総合論文

含マンガン酵素の活性サイトモデル錯体の合成と性質

大 沢 正 久*・諸 岡 良 彦*・北 島 信 正*

Manganese Complexes Modeling the Active Sites of Manganese Proteins

Masahisa OSAWA*, Yoshihiko MORO-OKA* and Nobumasa KITAJIMA*

Binuclear or mononuclear divalent manganese complexes, $\text{LMn}(\text{OH})_2\text{MnL}(3)$, $\text{LMn}(\text{O})_2\text{MnL}(4)$, $\text{LMn}(\text{OH})(\text{OAc})\text{MnL}(7)$, $\text{LMn}(\text{OBz})(10)$, $\text{LMn}(\text{OBz})(3,5\text{-i-Pr}_2\text{pzH})(11)$ were synthesized with a hindered N₃ ligand (L = hydrotris (3,5-diisopropyl-1-pyrazolyl)borate) as structural analogues for the active sites of Mn containing proteins including PSII OEC, Mn Catalase and Mn SOD. The structure and properties were characterized and their biological relevance is discussed. The reactivity of 3 and 7 with O₂ or H₂O₂ were explored and the structures of oxidized products were determined by X-ray crystallography. The superoxide dismutation activities of 10 and 11 were examined by NTB method.

Key words : Mn-containing proteins ; PS II OEC ; Catalase ; Ribonucleotide reductase ; Superoxide dismutase ; Model complexes ; EPR spectra.

1. はじめに

マンガンは生物に対して毒素となりうる一方、生命活動にとっては不可欠な要素である。人体においては、成人男性の体内中に 10~20 mg 程度存在することが知られている。この量は鉄(3~4 g)に比べればはるかに微量であるが、それが欠落すると成長異常、骨の奇形、細胞膜形成異常、などさまざまな組織に障害が生じる。

さらに植物やある種のバクテリアにとってはマンガンが生命活動に必須な酵素の活性中心となっている。表 1

Table 1 Mn-containing proteins.

proteins	structure / function	charge
PSII OEC	tetramer (dimer to dimer ?) $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 \uparrow + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	?
Mn catalase	binuclear $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \uparrow$	(II,II) $\leftrightarrow$ (III,III)
Mn ribonucleotide reductase	binuclear ribonucleotide $\rightarrow$ 2'-deoxyribonucleotide	(II,II) $\leftrightarrow$ (III,III)
Mn superoxide dismutase	mononuclear $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \uparrow$	(II) $\leftrightarrow$ (III)

* 東京工業大学資源化学研究所 ()

* Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology ()

にマンガンイオンを活性点を持つタンパク質をまとめたが、現在までに純粋に単離され、その構造・性質が解明された含マンガン酵素はほとんどない。タンパク質内では数・種類は特定されていないが、アミノ酸残基の酸素あるいは窒素原子がマンガンイオンに配位していると考えられており、またマンガンイオンは+II, +III, +IVなど、多彩な酸化数をとることが知られている。 Mn^{2+} は d^5 , Mn^{3+} は d^4 , Mn^{4+} は d^3 という電子配置をとるため、それらは常磁性種となる。(Mn^{3+} の場合はハイスピン状態)そこで以下に示すような物理的手法で含マンガンタンパクの研究が行われている。

- 1) 電子スピン共鳴スペクトル(EPR)
- 2) 電子スペクトル
- 3) 磁化率
- 4) ラマンスペクトル
- 5) EXAFS・XANES

これらさまざまな物理学的手法から得られたタンパク質の構造に基づく特有の分光学的・磁気的性質を検証し、マンガン活性部位の構造を理解するために無機化学的観

点からその構造モデル錯体の合成が活発に試みられている。最近得られた成果、とくに複核マンガン錯体についていくつかの総説¹⁾で繰り返し述べられているので省略し、本稿では安定化配位子としてかさ高いヒドロトリス(ピ

ラゾリル)ポレートを用いた著者らの合成的研究について解説したい。

2. 光合成の酸素発生サイト(PSⅡ OEC)に関連したヒドロキシ錯体の酸化反応

光合成の反応中心には光化学系Ⅰ, Ⅱ(PSⅠ, Ⅱ)という2種類があり, 両者の協同作用により光合成が行われる。

PSⅠでは還元剤 NADPH を作り, PSⅡでは水から酸素を生じ別の還元剤を作るというそれぞれの役割を担っている。PSⅠとⅡをつなぐ電子伝達系で ATP が作られ, この ATP と NADPH が CO₂ を還元し炭水化物に変える働きをしている。この PSⅡ 内で起こる水から酸素への分解反応(式1)に4つのマンガンイオンが関与していることが明らかとなっている。

EXAFS による研究から Mn-Mn の距離には 2.7 および 3.3 Å という2つのペアが存在することが指摘されている²⁾。それら4つのマンガンイオンは dimer to dimer の構造を持っている可能性が高く図1に示すような構造が最近提案されている³⁾。

Fig.1 Schematic representation of "dimer to dimer" structure³⁾.

