

ATP 功能及固氮酶催化机理

姜 湧 明

(吉林大学化学系固氮组)

一、引 言

固氮酶能够催化 N_2 及其它底物 (N_2 , N_2O , C_2H_2 , HCN , RCN , RNC , H^+ , 丙二烯、环丙烯) 的还原反应, ATP 水解反应以及 $Na_2S_2O_4$ 氧化反应。

固氮酶究竟是钼铁蛋白, 还是由钼铁蛋白和铁蛋白所组成的复合物? 现在尚无定论, 但是, 一般认为, 它是由钼铁蛋白和铁蛋白所组成的复合物。

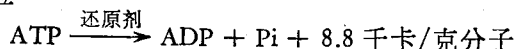
钼铁蛋白分子是由二个 α -亚基和二一个 β -亚基所组成的四聚体, 分子量 220,000 左右, 含有四个 Fe_4S_4 原子簇^[2]和二一个铁钼辅因子^[3]。铁钼辅因子的分子量小于 2000^[4], 含有 1Mo、6 ~ 8Fe、 $6S^{2-}$ ^[4, 5]。其空间结构与功能尚未确定。各种实验表明, N_2 、 C_2H_2 、 CN^- 、 H^+ 和 Co 络合在钼铁蛋白上。由此推测, N_2 等可还原底物的络合还原中心位于钼铁蛋白上。铁钼辅因子可以络合 Co (Co 可以非竞争性地抑制除放 H_2 而外的一切底物的还原反应)^[5], 由此推测, 铁钼辅因子可能是 N_2 等底物的络合还原中心的存在部位。

铁蛋白分子是由二个相同亚基所组成的二聚体, 分子量 60,000 左右, 含有一个 Fe_4S_4 原子簇。ATP 活性中心(电子活化中心)究竟是在铁蛋白上, 还是分别在铁蛋白和钼铁蛋白上, 或者是为二者所共有? 现在尚无定论, 但是, 一般认为, 它是由铁蛋白和钼铁蛋白的有关部分共同构成的^[7, 8]。其根据是: (1) 铁蛋白分子可以结合 $MgATP$; (2) 钼铁蛋白中铁钼辅因子上的自由 NH_2 基是 ATP 活性中心的必需基团^[8]; (3) 铁蛋白分子的活性 SH 基可能是 $MgATP$ 的结合基团^[9]。

巴氏梭菌铁蛋白的一级结构已经弄清, 钼铁蛋白一级结构的研究已有较大的进展。二者的空间结构尚未弄清, 但最近美国已得到较大的钼铁蛋白结晶, 为开展 X 射线结构分析奠定了物质基础。

二、ATP 功能

固氮酶可以催化需还原剂的 ATP 水解反应



此反应与 $Na_2S_2O_4$ 氧化反应、 N_2 等底物还原反应是偶联的, 称之为有用的 ATP 水解反应。

固氮酶还可以催化不需还原剂的 ATP 水解反应。此反应与 $Na_2S_2O_4$ 氧化反应, N_2 等底物的还原反应不偶联, 称之为无用的 ATP 水解反应。

在固氮酶催化过程中, ATP 水解与电子转移是有关的^[10]。ATP/ $2e^-$ 比值随实验条件而变化, 但最小值是 4。当溶液 pH 为 5.6、6.0、8.0 时, 巴氏梭菌固氮酶的 ATP/ $2e^-$ 比值分别为 8.0、4.0、4.6, 当 $pH = 5.2$ 时, 则变成不需还原剂的 ATP 水解。对棕色固氮菌固氮酶而言, 20°C 是转折点。当温度从 20°C 上升到 40°C 时, 则 ATP/ $2e^-$ 比值随之增大, 当温度从 20°C 下降到 10°C 时, 则 ATP/ $2e^-$ 比值亦随之增大, 当温度等于或低于 10°C 时, 只有 ATP 水解反应, 几乎没有 $Na_2S_2O_4$ 氧化反应(电子转移)^[10]。就固氮酶二组分比例而言, 随着钼铁蛋白的愈加过量, ATP/ $2e^-$ 比值可以增大到 ~20。肺炎克氏杆菌钼铁蛋白与巴氏梭菌铁蛋白的互补, 可以使 ATP/ $2e^-$ 比值增大到 ~50。

