

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04116

研究課題名(和文) ニトロゲナーゼ機能モデルとなる金属-硫黄クラスターの創出

研究課題名(英文) Synthesis of Cp^{*}-supported metal-sulfur clusters as functional analogues of the active site of nitrogenase

研究代表者

大木 靖弘 (Ohki, Yasuhiro)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10324394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000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からNH₃への還元反応は、FeMo-cofactorと呼ばれる金属-硫黄クラスターによって触媒されるが、その酵素反応過程はほとんど解明されておらず、また人工の金属-硫黄クラスター分子によるN₂の還元反応も困難を極めている。本研究では、FeMo-cofactorの機能発現に必要な要素を独自に考察して組み込んだ金属-硫黄クラスターとして、Cp^{*}基(C₅Me₅基)をモリブデンに結合させたキューバン型(立方体型)の[Mo₃S₄M]クラスターを設計、合成してN₂等の還元反応を検討し、キューバン型クラスターに取り込んだTiを反応点とするN₂の活性化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、多数の金属原子と硫黄原子を集めた「金属-硫黄クラスター」分子を用いて、N₂を捕捉し還元できることを世界で初めて実証した。この研究をさらに発展させることで、酵素タンパク中で金属-硫黄クラスターがどのようにN₂を捕捉し還元するかを明らかにすることや、酵素のN₂還元機能を人工的に再現することが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Inorganic components consisting of multiple transition metals and sulfur atoms are designated as metal-sulfur clusters, which are essential for various biological functions. The largest biological metal-sulfur cluster thus far structurally identified is the nitrogenase FeMo-cofactor, which catalyzes the reduction of N₂ into NH₃ under physiological conditions. Although various metal-sulfur clusters structurally relevant to FeMo-cofactor have been synthesized over the years, their use in the activation of N₂ has proven challenging to realize, and even the FeMo-cofactor extracted from the protein to organic solvents has not been found to reduce N₂. In this research project, we synthesized a series of Cp^{*} (C₅Me₅)-supported cubic [Mo₃S₄M] clusters, and demonstrated the activation of N₂ and its conversion into NH₃ and N₂H₄ on the [Mo₃S₄Ti] variant. This result represents an initial step toward modeling the reducing function of the FeMo-cofactor.

研究分野：錯体化学、生物無機化学、有機金属化学

キーワード：窒素固定化 ニトロゲナーゼ 金属-硫黄クラスター モリブデン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学的に不活性な N_2 を NH_3 へ還元する窒素固定化反応は、アミノ酸や核酸塩基に含まれる窒素原子を供給し、生命活動を維持する上で必要である。この反応を担う酵素はニトロゲナーゼと呼ばれ、その反応中心は **FeMo-cofactor** と呼ばれる金属-硫黄クラスターである(図1左下)。**FeMo-cofactor** は計8つの金属原子と多数の硫黄原子を含み、その構造は二つのキューバン型(立方体型)クラスターを融合させた形と見なせる。しかし **FeMo-cofactor** の構造が明らかにされてもなお、なぜ N_2 の還元複雑な金属-硫黄クラスターが使われ、何が機能発現の要素なのか、容易には想像できない。本研究代表者らは、ニトロゲナーゼに特有な金属-硫黄クラスターの構造モデル研究分野を先導し、例えば **P-cluster** の骨格再現や、**FeMo-cofactor** の幾何構造を模倣する鉄硫黄クラスターの合成を独自に達成してきた(図1右)。その一方で、一連のモデルクラスターは繊細であり、 N_2 から NH_3 への還元反応に必要なプロトン試剤や還元剤の存在下で分解するため、酵素機能の再現には至っていない。また、**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 N_2 を還元できなくなる。従ってニトロゲナーゼの窒素固定化機能を理解し、人工的に再現するには、タンパク中に保持された **FeMo-cofactor** がなぜ機能するのか考察し、鍵要素を抽出して組み込んだ分子を設計・合成する必要がある。