この2つのバイナリーな領域で酸素発生が起こっていると仮定すれば, 2分子の水がヒドロキシ基としてそれぞれのダイマ-の片側のマンガンイオンに結合し, これが2つのオキソ基となり, さらに酸化されて μ -パーオキソ基となり酸素を発生するメカニズムが考えられる(図2)。

そこで本研究ではかさ高い三脚型配位子, ハイドロトリス(3,5-ジイソプロピル-1-ピラゾリル)ポレートを用いビス(μ -ヒドロキシ)マンガン2核錯体を合成し, この錯体を水から酸素への分解反応の中間体とみなし, 各種酸化剤を用いビス- μ -オキソおよび μ -パーオキソ錯体への酸化的転換, すなわち図2の第2, 第3段階の錯体モデル化を試みた。

Fig.2 The hypothesis of water-oxidation cycle.

2.1. ヒドロキシ錯体の合成と性質

同じ配位子を用い銅のハライド錯体からビス- μ -ヒドロキシ錯体が得られることを当研究室で見いだしている⁴⁾。そこでマンガン2価のクロライド錯体1あるいは2を原料として同様の合成方法でビス- μ -ヒドロキシ錯体3の合成を行った(式2)⁵⁾。

塩化メチレン中から得られた単結晶の X 線構造解析の結果, 錯体3は分子内に対称心を有する2核錯体であ

Fig.3 ORTEP view of $[\text{Mn}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)_2](\text{OH})_2$ (3).

ることが判明した(図3)。

2つのヒドロキシ基はそれぞれのマンガン(II)イオンに対し2.094, 2.089 Åで架橋配位しており、架橋配位子はヒドロキシ基のみであった。それぞれのマンガンイオンは歪んだ5配位構造をとっており、Mn...Mn'の距離は3.3 Åであることが判明した。この錯体は2つのヒドロキシ基のみで架橋したマンガン2核錯体としては初めての合成例である。同様なビス- μ -ヒドロキシユニットを持つ錯体としてMaslenらにより、マンガン(III)2核錯体の合成が報告されている⁶⁾。しかし、Mn...Mnの距離が2.72 Åであり、この距離はヒドロキシ基のみで架橋した錯体としては短いため、現在はビス- μ -オキソマンガン(IV)2核錯体であると考えられている。ヒドロキシ基を有する2核錯体としては、Wieghardtらにより μ -ヒドロキシ-ビス(μ -カルボキシレート)マンガン(II)2核錯体が報告されている⁷⁾。錯体3のトルエン溶液のX-バンドEPRスペクトルを-160°Cで測定したところ0~900 mTにかけて非常にブロードで複雑なスペクトルが観測された。既に報告されている弱い反強磁性的相互作用を示すマンガン(II)2核錯体のスペクトルとよく類似していること、および磁化率の値(6.88 μ_B /mol at 298 K; μ_{SO} =8.37)から2つのハイスピンマンガン2価イオンの間に弱い磁氣的相互作用の存在が予想される。

2.2. ヒドロキシ錯体と過マンガン酸カリウムの反応

錯体3と4等量の過マンガン酸カリウムをアルゴン下、トルエン中、2日間反応させるとその溶液色は淡い黄色から濃い茶褐色へと変色し、この溶液中からマンガン(III, III)ビス(μ -オキソ)2核錯体4がほぼ量論的(92%)に得られた(式3)⁵⁾。

X線構造解析の結果を図4に示す。

Mn1...Mn2の距離は2.696 Åであり、典型的マンガン(ビス- μ -オキソ)ユニットの値であることが明らかとなった。これまで多くのビス(μ -オキソ)2核錯体の合成が報告されているが、ほとんどは(IV, IV)あるいは(III, IV)である。(III, III)はごく最近、2例の報告⁸⁾があるのみである。しかもそれらすべての錯体のマンガンイオンは6配位構造なのに対し、この錯体4はN₂O₂の5配位構造をとっているという特徴を持っている。ファラデー法により磁化率の温度依存性を測定した結果J=-210 cm⁻¹であることが判明し、2つのマンガンイオンの間に

Fig. 4 ORTEP view of $[\text{Mn}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)_2(\text{O})_2] \cdot 4$.

