



УДК 576.851.151

СОПРЯЖЕНИЕ АТР-АЗНОГО И СУБСТРАТСВЯЗЫВАЮЩЕГО
ЦЕНТРОВ В НИТРОГЕНАЗЕ *AZOTOBACTER VINELANDII*Сырцова Л. А., Писарская Т. Н., Назарова И. И.,
Узенская А. М., Лихтенштейн Г. И.

Отделение Института химической физики Академии наук СССР, Черноголовка

Методом ЯМР по измерению T_1 протонов воды изучено взаимодействие нитрогеназы и ее белковых компонентов Мо-Fe-белка и Fe-белка с АТР и Mn^{2+} . Показано, что нитрогеназа и Fe-белок образуют с АТР и Mn^{2+} тройные комплексы различной структуры. Предложен новый субстрат нитрогеназы — азидодитиокарбонат натрия (АДТК). Для выяснения функциональной связи АТР-азного и субстратсвязывающего центров в нитрогеназе использовано фотоаффинное мечение нитрогеназы по субстратсвязывающему центру АДТК. Выяснено, что АДТК может взаимодействовать с нативной нитрогеназой без специального восстановления, без АТР и Mn^{2+} . На основании этих данных обсуждается возможность существования в нитрогеназе единого центра связывания субстратов и ингибиторов — перехватчиков электронов.

Нитрогеназа (nitrogen: acceptor oxidoreductase, КФ 1.7.99.2) — фермент, катализирующий восстановление ряда субстратов, содержащих тройные связи: азота, ацетилена, азидов, нитрилов и т. д. [1, 2]. Фермент из *Azotobacter vinelandii* состоит из двух негеминовых железо-серных белковых компонентов: Fe-белка (M 64 000, 4 Fe) и Мо-Fe-белка (M 216 000, 24 Fe и 2 Мо) [3]. Для восстановления субстратов помимо фермента необходимы восстановитель ($Na_2S_2O_4$, ферредоксин), АТР и ионы двухвалентных металлов (Mg^{2+} или Mn^{2+} и др.). Восстановление азота и сопряженный с этим процессом гидролиз АТР возможны лишь в присутствии обоих компонентов нитрогеназы [1, 2].

Механизм действия АТР до сих пор остается неясным. Ранее нами было показано, что нитрогеназа образует тройной комплекс фермент-нитрогеназа — Mn^{2+} —АТР в присутствии АТР и Mn^{2+} ; превращение АТР в АДФ под действием нитрогеназы сопровождается конформационными изменениями белка [4]; на участке связывания АТР в нитрогеназе есть две свободные сульфгидрильные группы [5], которые расположены вблизи от кластера негеминового железа [6]. Было установлено, что под действием АТР происходит перенос электрона от Fe-белка к Мо-Fe-белку [7].

В настоящей работе мы поставили задачу исследовать характер взаимодействия АТР-азного центра нитрогеназы с ее субстратсвязывающим центром, в частности установить: а) как взаимодействует АТР с отдельными компонентами нитрогеназы и как меняется это взаимодействие при образовании нитрогеназного комплекса, б) нужна ли АТР для взаимодействия субстрата с нитрогеназой, в) как сказывается связывание суб-

Сокращение: АДТК — азидодитиокарбонат натрия.

Таблица 1

Результаты экспериментов по исследованию взаимодействия АТР с нитрогеназой и ее компонентами: Мо-Fe-белком и Fe-белком
 Растворитель — 0,1 М Трис-НСl-буфер, рН 7,2; $1/T_1 = 0,52 \text{ с}^{-1}$.
 Время инкубации перед измерением T_1 — 30 мин. В таблице приведены средние значения из 3 параллельных опытов. Ошибка $\pm 5\%$

Исследуемый белок, М · 10 ⁻⁶	Концентрация в ампуле		$1/T_1, \text{ с}^{-1}$
	Mn ²⁺ , М · 10 ⁻⁴	АТР, М · 10 ⁻⁴	
—	1,2	—	1,75
—	1,2	2	2,10
Мо-Fe-белок, 5	—	—	0,52
» 5	1,2	—	2,90
» 5	1,2	2	2,60
Fe-белок, 5	—	—	0,52
» 5	1,2	—	2,10
» 5	1,2	2	2,25
Мо-Fe-белок, 5	1,2	—	3,05
Fe-белок, 5	—	—	—
Мо-Fe-белок, 5	1,2	2	2,80
Fe-белок, 5	—	—	—
Fe-белок, 10	5	—	7,4
» 10	5	5	9,6
—	5	5	7,8

страта с нитрогеназой на АТР-азный центр, г) нужно ли восстановление субстратсвязывающего центра нитрогеназы для его взаимодействия с субстратом.

