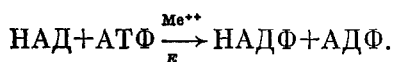


И. Д. ИНСАРОВА, А. Н. ЛЕБЕДЕВ, В. И. ТЕЛЕПНЕВА

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА НАД-КИНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 6 VIII 1974)

Трифосфопиридиннуклеотид в окисленной и восстановленной формах является необходимым участником большого числа метаболических процессов. Содержание этого кофермента в тканях определяется соотношением скоростей процессов его биосинтеза и распада. Для подавляющего большинства тканей животных и растений, а также для ряда микроорганизмов показан единственный путь образования НАДФ, осуществляемый ферментом НАД-киназой (АТФ : НАД 2'-фосфотрансферазой КФ 2.7.1.23) по реакции:



НАД-киназа, катализируя биосинтез НАДФ, может, в известной мере, регулировать и соотношение между двумя никотинамидными коферментами в органах и тканях. С этой точки зрения оправдан интерес, проявляемый к изучению НАД-киназ из самых разнообразных источников.

В настоящее время фермент выделен в частично очищенном виде из тканей животных и растений, а также микроорганизмов. Изучение каталитических свойств НАД-киназ из всех исследованных до сих пор источников показало, что лишь кинетика ферментов из митохондрий пекарских дрожжей⁽¹⁾, яиц морского ежа⁽²⁾ и скелетных мышц кролика⁽³⁾ не подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. Наиболее значительные отклонения от гиперболы при изучении зависимости v от $[S]_0$ обнаружены для НАД-киназы из скелетных мышц кролика. Кинетические характеристики этого фермента в большой степени зависят от концентрации белка⁽³⁾, рН среды⁽⁴⁾ и длительности хранения ферментного препарата^(3, 4). Методами тонкослойной гельфильтрации через сефадекс G-200⁽⁵⁾ и электрофореза в градиенте полиакриламидного геля⁽⁶⁾ в нашей лаборатории было обнаружено присутствие нескольких молекулярных форм в препарате НАД-киназы из скелетных мышц кролика. Способность молекулярных форм фермента осуществлять взаимные переходы позволила составить представление о НАД-киназе скелетных мышц, как о равновесной системе олигомеров, состоящих из различного числа субъединиц.

В настоящей работе представлены результаты дальнейших исследований структурных особенностей и кинетических свойств олигомерных форм НАД-киназы скелетных мышц кролика.

В работе использовали ферментный препарат, очищенный по методу, разработанному Беляевой^(3, 4), с некоторыми модификациями. Внесенные изменения заключались в снижении степени насыщения сульфатом аммония (с 60 до 52%), в замене трис-НСI буфера при диализе К-фосфатным буфером рН 8,0 и в проведении термообработки при более высокой температуре (при 58° С вместо 56° С). Удельная активность фермента в результате процедуры очистки повышалась в 100—120 раз, а выход активности составлял 70—85%. Препарат не содержал сопутствующих активностей, способных вызывать расщепление субстратов и продукта реакции.

Синтез НАДФ осуществляли в среде, содержащей в общем объеме 1 мл, следующие компоненты: 50 мкмол. трис-НСI рН 7,3; 3 мкмол. АТФ, 3 мкмол НАД, 10 мкмол. MgCl₂, от 15 до 400 мкг исследуемого белка. Инкубацию проводили при 37° в течение 1 часа, реакцию останавливали нагреванием в кипящей водяной бане. В указанных условиях реакция протекает линейно в течение 1,5 час. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое катализирует образование 1 нмоля НАДФ в 1 час в данных условиях. Количество синтезированного НАДФ определяли в безбелковом фильтрате по методу Слейтера (7) на спектромоме-360 при 600 нм.

Гельфильтрацию ферментного препарата проводили через сефадекс G-200 средний на колонке размером 2,5×50 см. В качестве элюирующего раствора использовали 0,05 М К-фосфатный буфер рН 7,3, содержащий 0,3 М КСI. Скорость протекания раствора через колонку составляла 3,6 мл/час, гидростатическое давление равнялось 14 см. На колонку наносили 8–12 мг белка в объеме 2 мл. Свободный объем колонки составлял 70 мл. Белок определяли спектрофотометрически при 220–230 нм. Поглощение в этих условиях обусловлено наличием пептидных связей в белке; данный метод является чрезвычайно чувствительным и позволяет уловить до 2 мкг белка в 1 мл (8). Об активности НАД-киназы в элюатах судили по скорости синтеза НАДФ в инкубационной среде. Условия инкубации и определения активности описаны выше.

