

棕色固氮菌固氮酶的金属原子簇

III. 邻菲啰啉处理的铁钼蛋白的催化活性、光谱特性与铁含量的关系

黄巨富 骆爱玲 梁寅初

(中国科学院植物研究所, 北京)

棕色固氮菌固氮酶铁钼蛋白与邻菲啰啉混合后, 生成一种红色的亚铁-邻菲啰啉螯合物。处理蛋白的 Mo 含量几乎不变, 但 Fe/Mo 比降低; 处理蛋白的乙炔还原活性、克分子消光系数 ϵ_{700nm} 和圆二色性克分子消光系数 $\Delta\epsilon_{430nm}$ 随着失去的 Fe 原子数目的增加而几乎成比例降低; 失去的活性可为轻度氧钝化的铁钼蛋白恢复。结果表明, 邻菲啰啉可能通过专一螯合 P-cluster 中的 Fe 原子而使其结构受到破坏, 从而使铁钼蛋白失去活性。由此可推论出, P-cluster 在铁钼蛋白还原底物过程中起着重要的作用。

关键词 邻菲啰啉; P-铁硫簇的功能; 铁钼蛋白; 棕色固氮菌

固氮酶由铁钼(FeMo)蛋白和铁(Fe)蛋白组成。已经知道, 络合和还原底物的中心存在于 FeMo 蛋白中, FeMo 蛋白分子量较大(约 220000—240000)并含有 Fe、Mo 和 S 原子^[1-6]。这些原子在 FeMo 蛋白中结合为至少三种类型不同的金属原子簇, 其中两种主要的原子簇为铁钼辅因子(FeMoco)和 P-铁硫原子簇(P-cluster)。1977 年, Shah 和 Brill^[7]首次从 FeMo 蛋白中提取出 FeMoco。许多证据都表明, FeMoco 是 FeMo 蛋白络合和还原底物的活性中心的重要组成部分^[1]。与此同时, P-cluster 也受到人们的重视, 用多种波谱, 例如穆斯鲍尔谱(Mössbauer)、圆二色散谱(CD)、磁圆二色散谱(MCD)、电子顺磁共振谱(EPR)和吸收光谱(ABS)等及用电化学和化学置换方法对 P-cluster 的类型、数目、氧化还原特性和氧敏感性等进行了大量的研究, 并得到了许多重要的结果^[3,5-15]。根据所得结果及其它铁硫(FeS)蛋白中铁硫簇的作用

提出关于 P-cluster 功能的种种假设^[15], 而且 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化和氧钝化的结果也只表明, P-cluster 受到破坏或损伤将导致 FeMo 蛋白活性的降低^[8,16-18]。至今很少见到单独使 FeMo 蛋白中的 P-cluster 受损伤而又不使 FeMoco 受损伤的方法, 证明 P-cluster 的损伤与蛋白活性存在相关性的报道, 进而得到它在 FeMo 蛋白中的作用的直接证据。

材料和方法

(一) 材料

1. “还原的 FeMo 蛋白” [FeMo(R)]: 根据前述方法^[19]得到棕色固氮菌固氮酶 FeMo 蛋白结晶溶液, 蛋白浓度为 20—25 mg/ml, 并含 0.3 mg/ml 的 $Na_2S_2O_4$ (DT)。

2. “处理蛋白” [FeMo(T)]: 用蒸馏水把邻

本文于 1987 年 3 月 7 日收到。

本所解雪梅、赵蒂莲和张宝田同志协助测定吸收光谱和制备样品, 本院生物物理所王熬金同志协助测定圆二色谱, 北京农业大学吴君绥先生等帮助测定金属含量, 在此一并致谢。

