

Л. А. СЫРЦОВА, И. И. НАЗАРОВА, Т. Н. ПИСАРСКАЯ,
В. Б. НАЗАРОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ АТФазного УЧАСТКА АКТИВНОГО ЦЕНТРА НИТРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ Я.М.Р.

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 10 IV 1972)

Нитрогеназа — фермент, восстанавливающий молекулярный азот до аммиака в присутствии аденозин-5'-трифосфорной кислоты (АТФ) и Mg^{2+} под действием природных доноров электрона или дитионита натрия (¹, ²). Mg^{2+} можно заменить другими двухвалентными катионами, причем наиболее эффективно — Mn^{2+} (³). Роль двухвалентного катиона в нитрогеназе и механизм действия АТФ не установлены. Попытки доказать связывание АТФ не имели успеха. Так, Бьюи и Мортенсон (⁴) установили, что Mg -АТФ- C^{14} или Mg -АДФ- C^{14} связываются с одним из компонентов нитрогеназы — азоферредоксином, однако эти данные противоречили результатам Биггинса и Келли (⁵). Действительно, константа связывания, вычисленная по данным (⁴), не согласуется с константой Михаэлиса по АТФ для нитрогеназы, равной $3 \cdot 10^{-4} M$ (³).

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия Mn^{2+} и АТФ с нитрогеназой методом я.м.р.

Выделение нитрогеназы из *Azotobacter vinelandii* проводили по описанной ранее методике (⁶) с введением дополнительных операций для получения гомогенного нитрогеназного комплекса: после фракционирования протаминсульфатом хроматографировали на Сефадексе Г-150 (4×20 см), концентрировали протаминсульфатом и пропускали через Сефадексе Г-75 (3×22 см), уравновешенный в трис-буфере 0,025 *M*, рН 7,2. При этом по сравнению с предыдущей стадией ферментативная активность, равная 45—50 нмол. N_2 за 1 мин. на 1 мг белка, не повышалась; активность в исходном экстракте составляла 1—2 нмол/мин·мг. Все стадии очистки, кроме получения экстракта, проводили в строго анаэробных условиях и, в отличие от (⁶), без прибавления Mg^{2+} и дитиотрептола. Гомогенность нитрогеназного комплекса контролировали по ультрацентрифугированию. Измерение времени спин-решеточной релаксации протонов воды (T_1) осуществляли при температуре $22 \pm 0,5^\circ$ на импульсном я.м.р. спектрометре конструкции нашего института на частоте 21 Мгц. T_1 определяли нулевым методом Карра — Парселла (⁷) в ампулах, снабженных приспособлением, позволяющим вакуумирование и заполнение аргоном. Ошибка $\pm 5\%$.

Измерения с АТФ и нитрогеназой проводили в присутствии АТФ-генерирующей системы — креатинфосфата (10 μ мол/мл) и креатинкиназы (0,05 мг/мл). Такая концентрация АТФ-генерирующей системы без нитрогеназы не влияла на T_1 в присутствии исследуемых концентраций Mn^{2+} и АТФ, но поддерживала концентрацию АТФ постоянной. Нами было измерено время протонной релаксации (T_1) в растворах нитрогеназы в зависимости от концентрации Mn^{2+} или Mn^{2+} и АТФ. Величина $1/T_1$ в водных растворах марганца в присутствии нитрогеназы повышается (см. рис. 1). Очевидно, образуется бинарный комплекс нитрогеназа — марганец ($E - Mn^{2+}$): ионы Mn^{2+} связываются с нитрогеназой на доступном воде участке. Этот вывод основан на следующих наблюдениях: скорость релаксации протонов воды $1/T_1$ увеличивается в присутствии парамагнитных

ионов (⁵): при связывании парамагнитного иона с макромолекулой его способность повышать скорость релаксации протонов воды возрастает, если металл-ион остается доступен воде, вследствие усиления магнитного взаимодействия между электронным спином парамагнитного иона и ядерным спином протонов гидратной оболочки парамагнитного иона, быстро обменивающихся с протонами всего раствора (^{9, 10}).

