

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

Structural Chemistry of the Model Complexes for the Active Center in Nitrite Reductase — X-ray Structural Studies on CubpaBzNO₂ Complexes

Yasushi Kai*, Hiroaki Arisawa*, 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)benzylamine)NO₂.ClO₄]₂ has been determined by X-ray diffraction method at -170 degrees centigrade. The molecule has dimeric structure related by the crystallographic center of symmetry. The copper atom has the square bipyramidal coordination geometry with three nitrogen atoms in approximately planar bpa ligand (bpa; bis(2-pyridylmethyl)amine), two oxygen atoms in nitrite ion (NO₂⁻), and an oxygen atom in nitrite ion of another half of the molecule. The cation - π interaction was found between copper atom and benzyl substituent resulting the long interatomic distances of Cu1-O2 = 2.698(3) and Cu2-O8 = 2.861(3) Å. Based on these distances, the nitrite ion is concluded to take end on coordination mode.

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。

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⁾。

* 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

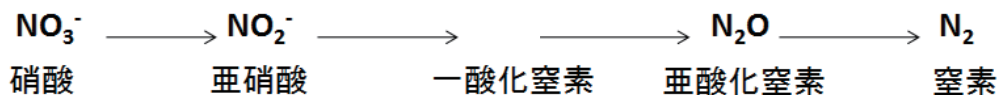


図1 脱窒素過程

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。

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、亜硝酸イオンが水に置き換わって得られる錯体についても単離、結晶化を行った。

2) X線結晶構造解析

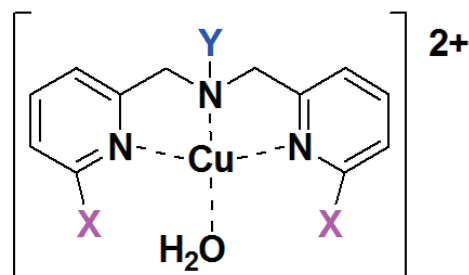
X線回折実験は、福井工業大学産学共同研究センターに設置されているイメージングプレート 2 次元回折計

(株式会社リガク製、RAPID-S) を用いて行った。25℃の室温及び -170℃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。

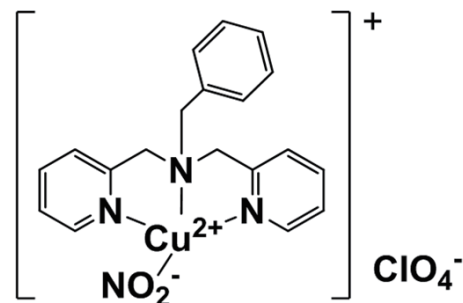
構造解析した錯体は、スキーム 1 で示した錯体で、

X = H、Y = benzyl の右の化合物で、CubpaBzNO₂ と

スキーム 1 の錯体に亜硝酸イオン NO₂⁻ が 2 個の銅に配位し、カウンターイオン



スキーム 1 NIR 活性中心モデル錯体

CubpaBzNO₂

スキーム 2 構造解析した分子の構造

は ClO₄⁻である。

CubpaBzNO₂ の単結晶は暗青色の板状であるが、0.25 x 0.25 x 0.30 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。CubpaBzNO₂ 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 4 であり、Table 1 の組成式の分子 2 個が結晶学的に独立となる。

回折強度測定の結果を Table 2 に示した。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 $2\theta_{\max}$ は 55° である。全測定反射数は 19,563、独立反射数は 9,262 であった。

構造解析と精密化について Table 3 に示した。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、最終の信頼度因子は、 $R = 0.0507$ 、 $R_w = 0.0717$ となった。

CubpaBzNO₂ 錯体の室温測定データを用いた精密化において、カウンターイオン ClO₄⁻ の O 原子に対し異方性温度因子を用いて精密化を試みると発散した。このことは、ClO₄⁻ イオンがディスプレイオーダー配置を取っているものと考えられる。

