



УДК 577.15.08

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ
ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникевич И. П.

*Отдел регуляции обмена веществ
Академии наук БССР, Гродно*

Из пивных дрожжей получен высокоочищенный препарат тиаминпирофосфокиназы, гомогенный при электрофорезе в полиакриламидном геле. Определены оптимальные условия для протекания реакции и K_m для тиамин, равная $6 \cdot 10^{-6}$ М. Пиритиамин является конкурентным ингибитором фермента, а окситиамин — ингибитором смешанного типа с K_i соответственно $6,5 \cdot 10^{-8}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ М. Кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (при соотношении $[Mg]/[ATP-1]$) выражались S-образной кривой, которая приобретала вид гиперболы в присутствии избытка Mg^{2+} . Коэффициент Хилла при этом уменьшился от 2,7 до 1. Кривые зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации аллостерического активатора (Mg^{2+}) также имели четко выраженный S-образный характер. Таким образом, для тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей в отличие от известных данных установлено гомотропное кооперативное взаимодействие между активными центрами и гомотропное взаимодействие между центрами связывания аллостерического активатора.

После обнаружения синтеза кокарбоксилазы — тиаминдифосфата (TDP) — гомогенатами мозга и экстрактами дрожжей [1, 2] было проведено большое число исследований по выделению и очистке тиаминпирофосфокиназы (ТПК) (КФ 2.7.6.2; АТР: тиаминпирофосфотрансфераза), а также по выяснению механизма ферментативного фосфорилирования тиамин [3—9]. Полученные авторами работ [8—10] ферментные препараты обладали невысокой удельной активностью, в связи с чем высказывалось предположение о том, что низкая скорость биосинтеза TDP является одним из механизмов, регулирующих ассимиляцию тиамин [10] и защищающих организм от гипервитаминозов. Нельзя, однако, исключить тот факт, что невысокая скорость биосинтеза TDP была лишь результатом низкой степени очистки ТПК. Аналоги тиамин, пиритиамин и окситиамин, ингибируют синтез TDP в различной степени [6—8, 11]. Для ТПК из головного мозга крысы [8] и свиньи [11] показано, что сродство первого антивитамина примерно в 1000 раз выше, чем второго. Можно предположить в связи с этим, что механизм взаимодействия обоих ингибиторов с ТПК неидентичен, хотя некоторые авторы [8] не видели таких различий. До настоящего времени практически не изученным остается также вопрос о характере регуляции активности ТПК *in vivo*. Важно отметить, что фермент может выполнять, по-видимому, ключевую роль на этапах построения соматической активации ряда апоферментов (пируватдекарбоксилазы, дегидрогеназы α -кетокислот, фосфокетолазы и др.) и осуществлять таким образом роль пускового звена в углеводном и некоторых других типах обмена.

Цель данной работы — получение высокоочищенной ТПК и изучение ее свойств.

Очистка тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей

Этапы очистки	Объем, мл	Общая активность, нмоль·ч ⁻¹	Белок, мг/мл	Удельная активность, нмоль·ч ⁻¹ ·мг ⁻¹	Выход фермента, %	Степень очистки
Исходный экстракт	160	10 400	130	0,4	100	—
Тепловая обработка	140	9 100	65	1,0	88	2
Фракционирование ацетоном	300	11 424	12	3,4	110 *	6,8
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	4,5	7 200	200	8	68	20
Гель-фильтрация на G-25	23	6 200	20	14	62	35
Хроматография на DEAE-сефадексе А-50	25	4 000	2	80	40	200
Гель-фильтрация на сефадексе G-200	14	2 800	0,8	240	28	600
Рехроматография на DEAE-сефадексе А-50	17	1 700	0,2	500	17	1200

* Увеличение выхода после ацетонового фракционирования связано с удалением фосфатаз.

Выделение фермента проводили, как описано ранее [6—12]. Далее после фракционирования ацетоном и с помощью сульфата аммония ферментный препарат очищали последовательной хроматографией на сефадексах G-25, DEAE A-50, G-200 и рехроматографией на DEAE A-50 (см. «Экспериментальную часть»).

