



УДК 577.152.361*1'134:577.112.4

**ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЙ ОСТАТОК ЛИЗИНА
В НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЕ ИЗ *E. COLI*****I. ВЗАМОДЕЙСТВИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ
С ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТОМ****Голиссаров А. А., Шпанченко О. В., Склякина 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*

Взаимодействие неорганической пирофосфатазы из *E. coli* с пиридоксаль-5'-фосфатом включает в себя связывание реагента в области активного центра за счет взаимодействия фосфатной группы с белком и последующую обратимую модификацию одного остатка лизина в каждой субъединице фермента. После установления химического равновесия белок представляет собой смесь молекул, состоящих из неактивных модифицированных и нативных субъединиц. При восстановлении модифицированного белка боргидридом натрия образуется устойчивый вторичный амин.

Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1) из *E. coli* — глобулярный белок с M_r 120 000, состоящий из шести идентичных субъединиц [1, 2]. Этот фермент эффективно катализирует гидролиз неорганического пирофосфата, хуже — три- и тетрафосфата [3]. Каждая субъединица пирофосфатазы имеет несколько центров связывания ионов металлов [4], необходимых для катализа. К настоящему времени известны кинетические особенности превращений субстрата [5, 6], однако механизм катализа практически не изучен, в первую очередь потому, что информация о функционально важных аминокислотных остатках весьма скудна. Ранее на основании инактивации пирофосфатазы 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, модифицирующей большое число групп, было высказано предположение о важности остатка лизина для проявления ферментативной активности [5]. В молекуле неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей — наиболее изученного представителя этой группы ферментов — в области активного центра локализован остаток лизина, модификация которого приводит к полной инактивации фермента [7]. В плане сравнения ферментов из разных источников в настоящей работе изучено взаимодействие неорганической пирофосфатазы из *E. coli* с пиридоксаль-5'-фосфатом, который широко используется для модификации и локализации остатков лизина в белках. Этот реагент является эфиром фосфорной кислоты, поэтому он может рассматриваться как представитель обширного класса аффинных ингибиторов, действие которых на неорганическую пирофосфатазу из дрожжей и *E. coli* довольно подробно исследовано [8, 9].

Реакцию неорганической пирофосфатазы из *E. coli* с пиридоксаль-5'-фосфатом проводили при pH 6–10 и температуре 28° С, используя концентрации белка и реагента 10^{-7} – 10^{-5} и 10^{-3} – 10^{-2} М соответственно. Реакция сопровождается быстрой инактивацией фермента, скорость которой зависит от концентрации ингибитора (рис. 1). Зависимость логарифма разности ($A - A_{\text{ост}}$, где A — активность фермента в данный момент времени, $A_{\text{ост}}$ — активность фермента при максимальной глубине инактивации) от времени линейна, т. е. реакция инактивации имеет первый порядок. Это позволяет определить наблюдаемую константу скорости инактивации (k_n). Зависимость k_n от концентрации пиридоксаль-5'-фосфата

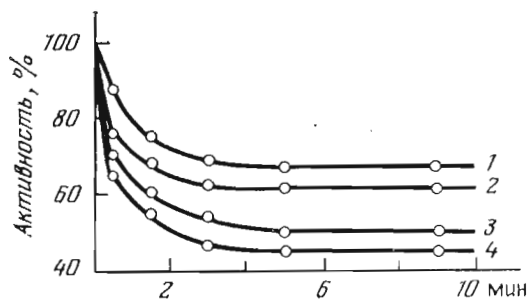


Рис. 1

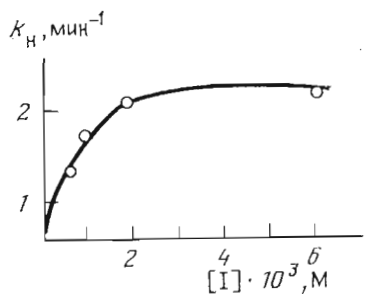


Рис. 2

Рис. 1. Изменение активности неорганической пирофосфатазы из *E. coli* под действием пиридоксаль-5'-фосфата при pH 9 и 28° С. Концентрации ингибитора (мМ): 0,6 (1), 0,8 (2), 1,8 (3), 6,0 (4); концентрация фермента 10^{-6} М

Рис. 2. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации фермента от концентрации пиридоксаль-5'-фосфата при pH 9 и 28° С. Концентрация белка 10^{-6} М

представляет собой гиперболу (рис. 2), что свидетельствует о существовании специфического центра связывания ингибитора на молекуле фермента.

