



УДК 577.153.35.02

НЕОДИНАКОВОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДВУХ ХИМИЧЕСКИ
ИДЕНТИЧНЫХ СУБЪЕДИНИЦ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ
ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ*Кузнецов А. В., Склянкина В. А., Аваева С. М.**Межфакультетская проблемная лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского, МГУ*

Неорганическая пирофосфатаза из дрожжей (КФ 3.6.1.1) катализирует гидролиз пирофосфата до ортофосфата в присутствии катионов двухвалентных металлов. Фермент состоит из двух субъединиц с одинаковой первичной структурой. В настоящее время открытым остается вопрос о числе активных центров и их взаимосвязи. Известно, что 1 моль фермента в условиях равновесного диализа связывает 2 моль аналога субстрата, пирофосфата кальция [1], а ингибированный фторидом пирофосфорилированный фермент содержит 2 моль пирофосфата магния [2]. В то же время в ряде реакций пирофосфатаза проявляет «половину своей потенциальной реакционной способности» — фосфорилирование фермента неорганическим фосфатом [3], реакция с *O*-метилгидроксиламином и эфиром глицина [4], модификация сульфгидрильных групп [5] не идет более чем на 50%.

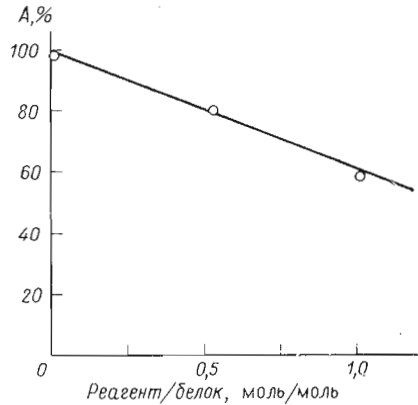
В настоящей работе изучено взаимодействие неорганической пирофосфатазы с аффинным реагентом *O*-фосфоэтанололамином и показано неидентичное поведение субъединиц фермента.

Реакция пирофосфатазы с *O*-фосфоэтанололамином была исследована при различных концентрациях ингибитора (10^{-5} — $2,5 \cdot 10^{-2}$ М) и фермента (0,01—0,2 мг/мл), при различных значениях рН (5,5—8,5) и ионной силы (0,05—0,3). За ходом реакции следили по изменению ферментативной активности и по количеству реагента, включившегося в белок [6]. Было установлено, что *O*-фосфоэтанололамин быстро подавляет активность неорганической пирофосфатазы. Так, при инкубации $2 \cdot 10^{-7}$ М фермента с $7 \cdot 10^{-3}$ М *O*-фосфоэтанололамином через 30 с его активность составляет примерно 60% от первоначальной, а за 40 мин достигается его полная инактивация, при этом на 1 моль белка включается ~ 2,5 моль реагента.

Действие ингибитора направлено по активному центру фермента. Об этом свидетельствуют данные по защитному эффекту субстратом (неорганическим пирофосфатом), насыщение фермента *O*-фосфоэтанололамином при низких его концентрациях, полная инактивация белка при включении малых количеств реагента.

Инактивация фермента является необратимой, поскольку белок не восстанавливает активности после освобождения от избытка реагента гель-фильтрацией или при разбавлении реакционной смеси в 1000 раз. Можно думать, что между пирофосфатазой и *O*-фосфоэтанололамином образуется ковалентная связь.

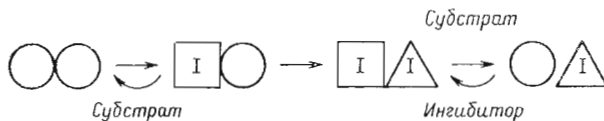
Корреляция глубины инактивации пирофосфатазы с количеством прочносвязанного ингибитора. 1,08 мкМ фермент инкубировали с 0,01 М О-фосфоэтанололамином в 0,1 М Pipes-NaOH-буфере (рН 7,0) в течение 1 ч при 30° (Pipes — пиперазинэтансульфокислота). Модифицированный белок, освобожденный от избытка реагента гель-фильтрацией на сефадексе G-50, выдерживали в 0,1 М имидазол-HCl-буфере (рН 7,1) в течение 1 ч при 30°



Исследование устойчивости инактивированного белка свидетельствует о том, что инактивация фермента — результат наличия в модифицированной пирофосфатазе двух различных по природе связей с ингибитором: достаточно лабильной и прочной. Первая может быть разрушена действием субстрата или нуклеофильного агента, например имидазола. Этот процесс протекает во времени и приводит к увеличению активности фермента.

