

棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白两种聚合体的研究

王 菲* 林永齐**

(吉林大学分子生物学系, 长春)

摘要 棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白八聚体相当于两个钼铁蛋白四聚体的聚合体。在细胞生长过程中, 胞内钼铁蛋白两种聚合体的相对含量出现规律性变化: 在对数期, 细胞固氮酶比活力成上升趋势, 而钼铁蛋白主要以高活力的四聚体形式存在; 在对数期结束至稳定期, 细胞固氮酶比活力下降至一个低水平的稳定值, 此时的钼铁蛋白基本上为八聚体形态。在细胞固氮生长时, 向培养基中加入过量氨可明显地导致钼铁蛋白由四聚体向八聚体的转化。我们推断, 生长过程中胞内钼铁蛋白聚合态的变化可能是调节固氮酶活力的一种方式。胞外, 钼铁蛋白的两种聚合态可以相互转化。

关键词: 固氮酶, 钼铁蛋白, 八聚体, 棕色固氮菌

以往的研究认为固氮酶钼铁蛋白为 $\alpha_2\beta_2$ 结构的四亚基聚合体。1987年我们首先发现了棕色固氮菌中的钼铁蛋白八聚体^[1,2]。我们认为低活力的八聚体可能是天然存在于固氮生长中的棕色固氮菌细胞内, 对固氮酶活力调控起重要作用的一种钼铁蛋白聚合形态, 八聚体和四聚体钼铁蛋白相当于两个次级同工酶。一般认为, 固氮酶活力调控可以通过底物控制方式、小分子物质对酶的别构部位的调节方式和钼铁蛋白与铁蛋白相互作用方式来实现^[3]。我们提出的钼铁蛋白通过聚合态变化对固氮酶活力的调控方式实际上是基于钼铁蛋白之间的相互作用。八聚体的发现及其性质研究将有助于揭示固氮酶活力调控机制。

材 料 与 方 法

棕色固氮菌 230 (*Azotobacter vinelandii* 230) 菌种由中科院沈阳林业土壤研究所提供。菌体用实验室摇瓶培养或者工业发酵罐培养。固氮酶钼铁蛋白八聚体的分离提纯采用林永齐方法^[1,2]。

钼铁蛋白两种聚合态相对含量的测定: 将无细胞抽提液上 DEAE-52 柱, 用 0.025mol/L Tris-HCl 洗柱, 之后收集 0.025mol/L Tris-HCl-0.4mol/L NaCl 的洗脱组分。此组分经聚丙烯

* 北京军事医学科学院毒物药物研究所 ** 陈航、杜建国、马勇参加部分工作

收稿日期: 1988-11-17, 修回日期: 1989-07-31

烯酰胺凝胶电泳之后，用0.2%的二硫酚溶液^[4]进行染色，含钼的两种钼铁蛋白显出棕色带来。用岛津CS-910薄层扫描仪对蛋白区带进行扫描，两峰峰面积之比相当于两个聚合态相对含量的比值。我们将钼铁蛋白四聚体与八聚体相对含量的比值用T:O值来表示，即

$$T:O = \frac{\text{四聚体峰面积}}{\text{八聚体峰面积}}$$

结 果 与 讨 论

一、钼铁蛋白八聚体在细胞生长过程中的形成

钼铁蛋白八聚体和四聚体在胞内的相对含量随菌龄的增加而产生规律性变化。在摇瓶60小时培养中，我们观察了8,18,32,48及60小时菌龄的无细胞抽提液中钼铁蛋白相对含量。电泳图谱中(Fig.1)，8小时菌龄的无细胞抽提液中四聚体和八聚体都是强带，但是18小时菌龄的四聚体却变为弱带。将电泳凝胶进行积分扫描，结果18小时菌龄的八聚体相对含量比8小时的四聚体相对含量高一倍(Table 1)。菌龄大于32小时的无细胞抽提液电泳图谱上，薄层扫描仪检测不到四聚体钼铁蛋白带。说明在细胞生长过程中，随菌龄的增加，八聚体相对含量也随之提高。

