



УДК 577.152.361*1.05

МОНОМЕРНАЯ ФОРМА ПИРОФОСФАТАЗЫ *E. COLI*.
РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА, СТАБИЛЬНОСТЬ
И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АФФИННЫМИ ИНГИБИТОРАМИ

Борщук И. В., Пестова Т. В., Склянкина В. А.*,
Аваева С. М.

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

Из сравнительного изучения свойств субъединицы и нативного олигомера неорганической пирофосфатазы *E. coli* сделан вывод, что образование четвертичной структуры не является необходимой предпосылкой для проявления ферментом регуляторных свойств. Ассоциация субъединиц приводит к значительной стабилизации молекулы белка и является обязательной для протекания необратимого аффинного ингибирования.

Настоящая работа является частью исследований, посвященных изучению функциональной роли четвертичной структуры неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) *E. coli*, катализирующей в присутствии ионов двухвалентных металлов гидролиз неорганического пирофосфата. Молекула фермента представляет собой гексамер, состоящий из шести химически идентичных субъединиц [1, 2]. Мономерная форма пирофосфатазы каталитически активна, при этом ее сродство к субстрату, пирофосфату магния, металлу-активатору магнию и максимальная скорость процесса идентичны соответствующим показателям для нативного гексамера [3]. Следовательно, образование четвертичной структуры не отражается на каталитических свойствах фермента.

Предстояло выяснить, как существование четвертичной структуры в пирофосфатазе *E. coli* сказывается на ее регуляторных свойствах, стабильности и взаимодействии с аффинными ингибиторами. Для решения этих вопросов была получена субъединица пирофосфатазы из *E. coli* и охарактеризованы ее свойства в сравнении с нативным гексамером.

Известно, что фосфорилирование регуляторного центра неорганической пирофосфатазы *E. coli* АТФ приводит к значительному увеличению гидролитической активности фермента [4, 5]. Аналогичный эффект вызывает связывание в регуляторном центре пирофосфата хрома и имидодифосфата магния. Это обстоятельство было использовано для обнаружения регуляторного центра в мономерной форме пирофосфатазы. Исследование начальных скоростей гидролиза пирофосфата магния, катализируемого субъединицей пирофосфатазы, в отсутствие и в присутствии пирофосфата хрома, показало, что в этом случае так же, как и при катализе олигомерной формой фермента, активируется гидролиз субстрата. При этом максимальная скорость гидролиза возрастает приблизительно на 25 %, константа Михаэлиса остается практически без изменения. Это свидетельствует о связывании субъединицей аналога субстрата в центре, отличном от активного. Отсюда можно заключить, что фермент в мономерной форме имеет регуляторный центр. Следовательно, для формирования регуляторного центра в неорганической пирофосфатазе *E. coli* наличие четвертичной структуры не является необходимым (то же было показано ранее для каталитического центра [3]).

Хорошо известно, что одна из функций четвертичной структуры заключается в стабилизации белковой глобулы к денатурирующему воздействию среды. Неорганическая пирофосфатаза *E. coli* отличается удиви-

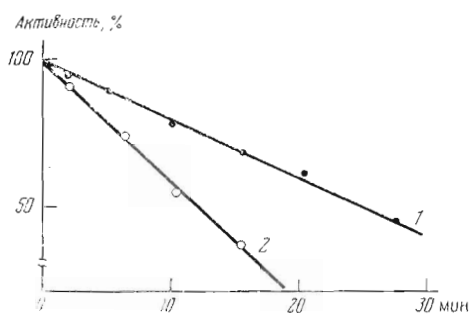


Рис. 1

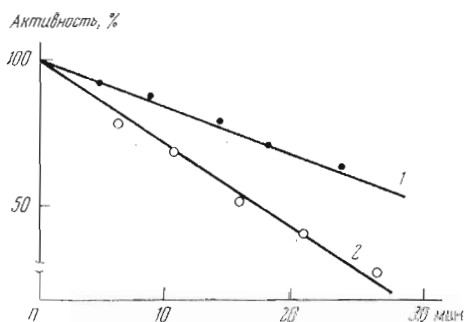


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация гексамерной (1) и мономерной (2) форм пирофосфатазы при 78° C

Рис. 2. Инактивация гексамерной (1) и мономерной (2) форм пирофосфатазы под действием субтилизина

