



УДК 577.158.03

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СВЯЗЫВАНИЯ АТР С АТР-АЗНЫМ ЦЕНТРОМ НИТРОГЕНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ АНАЛОГОВ СУБСТРАТА

Садков А. И., Гвоздев Р. И.

*Отделение института химической физики
Академии наук СССР, Черноголовка*

Проведено исследование влияния серии аналогов АТР на активность нитрогеназы. Показано, что соединения, являющиеся ди- и трифосфатами, служат конкурентными ингибиторами нитрогеназы (GTP, UTP, CTP, ADP, неорганический трифосфат и неорганический пирофосфат). Соединения, имеющие одну фосфатную группу (AMP и неорганический фосфат), а также аденозин, не ингибируют нитрогеназу. Некоторые аналоги FAD, а также NAD не оказывали ингибирующего действия. 1,6-Этепо-АТР, люминесцентный аналог АТР, не заменяет АТР в АТР-азной реакции нитрогеназы, а, напротив, ингибирует фермент. Анализ этих данных показывает, что при связывании АТР в АТР-азном центре нитрогеназы основную роль играет трифосфатная группа этого нуклеозидфосфата. Аденин не имеет большого значения для связывания, но необходим для нормального протекания АТР-азной реакции нитрогеназы. Существенная роль в этом процессе принадлежит 6-NH₂-группе. АТР-азную реакцию катализировали Mg²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ и Mn²⁺. Наблюдается хорошая корреляция между активированием АТР-азной реакции и радиусом этих ионов.

Исследования механизма биологической фиксации молекулярного азота стали проводить на молекулярном уровне вскоре после работ Мортенсона [1] и Харди [2], в которых была установлена необходимость присутствия АТР для восстановления N₂ до NH₃ бесклеточными экстрактами из азотфиксирующих микроорганизмов. Результаты этих работ позволили многим группам исследователей в сравнительно короткие сроки выделить нитрогеназу из различных источников и начать исследование механизма отдельных стадий ферментативного восстановления N₂.

Кинетическими методами было показано, что для «активирования» пары электронов необходимо от 2 до 4 молекул АТР [3—5]. Исследование влияния температуры на протекание редокс-зависимого гидролиза АТР до ADP и P_i и на восстановление N₂ и C₂H₂ показали, что лимитирующей стадией этих процессов является редокс-зависимый гидролиз АТР [6—8]. На основании данных исследования нитрогеназы с помощью специфических ингибиторов CO и NO предполагается, что нитрогеназа имеет два центра: АТР-центр и центр, на котором происходит выделение и восстановление различных субстратов (N₂, C₂H₂, N₃⁻ и т. д.), которые на основании некоторых косвенных данных могут быть пространственно разобщены [7—9].

В настоящей работе представлены результаты кинетических исследований АТР-азного центра нитрогеназы с помощью набора различных аналогов АТР, проведенных с целью выяснения механизма связывания АТР с АТР-азным центром нитрогеназы.

Влияние химических аналогов АТР на активность нитрогеназы

В скобках приведено число экспериментов. Условия определения констант см. в подписи к рис. 1

Соединение	K_m или K_i	Соединение	K_m или K_i
АТР	$(6-8) \cdot 10^{-4}$ (6)	Трифосфат натрия	$(2-4) \cdot 10^{-4}$ (5)
АДР	$3 \cdot 10^{-3}$ (2)	Пирофосфат натрия	$(6-8) \cdot 10^{-4}$ (4)
АМР	Не ингибирует до $5 \cdot 10^{-2}$ (2)	ГТР	$(0,9-1) \cdot 10^{-3}$ (6)
Аденозин	То же	СТР	$1 \cdot 10^{-3}$ (2)
(I)	Не ингибирует до $1 \cdot 10^{-3}$ (2)	УТР	$2 \cdot 10^{-3}$ (2)
NAD	То же	1,6-Этено-АТР	Ингибирует на 30% при $5 \cdot 10^{-3}$ (характер ингибирования не проверяли)
FAD	Не ингибирует до $5 \cdot 10^{-3}$ (2)		
(II)	Не ингибирует до $1 \cdot 10^{-3}$		

Эксперименты показали, что субстратом нитрогеназы является только АТР, в то время как другие природные нуклеозидтрифосфаты (ГТР, СТР и УТР) не являются субстратами нитрогеназы (см. таблицу), что согласуется с ранее полученными данными [10]. Вместе с тем ГТР, СТР и УТР конкурентно ингибируют нитрогеназу с K_i $(0,9-2,0) \cdot 10^{-3}$ М. На рис. 1 приведены данные о конкурентном характере ингибирования ГТР. Аналогичная картина наблюдалась и при использовании других аналогов АТР.

