



УДК 577.153.35.02

ЛИЗИН В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ
ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *

Склянкина В. А., Суранова Е. Д., Аваева С. М.

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Установлено, что инактивация неорганической пирофосфатазы дрожжей под действием ТНБС является результатом модификации ϵ -аминогрупп лизина. Сделано предположение об участии ϵ -аминогрупп лизина в одной из стадий превращения субстрата.

Ранее нами было показано, что обработка неорганической пирофосфатазы дрожжей (КФ 3.6.1.1.) ТНБС — реагентом на аминок- и сульфгидрильные группы белков — приводит к полной потере ферментативной активности [1].

Предстояло определить, модификация каких групп фермента (α -NH₂-, ϵ -NH₂- или -SH) вызывает его инактивацию. Молекула неорганической пирофосфатазы содержит ~ 50 остатков лизина, две концевые группы треонина и четыре остатка цистеина [2—5]. В настоящей работе показано, что потеря ферментативной активности дрожжевой пирофосфатазы под действием ТНБС обусловлена модификацией ϵ -NH₂-групп лизина. Этот вывод был сделан на основании исследования свойств ТНФ-фермента и продуктов его кислотного гидролиза.

Было установлено, что спектр ТНФ-белка в области 300—450 нм идентичен спектру ϵ -N-ТНФ-аминокислоты и характеризуется наличием четко выраженного максимума при 348 нм (рис. 1). Однако на основании этих данных исключить тринитрофенилирование SH-групп цистеина было нельзя, так как коэффициент молярной экстинкции S-ТНФ-цистеина при 348 нм на порядок ниже коэффициента молярной экстинкции N-ТНФ-аминокислот.

Вывод о том, что потеря ферментативной активности пирофосфатазы не связана с модификацией остатков цистеина был сделан на основании следующих соображений. Как известно, S-алкильные производные цистеина, например S-динитрофенилцистеин, легко отщепляют алкильную группу под действием тиоспиртов [6]. Если инактивация ферментов обусловлена блокированием SH-групп, обработка модифицированных ферментов тиоспиртами приводит к их реактивации [7]. Выдерживание неорганической пирофосфатазы, инактивированной на 50% введением двух

* Сокращения: ТНФ- — тринитрофенил-, ТНБС — 2,4,6-тринитробензолсульфокислота.

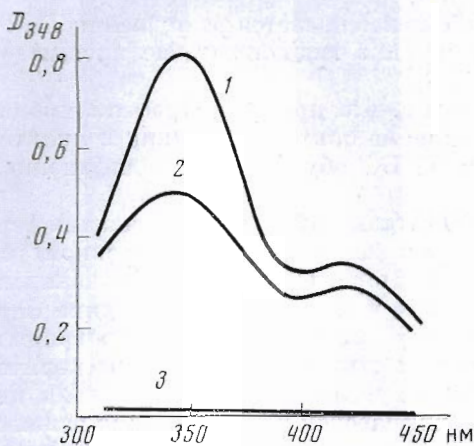


Рис. 1

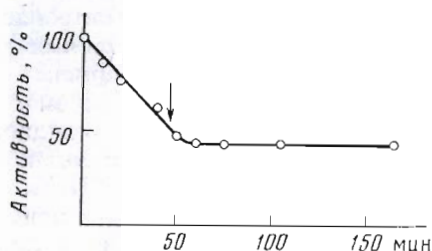


Рис. 2

Рис. 1. Спектры тринитрофенилированной неорганической пирофосфатазы и ϵ -ТНФ-лизина: 1 — ϵ -ТНФ-лизин в 6 н. HCl; 2 — ТНФ-пирофосфатаза в 6 н. HCl, кислотный гидролизат и водная фракция после экстракции эфиром; 3 — остаток, полученный упариванием эфирной фракции после экстракции кислотного гидролизата ТНФ-пирофосфатазы

Рис. 2. Изменение активности неорганической пирофосфатазы под действием ТНБС в последующей реакции ТНФ-белка с дитиотреитом (показано стрелкой)

