



УДК 577.152.111*49.03

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗБЫТКОМ СУБСТРАТА И КОФЕРМЕНТА

© 1996 г. В. В. Рогожин

Якутская государственная сельскохозяйственная академия,
677018, Якутск, ул. Красильникова, 15*

Поступила в редакцию 12.01.96 г.

Изучена кинетика ферментативного окисления глюкозо-6-фосфата, катализируемого глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой из зерен пшеницы, в области значений pH от 6.0 до 11.0 и в широком интервале концентраций глюкозо-6-фосфата и NADP. Показано, что субстрат в высоких концентрациях (выше 4–6 мМ) активирует фермент при всех изученных значениях pH, тогда как избыток NADP приводит к ингибированию фермента в интервале pH 6.0–9.5. В связывании NADP и глюкозо-6-фосфата в фермент-субстратных комплексах участвуют группы активного центра с рК 7.2, 8.0 и 9.0. Ионизация в активном центре фермента двух групп с рК 8.0 и 9.5 может влиять на его каталитическую активность. Депротонирование группы с рК 9.5 приводит к возрастанию скорости ферментативной реакции, а протонирование этой группы способствует ингибированию фермента NADP в больших концентрациях.

Ключевые слова: глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, глюкозо-6-фосфат, NADP.

Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (G6P-дегидрогеназа, КФ 1.1.1.49) катализирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата (G6P) до 6-фосфоглюконолактона в присутствии NADP и ионов Mg^{2+} . Фермент состоит из четырех субъединиц, однако в разбавленных растворах он диссоциирует до димерных форм, которые сохраняют высокую активность [1, 2]. С использованием 2',3'-дигидрокси-ацетонфосфата (DHAP) показано, что с каждой из субъединиц фермента связывается по одной молекуле oNADP с образованием дигидроморфолинового производного, необратимо ингибирующего G6P-дегидрогеназу [3]. Кроме того, фермент ингибируется хлормеркурибензоатом [4], восстановленным глутатионом [5] и NADPH в низких концентрациях [6].

Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа выделена из различных источников. Активность фермента пресноводного двустворчатого моллюска снижается в ряду тканей: жабры > пищеварительная железа > мышцы > мантия > кишечник. Значения K_m для глюкозо-6-фосфата и NADP составляют 20 и 88 мкМ соответственно. Активность G6P-дегидрогеназы увеличивается линейно при повышении pH среды инкубации от 7.0 до 8.4 [7]. G6P-дегидрогеназа из взрослых особей нематоды *O. volvulus* имеет pH-оптимум в пределах 7.3–7.8 с величина-

ми K_m для глюкозо-6-фосфата и NADP 56.6 и 2.2 мкМ [8].

Механизм реакции, катализируемой в стационарных условиях G6P-дегидрогеназой из эритроцитов человека, включает образование тройного комплекса фермент-NADP-глюкозо-6-фосфат с величинами K_m 11 и 43 мкМ соответственно для NADP и глюкозо-6-фосфата. Ингибирование фермента продуктом реакции (NADPH) конкурентно по отношению к обоим субстратам реакции, тогда как фрагмент NADP – АТР-рибоза оказался ингибитором фермента, конкурентным по отношению к NADP и неконкурентным по отношению к глюкозо-6-фосфату. Глюкозамин-6-фосфат, наоборот, является ингибитором, неконкурентным по отношению к NADP и конкурентным по отношению к глюкозо-6-фосфату. Такие различия в связывании ингибиторов и субстратов могут свидетельствовать о том, что образование тройного фермент-субстратного комплекса происходит либо неупорядоченным путем, либо по механизму Теорелла-Чанса [9].

Целью настоящей работы было изучение стационарной кинетики реакции окисления глюкозо-6-фосфата, катализируемой G6P-дегидрогеназой из зерен пшеницы, в широком интервале концентраций NADP (5 мкМ–6.96 мМ) и глюкозо-6-фосфата (0.4–16 мМ). В процессе работы предполагалось исследовать влияние на активность

* Тел.: 5-84-79, факс: (8-411-22) 6-49-49.

