



УДК 577.452.361*1'434:577.112.4

ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЙ ОСТАТОК ЛИЗИНА
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ*Комиссаров А. А., Макарова Н. А., Скляпкина В. А.,
Аваева С. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Химический факультет и Межфакультетская проблемная
научно-исследовательская лаборатория им. А. Н. Белозерского*

Установлено, что инактивация неорганической пирофосфатазы пекарских дрожжей 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой является результатом модификации остатка лизина, занимающего 56-е положение в аминокислотной последовательности. Высказано предположение, что Lys⁵⁶ участвует в связывании иона металла-активатора ферментом.

Неорганическая пирофосфатаза (КФ 3.6.1.4) пекарских дрожжей катализирует гидролиз и синтез неорганического пирофосфата. Молекула фермента состоит из двух идентичных субъединиц, содержащих по 285 аминокислотных остатков, последовательность которых полностью установлена [1]. Пирофосфатаза — металлозависимый фермент. Для активации гидролиза субстрата необходимо присоединение к ферменту двух ионов двухвалентного металла, из которых наиболее эффективны Mg²⁺ и Zn²⁺ [2]. Эти ионы связываются в центрах фермента, которые имеют различающееся на порядок сродство к Mg²⁺. Константы диссоциации соответствующих комплексов составляют $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ М [2–4]. Субстратом фермента является комплекс пирофосфата с магнием. На основании рентгеноструктурного анализа, выполненного с разрешением 3,2 Å, построена атомная модель фермента и локализована область активного центра [5].

Создание детальной картины механизма действия фермента требует идентификации аминокислотных остатков, участвующих в каталитическом процессе. Для выявления функционально важных остатков в молекулах ферментов широко используется метод химической модификации. В частности, при применении для модификации неорганической пирофосфатазы фенилглиоксаля была установлена роль Arg⁷⁷ в связывании субстрата [6, 7].

Ранее нами было показано, что в каждой субъединице пирофосфатазы имеется один остаток лизина, реагирующий с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой (TNBS) с большей скоростью, чем остальные 26 остатков Lys [8, 9]. Модификация этого остатка ведет к инактивации фермента.

Настоящая работа является продолжением этих исследований и посвящена локализации в аминокислотной последовательности и выяснению возможной функциональной роли остатка лизина, тринитрофенилирование которого ингибирует пирофосфатазную активность.

Модификацию неорганической пирофосфатазы проводили при pH 8,5 и 37° С, используя 2,5-кратный мольный избыток реагента по отношению к белку. В отличие от работы [9] в реакционную смесь добавляли 10% ацетона, что позволило значительно увеличить скорость реакции и повысить ее селективность. При этом полностью сохранялись основные закономерности процесса — полная защита от ингибирования субстратом (пирофосфатом магния) и хорошая корреляция между глубиной ингибирования и количеством заблокированных остатков лизина. В контрольных экспериментах в отсутствие TNBS фермент полностью сохранял активность.

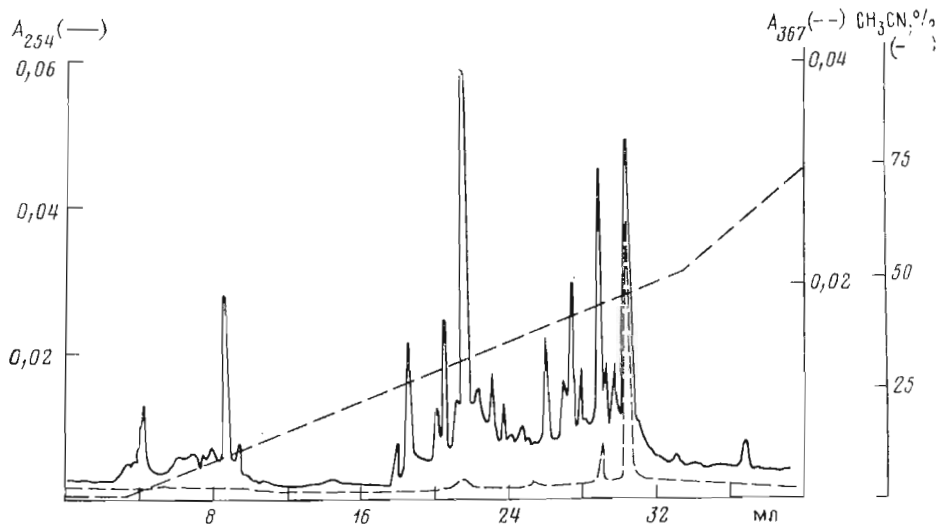


Рис. 1. Разделение пептидов триптического гидролизата тринитрофенилированной неорганической пирофосфатазы

