



УДК 577.152.361*1:577.112.4

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ
АКТИВНОСТИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ*E. COLI*II. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИПА ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ФОСФАТА
С ФЕРМЕНТОМ*Венер А. В., Ичетовкина Л. Е., Комиссаров А. А.,
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*

Установлено, что фосфорилирование регуляторного центра неорганической пирогосфатазы *E. coli* ортофосфатом приводит к образованию ацилфосфатной связи, лабильной в кислой и щелочной средах и быстро разрушающейся под действием гидроксиламина при нейтральных значениях pH. Активированные карбоксильные группы фермента модифицируются также N-метилгидроксиламином. Фосфорилирование неорганической пирогосфатазы под действием АТР приводит к образованию устойчивой в щелочных условиях фосфоамидной связи. Из щелочного гидролизата фермента, фосфорилированного АТР, выделена фосфоаминокислота, идентифицированная как фосфогистидин.

Возможность регуляции активности неорганических пирогосфатаз (КФ 3.6.1.1) пекарских дрожжей и *E. coli* фосфорилированием их регуляторных центров [1, 2] делает необходимым выяснение механизма фосфорилирования и прежде всего химической природы связей фосфат — белок, образующихся в реакциях пирогосфатаз с АТР и P_i . Ранее было показано, что фосфорилирование неорганической пирогосфатазы дрожжей как под действием P_i , так и под действием АТР приводит к образованию ацилфосфатной связи [3, 4], однако эти реагенты фосфорилируют остатки разных дикарбоновых аминокислот фермента [4]. В настоящей работе проведено изучение природы химических связей, образующихся между остатком фосфата и белком в реакциях P_i и АТР с неорганической пирогосфатазой *E. coli*.

Первым этапом работы было изучение устойчивости связей фосфат — белок при различных значениях pH. Неорганическую пирогосфатазу *E. coli* инкубировали с $^{32}P_i$ или $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{АТР}$, отделяли от избытка низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией, выдерживали определенное время при фиксированных значениях pH и определяли количество фосфата в белке. Фермент, фосфорилированный под действием $^{32}P_i$, полностью терял метку в 2 н. HCl при 20° С за 30 мин. Изучение дефосфорилирования этого белка в широком диапазоне значений pH позволило установить, что связь фосфата с ферментом лабильна и в щелочных условиях (рис. 1, 1). Быстрый гидролиз в кислой и щелочной средах типичен для соединений с ацилфосфатной связью, поэтому было сделано предположение, что в реакции P_i с неорганической пирогосфатазой *E. coli*, так же как и в реакции P_i с пирогосфатазой дрожжей, образуется ацилфосфатная связь. Поскольку для ацилфосфатов характерно быстрое превращение в гидроксаматы под действием гидроксиламина при нейтральных значениях pH, было изучено влияние гидроксиламина на пирогосфатазу, фосфорилированную ортофосфатом. Гидроксиламин действительно приводил к быстрому дефосфорилированию фермента (рис. 2, 2). Таким образом, были получены доказательства ацилфосфатной природы химической связи,

образующейся при модификации неорганической пирофосфатазы *E. coli* ортофосфатом.

Фермент, фосфорилированный под действием АТР, также полностью терял фосфат в 2 н. HCl при 20° С за 30 мин. Однако связь между фосфатным остатком и белком была устойчива в щелочных условиях (рис. 1, 2), и дефосфорилирование не происходило даже при нагревании с 3 н. КОН. Такая устойчивость позволила предположить образование фосфоамидной связи в реакции пирофосфатазы с АТР. Гидроксиламин вытеснял фосфат из модифицированного таким образом фермента (рис. 2, 4) гораздо медленнее, чем из белка, фосфорилированного под действием P_i (рис. 2, 2). Эти результаты также говорили в пользу образования фосфоамидной связи в пирофосфатазе, фосфорилированной АТР, так как фосфоамиды при нейтральных pH разрушаются гидроксиламином со скоростью, примерно на порядок меньшей, чем ацилфосфаты [5, 6].

