



УДК 577.153.35.02

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА
НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ
N-ХЛОРАЦЕТИЛФОСФОЭТАНОЛАМИНОМ

*Аваева С. М., Диков М. М., Кузнецов А. В.,
Склянкина В. А.*

*Химический факультет и Межфакультетская проблемная
научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Неорганическая пирофосфатаза из дрожжей специфически и необратимо инактивируется N-хлорацетилфосфоэтанолламином. Реакция протекает в две стадии: первая, обратимая, соответствует быстрому связыванию реагента в активном центре; вторая, необратимая, включает карбоксиметилирование функционально важной группы белка, приводящее к полной утрате ферментативной активности. Предполагается, что этой группой является карбоксильная группа.

Применение метода химической модификации для изучения механизма действия неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей (КФ 3.6.1.1) позволило выявить ряд аминокислотных остатков, модификация которых приводит к инактивации фермента [1—5]. Однако до сих пор очень мало известно о функциональной роли этих аминокислот и полностью отсутствуют данные о топографии активного центра. Решение этих вопросов может быть достигнуто использованием субстратоподобных ингибиторов. Однако создание последних для неорганической пирофосфатазы наталкивается на значительные трудности. Из всех известных субстратов фермент с наибольшей скоростью гидролизует неорганический пирофосфат, а любая его модификация приводит к резкому ухудшению субстратных свойств. Кроме того, следует отметить сложность получения моноэфиров пирофосфорной кислоты с дополнительными функциональными группами. В то же время известно, что пирофосфатаза может быть профосфорилирована по активному центру неорганическим фосфатом [6]. Это указывает на вероятность получения специфических ингибиторов фермента на основе фосфорной кислоты.

Целью настоящей работы явилось исследование взаимодействия неорганической пирофосфатазы из дрожжей с N-хлорацетилфосфоэтанолламином. Можно думать, что наличие остатка фосфорной кислоты в этом соединении обеспечит проведение реакции по активному центру, а присутствие хлорацетильной группы позволит модифицировать различные функциональные группы. При этом будут образовываться карбоксиметилированные аминокислоты, идентификация которых достаточно хорошо разработана.

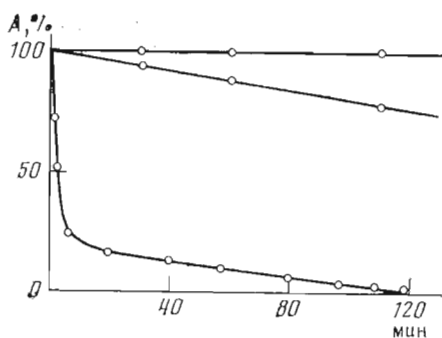


Рис. 1

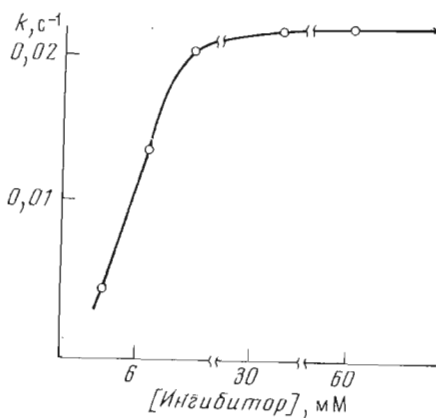


Рис. 3

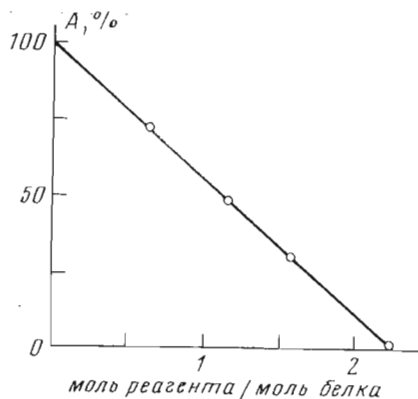


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация неорганической пирофосфатазы ($7 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) под действием N-хлорацетилфосфоэтанолamina (10^{-2} М) в отсутствие (1) и в присутствии 10^{-3} М сульфата магния (2) или 10^{-3} М неорганического пирофосфата (3)

Рис. 2. Зависимость ферментативной активности пирофосфатазы (0,15 мг/мл) от количества связанного ингибитора (исходная концентрация 10^{-2} М, рН 6,6)

Рис. 3. Зависимость констант скорости инактивации пирофосфатазы ($6 \cdot 10^{-6}$ мг/мл) от концентрации ингибитора (рН 6,6)

Было установлено, что N-хлорацетилфосфоэтаноламин представляет собой ингибитор неорганической пирофосфатазы.

