

博 士 論 文

NiSOD活性部位の構造と機能の生物無機化学的アプローチ

2010年

中 根 大 輔

名古屋工業大学博士論文  
甲第750号(課程修了による)  
平成22年6月23日授与

博 士 論 文

NiSOD 活性部位の構造と機能の生物無機化学的アプローチ

2010 年

中 根 大 輔

-目次-

第1章 緒言

1.1. 酸素の発見と酸素障害	5
1.2. 生物の進化と酸素障害防御	5
1.3. 活性酸素の生成、消去と SOD	6
1.4. SOD の種類とその特徴	7
1.5. NiSOD の活性中心の構造	7
1.6. NiSOD をめぐる研究	8
1.7. 本研究の目的	8
1.8. 参考論文	12

第2章

N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 型 Ni(II)錯体による NiSOD 活性中心の第1配位圏の環境と酸化還元電位との関連性の検討

2.1. はじめに	15
2.2. 実験	
2.2.1. 配位子合成	16
2.2.2. 錯体合成	19
2.2.3. 測定機器	20
2.3. 結果	
2.3.1. 各種錯体の結晶構造	22
2.3.2. 各種 Ni(II)錯体の吸収スペクトル	22
2.3.3. 各種 Ni(II)錯体の電気化学的性質	23
2.4. 考察	24
2.5. 結論	25
2.6. 参考論文	33

### 第3章

N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>型 Ni(II)錯体による NiSOD 活性中心第2配位圏に見られるアミダト部位、チオラト部位での水素結合と SOD 活性との相関性

3.1.	はじめに	35
3.2.	実験	
3.2.1.	配位子、錯体合成	36
3.2.2.	測定機器	36
3.3.	結果	
3.3.1.	各種 Ni(II)錯体の溶液中における磁氣的性質	38
3.3.2.	amidato O 原子と溶媒分子との間の相互作用	39
3.3.3.	Thiolato S 原子と溶媒分子との間の求核的相互作用	40
3.4.	考察	42
3.5.	結論	43
3.6.	参考論文	55

### 第4章

N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>型 Ni(II)、Ni(III)錯体を用いた NiSOD 活性中心周りの構造柔軟性の検討

4.1.	はじめに	57
4.2.	実験	
4.2.1.	配位子、錯体合成	58
4.2.2.	測定機器	60
4.3.	結果	
4.3.1.	N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> 型 Ni(II)錯体[Ni <sup>II</sup> (L4)] <sup>+</sup> 、およびその[Ni <sup>III</sup> (L4)] <sup>2+</sup> の構造と性質	62
4.3.2.	Ni(III)錯体[Ni(L2)] <sup>2+</sup> の構造と imidazole 添加に伴う構造変化	63
4.3.3.	[Ni(L3)] <sup>-</sup> への 1-methylimidazole の配位挙動	63
4.3.4.	Ni(III)錯体[Ni(L3)]の構造と imidazole, pyridine 添加に伴う構造変化	63
4.4.	考察	65
4.5.	結論	66
4.6.	参考論文	73

第5章	
各種 Ni(II)錯体とスーパーオキシドアニオンとの反応	
5.1. はじめに	75
5.2. 実験	
5.2.1. 配位子、錯体合成	76
5.2.2. 測定機器	76
5.3. 結果	
5.3.1. Ni(I)錯体[Ni(L1)] <sup>+</sup> と O <sub>2</sub> との反応	78
5.3.2. [Ni(L1)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> と KO <sub>2</sub> との反応	78
5.3.3. [Ni(L2)](ClO <sub>4</sub> )と KO <sub>2</sub> との反応	78
5.3.4. Na[Ni(L3)]と KO <sub>2</sub> との反応	79
5.4. 考察	
5.4.1. Ni(I)錯体と O <sub>2</sub> との反応および Ni(II)錯体と KO <sub>2</sub> との反応に伴う構造変化	80
5.4.2. [Ni(L3)] <sup>-</sup> と KO <sub>2</sub> との反応における imidazole の軸配位の効果	81
5.5. 結論	81
5.6. 参考文献	88
第6章 結言	91
著者発表の論文	93
謝辞	95



## 第1章 緒言

### 1.1. 酸素の発見と酸素障害

酸素は 1770 年代の初期にシェーレとプリーストリによって発見された。プリーストリは HgO や PbO に大型レンズで集光した太陽光を照射するとロウソクが激しく燃え、ネズミが長い時間窒息しないで見られる気体が発生することを見出した。また、彼は同じ気体がハッカの小枝を用いても発生し、この中でネズミが長く窒息しないことを明らかにし、地球上での酸素の循環、すなわち、植物による酸素発生と動物の呼吸による酸素吸収に相当する実験もおこなっている。<sup>1</sup> プリーストリのこの発見を元にラボアジエはこの気体が新しい元素であり、燃焼により酸を生じることから、この気体を「酸素」と命名し、燃焼とは酸素との結合であるという科学的に正しい説明を与えた。ラボアジエは同時にネズミの呼吸による酸素の吸収量とカロリーメーターを用いて測定した発熱量から呼吸が燃焼に等しいことを示し、呼吸を熱力学の点から正しく把握していた。<sup>2</sup>

プリーストリが酸素を発見し、ラボアジエが呼吸の熱力学的な意義を明らかにしてから 240 年近い年月が経過したが、その間に生理学、生化学の多くの研究によって、酸素分子が生化学エネルギー生産効率の高い呼吸の電子受容体になることができ、また、多種類の代謝産物を供給する酸化酵素、酸素添加酵素反応を可能にすることが明らかにされ、その詳細な反応機構も明らかにされてきた。酸素分子を利用する能力を獲得できた生物が生物の進化の上で有利な位置を占め、酸素が生物進化の大きな原動力になったことは疑う余地が無い。

このように酸素分子が好機性生物にとって必須であり、それがいかに有利であるかについてはよく理解されてきたが、次第に、酸素には生物に対して障害を与えるという一面もあることが明らかになってきた。

### 1.2. 生物の進化と酸素障害防御

現在、地球の大気の 21% を占める酸素であるが、原始の地球では、酸素の発生源は紫外光による H<sub>2</sub>O の光分解のみであり、酸素を発生する最古の光合成生物である藍藻(Cyanobacteria) が登場した約 30 億年前以前は大気中の酸素濃度は 0.003% 程度であったことがカンブリア紀の鉄の酸化状態から予測されている。<sup>3</sup> このような環境で出現した生物は当然のことながら酸素を利用できない嫌気性菌であったが、彼らにとってはこの 0.003% 程度の酸素も有害であり、彼らはすでに酸素障害に対する防御機構を有していた。<sup>4</sup>

これを考慮すると、酸素を発生する最古の光合成生物である Cyanobacteria が酸素障害を防ぐ機構を有していたことは不思議なことではない。逆に酸素障害に対する防御機構を有していたからこそ彼らは、光合成という光エネルギーを用いて H<sub>2</sub>O から電子を取り出す画期的な能力を取得できたと考えられる。

Cyanobacteria およびそれから進化した真核藻類は大気に酸素を供給し続け、6 億年前のカンブリア紀には大気中の酸素濃度は 1%、4 億年前のシルル紀には 10% となった。シルル紀



にはオゾン層が形成され、これが太陽光の紫外線を吸収するようになったため、陸上にも生物が進出し、それ以降は陸上植物も大気に酸素を供給し、現在の 21 %の酸素を含む地球の大気をつくり上げてきた。<sup>3</sup>この間に生物は酸素を電子受容体とする好気呼吸、酸化酵素、酸素添加酵素による酸素の利用能を獲得したが、これらは H<sub>2</sub>O を利用する Cyanobacteria 同様、酸素障害に対する防御機構を有していなければ成し得ないことであった。

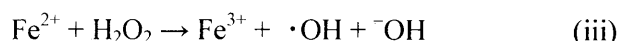
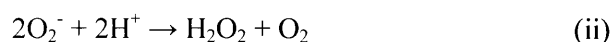
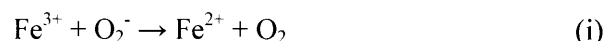
### 1.3. 活性酸素の生成、消去と SOD<sup>5</sup>

酸素障害は細胞成分の非特異的な酸化によってもたらされる。基底状態(3 重項状態、<sup>3</sup>O<sub>2</sub>)の酸素分子の反応性は低く、そのため酸素障害は反応性の高い酸素の還元分子種(O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH)および励起分子種(1 重項酸素、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)によって細胞組織が酸化されることによって生じる。この反応性の高い酸素の分子種を活性酸素と呼ぶ。

三重項酸素は反応性が低いため、生物は酵素による制御の下、酸素を活性化して基質の酸化反応、酸素添加反応に利用している。植物が H<sub>2</sub>O を 4 電子酸化して O<sub>2</sub> を発生する H<sub>2</sub>O 酸化酵素でも酵素に特異的な遊離しない活性酸素種が中間体となり、特定の基質の反応だけを触媒し、酸素、水を安全に利用している。

酸素障害はおもに活性酸素による生体分子の酸化によって生じるため、生物は酸素障害を防ぐため、まず活性酸素の生成量を低く保ち、さらに生成した活性酸素を消去することで生体分子の酸化を防いでいる。好気性生物は呼吸する O<sub>2</sub> の大部分を安全に利用しているが、酸化酵素、酸素添加酵素、自動酸化、光増感反応、遷移金属イオンによる触媒能などによって遊離の活性酸素が生成し、正常な細胞で良好な環境下でも活性酸素の発生をなくすことはできない。

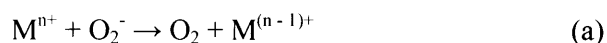
活性酸素のうち、最も反応性が高く、生物障害作用が最も大きいとされる<sup>•</sup>OH は、生体内では主に以下に示した式(i)~(iii)に基づいて産生される。



つまり、O<sub>2</sub><sup>-</sup>とその不均化反応により生じる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とから、鉄イオンの存在下において生成する。<sup>•</sup>OH はほとんどの細胞成分を拡散律速に近い速度で反応してしまうため、生物はこれを消去する機構を持つことはできない。そこで生物はむしろ<sup>•</sup>OH の発生源である O<sub>2</sub><sup>-</sup>と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> をできるだけ完全に消去し、さらに<sup>•</sup>OH の生成を触媒しない形で遷移金属イオンを存在させることにより、酸素障害を防いでいる。生体内でこの役割を果たしているのは主にスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とカタラーゼである。スーパーオキシドジスムターゼは O<sub>2</sub><sup>-</sup>を O<sub>2</sub>と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>へと不均化することにより消去する反応を、カタラーゼは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を O<sub>2</sub>と H<sub>2</sub>Oへと不均化することにより消去する反応を触媒している。

#### 1.4. SODの種類とその特徴

SODは先述したように $O_2^-$ を $O_2$ と $H_2O_2$ へと不均化することにより消去する反応を触媒する酵素である。SODの活性中心には、遷移金属イオンが含まれており、このイオンの種類によりCu, ZnSOD, FeSOD, MnSODに分類されている。Cu, ZnSODでは両イオンはともに四面体型構造をとっており、複核の活性中心を形成している。Cu, Zn-SODのZnイオン周りにはHis由来のimidazoleが2座、Asp残基のO原子が1座、Cuイオン周りにはHis由来のimidazoleが2座配位し、Cu, Znイオン間をimidazolateが架橋した構造をとっている(Figure 1-1)。<sup>6</sup>また、Fe-SOD, Mn-SODの活性中心はともに非常に類似した構造をとっており、中心金属にHis1由来のimidazoleが3座、Asp由来のカルボキシレートO原子が1座配位した四面体型構造をとっていることが明らかとなっている(Figure 1-2)。<sup>7,8</sup>いずれのSODも以下に示した反応(a), (b)をサイクルすることにより $O_2^-$ の不均化をおこなわれていると考えられている。



これらのSODはいずれもimidazole richな配位環境を有しており、特にFeSODとMnSODの活性中心周りの構造はほぼ同一である。Cu,ZnSODについては反応メカニズムについての検討もなされている。Cu,ZnSODは銅イオンが基質であるsuperoxideと電子授受をすることでCu(I), Cu(II)状態をサイクルし、superoxideの不均化を触媒していると考えられている。この際、Cu(I)状態では架橋imidazolateがプロトン化し、Cu(I)から脱離した構造をとっていることが予想されており、これは、銅イオンの電子状態のコントロール、superoxideの不均化に必要なとされるプロトンの供給などの役割を果たしていると考えられている。<sup>9</sup>

このようにこれらのSODは構造的、生物化学的、および理論的な研究が盛んにおこなわれ、その反応メカニズムについても知見が得られている。そんな中、1996年に活性中心にNiイオンを含むSODが*Streptomyces*属<sup>10,11</sup>およびCyanobacteria<sup>12</sup>から発見された。

#### 1.5. NiSODの活性中心の構造

NiSODの活性中心の構造はEXAFS測定の結果から、NiイオンにはS原子が配位していることが予想された。<sup>13</sup>また、ESR測定では $g_{\parallel}$ にhyperfine splittingをともなったNi(III)状態に特徴的な $d_{z^2}$ 基底のスペクトルを示すことが知られていた。これらのことから、NiSODはNi(II)/Ni(III)状態をサイクルすることでsuperoxideの不均化を行い、さらにNi(III)状態では中心金属であるNi(III)イオンの軸位にN原子が配位しているということが予想されてきた。

10-12,14

2004年にはNiSODの結晶構造が明らかになった。NiSODの活性中心の構造は他のSODとは大きく異なり、中心金属であるNi(II)イオンは平面4配位構造を有し、His1由来のamino N原子が1座、そのcis位にCys2由来のamidato N原子が1座配位し、残りの2座にはCys2, Cys6由来のthiolate S原子が配位していることが明らかとなった(Figure 1-3)。<sup>15,16</sup>また、酸化状態であるNi(III)型のNiSODの結晶構造も同時に報告され、Ni(III)イオンから約2.5 Åの距離に

His1 由来の imidazole N 原子が存在していたことから、NiSOD の Ni(III)状態の ESR スペクトルで観測された hyperfine splitting は His1 由来の imidazole N 原子の軸配位によるものであると考えられている。<sup>14</sup> しかしながら、末端 His を Gln に置換した SOD (HIQ-NiSOD) も同様の triplet の hyperfine splitting を示す<sup>17</sup> ことから NiSOD の活性中心の構造は結晶構造が明らかになった現在でもなお、議論の余地を残している。さらに第 2 配位圏に目を向けると、配位主鎖ペプチド由来の amidato O 原子と 2 つの水分子、Cys6 由来の thiolato S 原子とペプチド主鎖との水素結合がみられる。<sup>14</sup>

## 1.6. NiSOD をめぐる研究

結晶構造が明らかになったことで最も進展した分野は理論計算を用いた研究であり、現在では強い donor 性を有する amino-amidato-dithiolato 構造は HOMO 軌道における thiolato S 原子の寄与が小さく、metal-base で redox を起こすのに適した構造であること、<sup>18</sup>Ni(III)状態における imidazole の軸配位は redox active な軌道(SOMO)における Ni(III)イオンの寄与を大きくし、ligand-base の redox を防ぎ、さらにこの redox active な軌道に関わる Ni(III)イオンの軌道を  $dx^2-y^2$  軌道から  $dz^2$  軌道へと変化させることで Ni(III)イオンの軸方向から近づいてくると予想される superoxide との電子授受をよりスムーズに進行させる効果があることが予想されている。<sup>19,20</sup> また、superoxide の還元に必要なとされるプロトンの伝達経路に関する検討も行われており、現在のところ、直接中心金属に配位している Cys2 あるいは Cys6 残基由来の thiolato S 原子、<sup>21,22</sup> 活性中心近傍に存在する Tyr9 の phenolato O 原子<sup>22</sup> が候補に挙げられている。Superoxide 不均化の各段階における Ni(II)および Ni(III)イオンの spin 状態に関する検討も行われているが、<sup>21,23</sup> この研究はそれぞれの段階で仮定している構造がかなり恣意的なため、NiSOD のメカニズムを考える上での有力な情報にはなっていない。

NiSOD に関する研究で、理論計算を用いた研究以上に盛んに行われているのが mutant あるいは NiSOD のアミノ酸配列を模倣した metallo-origopeptide を用いた研究である。しかしながら、この分野の研究には SOD 活性の有無を報告する研究や、<sup>24</sup> mutant は天然の NiSOD に比して SOD 活性が落ちることから、「NiSOD の第 1、第 2 配位圏の構造は SOD 活性を発現する上で最適化された構造である」という結論に帰結する報告が多く、<sup>25-27</sup> そのメカニズムに言及する報告は、現在のところ superoxide の還元に必要なプロトンの伝達経路に関する提案がわずかになされているのみである。<sup>28</sup>

モデル研究の分野はこれらの研究よりも立ち遅れており、プロトンの伝達経路に言及したもの<sup>29</sup>を除けば、そのほとんどは錯体の結晶構造、分光学的、電気化学的性質を報告するにとどまっている。<sup>30-33</sup>

## 1.7. 本研究の目的

以上のように NiSOD に関する研究は未だ発展の途上にあり、そのメカニズムはもとより、その活性中心周りの構造は SOD 活性を発現する上でどのような必然性があるのかさえもほ

とんど明らかになっていない。また、モデル研究は未だ NiSOD への理解を深めることに貢献しているとは言い難い。

本研究ではモデル研究の長所を十分に生かすことができる以下の 4 点に注目した研究を行った。

- (1) NiSOD 第 1 配位圏の構造が SOD 活性を発現する上で果たす役割
- (2) NiSOD の活性中心の第 2 配位圏にみられる水素結合が中心金属の性質に与える影響
- (3) HIQ-NiSOD が天然の NiSOD の結晶構造と矛盾した EPR スペクトルを示す原因
- (4) Ni(III)状態における imidazole の軸配位が SOD 活性発現に果たす役割

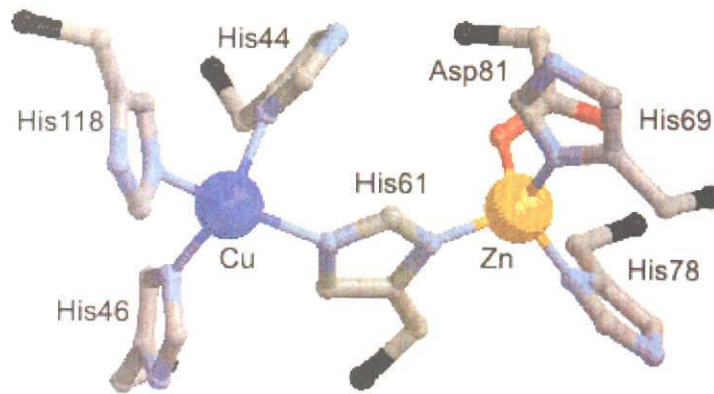
第 2 章では NiSOD 活性中心モデルとして diamino-dithioether 型、amino-amidato-thioether 型、および NiSOD と同様の amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体を合成し、第一配位圏の N 原子、S 原子の配位様式が中心金属の性質、特に電気化学的性質に与える影響について検討し、NiSOD の活性中心に見られる amino-amidato-dithiolato 型の配位構造が SOD 活性を発現する上で最も理にかなった  $N_2S_2$  型の配位様式であることを明らかにした。

第 3 章では NiSOD の活性中心の第 2 配位圏にみられる amidato O 部位、thiolato S 部位での水素結合が、NiSOD の活性中心の酸化還元電位に与える影響を検討するため、diamino-dithioether 型、amino-amidato-dithioether 型、および amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体を用い、amidato O 部位、thiolato S 部位での水素結合形成能の検討を行った。さらにこれらの水素結合が中心金属の酸化還元電位に与える影響を検討し、NiSOD の活性中心の第 2 配位圏にみられる amidato O 部位、thiolato S 部位での水素結合は中心金属の酸化還元電位を調整する上で重要な働きをしていることを明らかにした。

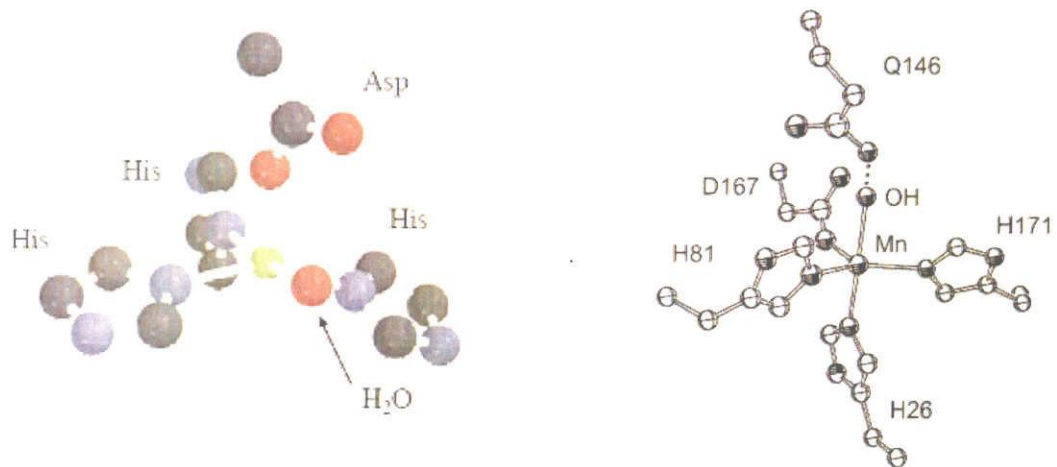
第 4 章では、HIQ-NiSOD が天然の NiSOD と異なった配位構造をとるのは NiSOD 活性中心にはこのような大きな構造変化を起こすだけの骨格構造の柔軟性があるためであると考え、amino-amidato-dithioether 型および amino-amidato-dithiolato 型 Ni(III)への外部配位子の配位に伴う構造変化の検討を行い、NiSOD 活性中心周りの骨格構造は大きな構造変化を起こすだけの柔軟性があることを明らかにした。

第 5 章では NiSOD の superoxide の還元過程に相当する各種 Ni(II)錯体と  $KO_2$  との反応を検討し、その結果生じた Ni(III)錯体の構造について考察した。さらに Ni(III)状態における imidazole の軸配位には、superoxide の還元過程において side-on 型の peroxo 種の生成を防ぎ、SOD 活性メカニズムを滞らせない効果があること、さらにこの配位には Ni(III)状態を安定化し、この過程の平衡を生成側に偏らせる効果があることを明らかにした。

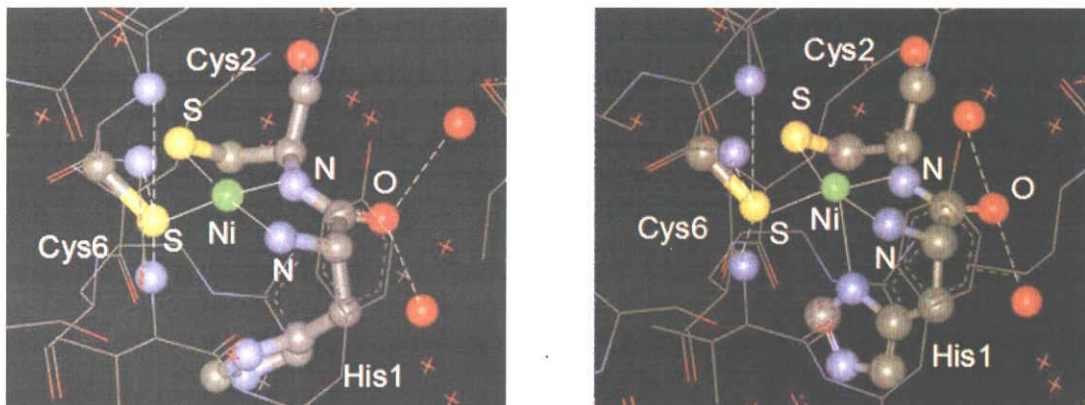
第 6 章では本論文を総括し、NiSOD の活性中心周りの構造の柔軟性、superoxide との反応性とその中間体の構造、および第 2 配位圏に見られる水素結合と SOD 活性との関連について言及し、結言とした。



**Figure 1-1.** Active site structure of Cu,ZnSOD



**Figure 1-2.** Active site structure of FeSOD (left) and MnSOD (right)



**Figure 1-3.** Active site structure of NiSOD in the reduced (left) and oxidized (right) state.

## 1.8. 参考論文

1. 原 光雄: 酸素の発見, 大日本出版, 東京 (1946)
2. 高宮 篤: 生命のエネルギー, pp. 1-56, 共立出版, 東京 (1978)
3. 小嶋 稔: 地球史入門, 岩波書店, 東京 (1987)
4. 浅田 浩二: 続分子進化学入門, pp. 195-226, 培風館, 東京 (1986)
5. 中野 稔, 浅田 浩二, 大柳 善彦: 活性酸素, 共立出版, 東京 (1988)
6. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., Richardson, D. C. *Nature* **1983**, *306*, 284-287.
7. Stallings, W. C., Powers, T. B., Pattridge, K. A., Ludwig, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.: Biol. Sci.* **1983**, *80*, 3879-3883.
8. Stallings, W. C., Ludwig, M. L. Pattridge, K. A., Ludwig, M. L. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 6424-6432.
9. Boedo, D.; Pesce, A.; Bolognesi, M.; Stroppolo, M. E.; Falconi, M.; Desideri, A., *Handbook of METALLOPROTEINS*, vol. 2, 1284-1300, WILEY.
10. Youn, H. D., Kim, E. J., Roe, J. H., Hah, Y. C., Kang, S. O. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 889-896.
11. Youn, H. D. Youn, H., Lee, J. W., Yim, I. Y., Lee, J. K., Hah, Y. C., Kang, S. O. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *334*, 341-348.
12. Plenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F. W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E. E. McCarren, J., Pausen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E. A., Waterbury, J. *Nature* **2003**, *424*, 1037-1042.
13. Szilagy, R. K., Bryngelson, P. A., Maroney, M. J., Hedman, B., Hodgson, K. O., Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3018-3019.
14. Choudhury, S. B., Lee, J.-W., Davidson, G., Yim, Y.-I., Bose, K., Sharma, M. L., Kang, S. O., Cabelli, D. E., Maroney, M. J. *J. Biochem.* **1999**, *38*, 3744-3752.
15. Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038-8047.
16. Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Carugo, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8569-8574.
17. Bryngelson, P. A., Arobo, S. E., Pinkham, J. L., Cabelli, D. E., Maroney, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 460-461.
18. Shearer, J.; Dehestani, A.; Abanda, F. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2649-2660
19. Fiedler, A. T.; Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J.; Brunold, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5449-5462.
20. Stenson, P. A.; Board, A.; Marin-Becerra, A.; Blake, A. J.; Davies, E. S. Wilson C.; McMaster, J.; Schröder, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2564-2576.
21. Pelmentschikov, V.; Siegbahn, P. E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7466-7475.

22. Prabhakar, R.; Morokuma, K.; Musaev, D. G. *J. Comput. Chem.*, **2006**, 1438-1445.
23. Neupane, K. P.; Gearty, K.; Francis, A.; Shearer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14605-14618.
24. Shesrer, J.; Long, L. M. *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 2358-2360.
25. Neupane, K. P.; Shearer, J. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10552-10566.
26. Krause, M. E.; Glass, A. M.; Jaxkson, T. A.; Laurence, J. S. *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 362-364.
27. Shearer, J.; Neupane, K. P.; Callan, P. E. *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 10560-10571.
28. Herbst, R. W.; Guce, A.; Bryngelson, P. A.; Higgins, K. A.; Ryan, K. C.; Cabelli, D. E.; Garman, S. C.; Maroney, M. J. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 3354-3369.
29. Gale, E. M.; Patra, A. K.; Harrop, T. C. *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 5620-5622.
30. Shearer, J.; Zhao, N. *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 9637-9639.
31. Fiedler, A. T.; Brunold, T. C. *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 8511-8523.
32. Ma, H.; Chattopadhyay, S.; Petersen, J.; Jensen, M. P. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 7966-7968.
33. Mullins, C. S.; Grapperhaus, C. A.; Frye, B. C.; Wood, L. H.; Hay, A. J.; Buchanan, R. M.; Mashuta, M. S. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 9974-9976.





