



УДК 577.152.361*1'135

СУБСТРАТЫ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ *E. coli*

Курилова С. А., Богданова А. В., Назарова Т. И.,
Аваева С. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского, Москва

Изучена субстратная специфичность неорганической пирофосфатазы из *E. coli*. Этот фермент гидролизует наряду с пирофосфатом и триполифосфатом также простейший органический субстрат — метилпирофосфат, но не гидролизует АТФ и АДР. Катализ осуществляется в присутствии Zn^{2+} , а не Mg^{2+} . Субстратом пирофосфатазы из *E. coli* является и бидентатный комплекс пирофосфата с Cr^{3+} . Сравнительное изучение кинетики гидролиза этого субстрата и $MgPP$ при рН 7,5 показало, что константа диссоциации комплекса фермент — активатор — субстрат для $CrPP$ в 3 раза выше, чем для $MgPP$, а максимальная скорость составляет 1,2% соответствующей величины для $MgPP$.

Неорганические пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) получили свое название в соответствии со специфичностью, так как их основным субстратом является пирофосфат (PP_1). Некоторые представители этого класса ферментов имеют очень узкую специфичность и гидролизуют только пирофосфат, другие наряду с пирофосфатом расщепляют триполифосфат (PPP_1) и органические эфиры ди- и трифосфорной кислот. Ферментом с наиболее широкой специфичностью является пирофосфатаза пекарских дрожжей, которая гидролизует PP_1 , PPP_1 , АТФ, АДР, О-пирофосфозаноламин, метилпирофосфат и другие эфиры [1–3]. Все пирофосфатазы — металлозависимые ферменты, проявляющие активность лишь в присутствии катионов двухвалентных металлов, среди которых наиболее эффективны Mg^{2+} и Zn^{2+} [4]. Пирофосфат и триполифосфат гидролизуются в присутствии обоих катионов-активаторов, а эфиры — только в присутствии Zn^{2+} . Несколько лет назад в целях выявления принципиальных основ функционирования пирофосфатаз из различных источников начато изучение пирофосфатазы из *E. coli*. Этот фермент гидролизует PP_1 и PPP_1 в присутствии как ионов магния, так и цинка, причем рН-оптимум гидролиза при переходе от Mg^{2+} к Zn^{2+} изменяется с 9,1 до 7,5 [4].

Цель настоящей работы — дальнейшее исследование субстратной специфичности пирофосфатазы из *E. coli*. Оказалось, что АТФ и АДР, расщепляясь ферментом из дрожжей, практически не гидролизуются пирофосфатазой из *E. coli* ни в присутствии Mg^{2+} , ни в присутствии Zn^{2+} в широком диапазоне рН и концентраций катиона-активатора. В то же время метилпирофосфат, простейший органический субстрат пирофосфатазы из дрожжей, расщепляется ферментом из *E. coli*. Гидролиз имеет место только в присутствии Zn^{2+} , а максимальная скорость достигается при рН 7,5. В оптимальных условиях (2 мМ метилпирофосфат, 1 мМ Zn^{2+}) она составляет 3% максимальной скорости гидролиза PP_1 в присутствии Mg^{2+} при рН 7,5. Таким образом, для пирофосфатазы из *E. coli* характерна более узкая специфичность, чем для фермента из дрожжей.

Ранее было установлено [5], что при гидролизе пирофосфата в присутствии ионов магния, катализируемом пирофосфатазами из дрожжей и *E. coli*, продуктивный комплекс, превращающийся в продукты реакции, включает в себя три иона металла-активатора и молекулу пирофосфата, а истинным субстратом является пирофосфат магния ($MgPP$). Однако рН-оптимум гидролиза пирофосфата для пирофосфатазы из дрожжей составляет 7,2, а для фермента из *E. coli* — 9,1. Указанный оптимум рН для

**Кинетические параметры гидролиза субстратов
неорганической пирофосфатазы из *E. coli***

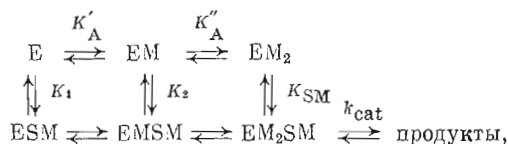
| Субстрат | pH | V, ед. акт./мг | K _{SM} , мкМ |
|----------|-----|----------------|-----------------------|
| MgPP | 9,1 | 760 * | 31 * |
| MgPP | 7,5 | 500 | 110 |
| CrPP | 7,5 | 6,1 | 330 ** |

* Данные работы [5].