Модифицированный фермент, содержащий около двух тринитрофенильных групп на 1 моль димера, гидролизовали трипсином. Полученные пептиды разделяли ВЭЖХ. Из рис. 1 видно, что пептид, содержащий модифицированный остаток лизина, обладает большой гидрофобностью, он находится во фракции, выходящей при концентрации ацетонитрила $\sim 45\%$. Выделенный пептид гомогенен по данным двумерной хроматографии в тонком слое целлюлозы. Для идентификации N-концевой аминокислоты пептид дансильировали и гидролизовали соляной кислотой [10]. При этом дансильированная аминокислота не была обнаружена, что позволило предположить наличие на N-конце исследуемого пептида остатка триптофана, дансильное производное которого разрушается в условиях кислотного гидролиза. Действительно, дансильтриптофан был обнаружен после расщепления дансильированного пептида химотрипсином, что свидетельствовало о правильности сделанного предположения.

Известно, что под действием трипсина нативная пирофосфатаза образует 35 пептидов, из которых только один, пептид Т-9, содержит на N-конце триптофан [1]. Этот пептид занимает в аминокислотной последовательности молекулы фермента положение с 52-го по 56-й и имеет на С-конце остаток лизина. Полученные нами данные позволили предположить, что тринитрофенилирование подвергается именно остаток Lys⁵⁶. Тогда в триптическом гидролизате модифицированной пирофосфатазы должен присутствовать Т-9, удлиненный с С-конца на участок 57–61 п, следовательно, имеющий структуру Trp-Thr-Asn-Ala-Lys(Trp)-Leu-Gln-Phe-Thr-Lys [1]. Действительно, результаты аминокислотного анализа, приведенные в таблице, подтверждают его состав. Можно отметить характерное уменьшение в гидролизате содержания треонина, стоящего рядом с триптофаном, разрушающимся в процессе кислотного гидролиза. Такой факт наблюдался и ранее [1].

Таким образом, аминокислотным остатком, модификация которого TNBS приводит к потере ферментативной активности, является остаток лизина, занимающий положение 56 в первичной структуре неорганической пирофосфатазы из дрожжей.

Исследование функциональной роли Lys⁵⁶. Из рассмотрения атомной модели неорганической пирофосфатазы следует, что Lys⁵⁶ расположен в полости активного центра фермента в непосредственной близости к Arg⁷⁷, Lys⁶⁹⁷ и Glu⁵⁸ [5]. Для первых двух остатков предполагается участие в связывании субстрата, а последнему приписывается координация с одним из ионов металлов-активаторов, а также возможное участие в активации мо-

**Аминокислотный состав тринитрофенилированного пептида,
выделенного из триптического гидролизата модифицированной
TNBS пирофосфатазы**

Аминокислота	Число остатков	Аминокислота	Число остатков
Asp	1,3(1)	Glu	1,3(1)
Thr	0,6(2)	Ile	0,9(1)
Ala	0,8(1)	Leu	0,9(1)
Lys	1,0(1)		

лекулы воды, связанной с ионом металла в центре низкого сродства [5, 11]. Следует отметить также, что, по данным рентгеноструктурного анализа, боковая группа Lys⁵⁶ направлена в сторону центра присоединения металла низкого сродства.

Для остатка Lys в составе фермент-субстратного соединения возможны два различных состояния: 1) аминогруппа протонирована. В этом случае остаток лизина может участвовать в связывании пирофосфата, увеличивая электрофильность атома фосфора, атакуемого водой, или стабилизировать переходное состояние в процессе гидролиза субстрата, или выступать донором протона для уходящей фосфатной группы; 2) аминогруппа свободна, и тогда остаток лизина может являться лигандом одного из ионов металла-активатора. В этом случае он располагается или в центре связывания иона металла высокого сродства, заполнение которого способствует формированию сорбционной и каталитической областей, или в месте связывания иона металла низкого сродства. Предполагается, что при этом ион металла участвует в активации воды, а также взаимодействует с субстратом [11]. Исходя из сказанного, можно предположить, что роль Lys⁵⁶ в каталитической функции неорганической пирофосфатазы может заключаться в связывании либо субстрата, либо одного из ионов металлов-активаторов.

Нами было, во-первых, исследовано влияние на реакцию неорганической пирофосфатазы с TNBS ионов магния и аналога субстрата — пирофосфата кальция; во-вторых, изучена способность тринитрофенилированного фермента взаимодействовать с ионами магния и пирофосфатом кальция.

