



УДК 577.153.3.02

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАСТВОРИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ
АТФ-АЗЫ С АДЕНИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ И Mg^{2+}

Козлов И. А., Кононенко В. А.

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

Исследована роль Mg^{2+} в реакции гидролиза АТФ растворимой митохондриальной АТФ-азой. Показано, что истинным субстратом реакции является $Mg - АТФ$ (K_m $0,36 \pm 0,08$ мМ), а АТФ и Mg^{2+} — конкурентные ингибиторы процесса. Изучена роль Mg^{2+} в механизме ингибирования АТФ-азной реакции АДФ. На основании полученных результатов предполагается, что $Mg - АДФ$ является конкурентным ингибитором процесса с K_i $0,5 \pm 0,2$ мМ.

Актуальность исследования механизма действия растворимой митохондриальной АТФ-азы определяется важной ролью этого фермента в процессах окислительного фосфорилирования. Для понимания механизма АТФ-азной реакции большое значение имеет выяснение характера взаимодействий фермента с АТФ и Mg^{2+} , а также АДФ — эффективным ингибитором АТФ-азы и субстратом окислительного фосфорилирования. В настоящее время отсутствует единое мнение как о роли Mg^{2+} в АТФ-азной реакции, так и о числе центров связывания ферментом адениновых нуклеотидов. По мнению Хаммеса и Хилборна [1], АТФ-аза имеет два независимых АДФ-связывающих центра и один АТФ-связывающий центр. Авторы считают, что субстратом этой реакции является АТФ, а не его магниевая соль. Некоторые исследователи придерживаются другой точки зрения. Так, Катерел и Педерсен [2] обнаружили у фермента только один АДФ-связывающий центр. Кроме того, в ряде работ предполагается, что субстратом реакции является $Mg - АТФ$, а свободные Mg^{2+} и АТФ — конкурентные ингибиторы процесса [3, 4]. Настоящая работа посвящена выяснению характера взаимодействий АТФ-азы с компонентами АТФ-азной реакции — АТФ, АДФ и Mg^{2+} .

При обсуждении результатов кинетических исследований митохондриальной АТФ-азы и родственных ферментов не всегда обращалось должное внимание на роль Mg^{2+} . Так, Нельсон и др. [5], изучая скорость гидролиза АТФ АТФ-азой из хлоропластов как функцию от концентрации субстрата и ингибитора (АДФ), варьировали концентрации адениновых нуклеотидов, не учитывая при этом отношение $[Mg^{2+}]/АТФ$ и $[Mg^{2+}]/АДФ$. Изменение количества адениновых нуклеотидов в реакционной среде при фиксированном количестве Mg^{2+} приводило не только к изменению свободных концентраций АТФ, АДФ и Mg^{2+} , но и к неравномерному изменению концентраций соответствующих магниевых комплексов. Полученный указанными авторами сигмовидный характер зависимости скорости реакции от концентрации АТФ в присутствии АДФ скорее отра-

