

优化固氮活性模型信息研究^①——双齿配体 DPPE 和 DPPM 对固氮酶促反应的影响

刘爱民^{† ②} 张凤章[†] 张鸿图[†] 袁友珠[†]

许良树[†] 万惠霖^{① ③} 蔡启瑞^①

(厦门大学化学系[†], 生物系[‡], 固体表面物理化学国家重点实验室[§], 厦门 361005)

摘 要 报道了某些双齿配体对固氮酶促反应影响的研究结果. 发现 1, 2-双(二苯基磷)-乙烷 (DPPE) 对固氮酶促乙炔还原反应有促进作用, 但同时又抑制了固氮酶的放氢反应. 而比 DPPE 少一个 $-\text{CH}_2-$ 链的双(二苯基磷)-甲烷 (DPPM) 却不能表现出对固氮酶促乙炔还原活力的促进作用. 对照固氮酶 MoFe-蛋白 X-光衍射结构分析结果和量子化学近似计算所导出的固氮酶活性中心结构模型提出了 DPPE 促进酶促乙炔还原反应的一种可能的解释.

关键词 固氮酶, 双齿配体, 促进剂, 抑制剂.

1. 前 言

天然固氮酶催化还原 N_2 为 NH_3 的过程长期受到人们关注. 最近, Bolin 和 Rees 等分别独立采用 X-光衍射分析固氮酶 MoFe-蛋白, 给出了 0.28 nm ~ 0.22 nm 分辨率的 M-簇(体外时称 FeMo-cofactor 或 FeMo-co) 和 P-簇的结构模型^[1-6]. 前者是由两个缺(活)口立方烷, Fe_4S_3 和 MoFe_3S_3 簇, 靠两个硫和一个 Y 配体(氧、氮或硫)桥连形成的具有近似 C_{3v} 对称性的笼状原子簇结构, Mo 原子处在一端的角落位置上. 该模型可表示为 $[\text{L}_3\text{MoFe}_3\text{S}_3](\mu_2\text{-S})_2(\mu_2\text{-Y})[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{L}]$; P-簇则主要是由两个 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ 组成. MoFe-蛋白晶体结构分析结果使得固氮酶活性中心结构的研究又上了新的台阶^[7]. 但是, 问题并没有彻底解决, 在该模型中, 配体(Y)的种类尚未最终确定^[8], 完整的结构参数也有待给出.

对于固氮酶底物活性中心 M-簇而言, 酶的十几种底物及抑制剂是揭示和检验其化学结构与功能关系的有力工具. 本工作在以前化学探针方法研究固氮酶活性中心结构工作的基础上^[9-11], 考察了一系列具有双齿结构的有机配体对固氮酶促反应的影响, 从中寻找出固氮酶的新抑制剂和促进剂并以其作为揭示酶活性中心结构与功能的新探针. 本文报道了双齿含磷有机化合物改变固氮酶促底物还原行为(促进或抑制)的研究结果; 并以化学探针的思路对实验结果提出了初步解释.

1993年8月10日收到初稿, 1993年11月29日收到修改稿.

①国家基础性研究重大关键项目(攀登计划)子课题及人事部专家司博士后经费资助项目.

②黄静伟、扬如、周明玉同志参加了本工作.

③通讯联系人.

2. 材料与方 法

双(二苯基磷)-甲烷和 1, 2-双(二苯基磷)-乙烷晶体由本实验室合成. 邻苯二甲醛为市售分析纯. 反应系统 Cp、Ck、ATP 和连二亚硫酸钠等都经无氧处理并保存于氩气氛中备用. 固氮酶铁蛋白、钼铁蛋白依文献^[12-14]的分离纯化方法从 *Av.* 230 菌(沈阳应用生态研究所发酵)中得到. 所有实验均在绝氧条件下操作完成. 反应时, 分别取一定量(约 0.05 ml, 蛋白浓度为 10.0 mg/ml)的固氮酶铁蛋白、钼铁蛋白和固氮酶全酶(Fe-Protein + MoFe-Protein)于严格无氧条件下按摩尔比 Mo : L = 1.0 : 1.1 加双齿配体 DPPE 或 DPPM、邻苯二甲醛. 30 °C 水溶液中振荡反应 0.5 h; 然后加入固氮酶其余的组分蛋白和反应系统(ATP, Cp, Ck, MgCl₂, Na₂S₂O₄)及底物乙炔, 重新置于温浴中振荡反应. 采用乙炔还原气相色谱法(103 型气相色谱仪, 氢火焰离子检测器)测定固氮活性; 以 102 G 型色谱仪及热导池检测器测量固氮酶放氢活性.

