

# 铜型亚硝酸还原酶的电子传递模式及催化机理研究进展

胡朝松 李春强 廖文彬 彭 明\*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101)

**摘 要:** 亚硝酸还原酶(NiRs)是反硝化过程中的关键作用酶, 它使 $\text{NO}_2^-$ 转变成 $\text{NO}$ , 减轻了水体中的氮污染。根据辅基的不同, NiRs分为血红素 $\text{cd}_1$ 型亚硝酸还原酶( $\text{cd}_1$ -NiRs)和铜型亚硝酸还原酶( $\text{Cu}$ -NiRs)两种。 $\text{Cu}$ -NiRs呈三聚体结构, 每个单体都含有两种类型的铜原子, 它们在酶催化过程中起着传递电子的重要作用。在催化过程中,  $\text{Cu}$ -NiRs中部分残基的结构变化有利于催化反应的进行。此文结合 $\text{Cu}$ -NiRs的最新研究成果, 从整体上对其结构特点、电子传递过程及催化机理等研究作了系统地阐述。

**关键词:** 铜型亚硝酸还原酶, 电子传递, 催化机理, 生物脱氮

## The Progress on Electron Transport Pathway and Catalytic Mechanism of Copper-containing Nitrite Reductase

HU Chao-Song LI Chun-Qiang LIAO Wen-Bin PENG Ming\*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101)

**Abstract:** Nitrite reductases (NiRs) are the key enzymes in the denitrification pathway of the nitrogen cycle. By the catalysis of NiRs, the nitrites are turned into nitric oxides and the nitrogen pollution is decreased in water body. NiRs are divided into two different types based on their prosthetic groups, namely heme-containing nitrite reductases ( $\text{cd}_1$ -NiRs) and Copper-containing nitrite reductases ( $\text{Cu}$ -NiRs). As all know,  $\text{Cu}$ -NiRs have trimeric structures, in their each monomer, there exist two types of Cu centers that play pivotal roles as the components of electron transfer pathway in the process of catalysis. Furthermore, some residues alteration of  $\text{Cu}$ -NiRs would contribute to the catalytic reaction. In this review, the latest progresses about the construction features, the process of electron transfer and catalytic mechanism of  $\text{Cu}$ -NiRs were discussed.

**Keywords:** Copper-containing nitrite reductases, Electron transfer, Catalytic mechanism, Denitrification

由于工业废水和生活污水的排放, 以及水产养殖业的影响使水体污染严重, 水体富营养化成为当前我国及世界各国水环境共同面临的重大问题。含

氮化合物为水体富营养化的一大主要因子, 而利用某些微生物的反硝化作用可以将水体中的氮氧化合物( $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$ )通过气态中间产物( $\text{NO}$ 和 $\text{N}_2\text{O}$ )转化

为氮气,从而减轻水体中的氮污染<sup>[1-3]</sup>。微生物的反硝化作用在全球氮循环过程中起着重要作用,特别是在环境净化方面有着举足轻重的作用。目前已发现超过 130 种反硝化细菌,分布在 50 多个属<sup>[4]</sup>。此外,反硝化作用还产生了具有重要环境影响力的物质,其中包括有毒气体NO和强烈的温室效应气体N<sub>2</sub>O,后者的温室效应影响仅次于CO<sub>2</sub>和CH<sub>4</sub>,但其温室效应潜势却远高于CO<sub>2</sub>和CH<sub>4</sub><sup>[5-7]</sup>。由于反硝化的重要环境生态作用及其过程中产生的环境影响物质,使之得到了广泛研究。

现在公认的反硝化过程分为 4 步,分别由不同的还原酶催化。其中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>转变成NO由亚硝酸还原酶(NiRs)所催化,其催化反应为:  $\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$ ,这一步实现了水体中的氮向大气中转变,是反硝化作用区别于其它硝酸盐代谢的标志性反应,在反硝化过程中扮演了重要角色<sup>[8]</sup>。NiRs分布于细胞壁与细胞膜之间,根据其辅基的不同分为血红素cd<sub>1</sub>型亚硝酸还原酶(cd<sub>1</sub>-NiRs)和铜型亚硝酸还原酶(Cu-NiRs)两种类型,它们分别以血红素cd<sub>1</sub>和Cu作为辅基,每种反硝化细菌具有两种不同形式NiRs中的一种<sup>[8,9]</sup>。目前,对Cu-NiRs的电子传递模式和结构机理作了大量研究,而对cd<sub>1</sub>-NiRs的研究相对较少。本文结合Cu-NiRs的最新研究成果,从整体上对其结构和作用机理作了详细阐述。

