

УДК 577.15.049

БИОХИМИЯ

В. А. СКЛЯНКИНА, И. В. МЕДВЕДЕВА, С. М. АВАЕВА

УЧАСТИЕ ЛИЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ В ПРОЯВЛЕНИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 15 I 1973)

Косвенным указанием на важность лизиновых остатков для функционирования неорганической пирофосфатазы из дрожжей явилось проведенное ранее исследование влияния pH на кинетику ферментативного гидролиза. Было установлено наличие в ферменте группы с pK 8,7 которая в протонированной форме участвует в превращении активного комплекса в продукты реакции ⁽¹⁾. Эти данные требовали детального изучения изменения ферментативной активности по мере модификации лизиновых остатков в белке.

Настоящая работа посвящена исследованию реакции неорганической пирофосфатазы дрожжей с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой (ТНБС). Это соединение является специфическим реагентом на amino- и сульфгидрильные группы белков и не затрагивает оксигрупп серина, треонина, тирозина, имидазольное кольцо гистидина и гуанидогруппу аргинина ⁽²⁻⁴⁾. N-тринитрофенилированные аминокислоты характеризуются высокой молярной экстинкцией в области 340—420 мμ ($E \sim 1,0-1,5 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), что позволяет легко следить за количеством тринитрофенильных групп (ТНФ-групп), введенных в белок. Молярная экстинкция S-ТНФ-цистеина на порядок ниже молярной экстинкции N-ТНФ-аминокислот.

Неорганическая пирофосфатаза была выделена из пекарских маточных дрожжей по методике Кунитца с удельной активностью 500 Е/мг ⁽⁵⁾. Реакцию с тринитробензолсульфокислотой проводили при pH 8,5 и 25—37°. За ходом реакции следили как по изменению активности фермента, так и по числу ТНФ-групп, введенных в белок. Для этого находили абсорбцию реакционной смеси при 367 мμ или абсорбцию при 340 мμ реакционной смеси, разбавленной равным объемом 8 M мочевины в 1 M соляной кислоте, т. е. в условиях, когда сульфит-ион, образующийся в процессе тринитрофенилирования, не мешает количественному определению числа ТНФ-аминогрупп ^(6, 7). Для определения коэффициента молярной экстинкции использовали ε-тринитрофениллизин, синтезированный по методу Окуяма и Сатаки ⁽²⁾. Было найдено, что $E_{340} = 1,45 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $E_{367} = 1,67 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Реакция неорганической пирофосфатазы дрожжей с ТНБС приводит к инаktivации фермента, сопровождающейся ростом поглощения при 367 мμ. Так, при использовании 200-кратного избытка реагента за 40 мин. активность падает на 95%, а число введенных ТНФ-групп достигает 31 (рис. 1). Реакция инаktivации фермента в присутствии больших избытков ингибитора имеет кинетически псевдопервый порядок, о чем свидетельствует линейная зависимость $\ln$ остаточной активности от времени. Вычисленная константа скорости второго порядка с учетом концентрации ТНБС $K_2 = 1,53 \cdot 10^2 M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Изменение поглощения модифицированного белка при 367 мμ является результатом тринитрофенилирования ε-аминогрупп лизина. Об этом свидетельствует идентичность спектров тринитрофенилированного фермента и ε-ТНФ-лизина. ε-ТНФ-лизин наряду с пикриновой кислотой

идентифицирован при хроматографии кислотных гидролизатов модифицированной пирофосфатазы с остаточной активностью 5% в двух системах: бутанол — уксусная кислота — вода (5:1:2) и 1,5 М фосфатном буфере рН 6,0. Известно, что SH-реагенты не ингибируют неорганическую пирофосфатазу дрожжей⁽⁸⁾. Следовательно, инактивацию фермента тринитробензолсульфокислотой следует отнести за счет тринитрофенилирования ε-аминогрупп лизина. Эти данные указывают на важность лизиновых остатков для функционирования неорганической пирофосфатазы дрожжей.

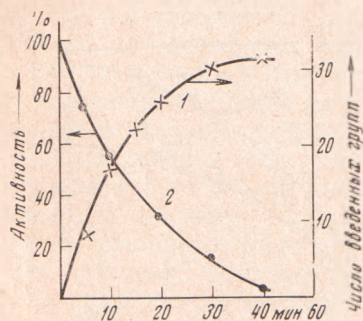


Рис. 1

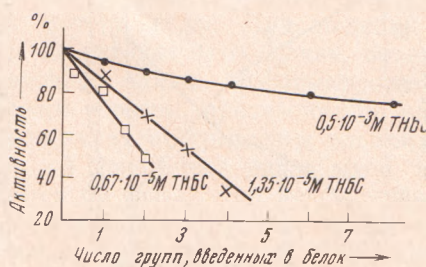


Рис. 2

Рис. 1. Тринитрофенилирование (1) и изменение активности пирофосфатазы (2) во времени в 0,5 М бикарбонатном буфере рН 8,5 и 37°, концентрация фермента и ингибитора соответственно равны $0,27 \cdot 10^{-5}$ М и $0,5 \cdot 10^{-3}$ М

Рис. 2. Изменение активности пирофосфатазы в зависимости от числа введенных в белок ТНФ-групп в 0,5 М бикарбонатном буфере рН 8,5 и 37°. Концентрация фермента $0,27 \cdot 10^{-5}$ М