3. 实验结果

双齿含磷配体 DPPE、DPPM 和双齿配体邻苯二甲醛对固氮酶乙炔还原比活力影响的结果列于表 1.

表 1. 双齿配体对固氮酶活性影响

Table 1. The effects of some bidentate ligands on nitrogenase activity

	Enzymatic reaction	Contrast	<i>o</i> -Phthalaldehyde		DPPM		DPPE	
			Activity	%*	Activity	%*	Activity	%*
Ligands mixed with MoFe-Protein solution	C ₂ H ₂ →C ₂ H ₄	58.8	12.6	-78.6	53.2	-9.5	72.8	+23.8
	H ₂ evolution	8.3	1.8	-78.3	5.4	-34.9	3.4	-59.0
Ligands mixed with Fe-protein solution	C ₂ H ₂ →C ₂ H ₄	42.0	11.1	-73.6	39.5	-6.0	50.2	+19.5
	H ₂ evolution	9.5	3.3	-65.3	5.8	-38.9	4.4	-53.7
Ligands mixed with nitrogenase** solution	C ₂ H ₂ →C ₂ H ₄	56.7	24.4	-57.0	49.8	-12.2	70.4	+24.2
	H ₂ evolution	4.8	2.7	-43.8	3.9	-18.8	3.1	-35.4

Activity: (nmol C₂H₄ formed/mg protein · min); Reaction time: 40 min (C₂H₂), 2 h (H₂ evolution).

* Activity/Contrast ** Fe-protein + MoFe-protein

在测定放 H₂ 量时, 各组(包括对照组)都观察到一定时间(~4 h)以后放 H₂ 量剧增的情况. 经分析认为是在反应系统中因长时间厌氧促使杂菌(野生厌氧菌)繁殖造成的. 单独 Fe-蛋白, 单独 MoFe-蛋白加反应系统的空白试验证实了上述推测. 所以, 在测放 H₂ 量时, 反应时间控制在 2 小时之内. 从表 1 可以看出, DPPE 可使固氮酶的乙炔还原活力提高约 20%, 而且不论配体是先与固氮酶组分蛋白预作用还是直接与固氮酶全酶作用结果皆相近. 可见 DPPE 是新发现的固氮酶乙炔还原活力的促进剂, 同时它又使固氮酶放 H₂ 受到很强的抑制. 与此同时, 仅比 DPPE 少一个 -CH₂- 链的 DPPM 对固氮酶乙炔还原活力在同样条件下几乎没有明显影响(Δ≈-5%), 但 DPPM 对固氮酶放 H₂ 也呈现出一定抑制作用. 作为对比, 一个已知的固氮酶抑制剂邻苯二甲醛则同时强烈抑制固氮酶的乙炔还原和放 H₂ 活力. 这三种双齿有机配体对固氮酶还原 N₂ 成 NH₃ 能力的影响尚待研究.

表 2. 固氮酶的新促进剂与抑制剂

Table 2. New promotor and inhibitors of nitrogenase activity

	<i>o</i> -Phthalaldehyde	Ph ₂ PCH ₂ PPh ₂	Ph ₂ PCH ₂ CH ₂ PPh ₂
C ₂ H ₂ →C ₂ H ₄	↓ (I)	↘ (I)	↑ (P)
H ₂ evolution	↓ (I)	↓ (I)	↓ (I)

4. 讨 论

分子氮和乙炔在固氮酶上的配位方式可能并非相同。文献中已有分子氮的还原必需 P-簇的协同作用，而乙炔分子的络合活化则仅在 M-簇上即可完成的报道^[15]。Bolin 和 Rees 等发表了固氮酶 MoFe-蛋白 X-光衍射结构分析结果^[1-6]以后，陈明旦等交替使用分子图形学软件和分子力学计算对其进行了分子模型设计^[16]，得出了 FeMo-co 模型的结构参数，刘爱民等采用群分解EHMO量子化学方法^[17]对 FeMo-co 模型进行了近似计算^[9,10]，提出 Rees 模型中未知