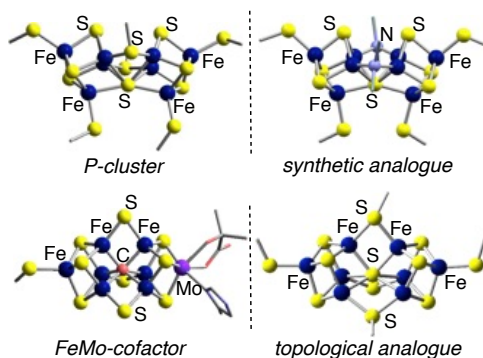


図1: (左)ニトロゲナーゼP-clusterとFeMo-cofactor、(右)代表者らがかつて合成したモデルクラスター

2. 研究の目的

本研究では、**FeMo-cofactor** の機能発現に必要な要素を独自に考察して組み込んだ金属-硫黄クラスターを設計・合成し、金属-硫黄クラスター上で N_2 を NH_3 へ還元する機能を、世界で初めて明確に実現するとともに、酵素反応機構の解明に資する分子レベルの知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

N_2 の活性化を可能にする金属-硫黄クラスターとして、**FeMo-cofactor** の部分構造と見なせ、比較的設計しやすく4つの金属原子を含むキューバン型(立方体型)クラスターを用いることにした。具体的には、まず Cp^* (C_5Me_5) 補助配位子を **Mo** に結合させた三核クラスター $Cp^*_3Mo_3S_4$ を前駆体として用い、これを鋳型として金属原子 **M** を1つ取り込むことで、反応点となる金属が **M** に限定されたキューバン型クラスターを合成することにした。続いて、 N_2 雰囲気下でキューバン型クラスターを還元し、取り込んだ金属 **M** 上に選択的に生じる反応点を用いて、 N_2 を捕捉し活性化することを想定した。

4. 研究成果

(1) 鋳型となるモリブデン三核クラスター $Cp^*_3Mo_3S_4$ の大量合成と、キューバン型 $[Mo_3S_4M]$ クラスターの系統的な合成と同定

本研究では、まず初めに出発錯体である $Cp^*_3Mo_3S_4$ の大量合成法を開発した。既法の反応では Na/Hg が用いられていたが、当該反応はスケールアップすると反応物と Na/Hg の接触効率低下を招くことから、少量の合成反応でしか成立しないことが判明した。そこで別途合成するため、まずカチオン性三核錯体 $[Cp^*_3Mo_3S_4]^+$ を大量かつ簡便に合成する反応・精製条件を確立した。さらにカチオン性三核錯体を KC_8 で一電子還元する反応から、十分な純度の $Cp^*_3Mo_3S_4$ が再現性よく大量に合成できることを確認した。続いて、 $Cp^*_3Mo_3S_4$ を還元剤で処理し、金属ハロゲン化物を作用させる反応から、種々のキューバン型 $[Mo_3S_4M]$ クラスター ($M = Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni$) が生成することを見出した(図2)。また、 $Cp^*_3Mo_3S_4$ の1電子還元体である $[K(18-crown-6)][Cp^*_3Mo_3S_4]$ を合成、単離し、これがキューバン型クラスターの合成前駆体になることを確認した。一連の生成物は常磁性化合物であったため、NMR測定による同定は困難であったが、全てX線構造解析により分子構造を決定した。これらの電気化学的性質を総括するとともに、特に $M = Fe$ のクラ

