



УДК 577.153.3.07.02

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ
ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ *HALOCYNTHIA*
AURANTHIUM

Байков А. А., Кашио В. Н., Аваева С. М.

Лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Разработан метод выделения неорганической пирофосфатазы из печени пурпурной асцидии. Полученный препарат фермента не обладает фосфатазной и аденозинтрифосфатазной активностью. Гидролиз пирофосфата протекает только в присутствии катионов двухвалентных металлов, наиболее эффективен из которых Mg^{2+} . Оптимальная активность фермента и наибольшая устойчивость по отношению к тепловой инактивации наблюдаются при pH 7,7. В присутствии NaF активность фермента значительно уменьшается. По влиянию Mg^{2+} на термическую устойчивость фермента определена константа диссоциации комплекса фермент — металл ($8 \cdot 10^{-5}$ M).

Неорганическая пирофосфатаза (К.Ф. 3.6.1.1) в присутствии катионов ряда двухвалентных металлов катализирует гидролиз пирофосфата. В кристаллическом виде этот фермент получен из нескольких источников [1—3].

В последние годы наблюдается повышение интереса к неорганическим пирофосфатазам. Это связано в первую очередь с новыми данными об участии этих ферментов в процессе синтеза АТФ из ADP и пирофосфата, т. е. в обмене энергии в клетке [4,5]. Кроме того, пирофосфатазная реакция является простейшей энзиматической моделью разрыва макроэргической фосфоангидридной связи — процесса, весьма распространенного в природе и в то же время мало изученного.

При изучении неорганических пирофосфатаз различного происхождения были обнаружены значительные различия в их строении и механизме действия [6, 7]. В связи с этим весьма перспективным для изучения общих закономерностей пирофосфатазной реакции представляется дальнейшее расширение круга используемых источников этого фермента.

Настоящая работа посвящена очистке и изучению в сравнительном аспекте некоторых свойств неорганической пирофосфатазы из печени морского беспозвоночного *Halocynthia aurantium*. *H. aurantium* является перспективным источником неорганической пирофосфатазы. В результате довольно простых операций (табл. 1) из 100 г исходного материала было получено около 9 мг очищенного препарата пирофосфатазы. Таким образом, выход активного белка оказался больше, чем при использовании такого популярного источника, как *S. cerevisiae* [8]. Результаты электрофореза полученного препарата в полиакриламидном геле показали, что пирофосфатаза составляет 70—80% общего белка. В то же время удельная активность фермента из *H. aurantium* невелика (30 ед/мг белка), поэтому по выходу пирофосфатазной активности этот организм уступает ряду других источников.

Таблица 1

Очистка пирофосфатазы

Стадия выделения	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Суммарная активность, М. Е.
Экстракт	510	4,5	1520
Насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
50%	570	1,5	1240
70%	52	4,9	1020
DEAE-сефадекс А-50	50	0,18	280

Таблица 2

Влияние катионов на пирофосфатазную активность
Условия: 0,1 М трис-НСl буфер (рН 7,2); $[\text{PP}_i] = 0,25$ мМ

Соль	Концентрация, мМ	Активность, %
MgSO_4	1,0	100
ZnSO_4	0,25	5,2
MnCl_2	0,25	4,6
CaSO_4	1,0	0,1
$\text{MgSO}_4 + \text{CaSO}_4$	1,0+1,0	0,5
Без солей	—	0,1

Специфичность фермента в отношении катиона-активатора. Каталитическая функция неорганической пирофосфатазы не проявляется в отсутствие двухвалентных катионов (табл. 2). Наиболее эффективным среди всех опробованных металлов оказался магний. Zn^{2+} и Mn^{2+} также способны активировать ферментативную реакцию. Ca^{2+} не только не является активатором, но в присутствии Mg^{2+} ведет себя как сильный ингибитор.

Субстратная специфичность фермента. Препарат фермента из *H. aurantiium* не обладал фосфатазной активностью. Это было проверено реакцией с 1 мМ *n*-нитрофенилфосфатом при рН 7,1 и 9,1 в 0,1 М трис-НСl буфере. Ни с Mg^{2+} , ни без него не было зарегистрировано превращения субстрата. Наличие АТР-азной активности было проверено при рН 7,2 в 0,1 М трис-НСl буфере при концентрации АТР 1 мМ. В присутствии 1,5 мМ Mg^{2+} , Zn^{2+} или Mn^{2+} активность фермента по этому субстрату была меньше 0,05% его активности по PP_i с Mg^{2+} .