菲啰啉 (o-phenanthroline, 简称: o-phen.) 配制成 10mmol/L 左右的溶液, 抽真空充 Ar 后加至 FeMo(R), 使 o-phen/FeMo 分子比在扣除 2 倍 DT 分子数目后为 120—150, 用电磁搅拌器搅拌 5 min, 搅拌过程中用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 6.5 或不调 pH (约为 7.0)。然后在 25—28℃ 的水浴中保温 0—5 h, 将保温溶液 [FeMo(T)] 厌氧加到预先用 0.13mol/L NaCl 和 0.3mg/ml DT 的 Tris 缓冲液 (25 mmol/L, pH7.4) 充分平衡的 Sephadex G-25 (2.3 × 16cm) 柱的上端, 用相同缓冲液洗脱, 厌氧收集棕褐色的蛋白 [FeMo(G)] 和红色的螯合物溶液。分别测定它们的活性、蛋白浓度、金属含量和 ABS、CD 谱。

3. “曝氧蛋白” [FeMo(O)]: 用 1.0ml 注射器吸取 0.2ml 7.0mg/ml 的 FeMo(R), 随即拔去针头, 在室温 (15—16℃) 下曝氧 20min。

(二) 方法

1. FeMo 蛋白和 Fe 蛋白的分离、提纯、结晶、乙炔还原活性和蛋白浓度的测定参照前述方法进行^[12,13,19]。

2. Mo、Fe 原子含量的测定: 按 Ballentine 的方法^[20]消化样品, 用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICAP-9000) 测定样品的金属含量。

3. 吸收光谱测定: 使用 557 双光束、双波长分光光度计。

4. 圆二色谱测定: 使用法国制造的圆二色谱仪 (DICHROGRAPHE)。

5. 单位表示: 乙炔还原活性为 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}$ 蛋白⁻¹ · min⁻¹, ε_λ 、 $\Delta\varepsilon_\lambda$ 表示波长为 λ 处的克分子消光系数和圆二色性克分子消光系数, $\Delta\varepsilon_G/\Delta\varepsilon_R$ 为 FeMo (G) 与 FeMo (R) 的 $\Delta\varepsilon$ 比值, $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ 为同一样品在同一波长的 $\Delta\varepsilon$ 与 ε 的比值, 因可消除某些测定误差, 更能表示样品的特性^[2]。FeMo 蛋白分子量以 240000 计。

结果和讨论

(一) 还原的 FeMo 蛋白特性

从棕色固氮菌中分离提纯得到的结晶 FeMo 蛋白, Fe/Mo 原子比为 13.0—16.5, 如按每个蛋白分子含有 2 个 Mo 原子计算, 每个 FeMo 蛋白分子就含有 26.0—

33.0 个 Fe 原子 (表 1)。有时因蛋白浓度和金属含量测定存在误差, 使测出的 Fe 和 Mo 原子数目低至 20.0 和 1.3。与饱和量的 Fe 蛋白重组显示出 FeMo 蛋白的乙炔还原活性为 1600—2300。

(二) FeMo 蛋白的光谱特性与 Fe 含量的关系

1. 螯合作用: 把过量的 o-phen 加至 FeMo(R) 溶液, 使 o-phen/FeMo(R) 分子比为 120—150, 使 NaCl 的最终浓度为 0.10—0.15mol/L, 在室温下保温数分钟后便在 510nm 处出现一个吸收峰, 峰的高度随保温时间增加而加大, 直至反应达到平衡才稳定 (图 1)。o-phen 在 DT 存在时, 除在 370 nm 附近有较强的吸收外, 在可

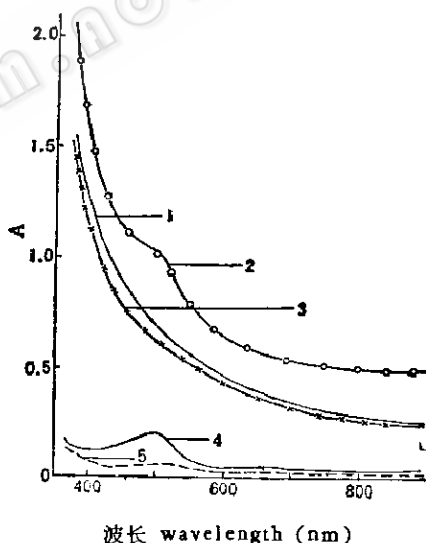


图 1 o-phenanthroline (3.26×10^{-3} moles) 对 FeMo 蛋白 (55.59mg) 吸收光谱的影响
Fig. 1 The effect of o-phenanthroline (3.26×10^{-3} moles) on the absorbance spectra of FeMo protein (55.59 mg)

