

С. М. ДУДКИН, Р. К. ЛЕДНЕВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РИБОНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФОАМИДАЗЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Рибонуклеозид-5'-фосфоамидаза катализирует гидролиз фосфоамидной связи в синтетических нуклеотидамидах; продуктами реакции являются нуклеозид-5'-фосфат и амин. В качестве аминоконпонента используются аминокислоты, короткие пептиды и различные алифатические и ароматические амины. Ранее активность фермента определяли путем измерения концентрации освободившегося в ходе реакции нуклеотида, который выделяли из реакционной среды при помощи хроматографии на бумаге (¹, ²). Нам разработан прямой спектрофотометрический и метод определения скоростей ферментативной реакции, основанный на различиях, существующих в у.-ф. спектрах ароматических аминов и их фосфорилированных нуклеотидами производных. В качестве субстрата использовали анизидид УМФ*.

При кислотном и ферментативном гидролизе анизида УМФ происходит увеличение оптической плотности реакционной среды в области максимума поглощения уридиловой кислоты (рис. 1). Оно обусловлено появлением в процессе гидролиза свободного

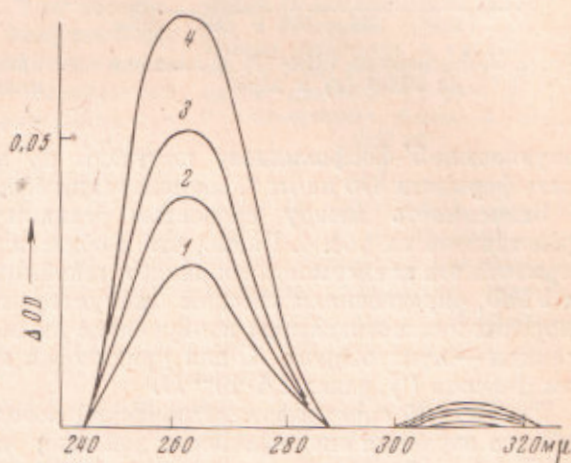


Рис. 1. Разностный спектр анизида УМФ, обработанного 0,05 N HCl в течение 10 (1), 15 (2), 20 (3) и 30 (4) мин. при 37° и той же концентрации анизида УМФ, не подвергавшегося гидролизу. Кислотный гидролиз останавливали добавлением эквимолярного количества NaOH

анизида, поскольку коэффициенты молярных экстинкций анизида УМФ и УМФ при этих длинах волн одинаковы (рис. 2). Коэффициент молярной экстинкции анизида УМФ рассчитывали по содержанию фосфора, который определяли после сжигания фосфоамида (³). Форма у.-ф. спектра анизида в водном растворе зависит от pH среды. С повышением pH максимум разностного спектра смещается с 262 на 265 мμ (рис. 3). За ходом ферментативного гидролиза следили при длине волны 265 мμ при pH 5 (оптимум действия рибонуклеозид-5'-фосфоамидазы). E_{265}^{25} для анизида при pH 5 $1,1 \cdot 10^3$. Все спектрофотометрические измерения проводили при помощи самопишущего спектрофотометра Cary-15 (США). Ани-

* Используемые сокращения: УМФ — уридин-5'-фосфат, дУМФ — дезоксиуридин-5'-фосфат, араУМФ — β-D-арабинофуранозилурацил-5'-фосфат, ксилУМФ — β-D-ксилофуранозилурацил-5'-фосфат.

зидид УМФ был синтезирован по методу (4) и использовался в виде триэтиламониевой соли.

