



УДК 576.851.15

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
НИТРОГЕНАЗЫ ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА
ЭНЕРГИИ МЕЖДУ КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННОЙ
ПО АТР-АЗНЫМ ЦЕНТРАМ АФИННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ
МЕТКОЙ И ЖЕЛЕЗО-СЕРНЫМИ КЛАСТЕРАМИ

*Гвоздев Р. И., Котельников А. И., Пивоваров А. П.,
Садков А. П., Кост А. А.*

*Отделение Института химической физики
Академии наук СССР, Черноголовка*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Люминесцентный аналог АТР—1,6-энено-АТР, ковалентно присоединенный к нитрогеназе, афинно связывается с АТР-азным центром фермента. После разделения нитрогеназы, модифицированной аналогом, на Fe—белок и Mo—Fe—белок установлено, что 1,6-энено-АТР связывается с обоими белками; это свидетельствует о наличии в нитрогеназе как минимум двух различных АТР-азных центров. С помощью теории индуктивно-резонансного переноса энергии оценили расстояние между АТР-азным центром и железо-серным кластером в Fe—белке (≈ 3 нм) и в Mo—Fe—белке (< 1 нм), расстояние между АТР-азным центром Fe—белка и железо-серным кластером Mo—Fe—белка (≈ 3 нм), а также расстояние между обоими АТР-азными центрами (≈ 3 нм). Обсуждается роль АТР-азных центров нитрогеназы в механизме восстановления N_2 .

Нитрогеназа катализирует восстановление N_2 , некоторых ацетиленовых углеводов и нитрилов, N_3^- и N_2O , а также восстановление H^+ до H_2 [1—3]. Фермент состоит из двух белковых компонентов: Fe—белка ($M \approx 55\,000$, 4 атома негемового железа) и Mo—Fe—белка ($M \approx 270\,000$, 28—32 атома негемового железа, 2 атома молибдена). Ферментативной активностью обладает только белковый комплекс, состоящий из обоих компонентов. Для восстановления субстратов, помимо фермента, необходимы восстановитель ($Na_2S_2O_4$, ферредоксин, флаводоксин), АТР и ионы двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} или Co^{2+}) [3—4].

АТР играет исключительно важную роль в ферментативном восстановлении субстратов, но механизм его действия до сих пор остается неясным. Известно, что для активации пары электронов необходимо от 2 [2] до 4 молекул АТР [5]. При взаимодействии АТР с нитрогеназой появляются дополнительные легко титруемые SH-группы [6, 7], увеличивается эффективность комплексообразования негемового железа нитрогеназы с *o*-фенантролином [5] и Fe—белка с α , α' -дипиридиллом [8]. Кроме того, при этом увеличивается степень инактивации Fe—белка кислородом [9] и, судя по данным ЭПР при 15—19° К, существенно изменяется структура железо-серного кластера (ЖСК) [10—12]. При взаимодействии Mo—Fe—белка с АТР аналогичных явлений не наблюдается. АТР связывается с нитроге-

