



УДК 577.152.361\*4'135

ГИДРОЛИЗ СУБСТРАТА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗОЙ  
ИЗ *E. COLI*

Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. И. Белозерского*

Изучен гидролиз пирогосфата неорганической пирогосфатазой из *E. coli* в присутствии ионов магния. Предложена кинетическая схема гидролиза субстрата, согласно которой в состав активного комплекса входят три иона магния, один из которых принадлежит субстрату, а два других связываются с ферментом. Показано, что катионы кальция являются эффективными ингибиторами ферментативного процесса, причем ионы  $Ca^{2+}$  конкурируют с ионами  $Mg^{2+}$  по крайней мере в двух из трех возможных мест в фермент-субстратном комплексе. Методом дифференциальной УФ-спектроскопии доказано, что ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  непосредственно взаимодействуют с пирогосфатазой из *E. coli*, вызывая структурные перестройки в белковой молекуле. Высказано предположение, что молекула фермента, состоящая из шести одинаковых субъединиц, содержит шесть активных центров.

Неорганические пирогосфатазы (КФ 3.6.1.1) широко распространены в природе и играют важную роль в метаболизме, которая заключается прежде всего в регуляции процессов биосинтеза, протекающих с образованием неорганического пирогосфата. Наряду с гидролизом субстрата эти ферменты способны также к синтезу пирогосфата, что свидетельствует о возможном участии их в поддержании энергетического баланса в клетке. Все это объясняет интерес к исследованию неорганических пирогосфатаз животного, растительного и бактериального происхождения. Все изученные до настоящего времени пирогосфатазы металлозависимы, т. е. они проявляют ферментативную активность в присутствии катионов двухвалентных металлов, из которых наиболее эффективны катионы магния. Наиболее детально изучен гидролиз пирогосфата неорганической пирогосфатазой из дрожжей. Для этого фермента предложена кинетическая схема, согласно которой для гидролиза необходимы три иона магния; один из них принадлежит субстрату, а два связываются непосредственно с ферментом, приводя его к активации [1]. Тот факт, что ионы металла-активатора связываются не только с субстратом, но и с ферментом, был установлен и для пирогосфатаз, выделенных из других источников, например для ферментов из пивных дрожжей [2], бактерий *Vibrio alginolyticus* [3] и *Bacillus stearothermophilus* [4], эритроцитов [5] и митохондрий сердца быка [6].

Настоящая работа посвящена изучению роли металлов-активаторов в механизме гидролиза пирогосфата неорганической пирогосфатазой, выделенной из кишечной палочки *E. coli*. Этот фермент был выделен в чистом виде Джоссом в 1966 г. [7], который впервые изучил кинетику гидролиза субстрата и пришел к выводу, что субстратом фермента является пирогосфат магния. Предложенная им кинетическая схема не включала в себя стадии активации фермента ионами металла-активатора [8]. Полученные Джоссом экспериментальные данные позднее были пересмотрены Рапопортом с сотр., предположившими, что пирогосфатаза из *E. coli* непосредственно взаимодействует с ионами магния и это приводит к ее активации [9]. В связи с начатыми в нашей лаборатории планомерными исследованиями неорганической пирогосфатазы из *E. coli* возникла необходимость определения количества активных центров в молекуле фермента, выяснения числа ионов металлов, принимающих участие в катализе, их роли, а также их сродства к пирогосфатазе.

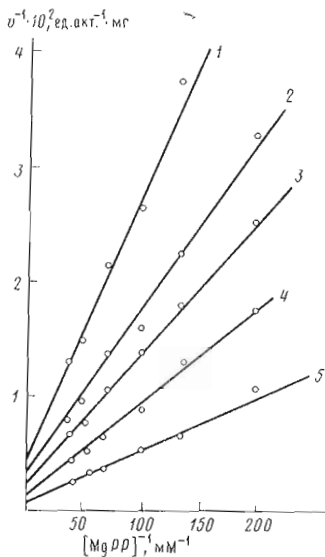


Рис. 1

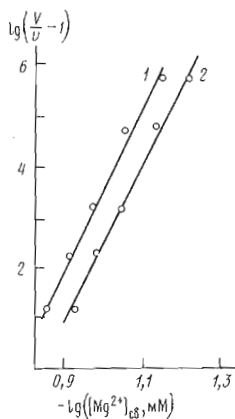


Рис. 2

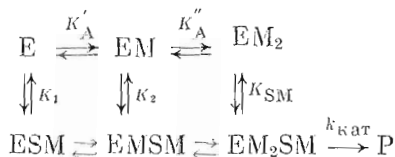
Рис. 1. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации комплекса пирофосфат –  $Mg^{2+}$  при концентрациях  $MgCl_2$  ( $[Mg^{2+}]_{св}$ ) 60 (1), 90 (2), 120 (3), 135 (4), 600  $\mu M$  (5)