## 1 Cu-NiRs 的结构特点

对酶蛋白所作的氨基酸序列分析和X射线结构研究表明<sup>[10,11]</sup>,Cu-NiRs呈三聚体结构(见图1),形成一个高度保守的蛋白家族,其每个亚基分子量约为 40 kD;每个单体都含有两种类型的铜原子,分别为类型 (T1Cu)和类型 (T2Cu)铜活性中心。普遍认为<sup>[12,13]</sup>,在Cu-NiRs的电子传递过程中由T1Cu位点从外部电子传递蛋白接受一个电子再将它传递到T2Cu催化位点。

T1Cu被包埋在每个单体中,脉冲分析显示T1Cu中心位于每个单体表面下约 7 Å 处,具有(His)<sub>2</sub>-Cys-Met连接特点(见图2)<sup>[14-16]</sup>。T1Cu与亚单位内的基团结合,突变体研究发现电子由T1Cu传递到T2Cu中心,故T1Cu中心与分子内电子转移有关<sup>[17,18]</sup>。Cu-NiRs根据T1Cu中心的光学特性分为蓝色和绿色两种类别。蓝色还原酶在约 590 nm处呈现强

吸光带,绿色还原酶在约 460 nm和 600 nm处有两个强吸光带<sup>[11]</sup>。这两类Cu-NiRs因细菌种类不同而颜色各异,如*Alcaligenes xyloxydans*中的NiRs (AxNiR)是蓝色,而*Achromobacter cycloclastes* (AcNiR)和*Alcaligenes faecalis* (AfNiR)中的NiRs都是绿色<sup>[19-21]</sup>。

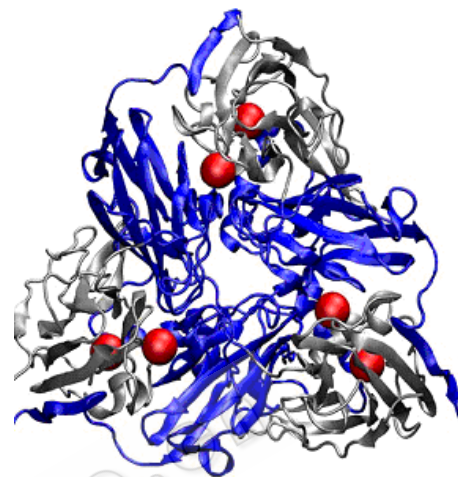


图1 Cu-NiR 的晶体结构,每个单体由两个亚单位组成(引自文献[10])

Fig. 1 Crystal structure of Cu-NiRs, each monomer has two subunits (Refer from [10])

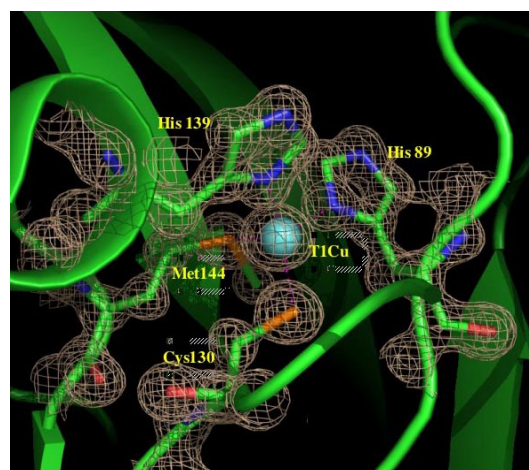


图2 AxNiR 中 T1Cu 结构(引自文献[14])

Fig. 2 Native T1 Cu site in AxNiR (Refer from [14])

T2Cu结合在两个单体之间,位于一个约 12 Å深的溶剂通道底部,起着催化中心的作用。T2Cu具有(His)<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (或OH<sup>-</sup>)的连接特点,3个His中的两个来自同一单体,另一个来自其邻近单体,且显示出扭曲的四面体几何学构型(见图3)<sup>[11,14,22]</sup>。

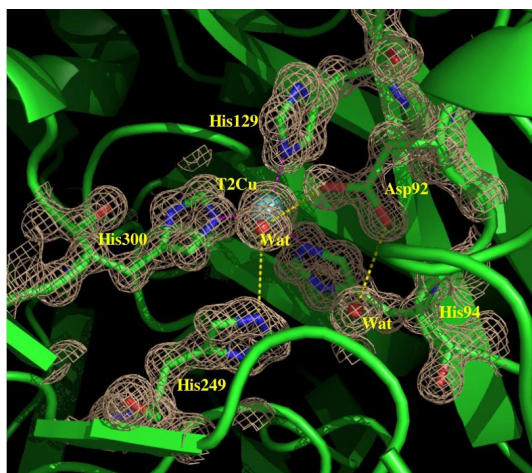


图3 AxiNiR 中 T2Cu 结构(引自文献[14])