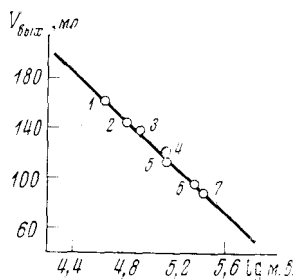


Рис. 1. Калибровочный график зависимости объема выхода белка от логарифма его молекулярного веса. 1 — овальбумин, 2 — БСА (М), 3 — креатинкиназа, 4 — БСА (Д), 5 — лактатдегидрогеназа, 6 — пируваткиназа, 7 — БСА (Т)

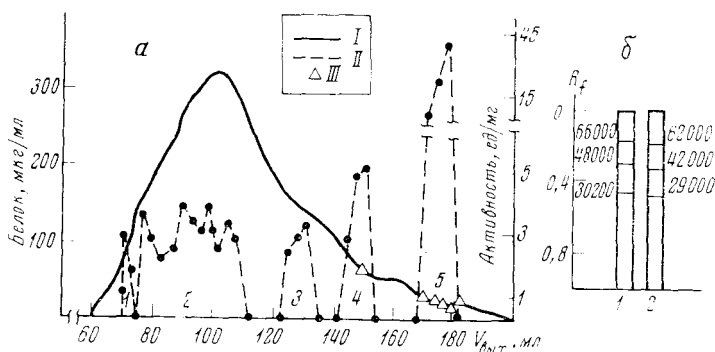


Рис. 2. а — профиль элюции белка и выхода НАД-киназы при гельфильтрации ферментного препарата через колонку сефадекса G-200. I — белок, II — удельная активность НАД-киназы, III — фракции, исследованные электрофоретически; 1–5 — номера фракций; б — схема электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. 1 — фракция, объем выхода которой составляет 150 мл (м. в. 62 000), 2 — объединенная фракция, объем выхода которой составляет 168–180 мл (м. в. 28 000–33 000). Цифрами обозначены молекулярные веса белков

Молекулярный вес содержащих НАД-киназу фракций определяли по калибровочному графику зависимости объема выхода белка от логарифма его молекулярного веса (рис. 1). В качестве белков-стандартов использовали: овальбумин — 45000; бычий сывороточный альбумин (БСА) — мономер (М) — 67000, димер (Д) — 134000, тетрамер (Т) — 268000; креатинкиназу — 80000; лактатдегидрогеназу — 140000; пируваткиназу — 237000.

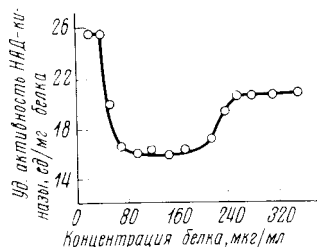
Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСNa) проводили в 10% полиакриламидном геле по методике Вебера и Осборн⁽⁹⁾. Наносили 20—60 мкг белка на трубочку; электрофорез проводили в течение 6 час. при силе тока 8 ма на трубочку. Столбики геля окрашивали 0,25% раствором кумасси бриллиантового, приготовленным на смеси метанол: ледяная уксусная кислота: вода в соотношении 5:1:5, в течение 40—60 мин. Подвижность белка (R_f) определяли по формуле $R_f = l_6/l_{m.ц}$, где l_6 — расстояние, пройденное белком, а $l_{m.ц}$ — расстояние, пройденное мономером цитохрома *c*. Следует отметить, что в описанных условиях цитохром *c* образует две формы: агрегированную и дезагрегированную (димер и мономер соответственно). Молекулярный вес рассчитывали по калибровочному графику зависимости R_f от логарифма молекулярного веса.

Изучение четвертичной структуры НАД-киназы, начатое нами методом разделения в тонком слое сефадекса⁽⁵⁾, было продолжено в настоящей работе с помощью метода гельфильтрации через колонку. В результате разделения препарата на колонке с сефадексом выявлен только один асимметричный пик белка (рис. 2а, I). Однако НАД-киназной активностью обладали пять фракций (рис. 2а, II). Белки низкомолекулярных фракций, обнаруживающие ферментативную активность, имеют молекулярные веса, соответствующие 31000 (фракция 5), 62000 (фракция 4) и 94000 (фракция 3). Фракция 2 охватывает большой диапазон молекулярных весов от 150000 до 310000. Наиболее высокомолекулярная форма (370000 — фракция 1) присутствует не во всех исследованных препаратах НАД-киназы. Значения молекулярных весов различных форм НАД-киназы, определенные в настоящей работе, совпадают с полученными нами ранее⁽⁶⁾, за исключением выявленной впервые высокоассоциированной формы (370000). Ее образование, по-видимому, обусловлено высокой ионной силой раствора. Величины же молекулярных весов более низкомолекулярных форм фермента, определенные различными методами, совпадают.

Оставался невыясненным вопрос о том, является ли белок с молекулярным весом 31000 субъединицей НАД-киназы или он способен (в более жестких условиях) к дальнейшей диссоциации.

