

固氮酶反应中 ATP 驱动的电子传递*

吴也凡 曾 定

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

提 要

本文通过分析 Mg-ATP 与铁蛋白相互作用的物理化学行为, 探讨了 Mg-ATP 在铁蛋白上的可能结合部位以及 Mg-ATP 的水解与电子传递的偶联关系。

关键词 铁蛋白, Mg-ATP, 电子传递

关于固氮酶作用机理的研究, 还存在着这样一些令人困惑的问题: Mg-ATP 结合在铁蛋白的什么部位? 为什么 Mg-ATP 在这种部位的结合会活化电子, 并使得铁蛋白中的铁硫原子簇更易与亚铁螯合剂反应? Mg-ATP 的酶促水解与电子传递的偶联关系如何? 弄清这些问题, 不仅是深入理解固氮酶反应中电子传递的关键, 而且也有助于解决许多生理过程的能量转换、传递和贮存机制方面的问题。

铁蛋白是由两个亚基组成的二聚体, Fe_4S_4^* 原子簇为铁蛋白的电子传递中心, 起着贮存和传递电子的作用。 Fe_4S_4^* 原子簇位于两个蛋白亚基之间。 一个铁蛋白可以结合两个 Mg-

ATP。 Mg-ATP 与还原态铁蛋白的结合, 使得铁蛋白的氧化还原电位负移约 110mV, 同时增大铁蛋白对氧的敏感性 (100 倍以上)^[1]; Mg-ATP 与铁蛋白的结合, 使得铁蛋白的非轴对称的 ESR 信号变成近似轴对称, 信号振幅减小, 在 $g = 1.43$ 处强度增大或产生分裂信号^[2]。 Mg-ATP 与铁蛋白的结合, 使得氧化态的非对称性铁硫生色团的 CD 谱发生很大的变化, 用 ATP 滴定氧化态铁蛋白, 其 CD 谱分别在 325, 390 和 450nm 处出现三个新的等吸收点^[3]; Mg-ATP 与还原态铁蛋白的结合, 引起 ATP 的 α -、 β -和

* 国家自然科学基金 助项目。

- 1975; 250: 2640
- 3 Tada M, Kadoma M, Inui M *et al. Methods in Enzymology*, 1988; 157: 107
- 4 Le Peuch C J, Le Peuch D A M, Demaille J G. *Biochemistry*, 1980; 19: 3368
- 5 Jones L R, Simmerman H K B, Wilson W W *et al. J Biol Chem*, 1985; 260: 7721
- 6 Simmerman H K B, Collins J H, Theibert J L *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 13333
- 7 Imagawa T, Watanabe T, Nakamura T. *J Biochem (Tokyo)*, 1986; 99: 41
- 8 Suzuki T, Lui P, Wang J H. *Biochem Cell Biol*, 1987; 65: 302
- 9 Le Peuch C J, Haiech J, Demaille J G. *Biochemistry*, 1979; 18: 5150
- 10 Movsesian M A, Nishikawa M, Adelstein R S. *J Biol Chem*, 1984; 259: 8029
- 11 Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. *Biochem J*, 1988; 252: 269
- 12 Wegener A D, Simmerman H K B, Liepnieks J *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 5154
- 13 Nagal R *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 2966
- 14 Suzuki T, Wang J H. *J Biol Chem*, 1986; 261: 7018
- 15 Suzuki T, Wang J H. *J Biol Chem*, 1987; 262: 3880
- 16 Jakab G, Kranias E G. *Biochemistry*, 1988; 27: 3799
- 17 Kranias E G, Di Salvo J. *J Biol Chem*, 1988; 263: 15681
- 18 Lyer R B, Koritz S B, Kirchberger M A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1988; 55: 1
- 19 Fowler C, Huggins J P, Hall C *et al. Biochem Biophys Acta*, 1989; 980: 348
- 20 Li C F, Wang J H, Colyer J. *Biochemistry*, 1990; 29: 4535

[本文于1990年8月20日收到, 11月7日修回]

