ニトロゲナーゼ活性中心の構造と機能に関する新展開

Recent Progress in Research on the Structures and Functions of Nitrogenase Active Sites

大木 靖弘* (名古屋大学大学院理学研究科)

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, Yasuhiro Ohki*

Received July 29, 2015; E-mail: ohki@chem.nagoya-u.ac.jp

Abstract. Nitrogenases are a class of enzymes that catalyze the reduction of N_2 to NH_3 under ambient conditions in the presence of protons and electrons. The active site of the most prevalent nitrogenase is called as the FeMo-cofactor, which is often designated as the M-cluster. It consists of one molybdenum, seven irons, and several sulfur atoms, and represents the most complex metal-sulfur cluster in biology. Some homologues containing vanadium or iron in place of molybdenum exist in alternative nitrogenases, while a precursor of FeMo-cofactor was also identified as an all-iron homologue. Recent crystallographic and biochemical studies on nitrogenases uncovered some important clues about the structure-function relationship of the nitrogenase active sites, such as the precise structure of the FeMo-cofactor, unique catalytic functions of the FeMo-cofactor and its homologues, and the detailed mechanistic insights in the nitrogen fixation. Transition-metal mediated conversion of small molecules that contain triple bonds has been of interest to the community of coordination chemistry, and this contribution introduces some important progresses in the nitrogenase chemistry/biochemistry made in recent years.

に保持され、Mo にはさらに *R*-ホモクエン酸がキレート配位している。FeMo-cofactor の他にも、Mo の代わりに V や Fe を持つ FeV-cofactor や FeFe-cofactor も、場合によって発現することが知られている¹⁾。また、ニトロゲナーゼが還元できる基質は、 N_2 の他にも $HC\equiv CH$ や $[CN]^-$ 等があり、本稿で以下紹介する通り、CO や CO_2 を還元し C-C 結合を形成する反応も、最近見いだされている。

錯体化学の観点から興味の対象になるのは、ニトロゲナーゼ活性中心の構造と機能の関係、すなわち活性中心をなす金属-硫黄クラスターがどのように N_2 等の基質を捕捉し還元するかであり、また合成化学の観点からは、複雑な金属-硫黄クラスター構造の生成過程にも興味をもたれる。最近5年ほどの間に、ニトロゲナーゼ活性中心の構造や生合成、窒素固定メカニズム、および基質還元機能に関して大きな進展が見られたことから、本稿ではそれらの成果を整理し紹介するとともに、活性中心をなす金属-硫黄クラスターの働きについて議論したい。

1. はじめに

大気中の N_2 をプロトン存在下で還元してアンモニアに変換する酵素は、ニトロゲナーゼと呼ばれる。その代表的な活性中心は FeMo-cofactor であり、Fig. 1 に示す通り、計 8 つの金属原子と 9 つの S 原子を含み、中心にある C 原子は三角柱状に配列した 6 つの Fe を架橋している。この金属-

硫黄クラスターは、末端の Fe に結合したシステインの硫黄と、Mo に配位したヒスチジン残基のイミダゾールによってタンパク中

Fig. 1 Structure of the nitrogenase FeMo-cofactor. Cys = cysteine, His = histidine

2. FeMo-cofactor や前駆体の構造解析とクラスター生成過程

FeMo-cofactor の構造が初めて報告されたのは 1992 年であるが²⁾、当時のデータ精度では詳細な構造決定は困難であった。より高精度のデータが得られた 2002 年には、クラスターの中心に 6 つの鉄を架橋する軽原子 X ($X = O, N$, or C) が存在することが判明し³⁾、最終的には Fig. 1 に示す通り $X = C$ であることが、2011 年に確認された^{4,5)}。このとき用いられたデータ類は、高分解能 (1.0 Å) の X 線結晶回折データから求めた詳細な電子密度解析結果と、電子スピンエコー変調 (ESEEM)、および X 線発光分光 (XES) であった。