В таблице приведены результаты всех стадий очистки фермента. На завершающем этапе степень очистки составляла 1000—1200 раз, а выход — 17%. Полученный препарат давал одну белковую полосу при электрофорезе на полиакриламидном геле. Кроме того, при повторной элюции на колонке с G-200 (1,2 × 90 см) белок вымывался в виде одного симметричного пика с одинаковой удельной активностью во всех фракциях, содержащих фермент. Таким образом, нет оснований предполагать, что высокоочищенный препарат ТПК не является гомогенным и содержит другие неспецифические белки. Следует, однако, отметить, что гомогенный ферментный препарат (после рехроматографии) отличался неустойчивостью при хранении, в то время как ТПК, полученная после гель-фильтрации на G-200, сохранялась на холоду в течение нескольких месяцев без изменения активности.

При изучении зависимости активности ТПК от pH было показано, что фермент имеет оптимум при pH 8,6. При температуре 40° биосинтез ТДР протекал линейно в течение 4 ч; стало быть, используемая нами часовая инкубация при кинетических расчетах была пригодной для определения начальной скорости реакции. Линейный характер зависимости скорости реакции от количества фермента в пробе соблюдался до 500 мкг. Таким образом, используемые нами концентрации фермента (10—100 мкг/мл в зависимости от чистоты препарата) позволяли работать в оптимальных условиях [12].

Как видно из рис. 1, а. насыщение фермента тиамином наблюдается при очень низких концентрациях K_m $6 \cdot 10^{-6}$ М. Как пиритиамин, так и окситиамин ингибируют эту реакцию. Однако расчет полученных данных по методу двойных обратных величин (рис. 1, б) показывает, что окситиамин проявляет смешанный тип ингибирования, поскольку наряду с увеличением K_m по тиамину снижается максимальная скорость реакции. При концентрации окситиамина $3 \cdot 10^{-2}$ М она вообще равна нулю. Пиритиамин проявляет конкурентный тип ингибирования. Как показали наши результаты, K_i для пиритиамина и окситиамина равны соответственно $6,5 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ М. Таким образом, пиритиамин обладает таким же сродством к ферменту, как и витамин, в то время как у окситиамина эта величина почти в 2000 раз ниже. В настоящее

Рис. 1. Зависимость скорости реакции (вмоль ТДФ/ч·мг), катализируемой ТПК, от концентрации тиамин (а); б — то же в координатах Лайнуивера — Берка. 1 — без добавок, 2, 3 — в присутствии соответственно $4 \cdot 10^{-8}$ М окситиамина и $5 \cdot 10^{-6}$ М пиритиамина

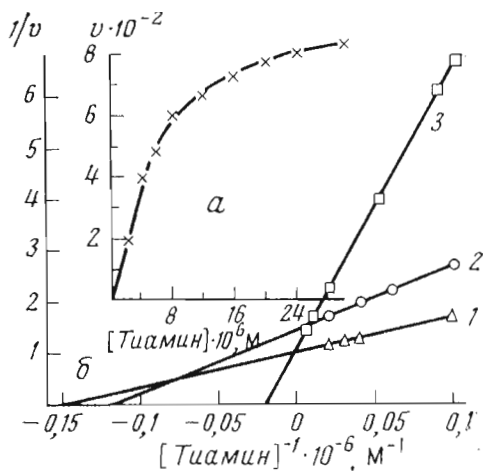


Рис. 1

Рис. 2. Скорость реакции, катализируемой ТПК в зависимости от концентрации субстрата Mg — АТР (а); б — то же в координатах Лайнуивера — Берка; в — определение коэффициента кооперативности. Концентрация тиамин $2 \cdot 10^{-4}$ М, $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{АТР}^{4-}]$ равно 10 (1) и 1 (2)