Fig. 3 Native T2 Cu site in AxiNiR (Refer from [14])

## 2 Cu-NiRs 的电子传递模式

目前,通过新的实验技术已经获得一些Cu-NiRs的原子分辨率结构,其中包括催化过程中Cu-NiRs的不同构型(底物或产物结合形式的Cu-NiRs)以及与催化过程密切相关的蛋白分子结构,这些研究成果和酶催化过程的动力学研究结论对于讨论Cu-NiRs的催化机理具有重要作用。突变体研究表明<sup>[23]</sup>,两个Cu活性中心对于酶的催化活性都是必不可少的。为了阐明两个Cu活性中心在酶催化过程中的具体作用,Nojiri M等进行了相关研究<sup>[24]</sup>。其结果说明T1Cu作为电子受体从电子供体蛋白接受一个电子再传递给T2Cu,后者与底物结合还原 $\text{NO}_2^-$ 为NO。而在AxiNiR中具体测定了电子传递途径中所包含的氧化还原电位大小<sup>[23]</sup>,从天青蛋白(+305 mV)到T1Cu(+240 mV)再到T2Cu(+230 mV),这进一步说明在催化过程中电子传递的具体过程。另外,通过对酶转变形式的电子顺磁共振波谱分析表明<sup>[11]</sup>,Cu-NiRs中的电子传递在催化过程中包括3个快速的氧化还原过程:(a)T1Cu被外源电子供体还原;(b)分子内电子从T1Cu向T2Cu转移;(c) $\text{NO}_2^-$ 在T2Cu中心被还原。

### 2.1 T1Cu 的还原

在反硝化细菌的周质空间发现一系列小型氧化还原蛋白作为潜在的电子供体传递给NiRs,它们包括细胞色素c(Cyt c)、假天青蛋白(Paz)和天青蛋白(Az)<sup>[25]</sup>。在不同的有机体内蓝色和绿色Cu-NiRs分别与Az和Paz相关联,并作为潜在的电子供体将电子

传递给T1Cu中心<sup>[1]</sup>。对*Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015 中电子供体的研究表明<sup>[16]</sup>,在反硝化条件下合成了两种天青蛋白,分别为Az 和Az<sub>2</sub>,两者都是作为有效的电子供体传递电子给NiRs;与Az<sub>2</sub>相比,Az<sub>1</sub>在体内作为电子供体传递给AxiNiR更有效。还原型Az<sub>1</sub>具有T1Cu中心,并传递电子给NiRs的T1Cu中心,推测它可能通过形成蛋白-蛋白复合体来完成<sup>[26]</sup>。对于Az与Cu-NiRs中T1Cu在电子传递过程中的作用方式,Barrett ML等在AxiNiR中进行了研究<sup>[27]</sup>,发现酶表面的个别残基在这个过程中可能起着关键作用。Barrett ML等指出<sup>[27]</sup>,Trp138 残基与T1Cu一个配基相毗连,它位于表面残基Trp197 以下且在不同物种的NiRs中具有高度的保守性,这说明Trp138 可能是NiRs与其电子供体Az形成复合物的关键;他们通过对突变体进一步研究,发现Trp138 是电子从Az中Cu位点传递到AxiNiR中T1Cu位点的关键残基。基于几种生物的NiRs晶体结构和生化数据,有学者提出在NiRs表面存在“疏水区域”,它接近T1Cu位点并作为氧化还原辅助蛋白的结合位点<sup>[28]</sup>。

通过对*Hyphomicrobium denitrificans* 中Cu-NiRs(HdNiR)的突变体C114A(N-末端结构域缺失T1Cu离子)和C260A(C-末端结构域缺失T1Cu离子)的研究发现<sup>[12,29]</sup>,C114A突变体显示出催化活性,而C260A突变体则几乎不具有任何 $\text{NO}_2^-$ 还原活性;同源的Cyt c550 作为电子供体传递电子给C114A但不传给C260A,说明HdNiR中的电子接受位点是C-末端结构域中与T2Cu配对的T1Cu<sub>C</sub>而不是N-末端结构域中的T1Cu<sub>N</sub>。Nojiri M等<sup>[24]</sup>也进行了HdNiR及其突变体C114A和C260A被生理电子供体蛋白Cyt c550 还原的动力学研究,发现HdNiR中的最快和最慢还原过程可能分别与T1Cu<sub>C</sub>和T1Cu<sub>N</sub>的还原过程相关,并提出可能Cyt c550 结合位点位于T1Cu<sub>C</sub>距蛋白表面约15 Å处形成的一个约500Å<sup>2</sup>的裂口,在裂口中心是4个疏水性氨基酸,它们由极性氨基酸残基所包围。Glu172 残基位于裂口表面,其羧基O原子与His219 残基上的N原子形成氢键[Glu172(O<sup>e1</sup>)-His219(N<sup>e2</sup>),2.69 Å]。由于Cu位点与Glu172的羧基部分距离约7 Å,故该氢键提供了与T1Cu<sub>C</sub>的直接表面可接触性。因此,还原的Cyt c550 结合到裂口上可能在初始快速阶段通过Glu172 提供1个电子给T1Cu<sub>C</sub>,随后发生了从T1Cu<sub>C</sub>到T2Cu和还原底物

