



УДК 577.152.361*1.042:577.112.4

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ
АКТИВНОСТИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ
E. COLI

1. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА
ПОД ДЕЙСТВИЕМ АТР

Венер А. В., Ичетовкина Л. Е., Назарова Т. И.,
Аваева С. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии
им. А. Н. Белозерского

АТР фосфорилирует регуляторный центр неорганической пирофосфатазы *E. coli*, что приводит к увеличению активности фермента в 1,5 раза. Максимальное включение γ -фосфатной группы АТР в пирофосфатазу составляет 3 моль на 1 моль белка. Ортофосфат также фосфорилирует регуляторный центр фермента, вызывая снижение активности пирофосфатазы на 10–15%. Процессы фосфорилирования под действием АТР и ортофосфата взаимосвязаны: АТР препятствует фосфорилированию неорганической пирофосфатазы *E. coli* под действием ортофосфата и приводит к быстрому дефосфорилированию белка, предварительно модифицированного ортофосфатом.

Недавно нами было установлено, что АТР фосфорилирует регуляторный центр неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) пекарских дрожжей, в результате чего активность фермента возрастает в 2 раза [1]. Ортофосфат (P_i) также фосфорилирует регуляторный центр этой пирофосфатазы, но каталитическая активность фермента при этом не меняется [2]. АТР и P_i конкурируют в реакции фосфорилирования неорганической пирофосфатазы дрожжей [3]. Обнаруженный эффект активации фермента наблюдается при концентрациях АТР, соответствующих концентрациям его *in vivo*. Поэтому было высказано предположение, что АТР (предшественник пирофосфата во многих реакциях биосинтеза) выступает в клетке как эффектор неорганической пирофосфатазы, а P_i , являющийся продуктом ферментативной реакции, способен подавлять активирующее действие АТР и, вероятно, также может участвовать в регуляции активности этого фермента [3]. Однако обнаруженный путь регуляции был предложен пока только для одного представителя класса пирофосфатаз — фермента из пекарских дрожжей, и оставалось неясным, возможна ли такая регуляция для других ферментов этого класса. Целью настоящей работы было изучение взаимодействия неорганической пирофосфатазы *E. coli* с АТР, а также с P_i .

Неорганическая пирофосфатаза *E. coli* состоит из шести идентичных субъединиц с молекулярной массой 20 кДа [4], обладающих каталитической активностью [5]. Как и другие ферменты этого класса, пирофосфатаза *E. coli* способна катализировать гидролиз пирофосфата только в присутствии катионов некоторых двухвалентных металлов, наиболее эффективными из которых являются Mg^{2+} и Zn^{2+} [6]. Катионы Ca^{2+} ингибируют ферментативную активность [7]. Каждая субъединица пирофосфатазы помимо активного содержит и регуляторный центр. Связывание в регуляторном центре пирофосфата хрома(III) или имидодифосфата приводит к увеличению активности фермента [8]. Неорганическая пирофосфатаза *E. coli* в присутствии катионов Mg^{2+} может взаимодействовать с P_i , в результате чего происходит включение до 3 моль фосфата на 1 моль белка,

т. е. фосфорилируется половина от общего количества субъединиц фермента [8]. Однако не было известно, по какому центру идет фосфорилирование, по активному или регуляторному, и влияет ли оно на ферментативную активность.

Взаимодействие неорганической пирофосфатазы *E. coli* с АТР изучали путем инкубирования фермента в присутствии $MgCl_2$ с $[U-^{14}C]ATP$ или с $[\gamma-^{32}P]ATP$ и последующего отделения белка от избытка низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией. При использовании $[U-^{14}C]ATP$ связывания метки с ферментом обнаружено не было. В экспериментах с $[\gamma-^{32}P]ATP$, напротив, было установлено включение метки в белок (рис. 1). Максимальное включение γ -фосфатной группы АТР достигало почти 3 моль на 1 моль фермента при концентрациях АТР, больших 6 мМ. Удельная активность пирофосфатазы, содержащей три остатка фосфата, была в 1,5 раза выше, чем активность фермента в контрольных экспериментах в отсутствие АТР. Чтобы ответить на вопрос, какой центр фермента вступает в реакцию с АТР, к фосфорилированной под действием $[\gamma-^{32}P]ATP$ пирофосфатазе добавляли $MgCl_2$ и $Na_4P_2O_7$ до концентрации 2 и 1 мМ соответственно. После протекания нескольких сотен каталитических актов (о чем судили по глубине превращения субстрата) проводили гель-фильтрацию и определяли содержание радиоактивного фосфата в ферменте. Заметного дефосфорилирования белка обнаружено не было. Устойчивость связи фосфата с ферментом в процессе катализа указывает на то, что АТР фосфорилирует не активный, а регуляторный центр фермента, и этот процесс приводит к возрастанию удельной активности пирофосфатазы.