**Для комплекса EM₂SM'.

фермента из дрожжей обусловлен наличием в его активном центре, с одной стороны, группы с pK 5,6 и, с другой — группы с pK 7,5, функционирующей в протонированной форме [6]. Причины же высокого pH-оптимума для фермента из *E. coli* неизвестны, тем более что физиологический pH в клетке *E. coli* составляет 7,5.

В настоящей работе изучена кинетика гидролиза пирофосфата магния при значении pH 7,5. Исследована зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации истинного субстрата, пирофосфата магния, при нескольких фиксированных концентрациях ионов магния. Анализ полученных результатов позволил предложить следующую кинетическую схему гидролиза субстрата при pH 7,5:



где M — ионы магния, S — пирофосфат, E — субъединица фермента.

Согласно этой схеме, для активации гидролиза необходимо непосредственное связывание с ферментом по крайней мере двух ионов магния, истинным субстратом является пирофосфат магния, а каталитически активен только комплекс EM₂SM. Данная кинетическая схема полностью совпадает со схемой, предложенной ранее для pH 9,1 [5]. Кинетические параметры гидролиза MgPP при pH 7,5 и 9,1 (таблица) существенно не различаются: максимальная скорость при pH 7,5 составляет 66% от величины, определенной для pH 9,1, а константа диссоциации комплекса фермент — активатор — субстрат (K_{SM}) увеличивается в 3,5 раза. Анализ

кинетических данных позволяет оценить произведение констант (K_A · K''_A), характеризующих связывание катионов-активаторов с ферментом. При pH 7,5 оно равно 7 · 10⁻⁸ M², а при pH 9,1 — 1,5 · 10⁻⁸ M².

Если для ферментов из дрожжей и *E. coli* сохраняются общие черты в механизме действия, то можно думать, что высокий оптимум pH гидролиза MgPP пирофосфатазой из *E. coli* обусловлен большим, чем 7,5, значением pK для группы, функционирующей в протонированном состоянии.

Недавно для неорганической пирофосфатазы из дрожжей найден еще один субстрат — бидентатный комплекс пирофосфата с трехвалентным хромом (CrPP) [6]. В составе пирофосфата хрома ион Cr³⁺ связан настолько прочно, что не обменивается в процессе гидролиза на присутствующие в среде катионы других металлов, поэтому использование такого субстрата дает возможность более детально исследовать процесс активации фермента катионами металла. В настоящей работе показано, что пирофосфатаза из *E. coli* также катализирует гидролиз CrPP в присутствии как Mg²⁺, так и Zn²⁺, и изучена кинетика гидролиза этого субстрата при нескольких фиксированных концентрациях ионов магния.

Результаты этих исследований приведены на рис. 1 в координатах обратных величин. Для определения числа ионов магния, участвующих в ферментативном акте, данные кинетических измерений представлены в координатах Хилла (рис. 2). Коэффициент Хилла составил 1,6. Эти ре-

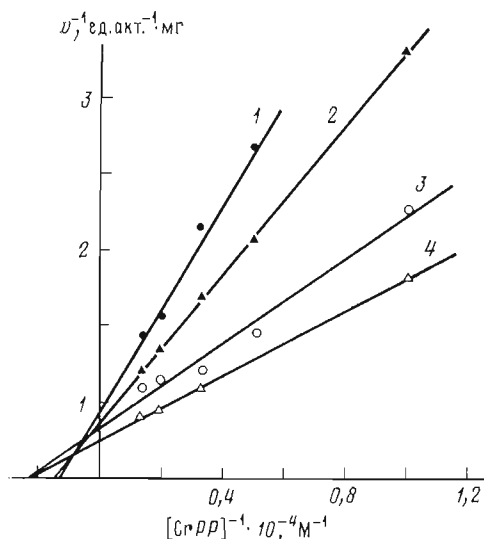


Рис. 1. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации CrPP при концентрации Mg^{2+} 300 (1), 400 (2), 500 (3), 800 (4) μM