При взаимодействии фермента с пиридоксаль-5'-фосфатом в спектре поглощения появляется пик при 390 нм (рис. 3а), характерный для основания Шиффа, образующегося из ϵ -аминогруппы лизина и альдегидной группы ингибитора. После восстановления модифицированного белка боргидридом натрия длина волны максимума поглощения сдвигается в более коротковолновую область и становится равной 325 нм (рис. 3а), что характерно для образования пиридоксамина. Зависимость от pH поглощения модифицированной неорганической пирофосфатазы при 325 нм имеет характерный для пиридоксамина и его производных [10] колоколообразный вид с максимумом в районе pH 6–7 (рис. 3б).

Глубина инактивации фермента хорошо коррелирует со степенью его модификации. Из рис. 4 видно, что инактивация фермента под действием ингибитора, по-видимому, связана с модификацией одного из 16 остатков лизина в субъединице фермента. Таким образом, при взаимодействии неорганической пирофосфатазы с пиридоксаль-5'-фосфатом в отличие от реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [5] происходит селективная модификация функционально важного остатка лизина, вероятно, обусловленная наличием у реагента фосфатной группы.

Существенно, что степень инактивации пирофосфатазы под действием пиридоксаль-5'-фосфата даже при использовании высоких концентраций ингибитора не достигает 100%, причем максимальная глубина инактивации тем меньше, чем меньше концентрация пиридоксаль-5'-фосфата (рис. 1). Зависимость разности ($A_0 - A_{\text{ост}}$, где A_0 — исходная активность фермента) от концентрации ингибитора представляет собой кривую с насыщением (рис. 5), что, вероятнее всего, объясняется существованием равновесия между основанием Шиффа, образующимся при модификации остатка лизина, контролирующего ферментативную активность, и продуктами его гидролиза. Возможно также, что с ингибитором взаимодействует остаток лизина, расположенный вне активного центра, что приводит к конформационным изменениям молекулы белка или возникновению стерических препятствий для субстрата, создаваемых остатком ингибитора и отражающихся на кинетических параметрах гидролиза пирофосфата магния. Выбор между этими двумя возможностями можно сделать на основании результатов следующего эксперимента. Неорганическую пирофосфатазу выдерживали с пиридоксаль-5'-фосфатом и затем восстанавливали боргидридом натрия (30 мин). В специально поставленных опытах было показано, что сам по себе NaBH₄ не инактивирует фермент при инкубации при 20° С даже в течение 2 ч. Модифицированную и затем восстановленную боргидридом натрия пирофосфатазу выделяли из реакционной смеси гель-фильтрацией и вновь инкубировали с пиридоксаль-5'-фосфа-

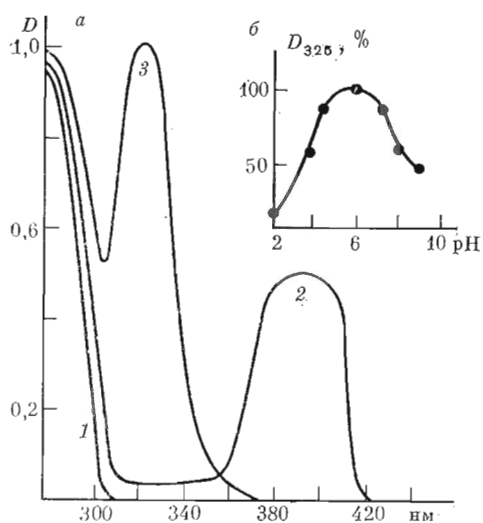


Рис. 3

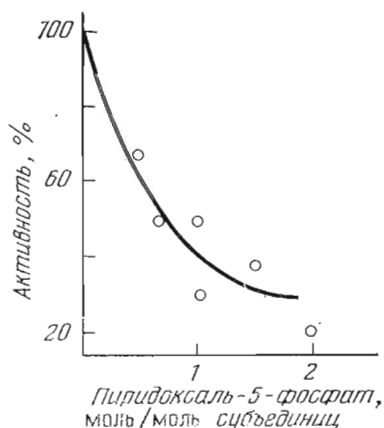


Рис. 4

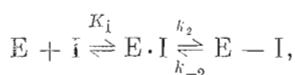
Рис. 3. Спектры поглощения (а) нативной неорганической пирофосфатазы (1), фермента, модифицированного пиридоксаль-5'-фосфатом (2), фермента, восстановленного после модификации боргидридом натрия (3), и зависимость поглощения при 325 нм восстановленной NaBH_4 пирофосфатазы от pH (б)