γ -PO₄ 的 ^{31}P NMR 信号发生显著的变化,其中的 α - ^{31}P 、 β - ^{31}P 、 γ - ^{31}P NMR 谱峰分别往低磁场方向移动 8.7ppm、9ppm、7.7ppm^[4]。在未变性的铁蛋白中加入亚铁螯合剂,铁蛋白中的铁对亚铁螯合剂作用不敏感,一旦在铁蛋白中加入 Mg-ATP,则铁蛋白中的铁迅速与亚铁螯合剂作用,生成相应的亚铁螯合物^[5]。用羧甲基化试剂碘乙酸处理结合了 Mg-ATP 的铁蛋白,其中有两个巯基未被羧甲基化^[6]。用巯基试剂检测结合了 Mg-ATP 的铁蛋白,发现其中可检测的巯基含量下降。Mg-ATP 与铁蛋白的结合,其热力学函数变化值为: $\Delta G = -27758.88 \text{ J/mol}$, $\Delta H = -19923.04 \text{ J/mol}$, $\Delta S = 26.30 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$ ^[7]。Mg-ATP 与铁蛋白的结合,破坏铁蛋白晶体的形成并且改变铁蛋白的沉降行为。没有 Mg-ATP 的作用,铁蛋白不能向钼铁蛋白传递电子。只有与 Mg-ATP 结合的铁蛋白才能将电子传递给钼铁蛋白,将钼铁蛋白还原至无 ESR 信号的深度还原态,处于这种氧化态的钼铁蛋白才能还原底物。在固氮酶的催化反应中,ATP 的水解反应没有延缓期,而底物还原反应却有延缓期,表明底物还原反应与 ATP 的水解不是直接偶联的。铁蛋白在结合 Mg-ATP 时, Mg-ATP 基本上不水解,只有在与钼铁蛋白结合,并传递电子给钼铁蛋白时, Mg-ATP 才酶促水解为 Mg-ADP 和无机磷 (Pi), 电子传递 ($42 \pm 3 \text{ ms}$) 和 ATP 的水解速度 ($44 \pm 4 \text{ ms}$) 是两个快速的偶联过程^[8]。因此,一般认为 Mg-ATP 作为电子活化剂起着活化电子以及变构的作用。在这个电子和能量偶联传递的过程中,ATP 的作用引起人们极大的关注。由于实验现象错综复杂,对此众说纷芸。

Stiefel^[9] 认为 ATP 的腺嘌呤核苷二磷酸部分束缚在铁蛋白分子内部,其自由的末端磷酸基被暴露出来。这末端的磷酸基可能与钼铁蛋白分子接触,参与固氮酶二组分之间的相互作用,并促进二组分之间的电子传递。由于钼原子接受了由 FeS 原子簇传递而来的电子, Mo-O 可能变得更加亲核性,它攻击 ATP 的末端磷

酰基,这种基团便转移到钼原子上,产生了钼磷酸和 ADP,然后这种钼-磷酸根发生解离;Hodgson 等用外延 X 光吸收光谱精细结构 (EXAFS) 探明了 Mo-Fe 蛋白和铁钼辅基中的 Mo 的价态和周围的微环境,表明在钼铁蛋白分子中不存在 Mo=O 键,顶部的 Mo=O 键只见于受氧损害的钼铁蛋白。所以 Stiefel 的关于 ATP 的功能之一在于从钼原子上除去氧原子这一假设缺乏实验事实的支持。

Robson^[10] 通过对 ATP 酶、腺苷激酶与 ATP 结合部位的氨基酸序列分析,并与铁蛋白进行比较,认为 Mg-ATP 可能与铁蛋白的某一肽段结合,该肽段具有 β -折迭- α -螺旋- β -折迭,在其 α -螺旋处的 N 端带有正电荷,可与 ATP 带负电荷的磷酸根部分稳定地结合。

