

*Azotobacter vinelandii*에서의 생물학적 질소고정 작용 메커니즘

김용웅 · 한재홍*

중앙대학교 생명공학과, 금속효소 연구그룹, 생명환경 연구원

Mechanism of Biological Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*

Yong-Ung Kim and Jaehong Han*

Metalloenzyme Research Group, BET Research Institute and Department of Biotechnology,
Chung-Ang University, Anseong, Korea

Received June 14, 2005; Accepted September 6, 2005

Biological nitrogen fixation is an important process for academic and industrial aspects. This review will briefly compare industrial and biological nitrogen fixation and cover the characteristics of biological nitrogen fixation studied in *Azotobacter vinelandii*. Various organisms can carry out biological nitrogen fixation and recently the researches on the reaction mechanism were concentrated on the free-living microorganism, *A. vinelandii*. Nitrogen fixation, which transforms atmospheric N_2 into ammonia, is chemically a reduction reaction requiring electron donation. Nitrogenase, the biological nitrogen fixer, accepts electrons from biological electron donors, and transfers them to the active site, FeMo-cofactor, through Fe_4S_4 cluster in Fe protein and P-cluster in MoFe protein. The electron transport and the proton transport are very important processes in the nitrogenase catalysis to understand its reaction mechanism, and the interactions between FeMo-cofactor and nitrogen molecule are at the center of biological nitrogen fixation mechanism. Spectroscopic studies including protein X-ray crystallography, EPR and Mössbauer, biochemical approaches including substrate and inhibitor interactions as well as site-directed mutation study, and chemical approach to synthesize the FeMo-cofactor model compounds were used for biological nitrogen fixation study. Recent research results from these area were presented, and finally, a new nitrogenase reaction mechanism will be proposed based on the various research results.

Key words: Nitrogen fixation, Nitrogenase, *Azotobacter vinelandii*, Mechanism, Fe protein, MoFe protein, FeMo-cofactor, Protein X-ray structure

서 론

공기중의 N_2 (질소 가스)는 화학적으로 매우 안정하여 번개에 의한 자연적 환원을 제외하고는, 그 환원이 촉매의 도움을 필요로 한다. 식물체의 생육이 정상적일 때 대부분의 농지에서 식물의 성장은 질소 공급에 의해 제한된다. 전세계적으로 매년 8천만 톤 이상의 질소가 산업적 질소고정에 의해 생산된 후, 암모니아나 질산염의 형태로 토양에 공급된다. Haber-Bosch법은 질소고정을 위해 철을 포함한 촉매를 사용하는 것이다. 이러한 산업적 질소 고정 없이는 현재 지구상 인구의 1/3가 존재할 수 없을 것이라고 보고되어있다.¹⁾ 하지만, 매년 9천만 톤 이상의 질소가 생물학적 질소고정에 의해 토양에 공급된다. 지구상의 생물학적 질소고정은 미생물이 생산량 면에 주요 담당자이며, 콩과 식물은 일부에 해당한다. 생물학적 질소고정 시스템은 현

제 널리 사용되는 Haber-Bosch법을 이용한 산업적 질소고정과 비교하였을 때 그 효율성과 반응조건이 구분된다. 공기중의 N_2 를 고정하여 암모니아를 형성하는 효소계를 질소고정효소(nitrogenase)라고 하며, 이 효소계는 상온에서 0.8 기압의 N_2 를 환원시킨다. 이에 비해 산업적 Haber-Bosch 과정은 400-500°C의 고온과 400-1,000 기압의 반응조건을 필요로 한다. 산업적 질소고정과정은 반응 조건상 매우 에너지 집약적인 과정으로 전세계적으로 전력의 1% 가량을 질소고정에 사용하고 있다고 한다.²⁻⁴⁾ 그러므로 생물학적 질소고정작용의 메커니즘 이해는 학문적 필요성 뿐 아니라 농업과 인류 미래에 있어서 중요한 과제이다. 질소고정효소에 대해서는 생화학, 화학, 유전학 등의 다양한 분야에서 많은 충설이 현재까지 보고되어있다.⁵⁻³⁰⁾ 본 충설에서는 질소고정효소의 생화학적 특성과 그 메커니즘을 중심으로 최근의 동향을 다룰 것이다.

*Corresponding author
Phone: +82-31-670-4830
E-mail: jaehongh@cau.ac.kr

질소고정효소

자연계에 존재하는 질소고정효소는 뿌리혹 박테리아를 비롯하여 거의 모든 종이 동일한 단백질 구조를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 현재 질소고정효소의 메카니즘에 대한 연구는 주로 미생물을 대상으로 이루어지고 있으며, 대표적인 균주로는 절대 호기성인 *Azotobacter vinelandii*, 통성 혐기성인 *Klebsiella pneumoniae*, 그리고 절대 혐기성인 *Clostridium pasteurianum* 등이 있다. 이외에도 cyanobacteria와 methanogens에서도 일부 연구되고 있다. 금속 조효소를 포함하는 질소고정효소는 공기 중의 산소에 극도로 불안정하며, 그 활성이 산소에 의해 저해된다. 그러므로, 질소고정효소의 분리는 세포를 파쇄할 때부터 무산소 조건인 아르곤(Ar) 기체 하에서 이루어진다. 또한, 완충 용액은 산소가 완전히 제거되어야 하므로, 탈기 후 sodium dithionite($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)를 첨가하여 사용한다. 현재 확립된 방법은 초음파 파쇄 후 이온 칼럼 크로마토그래피로 MoFe 단백질(dinitrogenase, component I)과 Fe 단백질(dinitrogenase reductase, component II)을 분리하고(Fig. 1), 겔 여과 칼럼 크로마토그래피, 소수성 칼럼 크로마토그래피 등의 순으로 MoFe 단백질을 더욱 정제하는 방법이다. 보통, 100 그램 정도의 세포에서 800 mg 정도의 활성이 좋은 MoFe 단백질을 분리할 수 있다. 분리되는 Fe 단백질의 양은 500 mg 정도이나, 분리되는 양의 재현성이 적다.

질소고정효소는 대표적인 금속효소로, 질소 환원을 담당하는 MoFe 단백질과 MoFe 단백질에 전자를 전달하는 역할을 하는 Fe 단백질로 구성되어 있다. MoFe 단백질은 유전자 *nifDK*에 의해서 Fe 단백질은 유전자 *nifH*에 의해서 합성된다. 대부분의 질소고정효소는 금속조효소로 몰리브덴(Mo)과 철(Fe)을 포함하고 있다. 하지만, *A. vinelandii*를 Mo이 제한된 조건에서 배양하면, Mo 대신에 바나듐(V)을 포함하는 질소고정효소가 형성되는 것이 보고되었으며, 이때 V는 금속조효소에서 Mo의 자리에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한, Fe을 제외한 모든 금속이온을 제한하였을 경우에는 Fe 만을 포함하는 질소고정효소가 형성된다.^{31,32)} 이들은 각각 Mo-질소고정효소, V-질소고정효소,³³⁻³⁵⁾ Fe-질소고정효소로³⁶⁻³⁸⁾ 불린다. 세가지 질소고정효소는 동일한 Fe 단백질을 가지고 있으며, MoFe 단백질의 금속조효소의 구성성분이 다른 것으로 밝혀졌다. 따라서 MoFe 단백질, VFe 단백질, FeFe 단백질 세가지가 알려져 있다. 효소 활성 측면에서는 Mo-질소고정효소가 제일 좋으며, V이나 Fe을 포함하는 질소고정효소는 질소고정 활성이 떨어지는 것으로 알려져 있다(Table 1). N_2 존재시 질소고정효소는 암모니아를 생성하나, 아무런 기질이 주어지지 않으면 수용액 중의 수소이온

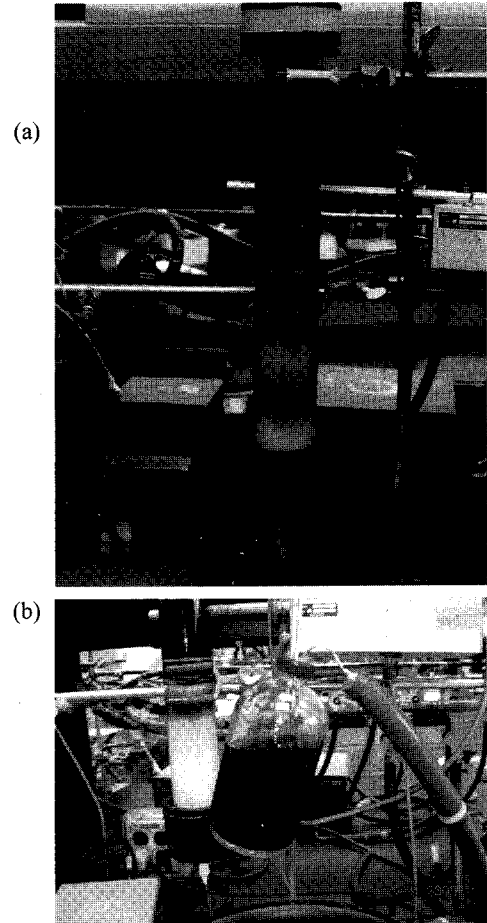


Fig. 1. Isolation of MoFe protein and Fe protein by ion exchange (Q-sepharose) column chromatography. (a) The proteins are black due to the metallo-cofactor which nitrogenase contains. The MoFe protein is eluted first, as shown in the picture, and then Fe protein is eluted at higher concentration of NaCl. (b) The isolated MoFe protein from ion exchange column chromatography. (Pictures were taken by J. Han)

을 환원시킨다. 이때 생성되는 수소 가스는 TCD detector가 장착된 가스 크로마토그래피로 쉽게 측정할 수 있는데, 단위효소당 단위시간에 생성되는 수소 가스의 양은 질소고정효소의 활성을 나타내는 주요 지표가 된다.⁴⁰⁾ Table 1에서 Mo-질소고정효소는 2,100 nmoles H_2 /min/mg 정도의 활성을 보이며, V-질소고정효소와 Fe-질소고정효소는 각각 Mo-질소고정효소의 65%와 12% 정도의 활성을 보인다. 또한 Mo-질소고정효소가 N_2 와 아세틸렌($\text{HC}\equiv\text{CH}$)으로부터 암모니아와 에틸렌($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$)만을 반응 산물로 생성하는 반면, 다른 질소고정효소는 여기에 반응 중간체로 여겨지는 히드라진(NH_2NH_2)과 과다환원물인