一方、-170°C で測定したデータを用いて精密化すると、これらの O 原子に異方性温度因子を適用することができた。得られた分子構造の結合距離などの標準偏差値からみて、十分な精度の構造が得られたと判断できる。

3. 結果と考察

1) 分子構造

得られた分子構造を図 2 に示す。

結晶構造を詳しく調べてみると、結晶学的に独立な 2 個の分子は、結晶学的な対称中心

Table 1. Crystal Data of CubpaBzNO₂

Formula; C₁₉H₁₉O₆N₄Cl₁Cu₁
F.W. = 498.38
 Crystal System; triclinic
 Space Group; $P\bar{1}$
 Temperature; -170 °C
 $a = 12.3856(8) \text{ \AA}$
 $b = 13.3590(10)$
 $c = 14.4027(10)$
 $\alpha = 67.9468(18)^\circ$
 $\beta = 72.3282(17)$
 $\gamma = 72.4080(18)$
 $V = 2056.1(3) \text{ \AA}^3$
 $Z = 4$
 $D_c = 1.610 \text{ g cm}^{-3}$

Table 2. Data Measurement of CubpaBzNO₂

RIGAKU RAXIS-RAPID
 MoK α ; $\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$
 graphite monochromated
 Data images; 44 exposures
 Oscillation angle; 5° /exposure
 $2\theta_{\max}$; 55.0°
 No. of reflections measured; 19,563
 No. of unique reflections; 9,262

で関係づけられる 2 量体構造を取ることが明らかとなった。図 2 には、独立な 2 個の 2 量体分子を Molecule-1、Molecule-2 として示している。

2 個の 2 量体分子を bpa 配位子の配置が一致するように投影すると、ベンジル基の配置に若干の違いが認められる以外、類似の構造をとっている。ベンジル基の配置の違いは、N2-C13 および N6-C33、あるいは C13-C14 および C33-C34 結合回りのねじれ角の違いに反映されており、 $\angle \text{Cu1-N2-C13-C14} = 58.1(4)^\circ$ 、 $\angle \text{Cu2-N6-C33-C34} = 41.6(5)$ 、 $\angle \text{N2-C13-C14-C15} = 103.5(6)^\circ$ 、 $\angle \text{N6-C33-C34-C35} = 94.44(6)^\circ$ となっている。

Table 3. Structure Determination and Refinement of CubpaBzNO₂

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 ($I > 2.00\sigma(I)$); 7,552
No. of Variables; 597
Reflection / Parameter Ratio; 12.65
 $R^1(I > 2.00\sigma(I))$; 0.0507
 $R_w^2(I > 2.00\sigma(I))$; 0.0717
Goodness of Fit Indicator; 3.591