Работа выполнена на гомогенных препаратах белковых компонентов нитрогеназы или нитрогеназного комплекса из *Az. vinelandii*.

Взаимодействие АТР с нитрогеназой и ее отдельными компонентами исследовалось методом ЯМР по измерению времени спин-решеточной релаксации (T_1) протонов воды. Известно, что величина T_1 протонов воды в растворе фермента в присутствии парамагнитного иона и субстрата зависит от характера взаимодействия фермента с этим ионом и субстратом [8, 9].

Полученные данные (табл. 1) позволяют сделать определенные качественные заключения о характере взаимодействия АТР с нитрогеназой и ее компонентами.

Увеличение $1/T_1$ в растворах Мо-Fe-белка и Fe-белка в присутствии Mn^{2+} свидетельствует об образовании двойных комплексов этих компонентов нитрогеназы с Mn^{2+} . Увеличение скорости релаксации наблюдается также в случае взаимодействия Mn^{2+} с АТР.

В присутствии АТР в условиях наших опытов вклад ионов Mn^{2+} пренебрежимо мал, поскольку практически весь Mn^{2+} связан в двойной комплекс $Mn^{2+} - АТР$ (константа диссоциации комплекса $Mn^{2+} - АТР$ 10^{-5} М [9] при $10^{-3} \text{ М} > [АТР] > 0$).

В растворах, содержащих Mn^{2+} , АТР и белковые компоненты (Б), имеется целый ряд комплексов ($Mn^{2+} - АТР$, $Mn^{2+} - АТР - Б$), оказывающих влияние на релаксацию протонов воды. При одинаковой начальной концентрации Mn^{2+} в принципе возможны три варианта:

1) интегральная скорость релаксации $(1/T_1)_{ин}$ больше $1/T_1$ для каждого из двойных комплексов $Mn^{2+} - АТР$ или $Mn^{2+} - Б$. Этот результат однозначно свидетельствует об образовании тройного комплекса $Mn^{2+} - АТР - Б$;

2) величина $(1/T_1)_{ин}$ является промежуточной между значениями $1/T_1$ для двойных комплексов. В этом случае изменение $(1/T_1)_{ин}$ может быть обусловлено как образованием тройного комплекса, так и перераспреде-

лением Mn^{2+} между АТР и белковым компонентом, и для выбора между возможными вариантами необходимы независимые данные;

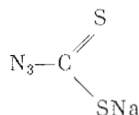
3) величина $(1/T_1)_{ин}$ меньше $1/T_1$ для каждого из двойных комплексов, что также характерно для образования тройного комплекса.

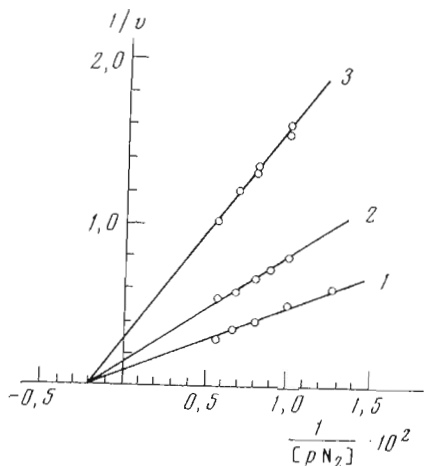
При прибавлении АТР к бинарному комплексу Мо-Fe-белка наблюдалось уменьшение $1/T_1$, что скорее всего свидетельствует о существовании системы двух бинарных комплексов с Mn^{2+} : Мо-Fe-белка и АТР. При прибавлении АТР к раствору Fe-белка наблюдается увеличение $1/T_1$ по сравнению с $1/T_1$ для бинарного комплекса Fe-белка с Mn^{2+} , что говорит об образовании тройного комплекса Fe-белка: Fe-белок—АТР— Mn^{2+} . Блокирование с помощью *n*-хлормеркурибензоата SH-групп Fe-белка не влияло на $(1/T_1)_{ин}$ в случае комплекса Fe-белок— Mn^{2+} , но в присутствии АТР снижало $(1/T_1)_{ин}$ до величины, соответствующей комплексу Mn^{2+} —АТР. Вывод об образовании Fe-белком тройного комплекса подкрепляется работами, в которых наблюдалось влияние комплекса Mg^{2+} —АТР на спектр ЭПР Fe-белка [7].