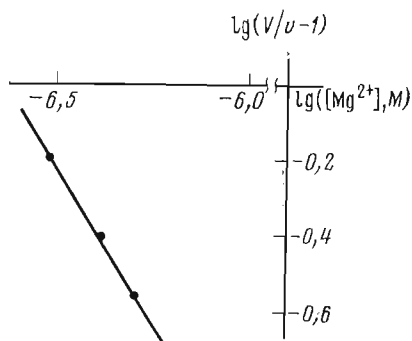
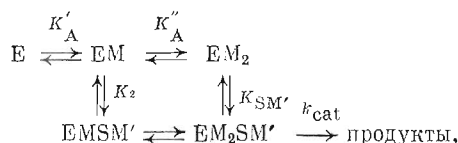


Рис. 2. График Хилла для гидролиза CrPP при фиксированной концентрации ионов магния

результаты указывают на то, что в ферментативном акте участвуют по крайней мере два иона магния. Для установления кинетической схемы гидролиза CrPP были построены вторичные графики зависимости наклона прямых ($K_{SM'(\text{эф})}/V_{\text{эф}}$) и отрезка, отсекаемого на оси ординат ($1/V_{\text{эф}}$), от величины, обратной концентрации активатора (рис. 3). Параболический характер зависимости $K_{SM'(\text{эф})}/V_{\text{эф}}$ от $1/[Mg^{2+}]$ и линейный характер зависимости $1/V_{\text{эф}}$ от $1/[Mg^{2+}]$ согласуются со схемой



где M — ион магния, M' — ион хрома, S — пирофосфат, E — субъединица фермента.

Согласно этой схеме, в состав продуктивного комплекса, как и при гидролизе MgPP, входят два катиона магния, связанных с ферментом, и молекула субстрата, в данном случае CrPP. Но в отличие от гидролиза MgPP пирофосфат хрома присоединяется только к комплексу пирофосфатазы с одним или двумя катионами металла-активатора. Уравнение скорости процесса, протекающего по этой схеме, имеет вид

$$1/v = 1/V \left(1 + \frac{K''_A K_{SM'}}{[M] K_2} \right) + \frac{K_{SM'}}{V [SM']} \left(1 + \frac{K''_A}{[M]} + \frac{K'_A K''_A}{[M]^2} \right).$$

При фиксированной концентрации ионов магния это уравнение в координатах обратных величин описывает прямую линию

$$1/v = 1/V_{\text{эф}} + K_{SM'(\text{эф})}/V_{\text{эф}} [SM']$$

с параметрами

$$1/V_{\text{эф}} = 1/V \left(1 + \frac{K''_A K_{SM'}}{[M] K_2} \right); \quad K_{SM'(\text{эф})}/V_{\text{эф}} = K_{SM'}/V \left(1 + \frac{K''_A}{[M]} + \frac{K'_A K''_A}{[M]^2} \right).$$

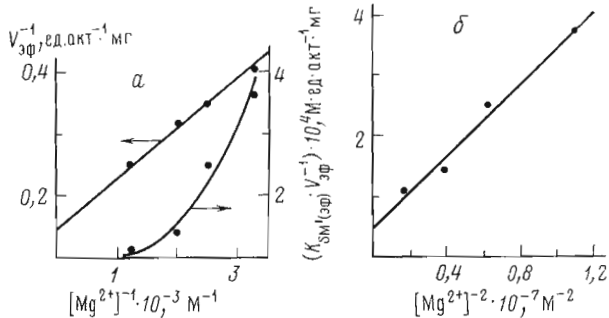


Рис. 3. Зависимость параметров прямых рис. 1 от обратной концентрации (а) и от квадрата обратной концентрации (б) ионов магния в растворе