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

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

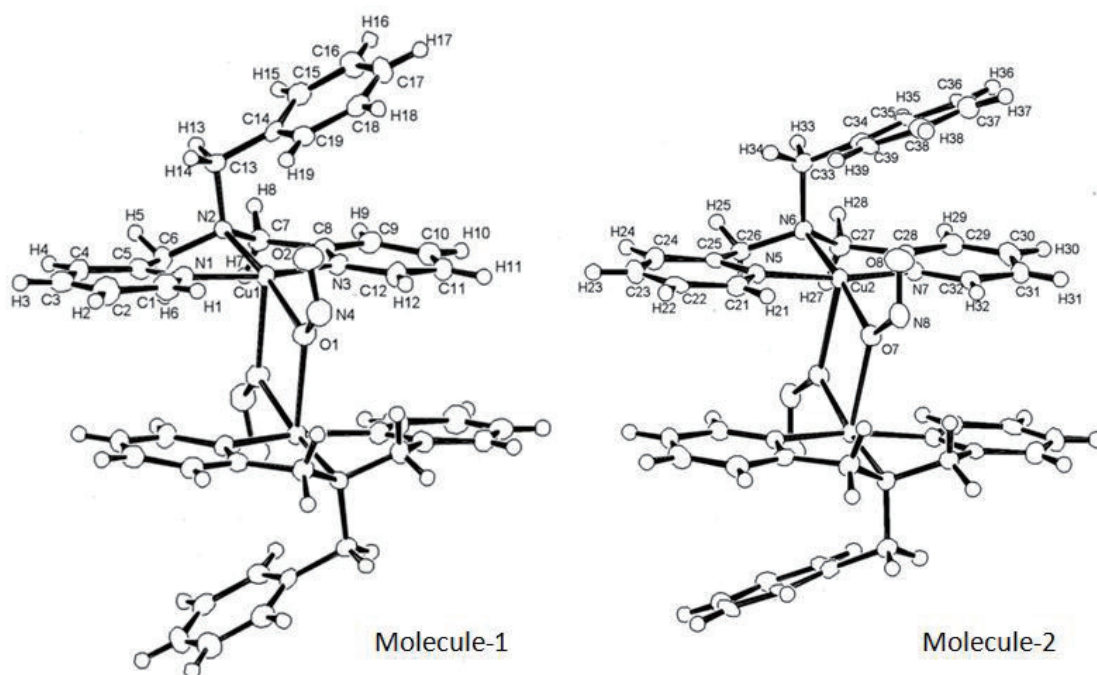


図 2. CubpaBzNO₂ 錯体の分子構造；各原子は確率 50%の熱振動楕円体で示した。
なお、ClO₄⁻イオンは省略している。

中心の Cu 原子には bpa 配位子の 3 つの N 原子と NO₂⁻ の 1 つの O 原子がほぼ平面をなす様に配位しており、その配位平面の一方から 2 量体を形成する Cu-O' 架橋結合が、また他方から NO₂⁻ の他の O 原子とベンジル基の 1 つの π 結合が接近した配位構造を取っている。Cu1, N1, N3,

C1 ~ C5, C8 ~ C12 及び Cu2, N5, N7, C21~C25, C28~ C32 は良い平面性を示し、O1 と N2、O7 と N6 は反対側にずれている。また、CubpaNO₂ 錯体では、N2 原子は配位平面の上下に大きな熱振動を示したのに対し、N2, N6 にベンジル基が置換したこの錯体では、N2、N6 の熱振動は小さい。このことは、CubpaNO₂ 錯体では、N2 の置換基が H であり、配位平面の両側にディスオーダーする可能性があるのに対し、ベンジル基が置換した本錯体ではディスオーダーの余地がないことによるものと思われる。

Table 4 に主な結合距離を、Table 5 に主な結合角を示した。

Table 4. Important Interatomic Bond Distances (Å) of CubpaBzNO₂ (' shows the symmetry related atoms)

Molecule-1:

Cu1	-	Cu1'	3.5579(9)	Cu1	-	O1	1.982(3)
Cu1	-	O1'	2.488(3)	Cu1	-	O2	2.698(3)
Cu1	-	N1	1.993(5)	Cu1	-	N2	2.012(3)
Cu1	-	N3	1.967(5)	O1	-	N4	1.309(5)
O2	-	N4	1.230(7)	Cu1	-	C14	3.344(5)
Cu1	-	C19	3.224(4)				

Molecule-2:

Cu2	-	Cu2'	3.4393(8)	Cu2	-	O7	1.972(3)
Cu2	-	O7'	2.409(3)	Cu2	-	O8	2.861(3)
Cu2	-	N5	1.984(5)	Cu2	-	N6	2.032(3)
Cu2	-	N7	1.972(5)	O7	-	N8	1.318(5)
O8	-	N8	1.219(6)	Cu2	-	C34	3.134(4)
Cu2	-	C39	3.107(5)				

