

Ч. МАК КЕННА *, Н. П. ЛЬВОВ, В. Л. ГАНЕЛИН, Н. С. СЕРГЕЕВ,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

О СУЩЕСТВОВАНИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ФАКТОРА, ОБЩЕГО ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ МОЛИБДЕНСОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ

Показана (¹) возможность самосборки нитратредуктазы при добавлении к экстракту из дефектного по нитратредуктазе мутанта *Neurospora crassa nit-1* экстракта из неиндуцированного дикого штамма этого гриба. Указанный мутант *nit-1* сохранял, после индукции нитратом, начальный участок характерной для нитратредуктазы цепи переноса электронов (цитохром-с-редуктаза), однако у него отсутствовала полная цепь переноса электронов от НАДФ-Н₂ к NO₃⁻. Образование *in vitro* нитратредуктазы авторы назвали комплементацией. В дальнейшем оказалось, что в комплементации с экстрактом мутанта *nit-1*, сопряженной с образованием *in vitro* нитратредуктазы, способны, после кислотной обработки, молибденсодержащие ферменты животного (ксантин-, альдегид- и сульфитоксидазы), бактериального (нитрогеназа) и растительного (нитратредуктаза) происхождения (², ³). Эти данные позволили Нейсону предполагать наличие общего для всех молибденсодержащих ферментов фактора, который, по-видимому, является низкомолекулярным соединением, возможно молибденсодержащим пептидом (²). Ранее было показано также, что при определенных условиях (электрофорез, щелочные значения рН, высокая ионная сила) молибден отрывается от нитрогеназы в виде низкомолекулярного соединения, в ряде случаев в виде молибденсодержащего пептида (⁴⁻⁶).

В настоящей работе мы подтвердили, что фактор, общий, по крайней мере, для двух молибдоферментов (ксантиноксидаза и нитрогеназа азотобактера), существует, и изучили некоторые свойства этого фактора. Активность нитратредуктазы определялась по образованию нитрита колориметрическим методом с использованием N-(1-нафтил)-этилендиамина (НЭДА) и сульфаниловой кислоты (⁷). Метод определения нитрита с использованием (вместо НЭДА) α -нафтиламина оказался в 3 раза менее чувствительным, и, кроме того, интенсивность окраски при этом нарастала в течение нескольких часов, вместо 10 мин., необходимых для развития окраски с НЭДА. НАДФ-Н₂ в концентрации, применяемой при комплементации ($2 \cdot 10^{-4}$ M), резко уменьшает интенсивность образования окраски НЭДА с нитритом. Как видно из рис. 1, именно те концентрации НАДФ-Н₂, которые нужны для максимальной активности образующейся *in vitro* нитратредуктазы и цитохром-с-редуктазы (из *nit-1*), резко снижают интенсивность окраски НЭДА с нитритом. Использование ацетата бария для устранения избытка НАДФ-Н₂ (⁷) оказалось мало пригодным для наших исследований, поэтому мы изучили ряд других способов устранения избытка НАДФ-Н₂ и остановились на следующем: прогревание реакционной смеси в течение 15 мин. при 100°. Прогревание, предшествующее добавлению реагентов на нитриты, почти полностью устраняло мешающий эффект НАДФ-Н₂. Интенсивность окраски измеряли при 548 мкм на спектрофотометре «Hitachi». Активность нитратредуктазы

* Гарвардский университет, США.

выражали в нмолях NO_2^- , образованного за 1 мин. на 1 мг белка экстракта nit-1. Активность цитохром-с-редуктазы в экстрактах из nit-1 определяли как описано ранее (8). Экстракты из индуцированного нитратом мутанта nit-1, использованные в наших опытах, имели активность цитохром-с-редуктазы около 150 единиц на 1 мг белка. В нашей работе мы использовали экстракты из nit-1, полученные от проф. П. Кетчума (Оклендский университет, США), а также экстракты, полученные нами путем разрушения мицелия мутанта nit-1 на прессе (9) и последующего центрифугирования гомогената при 15000 g в течение 20 мин. Экстракт из дикого штамма *N. crassa*, полученного от проф. П. Кетчума, готовился аналогичным образом. Нитрогеназу очищали по модификации (10) до стадии ресольubilизации на целлюлозофосфате и хранили в жидком азоте.

