

Академик С. Е. СЕВЕРИН, Е. С. СЕВЕРИН, Л. И. МИХАЙЛОВА,
Н. Н. ГУЛЯЕВ, П. Л. ВУЛЬФСОН

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФОСФОРИЛАЗЫ Б ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ХЛОРМЕТИЛФОСФОНАТОМ

В ряде работ, посвященных изучению роли пиридоксальфосфата (ПДФ) в молекуле фосфорилоразы В (ФВ), были использованы различные химические аналоги ПДФ (¹⁻⁴). Аналоги ПДФ, лишнные фосфатной группы или с замещенной фосфатной группой, связываются с апофосфорилоразой В (апо-ФВ), образуя комплексы, не обладающие ферментативной активностью (^{1, 3, 5}). Эти данные свидетельствуют о значении фосфатной группы кофермента для ферментативной реакции (⁶). Если предположить, что фосфатная группа ПДФ принимает участие в катализе, то можно ожидать, что фосфатный остаток располагается в непосредственной близости от субстратной площадки активного центра ФВ. В связи с этим представляет интерес избирательное блокирование функциональных групп активного центра фермента, участвующих во взаимодействии с фосфатной группой кофермента. Нами (⁷) были изучены ингибирующие свойства аналога ПДФ — ПЛ-5'-хлорметилфосфоната, у которого одна из гидроксильных групп фосфатного остатка с рК 6,2 замещена на хлорметильную группировку. Это соединение, обладая алкилирующими свойствами, способно ковалентно блокировать одну из функциональных групп активного центра ФВ.

В настоящей работе проведено изучение взаимодействия данного аналога ПДФ с апо-ФВ. Исследованы свойства фермент-ингибиторного комплекса, из триптического гидролизата которого выделен и очищен пептид активного центра.

Кристаллическую ФВ получали методом Фишера и др. (⁸). Использовали препараты ФВ, перекристаллизованные 4 раза. Апо-ФВ получали в присутствии деформирующего агента (имидазол-цитратный буфер рН 6,2) и *l*-цистеина (⁹). Реакцию между апо-ФВ и ПЛ-5'-хлорметилфосфонатом проводили в буфере, содержащем 0,05 М β-глицерофосфат, 0,001 М ЭДТА рН 6,8 при 30° в течение 1—2 час. в присутствии 10- или 20-кратного молярного избытка ПЛ-5'-хлорметилфосфоната или аналога ПЛ-5'-хлорметилфосфоната. Для реактивации фермента к комплексу апо-ФВ с аналогом ПЛ-5'-хлорметилфосфоната добавляли 10- или 20-кратный молярный избыток ПЛ-5'-хлорметилфосфоната. Инкубировали 10 мин. в тех же условиях. Ферментативную активность определяли по синтезу гликогена (¹⁰); белок — методом Лоури. Избыток ПЛ-5'-хлорметилфосфоната удаляли гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-25. Для выделения пептидов брали 100—400 мг нативной ФВ или комплекса апо-ФВ с аналогом ПЛ-5'-хлорметилфосфоната, обрабатывали 8 М мочевиной и моноодацетатом. После алкилирования SH-групп избыток реагентов удаляли диализом против 0,001 М HCl. Триптический гидролиз проводили в течение 3-х час. в 1% NH₄HCO₃-буфере рН 8,2—8,4. На первой стадии очистки на колонке с сефадексом G-25 (2,5×100 см) из триптического гидролизата выделен флуоресцирующий пептидный материал. Полученные флуоресцирующие пептиды очищали с помощью высоковольтного электрофореза при рН 6,5 и 3,5, после чего проводили гель-фильтрацию через колонку с сефадексом G-25 (1×40 см). Первичную структуру пептидов определяли методом Эдмана с использованием дансилхлорида (¹¹). N-концевые аминокислоты

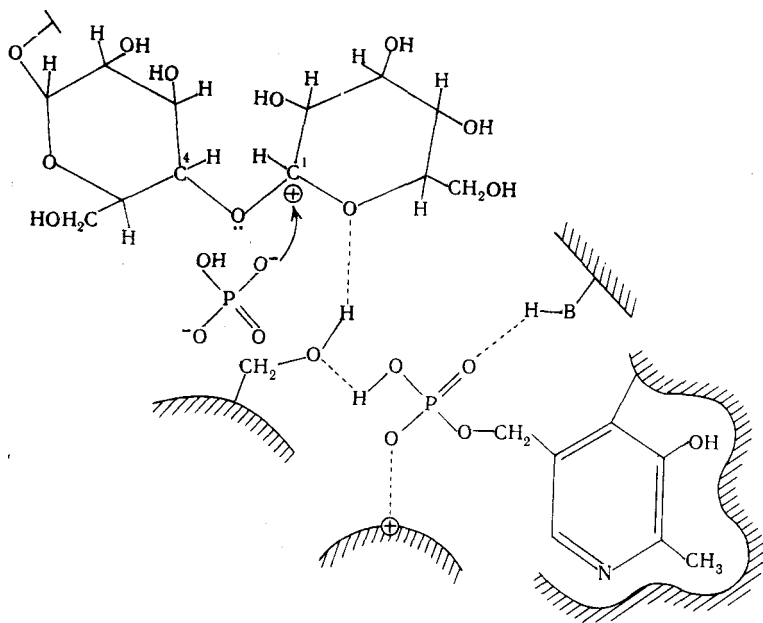


Рис. 2. Схема гипотетического механизма ферментативной реакции

В этом пептиде ПЛФ связан с ϵ -аминогруппой лизина. Для идентификации остатка ϵ -пиридоксиллизина в составе пептида был использован синтезированный нами препарат ϵ -пиридоксиллизина. Пиридоксалевый пептид, выделенный в настоящей работе из нативной ФБ, существенно отличается по своей структуре от ранее описанного в литературе (¹⁶).