2 量体の形成は、亜硝酸イオン (NO₂⁻) の 2 つの O 原子の内 bpa 配位子の面上にある O1 あるいは O7 が、隣接する Cu1 あるいは Cu2 に架橋する形で行われる。そのため、bpa 配位子面内の Cu-O 結合と架橋 Cu-O 結合は大きく異なり、分子 1 では、Cu1-O1 = 1.982(3), Cu1-O1' = 2.488(3) Å、分子 2 では Cu2-O7 = 1.972(3), Cu2-O7' = 2.409(3) Å となっている。ここで、「'」は対称中心で関係づけられる 2 量体の他方の原子を示している。

2) 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、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、様式 d は中央の N 原子が Cu と配位結合する場合である。

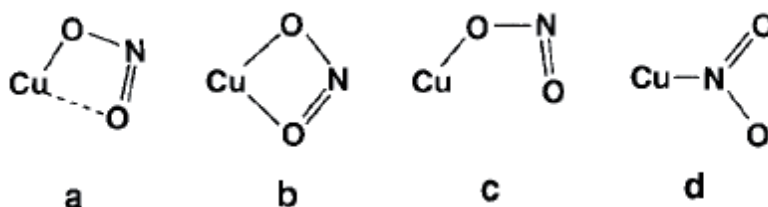
Table 5. Important Interatomic Bond Angles (deg.) of CubpaBzNO₂

Molecule-1:

O1 - Cu1 - O1'	75.07(13)	O1 - Cu1 - O2	50.82(15)
O1 - Cu1 - N1	98.23(17)	O1 - Cu1 - N2	169.76(16)
O1 - Cu1 - N3	94.67(18)	O1' - Cu1 - O2	125.55(12)
O1' - Cu1 - N1	95.70(16)	O1' - Cu1 - N2	94.69(14)
O1' - Cu1 - N3	85.29(16)	O2 - Cu1 - N1	87.40(15)
O2 - Cu1 - N2	139.34(16)	O2 - Cu1 - N3	102.71(15)
N1 - Cu1 - N2	82.56(18)	N1 - Cu1 - N3	166.87(16)
N2 - Cu1 - N3	84.31(18)	O1 - N4 - O2	112.3(4)

Molecule-1:

O7 - Cu2 - O7'	77.02(12)	O7 - Cu2 - O8	47.98(13)
O7 - Cu2 - N5	96.97(16)	O7 - Cu2 - N6	171.95(16)
O7 - Cu2 - N7	96.45(16)	O7' - Cu2 - O8	124.97(11)
O7' - Cu2 - N5	90.93(16)	O7' - Cu2 - N6	94.95(14)
O7' - Cu2 - N7	90.96(16)	O8 - Cu2 - N5	96.47(16)
O8 - Cu2 - N6	140.07(15)	O8 - Cu2 - N7	93.36(14)
N5 - Cu2 - N6	82.49(18)	N5 - Cu2 - N7	166.54(15)
N6 - Cu2 - N7	84.07(18)	O7 - N8 - O8	113.8(3)



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、Cu—O1 = 1.982(3)、Cu2—O7 = 1.972(3) Å 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 = 2.698(3)、Cu2—O8 = 2.861(3) Å は非常に長くなっており、O2、O8 原子と Cu1、Cu2 原子の間に有意な原子間相互作用があるとは言い難い距離である。O1—N4 = 1.309(5)、O7—N8 = 1.318(5) Å に比べ O2—N4 = 1.230(7)、O8—N8 = 1.219(6) Å 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) Å 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 ではなく様式 a あるいは様式 c と考えられる。ただし、CubpaNO₂ 錯体においては、O2—Cu = 2.5381(16) Å であったのに比べ、CubpaBzNO₂ 錯体では、前述の通り Cu1—O2 および Cu2—O8 が非常に長くなっており、様式 c、つまり end on 配位様式とするのが妥当であると考えられ

る。

この様に、CubpaNO₂ 錯体で様式 a、CubpaBzNO₂ 錯体では様式 c の配位構造をとるとみなされるが、このことは前者が単量体、後者が 2 量体であることに起因すると考えられる。

