

## 亜硝酸還元酵素活性中心モデル錯体の構造化学 (3) —CubpaPheEtR (R=H<sub>2</sub>O, NO<sub>2</sub>) 錯体の X 線結晶構造解析

甲斐 泰、近江一恵、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 CubpaPheEtR(R=H<sub>2</sub>O, NO<sub>2</sub>) Complexes

Yasushi Kai\*, Kazue Ohmi\*, Kazuya Yamaguchi\*\*, Masaki Nojiri\*\*,  
Shinnichiro Suzuki\*\*

The crystal structure of the model complexes for the active center in nitrite reductase, Cu(II)(bis(2-pyridylmethyl)amine)PhEtR (complex 1; R=H<sub>2</sub>O, complex 2; R=NO<sub>2</sub>), have been determined by X-ray diffraction method at -160 degrees centigrade. The complex 1 has an H<sub>2</sub>O and two ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> ions in the crystal structure. The molecular structure of the complex 1 gives the original structure of this series of complexes before NO<sub>2</sub> coordination to the copper atom. The Cu-O1(H<sub>2</sub>O) bond distance is 1.970(6) Å, which is the normal coordination bond distance of Cu-O. The complex 2 gives the 6-coordination copper atom with three sites occupied by bpa ligand, two by NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ion, and one by ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> ion. Even though both oxygen atoms in nitrite ion are bonding to copper atom, the bond distances are quite different, Cu-O1 = 1.962(2) and Cu-O2 = 2.544(3) Å. Based on these distances, the nitrite ion is resulted to take an asymmetrical chelate coordination with distinct bond distances.

#### 1. はじめに

生命の維持に必須の元素はすべて、生物を取り巻く自然界の中でたえず循環し活用されている。とりわけ重要な炭素、酸素、窒素などは、大気、生物、地層や海洋の間を大きく循環しており、その過程の多くに生物が関与している。

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。

---

\* 環境生命化学科

\*\*大阪大学大学院理学研究科化学専攻

---

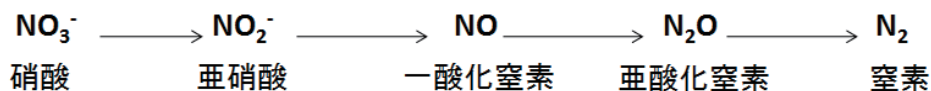


図 1 自然界における脱窒素過程

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(図 3) <sup>1)</sup>。従来知られていた NIR は 3 量体であるが、我々が構造解析した C1 資化性脱窒菌、*Hyphomicrobium denitrificans* 由来の NIR (HdNIR) は、3 量体がさらに 2 量体になった 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 個が含まれている。一般に、タイプ I 銅は電子伝達タンパク質から電子を受け取る役割を担い、2 個のヒスチジン、システイン、メチオニンの 4 つのアミノ酸残基が銅に歪んだ四面体型で配位しており、鮮やかな青色を呈する。一方、タイプ II 銅は、3 個のヒスチジンが配位し、残る 1 個の配位座が基質分子の占める配位座となることが考えられる。HdNIR においても、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。

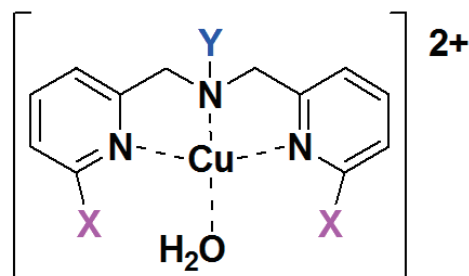
NIR の立体構造が解析され、電子受容サイトと亜硝酸還元サイトの特定およびそれらの相対的な位置関係が明らかとなって、酵素反応の概要が解明された。また、NIR に反応基質である亜硝酸イオンが配位した分子構造も報告されているが、今後さらに分解能を高めた研究によって、亜硝酸還元サイトの詳細な分子機構を明らかにする必要がある <sup>2)-4)</sup>。

## 2. 実験

### 1) モデル錯体の合成

酵素の分子機構を解明するための研究手法の 1 つに、活性中心モデル錯体に関する研究が知られている。酵素の活性中心によく似た錯体を合成し、それを活性中心モデルとして、詳細な研究を試みるものである。勿論、モデル錯体としての限界はあるが、その代わり、酵素を直接研究対象としないことによる実験上の利点も多く、また酵素の研究では得られない高い構造分解能が期待できる。