рН-зависимость устойчивости пирофосфатазы. Стабильность фермента была охарактеризована отношением его активности после предынкубации в течение 1 ч в растворе буфера с заданным рН к активности фермента при том же значении рН, не подвергнутого такой обработке. Активность определяли при рН инкубационной системы. На рис. 1 видно, что максимальная устойчивость фермента проявляется при рН 7,7. В более щелочной области стабильность несколько уменьшается и резко падает при низких значениях рН.

рН-зависимость активности фермента. При изменении рН от 6,1 до 9,1 наблюдалась колоколообразная зависимость активности с максимумом при рН 7,7 (рис. 2). Интересно отметить, что рН-оптимумы активности и устойчивости фермента близки к рН морской воды, в которой обитает *Halocynthia aurantiium*.

Зависимость активности от концентраций Mg^{2+} , PP_i и фермента. На рис. 3 представлена зависимость скорости ферментативного процесса от $-\lg[\text{Mg}^{2+}]$ при постоянной концентрации субстрата. При достаточно низком содержании Mg^{2+} увеличение концентрации активатора приводило к

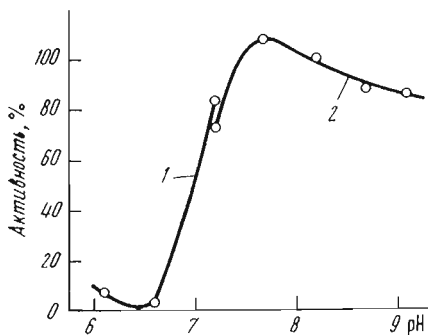


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость устойчивости фермента от рН Условия: 30°, 0,13 М имидазол-НСl буфер (кривая 1) или трис-НСl буфер (кривая 2); [E] = 7,6 мг/л

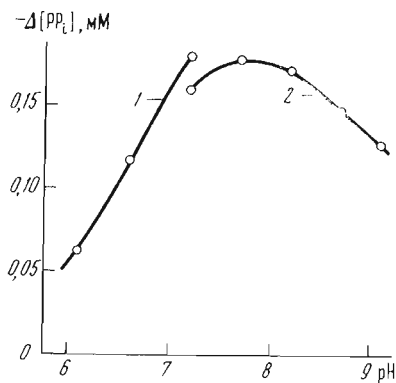


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности фермента от рН Условия: 30°; 0,1 М имидазол-НСl буфер (кривая 1) или трис-НСl буфер (кривая 2); [PP_i] = 1 мМ; [MgSO₄] = 1,5 мМ; [E] = 3,2 мг/л

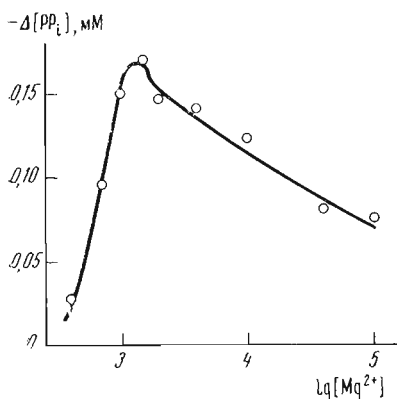


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость активности фермента от концентрации Mg²⁺ (мМ) Условия: 0,1 М трис-НСl буфер (рН 7,2); [PP_i] = 1 мМ; [E] = 3,2 мг/л

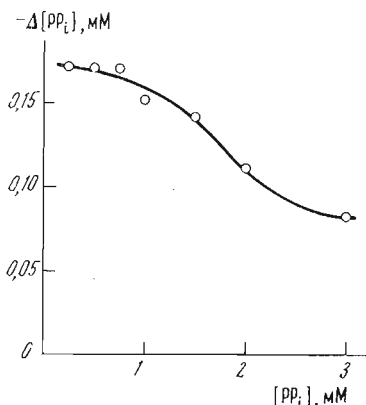


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость активности фермента от концентрации субстрата Условия: 0,1 М трис-НСl буфер (рН 7,2); [MgSO₄] = 1 мМ; [E] = 5,7 мг/л

росту активности. Оптимальная скорость наблюдалась при соотношении $[Mg^{2+}]/[PP_i] = 1,5$. Дальнейшее возрастание Mg^{2+} приводило к некоторому уменьшению активности.

Аналогичная зависимость скорости ферментативного процесса от концентрации субстрата при постоянном содержании активатора приведена на рис. 4. Она также интересна тем, что увеличение $[PP_i]$ выше некоторого предела вызывает уменьшение активности пиррофосфатазы.

Изменение концентрации фермента в диапазоне 1—5 мг/л вызывало линейное изменение скорости реакции.

