

УДК 584.133.1

БИОХИМИЯ

Е. М. МАРТЫНОВА, З. Г. ЕВСТИГНЕЕВА, К. Б. АСЕЕВА,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

РЕГУЛЯЦИЯ НИТРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРОИДОВ ЛЮПИНА

Регуляция активности нитрогеназы симбиотрофных микроорганизмов изучена совершенно недостаточно. В то же время имеются данные, что нитрогеназа свободноживущего азотфиксатора — азотобактера ингибируется аммиаком или продуктами его превращения и является аллостерическим ферментом (^{1, 2}). Ранее нами было показано, что активность нитрогеназы из бактериоидов *Rhizobium lupini* ингибируется глютаминовой кислотой, аспарагиновой кислотой и их амидами, но каждый эффектор, взятый отдельно, ингибирует нитрогеназу в незначительной степени (³).

Таблица 1

Влияния глютаминовой кислоты, глютамина, аспарагиновой кислоты, аспарагина NH_4^+ на активность нитрогеназы (остаточная активность, % от исходной без эффектора)

Эффектор	Глютаминовая кислота				Глютамин				NH_4^+				Эффектор	Аспарагиновая кислота				Аспарагин				NH_4^+			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Глютаминовая кислота	78	—	—	—	55	57	51	—	49	47	38	—	Аспарагиновая кислота	65	—	—	—	53	44	32	—	53	23	14	—
Глютамин	—	55	57	51	73	—	—	—	34	44	32	—	Аспарагин	—	53	44	32	67	—	—	—	33	33	16	—
NH_4^+	—	45	47	38	—	34	44	33	60	—	—	—	NH_4^+	—	52	32	14	—	33	33	16	49	—	—	—

Примечание. 1 — действие самого эффектора; 2 — результат опыта; 3 — вычислено, исходя из предположения о кумулятивности действия эффекторов; 4 — вычислено, исходя из предположения об аддитивности действия эффекторов.

В задачу настоящей работы входило выяснение условий и характера ингибирующего действия аминокислот, амидов и кетокислот, метаболизм которых тесно связан с процессами ассимиляции аммиака, являющегося первым стабильным продуктом фиксации азота атмосферы.

Источником для получения нитрогеназы служили бактериоиды *Rh. lupini*, выделенные из клубеньков желтого люпина и обработанные по методу, опубликованному ранее (³). Выделение и очистку нитрогеназы проводили в строго анаэробных условиях под аргоном, с использованием растворов, насыщенных аргоном, герметичной посуды и шприцев. Поскольку нитрогеназа способна катализировать не только восстановление N_2 в NH_3 , но и восстановление ацетилен в этилен, для определения активности нитрогеназы использовали ацетиленовый метод, предложенный Харди и сотрудниками (⁴), в нашей модификации (³). Опытную смесь вносили в реакционные сосуды емкостью 15 мл, которые вставляли в герметичный блок конструкции Шапошникова (⁵). Опытная смесь в объеме 1 мл содержала: 100 мкмол. трис- HCl -буфера pH 7,2; 5 мкмол. $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 мкмол. АТФ динатриевой соли; 35 мкмол. креатинфосфата натриевой соли, 0,2 мг креатинкиназы, 20 мкмол. дитионита ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$); 3–7 мг белка ферментного

препарата. Газовая фаза состояла из 88% спектрально чистого аргона и 12% очищенного ацетилена (субстрат). Реакцию начинали введением ацетилена, проводили при 27–28° в течение 15 мин. при непрерывном перемешивании, останавливали реакцию добавлением ТХУ. Определение этилена и ацетилена проводили на газовом хроматографе «Хром 31» с использованием колонки, наполненной поропаксом N. За единицу активности нитрогеназы принимали количество нмоль (10^{-9} M) этилена, образующегося из ацетилена за 1 мин. Удельная активность определялась числом единиц активности на 1 мг белка.

Все опыты проводили в 5–9-кратной повторности. В работе были использованы: аргон особой чистоты, очищенный ацетилен, дитионит фирмы «Мерк», динатриевая соль глутаминовой кислоты фирмы «Адзипомото».