強い反強磁性的相互作用の存在することが確認された。

2.3. ビス- μ -オキソ錯体と硝酸セリウムの反応

2.2. ではマンガン2核錯体上でビス(μ -ヒドロキシ)ユニットからビス(μ -オキソ)ユニットへの酸化的転換反応について述べた。これは先に示した水から酸素への分解反応の作業仮説(図2)の2つ目のステップに対応するものである。そこで次に錯体4の酸化を試みた。

金子らは水溶液中 $[(\text{Phen})_2\text{Mn}^{3+}(\mu\text{-O})_2\text{Mn}^{4+}(\text{Phen})_2]^{3+}$ および $[(\text{bpy})_2\text{Mn}^{3+}(\mu\text{-O})_2\text{Mn}^{4+}(\text{bpy})_2]^{3+}$ と、強い1電子酸化剤硝酸セリウムアンモニウム塩の反応で酸素が発生することを報告している⁹⁾。この反応ではCe⁴⁺イオンが、2つのマンガンイオンに弱く配位した2分子の水を4電子酸化すると考えられている。そこで本系でも錯体4と硝酸セリウムアンモニウム塩の反応を検討した。アルゴン下トルエン中、錯体4と2等量の(NH₄)₂Ce(NO₃)₆を反応させるとその溶液の濃い茶褐色が徐々に退色し、14時間後にはほぼ無色になった。そしてその反応溶液からマンガン2価単核硝酸錯体5が収率66%で得られた(式4)。

X線構造解析の結果、硝酸イオンが2座配位した5配位4角錐構造をしていることが明らかになった。マンガンイオンが2価であることは無色であること、磁化率の値(5.98 μ_B /mol at 295 K; μ_{SO} =5.92)から明らかである。トリフェニルホスフィン存在下でこの反応を行うとトリフェニルホスフィンオキサイトが錯体4に対して100%検出されることから μ -オキソの酸素原子の活性

化が起きていることが判明した。残念ながら種々の検討を試みたものの現在までのところ、錯体4の酸化による酸素の発生の確認には至っていない。

2.4. ヒドロキシ錯体と酸素の反応

次にヒドロキシ錯体3と酸素との反応を検討した。錯体3のトルエン溶液を1気圧の酸素雰囲気下に放置すると、その溶液の色は淡い黄色から濃い緑黒色へと変化した。錯体4以外に錯体6を分離した。それぞれの単離収率は、錯体4が50%、錯体6が38%であった。錯体6は濃い青色を呈しており、配位子の一部であるイソプロピル基のメチン部分が水酸化された μ -オキシ錯体であることが判明した¹⁰⁾。

Fig. 5 ORTEP view of $[\text{Mn}(\text{HB}(3\text{-OiPr}, 5\text{-iPrpz})(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_2)]_2(\text{O})(6)$.

X線結晶解析の結果図5に示すようにこの錯体はオキシ基のみで架橋した2核錯体であることが判明した。水酸化されたメチン部はアルコキシとしてそれぞれのマンガニオンにシス-配位で配位していることが判明した。この錯体の全体の電荷は中性であり、それぞれのマンガニオンは3価である。1つのオキシ基のみで架橋したマンガニオン3価2核錯体は現在までに3例報告されており¹¹⁾、それらのMn-O-Mnの角度はほぼ 180° である。錯体6においてもその角度は 175° であった。ファラデー法により磁化率の温度依存性を測定した結果、 $J = -257 \text{ cm}^{-1}$ であることが判明し、2つのマンガニオンの間に μ -オキシ基を通じて強い反強磁性的相互作用の存在が確認された。

2.5. 酸素添加反応の機構の検討

ヒドロキシ錯体3と酸素の反応のメカニズムを検討する目的で、ビス- μ -オキシ錯体4の2つの酸素、錯体6の μ -オキシ、アルコキシ部、合計3つの酸素の由来を確かめる実験を行った。錯体3のヒドロキシ基の酸素原子をラベルし酸素と反応させ、FD-MSスペクトルで分

析した。

^{18}OH 基を有する錯体3と $^{16}\text{O}_2$ を反応させると錯体6には1つの ^{18}O が取り込まれることが判明した(図6)。

逆に、 ^{16}OH 基を有する錯体3と $^{18}\text{O}_2$ を反応させると錯体6には2つの ^{18}O が取り込まれることが判明した(図7)。

Fig. 6 Labeling experiment 1.

Fig. 7 Labeling experiment 2.

以上の実験から錯体6の μ -オキシの酸素原子は、錯体3のヒドロキシ基由来であること、2つのアルコキシ酸素原子は外部の酸素由来であると結論できる。また同時に錯体4の分析も行った結果、2つの μ -オキシの酸素原子は、錯体3のヒドロキシ基由来であることが判明した。

^{16}OH 基を有する錯体3を混合酸素($^{16}\text{O}_2 : ^{18}\text{O}_2 = 1 : 1$)で酸化し分析すると、 $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ を含む錯体6と $^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ を含む錯体6がほぼ等量生成し、 $^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ を含む錯体6は生成していないことが判明した(図8)。

よって錯体6の2つのアルコキシ酸素原子は外部の同

Fig. 8 Labeling experiment 3.