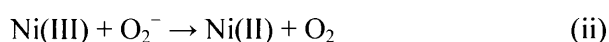
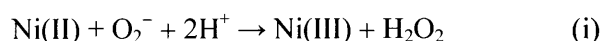
## 第2章

### N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>型 Ni(II)錯体による NiSOD 活性中心の第1配位圏の環境と酸化還元電位との関連性の検討

#### 2.1. はじめに

スーパーオキシドアニオン(superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>)は、酸素呼吸を行うことで生命活動に必要なエネルギーを獲得している生物にとって避けることのできない副生成物であり、それ自体が様々な生体分子に深刻な損害を与える活性酸素種であるのみならず、他の活性酸素種の発生源ともなる化学種である。そのため、好気性の生物はこの superoxide の脅威から身を守るため、超酸化物不均化酵素(superoxide dismutase (SOD))を有している。SOD は生体内で発生した superoxide を過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)と酸素(O<sub>2</sub>)へと不均化することで superoxide を除去する反応を触媒する酵素である。SOD の活性中心には一般的に金属イオンが含まれ、この金属イオンが superoxide の不均化の際、電子の移動を媒介している。

Ni 含有型 superoxide 不均化酵素(Ni-containing superoxide dismutase, NiSOD)は比較的近年に発見された SOD でその活性中心にはニッケルイオンが含まれ、以下に示したように Ni(II)および Ni(III)状態をサイクルすることで superoxide の不均化を触媒している。<sup>1</sup>



X 線結晶構造解析により NiSOD の構造が明らかにされ、Ni(II)状態では、末端 His 由来の amino N 原子、peptide backbone 由来の脱プロトン化した amidato N 原子および Cys2 および Cys6 由来の thiolato S 原子が中心金属である Ni(II)イオンに配位した平面 4 配位構造をとっていることが知られている(Figure 2-1)。<sup>2,3</sup>

SOD 活性を発現する上で最も重要とされる条件の一つとして中心金属の酸化還元電位があげられる。その範囲は-0.16 ~ +0.89 V (vs. NHE)とされており<sup>4</sup>、NiSOD はこの条件をよく満たした Ni(II)/(III)の酸化還元電位(0.29 V)<sup>5</sup>を示すことが知られている。

本章では NiSOD 活性中心モデルとして diamino-dithioether 型、amino-amidato-thioether 型、および NiSOD と同様の amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>) および Na[Ni(L3)] (Figure 2-2)を合成し、第一配位圏の N 原子、S 原子の配位様式が中心金属の性質、特に電気化学的性質に与える影響について検討し、NiSOD の活性中心に見られる amino-amidato-dithiolato 型の配位構造が SOD 活性を発現する上で最も理にかなった N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>型の配位様式であることを明らかにした。

## 2.2. 実験

2-Benzylmercapto-2-methylpropanoic acid<sup>6</sup> および 2-chloro-1-methylpyridinium iodide<sup>7</sup> は既報の方法に従い合成した。Benzylmercaptane および methyl iodide はナカライテスク社より、Ni(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O および [Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>] は Sigma-Aldrich 社より購入した特級試薬をそのまま用いた。(n-Bu)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> は東京化成工業株式会社より購入した特級試薬を再結晶したものをを用いた。その他の試薬は和光純薬工業株式会社より購入した特級試薬をそのまま用いた。

### 2.2.1. 配位子合成

配位子 L1 の合成スキームを Scheme 2-1 に、L2, L3 の合成スキームをそれぞれ Scheme 2-2, に示した。

#### 2.2.1.1. *N,N'*-Bis(2-benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-1,2-diaminoethane の合成

2-Benzylmercapto-2-methylpropanoic acid を 2.0 g (9.5 mmol)、2-chloro-1-methylpyridinium iodide<sup>20</sup> を 2.4 g (9.5 mmol)、Et<sub>3</sub>N を 1.0 g (9.5 mmol)、MeCN 200 ml に溶解させた。1 時間攪拌した後、ethylenediamine 0.3 g (4.7 mmol) 及び Et<sub>3</sub>N 1.0 g (9.5 mmol) を溶解させた MeCN 50 ml を加え、3 時間攪拌した。反応終了後減圧濃縮により MeCN を除去し、析出した固体を H<sub>2</sub>O 及び少量の Et<sub>2</sub>O で洗浄することにより目的物を得た。(収量 1.67 g, 収率 80%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz); 1.52 (s, 12H), 3.19 (t, 4H), 3.73 (s, 4H), 7.27 (m, 10H).

#### 2.2.1.2. *N,N'*-Bis(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

*N,N'*-Bis(2-benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-1,2-diaminoethane 1.8 g (4 mmol) を蒸留 THF 100 ml に溶解させ、窒素置換した。これを氷冷下、蒸留した THF 50 ml 中において NaBH<sub>4</sub> 1.14 g (30 mmol) と BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O 8.5 g (60 mmol) を混合して調製した B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> を加え、16 時間還流した。放冷後、少量の MeOH で残存の B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> を分解した後、H<sub>2</sub>O 100 ml を加え、減圧濃縮により THF を除去した。その後 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて pH 9 とし、Et<sub>2</sub>O によって抽出をおこなった。Et<sub>2</sub>O 層を飽和食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた後、Et<sub>2</sub>O を減圧濃縮によって取り除き、透明の油状物を得た。(収量 1.20 g, 収率 72%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz); 1.33 (s, 12H), 2.54 (s, 4H), 2.58 (s, 4H), 3.70 (s, 4H) 7.27 (m, 10H).

#### 2.2.1.3. *N,N'*-Bis(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

窒素気流下、-78 °C において *N,N'*-bis(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 1.0 g (2.4 mmol) を溶解させた蒸留 THF 2.4 g を含む液体 NH<sub>3</sub> 200 ml に Na 1.0 g を加えて 30 分攪拌した。NH<sub>4</sub>Cl を添加することで反応を停止し、窒素気流下、常温で放置することにより NH<sub>3</sub> を気化させた後、H<sub>2</sub>O 50 ml を加え、pH 12 において Et<sub>2</sub>O で抽出することで不純物を Et<sub>2</sub>O 相に抽出した後、水相を 12 N HCl により pH 9 として Et<sub>2</sub>O で抽出をおこなった。Et<sub>2</sub>O 層を飽和

NaCl 水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた後、減圧濃縮することで Et<sub>2</sub>O を除去し、透明の油状物を得た。(収量 0.43 g, 収率 76 %)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz); 1.38(s, 12H), 2.62(s, 4H), 2.79(s, 4H).

#### 2.2.1.4. *N,N'*-Bis(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane (H<sub>2</sub>L1)の合成

*N,N'*-Bis(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 0.7 g (3 mmol)の EtOH 溶液 50 ml に Na 0.2 g (6.5 mmol)を溶解させ、CH<sub>3</sub>I 0.9 g (6.5 mmol)を添加し、40 °C で 2 時間攪拌した。反応終了後、減圧濃縮により EtOH を除去し、得られた油状物をシリカゲルカラムにより精製(溶離液;CHCl<sub>3</sub>)した。溶離液を減圧濃縮によって除去し、透明の油状物を得た。(収量 0.56 g, 収率 70 %)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz); 1.30(s, 12H), 1.99(s, 6H), 2.60(s, 4H), 2.82(s, 4H).

#### 2.2.1.5. *N*-(2-Benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-1,2-diaminoethane の合成

MeCN 100 ml に 2-benzylmercapto-2-methylpropanoic acid 4.0 g (19 mmol), 2-chloro-1-methyl-pridinium iodide 4.8 g (19 mmol), Et<sub>3</sub>N 2.0 g (19 mmol) を加え 1 時間攪拌した。Et<sub>3</sub>N 2.0 g (19 mmol)を加えた 1,2-diaminoethane 20 ml にこの溶液を滴下し、一晩攪拌した。反応後、減圧濃縮により MeCN を除去し、さらに真空ラインにて未反応の 1,2-diaminoethane を除去し、橙色油状物を得た。この油状物に H<sub>2</sub>O 100 ml を加え、NaOH にて pH 12 にした後 AcOEt で抽出を行うことにより透明な油状物を得た。(収量 3.1 g, 収率 63 %)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.56 (s, 6H), 2.78 (t, 2H), 3.20 (q, 2H), 3.76 (s, 2H), 7.29 (m, 5+1H).

#### 2.2.1.6. *N*-(2-Benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

蒸留した THF 150 ml に *N*-(2-benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-1,2-diaminoethane 3.1 g (12.0 mmol)を加え、窒素置換を行った。蒸留した THF 50 ml 中で NaBH<sub>4</sub> 1.7 g (45 mmol), BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O 12.8 g (90 mmol)を混合することにより調製した B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> 0.76 g (45 mmol)をこの溶液に加え、20 時間還流した。反応終了後、放冷した後に過剰の B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> を少量の MeOH を添加することで分解し、さらに H<sub>2</sub>O 50 ml を加え、減圧濃縮により THF および MeOH を除去した。得られた溶液を NaOH にて pH 12 にし、AcOEt で抽出することで透明の油状物を得た。さらにこれをシリカゲルカラム(溶離液; CH<sub>3</sub>Cl:MeOH = 20:1)で精製し、透明の油状物を得た。(収量 2.0 g, 収率 70 %)

<sup>1</sup>H-NMR δ (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.34 (s, 6H), 1.86 (br, 2H), 2.51 (s, 2H), 2.54 (q, 2H), 2.73 (t, 2H), 3.70 (s, 2H), 7.32 (m, 5H).

#### 2.2.1.7. *N*-(2-Benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

MeCN 100 ml に 2-benzylmercapto-2-methylpropanoic acid 1.77 g (8.35 mmol), 2-chloro-1-methyl-pyridinium iodide 2.1 g (8.35 mmol), Et<sub>3</sub>N 0.88 g (8.35 mmol) を加え 1 時間攪拌した。この溶液を Et<sub>3</sub>N 0.88 g (8.35 mmol), *N*-(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 2.0 g (8.35 mmol) を溶解させた MeCN 50 ml と混合し、一晩攪拌した。反応後、減圧濃縮により MeCN を除去し、褐色油状物を得た。この油状物に H<sub>2</sub>O 100 ml を加え、NaOH にて pH 12 にした後 AcOEt で抽出を行い、褐色油状物を得た。さらにこれをシリカゲルカラム(溶離液; CH<sub>3</sub>Cl:MeOH = 20:1)で精製し、透明の油状物を得た。(収量 2.6 g, 収率 69%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.32 (s, 6H), 1.53 (s, 6H), 2.47 (s, 2H), 2.54 (t, 2H), 3.17 (q, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 7.21-7.35 (m, 10H), 7.37 (br, 1H).

#### 2.2.1.8. *N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane (L3) の合成

蒸留した THF 10 ml に *N*-(2-benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 2.6 g (5.8 mmol) を溶解させ、この溶液に液体 NH<sub>3</sub> 100 ml を加えた。この溶液に金属 Na 1.0 g (43 mmol) を添加し、窒素気流下にて 1 時間攪拌した。NH<sub>4</sub>Cl を加えることで反応を停止させ、窒素気流下で十分に液体 NH<sub>3</sub> を蒸発させた後、H<sub>2</sub>O 50 ml を加え、pH 12 において Et<sub>2</sub>O で抽出することで不純物を Et<sub>2</sub>O 相に抽出した。得られた水相に 12 N 塩酸を加えて pH 8~9 とし、AcOEt で抽出を行い、透明油状物を得た。(収量 1.25 g, 収率 83%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.38 (s, 6H), 1.60 (s, 6H), 2.62 (s, 2H), 2.85 (t, 2H), 3.35 (q, 2H), 7.46 (br, 1H).

#### 2.2.1.9. *N*-(2-methylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane (L2) の合成

*N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 1.3 g (5.2 mmol) を溶解させた EtOH 100 ml に CH<sub>3</sub>I 1.47 g (10.4 mmol) を添加し、40 °C で 3 時間攪拌した。溶媒である EtOH を減圧濃縮により除去し、透明の油状物を得た。この油状物を H<sub>2</sub>O 100 ml に溶解させ、pH 12 において Et<sub>2</sub>O で 3 回抽出した。Et<sub>2</sub>O 相を飽和食塩水で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた後 Et<sub>2</sub>O を減圧濃縮により除去することで透明の油状物を得た。(収量 1.25 g, 収率 86%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.29 (s, 6H), 1.50 (s, 6H), 1.98 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.56 (s, 2H), 2.80 (t, 2H), 3.36 (q, 2H), 7.45 (br, 1H).

## 2.2.2. 錯体合成

### 2.2.2.1. [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の合成

配位子 L1 (*N,N'*-Bis(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane) 0.26 g (1 mmol) を MeOH 10 ml に溶解させ、MeOH 10 ml に溶解させた Ni(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.37 g (1 mmol)をこの溶液に添加したところ橙色の粉末が沈殿した。この粉末の acetone 溶液に Et<sub>2</sub>O を蒸気拡散させることで赤色板状結晶が得られた。(収量 0.41g, 収率 78%)

元素分析

計算値(C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NiO<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) : C, 27.61; H, 5.41; N, 5.37%.

実測値 : C, 27.72; H, 5.66; N, 5.50%.

UV-vis スペクトル(MeOH)

$\lambda_{\max}$  ( $\epsilon_M$ ) 221 (7600), 278 (8300), 474 (210).

### 2.2.2.2. [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)の合成

配位子 HL2 (*N*-(2-methylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane) 0.53 g (1.90 mmol)を MeOH 10 ml に溶解させた溶液に MeOH 10 ml に溶解させた NaOMe 0.11 g (2.02 mmol)を添加し 15 分攪拌した。この溶液に MeOH 5 ml に溶解させた Ni(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.50 g (1.88 mmol)を滴下したところ、溶液の色が暗赤色へと変化した。一晚攪拌した後 MeOH を減圧濃縮により除去したところ暗赤色の固体が得られた。この固体を MeCN に溶解させ、溶け残った白色粉末を濾去した溶液を濃縮し、Et<sub>2</sub>O を添加したところ橙色粉末が沈殿した。この粉末を MeCN 1 ml に溶解させ、これに Et<sub>2</sub>O を蒸気拡散することで橙色の結晶を得た。(収量 0.55 g, 収率 67%)

元素分析

計算値(C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>NiO<sub>5</sub>S<sub>2</sub>) : C, 33.09; H, 5.78; N, 6.43%.

実測値 : C, 33.00; H, 5.53; N, 6.35%.

UV-vis スペクトル(MeOH)

$\lambda_{\max}$  ( $\epsilon_M$ ) 251 (7500), 292 (3600), 438 (290), 535 (sh 56).

### 2.2.2.3. Na[Ni(HL3)]の合成

グローブボックス内にて DMF 10 ml に溶解させた配位子 H<sub>4</sub>L3 (*N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane) 1.25 g (4.98 mmol)に NaH 0.72 g (29.9 mmol)を添加し、15 分攪拌した。この溶液に 5 ml の DMF に溶解させた NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.71 g (3.0 mmol)を滴下したところ、溶液の色が暗赤色へと変化した。一晚攪拌した後、白色の不溶物(NaCl)を濾去し、この溶液をシュレンク管に移し、真空ラインで DMF を除去したところ、橙色の固体を得た。この固体を 10 ml の MeCN に溶解させ、白色の不溶物(NaCl)を再度濾

去した。この溶液を濃縮し、AcOEt を添加したところ橙色の粉末が得られたのでこれを濾取した。この粉末を MeCN に溶解させ、Et<sub>2</sub>O を蒸気拡散させることで赤色結晶を得た。(収量 0.41 g, 収率 42 %)

#### ESI-MS (ES<sup>-</sup>)

計算値(C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>ONi) : m/z = 305.0.

実測値 : m/z = 305.1.

#### UV-vis スペクトル(MeOH)

$\lambda_{\max}$  ( $\epsilon_M$ ) 256 (12000), 442 (180), 560 (sh 33).

### 2.2.3. 測定機器

#### 2.2.3.1. <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

測定装置は配位子の測定については Varian Gemini-300 型 300 MHz フーリエ変換(FT)核磁気共鳴装置を使用した。溶媒は内部基準物質としてテトラメチルシラン(TMS)を含む CDCl<sub>3</sub> を使用し、内径 5 mm のサンプルチューブ内に濃度 5~10 mM に調製した試料溶液について測定した。錯体溶液をサンプルとした測定には BRUKER・BIOSPIN AVANCE 600 型 600 MHz フーリエ変換(FT)核磁気共鳴装置を使用した。溶媒には TMS を含む各種重溶媒を使用し、内径 5 mm のサンプルチューブ内に濃度 20 mM に調製した試料溶液について測定した。

#### 2.2.3.2. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光製 Ubest V-550 型紫外可視吸収分光光度計を使用し、最大波長領域 900~200 nm について測定を行った。セルは光路長が 1 cm の石英セルを使用し、サンプルの濃度は 0.1~1 mM に調製した溶液を使用した。

#### 2.2.3.3. サイクリックボルタンメトリー

測定装置は ALS/CH Instruments Electrochemical Analyzer Model 600A を使用した。サンプルは、各種錯体を 1 mM になるように acetone に溶解させ、支持電解質として(n-Bu)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> を 0.1 M になるように溶解させた溶液を用いた。測定は作用極にはグラッシーカーボン、対極には白金線、参照極には Ag/Ag<sup>+</sup>電極を用い、掃引速度 0.1 V/s でおこなった。観測された電位は Fc/Fc<sup>+</sup>基準の電位に換算した後、次の式を用いて NHE 基準の電位へと換算した(NHE = Fc/Fc<sup>+</sup> + 0.40)。<sup>8</sup>

#### 2.2.3.4. X線結晶構造解析

回折データの測定には一辺が 0.2 mm の大きさの単結晶をガラスファイバーの先端に固定したものを使用した。格子定数は 15° < 2 $\theta$  < 25° の範囲内の適当な強度の回折点を用い、最小

二乗法により精密化を行った。

強度測定には Rigaku/MSM Mercury CCD を用い、グラフィットで単色化した Mo  $K\alpha$  線を X 線源として、50 kV, 200 mA において測定を行った。測定条件は、カメラ長 45 mm、 $2\theta$  は  $20^\circ$ 、露光時間 10 秒で測定を行った。反射イメージは 1200 枚測定し、全反射データに対し Lorentz 因子および偏光因子の補正を加えた後、全反射を用いて解析を行った。

構造は直接法<sup>9</sup>により解析し、差フーリエ合成で得られなかった水素原子の座標は、計算によって求めた。非水素原子には異方性温度因子を適用し、異常分散による補正および吸収補正を実行し、完全マトリックス最小二乗法で精密化した。最小にした関数は  $\sum w(|F_o| - |F_c|)^2$ 、 $w^{-1} = \sigma^{-2}(F_o)$  である。原子散乱因子は International Tables for X-ray Crystallography Vol.IV<sup>10</sup>に記載の値を用いた。構造解析、精密化等の計算は *CrystalStructure* 構造解析プログラム<sup>11</sup>により行った。



## 2.3. 結果

### 2.3.1. 各種錯体の結晶構造

#### 2.3.1.1. [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の結晶構造

[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の結晶学的パラメーターを Table 2-1 に、ORTEP 図を Figure 2-3 に、主な結合長、結合角を Table 2-2 に示した。[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>は2つの amino N 原子と2つの thioether S 原子が equatorial 位にそれぞれ *cis*-型に配位した C<sub>2</sub> 対称の平面 4 配位構造を有していた。Ni-N 間距離(1.931(4) Å)、および Ni-S 間距離(2.197(1) Å)は3つの5員環 chelate を有する diamine あるいは dithioether 型 Ni(II)錯体のそれとほぼ同様の値であった。<sup>12-15</sup>

#### 2.3.1.2. [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)の結晶構造

[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)の結晶学的パラメーターを Table 2-3 に、ORTEP 図を Figure 2-4 に、主な結合長、結合角を Table 2-4 に示した。[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)は2つの N 原子、および2つの S 原子が配位した平面 4 配位構造をとっていた。Ni-N1 (amidato)間距離(1.844(4) Å)は、Ni-N2 (amine)間距離(1.915(3) Å)よりも短い値であった。これは amidato N 原子の強い donor 性に由来するものと考えられる。Ni-S1 間距離(2.174(1) Å)は Ni-S2 間距離(2.167 (1) Å)よりもわずかに長かった。これは amidato 側の C-C-N 結合角と amino 側の C-C-N 結合角の違いに由来するものと考えられる。これらの結合長は3つの5員 chelate 環を有する N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 型平面 4 配位構造の Ni(II)錯体とほぼ同等の値であった。<sup>12-15</sup>

#### 2.3.1.3. Na[Ni(L3)]の結晶構造

Na[Ni(L3)]の結晶学的パラメーターを Table 2-5 に、ORTEP 図を Figure 2-5 に、主な結合長、結合角を Table 2-6 に示した。Na[Ni(L3)]は還元状態(Ni(II)状態)の NiSOD と同様の1つの amino N 原子、1つの amidato N 原子、および2つの thiolato S 原子が Ni(II)イオンに配位した平面 4 配位構造をとっていた。Ni-N1 間距離(1.867(9) Å)は3つの5員 chelate 環を有する N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 型 Ni(II)錯体の Ni-N<sub>amidato</sub> 間距離と同程度の値であり、<sup>12-15</sup>Ni-N2 間距離(1.913(9) Å)よりも小さい値であった。これは amidato N 原子の donor 性が amino N 原子のそれよりも強いことに由来していると考えられる。Ni-S2 間距離(2.171(3) Å)は Ni-S1 間距離(2.146(3) Å)よりも長く、これは amidato N 原子の強い donor 性によるトランス効果によるものと考えられる。

### 2.3.2. 各種 Ni(II)錯体の吸収スペクトル

[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>), Na[Ni(L3)]は MeOH 中で配位 S(π)→Ni(dx<sup>2</sup>-y<sup>2</sup>)イオンへの LMCT に帰属される吸収極大<sup>16</sup>をそれぞれ 474 nm ( $\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} = 210$ ), 438 nm ( $\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} = 290$ ), 442 nm ( $\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} = 180$ )および 472 nm ( $\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} = 250$ )に示した。この吸収は平面 4 配位<sup>12-15,17-19</sup>を有する Ni(II)錯体に特徴的なものである。このことから、これらの Ni(II)錯体はいずれも溶液中においても結晶構造解析によって得られた構造を維持していると考えられる。

これらの Ni(II)錯体および関連する N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 型平面 4 配位 Ni(II)錯体および NiSOD の極大吸収の比較を Table 2-7 にまとめた。

### 2.3.3. 各種 Ni(II)錯体の電気化学的性質

[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> は acetone 中で Ni(I)/(II) に対応する準可逆な酸化還元を -0.68 V (vs. NHE,  $\Delta E = 65$  mV) に、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中で Ni(II)/Ni(III) に対応する擬可逆な酸化還元過程を 1.71 V ( $\Delta E = 226$  mV) に示した。Ni(II)錯体 [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>) は acetone 中で Ni(I)/(II) に対応する準可逆な酸化還元対を -1.13 V ( $\Delta E = 67$  mV) に、Ni(II)/(III) に対応する可逆な酸化還元対を 1.26 V ( $\Delta E = 78$  mV) に観測した。Ni(II)錯体 Na[Ni(L3)] は DMF 中において -0.16 V ( $\Delta E = 74$  mV) に Ni(II)/(III) に対応する可逆な酸化還元波を示した。Ni(I)/(II) に対応する酸化還元波は観測されなかった。

これらの錯体の Ni(I)/(II) および Ni(II)/(III) に対応する酸化還元過程はいずれも可逆性が高いことから、この錯体は酸化還元に伴った溶媒の配位、あるいは配位構造の再構成といった構造変化を生じないと考えられる。

## 2.4. 考察

各種  $N_2S_2$  型平面 4 配位 Ni(II)錯体および NiSOD の配位 S 原子から Ni(II)イオンへの LMCT に帰属される極大吸収の比較を Table 2-7 に示す。これらの Ni(II)錯体の極大吸収波長は、amidato N 原子の配位を多く有する錯体ほど、また、thioether S 原子よりも thiolato S 原子の配位を有する錯体ほど短波長に現れる。これは donor 性の強い amidato N 原子の配位が多いほど、Ni(II)イオンの d 軌道のエネルギーが上昇し、また、配位 S 原子が thiolato から thioether へと変化すると S 原子の 3p 軌道のエネルギーが低下することに起因すると考えられる。また、NiSOD と同様の amino-amidato-dithiolato 型の配位環境を有する  $Na[Ni(L3)]$  および  $(Et_3N)[Ni(beaam)]^{12}$  は一連の  $N_2S_2$  型平面 4 配位構造を有する Ni(II)錯体の中で最も NiSOD (450 nm)<sup>17</sup> に近い極大吸収波長を示すことから、NiSOD 活性中心における中心金属イオンの電子状態には、その第一配位圏の N 原子、S 原子の配位様式が大きく影響を与えていることがわかる。

2.1.項にも示したように、SOD 活性を発現するためにはその中心金属の酸化還元電位が非常に重要である。SOD 活性を発現する上で求められる電位の幅は  $-0.16 \sim +0.89$  V (vs. NHE)<sup>4</sup> であるといわれており、実際に NiSOD は 0.29 V と、この条件をよく満たした酸化還元電位を示す。<sup>5</sup>

一連の  $N_2S_2$  型 Ni(II)平面 4 配位錯体、および Ni(II)/(III)に対応する NiSOD の酸化還元電位を Table2-8 にまとめた。

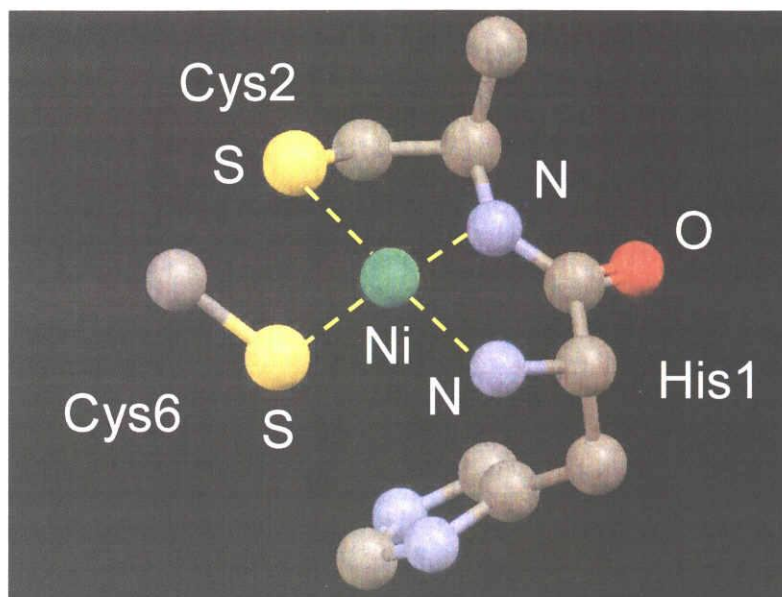
各種錯体の電気化学的性質を比較すると、中心金属の酸化還元電位は、amidato N 原子、thiolato S 原子といった donor 性が高い配位原子が多いほど負側に現れ、また、錯体の全電荷が正であるか負であるかによって大きく異なることがわかる。全電荷が正または中性である Ni(II)錯体の酸化還元電位はいずれも 1 V 以上であり、SOD 活性を発現するには高すぎる。一方、全電荷が負である Ni(II)錯体の Ni(II)/(III)に対応する酸化還元電位はいずれも 0 V 以下と全電荷が正または中性である Ni(II)錯体の場合に比べるとかなり低い。しかしながら、全電荷が 2 価の負に帯電した  $[Ni(emi)]^{2-}$  の酸化還元電位は  $-0.50$  V と SOD 活性を発現するには低すぎる。ところが、全電荷が 1 価の負に帯電した amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体  $Na[Ni(HL3)]$  および  $(Et_3N)[Ni(beaam)]^{12}$  の酸化還元電位はそれぞれ、 $-0.16$  V および  $-0.04$  V であり、一連の  $N_2S_2$  型平面 4 配位構造を有する Ni(II)錯体の中で最も SOD 活性を発現する上で適切な酸化還元電位を示す。従って、NiSOD 活性中心 amidato-amino-dithiolato 型の構造は中心金属の酸化還元電位を SOD 活性の発現に必要なとされる電位幅に収めるために必要な原子の組み合わせであるといえる。

## 2.5. 結論

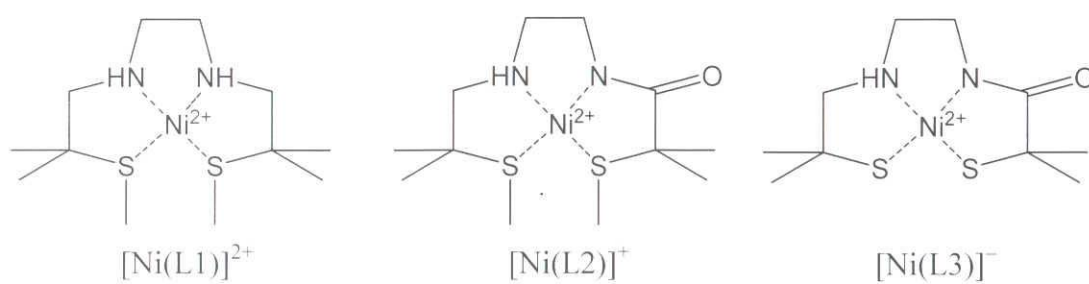
本章では NiSOD 活性中心モデルとして diamino-dithioether 型、amino-amidato-dithioether 型、および NiSOD と同様の amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II) 錯体として  $[\text{Ni}(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$ 、 $[\text{Ni}(\text{L2})](\text{ClO}_4)$  および  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L3})]$  を合成し、その結晶構造、分光学的、電気化学的性質を明らかにした。