С целью идентификации аминокислотного остатка, фосфорилирующегося в неорганической пирофосфатазе *E. coli* под действием АТР, был проведен щелочной гидролиз фермента, фосфорилированного [γ - ^{32}P]АТР. Продукты гидролиза разделяли при помощи ионообменной хроматографии (рис. 3). Было получено два радиоактивных пика, первый (А) по месту выхода соответствовал P_i , а второй (Б), содержащий 30% радиоактивности, — фосфорилированной аминокислоте. Этот результат явился доказательством образования фосфоамидной связи в реакции фермента с АТР, так как другие фосфорные производные аминокислот разрушаются в условиях жесткого щелочного гидролиза (3 н. КОН, 105° С, 4 ч). Таким образом, АТР мог фосфорилировать в белке либо остаток лизина, либо остаток гистидина. Для того чтобы сделать выбор между этими остатками, был использован следующий подход. Фракцию Б обрабатывали дансилхлоридом (pH 9), при этом дефосфорилирование модифицированной аминокислоты не происходило, и она превращалась в дансилфосфоаминокислоту. Смесь разделяли с помощью ВЭЖХ и определяли радиоактивность полученных фракций (рис. 4). К единственной радиоактивной фракции (В) добавляли HCl до pH 2—3 для гидролиза фосфоамидной связи и превращения дансилфосфоаминокислоты в дансильное производное соответствующей аминокислоты. Затем вновь проводили ВЭЖХ. В результате было обнаружено дансильное производное единственной аминокислоты, имеющее время выхода 65,4 мин. При разделении стандартной смеси дансил-аминокислот производные лизина и гистидина имели времена выхода 64,2 и 65,3 мин соответственно. Таким образом, было установлено, что АТР фосфорилирует аминокислотный остаток гистидина регуляторного центра неорганической пирофосфатазы *E. coli*.

Образование ацилфосфатной связи в реакции неорганической пирофосфатазы с P_i указывало на существование в этом ферменте активированных карбоксильных групп, способных взаимодействовать с нуклеофильными реагентами. Подтверждением этого явилась модификация пирофосфатазы N-метилгидроксиламином. Фермент инкубировали с ^{14}C -меченым N-метилгидроксиламином, отделяли от избытка низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией и определяли степень включения метки в белок. За 1 ч под действием 0,5; 1 и 2 М [^{14}C]H₃NHOH в присутствии 5 мМ MgCl₂ включалось 1,8; 2,8 и 3 моль реагента на 1 моль белка соответственно (рис. 5, 2). Увеличение времени реакции до 1,5—2 ч не приводило к возрастанию включения метки. Таким образом, N-метилгидроксиламин модифицировал в молекуле пирофосфатазы, состоящей из шести субъединиц, только три группы, что, вероятно, является следствием взаимного влияния субъединиц. Это наблюдалось ранее в реакциях неорганических пирофосфатаз *E. coli* и дрожжей с P_i и АТР [4, 2, 7, 8]. Вставал вопрос, являются ли группы, модифицирующиеся метилгидроксиламином, теми же, которые взаимодействуют с P_i с образованием ацилфосфата. На этот вопрос получен утвердительный ответ. Оказалось, что, как и гидроксиламин, N-метилгидроксиламин быстро вытесняет фосфат из пирофосфатазы, фосфорилированной ортофосфатом. При этом включение CН₃NHOH в пирофосфатазу, модифицированную P_i , составило 3 моль/моль фермента (рис. 5, 3). Под-

