



УДК 577.15.02

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ
ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Воскобоев А. И., Островский Ю. М., Черникевич И. П.

Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР, Гродно

Десенсбилизация тиаминпирофосфокиназы (ТПФкиназы) ведет к потере чувствительности фермента к действию аллостерических эффекторов, что предполагает наличие в ТПФкиназе отдельных активных и аллостерических центров. Показано, что обработка ТПФкиназы (M 90 000—95 000) 6 M мочевиной или додецилсульфатом натрия в присутствии меркаптоэтанола приводит к диссоциации фермента на субъединицы с M 24 000. Предполагается, что ТПФкиназа относится к классу регуляторных диссоциирующих ферментов.

Разработанные в настоящее время методы выделения и очистки ТПФкиназы (КФ 2.7.6.2) из пивных дрожжей позволяют получить высокоочищенные препараты фермента с M 90 000—95 000 [1, 2]. Очищенная ТПФкиназа является, по-видимому, олигомером, поскольку обладает рядом свойств, присущих аллостерическим ферментам [3]. Например, кривые зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (АТФ), а также от концентраций аллостерических активаторов (Mg^{2+} , Mn^{2+}) и ингибитора (АМР) имеют S-образный характер. Все эти ферменты являются олигомерами и содержат обычно несколько активных и аллостерических центров в молекуле. Известно, что непосредственным доказательством взаимодействия активных и аллостерических центров является получение регуляторного фермента в десенсбилизированном состоянии. В настоящей работе изучены кинетические свойства ТПФкиназы в десенсбилизированном состоянии и ее четвертичная структура.

Как видно из рис. 1, прогревание фермента при 37° в течение 5 мин приводило к существенному изменению S-образности кривой скорости реакции в зависимости от концентрации аллостерического эффектора. При исследовании нативного фермента эта кривая в координатах Лайнуивера — Берка является выпуклой к оси абсцисс, а для десенсбилизированной ТПФкиназы она спрямляется. Коэффициент Хилла при этом уменьшается с 3 до 1,1. При десенсбилизации ТПФкиназы $2 \cdot 10^{-5} M$ $HgCl_2$ S-образность кривой при активации фермента ионами Mg^{2+} также уменьшалась, что подтверждается изменением коэффициента кооперативности Хилла. Таким образом, учитывая кооперативные взаимодействия центров связывания субстрата и аллостерических эффекторов, а также данные, полученные при десенсбилизации фермента, можно предположить, что ТПФкиназа из пивных дрожжей является олигомерным белком.

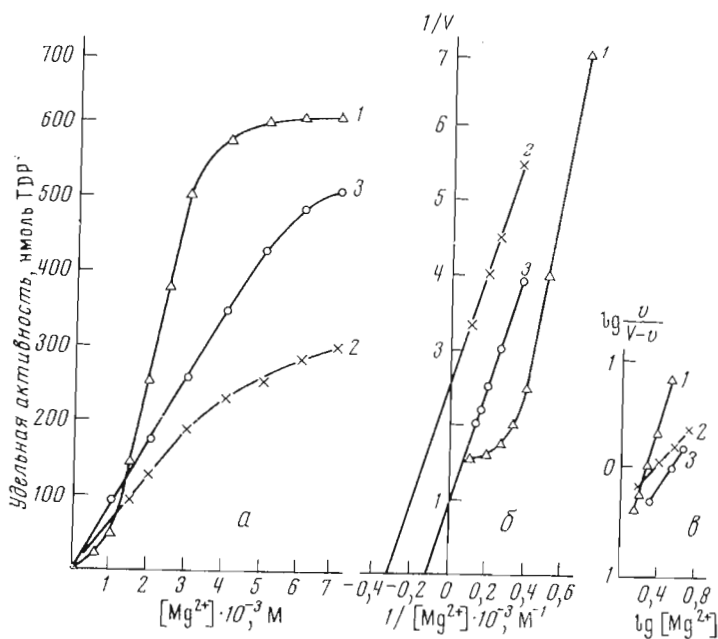


Рис. 1

Рис. 1. Скорость ферментативной реакции, катализируемой ТПФкиназой, нативной (1), десенсибилизированной температурной обработкой (2) и $HgCl_2$ (3) в зависимости от концентрации аллостерического активатора: а — скорость ферментативной реакции в координатах удельная активность — концентрация аллостерического активатора (Mg^{2+}); б — то же в координатах Лайнуивера — Берка; в — расчет коэффициента кооперативности Хилла графическим методом. Инкубационная смесь в 1 мл содержала, М: тиамин — $2,5 \cdot 10^{-3}$, АТР — $1 \cdot 10^{-6}$, трис-НСI буфер (рН 8,6) — $5 \cdot 10^{-5}$ и соответствующие концентрации Mg^{2+} . Инкубация 1 ч при 40.