分光法に基づく $X = C$ の帰属は、以下の通り行われた。まず ESEEM 測定においては、タンパクを構成するアミノ酸や FeMo-cofactor の中心原子を含めた、全ての C 原子または N 原子を ^{13}C または ^{15}N 標識したサンプルを用い、休止状態にある FeMo-cofactor の電子スピン ($S = 3/2$) と ^{13}C または ^{15}N の核スピン ($I = 1/2$) の間に見られる超微細構造を調べた。結果として ^{13}C 標識した場合に大きなカップリングが見られたことから、FeMo-cofactor の中心に C 原子が存在することが示唆された。

連絡先著者名: 大木 靖弘

連絡先: 464-8602 名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院理学研究科

Tel: 052-789-2476 Fax: 052-789-2943

Corresponding Author: Yasuhiro Ohki

Address: Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

Keywords: nitrogenase, enzyme, molybdenum, vanadium, iron, sulfur, cluster, nitrogen fixation

Fig. 2 Possible biosynthetic pathways to the FeMo-cofactor from K-cluster through L-cluster. Mechanisms of carbon insertion are also proposed. SAM = S-adenosyl-methionine, 5'-dA = 5'-deoxyadenosyl moiety.

また XES 測定においては、Fe の 1s 電子を排出したところへ S の 3s 電子が充填される際の放出エネルギーを主に観測した。このとき、FeMo-cofactor 以外にタンパクに含まれる Fe-S 成分 (P-cluster) の影響を差し引くことで、FeMo-cofactor 由来のスペクトル成分を求め、さらに DFT 計算で求めた構造に基づいてシミュレーションした XES スペクトルと実測を比較することで、X = C であると帰属した。

FeMo-cofactor の構造が最終決定された翌年の 2012 年には、中心 C 原子の由来が S- アデノシルメチオニン (SAM) の S-CH₃ 部位であることが、放射性の ¹⁴C を用いた同位体標識実験により明らかにされた⁶⁾。またこの中心 C 原子は、酵素反応過程で放出されないことも確認された⁷⁾。SAM 由来の CH₃ 基が取り込まれるのは、FeMo-cofactor の生合成過程のうち、比較的早い段階である (Fig. 2)。このとき K-cluster と呼ばれる一対のキューバン型 [Fe₄S₄] クラスタが連結し、中心 C 原子をもつ [Fe₈S₉C] 骨格の L-cluster (Fig. 2 右下) が生成すると考えられている。続いて、L-cluster に含まれる Fe の一つが Mo に置換され、FeMo-cofactor へと変換される。この一連の過程では、K-cluster → L-cluster → FeMo-cofactor へと変換される度に別のタンパクへと金属-硫黄クラスターが移送されることも特徴的である。

L-cluster が生成する過程では、SAM 由来の CH₃ 基が C-H 結合を持たない C 原子へと変換される。この C-H 結合切断反応の少なくとも一部は、SAM から別途生じるアデノシルラジカル (Fig. 2 の 5'-dA•) が H 原子を引き抜くことで達成される。つまり SAM は、CH₃ 基およ

びアデノシルラジカルの供給源として、二通りの役割を果たしている。なお、SAM の S- アデノシル結合を開裂させて、アデノシルラジカル (とメチオニン) を生じる反応は、radical-SAM⁸⁾ と総称される SAM 含有 Fe-S タンパクの代表的な機能であり、Co-C 結合をラジカル開裂させてアデノシルラジカルを生じるアデノシルコバラミン (補酵素 B₁₂) と同様に、生体内の様々なラジカル反応に利用される。

FeMo-cofactor の前駆体である L-cluster (Fig. 2 右下) は、中心 C 原子を持つ [Fe₈S₉C] クラスタであることが、タンパク結晶構造解析により確認された⁹⁾。ただし中心 C 原子の存在は、分解能 (2.6 Å) が不十分な回折データではなく、前々段落に述べた生化学実験の結果⁶⁾に基づいて証明されている。L-cluster は、FeMo-cofactor へ変換された後に別のタンパクへと移送されるが、L-cluster を保持するタンパクの構造は、移送先である FeMo-cofactor を取り込むタンパクの構造に似ている。