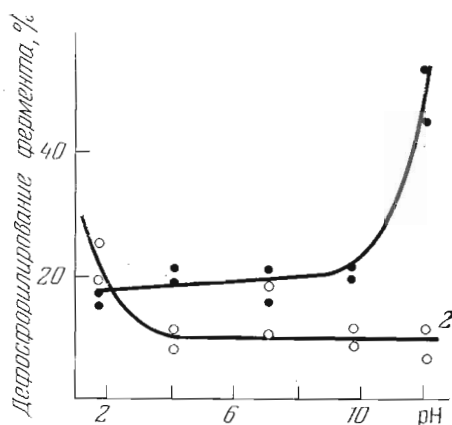


Рис. 1

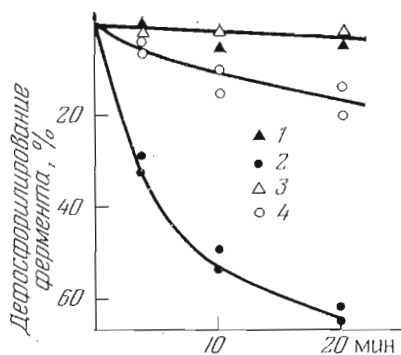


Рис. 2

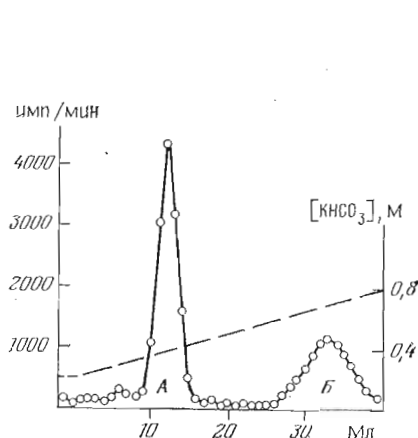


Рис. 3

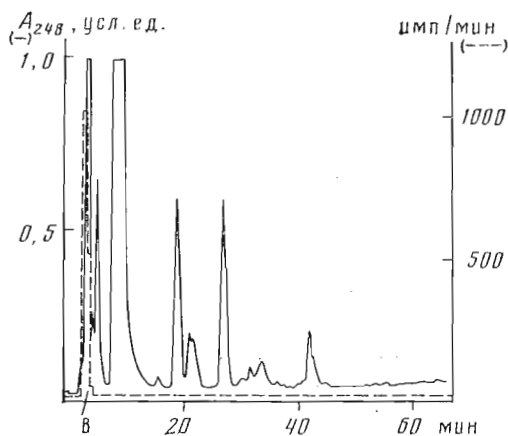


Рис. 4

Рис. 1. Зависимость дефосфорилирования модифицированной под действием P_i (1) или АТР (2) неорганической пирофосфатазы от pH среды (1,5 ч, 37° С)

Рис. 2. Дефосфорилирование модифицированной ортофосфатом (1, 2) или АТР (3, 4) неорганической пирофосфатазы под действием 2,5 М КСl (1, 3) или 2 М гидроксил-амина (2, 4)

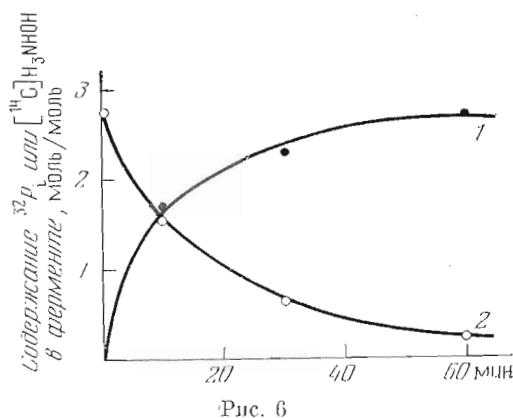
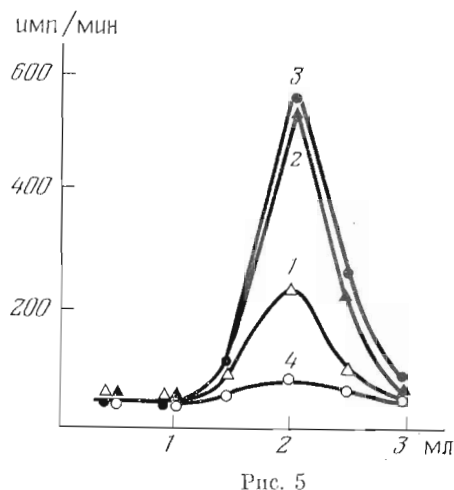
Рис. 3. Ионнообменная хроматография щелочного гидролизата неорганической пирофосфатазы, фосфорилированной $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, на дауэксе 1×8

Рис. 4. ВЭЖХ фракции Б (рис. 3), обработанной дансилхлоридом

тверждением того, что CH_3NHOH взаимодействует непосредственно с ацил-фосфатами в фосфорилированном белке, явилась корреляция между включением ^{14}C -меченого N-метилгидроксил-амина в фосфорилированный под действием $^{32}\text{P}_i$ фермент и дефосфорилированием этого белка (рис. 6).