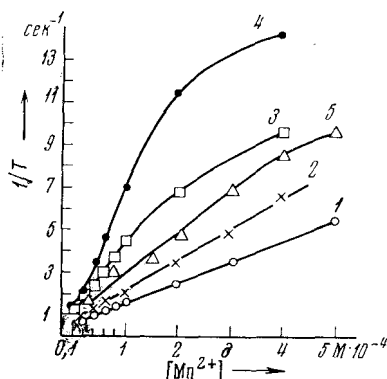


Рис. 1. Зависимость $1/T_1$ от концентрации Mn^{2+} без иных добавок (1), а также в присутствии АТФ (2) ($[АТФ] / [Mn^{2+}] = 1$), нитрогеназы (3) (С белка 3,6 мг/мл), нитрогеназы и АДФ (4) (С белка 3,6 мг/мл, $[Mn^{2+}] / [АДФ] = 1$) или нитрогеназы и АТФ (5) (С белка 3,6 мг/мл) $[АТФ] / [Mn^{2+}] = 1$, креатинфосфат 10 μ мол/мл, креатинкиназа 0,05 мг/мл. Растворитель — трис-буфер 0,20 М, рН 7,2. Время инкубации перед измерением T_1 5–7 мин.

В присутствии Mn^{2+} и АТФ величина $1/T_1$ падает по сравнению с $1/T_1$ для $E - Mn^{2+}$ (см. рис. 1). Очевидно, АТФ связывается с нитрогеназой, образуя тройной комплекс $E - Mn^{2+} - АТФ$, и Mn^{2+} становится менее доступен протонам воды, чем в бинарном комплексе $E - Mn^{2+}$. Активность фермента возрастает линейно в пределах исследуемых нами концентраций Mn^{2+} (³). Это свидетельствует о том, что наблюдаемое взаимодействие Mn^{2+} и АТФ с нитрогеназой происходит на активных центрах фермента.

В присутствии аденозин-5'-дифосфорной кислоты (АДФ) — конкурентного ингибитора фиксации азота (¹¹) и Mn^{2+} $1/T_1$ повышается (рис. 1) по сравнению с величиной $1/T_1$ для $E - Mn^{2+}$ и $E - Mn^{2+} - АТФ$. Значит, образуется тройной комплекс $E - Mn^{2+} - АДФ$, в котором Mn^{2+} более доступен протонам воды, чем в $E - Mn^{2+} - АТФ$, по той причине, видимо, что в этом комплексе у нитрогеназы иная конформация. Такая же зависимость $1/T_1$ от $[Mn^{2+}]$ получается через 30 мин. после прибавления субстратных количеств АТФ без АТФ-генерирующей системы, так как нитрогеназа может осуществлять гидролиз АТФ и без восстановителя, но с меньшей скоростью при рН 7,2 (^{1, 2}). Повышение концентрации нитрогеназы в отсутствие Mn^{2+} лишь незначительно сказывается на T_1 . Видимо, этот эффект обусловлен лишь белковой частью фермента (¹²), и в нативной нитрогеназе парамагнитные катионы железа недоступны протонам воды. Прибавление $Na_2S_2O_4$ не изменяет $1/T_1$ в $E - Mn^{2+} - АТФ$. Таким образом, восстановление нитрогеназы не является необходимым условием для ее реакции с АТФ. Это согласуется с данными Бьюи и Мортенсона (¹³), которые показали, что скорость гидролиза АТФ нитрогеназой при низких рН высокая и на нее не влияет дитионит натрия, и высказали предположение, что реакция нитрогеназы с АТФ должна предшествовать ее реакции с донором электронов.

Известно, что АТФазную активность нитрогеназы отключает реагент на SH-группы — *n*-хлормеркурибензоат (*n*-ХМБ) (¹⁴). Однако *n*-ХМБ не влияет на взаимодействие Mn^{2+} с нитрогеназой (табл. 1). Очевидно, Mn^{2+} в $E - Mn^{2+}$ связывается не с SH-группами нитрогеназы. В присутствии АТФ и *n*-ХМБ $1/T_1$ падает до величины, близкой к $1/T_1$ для $Mn^{2+} - АТФ$. Значит, SH-группы принимают участие в образовании тройного комплекса $E - Mn^{2+} - АТФ$. Так же действует *n*-ХМБ на тройной комплекс $E - Mn^{2+} - АДФ$.

