



УДК 577.152.361*1.042

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

II. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНОГО ЦЕНТРА

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

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

Монозамещенные производные пирофосфорной кислоты активируют гидролиз пирофосфата магния, катализируемый неорганической пирофосфатазой дрожжей, за счет фосфорилирования карбоксильной группы регуляторного центра фермента. Активирующее действие оказывают соединения, находящиеся в свободной форме, а не в виде комплексов с ионами магния, последние же необходимы для создания реакционноспособной конформации белка. АТФ и неорганический фосфат конкурируют в реакции фосфорилирования неорганической пирофосфатазы, однако акцепторами фосфата в этих случаях являются разные аминокислотные остатки фермента. Обсуждается механизм регуляции активности пирофосфатазы под действием монозамещенных производных пирофосфорной кислоты и фосфата.

Ранее было установлено, что взаимодействие неорганической пирофосфатазы пекарских дрожжей (КФ 3.6.1.1) с АТФ приводит к фосфорилированию регуляторного центра и, как следствие, к активации фермента [1]. Изучение фосфорилирования и регуляции активности фермента представляет большой интерес и делает необходимой дальнейшую характеристику регуляторного центра пирофосфатазы. В задачи настоящего исследования входило выяснение возможности активации фермента различными фосфорсодержащими метаболитами, установление характера связи, образующейся между фосфатом и белком, и понимание взаимосвязи процессов фосфорилирования белка под действием АТФ и фосфата (P_i), так как в последнем случае фосфорилирование пирофосфатазы не приводит к изменению ее каталитических свойств [2].

Результаты изучения влияния ряда фосфорсодержащих метаболитов на активность неорганической пирофосфатазы дрожжей представлены в табл. 1. Активность фермента определяли после его инкубации с каждым из этих соединений в присутствии Mg^{2+} . 2500-кратное разбавление фос-

Таблица 1

Активация неорганической пирофосфатазы под действием различных фосфорсодержащих соединений

Соединение	Активация (v/v_0 %)	Соединение	Активация (v/v_0 %)
АТФ (1)	1,87±0,07	АМР (8)	1,00±0,03
СТР (2)	1,80±0,05	Глюкозо-6-фосфат (9)	1,01±0,03
АДФ (3)	1,83±0,15	Глюкозо-1-фосфат (10)	1,01±0,03
Метилпирофосфат (4)	1,84±0,05	Фруктозо-1,6-дифосфат (11)	1,07±0,03
Триполифосфат (5)	1,91±0,05	Креатинфосфат (12)	1,02±0,03
Тетраполифосфат (6)	1,58±0,10	Фосфоенолпируват (13)	1,05±0,03
P_i (7)	1,02±0,03	NADH (14)	1,00±0,03

* v и v_0 — скорости ферментативного гидролиза $MgPP$ образцами пирофосфатазы, преинкубированными в присутствии изучаемого соединения (0,7 мМ) и в его отсутствие соответственно.

Влияние АТР и АДР на скорость ферментативного гидролиза $MgPP$ при различных концентрациях $MgCl_2$

$MgCl_2$, мМ	v/v_0 для АТР	v/v_0 для АДР
2	1,60	1,67
3	1,24	1,36
4	1,08	1,10

Условия: 0,1 М $Mes-NaOH$ -буфер (рН 6,5), 25° С, 100 мкМ PP_1 , 1 мМ АТР или АДР. v и v_0 — скорости гидролиза $MgPP$ в присутствии АТР (АДР) и в его отсутствие.

фосфодержащего метаболита при определении скорости гидролиза пирогосфата (PP_1) исключало влияние на ферментативную активность непрочных комплексов фермента с изучаемым соединением. Из табл. 1 видно, что активаторами неорганической пирогосфатазы являются монозамещенные производные пирогосфорной кислоты. Активация фермента после инкубации с этими соединениями была следствием фосфорилирования регуляторного центра фермента, что подтверждают результаты описанных ниже экспериментов. Существенно, что характер заместителя в монозамещенных производных пирогосфорной кислоты (его заряд, гидрофобность и размер) практически не сказываются на степени активации. Напротив, Р, и его моноэфир (соединения 7—13) активирующим действием не обладают. Причем не оказывали влияния на ферментативный гидролиз PP_1 и креатинфосфат, и фосфоенолпируват, соединения, имеющие больший потенциал переноса фосфатной группы, чем АТР. Увеличение концентрации этих макроэргов на порядок (до 7 мМ при концентрации Mg^{2+} от 1 до 7,5 мМ) также не приводило к заметному изменению активности пирогосфатазы. Не влиял на активность фермента и диэфир пирогосфорной кислоты (NADH).