Ферментативную реакцию проводили в 0,1 мм кварцевой кювете в объеме 0,3 мл в ацетатном буфере pH 5,0 (в конечной концентрации 0,05 M) при 25° С. В реакционную кювету и кювету сравнения помещали раствор субстрата одинаковой концентрации. За увеличением оптической плотности реакционной смеси после добавления фермента следили в течение 2 мин. Анизидид УМФ использовали в концентрации 0,3—2,2·10⁻³ M. Рн-

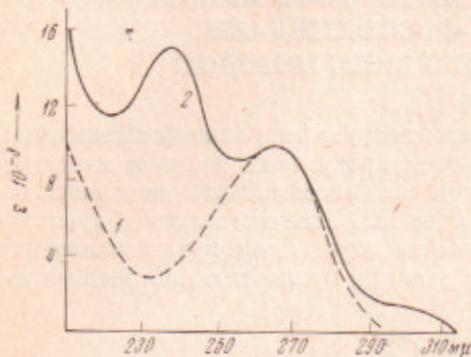


Рис. 2. У.-ф. спектры УМФ (1) и анизидида УМФ (2) в воде

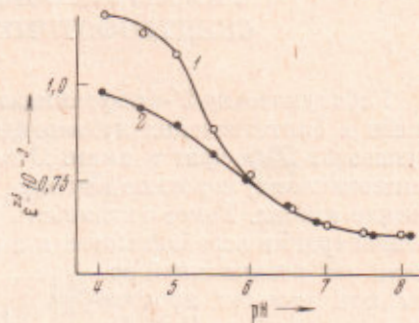


Рис. 3. Зависимость коэффициентов молярной экстинкции анизидина от рН: $E_{265}^{25^\circ}$ (1) и $E_{282}^{25^\circ}$

боцуклеозид-5'-фосфоамидазу получали по методу (4). Удельная активность фермента 870 ме/мг*, концентрация белка 1,8 мг/мл.

Зависимость между скоростью реакции и концентрацией фермента представлена на рис. 4. Видно, что в области используемых концентраций фермента эта зависимость сохраняет линейный характер. K_m для анизидида УМФ, определенная методом Лайпуивера и Берка (6), равна 2·10⁻³ M. Гидролиз нуклеотида конкурентно ингибируется одним из продуктов реакции — нуклеотидом. K_i для уридиловой кислоты, определенная методом Диксона (6), равна 2,4·10⁻⁴ M.

Разностный спектрофотометрический метод мы использовали для дальнейшего изучения специфичности действия рибонуклеозид-5'-фосфоамидазы. Ранее на фенилаланиновых производных дАМФ и дУМФ было показано, что отсутствие 2'-гидроксильной группы резко снижает степень гидролиза этих соединений по сравнению с соответствующими производными АМФ и УМФ (4). Для выяснения роли 2'- и 3'-гидроксильных групп сахара во взаимодействии фермента с субстратом мы исследовали ферментативный гидролиз анизидидов дУМФ, араУМФ и ксилУМФ. Все нуклеотидамы были синтезированы по методу (4), араУМФ и ксилУМФ по методу (7). Фосфоамиды и нуклеотиды использовались в виде триэтиламониевых солей.

Оказалось, что анизидиды УМФ и араУМФ гидролизуются с одинаковой V_{max} , но K_m для анизидида араУМФ равна 1,1·10⁻² M, т. е. несколько больше, чем K_m для анизидида УМФ (рис. 4). Соответствующие амиды дУМФ и ксилУМФ ферментом не гидролизуются. Важно отметить, что свободные нуклеотиды дУМФ, ксилУМФ и араУМФ в концентрациях, в три раза превышающих концентрацию субстрата, не ингибируют гидролиз анизидида УМФ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что 2'- и 3'-гидроксильные группы рибозы играют существенную роль во взаимодействии нуклеотидамы с ферментом. По-видимому, для образования фермент-субстратного

* Одна единица фермента — количество фермента, которое при заданных условиях катализирует гидролиз 1 микроля анизидида УМФ в 1 мин.

комплекса важно не только наличие в молекуле субстрата свободных 2'- и 3'-гидроксильных групп, но и их взаимное расположение, так как инверсия гидроксильных групп приводит к резкому уменьшению сродства фермента к субстрату.

