

А. К. РОМАНОВА, И. Я. ВЕДЕНИНА

ИНГИБИРОВАНИЕ РИБУЛОЗОДИФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТОМ У АВТОТРОФНЫХ ОРГАНИЗМОВ

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 22 VI 1972)

Одним из широкопринятых энзимологических тестов на действие восстановительного пентозофосфатного пути усвоения углекислоты является включение $\text{HC}^{14}\text{O}_3^-$ на рибозо-5-фосфате (Р5Ф) и АТФ *in vitro*. Фиксация углерода бикарбоната при этом обусловлена последовательным действием трех ферментов цикла Кальвина: рибозофосфатизомеразы (КФ 5.1.3.6), фосфорибулокиназы (КФ 2.7.1.19) и рибулосодифосфаткарбоксилазы (КФ 4.1.1.39). В экстрактах из водородных бактерий *Hydrogenomonas eutropha* Z-1 этот тест дал отрицательный результат ⁽¹⁾, хотя ряд других данных свидетельствует о действии у этого микроорганизма цикла Кальвина ⁽¹⁻³⁾. Напротив, в экстрактах из клеток водородных бактерий другого вида *H. facilis* показано включение C^{14} -бикарбоната в присутствии Р5Ф и АТФ в кислотоустойчивый продукт реакции ⁽⁴⁾. Противоречивость этих данных заставляет предположить, что в регуляции действия ферментов, участвующих в реакции фиксации C^{14} -бикарбоната на Р5Ф и АТФ у разных автотрофов имеются различия. Это побудило нас исследовать влияние субстратов, используемых в энзимологическом тесте, на активность последнего фермента последовательности — рибулосодифосфаткарбоксилазы. Необходимо было выяснить применимость энзимологической пробы на три фермента как качественного или количественного показателя фиксации бикарбоната по автотрофному пути в неочищенных экстрактах.

Методика. Объектами исследования служили следующие автотрофные организмы: водородные бактерии *H. eutropha* Z-1, *H. pantotropha* Z-14, *Pseudomonas palleronii* и *Alcaligenes paradoxus* ATCC 17416; тионовые бактерии *Thiobacillus thiooxidans* 58R и *T. neapolitanus* 70S; несерная фотосинтезирующая бактерия *Rhodospseudomonas palustris*; зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* (выращены в автотрофных условиях) и высшие растения — листья сахарной свеклы и проростков гороха и фасоли.

Клетки микроорганизмов, промытые и суспендированные в десятикратном объеме 0,1 *M* трис- HCl буфера pH 7,8 с 0,01 *M* меркаптоэтанолом и 0,005 *M* MgCl_2 разрушали ультразвуком в аппарате УЗДН при частоте 22 кГц в течение 15 мин. при 4°. Листья высушенных растений растирали в охлажденной фарфоровой ступке с кварцевым песком в присутствии 2,5-кратного по отношению к весу объема буферной смеси. Активность ферментов определяли после центрифугирования гомогенатов при 20 000 *g* и 0° в течение 40 мин. Как правило, скорость фиксации определяли в свежеприготовленных экстрактах, однако активность рибулосодифосфаткарбоксилазы в неочищенных экстрактах сохранялась в течение длительного времени при хранении их в замороженном виде.

Содержание белка в экстрактах из клеток, фиксацию $\text{HC}^{14}\text{O}_3^-$ на Р5Ф и АТФ и на рибулосодифосфате определяли, как описано ранее ^(1, 2). Концентрации субстратов приводятся в тексте. Активность ферментов выражали в нмолях фиксированного $\text{HC}^{14}\text{O}_3^-$, включенного за 1 мин., в пересчете на 1 мг белка.

Результаты. Добавление Р5Ф в конечных концентрациях 1,14; 5,7 и 11,4 *mM* не влияло на активность рибулосодифосфаткарбоксилазы в экст-

рактах из *H. eutropha* Z-1 и активировало фермент соответственно на 22,2, 43,7 и 151,2% в экстрактах из *T. thiooxidans* 58R. АТФ — второй субстрат энзимологического теста на действие трех ферментов ингибировал рибулозодифосфаткарбоксилазу в экстрактах из 10 испытанных автотрофных организмов. У всех объектов, кроме сахарной свеклы и фасоли при концентрации АТФ 4,4 мМ (применявшейся в энзимологической пробе на три фермента) ингибирование рибулозодифосфаткарбоксилазы превышало 90% (рис. 1). Ферменты из листьев сахарной свеклы и фасоли оказались малочувствительными к действию АТФ. Торможение реакции на 50%

