

В. Р. ШАТИЛОВ, В. Г. АМБАРЦУМЯН,
М. А. КАСПАРОВА, член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

АКТИВАЦИЯ НАДФ-Н И ГЛЮТАМАТОМ СПЕЦИФИЧНОЙ К НАДФ ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ХЛОРЕЛЛЫ

Ранее (^{1, 2}) было показано, что в клетках хлореллы (*Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82Г) под влиянием ионов аммония индуцируется НАДФ-специфичная глутаматдегидрогеназа (НАДФ-ГДГ). Эта индуцируемая НАДФ-ГДГ и конститутивная глутаматдегидрогеназа, функционирующая как с НАД, так и с НАДФ (НАД(Ф)-ГДГ), были полностью разделены и получены в виде очищенных препаратов (³).

При изучении кинетических свойств ГДГ в реакции дезаминирования для индуцируемой НАДФ-ГДГ наблюдалось возрастание начальной скорости реакции во времени. Для конститутивной НАД(Ф)-ГДГ такое ускорение не наблюдалось. В настоящей работе приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие об активации НАДФ-ГДГ под влиянием глутамата и НАДФ-Н.

В опытах использовали препараты ГДГ, полученные по ранее описанной методике (³). Измерение скорости дезаминирования проводили при 25° на регистрирующем спектрофотометре SP-700 («Юникам») или EPS-3Т («Хитачи») по скорости увеличения поглощения при 340 мкм.

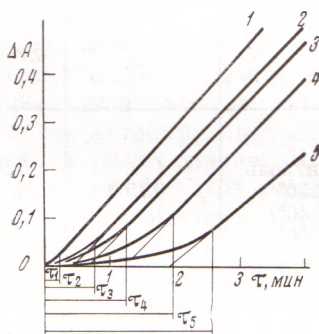


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика реакции дезаминирования, записанная на спектрофотометре SP-700 при различном порядке составления реакционной смеси. 1 — в присутствии НАДФ-Н, старт осуществлялся добавлением НАДФ⁺; 2, 3, 4 — старт реакции осуществлялся добавлением, соответственно, НАДФ⁺, L-глутамата и фермента; 5 — то же, что и 3, но при pH 8,2; $\tau_{1,2,3,4,5}$ — время ускорения реакции

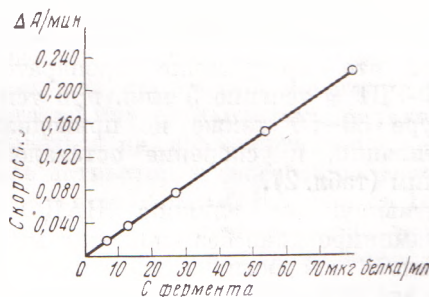


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость скорости стационарной фазы реакции дезаминирования от концентрации фермента при pH 8,7

Реакционная смесь в объеме 3 мл содержала: 0,05 М трис-HCl-буфер pH 9,0; 10⁻¹ М L-глутамат-Na («Adinomoto», Япония); 5·10⁻⁴ М НАДФ⁺ («Reanal», Венгрия) и 100–150 мкг белка. Конечное значение pH после протекания реакции (2–3 мин.) равнялось 8,7–8,8. Указанные значения pH являются оптимальными, а концентрации субстратов — насыщающими. В таких условиях максимальное изменение оптической плотности за 1 мин. составляло 0,150–0,200. Во всех приведенных в работе таблицах

и на рис. 2 значение максимальной скорости $\Delta A/\text{мин}$ дано для линейного участка зависимости скорости реакции от времени. На рис. 1 представлены кривые зависимости скорости реакции дезаминирования от времени, записанные на спектрофотометре SP-700 при разных условиях. Буквой τ обозначено время ускорения, т. е. время, в течение которого происходит нарастание скорости до линейной зависимости. Как видно из рис. 1, это

Таблица 1
Влияние прединкубации НАДФ-ГДГ
с *L*-глутаматом-Na на время
ускорения реакции дезаминирования

Время пред- инкубации, мин.	Время уско- рения τ , мин.	$\Delta A/\text{мин}$
0	0,73	0,155
1	0,60	0,160
3	0,30	0,155
5	0,10	0,150

Во всех трех указанных случаях максимальная скорость остается постоянной. При уменьшении pH реакционной смеси до 8,2 τ значительно увеличивается (τ_5 , кривая 5). Если реакцию дезаминирования проводить в присутствии НАДФ-Н, то ускорение или отсутствует полностью, или происходит в несколько секунд (τ_1 , кривая 1). В этом случае максимальная скорость реакции зависит от концентрации НАДФ-Н: при концентрации, большей, чем концентрация НАДФ⁺, наряду с устранением ускорения, происходит ингибирование, но при концентрации, значительно меньшей, чем концентрация НАДФ⁺, максимальная скорость увеличивается на 10–20%. α -Кетоглутарат и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ не изменяли величину τ , но значительно ингибировали дезаминирование. Следует отметить, что прогревание препаратов НАДФ-ГДГ в течение 5 мин. при температуре 30–50° также не приводило к активации, и ускорение оставалось прежним (табл. 2).