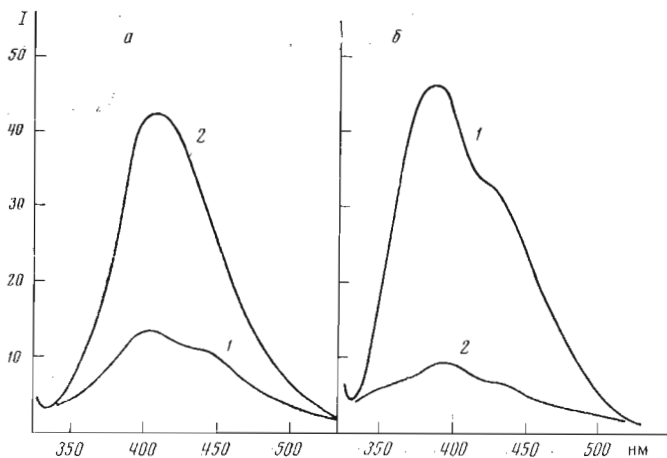


Рис. 1. Спектры флуоресценции нитрогеназы, модифицированной ϵ -АТФ: *а*: 1 — нативная нитрогеназа и 2 — нитрогеназа после удаления негемового железа (концентрация нитрогеназы — $2 \cdot 10^{-6}$ М); *б*: 1 — модифицированная нитрогеназа и 2 — нитрогеназа, модифицированная в присутствии 10-кратного молярного избытка АТФ по отношению к ϵ -АТФ (концентрация белка — $4 \cdot 10^{-6}$ М; *I* — интенсивность флуоресценции в относительных единицах)

назой преимущественно через трифосфат [4, 7], образуя тройной комплекс белок — Me^{2+} — АТФ [13]. Считают, что в состав АТФ-азного центра нитрогеназы входят, по крайней мере, две необходимые для ферментативной активности SH-группы Fe — белка, расположенные рядом с ЖСК [4, 7, 14—16]. Однако пока не известно число АТФ-азных центров в молекуле нитрогеназы, их структура и расположение относительно ЖСК.

В настоящей работе строение АТФ-азных центров нитрогеназы из азотобактера исследовано с помощью афинной люминесцентной метки — 4,6-энено-АТФ (ϵ -АТФ). Мы полагали, что ϵ -АТФ, как аналог АТФ, должен связаться по сродству в районе АТФ-азного центра фермента. Основанием для такого предположения являются следующие факты: во-первых, данные, показывающие, что для связывания АТФ в АТФ-азном центре фермента химическая модификация аденина незначительна [4], и, во-вторых, возможность модификации с помощью ϵ -АТФ регуляторного центра Нв, связывающего органические полифосфаты [17]. Модифицированный препарат нитрогеназы отделяли от непрореагировавшего ϵ -АТФ гелем-фильтрацией через сефадекс G-25. Было показано, что модифицированная нитрогеназа обладает флуоресценцией, характерной для ϵ -АТФ (рис. 1).

Для выяснения специфичности присоединения ϵ -АТФ к АТФ-азному центру нативную нитрогеназу модифицировали в присутствии 10-кратного молярного избытка АТФ. В этом случае препарат фермента содержал в 10—15 раз меньше ϵ -АТФ (рис. 1) по сравнению с препаратом нитрогеназы, модификация которого осуществлялась в отсутствие АТФ. Этот результат свидетельствует о специфичности присоединения ϵ -АТФ к АТФ-азному центру нитрогеназы.

Для выяснения вопроса о том, в каком из белковых компонентов нитрогеназы находится АТФ-азный центр, фермент, модифицированный ϵ -АТФ, разделяли на Mo — Fe — белок и Fe — белок и изучали их флуоресцентные свойства (рис. 2 и 3). Mo — Fe — белок не обладал флуоресценцией, в то время как Fe — белок обладал флуоресценцией, интенсивность которой была соизмерима с интенсивностью флуоресценции модифицированной исходной нитрогеназы (рис. 1). Этот факт свидетельствовал о том, что АТФ-азный центр нитрогеназы находится на Fe-белке. Аналогичный вывод следует из результатов исследований нитрогеназы методом ЭПР [10—12] и

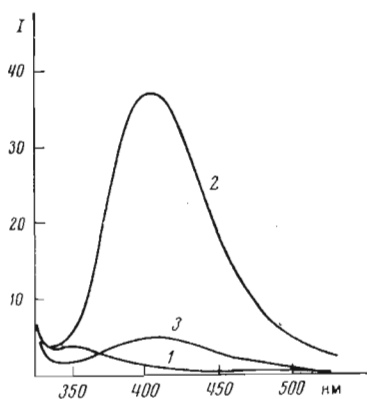


Рис. 2

Рис. 2. Спектры флуоресценции Mo — Fe — белка, модифицированного ϵ -АТР: 1 — модифицированный белок, 2 — белок после удаления негемового железа, 3 — белок, полученный из нитрогеназы, модифицированной в присутствии 10-кратного молярного избытка АТР по отношению к ϵ -АТР после удаления негемового железа (концентрация белка — $4 \cdot 10^{-6}$ М)