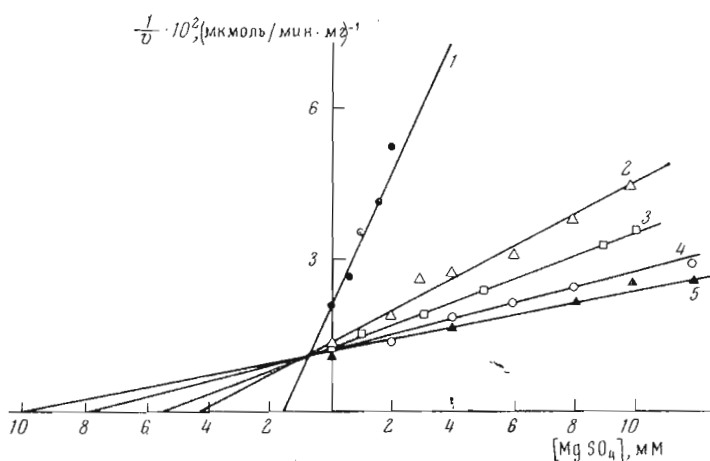


Рис. 1. Зависимость обратной скорости ферментативного гидролиза АТР от концентрации свободного Mg^{2+} при различных постоянных концентрациях $Mg-АТР$.
 Реакционная смесь: сахараза — 0,25 М; трис-НСI буфер (рН 8,3) — 3 мМ; АТР-аза — 10 мкг. $Mg-АТР$, мМ: 1 — 1; 2 — 2; 3 — 3; 4 — 4; 5 — 5

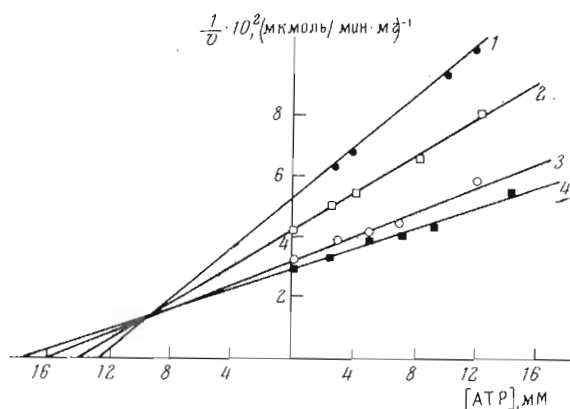
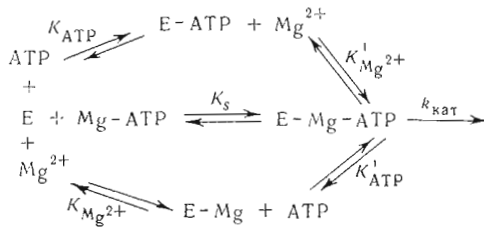


Рис. 2. Зависимость обратной скорости ферментативного гидролиза АТР от концентрации свободного АТР при различных постоянных концентрациях $Mg-АТР$.
 Состав реакционной смеси — см. подпись к рис. 1. $Mg-АТР$ мМ: 1 — 0,3; 2 — 0,5; 3 — 1; 4 — 2

жает изменение концентраций различных форм адениновых нуклеотидов, чем аллостерический механизм регуляции АТР-азной активности фермента. С целью выяснения роли Mg^{2+} в АТР-азной реакции мы исследовали систему фермент—субстрат—металл по методу Лондона—Стека [6]. Как известно, имеются факторы, существенно облегчающие исследование такой системы. Это, во-первых, высокое сродство субстрата к иону металла и, во-вторых, существование только одного типа комплекса металла с субстратом. Исследованная нами система удовлетворяла обоим условиям. Во всем интервале применяемых нами концентраций субстрата и Mg^{2+} преимущественно образовывался комплекс состава $Mg-АТР$ с $K_{длс}$ $10^{-3}M$ [7, 8]. На рис. 1 и 2 изображены зависимости обратных величин скорости АТР-азной реакции от свободных концентраций Mg^{2+} и АТР соответственно при постоянных концентрациях $Mg-АТР$. Характер полученных зависимостей удовлетворяет предположению, высказанному Селвином [3], а также Акименко и др. [4], что субстратом реакции является $Mg-АТР$, а свободные Mg^{2+} и АТР — конкурентные ингибиторы

процесса. В этом случае схему ферментативной реакции можно представить следующим образом [9]:



Скорость АТР-азной реакции связана с концентрацией Mg—АТР, АТР и Mg^{2+} уравнением [9]:

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [\text{E}] [\text{S}]}{[\text{S}] + K_m \left(\frac{[\text{Mg}^{2+}]}{K_{\text{Mg}^{2+}}} + \frac{[\text{АТР}]}{K_{\text{АТР}}} + 1 \right)}, \quad (1)$$