Протекание пиррофосфатазной реакции во времени. Зависимость концентрации продукта от времени до полного исчерпания субстрата приведена на рис. 5 (кривая 1). Форма начального участка кривой указывает на существование индукционного периода реакции. Для пиррофосфатазы

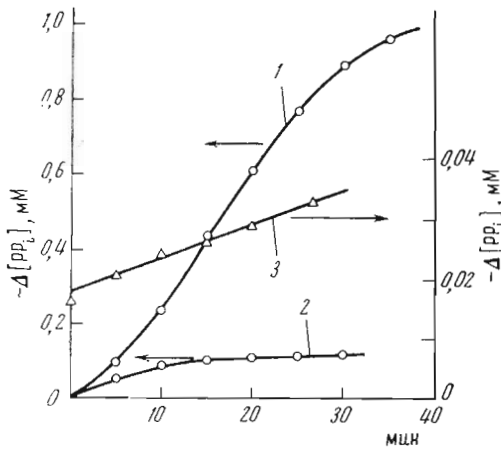
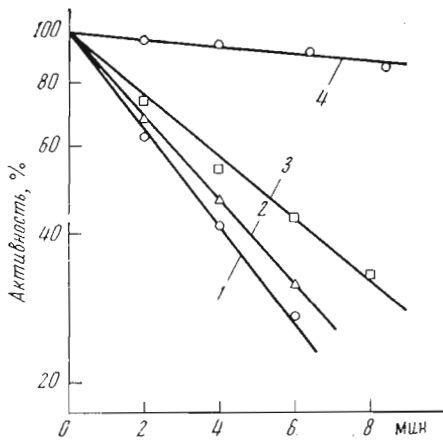


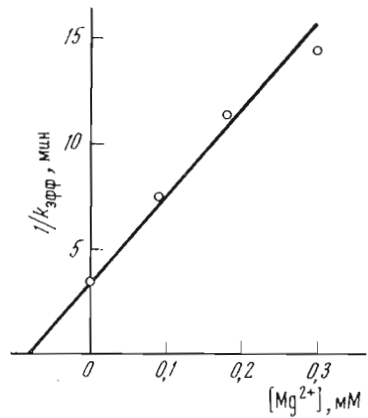
Рис. 5

Рис. 5. Кинетические кривые пирофосфатазной реакции в отсутствие и в присутствии NaF. Условия: 0,1 М трис-HCl буфер (pH 7,2); $[PP_i] = 1$ мМ; $[MgSO_4] = 1,5$ мМ; $[NaF] = 0$ (1), 0,1 (2) и 5 (3) мМ; $[E] = 6$ (1 и 2) и 70 (3) мг/л

Рис. 6. Влияние катионов на термическую стабильность фермента: а — сравнение защитного эффекта различных металлов. Условия: 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7,2, при 25°; 47°. 1 — без добавки; 2 — $[ZnSO_4] = 0,2$ мМ; 3 — $[CaSO_4] = 1$ мМ; 4 — $[MgSO_4] = 0,2$ мМ; б — данные о влиянии магния на тепловую инактивацию фермента в координатах уравнения (1)



а



б

Рис. 6

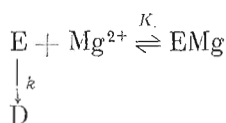
из *Saccharomyces cerevisiae* аналогичный факт позволил предположить существование медленной стадии взаимодействия фермента с катионом-активатором [9].

Ингибирование реакции фторидом. Из рис. 5 видно, что в присутствии фторида кривая накопления продукта резко меняет свой вид. Введение всего 0,1 мМ NaF (кривая 2) в реакционную смесь приводит к снижению величины превращения субстрата за 30 мин с 90 до 12%. Кинетическая кривая ингибированной реакции состоит из двух участков: криволинейного и линейного. Существование линейной зависимости $-\Delta[PP_i]$ от t при достаточно большом времени реакции отчетливо видно на рис. 5 (кривая 3). Отсюда следуют два вывода: реакция ингибирования развивается в течение нескольких минут, и ингибированный фермент сохраняет часть своей активности.

Тепловая инактивация фермента в присутствии катионов. Выдерживание фермента при температуре 47° вызывает постепенную его инактивацию. Наблюдение за ходом этого процесса в течение двух периодов полупревращения позволяет сделать вывод о том, что он является реакцией первого порядка (рис. 6, а, кривая 1). В присутствии катионов фермент более устойчив (рис. 6, а). Наибольшая стабилизация достигается добавлением соли магния, которая в концентрации 3 мМ полностью защищает фермент от инактивации в течение 8 мин. Аналогичный факт влияния катио-

нов на устойчивость пирофосфатазы из *S. cerevisiae* был объяснен существованием взаимодействий в системе фермент — катион [10].