Кинетическое изучение влияния монозамещенных производных пирогосфорной кислоты на ферментативный гидролиз пирогосфата магния ($MgPP$) показало, что АДР, СТР и ГТР, как и АТР [1], активируют пирогосфатазу по некокурентному типу. Количественные характеристики активации этими нуклеотидами также близки параметрам, полученным при изучении реакции с АТР [1]. Так, при рН 6,5 в случае АДР коэффициент активации фермента равнялся 1,96 (1,95 для АТР), а степень активации составляла половину от максимальной при 0,4 мМ АДР (0,45 мМ для АТР). АДР даже в концентрации 3 мМ не влиял на ферментативный гидролиз $MgPP$.

Для подтверждения того, что АДР, ГТР и СТР активируют фермент за счет фосфорилирования его регуляторного центра, пирогосфатазу инкубировали с тем или иным из указанных нуклеотидов, отделяли от избытка низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией и определяли активность и содержание фосфата в белке после минерализации последнего. В оптимальных условиях (0,7 мМ АДР, ГТР или СТР и 1 мМ $MgCl_2$) в пирогосфатазу включался 1 моль фосфата на 1 моль белка, а активность такого фосфорилированного фермента почти в 2 раза превышала активность нефосфорилированного.

В отсутствие ионов Mg^{2+} фосфорилирования и активации пирогосфатазы под действием монозамещенных производных пирогосфорной кислоты не наблюдали, что указывало на необходимость ионов Mg^{2+} для создания реакционноспособной конформации фермента. С другой стороны, на примере АТР и АДР видно (табл. 2), что увеличение концентрации ионов магния в реакционной среде ведет к снижению активирующей способности этих нуклеотидов. Следовательно, активация фермента происходит под действием свободной формы активатора, а не его магниевого комплекса. Таким образом, нельзя исключить, что пирогосфатная часть молекулы

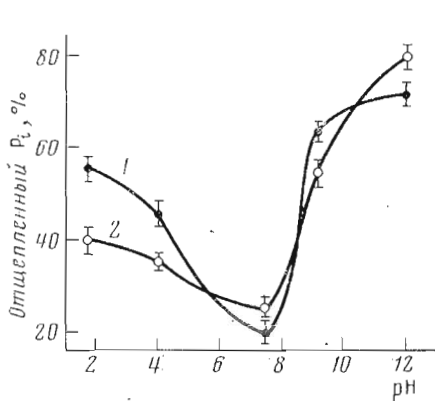


Рис. 1

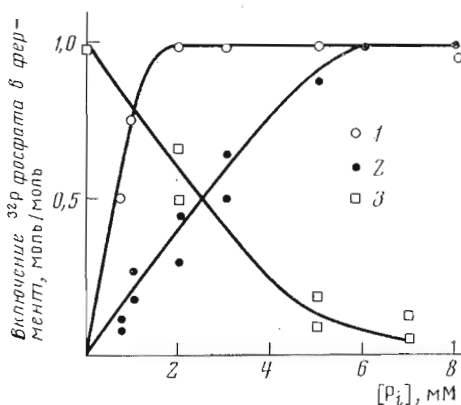


Рис. 3

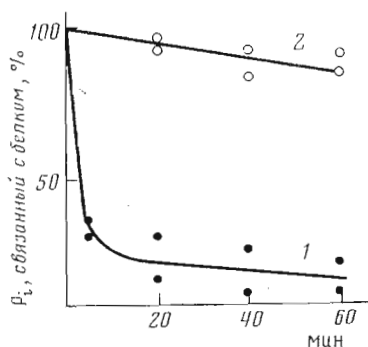


Рис. 2

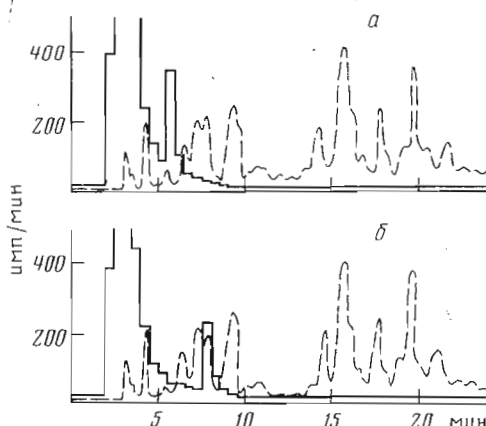


Рис. 4

Рис. 1. Зависимость отщепления фосфата от пирофосфатазы, фосфорилированной АТР (1) и P_i (2), от рН. Инкубацию для каждого значения рН вели 1,5 ч при 30° С