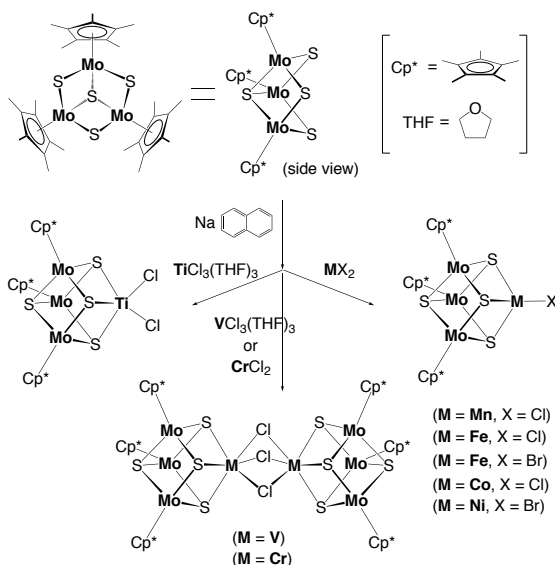


図2: キューバン型 $[Mo_3S_4M]$ クラスターの合成

スターについては、 ^{57}Fe メスバウアー分光測定ならびに DFT 計算に基づく構造最適化とスペクトルのシミュレーションにより、 Fe(II) 中心を含む $S = 1$ 状態が基底状態であることを決定した。また、取り込んだ金属 M とハロゲンの比は 1:2 (Ti) から 1:1.5 (V, Cr)、1:1 (Mn, Fe, Co, Ni) へと段階的に変化し、前周期金属原子が相対的に大きい原子半径と高い酸化状態を取りやすい傾向を反映していた。

Cp^* の代わりに $\text{C}_5\text{Me}_4\text{H}$ 基を補助配位子とするモリブデン三核クラスター ($\text{C}_5\text{Me}_4\text{H})_3\text{Mo}_3\text{S}_4$ を、新たに合成した。 $\text{Cp}^*_3\text{Mo}_3\text{S}_4$ の大量合成法に倣う反応では、標的三核クラスターが低収率でしか得られなかったことから、短工程の反応も新たに開発した。半サンドイッチ型 Mo(V) テトラクロリド錯体に対して硫黄化試剤 Li_2S_2 と還元剤 KC_8 を加えて硫黄原子を導入しつつ余剰の塩素を除去する反応を検討した結果、適切な反応条件下ではカチオン性の三核錯体が中程度の収率で生成することが明らかになった。ただし生成物の種類と選択性は反応試剤の混合比や補助配位子の種類に強く依存し、例えば加える KC_8 を増やすと、キューバン型 (立方体型) の Mo_4 クラスターが主に生成することも明らかになった。さらに短工程の合成法開拓を目指し、比較的解離しやすい H_2O や CH_3CN , THF をモリブデンに配位させた既知化合物 $[\text{Mo}_3\text{S}_4(\text{solv})_9]^{4+}$ を文献記載の手法に従って合成し、これらへの Cp 系補助配位子の導入を検討したが、この反応からは複雑な混合物が生じ、少なくとも嵩高い Cp 系配位子の導入には適していないことが明らかになった。

(2) キューバン型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{Ti}]$ クラスターの Ti を反応点とする N_2 の活性化

Ti を反応点とするキューバン型 (立方体型) 金属-硫黄クラスターを N_2 雰囲気下で還元剤処理すると、2つのキューバン型クラスターを用いて N_2 を捕捉した、 Ti-N=N-Ti 型クラスター (図 3 中) が生成することを見出した。捕捉された N_2 部位の窒素原子間結合は、二重結合と単結合の中間程度まで弱められていることが、分子構造ならびに $^{15}\text{N}_2$ を用いた同位体標識実験と共鳴ラマンスペクトルから明らかになった。生成した Ti-N=N-Ti 型クラスターは反磁性であったことから、NMR スペクトルによる同定も進めた。

Ti-N=N-Ti 型クラスターを過剰量の H_2O と反応させたところ、アンモニア (0.11 eq.) およびヒドラジン (0.68 eq.) が生じた。還元剤 KC_8 を共存させて N-N 結合を切断するための電子を供給するとアンモニアの選択性が上がり、100 当量の KC_8 共存下ではアンモニアの生成量が 1.21 eq. に上昇しヒドラジンは発生しなくなった。これらの反応で生じるアンモニアやヒドラジンが Ti-N=N-Ti 部位に由来することは、 $^{15}\text{N}_2$ を用いた標識実験に基づいて確認した。 Ti-N=N-Ti 型クラスターの 1 電子還元体が、過剰量の KC_8 存在下で生成することから (図 3 下)、 Ti-N=N-Ti 型クラスターを少なくとも 1 電子還元することが、 NH_3 へ変換するために重要であることが示唆された。 NH_3 への変換過程では、プロトン化により Ti 原子が解離する様子が見られ、分解生成物には鋳型として用いたモリブデン三核クラスターが含まれていた。Ti-S の親和性が低い一方で Ti-N (N_2 由来)、Ti-O (H_2O 由来) の親和性が高く、Ti が容易にキューバン型骨格から外れてしまうことが、 N_2 の変換が化学量論反応にとどまっている主因であり、この問題は反応点となる金属元素を前周期金属の Ti から後周期金属に変えることで、解決できると考えている。