Рис. 2. График Хилла для гидролиза пирофосфата магния при фиксированных концентрациях  $MgCl_2$  в инкубационной смеси и концентрации  $MgPP$ , равной 10 (1) и 17  $\mu M$  (2)

В первую очередь детально была изучена кинетика гидролиза субстрата. С этой целью была исследована зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации истинного субстрата, пирофосфата магния, при нескольких фиксированных концентрациях ионов магния (рис. 1). Для определения числа ионов магния, участвующих в катализе, результаты кинетических исследований были представлены в координатах Хилла (рис. 2). Коэффициент Хилла, определяемый как тангенс угла наклона прямых на рис. 2, составил 1,5–1,8. Эти результаты показывают, что в ферментативном превращении кроме одного иона магния, необходимого для образования субстрата, участвуют еще по крайней мере два иона магния. Следовательно, при гидролизе пирофосфата магния ферментом из *E. coli* имеет место непосредственное взаимодействие пирофосфатазы с ионами металла-активатора.

Для установления кинетической схемы процесса были построены вторичные зависимости наклона прямых  $K_{3M(эф)}/V_{эф}$ , показанных на рис. 1, и отрезков, отсекаемых ими на оси ординат ( $1/V_{эф}$ ), от величины обратной концентрации свободных ионов  $[Mg^{2+}]_{св}$  (рис. 3а).

Если предположить, что каждая субъединица фермента функционирует независимо, то параболический характер зависимостей удовлетворяет следующей схеме:



где M – ионы магния, S – пирофосфат, E – субъединица фермента.

Согласно этой схеме, пирофосфат магния может присоединяться к свободной форме фермента, а также к комплексам фермента с одним и двумя катионами магния, причем каталитически активен только комплекс  $EM_2SM$ .

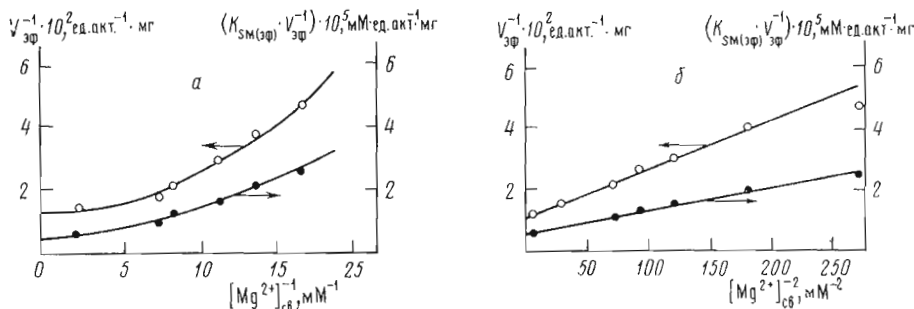


Рис. 3. Зависимость параметров прямых рис. 1 от обратной концентрации (а) и от квадрата обратной концентрации (б) ионов магния в растворе

Уравнение скорости процесса, протекающего по этой схеме, имеет вид

$$1/v = \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{K'_A K_{SM}}{K_2 [M]} + \frac{K'_A K''_A K_{SM}}{K_2 [M]} + \frac{K'_A K''_A K_{SM}}{K_1 [M]^2} \right) + \frac{K_{SM}}{[SM] V} \left( 1 + \frac{K''_A}{[M]} + \frac{K'_A K''_A}{[M]^2} \right).$$

При фиксированной концентрации ионов магния это уравнение в координатах Лайнуивера — Берка описывает прямую

$$1/v = \frac{1}{V_{эф}} + \frac{K_{SM(эф)}}{V_{эф}} \cdot \frac{1}{[SM]}$$

с параметрами

$$1/V_{эф} = \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{K'_A K_{SM}}{K_2 [M]} + \frac{K'_A K''_A K_{SM}}{K_2 [M]} + \frac{K'_A K''_A K_{SM}}{K_1 [M]^2} \right),$$

$$K_{SM(эф)}/V_{эф} = \frac{K_{SM}}{V} \left( 1 + \frac{K''_A}{[M]} + \frac{K'_A K''_A}{[M]^2} \right).$$