Eady 等^[6] 用羧甲基化试剂碘乙酸处理含有足够量 ATP 的铁蛋白,发现其中有二个巯基不被羧甲基化,认为 ATP 可能与铁蛋白的半胱氨酸残基结合。

Mortenson 等^[5] 以前主要根据 Mg-ATP 与铁蛋白结合后,使铁蛋白中的铁对亚铁试剂变得更敏感这一实验事实,认为 Mg-ATP 与铁蛋白的结合部位远离铁蛋白的活性中心 Fe_4S_4^* 原子簇,由于 Mg-ATP 与铁蛋白外围组织的结合,改变了铁蛋白的构象,增大了铁蛋白的还原能力,使铁蛋白的铁暴露出来而易与亚铁试剂螯合。但后来(1980 年)他们根据 ^{31}P NMR 实验结果,改变了上述看法,认为 Mg-ATP 与铁蛋白的结合部位也有可能是 Fe_4S_4^* 原子簇。

综上所述,除了 Mortenson 后来的看法有些改变外,大多数研究者认为, Mg-ATP 不是与铁蛋白的活性中心 Fe_4S_4^* 结合,而是与铁蛋白的其它部位结合(例如与铁蛋白上的-SH 或者外围组织结合),改变了铁蛋白的构象,增大了铁蛋白的还原能力,使铁蛋白中的铁暴露出来而易与亚铁螯合剂作用,ATP 的水解又引起铁蛋白的构象发生进一步变化,从而驱动电子传递到钼铁蛋白,将钼铁蛋白还原至无 ESR 信号的深度还原态,处于这种氧化态的钼铁蛋白才能还原底物。然而,上述观点仍存在某些不

足。在大多数 Mg-ATP 与铁蛋白相互作用的模式中, ATP 与铁蛋白中的键合性质是不确定的。铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^* 原子簇的贮存和传递电子的功能是通过铁的价态交替地变化而实现的。如果 Mg-ATP 结合在铁蛋白的外围组织上, 那么为什么在固氮酶上不发生电子传递时, Mg-ATP 不水解, 而只有在发生电子传递时, Mg-ATP 才酶促水解呢? Mg-ATP 酶促水解的动力又是从何而来的呢? 根据已知的化学知识, Mg-ATP 与 $-\text{SH}$ 基团之间不存在化学键合, 但磷酸根尤其是多聚磷酸根与 $\text{Fe}^{+2(+3)}$ 有突出的结合能力是已知事实。因此难以想象 Mg-ATP 与铁蛋白的 $-\text{SH}$ 基团之间存在着如此强的化学键合, 并足以抵抗巯基试剂的侵蚀。如果真的存在着这样强的键合, 则电子传递伴随着的 Mg-ATP 的水解产物 Mg-ADP 和 P_i , 也就可能不容易从铁蛋白上消除, 因而必然影响酶的催化循环。已知磷酸根是亲铁的 ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 与 Fe^{+2} 络合的 $\lg\beta = 9.35$, $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 与 Fe^{+3} 络合的 $\lg\beta = 22.2$)。ATP 的三磷酸根部分是亲铁的。Mg-ATP 进入铁蛋白后为什么不与铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^* 络合, 而与铁蛋白的其它非铁部分结合呢? 蔡启瑞^[11]曾提出固氮酶反应中二步 ATP 驱动的能量与电子偶联传递机理。其中的论点认为: 由于 Mg-ATP 络合在铁蛋白的电子传递中心 Fe_4S_4^* 原子簇上, 增大其配位场和配位数, 引起其还原电位的降低, 从而促进电子的输出。反过来, 电子的传递又促进了 ATP 的水解, ATP 的水解与电子传递是偶联着进行的。

事实上, 许多权威性的文献在报道 Mg-ATP 与铁蛋白络合的指纹特征时, 也强烈地暗示着 Mg-ATP 可能络合在铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^* 原子簇上。Orme-Johnson^[12]注意到, Mg-ATP 与铁蛋白络合时所引起的 ESR 谱变化, 很可能是由于 Mg-ATP 同铁蛋白中的铁相互作用所创造的第二环境引起的。Mg-ATP 与氧化态铁蛋白的结合, 使得铁蛋白的非对称的铁硫生色团的圆二色性谱发生很大的变化^[6]。Mortenson 等^[6]用 ^{31}P NMR 观察到: Mg-ATP