В случае смеси компонентов (табл. 1) или нитрогеназы [4] значение $(1/T_1)_{ин}$ в присутствии АТР и Mn^{2+} было промежуточным между значениями $1/T_1$ для бинарного комплекса нитрогеназы — Mn^{2+} и Mn^{2+} —АТР. Однако в присутствии *n*-хлормеркурибензоата—ингибитора АТР-азного центра, не влияющего на $(1/T_1)_{ин}$ в случае комплекса нитрогеназы— Mn^{2+} , величина $(1/T_1)_{ин}$ тройного комплекса нитрогеназы [4] или смеси Мо-Fe-белка и Fe-белка соответствовала форме Mn^{2+} —АТР. Это свидетельствует о том, что блокирование SH-групп препятствует образованию комплекса с Mn^{2+} , который в условиях опыта практически весь связан с АТР. Очевидно, что фиксируемые в отсутствие *n*-хлормеркурибензоата значения $1/T_1$ соответствуют тройному комплексу: нитрогеназы — Mn^{2+} —АТР. В случае Мо-Fe-белка *n*-хлормеркурибензоат не оказывал влияния на $(1/T_1)_{ин}$ в присутствии Mn^{2+} и АТР по сравнению с системой бинарного комплекса Мо-Fe-белок— Mn^{2+} .

Тот факт, что в случае нитрогеназы происходит уменьшение $1/T_1$, а в случае Fe-белка увеличение $1/T_1$ по сравнению с $1/T_1$ для соответствующих бинарных комплексов, позволяет предположить, что характер взаимодействия АТР с нитрогеназой и Fe-белком различен. Хотя АТР взаимодействует с нитрогеназой и Fe-белком на участке, доступном воде, в случае нитрогеназы структура тройного комплекса иная; Mn^{2+} , по-видимому, менее доступен воде, чем в случае Fe-белка. Возможно, тройной комплекс нитрогеназы с АТР и Mn^{2+} располагается на стыке Fe-белка и Мо-Fe-белка нитрогеназы и существуют стерические препятствия для доступа к нему воды. Можно также допустить, что в нитрогеназе существует дополнительный центр связывания АТР, например на Мо-Fe-белке.

Для изучения взаимосвязи между АТР-азным и субстратсвязывающим центрами в нитрогеназе представлялось необходимым использовать субстрат, связывание которого с окисленным и восстановленным состоянием фермента могло быть зафиксировано независимым методом. Предполагается, что в связывании субстрата принимает участие входящий в состав Мо-Fe-белка атом молибдена [10]. Однако в нативной нитрогеназе ни Мо, ни его комплексы не проявляются ни в спектре ЭПР, ни в спектре абсорбции. Представлялось интересным подобрать субстрат, который стал бы бифункциональным агентом и кроме группы, связывающейся и восстанавливаемой нитрогеназой, содержал группировку, обеспечивающую фотоаффинное мечение, приводящее к инактивированию фермента. Таким соединением явился АДТК:



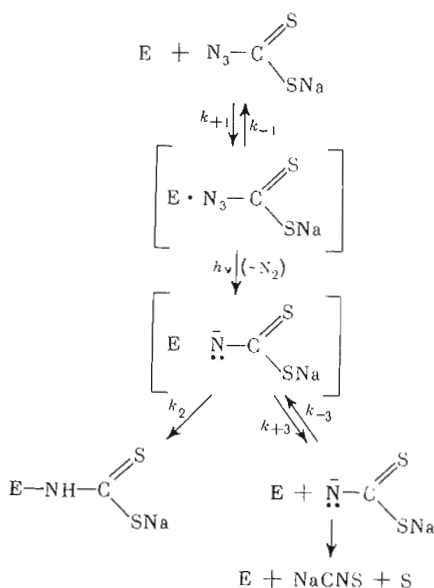


Влияние АДТК на азотфиксирующую активность нитрогеназы. Зависимость в обратных координатах азотфиксирующей активности нитрогеназы (v , отн. ед.) от концентрации азота (pN_2 , мм) (1), то же в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ М (2) и 10^{-2} М (3) азидодитиокарбоната натрия

Было установлено (рисунок), что АДТК — ингибитор нитрогеназы (50% ингибирование азотфиксирующей активности наблюдается при $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ М АДТК). Аналогичным образом АДТК ингибирует выделение водорода, не влияя на АТР-азную активность нитрогеназы. Обнаружен один из продуктов восстановления АДТК — аммиак. Таким образом, АДТК не только ингибитор, но и субстрат нитрогеназы.