Детальное исследование кинетики ингибирования и модификации, а также процесса реактивации позволило установить, что неоднозначная модификация пирофосфатазы связана с неодинаковым функционированием субъединиц.

Инактивация белка, как результат образования лабильной связи с модификатором, протекает с существенно большей скоростью, чем инактивация, обусловленная образованием прочной связи. В начальный момент времени происходит быстрое связывание ингибитора лабильной связью, что приводит к падению активности приблизительно до 50%. Такой белок может быть полностью освобожден от реагента и таким образом реактивирован до исходной активности. Дальнейшая инкубация пирофосфатазы с О-фосфоэтанололамином приводит к более глубокому ингибированию. Однако при этом изменяется характер инактивации. Происходит образование прочной связи между белком и реагентом, которая не может быть разрушена действием нуклеофильного агента или субстрата. Отсюда вытекает, что в белке, инактивированном более чем наполовину, присутствуют два типа связи с ингибитором: прочная и лабильная. Действительно, модифицированный фермент с активностью 50, 20 и 0% от исходной восстанавливает активность соответственно до 100, 70 и 50%. При этом наблюдается полная корреляция глубины инактивации и количества связанного ингибитора, что видно из рисунка. Существенно подчеркнуть, что полностью неактивный белок можно реактивировать не более чем на 50—60%. Такой фермент с 50% активности может быть вновь введен в реакцию с О-фосфоэтанололамином. Эта реакция приводит к полной потере активности. Однако, как и следовало ожидать, вновь образовавшаяся связь является лабильной и активный центр прореагировавшей субъединицы может быть полностью освобожден от реагента. Происходящие процессы, отображающие взаимное влияние субъединиц, представлены на схеме:



где кружком обозначена активная субъединица, квадратом — модифицированная субъединица, в которой ингибитор (I) связан лабильно, тре-

угольником — модифицированная субъединица, в которой ингибитор (I) связан прочно.

В настоящее время выявлено большое число ферментов, в которых химически идентичные субъединицы функционируют неодинаково. Неорганическая пирофосфатаза может быть отнесена к их числу.

Выяснение природы связей между белком и O-фосфоэтанололамином является предметом наших исследований в настоящее время, и по этому вопросу можно высказать следующие предположения. Известно, что в активный центр пирофосфатазы входит активированная карбоксильная группа [7]. Поскольку O-фосфоэтанололамин содержит две реакционноспособные группы, фосфатную и аминную, весьма вероятно, что модификация активного центра одной субъединицы означает образование ацилфосфатной связи, в то время как прочная связь во второй является амидной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ridlington F. W., Butler L. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7303—7307.
2. Вауков А. А., Бакулева Н. П., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **481**, 184—194.
3. Назарова Т. И., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 169—173.
4. Финк Н. Ю., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1975) *Химия природн. соед.*, **2**, 235—240.
5. Шафранский Ю. А., Аваева С. М., Котельников А. И. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 203—207.
6. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 943—949.
7. Аваева С. М., Бакулева Н. П., Баратова Л. А., Назарова Т. И., Финк Н. Ю. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **482**, 173—184.

Поступило в редакцию
7.II.1978.

NON-EQUIVALENT BEHAVIOUR OF TWO CHEMICALLY IDENTICAL SUBUNITS OF BAKER'S YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE

KUZNETSOV A. V., SKLYANKINA V. A., AVAIEVA S. M.

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

The inactivation of inorganic pyrophosphatase with an affinity reagent, O-phosphoethanolamine, has been studied. It has been found that the two enzyme subunits react in a different way, their bonds with the inhibitor varying in stability. Binding the inhibitor to one of the subunits prevents the analogous binding by the other one.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 20.04.78 Подписано к печати 12.06.78 Т-1283 Формат бумаги 70×108^{1/4}
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Уч.-изд. л. 13,1 Бум. л. 4,5 Тираж 845 экз. Зак. 40Б

Издательство «Наука». 103717, Москва, Подосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 125109, Москва, Шубинский пер., 10