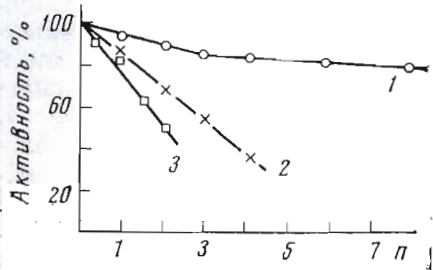


Рис. 3

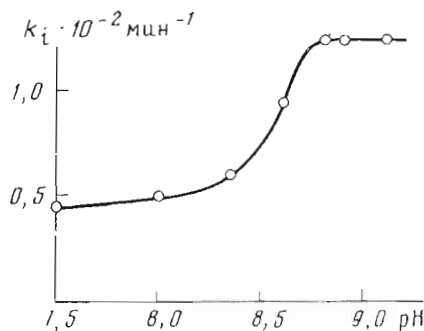


Рис. 4

Рис. 3. Изменение активности пирофосфатазы в зависимости от числа введенных в белок ТНФ-групп (n) ТНБС: 1 — $0,5 \cdot 10^{-3}$ М; 2 — $1,35 \cdot 10^{-5}$ М; 3 — $0,67 \cdot 10^{-5}$ М

Рис. 4. Зависимость константы скорости ингибирования пирофосфатазы ТНБС от рН

ТНФ-групп, с дитиотреитолом не приводило к реактивации фермента (рис. 2). Это указывало на то, что инактивация пирофосфатазы вызвана модификацией аминокрупп.

Изучение продуктов кислотного гидролиза ТНФ-фермента показало, что модифицированные аминокруппы принадлежат лизину. Пирофосфатазу обрабатывали 100-кратным избытком ТНБС в натрий-бикарбонатном буфере (рН 8,8) в течение 10 мин. Модифицированный белок отделяли от избытка ингибитора гель-фильтрацией через сефадекс G-25. Полученный неактивный ТНФ-фермент содержал 9,5 ТНФ-аминокрупп на моль белка. Далее этот белок гидролизовали соляной кислотой, гидролизат экстрагировали эфиром и спектрофотометрически исследовали эфирную и водную фракции (рис. 1). Следовало ожидать, что аминокислота с тринитрофенилированной α -NH₂-группой будет находиться в эфирном слое, в то время как ϵ -ТНФ-лизин останется в водной фазе. Как видно из рисунка, ТНФ-аминокислота находится только в водной фазе. Важно также,

что в процессе гидролиза практически не наблюдается разрушения ТНФ-аминокислоты, так как убыль ТНФ-групп в гидролизате не превышает степени разрушения ϵ -ТНФ-лизина (7%).

Эти результаты свидетельствуют о том, что при тринитрофенилировании фермента не затрагиваются N-концевые остатки треонина и инактивация пирофосфатазы под действием ТНБС обусловлена модификацией только ϵ -NH₂-групп остатков лизина.

Скорости тринитрофенилирования остатков лизина и инактивации фермента определяются условиями реакции: температурой, величиной рН среды, концентрациями фермента и ингибитора. Особенно существенными являются природа используемого буфера и молярное соотношение фермент — ингибитор. Из рис. 3 видно, что глубина тринитрофенилирования и степень снижения ферментативной активности пропорциональны количеству введенной в реакцию ТНБС. Однако с увеличением концентрации ингибитора реакция становится менее специфической и модификация важных для активности ϵ -NH₂-групп лизина сопровождается тринитрофенилированием большого числа остатков лизина.

Следует обратить особое внимание на влияние природы буферов на ход инактивации пирофосфатазы под действием ТНБС. В 0,2 М боратном, 0,05 М фосфатном и 0,1 М пирофосфатном буферах по сравнению с 0,5 М бикарбонатным буфером скорость инактивации фермента значительно ниже. Так, взаимодействие пирофосфатазы с $4 \cdot 10^{-5}$ М ТНБС в этих буферах в течение 30 мин при рН 8,5 приводит к снижению активности соответственно на 20, 30, 12 и 98%. Активность фермента полностью сохраняется в течение 2 ч, если его обрабатывать ТНБС в присутствии 10^{-3} М пирофосфата.