На основании изложенных данных можно представить строение тройного комплекса нитрогеназы — металл — АТФ следующим образом: Mn^{2+} и другие металл-катионы, которые заменяют Mg^{2+} в нитрогеназе ⁽³⁾, как следует из работ ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, связываются с двумя концевыми фосфатами (кроме того, через гидратную воду может быть связь с N-7 пурина ⁽¹⁷⁾). На пуриновой части АТФ есть участки, которые могут соединяться (на-

Т а б л и ц а 1

Влияние *n*-ХМБ на взаимодействие Mn^{2+} и АТФ с нитрогеназой

№ оп.	$[Mn^{2+}]$, М·10 ⁻⁴	АТФ- генерир. система	$[АТФ]$, М·10 ⁻⁴	$[n\text{-ХМБ}]$, М·10 ⁻⁴	$1/T_1$, сек ⁻¹	№ оп.	$[Mn^{2+}]$, М·10 ⁻⁴	АТФ- генерир. система	$[АТФ]$, М·10 ⁻⁴	$[n\text{-ХМБ}]$, М·10 ⁻⁴	$1/T_1$, сек ⁻¹
1	0,8	—	—	—	3,94	5	2,0	+	4	—	5,50
2	0,8	—	—	—	3,94	6	2,0	+	4	—	5,50
3	0,8	—	—	0,8	3,94	7	2,0	+	4	0,6	4,20
4	0,8	—	—	0,8	3,94	8	2,0	+	4	1,2	4,20

П р и м е ч а н и е. С белка 4 мг/мл. $T_1 = 0,575$ сек. Растворитель — трис-буфер, 0,20 М, рН 7,2, $T_1 = 0,515$ сек. Газовая фаза — аргон. Время инкубации перед измерением T_1 5 мин. В опытах №№ 7 и 8 нитрогеназу предварительно обрабатывали *n*-ХМБ в течение 30 мин.

пример, водородной связью) с нитрогеназой. Металл-катион, видимо, ориентирует АТФ на определенный участок нитрогеназы. АТФ, соединяясь в тройном комплексе с нитрогеназой, может индуцировать конформационные изменения в белке, формируя активный центр, или же, обладая электроноакцепторными свойствами, менять редокс-потенциал восстанавливающих центров в нитрогеназе. В этом может состоять разгадка так называемого активированного электрона в нитрогеназе.

Авторы выражают благодарность Г. И. Лихтенштейну и В. Ф. Быстрову за критические замечания при обсуждении результатов работы и В. А. Громогласовой — за техническую помощь в работе.

Филиал Института химической физики
Академии наук СССР
Черноголовка Московской обл.

Поступило
3 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. W. F. Hardy, R. C. Burns, G. W. Parshall, Bioinorg. Sympos., U.S.A., 1970.
- ² А. Е. Шилов, Г. И. Лихтенштейн, Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 518 (1971).
- ³ R. C. Burns, Biochem. et biophys. acta, 171, № 2, 253 (1969).
- ⁴ P. T. Bui, L. E. Mortenson, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 61, 1021 (1968).
- ⁵ D. R. Biggins, M. Kelly, Biochem. et biophys. acta, 205, 288 (1970).
- ⁶ Л. А. Сырцова, Л. А. Левченко и др., Молек. биол., 5, в. 5, 726 (1971).
- ⁷ Н. У. Сатт, Е. М. Parcell, Phys. Rev., 94, 640 (1954).
- ⁸ А. Керригтон, Э. Мак-Лечлан, Магнитный резонанс и его применение в химии, М., 1970, стр. 295.
- ⁹ В. Ф. Быстров, В. Г. Сахаровский, Ж. В. Хим. О. им. А., 16, № 4, 380 (1971).
- ¹⁰ M. Cohn, J. Reuben, Accounts Chem. Res., 4, № 6, 214 (1971).
- ¹¹ R. A. Parejko, P. W. Wilson, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 68, № 9, 2016 (1971).
- ¹² Л. А. Абецедарская, Ф. Г. Мифтахутдинова и др., Молек. биол., 1, в. 4, 451 (1967).
- ¹³ P. T. Bui, L. E. Mortenson, Biochemistry, 8, № 6, 2461 (1969).
- ¹⁴ R. W. F. Hardy, E. Knight, Biochem. et biophys. acta, 122, № 3, 520 (1966).
- ¹⁵ L. Rimai, M. E. Heyde, Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, № 2, 313 (1970).
- ¹⁶ J. A. Harper, M. Morales, J. Am. Chem. Soc., 88, № 9, 2077 (1966).
- ¹⁷ T. A. Glassman, C. Cooper et al., Biochemistry, 10, № 5, 843 (1971).