Изменение ферментативной активности неорганической пирофосфатазы во времени при выдерживании с N-хлорацетилфосфоэтанолamiном указывает на быструю инактивацию фермента (рис. 1). Так, при реакции с 10^{-2} М раствором реагента в течение 3 мин остаточная активность составляет 20%, через 110 мин наблюдается полная инактивация фермента.

Падение ферментативной активности коррелирует с количеством ингибитора, включенного в белок (рис. 2). Связывание двух молекул N-хлорацетилфосфоэтанолamina приводит к образованию каталитически неактивной пирофосфатазы. Молекула неорганической пирофосфатазы состоит из двух идентичных субъединиц [7]. Следовательно, модификация одной аминокислоты в субъединице сопровождается ее полной инактивацией. Полученные результаты дают основание полагать, что реакция N-хлорацетилфосфоэтанолamina с неорганической пирофосфатазой вызывает блокирование группы активного центра. В пользу этого предположения говорят данные по защитному действию неорганического пирофосфата и ионов магния. Например, при выдерживании пирофосфатазы с 10^{-2} М раствором N-хлорацетилфосфоэтанолamina в присутствии 10^{-3} М пирофосфата калия или 10^{-3} М сульфата магния в течение 50 мин активность фермента соответственно не изменяется совсем или уменьшается лишь на 15%. В то же время степень инактивации белка в опытах без добавления пирофосфата или соли магния достигает 90% (рис. 1).

Существенно, что хлорацетат в исследованных условиях не влияет на фермент, а при концентрации, равной 0,1 М, снижает активность пирофос-

Остаточная активность неорганической пирофосфатазы (% от нативного фермента) после обработки 10^{-2} М ингибитором и последующей реактивации при разбавлении реакционной смеси и выдерживании 1 ч в 0,1 М имидазольном буфере, рН 6,6

Инактивация	Реактивация	Инактивация	Реактивация
50	90	5	12
25	80	0	5
18	55	0	0
12	30		

фатазы за 2 ч на 50%. По-видимому, высокая скорость ингибирующего действия N-хлорацетилфосфоэтанолamina обеспечивается наличием фосфатного остатка. О большой специфичности реакции фермента с N-хлорацетилфосфоэтанолaminом свидетельствуют также опыты по исследованию зависимости глубины инактивации фермента от концентрации ингибитора: с ростом концентрации ингибитора от $3 \cdot 10^{-3}$ до 10^{-2} М скорость инактивации увеличивается, однако дальнейшее повышение концентрации ингибитора не сказывается на скорости реакции (рис. 3). Следовательно, при концентрации N-хлорацетилфосфоэтанолamina выше 10^{-2} М наступает насыщение активного центра.

Таким образом, установлено, что N-хлорацетилфосфоэтанолamin является специфическим ингибитором неорганической пирофосфатазы из дрожжей. Это, по-видимому, результат связывания его в активном центре фермента за счет фосфатной части молекулы. Данные результаты указывают на возможность исследования строения и топографии активного центра пирофосфатазы с помощью производных фосфорной кислоты.

Важность сделанного вывода требует, естественно, детального исследования механизма взаимодействия производных фосфорной кислоты с неорганической пирофосфатазой.

Ценная информация для понимания механизма реакции была получена при исследовании ее обратимости и рН-зависимости.

При инкубации фермента в 0,1 М имидазольном буфере (рН 6,6) наблюдается частичное восстановление активности. Этот процесс протекает во времени и заканчивается через 1 ч. Согласно табл. 1, способность восстанавливать активность уменьшается с увеличением глубины инактивации фермента. Например, препараты модифицированного белка, ферментативная активность которых составляла 50 и 12% после выдерживания в условиях реактивации, восстанавливает свою активность соответственно до 90 и 30%.