тельно) высокой стабильностью, особенно в форме, насыщенной ионами магния. Выдерживание такого фермента при 80° C в течение 10 мин практически не сказывается на его активности и является одной из стадий выделения пирофосфатазы, позволяющей отделить ее от большого количества балластных белков, денатурирующих при этой температуре [6]. Для того чтобы выяснить, не является ли высокая термостабильность пирофосфатазы следствием ассоциации субъединиц, была изучена кинетика инактивации мономерной формы фермента и нативного олигомера при 78° C и pH 7,5 (рис. 1). Времена полуинактивации ($\tau_{0,5}$) двух форм фермента составили соответственно 12 и 27 мин, т. е. при переходе от мономера к гексамеру $\tau_{0,5}$ увеличивается приблизительно в 2,5 раза. Аналогичное различие в устойчивости субъединицы и олигомера наблюдается и по отношению к действию протеолитических ферментов, например субтилизина. Выдерживание фермента с субтилизином приводит к деградации молекулы белка, сопровождающейся падением его пирофосфатазной активности (рис. 2). В условиях представленного эксперимента $\tau_{0,5}$ для мономера и гексамера составляет соответственно 15 и 32 мин.

Таким образом, объединение субъединиц в нативный гексамер приводит к повышению стабильности неорганической пирофосфатазы *E. coli*. На основании полученных результатов можно предположить, что изолированные субъединицы и субъединицы в составе олигомера имеют различные конформации. Следствием этого, по-видимому, являются принципиальные различия в протекании реакции мономерной и гексамерной форм пирофосфатазы с моноэфирами фосфорной кислоты, аффинными ингибиторами фермента.

Пирофосфатаза *E. coli* в гексамерной форме быстро и необратимо теряет каталитическую активность при выдерживании с метилфосфатом, фосфогликолевой кислотой, N-ацетилфосфосерином или фосфоэтанолламином [7]. Это происходит в результате модификации фосфатами карбоксильной группы активного центра фермента. Иная ситуация имеет место в случае мономерной формы пирофосфатазы. После длительной инкубации ее с моноэфирами фосфорной кислоты и последующего удаления последних фермент проявляет полную активность (рис. 3), т. е. ковалентного присоединения реагентов не происходит. В то же время мономерная форма пирофосфатазы сохраняет способность связывать фосфаты в активном центре, на что указывает конкурентный характер ингибирования гидролиза субстрата, наблюдаемый в присутствии моноэфиров фосфорной кислоты (рис. 4). Следует отметить, что в этом случае наблюдается также изменение свойств субъединицы по сравнению с олигомером, выражающееся в более слабом сродстве первой к ингибиторам. Константы ингибирования двух форм фермента составляют соответственно 3,2 и 1,0 мМ (метилфосфат), 2,4 и 0,36 мМ (фосфоэтанолламин), 1,2 и 0,28 мМ (N-ацетилфосфосерин).

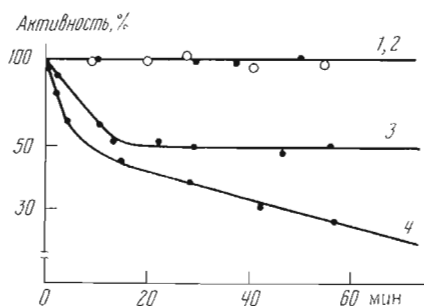


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость активности субъединицы (1, 2) и гексамера (3, 4) пирофосфатазы от времени взаимодействия с метилфосфатом (1, 3) и фосфоэтанололамином (2, 4)

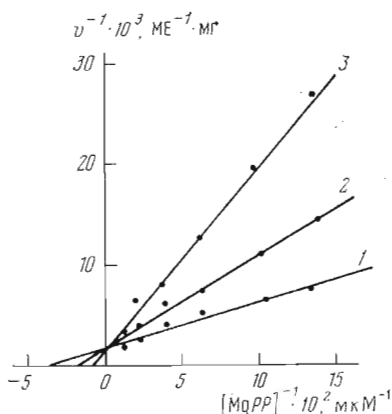


Рис. 4

Рис. 4. Гидролиз пирофосфата магния мономерной формой пирофосфатазы в отсутствие (1) и в присутствии 0,8 (2) и 4,0 мМ (3) метилфосфата

Таким образом, проведенное сравнительное изучение мономерной и олигомерной форм пирофосфатазы позволило выявить особенности ее поведения, обусловленные образованием четвертичной структуры: значительное увеличение стабильности и появление способности подвергаться ковалентной модификации моноэфирами фосфорной кислоты, необратимыми аффинными ингибиторами фермента.

Экспериментальная часть

Неорганическую пирофосфатазу (M_r 120 000) выделяли из штамма *E. coli* MRE-600 по методу Джосса [6]. Удельная активность составила 600—650 ME/мг.

