

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21750064

研究課題名（和文） 酸素活性化金属酵素の鍵中間体のモデル化学と分光学

研究課題名（英文） Spectroscopic Studies of Dioxygen-Activating Functional Heme Models

研究代表者

太田 雄大（OHTA TAKEHIRO）

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：70509950

研究成果の概要（和文）：

効率的な酸素の活性化および還元は金属酵素が成しえる重要なエネルギー変換化学である。本課題では金属酵素の酸素活性化機構の解明を目的とし、機能性ヘムモデル錯体を用いた酸素活性化反応において捕捉した重要な反応中間体について分光学的解析を行い、構造-電子状態-反応性の相関の理解に寄与した。

研究成果の概要（英文）：

The dioxygen activation catalyzed by metalloenzymes is important chemistry in terms of development of energy conversion catalysts. Elucidation of the dioxygen activation mechanism is highly desired to understand the design principle of the nature for the development of bio-inspired molecular catalysts. Thus functional heme models are used for the investigation of the dioxygen activation mechanism applying spectroscopic methods, providing fundamental insights into the biological mechanism which underlies the efficacy of the catalyst.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・無機化学

キーワード：ポルフィリン・モデル化・共鳴ラマン分光・分子触媒化学・生物無機化学・酸素活性化・量子化学計算・金属酵素

1. 研究開始当初の背景

金属酵素による選択的な酸素還元機構の研究は、生化学的な重要性のみならず、持続可能社会において求められる高効率な酸化反応触媒や燃料電池酸素極触媒の創製のために重要である。生体の燃料電池と見なせる

シトクロム酸化酵素のヘム鉄-銅二核金属活性中心においては、酸素分子の四電子還元反応が選択的に触媒される。しかしながら、燃料電池酸素極の実用触媒である白金は、部分還元種（二電子還元種の過酸化水素）を発生するため、その選択性向上へ向けた基礎研究

が必要とされており、そのためには極めて効率的な金属酵素の反応機構の理解が必要とされている。また、水の電解を低エネルギーで行う技術は水素社会構築のために重要である。光合成 II の酸素発生マンガンクラスターは、低過電圧で水の酸化を触媒するが、その過程で生成するとされる、高原子価マンガノキソ種および酸素-酸素結合を生成したペルオキシレベルの反応中間体の性質の解明は極めて重要な研究課題である。

反応機構の理解には、反応中間体の分子構造解析が必要であるが、そのためには、酸素活性化反応を低温に行い反応速度を下げることで、遷移的な性質を有する反応中間体を捕捉し、詳細な物理化学的な解析をすることが望まれる。酵素を用いた研究においては低温反応が困難であることと分子構造の複雑さから、重要な反応中間体の分子・電子構造を詳細に検討することは難しいため、機能的なモデル酵素錯体による詳細な研究が必要とされている。

近年、酵素における反応機構の解明が進み、酸素還元ヘム系においては Fe^{2+} 種への酸素付加により生成するスーパーオキシ種（の一電子還元により Fe^{3+} -ペルオキシもしくは Fe^{2+} -スーパーオキシ種が生成し、その後プロトン化によりヒドロペルオキシ種が生成すると考えられている。研究開始当初には、この化学種は窒素凍結下、 γ 線照射により生じる電子による還元法（低温放射線分解法）により主として EPR および ENDOR により観測されているが、共鳴ラマン分光などの振動分光による詳細な分子構造に関する知見は得られていなかった。

また、水の酸化反応において高原子価マンガノキソ種の性質については明らかにされているが酸素-酸素結合の生成機構を明らかにするペルオキシレベルの中間体の性質については理解されていない。

2. 研究の目的

酸素活性化を経由する金属酵素を範として分子設計したモデル分子において、酸素活性化反応機構の鍵となる反応中間体（（ヒドロ）ペルオキシ、高原子価オキシ中間体）を低温下溶液中酸素との反応、もしくは電気化学的酸化により調製する方法を確立し、低温下溶液中もしくは極低温下にて振動分光による解析を行う。分光学的知見と理論化学的考察により、反応機構において鍵となる反応中間体の分子構造、電子状態と反応性の相関を明らかにする。得られる知見は、酵素反応機構の理解につながり、かつ高効率な燃料電池酸素極触媒、電解触媒、および有機酸化反応触媒の分子設計に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 酸素活性化機能を有する機能性ヘム錯体を用いて、不安定反応中間体（（ヒドロ）ペルオキシ、オキシ中間体）を低温下溶液中で調製する方法を確立し、各種分光手法による解析を行う。