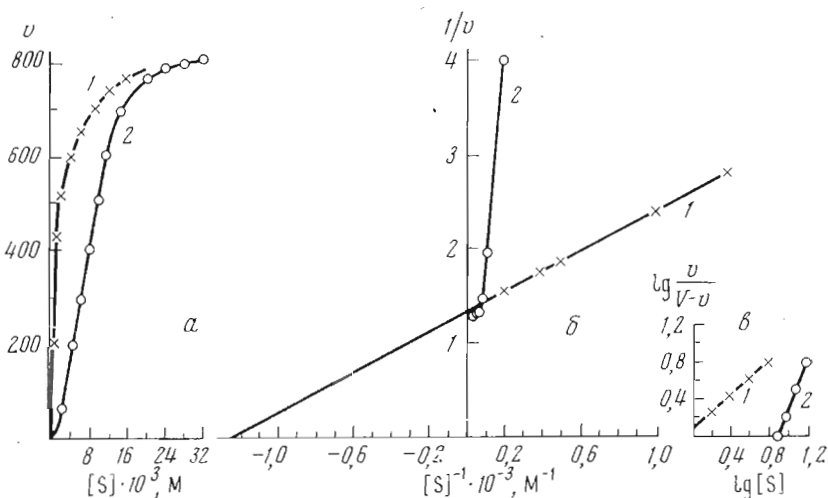


Рис. 2

время считается, что окситиамин, выступая в реакции ТПК как конкурентный ингибитор тиамин, фосфорилируется при этом до пиродифосфатного производного [8]. Однако в наших условиях в присутствии окситиамина резко снижалась максимальная скорость реакции. Невозможность реактивировать ТПК с помощью специфического субстрата, тиамин, позволяет высказать предположение, что антивитамины достаточно прочно связываются с ферментом или очень медленно отщепляются от него в виде окситиаминдифосфата. В последнем случае наиболее вероятным молекулярным механизмом торможения ферментативной реакции, по-видимому, следует считать резкое замедление выхода антикофермента из активного центра киназы из-за жесткости (замедленной тиолизаии) его тиазолового цикла [13]. Что же касается пиритиамина, то этот ингибитор, по-видимому, обратимо связывается с активным центром фермента, закрывая туда доступ тиамину, поскольку обладает с ним одинаковым сродством.

Наши предварительные опыты показали, что ТПК из пивных дрожжей неактивна в отсутствие ионов двухвалентных металлов Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} . Таким образом, истинным субстратом ферментативной реакции является комплекс металл — АТР.

Как видно из рис. 2, а, кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата Mg — АТР при $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{АТР}] = 1$ имела S-образный

характер (рис. 2). Представленные на рис. 2, б эти же экспериментальные данные в обратных координатах еще более наглядно показывают отклонение кривой от гиперболической зависимости. При этом концентрация субстратов, необходимая для достижения полумаксимальной скорости реакции ($[S]_{0,5}$), равнялась $8 \cdot 10^{-3}$ М. В данном случае характер зависимости скорости реакции от концентрации субстрата зависел от содержания активатора (Mg^{2+}) в инкубационной смеси. Увеличение концентрации активатора приводило к уменьшению величины $[S]_{0,5}$ для субстрата, а также степени S-образности. В присутствии избытка ионов Mg^{2+} при $[Mg^{2+}]/[ATP] = 10$ зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата вообще характеризовалась обычной гиперболической кривой (рис. 2, а). При этом K_m для АТР, которую можно условно приравнять к $[S]_{0,5}$, равнялась $8 \cdot 10^{-4}$ М, т. е. на порядок ниже, чем в том случае, когда Mg^{2+} и АТР использовались в эквимоларных концентрациях. Изменение кривой субстратного насыщения от сигмоидальной ($[Mg^{2+}]/[ATP] = 1$) к гиперболической ($[Mg^{2+}]/[ATP] > 1$) отражает типичное кооперативное взаимодействие, которое снимается присутствием аллостерического активатора исходя из модели, предложенной Моно [14].

