

С. С. МЕЛИК-САРКИСЯН, М. В. РАЙХИНШТЕЙН, А. И. АРЧАКОВ,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТОВ И ИНГИБИТОРОВ МИКРОСОМАЛЬНОГО ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ НА АЗОТФИКСИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОИДОВ ЛЮПИНА

Цитохром P-450_{Rh} найден в азотфиксирующих бактериоидах клубеньков сои⁽¹⁾ и люпина⁽²⁾, но отсутствует в неэффективных бактериоидах, не способных осуществлять восстановление молекулярного азота⁽³⁾. В клетках аэробно выращенной культуры *Rhizobium* найдены лишь следы этого цитохрома⁽⁴⁾. Ранее нами было показано, что содержание цитохрома P-450_{Rh} в бактериоидах люпина в процессе вегетации растений подвержено значительным изменениям⁽⁵⁾. Количество цитохрома P-450_{Rh} нарастало в ходе развития клубенька и было наибольшим в период активной азотфиксации, а затем уменьшалось.

Эти данные приводят к тому, что функция цитохрома P-450_{Rh} в бактериоидах тесно связана с процессом азотфиксации. Такое предположение было высказано в свое время Эпплби⁽¹⁾ на основании данных об участии цитохрома P-450 в восстановлении азотсоединений микросомами печени⁽⁶⁾. Однако это предположение не было пока экспериментально подтверждено, и роль, которую играет цитохром P-450_{Rh} в обмене веществ бактериоидов, остается неясной.

Т а б л и ц а 1

Влияние веществ, образующих комплексы с цитохромом P-450_{Rh}, на азотфиксацию и дыхание бактериоидов из клубеньков люпина

Вещество	Концентрация, мМ	Ингибирование, %		
		образования этилена	поглощение кислорода	
			эффективными бактериоидами	неэффективными бактериоидами
Диметиланилин	6,00	50	22	0
Гексобарбитал	1,88	50	20	0
D(+)-камфора	2,55	50	34	0
SKF-525A	0,35	50	66	22
Анилин	10,10	50	24	0
Метирапон	3,45	50	26	0

Согласно полученным нами данным, цитохром P-450_{Rh} образует спектрально регистрируемые комплексы с субстратами и ингибиторами микросомального гидроксилирования⁽⁷⁾. В настоящей работе изучалось влияние этих веществ на скорость фиксации азота и интенсивность дыхания бактериоидов люпина.

Бактериоиды выделяли описанным ранее способом⁽⁷⁾. Активность азотфиксации определяли по ацетиленовому методу⁽⁸⁾. В сосуд объемом 7 мл, герметизированный резиновой пробкой, помещали 1 мл суспензии бактериоидов (50 мг белка) в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,0, содержа-

щем 12 мМ сукцинат натрия и 1 мМ Mg^{2+} . Газовая среда состояла из 78% аргона, 12% кислорода и 10% ацетилена. Инкубацию проводили 60 мин. при 28°. В указанных условиях бактериоиды за 1 час катализировали образование 160 нмол. этилена, что составляло $3,2 \text{ нмол} \cdot \text{час}^{-1}$ на 1 мг^{-1} белка.

Поглощение кислорода регистрировали на полярографе LP-7 (ЧССР) с закрытым платиновым электродом (°). В 2,5-миллиметровую ячейку помещали 20 мг бактериоидов в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 12 мМ сукцинат натрия. Температура опыта 28°.

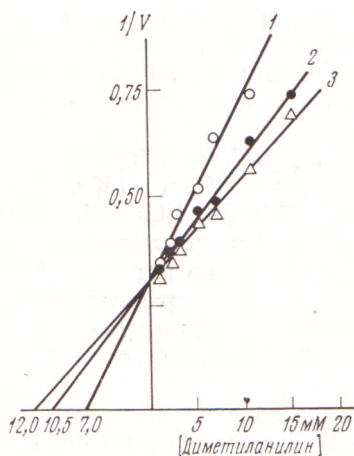


Рис. 1

Рис. 1. Ингибирование азотфиксирующей активности бактериоидов диметиланилином. 1 — диметиланилин, 2 — диметиланилин в присутствии 2 мМ гексобарбитала, 3 — диметиланилин в присутствии 6 мМ анилина. V — скорость образования этилена, $\text{нмол} \cdot \text{час}^{-1}$ на 1 мг^{-1} белка

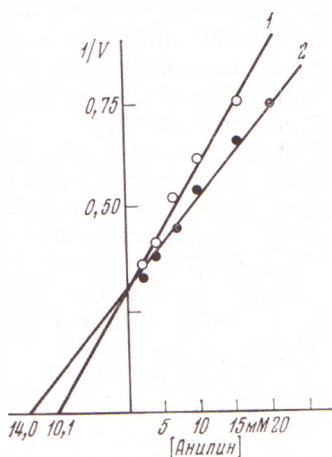


Рис. 2

Рис. 2. Ингибирование азотфиксирующей активности бактериоидов анилином. 1 — анилин, 2 — анилин в присутствии 2 мМ гексобарбитала

Неэффективные бактериоиды выделяли из клубеньков растений, выращенных, как описано ранее (10). Белок определяли по Лоури в модификации Мосолова и Скарлат (11).

