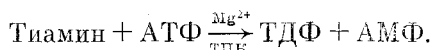


А. И. ВОСКОБОЕВ, И. П. ЧЕРНИКЕВИЧ, Ю. М. ОСТРОВСКИЙ

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 29 I 1975)

Коферментные функции тиаминдифосфата (ТДФ) в реакциях декарбонирования кетокислот и транскетолазной реакции достаточно хорошо известны. В этой связи все больший интерес представляет изучение биосинтеза ТДФ, осуществляемого тиаминпирофосфокиназой (АТФ: тиаминпирофосфотрансфераза, КФ 2.7.6.2) по следующему механизму:



Кроме АТФ, по данным некоторых авторов (^{1, 2}), субстратной специфичностью обладали другие нуклеотидтрифосфаты (НТФ), однако их донорная активность была значительно ниже, чем у АТФ. Кроме того, по мере очистки фермента, специфичность тиаминпирофосфокиназы (ТПК) к другим НТФ резко снижалась. Следует отметить, что данные по субстратной специфичности вообще крайне противоречивы, как отмечается в обзоре (³); поскольку, во-первых, опыты проводились не с хроматографически чистыми препаратами НТФ и, во-вторых, не с гомогенным ферментным белком. Исходя из этого выдвигались концепции: 1) «истинным» субстратом ТПК является АТФ, а другие НТФ прежде чем включиться в реакцию превращаются в АТФ примесью других ферментных белков, и 2) тиаминпирофосфокиназа содержит в своем составе ряд белков (изоферментов), специфичных к определенным НТФ. Поскольку нами был разработан метод очистки ТПК и получен гомогенный препарат фермента (⁴), не содержащий неспецифических белков, целью данной работы было изучить субстратную специфичность тиаминпирофосфокиназы, используя хроматографически чистые препараты НТФ. Выделение и очистку фермента проводили по ранее описанному методу (³), а очистку НТФ на ДЭАЭ-сефадексе А-25. При этом оказалось, что АТФ, ГТФ, ИТФ, ЦТФ, УТФ фирмы «Reanal» содержат помимо основного вещества до 5% монофосфатов, 30% дифосфатов и 6% полифосфатов (тетрапентафосфаты), хотя сроки годности препаратов еще далеко не истекли. Сведениями об условиях хранения и транспортировки НТФ до поступления в нашу лабораторию мы не располагали. Определение активности фермента проводили в стандартных условиях: 1 мл инкубационной смеси содержал $2 \cdot 10^{-5}$ М тиамин, 20 мкг ТПК, $2 \cdot 10^{-3}$ М трис-НСl pH 8,6 и соответствующие (оптимальные) соотношения металл/НТФ. После часовой инкубации при 40° реакцию останавливали кипячением в течение 1 мин., а содержание ТДФ определяли ферментативным методом (^{5, 6}). Удельную активность фермента выражали в эмоль ТДФ, синтезированного 1 мг белка за 1 час. Определение белка проводили по методу Лоури (⁷).

Поскольку «истинным» субстратом ТПК является комплекс $\text{Mn} : \text{Mg} : \text{АТФ}$ необходимо было подобрать оптимальные соотношения между субстратом и активатором.

Как видно из рис. 1, оптимальные соотношения НТФ с ионами Mg^{2+} выражаются следующим образом: Г : И : У : А : Ц = 4 : 4 : 4 : 4 : 20, а с Mn^{2+} — Г : И : У : А : Ц = 0,55 : 0,75 : 1,0 : 1,2 : 1,5. Кроме того, как Mg^{2+} , так и Mn^{2+} являются аллостерическими активаторами фермента, поскольку

кривые насыщения металлами характеризовались S-образностью. Из представленных данных также четко явствует, что АТФ не является оптимальным субстратом, так как при произвольно выбранных концентрациях НТФ $1 \cdot 10^{-3}$ M количество синтезируемого ТДФ в присутствии АТФ и ЦТФ наименьшее. Поскольку ТПК была выделена нами в гомогенизованном состоянии, можно с уверенностью сказать, что фермент обладает широкой субстратной специфичностью.

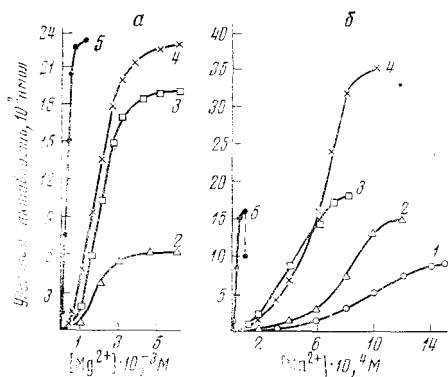


Рис. 1

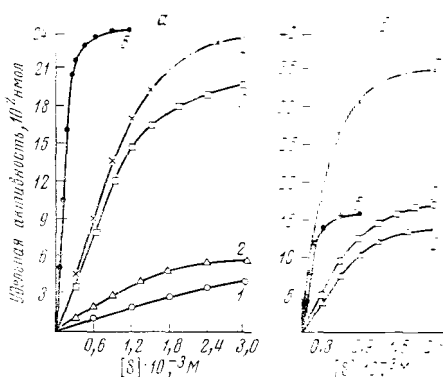


Рис. 2

Рис. 1. Оптимальные соотношения ионов Mg^{2+} (а) и Mn^{2+} (б) с различными нуклеотидтрифосфатами в качестве доноров тиаминпирофосфокиназной реакции. Концентрации нуклеотидтрифосфатов: 1 – ЦТФ $1 \cdot 10^{-3}$ M; 2 – АТФ $1 \cdot 10^{-3}$ M; 3 – ИТФ $1 \cdot 10^{-3}$ M; 4 – УТФ $1 \cdot 10^{-3}$ M; 5 – ГТФ $1 \cdot 10^{-4}$ M