Рис. 4. Зависимость остаточной активности неорганической пирофосфатазы от числа введенных в субъединицу остатков пиридоксаль-5'-фосфата

том. При этом происходило дальнейшее падение ферментативной активности, причем характер ингибирования был аналогичен тому, который наблюдается для ингибирования нативной пирофосфатазы. Эти результаты свидетельствуют о том, что неполная инактивация связана с существованием равновесия в реакции неорганической пирофосфатазы с пиридоксаль-5'-фосфатом и что после его установления фермент представляет собой смесь молекул, состоящих из нативных и полностью неактивных модифицированных субъединиц. С предположением о принадлежности блокированного остатка лизина к активному центру согласуется также наблюдаемая защита фермента от инактивации аналогом субстрата пирофосфатом кальция.

Проявлением обратимости реакции образования основания Шиффа служит возрастание активности фермента при уменьшении в системе концентрации ингибитора. Если фермент выдержать с 5 мМ пиридоксаль-5'-фосфатом до достижения максимальной глубины инактивации, а затем разбавить в 5 раз буферным раствором, происходит быстрое возрастание ферментативной активности до уровня инактивации, соответствующего концентрации реагента, равной 1 мМ (рис. 6). При разбавлении реакционной смеси в 5 раз 5 мМ раствором ингибитора изменения ферментативной активности не происходит. Следует отметить, что разбавление в 1000 раз не сопровождается быстрым и полным восстановлением активности фермента (рис. 6) (именно по этой причине удастся следить за ходом реакции пиридоксаль-5'-фосфата с пирофосфатазой, контролируя ферментативную активность). По-видимому, это обусловлено происходящими при сильном разбавлении конформационными изменениями в молекуле модифицированного фермента, приводящими к стабилизации альдиминной связи.

Простейшая схема взаимодействия ингибитора с белком, согласующаяся с полученными результатами, выглядит следующим образом:



где E — фермент; I — ингибитор; E · I — комплекс фермент-ингибитор, образующийся при специфическом связывании пиридоксаль-5'-фосфата;

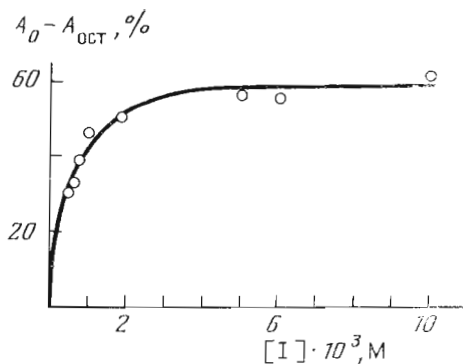


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость максимальной глубины инактивации ($A_0 - A_{ост}$) неорганической пирофосфатазы пиридоксаль-5'-фосфатом от концентрации ингибитора при pH 9 и 28° С

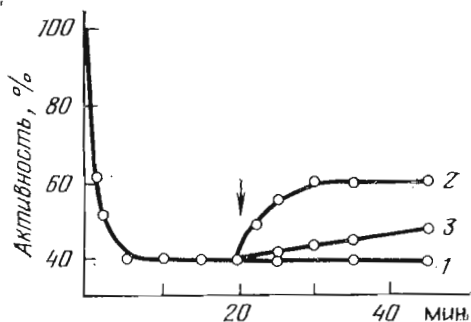


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость активности неорганической пирофосфатазы от времени при обработке 5 мМ пиридоксаль-5'-фосфатом (1) и последующем разбавлении реакционной смеси в 5 раз (2) и в 1000 раз (3) в момент, указанный стрелкой (температура 20° С)

Рис. 7. Зависимость $A_{ост}/(A_0 - A_{ост})$ от обратной концентрации пиридоксаль-5'-фосфата при pH 6 (1), 7 (2), 8 (3), 9 (4), 10 (5) (а) и зависимость константы ингибирования от pH (б)