Молекула неорганической пирофосфатазы содержит около 50 остатков лизина⁽⁹⁾. Важной проблемой явилось выяснение числа ε-аминогрупп лизина, необходимых для проявления ферментативной активности. С этой целью изучено взаимодействие пирофосфатазы с тринитробензолсульфокислотой при различных концентрациях ингибитора (рис. 2). Глубина тринитрофенилирования белка и скорость уменьшения ферментативной активности пропорциональны количеству введенной в реакцию ТНБС. Однако наблюдается несоответствие между числом ТНФ-групп, включенных в белок, и соответствующей инактивацией фермента. Увеличение концентрации ТНБС приводит к модификации большего количества лизиновых групп, но активность фермента падает медленнее с повышением концентрации ингибитора. Так, при использовании $0,67 \cdot 10^{-5}$ М, $0,13 \cdot 10^{-4}$ М и $0,5 \cdot 10^{-3}$ М тринитробензолсульфокислоты модификация двух остатков лизина приводит к уменьшению ферментативной активности на 10, 30 и 50% соответственно. Эти опыты показывают, что в условиях высоких концентраций ингибитора происходит модификация большого числа ε-аминогрупп лизина, но возникают стерические трудности для взаимодействия ТНБС с остатками лизина, важными для функционирования фермента.

В связи с этим была проведена модификация неорганической пирофосфатазы малыми избытками реагента (рис. 3). Оказалось, что в результате обработки белка практически эквимолекулярным количеством ТНБС через 120 мин. тринитрофенилируется одна ε-аминогруппа лизина и активность фермента падает до 65%. Добавление в реакционную смесь новой, равной первой, порции ингибитора приводит к быстрому включению в белок второго моля тринитробензолсульфокислоты, при этом инактивация фермента достигает 80%. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что два остатка лизина в молекуле неоргани-

ческой пирофосфатазы важны для проявления ее каталитической активности. Они характеризуются большей реакционной способностью по сравнению с остальными лизинами, что может быть связано с более низким значением их pK .

Однако эти данные не дают указания на принадлежность лизина активному центру. Нельзя исключить его участие не в каталитическом акте, а в поддержании активной конформации молекулы фермента.

В качестве подхода к решению этого вопроса была проведена серия опытов в присутствии субстрата — неорганического пирофосфата и пиро-

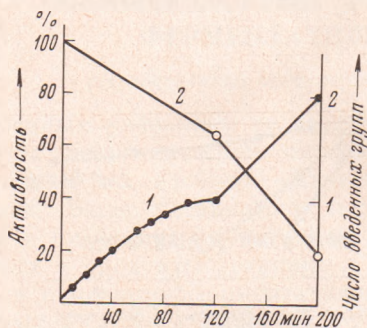


Рис. 3

Рис. 3. Тринитрофенилирование (1) и изменение активности пирофосфатазы (2) в присутствии малых избытков тринитробензолсульфокислоты в 0,5 М бикарбонатном буфере pH 8,5 и 37°. Концентрация фермента $3,2 \cdot 10^{-6}$ М, в нулевой момент концентрации ингибитора $4,0 \cdot 10^{-6}$ М, после 120 мин. его концентрация увеличена до $8,0 \cdot 10^{-6}$ М

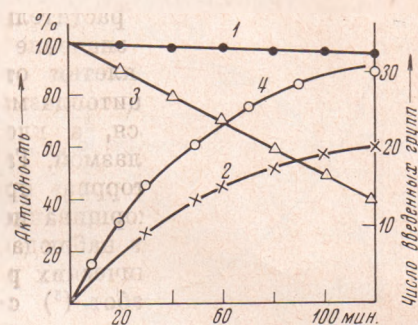


Рис. 4

Рис. 4. Тринитрофенилирование (2, 4) и изменение активности пирофосфатазы (1, 3) в присутствии (1, 2) и без (3, 4) пирофосфата в 0,05 М трис-НСl-буфере pH 8,5 и 37°. Концентрация фермента, ингибитора и пирофосфата соответственно равны $1,7 \cdot 10^{-6}$ М, $1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $1,0 \cdot 10^{-3}$ М

фосфата кальция. Фермент инкубировали с тринитробензолсульфокислотой в $1-10^{-3}$ М растворе неорганического пирофосфата. Параллельно такой же опыт проводили без пирофосфата. За ходом реакции следили по включению ТНФ-групп в белок и изменению активности.

Было установлено, что субстрат, связываясь с ферментом, защищает функциональноважные лизины от модификации. Так, при проведении реакции в присутствии 10^{-3} М неорганического пирофосфата через 2 часа после начала реакции удастся проалкилировать 20 ε-аминогрупп лизина, но активность такого белка остается без изменений. В контрольном опыте за то же время происходит модификация 30 групп, и остаточная активность составляет 40% (рис. 4). Аналогичные результаты были получены и в опытах с пирофосфатом кальция. Эти данные свидетельствуют в пользу присутствия лизина в активном центре фермента.

Таким образом, изучение реакции неорганической пирофосфатазы дрожжей с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой показало, что два остатка лизина важны для функционирования.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
15 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Байков, Л. В. Романов, С. М. Аваева, Биохимия, 38, № 2 (1973).
² Т. Окуяма, К. Sasaki, J. Biochem., 47, 454 (1960). ³ Т. Окуяма, К. Sasaki, J. Biochem., 47, 654 (1960). ⁴ А. Katakai, N. Harada, J. Biochem., 53, 553 (1964). ⁵ M. Kunitz, J. Gen. Physiol., 45, 31 (1962). ⁶ A. R. Goldfarb, Biochemistry, 5, 2570 (1966). ⁷ C. J. Coffee, B. R. Goldin, C. Friedman, Biochemistry, 10, 3516 (1971). ⁸ С. М. Аваева, О. В. Ковальчук, Хим. природн. соед., 6, 813 (1971). ⁹ W. Hausmann, J. Am. Chem. Soc., 74, 3181 (1952).