Гомотропное кооперативное присоединение $Mg - ATP$ в отсутствие избытка Mg^{2+} указывает на то, что субстрат связывается более чем на одном активном центре фермента, поскольку коэффициент кооперативности (рис. 2, в) $\bar{n}_n = 2,7$. В то же время при избытке Mg^{2+} связывается только одна молекула $Mg - ATP$, и коэффициент Хилла $\bar{n}_n = 1,0$, поскольку Mg^{2+} , выступая в роли положительного эффектора, способствует присоединению $Mg - ATP$ путем изменения конформации белковой молекулы [15].

Исходя из известных данных [6, 7, 9] кривая зависимости скорости реакции от концентрации Mg^{2+} (аллостерического активатора) описывается гиперболой, что свидетельствует о наличии в молекуле фермента лишь одного центра для связывания активатора или об отсутствии гомотропного взаимодействия между этими центрами (если их имеется несколько) при связывании аллостерического активатора. Однако нами ранее было показано, что для проявления максимальной активности фермента концентрация Mg^{2+} должна не менее чем в 4—6 раз превышать таковую АТР. Кроме того, как уже установлено выше, изучение кривых зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (при $[Mg^{2+}]/[ATP] = 1$) подтверждает наличие гомотропного взаимодействия между активными центрами у этого фермента. Соответственно этому можно было бы ожидать гомотропное взаимодействие и между центрами, связывающими аллостерический активатор. Как видно из рис. 3, а, кривая зависимости скорости реакции от концентрации активатора $[Mg^{2+}]$ носит ярко выраженный S-образный характер. Выражение этих экспериментальных данных в координатах Лайнуивера—Берка (рис. 3, б) и в координатах $\lg [v/(V - v)] \div \lg [Mg^{2+}]$ (рис. 3, в) подтверждает тот факт, что между содержащимися в ферменте аллостерическими центрами устанавливается гомотропное взаимодействие при связывании аллостерического активатора.

Подобно ТПК из других объектов [6, 7, 9], активность фермента из пивных дрожжей ингибируется АМР по смешанному типу. Как показали наши данные (рис. 4, а), АМР является аллостерическим ингибитором фермента. При этом в присутствии АМР кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (при $[Mg^{2+}]/[ATP] = 10$) отклоняется от кинетики Михаэлиса и не спрямляется в системе двойных обратных величин (рис. 4, б). Кроме этого, величина коэффициента Хилла возрастает от 1,3 до 3,0. Величина K_m , которая в данном случае может быть представлена как $[S]_{0,5}$ в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ М АМР, также увеличивается от $1,0 \cdot 10^{-3}$ М до $1,8 \cdot 10^{-3}$ М. Таким образом, ингибирование ТПК реакции АМР имеет аллостерическую природу; молекула фермента содержит аллостерический центр, связывание АМР на котором приводит к изменениям ка-

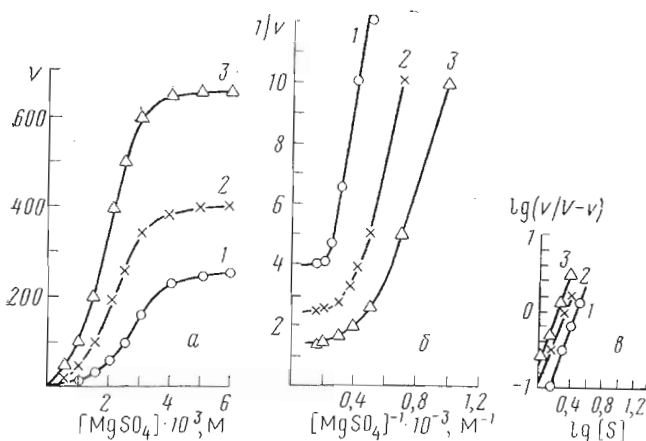


Рис. 3. Зависимость скорости реакции, катализируемой ТПК от концентрации Mg^{2+} при фиксированных концентрациях АТР (а); б — то же в координатах Лайнуивера — Берка, в — определение коэффициента кооперативности. [АТР] $0,5 \cdot 10^{-3}$ (1), $1 \cdot 10^{-3}$ (2), $2 \cdot 10^{-3}$ (3)