Изучение влияния катионов-эффекторов фермента на фосфорилирование неорганической пирофосфатазы *E. coli* под действием АТР позволило установить следующее. В отсутствие двухвалентных катионов включение фосфатной группы не превышало 0,4 моль на 1 моль белка при концентрации АТР, равной 6 мМ. Добавление в реакционную смесь соли магния приводило к увеличению степени фосфорилирования пирофосфатазы (рис. 2). Фосфорилирование достигало максимальной величины при концентрации свободной формы Mg^{2+} , большей 2–3 мМ. Катионы Zn^{2+} являлись менее эффективными активаторами реакции фосфорилирования. В присутствии 0,1–5 мМ Zn^{2+} и 4 мМ АТР включение фосфатной группы в молекулу фермента было примерно в 2 раза ниже, чем в экспериментах с такими же концентрациями Mg^{2+} и АТР. $CaCl_2$ в концентрациях 1–10 мМ не приводил к активации фосфорилирования пирофосфатазы под действием АТР: включение фосфата в фермент не превышало 0,5 моль на 1 моль белка даже при концентрации АТР, равной 8 мМ. Из этой части работы видно, что по влиянию двухвалентных катионов на процесс фосфорилирования под действием АТР неорганическая пирофосфатаза *E. coli* отличается от неорганической пирофосфатазы дрожжей: в первом случае фосфорилирование в некоторой степени идет и в отсутствие катионов двухвалентных металлов, а во втором — катионы Mg^{2+} или Zn^{2+} абсолютно необходимы для протекания реакции.

Как отмечалось выше, до настоящего времени не было известно, с каким центром неорганической пирофосфатазы взаимодействует P_i и влияет ли этот процесс на ферментативную активность. В настоящей работе установлено, что удельная активность неорганической пирофосфатазы *E. coli*, содержащей после взаимодействия с P_i в присутствии Mg^{2+} ~3 моль фосфата на 1 моль белка, на 10–15% ниже активности нативного фермента. Добавление к фосфорилированной под действием $^{32}P_i$ пирофосфатазе $MgCl_2$ и $Na_4P_2O_7$ не приводило к дефосфорилированию белка. Таким образом, устойчивость связи фосфата с ферментом в процессе протекания ферментативной реакции указывает на то, что в реакции пирофосфатазы с P_i , так же как и в реакции с АТР, происходит фосфорилирование центра фермента, отличного от активного.

Фосфорилирование неорганической пирофосфатазы *E. coli* под действием АТР и P_i в значительной степени зависит от рН реакционной среды (рис. 3). Явное различие кривых, отражающих эту зависимость, для двух

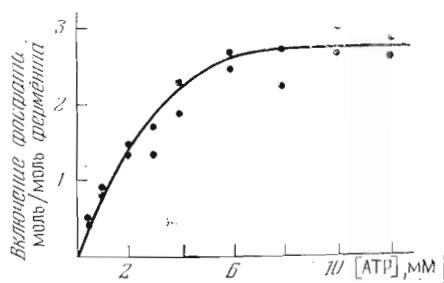


Рис. 1

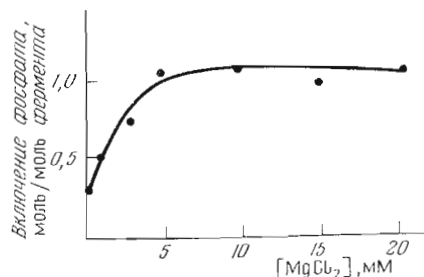


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость степени фосфорилирования неорганической пирофосфатазы от концентрации АТР. Концентрация свободной формы Mg^{2+} 1 мМ

Рис. 2. Зависимость степени фосфорилирования неорганической пирофосфатазы под действием 2 мМ АТР от концентрации $MgCl_2$