Молибден определяли полярографическим методом (11). Разбавленные белковые растворы концентрировали в шприце с сефадексом G-15 разработанным нами методом (12).

Наши данные подтверждают существование открытого Нейсоном и сотрудниками фактора, общего для различных молибдоферментов и образующего *in vitro* при комплементации с экстрактом nit-1 нитратредуктазу. При этом фактор из ксантиноксидазы был более способен к комплементации с nit-1 (80–100% активности дикого штамма, что соответствует 4–5 нмол. NO_2 за 1 мин. на 1 мг белка), чем фактор из нитрогеназы *A. vinelandii* (около 35% активности дикого штамма или 1,5–2,0 нмоля NO_2 за 1 мин. на 1 мг белка). Мы обнаружили, что при кислотной обработке фактор выделяется из молибдофермента

мгновенно, однако затем его способность к комплементации быстро падает, составляя через час хранения при 4–5° не более 20–30% активности исходного препарата. Молибденсодержащий белок способен к комплементации только после кислотной обработки (рН 2,2–2,5). Так же, как и другие исследователи (2), мы не обнаружили выход фактора при рН 4,0 и 7,0. Мы изучили влияние различных факторов на реакцию комплементации. Было установлено, что НАДФ-Н₂ нужен не только как источник электронов для восстановления нитрата, но он также необходим для реакции комплементации. Добавление НАДФ-Н₂ до комплементации увеличивало выход активности нитратредуктазы почти в четыре раза по сравнению с добавлением НАДФ-Н₂ после комплементации. Важное значение для комплементации имеет концентрация в пробе белка nit-1 и температура, при которой происходит реакция комплементации. Наиболее значительная комплементация происходит при концентрации белка nit-1 1,2–1,5 мг на пробу и комнатной температуре (при 4° скорость комплементации в пять раз ниже). Высокая ионная сила (0,5 M NaCl) на 64% ингибирует комплементацию.

Несмотря на то что отделение фактора при кислотной обработке происходит только от молибдоферментов, образующийся фактор не является молибдатом, так как последний в концентрации от $5 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-2}$ M не заменял фактора при комплементации. Интересно, что способность фак-

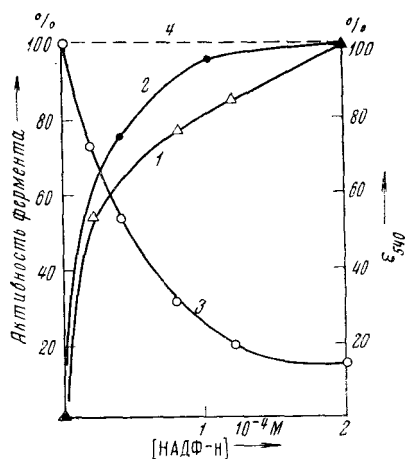


Рис. 1. Влияние концентрации НАДФ-Н₂ на образование окраски N-(1-нафтил)-этилендиамина с нитритом, на активность *in vitro* образовавшейся нитратредуктазы и цитохром-с-редуктазы из экстракта nit-1. 1 — активность цитохром-с-редуктазы (в % от максимальной); 2 — активность нитратредуктазы (в % от активности в отсутствие НАДФ-Н₂); 3 — E_{548} при внесении 22,8 нмоля нитрита, без прогрева (в % от E_{548} без НАДФ-Н₂); 4 — то же, что и 3, но после прогрева

тора к комплементации не связана с азотфиксирующей активностью нитрогеназы. Препараты нитрогеназы, инкубированные на воздухе в течение 10 мин. и не обнаруживающие активности по восстановлению ацетилену в этилен, давали после кислотной обработки высокую активность в реакции комплементации. Исходя из предположения, что фактор представляет собой низкомолекулярное соединение (¹³), мы пытались выделить его в низкомолекулярном виде из молибдоферментов (нитрогеназа и ксантиноксидаза) после кислотной обработки, используя для этого гель-фильтрацию через сефадексы G-25 и G-100. В некоторых опытах фактор частич-