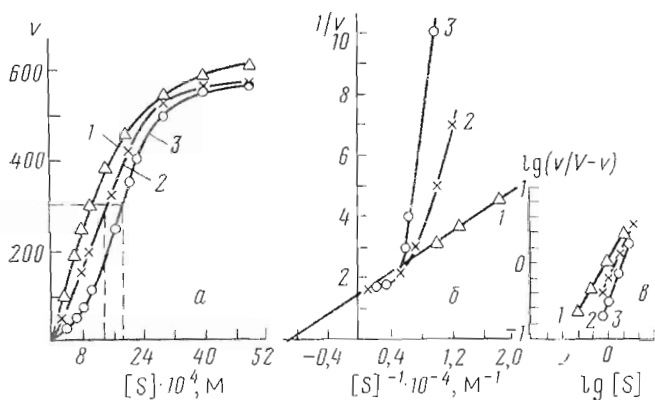


Рис. 4. Влияние АМР на скорость ферментативной реакции (а) и величину коэффициента кооперативности (б); в — кинетика реакции в координатах Лайнуивера — Берка. 1 — без АМР, 2, 3 — в присутствии соответственно $2 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-2}$ М АМР

талитических свойств активного центра, осуществляя регуляцию фермента по принципу обратной связи.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что выделенный из пивных дрожжей высокоочищенный препарат ТПК имеет аллостерическую природу и является олигомером, т. е. обладает четвертичной структурой. Возможно, что фермент содержит пространственно разделенные центры для связывания тиамин, $Mg - ATP$, Mg^{2+} , ATP и AMP . Некоторые из них (для $Mg - ATP$, Mg^{2+} и AMP) могут быть взаимозависимыми, что подтверждается эффектом Mg^{2+} и AMP на гомотропную кооперативную природу связывания $Mg - ATP$. Исследование четвертичной структуры ТПК и ее кинетики в десенсибилизированном состоянии служит доказательством такого предположения [16].

Все известные до настоящего времени регуляторные ферменты построены из субъединиц и содержат несколько активных и аллостерических центров. Именно этим и объясняется S-образный характер зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, или алло-

стерического эффектора, поскольку взаимодействие активных и аллостерических центров приводит к отклонению от обычной кинетики Михаэлиса. Как правило, регуляторные ферменты занимают ключевое положение в обмене веществ. Таким образом, можно предположить, что ТПК является регуляторным ферментом, поскольку ТДР играет ключевую роль в углеводном метаболизме. Однако нам наиболее вероятным кажется, что этот фермент входит в ряд полиферментных систем, как, например, в пируватдегидрогеназный комплекс. Отличительная особенность полиферментных систем состоит в том, что продукты реакции не выходят в окружающую среду. В основном полиферментные системы обладают аллостерическими свойствами, а сам аллостерический центр обычно находится в субъединицах фермента, запускающего первую реакцию (пируватдекарбоксилаза) [17]. Возможно, что ТПК может осуществлять функционирование этого комплекса на уровне синтеза ТДР, необходимого кофактора пируватдекарбоксилазы. При выделении пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей на большинстве этапов очистки фермента [18] ему сопутствует, по нашим данным, в заметном количестве ТПК. Опыты по индукции синтеза пируватдегидрогеназы инъекциями тиаминг авитаминозным животным [19] также не исключают, а скорее подтверждают причастие ТПК к регуляции биосинтеза ТДР-зависимых ферментов, даже на генетическом уровне. Таким образом, естественно, напрашивается предположение, что ТПК как регуляторный фермент синтезируется и присутствует в клетках в составе полиферментных комплексов с другими ТДР-зависимыми ферментами.