一連の  $\text{N}_2\text{S}_2$  型 Ni(II) 錯体の分光学的、電気化学的性質を NiSOD と比較したところ、NiSOD 活性中心における中心金属の性質は、第 1 配位圏における N 原子、S 原子の配位様式に強く依存している。吸収スペクトルにおいては amidato N 原子が多いほど、また、thiolato S 原子の配位を thioether に置き換えるとより短波長に観測されることが明らかになった。

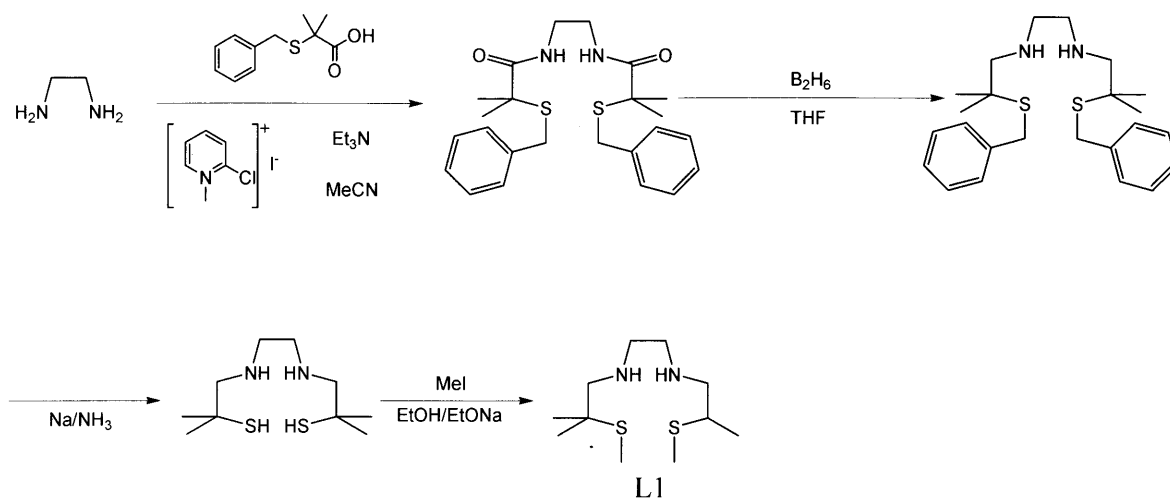
さらに、一連の  $\text{N}_2\text{S}_2$  型 Ni(II) 錯体の酸化還元電位の比較により、Ni(II)/(III) に対応する酸化還元電位は第 1 配位圏の構造のみで 2 V 以上も異なり、中心金属の酸化還元電位は同じ  $\text{N}_2\text{S}_2$  型の配位構造であっても、N 原子、S 原子の配位様式の影響を非常に強く受けることが明らかになった。中でも amino-amidato-dithiolato 型の配位構造を有する  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L3})]$  は一連の錯体の中で天然の NiSOD に最も近い酸化還元電位を示した。このことから NiSOD 活性中心に見られる amino-amidato-dithiolato 型の配位構造は、中心金属の酸化還元電位を与える SOD 活性を発現する上で最も適切な  $\text{N}_2\text{S}_2$  型の配位様式であることが明らかになった。



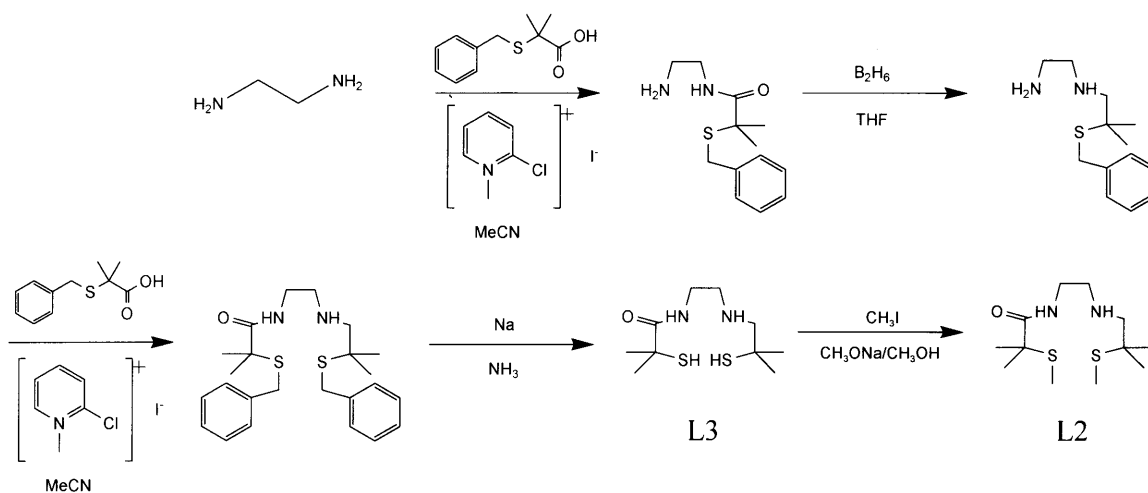
**Figure 2-1.** Structures of NiSOD active site in the reduced state.



**Figure 2-2.** Ni(II) complexes prepared as a model compound of NiSOD active site.



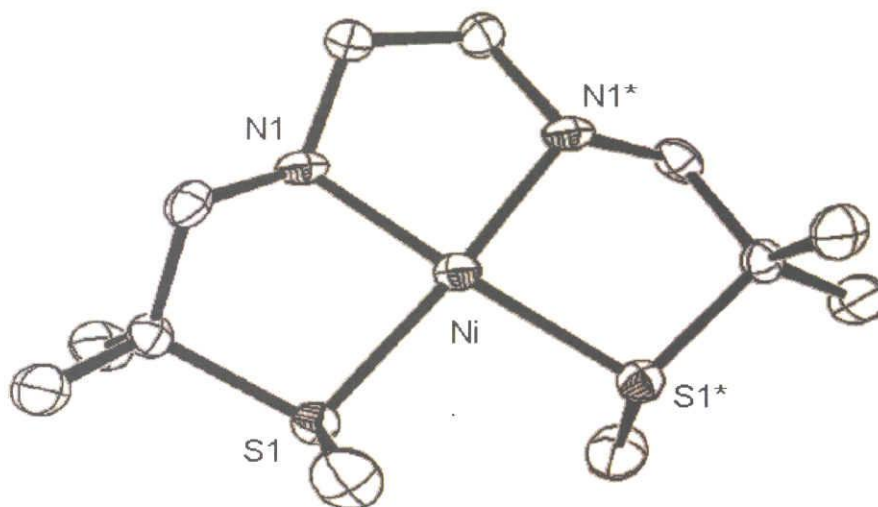
**Scheme 2-1.** Synthetic scheme of L1 and its Ni(II) complex.



**Scheme 2-2.** Synthetic scheme of H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>L<sub>3</sub>.

**Table 2-1.** Crystallographic data of [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Empirical formula	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> NiO <sub>8</sub> S <sub>2</sub>
Formula weight	522.09
Crystal system	monoclinic
Space group	<i>C</i> 2/ <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	17.864(4)
<i>b</i> (Å)	8.569(2)
<i>c</i> (Å)	13.909(3)
$\beta$ (°)	107.176(3)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	2034.2(8)
<i>Z</i>	4
<i>D</i> calcd	1.705
Unique refls. ( <i>R</i> int)	2297 (0.019)
<i>R</i> / <i>R</i> <sub>w</sub>	0.0452/0.1452
GOF	1.018



**Figure 2-3.** ORTEP drawing of the cation moiety of [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> with thermal ellipsoids drawn at 50 % probability. The hydrogen atoms and counter anions (perchlorate) are omitted for clarity. The atoms with and without an asterisk are related by the crystallographic two-fold axis.

**Table 2-2.** Selected bond lengths and angles of [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

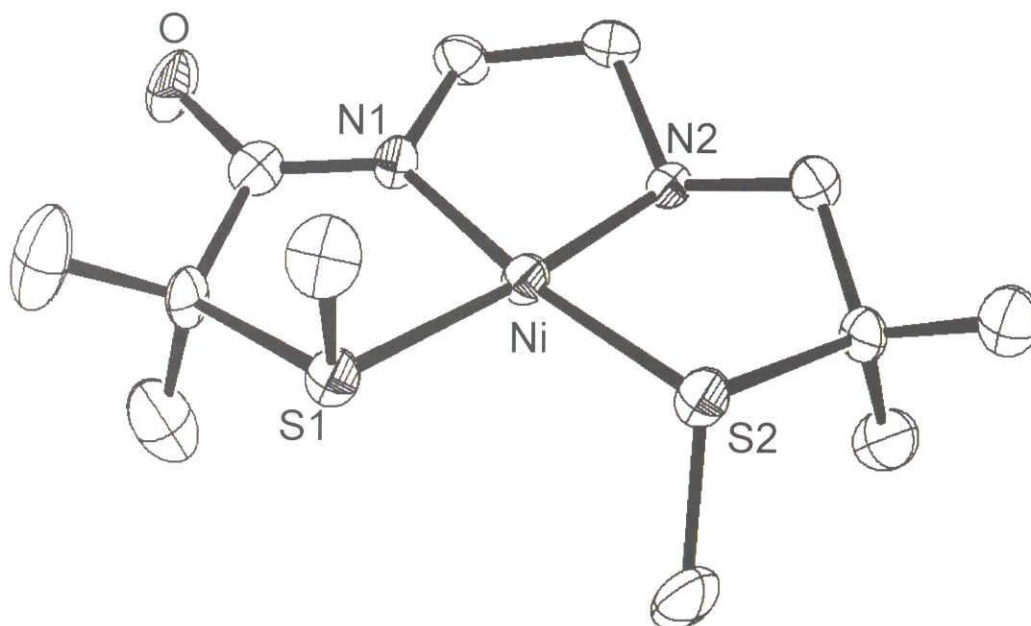
Bond Lengths (Å)			
Ni-N	1.924(3)	Ni-S	2.1981(10)
Bond Angles (°)			
N1-Ni-N1*	87.26(13)	N1-Ni-S1*	173.97(8)
N1-Ni-S1	88.60(9)	S1-Ni-S1*	95.85(4)

The atoms with and without an asterisk are related by the crystallographic two fold axis

**Table 2-3.** Crystallographic data of [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)

Empirical formula	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> NiO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
Formula mass	435.61
Crystal system	monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	10.9799(8)
<i>b</i> (Å)	8.0567(5)
<i>c</i> (Å)	21.4381(16)
$\beta$ (°)	98.494(4)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1875.6(2)
<i>Z</i>	4
<i>D</i> calcd	1.542
Unique refls. ( <i>R</i> int)	4028 (0.048)
<i>R</i> / <i>R</i> <sub>w</sub>	0.0414/0.0770
GOF	0.885





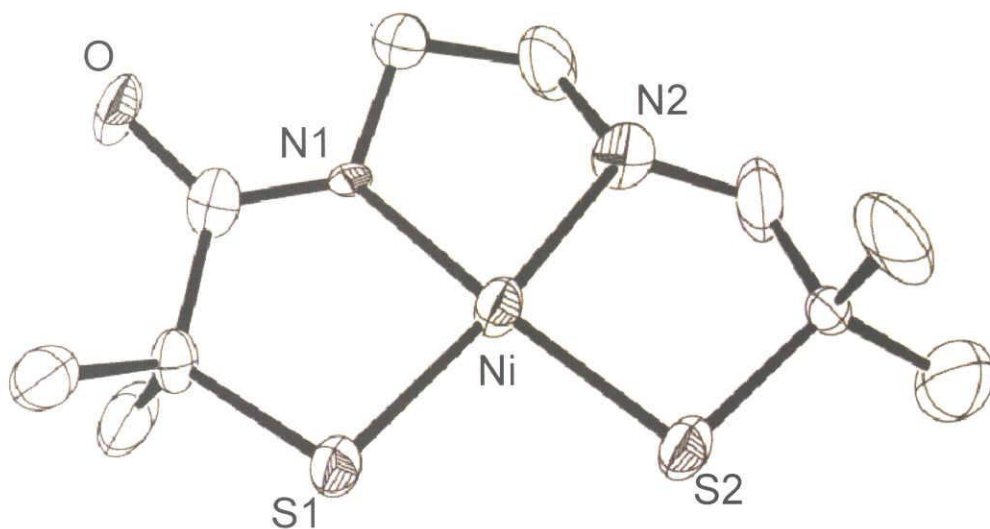
**Figure 2-4.** ORTEP drawing of the cation moiety of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  with thermal ellipsoids drawn at 50 % probability. The hydrogen atoms and counter anion (perchlorate) are omitted for clarity.

**Table 2-4.** Selected bond lengths and angles of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$

Bond Lengths (Å)			
Ni-N1	1.845(3)	Ni-S1	2.1772(9)
Ni-N2	1.909(2)	Ni-S2	2.1692(10)
Bond Angles (°)			
N1-Ni-N2	85.91(11)	N2-Ni-S1	173.83(9)
N1-Ni-S1	87.96(8)	N1-Ni-S2	172.46(9)
S1-Ni-S2	96.63(3)	N2-Ni-S2	89.40(8)

**Table 2-5.** Crystallographic data of Na[Ni(L3)]

Empirical formula	$C_{12}H_{24}N_2NaNiO_{1.50}S_2$
Formula weight	366.14
Crystal system	monoclinic
Space group	$C2/c$
$a$ (Å)	20.823(8)
$b$ (Å)	11.363(4)
$c$ (Å)	15.760(6)
$\beta$ (°)	114.602(6)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	3390(2)
$Z$	8
$D$ calcd	1.614
Unique refls. ( $R$ int)	3891 (0.102)
$R/R_w$	0.0359/0.0707
GOF	0.985



**Figure 2-5.** ORTEP drawing of anion moiety of Ni(II) complex Na[Ni(L3)] with thermal ellipsoids drawn at the 50% probability. The hydrogen atoms and counter cation ( $Na^+$ ) are omitted for clarify.

**Table 2-6.** Selected bond lengths and angles of Na[Ni(L3)].

Bond Lengths (Å)			
Ni-N1	1.867(9)	Ni-S1	2.146(3)
Ni-N2	1.913(9)	Ni-S2	2.171(3)
Bond Angles (°)			
N1-Ni-N2	86.4(4)	N2-Ni-S1	173.9(2)
N1-Ni-S1	88.0(3)	N1-Ni-S2	176.1(3)
S1-Ni-S2	95.89(13)	N2-Ni-S2	89.7(2)

**Table 2-7.** Comparison of absorption maxima of the related Ni(II) complexes.

Complex	amidato	thiolato	$\lambda_{\max}$ / nm	Ref.
Ni[(emi)] <sup>2-</sup>	2	2	430	13
[Ni(beam)] <sup>-</sup>	1	2	461	12
[Ni(HL3)] <sup>-</sup>	1	2	443	This work
NiSOD	1	2	450	5
[Ni(bmmp-dmed)]	0	2	480	14
[Ni(ema)·(Me) <sub>2</sub> ]	2	0	416	15
[Ni(HL2)] <sup>+</sup>	1	0	438	This work
[Ni(H <sub>2</sub> L1)] <sup>2+</sup>	0	0	474	This work

**Table 2-8.** Comparison of redox potentials for Ni(II)/(III) process of the related Ni(II) complexes.

Complex	amidato	thiolato	$E$ / V (vs. NHE)	Ref.
Ni[(emi)] <sup>2-</sup>	2	2	-0.50	13
[Ni(beam)] <sup>-</sup>	1	2	-0.04	12
[Ni(HL3)] <sup>-</sup>	1	2	-0.16	This work
NiSOD	1	2	0.29	5
[Ni(bmmp-dmed)] <sup>-</sup>	0	2	1.04 ( $E_{pa}$ )	14
[Ni(ema)·(Me) <sub>2</sub> ]	2	0	1.24	15
[Ni(HL2)] <sup>+</sup>	1	0	1.26	This work
[Ni(H <sub>2</sub> L1)] <sup>2+</sup>	0	0	1.71	This work

## 2.6. 參考論文

1. Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 889-896.
2. Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038-8047.
3. Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Carugo, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8569-8574.
4. Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, 2239-2314.
5. Herbst, R. W.; Guce, A.; Bryngelson, P. A.; Higgins, K. A.; Ryan, K. C.; Cabelli, D. E.; Garman, S. C.; Maroney, M. J. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 3354-3369.
6. Mach, R. H.; Kung, H. F.; *Organic Mass Spectrometry*, **1991**, *26*, 528-530.
7. Saigo, K.; Usui, M.; Kikuchi, K.; Shimada, E.; Mukaiyama, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1863-1866.
8. Gange, R. R.; Coval, C. A.; Lisensky, G. C. *Inorg. Chem.*, **1980**, *19*, 2854-2855.
9. Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Burla, M.; Polidori, G.; Camalli, M. *J. Appl. Cryst.* **1994**, *27*, 435-436.
10. *International Tables for X-ray Crystallography*, Ibers, J. A.; Hamilton, W. C. eds., Kynoch Press, Birmingham, U. K., **1974**, Vol. IV.
11. Rigaku Corporation, Tokyo, Japan **2007**.
12. Shearer, J.; Zhao, N. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9637-9639.
13. Ciurli, S.; Holm, R. H.; *Inorg. Chem.*, **1991**, *30*, 743-750.
14. Grapperhaus, C. A.; Mullins, C. S.; Kozlowski, P. M.; Mashuta, M. S. *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 2859-2866.
15. Hatlevik, O.; Blanksma, M. C.; Mathrubootham, V.; Arif, A. M.; Hegg, E. L. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, *9*, 238-246.
16. Neupane, K. P.; Shearer, J. *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 10552-10566.
17. Green, K. N.; Brothers, S. M.; Jenkins, R. M.; Carson, C. E.; Grapperhaus, C. A.; Darensbourg, M. Y. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7536-7544.
18. Fiedler, A. T.; Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J.; Brunold, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5449-5462.



### 第3章

## N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>型 Ni(II)錯体による NiSOD 活性中心第2配位圏に見られるアミダト部位、チオラト部位での水素結合と SOD 活性との相関性

### 3.1. はじめに

NiSOD の活性中心における第1配位圏の構造は、Ni(II)状態では His1 由来の amino N 原子、主鎖ペプチド由来の脱プロトン化した amidato N 原子、および Cys2 および Cys6 側鎖由来の thiolato S 原子が2つ配位した平面4配位構造を、Ni(III)状態ではさらに末端 His 側鎖由来の imidazole が配位した構造であることは知られている。<sup>1,2</sup>

一般的に、SOD 活性を発現する上で重要なファクターとして中心金属の酸化還元電位があげられ、その範囲は-0.16 ~ +0.89 V (vs. NHE)とされている<sup>3</sup>。第2章では、第1配位圏に見られる amino-amidato-dithiolato 型の配位構造が、一連の N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>型の配位様式の中で SOD 活性を発現する上で最も理にかなった酸化還元電位を与える配位様式であることを明らかにした。しかしながら、Na[Ni(HL3)]は、天然の NiSOD と同様の amino-amidato-dithiolato 型の配位構造を有しているにもかかわらず、DMF 中において-0.16 V と、NiSOD の酸化還元電位(0.29 V (vs. NHE))<sup>4</sup>と比べて 0.5 V 近くも低い値を示した。このことから、第1配位圏の構造は、中心金属の酸化還元電位をおおまかに調節する効果があるものの、それのみでは SOD 活性を発現する中心金属の酸化還元電位を与えるには不十分であると考えられる。

そこで、NiSOD 活性中心の第2配位圏に着目すると、還元型、酸化型両状態において、主鎖ペプチド由来の amidato O 原子は2つの水分子と、Cys 6 残基由来の thiolato S 原子は主鎖ペプチド由来の3つの NH プロトンと水素結合距離にあることが見出される(Figure 3-1)<sup>2</sup>。

本章では NiSOD の活性中心の第2配位圏にみられる amidato O 部位、thiolato S 部位での水素結合が、NiSOD の活性中心の酸化還元電位に与える影響を検討するため、第2章でも用いた diamino-dithioether 型 Ni(II)錯体として[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、amino-amidato-dithioether 型 Ni(II)錯体として[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)、amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体として Na[Ni(L3)] (Figure 3-2)について、amidato O 部位、thiolato S 部位での水素結合形成能の検討を行った。さらにこれらの水素結合が中心金属の酸化還元電位に与える影響を検討し、NiSOD の活性中心の第2配位圏にみられる amidato O 部位、thiolato S 部位での水素結合が中心金属の酸化還元電位を調整する上で重要な働きをしていることを明らかにした。

## 3.2. 実験

$(n\text{-Bu})_4\text{NBF}_4$  は東京化成工業株式会社より購入した特級試薬を再結晶したものをを用いた。その他の試薬は和光純薬工業株式会社より購入した特級試薬をそのまま用いた。

### 3.2.1. 配位子、錯体合成

Ni(II)錯体 $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$ 、 $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$ および $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$ は第2章で報告した方法に従い合成した。

### 3.2.2. 測定機器

#### 3.2.2.1. $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

測定装置はBRUKER-BIOSPIN AVANCE 600型 600 MHz フーリエ変換(FT)核磁気共鳴装置を使用した。溶媒には $\text{MeCN-d}_6$ 、 $\text{DMSO-d}_6$ 、 $\text{MeOH-d}_4$ および $\text{D}_2\text{O}$ を使用し、内径5 mmのサンプルチューブ内に濃度20~100 mMに調製した試料溶液について測定を行った。

#### 3.2.2.2. $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

測定装置はBRUKER-BIOSPIN AVANCE 600型 600 MHz フーリエ変換(FT)核磁気共鳴装置を使用した。溶媒には $\text{MeCN-d}_6$ 、 $\text{MeOH-d}_4$ および $\text{D}_2\text{O}$ を使用し、内径5 mmのサンプルチューブ内に濃度20~100 mMに調製した試料溶液について測定を行った。

#### 3.2.2.3. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光製 Ubest V-550型紫外可視吸収分光光度計を使用し、最大波長領域900~200 nmについて測定を行った。セルは光路長が1 cmの石英セルを使用し、サンプルの濃度は1.0 mMに調製した溶液を使用した。

#### 3.2.2.4. 赤外吸収スペクトル

測定は日本分光社のFT/IR-4200を使用し、測定領域 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ について測定した。サンプルは10~100 mMに調製した錯体溶液を $\text{CaF}_2$ のセルに注入したものをを用いた。

#### 3.2.2.5. サイクリックボルタンメトリー

測定装置はALS/CH Instruments Electrochemical Analyzer Model 600Aを使用した。サンプルは、各種錯体を1 mMになるように溶解させ、支持電解質として、有機溶媒中での測定には $(n\text{-Bu})_4\text{NBF}_4$ を、水溶液中での測定には $\text{NaClO}_4$ を0.1 Mになるように溶解させた溶液を用いた。測定は、作用極にグラッシーカーボン、対極に白金線、参照極には、有機溶媒中での測定には $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ 電極を、水溶液中での測定には $\text{Ag}/\text{AgCl}$ 電極を用い、掃引速度0.1 V/sでおこ

なった。観測された電位は  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  基準の電位に換算した後、次の式を用いて NHE 基準の電位へと換算した ( $\text{NHE} = \text{Fc}/\text{Fc}^+ + 0.40$ )。<sup>5</sup>

#### 3.2.2.6. 磁化率測定

測定装置は Sherwood Scientific 社の MSB-MKI を使用した。測定溶媒には acetone, DMF, PC, MeCN, DMSO, EtOH, MeOH, H<sub>2</sub>O を使用し、内径 3.2 mm のサンプルチューブ内に 100 mM あるいは飽和濃度に調製した試料溶液について測定を行った。



### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 各種 Ni(II)錯体の溶液中における磁氣的性質

[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)および Na[Ni(L3)]の各種溶媒中における磁性、および吸収スペクトルにおける極大吸収の値を Table 3-1 にまとめた。

##### 3.3.1.1. [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の各種溶媒中における磁氣的性質

Evans 法による磁化率測定の結果、diamino 型 Ni(II)錯体である[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>は MeCN、DMSO、DMF 中で常磁性を示し、acetone、PC、EtOH、MeOH 中で反磁性を示した。この結果は UV-vis スペクトルによっても支持され、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>は MeCN、DMSO、DMF 中において Ni(II) high-spin 種に特徴的な吸収スペクトルを示し、acetone、PC、EtOH、MeOH において Ni(II) low-spin 種に特徴的な吸収スペクトルを示した。この[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の溶媒の違いによる磁性の変化は、MeCN、DMSO、DMF の Ni(II)中心への配位により、平面 4 配位から 6 配位 8 面体構造に変化したことに由来すると考えられる。

##### 3.3.1.2. [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の各種溶媒中における磁氣的性質

Evans 法による磁化率測定の結果、amino-amidato 型 Ni(II)錯体である[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)は MeCN、DMSO、DMF、PC、EtOH および MeOH 中において反磁性を示し、UV-vis スペクトルにおいても上記のいずれの溶媒中においても Ni(II) low-spin 種に特徴的なスペクトルを示し、[Ni(HL2)](ClO<sub>4</sub>)はいずれの溶媒中においても平面 4 配位構造を保っていることが示された。

##### 3.3.1.3. Na[Ni(L3)]の各種溶媒中における磁氣的性質

Na[Ni(L3)]は MeCN-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>、MeOH-d<sub>4</sub> および D<sub>2</sub>O 溶液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定において常磁性領域にシグナルが観測されなかった。Evans 法による磁化率測定においては MeCN、DMF、DMSO、MeOH 中で反磁性を示した。DMA、DMF、MeCN、DMSO、MeOH、EtOH、H<sub>2</sub>O 中で Ni(II)平面 4 配位錯体に特徴的な吸収スペクトルを示した。以上のことからこれらのいずれの溶媒中においても Ni(II) low-spin 状態、すなわち平面 4 配位構造を保っており、Ni(II)中心への溶媒の配位は起こらないことが示された。

[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>と[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)、Na[Ni(L3)]との間にこのような溶媒分子の配位挙動の違いが見られたのは、[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の配位 N 原子がいずれも 2 級アミンおよび thioether であるのに対し、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)および Na[Ni(L3)]は donor 性の強い脱プロトン化した amidato N 原子および thiolato S 原子の配位を有していることに由来していると考えられる。

### 3.3.2. amidato O 原子と溶媒分子との間の相互作用

#### 3.3.2.1. $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$ の amidato O 原子と溶媒分子との間の水素結合の検討

$[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の各種溶媒中における amidato 部位の C=O 伸縮振動数と溶媒の求電子的性質の指標である acceptor number (AN)<sup>6</sup> との相関を Table 3-2 および Figure 3-3 に示す。 $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の C=O 伸縮振動と溶媒の AN はほぼ直線関係にあり、より AN の大きい溶媒中でより低い C=O 伸縮振動の値を観測した。このことから  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  は amidato O 部位で溶媒分子と求核的な相互作用をしていることが示唆された。このことは同錯体の <sup>13</sup>C-NMR スペクトルにおける  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  のカルボニル炭素の chemical shift 値と測定に用いた溶媒の acceptor number との間に直線関係が見られたことから支持される (Table 3-3、Figure 3-4)。なお、AN と  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の S 原子から Ni(II) イオンへの LMCT と帰属される極大吸収波長には相関は見られなかった。

#### 3.3.2.2. $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$ の amidato O 原子と溶媒分子との間の相互作用

$\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  の各種溶媒中で観測された C=O 伸縮振動に対応する波数 ( $\text{cm}^{-1}$ ) の溶媒の AN 依存性を Table 3-4、Figure 3-5 に示す。

$\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  は、より AN の大きい溶媒中でより低い C=O 伸縮振動の値を示し、両者はほぼ直線関係にあった。このことから  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  は amidato O 部位で溶媒分子と求核的な相互作用をすることが示された。

#### 3.3.2.3. amidato O 部位と溶媒分子との間の相互作用が電気化学的性質に与える影響

amidato O 原子と溶媒分子との間の水素結合が中心金属である Ni(II) イオンの酸化還元電位に与える影響を検討するため、diamino 型 Ni(II) 錯体である  $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  と amino-amidato 型錯体である  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の各種溶媒中における酸化還元電位を比較した。なお、spin 状態の違いが酸化還元電位に与える影響を排除するため、 $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  の電気化学的測定はすべて反磁性を示した溶媒 (acetone、PC、MeOH、EtOH) 中で得られた値のみを比較に用いた。

各種溶媒中における  $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  および  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の酸化還元電位と測定に用いた溶媒の acceptor number との相関を Table 3-5 および Figure 3-6 に示す。 $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  および  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  はいずれの溶媒中においても可逆な酸化還元波を示した。 $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  は全体的に  $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  よりも低い酸化還元電位を示した。これは  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  が脱プロトン化した負電荷を有する amidato N 原子の配位を有しているためであると考えられる。