1,6-Этено-АТР не является субстратом нитрогеназы, но ингибирует АТР-азную активность. Хотя характер ингибирования пока детально не исследован, по аналогии с природными трифосфатами предполагается, что ингибирование может носить конкурентный характер. Таким образом, очевидно, что 6-NH₂-группа аденина и N¹ адениновой структуры АТР играют важную роль в АТР-азной реакции.

Укорочение фосфатного конца АТР на одну фосфатную группу приводит к образованию конкурентного ингибитора — АДР с K_i $2,8 \cdot 10^{-3}$ М. АДР несколько более слабый ингибитор, чем ГТР, СТР и УТР и, следовательно, образует более слабые комплексы с АТР-азным центром нитрогеназы по сравнению с другими нуклеозидфосфатами. Дальнейшее укорочение фосфатного конца АТР (АМР, аденозин) сопровождается полным падением ингибиторного эффекта.

Присоединение рибофлавина к фосфатному концу АДР (FAD), АТР (I) или АМР (II), а также к фосфатному концу АДР никотинмононуклеотида (NAD) приводит к образованию соединений, которые не являются ни субстратами, ни ингибиторами нитрогеназы.

Напротив, неорганический трифосфат и пирофосфат, которые можно рассматривать как наиболее сильные конкурентные аналоги АТР и АДР, лишённые аденозина, являются наиболее сильными конкурентными ингибиторами нитрогеназы, имеющими K_i $(3-4)$ и $(5-6) \cdot 10^{-4}$ М соответственно. Неорганический трифосфат несколько более сильный ингибитор, чем неорганический пирофосфат, что коррелирует с данными по ингибированию природными аналогами АТР, содержащими три- (ГТР, СТР, УТР) и дифосфат (АДР). Таким образом, можно полагать, что неорганический трифосфат образует более прочные комплексы с нитрогеназой по сравнению с неорганическим пирофосфатом.

Так как АМР и аденозин не ингибируют активность нитрогеназы, можно предполагать, что аденозиновая часть АТР не играет существенной роли в связывании АТР в АТР-азном центре фермента. Таким образом, основная роль в связывании АТР с нитрогеназой принадлежит трифосфату и для исследования активного центра нитрогеназы с помощью специфических ингибиторов АТР-азы можно проводить химические моди-

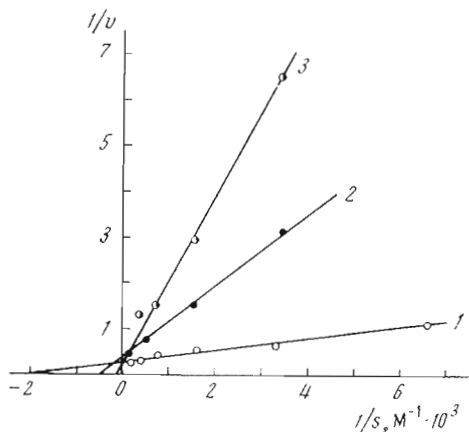


Рис. 1

Рис. 1. Определение характера ингибирования и константы ингибирования для ГТР: 1 — без ГТР, 2 — в присутствии 2 мкмоль ГТР, 3 — в присутствии 5 мкмоль ГТР (в тесте 5 мкмоль АТР. Количество Mg^{2+} было в 2 раза меньше суммарной концентрации нуклеотидов)

Рис. 2. Влияние АТР и Me^{2+} на активность нитрогеназы: а — влияние АТР на активность нитрогеназы (активность фермента измеряли при постоянной концентрации Mg^{2+} , равной 2,5 мкМ); б — влияние Me^{2+} на активность нитрогеназы (активность фермента измеряли при постоянной концентрации АТР, равной 5 мкМ. Концентрацию Me^{2+} меняли, как показано на рисунке): 1 — Co^{2+} , 2 — Mn^{2+} , 3 — Fe^{2+} , 4 — Mg^{2+}