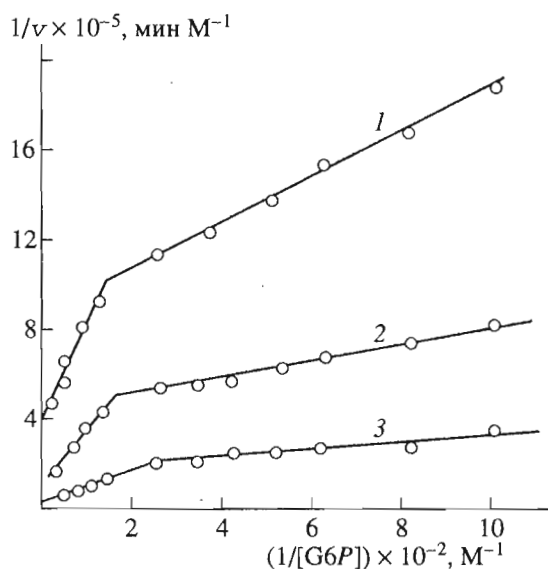


Рис. 1. Зависимость начальной скорости ферментативного окисления глюкозо-6-фосфата от его концентрации в координатах Лайнуивера–Берка. Условия определения: pH 6.0 (1), 7.0 (2), 11.0 (3); концентрация, mM: NADP – 0.2–6.96, G6P – 1.0–16.0, MgCl₂ – 4.0.

фермента высоких концентраций глюкозо-6-фосфата и NADP при различных значениях pH среды. Мы изучали стационарную кинетику реакции окисления глюкозо-6-фосфата при pH 6.0–11.0 с целью получения информации об ионогенных группах белка, влияющих на образование комплекса Михаэлиса с глюкозо-6-фосфатом и NADP, поскольку такие данные в литературе отсутствуют.

В стационарных условиях начальная скорость окисления глюкозо-6-фосфата подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен.

На рис.1 показана зависимость начальной скорости окисления глюкозо-6-фосфата от его концентрации в двойных обратных координатах при pH 6.0, 7.0, 11.0 и при насыщающих концентрациях NADP и Mg²⁺. Аналогичные зависимости были получены и для других значений pH. Характер зависимостей свидетельствует об активации G6P-дегидрогеназы субстратом в высоких концентрациях.

NADP в высоких концентрациях ингибирует реакцию окисления глюкозо-6-фосфата (рис. 2). Эффект ингибирования отмечался при pH 6.0–9.5. Поэтому при всех исследованных значениях pH была найдена насыщающая концентрация NADP, не лежащая в области ингибирования, при которой были изучены зависимости начальной скорости реакции (v_0) от концентрации глюкозо-6-фосфата.

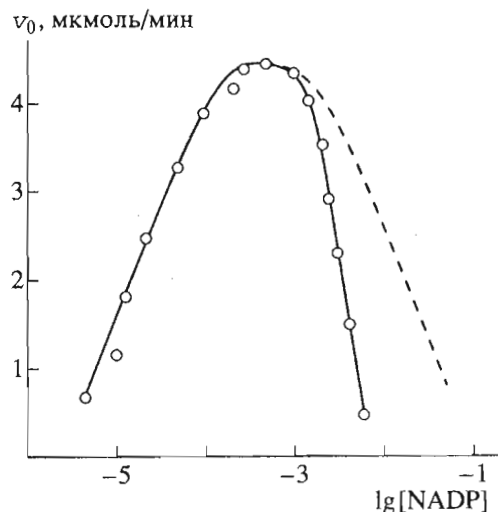


Рис. 2. Ингибирование реакции окисления глюкозо-6-фосфата G6P-дегидрогеназой под действием NADP. Штриховая кривая является теоретической при условии образования неактивного фермент-субстратного комплекса (2NADP–E–G6P). Условия определения: трис-HCl-буфер, pH 9.05; концентрация, mM: NADP – 0.005–6.0; G6P – 4; MgCl₂ – 4.0.