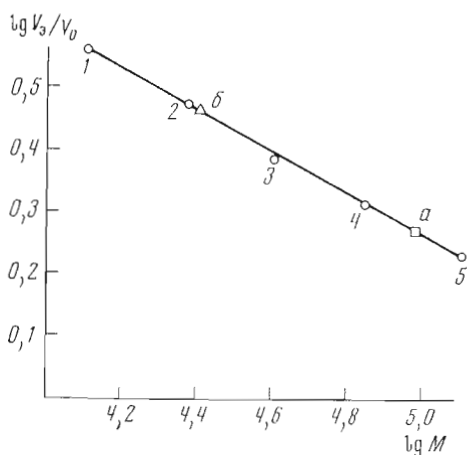


Рис. 2

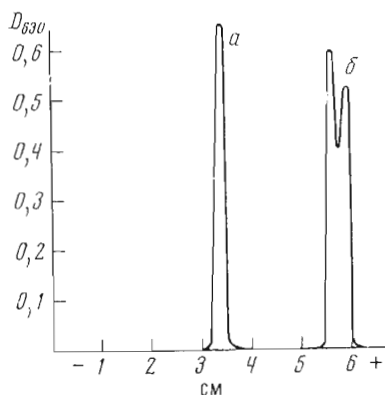


Рис. 3

Рис. 2. Молекулярный вес нативной (а) и диссоциированной в 6 М мочевице (б) ТПФкиназы по данным гель-фильтрации через сефадекс G-200.

Маркеры: 1 — цитохром с (M 12 400), 2 — трипсин (M 23 800), 3 — пероксидаза (M 44 000), 4 — гемоглобин (M 67 000), 5 — лактатдегидрогеназа (M 135 000)

Рис. 3. Схема электрофореграммы ТПФкиназы, диссоциированной додецилсульфатом натрия в присутствии 2-меркаптоэтанолола: а — до диссоциации, б — после диссоциации

Число субъединиц в ТПФкиназе определяли методом диссоциации в растворах мочевины и додецилсульфата натрия. В первом случае раствор фермента разбавляли 8 М мочевиной до ее конечной 6 М концентрации и затем хроматографировали на колонке с сефадексом G-200. Как видно из рис. 2, белок при этом вымывался одним пиком, имеющим M 24 000, что составляет $1/4$ от молекулярного веса нативного фермента. Следовательно, в присутствии 8 М мочевины ТПФкиназа диссоциирует на 4 субъединицы. Полученный при этом мономер оказался неактивным. Удаление мочевины диализом или фильтрацией через колонку с сефадексом G-25 не приводило к ассоциации субъединиц и восстановлению активности.

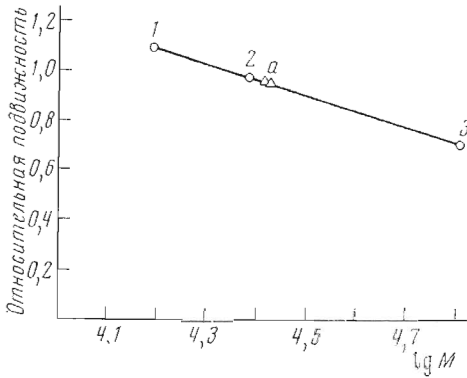


Рис. 4. Молекулярный вес диссоциированной додецилсульфатом натрия ТПФкиназы (а) по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Маркеры: 1 — гемоглобин (M 15 500), 2 — трипсин (M 23 800), 3 — альбумин (M 67 000)

Как видно из рис. 3, белок, обработанный додецилсульфатом натрия, имеет относительную электрофоретическую подвижность, значительно большую, чем нативный фермент. При этом ТПФкиназа разделяется на два компонента с очень близкой электрофоретической подвижностью (возможно, вследствие наличия примесей в додецилсульфате натрия [5]) и молекулярным весом 24 000 и 26 000 (рис. 4). Повышение температуры не вызывало дальнейшей диссоциации фермента.

Таким образом, минимальный каталитически активный олигомер ТПФкиназы состоит из 4 субъединиц и, вероятно, этот фермент можно отнести к классу регуляторных диссоциирующих ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали высокоочищенную ТПФкиназу, гомогенную при электрофорезе в полиакриламидном геле и с одинаковой удельной активностью во всех фракциях, полученных при элюции с колонки сефадекса G-200, что также свидетельствовало о гомогенности препарата фермента.

Активность ТПФкиназы определяли описанным ранее методом [6] с некоторыми разработанными нами модификациями [1]. Количество тиамидифосфата (ТДФ) определяли ферментативным методом [7, 8] с помощью апопируватдекарбоксилазы (рН 6,8; 30 мин, комнатная температура). Активность образованной за время инкубации холопируватдекарбоксилазы (прямо пропорциональной содержанию ТДФ) определяли по убыли NADH_2 с помощью алкогольдегидрогеназы [8]. Белок определяли по методу Лоури [9]. Удельную активность ТПФкиназы выражали в нмоль ТДФ, образовавшегося за 1 ч при 40° в расчете на 1 мг ферментного препарата.

