

specifically. The co-crystal structure of TBP/TATA-box complex is introduced and its role in the initiation of transcription is discussed.

Key words TBP, TATA box, co-crystal structure, transcription

固氮酶中的电子传递*

黄静伟 张鸿图 万惠霖 蔡启瑞

(厦门大学化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要 提出改进的二步 ATP 驱动的电子传递机理, 对还原剂和 MgATP 都充足或其中有一种不充足的情况下固氮酶体系的 EPR 信号变化作了合理的解释.

关键词 固氮酶, ATP 驱动, EPR 信号, 电子传递

固氮酶是由 MoFe 蛋白 ($\alpha_2\beta_2$ 四聚体, 分子量约为 230 ku) 和 Fe 蛋白 (γ_2 二聚体, 分子量约为 65 ku) 两个组分构成. 随着 N_2 和其他外源底物络合到 MoFe 蛋白的活性中心, 电子从还原剂经由 Fe 蛋白传递到 MoFe 蛋白上, 再由 MoFe 蛋白传递给底物, 耦合着质子的传递, 底物得到不同程度的还原. 有关这一电子传递过程的研究一直是固氮酶研究的一个中心内容. 本文提出改进的二步 ATP 驱动的电子传递机理, 对还原剂 ($S_2O_4^{2-}$) 和 MgATP 都充足或其中有一种不充足情况下固氮酶体系的 EPR 信号变化进行尝试性解释.

1 改进机理的提出

在 Hardy 等^[1]证明生物固氮必须有 ATP 参加之后, Walker 和 Mortenson^[2]在稀固氮菌——巴氏芽胞梭菌 (*Clostridium pasteurianum*, Cp) 酶溶液中观察到当还原剂 ($S_2O_4^{2-}$) 和 MgATP 都充足时, 少量的 Fe 蛋白能还原分子数量大得多的 MoFe 蛋白, 使得 85% 的 MoFe 蛋白处在没有 EPR 信号的深度还原态, 大部分 Fe 蛋白处于有 EPR 信号的还原态, 大大降低了酶促活性. 然而 Smith 和 Lowe^[3]却在肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kp) $Kp1:Kp2=1:1$ 的较浓固氮酶溶液中观察到稳态酶周转时, 90% $Kp1$ 处于无 EPR 信号的还

原态, 而 70% 的 $Kp2$ 是没有 EPR 信号的氧化态. 为了很好地说明这些实验现象, Cai 等^[4]根据配位化学和络合催化作用原理, 提出了二步 ATP 驱动电子传递的固氮酶催化反应机理. 最近, Rees 等^[5]成功地解析了 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白单晶 X 射线衍射所得到的电子密度图, 得到 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白的三维空间结构, 指出 N_2 和其他外源底物是络合在固氮酶中的 M-簇合物 (蛋白键合的 FeMo-cofactor). M-簇合物是由 MoS_3Fe_3 和 FeS_3Fe_3 这二个缺口的类立方烷型簇合物通过三个非蛋白配体 (二个硫和一个比硫轻的“Y”) 桥联而成. 由于 M-簇合物是深埋在 MoFe 蛋白里, 电子是由 Fe 蛋白先传递给处在 MoFe 蛋白表层的 P-簇合物 (P-簇合物是由两个 Fe_4S_4 簇合物通过二个半胱氨酸的巯基配体桥联而成), 再传递给 M-簇合物. MgATP 可以络合到 Fe 蛋白或 MoFe 蛋白上^[6], 但单独的 Fe 蛋白或 MoFe 蛋白并不会使 MgATP 发生水解, 只有当络合着 MgATP 的 Fe 蛋白与 MoFe 蛋白结合产生碱性基团时才能催化 MgATP 的水解^[7]. 动力学研究^[8]表明: ATP 水解发生在 Fe 蛋白-MoFe 蛋白之间的电子传递之前. 虽然 ATP 在 Fe 蛋白上的具体键合位目前还未证实, 但已知 ATP

* 国家基础性研究重大关键项目 (攀登计划) 资助课题.

收稿日期: 1994-12-20, 修回日期: 1995-09-04

络合到 Fe 蛋白上会引起 Fe 蛋白的构型和氧化还原电位的变化, 从而促进了 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白的结合^[9]. 基因突变研究^[10]发现体外 FeMo-co 的生物合成需要有 Fe 蛋白和 MgATP, 但 Fe 蛋白并不必发生由于 MgATP 络合而诱发的构型变化, 也不需要一般的 MgATP 水解及发生从 Fe 蛋白到 MoFe 蛋白的电子传递. ATP 水解的数量与电子传递的关系进一步证实, $\text{MgATP}/2\text{e}^- > 4$ ^[11]. 根据上述这些研究结果, 我们提出了改进的二步 ATP 驱动的电子传递机理, 如图 1 所示.

