

亜硝酸還元酵素活性中心モデル錯体の構造化学 (4) —CubpaBzNO₂ 錯体のX線結晶構造解析

甲斐 泰、寺西春佳、山口和也、野尻正樹、鈴木晋一郎

Structural Chemistry of the Model Complexes for the Active Center in Nitrite Reductase — X-ray Structural Studies on CuR₂bpaEtNO₂ (R = H, Me) Complexes

Yasushi Kai*, Haruka Teranishi*, Kazuya Yamaguchi**, Masaki Nojiri**,
Shinnichiro Suzuki**

The crystal structure of a model complex for the active center in nitrite reductase, [Cu(II)(bis(2-pyridylmethyl-6-R)ethylamine)NO₂ (R = H, Me) complexes have been determined by X-ray diffraction method at -160 degrees centigrade. Two complexes have the different substituent in the positions next to the nitrogen of pyridine moiety in bis(2-pyridylmethyl)amine (bpa) ligand. The substituent is hydrogen in complex 1, and methyl group in complex 2. The difference in these substituents about the bulkiness and the electrostatic property resulted in the different coordination geometries around the central copper atoms. In complex 1, copper atom is coordinated by three nitrogen atoms in bpa ligand, two oxygen atoms in nitrite ion, and one oxygen of ClO₄⁻ ion. In complex 2, ClO₄⁻ ion is replaced by the crystallization water. Another big difference between the complexes is the reverse geometry of N2 atom in bpa ligand. The nitrite ion is concluded to take an asymmetric chelate coordination in both complexes.

1. はじめに

大気中の窒素は、アンモニア (NH₃)、硝酸塩 (M^INO₃)、亜硝酸塩 (M^INO₂) などに変換されて土壌や海中に固定される。土壌中に固定された窒素は、植物によって有機物に変えられ、動物がそれを捕食し、再び土壌に帰る。それを細菌などが分解し、窒素ガスを脱離して、大気中に放出する。土壌中での脱窒素過程を図1に示した。硝酸が還元され窒素ガスとして大気中に放出されるまで、何段階もの反応を経ることになるが、このうち、亜硝酸を還元して一酸化窒素に変える反応を触媒する酵素が亜硝酸還元酵素 (Nitrite Reductase, NIR) である。

* 環境・生命未来工学科

**大阪大学大学院理学研究科化学専攻

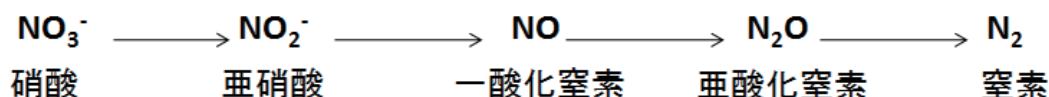


図1 脱窒素過程

NIR の構造と機能に関する研究は、大阪大学大学院工学研究科甲斐 泰研究室と大阪大学大学院理学研究科鈴木晋一郎研究室の間で協力して進められ、2005 年にその三次元構造が明らかとなった¹⁾。我々が構造解析した C1 資化性脱窒菌、*Hyphomicrobium denitrificans* 由来の NIR (HdNIR) は 6 量体構造をとっている。各サブユニット中にはタイプ I 銅 2 個とタイプ II 銅 1 個が含まれており、タイプ I 銅の 1 個は電子受容サイト、タイプ II 銅は亜硝酸イオンの反応サイトと考えられている。残る 1 個のタイプ I 銅は、6 量体形成に関与していることが明らかとなった。

NIR の立体構造が解析され、電子受容サイトと亜硝酸還元サイトの特定およびそれらの相対的な位置関係が明らかとなって、酵素反応の概要が解明された。また、NIR に反応基質である亜硝酸イオンが配位した分子構造も報告されているが、今後さらに分解能を高めた研究によって、亜硝酸還元サイトの詳細な分子機構を明らかにする必要がある。

2. 実験

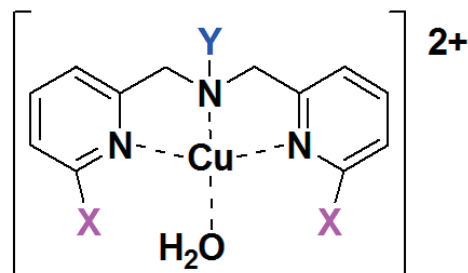
1) モデル錯体の合成

鈴木、山口らによって、NIR のタイプ II 銅活性中心のモデル錯体が合成された。タイプ II 銅は、3 つのヒスチジンと 1 個の水が歪んだ四面体型に配位した構造を取っている。そこで、bis(2-pyridylmethyl)amine (bpa と省略) を基本骨格とする種々の配位子を合成した (スキーム 1)。ここで、X は H か CH₃、Y は H、

