



УДК 577.152.361\*1.042

МОНОЭФИРЫ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ — АФФИННЫЕ  
ИНГИБИТОРЫ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ  
*E. COLI*

Борщук И. Б., Складкина В. А., Аваева С. М.

*Химический факультет и Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Моноэфиры фосфорной кислоты эффективно подавляют активность неорганической пирофосфатазы *E. coli*. Ингибиторы присоединяются к ферменту в стехиометрическом количестве, при этом наблюдается полная корреляция между глубиной инактивации и количеством связанного реагента. Ковалентной модификации белка предшествует образование специфического комплекса фермент — реагент. Ингибирование носит конкурентный характер. Субстрат предотвращает реакцию пирофосфатазы с монофосфатами. Эти факты свидетельствуют, что моноэфиры фосфорной кислоты являются аффинными ингибиторами неорганической пирофосфатазы *E. coli*. Обсуждаются общие черты в реакциях монофосфатов с пирофосфатазами из *E. coli* и пекарских дрожжей.

Метод аффинной модификации, впервые предложенный для идентификации групп активных центров ферментов, в настоящее время успешно применяется для решения широкого круга задач энзимологии. К ним относятся введение в фермент флуоресцентных, спиновых и тому подобных меток, которые могут служить индикаторами конформационных перестроек в белке, исследование участков связывания отдельных субстратов у многосубстратных ферментов, изучение кооперативных влияний каталитических и эффекторных центров друг на друга и кооперативных взаимодействий между однотипными центрами в олигомерных ферментах, выявление общих закономерностей в функционировании ферментов одного класса с применением одного и того же аффинного реагента и т. д. Перспективность использования аффинных реагентов для структурно-функциональных исследований ферментов в значительной мере определяется тем, насколько в процессе модификации выполняются основные критерии аффинной модификации [1].

Ранее нами было показано, что аффинными ингибиторами неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей являются моноэфиры фосфорной кислоты [2]. Метод аффинной модификации позволил выявить кооперативные взаимодействия между активными центрами этого белка [3]. Неорганические пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) в присутствии ионов двухвалентных металлов катализируют гидролиз и синтез неорганического пирофосфата. Фермент из пекарских дрожжей является димером, состоящим из химически идентичных субъединиц. Более сложно организована пирофосфатаза из *E. coli*. Она представляет собой гексамер, построенный из шести одинаковых субъединиц [4].

В настоящей работе показано, что моноэфиры фосфорной кислоты выступают в роли аффинных реагентов по отношению не только к дрожжевой пирофосфатазе, но и к ферменту из *E. coli*. Существенной характеристикой этого процесса в данном случае является также неэквивалентное поведение субъединиц.

Для исследования были выбраны моноэфиры фосфорной кислоты, содержащие различные заместители в органической части молекулы: N-ацетилфосфосерин, имеющий карбоксильную группу, фосфоэтаноламин

## Ингибирование неорганической пирофосфатазы *E. coli* моноэфирами фосфорной кислоты

Реагент	Инактивация, %	Включение, моль/моль белка	$K_i$ , мМ	$c^{-1}$		$K_i^*$ , мМ
				$k_1 \cdot 10^2$	$k_2 \cdot 10^4$	
Монометилфосфат	50	3,1	3,6	0,35	—	1
N-Ацетилфосфосерин	50	3,2	0,91	0,35	—	0,28
O-Фосфоэтаноламин	100	5,7	1,25	0,12	2,4	0,36
O-Фосфопропаноламин	100	5,5	—	0,19	1,89	0,4

\*  $K_i$  определена из данных по конкурентному ингибированию гидролиза пирофосфата магния.

и фосфопропаноламин, содержащие аминогруппы, и метилфосфат (без функциональных групп). О протекании реакции судили, измеряя через определенные промежутки времени ферментативную активность и количество реагента, связанного с белком. Результаты проведенных исследований суммированы в таблице.

Моноэфиры фосфорной кислоты эффективно ингибируют пирофосфатазу. Процесс развивается во времени, и скорость его зависит от концентрации фермента и ингибиторов. Типичные кинетические кривые падения ферментативной активности приведены на рис. 1. При инкубации пирофосфатазы с метилфосфатом или N-ацетилфосфосерином через 15 мин остается 50% исходной ферментативной активности, которая далее практически не меняется во времени. Иная картина наблюдается в реакции пирофосфатазы с фосфоэтанол- и фосфопропанолaminaми. В этом случае выдерживание фермента с реагентом в течение 7 мин сопровождается быстрой потерей 50% активности. Процесс на этом не останавливается, и наступает более медленная стадия ингибирования, которая заканчивается через 2,5 ч. В результате фермент полностью утрачивает каталитические свойства.