Экспериментальная часть

Выделение ТПК проводили по методу [6] с некоторыми модификациями [12]. Высушенные пивные дрожжи (100 г) после 3 ч автолиза при 37° центрифугировали в течение 1 ч при 105 000 *g* на центрифуге VAC-601. Надосадочную жидкость прогревали при 50° в течение 10 мин и после охлаждения центрифугировали. Надосадочную жидкость подвергали фракционированию ацетоном и выделяли фракцию между 35—46% насыщения. Полученный осадок растворяли в 20 мл H₂O и диализовали против 0,01 М трис-НСI буфера (рН 7,3) в течение 12 ч при + 4°. Диализованный раствор разбавляли и проводили фракционирование с помощью (NH₄)₂SO₄. Грубый ферментный препарат, полученный в пределах 50—60% насыщения (NH₄)₂SO₄, растворяли в минимальном объеме исходного трис-НСI буфера.

Гель-фильтрация на G-25. Ферментный препарат, растворенный в минимальном объеме буфера, центрифугировали в течение 20 мин при 20 000 *g*, а надосадочную жидкость наносили на колонку (50 × 1,5 см) с сефадексом G-25, уравновешенную 0,01 М трис-НСI буфером (рН 7,3). Элюцию проводили тем же буфером. При гель-фильтрации через сефадекс G-25 происходило не только обессоливание фермента, но также и некоторая его очистка (см. таблицу).

Хроматография на DEAE-сефадексе A-50. Колонку размером 2 × 30 см уравновешивали 0,01 М трис-НСI буфером (рН 7,3) и вносили в нее 20 мл раствора препарата после гель-фильтрации на G-25. После сорбции белка колонку промывали 300 мл исходного буфера до минимального поглощения при D₂₈₀. Ступенчатую элюцию проводили этим же буфером с возрастающими концентрациями NaCl. Фракции объемом 4 мл собирали на коллекторе. Скорость элюции 12 мл/ч. Результаты хроматографии представлены на рис. 5. ТПК вымывали 0,3 М NaCl. В результате хроматографии получали 30 мл раствора очищенного фермента.

Гель-фильтрация на G-200. Наиболее активные фракции фермента после хроматографии концентрировали против полиэтиленгликоля и наносили на колонку с сефадексом G-200 (1,5 × 90 см), уравновешенную 0,01 М трис-НСI буфером с 0,05 М NaCl. Белок элюировали исходным бу-

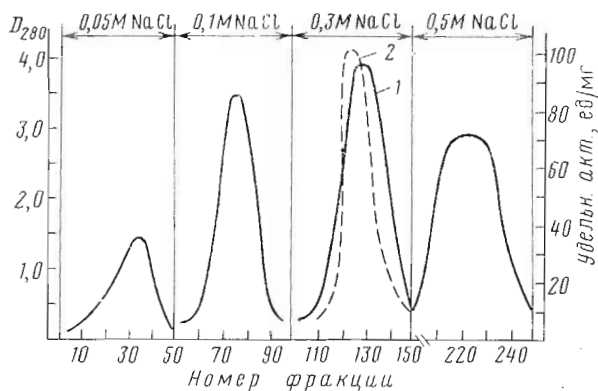


Рис. 5. Хроматография ТПК на DEAE-сефадексе А-50: 1 — D_{280} , 2 — удельная активность

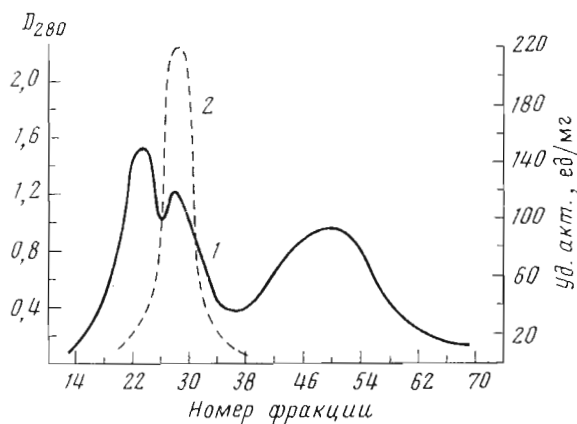


Рис. 6. Гель-фильтрация ТПК через сефадексе G-200: 1 — D_{280} , 2 — удельная активность