Table 1. Catalytic activity comparison among Mo-, V-, and Fe-nitrogenase³⁹⁾

	Mo-질소고정효소	V-질소고정효소	Fe-질소고정효소
Specific Activity (nmoles H_2 /min/mg)	2100	1348	253
% electrons to N_2	70	36	21
% electrons to C_2H_2	85-95	45	11
C_2H_2 Reduction Products	C_2H_4	$\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_6$	$\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_6$
N_2 Reduction Products	NH_3	$\text{NH}_3/\text{N}_2\text{H}_4$	$\text{NH}_3/?$

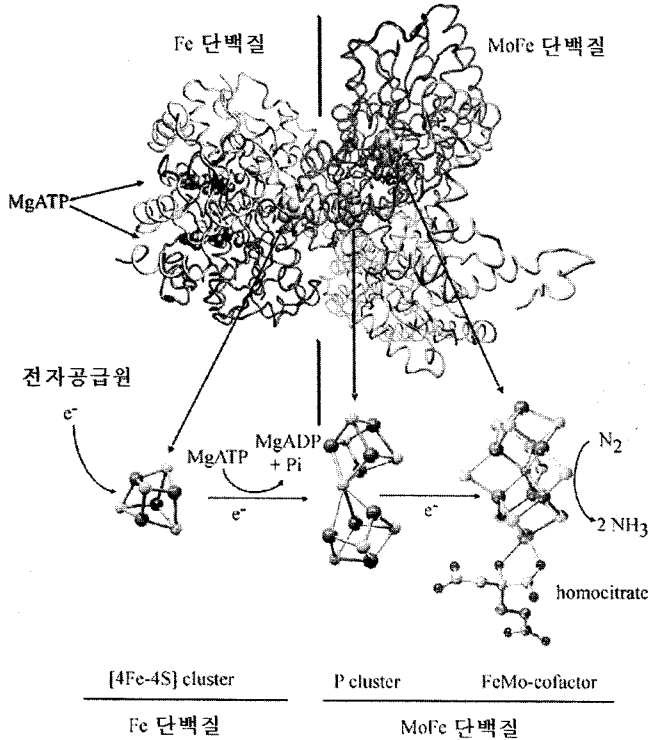


Fig. 2. Electron transport process in nitrogenase. The protein X-ray crystallographic structure of Fe protein and MoFe protein shown here is half of the Fe protein and MoFe protein complex. The electrons are subsequently transferred from the biological electron donors to the [4Fe-4S] cluster in the Fe protein, to the P cluster and to the FeMo-cofactor in MoFe protein.

에탄(CH₃CH₃) 등을 부가로 더 생성한다. 최근에는 *Streptomyces thermoautotrophicus*에서 새로운 형태의 질소고정효소가 발견되었는데, 이 효소는 산소에 의해 저해되지 않는 새로운 촉매활성을 보이는 것으로 보고되었다.⁴¹⁾

질소고정효소는 화학반응상 환원효소이며, 한 분자의 N₂를 환원시키기 위해서 최소한 6개의 전자가 공급되어야 한다. 전자 전달 순서를 보면(Fig. 2), 환원된 ferredoxin이나, flavodoxin과 같은 생물학적 전자 공급자로부터 Fe 단백질이 전자를 받으며,^{42,43)} 환원된 Fe 단백질과 두 분자의 ATP의 결합이 일어난 후에 MoFe 단백질에 결합하게 된다.⁴⁴⁾ 전자전달은 ATP의 ADP로의 가수분해를 동반하며,⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 전자는 Fe 단백질의 Fe₄S₄ 클러스터에서 MoFe 단백질의 P-cluster를 통해서 FeMo-cofactor로 전달되는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 질소고정효소의 전자 전달과 기질의 환원 반응은 기본적으로 세 개의 무기 클러스터에 의해 진행됨을 알 수 있다. FeMo-cofactor는 질소의 결합과 환원을 담당하는 조효소로 생물학적 질소고정작용의 이해에서 핵심적 위치를 차지한다. Fig. 3은 MoFe 단백질과 Fe 단백질이 결합한 상태를 결정화한 단백질 X-ray 결정구조인데, 질소고정효소에 존재하는 3가지 금속 클러스터의 상대적인 배치가 잘 나타나있다. Fe 단백질의 환원에는 환원된 ferredoxin이나 flavodoxin 같은 생물학적 전자 공급자 외에도 질소고정효소 분리시 첨가하는 Na₂S₂O₄가 주로 생화학적 실험에 사용된다. Fe 단백질은 MoFe 단백질에게 전자를 전달해주는 환원제의 역할을 하며, 현재까지 어떤 다른 환원제로도 Fe 단백질을 대신하

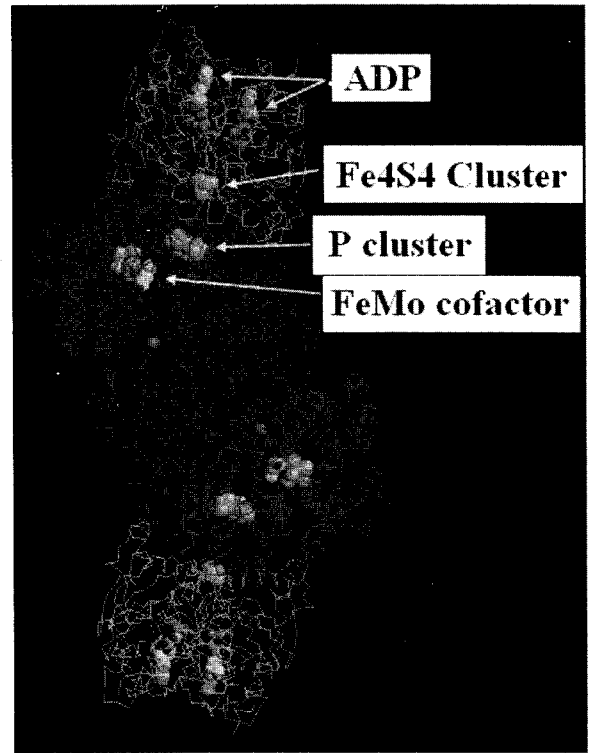


Fig. 3. X-ray crystallographic protein structure of nitrogenase. MoFe protein and Fe protein form a complex in the presence of the ATP analog.

여 MoFe 단백질을 환원하지 못하였다.⁴⁸⁾ 그러므로, MoFe 단백질의 효소활성 연구에는 반드시 Fe 단백질이 필요하다. 이는 MoFe 단백질에 다전자를 축적하기 위해 필수적인 Fe 단백질과 MoFe 단백질과의 형태적 신호전달(conformational signaling) 때문인 것으로 생각된다.^{49,50)} 이와 더불어 질소고정효소의 메커니즘 연구가 어려운 점은 MoFe 단백질은 두 개나 그 이상의 전자를 Fe 단백질로부터 전달받아야만 기질을 결합하며, 또한 기질이 없을 시에는 Fe 단백질로부터 전달된 전자가 MoFe 단백질의 환원된 상태를 유지하지 못하고, H⁺을 환원하는데 모두 사용되어 다시 환원되기 전의 상태로 돌아온다는 것이다.

질소고정효소의 단백질 구조. 1992년 Rees 그룹에 의해 최초의 구조가 밝혀진 이후,⁵¹⁾ 현재까지 30개 정도의 Fe 단백질과 MoFe 단백질을 포함하는 질소고정효소의 단백질 X-ray 결정구조가 여러 미생물에서부터 분리되어 보고되었으며, 이들은 대체적으로 유사한 3차원적 구조를 보인다.^{52,53)} 2002년에 보고된 MoFe 단백질의 구조는 질소고정효소의 금속조효소인 FeMo-cofactor에 알려지지 않았던 하나의 원자가 더 존재함을 밝혔다(이하 조효소 구조 참조).⁵⁴⁾

MoFe 단백질에 결합하여 전자를 전달하는 Fe 단백질은 두 개의 동일한 펩타이드가 결합한 homodimer의 구조(~64 kDa)를 가지며(Fig. 4), 각각의 펩타이드에는 ATP 결합 자리가 존재한다. 두 subunits 사이에는 전자 전달에 관여하는 Fe₄S₄ cluster가 cysteine 잔기를 통해서 결합되어 위치한다. 일반적인 생물학적 Fe₄S₄ clusters와는 달리 Fe 단백질의 Fe₄S₄ clusters는 용액에 노출되어 있으며 환원된 상태에서도 안정한 것으로 알려져 있다. 무산소 조건에서 분리된 Fe 단백질의 Fe₄S₄ cluster의 산화



Fig. 4. The X-ray crystallographic structure of the Fe protein (1NIP). The structure was generated at <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/>.

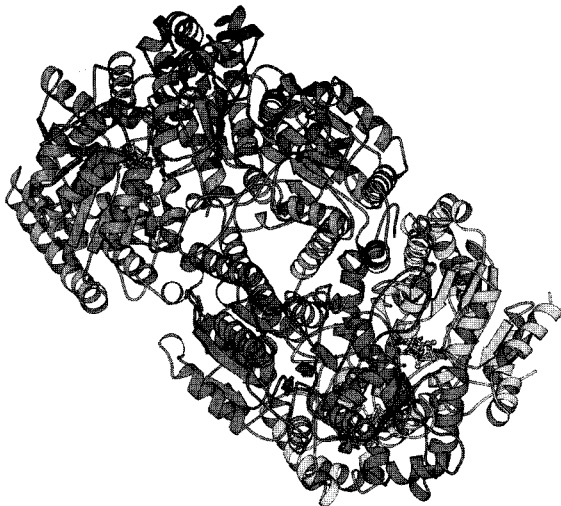


Fig. 5. The X-ray crystallographic protein structure of the MoFe protein (2MIN). The structure was generated at <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/>.