Ингибирование пирофосфатазы становится полностью необратимым примерно через 30 мин после достижения 100% инактивации.

На основании полученных данных можно предположить двухстадийный механизм взаимодействия пирофосфатазы с N-хлорацетилфосфоэтанолaminом. Первая стадия, обратимая, — быстрое связывание ингибитора в активном центре фермента; вторая, более медленная, — химическая модификация, приводящая к необратимой утрате каталитических свойств неорганической пирофосфатазы.

Подтверждение двухстадийности ингибирования было получено при изучении реакции пирофосфатазы с N-хлорацетилфосфоэтанолaminом в интервале рН 5,5—8,0. На кинетических кривых зависимости остаточной активности от времени инкубации с ингибитором (рис. 4) четко прослеживаются обе стадии протекания реакции, для которых были определены значения констант (k_1 и k_2 , табл. 2). Существенно, что константы скорости второй стадии на два порядка ниже констант скорости первой стадии. Например, при рН 6,6 значения k_1 и k_2 составляют соответственно $1,15 \cdot 10^{-2}$ и $2,5 \cdot 10^{-4}$ с $^{-1}$.

Были определены рК групп, участвующих в реакции неорганической пирофосфатазы с N-хлорацетилфосфоэтанолaminом (рис. 5, 6). Из представленных данных видно, что скорость инактивации на обеих стадиях реакции существенно зависит от рН. На первой стадии она постоянна в об-

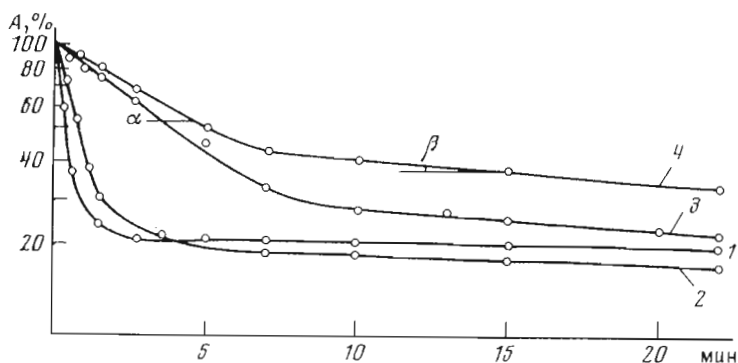


Рис. 4. Инактивация пирофосфатазы под действием N-хлорацетилфосфоэтанолamina при pH 5,7 (1), 6,6 (2), 7,5 (3), 8,0 (4)

ласти pH 7,5—8,0, но резко возрастает при переходе к pH 7,5—6,0. Затем скорость реакции изменяется очень незначительно. На основании полученных зависимостей величина pK группы, участвующей в первой стадии реакции, была определена равной 6,2. Ясно, что скорость инактивации увеличивается вследствие протонирования этой группы, принадлежащей, возможно, остатку гистидина, роль которого заключается в связывании ингибитора.

На второй, более медленной стадии зависимость константы скорости реакции от pH имеет иной характер. Она увеличивается с ростом pH (5,5—6,2) и остается постоянной в области pH 6,2—8,0. Величина pK группы, важной для этой стадии реакции, составила 5,7. Скорость инактивации увеличивается благодаря депротонированию этой группы, характеристика которой не является однозначной. Однако не исключено, что эта функциональная группа принадлежит аминокислоте, которая необратимо модифицируется N-хлорацетилфосфоэтанолaminом.

В специально поставленных опытах было показано, что ингибирование неорганической пирофосфатазы связано с ее карбоксиметилированием. Действительно, обработка фермента N-ацетилфосфоэтанолaminом и фосфатом калия не сказывается на его активности.

Предположение о природе модифицируемой аминокислоты было сделано на основании сравнения аминокислотного состава нативного и ингибированного фермента и реакции модифицированного белка с гидроксилaminом.