与铁蛋白的络合, 引起 ATP 的 $\alpha\text{-}^{31}\text{P}$ 、 $\beta\text{-}^{31}\text{P}$ 、 $\gamma\text{-}^{31}\text{P}$ NMR 低场位移。这时他开始认为: 这种变化可能是由于 ATP 与铁蛋白的某部位或者是与铁蛋白的活性中心 Fe_4S_4^* 的络合引起的。由于 Mg-ATP 驱动的铁蛋白向钼铁蛋白的电子传递速率随 Mg-ATP 浓度的增加而增大, 表明随着配位体浓度的增大, 络合平衡将向生成 Mg-ATP 络合物的方向移动。从铁蛋白分别与 Mg-ATP 和 Mg-ADP 饱和络合时的热力学函数的变化可知, 这种键合方式是属于弱键性质的^[7]。配位键合也是弱键性质的。在不同的氧化态, Fe_4S_4^* 原子簇所具有类立方烷骨架是相对稳定的。 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{-2}$ 或 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{-3}$ 原子簇的 4 个 Fe 的配位界上也分别只有 66 个电子或 67 个电子, 都不到 72 个电子, 因而都是配位不饱和的, 只要空间容许, 还可以配位络合几个带有孤单电子对的配体。由于 ATP 的带负电的磷酸根部分有可能与铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^* 原子簇的 $\text{Fe}^{+2(+3)}$ 络合, 增大作用于 Fe_4S_4^* 原子簇上的配位场, 改变铁的电子组态以及 $\text{S} \rightarrow \text{Fe}$ 之间的电荷转移能力, 同时也增大了作用于整个原子簇上的负电场, 使电子比较容易被驱动而传输出来给电子接受体。由于 ATP 与铁蛋白中的 Fe_4S_4^* 的络合, 降低了 ATP 中 P 核周围的电荷密度, 从而引起其 $\alpha\text{-}^{31}\text{P}$ 、 $\beta\text{-}^{31}\text{P}$ 和 $\gamma\text{-}^{31}\text{P}$ NMR 谱峰低场位移。体积庞大的 ATP 分子钻进铁蛋白的疏水环境而与 Fe_4S_4^* 络合, 除了增大其配位场和引起蛋白质变构以外, 还可能对铁蛋白中的某些 $-\text{SH}$ 起了屏蔽作用, 即 Mg-ATP 与铁蛋白络合后, 使得原铁蛋白中用巯基试剂可检测到的巯基数目减少, 不是由于 Mg-ATP 与 $-\text{SH}$ 之间存在着强烈的化学键合的缘故, 而是由于 ATP 所产生的空间位阻, 使得巯基试剂难以接近被屏蔽的 $-\text{SH}$, 使得 Mg-ATP 与铁蛋白中的 $-\text{SH}$ 之间似乎存在着强烈的化学键合。从空间屏蔽效应来解释为什么结合了 Mg-ATP 之后, 有些 $-\text{SH}$ 基团不为强的巯基试剂所作用, 是较容易理解的。

铁蛋白中的 Fe_4S_4^* 原子簇可用有机溶剂或者酸碱使之变性后, 再用适当的芳族巯基物, 如

苯硫酚 (HSC_6H_5)、邻苯二甲硫醇等,将其置换出来。被置换出来的 Fe_4S_4^+ 原子簇可用物理化学方法或者将其转移到简单的缺铁辅基的铁蛋白中去研究其性质。研究表明,被置换出来的 Fe_4S_4^+ 原子簇在置换前后其基本结构保持不变。铁蛋白是由十九种氨基酸组成的大分子。 Mg-ATP 与铁蛋白形成的络合物,由于结构复杂,不易进行深入的研究和确切的指认。因此,可转向于合成和研究分子量较小的模型化合物。在这样简单的簇合物中,配体不具有与 Mg-ATP 结合的能力,如果簇合物能与 Mg-ATP 结合,就只能可能结合在 Fe_4S_4^+ 的 Fe^{2+3} 上。铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^+ 与其模型化合物在化学性质上是基本相似的。因此, Mg-ATP 能否与铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^+ 原子簇络合,可通过其模型化合物来检验。如果络合后,其物理化学性质的改变与铁蛋白和 Mg-ATP 结合后相应的物理化学性质的改变基本上相似,这化学模拟实验就能成功地说明一些问题。模拟实验研究表明^[13]: ATP 与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{7-}$ 的络合,增加了 Fe_4S_4^+ 簇路上的配位数和配位场。 ATP 能活化 Fe_4S_4^+ 中的电子,加快其与电子受体之间的氧化还原反应,并敏化 Fe_4S_4^+ 中的 Fe^{+2} ,使其易与亚铁螯合剂作用。用 H_2O_2 为电子受体,在电子传递过程中,促进了部分 ATP 的水解。模拟体系具有 Mg-ATP 与铁蛋白相互作用时相似的物理化学性质。

