

固氮酶反应中 ATP 驱动电子传递的化学模拟

吴也凡 曾定

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

洪亮 林国栋

(厦门大学化学系, 厦门 361005)

关键词 ATP、铁蛋白、络合

MgATP 与铁蛋白络合的 esr、CD、³¹P-NMR 等研究, 都有助于支持蔡启瑞^[1]提出的 MgATP 是络合在铁蛋白活性中心 Fe₄S₄^{*} 原子簇上的这一论点。但由于 Mortenson 等^[2]发现 MgATP 能够敏化铁蛋白中的铁, 使其易与亚铁螯合剂反应这一重要的实验事实以来, 关于 MgATP 在铁蛋白的结合部位的研究, 大多数研究者倾向于^[3] MgATP 不是结合在铁蛋白的活性中心 Fe₄S₄^{*} 上, 而是结合在它的非铁部位。如果 MgATP 结合在铁蛋白活性中心 Fe₄S₄^{*} 原子簇上, 是否一定屏蔽原子簇中的铁, 使其不易与亚铁螯合剂反应? 由于铁蛋白的活性中心与其模型化合物的化学性质是基本相似的, 通过化学模拟研究, 有助于解决这一在固氮酶反应中 ATP 驱动的电子传递机理研究中至关重要的问题。

一、实验材料与方法

[R₂N]₂[Fe₄S₄(SPh)₄] 按已知方法^[4]制备。ATP、ADP、AMP 为 Sigma 公司产品。染料退色速率测定: 在 1cm 的比色池中注入 2ml [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ (0.1 μmol)-L (1 μmol), 快速加入等当量的亚甲蓝, 在 610nm 处用分光光度计测定其退色速率。痕迹量的 PhSH 用 AgDz 法^[5]测定。邻菲罗啉 (Phen) 与原子簇反应速率的测定: 在密封的厚度为 0.5cm 的比色池中注入样品后, 快速加入 Phen, 在 510nm 处测定其增色速率。³¹P-NMR 在 VARIAN-80A 型波谱仪上测试。

二、结果与讨论

在 [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ 中加入 26mol 的 ATP 后, 电子吸收光谱在 320nm 处出现一个新的特征吸收峰。在 [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ 中分别加入 26mol 的 ADP、AMP 后, 原子簇的吸收光谱也分别被压低, 其程度为 ATP >> ADP > AMP (图 1)。ATP 等核苷酸配体与 [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ 的络合, 也能压低其电子光谱。[Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ 在 458nm 处的特征吸收主要是 S → Fe 电荷跃迁的结果。ATP 中带负电荷的磷酸根配体与 Fe₄S₄^{*} 的络合, 增大了作用于原子簇上的配位场, 使其 S → Fe 之间转移电子的倾向减小, 从而引起其吸收峰蓝移。ATP、ADP、AMP 中的核糖所产生的空间障碍随着磷酸键的缩短而增加以及 π 电子的共轭杂化能各不相同, 因而它们在与原子簇络合时其络合常数也各不相同。由电子光谱可看出它们的络合能力为

本文 1991 年 1 月 23 日收到, 1991 年 4 月 15 日收到修改稿。

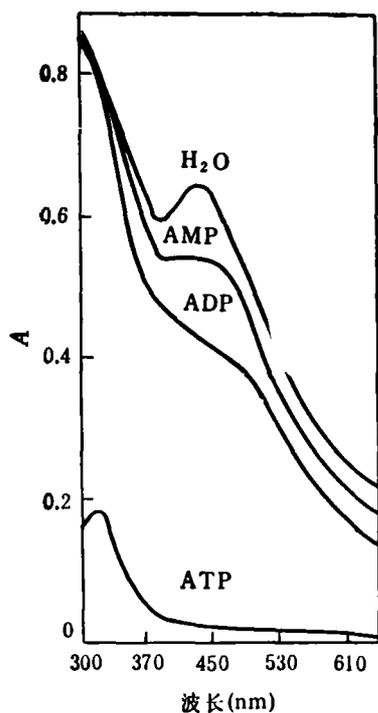


图1 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}\cdot\text{L}$ ($\text{L} = \text{H}_2\text{O}, \text{ATP}, \text{ADP}, \text{AMP}$) 在 $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (3:2(V/V), $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ 25mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ pH7.46) 介质中的电子光谱