Данные на рис. 3а подтверждают параболический характер зависимостей  $1/V_{эф}$  и  $K_{SM(эф)}/V_{эф}$  от обратной концентрации ионов металла. Линейный же характер этих зависимостей от квадрата обратной концентрации активатора (рис. 3б) показывает, что содержание форм EM и EMSM в общей смеси невелико. Иначе говоря, присоединение первого иона магния к ферменту облегчает присоединение второго иона металла-активатора, так что  $K'_A > K''_A$ . Из рис. 3б можно определить произведение констант

$K'_A \cdot K''_A$ , численно равное тангенсу угла наклона прямой, деленному на

$K_{SM}/V$ . Значение  $K'_A \cdot K''_A$  составляет  $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$ . Из данных дифференциальной УФ-спектроскопии можно вычислить одну из констант связывания металла с ферментом, величина которой составляет  $(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ M}$  (см. ниже). Эти данные позволяют рассчитать вторую константу (табл. 1). Таким образом, неорганическая пирофосфатаза из *E. coli* — металлоактивируемый фермент. Его истинным субстратом является пирофосфат магния, что согласуется с данными Джосса; кроме того, этот фермент непосредственно взаимодействует с двумя катионами магния, что приводит к его активации.

В настоящей работе также изучено влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на гидролиз пирофосфата магния в присутствии ионов  $\text{Mg}^{2+}$ . Катион кальция оказывает мощное тормозящее действие на пирофосфатазную реакцию, катализируемую некоторыми ферментами этого класса [6]. Что же касается пирофосфатазы из *E. coli*, то этот вопрос до настоящего времени оставался открытым. Оказалось, что ионы кальция действительно являются сильным

Таблица 1

**Кинетические параметры гидролиза MgPP  
неорганической пирофосфатазой из E. coli**

V, ед. акт./мг	$K_{SM}$ , мкМ	$K'_A$ , $10^{-4}$ М	$K''_A$ , $10^{-5}$ М
760±80	31±19	3,9±0,2	3,8±0,2

Примечание.  $K''_A$  определена методом дифференциальной УФ-спектроскопии (см.  $K_{дис}$  комплекса E—Mg<sup>2+</sup> в табл. 2).

Таблица 2

**Спектральные изменения, возникающие при связывании  
фермента с металлами, и константы диссоциации  
образующихся комплексов**

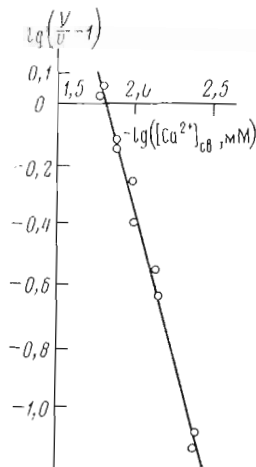
Взаимодействие	$\lambda_{мин}$ , нм	$\Delta\epsilon^{\lambda_2-\lambda_1}$ , $10^4$ М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$K_{дис}$ , $10^{-5}$
E+Mg <sup>2+</sup>	280	3,5±0,5	3,8±0,2
E+Ca <sup>2+</sup>	278	1,5±0,1	1,9±0,3

Примечание. В случае титрования фермента Mg<sup>2+</sup>  $\lambda_1=280$  нм,  $\lambda_2=320$  нм, при изучении взаимодействия с Ca<sup>2+</sup>  $\lambda_1=278$  нм,  $\lambda_2=320$  нм.

ингибитором реакции гидролиза пирофосфата магния под действием этого фермента (рис. 4). Вычисленный из данных рис. 4 коэффициент Хилла составил 1,5–2,0. Таким образом, ионы кальция конкурируют с ионами магния по крайней мере в двух из трех возможных мест в фермент-субстратном комплексе. Активность фермента снижается до 50% при соотношении  $[Mg^{2+}]/[Ca^{2+}]$ , равном 13–16. Это означает, что сродство мест связывания металла для ионов Ca<sup>2+</sup> примерно в 13–16 раз выше, чем для ионов магния.