После того, как была осуществлена аналогичная процедура очистки флуоресцирующего пептидного материала, выделенного из комплекса апо-ФБ с аналогом ПЛФ, получены два ПЛФ-содержащих пептида, подвергнутые детальному анализу. Эти пептиды обозначены под № 1 и № 2.

Апо-ФБ — аналог ПЛФ: $\overline{\text{Tyr}} - \overline{\text{Gly}} - \overline{\text{Thr}}$ (Pro, Lys, Glx, Glx, AspX, Arg)
пептид № 1

|
Pxy — 5 — P

Апо-ФБ — аналог ПЛФ: $\overline{\text{Phe}} - \overline{\text{Leu}} - \overline{\text{Ser}}$ (Glx, AspX, Ala) $\overline{\text{Arg}}$
пептид № 2

|
Pxy — 5 — P

По данным анализа N-концевых аминокислот в пептиде № 1 обнаружен тирозин, а в пептиде № 2 — фенилаланин. При прохождении двух шагов по методу Эдмана в пептиде № 1 идентифицированы два аминокислотных остатка: глицин и треонин. В пептиде № 2 после первого и второго отщепления по Эдману определены лейцин и серин. По данным аминокислотного анализа в пептиде № 1 содержится 9 аминокислотных остатков. При аминокислотном анализе второго пептида установлено, что он состоит из семи аминокислотных остатков. На основании полученных данных можно было предположить, что под действием ПЛ-5'-хлорметилфосфоната происходит блокирование остатка серина, входящего в состав 7-членного пептида; пептид № 1 соответствует пептиду нативной ФБ.

Таким образом, в результате реакции между аналогом ПЛФ и апо-ФБ в активном центре фермента происходит ковалентное блокирование остатка серина, расположенного в непосредственной близости от фосфат-

ной группы кофермента. В последнее время рядом авторов было высказано предположение о возможной роли фосфатного остатка ПЛФ в функционировании ФБ (¹, ⁴, ⁶). Выделение ПЛФ-содержащего пептида из комплекса апо-ФБ с аналогом ПЛФ, в котором фосфатная группа связана с остатком серина, дает возможность считать участие гидроксильной группы серина в сопряженной системе электронных переходов. В сопряженной системе, по всей вероятности, участвуют также кислородный атом кольца глюкозы и кислородный атом фосфатной группы кофермента. Можно полагать, что фосфатная группа кофермента способствует расщеплению гликозидной связи, выполняя при этом функцию донора протона. Протоно-донорные (или акцепторные) свойства гидроксильной группы фосфатного остатка ПЛФ с рК 6,2, расположенного в активном центре молекулы ФБ, могут определяться также взаимодействием кислородных атомов фосфатного остатка с положительно заряженным локусом активного центра и с ОН-группой остатка серина. Функционирование такой сопряженной системы обеспечит создание положительного заряда на С-1 углеводе остатка глюкозы и тем самым облегчит разрыв α -1,4-гликозидной связи в молекуле гликогена. Схема гипотетического механизма ферментативной реакции представлена на рис. 2.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
11 X 1974

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Kastenschmidt, J. Kastenschmidt, E. Helmreich, *Biochemistry*, v. 7, 3590 (1968).
² B. Illingworth, H. Janz, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 44, 1180 (1958). ³ T. Pfeuffer, J. Ehrlich, E. Helmreich, *Biochemistry*, v. 11, 2125 (1972). ⁴ T. Pfeuffer, J. Ehrlich, E. Helmreich, *Biochemistry*, v. 11, 2136 (1972). ⁵ S. Shaltiel, J. Hedrick et al., *Biochemistry*, v. 8, 5189 (1969). ⁶ M. Cortijo, S. Shaltiel, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, v. 39, 212 (1970). ⁷ Н. Н. Гуляев, М. Б. Агаларова и др., *Биохимия*, т. 39, в. 5, 1040 (1974). ⁸ E. Fischer, E. Krebs, *Methods in Enzymol.*, v. 5, 369 (1962). ⁹ S. Shaltiel, J. Hedrick, E. Fischer, *Methods in Enzymol.*, v. 11, 675 (1967). ¹⁰ B. Illingworth, G. Cory, *Biochem. Prep.*, v. 3, 1 (1953). ¹¹ W. Gray, *Methods in Enzymol.*, v. 11, 139 (1967). ¹² T. Koide, S. Tsunasawa, T. Ikenaka, *Europ. J. Biochem.*, v. 32, 408 (1973). ¹³ Б. Г. Беленький, Э. С. Ганкина, В. В. Нестеров, *ДАН*, т. 172, 91 (1967). ¹⁴ K. Woods, K. Wang, *Biochim. et biophys. acta*, v. 113, 366 (1967). ¹⁵ H. Gibbs, *J. Biol. Chem.*, v. 72, 649 (1927). ¹⁶ H. Forrey, C. Sevilla et al., *Biochemistry*, v. 10, 3132 (1971).