상태는 +1이나 생물학적인 산화상태는 +2로, 질소고정 과정에서 전자를 하나 받은 후 +1이 되며, 전자 전달 후에는 다시 +2의 산화상태로 돌아오게 된다. Sodium dithionite 대신에 titanium citrate를 환원제로 사용하면 Fe 단백질의 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ cluster가 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^0$ 의 산화상태를 가지는 것이 관측되었는데, 이런 산화상태가 생물학적으로 의미 있는 것인지는 분명하지 않다.⁵⁵⁻⁵⁹ Fe 단백질의 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^0$ 의 산화상태가 관심을 끄는 이유는 전자전달의 효율이 두배가 되어 질소고정효소의 에너지 효율이 두배가 되기 때문이다. Fe 단백질은 MoFe 단백질로의 전자 전달의 역할을 수행할 뿐 아니라, FeMo-cofactor의 생합성과 FeMo-cofactor가 결합하지 않은 apo-MoFe 단백질의 활성화에 관여하는 것으로 알려졌다.^{60,61}

MoFe 단백질(~230 kD)의 구조는 헤모글로빈과 유사하게 두 종류의 펩타이드가 $\alpha_2\beta_2$ tetramer를 형성하고 있으며, 각각의 $\alpha\beta$ dimer는 독립적으로 질소고정을 하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 5).^{62,63} 그러나, 두 개의 dimer 사이에 질소고정작용에 대한 cooperativity가 있는지는 밝혀지지 않았다. 각각의 α subunit

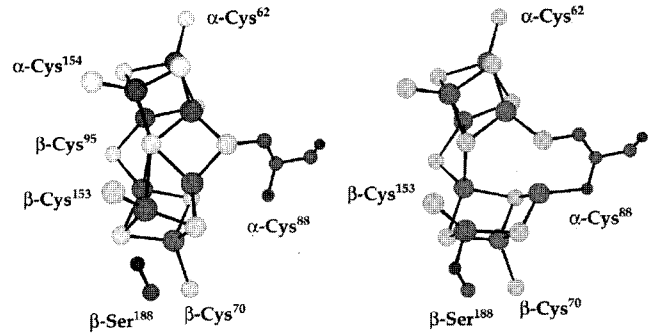


Fig. 6. Structural change of P-cluster upon reduction and oxidation. The left structure is P^{N} state P-cluster and the right structure is P^{OX} state which is two-electron oxidized form of the P^{N} state. (From Broach, R. 2004, Dissertation, Louisiana State University)

에는 Fe_8S_7 의 분자식을 가지는 P-cluster와 (R-homocitrate) $\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{X}$ (X = 미지의 원소)의 분자식을 가지는 FeMo-cofactor가 위치한다. FeMo-cofactor는 P-cluster에서부터 약 15Å 정도 떨어져 있으며, P-cluster는 Fe 단백질의 결합위치에 가까운 $\alpha\beta$ dimer의 경계면에 존재한다.

조효소의 구조. 질소고정효소에는 Fe_4S_4 cluster, P-cluster, FeMo-cofactor 등의 3개 무기 cluster 화합물이 존재하며, Fe_4S_4 cluster는 Fe 단백질에, P-cluster와 FeMo-cofactor는 MoFe 단백질에 각각 존재한다. Fe_4S_4 cluster는 +2/+1의 산화상태에서 일반적인 $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -type의 ferredoxin과 유사한 구조를 가진다. 그러나, all ferrous 상태로 환원이 되면, 집중적인 metal-metal bonding을 보여서 매우 짧은 Fe-Fe 결합길이가 발견된다.⁶⁴ 이는 전달된 전자가 Fe_4S_4 cluster의 Fe과 Fe 사이의 결합 오비탈에 저장됨을 의미한다.

MoFe 단백질에 존재하는 P-cluster는 Münck 그룹의 Mössbauer 연구에 의해서 그 존재가 처음 제안되었다.⁶⁵ P-cluster는 Fe_4S_4 cluster와 마찬가지로 Fe/S 클러스터이며, 두 개의 Fe_4S_4 cluster가 하나의 S 원자를 공유하고 있는 구조이다 (Fig. 6). P-cluster는 MoFe 단백질의 경계면에 존재하며, 여러 개의 cysteine 잔기와 하나의 serine 잔기에 결합하고 있다. 무산소의 환원 상태 (resting state)에서 분리하면 P_N 상태로 존재하며 두 개의 전자를 잃을 경우에는 $\text{P}_{\text{OX}}(\text{P}^{2+})$ 상태로 되어 그 구조가 변하는 것으로 알려져 있다.⁶⁶ 이는 질소고정효소의 FeMo-cofactor의 전자 입출입시의 커다란 구조 변화를 암시한다. 생물학적 산화상태도 P_N 이며, P-cluster를 구성하는 8개의 철 이온은 모두 ferrous(+2)이다. 그러나, 모든 Fe 이온이 +2 상태로 있는 P-cluster가 어떻게 전자를 Fe 단백질로부터 전달받는지에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

FeMo-cofactor는 질소고정효소의 조효소이며, 촉매 활성 자리이다. (R)-homocitrate의 유기 리간드와 $\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{X}$ 클러스터로 구성되어있으며, 몰리브데늄/철/황 클러스터 내부에는 확인되지 않은 가벼운 원자가 존재한다 (Fig. 7). 이 원자가 질소 원자일 것이라고, 그 존재를 최초로 밝힌 Rees는 제안하고 있지만, 아직까지 구체적인 증거는 없다. 다만, X-ray 구조상의 전자 밀도로 보아서 C, N, O 중의 하나 일 것으로 생각된다. FeMo-cofactor는 양끝이 단백질에 연결되어 있는데, 전체적으로는

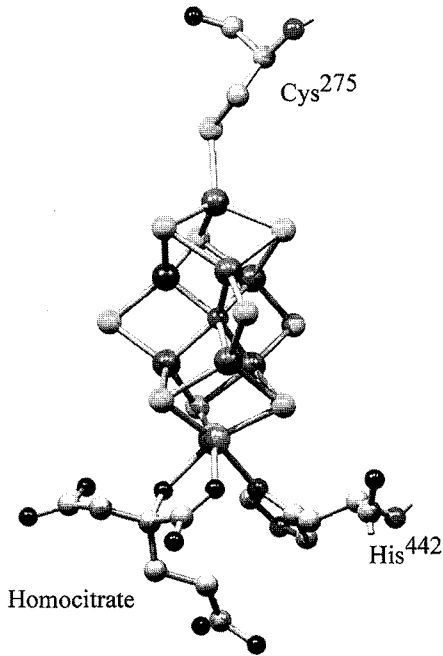


Fig. 7. Structure of FeMo-cofactor.

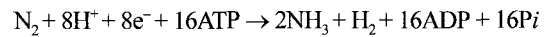
MoFe₃S₃X와 Fe₄S₃X(X = 미지의 원자)의 cubane 구조를 가지는 두 개의 클러스터가 X를 공유하면서 연결되어 있으며, 3개의 bridging 무기 황 원자에 의해 결합되어 있는 것으로 볼 수 있다. FeMo-cofactor의 폴리리테뉴 끝은 MoFe 단백질의 α-subunit의 α442-His 잔기의 δ-N에 결합되어 있으며, 철 끝은 α275-cys 잔기의 thiolate에 붙어있다.⁶⁷⁾ (R)-homocitrate는 bidentate 방식으로 Mo에 결합하고 있으며, Mo 원자는 3개의 무기 황원자와 1개의 α442-His의 imidazole의 질소 원자와 배위하고 있어, 6배위의 octahedral 구조를 형성한다. FeMo-cofactor 허리부분에 발견되는 6개의 Fe 원자는 3개의 S 원자와 한 개의 X 원자에 결합하여 정상적인 tetrahedral 배위 구조를 가진다. FeMo-cofactor에서는 전체적으로 강한 금속-금속 결합이 발견되는데, 기질의 결합과 환원에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. FeMo-cofactor의 생합성에는 다양한 유전자들이 관여하고 있음이 알려져 있는데,⁶⁸⁾ 본 총설에서는 생략한다.

질소고정효소의 분광학적 연구. 질소고정효소는 금속효소로 여러 개의 금속 클러스터가 촉매적 작용에 중요한 역할을 함을 보았다. 그러므로, 질소고정효소 내의 금속 클러스터를 연구하기 위해서 EPR, ⁵⁷Fe Mössbauer spectroscopy, Mo와 Fe X-ray absorption spectroscopy, ⁹⁵Mo, ³³S, ⁵⁷Fe, ¹H-ENDOR, MCD, IR 등의 다양한 분광학적 방법이 사용되었다. 이런 분광학적 방법은 FeMo-cofactor의 Mo과 Fe 원자 주변의 환경과 전자구조에 대한 자료를 제공하였다. Dithionite 존재 하에서 분리된 질소고정효소는 “as-isolated” 형태로 지칭하고, MoFe 단백질은 특징적인 전자 스핀 S = 3/2의 EPR 신호를 보인다. 이 신호는 FeMo-cofactor에서 기인한 것으로, 단백질은 분리하지 않고, 세포를 직접 측정하여도 같은 신호가 관찰된다.⁶⁹⁾ FeMo-cofactor는 가역적으로 산화, 환원이 가능하며, 이때는 각각 S = 0와 S = 정수의 EPR 비활성종이 얻어진다. 또한, resting

state의 MoFe-cofactor를 ⁵⁷Fe Mössbauer 분광기로 측정하면, 7개의 철 이온이 모두 전하 비편재화되어 나타난다. 최근에 Münck에 의해 FeMo-cofactor는 4개의 ferrous와 3개의 ferric center로 구성됨이 제안되었다. 이들 외에도 다양한 분광학적 방법이 질소고정효소의 redox centers인 Fe, Mo, S 원자를 연구하기 위해서 사용되었다.