Линейный характер зависимости $K_{SM'(\text{эф})}/V_{\text{эф}}$ от квадрата обратной концентрации активатора (рис. 3б) указывает на относительно невысокое содержание комплексов EM и EM_{SM}' по сравнению с количеством форм EM_2 и EM_2SM' , т. е. присоединение первого иона металла-активатора к

ферменту облегчает присоединение второго так, что $K_A'' < K_A'$, как это наблюдалось ранее при изучении гидролиза $MgPP$. Кинетические параметры гидролиза $CgPP$ приведены в таблице. Максимальная скорость гидролиза $CgPP$ в 82 раза ниже, чем скорость гидролиза $MgPP$ при pH 7,5, а константа диссоциации соответствующего комплекса при этом увеличивается лишь в 3 раза. В то же время для пирофосфатазы дрожжей величина V для гидролиза $CgPP$ в 36 раз меньше, чем для $MgPP$, а K_{SM} — в 10 раз больше [6]. Таким образом, $CgPP$ гидролизует пирофосфатазой из *E. coli* гораздо медленнее, чем $MgPP$, однако использование этого субстрата открывает принципиально новые возможности при изучении механизма действия фермента. Этот субстрат нашел применение при изучении регуляции активности пирофосфатазы из *E. coli* [7].

Экспериментальная часть

В работе использовали трис(гидроксиметил)аминометан (трис), хлорид тетраметиламмония (Fluka, Швейцария); Нерес (Serva, ФРГ), пирофосфат натрия (Sigma, США), морфолинэтансульфоновую кислоту (Mes) (Reanal, Венгрия), хлориды магния и трехвалентного хрома марки х.ч., хлорид цинка марки ч.д.а. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже х.ч. Для приготовления всех растворов использовали бидистиллированную воду. В работе применяли титрованные растворы $MgCl_2$ и $ZnCl_2$. Концентрацию пирофосфата натрия определяли после исчерпывающего гидролиза аликвоты раствора пирофосфатазой из *E. coli* по количеству образовавшегося фосфата на автоматическом анализаторе фосфата [8].

Неорганическая пирофосфатаза из *E. coli* была выделена из штамма *E. coli* MRE-600 по методу Джосса и имела удельную активность 600 МЕ/мг [9]. Константы диссоциации комплексов Mg^{2+} с неорганическим пирофосфатом при pH 7,5, температуре 25°C, $I=0,1$, рассчитанные согласно [10, 11], составили для $MgPP$ $4,8 \cdot 10^{-5}$ М, а для Mg_2PP — $2,42 \cdot 10^{-3}$ М. Скорость ферментативного гидролиза выражали в количестве субстрата (мкмоль), превращенного за 1 мин, в расчете на 1 мг белка (ед. акт./мг).

Пирофосфат хрома $Cg(H_2O)_4HP_2O_7 \cdot 3H_2O$ синтезировали и очищали по методике, предложенной Мерритом [12].

Метилпирофосфат натрия синтезировали по методике, описанной в работе [13], и очищали, как указано в [3].

Кинетику гидролиза пирофосфата, катализируемого неорганической пирофосфатазой из *E. coli*, в присутствии Mg^{2+} исследовали в 0,1 М трис-

HCl-буфере, pH 7,5, при I 0,1 и 25° С. Концентрацию свободной формы Mg^{2+} варьировали от 30 до 100 мкМ, а концентрацию пирофосфата магния — от 7,5 до 100 мкМ. Начальные скорости гидролиза пирофосфата магния определяли на автоматическом анализаторе фосфата, работающем в непрерывном режиме с чувствительностью $(1-5) \cdot 10^{-5}$ М фосфата на полную шкалу самописца. Реакцию проводили в термостатируемом сосуде, снабженном магнитной мешалкой. Кинетические параметры гидролиза оценивали графически.

