重要な課題の一つであり、酵素活性中心となる金属-硫黄クラスター錯体の構造と窒素固定化機能の関係を解明する大きな一歩となる。

(2) ニトロゲナーゼ活性中心の生合成過程と窒素還元機能における S 原子の重要性の解明

ニトロゲナーゼ活性中心 FeMo-cofactor が、なぜタンパク中でのみ窒素還元機能を発揮するのかを合理的に解釈するには、生化学的な知見も必要と考えた。そこで米国カリフォルニア大学アーバイン校の生化学者 (Markus W. Ribbe 教授、Yilin Hu 准教授) との共同研究として、標的 Fe-S クラスターをあらかじめ化学合成してアポタンパクに組み込む、合成化学と生化学を融合させた独自手法を開発した。1960 年代から現在まで用いられている、タンパク上に Fe-S クラスター錯体を再構成する古典的な手法は、クラスターを除去したアポタンパクに対して、Fe イオンと S イオン (およびチオール) を加える反応である。しかしこの反応では、アポタンパクと無関係に Fe, S イオン間で反応して硫化鉄を析出させるため、低確率でしか標的 Fe-S クラスター錯体をタンパク上に構築できない上に、標的 Fe-S クラスター錯体がさらに Fe, S イオンと反応する問題もあった。本研究で開発した独自手法であれば、硫化鉄がランダムに生じる問題や、標的と異なる Fe-S クラスター錯体を取り込んだ再構成タンパクが生成する問題を回避し、タンパク溶液を不必要に汚すことなく合目的かつ高純度に Fe-S クラスター錯体を再構成できる。ここで開発した、標的化合物を化学合成してタンパクに組み込む手法は、極めてシンプルであり、実際にヘムタンパクでは多くの実績があげられているが、Fe-S クラスター錯体を含むタンパクでは先

例がなかった。その主な理由は、導入する Fe-S クラスタ錯体の合成から生化学実験までを完全な嫌気下で行う技術的難易度が高いことと、Fe-S クラスタ錯体の合成および Fe-S タンパクの取り扱いにそれぞれノウハウが必要なことである。従って、独自技術の開発に至った鍵は、金属-硫黄クラスタ錯体分野で多くの実績をあげてきた研究代表者と、ニトロゲナーゼの生化学を先導する Ribbe, Hu らが連携し、上述の技術的な困難を克服したことにある。ここで開発した手法の利用法は、ニトロゲナーゼに限られない。鉄-硫黄クラスタは現在知られる全ての生物に存在し、またその生合成過程は現在でも未解明の部分が多く残されていることから、鉄-硫黄クラスタの生合成に関する基礎的な知見を得る手段として十分に利用可能と予想される。