これらの研究成果は、これまで不明とされていた FeMo-cofactor の生成過程の多くを明らかにするとともに、複雑なクラスター合成過程を化学の視点で理解する一助にもなると考えられる。

3. N₂ 等の基質捕捉段階に関係する新たな知見

FeMo-cofactor の詳細構造が明らかにされてもなお、N₂ 等の基質が FeMo-cofactor のどこに相互作用し、どのように還元されるのか容易には想像できない。なぜならば、我々が知る Fig. 1 の構造は休止状態 (resting state) であり、この状態から 4 電子と 4 プロトンが加わり N₂ を

Fig. 3 Proposed mechanism for N_2 binding / H_2 elimination from the "active state" [1] and the N_2 -dependent formation of HD and $\text{C}_2\text{H}_3\text{D}$ in the presence of D_2 .

捕捉できる活性状態では、休止状態と構造が異なる可能性が高いためである。

N_2 を捕捉できる活性状態の FeMo-cofactor には Fe 間を架橋する二つのヒドリド Fe-H-Fe (と二つの S-H 部位) が存在すること^{10,11)}、ならびに N_2 の捕捉段階で H_2 が還元的に脱離し、この反応が可逆であること^{12,13)} を示唆する実験結果が、最近得られた (Fig. 3)。例えば、FeMo-cofactor によるプロトン (H_2O) 還元を実施した場合、 D_2 雰囲気下の反応で検出できたのは H^+ を還元して生じた H_2 と気相に加えた D_2 だけであったが、気相に D_2 と N_2 を共存させると、HD も生成し始めた。同様に、 H_2O バッファ中、 D_2/N_2 混合雰囲気下で同位体標識したアセチレン $\text{H}^{13}\text{C}\equiv^{13}\text{CH}$ を還元すると、重水素化したエチレン $^{13}\text{C}_2\text{H}_3\text{D}$ や $^{13}\text{C}_2\text{H}_2\text{D}_2$ が一部生成したが、 N_2 が共存しない条件ではエチレンに重水素が取り込まれなかった。従って、これらの重水素取り込み反応では、活性状態の FeMo-cofactor (Fig. 3 [1]) と N_2 の反応が関与すると考えられる。

前段落に記載した、 D_2 もしくは D_2/N_2 雰囲気下の反応結果を解釈する際に、活性状態の FeMo-cofactor [1] が Fe-H-Fe と S-H 部位を二つずつ含み^{10,11)}、 N_2 との反応 ([1] $\rightleftharpoons$ [2]) が可逆に起こる¹³⁾ との前提を取り入れると、 N_2 捕捉体 [2] が気相の D_2 と反応し、二つの Fe-D-Fe を持つ活性状態 [3] を生じる可能性を導ける。続いて、S-H 部位による Fe-D-Fe の直接プロトン化を経て HD が

Fig. 4 Reversible formation of one of the CO-inhibited forms of FeMo-cofactor under turnover conditions.

生じる ([3] $\rightarrow$ [4]) と考えれば、前段落に記載した HD の生成を理解できる。また、HD が脱離した後の FeMo-cofactor [4] によってアセチレンが還元されれば、部分的に重水素化したエチレン $\text{C}_2\text{H}_3\text{D}$ の生成も説明できる。活性状態の FeMo-cofactor [1] と N_2 の反応が可逆に起こることは、 N_2 捕捉体 [2] を凍結したサンプルの EPR シグナル減衰速度と H_2/N_2 分圧の関係を追跡した実験からも支持されている¹³⁾。なお、 N_2 捕捉体 [2] の凍結サンプルからは、 H_2 が存在しない場合でも N_2 が徐々に脱離し、この場合は休止状態の FeMo-cofactor に 2 電子と 2 プロトンを加えた状態 (Fig. 3 [4] 相当) を生じる。さらにここから H_2 が不可逆に脱離することで、休止状態に至る。

