

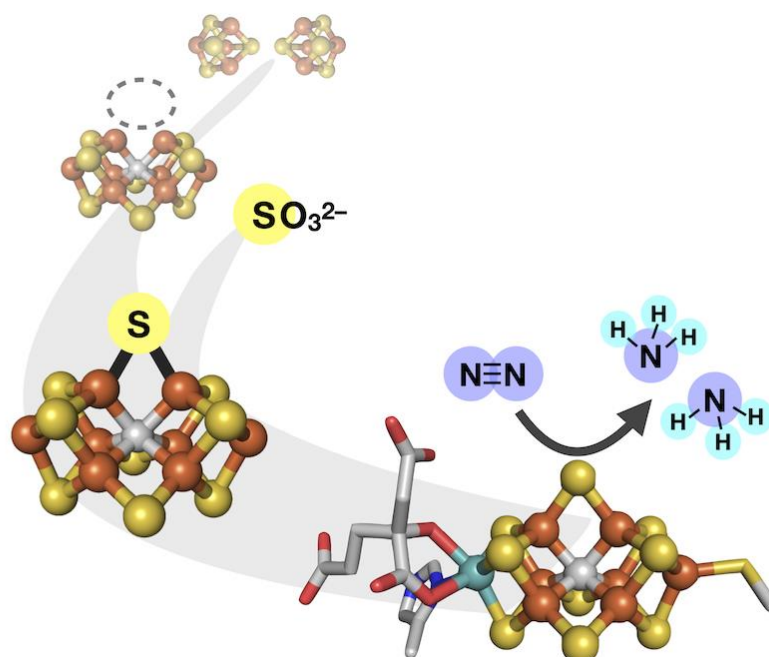
ニトロゲナーゼ活性中心への硫黄原子導入過程の解析

—窒素固定を支える含硫黄小分子の発見—

概要

京都大学化学研究所 谷藤一樹助教（カリフォルニア大学アーバイン校アシスタントプロジェクトサイエンティスト、当時）、大木靖弘 同教授とカリフォルニア大学アーバイン校の Markus W. Ribbe 教授、Yilin Hu 教授、カリフォルニア大学デービス校の R. David Britt 教授らの国際共同研究チームは、窒素還元酵素（ニトロゲナーゼ）の触媒活性中心となる金属-硫黄補酵素が、その生合成過程において亜硫酸イオン（ SO_3^{2-} ）から硫黄（S）原子を取り込む様子を明らかにしました。窒素（N）は生命活動に必須の元素であり、ニトロゲナーゼは大気窒素から生物が利用可能な窒素源を生み出すことで生態系を支えています。この酵素の触媒機能は M-cluster（または FeMoco）と呼ばれる Fe-Mo-S-C からなる活性中心が担っていますが、その生合成過程は未だ明らかになっておらず、ニトロゲナーゼを人工利用する上での妨げとなっています。本研究では、M-cluster の生合成を担うあるタンパク質に着目し、その前駆体である Fe 等価体（ $[\text{Fe}_9\text{S}_9\text{C}]$ ）が、タンパク質上で 2 つの $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターから生成する過程を詳しく調べました。すると、この過程では SO_3^{2-} から S 原子の取り込みが起こり、さらにその S 原子が同族元素（Se、Te）によって置き換えられることが分かりました。これにより取り込まれた元素の選択的な観測に成功したほか、反応過程のシミュレーションによって一連のプロセスの進行を支持する結果も得ました。この成果は、ニトロゲナーゼが機能するために外部基質となる S 源が必要になることを示しており、生物による窒素固定を人工利用する上で重要な発見と言えます。

本成果は、2021 年 10 月 11 日に英国の国際学術誌「Nature Chemistry」にオンライン掲載されました。



図：本研究の模式図。窒素還元酵素の活性中心（右下）が合成される過程で亜硫酸イオン（ SO_3^{2-} ）から硫黄（S）を取り込む様子を表す。

1. 背景

窒素 (N) は、アミノ酸や RNA、DNA といった分子に含まれる、生命活動に欠かせない元素です。この元素は窒素ガス (N_2) として私達の身の回りに豊富に存在しますが、多くの生物は非常に安定な N_2 を窒素源として用いることができません。自然界では窒素固定細菌と呼ばれる微生物が、窒素還元酵素 (ニトロゲナーゼ) を用いて N_2 から生物が利用可能な窒素源 (アンモニアなど) を生み出し、生態系を支えています。また窒素の供給は効率的な食料生産に不可欠であるため、生産性の高い窒素固定法を目指して、細胞、遺伝子、タンパク質レベルでニトロゲナーゼを利用しようとする研究が世界中で行われています。しかしながら、鉄-モリブデン-硫黄-炭素からなるニトロゲナーゼの触媒活性中心 (M-cluster または FeMoco, 図 1) は、複数のタンパク質が複雑に絡む反応を経て作られており、その合成に必要な材料 (生体分子) すら未だ完全に明らかではありません。この問題は、細胞、遺伝子、タンパク質レベルでニトロゲナーゼを人工利用しようとする際の妨げとなっています。

