

## ニトロゲナーゼモデル反応



研究ノート

## 1.はじめに

窒素固定酵素、ニトロゲナーゼは鉄一イオウ蛋白（分子量： $65 \times 10^3$ ）およびモリブデン一鉄蛋白（分子量： $220 \times 10^3$ ）からできており、八電子で  $N_2$  還元して二分子の  $NH_3$  と一分子の  $H_2$  を発生する（式(1)）。

鉄一イオウ蛋白には  $Fe_4S_4$  クラスター、



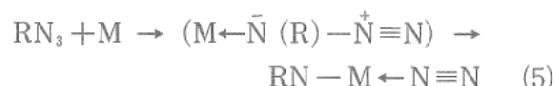
モリブデン一鉄蛋白には  $Fe_4S_4$  と  $MoFe_{6-8}S_{8-9}$  クラスターが含まれている<sup>1)</sup>。 $Fe_4S_4$  クラスターは電子伝達のみに関与し、 $N_2$  固定は  $MoFe_{6-8}S_{8-9}$  クラスターで起こると考えられている。酸あるいはアルカリでニトロゲナーゼを処理すると  $N_2$  の 4 電子還元生成物  $NH_2NH_2$  が生成することから<sup>2)</sup>、ニトロゲナーゼによる  $N_2$  固定反応は式(2)、(3)、(4)にしたがって進行していると考えら



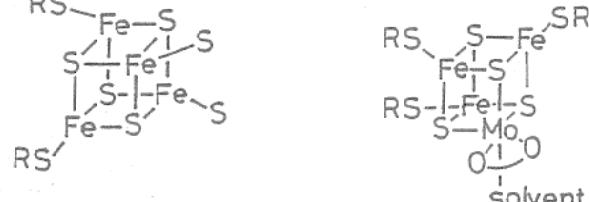
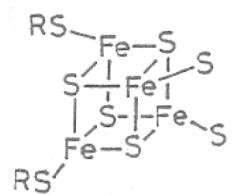
れている。 $NH_2NH_2$  の前駆体  $NH=NH$ （式(2)）は  $-100^\circ C$  以上で速やかに分解すること、式(2)の平衡電位が  $-1.90V$  vs. SCE でニトロゲナーゼへの電子供給体である  $4Fe_4S$  フェレドキシンの酸化還元電位  $-0.70V$  に比べて極めて負側であることから、 $N_2$  は  $MoFe_{6-8}S_{8-9}$  クラスターに配位した後、還元されていると考えられる。 $N_2$  は

田 中 晃 二\*, 田 中 敏 夫\*\*

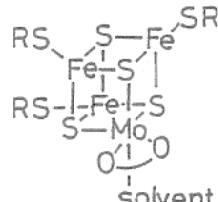
$MoFe_{6-8}S_{8-9}$  クラスターの  $M_0$  に配位することが常識のように思われているが、実験的な証明は全く得られていないのが現状である。現在、工業的には鉄系の触媒を用いて  $N_2$  を高温、高圧下で還元して  $NH_3$  が合成されている（ハーバー、ボッシュ法）。したがって、常温、常圧下での人工的な  $N_2$  から  $NH_3$  への還元法を見いだす一つのアプローチとして、鉄一イオウおよびモリブデン一鉄蛋白モデルクラスターと  $N_2$  との相互作用を明らかにし、 $NH_3$  への還元を行うことは生物学のみならず工業的にも非常に重要な意義を持つと思われる。しかしながら、今まで合成された酵素モデルとしての  $FeS$  および  $MoFeS$  クラスター<sup>3)</sup> は  $N_2$  と安定な付加体を形成しないため、筆者らはアルキルアザイド( $RN_3$ )が低原子価金属錯体と反応して  $RN$  と  $N_2$  が金属に結合した錯体（式(5)<sup>4)</sup>）を与えることに注目し



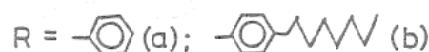
て、 $RN_3$  を  $[Fe_4S_4(SR)_4]^{2-}$  (1) および  $[MoFe_3S_4(SR)_3(O_2C_6Cl_4)(Solvent)]^{2-}$  (2) ( $R = C_6H_5$  (a);  $p-C_6H_4-n-C_8H_{17}$  (b)] に付加させ、クラスター上で発生する  $N_2$  (式(6)) をニトロゲナーゼ反応と同一条件で  $NH_3$  に還元す



