

Г. А. КОЧЕТОВ, П. П. ФИЛИПОВ

**МЕХАНИЗМ АКТИВИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ КАЛЬЦИЯ
НА ТРАНСКЕТОЛАЗУ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 12 III 1970)

При определении активности транскетолазы пекарских дрожжей в качестве иона-активатора обычно используется магний (¹⁻³). Считалось, что он выполняет функцию «мостика» между коферментом и апоферментом и что без металла фермент неактивен (¹⁻³). В предыдущей работе (⁵) нами было показано, что в состав нативной транскетолазы входит кальций — в количестве 2 атомов на 1 моль белка. В настоящей статье при-

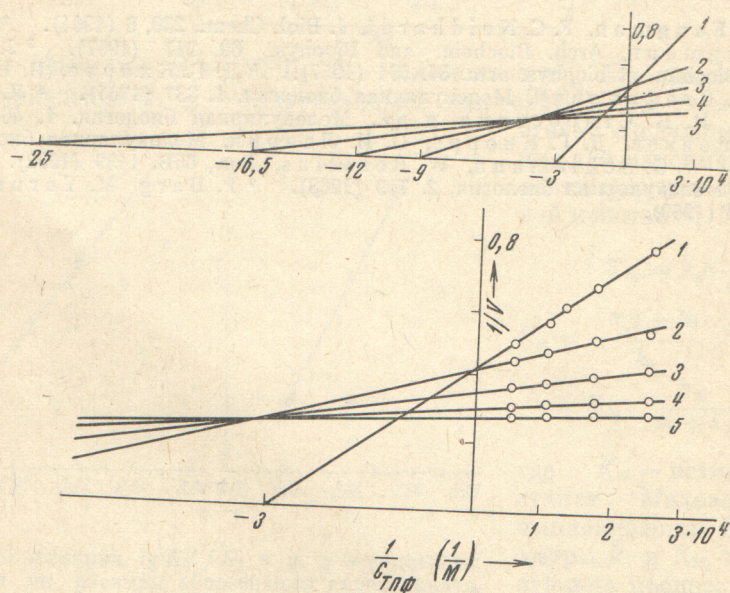


Рис. 1. Влияние кальция на зависимость скорости транскетолазной реакции от концентрации тиаминпирофосфата. Концентрация кальция (M): 1 — металлы отсутствуют, 2 — $1 \cdot 10^{-4}$, 3 — $4 \cdot 10^{-4}$, 4 — $1 \cdot 10^{-3}$, 5 — $5 \cdot 10^{-3}$

водятся данные по исследованию роли кальция в каталитическом действии фермента.

Выделение транскетолазы и определение ее активности осуществляли по методикам, описанным Рекером и сотрудниками (^{3, 6}). Полученный препарат фермента (удельная активность 6 м.ед. на 1 мг белка) был неактивен в отсутствие добавленных ивне кофакторов. Только с тиаминпирофосфатом проявлялось 60—70% от активности, измеренной в полной системе (с металлом и тиаминпирофосфатом). Исследовали взаимоотношения фермента, кальция и тиаминпирофосфата при насыщающей концентрации субстратов.

Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что в малой концентрации ($1 \cdot 10^{-4}$ M) металл влияет только на сродство тиаминпирофосфата к ферменту, понижая величину константы Михаэлиса от $3,3 \cdot 10^{-5}$ до $1,1 \cdot 10^{-5}$ M. При более высоких концентрациях наблюдается смешанный эффект: наряду с уменьшением K_m увеличивается максимальная скорость реакции. Характер зависимости скорости транскетолазной реакции от концентрации ионов кальция не укладывается ни в один из известных механизмов такой как конкурентный, неконкурентный или смешанный. Объяснить полученные экспериментальные данные можно следующим образом.

В молекуле транскетолазы есть два участка связывания металла. Взаимодействие кальция с первым из них сопровождается уменьшением константы Михаэлиса для тиаминпирофосфата, взаимодействие со вторым — приводит к повышению максимальной скорости транскетолазной реакции. Если предположить, что сродство катиона к первому участку выше, чем ко второму, то при достаточно низких концентрациях кальция изменится только константа Михаэлиса. При повышении концентрации металла он начнет связываться и со вторым участком фермента. Поэтому наряду с дальнейшим изменением K_m (но в уже относительно меньшей степени) будет повышаться максимальная скорость реакции.

В предыдущей работе⁽⁵⁾ было показано, что отщепление от транскетолазы одного атома кальция (из двух присутствующих в нативном ферменте) сопровождается уменьшением энзиматической активности, определяемой при добавлении только тиаминпирофосфата. Удаление второго атома металла эффекта не дает. Из сопоставления с данными кинетики, приведенными в настоящей статье, следует, что легко отщепляемый атом кальция ответствен за увеличение максимальной скорости транскетолазной реакции, а более прочно связанный — облегчает присоединение тиаминпирофосфата к апоферменту. Тиаминпирофосфат способен взаимодействовать с транскетолазой как при участии металла, так и без него, давая в обоих случаях одинаково активные комплексы. Поэтому функциональность прочно связанного атома кальция может быть выявлена только при достаточно низкой концентрации свободного кофермента.

Авторы выражают глубокую благодарность С. Е. Северину за интерес к работе и обсуждение результатов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 III 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Racker, G. de la Haba, J. G. Leder, J. Am. Chem. Soc., 75, 1010 (1953).
² G. de la Haba, J. G. Leder, E. Racker, J. Biol. Chem., 214, 409 (1955). ³ P. A. Srere, J. R. Cooper et al., Arch. Biochem. and Biophys., 74, 295 (1958). ⁴ A. G. Datta, E. Racker, J. Biol. Chem., 236, 617 (1961). ⁵ Г. А. Кочетов, П. П. Филиппов, Биохимия, 35, в. 2, 422 (1970). ⁶ E. Racker, The Enzymes, 5, N. Y., 1961, p. 397.