1. FeMo(R), pro. concn.: 5.59mg/ml
2. FeMo(T), pro. concn.: 7.19 mg/ml;
o-phen. concn.: 5.56 mmol/L
3. FeMo(G), pro. concn.: 5.96 mg/ml,
collection vol.: 8.3ml
4. Red chelate compound, collection vol.:
22.0ml
5. o-phen, concn.: 5.56 mmol/L

见光其它区域的吸收都很小。所以, 在 510nm 处吸收峰不是 DT 还原 o-phen, 而是 o-phen 这种亚铁螯合剂从 FeMo 蛋白中螯合出 Fe 原子并形成红色螯合物引起的。螯合速度与 o-phen 过量程度、反应温度和 pH 等有关。当反应体系的 pH 为 6.5 左右时, 反应加快并伴随出现浑浊, 导致在波长大于 600 nm 时光吸收明显增加。也许是对蛋白结构起稳定作用的金属原子簇因 Fe 原子被螯合而受到破坏才使蛋白溶液出现浑浊。

将 o-phen 处理的 FeMo 蛋白经 Sephadex G-25 柱层析时, 除有少量的沉淀物沉积于柱上端表层外, 大部分蛋白和红色螯合物都先后从柱中流出, 并可完全分开。蛋白回收率达 80% 以上。图 1 和图 2 表明, 厌氧收集的 FeMo(G) 和红色螯合物的总吸收 [OD × 体积 (ml)] 几乎与分离前的 FeMo(T) 总吸收 (400—600 nm) 相等。FeMo(G) 在所有波长上的 ϵ 都比 FeMo(R) 小。红色螯合物也在 510nm 处有一吸收峰, 峰高随螯合程度提高而增加, 用亚铁-邻菲罗啉螯合物的克分子消光系数 ($\epsilon_{510\text{nm}} = 1.11 \times 10^{-4}$) [21] 计算的螯合物 Fe 原子数目与用电感耦合等离子体发

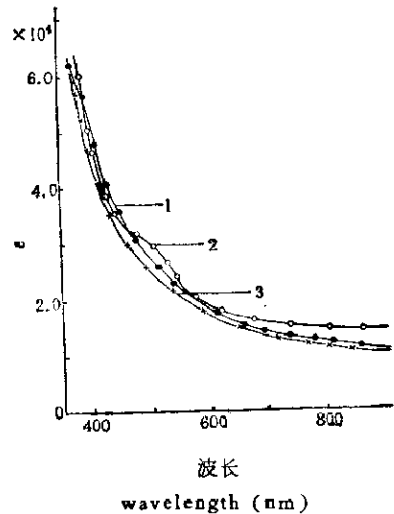


图 2 o-phen 对 FeMo 蛋白克分子消光系数的影响

Fig. 2 The effect of o-phenanthroline on the molar extinction coefficient (ϵ) of FeMo protein

1. FeMo (R) 2. FeMo(T) 3. FeMo (G)

射光谱仪测定的结果几乎相同, 而且还与蛋白失去的 Fe 原子总数相吻合 (表 1)。这表明, 红色螯合物就是 o-phen 从 FeMo 蛋白中螯合出来的 Fe 原与其形成的亚铁-邻菲罗啉螯合物。从 Mössbauer 和 EPR 的结果已经知道, 组成 FeMo 蛋白 P-cluster 的 Fe 原子为 16 个还原状态或高

表 1 o-phenanthroline 对 FeMo 蛋白活性和金属含量的影响

Table 1 The effect of o-phenanthroline on the activity and metals content of FeMo protein