질소고정효소의 순수분리 능력이 확립된 최근에는 기질과 조효소의 작용에 관한 연구를 분광학적인 방법을 사용하여 본격적으로 진행하게 되었다. 질소고정효소의 생물학적 기질은 공기중의 질소 가스이나, wild type의 질소고정효소와 질소 분자 사이의 작용에 대한 연구는 현재까지 성공하지 못하고 있다. 질소고정효소는 N₂ 뿐만이 아니라 H⁺, 아세틸렌(HC≡CH), CN⁻,⁷⁰⁾ HCN, N₃⁻, N₂H₄ 등의 기질과도 작용을 한다. 이러한 분자들과의 상호작용은 생물학적 질소고정 연구에 관한 중요한 자료를 제공하였다. 질소고정효소와 CO, CS₂,⁷¹⁾ 아세틸렌⁷²⁾과의 상호작용은 분광학적으로 연구되었으며, FeMo-cofactor와 기질이 어떻게 작용하는지의 중요한 단서를 제공하였다.

기질과 조효소의 작용연구. 질소고정효소의 화학반응은 전자와 수소이온을 소모하여 질소분자를 환원시키는 것으로, 이때 전자 전달은 ATP의 가수분해에 의해서 촉진된다. 질소고정에 대한 전체적인 화학 반응식은 아래와 같다.



위의 식을 보면 하나의 전자가 Fe 단백질에서 MoFe 단백질로 전달되기 위해서는 2개의 ATP가 소모됨을 알 수 있다. 그러나, 대부분의 질소고정 작용에서는 2개 이상의 ATP가 소모됨이 알려져 있으며 *in vitro* 조건에서 2.3 정도의 ATP를 소모한다. Titanium citrate를 환원제로 사용하여 all-ferrous Fe 단백질을 형성하였을 때는 하나의 전자 전달에 하나의 ATP만이 가수분해됨이 보고되었다.⁷³⁾ 또한 하나의 N₂가 환원될 때 부반응으로 하나의 수소분자가 형성되는데, 이는 세포 내 환원력의 손실을 의미한다. 실제로 질소고정효소에 의한 질소고정에서는 하나의 N₂ 환원 시 한 개 이상의 수소 분자가 형성됨이 잘 알려져 있다. 일반적으로 전달된 전자의 25-100%가 수소가스 형성에 사용되는데, 수소이온의 환원은 아주 높은 질소분자의 농도 하에서도 억제할 수가 없다.^{74,76)} 질소고정효소에 있어서 수소가스의 생성은 에너지의 낭비를 의미하므로, *rhizobium*을 비롯한 대부분의 질소고정균들은 수소가스를 흡수하는 수소흡수효소(uptake hydrogenase)를 가진다. 질소고정균은 수소흡수효소를 이용하여, 부산물로 생성된 수소로부터 다시 전자를 취할 수 있는 것이다. 회수된 전자는 질소고정효소로 다시 전달되거나, 호흡과정으로 사용된다.

단백질의 3차원 구조가 밝혀지고, 질소고정효소의 활성자리가 FeMo-cofactor라는 합의가 이루어지기 훨씬 전부터 일련의 생화학자들은 질소고정효소의 활성화와 다양한 기질과의 상호작용 등에 대해서 연구하여 왔다.⁷⁷⁾ 그러나, 질소고정효소의 분리능력의 차이 때문에 대부분의 1990년 이전의 효소 kinetics 결과와 기질환원 실험결과, 그리고, 저해제에 관한 결과 등은 주의 깊게 받아들여야 할 것이다.

질소고정효소의 작용은 여러 단계의 전자전달과 이를 위한

ATP의 결합과 분해, 그리고, 환원된 Fe 단백질의 MoFe 단백질에의 결합과 분해 등의 복잡한 일련의 과정을 모두 포함한다. 이들 과정 중에서 MoFe 단백질에 전자를 전달하고 산화된, Fe 단백질의 MoFe 단백질로부터의 분리가 가장 느려서 질소고정효소의 속도결정단계임이 알려져 있다. 실제 *K. pneumoniae*의 질소고정효소는 초당 6.4번의 전자 전달을 하는데,⁷⁸⁾ 이는 1초에 1분자 이하의 N_2 가 암모니아로 환원된다는 의미이다.

질소고정효소의 촉매 조효소는 FeMo-cofactor임이 여러가지 실험에 의해서 밝혀졌다. 첫째, FeMo-cofactor를 생합성하지 못하는 mutant는 apo-MoFe 단백질을 형성하는데,⁷⁹⁾ 이는 FeMo-cofactor는 가지고 있지 않으나, P-cluster는 가지고 있다. 이런 apo-MoFe 단백질에 정상 MoFe 단백질로부터 NMF(N-methylamide)를 사용하여 추출한 FeMo-cofactor를 더해주면 그 효소 활성이 회복되는 것으로 증명되었다.^{80,81)} 둘째, R-homocitrate는 citrate의 구조적 이성질체로 질소고정에 필수적인 역할을 하며, 실제로 질소고정 미생물에는 R-homocitrate를 합성하기 위한 독립적인 유전자가 존재한다. 이 유전자가 저해되었을 경우에는 citrate가 FeMo-cofactor에 결합하게 되며,^{82,83)} 이때, 효소는 H^+ 를 환원하여 H_2 를 생성하는 능력은 유지되나, 질소고정능력을 상실하는 것이 알려져 있다.⁸⁴⁾ 이렇게, citrate가 결합된 FeMo-cofactor를 apo-MoFe 단백질에 넣어주면, 새로운 MoFe 단백질은 역시 H_2 를 생성하는 능력은 유지되나, 질소를 환원하는 능력이 없는 것이 보고되었다.⁸⁵⁾ 마지막으로, 일부 FeMo-cofactor와 비공유 상호작용을 하는 주변 아미노산을 치환시킨 mutants는 극적인 기질 환원의 변화를 보임이 여러 경우에 보고되었다.^{86,87)} 구체적인 예로 MoFe 단백질의 $\alpha 69$ -Gly 잔기를 Ser으로 치환한 MoFe 단백질은 질소를 환원하는 능력에는 거의 변화가 없으나, 아세틸렌을 환원하지는 못하는 것으로 알려져 있다.^{88,89)} 또한, MoFe 단백질의 $\alpha 70$ -Val 잔기를 Ala이나 Gly으로 치환하면, MoFe 단백질은 아세틸렌을 환원할 수 있는 능력이 변화되어 propyne($CH_3C \equiv CH$)이나 butyne($CH_3CH_2C \equiv CH$)을 환원할 수 있었다.⁸⁷⁾ 이상의 예로부터 FeMo-cofactor가 기질의 결합 자리일 뿐 아니라, 환원이 일어나는 곳임이 밝혀졌으며, 최근에는 FeMo-cofactor의 특정 부분을 겨냥하여 구체적인 기질의 결합 자리에 대한 연구가 진행되고 있다.

질소고정효소 wile-type의 경우, N_2 의 환원은 CO, H_2 , 아세틸렌에 의해서 비경쟁적으로 저해된다. 아세틸렌은 에틸렌으로만 환원되며, 일부 mutant나, V-질소고정효소의 경우 에탄도 형성한다. 아세틸렌의 환원은 CO, N_2 , azide(N_3^-), 에틸렌 등에 의해 저해된다.⁹⁰⁾ 특히, CO는 자신은 환원되지 않으면서 H^+ 를 제외한 모든 기질의 환원을 저해한다. 그러므로, CO 존재 하에서는 질소고정효소가 H_2 만 생성하게 된다. CO는 질소고정효소의 전자전달을 저해하지 않아서, CO가 존재하지 않는 경우와 비교해서 전체 소모되는 전자의 양에는 변화를 주지 않는다. 이것은 질소고정효소의 활성자리인 FeMo-cofactor에서 H^+ 환원자리와 다른 기질의 환원자리가 다르다는 것을 시사한다. 질소고정효소에 CO가 결합하게 되면, 특이한 EPR 신호를 나타내게 되는데, CO의 농도에 따라서, 다른 EPR 신호가 얻어진다.⁹¹⁾ ENDOR 실험에서는 이 EPR 신호를 분석하여, CO가 FeMo-cofactor에 결합하는 방식을 제안하였다.⁹²⁾

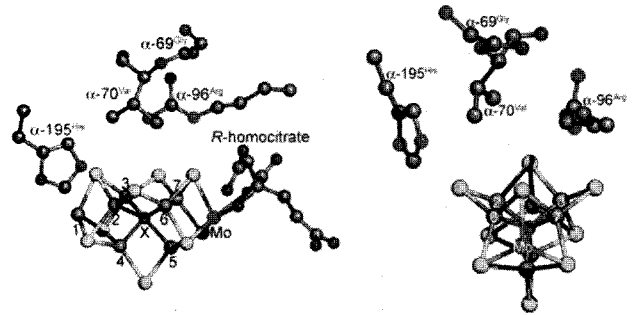


Fig. 8. X-ray structure of FeMo-cofactor and the important amino acid residues. (Adopted from *Acc. Chem. Res.* 38, 208)

현재까지는 질소고정효소의 FeMo-cofactor의 한 부분에 N_2 가 결합하여 환원되며, N_2 환원의 비경쟁적 저해제인 아세틸렌은 FeMo-cofactor의 두 부분 또는 그 이상의 자리에 결합하여 환원되는 것으로 보고되었다.⁹³⁾ 질소고정효소의 FeMo-cofactor와 CO, 아세틸렌, 에틸렌과의 상호작용에 관한 이론적 연구도 보고되었다.^{94,95)} FeMo-cofactor 주변의 아미노산 잔기(Fig. 8)를 site-directed mutation 시킨 MoFe 단백질은 기질에 대한 특이성의 변화를 보여주는데 이는 P-cluster 주변의 아미노산 잔기를 변화시킨 mutant가 기질 선택성에는 변화가 없이, 전체적 효소 활성의 변화를 가져온다는 점에서 대조를 이룬다. FeMo-cofactor 주변의 돌연변이 실험은 질소분자의 환원에 주변 아미노산 잔기들이 전자 전달이나, 수소이온 전달에 있어서 매우 필수적인 역할을 한다는 것을 잘 증명하고 있다. 또한, 추출된 FeMo-cofactor는 질소고정에 전혀 활성이 없다는 사실도 이를 잘 증명하고 있다.⁹⁷⁾ Site-directed mutation으로 변환시킨 mutant와 질소분자의 유도체인 아세틸렌을 기질로 하여, 질소고정효소와 기질 간의 상호작용이 연구되고 있다. 최근의 이러한 연구에서⁹⁸⁾ MoFe 단백질의 mutant인 $\alpha 70$ -Val과 propargyl alcohol($HC \equiv CCH_2OH$)과의 상호작용에 대한 ENDOR 연구에서 질소분자가 side-on mode로 결합하는 것이 제안되었다.⁹⁹⁾

질소고정효소의 독특한 효소 활성은 N_2 환원과정 중에 D_2 를 첨가하면 HD가 형성되는 것이다. HD 형성은 N_2 에 의해서만 촉진되며, 아세틸렌이나 다른 기질에서는 일어나지 않는다. 이런 현상은 질소고정효소의 한 단면을 보여주는 것으로 질소고정환원과정에 형성되는 중간체가 HD 형성에 필수적인 것으로 생각된다.¹⁰⁰⁾

생물학적 질소고정 메커니즘

기존에 제안된 질소고정 메커니즘. N_2 를 환원하여 암모니아를 형성하는 반응은 열역학적으로 발열반응이나, 반응의 중간체인 diazine(N_2H_2)을 형성하기 위해서는 182 kJ이라는 엄청난 에너지가 필요하다. 그러므로, 질소고정효소의 조효소인 FeMo-cofactor는 N_2 분자와 결합하여 이러한 에너지를 극복하도록 N_2 분자를 활성화시키는 것으로 생각된다.

