

И. В. БЕРЕЗИН, В. Л. ДЯКОВ

ФОТООКИСЛЕНИЕ α -ХИМОТРИПСИНА В ПРИСУТСТВИИ БОРНОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 9 X 1969)

Ранее было показано (1), что при окислении химотрипсина в присутствии метиленового голубого потеря энзиматической активности соответствует потере 1 гистидина. Кошланд и Рей (2), несколько видоизменив методику окисления, установили, что из 2 гистидинов белка один окисляется с гораздо большей скоростью («быстрый»), чем другой («медленный»). В данной работе сделана попытка проведения избирательного окисления медленного гистидина. Известно (3, 4), что борная кислота образует комплекс с имидазолом гистидина-57 и препятствует ацилированию фермента субстратом. Исходя из этого, можно было полагать, что остаток имидазола, включенный в комплекс с борной кислотой, в реакции фотоокисления будет проявлять существенно иные кинетические свойства. Окисление проводили по методу (1) при 25° в присутствии борной кислоты. Остаточную

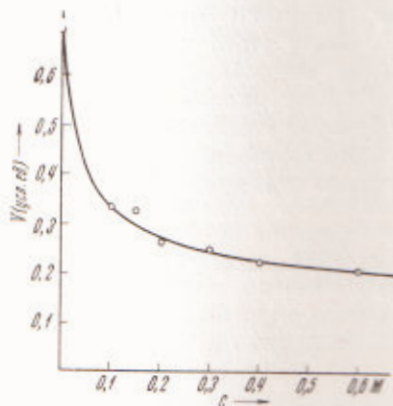


Рис. 1

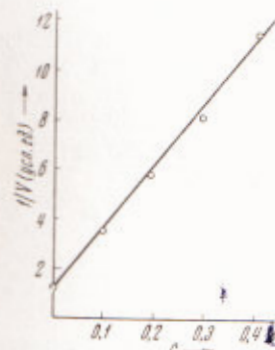


Рис. 2

Рис. 1. Влияние концентрации борной кислоты на скорость фотоинaktivации химотрипсина. (0,2 мМ раствор химотрипсина в 0,05 M фосфатном буфере рН 7,5 в присутствии 0,005% метиленового голубого; 25°; воздух)

Рис. 2. Зависимость величины обратной скорости фотоинaktivации химотрипсина, карбоксиметилированного подуксусной кислотой, от концентрации борной кислоты. Условия фотоокисления те же, что для рис. 1

активность измеряли по гидролизу п-нитрофенилтриметилацетата. Установлено, что борная кислота значительно снижает скорость фотоокисления в присутствии метиленового голубого. Изучение кинетики фотоокисления при разных концентрациях борной кислоты показало, что в присутствии борной кислоты не удается достигнуть полного ингибирования фотоокисления (рис. 1). Максимально удается снизить скорость фотоокисления в 4 раза. Можно рассмотреть два возможных объяснения этого эффекта:

1. Комплексование борной кислоты с имидазолом гистидина-57 не устраняет полностью фотоокисления этого имидазола.

2. Происходит окисление другой функциональной группы, вызывающей потерю активности.

При помощи специфического реагента на имидазольные группы, диазо-1-*n*-тетразола (3), были получены данные, показывающие, что в процессе фотоинактивации в присутствии борной кислоты происходит значительная потеря содержания гистидина. Для выбора между двумя вариантами объяснения наблюдаемого эффекта проводили фотоокисление химотрипсина, предварительно обработанного иодуксусной кислотой, которая, как известно, вызывает карбоксиметилирование имидазола гистидина-40 (6,7). В данном случае в присутствии борной кислоты в окислительной системе можно достигнуть полного ингибирования фотоинактивации химотрипсина, карбоксиметилированного иодуксусной кислотой. Константа ингибирования борной кислотой K_i , определенная по этим данным (рис. 2), равна $5 \cdot 10^{-2} M$, что хорошо коррелирует с известной из литературы величиной, равной для этой температуры $(4,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-2} M$. Эти результаты свидетельствуют в пользу второй альтернативы.

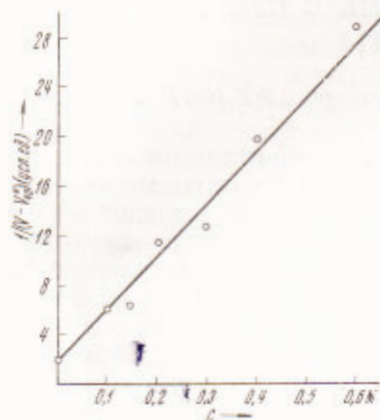


Рис. 3. Зависимость величины $1/(V - V_{40}^0)$ для химотрипсина от концентрации борной кислоты

скорости фотоинактивации нативного химотрипсина от концентрации борной кислоты. Если гистидин-40 не образует комплекса с борной кислотой, то следует ожидать, что на скорость его фотоокисления присутствие борной кислоты не будет оказывать никакого влияния. Иными словами, общая скорость фотоинактивации:

$$V = V_{57} + V_{40}^0 = \frac{V_{57}^0 K_i}{K_i + [H_3BO_3]} + V_{40}^0; \quad (1)$$

$$\frac{1}{V - V_{40}^0} = \frac{1}{V_{57}^0} + \frac{[H_3BO_3]}{V_{57}^0 K_i};$$

где V_{57}^0 — скорость фотоокисления гистидина-57 в отсутствие борной кислоты, V_{40}^0 — предельная скорость фотоинактивации, достигаемая при высоких концентрациях борной кислоты. Рис. 3 представляет собой анаморфозу рис. 1 в координатах формулы (1). Как видно, точки неплохо ложатся на прямую линию, из элементов которой для константы ингибирования получается значение $4,8 \cdot 10^{-2} M$, в хорошем соответствии с вышеприведенными данными.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 IX 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Weil, S. James, A. R. Buchert, Arch. Biochem. and Biophys., 46, 266 (1953). ² W. J. Ray, D. E. Koshland, Brookhaven Symp. Biol., № 13, 435 (1960). ³ И. В. Березин, Г. Я. Коломийцева и др., ДАН, 171, № 5, 1213 (1966). ⁴ X. Вилль, Кандидатская диссертация, МГУ, 1968. ⁵ H. Horinishi, Y. Nishimori et al., Biochim. et Biophys. acta, 86, 477 (1964). ⁶ Г. Н. Новодарова, М. М. Ботвиник, Вести. Московск. ун-ва, сер. хим., № 5, 114 (1968). ⁷ Г. Н. Новодарова, М. М. Ботвиник, Л. Л. Иванов, Вести. Московск. ун-ва, сер. хим., № 1, 107 (1969).