

Г. А. КОЧЕТОВ, П. П. ФИЛИПОВ

**ВЛИЯНИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ
НА ПОЛОЖЕНИЕ ОПТИМУМА рН ТРАНСКЕТОЛАЗНОЙ РЕАКЦИИ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 19 VI 1969)

В ранее проведенных исследованиях свойств транскетолазы (КФ 2.2.1.1) пекарских дрожжей в качестве одного из кофакторов использовались ионы магния (1, 2). В частности, было показано, что оптимум рН активности фермента находится при 7,6 (2). Недавно мы обнаружили, что помимо магния некоторые другие двухвалентные катионы способны активировать транскетолазу; при этом эффективность их сильно различается (3). Известно, что свойства ферментов, такие как оптимум рН, субстратная специфичность, стабильность и др., могут значительно меняться в зависимости от характера и концентрации металла-активатора (4, 8). Так, например, максимальная активность глутаминсинтетазы при оптимальной концентрации ионов магния проявляется в области рН 7—8, тогда как в присутствии оптимальной концентрации двухвалентного марганца — при рН 5—6. При этом в обоих случаях наблюдается сдвиг оптимума рН в кислую сторону при повышении концентрации катионов (5, 6).

Эффективность ионов магния и марганца как активаторов глутаминсинтетазы приблизительно одинакова при оптимальном для каждого катиона рН. Однако активирующая способность при рН 7—8 значительно меньше у марганца, чем у магния. Следовательно, если какой-нибудь фермент активируется несколькими катионами и величина эффекта различна при фиксированном рН (а обычно такое сравнение проводят при одном значении рН), то не исключена возможность, что различная эффективность катионов является кажущейся и на самом деле обусловлена неодинаковым положением оптимума рН с разными ионами.

В настоящей работе мы изучили такую возможность применительно к транскетолазе пекарских дрожжей.

Методика. Транскетолазу получали по методу Рэкера и сотрудников (9); в работе использовали препарат фермента, описанный ранее (3).

Активность транскетолазы определяли по количеству седогентулозо-7-фосфата, образующегося в процессе реакции. В качестве субстрата использовали смесь пентозофосфатов (3). Состав инкубационных проб: 10—15 μ г транскетолазы с удельной активностью 1 ед/мг; 0,2 М глицил-глициновый буфер требуемого рН; хлорид металла в необходимой концентрации; 70 μ М тиаминпирофосфат; 7 мг субстрата (в пересчете на бариевую соль); конечный объем 0,6 мл; рН смеси до и после инкубации практически не отличался от рН исходного глицил-глицинового буфера. Реакцию начинали добавлением субстрата. В момент начала инкубации, а затем через 5 и 10 мин. инкубации при 30° отбирали пробы, и в них определяли содержание седогентулозо-7-фосфата по методу Дитше (10).

Результаты. На рис. 1 представлены результаты одного из однозначных опытов по исследованию зависимости активности транскетолазы от рН в присутствии различных концентраций двухвалентных металлов. Использовались три концентрации катионов, а именно (в порядке возрастания): 1) та, при которой активность была неполной, 2) максимальной

и 3) сниженной (вследствие ингибирования). При выборе концентраций руководствовались данными по активации транскетолазы при pH 7,6.

Из рис. 1 видно, что в присутствии двухвалентного магния в концентрации $4,2 \cdot 10^{-5} M$ оптимум pH фермента находится при pH 7,0. Повышенные концентрации катиона до $2,5 \cdot 10^{-3} M$ приводит к сдвигу оптимума pH до 7,6—8,0, а при концентрации $8,2 \cdot 10^{-2} M$ оптимум находится при pH 8,0. Максимальная активность транскетолазы проявляется при pH 7,6—8,0 и концентрации катиона $2,5 \cdot 10^{-3} M$.

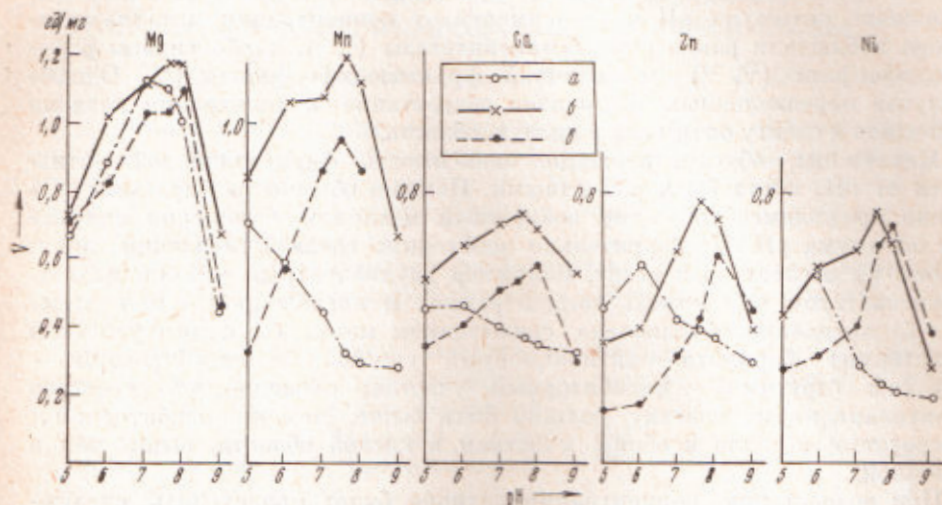


Рис. 1. Влияние двухвалентных металлов на положение оптимума pH транскетолазной реакции (активность в расчете на единицу веса фермента). Концентрации (M):

	а	б	в
Mg	$4,2 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$8,2 \cdot 10^{-2}$
Mn	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^{-2}$
Ca	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$
Zn	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$
Ni	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$

В случае марганца наблюдается аналогичная тенденция: при концентрации катиона $1,5 \cdot 10^{-4} M$ оптимум находится при pH 5,0, при концентрации $4,2 \cdot 10^{-3} M$ — при pH 7,6. Дальнейшее повышение концентрации до $8,3 \cdot 10^{-2} M$ влияния не оказывает. Максимальная активность имеет место при pH 7,6 и концентрации марганца $4,2 \cdot 10^{-3} M$.