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。それに模すために、bis(2-pyridylmethyl)-amine (bpa と省略) を基本骨格とする種々の配位子が合成された。ここで、X は H か CH<sub>3</sub>、Y は H、ethyl、benzyphenylethyl などである。これらの錯体に



スキーム 1 錯体 1; X = H、  
Y = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

$\text{NaNO}_2$ を反応させることによって、亜硝酸イオンが水に置き換わって配位する。これはちょうど、亜硝酸還元酵素の安定型が水を配位しているのに対し、亜硝酸イオンが水に置き変わって配位することにより、酵素－基質複合体が形成されることに対応している。

本研究でX線結晶構造解析した錯体は、錯体 **1** ;  $\text{X}=\text{H}$ 、 $\text{Y}=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (PheEt と省略) および錯体 **1** の水に置き換わって亜硝酸イオン( $\text{NO}_2^-$ )が配位した錯体 **2** である。

## 2) X線結晶構造解析

錯体 **1** および **2** の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、ここでは低温測定の結果を用いた議論を行う。

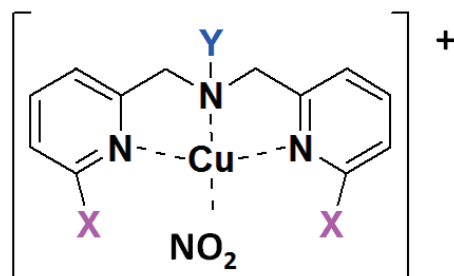
構造解析した錯体は、スキーム1で示した錯体で、 $\text{X}=\text{Y}=\text{H}$ の錯体 **1** と、錯体 **1** に亜硝酸イオン  $\text{NO}_2^-$ を配位させた錯体 **2** で、カウンターイオンはいずれも  $\text{ClO}_4^-$ である。

錯体 **1** の単結晶は暗青色の板状であるが、0.20 x 0.2 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。

錯体 **1** の結晶学的データを Table 1 に示す。構造解析の結果、銅の第4配位座には水分子が配位していることが明らかとなった。その結果、錯体のカウンターアニオンである  $\text{ClO}_4^-$ イオンは1分子当たり2個含まれることになる。単斜晶系、空間群 Cc で、単位格子中に含まれる分子の数 ( $Z$ ) は4であり、1分子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  $\text{MoK}\alpha$  線を用い、イメージングプレートを検出器として、振動写真法で回折強度測定を行った。1フレーム当たりの振動角を  $5^\circ$  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  $2\theta_{\text{max}}$  は  $55^\circ$  である。全測定反射数は11,860、独立反射数は5,612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 PATTY 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、最終の信頼度



スキーム2 錯体 **2** ; 錯体 **1** の水分子に  $\text{NO}_2^-$ が置き換わって配位した分

Table 1. Crystal Data of **1**, CubpaPheEtH<sub>2</sub>O

Formula;	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_9\text{N}_3\text{Cl}_2\text{Cu}_1$
F.W. =	583.84
Crystal System ;	monoclinic
Space Group;	Cc
Temperature;	-145 °C
$a =$	19.668(2) Å
$b =$	9.7939(10)
$c =$	13.2346(14)
$\beta =$	95.684(2)°
$V =$	2536.8(5) Å <sup>3</sup>
$Z =$	4
$D_c =$	1.528 g cm <sup>-3</sup>

因子は、 $R = 0.1051$ 、 $R_w = 0.1140$  となった。

カウンターアニオンの  $\text{ClO}_4^-$  は、球形の分子形態をしていることから、結晶格子中の熱振動が大きく、一般に  $R$  値を下げるための障害となるが、この構造解析に置いても同様であり、 $-160^\circ\text{C}$  の低温測定によっても、その傾向はあまり改善されなかった。