Ni(II) 錯体  $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  と  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の酸化還元電位の測定に用いた溶媒の AN に対する依存性を比較したところ、amidato 部位を有する  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  は amidato 部位を有さない  $(\text{ClO}_4)_2$  よりも強く依存すること明らかになった。これは  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  の amidato O 原子と溶媒分子との間に働く求核的な相互作用により、amidato N 原子から Ni(II) 中心への donor 性が

低下するためであると考えられる。このことは[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)の酸化還元電位が各種溶媒中で観測された C=O 伸縮振動とよい相関にあることから支持される(Table 3-6, Figure 3-7)。

### 3.3.3. Thiolato S 原子と溶媒分子との間の求核的相互作用

#### 3.3.3.1. Na[Ni(L3)]の吸収スペクトルの AN 依存性

Na[Ni(L3)]の各種溶媒中における吸収スペクトルにおける S 原子から Ni(II)イオンへの LMCT に帰属される極大吸収波長およびそのモル吸光係数を Table 3-7 に、極大吸収波長と溶媒の AN との関係を Figure 3-8、Figure 3-9 にまとめた。Na[Ni(L3)]の各種溶媒中における極大吸収波長およびそのモル吸光係数と溶媒の AN とはほぼ直線関係にあり、より AN の大きい溶媒中で極大吸収波長はより短波長側に観測され、モル吸光係数は小さくなることを見出された。一方、Na[Ni(L3)]の DMF 溶液に 1000 等量の(*n*-Bu)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>を添加した際、その吸収スペクトルに変化は見られなかったが、NH<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>を添加した場合には溶媒の AN 依存性と類似した極大吸収波長の短波長シフト、およびモル吸光係数の減少がみられた(Figure 3-10)。このような短波長シフトは N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 型 Ni(II)錯体の thiolato S 原子の配位を thioether に置き換えた場合とよく似た現象である。<sup>7-11</sup> これは、配位 S 原子の p<sub>π</sub> 軌道のエネルギーが溶媒分子との相互作用により低下したためであると考えられる。これは S 原子が thiolato ではなく、thioether として配位している[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)にはこのような溶媒依存性は見られなかったことから推測される。

以上の結果より、溶媒の AN の増大に伴う極大吸収波長の短波長シフトは、Na[Ni(L3)]と溶媒分子との間の求核的な相互作用の存在を示唆するものであり、その相互作用により配位子 L3 の Ni(II)中心への donor 性が低下していると考えられる。

#### 3.3.3.2. Na[Ni(L3)]の thiolato S 部位の酸化電位と AN との相関

Na[Ni(L3)]の各種溶媒中における thiolato S 原子の酸化に由来する E<sub>pa</sub> の値と溶媒の AN との関係を Table 3-8、Figure 3-11 に示した。

Na[Ni(L3)]の thiolato S 原子の酸化に対応する E<sub>pa</sub> は、より AN の大きい溶媒中でより高い値を示し、両者はほぼ直線関係にあった。これは thiolato S 原子も溶媒分子と求核的な相互作用を生じており、E<sub>pa</sub> の高電位シフトは S 原子上の電子密度が低下したためであると考えられる。

#### 3.3.3.3. Na[Ni(L3)]の amidato O 部位および thiolato S 部位における溶媒分子との求核的相互作用が中心金属の酸化還元電位に与える影響

3.3.2.2., 3.3.3.1.および 3.3.3.2.項から Na[Ni(L3)]は NiSOD 活性中心周辺における水素結合様式と同様、amidato O 部位および thiolato S 部位の双方において溶媒分子と求核的相互作用を生じることが示された。本項ではこの水素結合が SOD 活性を発現する上で重要であると考え、

中心金属の酸化還元電位に与える影響について検討した。

Na[Ni(L3)]の各種溶媒中における Ni(II)/(III)に対応する  $E_{pa}$  の値を Table 3-9 に、 $E_{pa}$  と溶媒の AN との関係 Figure 3-12 にまとめた。Na[Ni(L3)]は、AN の大きい溶媒中でより高い  $E_{pa}$  の値を示し、両者は直線関係にあった。また、特に水溶液中で観測された  $E_{pa}$  は 0.30 V (vs. NHE) と天然の NiSOD で観測されている中心金属の酸化還元電位(0.29 V,  $E_{1/2}$ )<sup>4</sup> とほぼ同程度の値を示した。また、Na[Ni(L3)]の DMF 中における Ni(II)/(III)に対応する酸化還元電位( $E_{1/2}$ )は、電解質を(*n*-Bu)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> から NH<sub>4</sub>BF<sub>4</sub> に変更した際、-0.16 V から-0.05 V へと 0.11 V 正側にシフトした(Figure 3-13)。このことから Ni(II)錯体 Na[Ni(L3)]の酸化還元電位の溶媒依存性は Ni(II)錯体 Na[Ni(L3)]の amidato O 部位、および thiolato S 部位での求核的な相互作用に起因していると考えられる。

### 3.4. 考察

NiSOD の活性中心の配位構造は amino-amidato-dithiolato 型の平面 4 配位構造である<sup>1,2</sup>。第 2 章では NiSOD と同様の amino-amidato-dithiolato 型の平面 4 配位錯体 Na[Ni(L3)]は関連する一連の N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 型 Ni(II)錯体のいずれよりも SOD 活性を発現する上で必要な電位の範囲(-0.16 ~ 0.89 V (vs. NHE))<sup>3</sup>に近い酸化還元電位を示し、SOD 活性を発現する上で必要不可欠な構造であることを示した。しかしながら、Na[Ni(L3)]が DMF 中において示した酸化還元電位(-0.16 V)は天然の NiSOD の酸化還元電位(0.29 V)<sup>4</sup>よりも 0.5 V 近くも低いものであった。この傾向は他の amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体にも見られる<sup>7</sup>。以上のことから NiSOD 活性中心は配位骨格構造に加えて、付加的な外的要因により最適な電位を与えられていることが予想される。

NiSOD の活性中心の第 2 次配位圏に目を向けると、主鎖ペプチド由来の amidato O 原子が 2 つの水分子と水素結合を形成していることがわかる<sup>2</sup>。

本章では[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)、および Na[Ni(L3)]の分光学的、電気化学的性質と溶媒の AN との相関性から、これらの錯体は NiSOD と同様、amidato O 部位、thiolato S 部位の双方で溶媒分子と相互作用を形成し得ることを明らかにした。また、この相互作用は中心金属への donor 性を低下させるのみでなく、thiolato S 原子の電子密度を低下させる効果があることが明らかになった。NiSOD は基質である superoxide と中心金属である Ni(II)、Ni(III)イオンとの間で電子の授受を行うことで superoxide の不均化を触媒している。一方で、thiolato S 原子は superoxide や peroxide などの活性酸素種や O<sub>2</sub> 分子によって容易に酸化される。このような thiolato S 原子の酸化は触媒活性を失活の原因となりうる。そのため、NiSOD 活性中心にみられる Cys6 残基由来の thioalto S 原子と主鎖ペプチド由来の NH プロトンとの水素結合には、thiolato S 原子の電子密度を低下させ、その酸化を防止する効果があると考えられる。

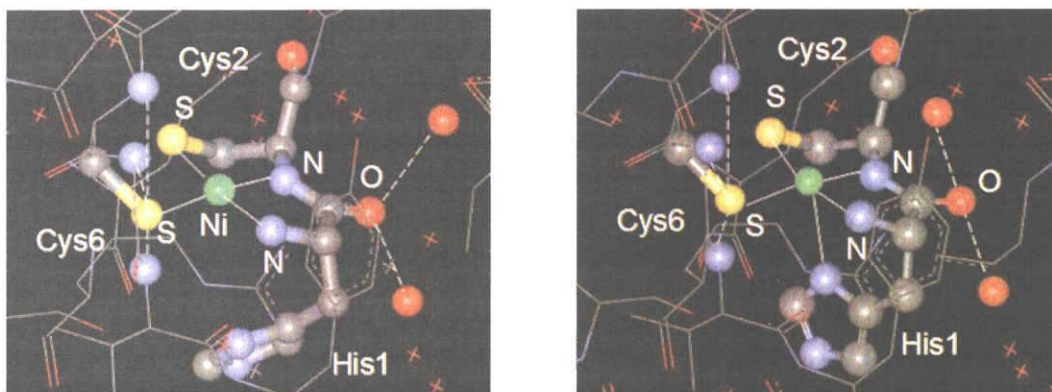
Na[Ni(L3)]の amidato O 部位および thiolato S 部位にみられた溶媒分子との求核的な相互作用が中心金属の酸化還元電位に影響を与え、その結果、特に水溶液中で天然の NiSOD とほぼ同様な酸化還元電位を示したことは興味深い。このことは NiSOD の活性中心の酸化還元電位は、第 1 配位圏の配位構造と、第 2 配位圏の水素結合によって触媒反応により最適な電位に調整されていることを示唆している。

### 3.5. 結論

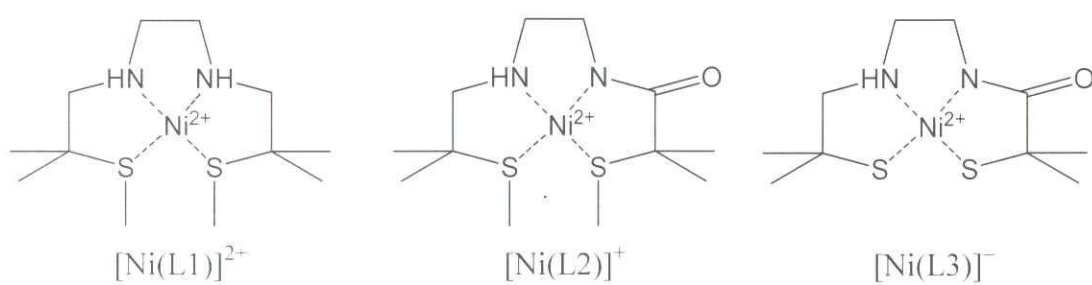
本章では NiSOD の第 2 配位圏にみられる amidato O 原子と水分子との水素結合、および thiolato S 原子と主鎖ペプチドの NH プロトンとの水素結合相互作用の影響を検討するため、diamino-dithioether 型 Ni(II)錯体である  $[\text{Ni}(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$ 、amino-amidato-dithioether 型 Ni(II)錯体である  $[\text{Ni}(\text{L2})](\text{ClO}_4)$ 、amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体である  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L3})]$ を用いて分光学的、電気化学的性質の溶媒依存性を検討した。

各種 Ni(II)錯体の溶媒中における分光学的、電気化学的性質の溶媒の AN 依存性から、amidato O 部位および thiolato S 部位は双方とも溶媒分子と水素結合が形成可能であることが示された。また、thiolato S 部位における相互作用には thiolato S 原子の電子密度を低下させ、その酸化を防ぐはたらきがあることが示唆された。

さらにこの相互作用には配位原子から中心金属への donor 性を低下させ、Ni(II)イオンの酸化還元電位を高め、水中においては NiSOD とほぼ同程度の酸化還元電位を示すことが明らかになった。このことから NiSOD が示す酸化還元電位は第 1 配位圏の配位環境に加え、第 2 配位圏の amidato O 部位および thiolato S 部位との水素結合によって調整されていることが示唆された。



**Figure 3-1.** Hydrogen bonds observed around the active site of NiSOD in the reduced (left) and oxidized (right) states the hydrogen bonds are shown with a dotted line.



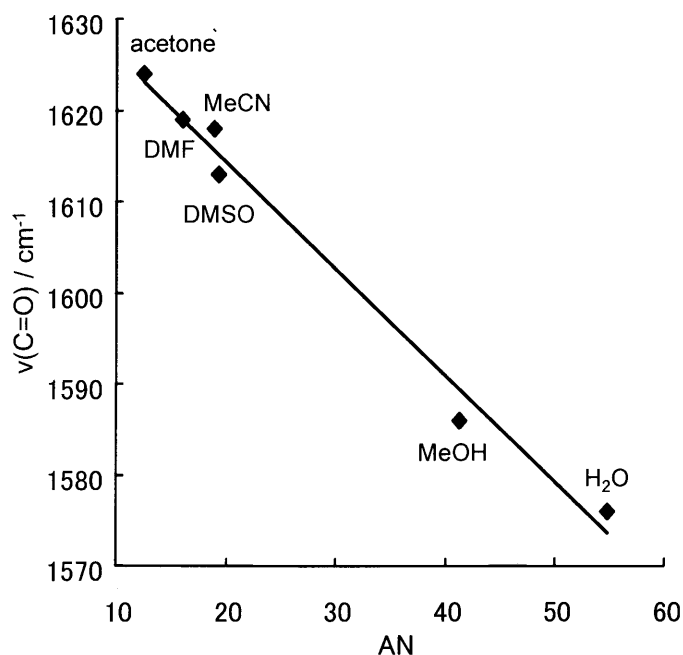
**Figure 3-2.** Ni(II) complexes prepared as a model compound of NiSOD active site.

**Table 3-1.** Electronic absorption spectral data and magnetic properties of Ni(II) complexes, [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>) and Na[Ni(L3)], in several solvents

complex	DMA	DMF	MeCN	DMSO	acetone	PC	EtOH	MeOH	H <sub>2</sub> O
[Ni(L1)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	379 (30) 614 (13) ~900 (24)	352 (50) 535 (20) 826 (30)	394 (16) 642 (7) ~900 (15)	478 (260)	476 (290)	476 (200)	475 (210)	-
	-	paramagnetism			diamagnetism				
[Ni(L2)](ClO <sub>4</sub> )	-	435 (290)	436 (330)	435 (250)	436 (390)	-	435 (310)	436 (300)	439 (310)
	-	diamagnetism							
Na[Ni(L3)]	448 (360)	449 (340)	445 (330)	446 (340)	-	-	441 (280)	441 (260)	438 (230)
	diamagnetism								

**Table 3-2.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $\nu(\text{C}=\text{O})$  values of [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>) in several solvents

solvent	acetone	DMF	MeCN	DMSO	MeOH	H <sub>2</sub> O
acceptor number	12.5	16.0	18.9	19.3	41.3	54.8
$\nu(\text{C}=\text{O}) / \text{cm}^{-1}$	1624	1619	1618	1613	1586	1576

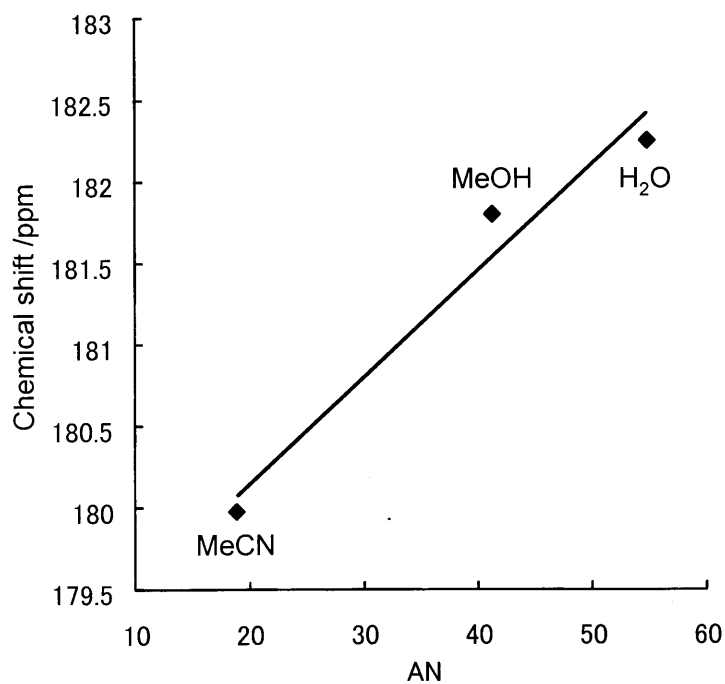


**Figure 3-3.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $\nu(\text{C}=\text{O})$  values of [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>).



**Table 3-3.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of the carbonyl carbon of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  in several solvents

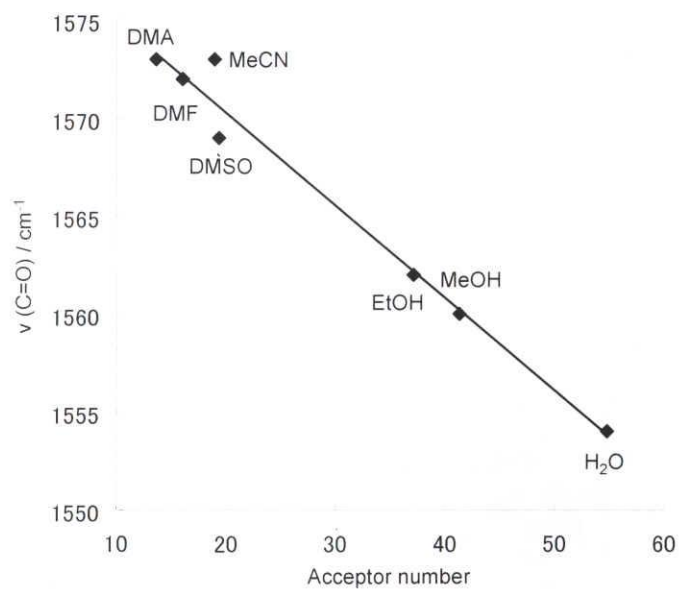
solvent	$\text{CD}_3\text{CN}$	$\text{CD}_3\text{OD}$	$\text{D}_2\text{O}$
acceptor number	18.9	41.3	54.8
chemical shift / ppm	180.0	181.8	182.3



**Figure 3-4.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of the carbonyl carbon of Ni(II) complex of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  in several solvents.

**Table 3-4.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $\nu(\text{C}=\text{O})$  values of  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  in several solvents

Solvent	DMA	DMF	MeCN	DMSO	EtOH	MeOH	H <sub>2</sub> O
acceptor number	13.6	16.0	18.9	19.3	37.1	41.3	54.8
$\nu(\text{C}=\text{O}) / \text{cm}^{-1}$	1573	1572	1573	1569	1562	1560	1554

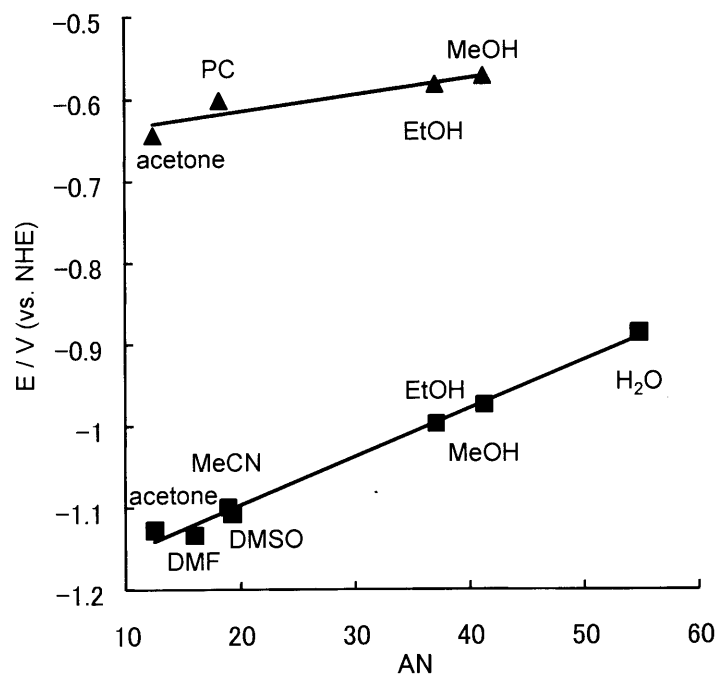


**Figure 3-5.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $\nu(\text{C}=\text{O})$  values of  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  in several solvents.

**Table 3-5.** Redox potentials of Ni(II) complexes, [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and [Ni(L3)](ClO<sub>4</sub>), in several solvents

solvent	acetone	DMF	PC	MeCN	DMSO	EtOH	MeOH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
acceptor number	12.5	16.0	18.3	18.9	19.3	37.1	41.3	54.8	54.8
E <sub>pa</sub> / V	-0.611	-0.811	-0.557	-0.631	-0.807	-0.547	-0.539	-	-
E <sub>pc</sub> / V	-0.676	-0.912	-0.657	-0.726	-0.948	-0.620	-0.607	-	-
ΔE / mV	65	101	100	95	141	73	68	-	-
E <sub>1/2</sub> / V	-0.6435	(-0.862)*	-0.607	(-0.679)*	(-0.878)*	-0.584	-0.573	-	-
E <sub>pa</sub> / V	-1.093	-1.095	-	-1.064	-1.070	-0.951	-0.935	-0.849	-0.849
E <sub>pc</sub> / V	-1.160	-1.169	-	-1.132	-1.144	-1.045	-1.013	-0.925	-0.925
ΔE / mV	67	74	-	68	74	94	78	76	76
E <sub>1/2</sub> / V	-1.127	-1.132	-	-1.098	-1.107	-0.998	-0.974	-0.887	-0.887

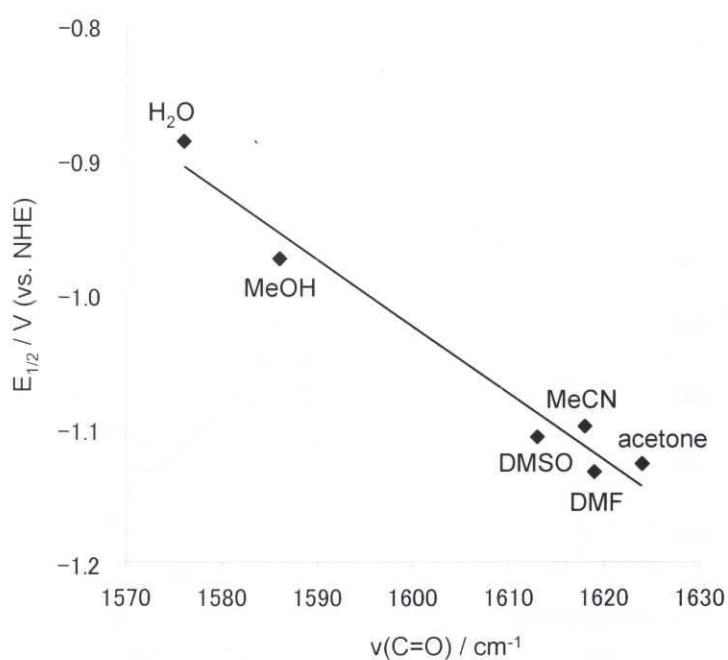
\*Ni(II) complex [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> showed a paramagnetic property in these solvents.



**Figure 3-6.** Relationships between acceptor numbers of solvents and redox potentials corresponding to Ni(I)/(II) process of [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (▲) and [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (■) in various solvents.

**Table 3-6.** Relationships between  $\nu(\text{C}=\text{O})$  values and redox potentials of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  in several solvents

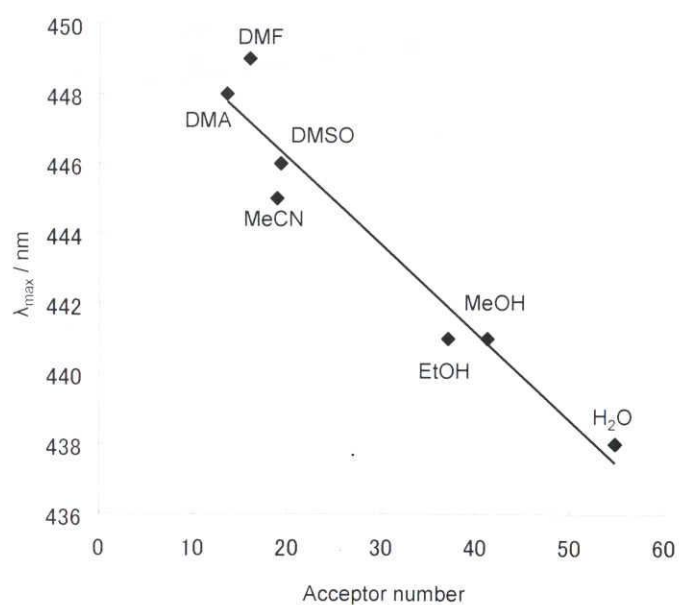
solvent	acetone	DMF	MeCN	DMSO	MeOH	H <sub>2</sub> O
$\nu(\text{C}=\text{O}) / \text{cm}^{-1}$	1624	1619	1618	1613	1586	1576
$E_{1/2} / \text{V}$	-1.127	-1.132	-1.098	-1.107	-0.974	-0.887



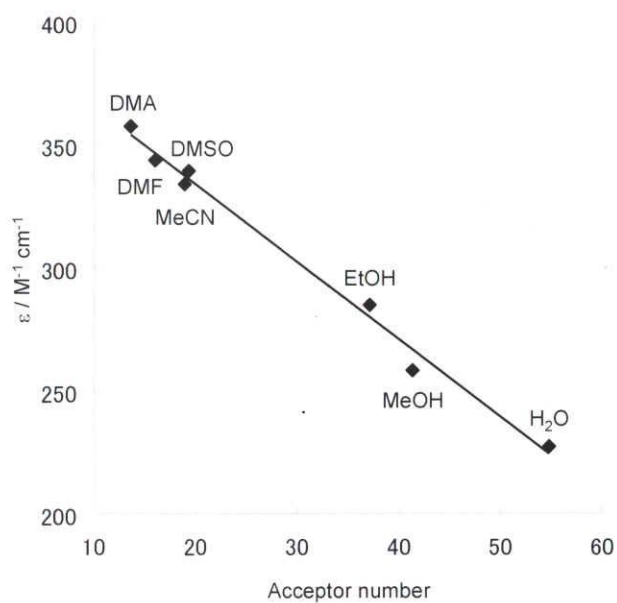
**Figure 3-7.** Relationships between  $\nu(\text{C}=\text{O})$  values and redox potentials of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)$  in several solvent.

**Table 3-7.** Relationships between acceptor numbers of solvents and absorption maxima of Na[Ni(L3)] in several solvents

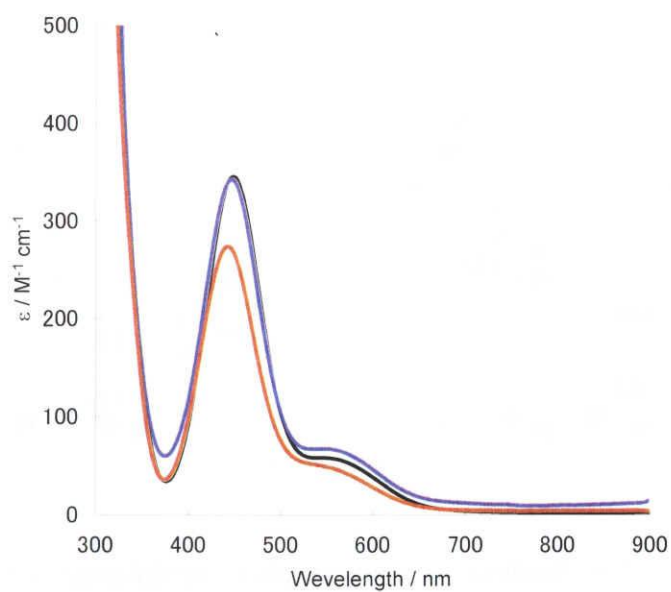
Solvent	DMA	DMF	MeCN	DMSO	EtOH	MeOH	H <sub>2</sub> O
acceptor number	13.6	16.0	18.9	19.3	37.1	41.3	54.8
$\lambda_{\max}$ / nm	448	449	445	446	441	441	438
$\epsilon$ / M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	357	343	333	339	284	258	227



**Figure 3-8.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $\lambda_{\max}$ /nm of Na[Ni(L3)] in several solvents.



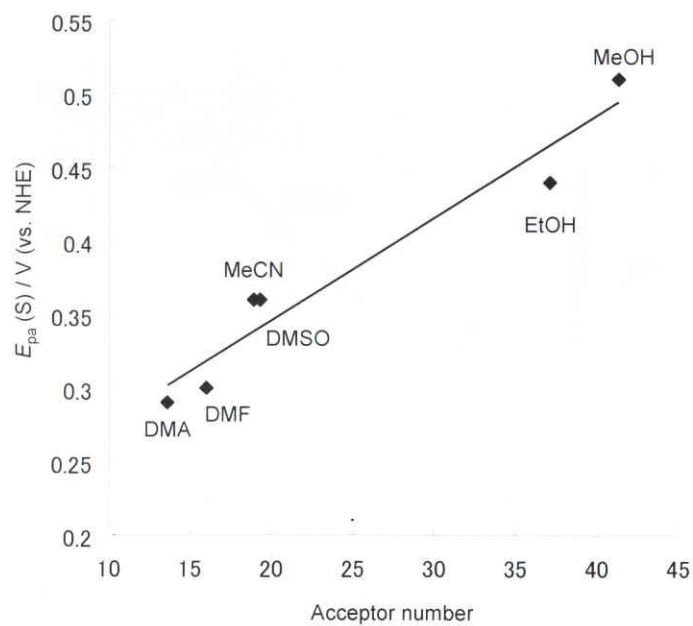
**Figure 3-9.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$  of  $Na[Ni(L3)]$  in several solvents.