Известно, что неорганическая пирофосфатаза из E. coli состоит из шести одинаковых субъединиц [10], однако число активных центров до сих пор не было определено. Для оценки их числа мы изучили связывание пирофосфата с ферментом в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup>. Фермент выдерживали в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> и пирофосфата, затем проводили гель-фильтрацию на колонке, уравновешенной ионами кальция, и определяли содержание пирофосфата в полученном белке. Оказалось, что выделенный таким образом фермент содержит 5,0–6,2 моль PP<sub>i</sub> на 1 моль белка или 0,8–1,0 моль пирофосфата на 1 моль субъединицы. Таким образом, можно предположить, что каждая субъединица содержит активный центр. Этот ре-

Рис. 4. График Хилла для ингибирования гидролиза пирофосфата магния ионами кальция при фиксированной концентрации свободной формы Mg<sup>2+</sup> ( $[Mg^{2+}]_{св}$  0,2 мМ) и MgPP 0,1 мМ



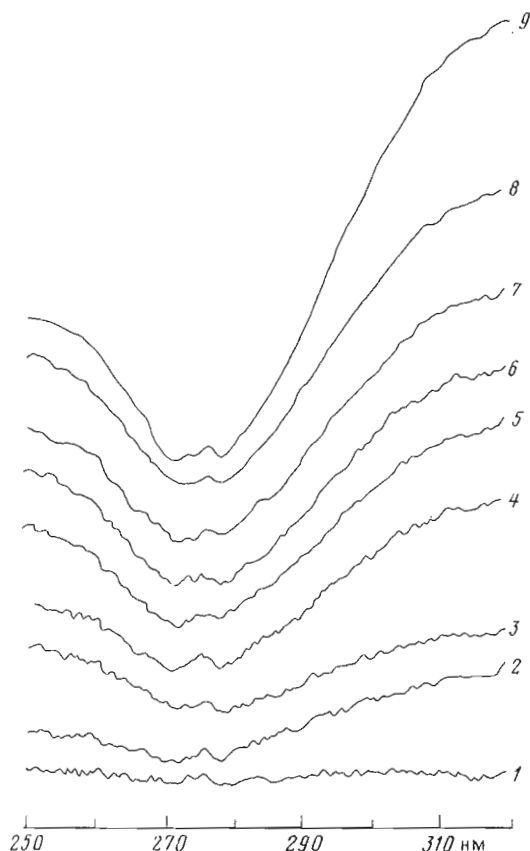


Рис. 5. Дифференциальные УФ-спектры неорганической пирофосфатазы из *E. coli* в отсутствие (1) и в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  при их концентрации 2,8 (2), 5,52 (3), 8,26 (4), 10,98 (5), 16,4 (6), 21,7 (7), 32,3 (8), 42,5 мкМ (9)

зультат делает весьма вероятным высказанное выше предположение о независимом функционировании субъединиц пирофосфатазы из *E. coli*.

Приведенные ранее данные по кинетике ферментативного гидролиза субстрата в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  выявили участие нескольких атомов магния в образовании активного комплекса и конкурентное поведение ионов кальция за места связывания. Таким образом, из кинетики вытекает, что имеет место взаимодействие металла с ферментом в отсутствие субстрата, и поэтому было важно изучить связывание пирофосфатазы с ионами этих металлов в отсутствие субстрата в условиях равновесия.

Добавление ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  к неорганической пирофосфатазе из *E. coli* вызывает появление разностных УФ-спектров. Из рис. 5, 6 видно, что спектры комплексов фермента с ионами магния и кальция похожи. Для них характерно наличие отрицательного максимума при 275–280 нм, что соответствует изменению окружения остатков тирозина и триптофана и объясняется переходом белковых хромофоров в более полярное окружение [11]. Определение зависимости спектральных изменений от концентрации добавленных ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  (рис. 7) позволило вычислить константы диссоциации комплексов фермента с ионами металлов (табл. 2).

Из линейного характера зависимостей  $1/\Delta\epsilon$  от  $1/[M^{2+}]$  (см. рис. 7б) вытекает, что связывание только одного атома металла-активатора вызывает появление разностных УФ-спектров. Согласно работе [12], можно формально оценить число остатков тирозина и триптофана, участвующих в перестройке молекулы фермента при связывании металла. Оказалось, что при титровании фермента ионами  $Mg^{2+}$  претерпевают изменения 6,4 остатка тирозина и 3,2 остатка триптофана, а при связывании ионов  $Ca^{2+}$  — 4,6