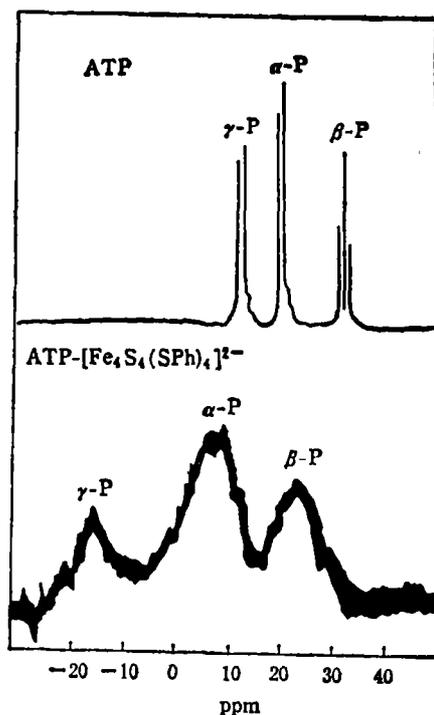


图2 在 $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (3:2(V/V), pH7.46) 介质中 ATP 与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ 络合的 ^{31}P NMR (Na_2HPO_4 为外标)

ATP > ADP > AMP.

在 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}\cdot\text{L}$ ($\text{z} = 2, 1$)-L 的 $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (3:2(V/V))介质中,用正庚烷为萃取剂,通过检测萃取剂中是否含苯硫酚,就可确定其作用方式.实验结果是,在萃取剂正庚烷中没有检测到痕迹量的苯硫酚,表明 ATP 等配体与 Fe_4S_4^* 络合仅仅是增加原子簇中铁的配位数.

ATP 等配体分别与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ ($\text{z} = 2, 1$) 的络合,都能加快络合物与等当量的亚甲蓝或靛红之间的氧还速率,加快的程度为 $\text{ATP} > \text{ADP} > \text{AMP}$,表明 ATP 等配体分别与原子簇的络合,都能活化其电子.

Mortenson 等^[6]用 ^{31}P NMR 观测到, MgATP 与还原态铁蛋白的络合,引起其 α -、 β -和 γ - ^{31}P 谱峰分别往低磁场方向移动 8.7、9 和 7.7ppm. 在化学模拟体系也有类似的情形. 在 $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (3:2(V/V))介质中,室温下 ATP与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ 的络合,使得 ATP 中的 α -、 β -和 γ - ^{31}P NMR 谱峰分别往低磁场方向移动 13.2ppm(半峰宽 325Hz) 8.3ppm(半峰宽 350Hz) 和 28.3(半峰宽 375Hz)ppm,该 ^{31}P 谱包络了较丰富的络合物物种的结构信息(图2). 在 -10°C 测试条件下, ATP 与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ 的络合,引起其 α -、 β -和 γ - ^{31}P 谱峰分别往低磁场方向移动 8.67(半峰宽 40Hz)、9.11(半峰宽 120Hz)和 9.98(半峰宽 120Hz) ppm,谱峰明显变窄,表明低温条件下,ATP 的络合和解络不如室温那么快.此介质中,ADP 与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ 的络合,使得其 α - 和 β - ^{31}P 谱峰往低磁场方向移动 15.77ppm(半峰宽 100Hz) 和 2.71ppm(半峰宽 80Hz). 该介质中 AMP 与 $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SPh})_4]^{2-}$ 的络合,使得其 α - ^{31}P 谱峰往低磁场方向移动 1.3ppm(半峰宽 400Hz). 由于 AMP 中的磷酸根紧靠着核糖,具有较大的空间位阻,