N_2 と等電子体である CO も、活性状態の FeMo-cofactor に配位すること、また CO が配位すると FeMo-cofactor と N_2 の反応が阻害されることが知られている。CO が一つあるいは二つ配位した、二種類の CO-阻害体のうち、CO が一つ配位したものの結晶構造が、2014 年に決定された (Fig. 4 右)¹⁴⁾。最も興味深い構造的特徴は、FeMo-cofactor の中央部で二つの Fe を架橋するスルフィドの一つが消失し、代わりに CO が架橋していることである。この CO-阻害体の結晶サンプルを酵素反応に適したバッファに浸すと、架橋 CO が脱離し、酵素反応活性が回復 (再活性化) することも確認された。再活性化した結晶サンプルに含まれる FeMo-cofactor では、元のスルフィドが CO の代わりに Fe 間を架橋している。つまり、S 原子の解離と CO の配位を伴う CO-阻害体の生成は、可逆に起こることが分かる。また、CO-阻害体の生成に伴って外れた S 原子は、元の場所から約 22 Å 離れた場所に捕捉されている可能性がある、同じタンパク結晶構造解析に基づいて提案されている。実際、再活性化して S 原子が元通り Fe 間を架橋すると、捕捉された S 原子と想定する場所の電子密度が減少する。

以上に紹介した最近の研究成果は、FeMo-cofactor が中央部にある Fe を用いて N_2 に代表される反応基質を捕捉する可能性を示唆している。少なくとも CO が Fe に配位することは、前段落に述べた結晶構造 (Fig. 4) により証明されており、アルキン類やヒドラジン類が Fe

に配位することも、基質還元活性や基質捕捉型 FeMo-cofactor の分光データと FeMo-cofactor の周囲にあるアミノ酸残基の関係を調査した研究成果¹⁵⁾により強く支持されている。N₂ が Fe に配位することを直接証明するデータは今なお存在しないものの、N₂ を捕捉する活性状態が二つの Fe-H-Fe を持つこと^{10,11)}と、N₂ の捕捉と H₂ の還元的脱離が協奏的に起こると考えられること^{12,13)}は、N₂ が Fe に配位することと矛盾しない。さらに、高精度のタンパク結晶構造と分子動力学計算に基づいて提案された基質の運搬経路(チャンネル)は、タンパク表層から FeMo-cofactor の Fe に向けて伸びている¹⁶⁾。

仮に FeMo-cofactor の N₂ 捕捉部位が Fe であるとした場合、次に浮かぶ疑問は、どのように反応点を空けるかである。現在までの研究成果を整理すると、CO-阻害体 (Fig. 4 右) のように FeMo-cofactor のスルフィド (μ -S) を解離させる、あるいは FeMo-cofactor の中心 μ_6 -C 原子と Fe の結合を開裂させる、の二通りの可能性が考えられる。なお後者は、主に錯体化学者によって提起されている^{17,18,19)}。

4. C₁ 基質の還元と C-C 結合形成反応

ニトロゲナーゼは N₂ を還元する酵素であるが、冒頭や前項に述べた通り、アセチレンやシアン化物イオン等の非天然基質も還元することが知られている。特に最近、V を含むニトロゲナーゼ (活性中心は FeV-cofactor) を主に用い、C₁ 基質の還元とともに C-C 結合が形成される反応が見出されている (Fig. 5)。