对于固氮酶的一切底物还原反应来讲,

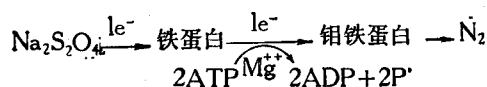
MgATP 是不可缺少的重要因素。MgADP 是固氮酶的生理抑制剂,能抑制固氮酶的各种活性。固氮酶活性的大小受 ADP/ATP 比例变化的调节。当 $ADP/ATP = 1/2$ 时,则固氮酶的活性完全受抑制。

固氮酶的一切底物还原反应为什么必须有 MgATP 的作用? MgADP 为什么能够抑制固氮酶的一切活性? 这些问题现在虽然还没有完全解决,但是,近几年来已经取得了显著的进展。

MgATP 可以与铁蛋白相结合,使铁蛋白暴露游离 SH 基和 Fe_4S_4 原子簇,增加铁蛋白对 O_2 的敏感性。这些实验现象表明: MgATP 可以使铁蛋白分子的构象发生变化。

MgATP 与铁蛋白相结合,使铁蛋白的还原电位从 $-294mV$ 提高到 $-400mV$ ^[14]。这是由于 MgATP 诱导铁蛋白构象变化的结果。

各种实验表明,从 $Na_2S_2O_4$ 到固氮酶的可还原底物,其电子转移顺序是:



停流实验揭示^[16],从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移与 ATP 水解反应,二者的反应时间常数相同,反应速度常数相同。由此推测,从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移与 ATP 水解反应是直接偶联的。

ATP 水解反应没有延缓期,而底物还原反应有延缓期^[17]。这说明 ATP 水解反应与底物还原反应不直接偶联。

从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移离开了 MgATP 便不能进行^[12],此电子转移的一级反应速度常数随 MgATP 浓度的增大而增大^[16],每转移一个电子水解二个 ATP 分子^[16]。这些实验结果说明了, MgATP 推动从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移。

从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移为什么必须由 MgATP 来推动?

根据电化学原理,要使铁蛋白上的电子自动转移到钼铁蛋白上去,必须具备二个基本条件:一个是电路接通,另一个是铁蛋白的还原

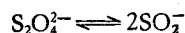
电位必须高于钼铁蛋白的还原电位。我们认为, ATP 可能为上述电子转移创造这二个条件。这一设想有待于实验检验。

MgADP 与铁蛋白相结合,使铁蛋白分子发生限速构象变化,从而抑制 SO_2^- 还原氧化态铁蛋白的速度,抑制从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移,因此, MgADP 能抑制固氮酶的一切活性。

三、固氮酶催化机理

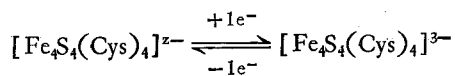
近年来,由于停流分光光度,莫斯鲍尔光谱以及顺磁共振等先进技术的应用,在固氮酶催化机理方面,已经取得了许多重要的进展。

用停流和快速冻结 EPR 法揭示:



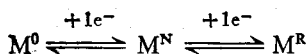
SO_2^- 是活性还原剂。氧化态铁蛋白从 SO_2^- 上接受一个电子,变成还原态,并出现 $g = 1.94$ 的 EPR 信号。在 MgATP 的诱导下,还原态铁蛋白向半还原态钼铁蛋白传递一个电子。