Рис. 2. Отщепление неорганического фосфата от фермента, фосфорилированного АТР, в присутствии 2 М гидроксилamina (1) и 2,7 М NaCl (2) при рН 6,5 и 20° С

Рис. 3. Фосфорилирование неорганической пирофосфатазы под действием ^{32}P в отсутствие (1) и в присутствии 1 мМ АТР (2) и под действием 1 мМ $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{АТР}$ (3) при различных концентрациях P_i

Рис. 4. Разделение триптических гидролизатов пирофосфатазы, фосфорилированной P_i (а) и АТР (б), при помощи ВЭЖХ. Сплошная линия — радиоактивность, пунктир — A_{254}

свободной формы активатора на стадии, предшествующей фосфорилированию регуляторного центра, координируется с одним из ионов магния на ферменте.

Особое место в ряду исследованных фосфорсодержащих метаболитов принадлежит PP_1 , для которого не удалось обнаружить активирующего действия на пирофосфатазу за счет фосфорилирования ее регуляторного центра. Во-первых, при изучении кинетики гидролиза $MgPP$ при рН 6,5 и 7,2 в диапазоне концентраций PP_1 от 3 мкМ до 3 мМ и концентрации свободной формы Mg^{2+} 1 мМ отсутствовала активация фермента. Во-вторых, инкубация пирофосфатазы с 1 мМ ^{32}P в присутствии 2 мМ $MgCl_2$ при рН 6,5 и 7,2 и 20° С не приводила к заметному включению метки в белок. Принимая во внимание большое сходство PP_1 и монозамещенных производных пирофосфорной кислоты, отличие в поведении PP_1 по сравнению с активаторами фермента трудно понять. Можно предполагать,

что PP_i способен фосфорилировать регуляторный центр пирогосфатазы, но в обычных условиях эта способность PP_i не реализуется из-за того, что сродство PP_i к активному центру на 2 порядка выше, чем сродство активаторов к регуляторному центру, а при больших концентрациях PP_i наблюдается интенсивный «сброс» P_i из регуляторного центра фермента.

Фосфорилирование регуляторного центра пирогосфатазы под действием АТР, вероятно, приводит к образованию ацилфосфатной связи. Об этом свидетельствуют существенное уменьшение устойчивости фосфорилированного фермента при снижении или увеличении рН (рис. 1, 1) и быстрое отщепление фосфата от фермента под действием гидроксилamina при рН 6,5 (рис. 2).

Ранее было установлено, что взаимодействие P_i с неорганической пирогосфатазой также приводит к фосфорилированию карбоксильной группы фермента, находящейся вне активного центра [3]. Сравнительное изучение фосфорилирования пирогосфатазы под действием АТР и P_i свидетельствует о взаимосвязи этих процессов. На рис. 3 показано, что в присутствии АТР фосфорилирование пирогосфатазы под действием P_i требует более высоких концентраций последнего в среде, чем в отсутствие АТР. С другой стороны, увеличение концентрации фосфата в среде приводит к снижению уровня фосфорилирования фермента под действием АТР. Таким образом, АТР и P_i конкурируют в реакции фосфорилирования фермента и, следовательно, имеет место взаимосвязь центров присоединения этих лигандов на белке. Общим для АТР и P_i является и то, что они фосфорилируют только одну субъединицу димерной молекулы пирогосфатазы, а ослабление контакта между субъединицами фермента создает возможность фосфорилирования обеих субъединиц [1, 4]. По-видимому, при взаимодействии пирогосфатазы с АТР, как и с P_i , реализуется «флип-флоп»-механизм фосфорилирования [5].