где $\text{S} = \text{Mg} - \text{АТР}$. При условии избытка Mg^{2+} или АТР уравнение (1) можно упростить:

$$v = \frac{[\text{E}] [\text{S}] k_{\text{кат}}}{[\text{S}] + K_m \left(\frac{A}{K_a} + 1 \right)}, \quad (2)$$

где A — компонент, находящийся в избытке (Mg^{2+} или АТР), а K_a соответствующая константа диссоциации. На основании полученных данных (рис. 1 и 2) в соответствии с уравнениями (1) и (2) можно вычислить $k_{\text{кат}}$ и константы равновесия реакций, представленных на схеме. Искомые величины были рассчитаны с использованием стандартной программы вычислительной машины: в предположении, что $K_m \approx K_s$; $k_{\text{кат}} = 2200 \pm \pm 600 \text{ мин}^{-1}$; $K_s = 0,36 \pm 0,08 \text{ мМ}$; $K_{\text{АТР}} = 8 \pm 3 \text{ мМ}$; $K_{\text{Mg}^{2+}} = 1 \pm \pm 0,3 \text{ мМ}$; $K'_{\text{АТР}} = 4 \pm 1 \text{ мМ}$; $K'_{\text{Mg}^{2+}} = 0,6 \pm 0,15 \text{ мМ}$. Близкие значения $K_m = 0,45 \pm 0,15 \text{ мМ}$ и $k_{\text{кат}} = 2100 \pm 700 \text{ мин}^{-1}$ были получены при изучении зависимости скорости АТР-азной реакции от концентрации $\text{Mg} - \text{АТР}$ в координатах Лайнуивера — Берка в отсутствие избытка Mg^{2+} и АТР.

В соответствии с уравнением (2) обратная величина скорости АТР-азной реакции линейно зависит от обратной концентрации $\text{Mg} - \text{АТР}$ в избытке Mg^{2+} при соблюдении одного из двух условий. Первое условие заключается в том, чтобы концентрация свободного Mg^{2+} не менялась при изменении концентрации $\text{Mg} - \text{АТР}$. Если концентрация свободного Mg^{2+} меняется, то необходимо соблюдать второе условие — поддерживать постоянным отношение $[\text{Mg} - \text{АТР}]/[\text{Mg}^{2+}]$ во всем интервале концентраций субстрата. Последнее требование было выполнено в работе Акименко и др. [4]. Определенная авторами кажущаяся величина K_m отличается от соответствующей константы, обозначенной на приведенной выше схеме в $K_{\text{Mg}^{2+}}/(K_{\text{Mg}^{2+}} + K_m \cdot n)$ раз, где $n = [\text{Mg}^{2+}]/[\text{Mg} - \text{АТР}]$.

Как уже отмечалось, АДФ является эффективным ингибитором АТР-азной реакции и это ингибирование осуществляется по конкурентному механизму [3]. Как правило, ингибирующий эффект АДФ изучался в присутствии избытка Mg^{2+} . Однако, как и в случае АТР-азной реакции, оставался невыясненным вопрос, какую роль играет Mg^{2+} в ингибирующем действии АДФ. По данным Хилборна и Хаммеса [10], как АДФ, так и $\text{Mg} - \text{АДФ}$ способны с высокой эффективностью связываться в активном центре АТР-азы. С другой стороны, в более ранней работе те же авторы утверждали, что величина ингибирующего эффекта АДФ зависит от