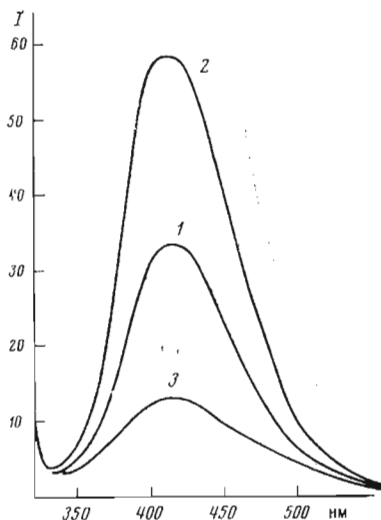


Рис. 3

Рис. 3. Спектры флуоресценции Fe — белка, модифицированного ϵ -АТР: 1 — модифицированный белок, 2 — белок после удаления негемового железа, 3 — белок, полученный из нитрогеназы, модифицированной в присутствии 10-кратного молярного избытка АТР по отношению к ϵ -АТР (концентрация белка — $1,6 \cdot 10^{-6}$ М)

равновесного диализа [18], кинетических данных по влиянию АТР на комплексование α, α' -дипиридила с негемовым железом Fe — белка [8] и результатов, указывающих на увеличение скорости инактивации Fe — белка молекулярным кислородом в присутствии АТР [9].

Единственным хромофором нитрогеназы, поглощение которого, перекрывая почти всю видимую область, находится в области флуоресценции ϵ -АТР, является негемовое железо. Это позволяет определить расстояние между АТР-азным центром нитрогеназы и негемовым железом, используя теорию индуктивно-резонансного переноса энергии [19—20].

Измеряя интенсивность флуоресценции донора, потушенной за счет безызлучательного переноса энергии (I), и интенсивность флуоресценции в отсутствие переноса (I_0), можно определить расстояние (R) между донором и акцептором из уравнения:

$$R = R_0 / \sqrt[6]{\frac{I_0}{I} - 1}, \quad (1)$$

где R_0 — расстояние между донором и акцептором, при котором вероятность переноса равна вероятности спонтанной дезактивации.

Величину R_0 можно определить из уравнения

$$R_0^6 = \left[9000 \cdot \ln 10 \cdot \Phi^2 \cdot \varphi \int_0^\infty I(\lambda) \cdot \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right] / \left[128 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N \int_0^\infty I(\lambda) d\lambda \right], \quad (2)$$

где N — число Авогадро; n — показатель преломления среды; Φ^2 — фактор ориентации; φ — квантовый выход флуоресценции; $I(\lambda)$ — спектральное распределение квантовой интенсивности флуоресценции донора; $\epsilon(\lambda)$ — молярный коэффициент поглощения акцептора как функции λ ; λ — длина волны в см.

Сильная степенная зависимость вероятности переноса от R позволяет оценить это расстояние с большой точностью. Ошибка в оценке величины интеграла перекрытия в 2 раза приводит к ошибке в определении расстояния R лишь на 12%.

Таким образом, для определения расстояния от АТР-азного центра до ЖСК, помимо спектра флуоресценции и спектра поглощения модифицированной нитрогеназы, необходимо знать спектр флуоресценции нитрогеназы, из которой удалено негемовое железо.