Пирогосфатаза, фосфорилированная под действием АТР, отличается по свойствам от фермента, фосфорилированного под действием P_i . Прежде всего нужно отметить, что АТР активирует пирогосфатазу за счет фосфорилирования, а P_i — нет. Различаются и устойчивости фосфорилированных разными способами белков в широком диапазоне значений рН (рис. 1). В обоих случаях добавление $MgPP$ к фосфорилированному ферменту приводит к отщеплению P_i от белка, но при одинаковых условиях пирогосфатаза, фосфорилированная АТР, теряет P_i почти в 2 раза медленнее, чем фосфорилированная P_i . Для доказательства того, что АТР и P_i фосфорилируют разные аминокислотные остатки белка, пирогосфатазу после реакции с радиоактивным АТР или P_i подвергали обработке трипсином и разделяли полученные пептиды при помощи ВЭЖХ. В условиях 4-ч трипсинолиза происходила полная потеря метки с пептидов, что указывало на значительную лабильность ацилфосфатных связей после нарушения структуры белка. Снижение времени обработки трипсином до 3,5 ч позволило обнаружить фосфорилированные пептиды (рис. 4). Хотя фосфорилированные фрагменты содержали лишь 4% оставшегося связанным фосфата, наблюдалась хорошая воспроизводимость результатов. Разное время выхода меченых пептидов позволило заключить, что АТР и P_i фосфорилируют остатки разных аминокислот белка. Конкуренция АТР и P_i указывает на то, что эти остатки взаимосвязаны так, что фосфорилирование одного из них препятствует фосфорилированию другого.

При обсуждении этой проблемы также важно учитывать, что АТР плохо фосфорилирует фермент, активный центр которого заблокирован комплексом пирогосфат—ион магния—фторид. Так, в оптимальных условиях включение в такой белок фосфата из АТР составляет 0,1 моль, хотя в реакции с P_i связывается 0,8 моль фосфата.

Активация неорганической пирогосфатазы под действием монозамещенных производных пирогосфорной кислоты представляет биохимический интерес, так как именно эти соединения являются предшественниками PP_i в реакциях биосинтеза: АТР — в реакциях синтеза аминоксил-

аденилатов и аденозилсульфата; нуклеозидтрифосфаты — в реакциях синтеза РНК, ДНК, нуклеозиддифосфат-сахаров; СТР — в реакциях синтеза СДР-глицеридов, СДР-холина и СДР-этанолamina; изопренилпирофосфат — в реакциях синтеза терпенов, каротиноидов и стероидов. Конкуренция АТР и P_i за фосфорилирование фермента указывает на то, что продукт ферментативной реакции (P_i) может элиминировать активирующее действие предшественников PP_i на фермент и таким образом может осуществляться еще один способ регуляции активности пирофосфатазы.

Экспериментальная часть

В работе использовали пирофосфат натрия, АТР, триполифосфат, тетраполифосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, морфолиноэтансульфокислоту (Mes) фирмы Sigma (США), GTP и СТР (Boehringer, ФРГ), ADP и глюкозо-1-фосфат (Reanal, Венгрия), креатинфосфат, фосфоенолпируват и NADH (Serva, ФРГ), AMP (Fluka, Швейцария), глюкозо-6-фосфат (BDH, Англия), ^{32}P -меченый пирофосфат без носителя (NEN, США), ^{32}P -меченую фосфорную кислоту без носителя и γ - ^{32}P -меченый АТР (отечественного производства) с активностью свыше 37 ПБк/моль. Остальные реактивы были отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.; метилпирофосфат был любезно предоставлен М. С. Мельник.

Гомогенный препарат неорганической пирофосфатазы с уд. акт. 650—750 МЕ выделяли из пекарских дрожжей по методу Брага и др. [6].

Кинетические измерения, выделение фосфорилированного фермента, определение в белке содержания меченого и немеченого фосфата проводили согласно [1].

Активация неорганической пирофосфатазы фосфорсодержащими метаболитами. Неорганическую пирофосфатазу инкубировали 3—5 мин при 25° С с нужным соединением (0,7 мМ) в присутствии 1 мМ $MgCl_2$ в 0,1 М Mes-NaOH-буфере, pH 6,5. 2 мкл реакционной смеси помещали в смесь для определения ферментативной активности (объем 5 мл), содержащую 0,1 М трис-HCl-буфер (pH 7,2), 1 мМ $MgCl_2$ и 50 мкМ PP_i , и определяли активность фермента на автоматическом анализаторе фосфата [7]. В контрольном эксперименте реакционная смесь не содержала фосфорсодержащего соединения. Об активации фермента судили, сравнивая скорости гидролиза $MgPP$ опытным и контрольным образцом пирофосфатазы. Все измерения проводили 3—4 раза. Содержание фосфата во всех изучаемых соединениях не превышало в мольном отношении 2%.