発見の契機は、V-ニトロゲナーゼを用いて CO 雰囲気下でプロトン還元反応を行った場合、消費される試剤の量論に整合性がない点を見逃さなかったことである。プロトン還元による H₂ 生成は、FeMo-cofactor を用いた場合には、CO 雰囲気下でも Ar 雰囲気下と同程度に進行するが、FeV-cofactor を用いると、CO 雰囲気下では活性が 35% ほど低下する。その一方で、電子供給に必要な ATP の消費量が低下しないことを疑問に感じた Ribbe らは、反応後の気相成分を調べ、エチレン、エタン、プロパンの存在を確認した (Fig. 5 (1) 左)²⁰⁾。これらの C₂ ~ C₃ 化合物に含まれる C, H 原子が、それぞれ CO, H₂O バッファー由来であることは、¹³CO および D₂O 標識実験により確認し^{20,21)}、また気相に H₂ を共存させても CO の還元生成物には取り込まれず、むしろ反応を阻害することも確かめられた²²⁾。

この発見を契機として、FeV-cofactor および関連クラスターによる CO の還元と C-C 結合生成反応が重点的に検討されている。FeMo-cofactor は CO を還元できないと従来考えられていたが、FeV-cofactor より 3 桁近く活性が低いものの CO を還元できること (Fig. 5 (2) 左)²²⁾、FeMo-cofactor の周囲にあるアミノ酸残基を変化させて反応空

Fig. 5 Reduction of C₁ substrates by FeM-cofactor (M = V, Mo) or L-cluster leading to the C-C bond formation.

間を広げると CO 還元活性を向上できること (Fig. 5 (3) 左)²³⁾、FeV-cofactor, FeMo-cofactor とともに主生成物である C₂ ~ C₃ 化合物に加えて少量の CH₄ や極微量の C₄ 化合物も生成すること (Fig. 5 (1)(2) 左)²²⁾、が相次いで明らかにされた。

還元する C₁ 基質を CO₂ に変え、D₂O 中で反応を実施すると、FeV-cofactor からは CO, CD₄, C₂D₄, C₂D₆ が生成し (Fig. 5 (1) 右)、FeMo-cofactor からは CO が生成したが (Fig. 5 (2) 右)、これらの還元生成物是用いたニトロゲナーゼに対して化学量論量未満に留まった²⁴⁾。CO₂ の還元活性は、FeMo-cofactor 周囲のアミノ酸残基を変えることで 2 桁程度向上し、このとき主生成物はメタンに変わることも明らかにされた (Fig. 5 (3) 右)²⁵⁾。

さらに、用いる FeV-cofactor や FeMo-cofactor をタンパクから抽出し、これらが分解する前に、還元試薬

として Eu(II) 化合物を加えて H₂O バッファー中で CO や [CN]⁻ を還元する反応も検討されている (Fig. 5 (4) (5) 左)²⁶⁾。この条件では、CO の還元はほとんど進行せず、[CN]⁻ を還元して生成する NH₃ はクラスターに対して最大 15 ~ 18 当量、炭化水素は主生成物のエチレンで 3.6 ~ 5.8 当量であった。これらの反応活性は、より強い還元剤である SmI₂ を用いることで向上することも見出された (Fig. 5 (4)(5)(6) 右)²⁷⁾。SmI₂ と H₂O の直接反応を回避するために有機溶媒を用い、H₂O に代わるプロトン源としてルチジン-HOTf 付加体を用いると、CO の還元反応では、FeV-cofactor を用いた場合に触媒回転数 (TON) が 2.7、FeMo-cofactor では TON = 3.0、また FeMo-cofactor の前駆体である L-cluster (Fig. 2 右下) では TON = 4.5 であった。[CN]⁻ の還元反応も促進され、炭化水素の生成量に基づいて触媒回転数を求めると、TON = 15 (FeMo-cofactor), 13 (FeV-cofactor), 13 (L-cluster) であった。さらに、CO₂ の還元反応も辛うじて触媒的に進行し、TON = 1.4 (FeMo-cofactor), 1.8 (FeV-cofactor), 2.3 (L-cluster) であった (Fig. 5 (4)(5)(6) 右)。なお、これら一連の反応で生成した炭化水素の主成分は CH₄ (約 6 ~ 7 割) であった。また、二番目に多い成分は、CO や [CN]⁻ の還元では C₂ 化合物 (エタン、エチレン) で 2 ~ 3 割、CO₂ の還元では CO (3 ~ 4 割) であった。これら以外の主要な還元生成物は、プロトンの還元により生成する H₂ であり、[CN]⁻ の還元反応では含炭素成分の発生総量と同程度、CO の還元反応では倍程度、CO₂ では三倍程度であった。