AMP 与原子簇的络合是较为松散的。

在 DMF/H₂O (3:2(V/V)) 介质中, ATP 和 ADP 都能促进原子簇与 Phen 的反应,其

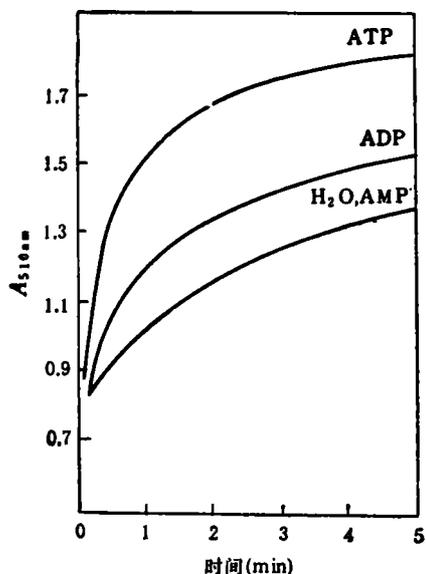
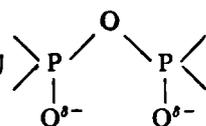


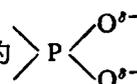
图3 在 DMF/H₂O (3:2(V/V)) Tris · HCl 25mmol · L⁻¹, pH7.46) 介质中, [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻-L (L = ATP、ADP、AMP) 与 Phen 的反应

促进程度为 ATP > ADP, AMP 加入与否,对反应基本上无影响(图3)。在 [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ 原子簇中, 4 个铁的配位界上的表观电子数共为 66 (配位饱和时为 72), 其中的 Fe^{II(III)} 是配位未饱和的, 相邻两个 Fe^{II(III)} 之间的间距约为 2.7 Å。ATP 是亲铁的螯形配体 (P₂O₇⁴⁻ 与 Fe^{II} 络合的 log β = 9.93, P₂O₇⁴⁻ 与 Fe^{III} 络

合的 log β = 22.2), 其中的  中相邻

两个氧原子间距约为 2.9 Å, 在电子效应和几何构型上允许存在端基单配位和桥基双配位二种络合方式。在 DMF/H₂O 介质中, ATP 与 Fe₄S₄^{*} 的络合存在着多种可能的络合方式。当有时只有一个 ATP 分子以桥基双配位方式络合在 Fe₄S₄^{*} 原子簇上, 并优先与 Fe^{III} 络合时, 由于 ATP 对 Fe^{III} 的定位作用, 大大减少了原子簇中 Fe^{II}-Fe^{II} 之间的离域, 使得原子簇中另一面的 Fe^{II} 未受到屏蔽。由于 ATP 增大了原子簇上的配位场, 当 Phen 靠近 Fe^{II} 时, 就较容易把 Fe^{II} 从原子簇

中夺取出来。当这种络合物品种含量较高时, 就使得原子簇中的铁表现出更易与 Phen 反应。这与在未变性的铁蛋白中加入 MgATP 后, 使得铁蛋白中的铁对亚铁试剂变得更敏感的情形相似, 但这里不存在蛋白质变构的因素。ADP 与原子簇的络合, 有时可能只有一个 ADP 分子

以端基磷酸根中的  双配位定位在 Fe₄S₄^{*} 的两个 Fe^{III} 上, 从而敏化了原子簇中的

Fe^{II}。但 ADP 与 Fe₄S₄^{*} 原子簇的络合程度不如 ATP 那么大。

模拟实验研究表明, ATP 与 [Fe₄S₄(SPh)₄]²⁻ 的络合, 增加了 Fe₄S₄^{*} 簇核上的配位场和配位数, 活化其电子, 并敏化 Fe₄S₄^{*} 中的 Fe^{II}, 使其易与亚铁螯合剂作用。模拟体系具有 MgATP 与铁蛋白相互作用时相似的物理化学性质。

致谢: 本研究工作是在蔡启瑞教授指导下进行的。

参 考 文 献

- [1] Tsai, K. R. et al., in *Fund. Res. Organomet. Chem.* (Eds. Tsutsui, M., Ishi, Y. and Huang Yaozheng), Park University Press, Baltimore, 1982, 1—12.
- [2] Mortenson, L. E. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 53(1973), 904—910.
- [3] 曾定, 固氮生物学, 厦门大学出版社, 厦门, 1987, 260—263.
- [4] Christou, F. G. et al., *J. C. S. Dalton Transation.* 6(1979), 1093—1098.
- [5] Kunkel, R. K. et al., *Anal. Chem.*, 31(1959), 1098—1101.
- [6] Mortenson, L. E. et al., in *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (Eds. Gibson, A. H. and Newton, W. E.), Australian Academy of Science Press, Canberra, 1981, 75—77.