实验 Exp.	样 品 Sample	蛋白回收 Recovery of protein (%)	比 活 Specific activity (%)	金属回收 Recovery of		每分子金属 含量 Metal per mol		每分子失去 金属原子 Metal lost per mol		用 ICAP 和 ABS 测定 螯合物 Fe 原子含量 推算每分子蛋白 Fe 原子 丢失数目 Fe lost/mol estimated from chelate compound by	
				Mo (%)	Fe (%)	Mo	Fe	Mo	Fe	ICAP	ABS
I	FeMo(R)	100	2250(100)	100	100	2.00	33.05	/	/	/	/
	FeMo(G)	82	1600 (71)	92	77	2.00	27.63	0	5.4	/	5.2—6.4
II	FeMo(R)	100	2100(100)	100	100	2.00	31.40	/	/	/	/
	FeMo(G)	96	1176 (56)	85	76	1.78	24.76	0.22	6.6	5.02	6.3—6.5

自旋亚铁原子^[3,5,6]。由此看来,邻菲啰啉整合的 Fe 原子来自 P-cluster。

2. 螯合作用对金属组成的影响: FeMo 蛋白经 o-phen 处理后 Fe 的含量明显降低。尽管少数结果表明 Mo 含量略有降低,但多数结果都表明 Mo 的含量几乎不降低,因而使 FeMo(G) 的 Fe/Mo 比下降(表 1)。这就表明, o-phen 只专一整合或者至少优先整合不含 Mo 原子的 P-cluster 中的 Fe 原子。

3. 螯合作用对吸收光谱的影响: Watt 等^[14]曾观察到, FeMo 蛋白的 ϵ_{700nm} 只随蛋白中的 P-cluster 得失电子数变化而成比例改变,而与 FeMoco 的氧化还原状态的变化无关。如果 o-phen 只整合 P-cluster 中的 Fe 原子,螯合后 P-cluster 数目就必然减少,因而导致 ϵ 的降低。这一假定与图 3 结果一致。 ϵ_{700nm} 随蛋白的 Fe 原子丢失数目的增加而直线降低。如果失去 16 个 Fe 原子, ϵ_{700nm} 就将降低 1/3 左右,这不仅与螯合物中的 Fe 原子主要来自 P-cluster 的观点不矛盾,而且还与

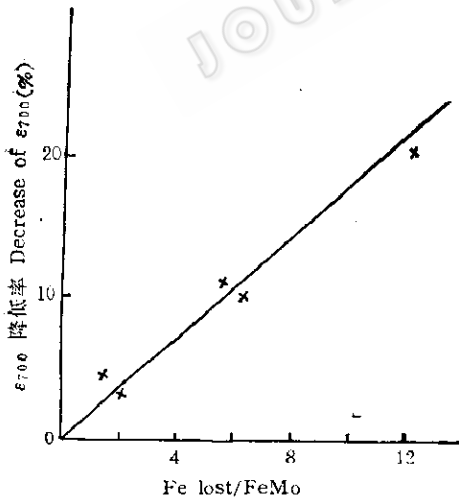


图3 o-phenanthroline 处理的 FeMo 蛋白的 ϵ_{700nm} 与 Fe 原子丢失的关系

Fig. 3 The relationship between ϵ_{700nm} and the loss of Fe atoms of FeMo protein treated with o-phenanthroline

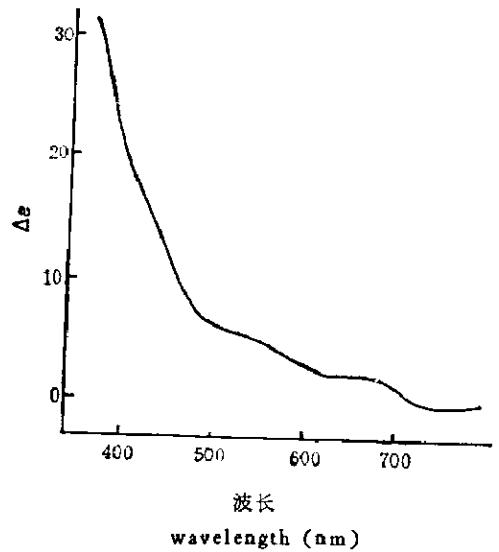


图4 FeMo(R) 的 CD 谱

Fig. 4 The CD spectrum of FeMo(R)