ここで述べた C₁ 基質の還元機能が、生物学的な意味を持つか否かは不明であるが、もし仮に進化の過程に関連するならば、原始的なニトロゲナーゼは N₂, CO 両方の還元を担っていたものの、光合成の台頭とともに窒素固定に特化して進化してきた、と類推することも可能である。

文献

- 1) R. R. Eady, *Chem. Rev.*, **96**, 3013 (1996).
- 2) J. Kim, D. C. Rees, *Science*, **257**, 1677 (1992).
- 3) O. Einsle, F. A. Tezcan, S. L. A. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science*, **297**, 1696 (2002).
- 4) T. Spatzal, M. Aksoyoglu, L. Zhang, S. L. A. Andrade, E. Schleicher, S. Weber, D. C. Rees, O. Einsle, *Science*, **334**, 940 (2011).
- 5) K. M. Lancaster, M. Roemelt, P. Eitenhuber, Y. Hu, M. W. Ribbe, F. Neese, U. Bergmann, S. DeBeer, *Science*, **334**, 974 (2011).
- 6) J. A. Wiig, Y. Hu, C. C. Lee, M. W. Ribbe, *Science*, **337**, 1672 (2012).
- 7) J. A. Wiig, C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 4982 (2013).
- 8) J. B. Broderick, B. R. Duffus, K. S. Duschene, E. M. Shepard, *Chem. Rev.*, **114**, 4229 (2014).
- 9) J. T. Kaiser, Y. Hu, J. A. Wiig, D. C. Rees, M. W. Ribbe, *Science*,

- 331**, 91 (2011).
- 10) R. Y. Igarashi, M. Laryukhin, P. C. Dos Santos, H. -I. Lee, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 6231 (2005).
- 11) D. Lukoyanov, Z. -Y. Yang, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 2526 (2010).
- 12) Z. -Y. Yang, N. Khadka, D. Lukoyanov, B. M. Hoffman, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 16327 (2013).
- 13) D. Lukoyanov, Z. -Y. Yang, N. Khadka, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 3610 (2015).
- 14) T. Spatzal, K. A. Perez, O. Einsle, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science*, **345**, 1620 (2014).
- 15) For example, see: B. M. Barney, H. -I. Lee, P. C. Dos Santos, B. M. Hoffman, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *Dalton Trans.*, 2277 (2006).
- 16) D. Smith, K. Danyal, S. Raugei, L. C. Seefeldt, *Biochemistry*, **53**, 2278 (2014).
- 17) J. Vela, S. Stoian, C. J. Flaschenriem, E. Münck, P. L. Holland, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4522 (2004).
- 18) S. Ohta, Y. Ohki, T. Hashimoto, R. E. Cramer, K. Tatsumi, *Inorg. Chem.*, **51**, 11217 (2012).
- 19) J. S. Anderson, J. Rittle, J. C. Peters, *Nature*, **501**, 84 (2013).
- 20) C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Science*, **329**, 642 (2010).
- 21) C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 5545 (2011).
- 22) Y. Hu, C. C. Lee, M. W. Ribbe, *Science*, **333**, 753 (2011).
- 23) Z. -Y. Yang, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *J. Biol. Chem.*, **286**, 19417 (2011).
- 24) J. G. Rebelein, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 11543 (2014).
- 25) Z. -Y. Yang, V. R. Moure, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 19644 (2012).
- 26) C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 1947 (2012).
- 27) C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 1219 (2015).