一酸素分子由来であると結論できる。

以上の同位体実験の結果から反応機構を(図9)のように考えることができる。

Fig.9 The proposed mechanism for oxidation of 3 by O_2 .

5配位の錯体3に酸素が付加しビス(μ -ヒドロキシ)- μ -パーオキシユニットを持つ中間体3aが生成する。次に H_2O_2 および H_2O の脱離が競争反応として起き、 H_2O_2 の脱離によってビス- μ -オキシ錯体4が生成する。一方、 H_2O の脱離からは μ -オキシ- μ -パーオキシ中間体3bが生成する。さらにO-Oホモリシスによって生じるマンガノオキシ(3c)を経由し水酸化が進行したと考えることができる。

この反応機構は、以下に述べるホスフィンを用いた実験によってさらに支持される。ヒドロキシ錯体3をトルエン中、10等量のトリフェニルホスフィン存在下、酸素と反応させるとその溶液の色は先の緑黒色と異なり茶褐色に変化した。この系では錯体6の生成は完全になくなり、錯体4が同収率(50%)で得られた。同時にヒドロキシ錯体に対して84%のトリフェニルホスフィンオキシサイドが検出された(eq.3~4)。この実験事実は、水酸化の中間体であるマンガノオキシ錯体(3c)がホスフィンと容易に反応してしまい、水酸化が妨げられたとして合理的に説明することができる。

2.6. OEC との関連の考察

以上のように PS II OEC の水から酸素への分解反応の

中間体のモデルとみなせるマンガ(II, II)ビス- μ -ヒドロキシ2核錯体の合成とその酸化的転換反応を行った。X線結晶解析の結果、ビス- μ -ヒドロキシ2核錯体の $Mn \cdots Mn$ が3.3 Åであることが明らかとなった。EXAFSの研究から提案されている $Mn \cdots Mn$ の距離2.7および3.3 Åのうち2.7 Åについては、モデル錯体の検討からビス- μ -オキシコア架橋を持つ $Mn \cdots Mn$ の距離に帰属する説が有力である。3.3 Åについては、 μ -オキシ-ビス- μ -カルボキシレート、 μ -ヒドロキシ-ビス- μ -カルボキシレートユニットが提案されているが、本研究で合成したビス- μ -ヒドロキシユニットでも3.3 Åによく一致することが判明した。一方、ヒドロキシ錯体を過マンガノ酸カリウムあるいは酸素で酸化することで、マンガ(III, III)ビス- μ -オキシ2核錯体の合成に成功した。この2核錯体上でのビス- μ -ヒドロキシコアからビス- μ -オキシコアへの酸化的転換反応は、作業仮説の2つ目のステップに対応するものである。

3. マンガンカタラーゼの活性点構造のモデルとしての μ -カルボキシレート2核錯体の合成と性質

カタラーゼはペルオキシソーム中に存在し過酸化水素を酸素と水に分解する酵素($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \uparrow$)であり、さらにペルオキシダーゼ($H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$)も持っている。人体内ではヘム鉄タンパク質がその役割を担っているが、ある種のバクテリア中ではマンガンを活性点に持つカタラーゼが知られている。現在までに以下の3種のバクテリア中から単離されている。

- 1) *Lactobacillus plantarum*¹²⁾
- 2) *Thermus thermophilus*¹³⁾
- 3) *Thermoleophilum album*¹⁴⁾

それぞれマンガンを活性点に持つ点では一致しているが、諸性質は一様ではない。1)と2)から単離されたカタラーゼは性質がよく似ており、X線結晶解析、EXAFSやESRによる検討が活発に行われている。一方、3)のカタラーゼはその単離が報告されているのみである。2)については1986年にX線結晶解析が行われており、 $Mn \cdots Mn$ の距離が3.6 Åの2核構造を有していることが明らかになっている。しかし分解能が3 Åであるため、マンガノイオンの配位環境は不明である¹⁵⁾。ESRの測定からマンガノカタラーゼは(Mn^{2+}, Mn^{2+}) $\rightleftharpoons$ (Mn^{3+}, Mn^{3+})のレドックスで反応が触媒的に進行すると考えられている¹⁶⁾。またその作用過程で(Mn^{3+}, Mn^{4+})、(Mn^{2+}, Mn^{3+})という過酸化水素の分解には不活性である2つの混合原子価状態が副生することが判明している。このよ

うに多くの情報はあがるが、活性点構造・反応機構にはまだ不明点が多い。とくに各酸化状態の架橋配位子のユニット構造が注目を集め、その特定のため EXAFS による研究などが活発に行われている。図 10 に種々の知見を総合し、Dismukes により提案された⁷⁾各酸化状態の構造を示す。

Fig. 10 The proposed mechanism for manganese catalase.