**Figure 3-10.** Absorption spectra of  $Na[Ni(L3)]$  in DMF in the absence of salts (black line), and in addition of 1000 eq. of  $(n-Bu)_4NBF_4$  (blue line), and 1000 eq. of  $NH_4NBF_4$  (red line).

**Table 3-8.** Relationships between acceptor numbers of solvents and the oxidation potentials ( $E_{pa}(S)$ ) of thiolato S atoms for Na[Ni(L3)] in several solvents

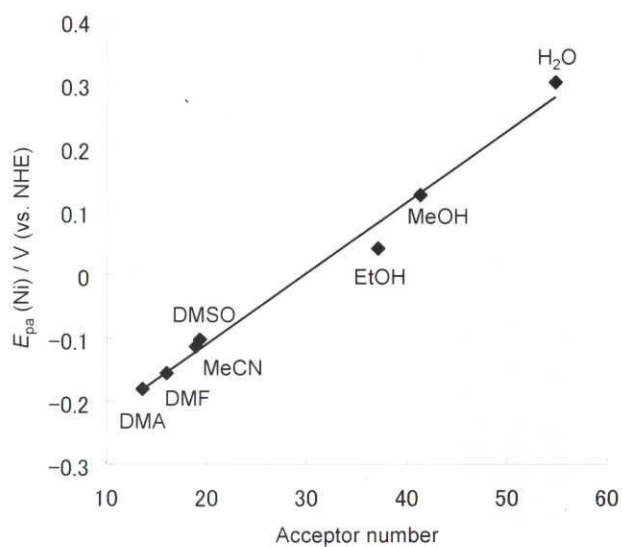
Solvent	DMA	DMF	MeCN	DMSO	EtOH	MeOH
acceptor number	13.6	16.0	18.9	19.3	37.1	41.3
$E_{pa}(S) / V$ (vs.NHE)	0.29	0.30	0.36	0.36	0.44	0.51



**Figure 3-11.** Relationships between acceptor numbers of solvents and the oxidation potentials ( $E_{pa}(S)$ ) of thiolato S atom for Na[Ni(L3)] in several solvents.

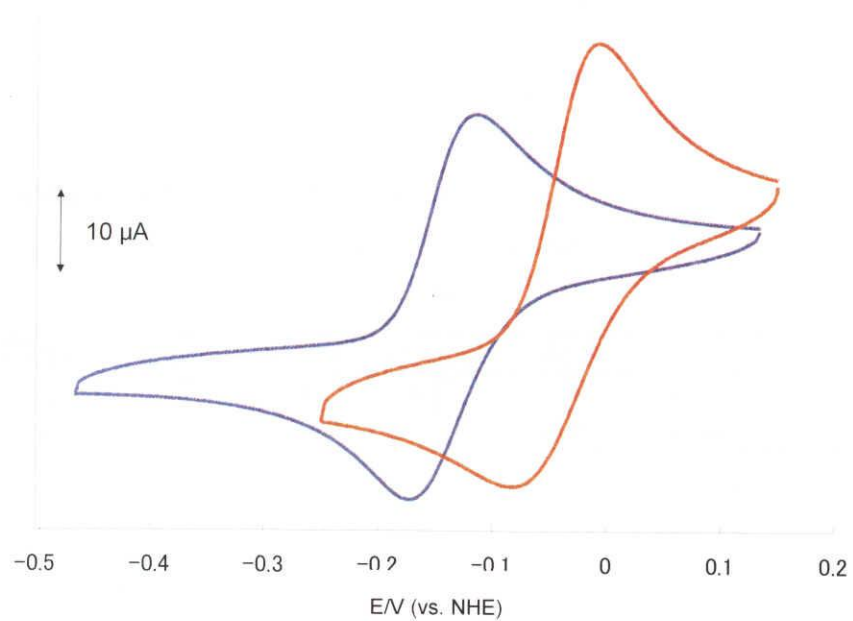
**Table 3-9.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $E_{pa}$  values of Ni(II)/(III) process of Na[Ni(L3)] in several solvents

Solvent	DMA	DMF	MeCN	DMSO	EtOH	MeOH	H <sub>2</sub> O
acceptor number	13.6	16.0	18.9	19.3	37.1	41.3	54.8
$E_{pa}$ (Ni) / V	-0.18	-0.16	-0.23	-0.18	0.04	0.13	0.30



**Figure 3-12.** Relationships between acceptor numbers of solvents and  $E_{pa}$  values of Ni(II)/(III) process of Na[Ni(L3)] in several solvents.





**Figure 3-13.** Cyclic voltammograms of Na[Ni(L3)] in DMF with 1000eq. of  $(n\text{-Bu})_4\text{BF}_4$  (blue line) and with 1000 eq. of  $\text{NH}_4\text{BF}_4$  (red line).

### 3.6. 参考論文

1. a) Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Biochem. J.*, **1996**, *318*, 889-896.  
b) Youn, H. D.; Youn, H.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Lee, J. K.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *334*, 341-348.
2. a) Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 8038-8047. b) Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Carugo, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 8569-8574.
3. Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, 2239-2314.
4. Herbst, R. W.; Guce, A.; Bryngelson, P. A.; Higgins, K. A.; Ryan, K. C.; Cabelli, D. E.; Garman, S. C.; Maroney, M. J. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 3354-3369.
5. Gange, R. R.; Coval, C. A.; Lisensky, G. C. *Inorg. Chem.*, **1980**, *19*, 2854-2855.
6. Mayer, U.; Gutmann, V.; Gerder, W. *Monatshefte fur Chemie*, **1975**, *106*, 1235-1257.
7. Shearer, J.; Dehestani, A.; Abanda, F. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2649-2660.
8. Ciurli, S.; Holm, R. H.; *Inorg. Chem.*, **1991**, *30*, 743-750.
9. Grapperhaus, C. A.; Mullins, C. S.; Kozlowski, P. M.; Mashuta, M. S. *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 2859-2866.
10. Hatlevik, O.; Blanksma, M. C.; Mathrubootham, V.; Arif, A. M.; Hegg, E. L. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, *9*, 238-246.
11. Herbst, R. W.; Guce, A.; Bryngelson, P. A.; Higgins, K. A.; Ryan, K. C.; Cabelli, D. E.; Garman, S. C.; Maroney, M. J. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 3354-3369.



## 第4章

### N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>型 Ni(II)、Ni(III)錯体を用いた NiSOD 活性中心周りの構造柔軟性の検討

#### 4.1. はじめに

NiSODはNi(II)およびNi(III)状態をサイクルすることでsuperoxideの不均化を触媒する酵素である。<sup>1</sup>NiSOD活性中心の構造はNi(II)状態では、末端His由来のamino N原子、peptide backbone由来の脱プロトン化したamidato N原子およびCys2およびCys6由来のthiolato S原子がそれぞれ*cis*-型でNi(II)イオンに配位した平面4配位構造である。一方、Ni(III)状態ではこの平面構造にさらに末端His由来のimidazole由来のN原子が弱く(~2.5 Å)相互作用した歪んだ四角錐型構造へと変化することが知られている(Scheme 4-1)<sup>2-3</sup>。この構造はNiSODのEPRスペクトルがdz<sup>2</sup>基底に特徴的なシグナルを示し、さらにg<sub>||</sub>領域にtripletのhyperfine splittingを示すことから支持されている。

しかしながら、N末端HisをGlnに置換したNiSOD(H1Q-NiSOD)はimidazole基が欠如しているにもかかわらず、そのNi(III)状態のEPRスペクトルも天然のNiSODと同様、tripletのhyperfine splittingを示すことが知られている<sup>4</sup>。これはNi(III)状態のH1Q-NiSODでは末端のamino N原子あるいはamidato N原子がNi(III)中心の軸位から配位していることを示唆する結果であり、天然のNiSODで得られているNi(III)状態の結晶構造と矛盾する。このことからH1Q-NiSODは天然のNiSODとは大きく異なる配位構造をとっていることが予想されるが、現在のところこの件に関して考察された報告はない。

本章ではH1Q-NiSODが天然のNiSODと異なった配位構造をとる要因としてNiSOD活性中心にはこのような大きな構造変化を起こす可能性があると考え、amino-amidato-dithioether型Ni(III)錯体として[Ni(L2)]<sup>2+</sup>(Figure 4-1)およびamino-amidato-dithiolato型Ni(III)錯体として[Ni(L3)](Figure 4-1)への外部配位子の配位に伴う構造変化の検討を行った。また、外部配位子が配位したこれらのNi(III)錯体の構造はN<sub>3</sub>S<sub>2</sub>型Ni(II)錯体である[Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>(Figure 4-1)の結晶構造を参考に考察した。その結果、NiSOD活性中心構造には大きな構造変化を起こすだけの空間的余裕、骨格構造の柔軟性があることを明らかにした。さらにNiSOD活性中心に見られるthiolato S原子の配位にはこのような大きな構造変化を抑制し、中心金属と基質であるsuperoxideとの素早い電子授受を可能にする環境を提供する効果があることが明らかになった。

## 4.2. 実験

CH<sub>3</sub>I はナカライテスク社より、Ni(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、[Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]、FcPF<sub>6</sub> は Sigma-Aldrich 社より購入した特級試薬をそのまま用いた。その他の試薬は和光純薬工業株式会社より購入した特級試薬をそのまま用いた。

### 4.2.1. 配位子、錯体合成

配位子 L4 の合成スキームを Scheme 4-2 に示した。

[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)および Na[Ni(L3)]は第 2 章で報告した方法に従い合成した。

#### 4.2.1.1. *N*-(2-Benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-1,2-diaminoethane の合成

MeCN 100 ml に 2-benzylmercapto-2-methylpropanoic acid 4.0 g (19 mmol), 2-chloro-1-methyl-pyridinium iodide 4.8 g (19 mmol), Et<sub>3</sub>N 2.0 g (19 mmol) を加え 1 時間攪拌した。Et<sub>3</sub>N 2.0 g (19 mmol)を加えた 1,2-diaminoethane 20 ml にこの溶液を滴下し、一晩攪拌した。反応後、減圧濃縮により MeCN を除去し、さらに真空ラインにて未反応の 1,2-diaminoethane を除去し、橙色油状物を得た。この油状物に H<sub>2</sub>O 100 ml を加え、NaOH にて pH 12 にした後 AcOEt で抽出を行うことにより透明な油状物を得た。(収量 3.1 g, 収率 63 %)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.56 (s, 6H), 2.78 (t, 2H), 3.20 (q, 2H), 3.76 (s, 2H), 7.29 (m, 5+1H).

#### 4.2.1.2. *N*-(2-Benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

蒸留した THF 150 ml に *N*-(2-benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-1,2-diaminoethane 3.1 g (12.0 mmol)を加え、窒素置換を行った。蒸留した THF 50 ml 中で NaBH<sub>4</sub> 1.7 g (45 mmol), BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O 12.8 g (90 mmol)を混合することにより調製した B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> 0.76 g (45 mmol)をこの溶液に加え、20 時間還流した。反応終了後、放冷した後に過剰の B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> を少量の MeOH を添加することで分解し、さらに H<sub>2</sub>O 50 ml を加え、減圧濃縮により THF および MeOH を除去した。得られた溶液を NaOH にて pH 12 にし、AcOEt で抽出することで透明の油状物を得た。さらにこれをシリカゲルカラム(溶離液; CH<sub>3</sub>Cl:MeOH = 20:1)で精製し、透明の油状物を得た。(収量 2.0 g, 収率 70 %)

<sup>1</sup>H-NMR δ (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.34 (s, 6H), 1.86 (br, 2H), 2.51 (s, 2H), 2.54 (q, 2H), 2.73 (t, 2H), 3.70 (s, 2H), 7.32 (m, 5H).

#### 4.2.1.3. *N*-(2-Benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

MeCN 100 ml に 2-benzylmercapto-2-methylpropanoic acid 1.77 g (8.35 mmol), 2-chloro-1-methyl-pyridinium iodide 2.1 g (8.35 mmol), Et<sub>3</sub>N 0.88 g (8.35 mmol) を加え 1 時間攪拌した。こ

の溶液を Et<sub>3</sub>N 0.88 g (8.35 mmol), *N*-(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 2.0 g (8.35 mmol)を溶解させた MeCN 50 ml と混合し、一晚攪拌した。反応後、減圧濃縮により MeCN を除去し、褐色油状物を得た。この油状物に H<sub>2</sub>O 100 ml を加え、NaOH にて pH 12 にした後 AcOEt で抽出を行い、褐色油状物を得た。さらにこれをシリカゲルカラム(溶離液; CH<sub>3</sub>Cl:MeOH = 20:1)で精製し、透明の油状物を得た。(収量 2.6 g, 収率 69%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.32 (s, 6H), 1.53 (s, 6H), 2.47 (s, 2H), 2.54 (t, 2H), 3.17 (q, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.73 (s, 2H), 7.21-7.35 (m, 10H), 7.37 (br, 1H).

#### 4.2.1.4. *N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

蒸留した THF 10 ml に *N*-(2-benzylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-benzylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 2.6 g (5.8 mmol)を溶解させ、この溶液に液体 NH<sub>3</sub> 100 ml を加えた。この溶液に金属 Na 1.0 g (43 mmol)を添加し、窒素気流下にて1時間攪拌した。NH<sub>4</sub>Cl を加えることで反応を停止させ、窒素気流下で十分に液体 NH<sub>3</sub> を蒸発させた後、H<sub>2</sub>O 50 ml を加え、pH 12 において Et<sub>2</sub>O で抽出することで不純物を Et<sub>2</sub>O 相に抽出した。得られた水相に 12 N 塩酸を加えて pH 8-9 とし、AcOEt で抽出を行い、透明油状物を得た。(収量 1.25 g, 収率 83%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.38 (s, 6H), 1.60 (s, 6H), 2.62 (s, 2H), 2.85 (t, 2H), 3.35 (q, 2H), 7.46 (br, 1H).

#### 4.2.1.5. *N*-(2-methylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane の合成

*N*-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-mercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 1.3 g (5.2 mmol)を溶解させた EtOH 100 ml に CH<sub>3</sub>I 1.47 g (10.4 mmol)を添加し、40 °C で3時間攪拌した。溶媒である EtOH を減圧濃縮により除去し、透明の油状物を得た。この油状物を H<sub>2</sub>O 100 ml に溶解させ、pH 12 において Et<sub>2</sub>O で3回抽出した。Et<sub>2</sub>O 相を飽和食塩水で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた後 Et<sub>2</sub>O を減圧濃縮により除去することで透明の油状物を得た。(収量 1.25 g, 収率 86%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.29 (s, 6H), 1.50 (s, 6H), 1.98 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.56 (s, 2H), 2.80 (t, 2H), 3.36 (q, 2H), 7.45 (br, 1H).

#### 4.2.1.6. *N*-(ethylpyridyl)-*N*-(2-methylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane (L4)の合成

2-Vinylpyridine 0.38 g (3.6 mmol) および *N*-(2-methylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-

(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane 0.50 g (1.8 mmol)を溶解させた EtOH 100 ml に、触媒量の CH<sub>3</sub>COOH を添加し、8 日間還流した。減圧濃縮により EtOH を除去し、得られた油状物を pH 12 において CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 相を飽和食塩水で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた後 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を減圧濃縮により除去することで淡黄色の油状物を得た。さらにこれをシリカゲルカラム(溶離液; CH<sub>3</sub>Cl)で精製し、透明の油状物を得た。(収量 50 mg, 収率 6.8%)

<sup>1</sup>H-NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); 1.27 (s, 6H), 1.51 (s, 6H), 2.02 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.61 (s, 2H), 2.82 (t, 2H), 2.96 (m, 2H), 3.35 (q, 2H), 7.12 (t, 1H), 7.16 (d, 1H), 7.60 (t, 1H), 8.53 (d, 1H).

#### 4.2.1.7 [Ni(L4)]BPh<sub>4</sub> の合成

配位子 HL1 (*N*-(ethylpyridyl)-*N*-(2-methylmercapto-2-methylpropanoyl)-*N'*-(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane) 50 mg (0.12 mmol)を溶解させた MeOH 5 ml に MeONa 7.07 mg (0.13 mmol)を添加し、15 分攪拌した。この溶液に Ni(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 31.1 mg (0.13 mmol)を溶解させた MeOH 5 ml を滴下し、3 時間攪拌した。減圧濃縮により溶媒を取り除いた後、得られた固体を 2 ml の MeCN に溶解させ、溶け残った白色粉末を濾去した。この溶液に H<sub>2</sub>O 5 ml に溶解させた sodium tetrphenylborate を添加したところ、淡褐色の沈殿が生じた。この沈殿を acetone に溶解させ、Et<sub>2</sub>O を蒸気拡散させることで再結晶を行い、褐色板状晶を得た。

#### 4.2.2. 測定機器

##### 4.2.2.1. <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

測定装置は配位子の測定については Varian Gemini-300 型 300 MHz フーリエ変換(FT)核磁気共鳴装置を使用した。溶媒は内部基準物質として TMS を含む CDCl<sub>3</sub> を使用し、内径 5 mm のサンプルチューブ内に濃度 5~10 mM に調製した試料溶液について測定した。錯体溶液をサンプルとした測定には BRUKER·BIOSPIN AVANCE 600 型 600 MHz フーリエ変換(FT)核磁気共鳴装置を使用した。溶媒には TMS を含む acetone-d<sub>6</sub> を使用し、内径 5 mm のサンプルチューブ内に濃度 20 mM に調製した試料溶液について測定した。

##### 4.2.2.2. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光製 Ubest V-550 型紫外可視吸収分光光度計を使用し、最大波長領域 900~200 nm について測定を行った。セルは光路長が 1 cm の石英セルを使用し、サンプルの濃度は 0.1 ~ 1 mM に調製した溶液を使用した。

##### 4.2.2.3. サイクリックボルタンメトリー

測定装置は ALS/CH Instruments Electrochemical Analyzer Model 600A を使用した。サンプル

は、各種錯体を 1 mM になるように acetone に溶解させ、支持電解質として (n-Bu)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> を 0.1 M になるように溶解させた溶液を用いた。測定は作用極にはグラッシーカーボン、対極には白金線、参照極には Ag/Ag<sup>+</sup>電極を用い、掃引速度 0.1 V/s でおこなった。観測された電位は Fc/Fc<sup>+</sup>基準の電位に換算した後、NHE 基準の電位へと換算した(NHE = Fc/Fc<sup>+</sup> + 0.40)。<sup>5</sup>

#### 4.2.2.4. EPR スペクトル

測定装置は JEOL 社製 JES-RE 1X ESR spectrometer を使用した。サンプル濃度は 10 mM に調製し、-78 °C において 10 mM の錯体溶液 50 μl と 10 mM の [Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]あるいは FcPF<sub>6</sub> の溶液 50 μl を混合し、直ちに液体窒素中(77 K)に浸してサンプルを凍結し、デュワーごと共振機に取り付けて測定を行った。

#### 4.2.3.5. X 線結晶構造解析

回折データの測定には一辺が 0.3 mm の大きさの単結晶をグラスファイバーの先端に固定したものを使用した。格子定数は 15° < 2θ < 25° の範囲内の適当な強度の回折点を用い、最小二乗法により精密化を行った。

強度測定には Rigaku/MSC Mercury CCD を用い、グラファイトで単色化した Mo Kα 線を X 線源として、50 kV, 200 mA において測定を行った。測定条件は、カメラ長 45 mm、2θ は 20°、露光時間 5 ~ 10 秒で測定を行った。反射イメージは 1200 枚測定し、全反射データに対し Lorentz 因子および偏光因子の補正を加えた後、全反射を用いて解析を行った。

構造は直接法<sup>6</sup>により解析し、差フーリエ合成で得られなかった水素原子の座標は、計算によって求めた。非水素原子には異方性温度因子を適用し、異常分散による補正および吸収補正を実行し、完全マトリックス最小二乗法で精密化した。最小にした関数は  $\sum w(|F_o| - |F_c|)^2$ 、 $w^{-1} = \sigma^2(F_o)$  である。原子散乱因子は International Tables for X-ray Crystallography Vol.IV<sup>7</sup>に記載の値を用いた。構造解析、精密化等の計算は *CrystalStructure* 構造解析プログラム<sup>8</sup>により行った。



### 4.3. 結果

#### 4.3.1. N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>型 Ni(II)錯体[Ni<sup>II</sup>(L4)]<sup>+</sup>、およびその[Ni<sup>III</sup>(L4)]<sup>2+</sup>の構造と性質

##### 4.3.1.1. [Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>の結晶構造

[Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>の結晶学的パラメーターを Table 4-1 に、ORTEP 図を Figure 4-2 に、主な結合長、結合角を Table 4-2 に示した。[Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>は1つの脱プロトン化した amidato N 原子、1つの amino N 原子、1つの pyridine N 原子および amidato 基側の thioether S 原子が Ni(II)イオンの equatorial 位を、amino 基側の thioether S 原子が Ni(II)イオンの axial 位に弱く(2.787(2) Å)相互作用した四角錘型構造をとっていた( $\tau = 0.06$ )。<sup>9</sup>

##### 4.3.1.2. [Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>の分光学的、磁氣的性質

[Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>は acetone 溶液中で 472 nm ( $\epsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1} = 250$ )に極大吸収を示した。この吸収は平面 4 配位<sup>10-15</sup>、または四角錘型構造<sup>16</sup>を有する Ni(II)錯体に特徴的なものである。また、この錯体の acetone-d<sub>6</sub>溶液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定したところ、常磁性領域(11.3 ~ 21.0 ppm)にシグナルが観測されたことから、この錯体は溶液中において high-spin 型の電子配置を有する四角錘型構造を有していることが示唆された。これらの結果は前述の X 線結晶構造解析で得られた構造が溶液中においても保たれていることを示唆している。

##### 4.3.1.3. [Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>の電気化学的性質

[Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>は acetone 溶液中において Ni(II)/(III)に対応する酸化還元対を 0.99 V (vs. NHE)に示した。peak separation ( $\Delta E$ )が 94 mV であり可逆性が高いことから、この錯体は酸化還元に伴った溶媒の配位、あるいは配位構造の再構成といった構造変化を示さないと考えられる。

##### 4.3.1.4. Ni(III)錯体[Ni(L4)]<sup>2+</sup>の EPR スペクトル

[Ni(L4)]<sup>+</sup>を酸化剤 ammonium cerium nitrate ([Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>])と反応させ EPR スペクトルを測定したところ、dz<sup>2</sup>基底の Ni(III)錯体に特徴的な rhombic なシグナルが観測された( $g = 2.20, 2.13, 2.01$ , Figure 4-3)。このことから[Ni(L4)]<sup>+</sup>は[Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]により、非対称な配位環境を有する low-spin Ni(III)錯体に酸化されたことがわかる。g<sub>z</sub>領域に観測されたシグナルが triplet ではなく singlet であったことから、配位子 L4 の 3 つの N 原子は全て Ni(III)イオンの equatorial 位に配位していると考えられる。すなわち、Ni(II)中心の Ni(III)状態への酸化に伴った構造変化は生じていないことが考えられる。また、EPR スペクトルにおける g 値は Ni(III)イオンまわりの構造が平面四角形から四角錘構造へと変化することで、より小さな g 値を与えるということが理論的に知られているが<sup>16</sup>、この錯体の g 値も他の平面 4 配位型 Ni(III)錯体の g 値(2.20 ~ 2.44)よりも小さく<sup>10,14,17-18</sup>、この錯体は酸化後も四角錘型構造を保っていると考えられる。

#### 4.3.2. Ni(III)錯体[Ni(L2)]<sup>2+</sup>の構造と imidazole 添加に伴う構造変化

##### 4.3.2.1. Ni(III)錯体[Ni(L2)]<sup>2+</sup>の EPR スペクトル

[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)を等量の[Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]と MeOH 中で反応させたところ、dz<sup>2</sup>基底に特徴的なスペクトルが観測された( $g_{\perp} = 2.21$ ,  $g_{\parallel} = 2.02$ , Figure 4-4 (A))。このことから、[Ni<sup>III</sup>(L2)]<sup>2+</sup>は Ni(II)状態の場合と同様、平面 4 配位構造を維持していると考えられる。これは Ni(III)イオンの電子状態は d<sup>7</sup>であり、Jahn-Teller 効果がはたらくことによって軸配位できなかったために生じたと考えられる。

##### 4.3.2.2. imidazole の添加に伴う Ni(III)錯体[Ni(L2)]<sup>2+</sup>の EPR 挙動

[Ni<sup>III</sup>(L2)]<sup>2+</sup>に 7.5 等量の imidazole を添加したところ、 $g_{\perp}$ 領域、 $g_{\parallel}$ 領域ともに triplet の hyperfine splitting を示す dz<sup>2</sup>基底に特徴的な EPR スペクトルが観測された( $g_{\perp} = 2.20$ ,  $|A_{\perp}| = 1.7$  mT,  $g_{\parallel} = 2.02$ ,  $|A_{\parallel}| = 2.3$  mT, Figure 4-4 (B))。これらの hyperfine splitting の由来となる N 原子を特定するため、<sup>15</sup>N ( $I = 1/2$ )でラベリングした imidazole を 7.5 等量外部配位子として用いたところ、先の測定で観測された triplet の hyperfine splitting が doublet として観測された( $g_{\perp} = 2.20$ ,  $|A_{\perp}| = 2.5$  mT,  $g_{\parallel} = 2.02$ ,  $|A_{\parallel}| = 3.5$  mT, Figure 4-4 (C))。このことは明らかに外部配位子として添加した imidazole が本錯体の Ni(III)中心の axial 位および equatorial 位に配位していることを示している(Scheme 4-3)。

##### 4.3.3. [Ni(L3)]<sup>-</sup>への 1-methylimidazole の配位挙動

[Ni(L3)]<sup>-</sup>は 1000 等量の 1-methylimidazole の添加にもかかわらずその吸収スペクトルに変化を示さなかった(Figure 4-5)ことから、本錯体は Ni(II)状態では 1-methylimidazole は配位しないと考えられる。この性質は天然の NiSOD における挙動と類似している。

#### 4.3.4. Ni(III)錯体[Ni(L3)]の構造と imidazole, pyridine 添加に伴う構造変化

##### 4.3.4.1. Ni(III)錯体[Ni(L3)]の EPR スペクトル

Na[Ni(L3)]を FcPF<sub>6</sub>と反応させたところ、 $g_x = 2.28$ ,  $g_y = 2.20$ ,  $g_z = 2.01$  に dz<sup>2</sup>基底に特徴的な rhombic なスペクトルが観測された(Figure 4-6 (A))。このことから本錯体は FcPF<sub>6</sub>によって Ni(III)状態へと酸化されたことが示唆された。

##### 4.3.4.2. imidazole, pyridine の添加に伴う [Ni<sup>III</sup>(L3)]<sup>2+</sup>の EPR 挙動

Ni(III)錯体[Ni(L3)]<sup>2+</sup>に 1000 等量の pyridine を添加したところ、 $g_x = 2.34$ ,  $g_y = 2.27$ ,  $g_z = 2.01$ ,  $|A_{\parallel}| = 2.4$  mT に dz<sup>2</sup>基底に特徴的な rhombic なスペクトルが観測された(Figure 4-6 (B))。g<sub>z</sub>領域に triplet の hyperfine splitting が見られたことからこの Ni(III)種は軸位に N 原子( $I = 1$ )が配位した構造をとっていることがうかがえる。この軸位の N 原子を特定するために外部配位子に

$^{15}\text{N}$ -pyridine を用いて同様の測定をしたところ、 $g_z$  領域に doublet の分裂が観測された( $g_x = 2.34$ ,  $g_y = 2.27$ ,  $g_z = 2.00$ ,  $|A_{\parallel}| = 3.2$  mT, Figure 4-6 (C))。このことからこの Ni(III)種は軸位から pyridine が配位した四角錐型構造をとっていると予測される。外部配位子として imidazole を用いた際も同様な triplet の hyperfine splitting が観測され( $g_x = 2.31$ ,  $g_y = 2.26$ ,  $g_z = 2.01$ ,  $|A_{\parallel}| = 2.4$  mT, Figure 4-6 (D))、 $^{15}\text{N}$  ラベリング実験により  $g_z$  領域の triplet は doublet へと変化した( $g_x = 2.30$ ,  $g_y = 2.26$ ,  $g_z = 2.01$ ,  $|A_{\parallel}| = 3.5$  mT, Figure 4-6 (E))。以上のことから、FcPF<sub>6</sub>による酸化により生じた Ni(III)錯体[Ni(L<sub>3</sub>)]は外部配位子 pyridine、あるいは imidazole の配位により平面 4 配位構造からこれらの外部配位子が Ni(III)中心の軸位に配位した四角錐構造へと変化することが示された。