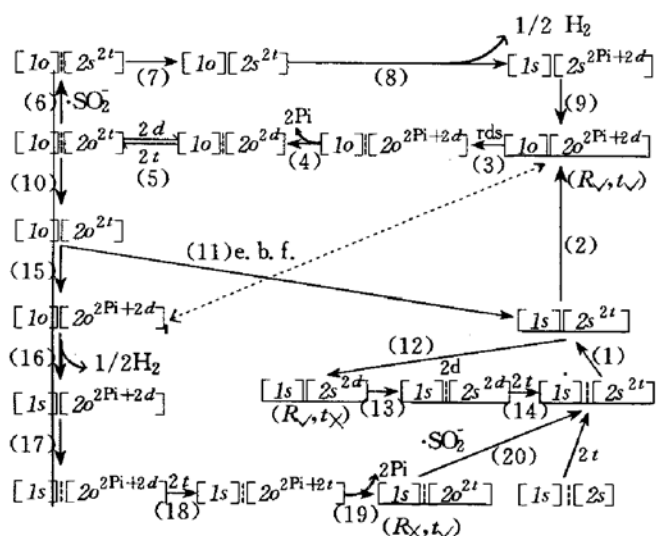


图 1 电子传递过程中固氮酶组分的氧化还原态和改进的二步 ATP 驱动的电子传递机理

ls: 具有 EPR 信号的半还原态 MoFe 蛋白; lo: 没有 EPR 信号的深度还原态 MoFe 蛋白; 2s: 具有 EPR 信号的还原态 Fe 蛋白; 2o: 没有 EPR 信号的氧化态 Fe 蛋白; t: ATP; d: ADP; Pi: 磷酸盐; R: 还原剂; ✓: 表示充足供应; ×: 表示不充足供应; $\cdot\text{SO}_2^-$: 表示含有自由基的还原剂.

2 改进的 ATP 驱动的电子传递机理

2.1 第一步 ATP 驱动的电子传递

天然分离的 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白分别具有 EPR 信号的半还原态 (ls) 和还原态 (2s). 当 ATP 络合到 Fe 蛋白上时引起了 Fe 蛋白构型和氧化还原电位的变化, 促进了 Fe 蛋白与 MoFe 蛋白结合为 $[\text{ls}][2\text{s}]^{2\text{t}}$. 由于 Fe 蛋白

和 MoFe 蛋白结合产生了碱性物种催化了 MgATP 的水解, 产生 ADP 和 Pi (无机磷酸盐), 同时放出大量的能量克服了电子从 Fe 蛋白传递给 MoFe 蛋白所需跃过的能垒, 完成电子的传递, 使 MoFe 蛋白变成没有 EPR 信号的深度还原态, 而 Fe 蛋白自己也变成无 EPR 信号的氧化态, 即得到 $[\text{lo}][2\text{o}]^{2\text{Pi}+2\text{d}}$, 这样就完成了 ATP 驱动的第一步电子传递, 如图 1 中 (1) → (2).