還元型はモノ(μ -カルボキシレート)ユニット、酸化型は μ -オキソ- μ -カルボキシレートユニット、3,4 価混合原子価状態ではビス(μ -オキソ) μ -カルボキシレートユニットを持つことが提案されている。しかしながら、モノ- μ -カルボキシレートユニットを有するマンガン 2 核錯体はこれまで知られていなかった。そこで還元型モデルとなる μ -ヒドロキシ- μ -カルボキシレート錯体の合成を行い、過酸化水素および酸素との反応を検討した。

3.1. μ -ヒドロキシ- μ -カルボキシレート錯体の合成と性質

2.1. 2.1. でその合成を述べたヒドロキシ錯体 3 から μ -ヒドロキシ- μ -カルボキシレート錯体 7 の合成を行った。トルエン中、錯体 3 に等量の酢酸を反応させることにより合成に成功した(式 5)。

塩化メチレン中から結晶化するのには成功しているが、結晶溶媒がさわめて飛びやすく結晶が不安定なため X 線構造解析には至っていない。しかし、IR スペクトルでヒドロキシ基の伸縮振動($\nu(\text{OH})$; 3652cm^{-1})が原料のヒドロキシ錯体のもの($\nu(\text{OH})$; 3685cm^{-1})からシフトしていること、同時にカルボキシレート基の伸縮振動が

観測できること($\nu(\text{COO})$; 1573cm^{-1})から μ -ヒドロキシ- μ -カルボキシレート錯体であると結論できる。また元素分析の結果もこの構造を支持している。磁化率の値($7.41\text{ }\mu_B/\text{mol}$ at 295K ; $\mu_{\text{SO}}=8.37$)はヒドロキシ錯体 3 のもの($6.88\text{ }\mu_B/\text{mol}$ at 298K)より大きく、より弱い反強磁性的相互作用の存在が予想される。

3.2. μ -ヒドロキシ- μ -アセテート錯体と過酸化水素の反応

錯体 7 と過酸化水素をトルエン中で反応させると、その溶液の色は淡い黄色から茶褐色へ変化した。反応後の EPR スペクトルからは、 $g=2$ 付近に 16 本のマルチラインシグナルが観察され、マンガン(III, IV)混合原子価錯体 8 の生成が確認された。しかし EPR スペクトルの積分から錯体 8 の収率はそれほど多くなく、MS スペクトルの測定から EPR 不活性であるマンガン(III, III) μ -オキソ- μ -カルボキシレート錯体の生成が示唆された。そこで分別結晶を行ったところ、溶液中からビス- μ -オキソ- μ -カルボキシレート錯体 8 が結晶として単離収率 18% で得られた。錯体 8 の X 線結晶構造解析の結果を図 11 に示す。

Fig. 11 ORTEP view of $[\text{Mn}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)]_2(\text{O})_2(\text{AcO})$ (8).

錯体 8 は分子内に C_2 軸を有し、2 つのマンガンイオンは結晶学的には等価であり、それぞれのマンガンイオンは 6 配位構造をとっていることが明らかになった。 $\text{Mn}\cdots\text{Mn}'$ の距離は $2.71\text{ }\text{\AA}$ でありビス(μ -オキソ)錯体 4 とほとんど同じである。2 つのマンガンイオンが構造的に等価であり不対電子が非局在化されている場合、観測される EPR スペクトルは 11 本になると予想されるが¹⁷⁾、単離した錯体 8 の EPR スペクトルは 16 本観測された。これが錯体 8 の結晶学的 disorder によるものなのか、錯体の電子的構造に起因する本質的なものなのかは、現時点では不明である。磁化率の値($2.69\text{ }\mu_B/\text{mol}$ at

295 K)から架橋配位子を通じて強い磁氣的相互作用の存在が予想された。さらに SQUID による磁化率の温度依存性(6~301 K)の測定から $J = -150 \text{ cm}^{-1}$ 程度であることが判明し、2つのマンガニオン間の強い反強磁性的相互作用の存在が確認された。実際のタンパク質の混合原子価状態が不活性であると同様、錯体8には過酸化水素分解活性はないことが判明した。また錯体8を分別した残りの溶液から EPR 不活性な茶褐色の錯体9が収率19%で得られた。X線結晶解析の結果、錯体9はマンガン2, 3価混合原子価の直線型3核錯体であることが判明した(図12)。

Fig. 12 ORTEP view of $(\text{Mn}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3))(\text{OH})(\text{AcO})_2\text{Mn}(\text{OH})(\text{AcO})_2(\text{Mn}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3))$ (9).

それぞれのマンガニオンは μ -ヒドロキシビス(μ -カルボキシレート)ユニットで架橋しており、それぞれ6配位構造をとっている。錯体9がカウンターアニオンをピラゾレートとして結晶化していること、および中央の Mn2 イオンがピラゾリルボレート配位子を有していないことから、再結晶を繰り返すうちに錯体が分解し配位子の再編成が起き、このような3核錯体が副生成したと考えられる。電子スペクトルの測定からもこのことが支持された。錯体9は486,518 nm に特徴的な吸収を持つが過酸化水素の反応直後の電子スペクトルにはそのような吸収は観測されなかった。

以上のように、錯体8と過酸化水素との反応ではカタラーゼと同様な架橋構造を持ったマンガン(III, IV)錯体が生成することがわかった。また新規な骨格構造を持つ(III, II, III)錯体の副生が見いだされた。一方、マンガンカタラーゼの作用過程で生成が確認されている(II, III)2核錯体の生成を予想し、錯体7と過酸化水素の反応溶液の低温(8 K)での EPR 測定を行ったが、(II, III)2核錯体に基づくシグナルは観測されなかった。

3.3. μ -ヒドロキシ- μ -アセテート錯体と酸素の反応

錯体7と1気圧の酸素をトルエン中反応させると、そ

の溶液の色は過酸化水素との反応と同様に淡い黄色から茶褐色へ変化した。12時間反応させた後の EPR スペクトルの測定から前節で述べた混合原子価錯体8が同様に生成していることがわかった。反応は過酸化水素の場合より遅いが、スペクトルの積分より錯体8の生成量は多いことが判明した。

3.4. 反応機構の検討

3.3. で述べた錯体7と酸素との反応で生成した錯体8のビス- μ -オキソユニットの2つの酸素の由来を確かめるためラベル実験を行い、FD-MS スペクトルで分析した。

^{16}OH 基を有する錯体7と $^{18}\text{O}_2$ を反応させると2つの ^{18}O が錯体8に取り込まれることが判明した。逆に ^{18}OH 基を有する錯体7と $^{16}\text{O}_2$ を反応させると2つの ^{16}O が錯体8に取り込まれた。したがって錯体8の2つの μ -オキソ原子は外部の酸素分子由来であると結論できる。

また ^{16}OH 基を有する錯体7と $^{18}\text{O}_2$ と $^{16}\text{O}_2$ の混合酸素(1:1)との反応で、 ^{16}O と ^{18}O を1つずつ取り込んだ錯体8が生成しなかったことから、錯体8のビス- μ -オキソユニットの2つの酸素が外部の同一酸素分子由来であることが判明した。以上のことから錯体8の生成を図13のように考えることができる。

Fig. 13 The proposed mechanism for oxidation of 7.

錯体7のヒドロキシ基は水として脱離し、酸素と反応し μ -パーオキソ- μ -カルボキシレート中間体が生成する。O-O ホモリシスが起き、ビス- μ -オキソ- μ -カルボキシレート錯体8が生成すると考えられる。

3.5. 生体系との関連の考察

以上本項ではマンガンカタラーゼの還元型の活性部位モデルとなる、 μ -ヒドロキシ- μ -カルボキシレート(II, II)錯体の合成に初めて成功した。 μ -ヒドロキシ- μ -カルボキシレート(II, II)錯体と過酸化水素との反応では、実際の酵素でもその生成が予想されているビス(μ -オキソ)- μ -カルボキシレート(III, IV)錯体が生成することを

見いだし、生成した混合原子価錯体の2つの μ -オキソ原子がヒドロキシ基由来ではなく外部の同一酸素分子由来であることを明らかにした。また(II, II)錯体には過酸化水素分解能があるのに対し、(III, IV)錯体には活性がないことを明らかにした。以上の結果は、実際のマンガカタラーゼで知られている知見によく一致しており、この酵素の活性サイトがモノ(μ -カルボキシレート)骨格を持つ可能性を強く示している。さらにこのことを証明するために μ -オキソ- μ -カルボキシレート架橋を持つ(III, III)錯体の合成を現在検討している。

以上のことを総括しマンガカタラーゼの作用過程を次のように考える(図14)。

Fig. 14 The proposed reaction mechanism for manganese catalase.