Поскольку азидная группировка фотоактивна, АДТК был использован для фотоаффинного мечения нитрогеназы (E) по схеме 1:

С х е м а 1



На этой схеме представлен возможный путь фотоаффинного мечения нитрогеназы с помощью АДТК. Если нитрогеназа образует комплекс с АДТК; то образующийся на свете нитреповый радикал, способный мгновенно реагировать почти с любой расположенной рядом группировкой [11], должен ковалентно связываться с субстратсвязывающим центром нитрогеназы и, таким образом, необратимо инактивировать фермент. Нитреповый радикал в растворе распадается с выделением серы и роданида [12].

Влияние фотоаффинного мечения нитрогеназы АДТК на азотфиксирующую активность нитрогеназы
Среднее из 3 опытов, ошибка 5%

Обработка нитрогеназы	Азотфиксирующая активность нитрогеназы, моль N ₂ /мин/мг белка	Обработка нитрогеназы	Азотфиксирующая активность нитрогеназы, моль N ₂ /мин/мг белка
Исходная нитрогеназа	192	Инкубация с АДТК,	143
Облучение, 15 мин	173	5·10 ⁻⁴ М, 30 мин	
Облучение, 30 мин	173	Облучение в присутствии АДТК, 5·10 ⁻⁴ М,	64
Инкубация с АДТК, 5·10 ⁻⁴ , 15 мин	153	15 мин	
		Облучение в присутствии АДТК, 5·10 ⁻⁴ М,	25
		30 мин	

Таблица 3

Влияние фотоаффинного мечения нитрогеназы АДТК на АТР-азную активность нитрогеназы

Данные опытов с тремя различными препаратами нитрогеназы

Обработка нитрогеназы	АТР-азная активность нитрогеназы, нмоль фосфата/мг белка в 1 мин *		
Исходная нитрогеназа	580±30	950±45	300±15
Облучение, 15 мин		830±40	
Облучение, 30 мин	590±30		300±15
Инкубация с АДТК, 5·10 ⁻⁴ М, 15 мин			370±20
Инкубация с АДТК, 5·10 ⁻⁴ М, 30 мин	600±30		320±15
Облучение в присутствии АДТК, 5·10 ⁻⁵ М, 15 мин		800±40	320±15
Облучение в присутствии АДТК, 5·10 ⁻⁴ М, 30 мин	400±20		

* Среднее из 3 параллельных опытов.

Таким образом, АДТК может быть использован для фотоаффинного мечения нитрогеназы и исследования характера сопряжения АТР-азного и субстратсвязывающего центров в нитрогеназе. Предполагалось выяснить, нужно ли для взаимодействия нитрогеназы с субстратом функционирование АТР-азного центра, предварительное восстановление дитионитом или присутствие Mg²⁺ и АТР. Представлялось интересным определить, как влияет на АТР-азный центр связывание нитрогеназы с субстратом.

Как видно из табл. 2, нативная нитрогеназа связывается с АДТК без предварительного восстановления: при облучении в присутствии АДТК наблюдается падение азотфиксирующей активности фермента. Специальные опыты показали, что АДТК разлагается на свету с выделением азота, и первичные продукты фоторазложения АДТК в растворе (роданид и сера) не ингибируют нитрогеназу при 5·10⁻⁴ М. Роданид ингибирует азотфиксирующую активность нитрогеназы при 10⁻² М лишь на 30%. Неспецифического связывания АДТК белковой поверхностью нитрогеназы также не может происходить, так как наши опыты показали, что при облучении альбумина, гемоглобина, лизоцима в концентрациях 10⁻⁵—10⁻³ М в присутствии АДТК не происходит его связывания этими белками. Это дает основание считать, что при фотоаффинном мечении при посредстве азидов связывание нитрена действительно происходит лишь по субстратсвязывающему центру [11].

