



УДК 577.322.6

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ ^{31}P -ЯМР
АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ЦИТОЗОЛЯ
КУРИНЫХ СЕРДЕЦ*Кортела Т. К., Хиланен Ю. П., Маттинен Ю.,
Механик М. Л.*, Торчинский Ю. М.***Отдел биохимии Университета г. Турку, Финляндия;***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

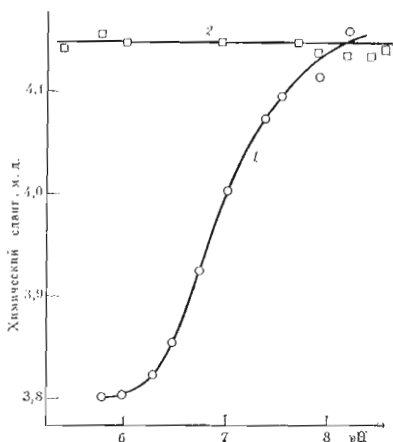
К настоящему времени опубликовано несколько работ, в которых методом ^{31}P -ЯМР изучалось состояние 5'-фосфатной группы пиридоксальфосфата, связанного в активном центре аспартат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1). По данным Мартинец-Кэрриона [1], химический сдвиг ^{31}P цитозольной свиной аспартат-аминотрансферазы не зависит от pH в интервале 5,6–9,2. Иные результаты на том же ферменте получил Шнаккерц [2], который нашел, что химический сдвиг ^{31}P обладает pH-зависимостью с pK 6,2; он объяснил pH-зависимое изменение химического сдвига переходом фосфатной группы кофермента из моноанионной в дианионную форму. При исследовании митохондриального изоэнзима аспартат-аминотрансферазы было показано, что химический сдвиг ^{31}P характеризуется pH-зависимостью с pK 6,3 [3]. В обоих случаях значение pK , найденное по изменению резонанса ^{31}P , совпало с pK диссоциации протона внутреннего альдимида, образуемого пиридоксальфосфатом с ϵ -аминогруппой Lys^{258} . В связи с этим было высказано предположение, что резонанс ^{31}P у данного белка отражает состояние протонирования указанного альдимида [4]. pH-Зависимое изменение химического сдвига составляло в случае цитозольного и митохондриального изоэнзимов соответственно 0,5 и 1,4 м.д.

Противоречивый характер имеющихся в литературе данных и отсутствие их однозначной интерпретации побудили нас исследовать спектры ^{31}P -ЯМР цитозольной куриной аспартат-аминотрансферазы, а также модельного основания Шиффа. Измерения проводили на ЯМР-спектрометре JEOL GX-400 при 161,7 МГц; в спектрах наблюдали один сигнал ^{31}P .

На рисунке представлена кривая pH-зависимости химического сдвига ^{31}P свободной аспартат-аминотрансферазы; видно, что химический сдвиг изменяется на 0,35 м.д. в интервале pH 5,7–8,2. Значение pK , найденное из кривой титрования, составляет 6,85. Это значение существенно отличается от величины pK диссоциации протона внутреннего альдимида, которую мы определили путем спектрофотометрического титрования фермента и нашли равной 6,0–6,3. Для комплекса фермента с аналогом субстрата, сукцинатом, химический сдвиг ^{31}P не зависит от pH в интервале 5,06–8,29 (рисунок).

При титровании трифторуксусной кислотой модельного основания Шиффа, образованного пиридоксальфосфатом с 2-амино-1-бутанолом в метаноле, мы нашли, что переход фосфатной группы из моноанионной в дианионную форму сопровождается изменением химического сдвига ^{31}P на 5,2 м.д. Из работы [5] известно, что изменение химического сдвига ^{31}P при титровании свободного пиридоксальфосфата и его основания Шиффа в водном растворе составляет соответственно 3,8 и 3,12 м.д. Таким образом, изменение химического сдвига при ионизации фосфатной группы пиридоксальфосфата в многократное превышает изменение, обнаруженное при титровании аспартат-аминотрансферазы. На

Влияние pH на химический сдвиг ^{31}P свободной аспартат-аминотрансферазы (1) и ее комплекса с 0,1 М сукцинатом (2). Измерения проведены при 15° С в трис-20 мМ какодилатном буфере, содержавшем 0,1 М KCl и 10% D₂O. Концентрация белка — 0,5 мМ в расчете на субъединицу. Химический сдвиг измеряли по отношению к 85% H₃PO₄



этом основании мы полагаем, что небольшое pH-зависимое изменение химического сдвига ^{31}P фермента обусловлено не ионизацией фосфатной группы кофермента, а скорее конформационным изменением в белке, которое влияет на геометрию связей у атома фосфора. Это изменение не происходит, очевидно, в присутствии аналога субстрата, сукцината, связывание которого стабилизирует конформацию белка.

Из данных о трехмерной структуре аспартат-аминотрансферазы известно, что фосфатная группа кофермента взаимодействует с остатком Arg²⁶⁶ и положительным концом диполя близлежащей α -спирали; кроме того, предполагается наличие нескольких водородных связей между фосфатной группой и соседними полярными группами белка [6]. Указанные взаимодействия должны существенно понижать рК фосфата. Эти данные, а также результаты изучения спектров ^{31}P -ЯМР аспартат-аминотрансферазы позволяют предположить, что фосфатная группа кофермента находится в дианионной форме в исследованном интервале pH; ее ионизация происходит, по-видимому, при pH ниже 5,5–5,0.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Martinez-Carrion M.* // Eur. J. Biochem. 1975. V. 54. № 1. P. 39–43.
2. *Schnackerz K. D.* // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 789. № 2. P. 241–244.
3. *Mattingly M. E., Mattingly J. R., Martinez-Carrion M.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 15. P. 8872–8878.
4. *Sanchez-Ruiz J. M., Martinez-Carrion M.* // Biochemistry. 1986. V. 25. № 10. P. 2915–2920.
5. *Schnackerz K. D.* // Coenzymes and Cofactors. V. 1. Pt. A. Vitamin B₆/Eds Dolphin D. et al. N. Y.: Wiley. 1986. P. 245–264.
6. *Torchinsky Yu. M.* // Coenzymes and Cofactors. V. 1. Pt. B. Vitamin B₆/Eds Dolphin D. et al. N. Y.: Wiley. 1986. P. 169–221.

Поступило в редакцию 6.XI.1986

^{31}P NMR STUDY OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE FROM CHICKEN HEART CYTOSOL

KORPELA T. K., HIMANEN J. P., MATTINEN J., MEKHANIK M. L.*, TORCHINSKY Yu. M.*

Department of Biochemistry, University of Turku, Finland;

**Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

^{31}P NMR spectra of the cytosolic chicken aspartate aminotransferase have been recorded at 161.7 MHz in the pH range of 5.7 to 8.2. The ^{31}P chemical shift was found to be pH-dependent with a pK of 6.85; difference in the chemical shift at pH 5.7 and 8.2 is only 0.35 ppm. The monoanion-dianion transition of 5'-phosphate group of a model Schiff base of pyridoxal phosphate with 2-aminobutanol in methanol is accompanied by a change in ^{31}P chemical shift of 5.2 ppm. It is inferred that the phosphate group of the protein — bound coenzyme is in dianionic form throughout the investigated pH range; the small pH-dependent change of chemical shift may be due to a protein conformational change that affects O—P—O bond angle. In the presence of the 0.1 M succinate, ^{31}P chemical shift of the enzyme remains constant in the pH range of 5.0 to 8.3.