



УДК 581.132 + 577.151

**КВЕРЦЕТИН — АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ
СОПРЯГАЮЩЕГО ФАКТОРА ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ, CF_1** *Мальян А. И., Акулова Е. А., Музафаров Е. И.**Институт фотосинтеза Академии наук СССР, Пущино*

Исследовано влияние кверцетина (Кв) на АТР-азную и АТР-синтетазную активность сопрягающего фактора фотофосфорилирования, CF_1 . Показано, что в реакционной среде, содержащей ионы двухвалентных металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+}), Кв существует в двух формах: свободной и связанной в комплекс с металлом ($Me \cdot Kв$). Свободный Кв снимает ингибирование АТР-азной реакции АДФ и подавляет реакцию фотофосфорилирования. Комплекс $Me \cdot Kв$ сильно ингибирует гидролиз АТР и менее значительно подавляет его синтез. На основе полученных данных предполагается, что влияние Кв на АТР-азную и АТР-синтетазную активность CF_1 имеет аллостерическую природу.

Сообщалось, что кверцетин (Кв) — вещество фенольной природы, относящееся к группе флавонолов, подавляет фотофосфорилирование по типу ингибиторов переноса энергии [1,2]. Это позволило предположить, что действие Кв направлено непосредственно на фермент, осуществляющий синтез АТР, — сопрягающий фактор, CF_1 . В связи с этим представлялось целесообразным исследовать влияние Кв на АТР-азные свойства CF_1 . Известно, что кинетические закономерности реакции гидролиза АТР зависят от присутствующего в среде иона — акцептора Mg^{2+} или Ca^{2+} [3]. В литературе имеется сообщение о том, что кемпферол (вещество, родственное кверцетину) при некоторых концентрациях стимулирует Ca^{2+} -зависимую, активируемую трипсином АТР-азу и ингибирует Mg^{2+} -зависимую, светоактивируемую АТР-азу хлоропластов [4].

Как видно из рис. 1, при 1 мМ концентрации $MgCl_2$ увеличение содержания Кв до $3 \cdot 10^{-5}$ М приводит к значительной стимуляции АТР-азной реакции. При дальнейшем увеличении концентрации Кв скорость реакции снижается. Практически полное ингибирование наблюдается при концентрации Кв $\sim 2,5 \cdot 10^{-4}$ М. Ингибирующий эффект возрастает при повышении концентрации $MgCl_2$ в реакционной среде до 5 мМ. В этих условиях 100% ингибирование достигается уже при концентрации Кв $1 \cdot 10^{-4}$ М.

В присутствии ионов Ca^{2+} стимулирующее влияние Кв выражено значительно слабее и заметно сильнее проявляется его ингибирующий эффект (рис. 2). Концентрация Кв, вызывающая 50% ингибирование в присутствии ионов Ca^{2+} , равна $2,5 \cdot 10^{-5}$ М, тогда как в присутствии Mg^{2+} — $4,2 \cdot 10^{-5}$ М.

Из приведенных данных следует, что влияние Кв зависит от содержания ионов металла в реакционной среде. Известно, что Кв может образовывать с металлами комплексы [5]. При этом происходит перераспределение электронной плотности в структуре Кв, которое сопровождается изменениями в спектре его поглощения. Оценка способности Кв к образованию

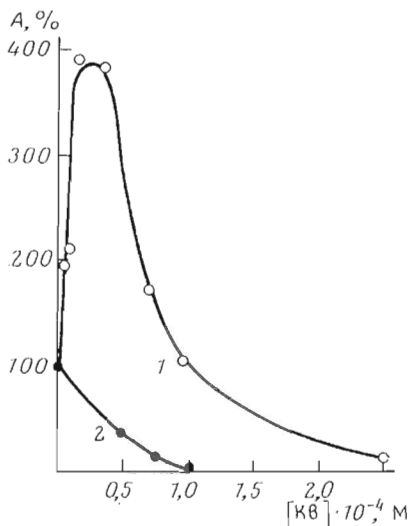


Рис. 1

Рис. 1. Влияние кверцетина на АТФ-азную активность CF_1 (14,6 мкг/мл) в присутствии 1 (1) и 5 мМ (2) $MgCl_2$. Концентрация АТФ — 5 мМ. 100% активности соответствует 0,258 (1), 0,12 (2) мкмоль P_i /мг белка/мин