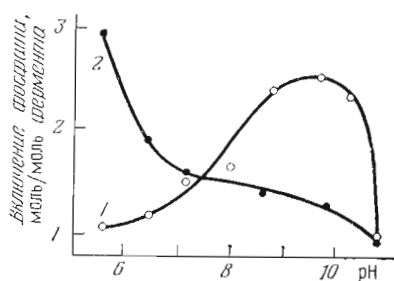


Рис. 3

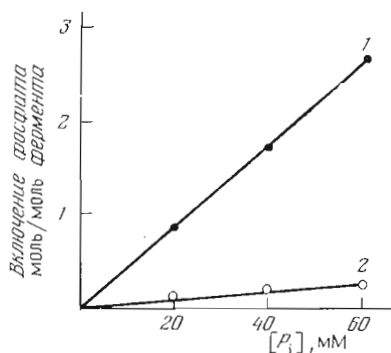


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость степени фосфорилирования неорганической пирофосфатазы от pH реакционной среды: 1 — фосфорилирование под действием 4 мМ АТР в присутствии 5 мМ $MgCl_2$ в течение 5 мин; 2 — фосфорилирование под действием 40 мМ P_1 в присутствии 4 мМ $MgCl_2$ в течение 20 мин

Рис. 4. Фосфорилирование неорганической пирофосфатазы под действием P_1 в отсутствие (1) и в присутствии 7 мМ АТР (2). Концентрация свободной формы Mg^{2+} 1 мМ

фосфорилирующих агентов (рис. 3, 1, 2) позволило предположить, что АТР и P_1 взаимодействуют с разными аминокислотными остатками фермента. Последующее изучение свойств двух фосфорилированных ферментов показало, что в реакцию с P_1 вступает остаток дикарбоновой аминокислоты фермента и образуется ацилфосфатная связь, а в реакцию с АТР — остаток гистидина с образованием фосфоамидной связи [9].

Процессы фосфорилирования неорганической пирофосфатазы под действием АТР и ортофосфата взаимосвязаны. В присутствии АТР значительно снижается степень фосфорилирования белка под действием P_1 (рис. 4). С другой стороны, добавление АТР к модифицированному ферменту, содержащему 3 моль фосфата на 1 моль белка как результат реакции с $^{32}P_1$, приводит к быстрому дефосфорилированию пирофосфатазы (рис. 5).

Таким образом, при изучении взаимодействия неорганической пирофосфатазы *E. coli* с АТР и P_1 выявлено значительное сходство этого фермента и исследованной ранее пирофосфатазы пекарских дрожжей [1, 3]. Во-первых, в обоих ферментах фосфорилирование проходит по регуляторному центру, причем заполняется только половина таких центров на ферменте: в случае пирофосфатазы дрожжей — один из двух, в случае пирофосфатазы *E. coli* — три из шести. Во-вторых, взаимодействие с АТР приводит к увеличению ферментативной активности. И наконец, для обоих ферментов показана взаимосвязь реакций фосфорилирования под действием АТР и P_1 . Различия в свойствах этих ферментов менее существенны и состоят в том, что АТР активирует пирофосфатазу дрожжей в большей степени (в 2 раза), чем пирофосфатазу *E. coli*, а P_1 не изменяет

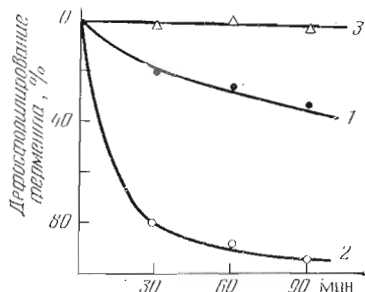


Рис. 5. Дефосфорилирование неорганической пирофосфатазы, фосфорилированной под действием P_i , при инкубации в 0,1 М трис-НСl-буфере, pH 7,2, в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ (1), 7 мМ АТР и 10 мМ $MgCl_2$ (2) и в отсутствие добавок (3)

активность пирофосфатазы дрожжей, хотя несколько снижает активность пирофосфатазы *E. coli*. Принципиальное сходство в регуляции активности двух изученных ферментов под влиянием АТР и P_i позволяет предположить, что эти метаболиты могут являться регуляторами пирофосфатаз и из других источников.

Экспериментальная часть

В работе использовали 3-циклогексиламинопропансульфоновую кислоту CAPS, трис-фосфат, $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ (Sigma Chemical Co., США), N-морфолино-2-этансульфоновую кислоту (MES) и АТР фирмы Reanal (Венгрия), кумасси голубой марки G (Serva, ФРГ). Остальные реагенты были отечественного производства марки ос.ч. и х.ч. ^{32}P -Меченая ортофосфорная кислота без носителя и $[\gamma-^{32}P]$ АТР марки ос.ч. с уд. акт. >37 ПБк/моль — препараты отечественного производства, $[U-^{14}C]$ АТР (16,9 ТБк/моль) получен из Института по изучению и использованию радиоактивных препаратов (Прага, ЧССР). Трис перекристаллизовывали из этанола, АТР — из водного этанола [10].