Таблица 1

Ультрафильтрация молибдоферментов после кислотной обработки

Молибдофермент	pH обработки	Мембрана	Препарат	Удельная активность нитратредуктазы, шмол. NO_2^- в 1 мин. на 1 мг белка
Нитрогеназа	2,2	«Amicon» UM-10	Исходный	1,27
			Фильтрат	0,0
	2,2	«Amicon» PM-30	Исходный	0,87
			Фильтрат	0,0
	2,2	Ацетатцеллюлозная	Исходный	1,22
			Фильтрат	0,19
Ксантиноксидаза	2,2	«Amicon» UM-10	Исходный	4,35
			Фильтрат	0,0
	2,2	Ацетатцеллюлозная	Исходный	2,78
			Фильтрат	0,29
	2,2	То же	Исходный	2,22
			Фильтрат	0,26

но отделялся от белка, однако активность комплементации в этих случаях была низкой. В большинстве опытов активность фактора оказалась связанной с белком. На это же указывают и результаты опытов по ультрафильтрации кислотнообработанных молибдоферментов. Было использовано два типа мембран: мембраны фирмы «Amicon» и ацетатцеллюлозная. Ультрафильтрация проводилась в течение 10 мин. при комнатной температуре. Отфильтровывалось $\frac{2}{3}$ исходного раствора молибдофермента, подвергнутого кислотной обработке, а затем в исходном растворе и в фильтрате определяли активность комплементации и содержание молибдена (табл. 1).

Полученные данные показывают, что преобладающая часть фактора в отсутствие экстракта pit-1 связана с белком и не проходит через мембраны, однако при ультрафильтрации через ацетатцеллюлозную мембрану небольшое количество фактора (менее 10%) все же проходит через мембрану и обнаруживается в фильтрате, который содержал также около 4% молибдена от исходного количества этого металла, содержащегося в препарате, использованном для ультрафильтрации.

Таким образом, результаты нашей работы подтверждают существование фактора, общего для различных молибдоферментов. Однако в условиях наших опытов этот фактор был связан с белком, в то время как в экспериментах других исследователей он проходил через диализационную мембрану (¹³). Различие между нашими данными и указанными выше результатами возникает, по-видимому, из-за разных условий опыта и состоит в том, что раствор кислотнообработанного белка в опытах П. Кетчума находился в постоянном контакте с экстрактом pit-1 через диализационную мембрану. Возможно, что фактор связан с белком и, отделяясь от него в виде низкомолекулярного соединения, быстро теряет активность. В то же время фактор приобретает способность к комплемен-

тации лишь после контакта с экстрактом nit-1. Все сказанное убедительно свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения природы фактора, общего для различных молибденсодержащих ферментов.

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

Поступило
28 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Nason, A. D. Antoine et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 65, 137 (1970).
² P. A. Ketchum, H. Y. Cambier et al., *ibid.*, v. 66, 1016 (1970). ³ A. Nason, D. K. Lee et al., *ibid.*, v. 68, 3242 (1971). ⁴ В. Л. Ганелин, Н. П. Львов и др., ДАН, т. 185, 1169 (1969). ⁵ В. Л. Ганелин, Н. П. Львов и др., ДАН, т. 206, 1236 (1972). ⁶ В. Л. Ганелин, Н. П. Львов и др., Сборн. Механизм биологической фиксации молекулярного азота (IV Баховский коллоквиум), Черноголовка, 1973, стр. 31. ⁷ R. H. Garret, A. Nason, J. Biol. Chem., v. 244, 2870 (1969). ⁸ R. H. Garret, A. Nason, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 73, 1603 (1967). ⁹ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Прикл. биохим. и микробиол., т. 4, 592 (1968). ¹⁰ С. Е. МакКенна, Diss. University of California, San Diego, 1971. ¹¹ Б. А. Кузнецов, М. И. Якушева, Н. П. Львов, Прикл. биохим. и микробиол., т. 8, 232 (1972). ¹² Ч. Мак Кенна, М. К. Вейнова и др., Прикл. биохим. и микробиол., т. 9, 940 (1973). ¹³ P. A. Ketchum, R. S. Swarin, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 52, 1450 (1973).