Зависимость v_0 –lg[NADP] имеет вид несимметричного колокола, правая ветвь которого значительно круче левой (рис. 2). Подобная форма кривой может указывать на то, что ингибирование реакции происходит за счет присоединения нескольких молекул NADP к фермент-субстратному комплексу [10]. Связывание дополнительных молекул кофермента фермент-субстратным комплексом происходит независимо.

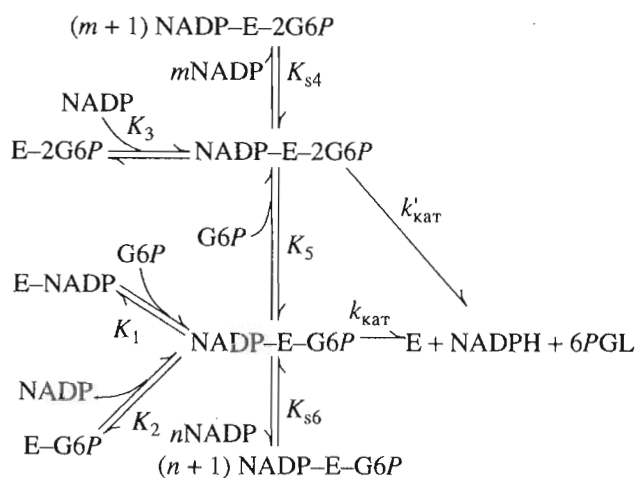
Для расчета констант равновесия (K_s) и определения числа молекул NADP, присоединенных к фермент-субстратному комплексу (n) и комплексу фермента с двумя молекулами глюкозо-6-фосфата (m), был использован предложенный в работе [11] графический способ. При этом экспериментальные данные были представлены в координатах $1/[NADP] + [NADP]^{n(m)}/K_m K_s \div 1/v$ и подбирались значения n (или m), при которых наблюдается линеаризация (рис. 3) [10].

$$\frac{1}{[NADP]} + \frac{[NADP]^{n(m)}}{K_m K_s} = \frac{V_m}{K_m v} - \frac{1}{K_m}$$

Значения кинетических констант для реакции окисления глюкозо-6-фосфата, катализируемой G6P-дегидрогеназой, констант равновесия и число молекул NADP, приводящих фермент в неактивное состояние, при различных значениях pH показаны в таблице.

Для объяснения активации G6P-дегидрогеназы глюкозо-6-фосфатом при pH 6.0–11.0 и ингибирования фермента NADP в высоких концентрациях

при $\text{pH} < 9.5$ мы предложили следующую схему ферментативной реакции:



где 6PGL – 6-фосфоглюконолактон, E-G6P, E-2G6P, E-NADP – двойные, а NADP-E-G6P, NADP-E-2G6P, (n+1)NADP-E-G6P, (m+1) × NADP-E-2G6P – тройные комплексы G6P-дегидрогеназы с NADP и глюкозо-6-фосфатом, $k_{\text{кат}}$, $k'_{\text{кат}}$ – каталитические константы ($k'_{\text{кат}} = \alpha k_{\text{кат}}$), K_1, K_2, K_3, K_5 – константы диссоциации соответствующих комплексов фермента с субстратом и коферментом, K_{s4}, K_{s6} – константы равновесия.

Схема предполагает, что реакция окисления глюкозо-6-фосфата, катализируемая G6P-дегидрогеназой, может осуществляться только в случае, если в активном центре фермента связываются одна молекула NADP и одна или две молекулы глюкозо-6-фосфата. При связывании двух молекул субстрата наблюдается активирование фермента ($\alpha > 1$). Связывание двух и более молекул NADP ингибирует G6P-дегидрогеназу. Эффекта ингибирования не наблюдается при $\text{pH} > 9.5$.