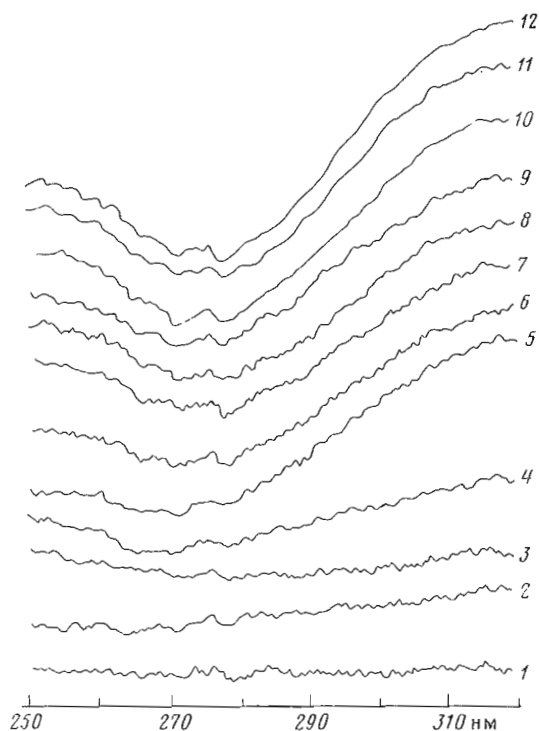


Рис. 6. Дифференциальные УФ-спектры неорганической пирофосфатазы из *E. coli* в отсутствие (1) и в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при их концентрации 2,8 (2), 5,52 (3), 8,26 (4), 10,98 (5), 16,4 (6), 21,7 (7), 32,3 (8), 42,5 (9), 52,6 (10), 62,5 (11), 72,1 мкМ (12)

остатка тирозина и 1,4 остатка триптофана, в то время как в молекуле фермента содержится 48 остатков тирозина и 12 остатков триптофана [13]. Таким образом, из данных дифференциальной УФ-спектроскопии следует, что ионы  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  непосредственно взаимодействуют с ферментом, приводя к структурным перестройкам в молекуле белка, причем ионы магния вызывают более глубокие изменения, чем ионы кальция.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол и пирофосфат натрия фирмы Sigma (США), хлориды магния и кальция классификации х.ч., тетраметиламмонийхлорид (Fluka, ФРГ). Все растворы приготавливали на дважды деионизованной воде. Применялись титрованные растворы  $\text{MgCl}_2$  и  $\text{CaCl}_2$ .

Неорганическая пирофосфатаза из *E. coli* была выделена из штамма *E. coli* MRE-600 по методу Джосса [10] и имела удельную активность 600 МЕ/мг.

Константы диссоциации комплексов неорганического пирофосфата с  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  при рН 9,1; 25°С и  $I=0,4$ , рассчитанные как описано ранее [14, 15], составили: для  $\text{MgPP} - 2,59 \cdot 10^{-6}$ ;  $\text{Mg}_2\text{PP} - 2,01 \cdot 10^{-3}$ ,  $\text{CaPP} - 8,17 \cdot 10^{-6}$  М.

Кинетику гидролиза пирофосфата в присутствии различных концентраций ионов  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  под действием фермента изучали при 25°С в 0,06 М 2-амино-2-метил-1,3-пропандиоле, рН 9,1, в присутствии 0,05 М тетраметиламмонийхлорида (буфер А). Начальные скорости гидролиза пирофосфата определяли на автоматическом анализаторе фосфата, работающем в непрерывном режиме [16] с чувствительностью  $(1-5) \cdot 10^{-5}$  М фосфата на полную шкалу самописца. Реакцию проводили в термостатируемом сосуде, снабженном магнитной мешалкой. Кинетические параметры гидролиза оценивали графически. Скорость ферментативного гидролиза выражали в

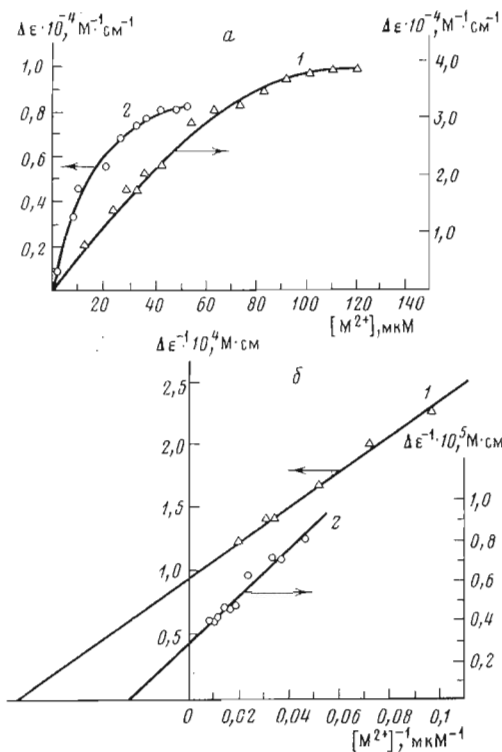


Рис. 7. Спектральное титрование фермента ионами  $Mg^{2+}$  (1) и  $Ca^{2+}$  (2). Изменение в разности молярного поглощения при 275–295 нм в зависимости от общей концентрации ионов металла (а); те же величины в обратных координатах (б)

количестве субстрата (мкмоль), превращенного за 1 мин в расчете на 1 мг белка (ед. акт./мг).