的分子内电子传递过程。此外, Gln76 的酰胺基与Cu中心距离约 8 Å, 电子供体蛋白也可通过Gln76 提供电子给T1Cu<sub>N</sub><sup>[24]</sup>。然而, 从T1Cu<sub>N</sub>到T1Cu<sub>C</sub>的距离大约是T1Cu<sub>C</sub>到T2Cu的 2 倍, 所以从T1Cu<sub>N</sub>到T1Cu<sub>C</sub>的远程电子传递可能非常缓慢, 可见还原的T1Cu<sub>N</sub>对于催化反应是不利的<sup>[12,24]</sup>。基于以前的研究可知, 外源电子供体传递电子给T1Cu<sub>C</sub>, 而T1Cu<sub>N</sub>可能是作为T1Cu<sub>C</sub>的电子传递配偶体, 其详细机理还有待进一步通过动力学测定来讨论。

## 2.2 T1Cu 到 T2Cu 的电子传递

NiRs的结构和动力学研究<sup>[30,31]</sup>说明, T1Cu位点首先从上游电子供体(Az、Paz或Cyt c)接受一个电子再将它传递给NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原的T2Cu位点, 这些Cu位点之间相距约 12 Å, 并通过十分保守的T1Cu位点上的Cys残基和T2Cu位点上的His残基连接。在A<sub>7</sub>NiR中研究<sup>[32]</sup>发现, 其电子传递的限速步骤是从T1Cu到T2 Cu的电子传递, 这说明在Cu-NiRs的催化反应中, 从T1Cu到T2Cu的电子传递是催化反应的关键, 它控制着整个催化反应的进行。Nojiri M等<sup>[24]</sup>测定了HdNiR的晶体结构, 该Cu-NiRs整体呈一个三角棱形分子, 由两个三聚体紧密联合成一个统一的六聚体结构。一般而言, 电子传递途径极依赖于电子供体和受体之间的距离, 而HdNiR六聚体中T1Cu<sub>C</sub>和T2Cu之间的Cu-Cu距离最近, 因此最可能的电子传递是从T1Cu<sub>C</sub>到T2Cu的电子传递, 这对于随后在T2Cu中心的NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原也有重要作用。

## 2.3 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的还原

已经证明NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 结合到T2Cu催化中心取代结合的水分子是通过一个有序的机理完成的<sup>[33]</sup>。Paraskevopoulos K等<sup>[28]</sup>在A<sub>x</sub>NiR的突变体Met144Leu中研究发现, 电子最初从氧化还原配体蛋白传递到T1Cu位点, 然后内部电子传递通过Cys130 His129 从T1Cu传递到T2Cu。Cys-His连接两个金属中心并通过底物感受器/信号环(His94-Asp92-His89)来控制<sup>[28,34]</sup>。Kataoka K等<sup>[35]</sup>研究发现, Cys-His连接两个Cu位点之间的距离约 12.5 Å。酶在T1Cu位点从电子供体蛋白接受 1 个电子并在T2Cu位点催化 1 个电子还原NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 为NO; 此外, T2Cu周围Asp和His所包含的氢键网络作用在于为底物提供质子。对于NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 结合到T2Cu催化中心的过程, Barrett ML等<sup>[27]</sup>通过两种催化晶体结构证实了酶蛋白表面的

“疏水口袋”在引导NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 进入其活性位点过程中发挥作用。

## 3 催化机理探讨

Cu-NiRs还原NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的步骤包括NO<sub>2</sub><sup>-</sup>与酶的结合、还原反应、结合的中间产物脱水以及NO的释放和酶的重新形成<sup>[8]</sup>。对于Cu-NiRs的催化机理, 最近的模型<sup>[11,13]</sup>认为NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 结合到氧化形式的T2Cu中心, 取代一个可溶性分子并在NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的一个氧原子和Asp98 残基间形成氢键。当电子从T1Cu中心传递到T2Cu中心后, 该氢键的质子从Asp98 残基转移到底物的氧原子上形成中间产物O=N-O-H; 该氧原子的N-O键随后断裂并形成产物NO, 然后在活性中心被释放。