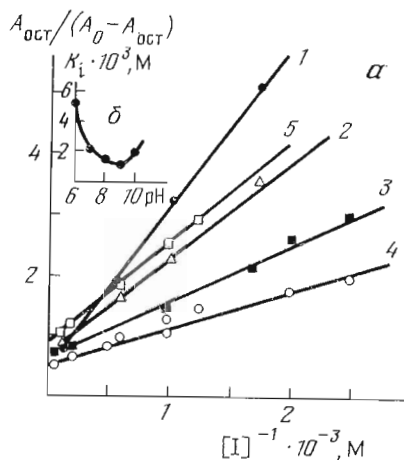


Рис. 7

$E - I$ — основание Шиффа; K_1 — константа ингибирования; k_2 и k_{-2} — соответственно константы скорости реакций образования и разрушения основания Шиффа. Предполагая, что реакция протекает в стационарном режиме, данную схему можно описать следующими уравнениями:

$$\frac{A_{ост}}{A_0 - A_{ост}} = K_2 K_1 \cdot \frac{1}{[I]} + K_2, \quad (1)$$

$$k_n = k_{-2} + \frac{k_2 [I]}{K_1 + [I]}, \quad (2)$$

где $K_2 = k_{-2}/k_2$.

Из графика зависимости $A_{ост}/(A_0 - A_{ост})$ от $1/[I]$ (рис. 7а) можно определить K_1 и K_2 . Зависимость k_n от $[I]$ при увеличении $[I]$ стремится к горизонтальной асимптоте, равной $k_2 + k_{-2}$. При pH 9 константы, рассчитанные по уравнениям (1) и (2), составили $K_1 = 10^{-3}$ М, $K_2 = 0,5$, $k_2 = 1,6$ мин $^{-1}$, $k_{-2} = 0,7$ мин $^{-1}$.

Для того чтобы выяснить влияние степени протонирования ингибитора и белка на глубину модификации, реакцию проводили в интервале pH 6–10. Зависимость константы ингибирования от pH (рис. 7б) имеет вид U-образной кривой с минимумом в районе pH 9 ($K_1 = 10^{-3}$ М). Наибольшее усиление связывания ингибитора (в 5 раз) наблюдается при изменении pH от 6 до 7. Причиной этого, вероятно, является депротонирование фосфатной группы реагента (pK_a 6,5), участвующей в его связывании с ферментом. Увеличение pH от 9 до 10 приводит к возрастанию K_1 . Это, по-видимому, отражает процесс депротонирования группы белка, взаимодействующей с отрицательно заряженным остатком фосфорной кислоты ингибитора. Величина pK этой группы лежит выше 9,5, что позволя-

ет предположить участие в образовании комплекса фермент-ингибитор остатка лизина или аргинина.

Если пиридоксаль-5'-фосфат заменить на пиридил-3-альдегид, молекула которого в интервале pH 6—10 может быть либо положительно заряженной, либо электронейтральной, активность фермента полностью сохраняется даже при концентрации ингибитора 10^{-2} М. Это соединение не только не инактивирует белок, но и не защищает его от потери активности при обработке пиридоксаль-5'-фосфатом, что доказывает важность фосфатной группы реагента для инактивации фермента.

От инактивации под действием пиридоксаль-5'-фосфата при pH 9 неорганическую пирофосфатазу защищают многозарядные анионы — пирофосфат и этилендиаминтетраацетат. Добавление в реакционную смесь, содержащую $5 \cdot 10^{-6}$ М ингибитор, после достижения максимальной глубины инактивации белка пирофосфата натрия до концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М приводит к полному восстановлению ферментативной активности. Это явление может быть связано либо с влиянием на процесс модификации активного центра заполнения регуляторного центра, существование которого показано для неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей и из *E. coli* [11, 12], либо с конкуренцией между отрицательно заряженным ингибитором и анионом при связывании с пирофосфатазой.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что так же, как и у описанных ранее аффинных ингибиторов, первой стадией реакции неорганической пирофосфатазы с пиридоксаль-5'-фосфатом является обратимое связывание ингибитора с ферментом с образованием специфического нековалентного комплекса за счет фосфатной группы.