図 3 に、分子 1 の半分について、ベンジル基の C14–C19 結合と Cu1 との相互作用を示した。

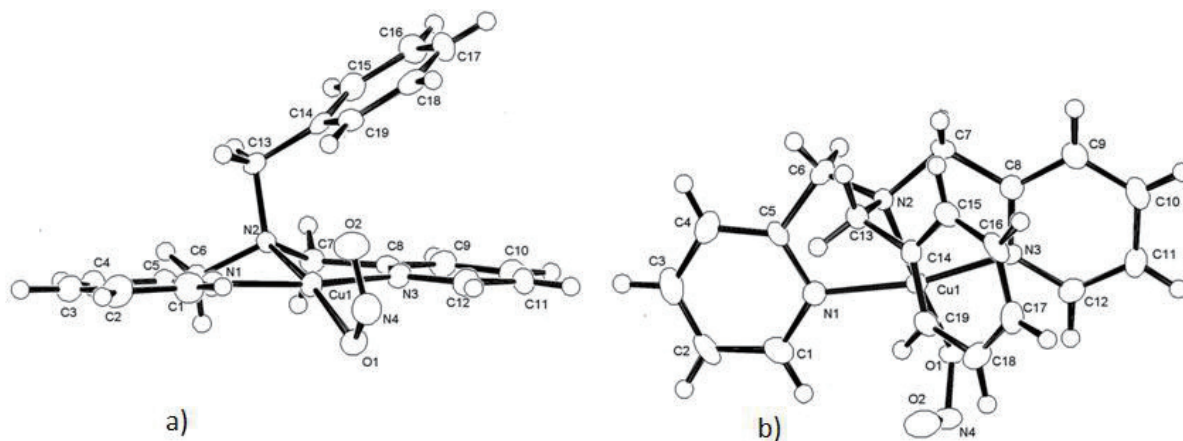


図 3. 分子 1 の半分について Cu1 と C14–C19 結合の相互作用を示す。a) bpa 配位子に沿った投影図、b) bpa 配位子上への投影図

Table 4 に示す通り、Cu1–C14 = 3.344(5)、Cu1–C19 = 3.224(4) Å と、Cu1 と C14–C19 結合はカチオン– π 相互作用を示唆する配置をとっており、これは分子 2 についても同様である。図 2 に示す通り、Cu 原子の第 6 配位座は 2 量体形成のための架橋結合に占められているため、第 5 配位座には、亜硝酸イオンの O 原子およびベンジル基の π 結合が競合する形となっている。そのため、亜硝酸イオンの O 原子と Cu 原子の相互作用は、単量体の CubpaNO₂ に比べ弱められ、その距離も非常に長くなっているものと考えられる。

錯体中心の Cu 原子の配位構造は、Table 5 の Cu 原子周りの結合角からも明らかなように、四角両推型構造から大きく歪んでいる。特に、 $\angle \text{O2–Cu1–N2}$ (139.34(16)°) および $\angle \text{O1–Cu1–O2}$ (50.82(15)°) は、四角両推型構造から期待される 90° から大きくずれている。このことは、亜硝酸イオン (NO₂[–]) が、四角両推型配位構造の 2 つの配位座を占めるには小さすぎることに加えて、O2 の配位と同じ第 5 配位座にベンジル基の π 結合が相互作用するからである。

3) 結晶構造

図 4 に CubpaNO₂ 錯体の結晶構造を示した。結晶学的な対称中心によって関係づけられ、(Cu–O)₂ の 4 員環が形成されるが、図 4 では、2 量体分子が 4 分子、ClO₄[–] イオンが 8 個確認される。なお、2 量体分子と ClO₄[–] イオンの間には、特別な相互作用は見出されなかった。

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 (NO₂[–]) 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)benzylamine)