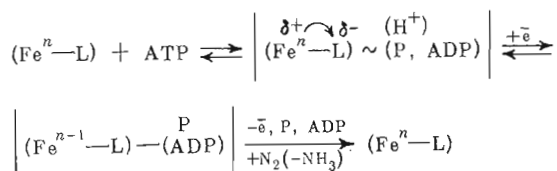
Фотоаффинное присоединение АДТК к нитрогеназе не приводит к ингибированию АТР-азной активности (табл. 3). Таким образом, отключение

субстратсвязывающего участка не нарушает работу АТР-азного центра. Этот результат подтверждает вывод о пространственном разделении АТР-азного и субстратсвязывающего участков фермента [13]. Специальные опыты показали, что восстановление нитрогеназы, а также Mg^{2+} — АТР не влияют на взаимодействие нитрогеназы с АДТК.

Этот вывод может объяснить сложный характер взаимодействия между ингибиторами и субстратами нитрогеназы. Поскольку некоторые субстраты нитрогеназы неконкурентны по отношению к азоту и друг к другу, существует предположение о мультиплетных участках субстратсвязывающего центра нитрогеназы [14]. В частности, неконкурентность по отношению к азоту (рисунок) объясняется тем, что АДТК, как следует из изложенного выше, может взаимодействовать с окисленным состоянием субстратсвязывающего центра нитрогеназы, а азот, судя по работам, выполненным на моделях нитрогеназы [15], должен взаимодействовать только с восстановленным состоянием субстратсвязывающего центра в нитрогеназе. В этом случае субстратсвязывающий центр может быть единым для всех субстратов. Субстрат, например азид, который связывается с окисленным состоянием субстратсвязывающего центра нитрогеназы и для восстановления которого нужны лишь 2 электрона, а не 6, как в случае азота, будет по отношению к последнему неконкурентным ингибитором-перехватчиком электронов.

В заключение рассмотрим, как на основании вышеизложенного можно представить себе механизм действия АТР. Учтем следующие факты: 1) АТР не подготавливает субстратсвязывающий центр для его взаимодействия с субстратом (это следует из данной работы); 2) АТР связывается в нитрогеназе рядом с кластером негемового железа [6, 16]; 3) хотя Fe-белок и связывается с АТР, он не расщепляет АТР и его потенциал в присутствии АТР и Mg^{2+} (-400 мВ при рН 7) [17] недостаточен для восстановления азота [1]; 4) нитрогеназа реагирует с АТР не так, как Fe-белок (это следует из настоящей работы); 5) в присутствии АТР происходит перенос электрона с Fe-белка на Mo-Fe-белок [7, 10]; 6) окислительно-восстановительный потенциал Mo-Fe-белка, восстановленного $Na_2S_2O_4$ без Fe-белка, составляет -70 мВ при рН 7 [17], что недостаточно для восстановления субстрата, хотя субстратсвязывающий центр находится именно на Mo-Fe-белке [10]. Эти факты позволяют предположить, что основные события при гидролизе АТР в нитрогеназе происходят именно на Mo-Fe-белке и основная роль гидролиза АТР заключается в понижении редокс-потенциала Mo-Fe-белка по схеме 2:

Схема 2



n — валентность железа, равная 2 или 3, L — лиганд железа.

АТР связывается с Fe-белком на стыке с Mo-Fe-белком рядом с кластером негемового железа. Продукты гидролиза АТР— H^+ или фосфорил-ион могут осуществлять протонирование или фосфорилирование Mo-Fe-белка в районе негемового железа. В силу своих акцепторных свойств или за счет конформационных изменений белка H^+ или фосфорил-ион будут понижать электронную плотность на негемовом железе, что может облегчать перенос дополнительного электрона на Mo-Fe-белок и способствовать понижению его редокс-потенциала. Эта схема была впервые описана нами в работе [6], более подробно она обсуждалась в работе [18]. В настоящей работе описаны новые сведения, подтверждающие ее достоверность.

Очистка нитрогеназы из *Az. vinelandii*

№ п.п.	Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность белка, $^{15}\text{N}_2$ /мин/мг	Выход по белку, мг	Очистка, число раз
1	Исходный бесклеточный экстракт	300	50	4	15 000	1
2	Фракционирование протамин-сульфатом	45	30	30	1350	7,5
3	Прогрев в течение 10 мин при 55°	40	18	50	720	12,5
4	Хроматография на целлюлозе Whatman DE-32 и затем на сефадексе G-200	30	2,5	220	75	55
5	Разделение на 2 компонента на целлюлозе Whatman DE-52 Мо-Fe-белок Fe-белок	20	2,5	360		125
		10	1,42	500		

Экспериментальная часть

Выделение нитрогеназы проводили, как описано ранее [10], с введением дополнительных стадий для получения гомогенных препаратов (табл. 4).