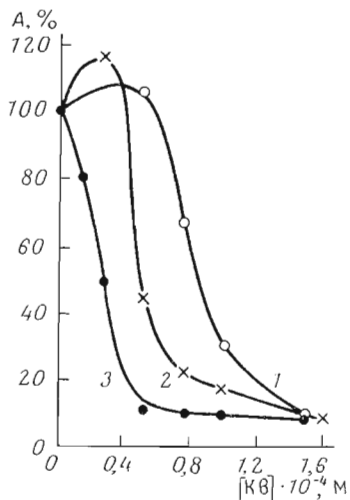


Рис. 2

Рис. 2. Влияние кверцетина на АТФ-азную активность CF_1 (3—15 мкг/мл) в присутствии Ca^{2+} . Состав реакционной смеси (мМ): АТФ — 5, $CaCl_2$ — 1 (1), 3 (2), 10 (3). 100% активности соответствует 0,24 (1), 1,2 (2), 2 (3) мкмоль P_i /мг белка/мин

комплексов с Mg^{2+} , выполненная нами по сдвигу длинноволнового максимума в спектре поглощения $Kв$ (λ 385 нм), дает значение константы устойчивости комплекса $Mg \cdot Kв$ ($K_{Mg \cdot Kв}$), равное $160 M^{-1}$ (см. «Экспериментальную часть»).

Учитывая сравнительно небольшую величину $K_{Mg \cdot Kв}$, следует ожидать, что концентрация комплекса $Mg \cdot Kв$ будет практически полностью определяться концентрацией свободного Mg^{2+} , которая, в свою очередь, зависит от соотношения АТФ — Mg . При избытке АТФ почти весь Mg будет связан в весьма прочный комплекс $Mg \cdot АТФ$, $K_{Mg \cdot АТФ} \geq 10\ 000$ [6], а $Kв$ будет находиться в свободном виде. Пользуясь указанными значениями констант устойчивости, можно рассчитать, что при концентрации Mg , АТФ и $Kв$ 1, 5 и 0,03 мМ соответственно доля комплекса $Mg \cdot Kв$ составит менее 0,3% общего содержания $Kв$. При увеличении содержания Mg до 5 мМ доля комплекса $Mg \cdot Kв$ возрастает до 11% и соответственно резко усиливается ингибирующий эффект $Kв$. Эти результаты дают основание считать, что комплекс $Mg \cdot Kв$ обладает ингибирующим, а свободный $Kв$ — стимулирующим действием на реакцию гидролиза АТФ. Очевидно, аналогичные рассуждения применимы для объяснения влияния $Kв$ на АТФ-азную активность в присутствии ионов Ca^{2+} . Однако в этом случае необходимо учесть меньшую устойчивость комплекса $Ca \cdot АТФ$ ($K_{Ca \cdot АТФ} \geq 2000$ [6]), что обуславливает более высокое содержание в реакционной среде свободного Ca^{2+} и, следовательно, комплекса $Ca \cdot Kв$. Этим, по-видимому, объясняется более сильный ингибирующий эффект $Kв$ в присутствии Ca^{2+} при высоких значениях АТФ/ Me (рис. 1 и 2, табл. 1). При избытке Me^{2+} , в полном согласии с выдвинутым выше предположением, различия в ингибирующем действии $Kв$ в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} не наблюдается (табл. 1).

С целью выяснения механизма ингибирующего действия $Kв$ на АТФ-азную активность мы исследовали зависимость эффективности ингибиро-

Таблица 1

Влияние кверцетина ($5 \cdot 10^{-2}$ мМ) на гидролиз АТФ при различных соотношениях АТФ — Мс
 100% соответствует скорости реакции в мкмоль/мг белка/мин: в присутствии Mg^{2+} (1 мМ) — 0,26, (5 мМ) — 0,125, (7,5 мМ) — 0,120; в присутствии Ca^{2+} (1 мМ) — 0,24, (5 мМ) — 2,2, (7,5 мМ) — 2,0