Antonyuk SV等<sup>[8]</sup>测定了A<sub>x</sub>NiR的结构, 发现邻近单体残基形成一个 6Å宽的疏水性通道, 其提供底物进入的可能路径。Ellis MJ等<sup>[36]</sup>发现Asp残基是A<sub>x</sub>NiR中T2Cu位点的关键残基, 它涉及底物的识别; 而在底物的引导中, 由Leu106和Ala137多个残基与Asp98 共同作用。晶体结构数据显示Asp98 残基具有底物引导和产物形成/释放的多个功能。当底物靠近进入位点时, 部分残基的构象变化引导其进入T2Cu位点<sup>[8]</sup>。可见, 在NO<sub>2</sub><sup>-</sup>与NiRs相结合的过程中, NiRs结构的一些关键残基起到对底物的识别作用, 并通过空间结构的变化引导底物进入催化位点。该过程中除了个别起主要作用的关键残基外, 还包括其他一些起辅助作用的残基, 它们在空间上的相邻位置使之能协同作用。

为了阐明NiRs的空间结构与催化过程的关系, 有不少学者从催化过程中酶空间结构变化的角度进行了研究, 如Tocheva EI等<sup>[37]</sup>研究了Cu-NiRs的晶体结构, 发现N原子和O原子与Cu的等距离侧向配位结合模式与该酶的催化机理密切相关。而在Met144Leu的晶体结构中观察到A<sub>x</sub>NiR的三聚体之间头碰头的作用方式, 这说明NiRs能通过这些表面接触区域自我联合, 以利于电子传递以及催化作用的进行<sup>[23]</sup>。刘盛权等<sup>[38]</sup>利用定点突变的方法得到了AcNiR的突变体并测定了其晶体结构, 该突变体已无酶活, 其晶体结构表明突变残基的侧链羧基与T2Cu结合, 堵住了T2Cu与外面接触的溶剂通道, 表明T2Cu的可接触性是酶保持生物活性的必要条



件。在HdNiR的研究中发现<sup>[12]</sup>, C-末端片段能够接受一个来自Cyt c550的电子且表现出比普遍Cu-NiRs更大的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原活性, 这说明C-末端结构域是HdNiR分子内电子转移和催化反应的基本区域。结构研究表明<sup>[38,39]</sup>, C-末端以折叠片方式介导单体间相互作用, 是维系三体结构的重要因素; 尽管C-末端远离活性中心, 但它不仅参与维系AcNiR的四级结构, 而且对保持酶的活力也是必须的。以上研究说明Cu-NiRs空间结构的特殊变化是催化过程能进行的主要因素, 该过程同样涉及一些关键残基的协同变化。

在NO<sub>2</sub><sup>-</sup>结合到酶的催化中心后, 中间产物的形成以及最终产物的释放过程受到不少学者的关注。Antonyuk SV等<sup>[8]</sup>对底物或产物结合形式的Cu-NiRs构象研究表明, 在引导底物和产物形成过程中, Asp98 占据产物NO对应位点并与水分子结合, 说明这种Asp构象有利于去质子作用, 它导致键的断裂和产物的形成及释放。在T2Cu还原位点, 质子从Asp转移到NO<sub>2</sub><sup>-</sup>形成Cu<sup>+</sup>NOOH中间产物, 而His255 的咪唑基则提供第2个质子用于断裂N-ON键以形成NO, 然后与水结合的氧化型T2Cu离子断裂并释放<sup>[11,23,40]</sup>。另外, 对*Alcaligenes faecalis* S-6 中的Cu-NiRs晶体结构研究表明<sup>[10]</sup>, 属于T2Cu配位层的界面残基His306 被Ala取代后, 明显影响了NiRs的热稳定性, 该突变阻碍了T2催化位点Cu离子的结合并使酶丧失其催化活性, 说明His306 具有结构和功能的双重作用。

此外, 还有学者从底物对酶的调节方面进行了研究。Pinho D等<sup>[11]</sup>的研究说明底物在调节T2Cu中心氧化还原电位上起了重要作用, 并影响分子内两个Cu中心的电子转移率。在*Ac. cycloclastes*中研究了电子在Paz与NiRs之间的转移, 发现Paz从电极接受电子并在NO<sub>2</sub><sup>-</sup>存在的条件下传递给NiRs<sup>[11]</sup>。电子顺磁共振数据提出NO<sub>2</sub><sup>-</sup>结合到T2Cu增加了该中心的氧化还原电位, 从而使分子内电子转移更有利<sup>[40]</sup>。这些证据说明底物的存在加强了NiRs催化过程的电子传递, 使反应更加有效地进行。