2. 研究手法・成果

研究チームはこれまでに M-cluster の生合成を試験管内で再現することに成功し、タンパク質と合成無機化合物を組み合わせたユニークな手法により、その過程を分子レベルで詳しくしてきました。本研究の足がかりとなった以前の報告 (参考論文 1-3) では、M-cluster の前駆体となる鉄-硫黄-炭素クラスター (L-cluster) が、2つのサイコロ型鉄-硫黄クラスター ($[Fe_4S_4]$ -cluster) を出発に、炭素 (C) 原子と硫黄 (S) 原子を段階的に取り込んで生成することを明らかにしています (図 2)。L*-cluster と名付けた中間体 (図 2 右上) を経て、次のステップで導入される S 原子は、亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) に由来する「らしい」という実験結果はあるものの、決定的な証拠は得られていませんでした。

本研究で対象となった C 原子、S 原子の取り込みを伴う L-cluster への変換は NifB と呼ばれるタンパク質上で起こります。そこでチームは、NifB と SO_3^{2-} に似た化合物である亜セレン酸イオン (SeO_3^{2-}) や亜テルル酸イオン (TeO_3^{2-}) を用いて、取り込まれる S 原子をセレン (Se) やテルル (Te) で置き換えようと考えました (図 3)。Se や Te はタンパク質中にほとんど存在しないため、取り込まれた原子だけを選択的に観測できます。実際に Se/Te 原子の取り込みを酵素活性によって評価したところ、S 原子の場合と同等の効率で起こることが確認でき、Se/Te によってラベル化した L-cluster は電子スピン共鳴 [1] スペクトルによって同定できました。こうして導入した Se/Te 原子は、X 線吸収分光 [2] を使ってクラスターの鉄と結合している様子を観察し、それぞれ Se^{2-}/Te^{2-} の状態に還元されていることを示す結果を得ました。さらに、理論計算を用いて $SO_3^{2-}/SeO_3^{2-}/TeO_3^{2-}$ が取り込まれる過程をシミュレーションしたところ、これらのイオンが L-cluster 上で $S^{2-}/Se^{2-}/Te^{2-}$ まで還元される反応が、実際に起こりうるという結果も得られました。

以上のように、本研究では生化学、分光学、理論化学を複合的に組み合わせたアプローチによって、M-cluster がその生合成過程において SO_3^{2-} から S 原子を取り込む様子を明らかにしました。これらの結果は、チームが提案してきた「L-cluster が SO_3^{2-} を還元して S 原子を取り込む」という仮説を強力にサポートするものです。

参考論文：

(1) Wiig, J. A.; Hu, Y.; Lee, C. C.; Ribbe, M. W. Radical SAM-dependent carbon insertion into the nitrogenase M-Cluster. *Science* **2012**, *337*, 1672–1675.

(2) Tanifuji, K.; Lee, C. C.; Sickerman, N. S.; Tatsumi, K.; Ohki, Y.; Hu, Y.; Ribbe, M. W. Tracing the “ninth Sulfur” of the nitrogenase cofactor via a semi-synthetic approach. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 568–572.

(3) Jasniewski, A. J.; Wilcoxon, J.; Tanifuji, K.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Britt, R. D.; Hu, Y.; Ribbe, M. W. Spectroscopic characterization of an eight-iron nitrogenase cofactor precursor that lacks the “9th Sulfur.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14703–14707.