Каждая субъединица неорганической пирофосфатазы содержит 2 остатка метионина и цистеина, 5 остатков гистидина, 27 остатков лизина и 60 остатков дикарбоновых кислот [7]. Как было показано выше, полная инактивация фермента — результат модификации одного аминокислотного остатка в субъединице. Этим аминокислотным остатком не является цистеин и лизин, так как известно, что модификация цистеина не приводит к полной потере ферментативной активности, а блокирование функционально важной ϵ -аминогруппы лизина, имеющей pK 8,7, в исследуемой области

Таблица 2

Константы скорости реакции неорганической пирофосфатазы с N-хлорацетилфосфоэтанолaminом

pH	k_{11} $c^{-1} \cdot 10^{-2}$	k_{21} $c^{-1} \cdot 10^{-2}$	pH	k_{12} $c^{-1} \cdot 10^{-2}$	k_{22} $c^{-1} \cdot 10^{-2}$
5,5	2,40	0,80	7,25	0,29	2,5
5,7	2,00	2,20	7,5	0,28	2,55
6,2	1,40	2,56	8,0	0,25	2,50
6,6	1,15	2,50			

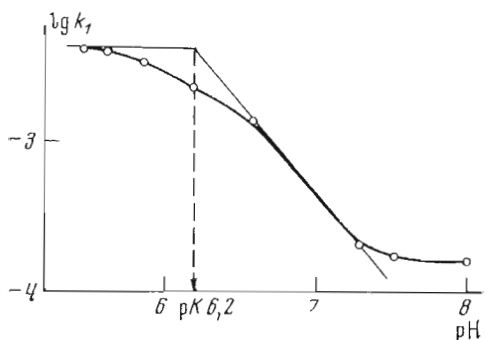


Рис. 5

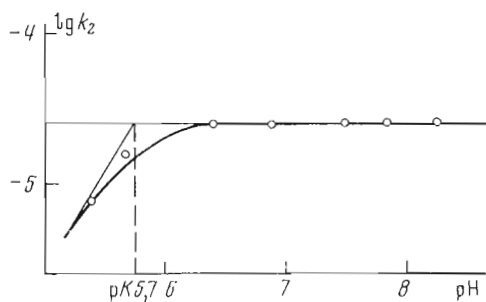


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость константы скорости первой стадии реакции инактивации от pH. Концентрации фермента и ингибитора соответственно $7 \cdot 10^{-3}$ мг/мл и 10^{-2} М

Рис. 6. Зависимость константы скорости второй стадии реакции инактивации от pH. Концентрации фермента и ингибитора соответственно $7 \cdot 10^{-3}$ мг/мл и 10^{-2} М

pH представляется маловероятной [1, 8]. Полная идентичность аминокислотных анализов фермента до и после обработки N-хлорацетилфосфоэтаноламином свидетельствовала о том, что при реакции с ингибитором не затрагиваются остатки метионина и гистидина. Это косвенно указывало на карбоксиметилирование в пиррофосфатазе карбоксильной группы дикарбоновой кислоты. В пользу такого вывода говорит реакция модифицированного фермента с гидроксиламином. Так, если пиррофосфатазу, инактивированную на 67% введением 1,4 моль реагента на 1 моль белка, выдерживать с щелочным раствором гидроксилamina, происходит медленное вытеснение производного фосфоэтанолamina из белка и через 1 ч степень модификации уменьшается в 4 раза.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что N-хлорацетилфосфоэтанолamin — необратимый, специфический ингибитор неорганической пиррофосфатазы, модифицирующий карбоксильную группу в активном центре фермента.

Гипотетический механизм ингибирования можно представить следующим образом: на первой стадии реакции происходит связывание молекулы ингибитора в активном центре фермента за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженной фосфатной части молекулы N-хлорацетилфосфоэтанолamina и протонированного имидазольного кольца гистидина. Эта стадия обратима. Нельзя исключить, что на первой стадии происходит фосфорилирование фермента. В пользу этого говорят данные о насыщении активного центра и медленная обратимость реакции. На второй стадии происходит карбоксиметилирование функционально важной группы белка, что приводит к полной инактивации неорганической пиррофосфатазы. Этой группой, по-видимому, является карбоксильная группа.