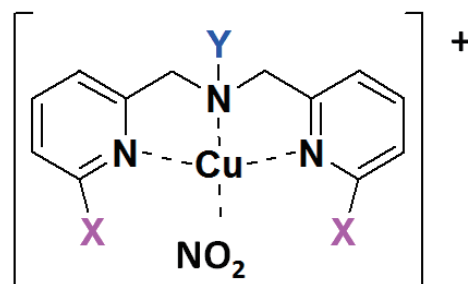
ethyl、benzyl、phenylethyl などである。これらの錯体に NaNO₂ を反応させることによって、亜硝酸イオン (NO₂⁻) が水に置き換わって配位した錯体についても単離、結晶化、構造解析を行った^{2)・4)}。

2) X線結晶構造解析

X線回折実験は、福井工業大学産学共同研究センターに設置されているイメージングプレート 2 次元回折計 (株式会社リガク製、RAPID-S) を用いて行った。25℃の室温及び -160℃の低温で測定を行ったが、低温測定データの解析精度の方が高いため、ここでは低温測定のデータ



スキーム 1 NIR 活性中心モデル錯体



スキーム 2 構造解析した分子錯体 1; X = H、Y = ethyl、錯体 2; X = methyl、Y = ethyl

を用いた議論を行う。

構造解析した錯体は、スキーム 2 で示した錯体の中、
X = H、Y = ethyl の錯体 **1** と、X = methyl、Y = ethyl
の錯体 **2** である。カウンターイオンは ClO₄⁻ である。

錯体 **1** の単結晶は暗青色の板状であるが、0.20
x 0.20 x 0.20 mm に整形した結晶を用いて、X 線回折
実験を行った。

結晶学的データを Table 1 に示す。錯体 **1** は三斜晶系、
空間群 P $\bar{1}$ で、単位格子中に含まれる分子の数 (*Z*) は 2
であり、分子 1 個が結晶学的に独立となる。

回折強度測定の結果を Table 2 に示す。グラフィート
モノクロメータで単色化した MoK α 線を用い、イメージ
ングプレートを検出器として、1 フレーム当たりの振動
角を 5° とし、合計 44 フレームの回折強度を測定
した。回折角の最大値 2 θ_{\max} は 55° である。全測定
反射数は 8,180、独立反射数は 3,848 であった。

構造解析と精密化について Table 3 に示す。
構造解析は、Rigaku Crystal Structure System
を用いて行った。構造解析は重原子法プログラム
PATY を用い、フルマトリックス最少二乗法に
より精密化した。水素原子以外の原子は異方性
温度因子で、水素原子は等方性温度因子で、また
水素原子の位置は幾何学的位置に束縛して精密
化したところ、最終の信頼度因子は、R = 0.0311、
R_w = 0.0369 となり、十分な精度の構造が得られ
た。

錯体 **2** の単結晶も **1** 同様暗青色の板状であるが、
0.30 x 0.30 x 0.40 mm の結晶を用いて、X 線
回折実験を行った。

錯体 **2** の結晶学的データを Table 4 に示す。
錯体 **2** は斜方晶系、空間群 P2₁2₁2 で、単位格子
中に含まれる分子の数 (*Z*) は 4 であり、分子
1 個が結晶学的に独立となる。錯体 **2** の回折強度
測定、構造解析・精密化は錯体 **1** と同様に、
全測定反射数は 19,186、独立反射数は 4,655、

Table 1. Crystal Data of **1**,
CubpaEtNO₂

Formula; C₁₄H₁₇O₆N₄Cl₁Cu₁
F.W. = 436.31
Crystal System ; triclinic
Space Group; P $\bar{1}$
Temperature; -160 °C
a = 8.2796(8) Å
b = 9.0039(9)
c = 11.8922(12)
 α = 95.890(2) °
 β = 95.455(3)
 γ = 104.321(3)
V = 851.08(15) Å³
Z = 2
*D*_c = 1.702 g cm⁻³