3. 波及効果、今後の予定

Se や Te によってラベル化された L-cluster は、さらに M-cluster へ誘導することで、取り込まれた原子が N_2 を還元する際にどのように振る舞うかを観察できると考えられます。また、本研究で提案した L-cluster による SO_3^{2-} の還元は、M-cluster が N_2 を還元して NH_3 を放出する過程にも関わると考えられ、チームは一層の研究を進めています。さらに、ニトロゲナーゼが機能するために S 源が必須である、という事実は細胞内での窒素固定が硫黄の代謝経路と密接に関わることを示唆します。つまり細胞レベルで窒素固定システムを利用するには、この S 源も考慮に入れる必要があると考えられ、関連する代謝工学や合成生物学にも有用な知見と言えます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費補助金、武田科学振興財団、立松財団、京都大学化学研究所国際共同利用・共同研究拠点、米国 National Institute of Health-National Institute of General Medical Sciences (NIH-NIGMS) グラントの支援によって行われました。また、測定に利用した SLAC National Accelerator Laboratory は米国 Department of Energy (DOE) の、Stanford Synchrotron Radiation Lightsource の構造生物学プログラムは DOE ならびに NIH-NIGMS の支援によって運営されています。

<用語解説>

1. 電子スピン共鳴

磁場の影響下におかれた不対電子がマイクロ波を吸収する現象を用いて、不対電子の検出とその電子が置かれた環境について情報を得る分光法。ニトロゲナーゼのように複数の金属と硫黄からなるクラスターを持つタンパク質に対して、クラスターの構造や酸化状態を知る手法として広く用いられている。

2. X線吸収分光

X線の吸収に伴う内殻電子の励起を利用して、物質の電子状態や局所構造を知るために用いられる分光法。本研究では特に Fe、Se、Te について測定を行い、得られたデータを統合することで L-cluster に導入された Se、Te 原子に関する情報を得た。高強度の X線を必要とするため、通常はシンクロトロン放射光施設を利用して測定が行われる。

<研究者のコメント>

この研究は、様々な専門を持つ研究者がそれぞれの持つ強みを持ち寄って完成させたものです。私たちは本研究の鍵となるデータを生化学的解析から手に入れていましたが、それだけではこの論文で発表した結論を導くのに十分とは言えませんでした。そこで分光学や理論化学といった多角的なアプローチを取り入れた結果、より強固な論理基盤を築くことができ、今回の発表に至りました。コラボレーションの利点を生かした良い仕事となったことを、嬉しく思っています。

< 論文タイトルと著者 >

タイトル : Tracing the incorporation of the “ninth sulfur” into the nitrogenase cofactor precursor with selenite and tellurite (亜セレン酸または亜テルル酸を利用した窒素還元酵素活性中心への「9番目の硫黄」導入過程の解析)

著者 : Kazuki Tanifuji, Andrew J. Jasniewski, David Villarreal, Martin T. Stiebritz, Chi Chung Lee, Jarett Wilcoxon, Yasuhiro Ohki, Ruchira Chatterjee, Isabel Bogacz, Junko Yano, Jan Kern, Britt Hedman, Keith O. Hodgson, R. David Britt, Yilin Hu, Markus W. Ribbe

掲載誌 : Nature Chemistry DOI : 10.1038/s41557-021-00799-8

< 参考図表 >

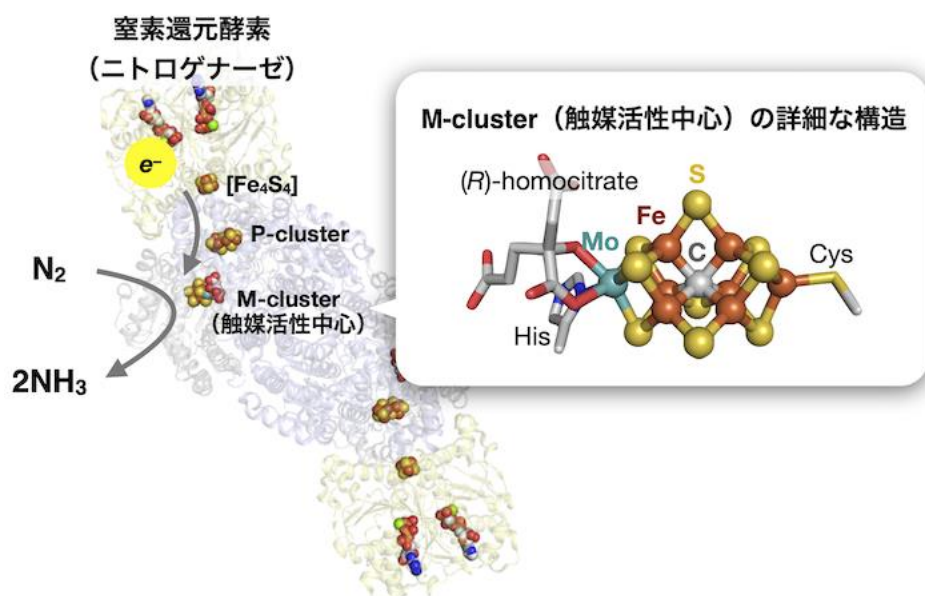


図 1. 窒素還元酵素 (ニトロゲナーゼ) とその触媒活性中心 (M-cluster) の構造. 図は Protein Data Bank (ID: 4WZB, 3U7Q) より該当部分を抜粋して作成した.

