

АКТИВИРОВАННАЯ КАРБОКСИЛЬНАЯ ГРУППА В НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЕ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Финк Н. Ю., Назарова Т. И., Аваева С. М.

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

При исследовании механизма действия неорганической пирофосфатазы из дрожжей было обнаружено образование фосфорилированного фермента как в реакции с субстратом — неорганическим пирофосфатом, так и в реакции с неорганическим фосфатом [1]. Изучение устойчивости фосфорилированного белка в широком интервале рН показало, что фосфорилированная пирофосфатаза представляет собой лабильное соединение, быстро теряющее остаток фосфорной кислоты в щелочной и, особенно, в кислой среде. Эти результаты позволяют предположить, что акцептором фосфата в неорганической пирофосфатазе является карбоксильная группа аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Образование ацилфосфата в реакции фермента с неорганическим фосфатом делает весьма вероятным присутствие в неорганической пирофосфатазе активированной карбоксильной группы.

Соединения, содержащие активированные карбоксильные группы, легко реагируют с гидроксиламином с образованием гидроксамовых кислот. Превращение карбоксильной группы, важной для ферментативной активности, в гидроксамат должно привести к утрате ферментом его каталитических свойств. Как оказалось, неорганическая пирофосфатаза при обработке нейтральным раствором NH_2OH быстро теряет ферментативную активность. Так, при действии $0,1\text{M}$ NH_2OH на белок в концентрации $1,65 \cdot 10^{-6}\text{M}$ активность падает за 15 мин на 75%, а за 1 ч — более чем на 95%. Однако в присутствии $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ неорганического пирофосфата инактивации под влиянием NH_2OH не наблюдается. Это согласуется с предположением, что действие ингибитора направлено на активированную группу активного центра.

Ингибитором неорганической пирофосфатазы является также $0,1\text{M}$ *O*-метилгидроксилламин, однако в этом случае активность фермента падает за 10 мин лишь на 32—36% (рН 5,5), а затем не изменяется в течение длительного времени. Опыты, проведенные с радиоактивным NH_2OCH_3 , содержащим в метильной группе изотоп ^3H , показали, что потеря активности сопровождается включением радиоактивной метки в белок. Включение составляет 0,6—0,8 моль реагента на моль белка, что хорошо согласуется с достигнутой глубиной ингибирования при расчете на два активных центра фермента. Радиоактивная метка прочно связана с белком и не отделяется от него при диализе, гель-фильтрации на сефадексе G-50 и электрофорезе в полиакриламидном геле. Важно отметить, что при проведении реакции с меченым NH_2OCH_3 в присутствии $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ пирофосфата активность фермента полностью сохраняется, а включение радиоактивной метки не превышает 0,15 моль/моль белка.

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния метилового эфира глицина на неорганическую пирофосфатазу. Этот реагент также является ингибитором фермента. При действии $0,5\text{M}$ метилового эфира глицина на белок в концентрации $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$ активность фермента падает за 20 мин на 30—35%, после чего не изменяется длительное время. Опыты с метиловым эфиром глицина, содержащим радиоактивный изотоп ^{14}C , показали, что при этом происходит включение радиоактивной метки в белок, достигающее 0,9—1,0 моль ингибитора на моль белка. Обычно для реакции карбоксильных групп белков с метиловым эфиром глицина необ-

ходима активация этих групп водорастворимым карбодимидом. В случае же неорганической пирофосфатазы соответствующая карбоксильная группа, очевидно, достаточно активирована, чтобы реакция с метиловым эфиром глицина прошла в мягких условиях без добавления конденсирующих агентов.

Известны [2, 3] данные о фосфорилировании ферментов неорганическим фосфатом с образованием ацилфосфатных связей, на основании которых можно предположить, что активированная карбоксильная группа присутствует не только в неорганической пирофосфатазе из дрожжей, но и в ряде других ферментов фосфорного обмена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назарова Т. И., Аваева С. М. (1973) Биохимия, **38**, 169—173.
2. Masuda H., de Meis L. (1973) Biochemistry, **12**, 4581—4585.
3. Dudding W. F., Winter C. G. (1971) Biochim. et biophys. acta, **241**, 650—660.

Поступила в редакцию
23.IX.1974