АТФ — Мс ²⁺	Относительная скорость гидролиза АТФ, %	
	Mg ²⁺	Ca ²⁺
5,0	354	107
1,0	41	26
0,67	16	17

Таблица 2

Зависимость ингибирования гидролиза АТФ комплексом Са-Кв от концентрации АТФ

Концентрация АТФ, мМ	Скорость реакции, мкмоль/мг белка/мин		Степень ингибирования, %
	без Кв	$7,2 \cdot 10^{-3}$ мМ Кв	
0,5	0,56	—	—
1,0	0,75	0,27	65
2,0	1,05	0,47	55
3,0	1,09	0,84	23
4,0	1,23	1,10	11
5,0	—	1,51	—

вания от концентрации субстрата в присутствии избытка ионов Ca^{2+} . При увеличении концентрации АТФ степень ингибирования реакции Са-Кв снижается, что говорит в пользу конкурентного механизма ингибирования (табл. 2).

Из табл. 1, а также рис. 2 следует, что степень стимуляции АТФ-азной активности фермента в присутствии Mg^{2+} и Ca^{2+} существенно различается. Максимальная стимуляция в присутствии Mg^{2+} составляет ~290%, тогда как в присутствии Ca^{2+} — лишь 17% (рис. 1, 2). По-видимому, эти различия могут быть лишь частично объяснены более сильным ингибирующим действием Кв на Са-зависимую активность фермента. В значительной степени они обусловлены спецификой поведения исследуемой системы в присутствии ионов Mg^{2+} .

Известно, что при переходе от Са- к Mg-зависимому гидролизу АТФ значительно возрастает ингибирование реакции АДФ [7]. Поэтому интересно было исследовать влияние Кв при различных концентрациях АДФ в реакционной среде. Как видно из табл. 3, в отсутствие Кв увеличение содержания АДФ примерно в 1,5 раза приводит к снижению скорости гидролиза АТФ Mg-зависимой АТФ-азой на 38%. Включение Кв в реакционную среду стимулирует гидролиз АТФ тем больше, чем выше концентрация АДФ. При этом скорость реакции во всем интервале варьируемых концентраций АДФ остается практически постоянной. Таким образом, стимулирующее влияние Кв на АТФ-азную активность CF_1 , по-видимому, обусловлено уменьшением ингибирования реакции аденозиндифосфатом. В тех условиях, когда степень ингибирования невелика (при малых концентрациях АДФ либо в присутствии ионов Ca^{2+}), стимулирующее влияние Кв незначительно.

Влияние ADP на стимуляцию кверцетином АТР-азной активности CF_1

Са-зависимая АТР-аза		Mg-зависимая АТР-аза				Стимуляция гидролиза АТР, %
без Кв		без Кв		2,5 · 10 ⁻² мМ Кв		
а	б	а	б	а	б	
0,090	0,684	0,105	0,263	0,109	0,300	14
0,123	0,636	0,127	0,219	—	—	—
0,137	0,618	0,138	0,175	0,146	0,289	65
—	—	0,154	0,164	0,180	0,298	82
—	—	—	—	0,240	0,334	>105

Примечание. Стимуляция Са-зависимой АТР-азной активности слабо зависела от концентрации ADP и составляла 10—15%. а — концентрация ADP, мМ. б — скорость, мкмоль/мг белка/мин.

Приведенные выше данные позволяют предполагать, что механизмы влияния свободного Кв и его комплексов с металлами на АТР-азную активность CF_1 существенно различаются. Ускорение реакции гидролиза АТР свободным Кв, по-видимому, исключает возможность конкуренции между Кв и аденозиндифосфатом. Вероятнее предположить, что снижение торможения реакции ADP обусловлено аллостерическим влиянием Кв на активность фермента. Присоединение Mg^{2+} к Кв изменяет характер взаимодействия между ферментом и Кв, придавая последнему ингибирующие свойства. Кантлей и Хаммес с помощью дифференциальной спектроскопии оценили прочность такого взаимодействия [8]. Они показали, что минимум спектральной кривой приходится на 410 нм при максимуме поглощения свободного Кв 385 нм. Согласно нашим данным, при связывании Кв с ионами Me^{2+} наблюдается длинноволновый сдвиг максимума поглощения Кв до 410 нм. Учитывая, что приведенные в работе [8] измерения дифференциального спектра CF_1 и Кв проводились при избытке $CaCl_2$ (5 мМ), минимум спектральной кривой, по-видимому, следует отнести за счет взаимодействия с ферментом комплекса Са·Кв. Этот же комплекс, вероятно, ответствен за ингибирование препарата CF_1 , лишённого минорных субъединиц [9], — факт, указывающий на то, что действие Са·Кв локализовано в пределах α -, β -субъединиц фермента. В литературе, однако, отсутствуют данные о взаимодействии свободной формы Кв с CF_1 .