Возрастающие концентрации двухвалентных кальция, цинка и никеля также смещают оптимум pH транскетолазы из кислой области в щелочную. При низких концентрациях этих катионов оптимум приходится на pH 6,0, при оптимальных — на pH 7,6 и при ингибирующих — на pH 8,0. Максимальная активность наблюдается при pH 7,6 и концентрациях кальция $1,0 \cdot 10^{-2} M$, цинка $1,0 \cdot 10^{-3} M$ и никеля $5,0 \cdot 10^{-4} M$.

Сдвиг оптимума pH при повышении концентрации хлоридов металлов нельзя объяснить влиянием на фермент ионной силы или анионов хлора, так как хлористый калий той же концентрации или ионной силы практически не влияет на положение оптимума в отсутствие добавленного ивне двухвалентного металла. На специфичность действия двухвалентных катионов указывает также следующий факт: при повышении концентрации хлористого марганца от $1,5 \cdot 10^{-4}$ до $4,2 \cdot 10^{-3} M$ (соответствует изменению ионной силы от $4,5 \cdot 10^{-4}$ до $1,3 \cdot 10^{-2}$), оптимум pH смещается от 5,0 к 7,6, т. е. на 2,6 ед. При изменении концентрации хлористого магния от $4,2 \cdot 10^{-5}$ до $8,2 \cdot 10^{-2} M$ (соответствует возрастанию ионной силы от $1,3 \cdot 10^{-4}$ до $2,5 \cdot 10^{-1}$), т. е. в гораздо более широком диапазоне оптимум сдвигается от 7,0 к 8,0 — всего на 1 ед. pH.

Как следует из приведенных данных, положение оптимума рН транскетотазы при оптимальной концентрации исследованных двухвалентных катионов практически неизменно и соответствует рН 7,6—8,0. Поэтому неодинаковую активирующую способность двухвалентных металлов нельзя объяснить различным положением оптимума рН с каждым из них, как это имеет место в случае глутаминсинтетазы (5).

Повышение концентрации катионов вызывает смещение оптимума рН транскетотазы из кислой области в щелочную: от рН 5,0—7,0 до 7,6—8,0 (для исследованных концентраций солей металлов). Различное положение оптимума рН в зависимости от концентрации металла-активатора наблюдали ранее у глутаминсинтетазы (5, 6), карбоксилазы рибулосодифосфата (11, 12) и щелочной фруктосодифосфатазы (4). Однако в случае перечисленных ферментов возрастание концентрации катиона приводило к сдвигу оптимума в кислую область.

Механизмы, обуславливающие зависимость ферментативной активности от рН, могут быть различными. Помимо обычно разбираемых (13) можно предложить еще один возможный механизм изменения положения оптимума рН. Предварительно необходимо сделать следующие допущения: а) исследуемый агент, например двухвалентный металл, является активатором при низких концентрациях и ингибитором — при высоких; б) активация обусловлена связыванием металла с одним участком (участками) фермента — активационный участок, а ингибирование — с другим (другими) — ингибиторный участок; очевидно, что сродство к активационному участку должно быть выше, чем к ингибиторному; в) сродство металла к обоим участкам в кислой области выше, чем в щелочной.

При возрастании концентрации катиона будет происходить следующее. При определенной, достаточно низкой концентрации оптимум находится в кислой области: активационный участок уже полностью насыщен катионом при низких значениях рН и частично — при высоких. Возрастание концентрации металла вызывает насыщение активационного участка в щелочной области и частичное связывание катионов с ингибиторным участком в кислой. Результатом явится снижение активности при низком рН, увеличение при высоком и смещение оптимума рН в щелочную сторону. Дальнейшее повышение концентрации металла приведет к более полному насыщению ингибиторного участка и к еще большему смещению оптимума в щелочную область.

Если исходить из обратных предпосылок, а именно, что сродство металла к ферменту выше в щелочной области, то повышение его концентрации вызовет смещение оптимума рН в противоположную сторону.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 VI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. de la Haba, I. G. Leder, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, **214**, 409 (1955).
² A. G. Datta, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, **236**, 617 (1961). ³ Г. А. Кочетов, П. И. Филиппов, Р. А. Усманов, *Биохимия*, **34**, в. 4, 810 (1969). ⁴ J. Preiss, M. L. Biggs, E. Greenberg, *J. Biol. Chem.*, **242**, 2292 (1967). ⁵ C. Monder, *Biochemistry*, **4**, 2677 (1965). ⁶ J. Greenberg, N. Lichtenstein, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2337 (1959). ⁷ Б. П. Валли, V Международн. биохимич. конгр., IV симпозиум, Изд. АН СССР, 1962, стр. 192. ⁸ A. Rosenberg, *Arkiv. kemi*, **17**, 25 (1960). ⁹ J. R. Cooper, P. A. Srere et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **74**, 306 (1958). ¹⁰ Z. Dische, *J. Biol. Chem.*, **204**, 983 (1953). ¹¹ J. A. Bussam, P. Sharp, I. Morris, *Biochim. et Biophys. acta*, **153**, 898 (1968). ¹² T. Sugiyama, N. Nakayama, T. Akazawa, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **126**, 737 (1968). ¹³ А. Уэбб, *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, 1966, стр. 611.