Активирующее влияние НАДФ-Н на дезаминирование без снижения максимальной скорости свидетельствует о том, что для его связывания на молекуле фермента существуют, по-видимому, другие, отличные от каталитических, центры. В таком случае эти центры являются аллостерическими. В пользу того, что активирующее действие НАДФ-Н имеет аллостерическую природу, свидетельствует также то, что он совершенно одинаково защищает как аминирование, так и дезаминирование от сильного ингибирования *n*-хлормеркурибензоатом (⁴).

Сравнивая кривые 2 и 3 рис. 1 можно заметить, что время ускорения тем меньше, чем дольше был контакт фермента с глутаматом. Действительно, при прединкубации фермента с *L*-глутаматом-Na τ значительно уменьшается, что видно из данных табл. 1.

Таким образом, из приведенных данных видно, что под влиянием глутамата и НАДФ-Н происходит активация НАДФ-ГДГ, причем в присутствии глутамата процесс идет относительно медленно, а под влиянием НАДФ-Н — быстро. Благодаря последнему обстоятельству в реакции аминирования, где НАДФ-Н является субстратом, время ускорения в ус-

время не является постоянной величиной и зависит от порядка добавления субстратов и значения pH. Так, например, при добавлении в последнюю очередь НАДФ⁺ ускорение происходит в течение 0,7 мин. (τ_2 , кривая 2). Если в последнюю очередь в реакционную смесь добавлять *L*-глутамат, то τ увеличивается до 1,2 мин. (τ_3 , кривая 3), а при добавлении последним препарата фермента τ составляет 2 мин. (τ_4 , кривая 4).

Таблица 2
Влияние прогревания на активацию
НАДФ-ГДГ

Температура * при про- гревании, °C	τ ускорения, мин.	$\Delta A/\text{мин}$
Контроль	1	0,145
25°	0,75	0,140
40°	1	0,140
50°	1	0,135

* Фермент прогревали при указанной температуре в течение 5 мин., затем охлаждали до 25°, добавляли буфер и субстраты и измеряли скорость реакции.

ловиях наших опытов практически равно 0, т. е. реакция сразу начинается и протекает линейно во времени. Однако, если в реакционную смесь при изменении скорости аминирования добавить НАДФ⁺ (как продукт реакции) в концентрации меньшей, равной или большей, чем оптимальная концентрация НАДФ-Н, то совершенно отчетливо проявляется ускорение. Наряду с этим происходит ингибирование. При увеличении кон-

Таблица 3

Влияние НАДФ⁺ на скорость реакции аминирования индуцируемой НАДФ — ГДГ

Концентрация НАДФ ⁺ , М	I *				II *			
	лаг-период, сек.	τ, сек.	ΔА/мин	ингибирование, %	лаг-период, сек.	τ, сек.	ΔА/мин	ингибирование, %
0	0	0	0,190	0	0	0	0,190	0
5·10 ⁻⁵	0	3—5	0,170	10,5	3	33	0,150	21
10 ⁻⁴	0	—	0,120	37,0	5	40	0,125	34
2,5·10 ⁻⁴	0	5—8	0,090	52,5	10	70	0,080	58
5·10 ⁻⁴	3—5	10	0,053	72,0	20	80	0,040	79

* Реакционная смесь составлялась в следующей последовательности: I — 5·10⁻³ М α-кетоглутарат + буфер рН 8,1 + фермент + 2,5·10⁻⁴ М НАДФ-Н + НАДФ⁺ + 7·10⁻² М (NH₄)₂НРО₄, II — α-кетоглутарат + буфер + фермент + НАДФ⁺ + НАДФ-Н + (NH₄)₂НРО₄.