Экспериментальная часть

Неорганическую пиррофосфатазу выделяли из маточных пекарских дрожжей по видоизмененной методике Купермана [9]. Удельная активность фермента составила 645 МЕ/мг.

Ферментативную активность (A) определяли в течение 2—10 мин в 0,06 М имидазол-HCl-буфере (pH 7,2), содержащем $1,7 \cdot 10^{-3}$ М сульфат магния и $1,7 \cdot 10^{-3}$ М пиррофосфат натрия. Реакцию останавливали добавлением 4 н. серной кислоты. Количество образующегося ортофосфата измеряли по методу [10]. В работе использовали морфолиноэтансульфо кислоту, имидазол и Трис (Reanal, Венгрия), сефадекс G-50, средний (Serva, ФРГ).

N-хлорацетилфосфоэтанолamin получали ацилированием фосфоэтанолamina свежеприготовленным хлорангидридом монохлоруксусной кисло-

ты при рН 7,5 и 5°. Ингибитор выделяли из реакционной смеси ионообменной хроматографией на дауэксе 1 × 2 (200—400 меш, HCOO⁻-форма), используя градиентную элюцию от 0,1 М муравьиной кислоты до 2 М формиата пиридина. Фракции, соответствующие N-хлорацетилфосфоэтанол-амину, многократно упаривали с водой в вакууме, пропускали через колонку с дауэксом 50 × 8 (200—400 меш, Na⁺-форма) и высаживали вещество ацетоном.

Натриевая соль N-хлорацетилфосфоэтанол-амина была получена в виде белого кристаллического порошка. Выход 60%. R_f в системе изопропанол—вода — трихлоруксусная кислота — аммиак (75 : 25 : 5 : 0,3 — А) 0,76; R_f фосфоэтанол-амина 0,54. Электрофоретическая подвижность $1,5 \cdot 10^{-5}$ В · см²/с. Электрофоретическая подвижность фосфоэтанол-амина $0,7 \cdot 10^{-5}$ В · см²/с. Электрофорез проводили в течение 40 мин в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,6) при напряжении 2400 В на приборе «Shandon» (Англия). Найдено, %: С 18,0; Н 4,5; N 5,25. C₄H₈O₅NPNaCl · 1,5 H₂O. Вычислено, %: С 18,0; Н 4,13; N 5,25.

N-Ацетилфосфоэтанол-амин получали ацилированием фосфоэтанол-амина уксусным ангидридом при рН 7,5 и 5°. Вещество выделяли из смеси высаживанием ацетоном. Натриевая смесь N-ацетилфосфоэтанол-амина была получена в виде белого кристаллического порошка. Выход 95%. R_f 0,73 (А). Найдено, %: С 23,4; Н 4,4. C₄H₉O₅NPNa. Вычислено, %: С 23,4; Н 4,4.

Реакция неорганической пирофосфатазы с N-хлорацетилфосфоэтанол-амином. Общая методика. Фермент ($4 \cdot 10^{-3}$ —1 мг) инкубировали в 0,5—7 мл буферного раствора (рН 5,5—8,0), содержащего 10^{-3} — 10^{-1} М реагента при 25°. Через определенные промежутки времени (0—250 мин) отбирали аликвоты для установления активности фермента. Одновременно находили количество связанного ингибитора. Для этого пробы, содержащие ~ 0,5 мг фермента, лиофильно высушивали, обессоливали на колонке с сефадексом G-50, минерализовали в смеси 60% хлорной кислоты и 10 н. серной кислоты и определяли количество неорганического фосфата [11].

Исследование обратимости реакции. $4 \cdot 10^{-3}$ мг фермента инкубировали в 0,5 мл 10^{-2} М раствора N-хлорацетилфосфоэтанол-амина в 0,1 М имидазол-HCl-буфере (рН 6,6) при 25°. Через определенные промежутки времени отбирали пробы, разбавляли их в 500 раз 0,1 М имидазол-HCl-буфером (рН 6,6), выдерживали 1 ч при 25° и находили ферментативную активность. Одновременно ее определяли в аликвотах реакционной смеси до разбавления.