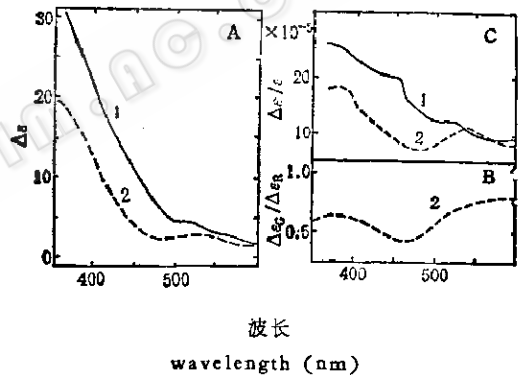


图5 o-phenanthroline 对 FeMo 蛋白的 CD 和 ABS 谱的影响

Fig. 5 The effect of o-phenanthroline on the CD and ABS spectra of FeMo protein

A. $\Delta\epsilon$ B. $\Delta\epsilon_G/\Delta\epsilon_R$ C. $\Delta\epsilon/\epsilon$
1. FeMo(R) 2. FeMo(G)

化学置换、EPR 和 Mössbauer^[6,10,11] 所表明的关于 FeMo 蛋白中有 16 个 Fe 原子组成 P-cluster 的结果也不矛盾。

4. 螯合作用对圆二色谱的影响: FeMo(R) 的 CD 谱与前已报道的结果相同^[8,12,13] (图 4)。Stephens 等^[8,12]曾指出, FeMo 蛋白在 450nm 附近的 CD 谱只反映 P-cluster 存在状态,因此可用 $\Delta\epsilon_{450nm}$

表 2 o-phenanthroline 对 FeMo 蛋白 Fe 含量、活性, CD 和 ABS 谱的影响

Table 2 The effect of o-phenanthroline on the Fe content, activity, CD and ABS of FeMo protein

实 验 Exp.	每分子丢失 Fe 原子 Fe lost per mol	活 性 activity (%)	$\Delta\epsilon_{450nm}$ (%)	$\Delta\epsilon_{450nm}/\epsilon_{450nm}$ (%)
1	0	100	100	100
2	2—3	72	77.4	79.6
3	5.5	71	81.6	79.1
4	6.6	56	71.6	67.6
5	12.0	27	40.2	42.6

或 $\Delta\epsilon_{450nm}/\epsilon_{450nm}$ 来表示 FeMo 蛋白中的 P-cluster 存在状态。o-phen 处理后, FeMo 蛋白在 540—600 nm 区域的 CD 谱变化较小, 在 360—540nm 区域变化显著, 变化最大的区域正好在 450nm 附近 (图 5)。这与氧化剂氧化时发生的变化很相似^[8,12]。但是, 氧化剂氧化 FeMo 蛋白是在没有 DT 存在下进行的, 氧化后如再加入 DT 等还原剂, FeMo 蛋白的 CD 谱就恢复至氧化前的还原状态^[8,9,13]。而 o-phen 处理后并经凝胶柱层析得到的 FeMo(G) 的 CD 谱是在除去 o-phen 及含有大量的 DT [DT/FeMo(G) 大于 40] 条件下测定的, 不可能像氧化剂氧化那样可被 DT 恢复至还原状态。因此, FeMo(G) 的 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 的降低不是反映 P-cluster 的氧化还原状态的变化, 而是反映 P-cluster 存在数量的减少。Fe 原子丢失数目不同的 FeMo(G) 的 CD 谱是不相同的, 随着 Fe 原子丢失越多 (即 P-cluster 因其 Fe 原子被整合越多, 而数量就越少), 反映 P-cluster 数量的 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 、 $\Delta\epsilon_{450nm}/\epsilon_{450nm}$ 的值也就降低越多 (表 2)。CD 谱结果同上述结果一致表明, o-phen 几乎专一整合 P-cluster 中的 Fe 原子。