## 4 基因表达调控

Cu-NiR由*nirK*基因编码, 该基因已从*Pseudomonas aureofaciens*中分离并测序, *nirK*编码含有363

个氨基酸的多肽, 该多肽含有一段由24个氨基酸组成的起蛋白输出作用的信号肽<sup>[41]</sup>。Harris RL等<sup>[1]</sup>对*Alcaligenes xyloxydans*的研究发现, *azuA*和*nirK*不是同步转录的; 且*nirK*基因的转录起始发生在两个邻近的胸腺嘧啶残基, 它们位于*nirK*基因的翻译起始密码子上游43和44碱基处。Beaumont HJ等<sup>[42]</sup>对*Nitrosomonas europaea*中*NirK*基因的表达调控进行了深入研究, 发现*NirK*基因受*NsrR*调控, 而*NsrR*通过抑制启动子P<sub>nir</sub>转录来调控。*NsrR*的阻抑可通过细胞内NO<sub>2</sub><sup>-</sup>或HNO<sub>2</sub>逆转, 因此可通过增加细胞外NO<sub>2</sub><sup>-</sup>浓度和降低细胞外pH来诱导P<sub>nir</sub>转录增加。Pittman MS等<sup>[43]</sup>证实了底物NO<sub>2</sub><sup>-</sup>在诱导基因表达中的作用, 因此不排除还有其他*NirK*表达调控的附加调节机制的可能性, 比如可能存在翻译后和代谢水平调控。

在分子水平, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原由NNR控制, NNR是一种属于转录激活因子FNR家族的调节蛋白<sup>[44]</sup>。最近在副球菌属反硝化细菌中发现, NO激活NNR介导的转录活性<sup>[45]</sup>。在缺失NNR调控的*NirX*基因的突变体上观察到反硝化细菌*Paracoccus*中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的积累, 该基因编码一种与NiRs转录激活有关的可溶性周质蛋白。Barak Y等<sup>[44]</sup>的研究证明, 在*Paracoccus*的质粒中可能含有促进NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原的基因, 并找到该质粒的一个ORF-*orfB*, 它与编码细菌的ABC转运蛋白基因具有高度同源性, 而ABC转运蛋白涉及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>活化、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>运输以及Cyt c生物发生等多个生化过程。这些研究表明, 在Cu-NiRs的催化过程中, 涉及一些基因调控的蛋白分子协同作用, 而底物的反馈调节又影响这些蛋白的表达调控。目前虽然获得了不少研究成果, 但对于Cu-NiRs在催化过程中相关蛋白分子的基因表达调控还有待于进一步研究, 特别是涉及催化过程中的一些电子传递蛋白, 它们的表达与调控对于催化反应的进行起着至关重要的作用。

## 5 展望

随着工业污水以及农用化肥的影响, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和NO<sub>2</sub><sup>-</sup>对水体污染严重, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的高致癌性威胁着人们的生活, 细菌的反硝化作用对于环境具有重要的生态学意义。生物脱氮以其独特的优势吸引着世界各国环保工作者的目光。NiRs是反硝化过程中的关键

催化酶, 因此对NiRs结构和作用机理的研究尤为迫切。我国在这方面的深入研究相对较少, 但也有学者利用晶体结构学研究了NiRs的突变体和特异结构, 对NiRs的催化机理研究做出了贡献<sup>[46,47]</sup>。目前对于两种NiRs的结构以及机理研究已取得了不少成果, 但还有待进一步深入研究其分子机理, 主要包括以下几方面: (1) 催化过程中NiRs内部涉及电子传递相关氨基酸残基的结构变化特点; (2) Cu-NiR内部残基间以及与两个铜活性中心的电子传递过程; (3) NiRs及其与其他反硝化酶之间的基因表达调控研究。通过这些研究以便进一步开发利用反硝化细菌, 为生物脱氮开辟新途径。