Дифференциальные УФ-спектры снимали на спектрофотометре Cary-219 (США) с использованием шкалы 0–0,02 ОЕ при 25° С. Аликвоты по 0,9 мл (7,4–8,7) · 10<sup>-7</sup> М фермента в буфере  $\Lambda$  помещали в две идентичные кварцевые кюветы (длина оптического пути 0,5 см). При титровании фермента ионами металлов в образец добавляли по 2,5–10 мкл раствора хлорида металла; в контрольную кювету добавляли такой же объем буфера. Изменение объема в конце титрования составляло около 10%.

*Определение числа молекул пирофосфата, связанных с ферментом.*

Фермент (0,18 мг) инкубировали в 1 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 7,5, содержащего 2 мМ  $CaCl_2$  и 7 мМ пирофосфат натрия, в течение 10 мин при 30° С, избыток реагентов удаляли на колонке (0,8×20 см) с сефадексом G-50 fine, уравновешенным 2 мМ  $CaCl_2$ . В полученных фракциях определяли содержание белка по поглощению при 280 нм [10] и количество неорганического фосфата [17].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Baykov A. A., Tam-Villoslado J. J., Awaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 569, № 2, p. 228–238.
2. Кашо В. П., Дуженко В. С., Аваева С. М. Биохимия, 1978, т. 43, № 1, с. 50–57.
3. Unemoto T., Tanaka M., Hayashi M. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 327, № 2, p. 490–500.
4. Scheier E., Höhne W. E. FEBS Lett., 1978, v. 90, № 1, p. 93–96.
5. Thuillier L. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 524, № 1, p. 198–206.
6. Volk S. E., Baykov A. A., Duzhenko V. S., Awaeva S. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 2, p. 215–220.
7. Josse J. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 1938–1947.
8. Josse J. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 1948–1957.
9. Rapoport T. A., Höhne W. E., Reich J. G., Heitmann P., Rapoport S. M. Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 2, p. 237–246.
10. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 17, p. 4335–4345.

11. *Timasheff S. N.* In: *The Enzymes*/Ed. Boyer P. D. New York – London: Acad. Press, 1970, v. 2, p. 408–445.
12. *Herskovits T. T.* In: *Methods in Enzymology*/Ed. Hirs H. W. New York – London: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 748–790.
13. *Burton P. M., Hall D. C., Josse J. J.* *Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 17, p. 4346–4352.
14. *Шафранский Ю. А., Байков А. А., Андрукович П. Ф., Аваева С. М.* *Биохимия*, 1977, т. 42, № 17, с. 1244–1251.
15. *Irani R. R., Callis G. E.* *J. Phys. Chem.*, 1960, v. 64, № 7, p. 1398–1407.
16. *Baykov A. A., Avaeva S. M.* *Eur. J. Biochem.*, 1973, v. 32, № 1, p. 136–142.
17. *Hess H. H., Derr J. E.* *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 63, № 2, p. 607–613.

Поступила в редакцию  
17.I.1983

## SUBSTRATE HYDROLYSIS BY INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM *E. COLI*

KURILOVA S. A., NAZAROVA T. I., AVAEVA S. M.

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

Hydrolysis of pyrophosphate ( $PP_i$ ) by inorganic pyrophosphatase from *E. coli* in the presence of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions has been studied. According to the proposed scheme the active complex contains two  $Mg^{2+}$  ions and one molecule of  $MgPP_i$ . The  $Ca^{2+}$  ions strongly inhibited pyrophosphatase activity and competed with  $Mg^{2+}$  for at least two of the three available sites in the enzyme-substrate complex. The direct interaction of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions with pyrophosphatase, leading to structure rearrangements, was demonstrated by UV difference spectroscopy. It was supposed that a molecule of the enzyme, which consists of six identical subunits, contains six active sites.