Десенсублизация ТПФкиназы: фермент нагревали 5 мин при 37°, охлаждали и проводили кинетические исследования. Для изучения действия HgCl_2 ингибитор в $2 \cdot 10^{-5}$ М концентрации добавляли в реакционную смесь в момент начала ферментативной реакции.

Диссоциация в мочеине: фермент инкубировали в 6 М мочеине в течение 30 мин при 4° в 0,01 М трис-НСI буфере (рН 7,3). Обработанный мочеиной препарат пропускали через колонку ($1,7 \times 90$ см) с сефадексом G-200, предварительно уравновешенную 6 М мочеиной в 0,01 М трис-НСI-буфере (рН 7,3), содержащем 0,01% 2-меркаптоэтанол. Элюцию со скоростью 8 мл/ч проводили тем же раствором, собирая фракции по 3 мл. Молекулярный вес фермента и продуктов его диссоциации в мочеине определяли фильтрацией через сефадекс G-200 [10] с использованием белков-маркеров (см. рис. 2). Свободный объем колонки определяли по голубому декстрану, белок в элюате — спектрофотометрически при 280 нм.

Диссоциация в додецилсульфате натрия: ТПФкиназу выдерживали в 0,01 М трис-НСI буфере (рН 7,3), содержащем 1%-ный додецилсульфат натрия и 1%-ный меркаптоэтанол, в течение 16—18 ч при 37° или 1,5 мин при 100°. Электрофорез в присутствии 0,1%-ного додецилсульфата натрия и определение молекулярных весов полипептидных цепей ТПФкиназы проводили по ранее описанному методу [4, 11]. После электрофореза гели фиксировали в 10% трихлоруксусной кислоте и окрашивали 0,25% кумасси-синего. Молекулярный вес диссоциированной ТПФкиназы рассчитывали по калибровочному графику, выражающему зависимость логарифма молекулярного веса от относительной подвижности стандартных белков-маркеров [11]. Относительную подвижность измеряли как отношение расстояния миграции белковой полосы к расстоянию, пройденному красителем — бромфеноловым синим.

Окрашенные гели денситометрировали в спектрофотометре «Specord» (ГДР) с соответствующей приставкой. Относительное весовое содержание компонентов определяли по денситограммам гелей, считая, что площадь под каждым пиком оптической плотности пропорциональна весовому количеству белка в этой полосе [4]. Диск-электрофорез нативной ТПФкиназы проводили по описанному методу [12]. После фиксирования в трихлоруксусной кислоте гели окрашивали амидочерным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воскобоев А. И., Черникевич И. П., Островский Ю. М. (1975). Прикл. биохимия и микробиол., 11, 230—236.
2. Островский Ю. М., Воскобоев А. И., Черникевич И. П. (1974) Весті АН БССР, 4, 106—108.
3. Курганов Б. И., Поляповский О. Л., (1971). Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 16, 421—431.
4. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4410.
5. Swaney I. B., Woude G. F. V., Bachrach H. L. (1974) Anal. Biochem., 58, 337—401.
6. Mano Y. (1959) J. Biochem., 47, 24—36.
7. Ullrich J. (1970) Methods Enzymol., 18, 109—115.
8. Näveke R., Goedde H. W., Holzer H. (1962) Arch. Microbiol., 44, 93—100.
9. Lowry O. H., Rosenberg N. J., Farr A. L., Randall R. I. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
10. Andrews P., Folley S. I. (1964) Biochem. J., 91, 222—223.
11. Laemmli U. K. (1970) Nature, 227, 680—685.
12. Ornstein L. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321—325.

Поступила в редакцию
18.XI.1974

THE QUATERNARY STRUCTURE OF THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE FROM BREWER'S YEAST

VOSKOBOEV A. I., OSTROVSKY Yu. M., CHERNIKEVICH I. P.

*Metabolism Regulation Division,
Academy of Sciences of the BSSR, Grodno*

On thermal desensibilisation (at 37°), thiamine pyrophosphokinase from brewer's yeast (EC 2.7.6.2) loses sensitivity to allosteric effectors. This indicates that the kinase contains allosteric binding sites spatially distant from the active sites. The quaternary structure of thiamine pyrophosphokinase (mol. weight 90 000—95 000) has been studied. Treatment of the enzyme with 6 M urea leads to its dissociation into catalytically inactive subunits having (from the results of gel filtration through Sephadex G-200) a molecular weight of 24 000. Sodium dodecyl sulfate (1%) in the presence of 2-mercaptoethanol and subsequent gel electrophoresis in SDS-polyacrilamide bring about the dissociation of the enzyme into 2 components with the molecular weights of 24 000 and 26 000. Thus, the minimal catalytically active oligomer consists of four subunits, i. e., the enzyme is, apparently, a tetramer and belongs to the class of dissociating regulatory enzymes.