Негемовое железо железно-серных белков, и в том числе нитрогеназы, легко удаляется при подкислении раствора белка до pH 1,0. Поэтому были получены спектры флуоресценции модифицированной нитрогеназы и Fe — белка, растворы которых предварительно подкисляли до pH 1,0 и затем нейтрализовали до pH 9,0—9,5. При этом оказалось, что интенсивность флуоресценции нитрогеназы возрастала в 3,4 раза (рис. 1), а интенсивность флуоресценции Fe — белка — в 1,6—2 раза (рис. 3). Такое резкое различие

Определение расстояния между АТР-азными центрами отдельных белковых компонентов нитрогеназы и их ЖСК

Белковый компонент	R_0 , нм	I_0/I	Количество негемового железа	R , нм
Mo — Fe — белок	2,5	100	(а) 1	1,1
			(б) 4	1,4
			(в) 30	2,0
Fe — белок	2,7	1,6—2,0	(а) 1	2,7—2,9
			(б) 4	2,9—3,1

в интенсивности флуоресценции нитрогеназы и Fe — белка после удаления из них негемового железа можно объяснить, если предположить следующее. В составе нитрогеназы имеется место связывания ϵ -АТР, которое расположено от ЖСК Mo — Fe — белка так близко, что флуоресценция ϵ -АТР практически полностью потушена за счет индуктивно-резонансного переноса энергии. Экспериментальные данные подтвердили эту точку зрения. Mo — Fe — белок, полученный хроматографией модифицированной нитрогеназы на DEAE-целлюлозе, после удаления негемового железа обладал флуоресценцией (рис. 2), соизмеримой с интенсивностью флуоресценции модифицированной нитрогеназы и Fe — белка. Таким образом, большее увеличение флуоресценции нитрогеназы по сравнению с увеличением флуоресценции Fe — белка после удаления из них негемового железа обусловлено флуоресценцией Mo — Fe — белка.

Mo — Fe — белок, полученный из нитрогеназы, модифицированной ϵ -АТР в присутствии 10-кратного молярного избытка АТР, обладал в 8—15 раз более слабой флуоресценцией по сравнению с Mo — Fe — белком (после удаления негемового железа), полученным из нитрогеназы, модифицированной ϵ -АТР в отсутствие АТР (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют о специфичности присоединения ϵ -АТР к АТР-азному центру Mo — Fe — белка и позволяют предположить, что в состав нитрогеназы входит, как минимум, два различных АТР-азных центра.

Квантовый выход флуоресценции ϵ -АТР существенно не зависит от полярного окружения и подвижности хромофорной группы ϵ -АТР [21], которые могут реализоваться после присоединения ϵ -АТР к белку. Поэтому тушение флуоресценции ϵ -АТР, связанного с нитрогеназой, происходит по индуктивно-резонансному механизму за счет миграции энергии возбуждения на ближайший ЖСК. Исходя из этого были рассчитаны величины R_0 для Mo — Fe — белка и Fe — белка и определено расстояние от АТР-азного центра до ближайшего ЖСК (см. таблицу). В расчетах были приняты следующие значения входящих в формулы (1) и (2) величин:

$\epsilon_{\text{Mo-Fe белка}(420 \text{ нм})} = 0,19 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{см} \cdot \text{моль}^{-1}$; $\epsilon_{\text{Fe-белка}(420 \text{ нм})} = 0,31 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{см} \cdot \text{моль}^{-1}$; $n = 1,65$ [22]; $\varphi = 0,55$ [21]; $\Phi^2 = 0,583$ (все величины ϵ даны в расчете на один атом Fe). Расчеты проводили из предположения, что тушение обусловлено переносом энергии (см. таблицу): а) на ближайший атом негемового железа, б) ближайший кластер типа $4\text{Fe} - 4\text{S}$ и в) на все атомы негемового железа (30 атомов для $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$). При выборе значения для Φ^2 учитывалось, что атомы железа нитрогеназы организованы в структуры типа $4\text{Fe} - 4\text{S}$, и допускалось, что в силу кубической симметрии эти структуры не имеют значительной анизотропии направлений дипольных моментов переходов. Предполагалось также, что модифицированный адениновый компонент $\epsilon\text{-АТР}$ является хромофором с плоской поляризацией, который свободно вращается вокруг точки присоединения к белку.