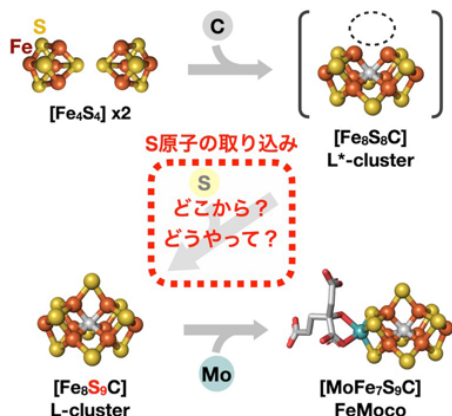


図4. 提案されているFeMo-cofactorの生合成過程と、本研究で解明したS原子の取り込み段階。

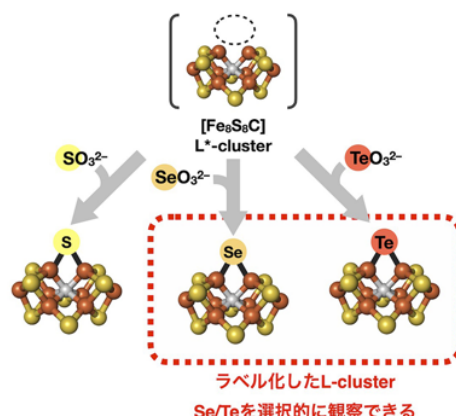


図5. 本研究で開発した、中央部のS原子をSe/Te原子で選択的にラベル化する手法の模式図。反応はNifBと呼ばれるタンパクで起こる。

上記の再構成法を利用して、窒素還元酵素ニトロゲナーゼの活性中心 FeMo-cofactor の生合成過程を追跡した。その結果、FeMo-cofactor の $[\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{C}]$ 骨格が2つの立方体型 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスタ錯体から構築されることと、2つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラウターだけでは不足している S 原子が $[\text{SO}_3]^{2-}$ イオンから供給されることを明らかにした (図4)。さらに、 $[\text{SO}_3]^{2-}$ の硫黄を異なる 16 族 (カルコゲン) 元素に変えた $[\text{SeO}_3]^{2-}$ や $[\text{TeO}_3]^{2-}$ を用いることで、FeMo-cofactor の前駆体クラスタ錯体として知られる L-cluster の中央を二重架橋するカルコゲン原子を位置選択的に元素修飾できることを明らかにした (図5)。Se/Te によってラベル化した L-cluster は電子スピン共鳴スペクトルによって同定し、X 線吸収分光を用いて Fe-Se/Te 結合を形成していることを確認した。さらに、理論計算を用いて $[\text{SO}_3]^{2-}$, $[\text{SeO}_3]^{2-}$, $[\text{TeO}_3]^{2-}$ が取り込まれる過程をシミュレーションし、これらのイオンが L-cluster 上で $[\text{S}]^{2-}/[\text{Se}]^{2-}/[\text{Te}]^{2-}$ まで還元される反応が、実際に起こりうるという結果も得られた。また、 $[\text{SO}_3]^{2-}$ が存在しない条件ではニトロゲナーゼの N_2 還元機能が発現されないことも確認した。ニトロゲナーゼが機能するためには外部基質となる S 源が必要になることを示しており、自然界の窒素固定を人工利用する上で重要な発見と言える。この共同研究成果を *Nature Chemistry* 誌に報告し (*Nature Chem.* 2021, 13, 1228-1234)、当該分野の化学者や生化学者の注目を集めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Marvin Oberling, Elisabeth Irran, Yasuhiro Ohki, Hendrik F. T. Klare, Martin Oestreich	4. 巻 39
2. 論文標題 Cationic Ru - Se Complexes for Cooperative Si - H Bond Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organometallics	6. 最初と最後の頁 4747 - 4753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.organomet.0c00719	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 Hajime Kameo, Shigeyoshi Sakaki, Yasuhiro Ohki, Naoki Uehara, Takuya Kosukegawa, Hiroharu Suzuki, Toshiro Takao	4. 巻 60
2. 論文標題 Four-Electron Reduction of Dioxygen on a Metal Surface: Models of Dissociative and Associative Mechanisms in a Homogeneous System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 1550-1560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.0c02936	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 -
1. 著者名 Yasuhiro Ohki, Kodai Ishihara, Moeko Yaoi, Mizuki Tada, W. M. C. Sameera, Roger E. Cramer	4. 巻 56
2. 論文標題 A dinuclear Mo ₂ H ₈ complex supported by bulky C ₅ H ₂ tBu ₃ ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 8035-8038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc03274c	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 Kazuki Tanifuji and Yasuhiro Ohki	4. 巻 120
2. 論文標題 Metal - Sulfur Compounds in N ₂ Reduction and Nitrogenase-Related Chemistry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Rev.	6. 最初と最後の頁 5194-5251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrev.9b00544	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 -

1. 著者名 Kodai Ishihara, Yuna Araki, Mizuki Tada, Tsutomu Takayama, Yoichi Sakai, W. M. C. Sameera, Yasuhiro Ohki	4. 巻 26
2. 論文標題 Synthesis of Dinuclear Mo@Fe Hydride Complexes and Catalytic Silylation of N ₂	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 9537-9546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202000104	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 -

1. 著者名 Kazuki Tanifuji, Yasuhiro Ohki	4. 巻 1876
2. 論文標題 Chemical Synthesis of an Asymmetric Mo-Fe-S Mimic of Nitrogenase Active Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol	6. 最初と最後の頁 229-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8864-8_15	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 -

1. 著者名 Yasuhiro Ohki, Ryota Hara, Kenichiro Munakata, Mizuki Tada, Tsutomu Takayama, Yoichi Sakai, Roger E. Cramer	4. 巻 58
2. 論文標題 Synthesis of [Mo ₃ S ₄] Clusters through Half-Sandwich Mo(V) Chlorides and Their Application as Platforms for [Mo ₃ S ₄ Fe] Cubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 5230-5240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.9b00309	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 Kazuki Tanifuji, Yasuhiro Ohki	4. 巻 179
2. 論文標題 Recent Advances in the Chemical Synthesis of Nitrogenase Model Clusters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Struct. Bond.	6. 最初と最後の頁 33-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/430_2018_26	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6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大木 靖弘
2. 発表標題 金属-硫黄クラスターと酵素・生化学の接点を目指して
3. 学会等名 岡山大学ナノ・バイオ融合によるエネルギー集積・高度利用研究拠点形成 ミニシンポジウム「酵素と化学の接点」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大木 靖弘
2. 発表標題 金属-硫黄クラスター錯体による窒素分子の活性化
3. 学会等名 統合物質創製化学研究推進機構 第6回国内シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大木 靖弘
2. 発表標題 有機金属化学と生物無機化学の境界を志向したものづくり：ニトロゲナーゼを題材に
3. 学会等名 徳島大学研究クラスター「有機合成化学を起点とするセンシング技術の開発と応用」特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro Ohki
2. 発表標題 Molybdenum-Containing Metal-Sulfur Clusters for Bio-Inspired N ₂ Activation
3. 学会等名 12th China-Japan Joint Symposium on Metal Cluster Compounds（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Ohki
2. 発表標題 Organometallic Approach Toward Functional Analogues of the Nitrogenase Metallo-cofactors
3. 学会等名 第69回錯体化学討論会 シンポジウム ” Metal-ligand cooperation : New design in the development of functional organometallic complexes ” (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Ohki
2. 発表標題 Bio-inspired N ₂ Activation by Cubic Metal-Sulfur Clusters
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Yangon 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 増田秀樹、大木靖弘他多数	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 1000
3. 書名 錯体化合物事典 鉄(生物無機化学) (分担執筆)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

錯体触媒変換化学研究領域
<http://om.kuicr.kyoto-u.ac.jp>

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
---------	---------