생물학적 질소고정 메커니즘에 대한 중요한 이슈는 기질의 결합 위치와 환원작용이며, 이에 동반되는 전자와 H^+ 이온의 전달과정이다.¹⁰¹⁾ 질소고정효소의 전자전달이 Fe 단백질의 MoFe

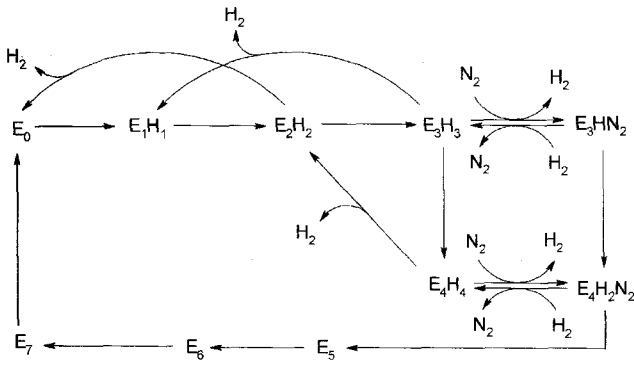
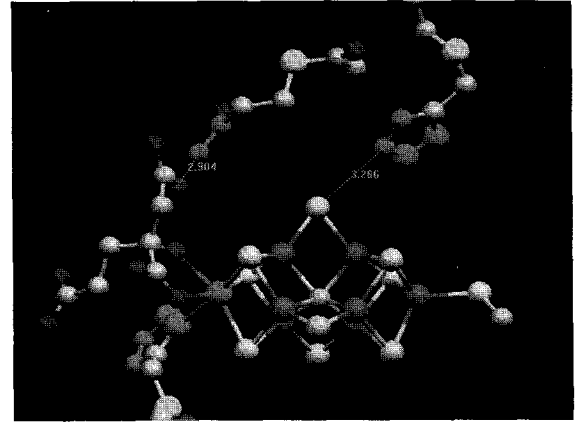


Fig. 9. Catalytic cycle of the MoFe protein proposed by Thorneley and Lowe.

단백질로부터의 분리에 의해 결정되는 생화학적 과정인 반면, FeMo-cofactor에 전자가 전달되었을 때 기질의 결합과 환원에 대한 작용 연구는 생화학 이상의 접근 방법을 요구하였다. 이는 무기 클러스터 화합물인 FeMo-cofactor의 유기 기질과의 상호작용이 생화학적 연구에 의해서만은 해결될 수 없기 때문이다. 화학적 접근에는 Michigan 대학의 Coucouvanis 그룹과,¹⁰²⁻¹⁰⁶ Harvard 대학의 Holm 그룹에서¹⁰⁷⁻¹¹⁰ 선도적으로 연구되었다. 이 두 그룹의 연구는 질소고정효소의 작용 메커니즘 연구에 화학적 자료를 제공하여 많은 기여를 하였다. 예를 들어, 무기 합성에 의해서 생물계에 존재하는 ferredoxin이 합성되었으며, 질소고정효소의 P-cluster와 FeMo-cofactor들의 모델 화합물이 합성되어 이들의 물리화학적 특성과 촉매 작용에 대한 이해를 촉진하였다.

환원적 조건에서 분리된 MoFe 단백질은 resting state(E_0)로 지칭되며(Fig. 9), 이때 금속이온의 산화상태는 Mössbauer 분광학에 의해 1Mo^{4+} , 3Fe^{3+} , 4Fe^{2+} 로 추정된다.^{111,112} MoFe 단백질이 하나의 전자를 받아들이면 환원된 상태가 되며 이를 E_1 라 한다. E_1 에서 전자를 더 받아들이면 E_2 와 E_3 전환되고, E_2 와 E_3 상태는 다른 기질이 존재하지 않을 때, 용액중의 수소이온을 환원하여, H_2 를 형성하면서, 각각 E_0 와 E_1 으로 되돌아가게 된다. N_2 는 MoFe 단백질이 E_3 나 E_4 에 이르렀을 때만 결합하는 것으로 알려져 있다. MoFe 단백질이 3개나 4개의 전자를 받아들인 후, 결합된 질소는 외부의 H_2 와의 교환이 가능하게 된다. 아세틸렌의 경우에는 E_0 나 E_1 의 환원상태의 MoFe 단백질에 결합하여 환원되는 것으로 알려져 있다. Fig. 9는 기질의 결합을 중심으로 설명한 질소고정효소의 작용 메커니즘이며, 실제로는 전자 전달 후 FeMo-cofactor로의 수소이온의 전달이 촉매작용에서 더욱 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각된다. 이러한 수소이온의 전달은 동위원소로 치환된 기질을 사용하여 연구할 수 있다. 예를 들어, C_2D_2 를 사용할 경우 기질의 환원이 FeMo-cofactor 표면의 두 자리에서 일어나며, 이때 불균일한 수소이온의 전달에 의해 *cis*-dideuterioethylene과 *trans*-dideuterioethylene의 두 가지 다른 생성물이 형성된다.⁹³

새로운 질소고정효소의 구조가 발표된 후에 FeMo-cofactor 내부의 원소를 규명하기 위한 연구들이 진행되었다. 계산화학에 의하면, 이 원소는 질소나 산소일 가능성이 높으며, 그 중에서도



(a)

Fig. 10. Proposed nitrogenase N_2 reduction mechanism. (a) Structure of the FeMo-cofactor in resting state. $\alpha 96$ -Arg residue is close to one of the carboxy oxygens of *R*-homocitrate and $\alpha 195$ -His is closely located above the bridging sulfide of the FeMo-cofactor. (b) Suggested N_2 reduction steps of the FeMo-cofactor in nitrogenase.

질소 원자일 것으로 제안되었다.¹¹³ 또한, 이 원소가 질소환원의 촉매 활동이 진행되어도 변함없이 FeMo-cofactor 내부에 존재함이 관찰되었다.¹¹⁴ 그러므로, FeMo-cofactor 내부에 있는 원자가 무엇이던 질소환원작용에 관여하지는 않는 것으로 보인다.

새로운 질소고정 메커니즘. 생화학과 화학적 지식을 접목하여, 질소고정작용의 새로운 메커니즘이 제안될 수 있다. Fig. 10(a)는 FeMo-cofactor의 (*R*)-homocitrate의 산소와 μ -S에 $\alpha 96$ -Arg의 아민기와 $\alpha 195$ -His의 이미다졸기의 질소원자에 각각 2.9 Å과 3.3Å의 거리로 아주 가깝게 존재함을 보여준다.¹¹⁵ $\alpha 96$ -Arg와 $\alpha 195$ -His의 질소고정과정에서의 중요한 역할은 이들 mutant를 이용한 연구에서 잘 증명되어 있다. 또한, (*R*)-homocitrate의 촉매적 역할도 잘 보고되어 있다. Fig. 10(b)는 질소고정작용에서의 FeMo-cofactor와 N_2 의 상호작용과 환원을 제안한 것이다. 이 제안에서는 FeMo-cofactor 내부의 미지의 원소를 질소로 가정하였다.¹¹⁶ 질소고정효소를 환원상태에서 분리하면, resting state로 존재하며(구조 1), $\alpha 96$ -Arg는 (*R*)-homocitrate에, $\alpha 195$ -His는 FeMo-cofactor의 μ -S에 각각 수소 결합을 하고 있다. Fe 단백질로부터 전자가 두개 이상 전달되면, FeMo-cofactor의 Fe-S 결합이 깨어지면서, 전자를 수용하게 된다(구조 2). 전자전달에 따른 클러스터의 구조 변화는 P-cluster와 여러 모델 시스템에서 증명되었다. 이때 Fe으로부터 분리된 S를 안정화 시키기위해서 $\alpha 195$ -His의 수소화된 이미다졸기에 결합하게 된다. 추가로 전자가 FeMo-cofactor에 전달되게 되면, Fe-N와 Fe-Fe의 결합이 깨어지며(구조 3과 4), N_2 가 결합할 수 있는 빈 공유결합 자리를 두개의 Fe이 제공하게 된다. 두개의 Fe에 N_2 분자는 side-on 방식으로 결합하게 되면, 이 결합에 아마도 분리된 S이 간여할 수도 있을 것이다(구조 5). 이렇게 결합한 N_2 는 구조 6의 end-on 방식의 중간체와도 평형의 관계가 있을 수 있다. FeMo-cofactor는 질소를 환원하기 위해서 내부의 질소원자와 결합한 N_2 를 이용하여, azide형태의 화합물을 형성할 것이다(구조 7). 이런 반응 경로를 따르는 것이 질소의 $\text{N}\equiv\text{N}$ 삼중결합을 환원시키는데 용이할 것이다. 이 질소화합물은 Fe