-nitrite]ClO₄ (CubpaBzNO₂) の X 線結晶構造解析を -170°C の低温条件下で行った。その結果、結晶学的な対称中心で関係づけられる 2 個の独立な分子が単位格子中に見出された。また、基質亜硝酸イオンは様式 c の配位構造、つまり亜硝酸イオンの 2 つの O 原子のうち一方のみが Cu に配位する end on 構造をとることが結論された。また、Cu 原子とベンジル基の π 結合との間にカチオン- π 相互作用を示唆する配置をとっていることが明らかとなった。本錯体の 2 量体形成が、錯体の合成段階で起こるか、結晶化段階で起こるかについては今後の研究で明らかにしたい。

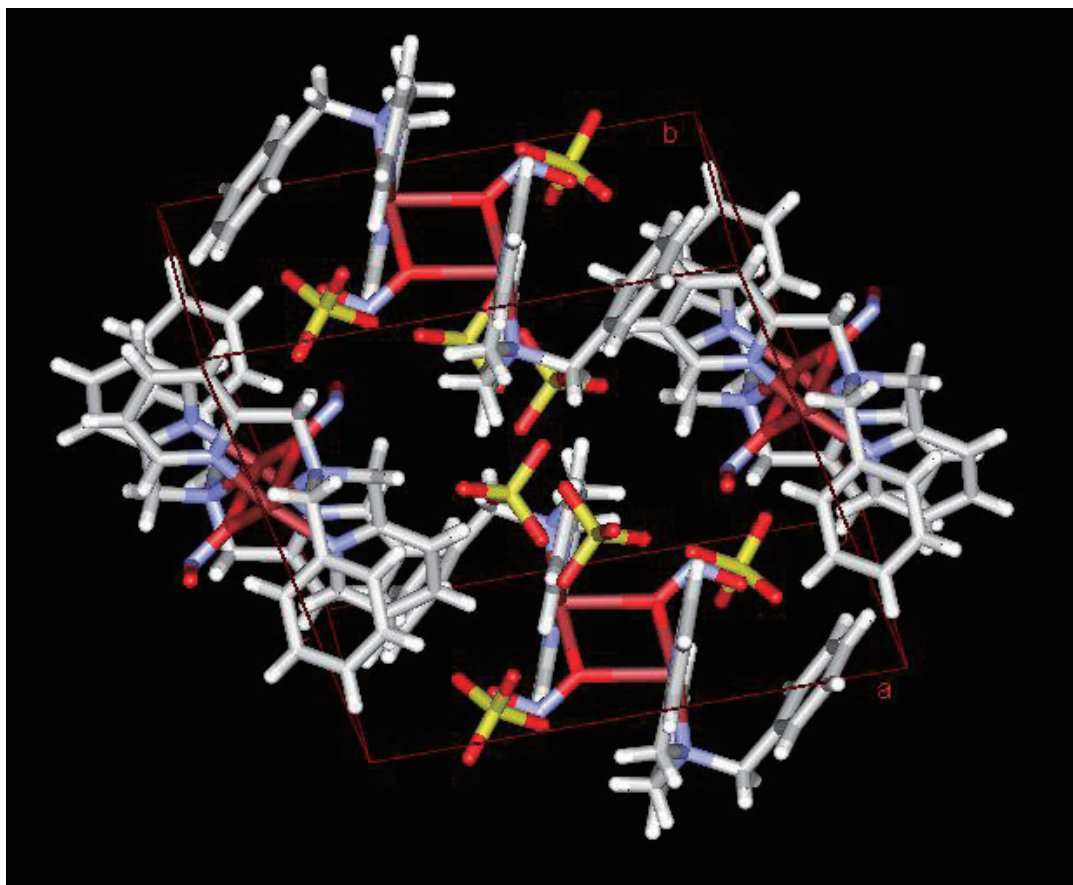


図 4. CubpaBzNO₂ 錯体の結晶構造

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.

(平成 21 年 3 月 31 日受理)