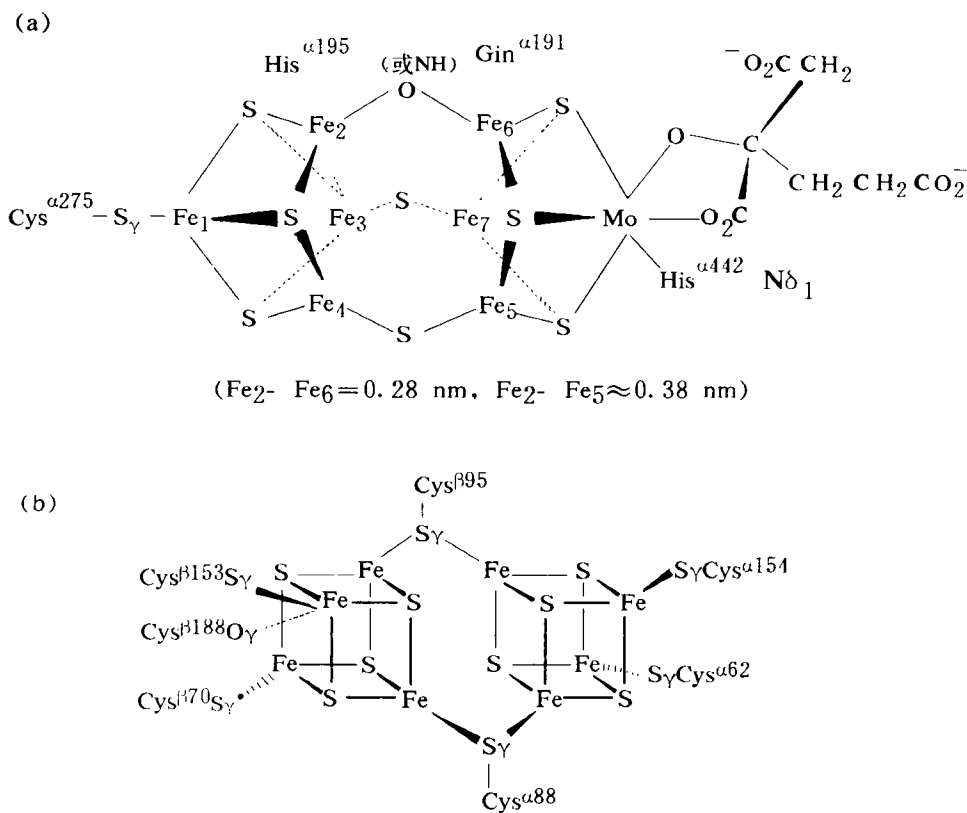
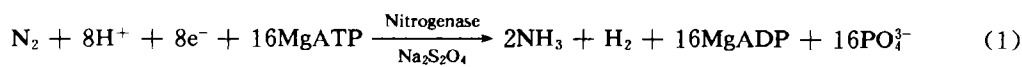


图 1 (a)固氮酶 M-簇模型；(b)固氮酶 P-簇模型
Fig. 1 (a) Model of the nitrogenase M-cluster (FeMo-co) ;
(b) Structure of the nitrogenase P-cluster pair.

配体(Y)应为 O= 或 NH=(图 1a)的推论^[8], 与 Sellmann 几乎同时发表的经验性假设^[7]相似.

从图 1a 可以看出, DPPE 分子既难以直接与 Mo 络合, 又没有合适的位置可挂在 M-簇上面; 但它的分子尺度与 P-簇(图 1b)却较接近, 一个可能的解释是 DPPE 抑制了依赖 P-簇的某个放 H₂ 中心, 使得 ATP-驱动的电子传递在分配上发生变化, 即 M-簇可以获得更多的电子, 所以在 M-簇上呈现出乙炔还原活力的提高. 与此同时, DPPM 因少了一个碳链, 作用则明显不同. DPPM 对与 P-簇有关的放 H₂ 中心的抑制较 DPPE 弱, 且因其双齿间距与 M-簇靠硫(或氧)配体桥联的双铁间距(0.35~0.38 nm)相近(图 1a), 所以它更可能抑制了固氮酶 M-簇的放氢位, 从而对固氮酶乙炔还原活力显示出弱抑制作用.

多数研究人员曾认为, 每还原 1 摩尔 N₂ 成为 2 摩尔 NH₃ 的同时要出 1 摩尔 H₂, 即 75% 的电子(能量)用于生成 NH₃, 25% 的电子(能量)用于放 H₂, 如式 1 所示



但更深入的研究发现, 纯固氮酶在正常条件下催化内源底物 H⁺ 还原放 H₂ 所消耗的电子, 却总是大于 25%. 即使在 50 大气压的 P_{N₂} 下, 仍有 27% 的电子用于放 H₂. 在不同 N₂ 分压条件下, 催化 N₂ 还原和 H₂ 释放反应动力学的定量分析^[19, 20]都说明固氮酶除了在 M-簇上固氮并同时放出 H₂ 以外, 还应有另外的放氢位和放 H₂ 中心. 这个假设便成为产生上述解释的基础; 换言之, 本文报道的研究结果也可理解为支持了固氮酶双位放氢假设.