О специфичности действия моноэфиров фосфорной кислоты свидетельствует защита пирофосфатазы от ингибирования субстратом (рис. 1, 1). Ингибирование неорганической пирофосфатазы моноэфирами фосфорной кислоты необратимо, так как не наблюдается восстановления активности белка после его освобождения от избытка реагентов гель-фильтрацией или при разбавлении реакционной смеси в 1000 раз. Отсюда следует, что причиной инактивации фермента, вероятно, является ковалентное связывание им моноэфира фосфорной кислоты. В пользу этого также свидетельствует корреляция глубины ингибирования и количества связанного с бел-

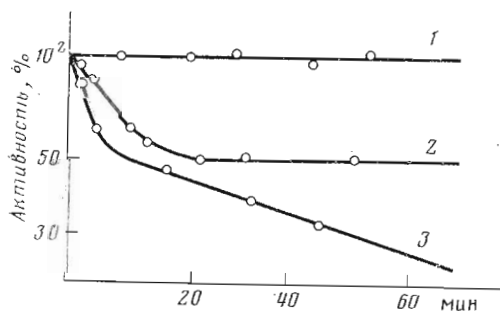


Рис. 1

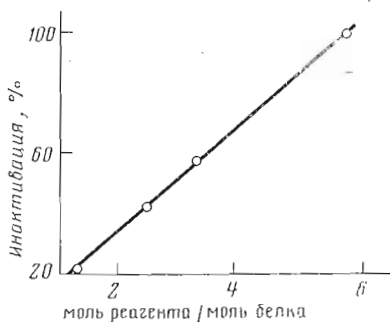


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация неорганической пирофосфатазы *E. coli* ( $10^{-7}$  М) под действием  $10^{-2}$  М N-ацетилфосфосерина (2) и  $10^{-2}$  М фосфопропанолamina (3). 1 — та же реакция в присутствии  $10^{-3}$  М пирофосфата магния

Рис. 2. Зависимость степени инактивации пирофосфатазы фосфоэтанолamina от количества связанного ингибитора

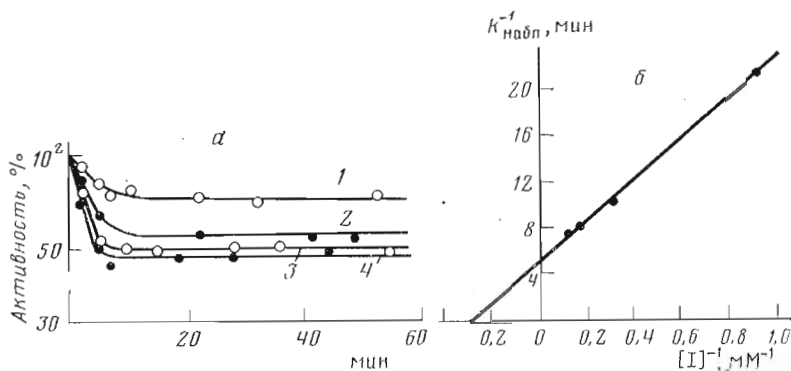


Рис. 3. Инактивация неорганической пирофосфатазы ( $5 \cdot 10^{-8}$  М) метилфосфатом: а — кинетика инактивации в присутствии ингибитора в концентрации 1,1 (1), 3,2 (2), 6,7 (3), 8,4–10,0 мМ (4); б — зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации от концентрации ингибитора в обратных координатах

ком реагента для всех изученных соединений (рис. 2, таблица). Модифицированная фосфоэтанололамином пирофосфатаза, обладающая 60% активности и полностью неактивная, содержит соответственно 2,6 и 5,7 моль реагента. В случае метилфосфата или N-ацетилфосфосерина, вызывающих потерю активности наполовину, максимальное количество присоединенного реагента составляет  $\sim 3$  моль на 1 моль белка. Поскольку молекула пирофосфатазы состоит из шести одинаковых субъединиц, можно думать, что модификации в данном случае подвергаются только три субъединицы. Таким образом, неорганическая пирофосфатаза *E. coli* проявляет в реакции с моноэфирами фосфорной кислоты феномен «реакционной способности половины центров».

Изучение кинетики реакции с ингибиторами, взятыми в различных концентрациях, позволило сделать вывод, что необратимому ингибированию предшествует образование специфического комплекса фермент-реагент. В случае метилфосфата (рис. 3) повышение его концентрации до  $8 \cdot 10^{-3}$  М приводит к увеличению наблюдаемой константы скорости инактивации; при дальнейшем росте концентрации моноэфира наблюдаемая константа скорости инактивации остается постоянной, что свидетельствует о насыщении фермента ингибитором. Из таблицы видно, что наличие аминной или карбоксильной группы в молекуле ингибитора увеличивает их сродство к ферменту, но практически не сказывается на скорости ингибирования.

