

窒素固定酵素の性質を遺伝子のレベルから理解する

人工的な窒素固定（空气中窒素のアンモニアへの還元反応）は、現在、全生態系における窒素固定量のおよそ10%に及び（文献1）、農業をはじめとする人類の生産活動にとって必要不可欠なものとなっています。そのほとんどは、ハーバー法によって賄われていますが、物質生産の省エネルギー化の観点から、高温・高圧を必要とする同法の代替プロセス開発はこれからますます重要な課題となってゆくでしょう。窒素固定酵素（ニトロゲナーゼ）を産生する細菌をバイオマスとして利用する方法は、代替プロセスの有力な候補の一つですが（文献1）、実現にはいくつかの課題があります。その一つに、「どのような生育環境下で、細菌の窒素固定化能は最大化するか」の理解が挙げられます。これまでなされてきた多くの研究結果から、ニトロゲナーゼの機能制御の第一段階は、ニトロゲナーゼ遺伝子の転写レベルで行われることが分かっていますので、機能制御機構を理解するには、何よりもまずニトロゲナーゼ遺伝子の転写調節機構を理解する必要があると言えます。我々の研究では、窒素固定酵素の一種である *Azotobacter vinelandii* (*A. vinelandii*) を対象に、制御機構の実体である転写制御タンパク質の作用機構を分子レベルで解明することを目指しています。

A. vinelandii とは、植物の根に寄生することなく窒素固定を行う細菌で水中や土中で生育します。古くよりゲノム解析が進んでおり、遺伝子操作が容易なことから、バイオマスへの利用が期待される窒素固定細菌の一つです（文献2）。この細菌では、3種類のニトロゲナーゼ（1、2、3）とその転写制御に関わる遺伝子の存在が特定され、図1の関係がずいぶん以前（1989年）に報告されています。以降、ニトロゲナーゼ-1の転写制御タンパク質である NifA/NifL のペアについての研究は盛んに行われ、100報を上回る研究（2011年10月 Web of Science 調べ）の結果、NifA/NifL が何を環境因子として感知し、どのようなメカニズムでニトロゲナーゼ-1の転写制御を行うのか整理されつつあります。一方、ニトロゲナーゼ-2,3の転写制御タンパク質、VnfA、AnfA については、同期間の研究報告数がともに10報程度と少なく、その制御機構については我々が研究を開始した時点でほとんど不明でした。その最大の理由は意外かもしれませんが、これらのタンパク質を組換え体として発現させた場合、不溶化してしまい、精製が極めて困難であるということでした。じつは、我々も当初同じ問題に直面しました。ただ、我々は以前より、金属含有転写制御タンパク質の精製と分光学的手法による機能解析研究に従事しており、その経験から、「VnfA、AnfAの不溶化は、大腸菌を使った組換え体発現系で補因子が発現したタンパク質にうまく組み込まれないことに原因がある」との感触を初期の実験で得ました。そこで補因子として、VnfA、AnfAのN末端に位置するシステイン残基の集積配列（VnfA: -Cys⁸-X-Cys¹⁰-XXXX-Cys¹⁵、AnfA: -Ser¹⁹-X-Cys²¹-XXXX-Cys²⁶）に着目し、この部位で、何らかの金属イオンまたは金属クラスターが配位すると予想し、VnfA、AnfAの可溶化と精製を再度試みました。その結果、鉄硫黄クラスターの生合成系を組換え体発現系へ新たに組み込むことで、VnfAを可溶性タンパク質として得ることに初めて成功し、さらに、VnfAが3Fe-4S型の鉄硫黄クラスターを有することを見出しました（図2）。3Fe-4Sクラスターを有する転写制御タンパク質は、ニトロゲナーゼ制御系のみならず、既知の転写制御系でも初めての例であり、その生理的意義は興味深いところです。タンパク質の生成・精製に成功した後

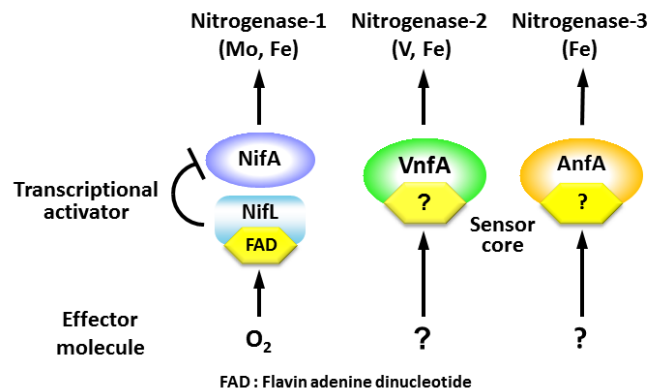


図1. *A. vinelandii* ニトロゲナーゼ転写制御系。

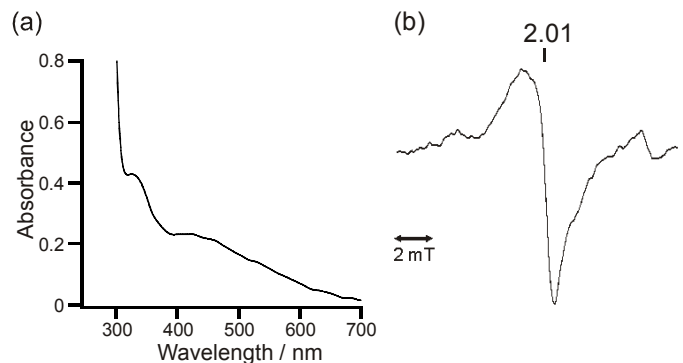


図2. 予備実験で発現・精製に成功した VnfA の(a)電子吸収、および (b) EPR スペクトル。解析の結果、これらは、[3Fe-4S]⁺に由来するものであることが分かった。