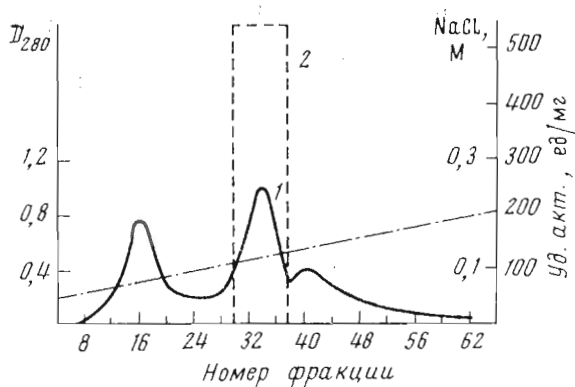


Рис. 7. Рехроматография ТПК на колонке с DEAE-сефадексом А-50: 1 — D_{280} , 2 — удельная активность

фером со скоростью 12 мл/ч, объем фракций 4 мл. Как видно из рис. 6, ферментативная активность обнаруживается во втором пике.

Рехроматография на DEAE-сефадексе А-50. Фракции второго пика объединяли и подвергали рехроматографии на DEAE-сефадексе. После нанесения белка на колонку ($2,5 \times 15$ см) последнюю промывали 250 мл 0,01 М трис-НСI буфера (рН 7,3) до прекращения выхода несвязавшегося белка. Фермент элюировали линейным градиентом NaCl от 0,05 до 0,2 М

со скоростью 12 мл/ч. Объем резервуара и смесителя — по 250 мл. ТПК выходила симметричным пиком в интервале 0,11—0,17 М NaCl (рис. 7).

Диск-электрофорез проводили в 7%-ном полиакриламидном геле (рН 8,3) при силе тока 5 мА на трубку в течение 2 ч [24, 25]. Количество белка 50—70 мкг. После электрофореза колонку геля фиксировали 5%-ной трихлоруксусной кислотой и окрашивали амидочерным.

Активность ТПК определяли в стандартных условиях. Реакционная смесь содержала: $2 \cdot 10^{-5}$ М тиамин, $2 \cdot 10^{-3}$ моль АТФ, $2 \cdot 10^{-3}$ моль трис-НСI буфера, $1 \cdot 10^{-2}$ моль $MgSO_4$ и 10—20 мкг фермента. Объем доводили до 1 мл H_2O . Смесь инкубировали на водяной бане в течение 1 ч. В качестве контроля использовали те же ингредиенты, к которым добавляли 10 мкг предварительно денатурированного нагреванием фермента. Количество образовавшегося TDP определяли ферментативным методом [20, 21]. Калибровочный график строили с хроматографически чистым препаратом TDP. Удельную активность фермента выражали в наномолях TDP, синтезированного за 1 ч 1 мг белка (ед/мг). Определение белка проводили спектрометрически и методом Лоури [22, 23].

Значения K_m определяли графически по методу двойных и обратных величин Лайнуивера—Берка. Константы ингибирования K_i для аналога тиамин рассчитывали по формуле:

