

Р. И. ГВОЗДЕВ, А. И. КОТЕЛЬНИКОВ, А. П. САДКОВ,  
Г. И. ЛИХТЕНШТЕЙН

## ИССЛЕДОВАНИЕ АТФазного ЦЕНТРА НИТРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ АФФИННОЙ СПИНОВОЙ РЕДОКС-МЕТКИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 25 XI 1974)

Сочетание аффинных подходов мечения регуляторных или активных центров ферментов с использованием люминесцирующих соединений или соединений, содержащих стабильные радикалы, открывает новые возможности исследования некоторых деталей структуры регуляторных или активных центров ферментов и механизма их действия.

В настоящей работе предлагается метод изучения взаимного расположения АТФазного и восстановительного участка фермента нитрогеназы с помощью аффинной спиновой редокс-метки.

Нитрогеназу выделяли из азотобактера (*Azotobacter vinelandii*) по методу, описанному в работе (1). Удельная активность используемого фермента составляла 400—500 нмол.  $C_2H_2$  в мин. на 1 мг белка. Ферментативную активность определяли по восстановлению  $C_2H_2$  до  $C_2H_4$  методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. В работе использовали 2,2,6,6-тетраметил-1-оксил-4-пиперидинилтрифосфорную кислоту (R-ЗР) (рис. 1), которую синтезировали по методу (2). АТФ («Реанал», Венгрия) использовали без дополнительной очистки.

Препараты свежеприготовленного очищенного Hb человека были любезно предоставлены А. П. Андреевой (Институт гематологии и переливания крови АМН СССР).

Спектры э.п.р. регистрировали на радиоспектрометре ЭПР-2М конструкции ИХФ. Концентрацию белка нитрогеназы определяли биуретовым методом, а концентрацию Hb — спектрофотометрически по интенсивности поглощения  $\alpha$ -полосы Hb.

Hb имеет один регуляторный центр, с которым связывается 2,2-дифосфоглицерат (4) и целый ряд органических полифосфатов (5, 6). Эти соединения резко меняют сродство Hb к  $O_2$ . Регуляторный центр расположен в щели между  $\beta$ -полипептидными цепями и сформирован несколькими аминокислотными остатками (2 концевых валина, гистидин и лизин) (7). Эти аминокислоты образуют локальные положительные заряды, с которыми специфически взаимодействуют органические полифосфаты.

При добавлении R-ЗР к раствору Hb спектр э.п.р. R-ЗР трансформируется в спектр, характерный для заторможенного радикала (рис. 1 а, б), что указывает на присоединение R-ЗР к молекуле Hb. Этот результат хорошо согласуется с данными Мак-Конелла (8). Добавление к таким препаратам Hb NaCl (0,3 M) (рис. 1в) или АТФ ( $10^{-12}$  M) (рис. 1г) приводит к появлению сигнала э.п.р., аналогичного сигналу э.п.р. R-ЗР в свободном состоянии в растворе. Эксперимент легко объясняется, если предположить, что локальные положительные заряды регуляторного центра нейтрализуются при повышении ионной силы раствора и что при добавлении АТФ наблюдается конкуренция АТФ и R-ЗР за один и тот же центр. Полученные данные свидетельствуют об аффинном связывании R-ЗР в регуляторном центре Hb.

Структура молекулы R-ЗР сходна со структурой молекулы АТФ (рис. 2). Поэтому можно ожидать, что R-ЗР будет также аффинно взаимо-

действовать с АТФазными центрами ряда АТФаз, в том числе с АТФазными центрами ферментов, у которых эти центры сопряжены с переносом электрона. Основанием для такого предположения являются экспериментальные данные, полученные при исследовании механизма связывания

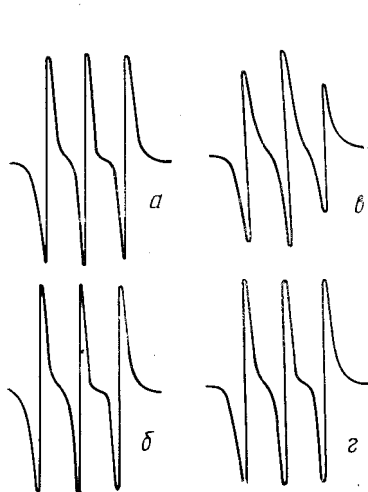


Рис. 1

Рис. 1. Спектры э.п.р. спин-метки R-3P. а — в 0,02 M трис-НСI-буфере, рН 7,0 ( $10^{-3}$  M R-3P); б — в 0,02 M трис-НСI-буфере, рН 7,0, в присутствии  $10^{-3}$  M Нв ( $10^{-3}$  M R-3P); в — то же, что и б, но в присутствии 0,3 M NaCl ( $10^{-3}$  M R-3P); г — то же, что и б, но в присутствии  $10^{-2}$  M АТФ ( $10^{-3}$  M R-3P)