Ранее было показано, что фосфорилирование неорганической пирофосфатазы АТР препятствует ее фосфорилированию под действием P_i [2], т. е. группы белка, вступающие в реакции с АТР и P_i , взаимосвязаны. Поэтому следовало ожидать, что фосфорилирование фермента под действием АТР приведет к снижению реакционной способности карбоксильных групп и в реакции белка с CH_3NHOH . Действительно, оказалось, что N-метилгидроксил-амин почти не модифицирует пирофосфатазу, предварительно инкубированную с АТР и MgCl_2 (рис. 5, 4). Следовательно, можно заключить, что фосфорилирование остатка гистидина регуляторного центра препятствует взаимодействию фермента как с P_i , так и с CH_3NHOH .

Суммируя полученные данные, можно заключить, что функционально важными остатками регуляторного центра неорганической пирофосфатазы *E. coli* являются аминокислотные остатки гистидина и аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Высокая реакционная способность карбоксильной



группы остатка дикарбоновой аминокислоты может быть следствием пониженной диэлектрической проницаемости области регуляторного центра фермента. Как следует из зависимости скорости взаимодействия пирофосфатазы с P_i от pH [2], реакционноспособной является протонированная форма карбоксильной группы. Фосфорилирование остатка гистидина под действием АТР приводит к возрастанию гидрофильности области регуляторного центра и ионизации карбоксильной группы, которая перестает модифицироваться ортофосфатом.

Интересной представляется роль ионов Mg^{2+} в функционировании регуляторного центра неорганической пирофосфатазы *E. coli*. Фосфорилирование под действием P_i [7], АТР [2], а также модификация N-метилгидроксиламином (рис. 6, 1) протекают и в отсутствие MgCl_2 , однако добавление этой соли вызывает увеличение степени модификации фермента всеми указанными реагентами. Можно предположить, что, хотя Mg^{2+} и не принимает непосредственного участия в функционировании регуляторного центра, связывание этого катиона с ферментом ($K_d \sim 1-3$ мМ) приводит к конформационным изменениям и, как следствие, к более эффективной работе регуляторного центра.

Таким образом, фосфорилирование неорганических пирофосфатаз *E. coli* и дрожжей под действием P_i вызывает образование ацилфосфатных связей между белком и остатком фосфата. Однако с АТР эти ферменты взаимодействуют по-разному. Так, в неорганической пирофосфатазе дрожжей АТР фосфорилирует остаток дикарбоновой кислоты, а в пирофосфатазе *E. coli* — остаток гистидина. При этом, несмотря на различие фосфорилирующихся остатков, взаимодействие обоих ферментов с АТР приводит к одному и тому же качественному эффекту — повышению их ферментативной активности. Этот факт может указывать на важность фосфорилирования неорганических пирофосфатаз под действием АТР в процессе их функционирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали те же реагенты и препарат неорганической пирофосфатазы *E. coli*, что и в предыдущей работе [2], а также 1-диметиламино-5-нафталинсульфохлорид (дансилхлорид; Serva, ФРГ) и $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{I}$ отечественного производства с удельной радиоактивностью 1,2 ГБк/ммоль.