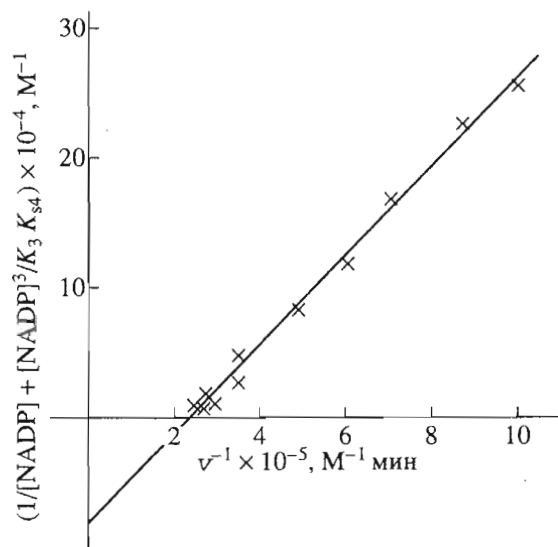


Рис. 3. Линеаризация экспериментальных данных по кинетике окисления глюкозо-6-фосфата, катализируемого G6P-дегидрогеназой, в условиях ингибирования ферментативной реакции NADP с образованием неактивного комплекса [(m+1)NADP-E-2G6P]. Условия определения: 0.1 М трис-НСl-буферный раствор, pH 8.5; концентрация, мМ: NADP – 0.02–6.96; G6P – 8; MgCl₂ – 4.

Как видно из таблицы, связывание NADP и субстрата в комплексах с ферментом зависит от pH, причем образование тройных комплексов определяется тем, субстрат или кофермент G6P-дегидрогеназы предварительно был связан с ферментом. Если с ферментом связаны две, а не одна молекула субстрата (E-2G6P), то последующее связывание NADP улучшается. Количество связавшихся молекул NADP зависит от pH и количества молекул глюкозо-6-фосфата в тройном фермент-субстратном комплексе. С комплексами

Величины констант (мкМ) для реакции окисления глюкозо-6-фосфата, катализируемой G6P-дегидрогеназой

pH	K_1	K_2	K_3	K_{s4}	K_5	K_{s6}	V_m , нмоль/(мин мг белка)	α	m	n
6.00	1200	24.8	9.3	5370.0	13100	302	2.07	2.0	1	1
7.00	680	17.3	6.1	7.0	3350	1360	2.64	1.3	2	1
7.47	760	15.0	7.6	6.1	3200	250	2.77	1.25	2	1
8.00	660	24.0	6.8	6.0	4060	0.0060	3.55	1.25	2	3
8.50	410	8.8	13.0	0.02	2540	0.0141	3.77	1.2	3	3
9.05	310	21.1	15.6	0.03	750	0.027	3.72	1.20	3	3
9.49	450	35.0	18.0	16.5	1100	0.0007	3.52	1.25	2	4
9.73	530	56.2	65.6		1500		5.01	1.5		
10.50	810	110.6	89.0		3240		8.25	2.6		
11.00	1100	7340	220.0		13500		10.34	5.7		

* Все кинетические измерения проводились с точностью $\pm 10\%$.

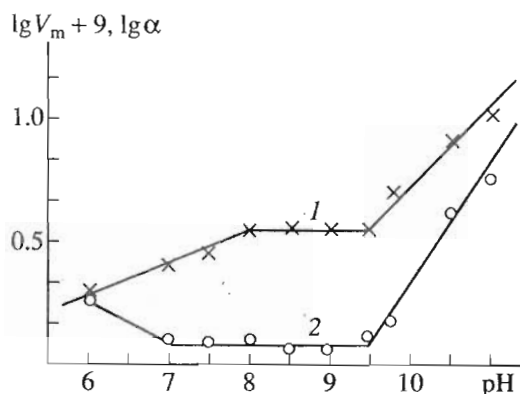


Рис. 4. pH-Зависимость величины $\lg V_m$ (1) и $\lg \alpha$ (2) при окислении глюкозо-6-фосфата в комплексах NADP-E-G6P и NADP-E-2G6P.

NADP-E-G6P и NADP-E-2G6P в физиологической области pH могут связываться 1–2 молекулы NADP. При $\text{pH} > 7.5$ ингибирующий эффект вызывается 3–4 молекулами NADP.