Для расчета констант скорости реакции на основании данных по изменению ферментативной активности при выдерживании с N-хлорацетилфосфоэтанол-амином строили графики зависимости остаточной активности в логарифмической шкале от времени. Суммарную константу скорости реакции рассчитывали по формуле $\operatorname{tg} \alpha = 0,454 (k_1 + k_2)$, где α — угол наклона первого прямолинейного участка. Константу скорости второй стадии определяли по формуле $\operatorname{tg} \beta = 0,434 k_2$ (β — угол наклона второго прямолинейного участка) (рис. 4). Реакцию проводили при концентрации фермента $1,2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл в присутствии 10^{-2} М ингибитора при 25°.

Реакция модифицированного фермента с гидроксил-амином. 1 мг фермента инкубировали в течение 80 мин при 25° в 7 мл 10^{-2} М раствора N-хлорацетилфосфоэтанол-амина в 0,1 М имидазол-HCl-буфере, рН 6,6. При этом степень инактивации достигла 67%, а количество включенного реагента — 1,4 моль/моль белка. Раствор лиофилизировали, растворяли в 0,6 мл воды, из которых 0,2 мл оставляли в качестве контроля, а к оставшимся 0,4 мл раствора добавляли 0,6 мл гидроксил-аминового реагента (рН 11), полученного смешиванием 2 М раствора солянокислого гидроксил-амина и 3 н. раствора едкого натра. Реакционную смесь выдерживали 14 ч при 4°. Контрольный и опытные растворы обессоливали на колонке с сефадексом G-50, лиофилизировали и определяли количество неорганического фосфата. Очо составило в опыте 0,36 и контроле 1,4 моль/моль белка.

Аминокислотный анализ нативной и модифицированной пиррофосфатазы. 1,2 мг фермента инактивировали на 80% введением 1,8 моль ингибитора на 1 моль белка. Раствор лиофильно высушивали, обессоливали с помощью сефадекса G-50 и гидролизovali 24 ч в 6 н. соляной кислоте при 110°. Аналогичной обработке подвергали контрольные образцы, содержащие 1 мг нативного фермента. Гидролизаты анализировали на аминокислотном анализаторе (Hitachi, Япония). Анализ был проведен для пяти независимых опытов. В опытных образцах было найдено 2,2 моль метионина и 5,6 моль гистидина на 1 моль белка, в контрольных образцах — соответственно 2,3 и 5,6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Склянкина В. А., Суранова Е. Д., Аваева С. М. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1352—1356.
2. Yano Y., Negi T., Irie M. (1973) *J. Biochem. (Tokyo)*, **74**, 67—76.
3. Cooperman S., Chiu N. Y. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1676—1682.
4. Heitmann P., Möllerke Ch., Unlig H. Y. (1972) *Acta biol. et med. Germ.*, **29**, 551—560.
5. Negi T., Samejima T., Irie M. (1972) *J. Biochem.*, **71**, 29—33.
6. Назарова Т. И., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 169—173.
7. Heinrichson R. L., Sterner R., Noges C., Cooperman B. S., Bruckmann R. H. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2521—2528.
8. Ковальчук О. В., Аваева С. М. (1974) *Химия природн. соедин.*, **3**, 389—395.
9. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) *Биохимия*, **38**, 344—350.
10. Baykov A. A., Awaeva S. M. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **32**, 136—142.

Получена в редакцию
11.1.1977

SPECIFIC MODIFICATION OF YEAST INORGANIC PYROPHOSPHATASE ACTIVE SITE BY N-CHLOROACETYLPHOSPHOETHANOLAMINE

AWAEVA S. M., DICKOV M. M., KUZNETSOV A. V.,
SKLYANKINA V. A.

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

Yeast inorganic pyrophosphatase was specifically and irreversibly inhibited by N-chloroacetylphosphoethanolamine. The reaction was shown to have a biphasic character: the first stage is a rapid and reversible binding of the reagent at the active site, while the second stage involves irreversible carboxymethylation of an essential protein group, presumably a carboxylic one, and leads to the complete loss of enzymatic activity.