С целью получить ответ на этот вопрос было проведено электрофоретическое исследование двух снятых с колонки фракций после их обработки ДСNa. Использовали фракции, обладающие молекулярным весом 62000 (объем выхода 150 мл) и объединенную фракцию 28000—33000 после ее концентрирования (объем выхода 168—180 мл). Результаты электрофореза приведены на рис. 2б. Можно видеть, что белки с молекулярным весом, меньшим, чем 30000, отсутствуют. В обеих исследованных фракциях, кроме низкомолекулярных белков с молекулярным весом порядка 30000, обнаружено еще два белка с молекулярными весами 42000—48000 и 62000—66000. Неясно, что представляет собой белок с молекулярным весом 62000—66000: балластный белок, не обладающий ферментативной активностью (так как препарат НАД-киназы не гомогенен) или димер НАД-киназы. Известно, что некоторые белки агрегируют в ДСNa (например, цитохром *c*) или устойчивы к его воздействию (гиалуронидаза при исследовании в ДСNa образует две полосы, соответствующие тетрамеру и мономеру⁽¹⁰⁾). Форма с молекулярным весом 42000—48000, количество которой крайне незначительно, по-видимому, является примесным белком, так как ее молекулярный вес не кратен 30.

Рис. 3. Зависимость удельной активности НАД-киназы от концентрации фермента



Следует отметить, что удельная активность НАД-киназы повышается по мере перехода к низкомолекулярным формам, достигая максимальной величины во фракции 5, соответствующей белку с молекулярным весом

31000 (рис. 2а). Имеющиеся в нашем распоряжении данные не дают однозначного ответа на вопрос о причине возрастания удельной активности фермента. Одним из объяснений можно считать высокую степень очистки фермента в указанных фракциях, характеризующихся низким содержанием белка. Нельзя исключить и другое объяснение, заключающееся в том, что неассоциированные низкомолекулярные формы НАД-киназы проявляют более высокую активность. Вероятность последнего предположения подтверждают результаты, полученные при изучении зависимости удельной активности от концентрации фермента (рис. 3). Как известно, агрегирующие системы могут подвергаться распаду на составляющие части при понижении концентрации; наоборот, повышение концентрации способствует ассоциации мономеров в более крупные агрегаты⁽¹¹⁾. Хотя полученные результаты не дают прямых доказательств того, какая или какие из множественных форм НАД-киназы обладают максимальной активностью, анализ многократно воспроизведенной кривой, изображенной на рис. 3, позволяет констатировать, что наиболее диссоциированные и наиболее ассоциированные в данных условиях формы фермента (левая и правая ветви) способны осуществлять синтез НАДФ с заметно большей скоростью, чем формы промежуточного молекулярного веса (средний участок кривой). Причем значительное разведение НАД-киназы (25 мкг белка в 1 мл) способствует проявлению максимальной активности фермента.

Результаты исследования активности НАД-киназы во фракциях после разделения на колонке наряду с кинетическими исследованиями позволяют сделать заключение о более высокой активности низкомолекулярных форм фермента. Вопрос о величине молекулярного веса формы НАД-киназы, обладающей наибольшей активностью, продолжает оставаться недостаточно ясным из-за перехода одних форм в другие. И хотя трудно предположить ассоциацию молекул в элюатах с колонки при чрезвычайно низкой концентрации белка, однако полностью исключить такую возможность нельзя, так как присутствие субстратов и высокая ионная сила могут способствовать смещению равновесия между белковыми олигомерами в сторону образования формы с молекулярным весом, большим, чем 31000.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова.

Поступило
25 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. K. Apps, *Europ. J. Biochem.*, v. 13, 223 (1970). ² C. H. Blomquist, *J. Biol. Chem.*, v. 248, 22, 7044 (1973). ³ Н. Ф. Беллева, В. И. Теленнева, *ДАН*, т. 209, № 4, 977 (1973). ⁴ Н. Ф. Беллева, В. И. Теленнева, Сб.: Витаминьы, № 7, 1972. Биохимия синтеза и обмена коферментов и коферментных витаминов. Матер. I Всесоюз. симпозиума, Киев, январь, 1972, стр. 6. ⁵ Н. Ф. Беллева, И. Д. Певзнер, В. И. Теленнева, II Всесоюз. конфер. по биохимии мышечной системы, Л., 1972, стр. 26. ⁶ В. И. Теленнева, И. Д. Инсарова, *ДАН*, т. 248, № 1 (1974). ⁷ T. F. Slater, B. Sawyer, U. Sträuli, *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, v. 72, 3, 427 (1964). ⁸ N. Catsimpoilas, J. Kenney, *J. Chromatogr.*, v. 71, 573 (1972). ⁹ K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, v. 244, 16, 4406 (1969). ¹⁰ A. Y. Khorlin, I. V. Vikha, A. N. Milishnikov, *FEBS Letters*, v. 31, 5, 107 (1973). ¹¹ Б. И. Курганов, В сб. Аллостерическая регуляция действия ферментов, М., 1971, стр. 57.