Известно, что в состав $\text{Fe} - \text{белка}$ входят 4 атома негемового железа, которые организованы в ЖСК типа бактериального ферредоксина [23]. Таким образом, расстояние от АТР-азного центра $\text{Fe} - \text{белка}$ до этого ЖСК равно $\approx 3,0$ нм. Расстояние от АТР-азного центра $\text{Fe} - \text{белка}$ до ЖСК $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$ в нативной нитрогеназе также должно составлять $2,7 - 3,5$ нм, так как для молекул $\epsilon\text{-АТР}$ на обоих компонентах при разрушении белка $I_0/I = 3,4$, причем половина этого эффекта обусловлена увеличением флуоресценции $\epsilon\text{-АТР}$, присоединенной к $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белку}$.

Следует отметить, что спектр флуоресценции модифицированной нитрогеназы обладает сложной структурой (рис. 4), что является результатом наложения двух спектров люминесценции, сдвинутых относительно спектра флуоресценции свободной $\epsilon\text{-АТР}$ примерно на 10 нм в длинноволновую и на 20—25 нм в коротковолновую область спектра. Это позволяет сделать вывод о том, что метка в АТР-азном центре $\text{Fe} - \text{белка}$ в нативном ферменте находится в двух различных состояниях, отличающихся от состояния метки в водном растворе. После разделения фермента на $\text{Fe} - \text{белок}$ и $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белок}$ — белок сложная структура спектра флуоресценции исчезает (рис. 2, 3). Аналогичный симметричный спектр флуоресценции наблюдался и в том случае, если модификация $\epsilon\text{-АТР}$ подвергался $\text{Fe} - \text{белок}$, предварительно отделенный от $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$. При этом степень модификации $\text{Fe} - \text{белка} \epsilon\text{-АТР}$, как и в случае нитрогеназы, резко снижалась, если модификация проводилась в присутствии 10-кратного молярного избытка АТР. Следовательно, при модификации $\text{Fe} - \text{белка}$, как и в случае нитрогеназы, $\epsilon\text{-АТР}$ специфически связывается с одним и тем же АТР-азным центром $\text{Fe} - \text{белка}$.

Можно полагать, что различные состояния флуоресцентной метки, связанной с $\text{Fe} - \text{белком}$ в нативном ферменте, обусловлены взаимодействием $\text{Fe} - \text{белка}$ с $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белком}$ и что АТР-азный центр $\text{Fe} - \text{белка}$ находится в месте контакта $\text{Fe} - \text{белка}$ и $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$.

АТР в АТР-азном центре $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$ должен непосредственно примыкать к ближайшему ЖСК. Полученные данные не позволяют сделать однозначных выводов о локализации АТР-азного центра $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$ относительно $\text{Fe} - \text{белка}$ в нативной нитрогеназе. Однако, поскольку отдельные белковые компоненты нитрогеназы не обладают ферментативной активностью, не исключено, что этот АТР-азный центр находится в месте контакта между $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белком}$ и $\text{Fe} - \text{белком}$. Так как АТР-азный центр $\text{Fe} - \text{белка}$ находится на расстоянии ≈ 3 нм от ЖСК $\text{Fe} - \text{белка}$ и примерно на таком же расстоянии от ЖСК $\text{Mo} - \text{Fe} - \text{белка}$, очевидно,

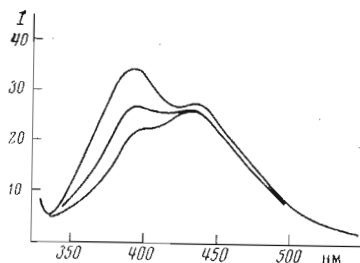


Рис. 4. Спектры флуоресценции модифицированной нитрогеназы, полученные в различных экспериментах