根据 EPR、莫斯鲍尔光谱以及电位法推测,电子转移与铁蛋白中的 Fe_4S_4 原子簇有关,每个 Fe_4S_4 原子簇传递一个电子。



铁蛋白分子有二个 MgATP 结合部位,能够结合二个 MgATP,其中有一个结合部位能够结合一个 MgADP。铁蛋白分子对二个 MgATP 结合的解离常数分别是 $430\mu M$ 和 $220\mu M$ ^[16],由此推测,铁蛋白分子对二个 MgATP 的结合不是同时进行的。铁蛋白分子只有与二个 MgATP 结合之后,才能引起蛋白质分子的构象发生变化^[18]。在铁蛋白分子中, MgATP 结合部位与 Fe_4S_4 原子簇有一定的距离^[8]。钼铁蛋白与铁蛋白的结合,不影响铁蛋白对 MgATP 的结合数量^[20]。

钼铁蛋白有三种氧化状态:氧化态;半还原态;还原态。其中,半还原态有 $g = 4.3, 3.6, 2.0$ 的 EPR 信号^[12]。钼铁蛋白的 EPR 信号来自铁钼辅因子^[5]。铁钼辅因子亦有相应的三种氧化状态^[19]:



M^0 : 氧化态, 用劳氏紫氧化之后得到, 无 EPR 信号; M^N : 在天然的 (半还原态) 钼铁蛋白中可以看到, 有 $g = 4.3, 3.6, 2.0$ 的 EPR 信号; M^R : 在固氮条件下稳定态时可以看到, 无 EPR 信号。

单独的半还原态钼铁蛋白不能结合 MgATP, 不能接受 SO_4^{2-} 的电子, 但能在 MgATP 推动下从还原态铁蛋白上接受电子^[12], 不能还原 N_2 等可还原的底物, 但能络合 C_2H_2 和 H^+ 等可还原的底物, 还原态钼铁蛋白可以还原 N_2 等可还原的底物。

实验初步揭示: 还原态铁蛋白或者还原态钼铁蛋白与 MgATP 的络合物, 可以与钼铁蛋白结合成固氮酶复合物^[15, 20]。1:1 或 1:2 的钼铁蛋白与铁蛋白的复合物都是有活性的固氮酶复合物^[13], 在二组分之间发生电子转移之后, 固氮酶复合物即发生解离^[17]。由表 1 可知, 固氮酶复合物的解离可能是限速步骤。

表 1 在固氮酶反应过程中的速度常数^[1, 6, 13]

反应种类	反应速度常数
Ac2ox 被 SO_4^{2-} 还原	$>10^8 M^{-1} S^{-1}$
MgATP 与 Kp2red 或 Kp1-Kp2 结合	$>2.5 \times 10^6 M^{-1} S^{-1}$
固氮酶复合物生成	$>10^7 M^{-1} S^{-1}$
二组分间的电子转移	$2.0 \times 10^3 S^{-1}$
从铁蛋白上释放 MgADP	$\sim 2.0 \times 10^3 S^{-1}$
固氮酶复合物的解离	$10 S^{-1}$

Ac2ox: 圆褐固氮菌氧化态铁蛋白; Kp2: 肺炎克氏杆菌铁蛋白; Kp1: 肺炎克氏杆菌钼铁蛋白。

二组分之间的电子转移与 ATP 水解直接偶联, 每传递一个电子水解二个 ATP 分子^[16]。ATP 的水解产物——ADP, 与固氮酶不生成长寿命的中间产物^[16]。ADP 从固氮酶分子上迅速解离下来^[1]。若 MgADP 与铁蛋白相结合, 则可以抑制从铁蛋白到钼铁蛋白的电子转移^[1], 抑制氧化态铁蛋白从 SO_4^{2-} 上接受电子。

底物还原反应与 ATP 水解反应不直接偶联^[17]。

根据上述一系列的实验结果, 我们提出了

一个可能的固氮酶催化机理模式图, 如图 1 所示:

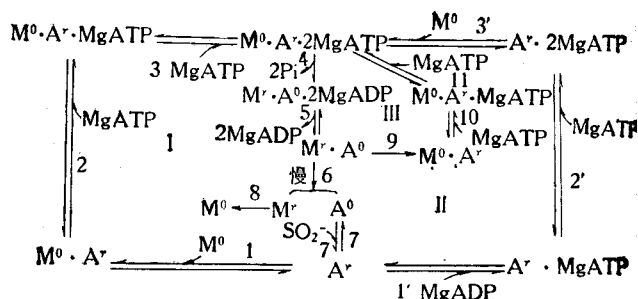


图 1 固氮酶催化机理模式图

M^0 : 氧化态钼铁蛋白, 这里指半还原态钼铁蛋白, 有 EPR 信号; M^r : 还原态钼铁蛋白, 无 EPR 信号; A^0 : 氧化态铁蛋白, 无 EPR 信号; A^r : 还原态铁蛋白, 有 EPR 信号。

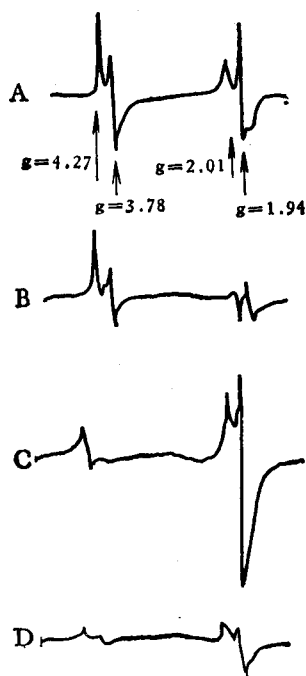
由图 1 可知, A^r 可以沿着二条途径到达 $M^0 \cdot A^r \cdot 2MgATP$ 。一条是 1-2-3, 即: A^r 与 M^0 以 1:1 分子比结合而成固氮酶复合物 ($M^0 \cdot A^r$), 此复合物先后与二个 MgATP 结合, 最后生成 $M^0 \cdot A^r \cdot 2MgATP$ 。另一条是 1'-2'-3', 即: A^r 首先与一个 MgATP 结合而成 $A^r \cdot MgATP$, 再结合一个 MgATP, 生成 $A^r \cdot 2MgATP$, 然后, $A^r \cdot 2MgATP$ 与 M^0 以 1:1 分子比结合而成 $M^0 \cdot A^r \cdot 2MgATP$ 。反应 4 表示: 二个 ATP 分子发生水解反应, 同时, 在 ATP 的推动下, A^r 上的一个电子转移到 M^0 上。反应 5 表示: 结合在固氮酶铁蛋白分子上的二个 MgADP 从铁蛋白上解离下来。反应 6 表示: 固氮酶复合物 ($M^r \cdot A^0$) 发生解离。反应 7 表示: 自由的氧化态铁蛋白 (A^0) 从 SO_4^{2-} 上接受一个电子。反应 8 表示: 还原态钼铁蛋白 (M^r) 传递一个电子给络合在底物络合还原中心上的底物分子。

总之, 由 ATP 推动的电子转移可以按照第 I 循环 (1-2-3-4-5-6-7-1) 和第 II 循环 (1'-2'-3'-4'-5'-6'-7'-1') 进行。每循环一次向底物分子传递一个电子。电子转移的通路可能是: 从铁蛋白的 Fe_4S_4 原子簇传递到钼铁蛋白的 Fe_4S_4 原子簇, 然后, 传递到深藏在疏水环境中的铁钼辅因子, 最后, 到达络合在底物络合还原中心上的底物分子。

反应 9 表示: 在异常的实验条件下(如: 钼铁蛋白过量, 杂交固氮酶、温度过高或过低, pH 过大或过小), 还原态钼铁蛋白 (M^+) 的一个电子倒流入氧化态铁蛋白 (A^0), 结果产生了第 III 循环 (2-3-4-5-9-2)。在第 III 循环中, 一个电子在固氮酶二组分之间来回传递, 并未用于底物还原反应, 也未消耗 $Na_2S_2O_4$, 但是, 每循环一次却白白消耗了二个 ATP 分子。这可能就是不需还原剂 ATP 水解反应 (无用 ATP 水解反应) 的机制。在异常的实验条件下, $ATP/2e^-$ 比值之所以大于 4, 可能就是因为异常条件增加了第 III 循环的机率。