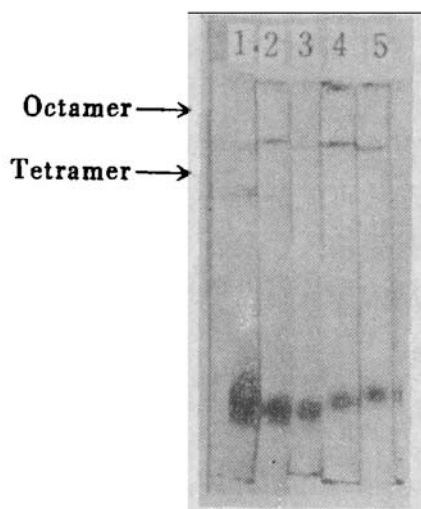


Fig.1 The polyacrylamide gel electrophoregram of the two polymeric MoFe-proteins in cell-free extracts of different aged *A. vinelandii*, by Mo-staining. 1,2,3,4 and 5 mean 8, 18, 32, 48 and 60h age, respectively.

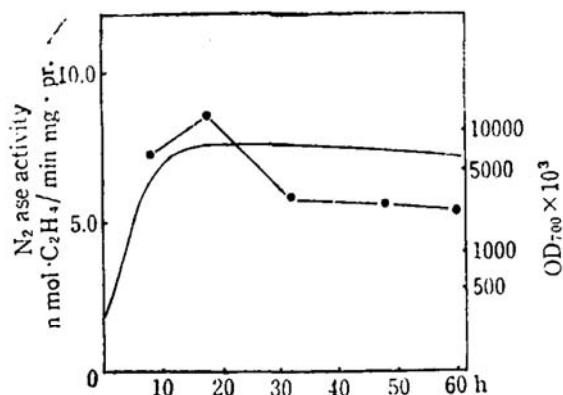


Fig.2 The growth-curve of *A.v.* (—) and N_2 ase activities at different ages (— · —)

Table 1 The ratios of tetrameric MoFe-protein's concentration to octameric MoFe-protein's in cell-free extracts at 8 and 18 hours age.

Age(h)	8	18
T:O	1.07	0.53

无细胞抽提液中固氮酶乙炔还原活力在对数期内逐渐增强, 到对数期末达到最大值。进入稳定期后, 活力明显下降, 最后稳定在一个低水平的数值(Fig. 2)。

钼铁蛋白八聚体的生成与积累, 伴随着固氮酶活力的下降, 而八聚体活力低于四聚体^[1,2]。因此钼铁蛋白两个聚合态的相对含量变化可能与固氮酶活力调控有关。对数期, 固氮酶活力较高, 高活力的四聚体相对含量就大。进入稳定期, 固氮酶活力下降, 因为酶的生物降解很缓慢^[5], 那么钼铁蛋白从四聚体向低活力的八聚体的转化可能就是一种调节固氮酶活力的有效方式。18小时菌龄的八聚体含量虽然比8小时的高, 但是18小时的钼铁蛋白总的蛋白含量可能比8小时的大, 加上其它调节作用的影响, 因而出现了18小时固氮酶活力高于8小时活力的现象。

二、氨抑制对钼铁蛋白聚合态动态变化的影响

在棕色固氮菌固氮生长时, 向培养基内加入过量醋酸铵(NH₄Ac), NH₄⁺不但会抑制固氮酶的合成也会抑制固氮酶的活性^[6], 同时对钼铁蛋白聚合态产生了很大的影响。在细菌培养第7小时加入NH₄Ac后仅1小时, T:O值由正常的1.04降至0.36(Table 2), 八聚体相对含量增加了近2倍。继续培养到18小时, T:O值由正常的0.53降至0.16, 八聚体相对含量为正常值的3倍。说明对数中期氨抑制使钼铁蛋白迅速从四聚体向八聚体转化, 并且这一作用维持到对数期结束。对数末期氨抑制的影响较小。第14小时加入NH₄Ac后培养到18小时, T:O值由正常的0.53降至0.43, 八聚体相对含量增加20%。

Table 2 The relative contents of the two polymeric MoFe-proteins after adding of NH₄Ac to the nitrogenfixing medium.

