

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550080

研究課題名(和文) マルチ銅酵素モデル錯体の創製と分光学的研究

研究課題名(英文) Synthesis, Reactivity, and Spectroscopic Studies of Multi-copper Enzyme Models

研究代表者

太田 雄大(Ohta, Takehiro)

兵庫県立大学・生命理学研究科・助教

研究者番号：70509950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：高効率に酸素を水分子へ還元するマルチ銅酵素の三核銅活性中心を規範として合理的に分子設計した多核銅錯体および関連する酸素活性化酵素を規範とした金属錯体を合成した。その酸素結合・活性化機構について洞察を得るべく、金属活性中心に酸素が結合した不安定反応中間体の単離を低温有機溶媒中にて行うことに成功し、各種分光学的解析を行った。また、燃料電池酸素極反応の観点から重要な電気化学的酸素還元触媒反応性について検討し、生体金属活性点の構造・反応性相関の解明に向けて貢献した。

研究成果の概要(英文)：New multi-copper enzyme model complexes, and related dioxygen activating enzyme model complexes were synthesized. Dioxygen binding and activation mechanism were studied with characterizing dioxygen binding reaction intermediates using spectroscopic methods. Reactivity of these enzyme model complexes were studied by electrochemical dioxygen reduction reaction. These studies contribute to energy conversion chemistry relating fuel cell system, unrevealing reaction mechanism of dioxygen activating enzymes.

研究分野：生物無機化学

キーワード：生体模倣金属錯体 マルチ銅酵素 酸素活性化

1. 研究開始当初の背景

自然界ではシトクロム c 酸化酵素とマルチ銅酸化酵素が酸素の選択的四電子還元を触媒する。シトクロム c 酸化酵素はヘム鉄-銅の二核金属中心とチロシンを活性中心としてもつことが知られているが、マルチ銅酵素の一種のラッカーセは四つの銅サイト、すなわち電子伝達サイト(タイプ I 銅)と酸素還元を触媒する三核銅サイト(単核タイプ II 銅および複核タイプ III 銅から構築されている)をもち、酸素の選択的四電子還元を触媒することが知られている。

これらの酵素の分子機構の研究は、生化学的な重要性のみならず、低炭素社会構築のために望まれている高効率な燃料電池酸素極触媒の創製の観点から重要である。今日の燃料電池の性能が理論値に達しない主たる原因として白金触媒を用いても鈍い酸素還元反応が挙げられ、卑金属中心での効率的な生体反応について深く理解する試みは、触媒分子設計を正しく導くために必要とされている。したがって、ヘム鉄および多核銅錯体による酸素活性化反応の研究は生体分子科学のみならず、エネルギー変換科学の観点から重要である。

ヘム鉄銅二核中心のモデル酵素錯体の研究はこれまで Collman (Stanford Univ, USA), 成田 (九州大), Karlin (The Johns Hopkins Univ, USA)らによって展開されており、活性中心の構造と反応性の相関について理解が深められている。また、シトクロム c 酸化酵素については、吉川ら (兵庫県立大)らの結晶構造解明を皮切りに (*Science* 1995)、反応機構の理解が深められている。特に Kitagawa (IMS), Babcock (Michigan State Univ, USA), Rousseau (Einstein Medical College, USA)らによる共鳴ラマン分光による研究では、酸素活性化中間体の性質の解明において大きな貢献がなされた。

一方で、ラッカーセを規範として三核の銅イオンに適切な配位構造をもたせかつ、適切な銅イオン間距離に配置し、それらの中心金属間の協同効果により酸素活性化を効率的に行える分子触媒が設計された研究例は希有である。また、ラッカーセ酵素の反応機構の解析においても、分光学および x 線結晶解析から知見が得られているが、鍵となる酸素活性化反応中間体の分子構造について決定的な証拠は得られていない。x 線結晶構造解析により、活性酸素種が結合した反応中間体の分子構造が提案されているが、解析の間に x 線により銅中心が還元されることが最近の研究で明らかにされている (櫻井ら, 錯体化学会第 61 回討論会, 講演番号 21a-16, 岡山)。このような背景から、銅三核錯体による酸素活性化機構の研究、および高選択性を示す銅触媒の創製は、マルチ銅酵素反応機構解明の観点からもチャレンジングな研究課題の一つと考えられていた。