Рис. 2. Зависимость скорости ТПК реакции от концентрации различных нуклеотидтрифосфатов при оптимальных соотношениях Mg^{2+} (а) и Mn^{2+} (б). 1 – ЦТФ, 2 – АТФ, 3 – ИТФ, 4 – УТФ, 5 – ГТФ

Исходя из вышесказанного, следующий этап работы заключался в исследовании субстратной специфичности тиаминпирофосфокиназы с ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} в качестве активаторов при оптимальных соотношениях металл/НТФ.

Как видно из рис. 2а, фермент обладал наибольшей удельной активностью с ГТФ и УТФ в качестве субстратов. В присутствии этих НТФ синтезировалось в 5 раз больше ТДФ (с ионами Mg^{2+}), нежели с АТФ. Полученные данные также свидетельствуют о том, что ГТФ обладал наибольшим сродством к ферменту. Расчет K_M в координатах Лайнуивера – Берка показал, что она равна $2,4 \cdot 10^{-4}$ M; $8 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $1,2 \cdot 10^{-3}$ для ГТФ, УТФ, ИТФ и АТФ соответственно.

Несколько иная картина наблюдалась при использовании Mn^{2+} в качестве активатора. В этом случае значительно увеличивался синтез ТДФ в присутствии почти всех нуклеотид-трифосфатов (в 2–3 раза), за исключением ГТФ и ИТФ. Такой эффект, по-видимому, можно объяснить различием в связывании Mg^{2+} и Mn^{2+} с нуклеотидами. О том, что это действительно так, свидетельствует тот факт, что кроме общего места связывания по фосфатам, Mn^{2+} , который имеет незаполненную *d*-орбиталь, взаимодействует с атомом азота N_7 пуриновых оснований, преимущественно гуанинов (6). Данные я.м.р. показывают, что при этом происходит лабильзация протона связи C_8-H (9) и могут происходить конформерные переходы. Образовавшийся конформер ГТФ, по-видимому, хуже связывается в активном центре фермента. Именно этим можно также объяснить резкое ингибирование синтеза ТДФ в присутствии ГТФ сравнительно невысокими концентрациями Mn^{2+} (рис. 1а).

Кроме того, из данных, представленных на рис. 2б, следует, что наибольшей донорной активностью обладал УТФ. В присутствии этого НТФ син-

тезировалось в 2—3 раза больше тиаминдифосфата (с ионами Mn^{2+}), чем с АТФ. Менее активным был ЦТФ.

Расчет K_m показал, что они равны $2 \cdot 10^{-4} M$; $7,5 \cdot 10^{-4} M$; $8 \cdot 10^{-4} M$ и $1 \cdot 10^{-3} M$ для ГТФ, УТФ, ИТФ, АТФ соответственно, т. е. существенно не отличаются от K_m , полученных для этих нуклеотидтрифосфатов в присутствии ионов Mg^{2+} . Таким образом АТФ обладал наименьшим средством к ферменту и был отнюдь не лучшим субстратом для тиаминширофосфокиназы.

Известно, что АМФ, второй продукт реакции, угнетает синтез ТДФ. Наши же данные показали, что при добавлении в АТФ (тиамин) — ТПК-систему ГМФ, УМФ, ИМФ, ЦМФ и АМФ наибольшим ингибиторным эффектом обладали УМФ и ГМФ, что также свидетельствует о большем средстве этих нуклеотидов к молекуле фермента.

Исходя из полученных данных, номенклатурное название тиаминширофосфокиназа (АТФ: тиаминширофосфотрансфераза) нам кажется не совсем корректным. Следовало бы называть фермент УТФ: тиаминширофосфотрансфераза, или исходя из его широкой субстратной специфичности — ИТФ: тиаминширофосфотрансфераза.

Академия наук БССР
Отдел регуляции обмена веществ
Гродно

Поступило
27 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Y. Kaziro, J. Biochem., v. 46, 1587 (1959). ² Y. Mano, R. Tanaka, J. Biochem., v. 47, 401 (1960). ³ А. И. Воскобоев, И. П. Черникевич, Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты, Минск, 1974, стр. 70. ⁴ А. И. Воскобоев, И. П. Черникевич, Ю. М. Островский, Весті АН БССР, т. 4, 106 (1974). ⁵ I. Ullrich, Enzymology, v. 18, 7884 (1970). ⁶ R. Naveke, H. Goedde, H. Holzer, Arch. Microbiol., v. 88, 93 (1962). ⁷ O. Lowry, N. Rosenbert et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁸ G. Luck, Ch. Zimmer, Europ. J. Biochem., v. 29, 528 (1972). ⁹ I. A. Anderson, G. P. Kunitz et al., Biochemistry, v. 10, 4368 (1971).