Связывание моноэфиров фосфорной кислоты, вероятно, осуществляется в активном центре пирофосфатазы из *E. coli*. Это следует из результатов изучения влияния реагентов на кинетические параметры ( $K_{MS}$  и  $V$ ) пирофосфатазной реакции. В качестве примера на рис. 4 представлены полученные зависимости начальной скорости гидролиза пирофосфата магния от концентрации N-ацетилфосфосерина в координатах Лайпшивера—Берка при фиксированной концентрации ионов свободного металла, равной  $10^{-2}$  М. Видно, что в присутствии ингибитора ухудшается связывание субстрата с ферментом, что приводит к увеличению  $K_{MS}$ , в то же время значение максимальной скорости гидролиза не меняется. Следовательно, моноэфиры фосфорной кислоты конкурируют с субстратом за место связывания на ферменте.

Суммируя вышеизложенные результаты, можно сказать, что все изученные моноэфиры фосфорной кислоты являются специфическими ингибиторами неорганической пирофосфатазы *E. coli*. Реакция характеризуется необходимыми чертами аффинной модификации и, по-видимому, специфична к активному центру фермента. Об этом свидетельствуют высокая скорость ингибирования, защитный эффект субстрата, корреляция между глубиной инактивации фермента и количеством связанного реагента, об-

разование специфического комплекса фермент — реагент, конкурентный характер ингибирования.

Как было сказано выше, моноэфиры фосфорной кислоты являются аффинными ингибиторами неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей. Следует отметить большое сходство в реакциях монофосфатов с пирофосфатазами из *E. coli* и дрожжей. В обоих случаях связывание ингибиторов осуществляется за счет фосфатной группы. Наличие аминной или карбоксильной групп в органической части молекулы реагента улучшает его сродство к ферменту, что указывает на образование дополнительных связей между ингибиторами и функциональными группами белка. Необратимое ингибирование пирофосфатаз наступает в результате ковалентной модификации. Важно подчеркнуть, что этот процесс, представляющий собой фосфорилирование фермента малореакционноспособными моноэфирами фосфорной кислоты, протекает в отсутствие внешнего источника энергии. Это позволяет предполагать, что источником энергии, необходимой для ковалентного присоединения аффинных ингибиторов к пирофосфатазам, служит внутримолекулярная активация группы активного центра, подвергающейся модификации. Этот вывод может иметь значение для понимания механизма синтеза в активном центре пирофосфатаз высокоэнергетического пирофосфата из ортофосфата.

Характерная особенность реакций пирофосфатаз из дрожжей и *E. coli* с аффинными ингибиторами — неодинаковое поведение субъединиц. В димерном ферменте из дрожжей модификация метилфосфатом или N-ацетилфосфосерином подвергается одна субъединица, у гексамерного фермента из *E. coli* в реакцию вступают только три субъединицы. По аналогии с дрожжевой пирофосфатазой можно предположить, что причиной этого являются кооперативные взаимодействия субъединиц.

Полученные результаты указывают на похожую организацию областей активного центра неорганических пирофосфатаз из пекарских дрожжей и *E. coli* и близкий механизм их действия.

Таким образом, данные настоящей работы свидетельствуют о возможности использования моноэфиров фосфорной кислоты для выявления общих черт в функционировании неорганических пирофосфатаз.

### Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу ( $M_r$  120 000) выделяли из штамма *E. coli* (MRE-600) по методу Джосса [5]. Удельная активность составила 600 МЕ/мг.

В работе использовали морфолиноэтансульфокислоту (Merck, ФРГ), трис, 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол (аммедииол), пирофосфат натрия, моноциклогексиламмониевую соль метилфосфата — препараты фирмы Sigma (США). Перед употреблением метилфосфат переводили в форму основания, освобождаясь от катиона на дауэксе 50 W. O-Фосфоэтаноламин и сфадекс G-50, тонкий, были получены от фирмы Serva (ФРГ). Для кинетических исследований O-фосфоэтаноламин дополнительно освобождали от следов фосфата пропусканием через колонку с анионообменником дауэкс 2×8, 200—400 меш. O-Фосфосерин получали от фирмы Calbiochem (Швеция), O-фосфопропаноламин и N-ацетилфосфосерин синтезировали как в работах [2,6]. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже ч. д. а. Все растворы готовили на бидистиллированной и деионизованной на приборе Elgastat (Англия) воде.