Реакция неорганической пирофосфатазы из *E. coli* с пиридоксаль-5'-фосфатом во многом похожа на взаимодействие этого фермента с моноэфирами фосфорной кислоты, инактивирующими его с образованием в активном центре ацилфосфатной связи (ковалентные соединения ингибитора с ферментом можно выделить с помощью гель-фильтрации [9]), но отличается от него тем, что инактивация происходит и при концентрации белка выше 10^{-6} М. В этой связи предстояло выяснить, образуется ли при взаимодействии неорганической пирофосфатазы с пиридоксаль-5'-фосфатом наряду с альдимином и ацилфосфатная связь. Установлено, что добавление гидросиламина (до 1 М) в реакционную смесь после достижения максимальной глубины инактивации приводит к очень быстрому (менее чем за 0,5 мин) полному восстановлению ферментативной активности. Это подтверждает предположение о том, что инактивация фермента обусловлена взаимодействием карбонильной группы ингибитора с ε-аминогруппой лизина. Из этих данных следует также, что при взаимодействии неорганической пирофосфатазы с пиридоксаль-5'-фосфатом между белком и остатком фосфорной кислоты молекулы ингибитора не происходит образования ацилфосфатной связи, приводящей к инактивации фермента.

Таким образом, при реакции пиридоксаль-5'-фосфата и неорганической пирофосфатазы из *E. coli* происходит избирательная модификация одного остатка лизина активного центра, приводящая к полной инактивации фермента. Важную роль в обеспечении селективности этой реакции играет фосфатная группа пиридоксаль-5'-фосфата, с помощью которой происходит предшествующее инактивации обратимое связывание ингибитора в области активного центра фермента, по-видимому, за счет электростатического взаимодействия с положительно заряженным остатком лизина или аргинина.

Экспериментальная часть

В работе использовали веронал (Reanal, Венгрия), сефадекс G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция). Пиридоксаль-5'-фосфат (Reanal, Венгрия) перед употреблением очищали ионообменной хроматографией на колонке с дауэксом 1×4 , 200—400 меш (Serva, ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ос. ч. Трис(оксиметил)аминометан (трис) использовали после его перекристаллизации из этанола. Концентрацию пиридоксаль-5'-фосфата определяли спектрофотометрически по поглощению при 410 нм, принятая $\epsilon_{410} = 5300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при pH 9 [10]. Неорганическая пирофосфатаза, выделенная из штамма *E. coli* MRE-600 по методу

Джосса [1], имела уд. акт. 600 МЕ/мг при 25° С. Концентрацию растворов фермента определяли по поглощению при 280 нм, используя значения $\epsilon^{0,1\%}=1,18$ [4] и $M_r=120\,000$.

Ферментативную активность определяли по скорости образования ортофосфата из пирофосфата магния по методике [6] с помощью автоматического анализатора фосфата [13].

Реакция неорганической пирофосфатазы с пиридоксаль-5'-фосфатом. Фермент (10^{-7} – 10^{-5} М) инкубировали с пиридоксаль-5'-фосфатом (10^{-4} – 10^{-2} М) при 28° С. Через определенные промежутки времени (0–30 мин) отбирали аликвоты для определения ферментативной активности. В контрольном эксперименте реакционная смесь не содержала пиридоксаль-5'-фосфата. При проведении модификации при рН 6–10 использовали 0,1 М вероналовый, натрий-боратный и карбонат-бикарбонатный буферы. В отдельных опытах в реакционную смесь при рН 9, содержащую 10^{-7} М фермент, добавляли либо 10^{-3} М пирофосфат натрия, либо 10^{-3} М этилендиаминтетраацетат натрия, либо $5 \cdot 10^{-5}$ М пирофосфат натрия и 10^{-3} М CaCl_2 и выдерживали 30 мин при 25° С, после чего добавляли пиридоксаль-5'-фосфат до концентрации 10^{-3} М. За происходящими процессами следили как описано выше.

Определение числа модифицированных остатков лизина. После достижения определенной степени инактивации фермента в реакционную смесь добавляли NaNH_2 до концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ М, выдерживали 30 мин при 25° С и отделяли низкомолекулярные вещества гель-фильтрацией на колонке (1×75 см) с сефадексом G-50, уравновешенным 10^{-2} М NH_4HCO_3 . В белковой фракции измеряли поглощение при 280 и 325 нм и рассчитывали степень включения ингибитора в молекулу пирофосфатазы, принимая для пиридоксамина $\epsilon_{325}=10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при рН 8 [10].

Спектры нативного и модифицированного фермента после отделения избытка низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией снимали на спектрофотометре Specord (ГДР) (шкала 0–1,4 ОЕ) в кювете с длиной оптического пути 1 см в интервале 270–420 нм. Зависимость поглощения при 325 нм модифицированного и восстановленного фермента от рН изучали с использованием спектрофотометра Cary-219 (Varian, США; шкала 0–0,02 ОЕ) при 25° С. Аликвоты по 10 мкл образца модифицированного фермента ($15 \cdot 10^{-6}$ М) помещали в кварцевую кювету (длина оптического пути 0,5 см), содержащую 1 мл буфера, рН 3–11. Кювета сравнения содержала 1 мл буферного раствора.