Защита фермента от инактивации под действием ТНБС субстратом — пирофосфатом и продуктом его ферментативного гидролиза — фосфатом, а также стерическим аналогом пирофосфата — боратом — свидетельствует в пользу присутствия остатков лизина в активном центре. Это предположение было подтверждено при изучении зависимости скорости инактивации фермента под действием ТНБС от рН среды. Как следует из рис. 4, константа скорости инактивации пирофосфатазы мало меняется в области рН от 7,5 до 8,5, но резко увеличивается с дальнейшим повышением рН. Точка перегиба на кривой зависимости константы скорости ингибирования от рН при рН 8,6 соответствует рК ϵ -NH₂-групп остатков лизина, модификация которых приводит к инактивации фермента. Полученное значение рК совпадает с величиной рК группы аминокислоты, входящей в активный центр пирофосфатазы и ответственной за превращение активного комплекса в продукты реакции [8].

Таким образом, полученные результаты — полная инактивация фермента при модификации небольшого числа остатков лизина, защита от инактивации субстратом и совпадение рК группы, тринитрофенилирование которой приводит к утрате ферментативной активности, с рК группы каталитической области активного центра — дают основания предположить, что остатки лизина принимают участие в одной из стадий превращения субстрата. Функционирование остатка лизина в активном центре в протонированном состоянии [8] и снижение рК его ϵ -NH₂-группы почти на две единицы по сравнению со свободным лизином указывают на его возможную роль как донора протона.

Данные настоящей работы находятся в противоречии с мнением Купермана и соавт. [9] об отсутствии лизина в активном центре неорганической пирофосфатазы из дрожжей. Авторы обрабатывали фермент 10^{-3} М ТНБС в фосфатном буфере 2,5 ч при рН 8,0, при этом, несмотря на глубокую модификацию остатков лизина, фермент терял только 13% активности. Несмотря на наши данные о защитном действии фосфат-иона и об уменьшении специфичности реакции с повышением концентрации ТНБС, причины полученных различий не вполне очевидны.

Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу выделяли из маточных пекарских дрожжей по методам Кунитца [10] или Брага и соавт. [11]. Полученные препараты имели удельную активность 485 и 805 МЕ/мг (соответственно 30 и 50 ед. по Кунитцу).

Ферментативную активность определяли в 0,03 М трис-НСI буфере (рН 7,2) в присутствии $1,7 \cdot 10^{-3}$ М $MgSO_4$ и $1,7 \cdot 10^{-3}$ М $Na_4P_2O_7$ в течение 5—10 мин. Реакцию прерывали добавлением 5%-ного раствора молибдата аммония в 4 н. H_2SO_4 . Количество образующегося ортофосфата измеряли по ранее описанному методу [12].

ϵ -ТНФ-лизин синтезирован по методу Окуямы и Сатаке [13]. ТНБС и дитиотреитол (фирма «Serva» ФРГ) использовали без дополнительной очистки.

Реакция неорганической пирофосфатазы с ТНБС. Фермент (10^{-10} — 10^{-5} М) инкубировали с $4 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-3} М ТНБС в 0,5—1,2 мл соответствующего буфера (рН 8,0—8,8) при 22, 30 или 37°. За ходом реакции следили по изменению ферментативной активности и по включению в белок ТНФ-групп. Степень тринитрофенилирования белка определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «Cary-15» (США) шкала 0—1, в кювете длиной 1 см, используя в качестве стандарта ϵ -ТНФ-лизин. Коэффициент молярной экстинкции ϵ -ТНФ-лизина при 348 нм в нейтральных и кислых растворах — $1,5 \cdot 10^4$.