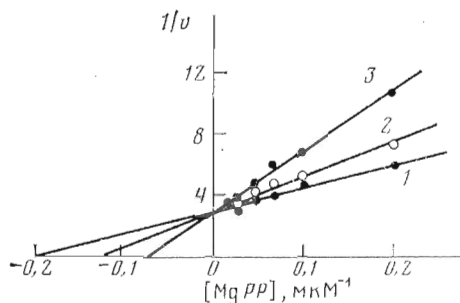


Рис. 4. Гидролиз MgPP пирофосфатазой в отсутствие (1) и в присутствии 0,21 (2) или 0,42 мМ (3) N-ацетилфосфосерина

Ферментативную активность определяли по скорости образования ортофосфата из пиррофосфата магния в 0,060 М трис-НСI-буфере, рН 9,1, содержащем 0,005 М хлорид магния и 0,001 М пиррофосфат натрия, путем непрерывного измерения концентрации фосфата в реакционной среде в ходе гидролиза на полуавтоматическом анализаторе по методу [7].

Количество ингибитора, связанного с пиррофосфатазой, определяли в препаратах пиррофосфатазы (0,5 мг), модифицированной 0,010 М реагентом в 50 мл, 0,025 М морфолиноэтансульфокислота-NaOH-буфере, рН 6,5, в течение 0,5–120 мин при 25° С. Раствор лиофильно высушивали, остаток растворяли в 0,5–1,5 мл воды, избыток ингибитора удаляли гель-фильтрацией на колонке (1×50 см) с сефадексом G-50, уравновешенным тем же буфером. Модифицированный белок затем минерализовали в смеси 60% хлорной и 10 н. серной кислот в течение 30 мин при 190° С и определяли количество неорганического фосфата [8].

Инактивация пиррофосфатазы под действием моноэфиров фосфорной кислоты. Фермент (4–100 мкг) инкубировали в 1–30 мл буферного раствора (рН 6,5–8), содержащего 0,1–20 мМ моноэфир фосфорной кислоты, при 25° С. Через определенные промежутки времени (0–120 мин) отбирали аликвоты для определения активности фермента. В контрольном опыте белок выдерживали в тех же условиях без ингибитора. В отдельных опытах реакцию проводили в присутствии 1 мМ пиррофосфата натрия и 1 мМ хлорида магния. Наблюдаемую константу скорости реакции рассчитывали по формуле

$$k_{\text{набл}} = \frac{0,693}{\tau_{1/2}},$$

где  $\tau_{1/2}$  — полупериод инактивации.

Для определения константы ингибирования ( $K_i$ ) и константы скорости инактивации ( $k_i$ ) строили графики зависимости наблюдаемой константы скорости инактивации от концентрации реагента в обратных координатах и по отрезку, отсекаемому на оси абсцисс, определяли  $K_i$ , а по отрезку, отсекаемому на оси ординат, —  $k_i$ .

Кинетика гидролиза пиррофосфатазой пиррофосфата магния в присутствии моноэфиров фосфорной кислоты прослежена при определении активности фермента по начальной скорости гидролиза пиррофосфата магния и концентрации субстрата 5–50 мкМ при фиксированной концентрации ионов магния, равной  $10^{-2}$  М, в 0,06 М аммедииол-НСI-буфере (рН 9,1; 25° С). Концентрации монофосфатов составляли 0,2–2 мМ. Полученные результаты представляли в координатах Лайнуивера–Берка. Константы ингибирования находили из графиков зависимости  $K_{\text{эф}}$  от концентрации реагента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горшкова И. И., Чимитова Т. А. В сб.: Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1983, с. 64–65.
2. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 943–948.
3. Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 7, с. 984–986.
4. Wong S. C. K., Hall D. C., Gosse J. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 17, p. 4335–4340.
5. Josse J. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 1930–1947.
6. Кузнецов А. В., Аваева С. М., Байков А. А., Склянкина В. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 950–957.
7. Baykov A. A., Awaeva S. M. Eur. J. Biochem., 1973, v. 32, p. 136–142.
8. Hess H. H., Derr J. E. Anal. Biochem., 1975, v. 63, p. 607–613.

Поступила в редакцию  
13.XII.1984

PHOSPHORIC ACID MONOESTERS AS AFFINITY INHIBITORS OF THE *E. COLI*  
INORGANIC PYROPHOSPHATASE

BORSHCHIK I. B., SKLYANKINA V. A., AVAEVA S. M.

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

Phosphoric acid monoesters are effective inhibitors of inorganic pyrophosphatase from *E. coli*. These inhibitors are bound in stoichiometric amounts, correlating with the degree of inactivation. A specific enzyme-reagent complex is formed before the covalent modification takes place. The inhibition is of competitive nature. A substrate prevents pyrophosphatase from reacting with the monoesters. These facts prove that phosphoric acid monoesters are affinity inhibitors of the *E. coli* inorganic pyrophosphatase.