Разделение нитрогеназы на 2 компонента осуществляли по методике [19] с некоторыми модификациями. Для перевода колонки с целлюлозой Whatman DE-52 в анаэробное состояние и для стабилизации нитрогеназы использовали смесь 0,1% раствора гидрохинона и 0,01% аскорбата натрия, как в работе [20]. DEAE-целлюлозу Whatman DE-52 уравнивали с 0,025 М Трис-НСl-буфером (рН 7,2), дегазировали и помещали в колонку (2,5 × 20 см). На всех последующих стадиях использовали такой же буфер.

Колонку переводили в анаэробное состояние промыванием 400 мл анаэробного, насыщенного аргоном буфера, затем 400 мл буфера, содержащего гидрохинон и аскорбат натрия. После этого в колонку вводили нитрогеназу и элюировали последовательно 100 мл буфера, 200 мл 0,1 М, 170 мл 0,25 М и 100 мл 0,35 М NaCl в буфере. Все элюирующие растворы были анаэробными, насыщены аргоном и содержали 0,1% гидрохинона и 0,01% аскорбата натрия. Фракции отбирали объемом 10 мл. Более 80% Мо-Fe-белка элюировалось в объеме 20 мл во фракции 0,25 М NaCl, а Fe-белок — в объеме 10—15 мл во фракции 0,35 М NaCl. Очистку нитрогеназы контролировали по величине ферментативной активности, диск-электрофорезу и анализу на содержание Мо и Fe. Азотфиксирующую активность измеряли по восстановлению $^{15}\text{N}_2$ в $^{15}\text{NH}_3$ масс-спектрометрически [21]. Активность компонента определяли титрованием избытком комплементарного белка. Специфическая активность Мо-Fe-белка 360 нмоль N_2 /мин/мг белка, Fe-белка — 500 нмоль N_2 /мин/мг белка, что соответствует активности по C_2H_2 соответственно 1450 и 2000 ед., т. е. обычной для гомогенных препаратов нитрогеназы активности [1, 3]. Аналитический диск-электрофорез осуществляли по методике [22] в присутствии додецилсульфата натрия. Белки предварительно разделяли на субъединицы по методике [23]. При этом в Мо-Fe-белке и Fe-белке соответственно фиксировали по одному типу субъединиц. Содержание Мо и Fe, определенное методом атомно-абсорбционной спектроскопии, совпадало с данными работы [3]. Для некоторых опытов получали гомогенный препарат нитрогеназы в виде комплекса белковых компонентов Мо-Fe-белка

Содержание молибдена и железа в нитрогеназе из *Az. vinelandii*

Определяемый элемент	Данные авторов *		Данные из работы [3]	
	Нитрогеназа комплекс и Fe-белка		Мо-Fe-белок	Fe-белок
	г/моль **	ат./моль		
Mo	202	2	1,54	—
	195	2		
Fe	1680	30,1	24	3,45
	1660	29,4		

* Содержание молибдена и железа определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

** Молекулярный вес нитрогеназы принят равным 276 500.

и Fe-белка без разделения на 2 компонента (стадия 4 в табл. 4). Для этого колонку ($2,5 \times 20$ см) с DEAE-целлюлозой Whatman DE-32 переводили в анаэробное состояние так же, как это описано выше для целлюлозы Whatman DE-52, наносили нитрогеназу, элюировали балластные белки 100 мл 0,04 M $MgCl_2$ в буфере, затем пропускали линейный градиент $MgCl_2$ (от 0,04 до 0,2 M) в буфере в объеме 200 мл. Нитрогеназный комплекс элюировали при 0,09 M $MgCl_2$ и для отделения $MgCl_2$ пропускали через колонку ($2,5 \times 45$ см) с сефадексом G-200, предварительно переведенную в анаэробное состояние так же, как описано выше для целлюлозы DE-52 Whatman. Молекулярный вес нитрогеназы, определенный методом гель-фильтрации [24], составлял $260\,000 \pm 10\,000$; расчет на основании содержания двух ионов молибдена на молекулу составил 276 500, что соответствует содержанию в нитрогеназе одной молекулы Мо-Fe-белка и одной молекулы Fe-белка. Чистота нитрогеназы, получаемой по этой методике, по данным ультрацентрифугирования и диск-электрофореза, равна 95—100%. Так как аналитические характеристики нитрогеназного комплекса не описаны, мы приводим содержание в нем Mo и Fe (табл. 5).