Реакция ТНФ-пирофосфатазы с дитиотреитом. Фермент ($6,0 \cdot 10^{-7}$ М) инкубировали с $3,0 \cdot 10^{-5}$ М ТНБС в вероналовом буфере (рН 8,6) при 37° в течение 40 мин. Полученный белок содержал 2 ТНФ-группы, а его активность составляла 50% от активности нативного фермента. ТНФ-белок обрабатывали дитиотреитом ($9,0 \cdot 10^{-3}$ М) при 30° и рН 8,6 и следили за изменением ферментативной активности в течение 180 мин (рис. 2).

Кислотный гидролиз ТНФ-белка. 2 мг пирофосфатазы ($1,85 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,5 М натрий-бикарбонатном буфере (рН 8,8) модифицировали $1,85 \cdot 10^{-3}$ М ТНБС в течение 10 мин при 37°. В этих условиях наблюдалась полная инактивация фермента. Реакцию прерывали добавлением 1 н. НСI до рН 6,3. ТНФ-белок выделяли гель-фильтрацией на колонке (1×25 см) с сефадексом G-25. Раствор ТНФ-белка разбавляли в 2 раза 12 н. НСI и выдерживали в запаянной ампуле при 105° в течение 16 ч. Одновременно такой же обработке подвергали ϵ -ТНФ-лизин и определяли степень разрушения ТНФ-аминокислот спектрофотометрически.

Инактивация фермента ТНБС различных концентраций. Фермент ($0,27 \cdot 10^{-5}$ М) инкубировали при 37° с ТНБС ($0,67 \cdot 10^{-5}$ — $0,5 \cdot 10^{-3}$ М) в натрий-бикарбонатном буфере (рН 8,5) в течение 10—120 мин. Через определенные промежутки времени из реакционных смесей отбирали пробы, в которых определяли степень тринитрофенилирования белка и его активность (см. рис. 3).

Кинетика ингибирования пирофосфатазы ТНБС при различных рН. Фермент ($6,0 \cdot 10^{-7}$ М) инкубировали с $3,0 \cdot 10^{-5}$ М ТНБС при 30° в вероналовом буфере, рН которого варьировали от 7,5 до 9,1. В аналогичных условиях выдерживали фермент без ингибитора. За ходом реакции следили по изменению ферментативной активности.

Константу ингибирования псевдопервого порядка определяли по формуле

$$K_i = \frac{1}{t} \ln \frac{A_0}{A},$$

где A_0 и A — активность в начальный момент времени и момент времени t .

ЛИТЕРАТУРА

1. Склянкина В. А., Медведева И. В., Аваева С. М. (1973) Докл. АН СССР, 211, 494—496.
2. Heinrikson R. G., Sterner R., Noyes C., Cooperman B. S., Brukman R. H. (1973) J. Biol. Chem., 248, 2521—2528.
3. Ковальчук О. В., Аваева С. М. (1973) Химия природн. соедин., 389—395.
4. Baratova L. A., Lebedeva Z. I., Belyanova L. P., Awaeva S. M. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 59, 653—657.
5. Hansen G., Eifler R., Heitmann R. (1972) Acta biol. et med. Germ., 28, 977—987.
6. Schalteil S. (1967) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 29, 178—181.
7. Schalteil S., Soria M. (1969) Biochemistry, 8, 4411—4415.
8. Байков А. А., Романов Л. В., Аваева С. М. (1973) Биохимия, 38, 478—484.
9. Cooperman B. S., Ning Yu Chin (1973) Biochemistry, 12, 1676—1682.
10. Kunitz M. (1952) J. Gen. Physiol., 35, 423—449.
11. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) Биохимия, 38, 344—350.
12. Weil-Malherbe, H., Green R. (1951) Biochem. J., 49, 286—291.
13. Okuyama T., Satake K. (1960) J. Biochem. (Tokio), 47, 454—466.

Поступила в редакцию
20.XII.1974

ACTIVE SITE LYSINE IN YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE

SKLYANKINA V. A., SURANOVA E. D., AWAEOVA S. M.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

Inactivation of yeast inorganic pyrophosphatase by trinitrobenzene sulfonic acid was shown to result from modification of lysine ϵ -amino groups. The assumption was made about their involvement in one of the steps of substrate transformation.