¹⁴C-Меченый N-метилгидроксиламин синтезировали по методике [9] из [¹⁴C]H₃I и калиевой соли гидроксиламинизодисульфокислоты, полученной по методике [10]. Фосфорилированный фермент в количествах 20–200 мкг получали как описано в работе [2]. Для получения больших количеств фосфорилированного фермента неорганическую пирофосфатазу (0,8–1 мг) инкубировали при 20°С в 3 мл реакционной смеси, содержащей 0,05 М трис-HCl-буфер (рН 7,2) или 0,05 М боратный буфер (рН 9), 10–12 мМ MgCl₂ и 7–8 мМ [γ -³²P]АТФ с удельной радиоактивностью ~1000 имп./мин·пмоль. Через 3–7 мин смесь подвергали гель-фильтрации на колонке (1,2×30 см) с сефадексом G-50 fine, уравновешенным либо 0,05 М раствором NH₄HCO₃, либо водой. Обессоленный фосфорилированный фермент лиофильно высушивали.

Дефосфорилирование неорганической пирофосфатазы при различных значениях рН. Неорганическую пирофосфатазу, фосфорилированную под действием ³²P_i или [γ -³²P]АТФ, инкубировали при 37°С в растворе одного из следующих 0,1 М буферов: оксалат калия, рН 1,7; ацетат натрия, рН 4,2; трис-HCl, рН 7,2; 3-циклогексиламинопропансульфоновая кислота — NaOH, рН 9,8; глицин — NaOH, рН 12,0. Через 90 мин аликвоты растворов объемом 5–15 мкл наносили на пластинки с тонким слоем полиэтилен-иминцеллюлозы (Merk) длиной 10 см и проводили восходящую ТСХ в 1,2 М растворе LiCl. В этих условиях R_f имел $R_f \sim 0,8$, а фосфорилированный фермент — $< 0,1$. Пластинки разрезали на части в направлении, перпендикулярном элюции, помещали их во флаконы с водой и просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике, определяя распределение ³²P на хроматограмме.

Дефосфорилирование пирофосфатазы гидроксиламином. К фосфорилированному ферменту в 0,1 М трис-HCl-буфере, рН 7,2, добавляли равный объем 4 М раствора хлоргидрата гидроксиламина, нейтрализованного КОН до рН 6–7, и инкубировали при 20°С. К контрольным образцам фосфорилированного фермента добавляли раствор KCl до концентрации 2,5 М. Через определенные промежутки времени аликвоты растворов подвергали ТСХ, как описано выше, и определяли количество радиоактивной метки, связанной с белком и освобожденной в виде ³²P_i.

Идентификация фосфогистидина в неорганической пирофосфатазе, фосфорилированной АТФ. К раствору фосфорилированного под действием [γ -³²P]АТФ фермента (0,2–0,8 мг, 20 000–30 000 имп./мин) в 100–150 мкл воды добавляли равный объем 6 н. раствора КОН и проводили щелочной гидролиз в запаянной вакуумированной ампуле 4 ч при 105°С. Щелочной гидролизат белка разбавляли до 2–3 мл водой, наносили на колодку (0,6×13 см) с дауэксом 1×8 (400 меш) и проводили элюцию градиентом 0,2–0,8 М KHCO₃ (40 мл), собирая фракции по 1 мл и определяя в них радиоактивность. Фракции радиоактивного пика В упаривали на роторном испарителе или лиофильно до ~0,5 мл, добавляли равный объем этанола и 30 мкл раствора дансилхлорида в ацетонитриле с концентрацией 5 мг/мл. Смесь инкубировали 60 мин при 37°С, упаривали до ~250 мкл и подвергали разделению с помощью ВЭЖХ на хроматографе модели 332 (Beckman, США) на колонке (0,48×25 см) с обращенной фазой Ultrasphere-ODS (размер частиц 5 мкм). Для элюции использовали растворы: 15% этанол, 20 мМ K₂HPO₄, H₂O и 75% этанол, 5 мМ K₂HPO₄, H₂O. Детекцию вели спектрофотометрически при 248 нм и по радиоактивности. Фракции, соответствующие пику В, упаривали, растворяли в воде и добавляли HCl до рН 2–3, через 12 ч инкубации при 20°С смесь вновь разделяли на хроматографе.