#### 4.4. 考察

[Ni(L4)]<sup>+</sup>およびその Ni(III)錯体[Ni(L4)]<sup>2+</sup>は、1つの脱プロトン化した amidato N 原子、1つの amino N 原子、1つの pyridine N 原子および amidato 基側の thioether S 原子が Ni(II)イオンの equatorial 位を占め、amino 基側の thioether S 原子が Ni(II)イオンの axial 位に弱く (2.787(2) Å) 相互作用した四角錘型構造であった。この構造は thioether S 原子の donor 性が pyridine N 原子のそれよりも弱いことに由来していると考えられ、実際にいくつかの Ni(II)および Cu(II)錯体で同様の原因により thioether S 原子が軸位から配位した構造が見られる<sup>19-20</sup>。また、Ni(III)錯体[Ni(L2)]<sup>+</sup>の平面位に配位した amine 側の thioether S 原子は、より強い donor 性を有する外部配位子(ここでは imidazole)の平面位への配位に伴い、平面位から軸位へと 'kick up' することが明らかになった。これらの構造は NiSOD の活性中心に同様の構造変化を起こしうる柔軟性 (flexibility) があることを示唆しており、非常に興味深い。NiSOD の活性中心の構造に目を向けてみると、末端 His 由来の amino N 原子、peptide backbone 由来の脱プロトン化した amidato N 原子および Cys2 由来の thiolato S 原子は2つの5員環を形成して中心金属である Ni(II)イオンに配位しているが、残った equatorial 位を占める Cys6 由来の thiolato S 原子は chelate 環を形成せずに配位している<sup>12</sup>。このことから NiSOD の活性中心の2つの Cys 残基由来の thiolato S 原子のうち、Cys6 由来の S 原子は chelate 環を形成せずに配位し、amidato 基により強固に平面構造を強制されることのない。また NiSOD 活性中心の imidazole の trans-位には十分な空間があり、少なくとも構造的には、[Ni(L4)]BPh<sub>4</sub> と同様に Ni(II)中心に軸位から配位することが可能であることが示唆される。

一方、Na[Ni(L3)]およびその酸化により得られた Ni(III)錯体[Ni(L3)]では S 原子の 'kick up' は見られなかった。これは Na[Ni(L3)]<sup>+</sup>および、[Ni(L3)]の S 原子は donor 性の強い thiolato 型の配位をしているためであると考えられる。Superoxide はプロトンの存在下において金属イオンの存在なしに不均化してしまうため、SOD は拡散律速でこの反応を触媒する必要があり、そのため、SOD の活性中心は superoxide と素早く電子授受を行う必要がある。中心金属の酸化還元に伴う構造変化はこの素早い電子授受を妨げることが予想されるため、一般的には thiolato S 原子の 'kick up' のような極端な構造変化は SOD 活性を発現する上で望ましくないと考えられる。しかしながら、前述の通り、NiSOD の活性中心には thiolato S 原子の 'kick up' が起こり得るに十分な自由度があることが予想される。NiSOD 活性中心に見られる donor 性の強い thiolato S 原子の配位にはこのような 'kick up' を抑制し、中心金属と superoxide の間の電子授受を素早く行えるようにする効果があると考えられる。

以上のことから、末端 His を Gln に置換した SOD (HIQ-NiSOD)が、His1 由来の imidazole が欠如しているにもかかわらず、EPR スペクトルにおいて g<sub>||</sub>領域に triplet の hyperfine splitting を示す<sup>4</sup>。このことは次のように説明できる。

HIQ-NiSOD の活性中心にみられる2つの N 原子と2つの S 原子のうち、キレート環を形

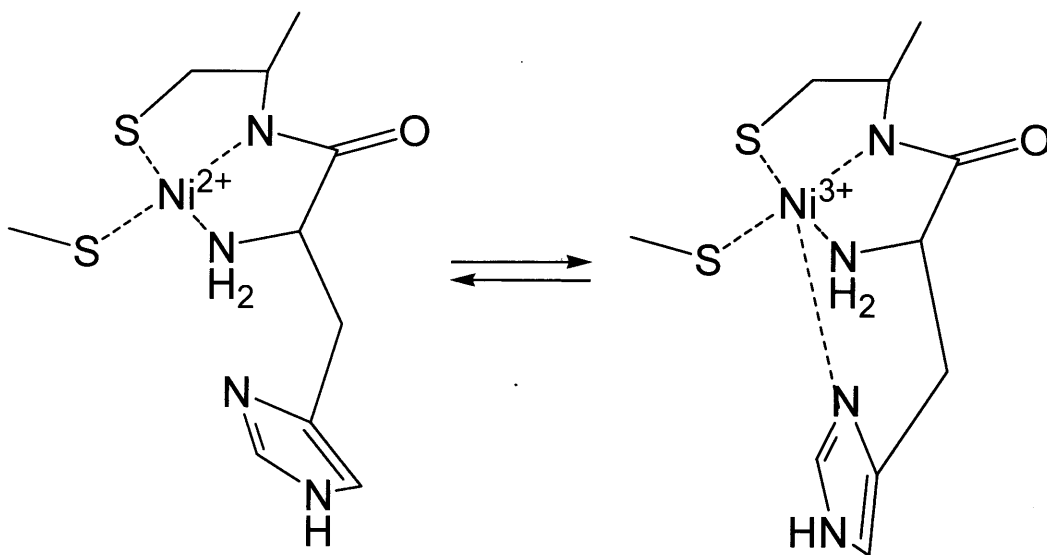
成せずに配位している Cys6 側鎖由来の thiolato S 原子が、より強い donor 性を有する配位子が平面位および軸位から配位した場合、金属中心の axial 位に 'kick up' し、さらにこの Ni(III) 中心の軸変換が起こった結果、2 つの N 原子のうち 1 つが錯体の軸位に変化した構造をしているものと推測される。

#### 4.5. 結論

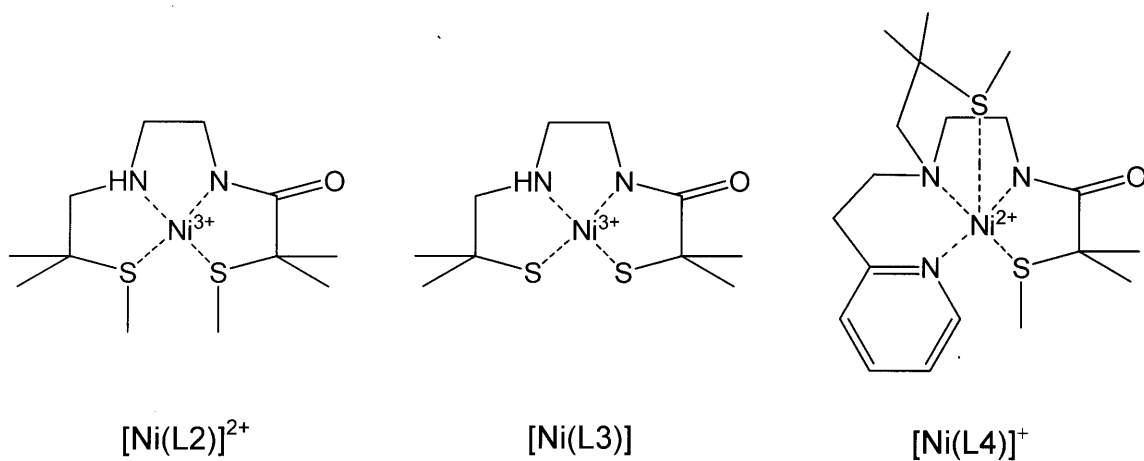
本章では HIQ-NiSOD が天然の NiSOD と異なった構造を示す原因を突き止めるため、 $N_2S_2$  型の Ni(III)錯体として  $[Ni(L2)]^{2+}$  および  $[Ni(L3)]$ 、への外部配位子(imidazole、pyridine)の配位に伴う構造変化について、EPR スペクトルを用いて検討した。ここで得られた情報に基づき、 $N_3S_2$  型 Ni(II)錯体である  $[Ni(L4)]^+$  の結晶構造を参照することによって構造を推定した。

$N_3S_2$  型 Ni(II)錯体である  $[Ni(L4)]^+$  の結晶構造および Ni(III)錯体である  $[Ni(L2)]^{2+}$  への imidazole の配位挙動の検討から、NiSOD 活性中心には、強い donor 性を有する外部配位子が与えられた場合、Cys6 由来の thiolato S 原子の配位が軸位へと 'kick up' することが可能な骨格構造の柔軟性を有していることが示唆された。HIQ-NiSOD が天然の NiSOD の結晶構造から予測されるものとは異なった EPR スペクトルを示すことは、この 'kick up' に加え Ni(III)中心の軸変換が起こることによって説明された。

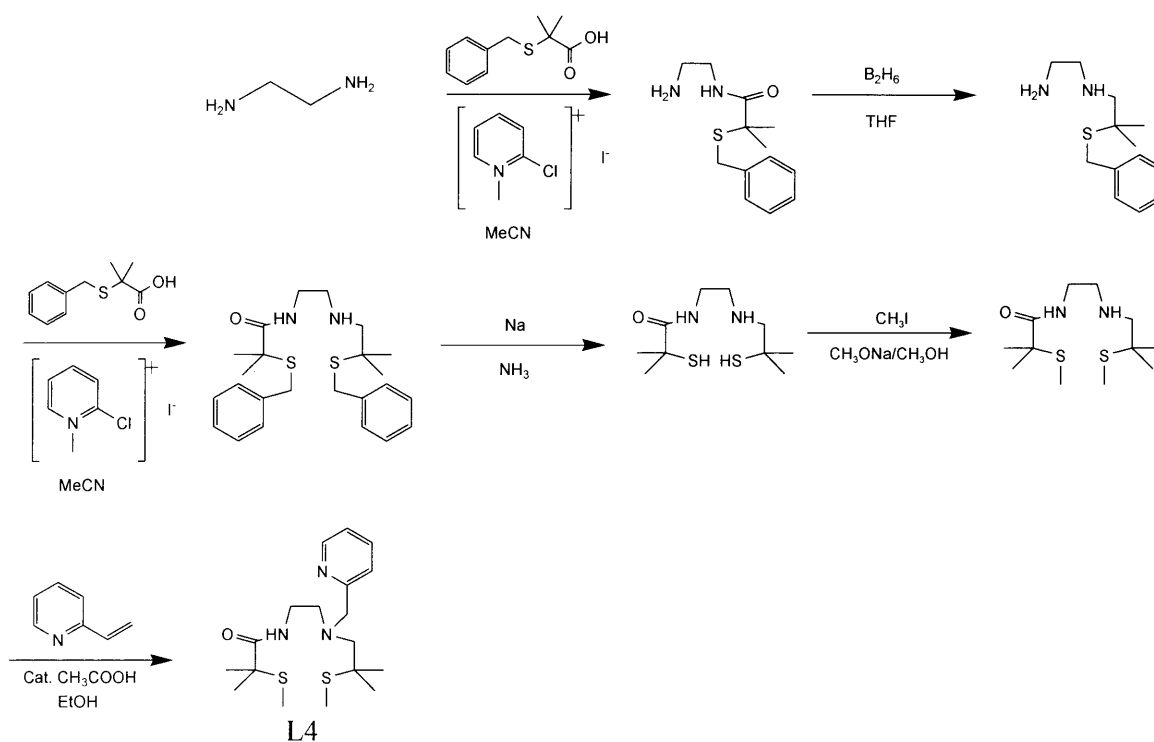
一方、thiolato S 部位を有する Ni(III)錯体  $[Ni(L3)]$  に添加した imidazole および pyridine は  $[Ni(L3)]$  の Ni(III)中心の軸位に配位することが示され、強い donor 性を有する thiolato S 原子は thioether S 原子ほどには 'kick up' を起こしにくいことが明らかになった。このことから、NiSOD 活性中心に見られる thiolato S 原子の役割の一つに S 原子の 'kick up' を抑制し、中心金属と superoxide の間の素早い電子授受を可能にする効果があると考えられる。



**Scheme 4-1.** Schematic structures of NiSOD active site in the reduced (left) and oxidized (right) states.



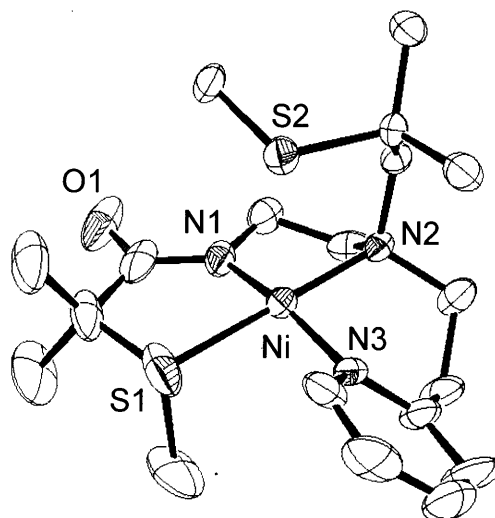
**Figure 4-1.** Ni(II) and Ni(III) complexes prepared as a model compound of NiSOD active site.



**Scheme 4-2.** Synthetic scheme of ligand L4.

**Table 4-1.** Crystallographic data of [Ni(L4)]BPh<sub>4</sub>

Empirical formula	C <sub>43</sub> H <sub>52</sub> BN <sub>3</sub> NiOS <sub>2</sub>
Formula weight	760.53
Crystal system	triclinic
Space group	<i>P</i> -1
<i>a</i> (Å)	11.488(6)
<i>b</i> (Å)	13.165(7)
<i>c</i> (Å)	13.751(8)
<i>α</i> (°)	89.013(13)
<i>β</i> (°)	87.479(10)
<i>γ</i> (°)	82.146(13)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	2058.0(20)
<i>Z</i>	2
<i>D</i> calcd	1.227
Unique refls. ( <i>R</i> int)	9420 (0.043)
<i>R</i> / <i>R</i> <sub>w</sub>	0.0925/0.1370
GOF	1.000

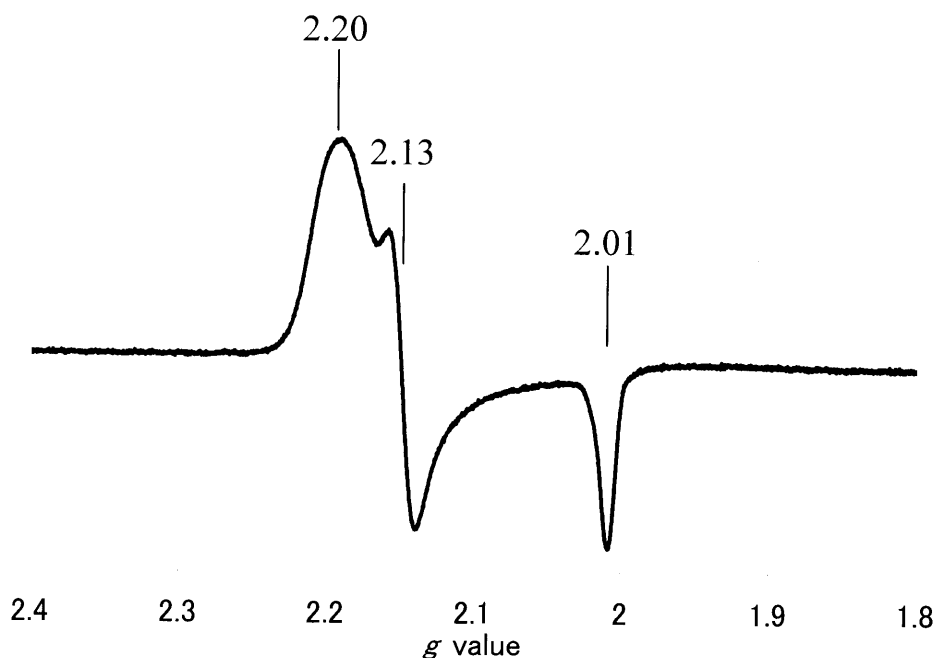


**Figure 4-2.** ORTEP drawing of a cation part of  $[\text{Ni}(\text{L4})]\text{BPh}_4$  with thermal ellipsoids drawn at the 30 % probability. The hydrogen atoms and counter anion are omitted for clarity.

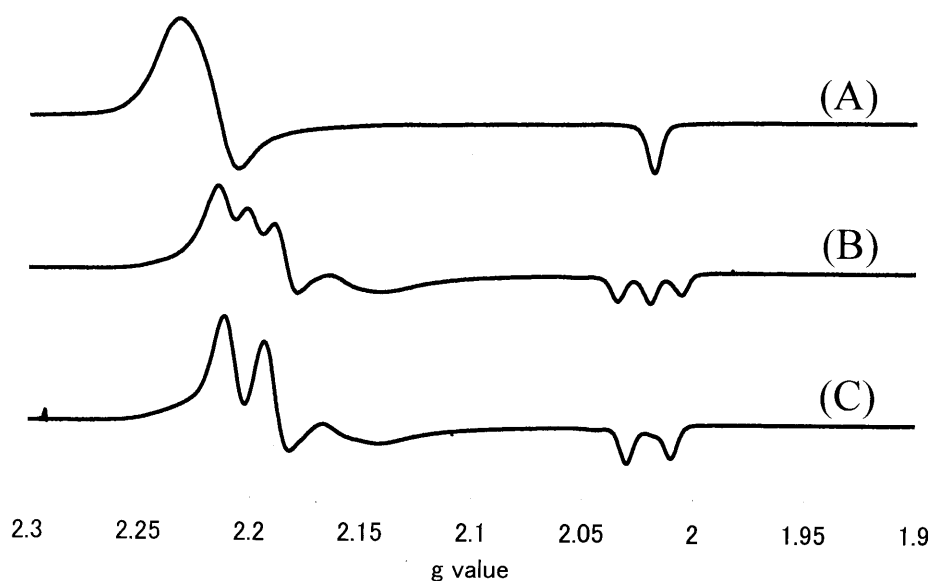
**Table 4-2.** Selected bond lengths and angles of  $[\text{Ni}(\text{L4})]\text{BPh}_4$

Bond Lengths (Å)			
Ni-N1	1.870(10)	Ni-S1	2.192(4)
Ni-N2	1.969(8)	Ni-S2	2.787(3)
Ni-N3	1.929(9)		
Bond Angles (°)			
N1-Ni-N2	86.2(4)	N2-Ni-S1	173.0(2)
N2-Ni-N3	94.9(3)	N1-Ni-S2	99.2(3)
N1-Ni-S1	87.8(3)	N2-Ni-S2	84.3(2)
N3-Ni-S1	90.2(3)	N3-Ni-S2	91.2(3)
N1-Ni-N3	169.5(4)	S1-Ni-S2	100.47(14)

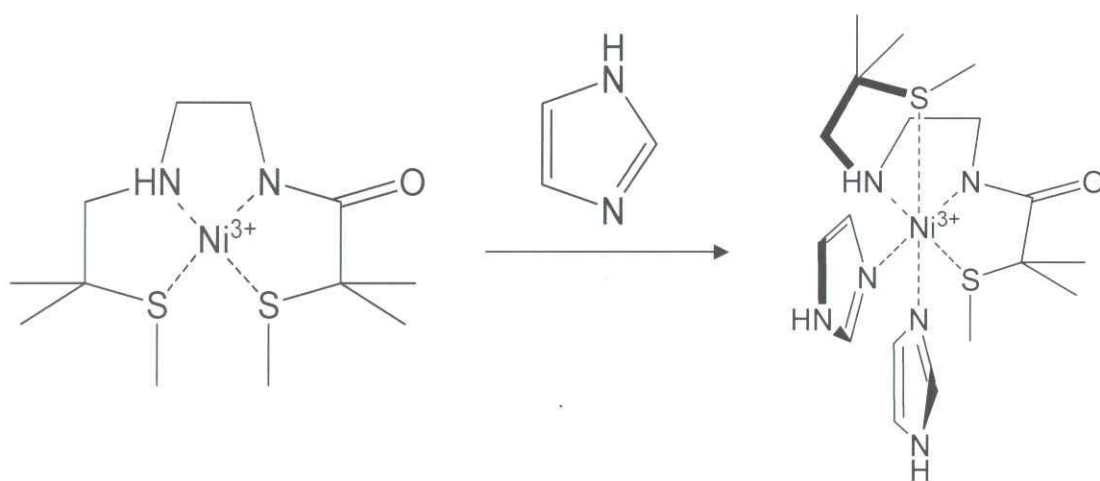




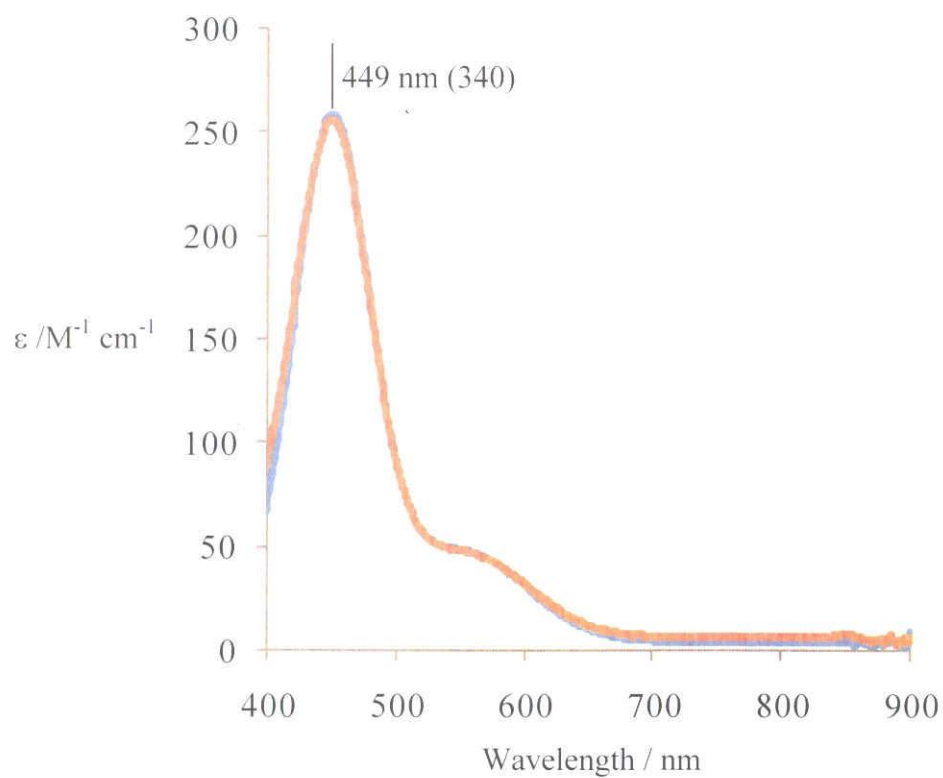
**Figure 4-3.** Frozen solution EPR spectrum of the oxidized form of complex  $[\text{Ni}(\text{L4})]^+$ . The sample was prepared in acetone solution (5 mM) by using 1 eq. of  $[\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$  as an oxidizing agent at 195 K.



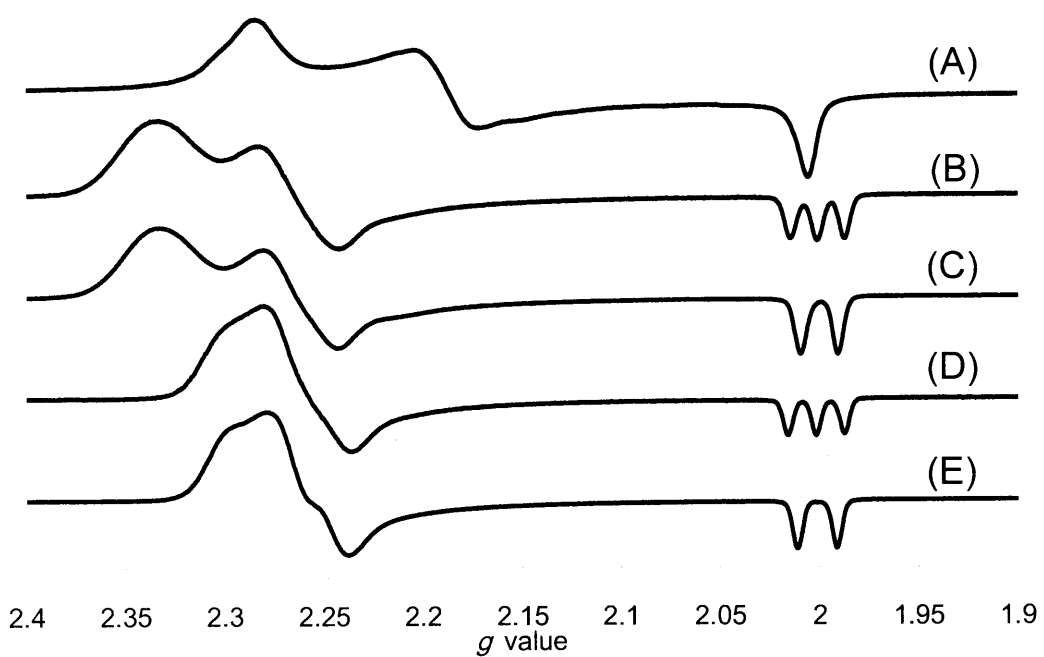
**Figure 4-4.** EPR spectra observed (A) after oxidation of  $[\text{Ni}(\text{L2})](\text{ClO}_4)$  using  $[\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$  (in MeOH), (B) by addition of 7.5 eq. of imidazole to the resulting product oxidized by  $[\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$  (in a 4:1 mixture of acetone and DMF), and (C) by addition of 7.5 eq. of  $^{15}\text{N}$ -labeled imidazole to the resulting product oxidized by  $[\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$  (in a 4:1 mixture of acetone and DMF).



**Scheme 4-3.** Proposed structural change of the Ni(III) complex  $[\text{Ni}(\text{L}2)]^{2+}$  induced by addition of imidazole.



**Figure 4-5.** UV-vis spectra of DMF solution of the Ni(II) complex  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  before (blue line) and after (red line) addition of 1000 eq. of 1-methylimidazole.



**Figure 4-6.** EPR spectra of oxidized products of  $[\text{Ni}(\text{HL4})]\text{Na}$  with (A) no additional ligand, (B) 1000 eq. of pyridine, (C) 1000 eq. of  $^{15}\text{N}$ -labeled pyridine, (D) 10 eq. of imidazole, (E) 10 eq. of  $^{15}\text{N}$ -labeled imidazole.

#### 4.6. 参考論文

1. Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Biochem. J.*, **1996**, *318*, 889-896.
2. Youn, H. D.; Youn, H.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Lee, J. K.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *334*, 341-348.
3. a) Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 8038-8047. b) Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Carugo, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 8569-8574.
4. Bryngelson, P. A.; Arbo, S. E.; Pinkham, J. L.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 460-461.
5. Gange, R. R.; Coval, C. A.; Lisensky, G. C. *Inorg. Chem.*, **1980**, *19*, 2854-2855.
6. Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Burla, M.; Polidori, G.; Camalli, M. *J. Appl. Cryst.* **1994**, *27*, 435-436.
7. *International Tables for X-ray Crystallography*, Ibers, J. A.; Hamilton, W. C. eds., Kynoch Press, Birmingham, U. K., **1974**, Vol. IV.
8. Rigaku Corporation, Tokyo, Japan **2007**.
9. Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Rijn, J. van; Verschoor, G. C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1984**, *13*, 1349-1356.
10. Krüger, H. J.; Peng, G.; Holm, R. H. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 734-742.
11. Shearer, J.; Zhao, N. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9637-9639.
12. Grapperhaus, C. A.; Mullins, C. S.; Kozlowski, P. M.; Mashuta, M. S. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 2859-2866.
13. Hatlevik, Ø.; Blanksma, M. C.; Mathrubootham, V.; Arif, A. M.; Hegg, E. L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 238-246.
14. Green, K. N.; Brothers, S. M.; Jenkins, R. M.; Carson, C. E.; Grapperhaus, C. A.; Darensbourg, M. Y. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7536-7544.
15. Fiedler, A. T.; Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J.; Brunold, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5449-5462.
16. Maki, A. H.; Edelstein, N.; Davison, A.; Holm, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4580-4587.
17. Lappin, A. G.; Murray, C. K.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 1630-1634.
18. Hanss, J.; Krüger, H. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 360-363.
19. Zhang, Z.; Kanamori, H.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Zhang, L. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **2009**, *34*, 521-524.
20. Tubbs, K. J.; Fuller, A. L.; Bennett, B.; Arif, A. M.; Berreau, L. M.; *Inorg. Chem.* **2003**, *42*,

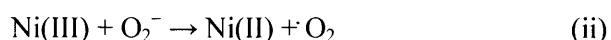
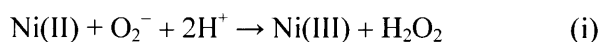
4790-4791.