2.2 第二步 ATP 驱动的电子传递

从 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白结合物的结构上看, Fe 蛋白的 Fe_4S_4 簇合物是被埋在 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白结合的界面上, 要使没有 EPR 信号的氧化态 Fe 蛋白被还原, Fe 蛋白和 MoFe 蛋白的结合物必须先解离, 产生 $[\text{lo}]$: $[\text{2o}]^{2\text{Pi}+2\text{d}}$. 从动力学上来考虑, 对于浓酶溶液, 图 1 (3) 这一步是整个固氮酶电子传递过程的速率决定步骤, 结果正如 Smith 等^[3]所观察的. 在 ATP 充足的情况下, ATP 会与 ADP 进行交换, 产生络合着 ATP 的没有 EPR 信号的氧化态 Fe 蛋白. 如果还原剂 ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) 也很充分, 则氧化态的 Fe 蛋白会被继续还原成有 EPR 信号的还原态, 使得深度还原态的 MoFe 蛋白和还原态 Fe 蛋白缔合为 $[\text{ls}][2\text{s}]^{2\text{t}}$. 对于稀酶溶液, 图 1 (7) 是整个过程的速率决定步骤, 该机理很好地说明了 Mortenson 等^[2]在稀酶溶液中所观察到的实验结果. 由于 ATP 和 Fe 蛋白络合在 MoFe 蛋白上, 使得 MoFe 蛋白的构型发生变化, 可能沟通了 MoFe 蛋白中 P-簇合物和 M-簇合物之间的电子传递路径, 促使电子传递给络合在 M-簇合物上的底物. 如果还原剂 ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) 并不充分, 则深度还原态的 MoFe 蛋白和氧化态 Fe 蛋白也会缔合为 $[\text{lo}][2\text{o}]^{2\text{t}}$, 同样会促进电子传递给底物. 这两个子过程, 如图 1 的 (5) → (6) → (7) → (8) 或 (5) → (10) → (15) → (16) 并不一定要求 ATP 发生水解, ATP 也可能是直接络合在 MoFe 蛋白上^[10]. 对于 ATP 不充足的情况, 可能会使得深度还原态的 MoFe 蛋白和络合着 ATP 的氧化态 Fe 蛋白之间发生电子倒流并发生 ATP 与

ADP 的交换, 见图 1 (11) 和 (12), 产生 $[1s][2s]^{2+}$ 和 $[1s][2s]^{2d}$. 随着电子传递的循环往复进行和质子连绵不断的提供, 使底物得到不同程度的还原.

参 考 文 献

- 1 Hardy R W F, D' Eustachio A J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964; **15**: 314
- 2 Walker M, Mortenson L E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973; **54**: 669
- 3 Smith B E, Lowe D J, Bray R C. *Biochem J*, 1973; **135**: 331
- 4 Cai Q R, Zhang H B, Lin G D. *Advance in Science of China*, 1987; **2**: 125
- 5 Rees D C, Kim J, Georgiadis M M *et al.* In: Stiefel E I eds. *Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems*. Washington DC: American Chemical Society, 1993: 170
- 6 Burris R H. In: Gibson A H eds. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Australia: Australian Academy of Science, 1981: 126
- 7 Wolle D, Dean D R, Howard J B. *Science*, 1992; **258**: 992
- 8 Thorneley R N F. In: Gresshoff P M eds. *Nitrogen fixa-*

tion: achievements and objectives. New York: Chapman and Hall, 1990: 103

- 9 Burgess B K. In: Stiefel E I eds. *Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems*. Washington DC: American Chemical Society, 1993: 144
- 10 Gavini N, Burgess B K. *J Biol Chem*, 1992; **267**: 21179
- 11 Orme-Johnson W H. *Science*, 1992; **257**: 1639

The Electron Transport in Nitrogenase. Huang Jingwei, Zhang Hongtu, Wan Huilin, Cai Qirui (Tsai Kuirui) (*Department of Chemistry, State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005, China*).

Abstract A modified mechanism of 2-step-ATP-driven electron transport is proposed, it can reasonably explain the change of EPR signal in the two components of nitrogenase when the supply of reductant ($S_2O_4^{2-}$) and MgATP are enough or only one is enough.

Key words nitrogenase, ATP-driven, EPR signal, electrontransport

昆虫病毒的增强蛋白

胡 薇 黎路林 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430070)

摘要 在某些昆虫病毒的包涵体中相继发现了增强蛋白. 这类蛋白可以增强核型多角体病毒对昆虫幼虫及体外培养的昆虫细胞的感染力, 缩短杀虫时间, 提高杀虫效率; 还可以增强其他生物杀虫剂 (如: Bt) 的毒力. 关于增强蛋白的作用机制有两种观点: 降解围食膜以利于病毒粒子侵染细胞或直接作用于细胞质膜促进病毒粒子的套膜与之融合. 该蛋白是由病毒编码的, 现已克隆出第一个增强蛋白基因, 该基因含有一个 2703 bp 的开放阅读框, 其核苷酸序列分析业已完成. 增强蛋白的发现有望对病毒杀虫剂的推广产生积极影响.

关键词 杆状病毒, 增强蛋白, 增效作用

在研究昆虫病毒感染性时, 人们发现某些颗粒体病毒 (GVs) 含有增强蛋白 (enhancing protein), 可以提高昆虫的敏感性, 加速核型多角体病毒 (NPV) 的感染进程^[1,2], 而且这种蛋

白还可以提高其他生物杀虫剂 (如: Bt δ -内毒素) 的杀虫效率. 近期的研究表明, 不同 GVs