

УДК 577.158.81

БИОХИМИЯ

Л. А. ЛЕВЧЕНКО, А. В. РАЕВСКИЙ, А. П. САДКОВ, Г. П. ЛИХТЕНШТЕЙН
**О ЛОКАЛИЗАЦИИ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩЕГО АКТИВНОГО ЦЕНТРА
НА МАКРОМОЛЕКУЛЕ НИТРОГЕНАЗЫ**

(Представлено академиком Н. Н. Семеновым 22 I 1973)

Одним из трудных вопросов при исследовании строения ферментов является вопрос о локализации активного центра на макромолекуле. Практически не существует метода решения такого рода задач для больших белков, недоступных рентгеноструктурному анализу.

В настоящей работе предлагается метод, основанный на введении в активный центр ферментов ионов тяжелых металлов (меток) и последующем изучении образцов с помощью электронного микроскопа.

Объектом исследования служил азотфиксирующий ферментный комплекс (нитрогеназа), выделенный из *Azotobacter vinelandii* по методике (1) с некоторыми модификациями. Молекулярный вес комплекса $340\ 000 \pm \pm 60\ 000$. По данным (2-4) в активный центр нитрогеназы входит негеминное железо и молибден. Методами ингибиторов и спиновых меток (4-7) показано, что железо связано с белковой глобулой через цистеиновые остатки и находится на близких расстояниях (не более 7-8 Å), причем расположения атомы железа не индивидуально, а группами (кластерами). Однако локализация этих кластеров на макромолекуле нитрогеназы не известна.

Тот факт, что негеминное железо, входящее в состав нитрогеназы, связано с белковой глобулой через цистеиновые остатки, дает возможность использовать для решения вопроса о локализации железа метод электронной микроскопии, поскольку специфический реагент на цистеиновые группы — *n*-хлормеркурибензоат (ПХМБ) содержит тяжелый атом ртути. Определить по расположению ртути, замещающей железо, локализацию цистеиновых групп на макромолекуле нитрогеназы, можно тем самым выявить и первоначальную локализацию негеминного железа.

Содержание железа в препаратах определяли по методу (8) с ортофенантролином, количество цистеиновых групп — по методу Бойера (9) с поправкой на лабильную серу.

Для исследования макромолекулярной структуры комплекса использовали метод негативного контрастирования (10), техника приготовления образцов описана нами ранее (1, 4).

Работа выполнена на электронном микроскопе «Hitachi» НИ-125, ускоряющее напряжение 100 кв, рабочее увеличение 100 000X.

В табл. 1 представлены данные по определению количества железа и цистеиновой серы в исследуемых препаратах нитрогеназы. Опыты были проведены в атмосфере аргона. Время реакции с ПХМБ 30 мин., с ортофенантролином 10 мин.

Из табл. 1 видно, что с повышением концентрации ПХМБ от 3 молярных эквивалентов до 100 число прореагировавших цистеиновых групп увеличивалось и достигало 32-35. При этом адекватно увеличивалось количество вытесненного в раствор железа. Дальнейшее повышение концентрации ПХМБ до 500 эквивалентов не вызывало существенных изменений.

Полученные данные хорошо согласуются с литературными (4-7) и подтверждают вывод о том, что в нитрогеназе железо связано с белковой гло-

булой через цистеиновые группы. В результате взаимодействия ПХМБ с цистеиновой серой железо вытесняется из белковой глобулы и переходит в раствор, уступая место ионам ртути. Столь высокая концентрация прореагировавшего ПХМБ (100 экв.) при наличии в молекуле нитрогеназы всего лишь 32—35 цистеиновых групп объясняется содержанием примерно такого же количества лабильной серы, которая взаимодействует с ПХМБ. Чтобы освободиться от продуктов этой реакции, исследуемые препараты пропускали через сефадекс Г-50.

Таблица 1

Определение цистеиновой серы и железа в исследуемых препаратах нитрогеназы

ПХМБ										
N ₂ -аза *	3	5	10	25	50	75	10	150	210	500
Число прореагировавших цистеиновых групп	3	7	9	10	16	26	32—35	32—35	32—35	32—35
Количество вытесненного в раствор Fe (Fe _{общ} — Fe _{фон} **), ат/молек.	3	6	8	10	19	23	29	29	29	29

* N₂-аза — нитрогеназа; концентрация фермента 10⁻⁵ мол/л.

** Fe — фоновое количество Fe, определяемое в отсутствие ПХМБ, составляло 3 ат. на 1 молекулу.

Для выявления локализации железа методом электронной микроскопии были исследованы препараты, обработанные 100 и 200 эквивалентами ПХМБ. Поскольку полученные результаты практически ничем не отличались, мы приводим здесь электронные микрофотографии лишь одного из этих вариантов.