Table 2. Data Measurement of complex **1**

RIGAKU RAXIS-RAPID
MoK α ; λ =0.7107 Å
graphite monochromated
Oscillation method
Data images; 44 exposures
Oscillation angle; 5° /exposure
2 θ_{\max} ; 55.0°
No. of reflections measured; 8,180
No. of unique reflections; 3,848

Table 3. Structure Determination
and Refinement of complex **1**

Rigaku Crystal Structure System V.3.8.2
Heavy atom Method; PATY program
Full-matrix least-squares on *F*
Function Minimized; $\Sigma w(|F_o| - |F_c|)^2$
Least-squares Weights; 1/ $\sigma^2(F_o)$
No. of Observations (*I* > 2.00 $\sigma(I)$); 7,156
No. of Variables; 308
Reflection / Parameter Ratio; 23.23
R¹(*I* > 2.00 $\sigma(I)$); 0.0311
R_w²(*I* > 2.00 $\sigma(I)$); 0.0369
Goodness of Fit Indicator; 4.504

$$^1) R = \Sigma (|F_o| - |F_c|) / \Sigma |F_o|$$

$$^2) R_w = [\Sigma w (|F_o| - |F_c|)^2 / \Sigma w F_o^2]^{1/2}$$

最終の信頼度因子は、 $R = 0.0586$ 、 $R_w = 0.0762$ となった。この構造についても十分な精度が得られたと判断できる。

3. 結果と考察

1) 銅の配位構造

錯体 **1** および **2** の分子構造および主な結合距離、結合角を図 2 および図 3 に示す。

いずれの錯体においても、bpa 配位子の 3 つの N 原子と亜硝酸イオン (NO_2^-) の 1 つの O 原子が銅原子に配位して、ほぼ平面 4 配位構造を形成し、その上下から亜硝酸イオンのもう一方の O 原子と ClO_4^- イオンの 1 つの O 原子あるいは結晶水が配位しており、銅は歪んだ 6 配位構造をとっている。

Table 4. Crystal Data of **2**, $\text{CuMe}_2\text{bpaEtNO}_2$

Formula; $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_4\text{Cl}_1\text{Cu}_1$