(三) FeMo 蛋白的催化活性与 P-cluster 的关系

1. P-cluster 对 FeMo 蛋白活性的影

响: 随着 FeMo 蛋白被 o-phen 整合的 Fe 原子数目增加的同时, 反映 P-cluster 存在的 Fe/Mo、 ϵ_{700nm} 和 $\Delta\epsilon_{450nm}$ 的值降低, 而且蛋白活性也随 P-cluster 数量的减少而降低 (表 2、图 6)。

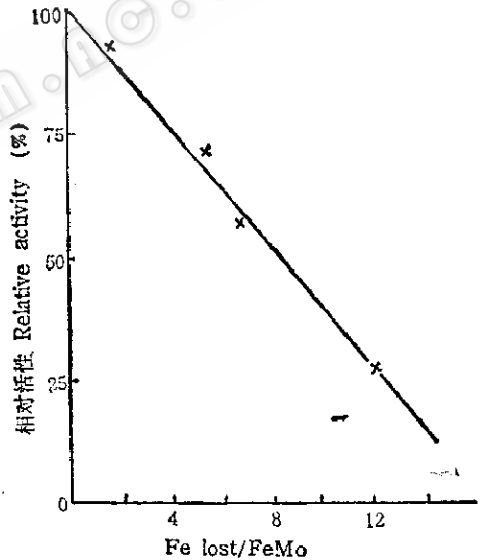


图 6 o-phenanthroline 处理的 FeMo 蛋白活性与 Fe 原子丢失的关系

Fig. 6 The relationship between the activity and the loss of Fe atoms of FeMo protein treated with o-phenanthroline

当 FeMo 蛋白丢失 Fe 原子数达到相当于蛋白中 P-cluster 的全部 Fe 原子 (15—16 个) 时, 活性完全丧失。既然前已有证据表明, o-phen 整合的 Fe 原子几乎全

表 3 FeMo(G) 与 FeMo(O) 互补作用

Table 3 The complement of FeMo(G) with FeMo (O)

样 品 Sample	互 补 前 Before complement	互 补 后 After complement*	
	比 活 Specific activity (%)	FeMo(G)	FeMo(O)
		比 活 Specific activity (%)	比 活 Specific activity (%)
FeMo(R)	1632 (100)	/	/
FeMo(O)	1010 (62)	1494 (92)	/
FeMo(G)	1118 (69)	/	1536 (94)

* FeMo(G)/FeMo(O) = 1.09

部来自 P-cluster; 所以图 6 实际表明蛋白活性与 P-cluster 的数量存在直接相关性, 从而证明, P-cluster 是 FeMo 蛋白还原底物所不可缺少的部分。这与我们^[8,17,18]和 Gomez-Moreno 等^[16]的结果一致。

2. FeMo(G) 与 FeMo(O) 的互补作用: 将曝氧失去 40% 左右活性的 FeMo(O) 与用 o-phen 处理失去 30% 左右活性的 FeMo(G) 混合, 再与 Fe 蛋白重组显示活性增加, 表明它们可以互补(表 3)。前已报道, 曝氧失去 30% 左右活性时, FeMo(O) 中的 FeMoco 受损伤, 而 P-cluster 仅仅受到可逆氧化^[8,13]。FeMo(G) 可与 FeMo(O) 互补增加活性说明, o-phen 处理的蛋白中 FeMoco 未受到损伤, 而部分的 P-cluster 受到损伤或破坏, 因而 FeMo(G) 活性降低。这与上述结果和 Levchenko^[22]的结果很一致。