## 第5章

### 各種 Ni(II)錯体とスーパーオキシドアニオンとの反応

#### 5.1. はじめに

Ni 含有型スーパーオキシドアニオン不均化酵素(Ni-containing superoxide dismutase, NiSOD) は比較的近年に発見された SOD である。その活性中心にはニッケルイオンが含まれ、以下に示したように Ni(II)および Ni(III)状態をサイクルすることで superoxide の不均化を触媒していると考えられている。<sup>1</sup>



NiSOD の Ni(II)および Ni(III)状態での構造は X 線結晶構造解析によって明らかにされており、Ni(II)状態では、末端 His 由来の amino N 原子、peptide backbone 由来の脱プロトン化した amidato N 原子および Cys2 および Cys6 由来の thiolato S 原子がそれぞれ *cis*-型に中心金属である Ni(II)イオンに配位した平面 4 配位構造を形成している。また、Ni(III)状態ではこの平面構造にさらに末端 His 由来の imidazole 由来の N 原子が弱く (~2.5 Å)相互作用した歪んだ四角錐型構造へと変化することが明らかになっている(Scheme 5-1)。<sup>2,3</sup>

以上のように NiSOD の構造についてはある程度のこと明らかになってきているが、Ni(III)状態における imidazole の配位の効果など未解決な部分も多く、その反応メカニズムについては理論計算を用いた検討が数例報告されるのみである<sup>4-11</sup>。また、モデル錯体研究の分野においても、superoxide との反応を直接試みた研究は未だ報告されていない。

本章では NiSOD の superoxide の還元過程に相当する各種 Ni(II)錯体(Figure 5-1)と KO<sub>2</sub>との反応を検討し、その結果生じた Ni(III)錯体の構造について考察した。これを通じて Ni(III)状態における imidazole の軸配位が superoxide の還元過程に果たす役割には、NiSOD 活性中心まわりの構造が superoxide の還元過程において大きく変化し得ることを防ぎ、さらに Ni(III)状態を安定化し、superoxide の還元過程の平衡を生成側に偏らせる効果があることを明らかにした。

## 5.2. 実験

KO<sub>2</sub>、FcPF<sub>6</sub> は Sigma-Aldrich 社より購入した特級試薬をそのまま用いた。その他の試薬は和光純薬工業株式会社より購入した特級試薬をそのまま用いた。

### 5.2.1. 配位子、錯体合成

[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)および Na[Ni(L3)]は第 2 章で報告した方法に従い合成した。

### 5.2.2. 測定機器

#### 5.2.2.1. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光製 Ubest V-550 型紫外可視吸収分光光度計を使用し、最大波長領域 900~200 nm について測定を行った。セルは光路長が 1 cm の石英セルを使用し、サンプルの濃度は 0.1 ~ 1 mM に調製した溶液を使用した。Ni(I)錯体と O<sub>2</sub> との反応、および Ni(II)錯体と KO<sub>2</sub> との反応の追跡はサンプル濃度 0.2 mM、測定温度は -78 °C にて行った。

#### 5.2.2.2. サイクリックボルタンメトリー

測定装置は ALS/CH Instruments Electrochemical Analyzer Model 600A を使用した。サンプルは、各種錯体を 1 mM になるように溶解させ、支持電解質として (n-Bu)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> を 0.1 M になるように溶解させた溶液を用いた。測定は、作用極にグラッシーカーボン、対極に白金線、参照極に Ag/Ag<sup>+</sup>電極を用い、掃引速度 0.1 V/s でおこなった。測定溶媒には DMF あるいは MeOH を用いた。観測された電位は Fc/Fc<sup>+</sup>基準の電位に換算した後、次の式を用いて NHE 基準の電位へと換算した(NHE = Fc/Fc<sup>+</sup> + 0.40)。<sup>12</sup>

#### 5.2.2.3. EPR スペクトル

測定装置は JEOL 社製 JES-RE 1X ESR spectrometer を使用した。サンプル濃度は 1.0 mM に調製し、Ni(I)錯体と O<sub>2</sub> との反応は、- 78 °C、Ar 雰囲気下において 1.0 mM の [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> の MeOH 溶液に等量の NaBH<sub>4</sub> を添加することで Ni(I)状態に還元し、さらにこの溶液を -78 °C において大気曝露した後、液体窒素中に浸してサンプルを凍結し、デュワーごと共振機に取り付けて測定を行った。KO<sub>2</sub> との反応は、- 78 °C において 1.0 mM の [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> の MeOH 溶液 50 μl と 10 mM の KO<sub>2</sub> の MeOH 溶液 50 μl を混合し、直ちに液体窒素中に浸してサンプルを凍結し、デュワーごと共振機に取り付けて測定を行った。

[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)と KO<sub>2</sub> との反応は、- 78 °C において 10 mM の錯体の MeOH 溶液 50 μl と 10 mM の KO<sub>2</sub> の acetone 溶液 50 μl を混合し、直ちに液体窒素中に浸してサンプルを凍結し、デュワーごと共振機に取り付けて測定を行った。

Na[Ni(L3)]と KO<sub>2</sub> との反応は、- 78 °C において 10 mM の錯体の acetone : DMF = 4 : 1 溶液

50  $\mu$ l と 18-crown-6-ether を用いて可溶化した  $\text{KO}_2$  の acetone : DMF = 4 : 1 溶液(10 mM) 50  $\mu$ l を混合し、その後、プロトンソースとして 100 mM の 2,6-dimethylpyridinium trifluoromethanesulfonate の acetone : DMF = 4 : 1 溶液 50  $\mu$ l を添加し、直ちに液体窒素中に浸してサンプルを凍結し、デュワーごと共振機に取り付けて測定を行った。

#### 5.2.2.4. 共鳴ラマンスペクトル

測定装置は Ritsu Oyo Kogaku Model MC-100DG を用いた。サンプル溶液の調製は-78  $^{\circ}\text{C}$  において 10 mM に調製した錯体の MeOH/MeCN 1:1 溶液 1 ml に、 $\text{KO}_2$  1.0 mg を添加することで行った。スペクトルの測定は-80  $^{\circ}\text{C}$  において行い、サンプルの励起には 364 nm の  $\text{Kr}^+$ レーザーを用いた。



### 5.3. 結果

#### 5.3.1. Ni(I)錯体[Ni(L1)]<sup>+</sup>とO<sub>2</sub>との反応

-78 °C において[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の MeOH 溶液に等量の NaBH<sub>4</sub>を反応させたところ、 $g_{\parallel} = 2.25$ ,  $g_{\perp} = 2.07$ に  $dx^2-y^2$  基底に特徴的な EPR シグナルが観測された(Figure 5-2 (A))。このことは Ni(II) 錯体[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> が NaBH<sub>4</sub> により平面構造を維持しつつ、Ni(I)状態に還元されたことを示唆している。この溶液を大気曝露した後、再度 EPR 測定をしたところ、 $g_{\perp} = 2.19$ ,  $g_{\parallel} = 2.05$ ,  $|A_{\parallel}| = 1.5$  mT に  $dz^2$  基底に特徴的なシグナルが観測された(Figure 5-2 (B))。この EPR スペクトルの変化は、Ni(I)状態に還元された[Ni(L1)]<sup>+</sup>が空気中の O<sub>2</sub> 分子と反応し、Ni(III)状態に酸化されたことを示唆している。この反応は NiSOD の superoxide 還元過程すなわち、Ni(II)中心の酸化過程と等価の反応である<sup>1</sup>。さらに、この系には N 原子( $I = 1$ )を有する外部配位子を添加していないにもかかわらず、 $g_{\parallel}$ 領域に triplet の hyperfine が観測されたことは非常に興味深い。なぜなら、これは O<sub>2</sub> との反応前には平面位であった支持配位子由来の N 原子の 1 つの配位が、反応後 axial 位に変化したことを強く支持する結果であるためである。この反応の際の構造変化については後で考察する。

#### 5.3.2. [Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>とKO<sub>2</sub>との反応

-78 °C において[Ni(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の MeOH 溶液に等量の KO<sub>2</sub>を添加したところ、 $g_{\perp} = 2.19$ ,  $g_{\parallel} = 2.05$ ,  $|A_{\parallel}| = 1.5$  mT にシグナルを示す EPR スペクトルが観測された(Figure 5-2 (C))。このスペクトルは先述の Ni(I)錯体[Ni(L1)]<sup>+</sup>と O<sub>2</sub>との反応で得られた EPR スペクトルと全く同一であった。この結果は NiSOD の superoxide 還元過程、すなわち、Ni(II)中心の酸化過程に対応する反応が本錯体で進行したことを示すと同時に、5.3.1項で示した Ni(I)錯体[Ni(L1)]<sup>+</sup>と O<sub>2</sub>との反応と同一の生成物を与えることも示唆している。このことは Ni(I)錯体[Ni(L1)]<sup>+</sup>と O<sub>2</sub>との反応と本反応の生成物が同様の吸収スペクトルを示すことから支持される(Figure 5-3, Figure 5-4)。さらにこの錯体の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、923 cm<sup>-1</sup> に side-on 型の Ni-dioxygen 種に特徴的なシグナル<sup>13</sup>が観測された(Figure 5-5)。

#### 5.3.3. [Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)とKO<sub>2</sub>との反応

-78 °C において[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)と等量の KO<sub>2</sub>を MeOH 中において反応させたところ、 $g_{\parallel}$ 領域に triplet の hyperfine splitting を有する  $dz^2$  基底に特徴的なスペクトルが観測された( $g_{\perp} = 2.17$ ,  $g_{\parallel} = 2.05$ ,  $|A_{\parallel}| = 1.5$  mT, Figure 5-6)。このことから、Ni(II)錯体[Ni(L2)](ClO<sub>4</sub>)は KO<sub>2</sub>によって Ni(III)状態に酸化されたことがわかった。この反応は NiSOD の不均化メカニズムにおける superoxide の還元過程に相当する反応である<sup>1</sup>。N 原子( $I = 1$ )を配位原子として有する外部配位子を添加していないにも関わらず triplet の hyperfine splitting が観測されたことは非常に興味深い。これは支持配位である L2 の amidato あるいは amino N 原子のどちらかが Ni(III)中心

の軸位を占めていることを意味する。

#### 5.3.4. Na[Ni(L3)]と KO<sub>2</sub>との反応

##### 5.3.4.1. 1-methylimidazole 共存下における Na[Ni(L3)]と KO<sub>2</sub>との反応

1-methylimidazole 共存下、-78 °C で Na[Ni(L3)]と KO<sub>2</sub>の acetone : DMF = 4 : 1 溶液を混合したところ、superoxide に特徴的な EPR シグナルが観測された( $g_{\parallel} = 2.12$ ,  $g_{\perp} = 2.00$ , Figure 5-7 (A))<sup>14</sup>。この溶液にプロトンソースとして 2,6-dimethylpyridinium trifluoromethanesulfonate を添加したところ、 $g_{\parallel}$ 領域に triplet の hyperfine splitting を示す  $dz^2$  基底に特徴的なスペクトルが得られた( $g_x = 2.31$ ,  $g_y = 2.26$ ,  $g_z = 2.01$ ,  $|A_{\parallel}| = 2.4$  mT, Figure 5-7 (B))。このスペクトルは 1-methylimidazole 共存下において、Na[Ni(L3)]を FcPF<sub>6</sub>によって酸化した際に観測されたスペクトルとまったく同一のものであった( $g_x = 2.31$ ,  $g_y = 2.26$ ,  $g_z = 2.01$ ,  $|A_{\parallel}| = 2.4$  mT, Figure 5-7 (C))。これは本錯体によって NiSOD による superoxide の還元過程と等価な反応が進行したことを意味する。

##### 5.3.4.2. 1-methylimidazole 非共存下における Na[Ni(L3)]と KO<sub>2</sub>との反応

1-methylimidazole を共存させない系において同様の反応を試みたところ、Na[Ni(L3)]と KO<sub>2</sub>の両溶液を混合した時点では superoxide に特徴的な EPR シグナルが観測されたもの( $g_{\parallel} = 2.12$ ,  $g_{\perp} = 2.00$ , Figure 5-8 (A))、プロトンの添加によって先のような Ni(III)種に特徴的なスペクトルは観測されず、EPR silent となった(Figure 5-8 (B))。これはプロトンの添加により superoxide が Ni(II)中心との電子授受を経由せずに不均化してしたためであると考えられる。

以上のことから、酸化状態における NiSOD の軸位への imidazole の配位には金属中心との電子授受を経由した superoxide の不均化を促進する効果があることが分かった。詳細については考察で述べる。

##### 5.3.4.5. imidazole の添加に伴う錯体 Na[Ni(L3)]のボルタモグラムの変化

Na[Ni(L3)]は MeOH 中では DMF 中とは異なり、不可逆なボルタモグラムを示した(Figure 5-9 (blue line))。これは溶媒である MeOH が酸化された錯体の Ni(III)中心に配位し、構造変化が生じたためであると予想される。この溶液に 1 等量の imidazole を添加したところ、還元波の negative shift が観測された(Figure 5-9 (pink line))。これは添加した imidazole が Ni(III)中心に配位にしたためと考えられる。酸化電位に変化が見られなかったのは、Ni(II)錯体 Na[Ni(L3)]には imidazole が配位しないためであると考えられる。

## 5.4. 考察

### 5.4.1. Ni(I)錯体と O<sub>2</sub> との反応および Ni(II)錯体と KO<sub>2</sub> との反応に伴う構造変化

Ni(I)錯体[Ni(L1)]<sup>+</sup>と O<sub>2</sub> との反応、および[Ni(L1)]<sup>2+</sup>と KO<sub>2</sub> との反応の検討の結果、両反応の生成物は同一の Ni(III)種であり、反応前には平面位であった支持配位子由来の N 原子の 1 つの配位が、反応後 axial 位に変化したことがわかった。また[Ni(L1)]<sup>2+</sup>と KO<sub>2</sub> との反応で得られたラマンスペクトルから、これらの反応の生成物が side-on 型の Ni-dioxygen 種であることが示唆された。以上の結果より推定される錯体の構造変化を Scheme 5-2 に示す。すなわち、これらの反応で生じた Ni(III)種は、まず、電子移動によって生じた peroxo イオンが side-on 型で Ni(III)中心に配位する。その結果、2 つの thioether S 原子のうち 1 つが第 4 章で紹介した [Ni(L4)]BPh<sub>4</sub><sup>15</sup> のように 'kick-up' し、Scheme 5-2 に示すように Ni(III)錯体上で軸変換が起こることで、2 つの amine N 原子のうち 1 つが錯体の軸位に配置した構造をとっているものと考えられる。Ni(II)錯体[Ni(L2)]<sup>+</sup>と KO<sub>2</sub> の反応によっても同様の EPR スペクトルが得られ、また第 4 章において Ni(III)錯体[Ni(L2)]<sup>2+</sup>の thioether S 原子が 'kick up' していたことから、この反応の生成物も同様の構造をとっているものと考えられる。

一般的な、dz<sup>2</sup>基底の EPR スペクトルを示す Ni(III)錯体に <sup>14</sup>N 原子(I = 1)を含む外部配位子を添加すると、その外部配位子は本錯体とは異なり、Ni(III)中心の軸位から配位することが知られている<sup>16-20</sup>。しかし、これらの錯体はいずれも配位子に強固に平面配位を強制する amidato 部位や imino 部位を有しており、配位子の柔軟性(flexibility)は非常に乏しいと考えられる。これに対して Ni(II)錯体[Ni(L1)]<sup>2+</sup>および[Ni(L2)]<sup>+</sup>は、配位子骨格に柔軟な amino 部位を有しており、これらの錯体に比べて構造変化を起こすのに十分な骨格構造の柔軟性を有していると考えられる。実際にこのような 'kick-up' 構造は配位子骨格に柔軟な amino 部位を有する Cu(II) または Ni(II)錯体で幾つか報告されており、これらの錯体は平面位に配位した thioether S 原子が、より強い donor 性を示す配位子が配位した際にこのような 'kick-up' 構造をとることが知られている<sup>15,21-23</sup>。

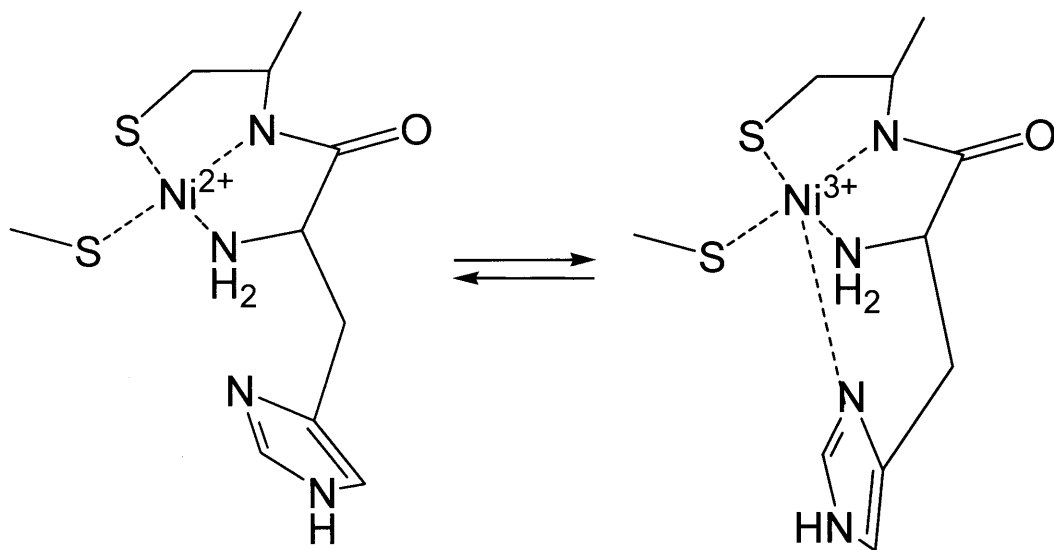
これと、第 4 章での結果から、NiSOD の活性中心には Cys6 由来の thiolato S 原子の 'kick up' が引き起こされるだけの空間的余裕、骨格構造の柔軟性があることが予想される。このことから、NiSOD 活性中心においても superoxide の還元過程の中間体としてこのような構造変化を起こしている可能性がある。ただし、本系はいずれも Ni(III)中心への外部配位子の軸配位を形成しない系である。このため、NiSOD の活性中心で同様の構造変化が起こる可能性を検討するには Ni(III)中心の軸位に外部配位子が配位した系での検討が必要になる。そこで、次項では Ni(III)状態において外部配位子が軸位から配位する Ni(II)錯体 Na[Ni(L3)]を用いた検討を行った。

#### 5.4.2. [Ni(L3)]<sup>+</sup>と KO<sub>2</sub>との反応における imidazole の軸配位の効果

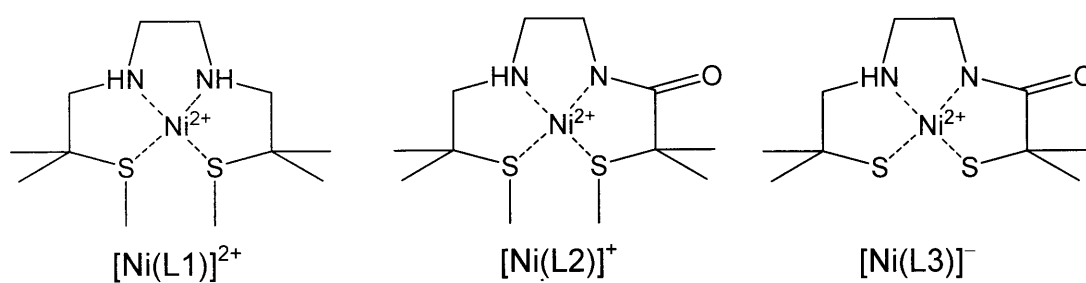
第 4 章において amino-amidato-dithiolato 型の配位構造を有する[Ni(L3)]<sup>+</sup>および Ni(III)錯体 [Ni(L3)]<sup>+</sup>は、他の thioether 型の錯体とは異なり、NiSOD と同様の imidazole の軸配位挙動を示すことを明らかにした。そこで、本錯体の Ni(III)状態における imidazole の軸配位が superoxide 還元過程に与える影響を検討したところ、KO<sub>2</sub>との反応は 1-methylimidazole 共存下においてのみ進行した。これは imidazole の軸配位により Ni(III)状態が安定化し、この反応の平衡が Ni(III)状態の生成側に偏ったためであると考えられる。このことは Na[Ni(L3)]<sup>+</sup>の電気化学測定により、imidazole の添加に伴い、還元波が negative shift したことによって確かめられた。よって、NiSOD の Ni(III)状態における imidazole の配位には superoxide の還元過程の平衡を peroxide の生成側に偏らせる効果があると考えられる。また、この反応の際 imidazole を添加していない系とは異なり、side-on 型の Ni(III)-peroxo 種の形成に由来すると考えられる EPR スペクトルは観測されず、軸位から imidazole が配位した Ni(III)錯体[Ni(L3)]<sup>+</sup>と同一のスペクトルが観測された。このことから、Ni(III)状態における imidazole の配位には Ni(III)中心の空配位座を一つふさぐことにより、Ni(II)中心と superoxide との電子授受により、side-on 型の Ni(III)-peroxo 種の形成を妨げ、SOD の触媒サイクルをよりスムーズに進行させる効果があることが示唆された。

#### 5.5. 結論

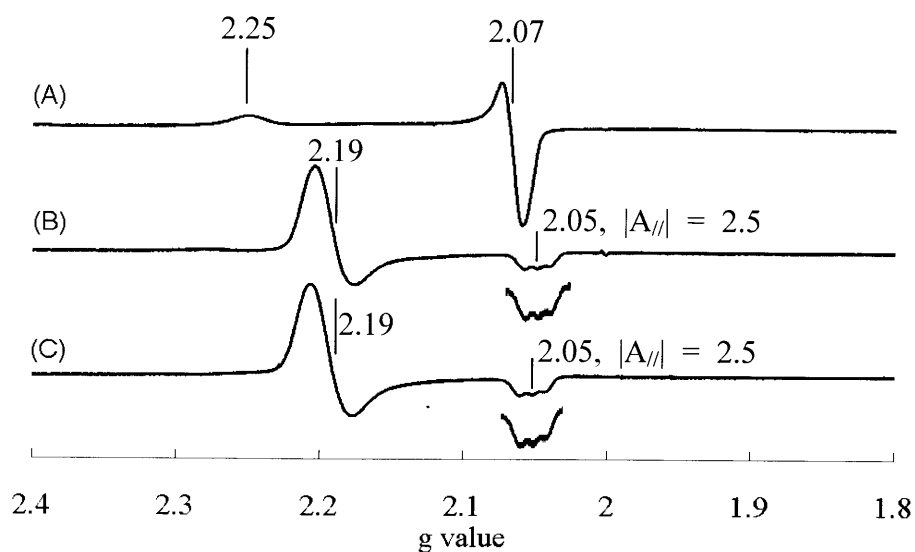
Ni(I)状態に還元した本錯体と O<sub>2</sub>との反応、および Ni(II)状態の本錯体と KO<sub>2</sub>との反応はともに同じ Ni(III)錯体を与えた。EPR スペクトル測定、共鳴ラマンスペクトル測定により、これらの反応の生成物の構造はニッケル中心との電子の授受による還元により生じた peroxo イオンが side-on 型の配位で Ni(III)中心に配位し、その結果 2 つの thioether S 原子のうち 1 つが 'kick up' したものであることが予想された。また、Ni(II)錯体[Ni(L2)]<sup>+</sup>も KO<sub>2</sub>との反応の際、同様の構造変化を伴っていることが示唆された。しかしながら、この反応はいずれも Ni(III)中心への外部配位子の軸配位を含まない系であった。そこで、Ni(III)状態において NiSOD と同様の imidazole の軸配位挙動を示す Ni(II)錯体[Ni(L3)]<sup>+</sup>と KO<sub>2</sub>との反応を検討した結果、Ni(III)状態における imidazole の配位には、Ni(III)状態を安定化し、superoxide の還元過程の平衡を生成側に偏らせる効果があることが示唆された。この推測は Ni(II)錯体 Na[Ni(L3)]<sup>+</sup>の Ni(II)/(III)に対応する還元電位が imidazole 共存下で negative shift したこと、および 1-methylimidazole 共存下においてのみ、Na[Ni(L3)]<sup>+</sup>と KO<sub>2</sub>との反応によって Ni(III)錯体の生成が確認されたことによっても支持された。さらにこの反応で得られた EPR スペクトルから、Ni(III)中心への imidazole の配位には Ni(III)中心の空配位座を一つふさぐことにより、Ni(II)中心と superoxide との電子授受により、side-on 型の Ni(III)-peroxo 種の形成を妨げ、SOD の触媒サイクルをよりスムーズに進行させる効果があることが示唆された。



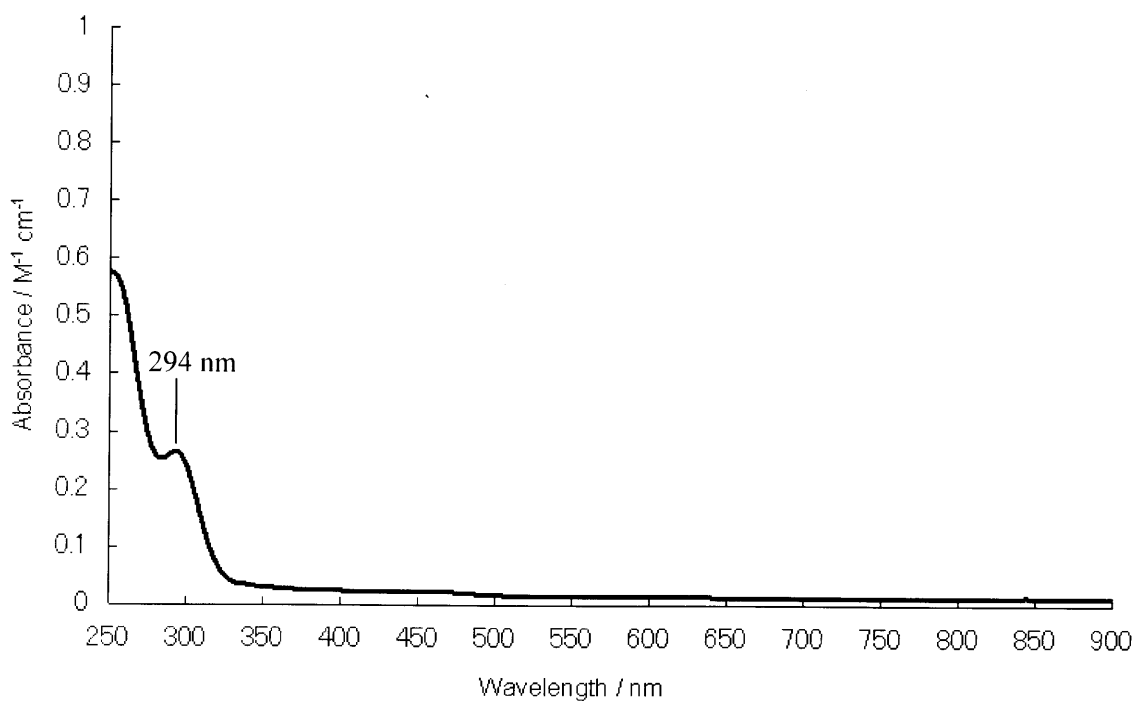
**Scheme 5-1.** Schematic structures of NiSOD active site in the reduced (left) and oxidized (right) states.



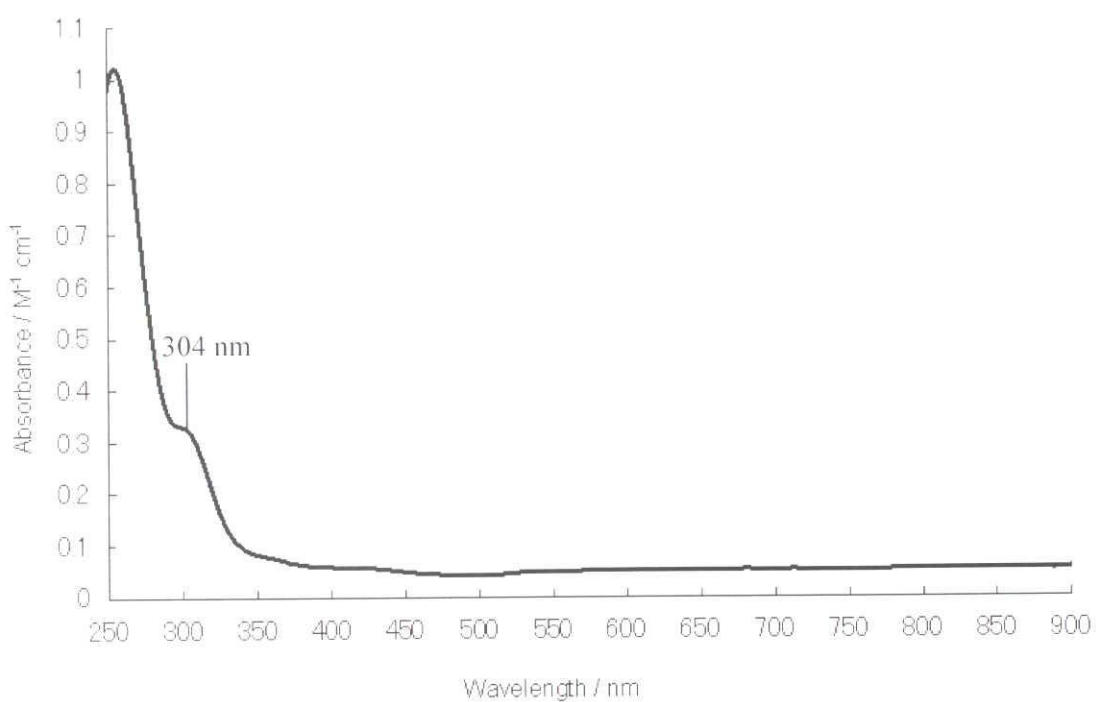
**Figure 5-1.** Ni(II) complexes prepared as a model compound of NiSOD active site.