Реактивацию модифицированного фермента изучали, добавляя пирофосфат натрия до концентрации 10^{-3} М в реакционную смесь, содержащую 10^{-7} М неорганическую пирофосфатазу, инактивированную 10^{-3} М пиридоксаль-5'-фосфатом при рН 9. Контрольной служила система, не содержащая пирофосфат.

Влияние пиридил-3-альдегида на активность неорганической пирофосфатазы и процесс инактивации под действием пиридоксаль-5'-фосфата. Фермент (10^{-7} М) инкубировали с 10^{-2} М пиридил-3-альдегидом в 0,1 М вероналовом буфере, рН 7,5, при 25° С. Фермент (10^{-7} М) инактивировали 10^{-3} М пиридоксаль-5'-фосфатом в вероналовом буфере, рН 9, при 25° С в присутствии 10^{-2} М пиридил-3-альдегида. Контрольные пробы не содержали пиридил-3-альдегида.

Изучение изменения степени инактивации неорганической пирофосфатазы при уменьшении концентрации ингибитора. Реакционную смесь, содержащую 10^{-6} М фермент и $5 \cdot 10^{-3}$ М пиридоксаль-5'-фосфат при рН 9, после достижения максимальной степени инактивации разбавляли в 5 или 1000 раз вероналовым буфером, рН 9. Контролем служила реакционная смесь, разбавленная буфером, содержащим $5 \cdot 10^{-3}$ М пиридоксаль-5'-фосфат. Через определенные промежутки времени отбирали по 5 мл полученного раствора, быстро добавляли пирофосфат натрия до 10^{-3} М и MgSO_4 до $5 \cdot 10^{-3}$ М и измеряли количество образующегося неорганического фосфата.

Взаимодействие пирофосфатазы, модифицированной пиридоксаль-5'-фосфатом, с гидроксиламином. В реакционную смесь, содержащую фер-

мент, инактивированный пиридоксаль-5'-фосфатом на 70%, добавляли гидроксилламин до концентрации 1 М. За ходом процесса следили, измеряя ферментативную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 17. P. 4335–4345.
2. Burton P. M., Hall D. C., Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 17. P. 4346–4352.
3. Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. № 9. P. 1948–1957.
4. Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. № 9. P. 1938–1947.
5. Burton P. M., Josse J. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 17. P. 4358–4364.
6. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. // *Биоорганическая химия*. 1983. Т. 9. № 8. С. 1032–1039.
7. Комиссаров А. А., Макарова И. В., Склянкина В. А., Аваева С. М. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 11. С. 1504–1509.
8. Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В., Склянкина В. А. // *Биоорганическая химия*. 1977. Т. 3. № 7. С. 943–949.
9. Борщик И. Б., Склянкина В. А., Аваева С. М. // *Биоорганическая химия*. Т. 11. № 6. С. 778–783.
10. Карнейский М. Я., Дудкин С. М., Сахаровский В. Г., Шляпников С. В. // *Структура и функции активных центров ферментов*. М.: Наука, 1974. С. 183–203.
11. Bakuleva N. P., Nazarova T. I., Baykov A. A., Avayeva S. M. // *FEBS Lett.* 1981. V. 124. № 2. P. 245–247.
12. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 10. № 10. С. 1336–1341.
13. Baykov A. A., Avayeva S. M. // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 32. № 1. P. 132–142.

Поступила в редакцию
21.VII.1986
После доработки
11.XI.1986

THE FUNCTIONALLY SIGNIFICANT RESIDUE OF LYSIN IN INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM *E. COLI*. I. INTERACTION OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE WITH PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE

KOMISSAROV A. A., SPANCHENKO O. V., SKLYANKINA A. A., AVAYEVA S. M.

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

Interaction of inorganic pyrophosphatase from *E. coli* with pyridoxal-5'-phosphate includes binding of the reagent at the active site through the phosphate group and then a reversible modification of one lysine residue in each of the enzyme's subunit. In the equilibrium state the protein's molecules contain both inactive modified and native subunits. A stable secondary amine is formed upon the sodium borohydride reduction of the modified protein.