Значения констант диссоциации комплекса NADP-E-2G6P в 2.5–13 раз выше, чем комплекса NADP-E-G6P. Таким образом, глюкозо-6-фосфат только в высоких концентрациях может вызывать активацию G6P-дегидрогеназы.

Из полученных данных следует, что в связывании NADP с комплексами E-G6P и E-2G6P участвует ионогенная группа фермента с рК 8.2–8.5, депротонирование которой ухудшает сродство кофермента к субстрат-ферментному комплексу. Связывание NADP с тройными комплексами NADP-E-G6P и NADP-E-2G6P обусловлено ионизацией групп с рК 7.2, 8.0 и 9.0. Группы с аналогичными рК принимают участие и в связывании глюкозо-6-фосфата с комплексами E-NADP и NADP-E-G6P.

Степень активации G6P-дегидрогеназы характеризуется величиной α (таблица), изменение которой связано с депротонированием группы активного центра фермента с рК 9.5 (рис. 4). По-видимому, эта группа играет важную роль в каталитическом процессе. Как видно из рис. 4, ионизация в активном центре фермента двух групп с рК 8.0 и 9.5 может влиять на каталитическую активность G6P-дегидрогеназы. Одна из них, возможно, принадлежит тиольной группе цистеина, а другая – ϵ -аминогруппе лизина [12]. Депротонирование группы с рК 9.5 приводит к возрастанию скорости ферментативной реакции. По-видимому, данная функциональная группа принимает активное участие в катализе. Протонирование этой группы может не только понизить активность фермента, но и создать условия для ингибирования фермента большими концентрациями NADP.

В заключение следует отметить, что в функционировании G6P-дегидрогеназы заложен сложный регуляторный механизм, который осуществляется за счет влияния глюкозо-6-фосфата, NADP и pH на процесс превращения субстрата в тройном фермент-субстратном комплексе. Высокие концентрации глюкозо-6-фосфата активируют фермент, а избыток NADP приводит к его ингибированию. В связывании и превращении субстрата и кофермента принимают участие четыре функциональные группы с рК 7.0, 8.0, 9.0 и 9.5. Из этих групп важнейшее значение имеет группа с рК 9.5, протонирование которой может понизить каталитическую активность, уменьшить активацию фермента избытком субстрата и вызвать ингибирование G6P-дегидрогеназы большими концентрациями NADP. По-видимому, данный регуляторный механизм способствует выполнению важной функциональной роли фермента в обеспечении состояния гипоблиоза семян пшеницы и при их прорастании. Выход семян из состояния покоя сопровождается активизацией процессов гидролиза крахмала, в результате чего образуется большое количество глюкозо-6-фосфата, который, активируя G6P-дегидрогеназу, ускоряет протекание в прорастающих зернах пентозофосфатного цикла превращения углеводов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реагенты: 6-фосфоглюконат (Sigma, США), глюкозо-6-фосфат, NADP (Reanal, Венгрия). Соли для приготовления буферных растворов дважды кристаллизовали из бидистиллированной воды.

G6P-дегидрогеназу выделяли из зерен пшеницы Якутянка 224, как описано в работе [13]. Предварительно зерна гомогенизировали на механической мельнице, добавляли 0.05 М глицин из расчета 2 мл раствора на 1 г зерен. Для удаления не полностью разрушенных клеток гомогенат центрифугировали 10 мин при 7000g. Полученный супернатант пропускали через колонку (2 × 50 см) с сефадексом G-100, уравниваемым 0.05 М глицином. Элюирование проводили тем же раствором. Фракции с наибольшей активностью использовали в работе. Активности дегидрогеназы 6-фосфогликоновой кислоты в этих фракциях не обнаружено. Белок определяли по методу Лоури [14].