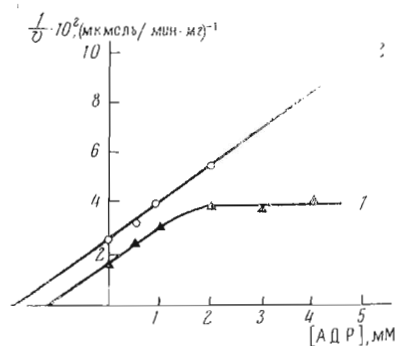


Рис. 3

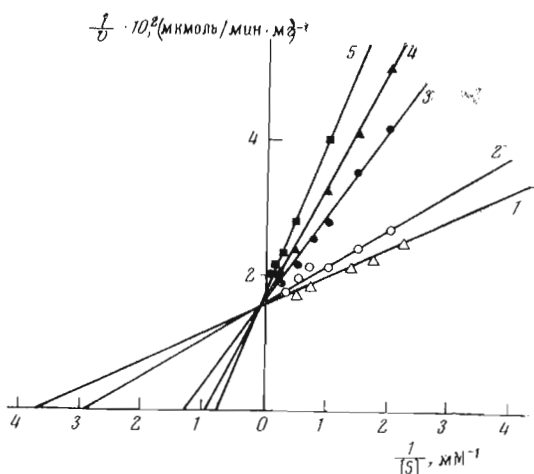


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость обратной скорости ферментативного гидролиза АТФ от концентрации АДФ.

Состав пробы: трис-НСl буфер (рН 8,3) — 3 мМ; АТФ — 3 мМ; АТФ-аза — 15 мкг. 1 — $[MgSO_4] = 4,5$ мМ, 2 — постоянный избыток свободного Mg^{2+} (2,5 мМ).

Рис. 4. Зависимость обратной скорости ферментативного гидролиза АТФ от обратной концентрации субстрата ($Mg - АТФ$) при различных постоянных концентрациях $Mg - АДФ$.

Состав пробы: сахараза — 0,25 М; трис-НСl буфер (рН 8,3) — 3 мМ; АТФ-аза — 15 мкг; постоянный избыток Mg^{2+} (0,3 мМ). $Mg - АДФ$, мМ: 1 — без $Mg - АДФ$, 2 — 0,3; 3 — 0,5; 4 — 0,8; 5 — 1,0

концентрации Mg^{2+} [1]. В соответствии с результатами, полученными в настоящей работе для проявления максимально ингибирующего эффекта АДФ требуется избыток Mg^{2+} . На рис. 3 приведена зависимость обратной скорости АТФ-азной реакции от концентрации АДФ в условиях фиксированного количества Mg^{2+} (4,5 мМ $MgSO_4$) в реакционной среде (1), а также в условиях постоянного избытка свободного Mg^{2+} (2,5 мМ) для всего интервала концентраций АДФ (2). Из рис. 3 видно, что обратная величина скорости АТФ-азной реакции линейно зависит от концентрации АДФ в условиях, когда весь АДФ находится в виде магниевой соли ($K_{дис} Mg - АДФ$ равна 10^{-4} М [7, 8]). Свободный АДФ в концентрации до 4 мМ не обладает заметным ингибирующим действием. Полученные результаты позволяют предположить, что истинным ингибитором АТФ-азной реакции является магниевая соль АДФ.

На рис. 4 представлена зависимость обратной скорости АТФ-азной реакции от обратной концентрации $Mg - АТФ$ при различных постоянных концентрациях $Mg - АДФ$. Реакцию проводили при постоянном избытке свободного Mg^{2+} (0,3 мМ), что обеспечивает существование адениновых нуклеотидов в виде магниевых комплексов во всем интервале применяемых концентраций субстрата и ингибитора. Из полученных результатов (рис. 4) следует, что $Mg - АДФ$ является конкурентным ингибитором АТФ-азной реакции. Этот вывод согласуется с данными работы [3]. Таким образом, при изучении ингибирующего эффекта $Mg - АДФ$ при избытке Mg^{2+} система включает, помимо субстрата, два конкурентных ингибитора (Mg^{2+} и $Mg - АДФ$). В этом случае скорость АТФ-азной реакции определяется уравнением [9]

$$v = \frac{k_{кат} [E] [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[Mg^{2+}]}{K_{Mg^{2+}}} + \frac{[Mg - АДФ]}{K_{Mg - АДФ}} \right)} \quad (9)$$

Уравнение (3), справедливое в предположении, что оба ингибитора конкурируют не только с субстратом, но и друг с другом за активный центр АТФ-азы, позволяет из экспериментальных данных рис. 4 вычислить K_{Mg-ADP} . Величина K_{Mg-ADP} , равная $0,5 \pm 0,2$ мМ, была рассчитана с использованием стандартной программы счетной машины БЭСМ-3М, с учетом полученных ранее данных по K_m и $K_{Mg^{2+}}$.