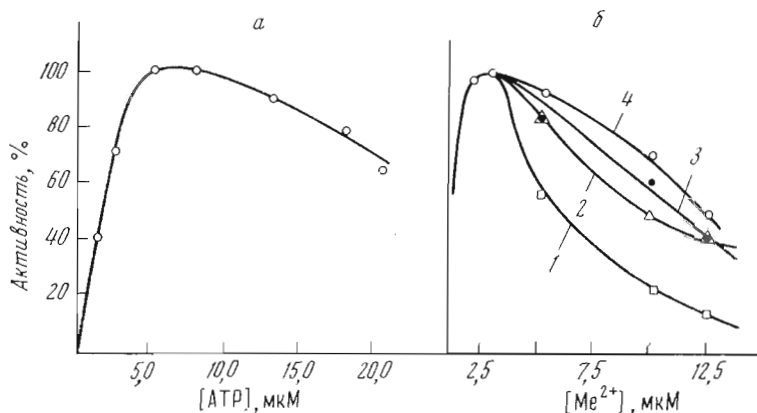


Рис. 2

фикации аденозиновой части молекулы АТР, не затрагивая трифосфатного конца. Исследования механизма связывания АТР с АТР-азным центром миозина [11, 12] и некоторых других АТР-аз [13—15] также показали, что основной вклад в связывание с белком вносится трифосфатной группой АТР. АТР-азные центры многих ферментов в этом отношении, по-видимому, имеют много общих черт, и не исключено, что в их состав в ряде случаев входят одни и те же аминокислотные остатки.

Роль адениновой части АТР в АТР-азной реакции нитрогеназы пока недостаточно ясна. Остаток аденина либо непосредственно принимает участие в АТР-азной реакции нитрогеназы, либо создает определенное пространственное расположение каталитически активных групп АТР-азного центра, благоприятное для протекания АТР-азной реакции. Исходя из поведения 1,6-энено-АТР в сравнении с АТР, существенную роль в этих процессах, по-видимому, играют 6- NH_2 -группа и N^1 остаток аденина молекулы АТР.

Для осуществления АТР-азной реакции нитрогеназы [16—18], как и в случае других АТР-азных реакций [13—15], необходимы ионы двухвалентных металлов, в частности ионы Mg^{2+} [19]. Как правило, у всех этих ферментов ионы металла принимают участие в связывании субстрата с ферментом с образованием тройного комплекса [20, 21, 22]. АТР с ионами двухвалентных металлов образует прочные хелатные комплексы. Константа диссоциации K_d АТР с Mg^{2+} равна $(1-1,2) \cdot 10^{-5}$ М [22, 23]. Таким

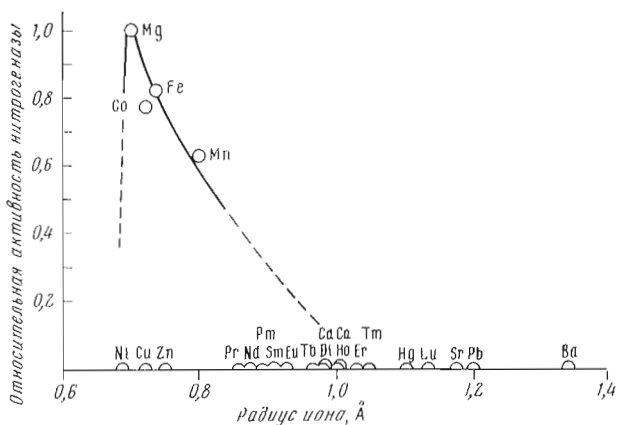


Рис. 3. Зависимость активности нитрогеназы от радиуса иона металла (активность фермента измеряли при соотношении АТФ : Me, равном 2 : 1)

образом, в условиях эксперимента вся АТФ находится в виде комплекса с Mg^{2+} . Другие ионы двухвалентных металлов также образуют комплексы с АТФ, имеющие K_d , близкие к K_d для комплексов с Mg^{2+} . Из них только Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} могли заменить Mg^{2+} в реакциях, катализируемых нитрогеназой [18, 24]. Можно полагать, что и в этих случаях истинным субстратом нитрогеназы является комплекс $(АТФ - Me)^{2-}$.