Пирофосфатазу обрабатывали TNBS в присутствии хлористого магния в различных концентрациях, т. е. в реакцию с ингибитором вводили фермент, содержащий ионы металла либо в центре высокого сродства, либо в обоих центрах, и следили за активностью фермента и степенью модификации. Результаты исследования, представленные на рис. 2а в виде графической зависимости изменения активности во времени, свидетельствуют, что в присутствии ионов магния ингибирование фермента под действием TNBS сильно замедляется. Так, при концентрации MgCl₂, равной 5 · 10⁻⁴ М, время, в течение которого наблюдается 50%-ная инактивация фермента, увеличивается более чем в 2 раза, а при концентрации 10⁻² М ингибирование не наблюдается совсем. Обработка результатов эксперимента (рис. 2б) в координатах 1/Δ*k* от 1/[Mg²⁺], где Δ*k* — разность констант скорости реакции в отсутствие и в присутствии ионов металла, показывает, что основной защитный эффект связан с образованием комплекса фермент — металл с *K*_а = 2 · 10⁻⁴ М, при этом в ферменте заполнены оба центра связывания ионов металлов. Далее было установлено, что сохранение активности пирофосфатазы при инкубации с TNBS в присутствии ионов магния обусловлено тем, что не происходит модификации функционально важного остатка Lys⁵⁶. Этот вывод вытекает из рассмотрения разностных спектров, полученных для реакционной смеси, содержащей фермент и реагент, против той же смеси, не содержащей 2 · 10⁻⁴ М MgCl₂. В ходе реакции на спектрах появляется максимум при 367 нм, величина которого увеличивается во времени и достигает максимального значения, соответствующего тринитрофенилированию двух остатков лизина в молекуле димера. При этом наблюдается полная инактивация пирофосфатазы (рис. 3). Отсутствие модификации в среде с MgCl₂ подтверждает и состав триптических

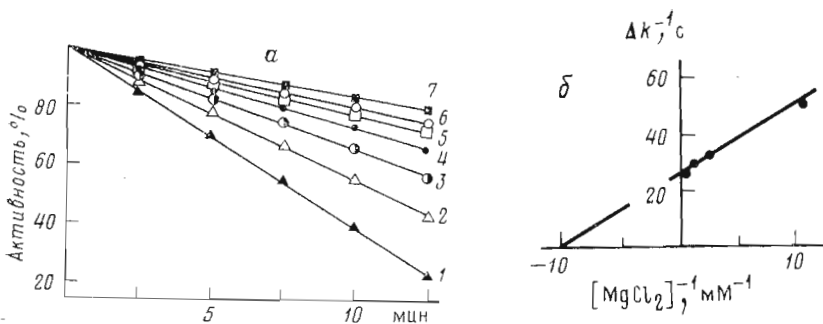


Рис. 2. Защитное влияние ионов магния на инактивацию неорганической пирофосфатазы ($5 \cdot 10^{-6}$ M) под действием TNBS (10^{-3} M): а — кинетика инактивации при концентрации $MgCl_2$: 0 (1), 10^{-5} (2), 10^{-4} (3), $5 \cdot 10^{-4}$ (4), $2 \cdot 10^{-3}$ (5), $5 \cdot 10^{-3}$ (6), 10^{-2} (7); б — зависимость скорости инактивации от концентрации $MgCl_2$, Δk — разность констант скоростей инактивации фермента в отсутствие и в присутствии ионов магния

пептидов пирофосфатазы, выдержанной с TNBS в присутствии ионов магния, среди которых не обнаруживается пептида, содержащего тринитрофенилированный остаток Lys⁵⁶.

Полученные данные позволяют предполагать, что TNBS модифицирует в пирофосфатазе центр связывания ионов металла, а остаток Lys⁵⁶ является лигандом одного из ионов металлов-активаторов.

Для выяснения, в каком из центров связывания ионов металлов — высокого или низкого сродства — находится остаток Lys⁵⁶, были изучены спектральные характеристики модифицированного фермента, содержащего ~1,7 тринитрофенильных групп в расчете на 1 мол. димера и сохранившего менее 15% остаточной активности. Известно, что связывание ионов магния ферментом в центре низкого сродства приводит к появлению на разностных УФ-спектрах максимумов в области 250 и 290 нм [3]. В случае тринитрофенилированной пирофосфатазы эти пики были выражены очень слабо (рис. 4). Их высота составила менее 15% от высоты пиков нативного белка. Эти данные позволяют предполагать, что тринитрофенилирование остатка Lys⁵⁶ так изменяет на ферменте центр связывания ионов металла низкого сродства, что ионы магния перестают с ним связываться.