Таким образом, суммируя полученные нами результаты (рис. 3 и 4), можно заключить, что ингибирование растворимой митохондриальной АТФ-азы $Mg - ADP$ протекает по конкурентному механизму с $K_i 0,5 \pm \pm 0,2$ мМ, причем в активном центре фермента связывается одна молекула $Mg - ADP$. Поскольку нам не удалось с помощью кинетических измерений обнаружить аллостерическое влияние ADP на АТФ-азную активность, остается открытым вопрос о роли идентифицированного Хилборном и Хаммесом [10] второго, некаталитического центра связывания ADP ферментом.

Экспериментальная часть

Растворимую митохондриальную АТФ-азу выделяли из митохондрий сердца быка по методу Ракера и Хорстмана [11]. С помощью методов электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что в выделенном препарате АТФ-азы отсутствуют в заметном количестве белковые примеси. Начальную скорость АТФ-азной реакции измеряли по методу Чанса [12], регистрируя изменение рН реакционной среды, сопровождающее гидролиз АТФ. За измеряемое время реакции изменение рН не превышало 0,04. Степень превращения субстрата за тот же промежуток времени не превышала 5%. В типичном эксперименте при определении скорости АТФ-азной реакции смесь содержала: АТФ — 2 мМ; $MgSO_4$ — 5 мМ, трис-НСI буфер (рН 8,3) — 3 мМ и фермент — 3—15 мкг; общий объем 8 мл. Все эксперименты проводили при 25°. Приведенные на рисунках значения скоростей АТФ-азной реакции представляют собой средние величины нескольких опытов, причем разброс в результатах не превышал 10%.

Все экспериментальные кривые проведены по методу наименьших квадратов с использованием стандартной программы счетной машины «Seiko» (Япония).

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Hammes and D. A. Hilborn (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 233, 580—590.
2. W. A. Catterall and P. L. Pedersen (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 4987—4994.
3. M. J. Selwyn (1967) *Biochem. J.*, 105, 279—288.
4. В. А. Акименко, И. Б. Минков, А. Д. Виноградов (1972) *Биохимия*, 37, 348—352.
5. N. Nelson, H. Nelson, E. Racker (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 6506—6510.
6. W. P. London and Th. L. Steck (1969) *Biochemistry*, 8, 1767—1779.
7. H. Shikama (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 147, 311—317.
8. K. Shikama, K.-J. Nakamura (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 157, 457—463.
9. Л. Уэбб (1966) *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, стр. 156—185, М., «Мир».
10. D. A. Hilborn, G. Hammes (1973) *Biochemistry*, 12, 983—989.
11. E. Racker and L. L. Horstman (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2547—2554.
12. M. Nishimura, T. Yto, B. Chance (1962) *Biochim. et biophys. acta*, 52, 177—182.

Поступила в редакцию
5.XI.1974

THE INTERACTION OF SOLUBLE MITOCHONDRIAL ATPase WITH ADENINE NUCLEOTIDES AND Mg^{2+}

KOZLOV I. A., KONONENKO V. A.

Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow

The role of Mg^{2+} in the hydrolysis of ATP by soluble mitochondrial ATPase has been investigated. Mg -ATP was shown to be the real substrate of the reaction ($K_m = 0.36 \pm \pm 0.08$ мМ), whereas free ATP and Mg^{2+} were the competitive inhibitors. The function of Mg^{2+} ions in ATPase inhibition by ADP was also examined. An assumption was made that the reaction is competitively inhibited by Mg -ADP ($K_i = 0.5 \pm 0.2$ мМ).