2. 研究の目的

マルチ銅酵素ラッカーセの銅三核活性中心および関連する酸素活性化酵素の活性中心での高効率な酸素還元機構解明および高効率な分子触媒の創製に向けた学際的研究を展開する。低温にて酸素活性化反応を行い反応において鍵となる中間体を捕捉して各種分光学的な解析を行い、詳細な分子構造および電子状態について洞察を得る。得られた知見をもとにさらに精密な配位子分子設計を施し、高選択・高効率な酸素還元触媒を創製し、燃料電池酸素還元触媒としての応用への可能性を探る。

3. 研究の方法

マルチ銅酵素および関連する酸素活性化金属酵素を規範とした生体模倣錯体の分子設計と合成をして、構造、反応性、分光学的特性を明らかにする。さらに、電気化学的酸素還元反応について検討するほか、低温にて反応中間体の捕捉と各種分光学的研究 (電子遷移吸収, 電子スピン共鳴, x 線吸収, 共鳴ラマンなど) を行い、構造と反応性の相関について定義する。選択的な酸素四電子還元の本質的な分子機構を明らかにし、さらなる効率的な分子触媒の創製に向けた配位子分子設計に役立てる。

4. 研究成果

選択的な酸素四電子還元反応を触媒するマルチ銅酵素の銅三核活性中心を規範として合理的に分子設計した新規な銅三核配位子 (Terpy-BPEN2) より銅一価錯体を合成し、酸素との反応性を検討した。-30 °C において銅一価錯体の酸素化反応を行い、吸収スペクトルにて反応過程を解析する中で、新規な反応中間体が生成することを見いだした。

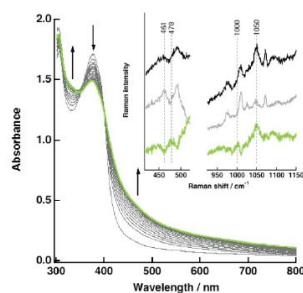


図 1. 反応中間体の吸収スペクトルと共鳴ラマンスペクトル。

この反応中間体について、共鳴ラマン分光法による解析を行ったところ (経時的に生成して分解する反応中間体を液体窒素温度で凍結し捕捉した上で)、銅-酸素 (Cu-O) 結合、酸素 (O-O) 結合の伸縮振動と同定できるラマンバンドの観測に成功した。その結果、酸素分子が多核銅中心に結合し、スーパーオキシに還元されていることを明らかにした。さら

に、X線吸分法により、反応中間体の分子構造と電子状態について解析し、多核銅中心の原子価には1価と2価が含まれていることを明らかにした。本実験からも、多核銅中心に結合した酸素は一電子還元を受けた状態で、スーパーオキシドとして結合していることを示唆する結果が得られた。上記の酸素活性化の反応性に関する研究から、銅-スーパーオキシド種のさらなる還元段階が熱力学的な律速段階であることが示されたが、この結果は、電気化学的触媒反応の解析結果とも一致する。

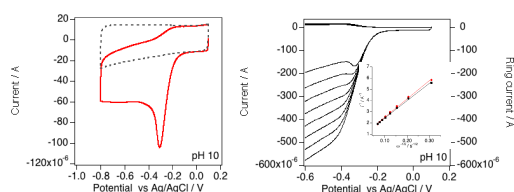


図2. 電気化学的酸素還元触媒反応の解析。

触媒分子を導電性炭素材料に吸着させた触媒インクを調製し電極表面に塗布、乾燥させ電気化学的解析(CVとRRDE電極による酸素還元反応解析)を行った。その反応のpH依存性、およびTafelプロットによる解析からも、銅-スーパーオキシドの還元段階が電気化学的触媒反応の律速段階であることが示唆された。本研究成果は、多核銅の協同的な作用で酸素活性化反応が示された希有な例であり、今後の効率的な分子触媒設計に重要な知見を与えた。

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7件)

太田雄大、瀬戸誠、核共鳴非弾性散乱分光法による鉄含有生体分子の振動構造解析、日本結晶学会誌、査読有、56(5)、2014、pp. 329-335、http://www.crsj.jp/digitalBook/CrSJ-56-05/_SWF_Window.html?pagecode=43

T. Kikunaga, T. Matsumoto, T. Ohta, H. Nakai, Y. Naruta, K.-H. Ahn, Y. Watanabe, S. Ogo, Isolation of a Mn^{IV} Acylperoxo Complex and Its Monooxidation Ability, *Chemical Communications*, 査読有, 49 (75), 2013, pp. 8356-8358, DOI: 10.1039/C3CC43447H