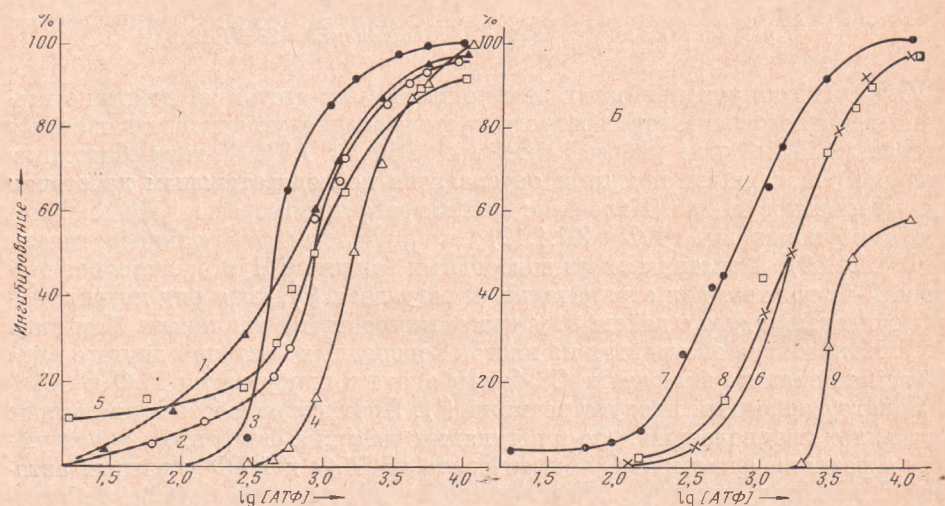


Рис. 1. Зависимость ингибирования рибулозодифосфаткарбоксилазы от концентрации АТФ (мМ) у хемоавтотрофных (А) и у фотоавтотрофных (Б) организмов. 1 — *Thiobacillus neapolitanus* 70S, 2 — *Hydrogenomonas pantotropha* Z-14, 3 — *Pseudomonas palleronii*, 4 — *Hydrogenomonas eutropha* Z-1, 5 — *Thiobacillus thiooxidans*, 58R, 6 — *Rhodospseudomonas palustris*, 7 — *Chlorella vulgaris*, 8 — горох, 9 — фасоль

(I_{50}) достигалось у разных объектов при следующих концентрациях АТФ (мМ): у *H. eutropha* Z-1 1,74; *H. pantotropha* Z-14 0,91; *P. palleronii* 0,46; *T. thiooxidans* 58R 0,91; *T. neapolitanus* 70S 0,63; *R. palustris* 1,75; *C. vulgaris* 0,68; горох 1,75 и только I_{50} для фермента листьев фасоли был близок к 4,4 мМ, а для фермента сахарной свеклы — еще выше. Кривые зависимости процента ингибирования от концентрации АТФ имели сигмоидную форму.

Степень ингибирования реакции карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата в присутствии АТФ в значительной мере зависела от порядка добавления реагентов. Наибольшее торможение (на 92%) наблюдалось при 10 мин. предынкубации экстракта из *H. eutropha* с АТФ; предынкубация ферментного препарата с АТФ при одновременном присутствии бикарбоната уменьшала ингибирование до 84%; если же фермент предынкубировали с одним бикарбонатом, а АТФ добавляли одновременно с рибулозо-1,5-дифосфатом, активность фермента снижалась только на 40%. Эти данные свидетельствуют о защитном действии ионов бикарбоната на рибулозодифосфаткарбоксилазу.

Из данных табл. 1 видно, что АМФ практически не действует на рибулозодифосфаткарбоксилазу водородных бактерий, а ингибирующее действие АДФ в несколько раз слабее действия АТФ. Эти данные свидетельствуют о том, что ингибирующим агентом является именно АТФ, а не ди- или мононуклеотид, которые могли бы образоваться из АТФ в аденилаткиназной реакции. В противном случае АМФ и АДФ должны быть более сильными ингибиторами при той же концентрации.

Последовательное действие трех ферментов при фиксации HCO_3^- на Р5Ф и АТФ предполагает частичное использование АТФ в реакции фосфорилирования рибулозо-5-фосфата. В идеальном случае снижение концентрации АТФ должно быть настолько значительным, чтобы не произошло ингибирование рибулозодифосфаткарбоксилазы. А так как имелись данные (⁵⁻⁷), что скорость реакции, катализируемой фосфорибулокиназой, у ряда автотрофных организмов достаточна, чтобы обеспечить субстратом следующую реакцию карбоксилирования, то фиксация HCO_3^- на Р5Ф и АТФ у таких организмов должна быть близка или даже может совпасть

Таблица 1

Влияние аденилатов на рибулозодифосфаткарбоксилазу в экстрактах из клеток *Hydrogenomonas eutropha* Z-1

Концентрация аденилатов, мМ	АМФ		АДФ		АТФ	
	нмол/мин на 1 мг белка	% ингибирования	нмол/мин на 1 мг белка	% ингибирования	нмол/мин на 1 мг белка	% ингибирования
0,10	24,5	0,0	24,3	0,0	24,0	1,3
0,20	22,0	9,5	23,4	3,7	19,4	20,2
1,00	22,3	8,2	15,2	37,4	5,1	79,0
3,00	23,2	4,5	11,4	53,0	1,9	92,2