综上所述, 有理由得出两点初步结论: 1. 尽管目前对 FeMo 蛋白的 P-cluster 和另一个不含 Mo 原子的 FeS 簇的类型和数目尚未取得完全一致, 但似乎可肯定组成 P-cluster 的 Fe 原子不少于 12 个。因此, 邻非啉螯合的 Fe 原子中, 虽然不能完全排除有少量的 Fe 原子来自包括 FeMoco 在内的其它 FeS 簇, 但是多数还是来自

P-cluster。2. P-cluster 在 FeMo 蛋白还原底物过程中起着不可缺少的重要作用。因此, 继续研究其结构和功能将有助于阐明生物固氮机理。

参 考 文 献

- [1] Hawkes, T. R. et al.: *Biochem. J.*, 217: 317—321, 1984.
- [2] Eady, R. R.: *Nitrogen Fixation*, Clarendon press, Oxford, (ed. Broughton, W. J. et al.), 4: 1—49, 1986.
- [3] Münck, E. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.* 400: 32—53, 1975.
- [4] Orme-Johnson, W. H.: *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 159—204, 1973.
- [5] Rawlings, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 253: 1001—1004, 1978.
- [6] Zimmermann, R. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 337: 185—207, 1978.
- [7] Shah, S. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 3249—3253, 1977.
- [8] 黄巨富: *植物学报*, 28: 276—285, 1986.
- [9] 黄巨富等: *植物学报*, 30: 46—53, 1988.
- [10] 黄巨富等: *植物学集刊*, 1: 155—158, 1983.
- [11] Kurtz, D. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4986—4989, 1979.
- [12] Stephens, P. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 2585—2589, 1979.
- [13] Stephens, P. J. et al.: *Biochem.*, 20: 2857—2864, 1981.
- [14] Watt, G. D. et al.: *Biochem.*, 20: 7272—7277, 1981.
- [15] Wong, G. B. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 101: 3078—3090, 1979.
- [16] Gomez-Moreno, C. et al.: *Molecular & Cellular*

Biochem., 26: 111—118, 1979.

[17] 骆爱玲等: 微生物学报, 27: 134—141, 1987。

[18] 黄巨富等: 植物学报, 24: 341—346, 1982。

[19] 中国科学院植物研究所七室: 植物学报, 15: 281—284, 1973。

[20] Ballentine, R. et al.: *Methods in Enzymol.*,

4: 1002—1003, 1957.

[21] Mossey, V.: *J. Biol. Chem.*, 229: 763—770, 1957.

[22] Levchenko, L. A. et al.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 277: 1003—1004, 1984.

METAL CLUSTERS IN NITROGENASE IRON-MOLYBDENUM PROTEIN FROM *AZOTOBACTER VINELANDII*

III. THE RELATIONSHIPS BETWEEN THE IRON CONTENT AND CATALYTIC ACTIVITY, SPECTROSCOPIC CHARACTERISTICS OF IRON-MOLYBDENUM PROTEIN TREATED WITH O-PHENANTHROLINE

Huang Jufu Luo Ailing Liang Yinchu

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing*)

A red chelate compound of ferrous o-phenanthroline appeared after o-phenanthroline was added to the solution of crystalline FeMo protein. The Mo content of the treated FeMo protein was almost not decreased, but the ratio of Fe to Mo atoms in the protein decreased; C_6H_2 -reduction activity, molecular extinction coefficient ϵ_{700nm} and molecular circular dichroic extinction coefficient $\Delta\epsilon_{450nm}$ of the treated protein were almost proportionally decreased when the lost Fe atoms increased. And the activity was able to be restored by an addition of an aerated FeMo

protein which was not severely damaged. The results show that a loss of activity of the treated protein is due to a removal of Fe atom by o-phenanthroline, which results in destruction of P-clusters. Therefore, it seems to be reasonable to deduce that P-clusters in FeMo protein can play an important role in the reduction of substrates.

Key words

o-phenanthroline; Function of P-cluster; FeMo protein; *Azotobacter vinelandii*