Мономерную форму пирофосфатазы получали инкубацией нативного гексамера в Tris-HCl-буфере, pH 7,2, содержащем 20% изопропилового спирта [3].

В работе использовали морфолинэтансульфокислоту (Mes) фирмы Reanal (ВНР), трис(оксиметил)аминометан (Tris), субтилизин, метилфосфат, фосфогликолевую кислоту (Sigma, США), N-2-оксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислоту (Nepes), аммедииол (Fluka, Швейцария), сефадексы G-50 и G-200 (Pharmacia, Швеция). O-Фосфоэтаноламин и N-ацетилфосфосерин синтезировали как в работе [8]. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже ч.д.а. Все растворы готовили на воде, бидистиллированной и деионизированной на приборе Elgastat (Англия).

Ферментативную активность определяли по скорости образования ортофосфата из пирофосфата магния в 0,060 M Tris-HCl-буфере, pH 9,1, содержащем 5 мМ хлорид магния и 1 мМ пирофосфат натрия, путем непрерывного измерения концентрации фосфата в реакционной среде с помощью полуавтоматического анализатора по методу [9].

Регуляторные свойства мономерной и гексамерной форм пирофосфатазы исследовали в реакции гидролиза пирофосфата магния при концентрации субстрата $(5,0-50,0) \cdot 10^{-5}$ M и фиксированной концентрации ионов магния, равной 10^{-3} M, в 0,1 M Mes-NaOH-буфере, pH 6,4, содержащем $1,5 \cdot 10^{-4}$ M пирофосфат хрома.

Стабильность мономерной и гексамерной форм пирофосфатазы. 0,3—2 мкМ фермент инкубировали в 0,05 M Tris-HCl-буфере, pH 7,5, при 78° C или в 0,1 M Nepes-NaOH-буфере, pH 7,8, содержащем субтилизин (10 мг/мл) при 38° C, определяли остаточную пирофосфатазную активность в течение 0—60 мин.

Взаимодействие мономерной и гексамерной форм пирофосфатазы с аффинными ингибиторами. а) 40—80 нМ фермент инкубировали при 25° C в 0,05 M Tris-HCl-буфере, pH 6,5—7,5, содержащем 10^{-2} M моноэфир фосфорной кислоты. Из реакционных смесей через 0—180 мин отбирали аликвоты для определения пирофосфатазной активности. В опытах были использованы метилфосфат, фосфогликолевая кислота, N-ацетилфосфосерин, фосфоэтаноламин.

б) Определяли активность фермента по начальной скорости гидролиза пиррофосфата при концентрации субстрата 0—8 мМ и концентрациях ионов магния 1—10 мМ в 0,05 М Tris-HCl-буфере, рН 7,2 (25° С). Концентрации моноэфиров фосфорной кислоты составляли 7,5—100 мкМ. Полученные результаты представляли в координатах Лайнуивера — Берка. Константы ингибирования рассчитывали как в работе [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. J. *Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 17, p. 4335—4340.
2. Burton D. M., Hall D. C., Josse J. J. *Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 17, p. 4353 — 4357.
3. Borschik I. B., Pestova T. V., Sklyankina V. A., Avaeva S. M. *FEBS Lett.*, 1985, v. 184, № 1, p. 65—67.
4. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. *Биоорганическая химия*, 1984, т. 10, № 10, с. 1336—1341.
5. Венер А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. *Биоорганическая химия*, 1985, т. 11, № 6, с. 791—796.
6. Josse J. J. *Biol. Chem.*, 1966, v. 241, № 9, p. 1930—1947.
7. Борщик И. Б., Склянкина В. А., Аваева С. М. *Биоорганическая химия*, 1985, т. 11, № 6, с. 778—783.
8. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 7, с. 943—948.
9. Вауков А. А., Аваева С. М. *Anal. Biochem.*, 1981, v. 116, № 1, p. 1—4.
10. Березин И. В., Класов А. А. *Практический курс химической и ферментативной кинетики*. М.: Изд. МГУ, 1976.

Поступила в редакцию
11.XII.1985

MONOMERIC FORM OF *E. COLI* PYROPHOSPHATASE. REGULATORY PROPERTIES, STABILITY AND INTERACTION WITH AFFINITY INHIBITORS

BORSHCHIK I. B., PESTOVA T. V., SKLYANKINA V. A., AVAEVA S. M.

Department of Chemistry and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

A comparative study on the *E. coli* inorganic pyrophosphatase subunit and native oligomer disclosed that the quaternary structure is not an essential prerequisite for exhibiting by the enzyme its regulatory properties. However, association of the subunits enhances the stability of the protein molecule and is obligatory for irreversible affinity inhibition.