Представляет большой интерес вопрос: каким образом свободный и связанный с Mg^{2+} Кв влияет на реакцию фотофосфорилирования, рассматриваемую как обращение реакции гидролиза АТР? Можно ожидать, что свободный Кв будет тормозить реакцию, ослабляя взаимодействие ADP с ферментом на стадии образования или превращения фермент-субстратного комплекса. На рис. 3 представлена зависимость обратной скорости реакции от обратной концентрации ADP, полученная при большом избытке P_i и Mg (при соотношении ADP : P_i : $MgCl_2$, равном 1 : 5 : 5). Наблюдаемое в присутствии Кв уменьшение эффективной константы Михаэлиса свидетельствует о том, что его ингибирующий эффект не связан со снижением сродства ADP к ферменту. Увеличение концентрации Кв вызывает незначительное возрастание наклона прямых, описывающих зависимость обратной скорости реакции синтеза АТР хлоропластами от обратной концентрации ADP. Это позволяет предположить, что эффект Кв может быть в значительной мере обусловлен бесконкурентным ингибированием, возникающим при взаимодействии ингибитора с фермент-субстратным комплексом [10]. Нужно также отметить, что в реакции синтеза АТР в отличие от реакции гидролиза степень ингибирования слабо зависит от концентрации Mg^{2+} (и соответственно $Mg \cdot Kв$) (рис. 4).

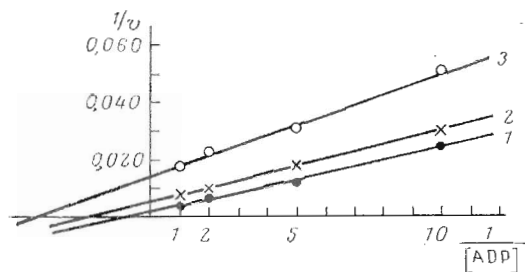


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость обратной скорости фотофосфорилирования от обратной концентрации ADP (мМ^{-1}) в отсутствие (1) и в присутствии $2,5 \cdot 10^{-6}$ (2) и $5 \cdot 10^{-6}$ М Кв (3)

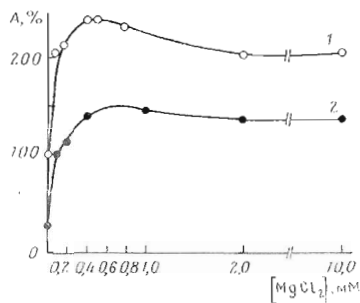


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость скорости фотофосфорилирования от концентрации MgCl_2 в отсутствие Кв (1) и в присутствии $2,5 \cdot 10^{-6}$ М Кв (2). 100% активности соответствует 365 мкмоль АТР/мг хл/ч

Таким образом, имеют место существенные различия в поведении свободного Кв и его комплекса с Me^{2+} по отношению к обоим реакциям. $\text{Mg} \cdot \text{Kv}$ сильно ингибирует АТР-азную активность фермента и значительно слабее подавляет его АТР-синтетазную активность. Свободный Кв, наоборот, энергично ингибирует фотофосфорилирование и стимулирует гидролиз АТР сопрягающим фактором, CF_1 . Механизм влияния свободного Кв имеет, по-видимому, аллостерический характер и связан с ингибированием стадии превращения фермент-субстратного комплекса.