Измерение времени спин-решеточной релаксации протонов воды (T_1) осуществляли при температуре $22 \pm 0,5^\circ$ на импульсном ЯМР-спектрометре конструкции нашего института на частоте 21 МГц. Полное время восстановления приемной системы при однокатушечной схеме датчика равнялось 10 мкс от начала 90-градусного импульса длительностью 2 мкс. T_1 определяли нулевым методом Карра — Парсела [25] в ампулах, снабженных затвором, позволяющим проводить вакуумирование и заполнение аргоном [13]. Ошибка составляла $\pm 5\%$. Измерения с АТР и нитрогеназой проводили в присутствии АТР-генерирующей системы — креатинфосфата (10 мкмоль/мл) и креатинкиназы (0,05 мг/мл). Такая концентрация АТР-генерирующей системы не влияла на величину $1/T_1$ в присутствии исследуемых концентраций Mn^{2+} и АТР, но в случае нитрогеназы поддерживала концентрацию АТР постоянной [4].

Азидодитиокарбоную кислоту получали по методике [12], переводили ее в натриевую соль обработкой эквимольным количеством едкого натра и хранили в виде водного раствора при -20° в атмосфере аргона.

Определение восстановления АДТК нитрогеназой проводили в атмосфере аргона в инкубационной системе: в реакционный сосуд объемом 40 мл вводили $^{15}N_2$ до указанного на оси абсцисс (рисунок) давления (pN_2), аргон до 760 мм и 20 мл инкубационной смеси, содержащей в 1 мл 4 мг нитрогеназы, 5 мкмоль АТР, 50 мкмоль креатинфосфата, 20 мкмоль $Na_2S_2O_4$, 150 мкмоль Трис-НСl-буфера (pH 7,2), 5 мкмоль $MgCl_2$, 0,75 мг креатинкиназы и указанное количество АДТК. После 5 мин инкубации при

30° реакцию останавливали прибавлением трихлоруксусной кислоты до 5% и определяли количество восстановленного N_2 масс-спектрометрически [21] (на оси ординат — количество образовавшегося $^{15}NH_3$ в отн. ед.). Для определения аммиака использовали метод изотопного разбавления. Через 30 мин инкубации к инкубационной системе прибавляли 0,3 мг водного раствора $(NH_4)_2SO_4$, обогащенного на 50% ^{15}N , проводили диффузию NH_3 по Конвею и определяли отношение $^{15}N/^{14}N$ масс-спектрометрически по методике работы [21]. Фоновое количество аммиака определяли в такой же инкубационной системе, но без АТР; отдельно определяли количество NH_3 в АТР. Активность нитрогеназы по АДТК составляла 65 нмоль NH_3 /мин/мг белка.

Фотоаффинное мечение проводили, как и в случае ароматических азидов, по описанной методике [11]. Образцы нитрогеназы (10^{-5} М), содержащие 0,1% гидрохинона и 0,01% аскорбата натрия с добавкой АДТК до $5 \cdot 10^{-4}$ М, освещали в атмосфере аргона в кварцевой кювете с длиной оптического пути 2 мм параллельным пучком света (λ 313 нм) лампы ДРШ-500. Питание лампы ДРШ-500, стабилизацию светового потока и его параллельность осуществляли с помощью универсального осветителя конструкции КБ ИХФ АН СССР. Монохроматический пучок света λ 313 нм вырезали с помощью набора жидкостных фильтров и фильтра УФС-2 по методике [26]. Время облучения 15 или 30 мин. После этого в обычных условиях [21] проводили измерение азотфиксирующей активности. В параллельных опытах определяли влияние на азотфиксирующую активность нитрогеназы облучения или инкубации с АДТК в темноте.

Определение АТР-азной активности осуществляли по методике работы [27].

Концентрацию белка определяли биуретовым методом [28] после отделения белковых препаратов от гидрохинона и аскорбата на колонке с сефадексом G-25.