本研究で得られた結果は、酵素活性中心を模倣した金属-硫黄クラスター分子による N_2 還元反応を明確に達成した初めての例であり、また機能発現に必要な要素を正しく反映させることで酵素に類似した N_2 活性化が実現できることを示している。本研究の結果を酵素活性中心の構造と機能の関係へフィードバックすると、 FeMo-cofactor を取り込めるタンパク鎖にはプロトン輸送以外の特別な機能はなく、単に N_2 還元機能と関係しない金属を保護しているのではないかと推察できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件) 全て査読あり

- ① Shigeharu Wakabayashi, Natsu Sugiyama, Yasuhiro Ohki, Takahito Itoh, Toshikazu Kitagawa, 3-[4'-(Diethylboryl)phenyl]pyridine: Exclusive Crystallization of Cyclic Tetramer, *Chem. Asian J.*, **14**, 568-573 (2019).
- ② Yasuhiro Ohki, Keisuke Uchida, Ryota Hara, Mami Kachi, Mayu Fujisawa, Mizuki Tada, Yoichi Sakai, W. M. C. Sameera, Cubane-Type $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{M}]$ Clusters with First-Row Group 4-10

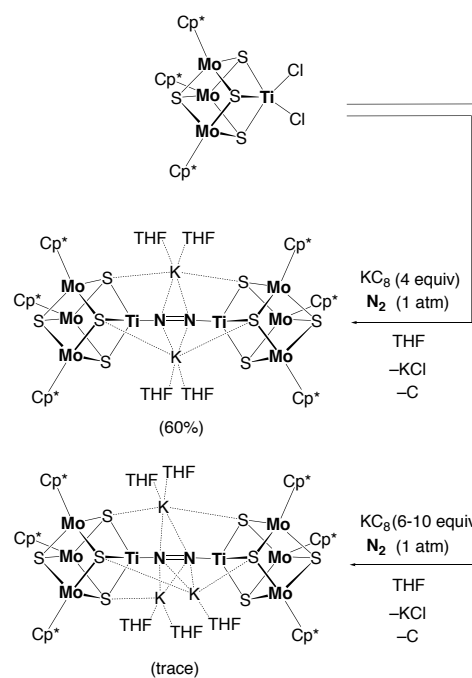


図3: キューバン型 $[\text{Mo}_3\text{S}_4\text{Ti}]$ クラスターによる N_2 の活性化

- Transition-Metal Halides Supported by C_5Me_5 Ligands on Molybdenum, *Chem. Eur. J.*, **24**, 17138-17147 (2018).
- ③ Yasuhiro Ohki, Keisuke Uchida, Mizuki Tada, Roger E. Cramer, Takashi Ogura, Takehiro Ohta, N_2 Activation on a Molybdenum-Titanium-Sulfur Cluster, *Nature Commun.*, **9**, 3200 (2018).
 - ④ Martin T. Stiebritz, Caleb J. Hiller, Nathaniel S. Sickerman, Chi Chung Lee, Kazuki Tanifuji, Yasuhiro Ohki, Yilin Hu, Ambient Conversion of CO_2 to Hydrocarbons by Biogenic and Synthetic $[Fe_4S_4]$ clusters, *Nature Catal.*, **1**, 444-451 (2018).
 - ⑤ Kazuki Tanifuji, Chi Chung Lee, Kazuyuki Tatsumi, Yasuhiro Ohki, Yilin Hu, Markus W. Ribbe, Tracing the ‘Ninth Sulfur’ of the Nitrogenase Cofactor via a Semi-Synthetic Approach, *Nature Chem.*, **10**, 568-572 (2018).
 - ⑥ Yasuhiro Ohki, Yuna Araki, Mizuki Tada, Yoichi Sakai, Synthesis and characterization of bio-inspired $[Mo_2Fe_2]$ hydride clusters and their application to the catalytic silylation of N_2 , *Chem. Eur. J.*, **23**, 13240–13248 (2017).