F.W. = 464.36

Crystal System; orthorhombic

Space Group; $P2_12_12$

Temperature; -160°C

$a = 14.6695(9) \text{ \AA}$

$b = 14.9891(10)$

$c = 9.3178(5)$

$V = 2048.8(2) \text{ \AA}^3$

$Z = 4$

$D_c = 1.505 \text{ g cm}^{-3}$

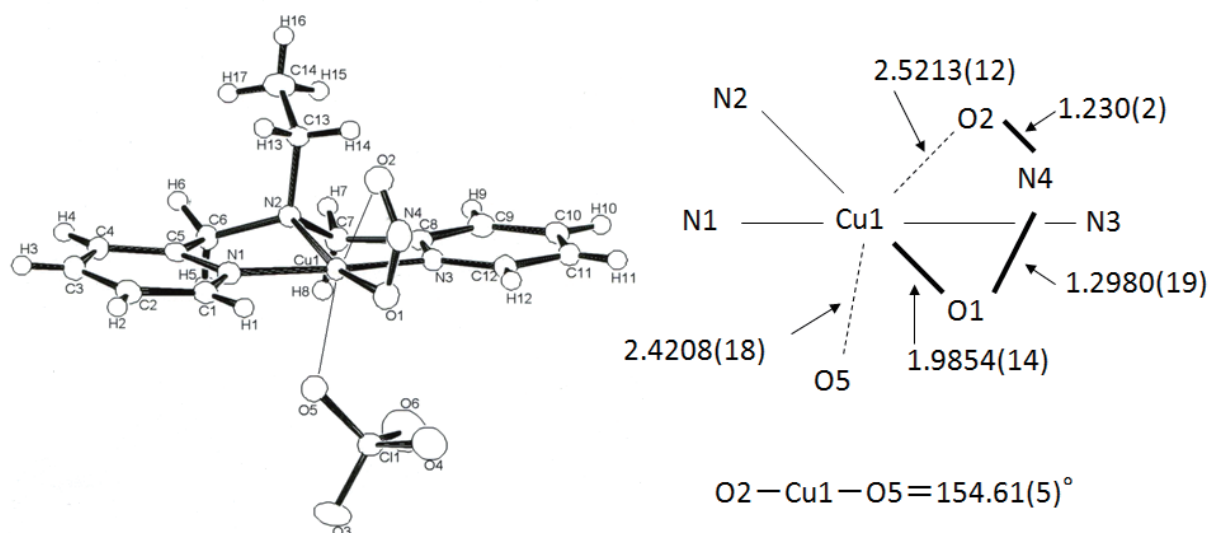


図 2 錯体 **1** の分子構造および主な結合距離・結合角

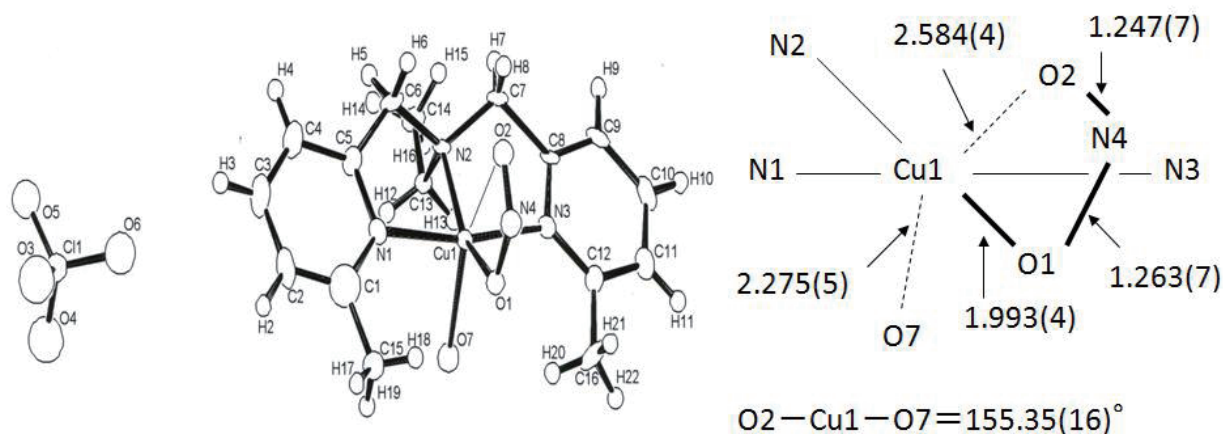


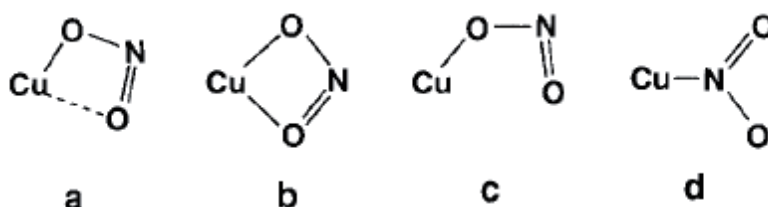
図 3 錯体 **2** の分子構造および主な結合距離・結合角

2) メチル置換基の効果

錯体 **1** と **2** の分子構造の最も大きな違いは、bpa 配位子の N2 のステレオが逆になっていることである。N2 原子は、sp³ 混成軌道の 1 軌道が非共有電子対で満たされ、銅原子へ配位するため、ピラミッド型構造となり、不整構造となる。図 1 と 2 の比較から明らかな通り、N2 の ethyl 置換基は、基準となる平面 4 配位構造に対して、錯体 **1** では亜硝酸イオンの O2 原子と同じ側、錯体 **2** では逆側になっている。しかも、錯体 **1** では、O2 の逆側の配位座は ClO₄⁻ の 1 つの酸素で占められているのに対し、錯体 **2** では、結晶水が配位しており、ClO₄⁻ イオンと銅原子間に直接の相互作用は見られない。これらのことから、pyridyl 基の 6 位の methyl 基の立体的効果が考えられる。錯体 **1** の pyridyl 基の 6 位に methyl 基を導入することによって、N2 のステレオの逆転を引き起こし、また 6 番目の配位座への ClO₄⁻ イオンの配位を困難にしたことにより、結晶水がそれに置き換わったのではないかと考えられる。

3) 亜硝酸イオン (NO₂⁻) の配位構造

この分子構造中最も重要な構造情報は、亜硝酸イオン (NO₂⁻) の中心金属 Cu への配位構造である。亜硝酸イオンの Cu への配位構造としては、スキーム 3 に示すような様式が考えられる。様式 a はキレート配位ではあるが一方の Cu–O 相互作用が弱い場合（非対称キレート配位）であり、様式 b は 2 つの Cu–O 相互作用が等しく有意な場合（対称キレート配位）、様式 c は一方の O 原子のみが Cu に配位しもう一方の O 原子は Cu と相互作用しない場合 (endo-on 型配位)、様式 d は中央の N 原子が Cu と配位結合する場合である。