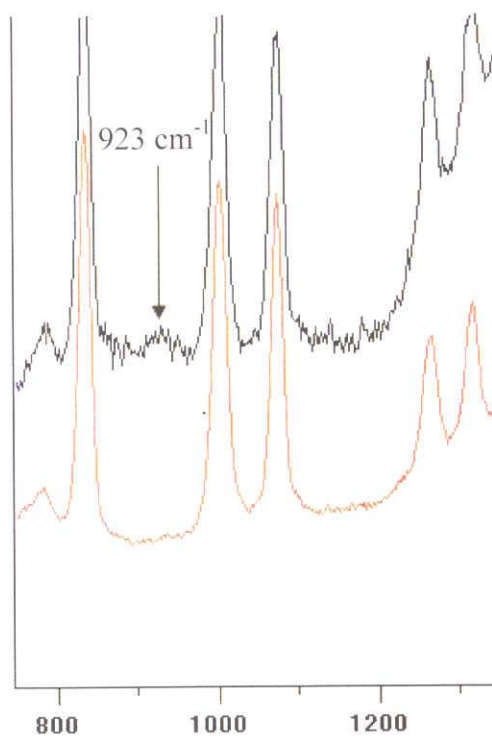
**Figure 5-2.** EPR spectra observed (A) after reduction of  $[\text{Ni}(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$  using  $\text{NaBH}_4$ , (B) after exposure of the solution to air, and (C) by reaction between  $[\text{Ni}(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$  and  $\text{KO}_2$ .



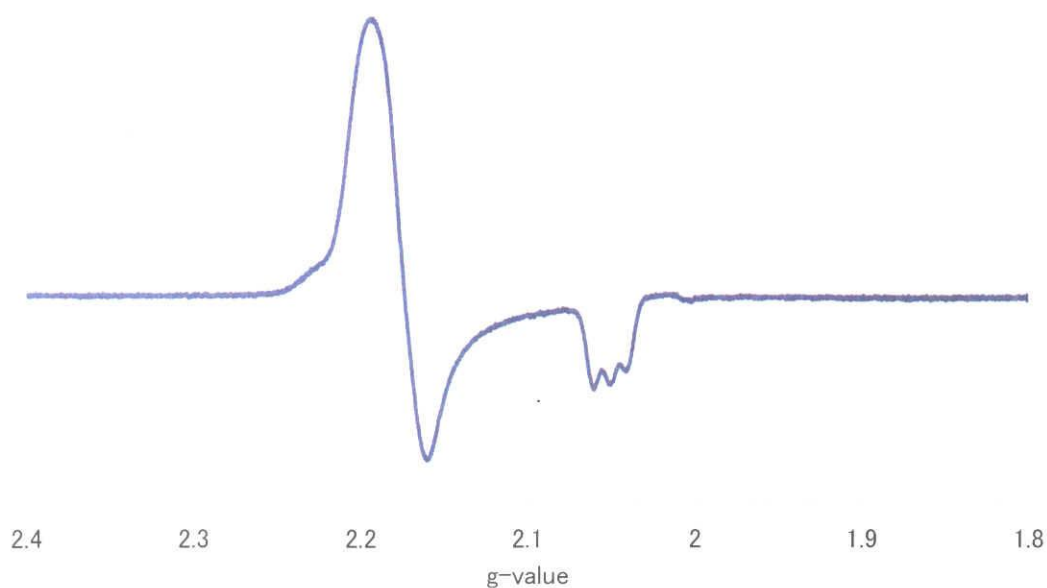
**Figure 5-3.** UV-vis spectrum obtained by the reaction between the reduced Ni(I) complex  $[\text{Ni}(\text{L1})]^+$  and  $\text{O}_2$ .



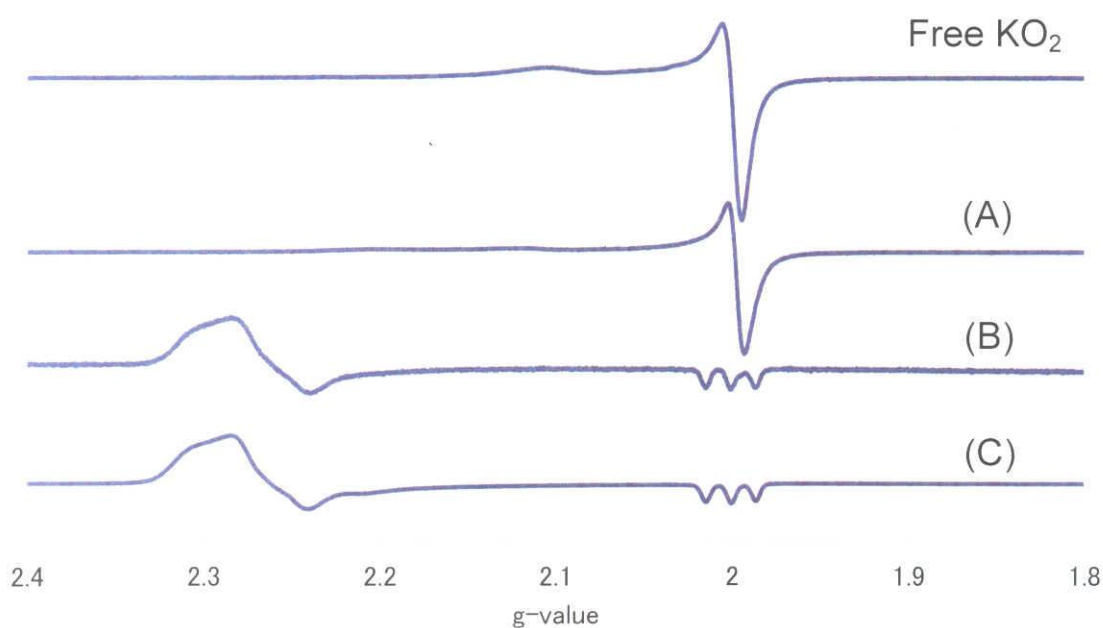
**Figure 5-4.** UV-vis spectrum obtained by the reaction between the  $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  and  $\text{KO}_2$ .



**Figure 5-5.** rR spectra of oxidized product obtained by the reaction between  $[\text{Ni}(\text{L}1)](\text{ClO}_4)_2$  and  $\text{KO}_2$  at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (upper) and at room temperature (bottom).

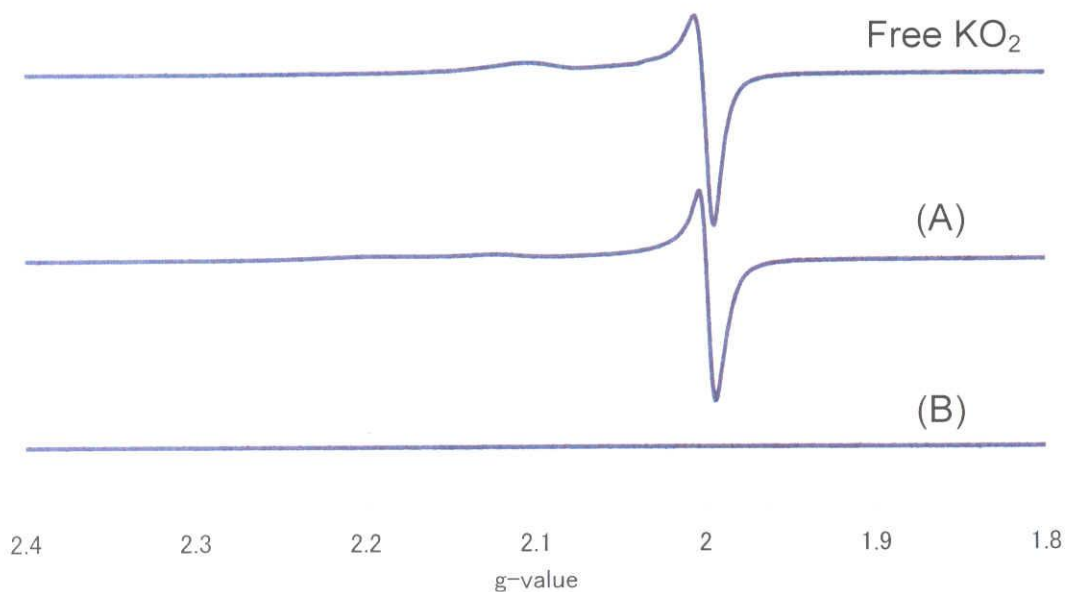


**Figure 5-6.** EPR spectrum of oxidized product of  $[\text{Ni}(\text{L}2)]^+$  obtained by reaction with  $\text{KO}_2$  in MeOH.

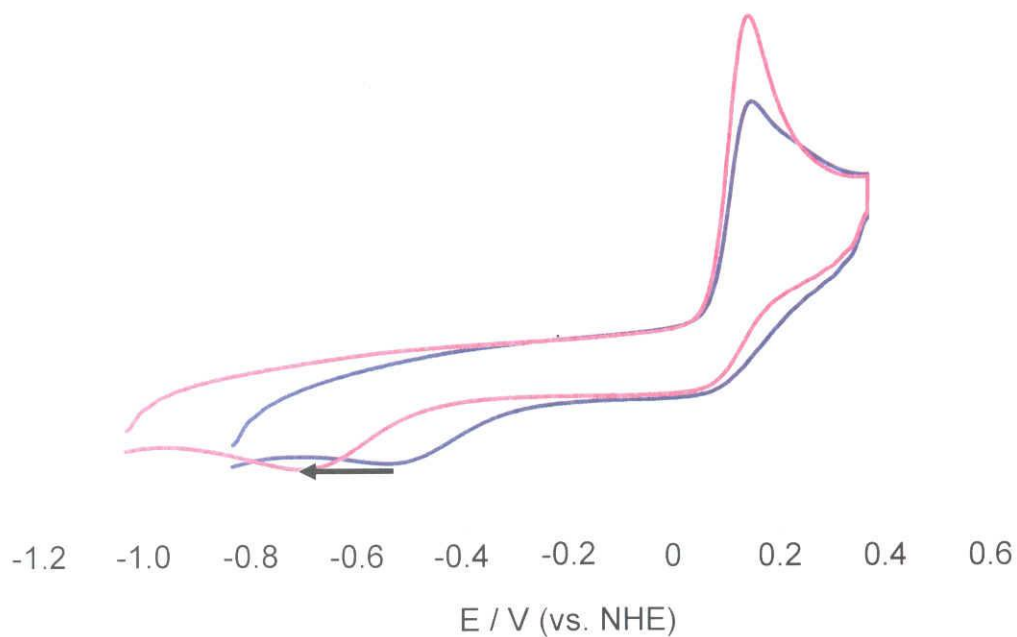


**Figure 5-7.** EPR spectra obtained by the reaction between  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  and  $\text{KO}_2$  *in the presence of* 1-methylimidazole (A) before addition of 2,6-dimethylpyridinium trifluoromethanesulfonate, and (B) after addition of 2,6-dimethylpyridinium trifluoromethanesulfonate. Spectrum (C) was obtained by oxidation of  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  using  $\text{FcPF}_6$  as oxidizing agent.

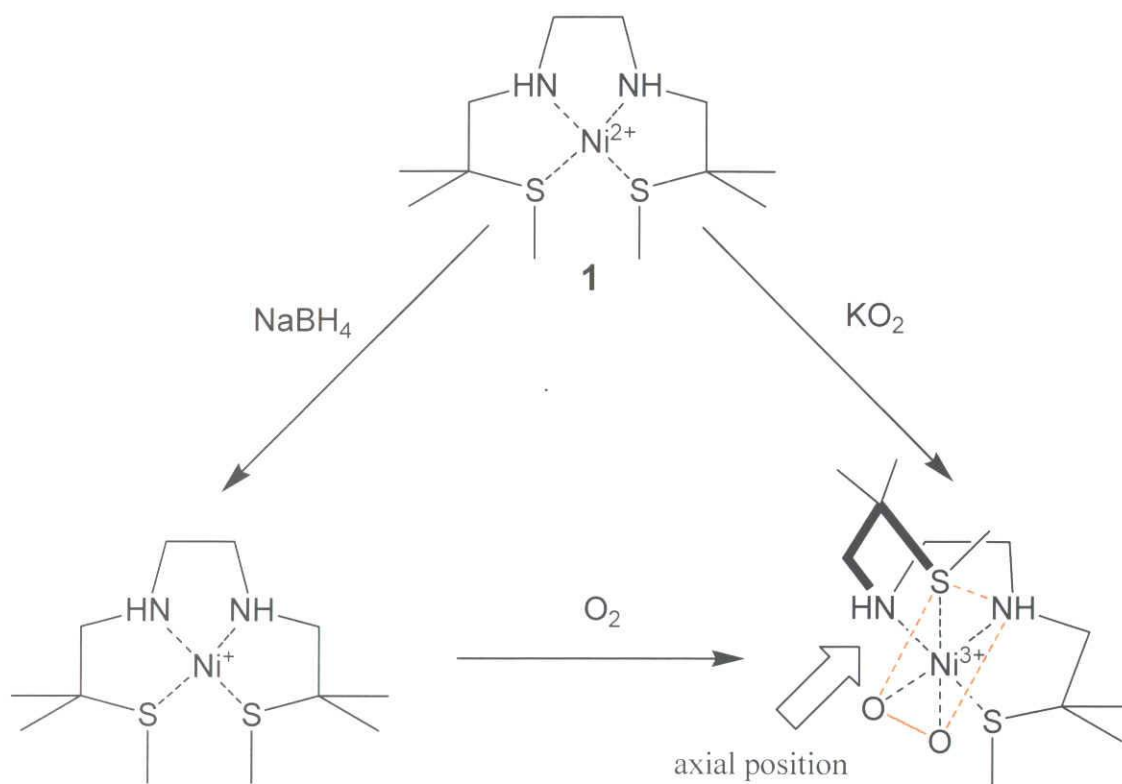




**Figure 5-8.** EPR spectra obtained by the reaction between  $\text{Na}[\text{Ni}(\text{L}3)]$  and  $\text{KO}_2$  in the absence of 1-methylimidazole (A) before addition of 2,6-dimethylpyridinium trifluoromethanesulfonate, and (B) after addition of 2,6-dimethylpyridinium trifluoromethanesulfonate.



**Figure 5-9.** Cyclic voltammograms of  $[\text{Ni}(\text{L}3)]\text{Na}$  before (blue line) and after (pink line) addition of 1 eq. of 1-methylimidazole.



**Scheme 5-2.** The reaction scheme of the complex  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)_2$  treated with  $\text{NaBH}_4$  and subsequent addition of  $\text{O}_2$ , and that of  $[\text{Ni}(\text{L}2)](\text{ClO}_4)_2$  with  $\text{KO}_2$ .

## 5.6. 参考文献

1. Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 889-896.
2. Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038-8047.
3. Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Carugo, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8569-8574.
4. Fiedler, A. T.; Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J.; Brunold, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5449-5462.
5. Pelmeshnikov, V.; Siegbahn, P. E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7466-7475.
6. Prabhakar, R.; Morokuma, K.; Musaev, D. G. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1438-1445.
7. Neupane, K. P.; Gearty, K.; Francis, A.; Shearer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14605-14618.
8. Fiedler, A. T.; Brunold, T. C. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 8511-8523.
9. Shearer, J.; Dehestani, A.; Abanda, F. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2649-2660.
10. Neupane, K. P.; Shearer, J. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10552-10566.
11. Mullins, C. S.; Grapperhaus, C. A.; Kozlowski, P. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 617-625.
12. Gange, R. R.; Coval, C. A.; Lisensky, G. C. *Inorg. Chem.*, **1980**, *19*, 2854-2855.
13. Yao, S.; Bill, E.; Milsmann, C.; Wieghardt, K.; Driess, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 7110-7113.
14. Knowles, P. F.; Gibson, J. F.; Pick, F. M.; Bray, R. C. *Biochem. J.*, **1969**, *111*, 53-58.
15. Nakane, D.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Masuda, H. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **2009**, *34*, 513-516.
16. Ciurli, S.; Holm, R. H.; *Inorg. Chem.*, **1991**, *30*, 743-750.
17. Green, K. N.; Broyhers, S. M.; Jenkins, R. M.; Carson, C. E.; Grapperhaus, C. A.; Darensbourg, M. Y. *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 7536-7544.
18. Hanss, J.; Kruger, H. D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 360-363.
19. Lappin, A. G.; Murray, C. K.; Margerrum, D. W. *Inorg. Chem.*, **1978**, *17*, 1630.
20. (a) Branscombe, N. D-J.; Atkins, A. J.; Marin-Becerra, A.; McInnes, E. J-L.; Mabbs, F. E.; McMaster, J.; Schroder, M. *Chem. Commun.*, **2003**, 1098-1099. (b) Gastel, M.; Shaw, J. L.; Blake, A. J.; Flores, M.; Schroder, J. M.; Lubitz, W. *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 11688-11697.
21. Tubbs, K. T.; Fuller, A. L.; Bennet, B.; Arif, A. M.; Berreau, L. M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4790-4791.
22. Lee, D. H.; Hatcher, L. Q.; Vance, M. A.; Sarangi, R.; Milligan, A. E.; Narducci Sarjeant, A. A.; Incarvito, C. D.; Rheingold, A. L.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I.; Karlin K. D.

*Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 6056-6068.

23. Kaasjager, V. C.; Bouwman, E; Jan Reedijk, S. G.; Grapperhaus, C. A.; Reibenspies, J. H.; Smee, J. J.; Darensbourg, M. Y.; Kovacs, A. D.; Thomson, L. M. *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 1837-1844.



## 第6章 結言

NiSOD は *streptomyces* 属や *cyanobacteria* 中で発見されたニッケルイオン含有酵素であり、生体内で発生した superoxide を、Ni(II)および Ni(III)状態をサイクルすることで酸素分子と過酸化水素へと不均化する反応を触媒している。

NiSOD の Ni(II)および Ni(III)状態における活性中心の構造は X 線結晶構造解析により明らかにされており、その第1配位圏の構造は、Ni(II)状態では末端 His 由来の amino 基、主鎖ペプチド由来の脱プロトン化した amidato 基、および Cys 残基由来の thiolato 基が配位した4配位平面構造、Ni(III)状態ではこれらの配位に加えて末端 His 残基由来の imidazole が中心金属の軸位から弱く相互作用した歪んだ四角錐構造をしていることが明らかにされている。この構造は Ni(III)状態の NiSOD の EPR スペクトルが triplet の hyperfine splitting を示すことによっても支持されている。しかしながら、末端 His を Gln に置換した SOD (HIQ-NiSOD)も同様の triplet の hyperfine splitting を示すことから NiSOD の活性中心の構造は結晶構造が明らかになった現在でもなお、議論の余地を残している。

一方、NiSOD 活性中心の第2配位圏に目を向けると、主鎖ペプチド由来の amidato O 原子が2つの水分子と、Cys6 残基由来の thiolato S 原子が主鎖ペプチドの NH プロトンとそれぞれ水素結合を形成していることが見出される。

以上の HIQ-NiSOD が天然の NiSOD の結晶構造と矛盾した EPR スペクトルを示すこと、および NiSOD 活性中心の第2配位圏にみられる水素結合が中心金属の性質に与える影響に注目した研究は未だ報告されておらず、また、NiSOD の superoxide 不均化メカニズムにおける superoxide の還元過程、および酸化過程に対応する Ni(II)および Ni(III)錯体と superoxide との反応の中間体を分光学的にとらえた例も存在しない。

本研究では、以上の3点を研究の軸とし、NiSOD の活性中心が有する柔軟性、amidato O 部位、thiolato S 部位にみられる水素結合が中心金属の性質に与える影響、Ni(II)錯体と superoxide との反応中間体の構造を、モデル錯体を用いた検討を行うことで明らかにすることを目的とした。

第1章では、酸素呼吸を行う上で避けることのできない活性酸素種の発生とそれによる障害、活性酸素の除去機構の一端としての SOD の役割、NiSOD の構造の特異性、および NiSOD に関する研究を紹介し、NiSOD について明らかにされている点、未だ検討がなされていない点を示し、本研究の意義、目的を明確にした。

第2章では一連の  $N_2S_2$  型 Ni(II)錯体の分光学的、電気化学的性質を NiSOD と比較したところ、NiSOD 活性中心における中心金属の性質は、第1配位圏における N 原子、S 原子の配位様式に強く依存していることを明らかにした。さらに、一連の  $N_2S_2$  型 Ni(II)錯体の酸化還元電位の比較により、NiSOD 活性中心に見られる amino-amidato-dithiolato 型の配位構造は、中

心金属の酸化還元電位を与える SOD 活性を発現する上で最も適切な  $N_2S_2$  型の配位様式であることが明らかにした。

第 3 章では NiSOD の第 2 配位圏にみられる amidato O 原子と水分子との水素結合、および thiolato S 原子と主鎖ペプチドの NH プロトンとの水素結合相互作用の影響を diamino-dithioether 型、amino-amidato-dithioether 型および amino-amidato-dithiolato 型 Ni(II)錯体を用いて検討した。その結果、thiolato S 部位における水素結合には thiolato S 原子の電子密度を低下させ、その酸化を防ぐはたらきがあること、さらに NiSOD が示す酸化還元電位は第 1 配位圏の配位構造と、第 2 配位圏の amidato O 部位および thiolato S 部位との水素結合によって調整されていることが推測された。

第 4 章では HIQ-NiSOD が天然の NiSOD で見られる結晶構造と矛盾した EPR スペクトルを示す原因を突き止めるため、thioether S 原子の配位を有する  $N_2S_2$  型の Ni(III)錯体への外部配位子(imidazole、pyridine)の配位に伴う構造変化を検討し、NiSOD 活性中心には、強い donor 性を有する外部配位子が与えられた場合、Cys6 由来の thiolato S 原子の配位が軸位へと 'kick up' することが可能な骨格構造の柔軟性を有していることが示唆された。一方、thiolato S 部位を有する Ni(III)錯体は thioether S 原子の配位を有する Ni(III)錯体ほどには 'kick up' を起こしにくいことが明らかになった。このことから、NiSOD 活性中心に見られる thiolato S 原子の役割の一つに S 原子の 'kick up' を抑制し、中心金属と superoxide の間の素早い電子授受を可能にする効果があると考えられた。

第 5 章では NiSOD の superoxide の還元過程に相当する各種 Ni(II)錯体と  $KO_2$  との反応を検討し、その結果生じた Ni(III)錯体の構造について考察した。その結果 NiSOD 活性中心まわりの骨格構造には side-on 型の Ni(III)-peroxo 種が生成することが可能な柔軟性を有していることが示唆された。さらに、Ni(III)状態における imidazole の軸配位にはこの過程の平衡を生成側に偏らせる効果があることを明らかにした。さらにこの軸配位には Ni(III)中心の空配位座を一つふさぐことにより、Ni(II)中心と superoxide との電子授受により、side-on 型の Ni(III)-peroxo 種の形成を妨げ、SOD の触媒サイクルをよりスムーズに進行させる効果があることが示唆された。

以上、本研究において NiSOD の活性中心に存在するニッケルイオンの酸化還元電位は、第 1 配位圏の amino-amidato-dithiolato 型の配位構造に加え、第 2 配位圏にみられる水素結合によって初めて SOD 活性を発現するにふさわしい値に調整されていることが推測された。また、NiSOD の活性中心には、少なくとも構造的には、Cys6 由来の thiolato S 原子が、より donor 性が強い外部配位子の配位により equatorial 位から axial 位へと 'kick up' するに十分な骨格構造の柔軟性があることが示唆された。一方で thiolato S 原子の配位を有する Ni(II)、Ni(III)錯体ではこのような 'kick up' を抑制する効果があることが示され、thiolato S 原子が平面位から配位した平面 4 配位構造を有する NiSOD 活性中心周りの構造は容易にはこのような 'kick up' は起

こさず、superoxide と中心金属との素早い電子移動が可能な環境であることが示唆された。さらに Ni(III)状態における His 側鎖由来の imidazole の配位には Ni(III)状態を安定化することで superoxide の還元過程を促進する効果があること、さらに、この過程で生じた Ni(III)中心の空配位座を一つふさぐことにより、side-on 型の Ni(III)-peroxo 種の形成を妨げ、SOD の触媒サイクルをよりスムーズに進行させる効果があることが示唆された。

本研究で得られた知見が NiSOD の反応メカニズムを解明する上で、さらに錯体化学、生物無機化学の発展にわずかながらでも貢献できることを期待し、結言とする。





## 著者発表の論文

1. Synthesis of an N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-type Ni(II) Complex Directed to NiSOD Active Site and Its Structural, Electrochemical, and Spectroscopic Properties  
D. Nakane, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda  
*Transaction of the Material Research Society of Japan*, **34**, 513-516 (2009).
2. A Square Planar Ni(II) Complex with an N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> Donor Set Similar to the Active Centre of Nickel-containing Superoxide Dismutase and Its Reaction with Superoxide  
D. Nakane, S. Kuwasako, M. Tsuge, M. Kubo, Y. Funahashi, T. Ozawa, T. Ogura, and H. Masuda  
*Chemical Communications*, accepted
3. A Square Planar Ni(II) Complex with an Asymmetric N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> Donor Set as a Model for the Active Site of Nickel-containing SOD: Structural Conversion Driven by Addition of a Strong Donor Ligand in the High Oxidation State  
D. Nakane, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda  
*Chemistry Letters*, accepted
4. ( $\mu$ -azido)[*N,N'*-(2-methylmercapto-2-methylpropyl)-1,2-diaminoethane] nickel(II) perchlorate acetonitrile monosolvate  
D. Nakane, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda  
*Acta Crystallographica E*, in submission
5. Spectroscopic and Electrochemical Studies of N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Type Ni(II) Complexes as Model Compounds of the NiSOD Active Center  
D. Nakane, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda  
*Inorganic Chemistry*, in submission

## 参考論文

1. Spectroscopic and Electrochemical Properties of Ni(II) Complexes with Axial Coordination as an Active Site Model of NiSOD  
D. Nakane, T. Fujii, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda  
*Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **12**, S85 (2007).
2. Spectroscopic and Electrochemical Studies on Influences of Hydrogen Bond in NiSOD Active Center  
D. Nakane, T. Inomata, Y. Funahashi, T. Ozawa, and H. Masuda  
*Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **14**, S130-S131 (2009).



## 謝辞

本研究は名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻増田研究室において、増田秀樹教授の適切なお指導のもと、大学院工学研究科博士後期課程の研究として行われたものであります。ここに増田秀樹教授に深く感謝の意を表すとともに謹んで御礼申し上げます。また、研究を金銭的にご支援していただいた知的クラスター創成事業の方々に心より感謝申し上げます。

本研究を行うに当たって、日頃より叱咤・激励していただき、適切なお助言をしていただいた小澤智宏准教授ならびに船橋靖博准教授に厚く御礼申し上げます。また、日頃から様々な便宜を図っていただいた谷山八千代技官、天野浩子さんに御礼申し上げます。

また、共鳴ラマンスペクトル測定においてお世話になりました兵庫県立大学の小倉尚志教授、久保稔博士に深く御礼申し上げます。

常に的確なお助言をしていただき、研究者としての在り方をご教示していただいた奥村健志博士、高橋勇雄博士、藤井達也博士、矢野卓真博士をはじめとする諸先輩方、苦楽を共にした同期の江口弘氏、河戸春樹氏、田嶋陽輔氏、古田央哲氏、齋藤真梨子さん、西川玲子さん、安江展子さん、西島千佳さん、齋藤航氏、五味渕大介氏、そして日々の実験を共にした柴山知範氏、杉浦由教氏、諏訪部達也氏、鶴留大介氏、和田昂氏、水野嵩麗氏、高木啓充氏、栗木悠氏をはじめとする増田研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後になりましたが、長きにわたる学生生活を精神的、金銭的に支えてくださった両親に感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

2010年6月

中根 大輔