在上述所有的反应中, 反应 6 进行最慢, 可能是速度限制步骤。

这一模式图不仅完全符合上述各种实验结果, 而且还能圆满地解释固氮酶反应中的 EPR 信号随 ATP 和 $Na_2S_2O_4$ 的相对用量而改变的实验现象。



ATP 耗尽, $S_2O_4^{2-}$ 足够 $M:A = 1:2$
 $S_2O_4^{2-}$ 耗尽, ATP 足够 $M:A = 1:2$ 或 $1:14$
 $S_2O_4^{2-}$ 和 ATP 均足够 $M:A = 1:14$
 $S_2O_4^{2-}$ 和 ATP 均足够 $M:A = 1:2$

图 2 $S_2O_4^{2-}$ 和 ATP 的相对用量对固氮酶二组分 EPR 信号的影响^[12]

当 $M:A = 1:2$ (分子比), ATP 和 $S_2O_4^{2-}$ 都足够时, 由于在第 I 和第 II 循环中, 其它的反应都很快, 只有反应 6 进行最慢, 因此, 有 $M^+ \cdot A^0$ 的积累。 M^+ 和 A^0 均无 EPR 信号, 如图 2-D 所示。 当 $M:A = 1:14$ (分子比), 而 ATP 和 $S_2O_4^{2-}$ 都足够时, 由于上述同样的原因, 故有 $M^+ \cdot A^0$ 的积累。 M^+ 和 A^0 均无 EPR 信号。 但是, 由于水溶液中 $M:A = 1:14$, 而活性固氮酶中 $M:A = 1:1$ 或 $1:2$, 因此, 水溶液中除有无 EPR 的 $M^+ \cdot A^0$ 而外, 还有多余的游离的 A^+ 和 $A^+ \cdot 2MgATP$, 即有还原态铁蛋白的 EPR 信号(图 2-C)。

当 ATP 足够而 $S_2O_4^{2-}$ 耗尽时, 反应 7 不能进行, 于是有 A^0 的积累, 反应 8 能进行, 得到 M^0 , 因而只出现 M^0 的 EPR 信号(图 2-B)。

当 $S_2O_4^{2-}$ 足够而 ATP 耗尽时, $1', 2', 2, 3$ 四个反应均不能进行, 反应 1 能进行, 结果有 $M^0 \cdot A^+$ 的积累, 因而出现了 M^0 和 A^+ 的 EPR 信号(图 2-A)。

四、对今后固氮酶催化机理研究的几点初步意见

固氮酶催化机理是一个非常复杂的问题, 现在, 虽然已经取得了许多重要的进展, 但是, 离开问题的圆满解决还有很大的距离。我们认为, 需要在下列几个方面作进一步的研究:

1. 固氮酶究竟是钼铁蛋白? 还是由钼铁蛋白和铁蛋白所组成的复合物? 在固氮过程中, 钼铁蛋白与铁蛋白之间存在着那些相互作用? 二者是结合成瞬间复合物? 还是结合成长寿命的复合物? 二者是否存在着相互变构相互调节的作用?

2. 底物络合还原中心是否位于钼铁蛋白的铁钼辅因子上? 其结构如何? M_0 和 Fe 原子在 N_2 等可还原底物分子的络合、还原、加氢过程中各起什么作用? N_2 等可还原的底物分子在此中心上是如何被络合、活化和还原、加氢的?

3. ATP 活性中心是位于铁蛋白上? 还是分别位于铁蛋白和钼铁蛋白上? 或者是由二者所共有? 其结构如何? 在此中心上, ATP 是如

何被络合,水解的?其水解产物——ADP 是否立即被释放?如何被释放?

4.在固氮酶催化过程中,ATP 究竟起哪些作用?ATP 水解所释放的自由能是否用来进一步提高铁蛋白的还原电位?是否用来提高钼铁蛋白底物络合还原中心的还原电位?