Кинетика гидролиза пирофосфата хрома, катализируемого неорганической пирофосфатазой из E. coli. Реакционную смесь, содержащую 0,3–1,5 мМ $MgCl_2$ и фермент в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 7,5 ($I=0,1$), выдерживали 10 мин при 25° С и добавляли 100–700 мкМ $CrPP$, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, реакцию останавливали добавлением H_2SO_4 до 0,1 н. концентрации. К реакционной смеси добавляли 1 н. NaOH до pH 2 и EDTA до концентрации 60 мМ, затем нейтрализовали 1 н. NaOH до pH 5, прогревали смесь 2 мин на водяной бане при 100° С, охлаждали и измеряли количество фосфата на автоматическом анализаторе. Для определения концентрации пирофосфата хрома аликвоту раствора $CrPP$ гидролизуют 1 ч 0,07 н. H_2SO_4 при 100° С и аналогичным образом определяли количество образовавшегося фосфата.

Ферментативный гидролиз метилпирофосфата, ATP и ADP исследовали в интервале pH 5,3–9,1 при 25° С. Использовали буферы: 0,05 М трис-малеат (pH 5,3), 0,05 М Mes-NaOH (pH 6,0), 0,05 М Hepes-NaOH (pH 7,5; 8,0) и 0,06 М аммедииол-HCl (pH 8,0; 9,1). 5 мл реакционной смеси содержали 2 мМ метилпирофосфат или 1,8 мМ ATP (ADP), 1 мМ $ZnCl_2$ или $MgCl_2$ и $(5,1-5,6) \cdot 10^{-8}$ М фермент. В случае ATP и ADP реакционную смесь выдерживали 1,5 ч, ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 4 н. H_2SO_4 и определяли количество образовавшегося фосфата на автоматическом анализаторе; ферментативную активность неорганической пирофосфатазы из *E. coli* по метилпирофосфату определяли по начальной скорости гидролиза субстрата на приборе для автоматического определения фосфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cooperman B. S. In: Methods in enzymology / Ed. Pestka S. N. Y.—L.: Acad. Press, 1982, v. 87, p. 526–548.
2. Кузнецов А. В., Аваева С. М., Байков А. А., Склянкина В. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 950–957.
3. Мельниц М. С., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биохимия, 1982, т. 47, № 2, с. 323–328.
4. Josse J. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 1930–1947.
5. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1032–1039.
6. Knight W. B., Fitts S. M., Dunaway-Mariano D. Biochemistry, 1981, v. 20, № 17, p. 4079–4086.
7. Курилова С. А., Богданова А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 9, с. 1153–1160.
8. Baykov A. A., Awaeva S. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 32, № 1, p. 132–142.
9. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 17, p. 4335–4345.
10. Шафранский Ю. А., Байков А. А., Андрукович П. Ф., Аваева С. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 7, с. 1244–1251.
11. Irani K. K., Callis G. E. J. Phys. Chem., 1960, v. 64, p. 1398–1407.
12. Merritt E. A., Sundaralingam M., Dunaway-Mariano D. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 12, p. 3565–3567.
13. Schülke U. Z. Anorgan. und allg. Chem., 1968, B. 361, № 5–6, S. 225–334.

Поступила в редакцию
30.I.1984

SUBSTRATES OF *E. COLI* INORGANIC PYROPHOSPHATASE

KURILOVA S. A., BOGDANOVA A. V., NAZAROVA T. I., AVAEVA S. M.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The substrate specificity of inorganic pyrophosphatase from *E. coli* has been investigated. Along with pyrophosphate and tripolyphosphate, this enzyme catalyzes hydrolysis of the simplest organic substrate — methylpyrophosphate, but does not hydrolyze ATP and ADP. The ester is hydrolyzed in the presence of Zn^{2+} , but not with Mg^{2+} . A bidentate complex of pyrophosphate with Cr^{3+} is also a substrate of *E. coli* pyrophosphatase. A comparative study of the hydrolysis of this substrate and $MgPP$ at pH 7,5 has shown that the dissociation constant for the enzyme — activator — substrate complex in the case of $CrPP$ is three times higher than that for $MgPP$, whereas the maximal rate for the former complex amounts only to 1,2% of the corresponding value for $MgPP$.