 - ⑦ Ryoichi Araake, Kazuki Sakadani, Mizuki Tada, Yoichi Sakai, Yasuhiro Ohki, $[Fe_4]$ and $[Fe_6]$ Hydride Clusters Supported by Phosphines: Synthesis, Characterization, and Application in N_2 Reduction, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 5596-5606 (2017).
 - ⑧ Shun Ohta, Yasuhiro Ohki, Impact of Ligands and Media on the Structures and Properties of Biological and Biomimetic Iron-Sulfur Clusters, *Coord. Chem. Rev.* **338**, 207-225 (2017).
 - ⑨ Nathaniel S. Sickerman, Kazuki Tanifuji, Yasuhiro Ohki, Kazuyuki Tatsumi, Markus W. Ribbe, Yilin Hu, High-Efficiency Reduction of C_1 Substrates to Hydrocarbons by the Homometallic Precursor and Synthetic Mimic of the Nitrogenase Cofactor, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 603-606 (2017).
 - ⑩ Yasuhiro Ohki, Yuki Shimizu, Ryoichi Araake, Mizuki Tada, W. M. C. Sameera, Jun-Ichi Ito, Hisao Nishiyama, $Co_6H_8(P^iPr_3)_6$: A Cobalt Octahedron Having Face-Capping Hydrides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 15821-15825 (2016).
 - ⑪ Kazuki Tanifuji, Nathaniel Sickerman, Chi Chung Lee, Takayuki Nagasawa, Kosuke Miyazaki, Yasuhiro Ohki, Kazuyuki Tatsumi, Yilin Hu, Markus W. Ribbe, Structure and reactivity of an asymmetric synthetic mimic of nitrogenase cofactor, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 15633-15636 (2016).
 - ⑫ Yasuhiro Ohki, Ryoko Hoshino, Kazuyuki Tatsumi, N-Heterocyclic Carbene Complexes of Three- and Four-Coordinate Fe(I), *Organometallics*, **35**, 1368-1375 (2016).
 - ⑬ Kazuki Tanifuji, Shunichi Tajima, Yasuhiro Ohki, Kazuyuki Tatsumi, Interconversion Between $[Fe_4S_4]$ and $[Fe_2S_2]$ Clusters Bearing Amide Ligands, *Inorg. Chem.*, **55**, 4512-4518 (2016).
 - ⑭ Takayoshi Hashimoto, Yuko Kawato, Yumiko Nakajima, Yasuhiro Ohki, Kazuyuki Tatsumi, Wataru Ando, Kazuhiko Sato, Shigeru Shimada, Synthesis of Dimethylmanganese(II) Complexes bearing N-Heterocyclic Carbenes and Nucleophilic Substitution Reaction of Tetraalkoxysilanes by Diorganomanganese(II) Complexes, *J. Organomet. Chem.* **820**, 14-19 (2016).

[学会発表] (計 17 件)