## 参 考 文 献

- [1] Harris RL, Eady RR, Hasnain SS, *et al.* Coordinate synthesis of azurin I and copper nitrite reductase in *Alcaligenes xylosoxidans* during denitrification. *Arch Microbiol*, 2006, **186**(3): 241–249.
- [2] Oakley BB, Francis CA, Roberts KJ, *et al.* Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(1): 118–130.
- [3] Basaglia M, Toffanin A, Baldan E, *et al.* Selenite-reducing capacity of the copper-containing nitrite reductase of *Rhizobium sulae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **269**(1): 124–130.
- [4] You SJ. Identification of denitrifying bacteria diversity in an activated sludge system by using nitrite reductase genes. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**(19): 1477–1482.
- [5] Ellis MJ, Dodd FE, Strange RW, *et al.* X-ray structure of a blue copper nitrite reductase at high pH and in copper-free form at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, **57**(Pt 8): 1110–1118.
- [6] Stadmark J, Leonardson L. Greenhouse gas production in a pond sediment: effects of temperature, nitrate, acetate and season. *Sci Total Environ*, 2007, **387**(1-3): 194–205.
- [7] Søvik AK, Augustin J, Heikkinen K, *et al.* Emission of the greenhouse gases nitrous oxide and methane from constructed wetlands in Europe. *J Environ Qual*, 2006, **35**(6): 2360–2373.
- [8] Antonyuk SV, Strange RW, Sawers G, *et al.* Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(34): 12041–12046.
- [9] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**(4): 533–616.
- [10] Stirpe A, Sportelli L, Wijma H, *et al.* Thermal stability effects of removing the type-2 copper ligand His306 at the interface of nitrite reductase subunits. *Eur Biophys J*, 2007, **36**(7): 805–813.
- [11] Pinho D, Besson S, Brondino CD, *et al.* Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50135. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(12): 2361–2369.
- [12] Xie Y, Inoue T, Seike N, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of dissimilar nitrite reductase isolated from *Hyphomicrobium denitrificans* A3151. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60**(Pt 12 Pt 2): 2383–2386.
- [13] Suzuki S, Kataoka K, Yamaguchi K. Metal coordination and mechanism of multicopper nitrite reductase. *Acc Chem Res*, 2000, **33**(10): 728–735.
- [14] Ellis MJ, Dodd FE, Sawers G, *et al.* Atomic resolution structures of native copper nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* and the active site mutant Asp92Glu. *J Mol Biol*, 2003, **328**(2): 429–438.
- [15] Kataoka K, Yamaguchi K, Kobayashi M, *et al.* Structure-based engineering of *Alcaligenes xylosoxidans* copper-containing nitrite reductase enhances intermolecular electron transfer reaction with pseudoazurin. *J Biol Chem*, 2004, **279**(51): 53374–53378.
- [16] Murphy LM, Dodd FE, Yousafzai FK, *et al.* Electron donation between copper containing nitrite reductases and cupredoxins: the nature of protein-protein interaction in complex formation. *J Mol Biol*, 2002, **315**(4): 859–871.
- [17] Boulanger MJ, Kukimoto M, Nishiyama M, *et al.* Catalytic roles for two water bridged residues (Asp-98 and His-255) in the active site of copper-containing nitrite reductase. *J Biol Chem*, 2000, **275**(31): 23957–23964.
- [18] Inoue T, Gotowda M, Deligeer, *et al.* Type I Cu structure of blue nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 at 2.05 Å resolution: comparison of blue and green nitrite reductases. *J Biochem (Tokyo)*, 1998, **124**(5): 876–879.
- [19] Dodd FE, Hasnain SS, Abraham ZH, *et al.* Structures of a blue-copper nitrite reductase and its substrate-bound complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1997, **53**(Pt 4): 406–418.
- [20] Murphy ME, Turley S, Adman ET. Structure of nitrite bound to copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis*. Mechanistic implications. *J Biol Chem*, 1997, **272**(45): 28455–28460.
- [21] Adman ET, Godden JW, Turley S. The structure of copper-nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* at five pH values, with NO<sub>2</sub>- bound and with type II copper depleted. *J Biol Chem*, 1995, **270**(46): 27458–27474.
- [22] Libby E, Averill BA. Evidence that the type 2 copper centers are the site of nitrite reduction by *Achromobacter cycloclastes* nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **187**(3): 1529–1535.
- [23] Hough MA, Ellis MJ, Antonyuk S, *et al.* High resolution