参考文献

- 1 Bolin J T, Ronco A E, Morgan T V et al. . *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **90**:1078
- 2 Bolin J T, Ronco A E, Mortenson L E et al; Grashoff P M, Roth L E et al. (Eds.), : "Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives"; Chapman and Hall, New York, 1990, 117 - 122
- 3 Kim J, Rees D C. *Science*, 1992, **257**:1677
- 4 Kim J, Rees D C. *Nature*, 1992, **360**, 553
- 5 Georgiadis M M, Komiya H, Chakrabarti P et al. . *Science*, 1992, **257**:1653
- 6 Chan M K, Kim J, Rees D J. *Science*, 1993, **260**:792
- 7 Sellmann D. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1993, **32**(1):64
- 8 刘爱民, 周泰锦, 万惠霖等. 高等学校化学学报, 1993, **14**(7):996
- 9 Tsai K R, Zhang H B, Lin G D. *Adv in Sci of China-Chem*, 1987, **2**:125
- 10 Tsai K R, Wan H L, Zhang H T et al. . In "The Nitrogen Fixation and its Research in China", Springer-Verlag, Heidelberg, 1991, 87
- 11 张鸿图, 扬 如, 林国栋等. 高等学校化学学报, 1992, **13**(3):362
- 12 曾 定, 许良树, 张凤章. 厦门大学学报(自然科学版), 1980, **19**(4):78
- 13 Newton W E, Burgess B K, Stiefel E I, Newton W E, Ostuka S (Eds), In: "Molybdenum Chemistry of Biological Significanes". Plenum Press, N. Y. , 1979, 191
- 14 Burgess B K. *Chem Rev*, 1990, **90**:1377;
- Huang H Q, Kofford M, Simpson F B, Watt G D. *J Inorg Biochem*, 1993, **52**(1):59
- 15 黄巨富, 骆爱玲, 解雪梅等. 植物学报, 1990, **32**:112
- 16 陈明旦, 赖伍江, 胡盛志. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, **32**(5):599
- 17 刘爱民, 周泰锦, 张鸿图等. 生物化学与生物物理进展, 1994, **21**(2)

18 周泰锦, 王南钦. 厦门大学学报(自然科学版), 1985, 24(3):345

19 Simpson R V, Burris R H. *Science*, 1984, 224:1095

20 张振水, 吴柏和、李季伦. 固氮酶催化的放 H_2 反应, 微生物学报, 1993, 33(5):320

Studies on Rationalization of Nitrogenase Active-Center Models — Novel Nitrogenase Inhibitors and Promoters as Chemical Probes

Liu Aimin[†], Zhang Fengzhang[†], Zhang Hongtu[†], Yuan Yuzhou[†],
Xu Liangshu[‡], Wan Huilin^{§†}, Tasi Khirui^{§†}

([†] Department of Chemistry, [‡] Department of Biology, [§] State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract

In previous work from this laboratory, nitrogenase substrates of about a dozen known types were regarded as chemical probes, and multinuclear coordination activation of the exogenous substrates by cubane-like, or twin-cubane-like cluster structural active-center was inferred. Recent publications of models of nitrogenase M-cluster and P-clusters by Bolin and Rees *et al.*, based upon single-crystal X-ray diffraction data with 0.28 and 0.22 nm resolution, have shed new light on the structure of nitrogenase active center. In the present work, we aim to gain information from new chemical probes which alter the substrate specificities (N_2 , acetylene, or proton reduction etc.) of nitrogenase. It will be very useful in examining and understanding the structure and function of the latest proposed model of nitrogenase active center.

The behaviors of 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, a promoter of in vitro nitrogenase catalyzed acetylene reductive hydrogenation, but an inhibitor of hydrogen evolution reaction, as a new chemical probe of nitrogenase active center are reported, together with more detailed study on the behaviors of *o*-phthalaldehyde as a potent inhibitor of nitrogenase activity.

The preliminary data we had acquired are consistent with the hypothesis of the two-site model of H_2 evolution in nitrogenase MoFe-protein. Furthermore, in addition to the M-cluster, P-cluster is probably involved in the second site of H_2 evolution. Further information provided by this work indicate that the functions of M- & P-clusters in nitrogenase catalyzed N_2 reduction reactivity may be different from that of acetylene reduction, for example, N_2 reduction to NH_3 needs assistance of Mo, whereas acetylene reduction does not.

Key words Nitrogenase, Bidentate ligands, Promoter, Inhibitor.