- ① Yasuhiro Ohki, Iron-Based Hydride Clusters: Synthesis, Characterization, and Application in the Catalytic N_2 Silylation, International Workshop on New Developments and Prospects for the Future of Mössbauer Spectroscopy (2018.11, Toyota Commemorative Museum of Industry and Technology (Nagoya)), 依頼講演
- ② Yasuhiro Ohki, Synthesis of Iron-Based Hydride Clusters and Their Application in the Catalytic Silylation of N_2 , 2018 Nankai International Symposium on Advanced Materials (2018.11, Nankai Univ. (China)), 依頼講演
- ③ Yasuhiro Ohki, C_5Me_5 (Cp^*)-Supported Metal-Sulfur Clusters for N_2 Activation, The 43rd International Conference on Coordination Chemistry (2018.7-8, Sendai), 依頼講演
- ④ Yasuhiro Ohki, Molecular Metal-Chalcogenides for Bio-inspired Nitrogen Activation, The 15th International Symposium on Inorganic Ring Systems (IRIS-15) (2018.6, Kyoto Univ.), 依頼講演
- ⑤ Yasuhiro Ohki, Cubic $[Mo_3S_4M]$ Clusters with First-Row Transition Metals for Bio-inspired N_2 Activation, The 3rd Japan-UK Joint Symposium on Coordination Chemistry (2018.4-5, Univ. St. Andrews (UK)), 依頼講演
- ⑥ Yasuhiro Ohki, Bio-inspired $[Mo_2Fe_2]$ Hydride Clusters: Synthesis and Application in the Catalytic Silylation of N_2 , International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) 2018 (2018.3, Siem Reap (Cambodia)), 依頼講演
- ⑦ Yasuhiro Ohki, $[Fe_4]$ and $[Fe_6]$ Hydride Clusters as Catalyst Precursors for N_2 Silylation, The 2nd Base Metal Catalysis Symposium ~After Discussion~ (2018.1, Kagoshima), 依頼講演
- ⑧ Yasuhiro Ohki, Synthesis of Hydride-Supported $[Fe_4]$ and $[Fe_6]$ Clusters and Their Application in the Catalytic N_2 Silylation, The 11th Japan-China Symposium on Cluster Science (2017.10, Nagoya Univ.), 依頼講演
- ⑨ Yasuhiro Ohki, Bio-inspired Transition Metal Cluster Molecules: Synthesis and Application in N_2 Transformation, Telluride Science Research Center workshop on “Control of Proton and Electron

- Transfers in Redox Catalysis” (2017.8, Telluride, Colorado (USA)), 依頼講演
- ⑩ Yasuhiro Ohki, Fe₄ and Fe₆ Hydride Clusters Supported by Phosphines: Synthesis, Characterization, and Application in the Conversion of N₂, International Symposium on Pure & Applied Chemistry (ISPAC) 2017 (2017.6, Ho Chi Minh (Vietnam)), Keynote Lecture
 - ⑪ 大木靖弘, 鉄系ヒドリドクラスター分子の創製と触媒的 N₂ 還元反応, 京都大学化学研究所セミナー (2017.3.13, 京都大学)
 - ⑫ 大木靖弘, 窒素固定化酵素ニトロゲナーゼの機能に学ぶ分子性クラスターの創製, 錯体化学若手の会北陸支部勉強会 (2016.12, 金沢大学), 依頼講演
 - ⑬ 大木靖弘, 化学の視点からニトロゲナーゼ活性中心の機能を考察し模倣する, 第 3 回エネルギー物質創成のための触媒科学技術研究会 (2016.11, 名古屋工業大学)
 - ⑭ 大木靖弘, ニトロゲナーゼの酵素機能に学ぶ金属クラスター化合物の合成, 近畿大学応用化学セミナー (2016.11, 近畿大学)
 - ⑮ 大木靖弘, ニトロゲナーゼの機能モデルを志向した金属-硫黄クラスター, 日本化学会青森地区講演会 (2016.10, 弘前大学), 依頼講演
 - ⑯ Yasuhiro Ohki, Synthesis, Structures, and Reactivities of Iron and Cobalt Hydride Clusters Supported by Phosphines, Pre-ICMM 2016 in Nagoya (2016.9, 名古屋大学), 依頼講演
 - ⑰ Yasuhiro Ohki, Toward Functional Mimics of Nitrogenase: Synthesis, Structures, and Reactivities of New Molecular Metal-Sulfur Clusters, International Symposium on Pure & Applied Chemistry (ISPAC) 2016 (2016.8, Kuching (Malaysia)), 依頼講演

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kazuki Tanifuji, Yasuhiro Ohki, Chemical Synthesis of an Asymmetric Mo-Fe-S Mimic of Nitrogenase Active Site, *Methods Mol. Biol.*, **1876**, 229-244 (2019).

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<https://inorg.chem.nagoya-u.ac.jp/members/ohki/ohki-j-frame.html>

6. 研究組織

研究分担者、協力者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。