1



2



\*田中晃二 (Koji TANAKA), 大阪大学工学部, 応用化学科, 講師, 工学博士, 生物無機化学

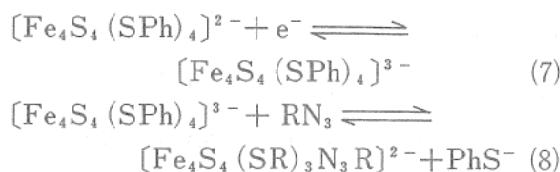
\*\*田中敏夫 (Toshio TANAKA), 大阪大学工学部応用化学科, 教授, 理学博士, 生物無機化学, 有機金属化学



ることを試みた。

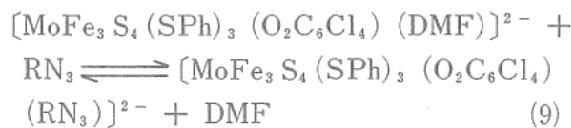
## 2. $\text{Fe}_4\text{S}_4$ および $\text{MoFe}_3\text{S}_4$ クラスターと $\text{RN}_3$ の付加体形成

$\text{Fe}_4\text{S}_4$  クラスター 1a の Fe は 4 配位で安定しており、ジメチルフォルムアミド (DMF) 中、 $\text{RN}_3$  ( $\text{R}=\text{C}_5\text{H}_{11}$ ) とは全く相互作用をしないが、1a の酸化還元電位 ( $-1.05\text{V}$  vs. SCE) より負の電位で 1a を電気化学的に一電子還元を行うと (式(7))、Fe に配位した  $\text{SC}_6\text{H}_5$  基の一つが  $\text{RN}_3$  により可逆的に置換されて 1:1 付加体を形成する (式(8))<sup>5)</sup>



1a-RN<sub>3</sub> 付加体の酸化還元電位 ( $-1.15\text{V}$ ) は 1a の酸化還元電位に比べて 100mV 負側にシフトする。このことは、RN<sub>3</sub> が 1a に配位すると  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  骨格の電子密度はフリーの 1a に比べて増大していることを示している。したがって、RN<sub>3</sub> は 1a に対しては電子供与体として作用していると考えられる。

2a の Mo に配位した溶媒分子は他の電子供与体または受容体で容易に置換されることが知られているが<sup>6)</sup>、酸化型の 2a と RN<sub>3</sub> の平衡 (式(9))



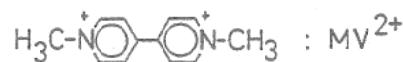
は DMF 中では左辺に偏っており、2a の大部分は溶媒和した型で存在する。しかしながら、2a の酸化還元電位 ( $-1.10\text{V}$ ) より負側の電位で 2a を一電子還元すると Mo に溶媒和した DMF は RN<sub>3</sub> に置換されて、ほぼ定量的に 1:1 付加体を形成する。

2a-RN<sub>3</sub> 付加体の酸化還元電位 ( $-0.83\text{V}$ ) は DMF が溶媒和した 2a に比べて約 300mV 正側にシフトする。このことは RN<sub>3</sub> が 2a の Mo に配位すると MoFe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> 骨格の電子密度は DMF 付加

体より減少しており、Mo は RN<sub>3</sub> に対して  $\pi$  電子供与体として作用していることを示している。

## 3. ミセル水溶液中での $\text{Fe}_4\text{S}_4$ および $\text{MoFe}_3\text{S}_4$ クラスターと $\text{RN}_3$ の相互作用

in vitro でのニトロゲナーゼによる N<sub>2</sub> 固定反応では Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ( $E=-0.90\text{V}$  vs. SCE) が還元剤として用いられている。また、水相の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> から蛋白中の  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  クラスターへの電子キャリアとしてメチルビオローゲン (MV<sup>2+</sup>) を添



加するとニトロゲナーゼの N<sub>2</sub> 固定能が上昇することが知られている<sup>7)</sup>。したがって、筆者らはニトロゲナーゼ反応と同一条件で水中  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  および  $\text{MoFe}_3\text{S}_4$  クラスターに配位した RN<sub>3</sub> を還元するため、1a, 2a の SC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 基のパラ位に長鎖のアルキル基を導入した疎水性の 1b, 2b を合成し<sup>8)</sup>、非イオン性界面活性剤 Triton X-100 ミセル水溶液中で 1b, 2b と RN<sub>3</sub> の相互作用を電気