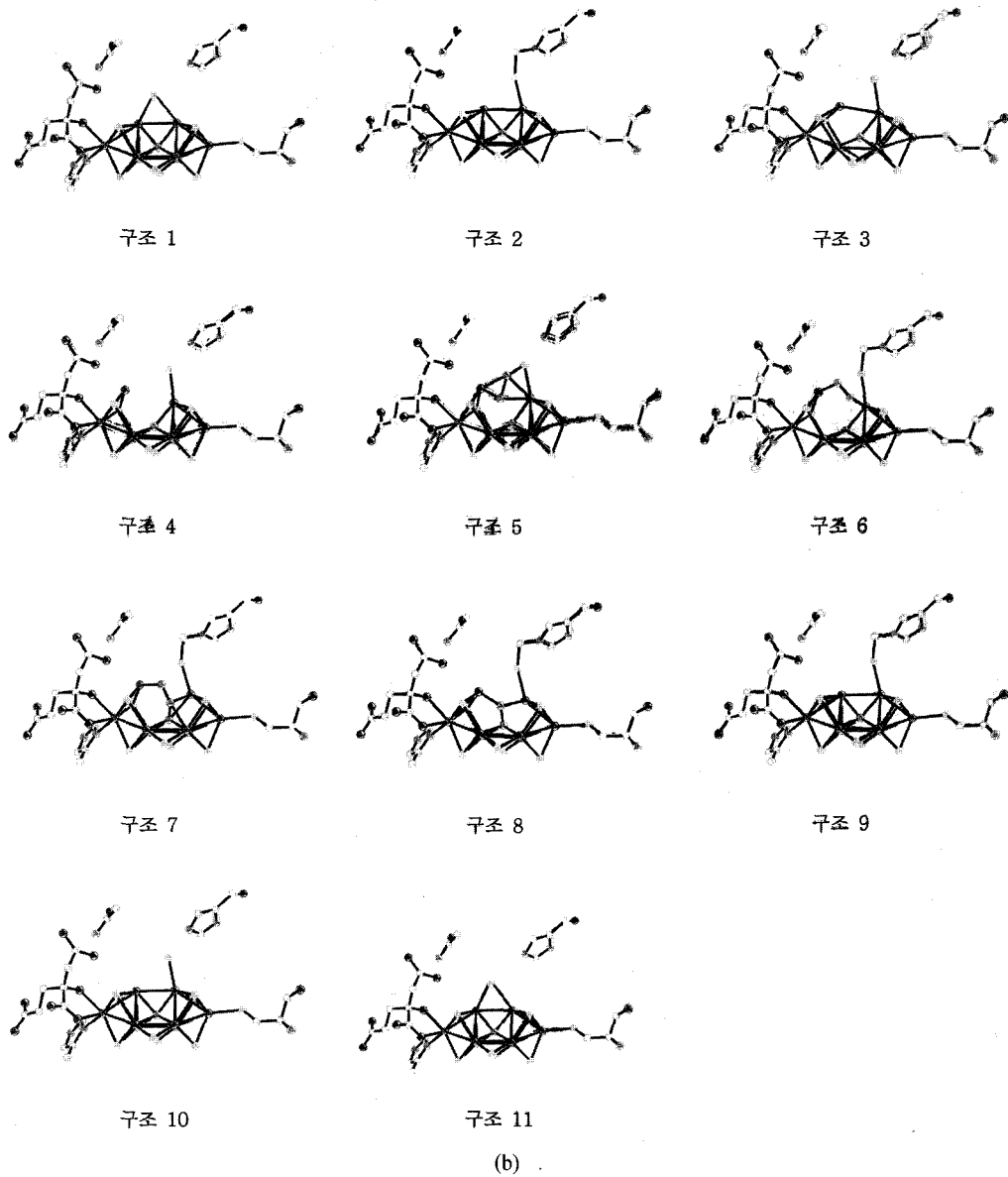


Fig. 10. Continued.

단백질에서 전자가 전달됨에 따라 순차적으로 암모니아를 방출하고(구조 8), hydrazine의 형태를 걸쳐서 하나의 암모니아를 더 형성하면, 구조 9를 형성하게 된다. 구조 9는 구조 2와 같은 모양을 가지며, 전자 전달 후에 또다른 N_2 를 결합할 준비가 된다. 만일 더 이상의 N_2 가 존재하지 않으면, FeMo-cofactor는 구조 10을 걸쳐서 원래의 구조(구조 11)로 돌아갈 것이다. 현재까지 위에서 제안된 diazene이나 hydrazine의 어떤 반응 중간체도 관찰되거나 분리되지 않았으나, 높은 pH에서는 hydrazine이 분리되었음이 보고되었다.

결 론

생물학적 질소고정 메커니즘에 관한 연구는 질소고정효소가 분리된지 70년이 지난 지금도 계속되어 오고 있으며, 이는 이 연구가 얼마나 중요하고도 어려운 일인가를 반증하는 것이다.

그러나, 지난 10년간의 발전은 혹시, 우리 세대에 질소고정 메커니즘의 열쇠를 풀 수 있을 지도 모른다는 희망을 안겨주고 있다. 그 이유로는, 질소고정 조효소인 FeMo-cofactor의 원자수준의 3차원 구조의 규명, 밀도함수이론을 이용한 정교한 계산으로부터의 FeMo-cofactor와 기질의 상호작용에 관한 연구, 여러 가지 중요한 mutants를 이용한 MoFe 단백질의 생화학적 연구와 이들의 분광학적 연구 등이 최근에 중요한 결과들을 도출하고 있기 때문이다. 본문에서 생물학적 질소고정의 메커니즘을 제한하였지만, 이를 분명히 이해하기 위해서 앞으로 반드시 해결해야 할 과제는, 질소고정효소 조효소인 FeMo-cofactor와 N_2 의 상호작용에 대한 원자수준에서의 직접적 관찰, FeMo-cofactor의 합성과 이를 이용한 질소환원의 모델 연구, 그리고, 질소고정효소의 생물학적 합성과 이들의 조절 메커니즘의 이해 등이 될 것이다.

초 록

생물학적 질소고정과정의 연구는 학문적으로나 산업적으로 매우 중요한 과정이다. 본 총설에서는 공업적 질소고정과 비교되는 생물학적 질소고정의 특징을 간단히 살펴보고, *Azotobacter vinelandii*에서 연구되고 있는 생물학적 질소고정효소의 특징을 다룬다. 생물학적 질소고정과정은 다양한 생명체에서 일어나며, 최근에는 미생물인 *A. vinelandii*에 그 작용 메커니즘에 관한 연구가 집중되어 있다. 공기중의 질소를 암모니아로 변환시키는 질소고정은 화학적으로 환원 반응에 해당하므로 전자의 공급이 필요하다. 생물학적 질소고정을 담당하는 질소고정효소는 촉매 반응을 위해 생물학적인 환원력을 사용하여 전자를 공급받아, Fe 단백질의 Fe₄S₄ cluster와 MoFe 단백질의 P-cluster를 거쳐 질소 환원 반응이 일어나는 FeMo-cofactor로 전달한다. 이러한 전자전달의 과정과 수소이온의 전달 과정은 질소고정효소의 반응 메커니즘 이해에 매우 중요한 과정이며, FeMo-cofactor와 질소분자의 상호작용은 생물학적 질소고정 메커니즘의 중심에 있다. 질소고정 작용 메커니즘의 연구에는 X-선 단백질 결정학, EPR과 Mössbauer 등의 다양한 분광학적 방법과, 효소의 기질과 저해제의 상호작용을 연구하고 mutant와 비교하는 생화학적 접근방법, 그리고 FeMo-cofactor의 모델 화합물을 합성하여 연구하는 화학적 방법 등이 적용되었다. 이들 분야의 최근 연구 결과를 소개하며, 마지막으로, 다양한 연구 결과에 바탕하여 새로운 질소고정효소의 작용 기작이 제안하였다.

Key words: 질소고정, *Azotobacter vinelandii*, 메커니즘, Fe 단백질, MoFe 단백질, FeMo-cofactor, 단백질 X-선 구조

감사의 글

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

참고문헌

- Smil, V. (2000) In *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production* (1st ed.) MIT Press, Cambridge, MA.
- Jennings, J. R. (1991) In *Catalytic Ammonia Synthesis*, Plenum press, New York.
- Ertl, G. (1980) Surface science and catalysis-studies on the mechanism of ammonia synthesis. *Catal. Rev.-Sci. Eng.* **21**, 201.
- Boudart, M. (1980) Kinetics and mechanism of ammonia synthesis. *Catal. Rev.* **23**, 1.
- Rees, D. C. and Howard J. B. (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 559-566.
- Pedrosa, F. O., Hungria, M., Yates, G. and Newton, W. E. (1999) *Nitrogen Fixation: From molecules to Crop Productivity*. In *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol. 38, Kluwer Academic Publ. London
- Sellman, D., Utz, J., Blum, N. and Heinemann, F. W. (1999) On the function of nitrogenase FeMo cofactors and competitive catalysts: chemical principles, structural blue-prints, and the relevance of iron sulfur complexes for N₂ fixation. *Coord. Chem. Rev.* **190-192**, 607-627.
- Smith, B. E. (1999) Structure, function, and biosynthesis of the metallosulfur clusters in nitrogenases. *Adv. Inorg. Chem.* **47**, 159.
- Sharp, R. E. and Chapman, S. K. (1999) Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1432**, 143-158.
- Dance, I. (1998) Understanding structure and reactivity of new fundamental inorganic molecules: metal sulfides, metallocarbohedrenes, and nitrogenase. *Chem. Comm.* 523-530.
- Tuczek, F. and Lehnert, N. (1998) New developments in nitrogen fixation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2636-2638.
- Kisker, C., Schindelin, H. and Rees, D. C. (1997) Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.
- Thorneley, R. N. F. and Lowe, D. J. (1996) Nitrogenase: substrate binding and activation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 576-580.
- Dance, I. (1996) Theoretical investigations of the mechanism of biological nitrogen fixation at the FeMo cluster site. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 581-586.
- Coucovanis, D. (1996) Functional analogs for the reduction of certain nitrogenase substrates. Are multiple sites within the Fe/Mo/S active center involved in the 6e⁻ reduction of N₂? *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 594-600.
- Pickett, C. J. (1996) The Chatt cycle and the mechanism of enzymic reduction of molecular nitrogen. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 601-606.
- Howard, J. B. and Rees, D. C. (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem. Rev.* **96**, 2965-2982.
- Richards, R. L. (1996) Reactions of small molecules at transition metal sites: studies relevant to nitrogenase, an organometallic enzyme. *Coord. Chem. Rev.* **154**, 83-97.
- Bazhenova, T. A. and Shilov, A. E. (1995) Nitrogen fixation in solution. *Coord. Chem. Rev.* **144**, 69-145.
- Eady, R. R. and Leigh, G. J. (1994) Metals in the nitrogenases. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2739-2747.
- Ludden, P. W. (1994) In *Nitrogenases & the Iron-Molybdenum Cofactor*. King, R. B. Ed. Encyclopedia of Inorganic Chemistry, John Wiley & Sons, vol. 5. pp. 2566-2580.
- Rees, D. C., Chan, M. K. and Kim, J. (1993) Structure and function of nitrogenase. *Adv. Inorg. Chem.* **40**, 89.
- Stiefel, E. I., Coucovanis, D. and Newton, W. E. Ed. (1993). ACS Symposium Series, v. 535. *Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems*. D. C.
- Stacy, G., Burris, R. H. and Evans, H. J. (1992) *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman & Hall.
- Burris, R. H. (1991) Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* **266**, 9339-9342.
- Coucovanis, D. (1991) Use of preassembled iron/sulfur and iron/molybdenum/sulfur clusters in the stepwise synthesis of potential analogs for the Fe/Mo/S site in nitrogenase. *Acc. Chem. Res.* **24**, 1-8.
- Burgmayer, S. J. N. and Stiefel, E. I. (1985) Molybdenum