центрации НАДФ⁺ время ускорения и степень ингибирования возрастают, кроме того появляется и увеличивается лаг-период — начальный период, в течение которого скорость вообще равна 0 (табл. 3). Действие НАДФ⁺ зависит от порядка его добавления в реакционную смесь. Если НАДФ⁺ добавлять после того, как к ферменту добавлен НАДФ-Н, то время выхода реакции на линейный участок несравненно меньше, чем то, которое наблюдается, когда НАДФ⁺ добавляется перед добавлением НАДФ-Н. С другой стороны, степень ингибирования практически не зависела от порядка добавления НАДФ⁺. Если предположить, что НАДФ⁺ оказывает свое действие, соединяясь только на каталитическом участке, то тогда легко объясняется его ингибирующее влияние как продукта реакции, но остается непонятным в таком случае, за счет чего возникает лаг-период и ускорение. Вероятно, что НАДФ⁺ может связываться на аллостерических центрах, на которых связывается НАДФ-Н как активатор, и способствовать поддержанию неактивной формы фермента. Таким образом, НАДФ-Н и НАДФ⁺ являются аллостерическими эффекторами противоположного действия. Наблюдаемое нами явление активации под влиянием субстратов можно объяснить или за счет изменения агрегации фермента, или за счет конформационного перехода неактивной или малоактивной формы в активную. В литературе известны и те, и другие случаи. Например, активация фосфорилоразлазы под влиянием гликогена происходит в результате диссоциации малоактивного тетрамера в более активный димер (⁵, ⁶). Наоборот, активация сукцинатдегидрогеназы из цитозоля печени быка происходит за счет ассоциации неактивного мономера в активный димер. Этот переход ускоряется в присутствии комплекса Me²⁺ — сукцинат (⁷). С другой стороны, активация НАДФ-ГДГ из дикого штамма (⁸) и различных ат⁻мутантов *Neurospora crassa* (⁹⁻¹²) под влиянием увеличения рН, субстратов, дикарбоновых кислот или кратковременного прогревания при 35—50° и D-лактатдегидрогеназы из *Escherichia coli* под влиянием пирувата (¹³) происходит, по мнению авторов, за счет конформационного перехода неактивной или малоактивной формы фермента в активную. В случае НАДФ-ГДГ хлореллы, по-видимому, имеет место также конформационный переход. Если считать, что активация происходит в результате изменения агрегационного состояния фермента, то тогда следует ожидать непропорциональной зависимости

между скоростью реакции и концентрацией фермента. Однако, как это видно из рис. 2, эта зависимость в области используемых концентраций НАДФ-ГДГ является пропорциональной, и активация проявляется при всех указанных концентрациях белка. Кроме того, до настоящего времени не известно ни одного случая, чтобы ГДГ микроорганизмов или высших растений подвергалась регуляции по типу ассоциация — диссоциация, за исключением НАДФ-ГДГ *Brevibacterium flavum*, которая существует в виде неактивного олигомера и активного мономера, и под влиянием KCl олигомер легко переходит в мономер (¹⁴).

Альперс и Паулюс (¹⁵), проанализировав и обобщив данные для некоторых аллостерических ферментов, высказали гипотезу, согласно которой ферменты могут находиться в «незрелой», каталитически неактивной форме, и переход в активное «зрелое» состояние осуществляется в результате конформационного изменения под влиянием различных лигандов. По-видимому, существование различных ферментов в неактивной или малоактивной форме и их переход в активное состояние под влиянием субстратов или других лигандов имеет более широкое распространение и может рассматриваться как механизм регуляции их активности. Однако специфика определения активности ферментов не всегда позволяет зафиксировать активацию, тем более, если этот процесс осуществляется очень быстро, как в случае НАДФ-ГДГ хлореллы под влиянием НАДФ-Н.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 I 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. L. Kretoovich, Z. G. Evstigneeva, N. G. Tomova, *Canad. J. Bot.*, v. 48, 1179 (1970).
- ² В. Р. Шатилов, Г. С. Калошина, В. Л. Кретович, ДАН, т. 194, 964 (1970). ³ В. Р. Шатилов, В. Г. Амбарцумян, В. Л. Кретович, ДАН, т. 207, 1229 (1972). ⁴ В. Р. Шатилов, В. Г. Амбарцумян и др., ДАН, т. 216, № 1 (1974). ⁵ S. H. Wang, M. L. Shouka, D. J. Graves, *Biochem.*, v. 4, 2296 (1965). ⁶ B. Metzger, E. Helmreich, L. Glaser, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 57, 994 (1967). ⁷ M.-F. Carlier, D. Pantaloni, *Europ. J. Biochem.*, v. 37, 341 (1973). ⁸ D. J. West, R. W. Tuveson et al., *J. Biol. Chem.*, v. 242, 2134 (1967). ⁹ J. R. S. Fincham, *Biochem. J.*, v. 65, 721 (1957). ¹⁰ J. R. S. Fincham, *J. Mol. Biol.*, v. 4, 257 (1962). ¹¹ T. K. Sundaram, J. R. S. Fincham, *J. Mol. Biol.*, v. 10, 423 (1964). ¹² D. B. Roberts, *J. Bacteriol.*, v. 91, 1888 (1966). ¹³ E. M. Tarmy, N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, v. 248, 2587 (1968). ¹⁴ I. Shiio, H. Ozaki, *J. Biochem.*, v. 68, 633 (1970). ¹⁵ J. B. Alpers, H. Paulus, *Nature*, v. 233, 478 (1970).