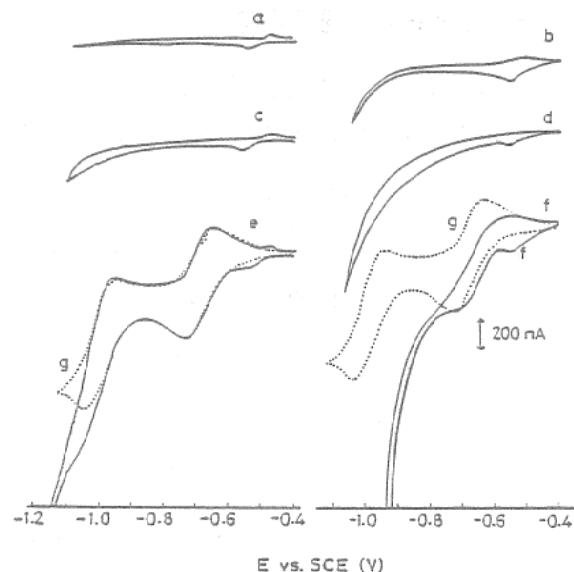


図 1 Triton X-100 ミセル水溶液中での 1a および 1b ( $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$ ) のサイクリックボルタモグラム：(a) 1b, (b) 2b, (c) 1b+RN<sub>3</sub> ( $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol}/\text{dm}^3$ ) (d) 2b+RN<sub>3</sub>, (e) 1b+RN<sub>3</sub>+MV<sup>2+</sup> ( $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol}/\text{dm}^3$ ), (f) 2b+RN<sub>3</sub>+MV<sup>2+</sup>; (g) MV<sup>2+</sup>; 掃引速度 10 mV/s

化学的に調べた。1b, 2b のサイクリックボルタモグラムを (図 1) に示す。ミセルの疎水空間に可溶化された 1b, 2b は電極との電子移動が起こりにくいために、非常に弱い酸化還元波

をそれぞれ  $E_{1/2} = -0.53$  ならびに  $-0.54\text{V}$  vs. SCE に示す (図 1a, 1b)。これらの溶液にクラスターの 100 倍量の  $\text{RN}_3$  を加えると、それらの還元電位よりも負側で 1b および 2b の還元体に配位した  $\text{RN}_3$  の還元に基ずく弱いカソード電流が観測される (図 1c, 1d)。ミセル内の 1b, 2b への電子移動を促進させるために、1b, 2b と等モルの  $\text{MV}^{2+}$  をクラスターと  $\text{RN}_3$  を含むミセル水溶液に加えると、 $\text{RN}_3$  還元による強いカソード電流が 1b の系では  $\text{MV}^{2+}$  の二電子還元電位 ( $\text{MV}^0/\text{MV}^{\pm} = -1.03\text{V}$ ) (図 1e), 2b の系では  $\text{MV}^{2+}$  の一電子還元電位 ( $\text{MV}^{\pm}/\text{MV}^{2+}$ ) から流れ始める (図 1f)。以上の結果は 1b の Fe, 2b の Mo に配位した  $\text{RN}_3$  はそれぞれ  $\text{MV}^0$  と  $\text{MV}^{\pm}$  を電子キャリヤーとして還元されることを示している。このことは  $\text{RN}_3$  - 1a, - 2a 付加体の還元電位がフリーの 1a, 2a に比べてそれぞれ  $-100$ ,  $+300\text{mV}$  シフトすることとよく一致している。

#### 4. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を電子源、 $\text{MV}^{2+}$ を電子キャリヤーとする $\text{RN}_3$ の還元反応

1b あるいは 2b と  $\text{RN}_3$  含む Triton X-100 ミセル水溶液に  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を加えると触媒的に  $\text{RN}_3$

の二電子還元反応が起こり、等量の  $\text{RNH}_2$  と  $\text{N}_2$  が生成する (式(6), 表 1)。 $\text{N}_2$  発生量より算出した 2b による  $\text{RN}_3$  還元反応の初期速度は 1a による  $\text{RN}_3$  還元より 5 倍程度速かった。一方、 $\text{MV}^{2+}$  存在下では 1b, 2b による  $\text{RN}_3$  還元反応速度は  $\text{MV}^{2+}$  が存在しない系に比べてそれぞれ 20 倍, 40 倍上昇した。さらに、1b の系では等量の  $\text{RNH}_2$  と  $\text{N}_2$  のみが生成するのに対して (式(6)) 2b の系では  $\text{RNH}_2$ ,  $\text{N}_2$  とともに  $\text{RN}_3$  の 6 電子及び 8 電子還元生成物  $\text{N}_2\text{H}_4$  (式(10)) と  $\text{NH}_3$  (式(11)) が触媒的に生成した。 $\text{NH}_3$  の生成は水相