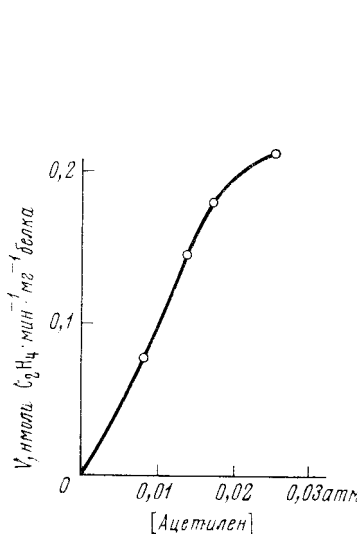


Рис. 1

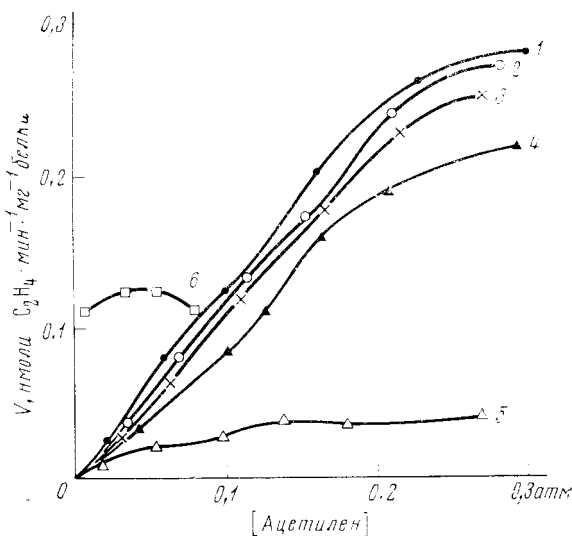


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость скорости реакции (V) от концентрации ацетилена

Рис. 2. Кривые зависимости скорости реакции (V) от концентрации ацетилена в присутствии ряда эффекторов; конечная концентрация добавленных аминокислот и амидов 1 мМ. 1 — без добавления эффектора, 2 — глутамин, 3 — аспарагиновая кислота, 4 — глутаминовая кислота, 5 — γ -АМК, 6 — γ -АМК 0,1 мМ

креатинфосфат, креатинкиназа, глутамин, аспарагин, аспарагиновая кислота, трис фирмы «Реапал», NH_4Cl особой чистоты класса А-2 для полупроводниковой техники, дитионит фирмы «Кох — Лайт».

На рис. 1 представлены данные о характере зависимости скорости реакции, катализируемой нитрогеназой, от концентрации ацетилена. Кривая имеет S-образную форму, что показано также для нитрогеназы из азотобактера (¹). $S_{0.5}$ было равно 0,022; это совпадает с данными, полученными для нитрогеназы из бактероидов сои (⁶).

Нитрогеназа из бактероидов люпина весьма чувствительна к кислороду. При хранении ее в атмосфере аргона с содержанием 2,3% кислорода теряется 50% активности в течение 6 мин.

На рис. 2 представлены кривые зависимости скорости реакции от концентрации ацетилена в присутствии некоторых аминокислот и амидов. Из приведенных данных можно видеть, что γ -аминомасляная кислота (γ -АМК) и глутаминовая кислота в концентрации 1 мМ являются ингибиторами нитрогеназы, практически не влияющими на характер кривой. Однако γ -АМК в концентрации 0,1 мМ, близкой к природной (⁷), и при низкой концентрации ацетилена активирует нитрогеназу. В тех же условиях ак-

тивирующим действием обладают аланин в концентрациях 0,1 и 1 мМ и аспарагин в концентрации 1 мМ.

Все указанные аминокислоты, а также фенилаланин ⁽⁷⁾ и ряд кетокислот в концентрации 10 мМ являются ингибиторами нитрогеназы, что можно видеть из данных рис. 3.

В табл. 1 представлены результаты опытов по влиянию глютаминовой кислоты, глютамина и аммония на активность нитрогеназы. Табл. 1 содержит данные, характеризующие действие самого эффектора и каждого из них в паре с другим эффектором. Кроме того, на основании данных о действии на нитрогеназу каждого эффектора, взятого в отдельности, были вычислены величины, характеризующие кумулятивность или аддитивность действия эффекторов. Расчеты были сделаны по Стедману ⁽⁸⁾.