На рис. 1* представлены исходные препараты нитрогеназы, обработанные 2% фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК) в отношении 1:1. На микрофотографиях можно наблюдать приближенно округлые и прямоугольные молекулы. Округлые молекулы имеют легкую огранку (6—8 углов), их диаметр 10 ± 5 Å. Размеры прямоугольных молекул составляют $100 \times 95 \pm 5$ Å. Элементарной ячейкой молекул является тетрада размером $40 \times 40 \pm 2$ Å, состоящая из 4 шаровидных субъединиц, каждая из которых имеет диаметр 20 ± 2 Å. Количество тетрад в молекулах четное и составляет в прямоугольных формах всегда 8, среди округлых встречаются неполные комплексы, состоящие из 6 тетрад.

При взаимодействии нитрогеназы с ПХМБ (рис. 2) происходит частичное разупорядочение комплекса. Четкая упаковка субъединиц нарушается, молекулы утрачивают свою объемность и распластаются на подложке. Их диаметр становится равным ~ 120 — 130 Å. Однако размеры субъединиц при этом существенно не изменяются, а увеличение диаметра молекул происходит за счет нарушения контактов между субъединицами и расхождения их на некоторое расстояние.

Этот результат свидетельствует о том, что в молекулах нитрогеназы железо располагается, по-видимому, где-то близко к поверхности субъединиц, и скорее всего на границе между ними. В процессе реакции с ПХМБ, когда железо вытесняется из белковой глобулы и одновременно происходит удаление сульфидной серы, контакты между субъединицами разрушаются и молекула разрыхляется.

Учитывая большую электронную плотность атомов ртути, мы исследовали под электронным микроскопом препараты нитрогеназы, обработанные ПХМБ, но не контрастированные ФВК. При этом были получены четкие электронные микрофотографии (рис. 3), на которых можно наблюдать регулярное группирование гранул ртути в кластеры, имеющие вид четырехугольников. Размер гранул 6 ± 1 Å. Расстояние между ними 8 ± 2 Å.

* Рис. 1—3 см. вклейку к стр. 215.

Исходя из размеров гранул можно предположить, что каждый угол кластера образован минимум 4 атомами ртути. В пользу сделанного предположения свидетельствует тонкая структура гранул.

На основании полученных данных можно представить картину распределения 32 атомов железа на макромолекуле нитрогеназы следующим образом. 1) Железо локализовано в двух элементарных ячейках комплекса и охватывает соответственно 8 субъединиц. В каждой субъединице содержится 4 атома железа, расположенных в одном участке полипептидной цепи, а именно в месте контакта субъединиц. Поскольку в 1 элементарной ячейке 4 субъединицы, ртутный кластер, образующийся в процессе заме-

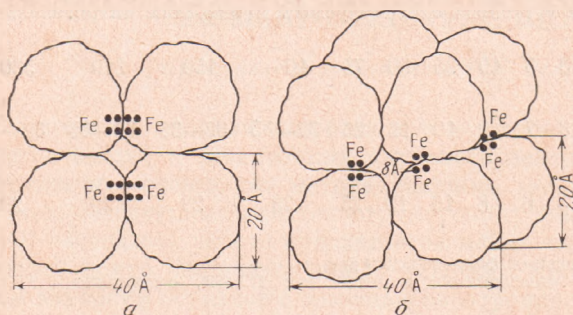


Рис. 4. Предполагаемая модель расположения атомов железа в макромолекуле нитрогеназы. а — локализация Fe в двух элементарных ячейках молекулы, вид сверху одной элементарной ячейки; б — локализация Fe в четырех элементарных ячейках, вид сбоку одной пары элементарных ячеек

щения железа меркуриалом, имеет вид четырехугольника (рис. 4а). 2) Железо локализовано в четырех элементарных ячейках и охватывает соответственно 16 субъединиц. В каждой субъединице содержится 2 атома Fe, которые также расположены в одном участке полипептидной цепи, где осуществляется контакт между субъединицами двух элементарных ячеек (рис. 4б). Образующийся кластер имеет вид четырехугольника.

Предложенный метод избирательного введения группы тяжелых атомов в активный центр фермента, по-видимому, может быть распространен и на другие классы ферментов, в том числе входящих в сложные биологические структуры.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
30 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. И. Гвоздев, А. П. Садков и др., Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 246 (1971).
- ² W. A. Bulen, J. R. Le Comte, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 979 (1966).
- ³ W. A. Bulen, J. R. Le Comte et al., in: Non heme Iron Proteins, Role Energy Conversion, Ohio, 1965, p. 261. ⁴ Л. А. Сырцова, Л. А. Левченко и др., Молекулярная биология, 5, 726 (1971). ⁵ Л. А. Сырцова, Г. И. Лихтенштейн и др., Молекулярная биология, 3, 651 (1969). ⁶ И. Н. Ивлева, Г. И. Лихтенштейн, А. П. Садков, Биофизика, 14, № 5, 779 (1969). ⁷ Е. Н. Фролов, Г. И. Лихтенштейн, Л. А. Сырцова, ДАН, 196, № 5, 1149 (1971). ⁸ Е. Сендел, В кн. Колориметрические методы определения следов металлов, М., 1964. ⁹ P. D. Boyer, J. Am. Chem. Soc., 76, 4331 (1954). ¹⁰ S. Brenner, R. W. Horne, Biochim. et biophys. acta, 34, 103 (1959).