錯体 **2** の単結晶も暗青色の板状であるが、 $0.20 \times 0.3 \times 0.30 \text{ mm}$  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。単斜晶系、空間群  $\text{P}2_1/\text{n}$  で、単位格子中に含まれる分子の数 ( $Z$ ) は 4 であり、1 分子が結晶学的に独立となる。X 線回折実験は錯体 **1** と同様に行い、測定反射数 20,923、独立反射数は 5,067 であった。構造解析、精密化も錯体 **1** と同様に行い、 $R = 0.0594$ 、 $R_w = 0.0616$  となり、この錯体については、十分な精度の解析結果となった。

### 3. 結果と考察

#### 1) 銅の配位構造

得られた錯体 **1** の分子構造を図 2 に、主な結合距離を Table 5 に示す。

中心の Cu 原子は 2 価であるので、カウンターアニオンの電荷が合計  $2^-$  になる必要がある。錯体 **1** は亜硝酸イオンを配位していないため、カウンターアニオンの  $\text{ClO}_4^-$  が 2 個 1 分子中に含まれることになる。結晶構造を解析したところ銅原子には bpa 配位子の 3 つの N 原子と同じ平面内には水分子の酸素が見出された。また、1 個の  $\text{ClO}_4^-$  が銅に弱く相互作用しているが、もう 1 個の  $\text{ClO}_4^-$  は銅と直接の相互作用をしていないことが明らかとなった。銅と水の酸素の配位結合距離は  $1.970(6) \text{ \AA}$  で通常の配位結合であるが、 $\text{ClO}_4^-$  の O2 と銅の距離は  $2.596(14) \text{ \AA}$  と非常に長くなっている。

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

RIGAKU RAXIS-RAPID  
MoK $\alpha$ ;  $\lambda=0.7107 \text{ \AA}$   
graphite monochromated  
Oscillation method  
Data images; 44 exposures  
Oscillation angle;  $5^\circ$  /exposure  
 $2\theta_{\text{max}}$ ;  $55.0^\circ$   
No. of reflections measured; 11,860  
No. of unique reflections; 5,612

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

Rigaku Crystal Structure System V.3.8.2  
Heavy atom Method; PATTY program  
Full-matrix least-squares on F  
Function Minimized;  $\sum w(|F_o| - |F_c|)^2$   
Least-squares Weights;  $1/\sigma^2(F_o)$   
No. of Observations ( $I > 2.00\sigma(I)$ ); 8,628  
No. of Variables; 299  
Reflection / Parameter Ratio; 28.86  
 $R^1(I > 2.00\sigma(I))$ ; 0.1051  
 $R_w^2(I > 2.00\sigma(I))$ ; 0.1140  
Goodness of Fit Indicator; 5.232

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

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

Table 4. Crystal Data of **2**, CubpaPheEtNO<sub>2</sub>

Formula;  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_4\text{Cl}_1\text{Cu}_1$   
 $F.W. = 512.41$   
Crystal System; monoclinic  
Space Group;  $\text{P}2_1/\text{n}$   
Temperature;  $-160^\circ\text{C}$   
 $a = 9.0822(7) \text{ \AA}$   
 $b = 18.6349(14)$   
 $c = 13.6242(12)$   
 $\beta = 105.892(2)^\circ$   
 $V = 2217.7(3) \text{ \AA}^3$   
 $Z = 4$   
 $D_c = 1.535 \text{ g cm}^{-3}$

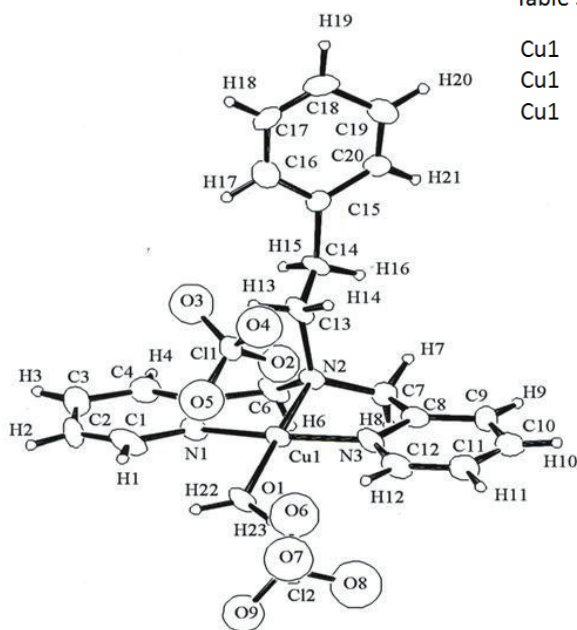


図2 錯体1の分子構造

Table 5. Important Interatomic Bond Distances (Å) of Complex 1

Cu1 - O1	1.970(6)	Cu1 - N1	1.930(8)
Cu1 - N2	2.038(7)	Cu1 - N3	1.921(9)
Cu1 - O2	2.596(14)		