- structural studies of mutants provide insights into catalysis and electron transfer processes in copper nitrite reductase. *J Mol Biol*, 2005, **350**(2): 300–309.
- [24] Nojiri M, Xie Y, Inoue T, *et al.* Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(11): 4315–4320.
- [25] Hasegawa N, Arai H, Igarashi Y. Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the nir gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **288**(5): 1223–1230.
- [26] Harris RL, Prudêncio M, Hasnain SS, *et al.* Heterologous metalloprotein biosynthesis in *Escherichia coli*: conditions for the overproduction of functional copper-containing nitrite reductase and azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*. *J Synchrotron Radiat*, 2005, **12**(Pt 1): 13–18.
- [27] Barrett ML, Harris RL, Antonyuk S, *et al.* Insights into redox partner interactions and substrate binding in nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans*: crystal structures of the Trp138His and His313Gln mutants. *Biochemistry*, 2004, **43**(51): 16311–16319.
- [28] Paraskevopoulos K, Hough MA, Sawers RG, *et al.* The structure of the Met144Leu mutant of copper nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* provides the first glimpse of a protein-protein complex with azurin II. *J Biol Inorg Chem*, 2007, **12**(6): 789–796.
- [29] Yamaguchi K, Kobayashi M, Kataoka K, *et al.* Characterization of two Cu-containing protein fragments obtained by limited proteolysis of *Hyphomicrobium denitrificans* A3151 nitrite reductase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300**(1): 36–40.
- [30] Jacobson F, Guo H, Olesen K, *et al.* Structures of the oxidized and reduced forms of nitrite reductase from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 at high pH: changes in the interactions of the type 2 copper. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, **61**(Pt 9): 1190–1198.
- [31] Wijma HJ, Jeuken LJ, Verbeet MP, *et al.* Protein film voltammetry of copper-containing nitrite reductase reveals reversible inactivation. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(27): 8557–8565.
- [32] Wijma HJ, Jeuken LJ, Verbeet MP, *et al.* A random-sequential mechanism for nitrite binding and active site reduction in copper-containing nitrite reductase. *J Biol Chem*, 2006, **281**(24): 16340–16346.
- [33] Strange RW, Murphy LM, Dodd FE, *et al.* Structural and kinetic evidence for an ordered mechanism of copper nitrite reductase. *J Mol Biol*, 1999, **287**(5): 1001–1009.
- [34] Ellis MJ, Antonyuk SV, Strange RW, *et al.* Observation of an unprecedented Cu Bis-His site: crystal structure of the H129V mutant of nitrite reductase. *Inorg Chem*, 2004, **43**(24): 7591–7593.
- [35] Kataoka K, Furusawa H, Takagi K, *et al.* Functional analysis of conserved aspartate and histidine residues located around the type 2 copper site of copper-containing nitrite reductase. *J Biochem (Tokyo)*, 2000, **127**(2): 345–350.
- [36] Ellis MJ, Prudêncio M, Dodd FE, *et al.* Biochemical and crystallographic studies of the Met144Ala, Asp92Asn and His254Phe mutants of the nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans* provide insight into the enzyme mechanism. *J Mol Biol*, 2002, **316**(1): 51–64.
- [37] Tocheva EI, Rosell FI, Mauk AG, *et al.* Side-on copper-nitrosyl coordination by nitrite reductase. *Science*, 2004, **304**(5672): 867–870.
- [38] Liu SQ, Chang T, Liu MY, *et al.* Crystal structure of a NO-forming nitrite reductase mutant: an analog of a transition state in enzymatic reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302**(3): 568–574.
- [39] Ellis MJ, Grossmann JG, Eady RR, *et al.* Genomic analysis reveals widespread occurrence of new classes of copper nitrite reductases. *J Biol Inorg Chem*, 2007, **12**(8): 1119–1127.
- [40] Veselov A, Olesen K, Sienkiewicz A, *et al.* Electronic structural information from Q-band ENDOR on the type 1 and type 2 copper liganding environment in wild-type and mutant forms of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry*, 1998, **37**(17): 6095–6105.
- [41] Glockner AB, Jüngst A, Zumft WG. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch Microbiol*, 1993, **160**(1): 18–26.
- [42] Beaumont HJ, Lens SI, Reijnders WN, *et al.* Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol Microbiol*, 2004, **54**(1): 148–158.
- [43] Pittman MS, Elvers KT, Lee L, *et al.* Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Mol Microbiol*, 2007, **63**(2): 575–590.
- [44] Barak Y, Yarmus M, Shapira R, *et al.* Nitrite reduction in *Paracoccus* sp. is affected by a novel plasmid pYR1. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **208**(1): 111–116.
- [45] Moir JW, Wood NJ. Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**(2): 215–224.
- [46] 刘盛权, 张俊英, 刘明毅, 等. 亚硝酸还原酶的突变体 1257E: 酶促反应过渡态之一的类似物的晶体结构. 第九次全国生物物理大会学术会议论文摘要集, 2002.
- [47] 李海涛, 张俊英, 刘明毅, 等. C-末端去五肽亚硝酸还原酶初步晶体学研究. 第九次全国生物物理大会学术会议论文摘要集, 2002.