(II, II)の還元型Aに酸素あるいは過酸化水素が反応し、(III, III)の μ -パーオキシ基を有するBが生成し、酸素が抜ければもとの還元型Aに戻り、O-Oホモリシスが起これば本系と同様に混合原子価状態Dを生成するという作用過程である。Cの状態に過酸化水素が反応すればBの状態が生成し、同様なサイクルを考えることができる。本研究で得られた錯体とマンガカタラーゼにおける各酸化状態のEXAFSの比較によりこの仮説を検証できると考えている。

4. 単核カルボキシレート錯体の構造とSOD活性

SODは O_2^- を H_2O_2 と H_2O に不均化する酵素である($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)。この不均化反応は $Mn^{2+} \rightleftharpoons Mn^{3+}$ のレドックス反応を伴い触媒的に進行すると考えられている¹⁸⁾。Mn-SODは多くの生物の真核細胞のミト

コンドリア中から単離されており、細胞にとって有害である活性酸素種から細胞を守るという点から生理学的にきわめて重要な酵素である。*Thermus thermophilus* から単離されたMn-SODのX線結晶解析が2.4 Åの解像度で行われ、その活性点構造が明らかになった(図15)。

Fig. 15 Schematic representation of the active site of the Mn-SOD.

Mn(III)イオンにヒスチジン28, 83, 169の3つのイミダゾール窒素とアスパラギン酸165のカルボキシレート基が単座配位し、合計4つのアミノ酸残基が配位している。1分子の水も配位しており全体で三方両錐の5配位構造を形成している。軸配位子はヒスチジン28の窒素原子と、水分子である。このようにMn-SODの活性点構造は明らかになっているが、その高い活性(Rate constant with O_2^- ($M^{-1}sec^{-1}$), 2×10^9)が何に由来しているのか、またその反応機構など不明な点が多い。そこでMn-SODの構造と活性、および反応機構に関する知見を得る目的でその還元型のモデルとみなせる5配位構造を有するマンガ2価単核錯体を合成した。そして、その錯体のSOD活性をNBT法²⁰⁾を用い測定した。

4.1. マンガン2価単核ベンゾエート錯体の合成

錯体2と安息香酸ナトリウムの反応からピラゾールベンゾエート錯体10を合成した。錯体の単結晶X線構造解析の結果を図16に示す。

マンガ(II)イオンは、 N_4O 型のやや歪んだ三角両錐型5配位構造を有し、Mn-SODの構造とよく類似している。ベンゾエートはマンガニオンに単座配位しており、配位していない酸素原子(O_2)はピラゾールのアミノプロトン(H_a)と水素結合している。

一方、錯体1と安息香酸ナトリウムの反応から同様な5配位構造を有するベンゾエート錯体11を合成した。X線構造解析の結果を図17に示す。

4.2. 錯体のSOD活性

Mn-SODの活性部位構造に類似した5配位の単核錯

Fig. 16 ORTEP view of $\text{Mn}(\text{OBz})(3,5\text{-iPr}_2\text{pzH})(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3$ (10).

Fig. 17 ORTEP view of $\text{Mn}(\text{OBz})(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)$ (11).

体 10, 11 の SOD 活性を測定した。

通常、酵素反応では、反応基質または生成物を測定する直接法がよく用いられる。しかし SOD の場合は基質が不安定なフリーラジカル(O_2^-)であるため、測定には間接法が用いられている。間接法は O_2^- を発生する系と O_2^- を検出する系とから構成され、SOD が検出系の反応を阻害する性質を利用している。活性を評価する単位としては、検出系の反応を 50% 阻害する SOD の濃度を 1 単位として IC_{50} で表される。ここではキサンチン-キサンチンオキシダーゼ法を O_2^- の発生系とした NBT 還元法を用いて SOD 活性を測定した。この方法は簡便で信

頼性が高いのでよく利用されている。キサンチンオキシダーゼはキサンチンと分子状酸素 O_2 との反応を触媒し、 O_2^- を生成する。生じた O_2^- は、NBT を還元し、560 nm に吸収を有する還元型 NBT (ジホルマゼン)にする。この系に SOD が存在すると、 O_2^- の不均化が促進され O_2^- は O_2 と H_2O_2 になる。したがって、SOD 非存在下と存在下のジホルマゼン濃度を比較することで SOD 活性を評価することができる。

4.3. SOD 活性の評価

錯体 10, 11, それぞれの測定結果を図 18 に示す。

Fig. 18 SOD activities of 10 and 11 in the xanthine oxidase-NBT assay.

それぞれの IC_{50} は 0.80, 0.75 μM と測定された。両者の差はほぼ誤差範囲と思われる。したがって、反応中 10 のピラゾールははずれ 11 が活性種となって反応が進行していると考えられる。錯体 10, 11 は実際の Mn-SOD と比較すると 2% 程度の活性だが、モデル錯体としては高い SOD 活性を有していることがわかった。Mn-SOD のモデル錯体の合成とその活性の報告例は数多くある。しかし活性の測定法が異なるため単純な比較はできない。そこで比較のため同一条件下で、モデル錯体として報告されている $\text{Mn}^{2+}(\text{PA})_2(\text{PAH})(\text{H}_2\text{O})$ (12)²¹⁾ (PAH=ピコリン酸)の活性の測定を行った。その結果、錯体 12 の IC_{50} は 6.5 μM であり、錯体 10, 11 の高い活性が裏づけられた。錯体 12 の構造は不明であるが、その組成から 6 配位構造と考えられる。このことから、錯体 10, 11 は Mn-SOD の活性点構造 (5 配位 3 角両錐) と類似した配位不飽和座を持つ 5 配位構造が高い活性に必要であると推論される²²⁾。

