

Академик С. Е. СЕВЕРИН, Н. П. МЕШКОВА, Л. Н. МАТВЕЕВА,
Д. Г. МИКЕЛАДЗЕ

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СУКЦИНИЛ-КоА-СИНТЕТАЗЫ ИЗ ГРУДНОЙ МЫШЦЫ ГОЛУБЯ

Сукцинил-КоА-синтетаза (сукцинат : КоА-лигаза (ГДФ), КФ 6.2.1.4; сукцинат : КоА-лигаза (АДФ), КФ 6.2.1.5) катализирует обратимую реакцию расщепления богатого энергией сукцинил-КоА до сукцината и КоА с образованием высокоэнергетического фосфатного соединения в виде ГТФ или АТФ. Данная реакция является единственной в цикле трикарбоновых кислот, в которой фосфорилирование происходит на уровне окисления субстрата. ГТФ или АТФ, образованные в результате прямого направления реакции, используются для осуществления тех или иных клеточных функций; сукцинил-КоА, образованный в реакции обратного направления, используется в синтезе β -аминолевулиновой кислоты — раннего предшественника в биосинтезе гема (^{1, 2}).

Несмотря на то что сукцинил-КоА-синтетазная реакция имеет большое физиологическое значение, сведения о свойствах фермента и механизме реакции немногочисленны. Предполагают образование нескольких промежуточных соединений (³⁻¹⁴). Однако в настоящее время данные о промежуточных соединениях носят дискуссионный характер и требуют дополнительной экспериментальной проверки. Целью настоящей работы было исследование механизма действия сукцинил-КоА-синтетазы грудной мышцы голубя.

Фермент выделяли из грудной мышцы голубя по методике, предложенной ранее в нашей лаборатории (¹⁵). Активность сукцинил-КоА-синтетазы определяли спектрофотометрически по образованию сукцинил-КоА при 235 нм. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1,0 мкмоль сукцинил-КоА в 1 мин. при 25°. Белок определяли биуретовым методом и по поглощению при 280 и 260 нм. Электрофорез на бумаге проводили в 0,05 М трис-ацетатном буферном растворе, pH 7,5, содержащем $1 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА при температуре 1–2°; градиент напряжения 40 в/см. Радиоактивность определяли после разрезания электрофореграммы на полоски шириной по 5 мм и просчета их в толуольном сцинтилляторе на автоматическом спектрометре. Хроматографирование компонентов инкубационной среды осуществляли на колонках с сефадексом G-50 (размер колонок 1×19 см), уравновешенных 0,05 М трис-ацетатным буферным раствором, pH 7,5. Элюирование проводили тем же буферным раствором. Объем каждой собранной фракции составлял 0,5 мл. В опытах использовали 8-¹⁴C-АТФ (Чехословакия) удельной активности 477 мкС/ммоль и γ -³²P-АТФ удельной активности 15,57 С/ммоль фирмы «Amersham». Реакционная проба содержала: СКС* от 2 до 8 ед., 10^{-2} М MgCl₂, $5 \cdot 10^{-4}$ М АТФ, 0,1 М трис-ацетатный буферный раствор. Конечный объем пробы 0,1 мл, pH 7,4. Концентрация ЭДТА в соответствующих реакционных пробах была 0,1 М.

Инкубирование сукцинил-КоА-синтетазы с γ -³²P-АТФ, а также с 8-¹⁴C-АТФ в присутствии ионов Mg²⁺ приводило к появлению радиоактивности (³²P и ¹⁴C) в белке. Радиоактивность в белковой фракции устанавливали

* СКС — сукцинил-КоА-синтетаза.

после отделения белка от оставшихся компонентов инкубационной среды хроматографированием на колонках с сефадексом G-50 (рис. 1). При этом белок, ферментативная активность и радиоактивность элюируются в виде одного пика, который выходит со свободным объемом колонки. Остальные компоненты инкубационной среды элюируются с колонки в большем объеме. При инкубировании фермента с вышеуказанными радиоактивными соединениями в отсутствие Mg^{2+} (без добавления Mg^{2+} и с добавлением в инкубационную среду ЭДТА) включение радиоактивной метки в белковую фракцию происходит всего на 6–8% (табл. 1). Исследование зависимости

Таблица 1

Количество радиоактивной метки (^{32}P и ^{14}C), включенной на 1 нмоль белка

Состав реакционной пробы	^{32}P , нмол.	^{32}P , %	^{14}C , нмол.	^{14}C , %
СКС+ ^{14}C -АТФ+ Mg^{2+}			2,194	100
СКС+ ^{14}C -АТФ- Mg^{2+}			0,175	8
СКС+ ^{14}C -АТФ+ Mg^{2+} +ЭДТА			0,134	6
СКС+ ^{32}P -АТФ+ Mg^{2+}	4,162	100		
СКС+ ^{32}P -АТФ- Mg^{2+}	0,295	7		
СКС+ ^{32}P -АТФ+ Mg^{2+} +ЭДТА	0,256	6		

Таблица 2

Зависимость степени включения в белок радиоактивной метки (^{32}P и ^{14}C) от ферментативной активности СКС

Активность фермента, ед.	Активность фермента, %	^{32}P , нмол.	^{32}P , %	Активность фермента, %	^{14}C , нмол.	^{14}C , %
12 *	100	17,3	100			
9	75	12,7	74			
21 *				100	13,7	100
14				67	8,9	65

* Активность фермента и включенная радиоактивность принималась за 100%.

степени включения радиоактивной метки в белок от ферментативной активности показало, что количество включенной метки в белок прямо пропорционально ферментативной активности (табл. 2). Данные о включении радиоактивной метки (^{32}P и ^{14}C -АТФ) могут свидетельствовать о связывании с белком всей молекулы АТФ с образованием комплекса: фермент — АТФ. Для связывания АТФ с ферментом необходимы ионы Mg^{2+} .

Параллельно с хроматографией на сефадексе инкубационную смесь разделяли с помощью высоковольтного электрофореза. Для сохранения нативности белка аликвоты инкубационной среды наносили на влажную, пропитанную буферным раствором, охлажденную на 1–2° бумагу. Электрофоретический анализ показал, что радиоактивность по ^{32}P определялась на уровне белка и АТФ. Однако радиоактивность по ^{14}C в белковой фракции после электрофореза на бумаге обнаружить не удавалось. Радиоактивность обнаруживали только на уровне АДФ и АТФ. Вероятно, это было обусловлено лабильностью комплекса фермент — АТФ. Для подтверждения данного предположения проверяли стабильность указанного комплекса во времени. С этой целью сукцинил-КоА-синтазу инкубировали с эквимоллярными количествами γ - ^{32}P -АТФ и 8- ^{14}C -АТФ в присутствии ионов Mg , смесь хроматографировали на сефадексе G-50, затем аликвоты объединенного элюата белковой фракции отбирали во времени и повторно хроматографи-

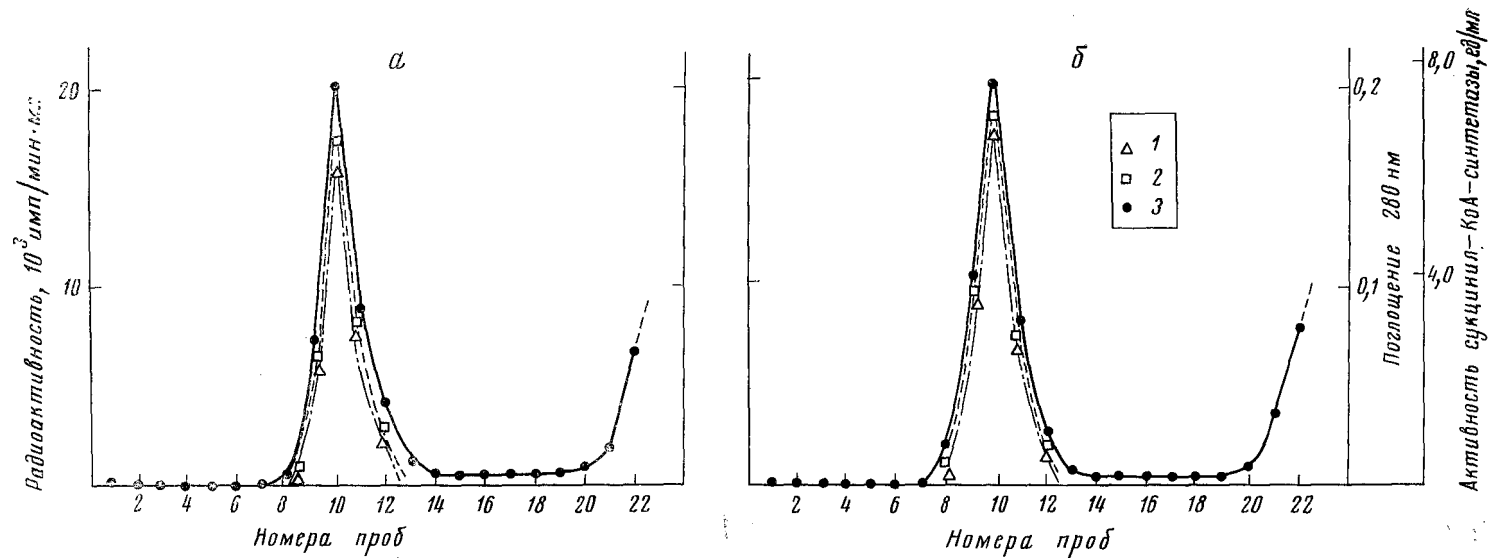


Рис. 1. Хроматографирование сукцинил-КоА-синтетазы на сефадексе G-50 после инкубации ее с γ - ^{32}P -АТФ (а) и с 8 - ^{14}C -АТФ (б) в присутствии Mg^{2+} . Время инкубации 10 мин., температура комнатная. 1 — поглощение при 280 нм, 2 — активность СКС, 3 — радиоактивность

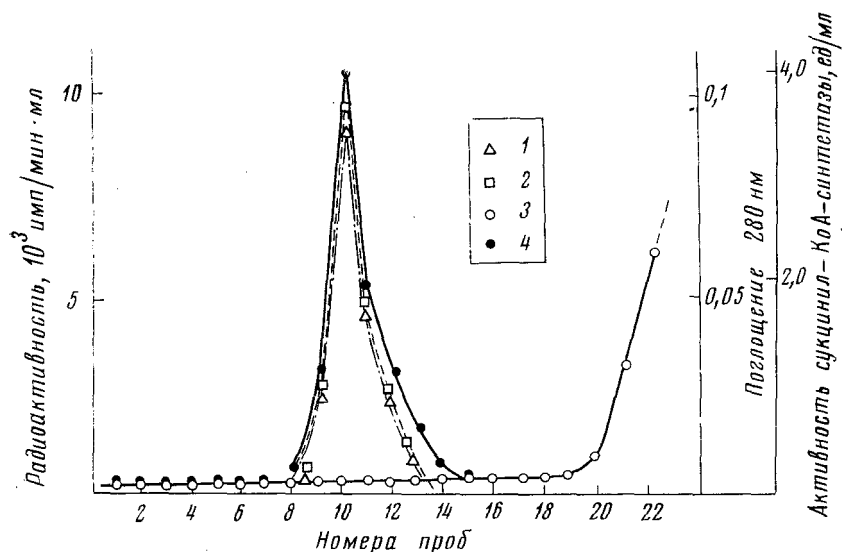


Рис. 2. Повторное хроматографирование СКС- ^{32}P - ^{14}C на сефадексе G-50 после 2 час. выстаивания при 0–4°. 1 – поглощение при 280 нм, 2 – активность СКС, 3 – радиоактивность по ^{14}C , 4 – радиоактивность по ^{32}P

ровали на колонках с G-50. В элюатах белковой фракции измеряли ферментативную активность и радиоактивность. Было найдено, что радиоактивность по ^{14}C исчезает во времени и через два часа снимается с белка на 97%, в то время как радиоактивность ^{32}P уменьшается всего на 5%. После 2 час. выстаивания и повторного хроматографирования получали белок, меченный только по ^{32}P (рис. 2).

Таким образом, из полученных данных следует, что сукцинил-КоА-синтетаза способна фосфорилироваться в присутствии АТФ и ионов Mg. Последовательность механизма фосфорилирования такова, что вначале фермент соединяется с АТФ, образуя комплекс СКС-АТФ, который затем диссоциирует с образованием фосфорилированного производного фермента (СКС-Ф) и АДФ.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 XI 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. F. Lable, T. Kuzumada, J. Onisawa, Biochim. et biophys. acta, v. 111, 403 (1965).
- ² D. L. Nandi, E. R. Waygood, Canad. J. Biochem., v. 43, 1605 (1965). ³ W. A. Bridger, W. A. Millen, P. D. Boyer, Biochemistry, v. 7, 3608 (1968). ⁴ G. Kreil, P. D. Boyer, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 16, 551 (1964). ⁵ J. S. Nishimura, A. Meister, Biochemistry, v. 4, 1457 (1965). ⁶ F. L. Grinnel, J. F. Nishimura, Biochemistry, v. 8, 568 (1969). ⁷ S. Cha, C.-J. M. Cha, R. F. Parks, J. Biol. Chem., v. 242, 2582 (1967).
- ⁸ R. W. Moyer, R. F. Ramaley et al., J. Biol. Chem., v. 242, 4299 (1967). ⁹ J. L. Robinson, R. W. Benson, P. D. Boyer, Biochemistry, v. 8, 2503 (1969). ¹⁰ F. J. Moffet, W. A. Bridger, J. Biol. Chem., v. 245, 2758 (1970). ¹¹ F. J. Moffet, W. A. Bridger, Canad. J. Biochem., v. 51, 44 (1973). ¹² J. G. Hildebrand, L. B. Spector, J. Biol. Chem., v. 244, 2606 (1969). ¹³ E. A. Wider de Xifra, A. M. del C. Baillie, Enzyme, v. 16, 128 (1973).
- ¹⁴ R. F. Romaley, W. A. Bridger et al., J. Biol. Chem., v. 242, 4287 (1967). ¹⁵ Н. П. Мешикова, Л. Н. Матвеева, Биохимия, т. 35, 374 (1970).