Простейшая схема, описывающая стабилизацию фермента магнием, имеет следующий вид:



где k представляет собой константу скорости первого порядка инактивации свободной формы фермента, а K — константу нестойкости комплекса фермент — металл, D — неактивный фермент. Математическая обработка этой схемы приводит к следующему выражению, удобному для определения величины K :

$$\frac{1}{k_{эфф}} = \frac{1}{k} \left(1 + \frac{[Mg^{2+}]}{K} \right) \quad (1)$$

где $k_{эфф}$ — константа скорости первого порядка инактивации фермента в присутствии эффиктора.

Результаты изучения стабилизации фермента различными концентрациями Mg^{2+} приведены на рис. 6, б в координатах уравнения (1). Линейный характер зависимости означает, что уравнение (1), а значит, и схема справедливы. K оказалась равной 0,08 мМ.

Сравнение данных о структуре и механизме действия пирофосфатаз из различных источников приводит к выводу о существовании значительных различий между этими ферментами. Так, фермент из *E. coli* состоит из шести субъединиц и имеет M 120 000 [11], в то время как пирофосфатаза из *S. cerevisiae* состоит из двух субъединиц и имеет M 70 000 [12—14]. Кроме того, функционирование фермента из *S. cerevisiae* включает стадию активации фермента металлом до взаимодействия с субстратом [15—17], а для пирофосфатазы из *E. coli* такая стадия не была обнаружена [18]. В настоящей работе не проводилось детального кинетического исследования, которое позволило бы оценить существенность активации металлом для фермента из *H. aurantium*. Однако обнаружение взаимодействия этого фермента с металлами в отсутствие субстрата позволяет предположить, что он имеет сходство с ферментом из *S. cerevisiae*. В рамках кинетической схемы, предложенной для последнего фермента, объяснение ингибирования реакции избытком субстрата и активатора, наблюдаемого для изучаемого препарата (рис. 3, 4), следует искать в том, что свободный субстрат и образующийся при большой концентрации Mg^{2+} комплекс Mg_2-PP_i являются соответственно конкурентным ингибитором и конкурентным субстратом с меньшей реакционной способностью по отношению к истинному субстрату, комплексу $Mg-PP_i$ [15—17].

Специфичность фермента из *H. aurantium* в отношении металла-активатора такая же, как у подавляющего числа других пирофосфатаз. Наиболее эффективным катионом во всех случаях является Mg^{2+} . Ряд других металлов также способен активировать фермент, но в меньшей степени. Очень характерным для пирофосфатаз является антагонизм между Mg^{2+} и Ca^{2+} , присущий и изучаемому ферменту.

Не менее общим свойством пирофосфатаз является подавление ферментативной активности в присутствии фторида, наблюдаемое также и для изучаемого фермента (рис. 5).

Для большинства пирофосфатаз пирофосфат является не единственным субстратом. Субстратная специфичность этих ферментов по отношению к «дополнительным субстратам» значительно различается. Фермент из *S. cerevisiae* гидролизует монозамещенные эфиры полифосфорных кислот, такие, как ADP и ATP [19], а фермент из *E. coli* такой способностью не обладает

[2, 20]. Пирофосфатаза из *H. auranthium* также каталитически неактивна при превращении АТР. Подобные различия в свойствах пирофосфатаз, по-видимому, являются отражением различий в организации и функционировании их активных центров, что, однако, не исключает существования более или менее универсального механизма каталитического расщепления фосфоангидридной связи.

Экспериментальная часть

В работе были использованы трис(гидроксиметил)аминометан, имидазол и динатриевая соль АТР фирмы «Reanal» (Венгрия). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ч.д.а. Концентрацию белковых растворов определяли методом Лоури и др. [21]. Активность фермента определяли по образованию фосфата в результате гидролиза пирофосфата в течение 10 мин при 30° в 0,1 М трис-НСl буфере (рН 7,2). Для измерения содержания фосфата был использован ручной вариант предложенного ранее автоматического метода [22, 23]. Из реакционной среды объемом 2 мл отбирали аликвоты объемом 0,04—1 мл и смешивали с 1 мл 1,75%-ного раствора молибдата аммония в 11%-ной серной кислоте. Полученную смесь доводили до объема 2,25 мл добавлением водного раствора красителя метилового зеленого и детергента «Triton» X305, и оптическую плотность немедленно измеряли при 650 нм спектрофотоколо-риметром «Spekol» («Carl Zeiss», ГДР). Запасной раствор краситель + детергент готовили с таким расчетом, чтобы концентрация красителя и детергента в кювете калориметра была соответственно 40 и 20 мг/л. При использовании фотометрической кюветы с длиной оптического пути 1 см концентрации фосфата 10^{-5} М в кювете соответствовала оптическая плотность 0,56.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и последующее определение белка и пирофосфатазной активности проводили по описанным методикам [24, 25].