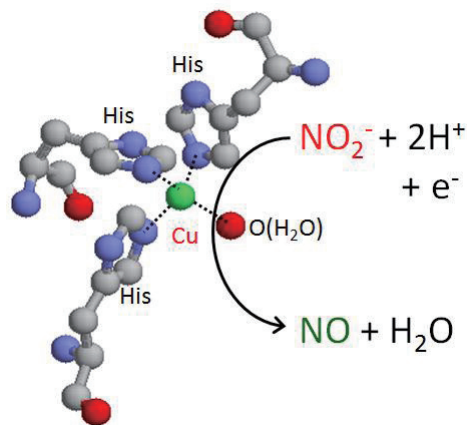


図3 亜硝酸還元酵素の活性中心

実際の亜硝酸還元酵素の活性中心の構造は、図3に示すように歪んだ4面体型構造をとっている。このような4面体型構造は、4配位の銅の低分子錯体では見られないものであり、酵素活性発現の根拠となっているものと考えられる。

図4に錯体2の分子構造と主な結合距離を示した。

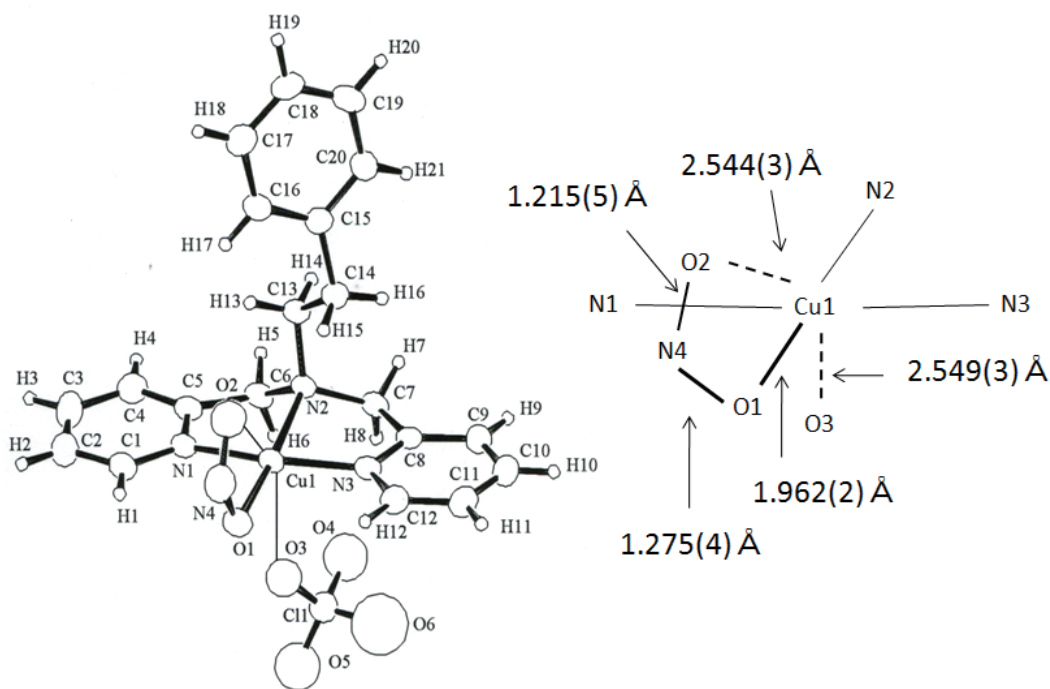


図4 錯体2の分子構造とおもな結合距離

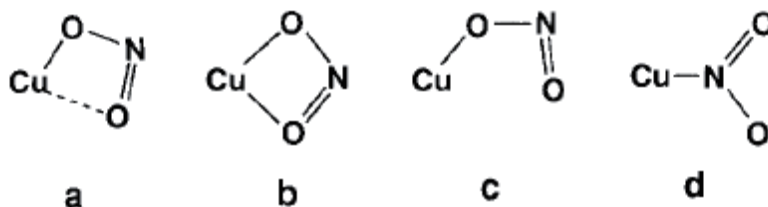
銅原子には bpa 配位子の 3 個の N 原子と亜硝酸イオンの 2 個の O 原子、 $\text{ClO}_4^-$  の 1 個の O 原子が配位しており、歪んだ 6 配位構造をとっている。N2 の置換基である Phenylethyl 基は亜硝



酸イオンの  $\text{O}2$  と同じ側にあり、 $\text{ClO}_4^-$  とは逆側に位置している。

## 2) 亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) 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 ( $\text{NO}_2^-$ ) の中心金属  $\text{Cu}$  への配位構造である。亜硝酸イオンの  $\text{Cu}$  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。



スキーム 3 亜硝酸イオンの  $\text{Cu}$  への配位様式

様式 a, b はキレート配位ではあるが、a は一方の  $\text{Cu}-\text{O}$  相互作用が弱い非対称キレート配位、様式 b は 2 つの  $\text{Cu}-\text{O}$  相互作用が等しく有意な対称キレート配位、様式 c は一方の  $\text{O}$  原子のみが  $\text{Cu}$  に配位し、もう一方の  $\text{O}$  原子は  $\text{Cu}$  と相互作用しない endo-on 配位、様式 d は中央の  $\text{N}$  原子が  $\text{Cu}$  と配位結合する場合を示している。

実際の分子構造を見ると、 $\text{Cu}-\text{O}1 = 1.962(2) \text{ \AA}$  が通常の  $\text{Cu}-\text{O}$  配位結合距離であるのに対し ( $\text{Cu}-\text{O}$ ;  $1.94, 2.07, 2.28 \text{ \AA}$  in  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}(\text{s})$ )、 $\text{Cu}1-\text{O}2 = 2.544(3) \text{ \AA}$  は非常に長くなっており、 $\text{Cu}1$  と  $\text{O}2$  の間に配位結合相互作用があるとしても非常に弱いことが示唆される。 $\text{Cu}$  に通常の配位結合をしている  $\text{O}1$  と  $\text{N}4$  の結合距離は  $1.275(4) \text{ \AA}$  となっているが、 $\text{Cu}$  と弱い相互作用をとる  $\text{O}2$  と  $\text{N}4$  の距離は  $1.215(5) \text{ \AA}$  と通常の二重結合距離を示している ( $\text{N}-\text{O}$ ;  $1.240(3)$  in  $\text{NO}_2^-$ ,  $1.20 \text{ \AA}$  in  $\text{NO}_2(\text{g})$ )。このことから、 $\text{NO}_2^-$  の  $\text{Cu}$  への配位構造は様式 b ではなく様式 a あるいは様式 c と考えられる。ただし、 $\text{O}2$  は  $\text{Cu}$  の配位座の 1 つを占める方向に位置していることから、 $\text{O}2$  と  $\text{Cu}$  の間には弱いながらも相互作用が存在するものとみなせるため、様式 a の非対称キレート配位とするのが妥当であると考えられる。

## 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 ( $\text{NO}_2^-$ ) が配位した構造を検討するために、活性中心モデル錯体  $\text{Cu}(\text{II})(\text{bis}(2\text{-pyridylmethyl})\text{amine})\text{PhEtR}$  (complex 1;  $\text{R} = \text{H}_2\text{O}$ , complex 2;  $\text{R} = \text{NO}_2^-$ ) の X 線結晶構造解析を  $-160^\circ\text{C}$  の低温条件下で行った。その結果、基質亜硝酸イオンは様式 a の非対称キレート配位構造、つまり亜硝酸イオンの 2 つの  $\text{O}$  原子が非等価に  $\text{Cu}$  にキレート配位する構造をとることが結論された。

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<sup>I</sup> and Cu<sup>II</sup> 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) – CubpaNO<sub>2</sub> 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) CubpaBzNO<sub>2</sub> 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)