Активность G6P-дегидрогеназы определяли при 23°C с помощью регистрирующего спектрофотометра DMS 100 S (Varian) по увеличению оптического поглощения при 340 нм за счет накопления NADPH в процессе окисления глюкозо-6-фосфата [15]. В типичном эксперименте в кювету (1 см) вносили 2.2 мл буферного раствора с соответствующим значением pH, 0.1 М MgCl_2 , 5–8000 мкМ NADP, 0.4–40 мМ глюкозо-6-фосфат

(все по 0.1 мл). Реакцию начинали введением 0.1 мл раствора фермента.

В работе использованы 0.1 М буферные растворы: натрий-ацетатный (рН 6.0), трис-НСl (рН 7.0–9.05), глицин-NaOH (рН 9.05–11.0). Расчет каталитических констант производили на компьютере IBM PC\DX 386, используя прикладные программы.

Активность дегидрогеназы 6-фосфоглюконовой кислоты определяли по методике [15]. В кювету вносили 2.2 мл 0.01 М трис-НСl-буфера (рН 7.6), 0.1 М MgCl₂, 0.025 М NADP, 0.05 М 6-фосфоглюконат (все по 0.1 мл). Реакцию начинали введением 0.1 мл тестируемого раствора.

Автор благодарит академика АН РС(Я) Б.М. Кершенгольца за участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nevulidine B.H., Levy H.R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1965. V. 21. P. 28–35.
2. Yoshida A. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. P. 4966–4972.
3. White B.J., Levy H.R. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 1223–1229.
4. Matsuoka N. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1991. V. 98. P. 539–542.
5. Khan A.A., Sohuler M.M., Coppock R.W. // *J. Toxicol. Environ. Health.* 1987. V. 22. P. 481–490.
6. Llobell A., Lopex-Ruiz A., Peinado J., Lopez-Barea J. // *Biochem. J.* 1988. V. 249. P. 293–296.
7. Hartley D.M. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1987. V. 88. P. 471–474.
8. Titanji V.P.K., Mufuh J.-P., Tohoupe J.-R. // *Parasitol. Res.* 1988. V. 74. P. 380–382.
9. Birke S., Kim H.W., Periclou A., Schorsch B., Grouse D., Craney C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. V. 999. P. 243–247.
10. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Гл. 6. М.: МГУ, 1976.
11. Бресткин А.П., Новикова Н.В., Прокофьева Е.Г., Ржевина Н.И. // *Биохимия.* 1961. Т. 26. С. 266–271.
12. Camardella L., Caruco C., Rutigiano B., Romano M., Di Priso G., Descalzi-Cancedda F. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 171. P. 485–489.
13. Рогожин В.В., Говорова Т.П. // Этанол и его метаболизм в высших организмах / Ред. В.Г. Алексеев. Якутск: ЯНЦ СО АН СССР, 1990. С. 14–19.
14. Loury O.H., Rosebrough N.L., Farr A.L., Randall R.L. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
15. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Ред. М.И. Прохорова. Л.: ЛГУ, 1982. С. 168–171.

Possible Mechanisms of the Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Regulation by the Excesses of Substrate and Coenzyme

V. V. Rogozhin

Yakutiya State Agricultural Academy, ul. Krasil'nikova 15, Yakutsk, Republic Sakha, 677018 Russia

Abstract—The kinetics of glucose 6-phosphate oxidation by glucose 6-phosphate dehydrogenase from wheat seeds was studied at pH 6–11 within a broad interval of the glucose 6-phosphate and NADH concentrations. A high substrate concentration (over 4–6 mM) activated the enzyme within the pH range studied; the excess of NADH inhibited glucose 6-phosphate dehydrogenase at pH 6.0–9.5. The enzyme's active site groups with pK of 7.2, 8.0, and 9.0 were shown to be involved in the substrate binding in the enzyme–substrate complexes. The ionization of the groups with pK 8.0 and 9.5 appeared to affect the catalytic activity of the enzyme. The deprotonation of the group with pK 9.5 increased the reaction rate, whereas its protonation favored enzyme inhibition by high NADH concentrations.

Key words: glucose 6-phosphate dehydrogenase, glucose 6-phosphate, NADP.