В отношении механизма торможения гидролиза АТР $\text{Ca} \cdot \text{Kv}$ имеются противоречивые данные. Согласно [8], $\text{Ca} \cdot \text{Kv}$ взаимодействует с некаталитическими центрами и его действие, следовательно, имеет регуляторную природу. С другой стороны, наблюдаемое нами при увеличении концентрации АТР снижение ингибирования гидролиза АТР комплексом $\text{Ca} \cdot \text{Kv}$ указывает на возможность конкурентного механизма.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу предположения, впервые высказанного Лангом и Рэкером [11], о некоторой аналогии действия Кв и природного ингибитора АТР-азы. Дальнейшие исследования взаимодействия CF_1 с Кв, рассматриваемым как модель природного ингибитора, вероятно, смогут дать ценную информацию о механизме действия Кв в процессе фотофосфорилирования.

Экспериментальная часть

Хлоропласты выделяли из 12—14-суточных проростков гороха *Pisum sativum*, сорт Неистощимый, по методике, описанной в [12]. Фотофосфорилирование определяли биOLUMИнесцентным методом [13]. Использовали смешанный тип фотофосфорилирования с феназинметасульфатом, но без внесения диурона. Реакционная смесь в 2 мл содержала: 0,05 М Трис-НСI-буфер (рН 7,8), 0,05 М КСI, 0,5 мМ АDР, 5 мМ P_i и 5,0 мкМ феназинметасульфат. Освещение осуществлялось диапроекторной лампой мощностью 400 Вт через конденсор, водный экран и светофильтр КС-13 ($\lambda > 600 \text{ нм}$). Интенсивность освещения $\sim 80 \text{ кэрг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Реакцию гидролиза АТР (5 мМ) проводили при 37° в 0,5 мл 40 мМ Трис-НСI, рН 8,0. При изучении влияния АТР на ингибирование реакции комплексом $\text{Ca} \cdot \text{Kv}$ концентрация CaCl_2 составляла 10 мМ (табл. 2).

При изучении влияния АDР на стимуляцию реакции кверцетином (табл. 3) изменение содержания АDР в среде достигалось регулированием степени превращения АТР (изменением концентрации CF_1 от 1 до 8 мкг/мл). Такая постановка опытов позволила исключить погрешности,

Расчет K комплекса $Mg \cdot Kв$

Концентрация $MgCl_2$, мм	Сдвиг максимума $\delta \cdot 10^{-3}$, см $^{-1}$	K , M^{-1}
1,51	0,49	150
2,70	0,80	170
3,86	1,01	—

Примечание. В расчетах использовали усредненное значение $K=160 M^{-1}$.

связанные с гидролизом АДФ и его загрязнением неорганическим фосфатом. В реакции использовали препарат CF_1 , полученный по методике, описанной в работах [14, 15], без предварительной активации теплом или трипсином. Активность фермента (A) выражали в мкмоль P_i , получающегося при гидролизе АТР 1 мкг фермента за 1 мин. Продолжительность инкубации составляла 1 ч. Реакцию останавливали трихлоруксусной кислотой и определяли выделившийся P_i по методике Лоури и Лопеса в модификации Скулачева [16].

Определение константы устойчивости (K) комплекса $Mg \cdot Kв$ проводили спектрофотометрическим методом [17], используя изменение спектра $Kв$ (длинноволновый сдвиг максимума λ 385 нм) при образовании комплекса $Mg \cdot Kв$, что позволило упростить процедуру определения. Вывод формулы для расчета K представлен ниже.

Обозначим сдвиг максимума поглощения $Kв$ при полном превращении $Kв$ в комплекс $Mg \cdot Kв$ через δ_0 . При частичном превращении $Kв$ в $Mg \cdot Kв$ максимум поглощения сдвигается на δ_1 . Доля комплекса $Mg \cdot Kв$ пропорциональна δ_1/δ_0 , а доля свободного $Kв$ — $1 - \delta_1/\delta_0$. Константа устойчивости комплекса $Mg \cdot Kв$ определится уравнением

$$K = \frac{[Mg \cdot Kв]}{[Mg_1^{2+}][Kв_1^{2-}]} = \frac{\frac{\delta_1}{\delta_0} [Kв_0]}{[Mg_1^{2+}] \left(1 - \frac{\delta_1}{\delta_0}\right) [Kв_0]}, \quad (1)$$

где $[Kв_0]$ — общая концентрация $Kв$.