(2) 極低温下 77 K においてヘム鉄-酸素付加体を γ 線照射して得られる還元化学種について電子スピン共鳴および共鳴ラマン分光により検討し、 Fe^{3+} -ペルオキシもしくは Fe^{2+} -スーパーオキシ種の性質について検討する。

(3) 生体反応を規範とした効率的な酸素活性化反応を人工ヘム錯体において実現すべくプロトン移動を可能にするプロトンメディエーターを導入したヘムモデル錯体を合成し、その反応機構について分光学的な解析を行う。

(4) 核共鳴非弾性散乱分光を用いて、機能性ヘム錯体のヘム鉄の振動ダイナミクスを解析し、構造-反応性の相関について解明する。

4. 研究成果

(1) 反応機構の解析においては、低温下において反応中間体の選択的な生成と捕捉、および、その分光学的解析を行い、分子構造と反応性の相関について洞察を得た。鉄三価-（ヒドロ）ペルオキシ中間体の単離および分光学的解析に成功し、酸素活性化において鍵となる化学種の分子構造の解明に寄与した。

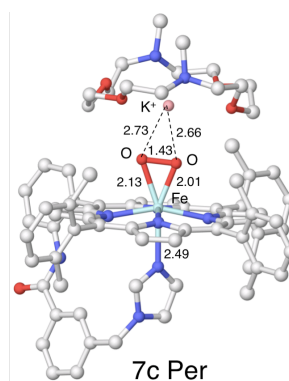


Fig. 1. DFT optimized structure of the high-spin 7c side-on peroxy heme adduct.

(2) 極低温下 77 K においてヘム鉄-酸素付加体を γ 線照射して得られる還元化学種について各種分光法（電子スピン共鳴および共鳴ラマン分光）により検討した。その結果、低極性溶媒中では、鉄二価スーパーオキシ体が生

成するのに対し、高い極性溶媒中においては、鉄三価ペルオキシ体が生成することを明らかにした。ヘムペルオキシ錯体は酸素活性化において鍵となる反応中間体であり、本基礎研究により、酸素活性化酵素反応機構の理解の深化ならびに、燃料電池酸素極触媒の分子設計に重要な知見を与えた。

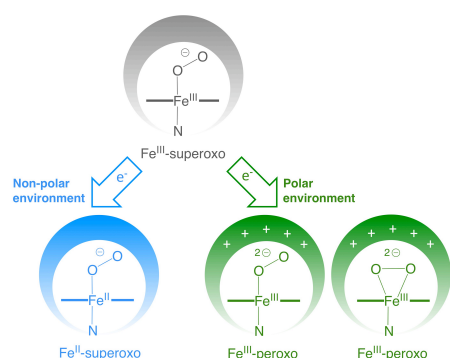


Fig. 2. Environment of heme determines the electronic configuration of heme-O₂ adduct (the {FeO₂}⁹ complex).

(3) 反応機構の解析においては、低温下において反応中間体の選択的な生成と捕捉、および、その分光学的解析を行い、分子構造と反応性の相関について洞察を得た。鉄-(ヒドロ)ペルオキシ中間体の単離および分光学的同定に成功し、酸素活性化において鍵となる化学種の解明に寄与した。また、触媒反応性について電気化学的に解析し、プロトンメディエーターの存在により酸素還元反応が著しく促進されることを明らかにした。これらの成果により、酸素還元を低い過電圧で実現する分子触媒の設計指針について、重要な知見が得られた。

(4) 酸素活性化ヘム錯体の分子構造と反応性の相関について理解を深めるために、核共鳴非弾性散乱分光法と密度汎関数法計算を用いてヘム鉄の振動ダイナミクス構造について解析し、酸素活性化機構に本質的なヘム軸配位子の効果について考察した。軸配位子の配位により、Dead-end種と考えられていた Side-on型ヘム-ペルオキシ種が活性化される分子機構について、ヘムの電子状態およびヘム鉄の振動ダイナミクスの観点から明らかにし、酸素活性化金属酵素の重要な分子構造メカニズムの解明に貢献した。

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 5 件)