	1	2	3	4	5
T:O	1.04	0.36	0.53	0.16	0.43

Notes, 1, 8 hrs N₂-fixing culture. 2, 8 hrs culture adding NH₄Ac at 7th hr. 3, 18 hrs N₂-fixing culture. 4, 18 hrs culture adding NH₄Ac at 7th hr. 5, 18 hrs culture adding NH₄Ac at 14th h.

氨抑制对固氮酶系统来说实际上模拟了一个衰老环境。自然衰老导致八聚体积累的因素可能很多, 但是氨抑制也导致八聚体的生成与积累, 说明钼铁蛋白聚合态的变化不仅与衰老有关, 并且进一步与固氮酶活性的抑扬调节密切相关。特别是对数中期氨抑制对八聚体的明显促进生成作用证实了这一点。

三、胞外温度对钼铁蛋白聚合态的影响

将钼铁蛋白两个聚合态的混合液置于4°C, 在15天的时间内, T:O值由4.3增至9.9, 钼铁蛋白四聚体的相对含量增加1倍(Table 3)。30°C保温2小时, 钼铁蛋白聚合态混合液的T:O值与未经30°C处理的T:O值相比减小了近1/2, 八聚体的相对含量增加了(见Table 4)。由此可见, 钼铁蛋白的两种聚合态通过改变条件可以可逆地相互转化。

总之, 在生长过程中钼铁蛋白两个聚合态始终处于动态变化之中, 研究这种动态变化将有助于揭示固氮酶结构与功能的关系。另外, 钼铁蛋白两种聚合态对固氮酶的调节机制很类

Table 3 The relative contents of the two polymeric MoFe-proteins in different time at 4°C.

Time (day)	0	1	7	15
T:O	4.3	5.0	8.6	8.8

Table 4 The relative contents of the two polymeric MoFe-proteins at 30°C.

	30°C, 2hr	4°C(reference)
T:O	4.4	8.6

似于两个次级同工酶的作用机制，在固氮酶作用机制中很可能包含同工酶机制的成份。

参 考 文 献

- [1] 林永齐, 马磊, 刘东波, 微生物学报, 1987, 27(4): 384—386.
 [2] 林永齐, 王菲, 马磊, 陈航, 杜建国, 吉林大学自然科学学报, 1989, 1: 113—117.
 [3] Smith Barrw E, Nitrogen Fix, Chem-Biochem-Genet Interface, 1983, p23—62, Plenum Press, New York.
 [4] Bulen W A, LeComte J R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, 56(3): 979—986.
 [5] Henneke H, Shanmugam K T. *Arch Microbiol*, 1979, 123 (3) ; 259—265.
 [6] Houmard J, Bogusz D. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 100(3): 1237—1244.

Studies on the Octameric and Tetrameric Molybdenum-iron Proteins of Nitrogenase From *Azotobacter Vinelandii*

Wang, Fei* Lin, Yong-qi

(Department of Molecular Biology, Jilin University, Changchun)

Abstract We have found and purified the octamer of molybdenum-iron protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* 230. The activity of the octamer is lower than that of the tetramer. The octamer formation in vivo is related to cell growth process. During the log-phase of cell growth, the specific activity of nitrogenase is increasing, and the tetramer is the major form of molybdenum-iron protein. After entering into the plateau-phase, the enzyme activity decreases from maximum quickly and tends to stabilize at a low value, and at the same time the octamer becomes the major form of molybdenum-iron protein. Adding ammonium to the culture medium during nitrogen-fixing growth stage of *Azotobacter vinelandii* induces the formation of the octamer obviously. We suggest that, the octamer of molybdenum-iron protein is a possible metabolite in regulation of nitrogenase activity, the conversion from the tetramer to octamer will cause the decrease of nitrogenase specific activity in vivo. The octamer converts to tetramer at 4°C in vitro, and the direction of conversion is reversed at 30°C.

Key words: Nitrogenase, Molybdenum-iron protein, Octamer, *Azotobacter vinelandii*

* Institute of Pharmacology and Toxicology, 27 Taiping road, Beijing