5. おわりに

以上含マンガンタンパク質の活性点構造や機能発現における金属の役割を明らかにすることを目的としたモデル錯体の合成、および反応性に関する我々の研究について述べた。含マンガンタンパク質は生理学的に重要な働きを果たし、興味深い作用を持っているにも関わらず、その反応機構の詳細はもとよりマンガンイオンの配位構造さえ現時点ではほとんど解明されていない。とくにPS II OEC は膜タンパク質であるため結晶化が困難であり、タンパク質からの活性点構造に関する情報が限られる。したがって、構造・機能モデル錯体の開発からタンパク質理解の手掛かりが得られることが、とくに期待される。

最後に SOD 活性の測定を行ってくださった東京大学薬学部の長野哲雄先生に深く感謝いたします。

(平成 5 年 7 月 1 日受理)

文 献

- 1a) L. Jr. Que, A.E. True, *Prog. Inorg. Chem.*, **38**, 98 (1990)
- b) K. Wieghardt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **28**, 1153 (1989)
- c) J.E. Vincent, G. Christou, *Adv. Inorg. Chem.*, **33**, 197 (1989)
- 2a) N.G. Graham, R.C. Prince, S.P. Cramer, *Science*, **243**, 798 (1988)
- b) J.B. Penner-Hahn, R.M. Fronko, V.L. Pecoraro, C.F. Yocum, S.D. Betts, N.R. Bowlby, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2549 (1990)
- 3) V.K. Yachandra, V.J. DeRose, M.J. Latimer, I. Mukerji, K. Sauer, M.P. Klein, *Science*, **260**, 675 (1993)
- 4) N. Kitajima, K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Moro-oka, *Chem. Lett.*, **1989**, 421
- 5) N. Kitajima, M. Osawa, M. Tanaka, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7758 (1991)
- 6) H.S. Maslen, T.N. Waters, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 760
- 7) U. Bossek, K. Wieghardt, B. Nuber, J. Weiss, *J. Inorg. Chim. Acta*, **1963**, 123 (1989)
- 8a) P.A. Goodson, D.J. Hodgson, *Inorg. Chem.*, **28**, 3606 (1989)
- b) P.A. Goodson, A.R. Oki, J. Glerup, D.J. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6248 (1990)
- 9) R. Ramaraj, A. Kira, M. Kaneko, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25**, 825 (1986)
- 10) N. Kitajima, M. Osawa, M. Tanaka, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8952 (1991)
- 11a) R.F. Ziolo, R.H. Stanford, H.B. Gray, *ibid.*, **96**, 7910 (1974)
- b) L.H. Vogt, A. Zalkin, D.H. Templeton, *Inorg. Chem.*, **6**, 1725 (1967)
- c) C.A. Kipke, M.J. Scott, J.W. Gohdes, W.H. Armstrong, *ibid.*, **29**, 2193 (1990)
- 12a) Y. Kono, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **258**, 6015 (1983)
- b) W.F. Beyer, I. Fridovich, *Biochemistry*, **24**, 6460 (1985)
- 13) V.V. Barynin, A.I. Grebenko, *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, **286**, 461 (1986)
- 14) G.S. Allgood, J.J. Perry, *J. Bacteriol.* **168**, 563 (1986)
- 15) V.V. Barynin, A.A. Vagin, V.R. Melik-Adamyan, A.I. Grebenko, *Akad. Nauk SSSR*, **288**, 877 (1986)
- 16) S.V. Khangulov, V.V. Barynin, S.V. Antonyuk-Baynina, *Biochem. Biophys. Acta*, **1020**, 25 (1990)
- 17) G.C. Dismukes, In *Applications in Chemistry, Physics and Biology*, Kluwer Academic Publishers, September 1990
- 18) H. Hassan, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 385 (1979)
- 19) W.C. Stalling, K.A. Patridge, M.L. Ludwig, *J. Biol. Chem.*, **260**, 16424 (1985)
- 20) H.P. Misra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **247**, 188 (1972)
- 21) K. Yamaguchi, L. Specer, D.T. Sawyer, *FEBS Lett.*, **197**, 249 (1986)
- 22) N. Kitajima, M. Osawa, N. Tamura, Y. Moro-oka, T. Hirano, M. Hirobe, T. Nagano, *Inorg. Chem.*, **32**, 1879 (1993)