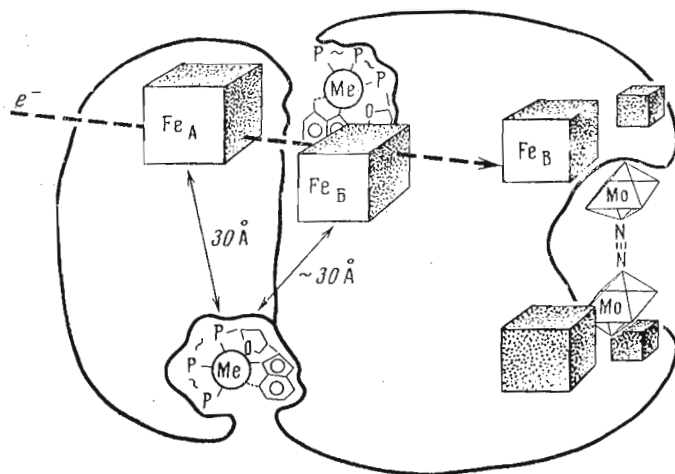


Рис. 5. Схема взаимного расположения активных центров нитрогеназы

что АТР-азный центр Fe — белка удален от АТР-азного центра Мо — Fe — белка на расстояние $\approx 3,0$ нм. Если принять во внимание, что Fe — белок состоит из двух субъединиц с молекулярным весом $\approx 25\,000$, то, учитывая допустимые линейные размеры Fe — белка, его ЖСК, по-видимому, должен находиться рядом с ЖСК и соответственно с АТР-азным центром Мо — Fe — белка.

Нитрогеназа содержит две свободные высокорекреационные SH-группы, необходимые для АТР-азной реакции [7, 14]. Эти SH-группы входят в состав Fe — белка [16] и расположены рядом с ЖСК [15—16]. Поэтому логично предположить, что свободные SH-группы Fe — белка принимают участие в формировании АТР-азного центра Мо — Fe — белка. Поскольку этот АТР-азный центр расположен рядом с ЖСК, который принимает участие в переносе электрона на молекулу N_2 , по-видимому, именно он и принимает участие в «активации» электрона.

Ранее были обнаружены два АТР-азных центра в составе Fe — белка [18], имеющих разные константы диссоциации для АТР и АДФ. Константа диссоциации для АДФ с одним из этих центров почти в 3 раза меньше, чем для АТР. По нашим данным, АТР-азный центр, расположенный на Fe — белке, находится вдали от ЖСК, играющих важную роль в восстановлении N_2 . Поэтому можно полагать, что этот центр играет регуляторную роль, специфически связывая АДФ. Второй АТР-азный центр Fe — белка, по-видимому, идентичен АТР-азному центру, который должен формироваться, как мы полагаем, с участием как аминокислотных остатков Мо — Fe — белка, так и Fe — белка.

Модель топографии активных центров нитрогеназы с учетом полученных данных представлена на рис. 5. Механизм действия АТР можно представить следующим образом. Электрон от восстановителя ($Na_2S_2O_4$, ферредоксин или флаводоксин) поступает на ЖСК Fe — белка (Fe_A). АТР связывается с АТР-азным центром Fe — белка. Связывание АТР с АТР-азным центром Fe — белка приводит к изменению конформации полипептидной цепи Fe — белка, в результате чего Fe_A Fe — белка подходит к ЖСК Мо — Fe — белка (Fe_B). Вторая молекула АТР, расположенная в АТР-азном центре Мо — Fe — белка, «активирует» электрон. Активированный электрон далее переносится на Fe_B Мо — Fe — белка с образованием сильного восстановительного центра на Fe_B или на ЖСК, расположенном на некотором расстоянии от АТР-азного центра Мо — Fe — белка (Fe_B), что приводит к появлению сигнала ЭПР Мо — Fe — белка [10—12]. Fe_B или Fe_B восстанавливает молекулярный азот по многоэлектронному механизму,

как описано ранее [3, 24]. Если в реакционной системе накапливается ADP, то ADP связывается с АТР-азным центром Fe — белка. Связывание ADP в АТР-азном центре Fe — белка приводит к конформационному переходу полипептидной цепи Fe — белка, в результате которого Fe_A отходит от Fe_B. При этом нарушается механизм сопряжения реакции гидролиза АТР в АТР-азном центре Mo — Fe — белка с «активацией» электрона и нитрогеназа не восстанавливает N₂.