Сушественно, что аналогичные результаты были получены и в опытах с CaPP. При инкубации пирофосфатазы с TNBS в присутствии CaPP не происходит ни инактивации фермента, ни тринитрофенилирования остатка Lys⁵⁶. Кроме того, тринитрофенилированный фермент не связывает аналог субстрата, о чем свидетельствует изучение взаимодействия модифицированного и нативного фермента с CaPP методом равновесной гель-хроматографии.

Из приведенных данных следует, что тринитрофенилирование пирофосфатазы критически сказывается на ряде ее свойств. Фермент утрачивает способность как связывать ионы металла в центре низкого сродства, так и присоединять молекулу субстрата. Нельзя было исключить, что причиной этого является не блокирование функционально важной ε-аминогруппы остатка Lys⁵⁶, а взаимодействие введенной тринитрофенильной группы с другими важными для активности аминокислотными остатками, что препятствует связыванию ионов металла или субстрата. Однако это предположение представляется маловероятным, поскольку даже в присутствии высоких концентраций тринитрофенола (>20 mM) у пирофосфатазы полностью сохраняется максимальная скорость гидролиза субстрата — пирофосфата магния.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что инактивация неорганической пирофосфатазы под действием TNBS обусловлена модификацией остатка Lys⁵⁶. Наиболее вероятно, что остаток Lys⁵⁶ является лигандом иона металла-активатора в центре низкого сродства молекулы

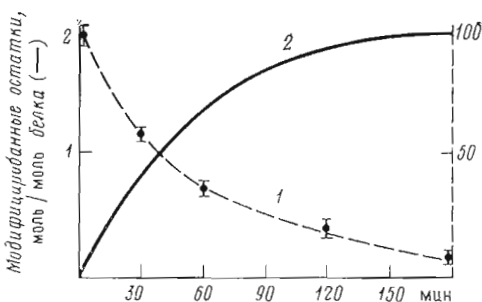


Рис. 3

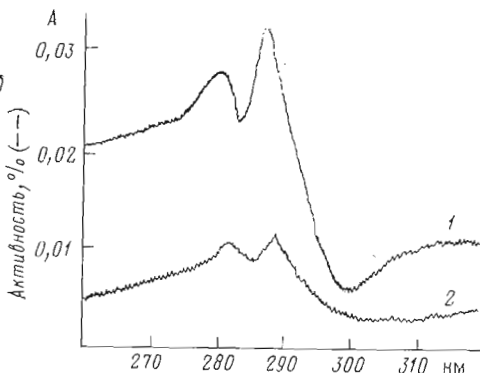


Рис. 4

Рис. 3. Изменение во времени активности пиррофосфатазы (1) и содержания тринитрофенильных групп (2) в процессе реакции модификации. Данные получены из разностных спектров, снятых для систем E+TNBS и E+TNBS+MgCl₂

Рис. 4. Разностные спектры, возникающие при добавлении 10⁻³ М MgCl₂ к нативной (1) и тринитрофенилированной (2) пиррофосфатазе

фермента. Этот ион металла участвует, по-видимому, в активации молекулы воды, осуществляющей нуклеофильную атаку пиррофосфатной связи, а также связан с молекулой пиррофосфата.

Экспериментальная часть

В работе использовали 2,4,6-тринитробензолсульфокислоту (TNBS), пиррофосфат натрия, трипсин (Serva, ФРГ) ацетонитрил (Merck, Швейцария), хлорид магния и бикарбонат аммония квалификации х.ч.

Неорганическая пиррофосфатаза с уд. акт. 700 МЕ/мг была выделена из маточных пекарских дрожжей по методике [12]; ферментативную активность определяли на автоматическом анализаторе фосфата [13].

Локализация функционально важного остатка лизина. Реакцию пиррофосфатазы с TNBS проводили как в работе [10], но с добавлением в реакционную среду 10% ацетона. Модифицированный фермент, содержащий два тринитрофенилированных остатка лизина в расчете на 1 моль белка и не обладающий активностью, растворяли в 0,01 М NaHCO₃, pH 7,8, до концентрации 10 мг/мл, добавляли трипсин (6% по весу) и выдерживали 4 ч при 37° С. Разделение пептидов проводили на жидкостном хроматографе фирмы Beckman, модель 332 (США) на колонке (250×4,8 мм) с обращенной фазой Ultrasphere-ODS, размер частиц 5 мкм. Для элюции использовали градиент концентраций ацетонитрила в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере, pH 5,6. За выходом пептидов с колонки следили спектрофотометрически по поглощению растворов при 367 и 254 нм. Фракции, поглощающие при 367 нм, объединяли, концентрировали в вакууме и определяли N-концевую аминокислоту [10] и аминокислотный состав после полного кислотного гидролиза (6 н. HCl, 105° С, 48 ч).