- enzymes, cofactors, and systems: the chemical uniqueness of molybdenum. *J. Chem. Ed.* **62**, 943.
28. Spiro, T. G. (1985) In *Molybdenum Enzymes*. John Wiley & Sons, New York.
 29. Henderson, R. A., Leigh, G. J. and Pickett, C. J. (1983) The chemistry of nitrogen fixation and models for the reactions of nitrogenase. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **27**, 197.
 30. Müller, A. and Newton, W. E. (1983) In *Nitrogen fixation*. Plenum press, New York.
 31. Eady, R. R. (1991) The Mo-, V-, Fe-based nitrogenase systems of *Azotobacter*, *Adv. Inorg. Chem.* **36**, 77-102.
 32. Luque, F. and Pau, R. N. (1991) Transcriptional regulation by metals of structural genes for *Azotobacter vinelandii* nitrogenases. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 481.
 33. Rehder, D. (2000) Vanadium nitrogenase. *J. Inorg. Biochem.* **80**, 133-136.
 34. Rüttimann-Johnson, C., Staples, C. R., Rangaraj, P., Shah, V. K. and Ludden, P. W. (1999) A vanadium and iron cluster accumulates on *VnfX* during Iron-Vanadium-cofactor synthesis for the vanadium nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **274**, 18087-18092.
 35. Eady, R. R. (1996) Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chem. Rev.* **96**, 3013-3030.
 36. Bishop, P. E., Jarlenski, D. M. L. and Hetherington, D. R. (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7342-7346.
 37. Chisnell, J. R., Remakumar, R. and Bishop, P. E. (1988) Purification of a second alternative nitrogenase from *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **170**, 27-33.
 38. Schneider, K., Gollan, U., Dröttboom, M., Selsemeier-Voigt, S. and Müller, A. (1997) Comparative biochemical characterization of the iron-only nitrogenase and the molybdenum nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* **244**, 789-800.
 39. Rees, D. C. and Howard J. B. (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 559-566.
 40. The activity of nitrogenase is generally represented by how much electrons are transferred to substrates because all electrons transferred to MoFe protein are used for substrate reduction.
 41. Ribbe, M., Gadkari, D. and Meyer, O. (1997) N_2 fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N_2 reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26627-26632.
 42. Erickson, J. A., Nyborg, A. C., Johnson, J. L., Truscott, S. M., Gunn, A., Nordmeyer, F. R. and Watt, G. D. (1999) Enhanced Efficiency of ATP Hydrolysis during Nitrogenase Catalysis Utilizing Reductants That Form the All-Ferrous Redox State of the Fe Protein. *Biochemistry* **38**, 14279-14285.
 43. Rees, D. C. and Howard, J. B. (1999) Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* **293**, 343-350.
 44. Clarke, T. A., Maritano, S. and Eady, R. R. (2000) Formation of a tight 1:1 complex of *Clostridium pasteurianum* Fe protein-*Azotobacter vinelandii* MoFe protein: evidence for long-range interactions between the Fe protein binding sites during catalytic hydrogen evolution. *Biochemistry* **39**, 11434-11440.
 45. ATP hydrolysis is not required for the electron transfer from Fe protein to MoFe protein, rather ATP accelerates electron transfer.
 46. Chan, J. M., Wu, W., Dean, D. R. and Seefeldt, L. C. (2000) Construction and characterization of a heterodimeric iron protein: defining roles for adenosine triphosphate in nitrogenase catalysis. *Biochemistry* **39**, 7221-7228.
 47. Chan, J. M., Ryle, M. J. and Seefeldt, L. C. (1999) Evidence that MgATP accelerates primary electron transfer in a *Clostridium pasteurianum* Fe protein-*Azotobacter vinelandii* MoFe protein nitrogenase tight complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 17593-17598.
 48. Burgess, B. K. and Lowe, D. J. (1996) Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem. Rev.* **96**, 2983-3012.
 49. Seefeldt, L. C. and Dean, D. R. (1997) Role of nucleotides in nitrogenase catalysis. *Acc. Chem. Res.* **30**, 260-266.
 50. Howard, J. B. and Rees, D. C. (1994) Nitrogenase-a nucleotide-dependent molecular switch. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 235-264.
 51. Kim, J. and Rees, D. C. (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* **360**, 553-560.
 52. RCSB Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/>
 53. The abbreviations for MoFe protein (dinitrogenase) and Fe protein (dinitrogenase reductase) are 1 and 2, respectively. For example, MoFe protein of *A. vinelandii* is presented as Av1.
 54. Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L. A., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B. and Rees, D. C. (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science* **297**, 1696-1700.
 55. Yoo, S. J., Angove, H. C., Burgess, B. K., Hendrich, M. P. and Münck, E. (1999) Mössbauer and interger-spin EPR studies and spin-coupling analysis of the $[4Fe-4S]^0$ cluster of the Fe protein from *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2534-2545.
 56. Watt, G. D. and Reddy, K. R. N. (1994) Formation of an all ferrous Fe_4S_4 cluster in the iron protein component of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *J. Inorg. Biochem.* **53**, 281-294.
 57. Angove, H. C., Yoo, S. J., Münck, E. and Burgess, B. K. (1998) An all-ferrous state of the Fe protein of nitrogenase. Interaction with nucleotides and electron transfer to the MoFe protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 26330-26337.
 58. Angove, H. C., Yoo, S. J., Burgess, B. K. and Münck, E. (1997) Mössbauer and EPR evidence for an all-ferrous Fe_4S_4 cluster with $S=4$ in the Fe protein of nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8730-8731.
 59. Nyborg, A. C., Erickson, J. A., Johnson, J. L., Gunn, A., Truscott, S. M. and Watt, G. D. (2000) Reactions of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase using Ti(III) as reductant. *J. Inorg. Biochem.* **78**, 371-381.
 60. Hausinger, R. P. and Howard, J. B. (1983) Thiol reactivity of the nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **258**, 13486-13492.
 61. Ribbe, M. W., Bursey, E. H. and Burgess, B. K. (2000)