Экспериментальная часть

Выделение нитрогеназы, Fe — белка и Mo — Fe — белка проводили по методу [4] в модификации, подробное описание которой будет опубликовано отдельно. Активность фермента определяли по степени восстановления C₂H₂ до C₂H₄ газохроматографическим методом с пламенно-ионизационным детектором [4]. Удельная активность препаратов фермента варьировала от 450 до 500 нмоль C₂H₄ за 1 мин на 1 мг белка. ε-АТР получали по методу [25] реакцией АТР с 0,5 М хлорацетальдегидом, рН 4,5 (37°, 48 ч) и очищали ионообменной хроматографией на дауэксе 1 × 8 (НСО₃⁻-форма; элюция 0,2—1,0 М триэтиламмонийбикарбонатом, рН 7,8) с последующей гель-фильтрацией через сефадекс G-10 (элюция водой). Выход ε-АТР 72%, вещество хроматографически однородно и по спектральным данным идентично описанному ранее [21].

Ковалентное присоединение ε-АТР к нитрогеназе или Fe — белку проводили по методике, предложенной в работе [17]. Для этого ε-АТР (0,01 ммоль) окисляли эквимолярным количеством Na₃H₂IO₆ («Reanal», Венгрия), добавляли к 20 мл нитрогеназы (15 мг белка на 1 мл) или к 5 мл раствора Fe — белка (5 мг белка на 1 мл) в 0,1 М трис-НСI буфере (рН 7,0), через 1 ч образуящееся шиффово основание восстанавливали добавлением NaBH₄ (0,1 ммоль). ε-АТР, не присоединенный к белку, отделяли гель-фильтрацией (3 мл раствора нитрогеназы или Fe — белка; колонка с сефадексом G-25, 1,5 × 20 см). Все операции с нитрогеназой и Fe — белком проводили в атмосфере Ar особой чистоты. Для получения Fe — белка и Mo — Fe — белка, модифицированных ε-АТР, модифицированную нитрогеназу разделяли на белковые компоненты хроматографией на DEAE-целлюлозе. В колонке DEAE-целлюлозы создавали инертную атмосферу, как описано ранее [4]. Нитрогеназу наносили на DEAE-целлюлозу в атмосфере Ar особой чистоты, после чего Na₂S₂O₄ удаляли из колонки пропусканием 30 мл 0,15 М NaCl. Fe — белок и Mo — Fe — белок элюировали, как описано ранее [4] за исключением того, что все элюирующие растворы не содержали Na₂S₂O₄. Перед использованием из всех элюирующих растворов тщательно удаляли растворенный кислород и растворы хранили в атмосфере Ar особой чистоты.

Спектры флуоресценции регистрировали в приборе, описанном ранее [26], но с автоматической регистрацией спектра. Эмиссию флуоресценции ε-АТР возбуждали при 313 нм. Представленные спектры флуоресценции корректировали на спектральную чувствительность фотоумножителя. Спектры поглощения регистрировали в спектрофотометре «Uniscam» SP-800 (Англия) в кварцевых кюветках (1 × 1 см). Все спектральные работы проводили в атмосфере Ar особой чистоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mortenson L. E., Jeng D. Y., Morris J. A. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, 141, 516—521.
2. Hurdy R. W. F., Burns R. C. (1968) *Annual Rev. Biochem.*, 37, 331—353.
3. Шилов А. Е., Лихтенштейн Г. И. (1974). *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 518—537.
4. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Левченко Л. А., Куликов А. В. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 46—52.
5. Halfield K. L., Bulen W. A. (1969). *Biochemistry*, 8, 5103—5109.

6. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Котельников А. И., Лихтенштейн Г. И. (1973) Изв. АН СССР. Сер. биол., 488—498.
7. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Котельников А. И., Алфимова Е. Я., Лихтенштейн Г. И., Яковлев В. А. (1973) Механизм биологической фиксации молекулярного азота, стр. 16, Черноголовка.
8. Walker G. A., Mortenson L. E. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 53, 904—909.
9. Yates W. G. (1972) Eur. J. Biochem., 23, 386—392.
10. Smith V. E., Lowe D. J., Bray R. C. (1973) Biochem. J., 135, 331—341.
11. Zumft W. G., Palmer G., Mortenson L. E. (1973) Biochim. et biophys. acta, 292, 413—421.
12. Mortenson L. E., Zumft W. G., Palmer G. (1973) Biochim. et biophys. acta, 292, 422—435.
13. Сырцова Л. А., Назарова И. И., Писарская Т. Н., Назаров В. Б. (1972) Докл. АН СССР, 206, 367—368.
14. Гвоздев Р. И., Садков А. П., Левченко Л. А., Куликов А. И., Воробьев Л. В. (1972) Изв. АН СССР. Сер. биол., 246—254.
15. Алфимова Е. Я., Сырцова Л. А., Писарская Т. Н., Лихтенштейн Г. И. (1974) Молекулярн. биология, 8, 676—679.
16. Лихтенштейн Г. И., Левченко Л. А., Раевский А. В., Садков А. П., Пивоварова Т. С., Гвоздев Р. И. (1973) Докл. АН СССР, 213, 1492—1494.
17. Воробьев Л. В., Котельников А. И., Кост А. А., Гвоздев Р. И. (1975) Биоорганическая химия, 1, 208—213.
18. Tso Man-Gin W., Burrell R. H. (1973) Biochem. et biophys. acta, 309, 263—270.
19. Forster T. (1946) Naturwiss. Unter., 33, 166—175.
20. Галапин М. Д. (1960) Труды физич. института АН СССР, 12, 3—21.
21. Secrist J. A., Barrio J. A., Leonard W. J., Weber G. (1972) Biochemistry, 11, 3499—3506.
22. Sober H. (1970) The Handbook of biochemistry. 2nd Addition, Chemical Rubber Co., p. 372.
23. Котельников А. И. (1974) Исследование многофункционального активного центра нитрогеназы физико-химическими методами, канд. дис., Долгопрудный.
24. Лихтенштейн Г. И., Шилов А. Е. (1970) Ж. физ. химии, 44, 849—856.
25. Kochetov N. K., Shibaev V. N., Kost A. A. (1971) Tetrahedron Lett., 22, 1993—1997.
26. Пивоваров А. П., Ершов Ю. А., Луковников А. Ф. (1966). Пластические массы, 10, 7—9.

Поступила в редакцию
28.XI.1974

**STUDY ON THE MECHANISM OF NITROGENASE ACTION BY RESONANCE
ENERGY TRANSFER BETWEEN LUMINESCENT AFFINITY LABEL,
COVALENTLY ATTACHED TO ATPase SITE, AND IRON-SULFUR CLUSTER**

GVOZDEV R. I., KOTEL'NIKOV A. I., PIVOVAROV A. P.,
SADKOV A. P., KOST A. A.

*Branch of Institute of Chemical Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka,
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

1, N⁶-Etheno-ATP(ϵ -ATP), a luminescent analog of ATP, covalently bound to nitrogenase was shown to attach to enzyme ATPase site by affinity. Nitrogenase was separated into Fe-protein and Mo-protein, whereby ϵ -ATP was proved to associate with both components. This fact is indicative of the presence of at least two ATPase sites in nitrogenase. Based on the theory of resonance energy transfer, the distances were estimated between ATPase site and iron-sulfur cluster (ISC) in Fe-protein (~ 3 nm) and Mo-Fe-protein (~ 1 nm), between ATPase site of Fe-protein and ISC of Mo-Fe-protein (~ 3 nm), as well as between two ATPase sites (~ 3 nm). The implication of nitrogenase ATPase sites in the mechanism of nitrogen reduction is discussed.