Неорганическую пирофосфатазу выделяли из штамма *E. coli* MRE-600 по методу Джосса [4]. Концентрацию растворов белка определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя величины $E_{280}^{0.1\%} = 1,18$ [6] и $M_r = 120\,000$ [4, 6], и с помощью красителя кумасси [11]. Активность фермента определяли по гидролизу $Na_4P_2O_7$ в смеси, содержащей 1 мМ $Na_4P_2O_7$ и 5 мМ $MgCl_2$ в 0,1 М трис-НСl-буфере, pH 8,8, при 25° С, на автоматическом анализаторе фосфата [12]. Содержание ^{32}P в образцах определяли по Черенкову, а ^{14}C — в диоксановом сцинтилляторе с использованием жидкостно-сцинтилляционных счетчиков LKB (Швеция) или Delta (США).

Получение фосфорилированного фермента. Стандартные реакционные смеси объемом 100 мкл содержали 0,1 М трис-НСl-буфер (pH 7,2), 20–40 мкг фермента, 1–20 мМ $MgCl_2$, $ZnCl_2$ или $CaCl_2$ и 20–60 мМ $NaH_2[^{32}P]O_4$, или 0,5–12 мМ $[\gamma-^{32}P]$ АТР, или $[U-^{14}C]$ АТР. Удельная радиоактивность меченых соединений составляла 10 000–30 000 расп./мин·нмоль. Смесь инкубировали 20 мин при 20° С с NaH_2PO_4 или 3–7 мин с АТР и отделяли избыток низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией с центрифугированием [1]; в элюате определяли концентрацию белка с помощью красителя кумасси, активность фермента и содержание радиоактивной метки. В контрольных экспериментах реакционная смесь не содержала либо белка, либо P_i (АТР). Содержание ^{32}P в элюатах контрольных опытов не превышало 10% от количества ^{32}P , связанного с ферментом в элюатах основных опытов. При изучении зависимости фосфорилирования фермента от pH реакционной среды использовали следующие 0,1 М буферы: MES-NaOH, pH 5,6; 6,5; трис-НСl, pH 7,2; 8,0; 8,6; CAPS-NaOH, pH 9,8; 10,4; 11,0.

Изучение дефосфорилирования фермента. Полученный, как указано выше, меченый фосфорилированный белок выдерживали в 0,1 М трис-НСl-буфере, pH 7,2, в присутствии либо 2 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ $Na_4P_2O_7$, либо 10 мМ $MgCl_2$, либо 10 мМ $MgCl_2$ и 7 мМ АТР, либо в отсутствие добавок. Через определенные промежутки времени проводили гель-фильтрацию аликвот реакционных смесей и определяли в элюате содержание белка и связанной с ним радиоактивной метки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венер А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 784-790.
2. Бакулева Н. П., Костенко Е. Б., Байков А. А., Аваева С. М. Биохимия, 1981, т. 46, № 5, с. 832-840.
3. Венер А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 791-796.
4. Wong S. C. K., Hall D. C., Josse J. J. Biol. Chem., 1970, v. 254, № 17, p. 4335-4345.
5. Borschik I. B., Pestova T. V., Sklyankina V. A., Awaeva S. M. FEBS Lett., 1985, v. 184, № 1, p. 65-69.
6. Josse J. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 9, p. 1938-1947.
7. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1032-1039.
8. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1336-1341.
9. Венер А. В., Ичетовкина Л. Е., Комиссаров А. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 200-205.
10. Berger Z. Biochim. et biophys. acta, 1956, v. 20, № 1, p. 23-26.
11. Bradford M. M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, p. 248-254.
12. Baykov A. A., Awaeva S. M. Anal. Biochem., 1981, v. 116, № 1, p. 1-4.

Поступила в редакцию
16.VII.1985

PHOSPHORYLATION AS A MEANS OF REGULATING THE ACTIVITY OF *E. COLI* INORGANIC PYROPHOSPHATASE I. ATP-INDUCED PHOSPHORYLATION AND ACTIVATION OF THE ENZYME

VENER A. V., ICHETOVKINA L. E., NAZAROVA T. I., AVAEVA S. M.

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

ATP phosphorylates the regulatory center of *E. coli* inorganic pyrophosphatase with the resultant 1.5-fold increase in the activity of the enzyme. The maximal incorporation of the ATP γ -group into pyrophosphatase is 3 moles per mole of the protein. P_i likewise phosphorylates the enzyme regulatory center and lowers the pyrophosphatase activity by 10-15%. The ATP- and P_i -mediated phosphorylation processes are interrelated; ATP prevents phosphorylation by P_i and brings about rapid dephosphorylation of P_i -modified protein.