Согласно данным табл. 1, субстраты и ингибиторы микросомального гидроксилирования, вызывающие изменения I и II типов в спектрах цитохрома P-450_{Rh} (7), подавляли азотфиксирующую активность бактериоидов люпина. При этом уменьшение скорости образования этилена на 50% происходило при концентрациях, близких к величинам K_s , полученным ранее (7). Эти данные указывают на то, что цитохром P-450_{Rh} имеет отношение к реакции восстановления ацетилена и что в данном случае механизм его действия может быть такого же типа, как и у цитохрома P-450 микросом печени. Из табл. 1 видно, что все соединения, ингибирующие образование этилена суспензией бактериоидов, ингибируют также поглощение кислорода. Видимо, определенная часть потребляемого бактериоидами кислорода приходится на долю реакций, в которых участвует цитохром P-450_{Rh}.

Поглощение кислорода суспензией неэффективных бактериоидов, не содержащих, как известно, цитохром P-450_{Rh} (3), не подавлялось связываемыми цитохромом P-450_{Rh} веществами в концентрациях, ингибирующих поглощение кислорода эффективными бактериоидами на 20–30%, а образование этилена — на 50%. Это подтверждает предположение об участии цитохрома P-450_{Rh} в процессах, связанных с азотфиксацией. Исключением являлось действие 0,35 мМ SKF-525A, который подавлял дыхание неэффективных бактериоидов на 22%, а эффективных — на 66%.

Возможно, это было результатом связывания ингибитора не только цитохромом P-450_{Rh}, но и какой-то другой оксидазой (или оксидазами), присутствующей как в эффективных, так и в неэффективных бактероидах.

Известно, что если в присутствии вещества, образующего комплекс с цитохромом P-450, определять K_s другого связываемого цитохромом P-450 вещества, то величина K_s для последнего оказывается завышенной, что является выражением конкуренции между этими соединениями. Так, амидопирин подавлял спектральные изменения, вызванные добавлением гексобарбитала к микросомам печени крыс (¹²). Если в наших опытах ингибирование азотфиксации происходило вследствие связывания именно цитохрома P-450_{Rh}, то можно было ожидать конкурентных отношений между веществами, ингибирующими процесс азотфиксации. В этом случае константа ингибирования K_i какого-либо ингибитора, определенная на фоне частичного ингибирования азотфиксации другим ингибитором, должна быть завышенной.

Как показано на рис. 1, в присутствии 2 мМ гексобарбитала, ингибирующего восстановление ацетилена примерно на 50% (табл. 1), величина K_i для диметиланилина повышалась от 7,0 до 12,0 мМ. Такого рода конкурентные отношения имели место не только в случае веществ, вызывающих спектральные изменения одного типа, но и в присутствии ингибиторов, вызывающих спектральные изменения разных типов. Так, в присутствии 6 мМ анилина K_i для диметиланилина увеличивалась до 10,5 мМ. Из рис. 2 видно, что 2 мМ гексобарбитал повышал K_i для анилина от 10,1 до 14,0 мМ.

Представленные в работе данные свидетельствуют в пользу участия цитохрома P-450_{Rh} в каких-то процессах, обеспечивающих фиксацию молекулярного азота бактероидами клубеньков люпина.

Институт биохимии им. А. И. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. А. Appleby, Biochim. et biophys. acta, v. 147, 399 (1967). ² В. Л. Крегович, С. С. Мелик-Саркисян, В. К. Марус, Биохимия, т. 37, 711 (1972). ³ В. К. Марус, С. С. Мелик-Саркисян, В. Л. Крегович, Микробиология, т. 42, 112 (1973). ⁴ С. А. Appleby, Biochim. et biophys. acta, v. 172, 88 (1969). ⁵ В. Л. Крегович, В. К. Марус, С. С. Мелик-Саркисян, Физиол. раст., т. 19, 1060 (1972). ⁶ P. Mazel, P. Hernandez, Federat. Proc., v. 26, 461 (1967). ⁷ М. В. Райхинштейн, С. С. Мелик-Саркисян и др., ДАН, т. 216, № 5 (1974). ⁸ К. Б. Асеева, З. Г. Евстигнеева и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 751 (1973). ⁹ Х. Ф. Шольц, Д. Н. Островский, Лаб. дело, т. 6, 375 (1965). ¹⁰ С. С. Мелик-Саркисян, Н. В. Каранетян, В. Л. Крегович, ДАН, т. 188, 930 (1969). ¹¹ В. В. Мосолов, И. В. Скарлат, Прикл. биохим. и микробиол., т. 1, 233 (1965). ¹² S. Orrenius, D. Kupfer, L. Ernster, FEBS Letters, v. 6, 249 (1970).