も鉄イオウクラスターの定量とその役割の同定をはじめ、かなり困難な研究が続きましたが、最近では、VnfA の作用機構について、大まかなイメージが掴めるようになってきました (図 3)

A. vinelandii のニトロゲナーゼ転写制御にかかわる遺伝子が報告されて以来、およそ 20 年間に研究の進展が著しい NifAL とほとんど進展がみられなかった VnfA、AnfA の差は、精製したタンパク質が得られるか否かでした。タンパク質の精製に進展がみられない中、AnfA の全長を精製するのは難しいと判断し、一部分だけを発現・精製した例は過去にありましたが、結局、機能の本質を理解するには至りませんでした。我々の研究で、VnfA タンパク質の大量発現・精製の成功、および 3Fe-4S クラスターの発見に至ったことにより、この分野は再び活発化すると考えられます。今後、先行する NifA 研究で得られた知見をも利用することによって、これまでのギャップを一気に解消し、ニトロゲナーゼ転写制御系全体の理解に拍車がかかることは間違いありません。我々の研究成果が契機となり、冒頭で述べた「ニトロゲナーゼが最大限に機能する細菌生育環境の理解」そして「バイオマスによる窒素固定」に大いなる進展が訪れるものと考えます。

引用文献)

1. “Nitrogen Fixation, 3rd Edition” John Postgate *Ed.*, Cambridge University Press (1998).
2. “Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria” Werner Klipp and Bernd Masepohl *Ed.*, Kluwer Academic Publisher (2004).

関連する我々の論文)

1. The role Fe-S cluster in the sensory domain of nitrogenase transcriptional activator VnfA *Azotobacter vinelandii.*, *FEBS J.* 2010, **277**, 817-832, Nakajima, H., Takatani, N., Yoshimitsu, K., Itoh, M., Aono, S., Takahashi, Y., Watanabe, Y.

1989 年に遺伝子が同定されて以来、30 年間に渡ってできなかった VnfA タンパク質の精製に成功しました。精製したタンパク質を解析することによって、これまで遺伝子レベルで予想されていた性状可否が数多く明らかとなりました。一つのハイライトは、このタンパク質が 3Fe-4S 型クラスターをセンサー部位として有することです。VnfA 以前、センサーに利用される鉄イオウクラスターは、2Fe-2S あるいは、4Fe-4S 型のみでしたが、このタンパク質の同定で、ようやくすべてのタイプのクラスターがセンサーとして機能することが明らかとなりました。

2. The role of the GAF and central domains of the transcriptional activator VnfA in *Azotobacter vinelandii*, *FEBS J.* 2011, **278**, 3287-3297, Yoshimitsu, K., Takatani, N., Kanematsu, Y., Miura, Y., Watanabe, Y., Nakajima, H.

ニトロゲナーゼ転写調節因子 VnfA は3つのドメインから構成されており、各ドメインの機能については、既知タンパク質とのホモロジー解析から予想だけはされていました。我々は、精製した VnfA タンパク質をもとに、実験的にその機能を確認し、その定量化を進めました。それにより、VnfA の作用機構の全体像がみえるようになってきました。

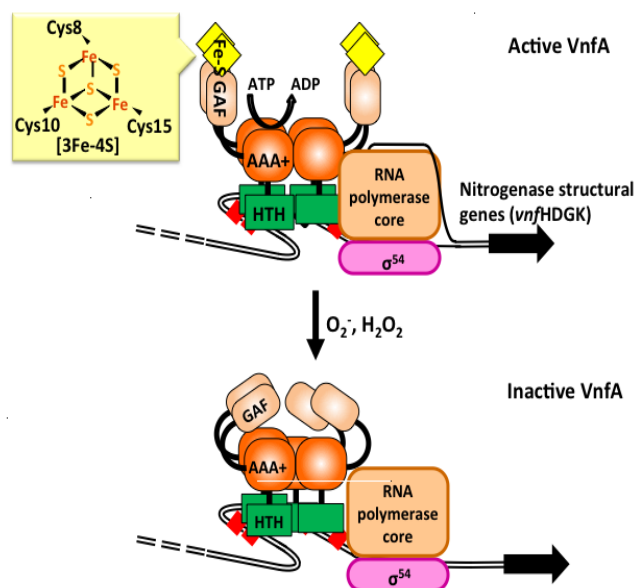


図 3. VnfA によるニトロゲナーゼ-2 (VFe 型) 遺伝子の制御機構。詳細については、FEBS 2010, 2011 を参照してください。

3. Effect of nitric oxide on VnfA, a transcriptional activator of VFe-nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*, *J. Biochem* 2015, **157**, 365-375, Miura, Y., Yoshimitsu, K., Takatani, N., Watanabe, Y., Nakajima, H.

2010年の論文で VnfA が O_2^- を選択的に感知することを提案しましたが、その際問題となったのが、同じラジカル分子である NO に対して、VnfA がどのような応答を示すかでした。この論文は、その問いに対する答えです。VnfA の 3Fe-4S 型クラスターは、 O_2^- の場合完全に分解されますが、NO との反応では、2 種類の鉄にニトロシル錯体を生成し、量論比に応じて生成し、VnfA の転写活性化能を 50%程度に抑制することが分かりました。ただし、その生理的意義はまだ不明なままであり、今後の研究が必要です。