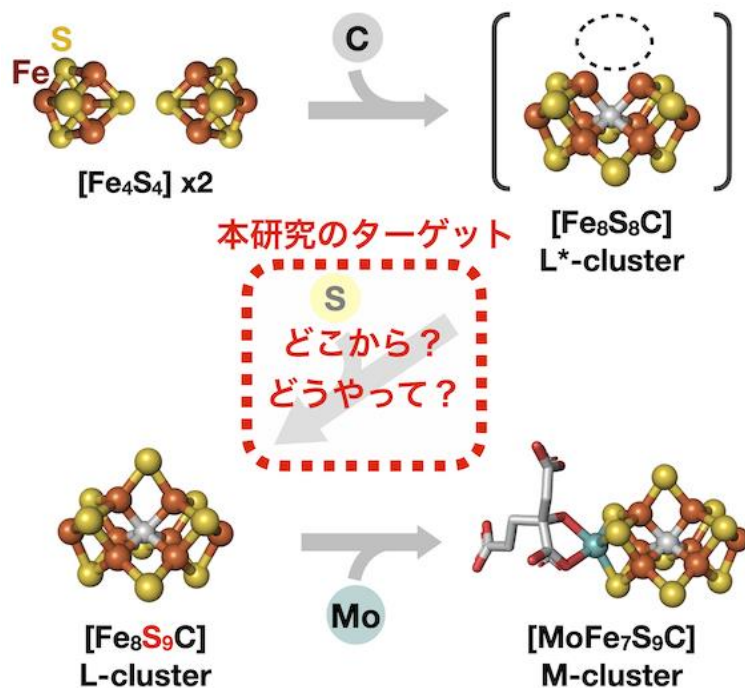


図 2. 研究チームが提案した M-cluster の生合成過程と本研究のターゲットである S 原子の取り込みステップの模式図. L*-cluster から L-cluster を生成する際に亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) から硫黄を取り込むと提案していたが、決定的な証拠に欠けていた.

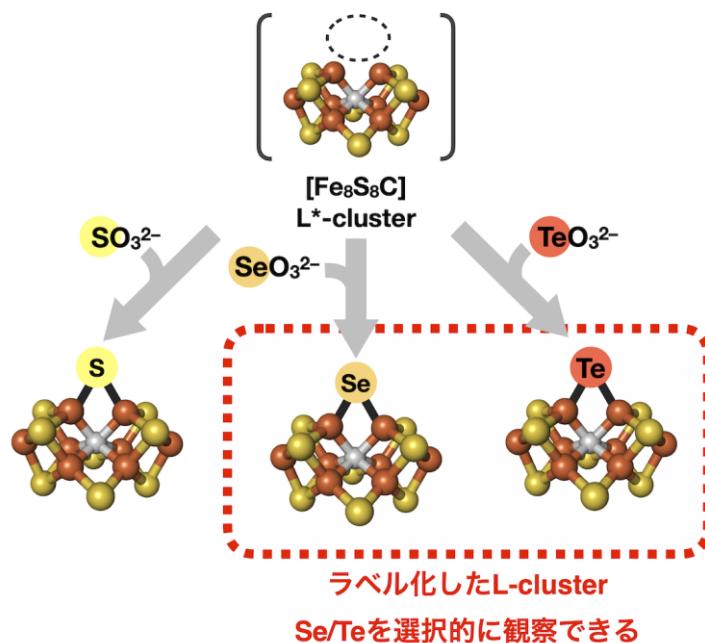


図 3. 本研究で開発した S 原子の Se/Te 原子によるラベル化手法の模式図. 反応は NifB と呼ばれるタンパク質において起こり、ラベル化した L-cluster が生成していることは酵素活性測定、電子スピン共鳴スペクトル、X 線吸収分光を用いて確認した. 注: この図では簡略化のために Se, Te が S と同様に結合した様子を表しているが、Te はサイズが大きいためわずかに異なった立体配置を取る (論文参照).