Изучение устойчивости фосфорилированного белка. а) ^{32}P -меченый фосфорилированный белок (1,5 мкМ) выдерживали при pH 6,5 или 7,2 и 20° С в отсутствие добавок или в присутствии 1 мМ $MgCl_2$ и 50 мкМ PP_i . Через определенные промежутки времени проводили гель-фильтрацию аликвот раствора белка и определяли количество оставшейся связанной с ферментом метки. б) ^{32}P -меченый фосфорилированный белок (~3 мкМ) выдерживали с 2 М гидроксиламином или 2,7 М NaCl при pH 6,5 или в одном из 0,1 М буферов: тетраоксалат калия, pH 1,68; калий фталевокислый, pH 4,01; трис-HCl, pH 7,5; натрий тетраборнокислый, pH 9,18; глицин-NaOH, pH 12. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и проводили ТСХ на полиэтилениминцеллюлозе (Merck, США) в 1,2 М растворе LiCl. Фосфорилированный фермент имел R_f меньше 0,1, а P_i — около 0,8. Хроматограммы разрезали в направлении, перпендикулярном элюции, на части, которые помещали во флаконы для определения радиоактивной метки.

Триптический гидролиз фосфорилированного фермента и разделение пептидов. Фосфорилированный белок, полученный в реакции с $[\gamma$ - $^{32}P]$ АТР или $^{32}P_i$, выделяли гель-фильтрацией [1] на сефадексе, уравновешенном 0,1 М NH_4HCO_3 . К белку (~10 мг/мл) добавляли трипсин (3% по весу от содержания пирофосфатазы) и инкубировали смесь 4 или 3,5 ч при 37° С, добавляя через 2 ч после начала инкубации еще 3% трипсина. Пептиды разделяли с помощью жидкостного хроматографа Altex (модель 332, США) на колонке с обращенной фазой C_8 , используя линейный градиент

вода — ацетонитрил (от 0 до 25% ацетонитрила). Скорость элюции 1мл/мин. Собирали фракции по 0,5 мл, детекцию вели спектрофотометрически при 254 нм и по радиоактивности фракций.

Получение фермента, содержащего в активном центре комплекс пирофосфат—ион магния—фторид [8]. Реакционную смесь, содержащую 3 мкМ фермент, 2 мМ MgCl₂, 3 мМ PP_i и 12,5 мМ NaF в 0,1 М Mes-NaOH-буфере, рН 6,5, инкубировали 7 мин при 20° С и проводили гель-фильтрацию в присутствии 1 мМ MgCl₂. Активность ингибированного фермента составляла 5% от активности контрольного (в отсутствие NaF) образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венер А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 784–790.
2. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Awaeva S. M. FEBS Lett., 1981, v. 124, № 2, p. 245–247.
3. Awaeva S. M., Bakuleva N. P., Baratova L. A., Nazarova T. I., Fink N. Yu. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, № 1, p. 173–184.
4. 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.
5. Bakuleva N. P., Baykov A. A., Kasho V. N., Nazarova T. I., Awaeva S. M. Int. J. Biochem., 1983, v. 15, № 6, p. 849–854.
6. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 2, с. 344–350.
7. Baykov A. A., Awaeva S. M. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 1, p. 1–4.
8. Baykov A. A., Artjukov A. A., Awaeva S. M. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 429, № 3, p. 982–992.

Поступила в редакцию
13.XII.1984

PHOSPHORYLATION AS AN ACTIVITY REGULATOR OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM BAKER'S YEAST.

II. THE REGULATORY CENTRE CHARACTERISTICS

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

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

Mono-substituted derivatives of pyrophosphoric acid activate magnesium pyrophosphate hydrolysis, catalysed by baker's yeast inorganic pyrophosphatase, as a result of the carboxylic group phosphorylation of the enzyme regulatory centre. The activation effect is displayed by the compound in a free form, rather than in a complex with magnesium ions which is necessary for a protein reactant conformation. ATP and P_i compete in an inorganic pyrophosphatase phosphorylation reaction, but in this case different amino acid residues of the enzyme operate as phosphate acceptors. The regulation mechanism of pyrophosphatase activity induced by monosubstituted derivatives of pyrophosphoric acid and P_i is discussed.