Авторы выражают благодарность Е. А. Кудряшовой за выращивание биомассы азотобактера, С. М. Гусаровой за выполнение масс-спектрометрических анализов, Д. Н. Соколову за выполнение анализов на Мо и Fe, О. К. Кононыхиной — за техническую помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hardy R. W. F., Burns R. C. (1968) *Annu. Rev. Biochem.*, **37**, 331—358.
2. Шилов А. Е., Лихтенштейн Г. И. (1971) *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 518—537.
3. Kleiner D., Chen C. H. (1974) *Arch. Mikrobiol.*, **98**, 93—100.
4. Сырцова Л. А., Назарова И. И., Писарская Т. Н., Назаров В. Б. (1972) *Докл. АН СССР*, **206**, 367—369.
5. Сырцова Л. А., Куликов А. В., Писарская Т. Н., Лихтенштейн Г. И. (1971) *Механизм биологической фиксации молекулярного азота*, с. 78, Изд. АН СССР, М.
6. Алфимова Е. Я., Сырцова Л. А., Писарская Т. Н., Лихтенштейн Г. И. (1974) *Молекулярн. биология*, **8**, 676—685.
7. Mortenson L. E., Zumft W. G., Palmer G. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **292**, 422—435.
8. Cohn M., Reuben J. (1974) *Accounts Chem. Res.*, **4**, 214—222.
9. Reed G. H., Cohn M. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6547—6552.
10. Сырцова Л. А., Левченко Л. А., Фролов Е. Н., Лихтенштейн Г. И., Писарская Т. Н., Воробьев Л. В., Громогласова В. А. (1971) *Молекулярн. биология*, **5**, 726—734.
11. Ruoho A. E., Kiefer H., Roeder P. E., Singer S. J. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2567—2571.
12. Smith G. B. L., Wilcoxon F., Browne A. W. (1923) *J. Amer. Chem. Soc.*, **45**, 2604—2613.
13. Сырцова Л. А., Лихтенштейн Г. И., Писарская Т. Н., Бердянский В. Л., Лезяна В. П., Степанинц А. У. (1974) *Молекулярн. биология*, **8**, 824—831.
14. Rivera-Ortiz M., Burriss R. H. (1975) *J. Bacteriol.*, **123**, 537—545.
15. Шилов А. Е. (1974) *Успехи химии*, **43**, 863—902.
16. Куликов А. В., Сырцова Л. А., Лихтенштейн Г. И., Писарская Т. Н. (1975) *Молекулярн. биология*, **9**, 203—212.

17. Zumft W. G., Mortenson L. E., Palmer G. (1974) Eur. J. Biochem., 46, 525—535.
18. Лихтенштейн Г. И., Шильов А. Е. (1976) Докл. АН СССР, 227, 1127—1130.
19. Shah V. K., Brill W. J. (1973) Biochim. et biophys. acta, 305, 445—454.
20. Kajiyama Shozo, Nosoh Yoshiaki (1972) Arch. Mikrobiol., 85, 181—192.
21. Bulen W. A., Le Comte J. R. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 976—986.
22. Davis B. I. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—408.
23. Eady R. R., Smith B. E., Cook K. A., Postgate J. R. (1972) Biochem. J., 128, 655—675.
24. Детерман Г. (1970) Гель-хроматография, с. 158—175, «Мир», М.
25. Carr H. Y., Parcell E. M. (1954) Phys. Rev., 94, 640—646.
26. Калверт Д., Питтс Д. (1968) Фотохимия, с. 305—325, «Мир», М.
27. Липиде В. Р., Алфимова Е. Я., Слепко Г. И., Узенская А. М., Лихтенштейн Г. И. (1969) Докл. АН СССР, 185, 636—638.
28. Бэйли Д. (1965) Методы химии белков, с. 266, «Мир», М.

Поступила в редакцию
10.I.1977

COUPLING OF ATP-ase AND SUBSTRATE-BINDING SITES IN *AZOTOBACTER VINELANDII* NITROGENASE

SYRTSOVA L. A., PYSARSKAYA T. N., NAZAROVA I. I.,
UZENSKAYA A. M., LIKHTENSTEIN G. I.

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

The interaction of nitrogenase and its proteinaceous components, Mo-Fe-protein and Fe-protein, with ATP and Mn^{2+} has been investigated by means of NMR measurement of T_1 for water protons. It was shown that the nitrogenase and Fe-protein interaction with ATP and Mn^{2+} results in formation of ternary complexes of different structures. A new substrate of nitrogenase — azidodithiocarbonate — was suggested and used as photoaffinity label for elucidation of functional relationship between the ATP-ase and substrate-binding sites. It was found that azidodithiocarbonate can interact with native nitrogenase without preliminary reduction and shows no requirement for ATP and Mg^{2+} . Basing on these data, the possibility of existence in nitrogenase of the single active site or binding either substrates or inhibitors-electron interceptors,— has been discussed.