Как показали наши опыты (рис. 2), соотношение АТФ : Me^{2+} , при котором проявляется максимальная активность нитрогеназы, равно 2 : 1. Ионы Me^{2+} обычно образуют комплексы с АТФ в соотношении 1 : 1 в широком диапазоне концентраций. Наличие максимальной активности нитрогеназы при соотношении АТФ : Me^{2+} , равном 2 : 1, может отражать либо существование двух АТФ-азных центров (АТФ-азный центр, в котором работает комплекс АТФ — Me, и АТФ-азный центр, в котором работает свободный АТФ, один из них может быть регуляторным), либо является результатом кинетических закономерностей протекания АТФ-азной реакции. Увеличение концентрации Me^{2+} или АТФ приводит к ингибированию нитрогеназы, что должно быть обусловлено блокированием АТФ-азного центра нитрогеназы свободными ионами Me^{2+} и свободным АТФ (рис. 2). Эти результаты соответствуют ранее полученным данным [25—27].

Измеренная нами зависимость активности нитрогеназы от радиуса иона для большой группы двух- и трехвалентных металлов представлена на рис. 3. На график нанесена в каждом случае максимальная активность нитрогеназы, проявляемая при соотношении АТФ : Me^{2+} , равном 2 : 1. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} и целая группа лантанидов не эффективны в реакциях, катализируемых нитрогеназой. Из них Sn^{2+} , Hg^{2+} и Pb^{2+} необратимо ингибировали активность нитрогеназы в результате взаимодействия с каталитически активными группами активных центров фермента. В отличие от ранее опубликованных данных в нашем эксперименте Ni^{2+} не активировал нитрогеназу. Активность фермента восстанавливалась, если в присутствии Zn^{2+} или Cr^{2+} добавляли ионы Mg^{2+} . В случае остальных исследованных ионов активность фермента восстанавливалась только после отделения ионов от фермента гель-фильтрацией через сефадекс G-25.

Наблюдаемая корреляция между радиусом иона и активностью нитрогеназы свидетельствует о том, что важным фактором, определяющим способность двухвалентного иона активировать этот фермент, является размер иона.

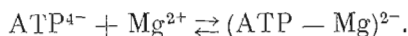
По данным рентгеноструктурного анализа, плоскость аденинового кольца АТФ перпендикулярна плоскости кольца рибозы, а фосфатный

конец близко подходит к N-7 адениновой части молекулы АТР [27—29]. На основании исследований растворов АТР методом ЯМР и лазерной спектроскопии очевидно, что двухвалентные металлы с радиусом иона более 0,9 Å (исключением является ион Cu^{2+}) образуют комплексы с концевыми фосфатными группами и N-7 адениновой части молекулы АТР [12, 29—31]. Ионы Mn^{2+} комплексуется с двумя концевыми фосфатными группами и образуют комплекс с N-7 адениновой части молекулы АТР через молекулу воды, находящуюся во внешней сфере комплекса иона [32]. Возможно, что Fe^{2+} , Co^{2+} и Mg^{2+} образуют такого же типа комплексы. Таким образом, активировать нитрогеназу могут только те ионы металлов, которые способны давать слабые комплексы с остатком аденина молекулы АТР. Ионы радиусом менее 0,68 Å, по-видимому, не образуют таких комплексов и не активируют нитрогеназу. Так как ионы Zn^{2+} не активируют нитрогеназу, несмотря на подходящий радиус иона, можно полагать, что ион Me^{2+} в комплексе с АТР и белком находится в координационном поле, отличном от структуры поля гидратированного иона Z^{2+} .

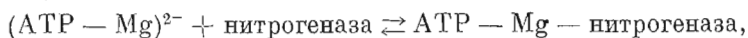
Хотя часть Me^{3+} лантаноидной группы имеет подходящий для активации радиус иона, она не активирует нитрогеназу. Это может быть результатом образования комплекса типа $(\text{АТР})_2 - \text{Me}$, $(\text{АТР})_3 - \text{Me}$ или комплексов более сложной структуры. Такие комплексы не входят в АТР-азный центр по стерическим причинам.

Таким образом, для протекания АТР-азной реакции нитрогеназы размер иона является важным, но не определяющим фактором. Существенная роль принадлежит также электронной структуре иона металла и его способности давать комплексы с определенными лигандными группами белка.