Инактивация пиррофосфатазы под действием TNBS в присутствии ионов магния и пиррофосфата кальция. Фермент (5·10⁻⁶ М) инкубировали при 30° С в 0,05 М NaHCO₃, pH 8,7, содержащем 10⁻³ М TNBS и 0–10⁻² М хлористый магний или 5·10⁻⁴ М хлористый кальций и 5·10⁻⁵ М пиррофосфат натрия. Через определенные промежутки времени (0–20 мин) отбирали аликвоты для определения активности фермента. На основании полученных данных строили графики зависимости ферментативной активности от времени в полулгарифмических координатах. Константу скорости инактивации рассчитывали по формуле $k=0,693/\tau_{0,5}$, где $\tau_{0,5}$ — полупериод инактивации.

Модификация пиррофосфатазы TNBS в присутствии ионов магния и пиррофосфата кальция. Исследование проводили спектрофотометрически

на спектрофотометре Cary 219 фирмы Varian (США) при чувствительности 0,04 ОЕ на шкалу. В две идентичные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см помещали по 2 мл 0,01 М NaHCO_3 , pH 8,7 (буфер А), содержащего 10% ацетона и $2,6 \cdot 10^{-5}$ М TNBS, и добавляли в измерительную кювету 20 мкл 0,5 М хлористого магния или $5 \cdot 10^{-2}$ М хлористого кальция и $5 \cdot 10^{-3}$ М пиррофосфата натрия в буфере А, а в кювету сравнения — 20 мкл буфера А. После стабилизации нулевой линии в обе кюветы прибавляли по 20 мкл $1,6 \cdot 10^{-5}$ М фермента и регистрировали поглощение при 367 нм в течение 3 ч.

Разностные спектры нативного и тринитрофенилированного фермента с понами магния измеряли на спектрофотометре Cary 219 с использованием шкалы 0—0,1 ОЕ при 25° С, как в работе [14].

Связывание пиррофосфата кальция с нативным и тринитрофенилированным ферментом измеряли методом гель-хроматографии, как в работе [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Heinrichson R. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 2, p. 889—897.
2. Butler L. G. In: The Enzyme/Ed. Boyer P. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 529—541.
3. Braga E. A., Avaeva S. M. FEBS Lett., 1972, v. 27, № 2, p. 251—255.
4. Ridlington J. W., Butler L. G. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 20, p. 7303—7307.
5. Терзян С. С., Воронова А. А., Смирнова Е. А., Куранова И. П., Некрасова Ю. В., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К., Хёне В., Хансен Г. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1469—1482.
6. Cooperman B. S., Chiu N. Y. Biochemistry, 1973, v. 12, № 9, p. 1676—1682.
7. Cooperman B. S., Chiu N. Y. Biochemistry, 1980, v. 19, № 1, p. 94—102.
8. Склянкина В. А., Медведева И. В., Аваева С. М. Докл. АН СССР, 1973, т. 211, № 2, с. 494—496.
9. Склянкина В. А., Суранова Е. Д., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1971, т. 1, № 9, с. 1982—1986.
10. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976, с. 274—281.
11. Cooperman B. S., Welsh K. M. Biochemistry, 1984, v. 23, № 23, p. 4947—4955.
12. Braga Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1973, т. 38, № 2, с. 344—350.
13. Вауков А. А., Аваева С. М. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 1, p. 1—4.
14. Мельник М. С., Назарова Т. П., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1483—1489.
15. Курилова С. А., Назарова Т. П., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1032—1039.

Поступила в редакцию

12.IV.1985

После доработки

16.V.1985

A FUNCTIONALLY SIGNIFICANT LYSIN RESIDUE OF BAKER'S YEAST PYROPHOSPHATASE

KOMISSAROV A. A., MAKAROVA I. A., SKLYANKINA V. A.,
AVAIEVA S. M.

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

The inactivation of inorganic pyrophosphatase from baker's yeast by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid was found to result from modification of the lysin-56 residue. It is suggested that Lys⁵⁶ is involved in binding cation of the enzyme activator.