количественно с фиксацией на рибулозо-1,5-дифосфате. Из исследованных нами объектов это наблюдалось только на примере сахарной свеклы (табл. 2). В других случаях, когда активность фосфорибулокиназы недостаточно велика, чтобы существенно понизить исходную концентрацию АТФ, ингибирующую рибулозодифосфаткарбоксилазу, усиление включения HCO_3^- на Р5Ф и АТФ можно получить, снижая исходную концентрацию АТФ до некоторого критического значения, обеспечивающего субстратом фосфорибулокиназу, но не ингибирующего рибулозодифосфаткар-

Таблица 2

Включение HCO_3^- в экстрактах из клеток автотрофных организмов в присутствии 5,7 мМ рибулозо-5-фосфата и двух концентраций АТФ в сравнении с активностью рибулозодифосфаткарбоксилазы (нмол/мин на 1 мг белка)

Организм	Р5Ф + 4,4 мМ АТФ	Р5Ф + 0,22 мМ АТФ	Рибулозо-1,5-дифосфат
<i>Hydrogenomonas eutropha</i> Z-1	0	0	30,0
<i>Hydrogenomonas pantotrophica</i> Z-14	0	0	32,5
<i>Pseudomonas palleronii</i>	0	0	16,0
<i>Alcaligenes paradoxus</i> ATCC 17116	0	—	28,5
<i>Thiobacillus thiooxidans</i> 58R	1,42	4,95	50,1
<i>Thiobacillus neapolitanus</i> 70S	0	—	6,7
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	0	—	6,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,46	3,30	3,1
Горох, листья 25-суточных проростков	5,5	40,6	68,4
Сахарная свекла	76,5	—	97,5
Фасоль	10,4	39,0	32,7

боксилазу. Для проверки этого положения мы определили интенсивность фиксации HCO_3^- на Р5Ф при двух концентрациях АТФ: 4,4 и 0,22 мМ в сравнении с фиксацией на рибулозо-1,5-дифосфате в экстрактах из разных автотрофных организмов.

Полученные данные отчетливо показали (табл. 2), что первоначально принятые условия проведения теста на присутствие трех ферментов цикла Кальвина непригодны не только для водородных бактерий, но и для ряда других объектов из-за ингибирующего действия АТФ. Действительно,

снижение концентрации АТФ в ферментной смеси до 0,22 мМ у некоторых организмов привело к увеличению фиксации радиоуглерода бикарбоната. В ряде случаев фиксация C^{14} на Р5Ф и 0,22 мМ АТФ была близка по величине к активности рибулозодифосфаткарбоксилазы. Однако в ряде случаев включение на Р5Ф и АТФ все же было ниже включения на рибулозо-1,5-дифосфате и составляло 52,6% у *T. thiooxidans* 58R и 59,6% у гороха (активность рибулозодифосфаткарбоксилазы принята за 100%). Ни у одного из испытанных штаммов водородных бактерий не удалось получить включения $HC^{14}O_3^-$ на Р5Ф и АТФ ни при одной из использовавшихся концентраций АТФ (минимальная 0,12 мМ).

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что обычно применяемая для демонстрации ключевых ферментов цикла Кальвина энзимологическая проба — фиксация $HC^{14}O_3^-$ на Р5Ф и АТФ — может рассматриваться лишь как качественная реакция. Получение количественных результатов возможно только после тщательного подбора исходных концентраций субстратов. Причиной ограничения скорости суммарной реакции является подавление активности рибулозодифосфаткарбоксилазы при высокой концентрации АТФ в ферментной смеси. Четкой корреляции между систематическим положением или особенностями энергетического обмена организмов и степенью торможения (I_{50}) или коэффициентом кооперативности центров связывания АТФ у исследованных организмов обнаружить не удалось. Торможение рибулозодифосфаткарбоксилазы, обнаруженное *in vitro*, может иметь место и в неповрежденном организме, так как ингибирующие концентрации АТФ близки к физиологическим⁽⁸⁾. У водородных бактерий ингибирование рибулозодифосфаткарбоксилазы не является единственной причиной отсутствия фиксации $HC^{14}O_3^-$ на Р5Ф и АТФ. Возможно, что вторая причина отсутствия фиксации — недостаточная активность фосфорибулокиназы в экстрактах вследствие повреждения фермента или нарушения регуляции его действия при выделении из клеток.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
22 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. К. Романова, И. Я. Веденина, А. Н. Ножевникова, Микробиология, **39**, 557 (1970). ² А. К. Романова, И. Я. Веденина, Н. Г. Доман, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 363 (1968). ³ А. К. Романова, И. Я. Веденина и др., Биохимия, **36**, 408 (1971). ⁴ R. D. MacElroy, M. K. Johnson, E. J. Johnson, Arch. Biochem. and Biophys., **131**, 272 (1969). ⁵ J. Hurwitz, A. Weissbach et al., J. Biol. Chem., **218**, 2, 769 (1956). ⁶ H. Truper, Arch. Mikrobiol., **49**, 23 (1964). ⁷ P. S. Rao, D. J. D. Nicholas, Biochim. et biophys. acta, **124**, 2, 221 (1966). ⁸ W. H. Holms, I. D. Hamilton, A. G. Robertson, Arch. Mikrobiol., **83**, 2, 95 (1972).