根据固氮酶已知的酶促反应和化学模拟实验事实以及配位化学、络合催化原理,可以推测在固氮酶体系中, Mg-ATP 可能通过 β 和 γ - PO ,以桥键双配位方式络合在铁蛋白的活性中心 Fe_4S_4^+ 簇路上。 Mg-ATP 与铁蛋白活性中心作用的可能模式见图 1。

其中, Mg-ATP 的腺嘌呤基团则结合在铁蛋白的某一疏水袋上。 Mg-ATP 与铁蛋白活性中心 Fe_4S_4^+ 的络合,增大作用于 Fe_4S_4^+ 原子簇上的配位数和配位场,活化其电子,引起铁蛋白变构,接通了铁蛋白与钼铁蛋白复合物中电子传递的通路,电子传递促进了 Mg-ATP 的水解,因而 ATP 的水解与电子传递是偶联着进

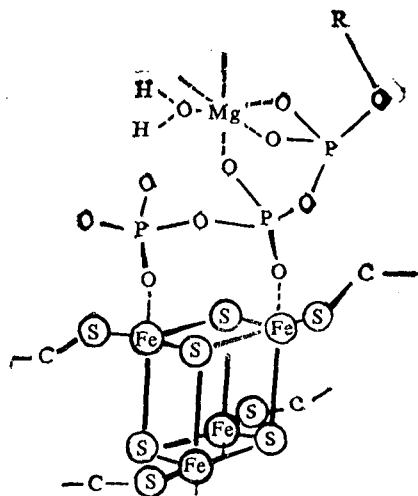


图1 Mg-ATP 与铁蛋白络合的可能模式

行的。这样,固氮酶通过 ATP 的焦磷酸根部分与 Fe_4S_4^+ 原子簇的络合提高瞬间还原电位,驱动电子传递,然后又用水解掉磷酸根配位的办法,巧妙地把 ATP 中的高能磷酸键的水解这一热力学自发过程与自由能变化较小的底物还原反应偶联起来,从而利用高能磷酸键的能量以帮助推动还原反应的进行。

参 考 文 献

- 1 曾定,固氮生物学. 厦门: 厦门大学出版社,1987: 260—265
- 2 Mortenson L E. *Biochim Biophys Acta*, 1973; 292: 422
- 3 Mekenna C E, Nakajima T, Tones J B *et al.* In: Broughton W J *et al* eds, *Nitrogen fixation*, Oxford: Clarendon Press, 1986; 4: 1
- 4 Mortenson L E, Upchurch R C. In: Gibson A H *et al* eds, *Current Perspectives in nitrogen fixation*, Canberra: Australian Academy of Science Press, 1981: 75—77
- 5 Walker G A, Mortenson L E. *Biochem Biophys Res Comm*, 1973; 53: 904
- 6 Eady R R. In: Broughton W J *et al* eds, *Nitrogen fixation*, Oxford: Clarendon Press, 1986; 4: 49
- 7 尤崇杓,王惠贤,高盟生. 植物生理学报,1984;10: 73
- 8 Eady R R. *FEBC Lett*, 1978; 95: 211
- 9 Stiefel E I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 70: 988
- 10 Robson R L. *FEBC Lett*, 1984; 173: 394
- 11 蔡启瑞,万惠霖,林硕田. 厦门大学学报(自然科学版), 1979;18: 30
- 12 Orme-Johnson W H, Davis L C. *Iron-Sulfur Protein*, 1977; 3: 15
- 13 Yefan Wu, Guodong Lin, Khirui Tsai *et al.* *Pure & Appl Chem*, 1988; 60: 1291

[本文于1990年9月14日收到,1991年2月7日修回]