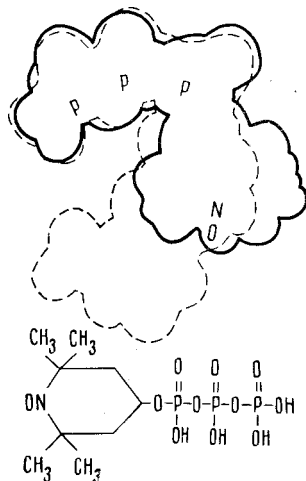


Рис. 2

Рис. 2. Структура спин-метки R-3P. В верхней части представлены проекции молекул R-3P и АТФ по Стюарду и Бригглюбу: сплошной линией изображена проекция структуры R-3P, а пунктирной — структура АТФ, построенная на основании рентгеноструктурных данных (<sup>12</sup>) и данных я.м.р. спектроскопии (<sup>12</sup>, <sup>14</sup>)

АТФ с АТФазным центром нитрогеназы с помощью набора различных аналогов АТФ (<sup>9</sup>), которые свидетельствуют о том, что связывание АТФ в АТФазном центре фермента преимущественно обусловлено трифосфатным участком АТФ. Таким образом, если АТФазный центр, сопряженный с

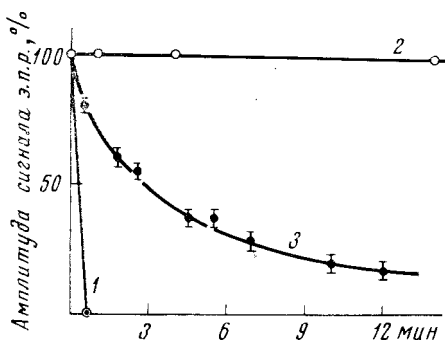


Рис. 3. Зависимость амплитуды сигнала э.п.р. спиновых меток от времени инкубации. 1 — R-3P ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) в присутствии нитрогеназы (15 мг белка в 0,02 M трис-НСI-буфере, рН 7,0); 2 — то же, что и 1, но вместо R-3P использовали 2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидинил-1-оксил, синтезированный по методу (<sup>3</sup>); 3 — то же, что и 1, но в присутствии  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M АТФ

переносом электрона, непосредственно контактирует с центром, через который происходит передача электрона, то должно наблюдаться восстановление иминоксильного фрагмента аналога АТФ R-3P. При добавлении АТФ, как и в случае с Нв, должна наблюдаться конкуренция за АТФазный центр, в результате которой скорость восстановления R-3P должна резко снизиться. Такой результат должен свидетельствовать о специфическом восстановлении R-3P в АТФазном центре фермента.

Проведенный эксперимент подтвердил исходные предпосылки. При добавлении  $\dot{R}$ -ЗР к нитрогеназе наблюдали быстрое восстановление радикала (рис. 3, 1). 2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидинил-1-оксил в аналогичных условиях практически не восстанавливался (рис. 3, 2). Добавление к нитрогеназе  $\dot{R}$ -ЗР в смеси с АТФ в соотношении 1 : 2 приводило к резкому снижению скорости восстановления  $\dot{R}$ -ЗР (рис. 3, 3).

Таким образом,  $\dot{R}$ -ЗР является истинной аффинной спиновой редокс-меткой, специфически связывающейся в АТФазном центре нитрогеназы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что АТФ в АТФазном центре нитрогеназы может непосредственно контактировать с восстановительным центром.

В состав нитрогеназы входит до 30 атомов негемового железа, которые образуют несколько кластеров, принимающих участие в переносе электрона от восстановителя на субстрат (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>). Наиболее вероятно, что один из этих кластеров и контактирует с АТФ.

Отделение Института химической физики  
Академии наук СССР  
Черноголовка Московской обл.

Поступило  
25 XI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Р. И. Гвоздев, А. П. Садков и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 488 (1973).  
<sup>2</sup> R. T. Ogata, H. M. McConnell, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 69, 335 (1972). <sup>3</sup> M. B. Neiman, E. Rosantsev, J. G. Mamedova, Nature, v. 196, 472 (1962). <sup>4</sup> R. Benesch, R. E. Benesch, Nature, v. 221, 618 (1969). <sup>5</sup> R. T. Ogata, H. M. McConnell, Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., v. 36, 325 (1971). <sup>6</sup> G. R. Janis, K. Ruckpaul, F. Jang, Febs Letters, v. 17, 173 (1971). <sup>7</sup> A. Arnone, Nature, v. 237, 146 (1972). <sup>8</sup> R. T. Ogata, H. M. McConnell, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 222, 56 (1973). <sup>9</sup> А. П. Садков, Канд. дисс., ИХФ АН СССР, 1974. <sup>10</sup> R. W. F. Hardy, R. Burns, Ann. Rev. Biochem., v. 37, 331 (1968). <sup>11</sup> А. Е. Шулов, Г. И. Лухренштейн, Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 518 (1971). <sup>12</sup> O. Kennard, N. N. Isaacs et al., Nature, v. 225, 523 (1970). <sup>13</sup> T. A. Glassman, C. Cooper, L. W. Swift, Biochem., v. 10, 843 (1971). <sup>14</sup> L. Rimai, E. T. Hayde, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 38, 231 (1971).