Для другой концентрации Mg_2^{2+} это уравнение примет вид

$$K = \frac{\frac{\delta_2}{\delta_0} [Kв_0]}{[Mg_2^{2+}] \left(1 - \frac{\delta_2}{\delta_0}\right) [Kв_0]}.$$

Приравнявая оба уравнения и решая их относительно δ_0 , получим (при постоянном значении $Kв_0$)

$$\delta_0 = \frac{\delta_1 \delta_2 ([Mg_1^{2+}] - [Mg_2^{2+}])}{[Mg_1^{2+}] \delta_2 - [Mg_2^{2+}] \delta_1}. \quad (2)$$

При большом избытке магния $[Mg^{2+}] \simeq [MgCl_2]$, что дает возможность определить по уравнению (2) δ_0 и вычислить K . Данные расчета представлены в табл. 4. Определение δ и K проводили при 25°, в 0,01 М Трис-НСИ (рН 8,0), при концентрации $Kв$ $2 \cdot 10^{-5}$ М, $MgCl_2$ 1,5—3,86 мм, с 0,2 мг/мл боргидрида натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arntzen C. J., Falkenthal S. V., Bobick S. (1974) *Plant Physiol.*, 53, 304—306.
2. Gromet-Elhanan Z. (1968) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 123, 447—456.
3. Мальян А. Н., Сарапча Ю. С., Макаров А. Д. (1974) *Биохимия*, 39, 1062—1067.
4. Schneider V. (1974) *Z. Pflanzenphysiol.*, 72, 36—51.
5. Зейкель М. К. (1968) в кн. *Биохимия фенольных соединений* (Харборн Дж., ред.), с. 36, «Мир», М.
6. Опанасенко В. К., Мальян А. Н., Макаров А. Д. (1974) *Итоги исследования механизма фотосинтеза* (Евстигнеев В. Б., ред.), с. 104—105, Пушчино.
7. Nelson N., Nelson H., Racker E. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6506—6510.
8. Cantley L. C., Hammes G. G. (1976) *Biochemistry*, 15, 1—8.
9. Deters D. W., Racker E., Nelson N., Nelson H. (1975) *J. Biol. Chem.*, 50, 1041—1047.
10. Уэстли Дж. (1972) *Ферментативный катализ*, с. 74—80, «Мир», М.
11. Lang D. R., Racker E. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, 333, 180—186.
12. Акулова Е. А., Музафаров Е. Н., Иванов Б. Н., Рузиева Р. Х., Шмелсва В. Л. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 677—683.
13. Акулова Е. А., Мурзаева С. В. (1973) *Биохимия*, 38, 901—905.
14. Vambutas V. K., Racker E. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 2660—2667.
15. Bennun A., Racker E. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 1325—1331.
16. Никулина Г. Н. (1965) *Обзор методов колориметрического определения фосфата по образованию «молибденовой сини»* (Семихатова О. А., Заленский О. В., ред.), с. 33—35, «Наука», М. — Л.
17. Россотти Ф., Россотти Х. (1965) *Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворах* (Рябчиков Д. И., ред.), с. 324—343, «Мир», М.

Поступила в редакцию
8.VI.1976

После доработки
15.XI.1976

QUERCETIN—AN ALLOSTERIC REGULATOR OF ACTIVITY OF THE PHOSPHORYLATION COUPLING FACTOR CF₁

MAL'YAN A. N., AKULOVA E. A., MUZAFAROV E. N.

*Institute of Photosynthesis, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

The effect of quercetin (Qu) on ATPase and phosphorylation activity of chloroplast coupling factor CF₁ was studied. In the reaction mixture containing divalent ions, Qu exists in free and metal bound forms (Me·Qu). Free Qu abolishes the inhibition of ATPase reaction by ADP and suppresses photophosphorylation. Me·Qu complex strongly inhibits ATP hydrolysis and has less pronounced effect on its synthesis. It is suggested that the effect of Qu on ATPase and phosphorylation activity of CF₁ is of allosteric nature.