Очистка фермента. Печень 25 свежесобранных асцидий (100 г) была охлаждена и затем гомогенизирована на микроизмельчителе тканей 5 мин при 3000 об/мин. Белки экстрагировали 300 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН 7,7). Смесь центрифугировали 15 мин при 8000 g, надосадочную жидкость собирали, а осадок растирали с кварцевым песком в течение 5 мин, экстрагировали еще 200 мл того же буфера и центрифугировали 15 мин при 8000 g. Надосадочные жидкости объединяли и к полученному объему (510 мл) добавляли сульфат аммония до 50%-ного насыщения. Спустя 2 ч смесь центрифугировали 15 мин при 8000 g и надосадочную жидкость доводили сульфатом аммония до 70%-ного насыщения. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в 30 мл дистиллированной воды и диализовали в течение 16 ч против воды. Диализованный экстракт уравнивали 0,03 М трис-НСl буфером (рН 7,7) и наносили на колонку (4,0 × 40 см) с сефадексом А-50, уравновешенным тем же буфером. Элюцию проводили со скоростью 0,5 мл/мин, используя линейный градиент от 0,02 М трис-НСl буфер (рН 7,7) до 0,02 М трис-НСl буфер (рН 7,7) + 0,3 М NaCl (общий объем 1000 мл). Пирофосфатаза выходила в последней трети градиента. Получено 9 мг препарата с активностью 30 ед/мг белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kunitz M. (1952) J. Gen. Physiol., 35, 423—450.
2. Josse J. (1966) J. Biol. Chem., 241, 1938—1947.
3. Niculescu S., Dumitru I. E., Iordulescu D. (1972) Acta vitaminol. et enzymol., 26, 13—22.
4. Keister D. L., Minton N. J. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 147, 330—338.
5. Мансурова С. Э., Белякова Т. Н., Рулаев И. С. (1973) Биохимия, 38, 223—226.

6. Josse J., Wong S. C. K. (1970) in *The Enzymes*, 3d edn. Academic Press, New York, v. 4, p. 499—527.
7. Butler L. G. (1970) in *The Enzymes*, 3d edn. Academic Press, New York, v. 4, p. 529—541.
8. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, 38, 344—350.
9. Höhne W. E., Rapoport T. A. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 32, 323—331.
10. Шафранский Ю. А., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, 38, 1248—1253.
11. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 4335—4345.
12. Ridlington J. W., Yang Y., Butler L. G. (1972) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 153, 714—725.
13. Hansen G., Eifler R., Heitmann P. (1972) *Acta biol. et med. ger.*, 28, 977—987.
14. Heinrikson R. L., Sterner R., Noyes C., Cooperman B. S., Bruckmann R. H. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2521—2528.
15. Moe O. A., Butler L. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7308—7314.
16. Rapoport T. A., Höhne W. E., Reich J. G., Heitmann P., Rapoport S. M. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 26, 237—246.
17. Braga E. A., Awaeva S. M. (1972) *Biochim. and Biophys. Res. Commun.*, 49, 528—535.
18. Josse J. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 1948—1955.
19. Schlesinger M. J., Coon M. J. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, 41, 30—36.
20. Pynes G. D., Younathan E. S. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2119—2123.
21. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275.
22. Van Belle H. (1970) *Anal. Biochem.*, 33, 132—146.
23. Baykov A. A., Awaeva S. M. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 32, 136—142.
24. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404—427.
25. Tono H., Kornberg A. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2375—2388.

Поступила в редакцию *
2.VIII.1974

**PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF INORGANIC
PYROPHOSPHATASE FROM HEPATOPANCREAS
OF *HALOCYNTHIA AURANTHIUM***

BAYKOV A. A., KASHO V. N., AVAeva S. M.

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

A method was developed for the isolation of inorganic pyrophosphatase from *Halocynthia auranthium* liver. The enzyme preparations obtained were devoid of phosphatase and adenosine triphosphatase activity. The hydrolysis of pyrophosphate proceeds only in the presence of divalent metal ions, Mg^{2+} being most effective among them. pH-optima of enzyme activity and thermal stability are equal to 7.7. In the presence of NaF enzyme activity considerably decreases. The dissociation constant of enzyme-metal complex was determined from the effect of Mg^{2+} on the thermal stability of the enzyme ($K_D = 8 \cdot 10^{-5}$ M).

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия»; дата поступления — 19.VI, 1974 г.