$$K_i = \frac{K_m[I]}{K_m' - K_m},$$

где K_m' — эффективная константа Михаэлиса. Реактивы: в работе были использованы TDP и полиэтиленгликоль фирмы «Fluka», АТФ * фирмы «Reanal» (ВНР), пиритиамин фирмы «Calbiochem», (Англия), сефадексы G-25, G-200 и DEAE A-50 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Другие реактивы — высокой чистоты, отечественного производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lohman K., Schuster P. (1937) Biochem. Z., 294, 188—193.
2. Euler H. V., Vestin R. (1973) Naturwiss., 25, 416—421.
3. Weil-Malherbe H. (1939) Biochem. J., 33, 1997—2007.
4. Stein-Parve E. P. (1952) Biochim. et biophys. acta, 8, 310—323.
5. Forsander O. (1956) Comment. phys.-math. Academic bookstore, Helsingfors, 19, p. 27—95.
6. Kaziro Y. (1959) J. Biochem., 46, 1523—1539.
7. Mano Y. (1960) J. Biochem., 47, 159—165.
8. Jonson L. R., Gubler C. J. (1968) Biochim. et biophys. acta, 156, 85—96.
9. Deus V., Blum H. E. C., Holzer H. (1969) Anal. Biochem., 27, 492—501.
10. Островский Ю. М., Ульрих И., Хольцер Х. (1971) Докл. АН ВССР, 15, 755—757.
11. Gubler C. J., Peterson J. W. (1971) Fed. Proc., 30, 515—516.
12. Воскобоев А. П., Черникович И. П., Островский Ю. М. (1975) Прикл. биохимия и микробиология, 11, 230—236.
13. Островский Ю. М. (1971) Тиамин, «Белорусь», Минск.
14. Monod J., Wyman J., Changeux J. P. (1965) J. Mol. Biol., 12, 88—102.
15. Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C. (1965) J. Biol. Chem., 240, 2682—2693.
16. Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникович И. П. (1975) Биоорганич. химия, 1, 828—832.
17. Курганов Б. И., Поляновский О. Л. (1971) Журнал Всесоюзного хим. общ., 16, 421—431.
18. Ullrich J., Wittorf J. H., Gubler C. J. (1966) Biochim. et biophys. acta, 113, 595—603.
19. Reinauer H., Grassow G., Hollmann S. (1968) Z. Physiol. Chemie, 349, 969—978.
20. Ullrich J. (1970) in Meth. d'Enzim. Analyse, 2 Aufl. (H. U. Bergmeuer), p. 130, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

* Для проведения опыта использовали АТФ после предварительной очистки путем ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25.

21. Naveke R., Goedde H. W., Holzer H. (1962) Arch. Mikrobiol., 44, 93—104.
22. Kunitz M. (1952) J. Gen. Physiol., 35, 423—429.
23. Lowry O. H., Rosenberg N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
24. Davis J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—413.
25. Ornstein L. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321—325.

Поступила в редакцию
2.VIII.1974*

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE FROM BREWER'S YEAST

VO SKOBOEV A. I., OSTROVSKY Yu. M., CHERNIKEVICH I. P.

*Metabolism Regulation Division, Academy of Sciences
of the BSSR, Grodno*

Thiamine pyrophosphokinase has been isolated from brewer's yeast and purified up to 1200-fold in about 17-20% yield. For purified enzyme K_m with thiamine was 6×10^{-6} M, for some antagonists the K_i values were 6.5×10^{-6} M for purithiamine and 1×10^{-2} M for oxythiamine. Thiamine diphosphate synthesis was strictly dependent upon Mg^{2+} concentration, and the optimum Mg^{2+}/ATP^{4-} ratio was found to be 4 : 1. Substrate-saturation curves of thiamine pyrophosphokinase for $MgATP^{2-}$ were sigmoidal at saturating concentration of thiamine provided the Mg^{2+}/ATP^{4-} ratio was maintained 1 : 1. Under identical conditions, except that Mg^{2+} was present in excess, hyperbolic curves were observed. The number of binding sites (calculated from Hill plots) is 2.7 for substrate when Mg^{2+}/ATP^{4-} ratio constitute 1 : 1 and 1.0 at excess of Mg^{2+} . The apparent K_m for $Mg \cdot ATP^{2-}$ is 8×10^{-3} M at a Mg^{2+}/ATP^{4-} ratio 1 : 1 and 8×10^{-4} M at excess of Mg^{2+} . The results obtained indicate the homotropic cooperative binding of $MgATP^{2-}$ and that Mg^{2+} is an allosteric activator of the enzyme.

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия».