



УДК 577.152.361*1.042

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

I. АКТИВАЦИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АТР

Венер А. В., Назарова Т. И., Азиева С. М.

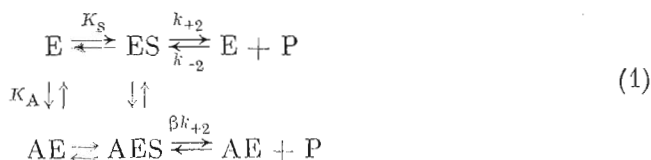
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

АТР активирует гидролиз пирофосфата магния, катализируемый неорганической пирофосфатазой пекарских дрожжей, по неконкурентному типу. С другой стороны, АТР, вызывая уменьшение количества связанного с ферментом пирофосфата, образующегося в реакции синтеза из фосфата, что подтверждает факт увеличения каталитической константы скорости ферментативного гидролиза пирофосфата. Причиной активации неорганической пирофосфатазы является фосфорилирование ее регуляторного центра под действием АТР с включением в белок γ -фосфатной группы АТР.

Неорганические пирофосфатазы (КФ 3.6.1.4) присутствуют во всех живых клетках. Их основная функция — гидролиз пирофосфата (PP_i), образующегося при таких жизненно важных процессах, как биосинтез белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, фосфолипидов и т. д. Таким образом, пирофосфатазы обеспечивают благоприятные термодинамические условия для протекания этих реакций. Предшественниками PP_i в перечисленных процессах являются нуклеозидтрифосфаты, главным образом АТР, поэтому изучение влияния АТР на активность пирофосфатаз представляет несомненный интерес.

Из неорганических пирофосфатаз наиболее изучена пирофосфатаза пекарских дрожжей, состоящая из двух идентичных субъединиц [1–3]. Каждая субъединица имеет активный центр [4], в котором в присутствии Mg^{2+} или некоторых других катионов двухвалентных металлов осуществляется обратимая реакция гидролиза PP_i . Наряду с активным центром каждая субъединица фермента содержит некаталитический центр связывания фосфата (P_i) [5, 6]. Фосфорилирование этого центра протекает по «флип-флоп»-механизму, т. е. P_i связывается ковалентно только с одной субъединицей фермента, а фосфорилирование второй субъединицы приводит к немедленному освобождению фосфата от первой [7]. Фосфорилирование неорганической пирофосфатазы под действием P_i не изменяет каталитическую активность фермента [5, 7].

Нами установлено [8], что АТР активирует неорганическую пирофосфатазу пекарских дрожжей в реакции гидролиза пирофосфата магния ($MgPP$). На рис. 1 представлены данные по активации фермента при рН 7,2, аналогичные результаты были получены при рН 6,5. Неконкурентный характер активации указывает на то, что связывание АТР происходит в центре фермента, отличающемся от активного. Кинетическая схема неконкурентной активации выглядит следующим образом:



где E — фермент, S — субстрат ($MgPP$), A — активатор, P — продукт ре-

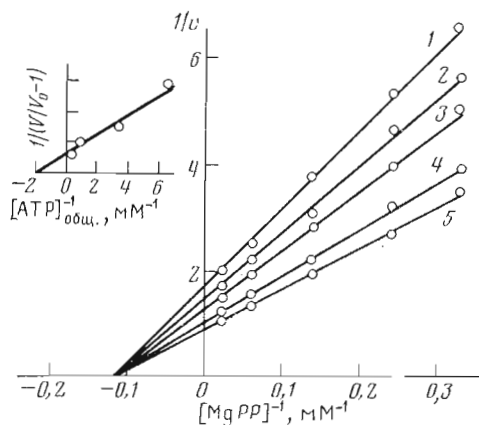


Рис. 1

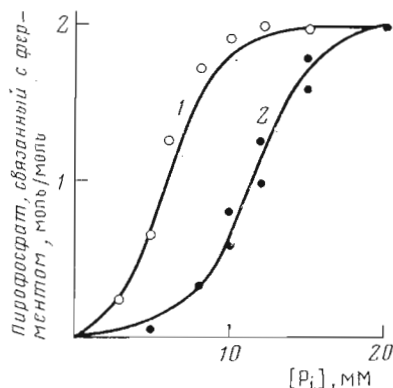


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость скорости ферментативного гидролиза $MgPP$ при pH 7,2 от его концентрации без АТР (1) и в присутствии 0,15 (2), 0,30 (3), 1,0 (4) и 3,0 мМ (5) АТР. На вставке зависимость величины активации от концентрации АТР

Рис. 2. Зависимость синтеза связанного с ферментом PP_1 от концентрации P_i в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 мМ тетраметиламмониевой соли АТР. Условия: 0,1 М трис-НСl-буфер, pH 7,2, концентрация $MgCl_2$ 1 (1) и 2 мМ (2)

акции (P_i), K_s и K_A — константы диссоциации комплексов фермента с субстратом и активатором соответственно, k_{+2} — константа скорости ферментативной реакции (каталитическая константа), β — коэффициент активации. В предположении, что стационарный режим в изучаемой системе устанавливается быстро, уравнение скорости ферментативной реакции будет иметь вид

$$v = \frac{k_{+2} \frac{K_A + \beta[A]}{K_A + [A]} [E]_0 [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (2)$$

Для определения параметров β и K_A выражение (2) можно представить следующим образом:

$$\frac{1/V}{V_0 - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_A}{\beta - 1} \frac{1}{[A]}, \quad (3)$$

где V_0 и V — максимальные скорости реакции в отсутствие и в присутствии активатора соответственно. Графический анализ полученных данных в координатах $1/V (V_0 - 1)$ от $1/[ATP]$ (рис. 1) позволил определить параметры β и K_A , равные 1,87 и 0,55 мМ соответственно для pH 7,2 и 1,95 и 0,45 мМ для pH 6,5.

Ранее было показано, что неорганическая пирофосфатаза способна синтезировать PP_1 из P_i , причем в отсутствие катионов щелочных металлов образуется комплекс фермента с PP_1 , который можно выделить быстрой гель-фильтрацией [6]. В присутствии АТР синтез PP_1 из P_i на ферменте также имеет место, однако он требует более высоких концентраций P_i по сравнению с экспериментами в отсутствие АТР (рис. 2). Причиной может быть уменьшение значения равновесной константы синтеза PP_1 на ферменте $K = k_{-2}/k_{+2}$ в присутствии АТР. Такое предположение согласуется с приведенными выше данными по кинетике гидролиза PP_1 , свидетельствующими об увеличении k_{+2} в присутствии АТР. Таким образом, АТР вызывает увеличение каталитической константы скорости гидролиза $MgPP$, катализируемого неорганической пирофосфатазой дрожжей.

Далее предстояло исследовать причины активирующего действия АТР на фермент. При взаимодействии неорганической пирофосфатазы дрожжей с $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ в присутствии Mg^{2+} или Zn^{2+} наблюдалось включение метки в фермент. В отсутствие катионов двухвалентных металлов фосфо-

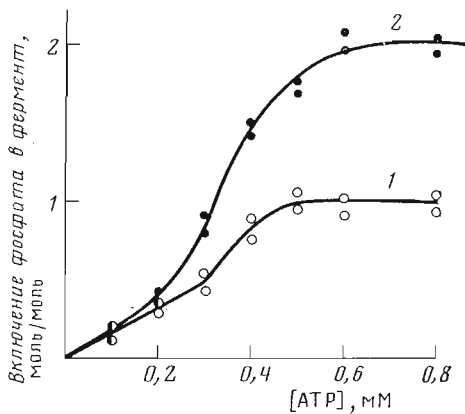


Рис. 3

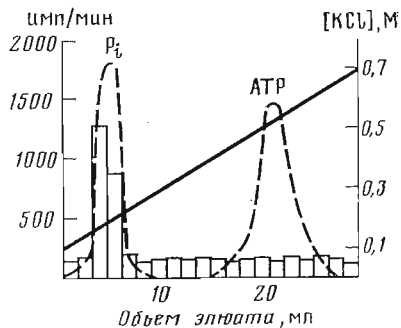


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость фосфорилирования неорганической пирофосфатазы от концентрации АТР. Условия: 0,1 М трис-НСl-буфер (рН 7,2), 1 мМ MgCl₂. Фосфорилированный фермент выделяли стандартной гель-фильтрацией (1) или гель-фильтрацией со сменой рН буфера (2)

Рис. 4. Хроматография меченого соединения, отщепляемого в кислых условиях от фермента, фосфорилированного под действием [γ -³²P]АТР на колонке (1,5 мл) с даурксом 1×4 (Cl⁻). Пунктиром показано место выхода P_i и АТР в контрольных экспериментах

рирования фермента под действием АТР не происходило. Выделение ³²P-меченого белка проводили гель-фильтрацией с центрифугированием, причем в обычных условиях максимальное включение составляло 1 моль фосфата на 1 моль фермента. Когда же при гель-фильтрации использовали смену рН буфера (см. «Экспериментальную часть»), включение фосфата в фермент возрастало и достигало 2 моль на 1 моль белка (или 1 моль на 1 моль субъединицы) (см. рис. 3). В присутствии Zn²⁺ (0,3 мМ) максимальное включение фосфата также составляло 1 и 2 моль на 1 моль белка при использовании двух разных методов выделения меченого фермента и достигалось при концентрации АТР 0,16 и 0,22 мМ соответственно. При фосфорилировании пирофосфатазы под действием P_i максимальное включение также составляет 1 моль, однако его можно увеличить до 2 моль, если реакционную смесь до отделения избытка P_i обработать додецилсульфатом натрия [9]. Это, вероятно, связано с конформационными изменениями белка, приводящими к ослаблению контактов между субъединицами и, как следствие этого, к независимому функционированию последних. Возможно, что увеличение включения фосфата в белок до 2 моль при проведении гель-фильтрации со сменой рН буфера вызвано теми же причинами.

Пирофосфатаза, содержащая два остатка фосфата, быстро теряет один из них (при немедленной повторной гель-фильтрации выделяли белок, содержащий уже один остаток фосфата на молекулу фермента). В соответствии с приведенной выше гипотезой можно думать, что после гель-фильтрации со сменой рН буфера быстро возобновляется взаимодействие субъединиц фермента в составе димера и присущий ему «флип-флоп»-механизм взаимодействия с фосфатом. При этом один остаток фосфата остается связанным с ферментом весьма прочно: при 20° С и нейтральных значениях рН период гидролиза половины фосфата равняется 7–8 ч. Все дальнейшие исследования проводили с пирофосфатазой, содержащей один остаток фосфата на молекулу белка.

Как в присутствии Mg²⁺, так и в присутствии Zn²⁺ АТР фосфорилирует не активный центр пирофосфатазы, так как добавление к фосфорилированному белку субстрата (MgPP_i или ZnАТР) приводит лишь к незначительному отщеплению фосфата от фермента даже после протекания нескольких десятков каталитических актов в активном центре белка.

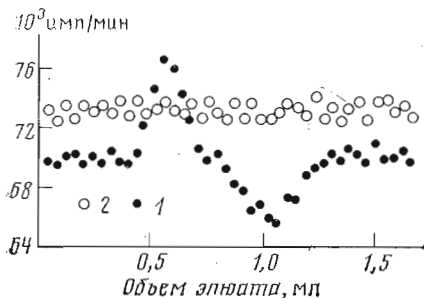


Рис. 5

Рис. 5. Равновесная гель-фильтрация неорганической пирофосфатазы в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (1) и $[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]\text{АТР}$ (2)



Рис. 6

Рис. 6. Зависимость активации фермента от степени его фосфорилирования под действием АТР. v и v_0 — скорости гидролиза MgPP под действием фосфорилированного и нефосфорилированного ферментов соответственно

Вывод о том, что в неорганическую пирофосфатазу включается только γ -фосфатный остаток молекулы АТР, был сделан на основании следующих экспериментов:

1) в отличие от экспериментов с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ при использовании в реакции с ферментом $[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]\text{АТР}$ не было обнаружено связывания метки с белком;

2) меченое соединение, отщепляемое в кислых условиях от фермента после его фосфорилирования под действием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, было хроматографически идентифицировано как $^{32}\text{P}_i$ (рис. 4);

3) в белке, выделенном гель-фильтрацией после его инкубации с немеченым АТР, колориметрически (после минерализации белка) обнаруживается не более 1 моль P_i на моль белка;

4) методом равновесной гель-фильтрации с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и $[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]\text{АТР}$ было показано, что комплексов фермента с целой молекулой АТР не образуется, тогда как фосфорилирование белка происходит. Включение P_i в фермент составляло $\sim 0,7$ моль на 1 моль белка (рис. 5).

Выделенный после реакции с АТР фосфорилированный фермент имел большую удельную активность, чем нефосфорилированный. Корреляция между включением фосфата из АТР в пирофосфатазу и возрастанием ее ферментативной активности (рис. 6) однозначно указывает на то, что именно фосфорилирование фермента под действием АТР является причиной увеличения каталитической константы скорости ферментативной реакции.

Обнаруженный эффект активации заслуживает внимания, так как он наблюдается при концентрациях АТР, существующих *in vivo* [10]. Таким образом, можно предполагать, что АТР, являясь предшественником PP_i , во многих реакциях биосинтеза, может выступать в клетке как эффектор неорганической пирофосфатазы.

Экспериментальная часть

В работе использовали морфолиноэтансульфоновую кислоту (Mes), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, натриевую соль АТР фирмы Sigma (США), гидрат тетраметиламмония (Fluka, Швейцария), остальные реагенты были отечественного производства марки ос. ч. и х. ч. Применяли $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ с уд. акт. 215 ПБк/моль (Amersham, Англия), свыше 37 ПБк/моль (отечественное производство), $[\text{U}\text{-}^{14}\text{C}]\text{АТР}$ с уд. акт. 16,9 ТБк/моль (Институт по исследованию, производству и применению радиоактивных изотопов, Прага).

АТР перекристаллизовывали из водного этанола [11]. Тетраметиламмониевую соль АТР получали нейтрализацией кислой формы АТР гидратом тетраметиламмония, кислую форму АТР — из натривой соли АТР с использованием ионообменника дауэкс 50. Трис использовали после его перекристаллизации из этанола. Гомогенный препарат неорганической пиррофосфатазы с уд. акт. 600–750 МЕ выделяли из пекарских дрожжей по методике Брага и др. [12]. Концентрацию растворов белка определяли по поглощению при 280 нм, используя $E_{280}^{0,1\%}$ 1,45 [13] и M_r 64 000 [14], и с помощью красителя кумасси [15]. Содержание ^{32}P в образцах определяли по Черенкову, а ^{14}C — в диоксановом сцинтилляторе с использованием жидкостно-сцинтилляционного счетчика (ЛКВ, Швеция).

Кинетические измерения. За ферментативным гидролизом PP_i следили по накоплению P_i во времени с помощью автоматического анализатора фосфата [16]. Реакционные смеси содержали неорганическую пиррофосфатазу ($\sim 0,1$ нМ) в 0,1 М трис- HCl -буфере (рН 7,2) или в 0,1 М MeS-NaOH -буфере (рН 6,5), АТР (0–3 мМ) и MgCl_2 (1–4 мМ). Концентрация свободной формы Mg^{2+} в реакционных смесях была равной ~ 1 мМ. Реакцию начинали добавлением PP_i и проводили при 25° С.

Гель-фильтрация с центрифугированием. Для отделения фермента от избытка низкомолекулярных лигандов использовали видоизмененную методику [17]. Колонку, содержащую 1,5 мл сефадекса G-50 (тонкий), уравновешенного нужным буфером, помещали в пробирку и центрифугировали 2 мин при 500g у основания геля. На колонку наносили реакционную смесь в объеме 100 мкл и дважды центрифугировали по 2 мин, нанося на колонку перед последним центрифугированием 100 мкл буфера. Объединенный объем элюата составлял 170–190 мкл. Использовали две модификации гель-фильтрации:

а) стандартную, при которой сефадекс был уравновешен тем же буфером, который использовали в реакционной смеси и при элюции;

б) гель-фильтрацию со сменой рН буфера, при которой сефадекс уравновешивали буфером, отличающимся от буфера, использованного для приготовления реакционной смеси и при элюции. Например, если реакционная смесь содержала 0,1 М трис- HCl -буфер, рН 7,2, то сефадекс уравновешивали 0,1 М MeS-NaOH -буфером, рН 6,5, а элюцию вели, используя трис- HCl -буфер, и наоборот. Если не отмечено особо, то использовали гель-фильтрацию по типу «а».

Получение фосфорилированного фермента и фермента, содержащего связанный пиррофосфат. Стандартные реакционные смеси объемом 100 мкл содержали нужный буфер, фермент в концентрации 2–6 мкМ, MgCl_2 или ZnCl_2 в концентрациях 1 или 0,3 мМ соответственно, $^{32}\text{P}_i$ (2–20 мМ), или $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (0,05–0,8 мМ), или $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{АТР}$ (0,1–0,8 мМ). Удельная радиоактивность меченых соединений составляла 20 000–40 000 расп/мин на нмоль. Смеси инкубировали 3–7 мин при 20° С и отделяли фермент от избытка низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией с центрифугированием. В контрольных экспериментах реакционные смеси либо не содержали пиррофосфатазы, либо вместо нее вводили альбумин. Содержание ^{32}P в элюатах контрольных опытов не превышало 10% от количества ^{32}P , связанного с ферментом в виде фосфата или пиррофосфата при основных экспериментах.

Идентификация связанных с ферментом радиоактивных соединений. $^{32}\text{P}_i$ и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PP}_i$, связанные с пиррофосфатазой в результате реакции с $^{32}\text{P}_i$, отщепляли от белка при обработке 3–4% HClO_4 при 0° С, а ^{32}P , введенный в фермент при реакции с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, — 10% HClO_4 при 0° С. Разделение и идентификацию отщепленных от фермента меченых соединений проводили либо экстракцией $^{32}\text{P}_i$ в виде фосфомолибдатного комплекса смесью изобутанол — бензол [18], либо ионообменной хроматографией. В последнем случае реакционную смесь нейтрализовали KOH , образовавшийся KClO_4 отделяли центрифугированием, к супернатанту добавляли раствор, содержащий 1 мкмоль P_i и 1 мкмоль PP_i (либо АТР), и проводили хроматографию смеси на колонке (1,5 мл) с дауэксом 1×4 (Cl^-). Элюцию вели в градиенте концентрации KCl в 0,025 М трис- HCl -буфере,

pH 7,2 (объем 30 мл), собирая фракции по 1,5 мл. При разделении P_1 и PP_1 использовали градиент концентрации KCl 0,1–0,4 М, при разделении P_1 и АТР — 0,1–0,7 М. Место выхода P_1 и PP_1 определяли при помощи автоматического анализатора фосфата, АТР — по поглощению при 260 нм. Количество меченых соединений рассчитывали по радиоактивности.

Колометрическое определение P_1 после минерализации фосфорилированного фермента. Реакционная смесь содержала 33 мкМ фермент, 1 мМ $MgCl_2$ и 0,7 мМ АТР в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 7,2. После 3–7 мин инкубации при 20° С проводили гель-фильтрацию смеси. Выход белка определяли спектрофотометрически при 280 нм. Раствор белка упаривали при 100–120° С, добавляли 20 мкл 10 н. H_2SO_4 и 100 мкл 57% $HClO_4$ и осуществляли минерализацию белка 30–60 мин при 180–190° С. P_1 в образцах определяли согласно [19]. Параллельно проводили два контрольных эксперимента: в первом случае в исходной реакционной смеси отсутствовал фермент, во втором — АТР.

Равновесная гель-фильтрация. Реакционную смесь (100 мкл), содержащую неорганическую пиррофосфатазу (160–180 мкМ), $MgCl_2$ (1,2 мМ) и $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{АТР}$ или $[U\text{-}^{14}C]\text{АТР}$ в концентрации 0,7 мМ, наносили на колонку (1,1 мл) с сефадексом G-25 (тонкий), уравновешенным 1,2 мМ $MgCl_2$ и 0,7 мМ $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{АТР}$ или $[U\text{-}^{14}C]\text{АТР}$. В качестве буфера использовали 0,1 М Mes-NaOH-буфер, pH 6,5. Элюцию вели смесью, применяемой для уравновешивания колонки, собирая фракции по ~40 мкл. Во фракциях определяли содержание фермента и радиоактивность.

Зависимость активации пиррофосфатазы от ее фосфорилирования. Реакционные смеси содержали 20 мкМ фермент, 1 мМ $MgCl_2$ и 0,2–0,7 мМ $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{АТР}$ в 0,1 М Mes-NaOH-буфере, pH 6,5. После гель-фильтрации в элюате определяли концентрацию белка спектрофотометрически, включение фосфата — по радиоактивности и ферментативную активность в 0,1 М Mes-NaOH-буфере, pH 6,5, содержащем 1 мМ $MgCl_2$ и 50 мкМ PP_1 . В контроле реакционная смесь не содержала АТР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ridlington J. M., Yang Y., Butler L. G. Arch. Biochem. and Biophys., 1972, v. 153, № 3, p. 714–725.
2. Hansen G., Eifler R., Heitmann P. Acta biol. and med. Germ., 1972, v. 28, № 5, p. 977–987.
3. Heinrikson R. L., Sterner R., Noyes C., Cooperman B. S., Bruckman R. H. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 7, p. 2521–2528.
4. Плаксина Е. А., Сергеев О. В., Склякина В. А., Аваева С. М. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 357–364.
5. Бакулева Н. П., Костенко Е. Б., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 832–840.
6. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Avaeva S. M. FEBS Lett., 1981, v. 124, № 2, p. 245–247.
7. Bakuleva N. P., Baykov A. A., Kasho V. N., Nazarova T. I., Avaeva S. M. Int. J. Biochem., 1983, v. 15, № 6, p. 849–854.
8. Венер А. В. Материалы конференции молодых ученых химического факультета МГУ. Москва, 25–28 января 1983 г., Москва, 1983, ч. III, с. 448–451, деп. в ВИНТИ № 7085–83.
9. Воробьева Н. Н., Назарова Т. И., Бакулева Н. П., Аваева С. М., Протасевич И. И., Платонов А. Л. Биохимия, 1982, т. 47, № 5, с. 740–745.
10. Erntakova S. A., Mansurova S. E., Kalebina T. S., Lobakova E. S., S'elyach I. O., Kulaev I. S. Arch. Microbiol., 1981, v. 128, № 2, p. 394–397.
11. Berger Z. Biochim. et biophys. acta, 1956, v. 20, № 1, p. 23–26.
12. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 39, № 2, с. 344–350.
13. Kunitz M. J. Gen. Physiol., 1952, v. 35, № 3, p. 423–450.
14. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrikson R. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 5, p. 714–725.
15. Bradford M. M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, p. 248–254.
16. Baykov A. A., Avaeva S. M. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 1, p. 1–4.
17. Penefsky H. S. J. Biol. Chem. 1977, v. 252, № 9, p. 2892–2899.
18. Janson C. A., Degani C., Boyer P. D. J. Biol. Chem., 1978, v. 254, № 10, p. 3743–3749.
19. Hess H. H., Derr J. E. Anal. Biochem., 1975, v. 63, № 2, p. 607–613.

Поступила в редакцию
13.XII.1984

PHOSPHORYLATION AS AN ACTIVITY REGULATOR OF INORGANIC
PYROPHOSPHATASE FROM BAKER'S YEAST. I. ATP-INDUCED ACTIVATION
OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE

VENER A. V., NAZAROVA T. I., AVAEVA S. M.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, Moscow State University, Moscow*

ATP activates non-competitively hydrolysis of magnesium pyrophosphate, catalyzed by baker's yeast inorganic pyrophosphatase. On the other hand, ATP decreases the amount of enzyme-bound pyrophosphate synthesized from phosphate, which is confirmed by an increase in the catalytic rate constant of pyrophosphate enzymatic hydrolysis. The activation of inorganic pyrophosphatase is caused by phosphorylation of its regulatory centre under the ATP effect with incorporation of the ATP γ -phosphate group into the protein.