E. Pinakoulaki, V. Daskalakis, T. Ohta, O.-M. H. Richter, K. Budiman, T. Kitagawa, B. Ludwig, C. Varotsis, The Protein Effect in the Structure of Two Ferryl-oxo Intermediates at the Same Oxidation Level in the Heme Copper Binuclear Center of Cytochrome c Oxidase, *Journal of*

Biological Chemistry, 査読有, 288 (28), 2013, pp. 20261-20266, DOI: 10.1074/jbc.M113.468488

K. Park, C. B. Bell III, L. V. Liu, D. Wang, G. Xue, T. Kwak, S. D. Wong, K. M. Light, J. Zhao, E. E. Alp, Y. Yoda, M. Saito, Y. Kobayashi, T. Ohta, M. Seto, L. Que Jr, E. I. Solomon, Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic and Computational Study of High-valent Diiron Complexes Relevant to Enzyme Intermediates, *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, 査読有, 110 (16), 2013, pp. 6275-6280, DOI: 10.1073/pnas.1304238110

J. Nomura, H. Hashimoto, T. Ohta, Y. Hashimoto, K. Wada, Y. Naruta, K. Oinuma, M. Kobayashi, Crystal Structure of Aldoxime Dehydratase and Its Catalytic Mechanism Involved in Carbon-Nitrogen Triple Bond Synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States of America*, 査読有, 110 (8), 2013, pp. 2810-2815, DOI: 10.1073/pnas.1200338110

T. Ohta, J.-G. Liu, Y. Naruta, Resonance Raman Characterization of Mononuclear Heme-Peroxo Intermediate Models, *Coordination Chemistry Reviews*, 査読有, 257 (2), 2013, pp. 407-413, DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.009

T. Ohta, J.-G. Liu, M. Saito, Y. Kobayashi, Y. Yoda, M. Seto, Y. Naruta, Axial Ligand Effects on Vibrational Dynamics of Iron in Heme Carbonyl Studied by Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, 116 (47), 2012, pp. 13831-13838, DOI: 10.1021/jp304398g

[学会発表](計11件)

太田雄大、生体金属活性点のエネルギー変換化学、第45回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 特別討論会(酵素、錯体および触媒をつなぐ化学の新展開)、平成26年11月29-30日、中部大学(愛知県春日井市)

太田雄大、生体エネルギー変換反応の要となる感応性化学種の分光学的研究、新学術領域研究「感応性化学種が拓く新物質科学」第3回公開シンポジウム、平成26年6月16-17日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

T. Ohta, Structure-reactivity Correlation in Oxygen-activating Heme Models, The 8th International Conference

on Porphyrins and Phthalocyanines, June 22nd-27th/2014, Istanbul (Turkey)

太田雄大、成田吉徳、マルチ銅酵素を規範とした新規多核銅錯体の合成と反応性、日本化学会第93春季年会、平成26年3月27-30日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

太田雄大、成田吉徳、マルチ銅酵素を規範とした新規多核銅錯体の合成と反応性、第63回錯体化学討論会、平成25年11月2-4日、琉球大学(沖縄)

P. Nagaraju、太田雄大、成田吉徳、Dioxygen Activation by Heme Enzyme Models And Their Application For Oxygen Reduction Reaction、平成25年3月22-25日、日本化学会第93春季年会、立命館大学(滋賀県草津市)

太田雄大、P. Nagaraju、劉勁剛、成田吉徳、酸素活性化ヘム酵素モデル錯体の反応機構解析、第62回錯体化学討会、平成24年9月21-23日、富山大学(富山市)

P. Nagaraju、J.-G. Liu、太田雄大、A. Maity、成田吉徳、Preparation of Bio-inspired Catalyst for O₂ reduction、日本化学会第92春季年会、平成24年3月25-28日、慶応大学(神奈川県横浜市)

劉勁剛、太田雄大、成田吉徳、化学モデルを用いた末端酸化酵素チトクロムc酸化酵素における酸素活性化機構の解明、日本化学会第92春季年会、平成24年3月25-28日、慶応大学(横浜市)

T. Ohta, P. Nagaraju, J.-G. Liu, Y. Naruta, Mechanistic Studies of Dioxygen Activation by Functional Heme Models, The 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, November 5th -8th/2012, Hong Kong (China)

P. Nagaraju, 劉勁剛, 太田雄大, A. Maity, 成田吉徳, Dioxygen Activation by Heme Enzyme Models and Their Application For Oxygen Reduction Reaction, The 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 1st-6th/2012, Jeju (Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 雄大 (OHTA, Takehiro)
兵庫県立大学・生命理学研究科・特任助教
研究者番号：70509950