- ① T. Ohta, J.-G. Liu, Y. Naruta, “Resonance Raman Characterization of Mononuclear Heme-Peroxo Intermediate Models” *Coord. Chem. Rev.*, (査読有り), 印刷中.
- ② S. M. Ibrahim, H. Nakajima, T. Ohta, K. Ramanathan, N. Takatani, Y. Naruta, Y. Watanabe, “Cytochrome C₅₅₂ from *Thermus thermophilus* Engineered for Facile Substitution of Prosthetic Group” *Biochemistry*, (査読有り), 50, (2011), 9826-9835
- ③ J.-G. Liu, Y. Shimizu, T. Ohta, Y. Naruta, “Formation of an End-On Ferric Peroxo Intermediate upon One-Electron Reduction of a Ferric Superoxo Heme” *J. Am. Chem. Soc.* (査読有り), 132, (2010), 3672-3673.
- ④ J.-G. Liu, T. Ohta, Y. Yamaguchi, T. Ogura, S. Sakamoto, Y. Maeda, Y. Naruta, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読有り), 48, (2009), 9262-9267.
- ⑤ J. J. Reddy, T. Ohta, Y. Naruta, “Synthesis and Characterization of a New Prostaglandin H Synthase Model” *Tetrahedron Letters*, (査読有り), 50 (2009), 3418-3421.

[学会発表] (計 10 件)

- ① T. Ohta, J.-G. Liu, P. Nagaraju, Y. Naruta, “Spectroscopic Insights into the Molecular Mechanism of Dioxygen Activation by Functional Heme Models” 243rd American Chemical Society National Meeting, March/27th/2012, San Diego, USA (Invited talk).
- ② T. Ohta, J.-G. Liu, P. Nagaraju, Y. Naruta, “NRVS and DFT Analyses of Heme-Peroxy Adducts” International Symposium on Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalytic Oxidation, July/8th/2011, Okinawa (Oral presentation).
- ③ T. Ohta, J.-G. Liu, M. Saito, Y. Kobayashi, Y. Yoda, Y. Naruta, M. Seto, “Spectroscopic and Computational Studies of Oxygen-activating Functional Heme Models” The International Symposium on Molecular Systems, Global COE Symposium for Young Researchers, May/11th/2011, Fukuoka (Oral presentation).

presentation).

④ 太田雄大, 劉 勁剛, 依田芳卓, 斎藤真器名, 小林康浩, 瀬戸 誠, 成田吉徳「酸素活性化ヘム酵素モデル錯体の分光学的研究」第44回酸化反応討論会, 2011年11月4日, 大阪, (口頭発表)

⑤ 太田雄大, 劉 勁剛, 依田芳卓, 斎藤真器名, 小林康浩, 瀬戸 誠, 成田吉徳「酸素活性化ヘム酵素モデル錯体の分光学的研究」第61回錯体化学討会, 2011年9月17日, 岡山, (口頭発表)

⑥ 太田雄大, 劉 勁剛, 成田吉徳, 依田芳卓, 斎藤真器名, 小林康浩, 瀬戸 誠「酸素活性化ヘム酵素モデル錯体の振動分光学的研究」日本化学会第91春季年会, 2011年3月29日, 横浜, (口頭発表)

⑦ 太田雄大「酸素活性化ヘム酵素のモデル化学と分光学」第一回統合物質シンポジウム統合創製物質化学の現状と展望, 2010年12月3日, 京都, (口頭発表)

⑧ 太田雄大, 千代健文, 谷文都, 成田吉徳「三座窒素配位子配位銅錯体を有するヘム-銅二核錯体の酸素活性化反応」日本化学会第90春季年会, 2010年3月28日, 大阪, (ポスター発表)

⑨ 太田雄大, 劉 勁剛, 千代健文, 谷文都, 成田吉徳「ヘム-ベルオキノ種の合成と分光学による同定」大学間連携第5回物質合成シンポジウム, 2009年11月19日, 京都, (ポスター発表)

⑩ T. Ohta, T. Chishiro, F. Tani and Y. Naruta, "A novel dioxygen activation by a heme-copper binuclear complex" 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009/07/27, Nagoya, (Poster presentation).

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003730/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 雄大 (OHTA TAKEHIRO)
九州大学・先導物質化学研究所・助教
研究者番号：70509950

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

成田 吉徳 (NARUTA YOSHINORI)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：00108079

劉 勁剛 (LIU JIN-GANG)

九州大学・先導物質化学研究所・特任准教授

研究者番号：70380540