の pH の減少ともに増大すること、また  $\text{MV}^{2+}$  が共存しない時には  $\text{NH}_3$  は全く生成しないことから、 $\text{RN}_3$  の多電子還元反応 (式(10), (11)) には反応サイトである Mo への速い電子輸送と高いプロトン濃度が必要条件であることを示している。

以上のように 1b の Fe に結合した  $\text{RN}_3$  は二電子還元反応のみを受けるのに対して、2b の Mo に配位した  $\text{RN}_3$  は  $\text{MV}^{\pm}$  により容易に八電子還元を受ける。これらの事実は  $\text{N}_2$  固定の反応サイト

表 1  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4^{\text{a)}$  を還元剤とする Triton X-100 ミセル水溶液中での  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_3^{\text{b)}$  還元反応<sup>c)</sup>

触媒 <sup>d)</sup>	pH <sup>e)</sup>	ターンオーバー数 <sup>f)</sup>			
		$\text{N}_2$	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NH}_2$	$\text{N}_2\text{H}_4$	$\text{NH}_3$
1b	6.0	0.2 (16.8)	0.1 (16.1)	0 (0)	0 (0)
	8.0	1.1 (56.0)	1.3 (56.8)	0 (0)	0 (0)
	10.0	0.9 (47.5)	1.0 (46.9)	0 0	0 0
2b	6.0	5.4 (90.1)	5.6 (75.0)	0 (0.5)	0 (20.3)
	8.0	4.8 (90.0)	5.0 (83.1)	0 (0.4)	0 (12.5)
	10.0	4.3 (93.4)	4.2 (96.2)	0 (0.4)	0 (5.3)

a)  $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ 。 b)  $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ 。 c) 1 h。

d)  $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ 。 e)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  - NaOH 緩衝溶液 ( $0.1 \text{ mol/dm}^3$ , 10cm<sup>3</sup>)。

f) (生成物mol) / (触媒mol) : 括弧内は  $\text{MV}^{2+}$  ( $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ ) 存在下。

としてMoがFeに比べて圧倒的に優れていることを示した最初の実験データである。

### 5. おわりに

上記のニトロゲナーゼモデルによるN<sub>2</sub>固定反応では水ならびに有機溶媒に対するN<sub>2</sub>の溶解度が低いなどの理由により、アルキルアジドの二電子還元反応で発生するN<sub>2</sub>を利用してい。一方、2aまたは2bの還元力を増大させるために、2aあるいは2bを修飾した炭素電極を用いて、-1.25V vs. SCEで水中N<sub>2</sub>を定電位電解すると、クラスターの還元型から優先的に水素発生が起り、NH<sub>3</sub>生成の電流効率は最高1%程度に止まっている。したがって、効率の良いN<sub>2</sub>固定反応には活性点であるMoの周囲に疎水基を導入し、プロトンとMoとの直接の相互作用を抑える必要があると思われる。

### [参考文献]

- 1) L.E. Mortenson and R.N.F. Thorley Ann. Rev. Biochem., 48, 387 (1979).
- 2) R.N.F. Thorley, R.R. Eady, and D.J. Lowe, Nature, 272, 557 (1978).
- 3) D. Coucavanis, Acc. Chem. Res., 14, 201 (1981). R.H. Holm, Chem. Soc. Rev. 10, 455 (1981).
- 4) J.P. Collman, M. Kubota, J. Sun, and D. Frederick, J. Amer. Chem. Soc., 89, 169 (1967).
- 5) S. Kuwabata, K. Tanaka, and T. Tanaka, Inorg. Chem., 25, 1691 (1986).
- 6) W.H. Armstrong, P.K. Maschark, Y. Mizobe, and R.H. Holm, J. Amer. Chem. Soc., 104, 4373 (1982).
- 7) D.A. Ware, Biochem. J., 130, 301 (1972).
- 8) K. Tanaka, M. Moriya, and T. Tanaka, Inorg. Chem., 25, 835 (1986).