На основании полученных данных можно предполагать следующий механизм связывания АТР с АТР-азным центром нитрогеназы. Первым этапом является образование комплекса АТР с Mg^{2+} :



Вторым этапом является образование тройного комплекса АТР с АТР-азным центром нитрогеназы:



причем в образовании этого комплекса наиболее существенная роль принадлежит хелату, который может связываться с ферментом через ион Mg^{2+} , а также свободными НО-группами в соответствии с рК этих групп. Экспериментальное подтверждение образования такого комплекса получено в работе [33]. Так как ГТР, СТР и УТР ингибируют, а АМР и аденозин не ингибируют нитрогеназу и в то же время адениновая часть молекулы АТР необходима для проявления ее активности, то образование такого комплекса должно привести к индуцированию конформационного перехода полипептидной цепи в районе АТР-азного центра и к формированию «площадки» для связывания остатка аденина молекулы АТР. Таким образом, третьим этапом в связывании АТР в АТР-азном центре является связывание адениновой части молекулы АТР.

В виду того что соединения, замещенные по концевому фосфату, не являются субстратами и ингибиторами нитрогеназы, можно предполагать, что АТР-азный центр нитрогеназы расположен в щели белка, размер которой определяется размерами молекулы АТР.

Экспериментальная часть

Выделение нитрогеназы. Нитрогеназу выделяли из азотобактера по методу [34] в небольшой модификации, которая заключалась в следующем. Нитрогеназу, полученную после фракционирования протаминсуль-

фатом, в течение 8 мин прогревали при 55° и центрифугировали при 70 000 *g* в течение 20—60 мин. Надосадочную фракцию очищали последовательной гель-фильтрацией на сефарозе 4В («Pharmacia», Швеция) и сефадексе С-100 (3,0 × 50 см). Белки элюировали 0,02 М трис-НСl буфером (рН 7,0), содержащим 0,1 мг/мл Na₂S₂O₄. Фракцию, обладающую активностью нитрогеназы, собирали и в случае необходимости концентрировали ультрафильтрацией в атмосфере инертного газа.

Определение активности нитрогеназы. Активность нитрогеназы определяли по восстановлению ацетилена до этилена. Ацетилен получали из CaC₂ [35] и подвергали дополнительной очистке вымораживанием при —110°. Количество этилена определяли газохроматографическим методом на газовом хроматографе «Цвет», модель 1-64 с пламенно-ионизационным детектором. Концентрацию ацетилена оценивали по высоте пика с помощью калибровочной кривой. Образцы газовых проб (объем 0,2 мл) отбирали из реакционных сосудов с помощью микродозатора.

Реакционная смесь состояла из 40 мкмоль дитионита натрия, 100 мкмоль трис-НСl буфера (рН 7,0), 2,5 мкмоль MgCl₂, 1,5—2 мг белка и соответствующих количеств АТР или его аналогов. Общий объем реакционной смеси 2,0 мл. Газовая фаза: 60 мм рт. ст. C₂H₂ и 700 мм рт. ст. Ar особой чистоты, объем газовой фазы 10 мл. В отдельных случаях параллельно проводили оценку активности нитрогеназы с ¹⁵N₂ по методу [36].

В качестве аналогов АТР использовали GTP, CTP, UTP, ADP, AMP, аденозин, FAD («Reanal», Венгрия), неорганический трифосфат натрия (марки «ч.», ФРГ), неорганический пиррофосфат натрия (марки х. ч.). Натриевые соли аналогов FAD (I и II) были синтезированы во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте. Неорганические соли, если они не были марки х. ч., дополнительно очищали двойной перекристаллизацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mortenson J. E. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 272—279.
2. D'Eustachio A. I. D., Hardy R. W. F. (1964) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 15, 319—323.
3. Hardy R. W. F., Knight E. (1966) Biochim. et biophys. acta, 132, 520—531.
4. Слепко Г. И., Линде В. Р., Узенская А. М., Левченко Л. А. (1971) Изв. АН СССР. Сер. биол., № 1, 86—90.
5. Линде В. Р., Алфимова Е. Я., Слепко Г. И., Узенская А. М., Лихтенштейн Г. И. (1969) Докл. АН СССР, 185, 636—638.
6. Hardy R. W. F., Burns R. C. (1968) Annual Rev. Biochem., 37, 331—353.
7. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Котельников А. И., Лихтенштейн Г. И. (1973) Изв. АН СССР. Сер. биол., № 4, 488—498.
8. Bulen W. A., Le Comte J. R., Burns R. C., Hinkson J. (1965) in «Non-heme iron proteins: role in energy conversion» (A San Pietro Ed) Ohio, Atioch press, p. 261.
9. Lockshin A., Burriss R. H. (1965) Biochim. et biophys. acta, 111, 1—10.
10. Bui P. M., Mortenson L. E. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 61, 1024—1027.
11. Morita F., Jagi K. (1966) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 22, 297—302.
12. Malik M. N., Marchioli Ls., Martonosi A., (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 153, 147—154.
13. Baykov A. A., Braga E. A., Avaeva S. M. (1972) FEBS Lett., 21, 80—82.
14. Riami L., Meyde E. F. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 41, 313—319.
15. Selwgh M. I. (1968) Nature, 219, 419—503.
16. Bulen W. A., Burns R. C., Le Comte J. R. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 53, 532—539.
17. Hardy R. W. F., Knight E. (1966) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 132, 409—413.
18. Dilworth M. I., Subramanian D., Munson T. O., Burriss R. H. (1965). Biochim. et biophys. acta, 132, 486—503.
19. Диксон М., Уэбб Э. (1964) Ферменты, стр. 371, ИЛ, М.
20. Malmström G., Rosenberg A. (1959) Advances in enzymol. 21, 131.
21. Jazawa M., Morita F., Yagi K. (1972) J. Biochem., 71, 301—310.
22. Norly J. G. (1970) Acta chem. scand., 24, 3276—3281.