Сравнение величин K_m и K_t показывает, что, по-видимому, имеется различие в способности амидов и соответствующих им нуклеотидов связываться с ферментом. Одна из причин этого явления, возможно, заключается в различии конформаций этих соединений.

Ранее на основании изучения д.о.в. и к.д. нуклеотидамидов⁽⁸⁾ было высказано предположение, что при введении в молекулу нуклеотида остатка анизида конформация нуклеотида изменяется за счет взаимодействия гетероциклического основания и аминок компонента. Это представление согласуется с данными⁽⁹⁾ об изменении конформации рибозы в динуклеозидфосфатах вследствие взаимодействия оснований, причем это изменение выражается в усилении C_3' -эндо-искривления рибозного кольца. Можно допустить, что подобного рода изменение конформации сахара имеет место и в анизидах нуклеотидов. Рассмотрение молекулярных моделей рибо- и арабинонуклеозида показывает, что при C_3' -эндо-искривлении рибозного кольца конформации 2',3'-диольной группы становится подобной — промежуточной между цис- и транс-расположением. Возможно, именно это изменение расположения 2'- и 3'-гидроксильных групп в нуклеотидамиде обуславливает способность анизида араУМФ, в отличие от соответствующего нуклеотида, связываться с ферментом.

С другой стороны, не исключена возможность, что при взаимодействии амидов нуклеотидов и свободных нуклеотидов с рибонуклеозид-5'-фосфоамидазой важную роль играет также взаимное расположение оснований и сахара. В связи с этим интересно отметить, что при C_3' -эндо-конформации сахара для производных арабинозида основание и 2'-гидроксил переходят из заслоненной в гош-конформацию, что создает большую свободу для вращения основания вокруг гликозидной связи. Последнее, возможно, и объясняет отмеченное при изучении д.о.в. и к.д. сближение оптических свойств анизидов УМФ и араУМФ⁽⁸⁾. Это изменение взаимной ориентации основания и сахара в молекуле субстрата (в отличие от свободного нуклеотида) может увеличивать для амида араУМФ сродство к ферменту.

Таким образом, рибонуклеозид-5'-фосфоамидаза проявляет высокую специфичность по отношению к строению сахарного остатка и, возможно, к конформации молекулы нуклеотида в целом.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
27 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. К. Леднева, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, 157, 473 (1964); 172, 977 (1967). ² Р. К. Леднева, Н. Н. Преображенская и др., II Всесоюз. биохимич. съезд, тез. секционных сообщений, секция 4, Ташкент, 1969, стр. 37. ³ H. Weil-Mahlerbe, R. H. Green, Biochem. J., 49, 286 (1951). ⁴ Н. Н. Преображенская, Н. Г. Шинский и др., ДАН, 192, № 5 (1970). ⁵ H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934). ⁶ М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, М., 1966, стр. 291. ⁷ Н. Г. Шинский, Н. Н. Преображенская и др., ДАН, 184, 622 (1969). ⁸ Б. В. Тяглов, Е. С. Громова и др., ДАН, 195, № 4 (1970). ⁹ B. W. Bangerter, S. J. Chan, J. Am. Chem. Soc., 91, 3910 (1969).

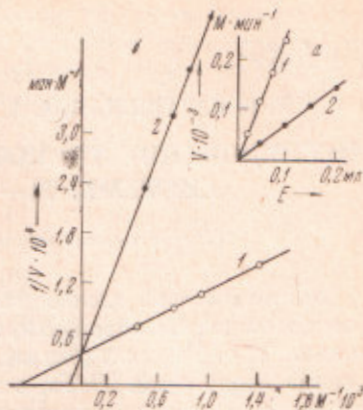


Рис. 4. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента (а) и субстрата (б). а — концентрация субстрата в пробе: анизид УМФ $1.6 \cdot 10^{-3} M$ (1) и анизид араУМФ $1.7 \cdot 10^{-3} M$ (2) б — содержание белка в пробе 0,09 мг