スキーム 3 亜硝酸イオンの Cu への配位様式

実際の分子構造を見ると、Cu1–O1 = 1.9854(14) Å (錯体 **1**)、1.993(4) Å (錯体 **2**) が通常の Cu–O 配位結合距離であるのに対し (Cu–O; 1.94, 2.07, 2.28 Å in [Cu(H₂O)₆]²⁺(s))、Cu1–O2 = 2.5213(12) Å (錯体 **1**)、2.584(4) Å (錯体 **2**) は非常に長くなっており、O2 原子と Cu1 原子の間の原子間相互作用は非常に弱いと言える。これは、亜硝酸イオンが銅の 6 配位構造の 2 つの配位座を占めるには小さすぎることによるが、この場合は、bpa 配位子と同一平面にある Cu–O 結合が優先されることを示している。銅の 6 配位構造からの歪みは、結合角 O2–Cu1–O5 = 154.61(5)° および、O2–Cu1–O7 = 155.35(16)° に反映されている。

一方、O1–N4 = 1.2980(19) Å (錯体 **1**)、1.263(7) Å (錯体 **2**) に比べ O2–N4 = 1.230(2) Å (錯体 **1**)、1.247(7) Å (錯体 **2**) 結合は短く、通常の二重結合とみなすことができる。(N–O; 1.240(3) in NO₂⁻, 1.20 Å in NO₂(g))。このことから、NO₂⁻ の Cu への配位構造は様式 b, c では

なく様式 **a** の非対称キレート配位と考えられる。すでに報告した、**CubpaBzNO₂** 錯体では、2 量体分子が形成されることから、錯体 **1**、**2** の Cu1–O2 結合に相当する結合が 2.698(3) および 2.861(3) とさらに長くなり、銅と O2 との相互作用が非常に弱くなることから、様式 **c** の endo-on 配位構造をとると考えられる。⁴⁾

4. 結論

亜硝酸還元酵素 (Nitrite Reductase) の活性中心に基質亜硝酸イオン (NO_2^-) が配位した構造を検討するため、活性中心モデル錯体 [copper(II)(bis(2-pyridylmethyl-6-R)ethylamine)-nitrite] ClO_4 ($\text{R} = \text{H, methyl}$) の X 線結晶構造解析を -160°C の低温条件下で行った。その結果、methyl 基の立体的な効果により N2 原子のステレオが逆転すること、および 6 番目の配位座の ClO_4^- イオンが結晶水に置き換わることを見出した。基質亜硝酸イオンは様式 **a** の配位構造、つまり亜硝酸イオンの 2 つの O 原子のうち一方が Cu に通常の配位をし、他方の O 原子が Cu 原子に弱く相互作用する非対称キレート配位構造を取ることが明らかとなった。

文献

- 1) Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase., Masaki Nojiri, Yong Xie, Tsuyoshi Inoue, Takahiko Yamamoto, Hiroyoshi Matsumura, Kunishige Kataoka, Deligeer, Kazuya Yamaguchi, Yasushi Kai, and Shinnichiro Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 4315-4320 (2007).
- 2) Cu^{I} and Cu^{II} complexes containing nitrite and tridentate aromatic amine ligand as models for the substrate-binding type-2 Cu site of jnitrite reductase, Hiroshi Yokoyama, Kazuya Yamaguchi, Manabu Sugimoto, and Shinnichiro Suzuki, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 1435–1441.
- 3) 亜硝酸還元酵素活性中心モデル錯体の構造化学 (1) – **CubpaNO₂** 錯体の X 線結晶構造解析 甲斐 泰、青木将和、山口和也、野尻正樹、鈴木晋一郎、福井工業大学研究紀要、39 号、271-278 (2009) .
- 4) 亜硝酸還元酵素活性中心モデル錯体の構造化学 (2) **CubpaBzNO₂** 錯体の X 線結晶構造解析 甲斐 泰、有澤宏章、山口和也、野尻正樹、鈴木晋一郎、福井工業大学研究紀要、39 号、279-286 (2009) .

(平成 22 年 3 月 31 日受理)