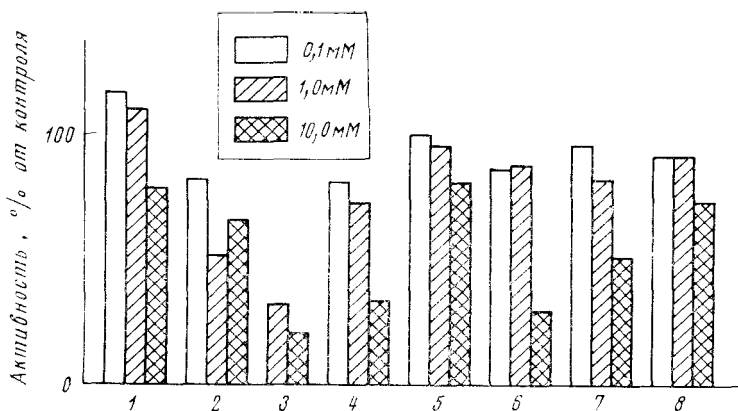


Рис. 3. Влияние различных аминокислот и кетокислот на активность нитрогеназы. 1 — аланин, 2 — аспарагин, 3 — фенилаланин, 4 — α-кетоглутаровая кислота, 5 — пировиноградная кислота, 6 — щавелевоуксусная кислота, 7 — глюкоксилевая кислота, 8 — β-оксимасляная кислота

Из приведенных данных можно видеть, что в большинстве вариантов, за исключением пары глютамин + аммоний, ингибирование имеет кумулятивный характер. Это указывает на то, что каждый из эффекторов действует на фермент независимо и имеет отдельный центр связывания, отличный от активного центра. В опытах по действию на нитрогеназу аспарагиновой кислоты, аспарагина и аммония (табл. 1) было показано, что действие этих эффекторов также носит кумулятивный характер.

Исходя из результатов, полученных нами ⁽⁷⁾ при определении суточной динамики количества аминокислот в бактероидах *Rh. lupini*, показавших, что данная бактериальная клетка характеризуется высоким содержанием дикарбоновых аминокислот и их амидов, нами были поставлены опыты с использованием суммы исследуемых ингибиторов. В результате проведенных опытов установлено, что аспарагиновая кислота, аспарагин и NH_4^+ , взятые вместе, ингибируют нитрогеназу на 68,7% (за 100% принята активность нитрогеназы без добавок). Ингибирование нитрогеназы глютаминовой кислотой, глютамином и NH_4^+ , также взятыми вместе, составляет 62,6%.

При совместном действии всех исследуемых эффекторов наблюдалось ингибирование фермента почти на 80%. Ингибирующее действие в данном случае нельзя отнести за счет действия ионной силы раствора, так как раствор NaCl той же ионной силы вызывал ингибирование, но только на 20%. Полученные данные дают возможность предполагать, что нитрогеназа

из бактериоидов Rh. lupini подвергается регуляции не только путем изменения соотношения концентраций АТФ:АДФ + АМФ (³, ⁹), но и путем действия метаболитов, образующихся из аммиака, т. е. по принципу отрицательной обратной связи. Ингибирующее действие этих метаболитов имеет кумулятивный характер.

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

Поступило
20 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. П. Львов, Н. С. Сергеев и др., ДАН, т. 201, 1493 (1971). ² B. Sete, L. E. Mortenson, J. Bacteriol., v. 117, 805 (1974). ³ К. Б. Асеева, З. Г. Евстигнеева и др., Изв. АН СССР, сер. биол., т. 5, 751 (1973). ⁴ R. W. F. Hardy, R. D. Holsten et al., Plant Physiol., v. 43, 1185 (1968). ⁵ Г. Л. Шапошников, Сб. докл.: Механизм биол. фиксации молек. азота (IV Баховский коллоквиум), Черноголовка, 1973, стр. 140. ⁶ B. Koch, H. J. Evans, Plant Physiol., v. 41, 1748 (1966). ⁷ Г. Л. Шапошников, З. Г. Евстигнеева и др., Физиол. раст., т. 22, 565 (1975). ⁸ E. R. Stedman, B. M. Shapiro et al., Adv. Enzym. Regul., v. 6, 257 (1968). ⁹ I. R. Kennedy, Biochim. et biophys. acta, v. 222, 135 (1970).