- Identification of an Fe protein residue (Glu146) of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase that is specifically involved in FeMo cofactor insertion. *J. Biol. Chem.* **275**, 17631-17638.
62. Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B. and Rees, D. C. (1997) Structure of ADP·AlF₄⁻-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* **387**, 370-376.
 63. Grossmann, J. G., Hasnain, S. S., Yousafzai, F. K., Smith, B. E., Eady, R. R., Schindelin, H., Kisker, C., Howard, J. B., Tsuruta, H., Muller, J. and Rees, D. C. (1999) Comparing crystallographic and solution structures of nitrogenase complexes. *Acta Cryst.* **D55**, 727-728.
 64. Strop, P., Takahara, P. M., Chiu, H.-J., Angove, H. C., Burgess, B. K. and Rees, D. C. (2001) Crystal structure of the all-ferrous [4Fe-4S]⁰ form of the Nitrogenase Iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* **40**, 651-656.
 65. McLean, P. A., Papaefthymiou, V., Orme-Johnson, W. H. and Münck, E. (1975) Isotopic hydrids of nitrogenase. Mössbauer study of MoFe protein with selective ⁵⁷Fe enrichment of the P-cluster. *J. Biol. Chem.* **262**, 12900-12903.
 66. Peters, J. W., Stowell, M. H. B., Soltis, S. M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K. and Rees, D. C. (1997) Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**, 1181-1187.
 67. The amino acid sequence of nitrogenase follows *A. vinelandii*.
 68. Dos Santos, P. C., Dean, D. R., Hu, Y. and Ribbe, M. W. (2004) Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem. Rev.* **104**, 1159-1173.
 69. Rawlings, J., Shah, V. K., Chisnell, J. R., Brill, W. J., Zimmerman, R., Münck, E. and Orme-Johnson, W. H. (1978) Novel metal cluster in the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Spectroscopic evidence. *J. Biol. Chem.* **253**, 1001-1004.
 70. Li, J.-G., Burgess, B. K. and Corbin, J. L. (1982) Nitrogenase reactivity: Cyanide as substrate and inhibitor. *Biochemistry* **21**, 4393-4402.
 71. Ryle, M. J., Lee, H.-I., Seefeldt, L. C. and Hoffman, B. M. (2000) Nitrogenase reduction of carbon disulfide: freeze-quench EPR and ENDOR evidence for three sequential intermediates with cluster-bound carbon moieties. *Biochemistry* **39**, 1114-1119.
 72. Benton, P. M. C., Christiansen, J., Dean, D. R. and Seefeldt, L. C. (2001) Stereospecificity of acetylene reduction catalyzed by nitrogenase. *Am. Chem. Soc.* **123**, 1822-1827.
 73. Nyborg, A. C., Johnson, J. L., Gunn, A. and Watt, G. D. (2000) Evidence for a two-electron transfer using the all-ferrous Fe protein during nitrogenase catalysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 39307-39312.
 74. Hadfield, K. L. and Bulen, W. A. (1969) Adenosine triphosphate requirement of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* **8**, 5103-5108.
 75. Rivera-Ortiz, J. M. and Burris, R. H. (1975) Interactions among substrate and inhibitors of nitrogenase. *J. Bacteriol.* **123**, 537-545.
 76. Simpson, F. B. and Burris, R. H. (1984) A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* **224**, 1095-1097.
 77. Hardy, R. W. F., Burns, R. C., Stansky, J. T. and Parashall, G. W. (1975) In *Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms*, Stewart, W. D. P. ed. IBP. 6. pp. 351-376.
 78. Fisher, K., Lowe, D. J. and Thorneley, R. N. F. (1991) *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. The pre-steady-state kinetics of MoFe-protein reduction and hydrogen evolution under conditions of limiting electron flux show that the rates of association with the Fe-protein and electron transfer are independent of the oxidation level of the MoFe-protein. *Biochem. J.* **279**, 81-85.
 79. The terminology of "apo-MoFe protein" was used historically to designate FeMo-cofactor void MoFe protein, which formed from nifE, nifN, nifB or nifH mutant. Strictly speaking, these proteins contain P-cluster and "apo" is misnomer. Besides, apo-MoFe proteins isolated from nifE, nifN, or nif B mutant were reported different from that of nifH mutant.
 80. Shah, V. K. and Brill, W. J. (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3249-3253.
 81. Christiansen, J., Goodwin, P. J., Lanzilotta, W. N., Seefeldt, L. C. and Dean, D. R. (1998) Catalytic and biophysical properties of a nitrogenase apo-MoFe protein produced by a nifB-deletion mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* **37**, 12611-12623.
 82. Liang, J., Madden, M., Shah, V. K. and Burris, R. H. (1990) Citrate substitutes for homocitrate in nitrogenase of a nifV mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry* **29**, 8577-8581.
 83. Mayer, S. M., Gormal, C. A., Smith, B. E. and Lawson, D. M. (2002) Crystallographic analysis of the MoFe protein of nitrogenase from a nifV mutant of *Klebsiella pneumoniae* identifies citrate as a ligand to the molybdenum of Iron Molybdenum cofactor (FeMoco). *J. Biol. Chem.* **277**, 35263-35266.
 84. McLean, P. A. and Dixon, R. A. (1981) Requirement of nifV gene for production of wild-type nitrogenase enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **292**, 655-657.
 85. Hawkes, T. R., McLean, P. A. and Smith, B. E. (1984) Nitrogenase from nifV mutants of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor. *Biochem. J.* **217**, 317-321.
 86. Scott, D. J., May, H. D., Newton, W. E., Brigle, K. E. and Dean, D. R. (1990) Role for the nitrogenase MoFe protein α -subunit in FeMo-cofactor binding and catalysis. *Nature* **343**, 188-190.
 87. Mayer, S. M., Niehaus, W. G. and Dean, D. R. (2002) Reduction of short chain alkynes by a nitrogenase α -70^{Ala}-substituted MoFe protein. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 802-807.
 88. Christiansen, J., Cash, V. L., Seefeldt, L. D. and Dean, D. R. (2000) Isolation and characterization of an acetylene-resistant nitrogenase. *J. Biol. Chem.* **275**, 11459-11464
 89. Christiansen, J., Seefeldt, L. D. and Dean, D. R. (2000) Competitive substrate and inhibitor interactions at the physiologically relevant active site of nitrogenase. *J. Biol. Chem.* **275**, 36104-36107.
 90. Davis, L. C. and Wang, Y.-L. (1980) In vivo and in vitro kinetics of nitrogenase. *J. Bacteriol.* **141**, 1230-1238.
 91. Maskos, Z. and Hales, B. J. (2003) Photo-lability of CO bound

- to Mo-nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Inorg. Biochem.* **93**, 11-17.
92. McLean, P. A., True, A., Nelson, M. J., Lee, H.-I., Hoffman, B. M. and Orme-Johnson, W. H. (2003) Effects of substrates (methyl isocyanide, C_2H_2) and inhibitor (CO) on resting-state wild-type and *NifV-Klebsiella pneumoniae* MoFe proteins. *J. Inorg. Biochem.* **93**, 18-32.
93. Han, J. and Newton, W. E. (2004) Differentiation of acetylene-reduction sites by stereoselective proton addition during *Azotobacter vinelandii* nitrogenase-catalyzed C_2D_2 reduction. *Biochemistry* **43**, 2947-2956.
94. Durrant, M. C. (2004) An atomic level model for the interactions of molybdenum nitrogenase with carbon monoxide, acetylene, and ethylene. *Biochemistry* **43**, 6030-6042.
95. Dance, I. (2004) The mechanism of nitrogenase. Computed details of the site and geometry of binding of alkyne and alkene substrates and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11852-11863.
96. Thorneley, R. N. F. and Lowe, D. J. (1985) In Molybdenum Enzymes; Spiro, T. G., Ed.; Wiley-Interscience: New York, p 221.
97. Smith, B. E., Durrant, M. C., Fairhurst, S. A., Gormal, C. A., Grönberg, K. L. C., Henderson, R. A., Ibrahim, S. K., Le Gall, T. and Pickett, C. J. (1999) Exploring the reactivity of the isolated iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Coord. Chem. Rev.* **185-186**, 669-687.
98. Dos Santos, P. C., Igarashi, R. Y., Lee, H.-I., Hoffman, B. M., Seefeldt, L. C. and Dean, D. R. (2005) Substrate interactions with the nitrogenase active site. *Acc. Chem. Res.* **38**, 208-214.
99. Lee, H.-I., Igarashi, R. Y., Laryukhin, M., Doan, P. E., Dos Santos, P. C., Dean, D. R., Seefeldt, L. C. and Hoffman, B. M. (2004) An organometallic intermediate during alkyne reduction by nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9563-9569.
100. Sellman, D., Fürsattel, A. and Sutter, J. (2000) The nitrogenase catalyzed N_2 dependent HD formation: a model reaction and its significance for the FeMoco function. *Coord. Chem. Rev.* **200**, 545-561.
101. Durrant, M. C. (2001) Controlled protonation of iron-molybdenum cofactor by nitrogenases: a structural and theoretical analysis. *Biochem. J.* **355**, 569-576.
102. Han, J. and Coucouvanis, D. (2005) Synthesis and structure of the Organometallic $MFe_2(\mu_3-S)_2$ clusters (M = Mo or Fe) *Dalton Trans.* 1234-1240.
103. Nava, P., Han, J., Ahlrichs, R. and Coucouvanis, D. (2004) An evaluation by density functional theory of M-M interactions in organometallic clusters with the $[Fe_3MoS_3]^{2+}$ cores. *Inorg. Chem.* **43**, 3225-3229.
104. Coucouvanis, D., Han, J., Ahlrichs, R., Nava, P. and Huniar, U. (2003) Density functional theory calculations on the nitrogenase cofactor and synthetic analogs. *J. Inorg. Biochem.* **96**, 19-19.
105. Coucouvanis, D., Han, J. and Moon, N. (2002) Synthesis and characterization of sulfur-voided cubanes. Structural analogs for the $MoFe_3S_3$ subunit in the nitrogenase cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 216-224.
106. Han, J., Beck, K., Ockwig, N. and Coucouvanis, D. (1999) Synthetic analogs for the $MoFe_3S_3$ subunit of the nitrogenase cofactor: Structural features associated with the total number of valence electrons and the possible role of M-M and multiple M-S bonding in the function of Nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10448-10449.
107. Rao, P. V. and Holm, R. H. (2004) Synthetic analogues of the active sites of iron-sulfur proteins. *Chem. Rev.* **104**, 527-559
108. Lee, S. C. and Holm, R. H. (2004) The clusters of nitrogenase: Synthetic methodology in the construction of weak-field clusters. *Chem. Rev.* **104**, 1135-1157.
109. Zhang, Y. and Holm, R. H. (2004) Structural conversions of molybdenum-iron-sulfur edge-bridged double cubanes and P-N-type clusters topologically related to the nitrogenase P-cluster. *Inorg. Chem.* **43**, 674-682.
110. Lee, S. C. and Holm, R. H. (2003) Speculative synthetic chemistry and the nitrogenase problem. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **100**, 3595-3600.
111. Although $1Mo^{4+}$, $1Fe^{3+}$, $6Fe^{3+}$ model was suggested by ENDOR spectroscopic study, Yoo, *et al's* result is recently more supported.
112. Yoo, S. J., Angove, H. C., Papaethymiou, V., Burgess, B. K. and Münck, E. (2000) Mössbauer study of the MoFe protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* using selective $Fe-57$ enrichment of the M-centers. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4926-4936.
113. Hinnemann, B. and Norskov, J. K. (2003) Modeling a central ligand in the nitrogenase FeMo cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1466-1467.
114. Lee, H.-I., Benton, P. M. C., Laryukhin, M., Igarashi, R. Y., Dean, D. R., Seefeldt, L. C. and Hoffman, B. M. (2003) The interstitial atom of the nitrogenase FeMo-cofactor: ENDOR and ESEEM show it is not an exchangeable nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5604-5605.
115. The distances are very short, considering hydrogen atoms are bonded to the amino acid residues.
116. It is reported recently that the atom inside FeMo-cofactor may not be nitrogen atom. Yang, T.-C., Maeser, N. K., Laryukhin, M., Lee, H.-I., Dean, D. R., Seefeldt, L. C. and Hoffman, B. M. (2005) The interstitial atom of the nitrogenase FeMo-cofactor: ENDOR and ESEEM evidence that it is not a nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.* ASAP ja0552489.