23. Продан Е. А., Продан Л. И., Ермоленко Н. Ф. (1969) в кн. Триполифосфаты, стр. 109, «Наука и техника», Мнвск.
24. Burns R. C. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **171**, 253—259.
25. Brintzinger H. (1963) *Biochim. et biophys. acta*, **77**, 343—345.
26. Bui P. T., Mortenson L. E. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 1021—1027.
27. Gallo A. A., Hansen I. L., Sable H. Z., Swift T. J. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 5913—5920.
28. Kennard O., Isaacs N. W., Coppola J. C., Kirby A. J., Warren S., Motherwell W. D. S., Watson D. G., Wampler D. L., Chenery D. H., Larson A. C., Kerr K. A., Sanseverino L. R. (1970) *Nature*, **225**, 323—326.
29. Rimai L., Heyde E. T. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **38**, 231—237.
30. Hammes G. G., Miller D. L. (1967) *Chem. Phys.*, **46**, 1534—1535.
31. Glassman T. A., Cooper C., Harrison L. W., Swift T. J. (1971) *Biochemistry*, **10**, 843—849.
32. Kuntz G. P. P., Glassman T. A., Cooper C., Swift T. J. (1972). *Biochemistry*, **11**, 538—543.
33. Сырцова Л. А., Назарова И. И., Писарская Т. Н., Назаров В. Б. (1972) Докл. АН СССР, **206**, 367—369.
34. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Левченко Л. И., Куликов А. В., Воробьев Л. В. (1971) Изв. АН СССР. Сер. биол., № 2, 246—253.
35. Рапопорт Ф. М., Ильинская А. А. (1963) в кн. Лабораторные методы получения чистых газов, стр. 92—202, 362—367, Госхимиздат, М.
36. Линде В. Р., Алфимова Е. Я., Слепко Г. И., Узенская, А. М., Райхман Л. А. Лихтенштейн Г. И. (1969) Докл. АН СССР, **184**, 473—476.

Поступила в редакцию*
2.VIII.1974

MECHANISM OF ATP BINDING AT THE ATPase SITE OF NITROGENASE: STUDIES WITH ATP ANALOGS

SADKOV A. P., GVOZDEV R. I.

*Branch of Institute of Chemical Physics, Academy
of Sciences of the USSR, Chernogolovka*

The effect of several ATP analogs on the nitrogenase activity was investigated. The compounds containing pyrophosphate and triphosphate were shown to be competitive inhibitors of nitrogenase; the compounds with one phosphate (AMP and inorganic phosphate), as well as adenosine, FAD and some its analogs, and NAD possessed no inhibitory activity. 1,6-Etheno-ATP, a luminescent ATP analog, could not replace ATP in ATP-ase nitrogenase reaction, but proved an inhibitor. Analysis of the data shows that the main role in ATP binding at ATP-ase centre of nitrogenase belongs to triphosphate moiety. Adenine does not make an important contribution to the ATP binding; however, it is essential for the ATP-ase reaction of nitrogenase, adenine 6-NH₂-group being important for the process. ATP-ase reaction of nitrogenase was catalyzed by Mg²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ and Mn²⁺ ions, whereby a good correlation between the reaction rates and ion radii was observed. The role of divalent and trivalent metal ions in the mechanism of ATP binding with nitrogenase is discussed.

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия»; дата поступления — 7.I.1974 г.