Модификация неорганической пирофосфатазы N-метилгидроксиламином. К 100 мкл реакционной смеси, содержащей 250 мкг фермента в 0,1 М трис-HCl-буфере, рН 7,2, и 5 мМ MgCl₂, либо 5 мМ MgCl₂ и 60 мМ трис-фосфат, либо 10 мМ MgCl₂ и 6 мМ АТФ, добавляли равный объем раствора ¹⁴C-меченого N-метилгидроксиламина (300 имп./мин·пмоль, рН 6–7) до концентрации 0,5–2 М. После 1–2 ч инкубации раствора при 37°С избыток низкомолекулярных соединений отделяли от белка гель-фильтрацией с центрифугированием [1] и повторной гель-фильтрацией на колонке

(0,7×13 см) с сефадексом G-50 fine, уравновешенным 0,1 М трис-НСl-буфером, рН 7,2. Во фракциях объемом 0,5 мл определяли концентрацию белка (спектрофотометрически) и содержание ^{14}C на жидкостно-сцинтилляционном счетчике в диоксановом сцинтилляторе, затем рассчитывали включение метки в белок.

Модификация фермента, фосфорилированного ^{32}P , ^{14}C -меченым N-метилгидроксиламином. К 0,5 мг $^{32}\text{P}_i$ -модифицированной, лиофильно высушенной неорганической пирофосфатазы (12 000 имп./мин) в 200 мкл 0,1 М трис-НСl-буфера, рН 7,2, добавляли равный объем 2 М [^{14}C]N₃ННОН (600 имп./мин·нмоль, рН 7). Смесь инкубировали при 37° С, через 0, 10, 30, 60 мин отбирали аликвоты по 100 мкл и обессоливали их гель-фильтрацией с центрифугированием [1] и последующей гель-фильтрацией на колонке (0,5×7 см) с сефадексом G-50 fine, уравновешенным 0,1 М трис-НСl-буфером, рН 7,2. Фракции объемом 170 мкл помещали во флаконы с 10 мл диоксанового сцинтиллятора и одновременно определяли в них содержание ^{14}C и ^{32}P на счетчике ЛКВ (эффективность счета составляла 40 и 50% соответственно). При вычислении содержания каждого из изотопов учитывали степень проникновения ^{32}P в канал измерения ^{14}C и степень проникновения ^{14}C в канал измерения ^{32}P , которые составляли 30 и <1% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венер А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 784–790.
2. Венер А. В., Ичетовкина Л. Е., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 195–199.
3. Аваева С. М., Бакулева Н. П., Баратова Л. А., Назарова Т. И., Финк Н. Ю. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 482, № 1, p. 173–184.
4. Венер А. В., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 791–796.
5. Koshland D. E. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, № 9, p. 2286–2292.
6. Jencks W. P., Gilchrist M. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 14, p. 3199–3209.
7. Курилова С. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. Биоорг. химия, 1984, т. 10, с. 1336–1341.
8. Бакулева Н. П., Байков А. А., Кашо В. Н., Назарова Т. И., Аваева С. М. Int. J. Biochem., 1983, v. 15, № 6, p. 849–854.
9. Traube W., Schulz A. P. Ber., 1923, B. 56, № 8, S. 1856–1860.
10. Raschig F. Ber., 1923, B. 56, № 1, S. 206–208.

Поступила в редакцию
16.VII.1985

PHOSPHORYLATION AS A MEANS FOR REGULATING THE ACTIVITY OF *E. COLI* INORGANIC

PYROPHOSPHATASE. II. IDENTIFICATION OF THE TYPE OF CHEMICAL BONDS BETWEEN PHOSPHATE AND THE ENZYME

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

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

A bond formed by phosphate with P_i -phosphorylated pyrophosphatase from *E. coli* was found to be labile in acidic and alkaline media and to be rapidly cleaved by hydroxylamine at neutral pH.

N-Methylhydroxylamine modifies also activated carboxyl groups of the enzyme. Interaction of inorganic pyrophosphatase with ATP produces an alkali-resistant phosphamide bond. A phosphorylated amino acid, identified as phosphohistidine, was isolated from the alkaline hydrolyzate of the ATP-phosphorylated pyrophosphatase.