5.在固氮酶复合物中,从电子供体($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)到被底物络合还原中心络合的 N_2 之间,是否存在着一一条或多条电子转移通路?此通路是否主要是由铁蛋白的 Fe_4S_4 原子簇和钼铁蛋白的 Fe_4S_4 原子簇和铁钼辅因子所构成的?

6.在固氮酶中所发生的一连串的反应步骤中,限速步骤是那一步?是否就是固氮酶复合物的解离?

7.ATP 水解与放 H_2 、 N_2 还原三种反应在固氮酶中存在着那些关系?

8.在各种物理,化学因素的作用下,固氮酶的结构象与活性有那些相应的变化规律?

9.钼铁蛋白的一级结构以及钼铁蛋白和铁蛋白的空间结构如何?

我们相信,上述问题的进一步研究,必将有助于进一步阐明固氮酶催化机理。

参 考 文 献

- [1] Thorneley, R. N. F., et al.: *Biochem. J.*, **165**, 255, 1977.
- [2] Kurtz, D. M. et al.: *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4986, 1979.

- [3] Zimmermann, R., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **537**, 185, 1978.
- [4] 吉林大学化学系固氮组,《吉林大学学报》,1978年,第4期,73页。
- [5] Rawlings, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 1001, 1978.
- [6] Mortenson, L. E., et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 387, 1979.
- [7] Stiefel, E. I., *Recent Development in Nitrogen Fixation* (Newton, W. E., et al.: ed.) pp. 69, Academic Press, London 1977.
- [8] Мицкова, И. З., и т. д., Докл. АН СССР, **251**, 494, 1980.
- [9] 尤崇杓等,《植物生理学报》1978年,第4期,123页。
- [10] Watt, G. D., et al., *Biochemistry*, **16**, 264, 1977.
- [11] Orme-Johnson, W. H., et al., *Recent Development in Nitrogen Fixation* (Postgate, J. R. et al. ed.) pp 131, Academic Press, London, 1977.
- [12] Mortenson, L. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 422, 1973.
- [13] Hageman, R. V., et al.: *Biochemistry*, **17**, 4117, 1978.
- [14] Zumft, W. G. et al., *Eur. J. Biochem.*, **46**, 525, 1974.
- [15] Thorneley, R. N. F.: *Biochem. J.*, **145**, 391, 1975.
- [16] Hageman, R. V. et al.: *Biochemistry*, **19**, 2333, 1980.
- [17] Hageman, R. V., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2699, 1978.
- [18] Walker, G. A., et al.: *Biochemistry*, **13**, 2382, 1974.
- [19] Huynh, B. H., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 192, 1979.
- [20] Emerich, D. W., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 359, 1978.

[本文于1980年12月10日收到]

(上接第43页)

验证了这个结论。

感谢张洪钧同志与郑丛英同志对这一工作的关心和支
持。

参 考 文 献

- [1] 汪云九:《生物化学与生物物理进展》1975年,第4期,第60页。
- [2] Barlow, H. B. et al.: *Science*, **177**(4049), 567, 1972.
- [3] 汪云九:《生物化学与生物物理学报》,1979年,第10卷,第1期,第1页。

- [4] Spiegler, G. et al.: *Photo. Korr.*, **67**, 4, 1931. *ibid*, **69**, 36, 1933.
- [5] Yule, J. A. C.: *Photo. Jour.*, **84B**, 321, 1944.
- [6] Schreiber, W. F.: *Pattern Recognition*, **2**(2), 117, 1970.
- [7] Levit, L.: *Computer Graphics and Image Processing*, **3**, 163, 1974.
- [8] Levit, L.: *Applications of Holography and Optical Data Processing*, **73**, 1977 Pergamon Press.
- [9] Armitage, J. D. et al.: *Appl. Opt.*, **4**(4), 445, 1965.

[本文于1980年12月27日收到]